استفاده از عصاره آنزیمی *لاکتوباسیلوس کازئی*، *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلوس اوریزا* جهت تولید پنیر اصلاح شده آنزیمی

مرضیه موسوی نسب [a]*، زهرا تحسیری [b]، سکینه منور [b]

[a] استاد بخش علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

[b] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، بخش علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۰۸/۰۹ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۰۵/۲۶

Archive of SID

چکیده

مقدمه: به دنبال تمایل مصرف‌کنندگان برای محصولات غذایی دارای عطر پنیر، تقاضای تولید طعم‌های پنیری نیز رو به افزایش می‌باشد. در حال حاضر اقتصادی‌ترین روش جهت تولید طعم‌های پنیری تولید پنیر اصلاح‌شده آنزیمی (EMC) می‌باشد. هدف از این تحقیق تولید عصاره آنزیمی *لاکتوباسیلوس کازئی*، *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلوس اوریزا* و اندازه‌گیری فعالیت پروتئینازی و لیپازی عصاره‌های آنزیمی تولید شده سپس بررسی اثر آن‌ها در تولید پنیر بود.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق جهت تولید آنزیم توسط آسپرژیلوس از روش تخمیر جامد استفاده گردید و برای تخریب سلول‌های *لاکتوباسیلوس کازئی* از لیزوزیم و *اولتراسوند* استفاده شد. به منظور تولید EMCs بعد از تولید دوغاب پنیر (Cheese slurry) عصاره آنزیمی *لاکتوباسیلوس کازئی* جهت تولید EMC1، ترکیبی از عصاره آنزیمی *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلوس اوریزا* جهت تولید EMC2 و مخلوطی از عصاره آنزیمی *لاکتوباسیلوس کازئی*، *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلوس اوریزا* جهت تولید EMC3 به آن اضافه گردید سپس به مدت ۴۸ ساعت در ۳۷°C گرمخانه‌گذاری شد و ارزیابی پروتئولیز و لیپولیز انجام شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که عصاره آنزیمی تولید شده توسط *لاکتوباسیلوس کازئی* ۸۰U/ml فعالیت پروتئازی و ۱۰۳U/ml فعالیت لیپازی داشت و عصاره‌های آنزیمی تولید شده بوسیله *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلوس اوریزا* به ترتیب ۲۴۰U/ml و ۱۵۵U/ml فعالیت لیپازی و پروتئازی داشتند. ارزیابی پروتئولیز در EMCs با روش اندازه‌گیری ازت محلول، ازت محلول در تری کلرواستیک اسید و اندازه‌گیری میزان اسیدهای آمینه آزاد و ارزیابی لیپولیز بوسیله GC و اندازه‌گیری عدد اسیدی انجام شد و مشاهده شد که بیشترین لیپولیز در EMC3 رخ داده است. بیشترین پذیرش کلی در ارزیابی حسی مربوط به EMC3 بود که تفاوت معنی داری با پنیر تجاری چدار نداشت.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان می‌دهد که ترکیب عصاره‌های آنزیمی *لاکتوباسیلوس کازئی*، *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلوس اوریزا* بیشترین تاثیر را بر پروتئولیز و لیپولیز دارد و می‌توان از این ترکیب در تولید پنیرهای اصلاح شده آنزیمی با طعم بیشتر و زمان رسیدگی کوتاهتر بهره برد.

واژه‌های کلیدی: *آسپرژیلوس اوریزا*، *آسپرژیلوس نایجر*، پنیر اصلاح شده آنزیمی، *لاکتوباسیلوس کازئی*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: marzieh.moosavi-nasab@mail.mcgill.ca

www.SID.ir

مقدمه

پنیر از جمله محصولات شیر و جزء جدانشدنی از سبد کالای خانواده‌ها در سراسر دنیا است که دارای ارزش غذایی بسیار بالایی می‌باشد. در تهیه پنیر همواره جنبه‌های حفظ ارزش تغذیه‌ای شیر همراه با عطر و طعم مطبوع و دلپذیر مورد نظر بوده، لذا هر چند زمان طولانی رساندن در برخی انواع پنیر به عنوان یک مزیت تلقی می‌شود با این حال مدت زمان طولانی بین تهیه پنیر و دست یابی به سود مالی آن برای کارخانه‌های پنیر سازی که نیاز به گردش مالی سریع و پوشاندن هزینه‌های مختلف تجهیزات و نیروی کاری دارند مناسب به نظر نمی‌رسد. از طرفی هر چه پنیر بیشتر در انبار بماند احتمال فساد آن بیشتر است. همچنین تقاضا برای محصولات دارای عطر و مزه پنیر روز به روز در حال افزایش است ولی استفاده از پنیرهای طبیعی در تولید مواد غذایی با مشکلاتی نظیر عدم تولید طعم لازم، افزایش چربی، افزایش هزینه تولید و افزایش قیمت نهایی محصول همراه می‌باشد. از طرفی افراد در مقایسه با محصولات و طعم دهنده‌هایی که از طریق شیمیایی سنتز می‌شوند تمایل دارند که از افزودنی‌هایی استفاده نمایند که بطور طبیعی و توسط میکروارگانیسم‌ها سنتز می‌شوند. امروزه به منظور تهیه پنیر اصلاح شده آنزیمی، آنزیم‌های تجاری پروتئیناز، پپتیداز و لیپاز را از منابع حیوانی و میکروبی استخراج می‌کنند. استخراج این آنزیم‌ها از گیاهان به دلیل هزینه و میزان ناخالصی بالا کمتر رایج است. آنزیم‌های تجاری به صورت مایع که حاوی آنزیم فعال شده در محلول‌های رقیق است، و یا به صورت پودرهایی که با ماده پرکننده [1] ترکیب شده است در تولسید پنیرهای اصلاح شده آنزیمی، بسته به نوع سوبسترا و عطر و طعم مورد انتظار در محصول نهایی پنیر، به کار می‌رود (Kilcawley *et al.*, 2012). این تحقیقات متعددی در مورد کاهش زمان دوره رسیدگی با طعم و آرومای منحصر به فرد به روش اضافه نمودن آنزیم صورت گرفته است که برخی از این روش‌ها باعث رساندن پنیر در یک دوره زمانی نرمال و مطلوب گردیده است (Wilkinson *et al.*, 1992). این نوع پنیر شدت طعمی تا ۳۰ برابر طعم پنیرهای طبیعی دارد و بصورت خمیری و پودری در دسترس می‌باشد (Moskowitz and Noelck, 1987). Lee و برخی محققین به بررسی اثر *Lactobacillus casei subsp-casei* در تولید پنیر پرداختند. نتایج نشان داد *Lactobacillus casei subsp-casei* به دلیل داشتن فعالیت‌های استرازی، پپتیدازی، پروتئینازی و لیپازی بسیار قوی، می‌تواند در تولید Enzyme modified cheese (EMC) به کار رود. مشکل اساسی در رابطه با کاربرد لاکتوباسیلوس‌ها در تولید پنیر تولید مقدار بالای اسید لاکتیک بود که منجر به تولید پنیر با کیفیت پایین از نظر طعمی می‌شد. این محققین به منظور مرتفع کردن این مشکل، استفاده از عصاره خام آنزیمی این میکرواورگانیسم-ها را پیشنهاد کردند (lee *et al.*, 1990). پنیرهای تقلیدی [2] به علت استفاده از مواد ارزان قیمت در تهیه آن‌ها کاربرد زیادی در آماده سازی غذا ها دارند، اما اغلب آن‌ها به دلیل داشتن چربی‌های گیاهی دارای طعم و مزه نامطلوب می-باشند. Noronha و عده‌ای از محققین از پنیر اصلاح شده آنزیمی جهت دادن عطر و طعم در این گونه پنیرها استفاده نمودند. در این تحقیق از پنیرهای تقلیدی با pH ۵/۵ و ۶ و EMCs با درجه لیپولیز متفاوت جهت ایجاد عطر و طعم در آن‌ها استفاده نمودند. نتایج نشان داد که پروفایل طعم در این نوع پنیرها علاوه بر اینکه به درجه لیپولیز و میزان اسیدهای چرب کوتاه زنجیر [3] تولید شده در EMCs بستگی داشت، همچنین pH پنیرهای تقلیدی در دریافت طعم توسط مصرف کننده به علت نقش آن در آزاد سازی طعم در این زمینه مؤثر بود (Noronha *et al.*, 2008). Wilkinson و همکاران بوسیله ترکیبی از آنزیم‌های پروتئولیتیک تجاری، محصولاتی با درجه پروتئولیز متفاوت از یک لخته خام و بدون طعم پنیر تولید کردند و سپس محصولاتی را که از لحاظ حسی مطلوبتر بودند جهت تولید EMC توسط لیپازهای مختلف میکروبی انتخاب نمودند و EMCs تولید شده را با انواع تجاری آن مورد مقایسه قرار دادند آن‌ها توانستند بوسیله یک سوبسترای ثابت و ترکیبی از آنزیم‌های مختلف محدوده‌ی وسیعی از انواع EMC را تولید نمایند و به این نتیجه رسیدند که با انتخاب دقیق آنزیم‌ها با فعالیت و ویژگی عمل مشخص، می‌توان انواع EMC با عطر و طعم منحصر به فرد تولید نمود (Wilkinson and Kilcawley, 2005). به‌طور کلی

[1] Filler
[2] Imitation Cheese
[3] Short Chain Fatty Acids

Archive of SID

www.SID.ir

هدف از انجام این پژوهش تولید EMC بوسیله تولید پنیر سنتی ایرانی و عصاره‌های آنزیمی *لاکتوباسیلوس کازئی*، *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلوس اوریزا* و بررسی خواص پروتئولیتکی و لیپولیتکی EMC تولیدی و مقایسه آن‌ها با پنیر تجاری چدار و پنیر تولیدی بود.

مواد و روش‌ها

- مواد مصرفی

آسپرژیلوس نایجر (PTCC5012)، *آسپرژیلوس اوریزا* (PTCC5163) و *لاکتوباسیلوس کازئی* (PTCC1608) از پژوهشکده بیوتکنولوژی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری شد. شیر خام با مشخصات فیزیکوشیمیایی مطلوب (pH ۶/۶ اسیدیته ۱۳درجه دورنیک، دانسیته ۱/۰۳۱ gr/cm^3، ماده خشک ۸/۱ ٪ w/w، چربی ۳/۸ ٪ w/w، بدون افزودن آب) و کازئین از کارخانه تولیدی فراورده‌های لبنی پگاه استان فارس تهیه شد، روغن زیتون از شرکت اتکا (رودبار – ایران) تهیه شد. نمک طعام تصفیه شده نیز از شرکت سپیددانه خریداری شد. آنزیم لیزوزیم از شرکت سیگما آلدریچ آمریکا، محیط کشت پلیت کانت آگار[1] و وایولت رد بایل آگار، هگزان، متانول، کلروفرم، پتاس، باکتوپپتون، منیزیم سولفات، کلرید پتاسیم، هیدروکسیدپتاسیم، تری کلرواستیک‌اسید، همچنین کلرید سدیم، تری سدیم سیترات، تری سدیم فسفات و دی هیدروژن سدیم فسفات برای تولید دوغاب پنیر با خلوص بالا از شرکت مرک آلمان تهیه شد. پنیر چدار تجاری با گذراندن زمان رسیدن ۴۵ روز و آماده عرضه به بازار از یک کارگاه لبنی واقع در آذربایجان شرقی (ایران) تهیه شد.

- روش‌ها

- تولید آنزیم لیپاز توسط *آسپرژیلوس نایجر*

کشت *آسپرژیلوس نایجر* بر روی آبگوشت مغذی و سپس بر روی محیط PDA (potato dextrose agar) به مدت ۷ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. بعد از اسپورزایی، اسپورها در آب مقطر استریل به حالت تعلیق درآمدند و سوسپانسونی حاوی 10^8/ml اسپور بوسیله تکنیک لوی چمبر[2] تهیه گردید (Sandhya *et al.*, 2005). همچنین محلول مواد معدنی حاوی ۰/۰۵ ٪ نیترات سدیم، ۰/۱ ٪ عصاره مخمر، ۰/۵ ٪ باکتوپپتون، ۰/۲ ٪ دی هیدروژن پتاسیم فسفات، ۰/۰۵ ٪ منیزیم سولفات و ۰/۰۵ ٪ کلرید پتاسیم به طور جداگانه آماده گردید (Mahadik *et al.*, 2002). **برای** تولید لیپاز بوسیله *آسپرژیلوس نایجر*، ۱۰ گرم سبوس گندم در ارلن‌های ml ۵۰۰ ریخته و با محلول مواد معدنی تهیه شده، مرطوب گردید و سپس اتوکلاو (مدل ۲۱۰۰، شرکت پریستیژ، ساخت انگلستان)، و سرد شد. و از آن‌ها جهت تولید آنزیم و بررسی فاکتورهای فرآیند جهت بهینه کردن شرایط تولید آنزیم استفاده گردید. به منظور بررسی تأثیر هر یک از فاکتورهای فرآیند در تولید آنزیم بعد از تهیه محیط کشت مناسب، تلقیح مایه میکروبی انجام شد. پس از رشد کپک‌ها و تولید آنزیم، آب مقطر استریل (۱:۲/۵ w/w) به محیط‌های کشت اضافه شد و به مدت ۴۵ دقیقه در تکان دهنده (مدل SH02، ساخت ایران)، گذاشته شد. سپس برای جداسازی توده کپک و سبوس گندم، محتویات محیط‌کشت بوسیله کاغذ واتمن شماره ۱ صاف گردید و سپس برای جداسازی باقیمانده سلول‌ها و سایر اجزای محیط کشت از بخش آنزیمی و پروتئینی از سانتریفوژ یخچال‌دار (SORVALL RC2- B، ساخت آمریکا)، (۱۰۰۰۰×g ,۴°C ,۱۵min) استفاده گردید (Sandhya *et al.*, 2005).

- آزمایش کیفی به منظور تأیید تولید لیپاز توسط *آسپرژیلوس نایجر*

برای پی بردن به توانایی تولید لیپاز توسط کپک *آسپرژیلوس نایجر* از محیط Yolk egg agar استفاده گردید. بعد از تلقیح اسپورها بر روی این محیط کشت و گرمخانه‌گذاری (انکوباتور مدل PIT053R، شرکت پا ایدهآل آزما، ساخت ایران) به مدت ۴ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد با مشاهده هاله اطراف میکروارگانیسم فعالیت لیپازی این میکروارگانیسم بررسی و تأیید شد (Hasan *et al.*, 2009). برای رشد بهتر قارچ محلولی از مواد معدنی و مغذی

- تولید آنزیم پروتئاز توسط *آسپرژیلوس اوریزا*

[1] Plate Count Agar

[2] Levy Chamber

Archive of SID

www.SID.ir

این مرحله از آزمایش مطابق روش به کار رفته بـرای تولید آنزیم لیپاز توسط *آسپرژیلوس نایجر* انجام گردید.

- آزمایش کیفی به منظور تأیید تولید پروتئاز توسط *آسپرژیلوس اوریزا*

به منظور پی بردن به توانایی تولید پروتئاز توسط میکروارگانیسم مورد نظر از محیط skim milk agar حاوی ۲ ٪ کازئین، ۰/۵ ٪ گلیسرول، ۰/۳ ٪ عصاره مخمر، ۰/۵ ٪ کلرید سدیم و ۲ ٪ آگار استفاده گردید. بعد از تلقیح اسپورها بر روی محیط‌کشت حاوی مواد فوق و گرمخانه-گذاری به مدت سه روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد با مشاهده هاله اطراف میکروارگانیسم فعالیت پروتئازی این میکروارگانیسم بررسی و تأیید شد. به منظور مشاهده بهتر این هاله‌ها پلیت‌ها با کوماسی بلو رنگ آمیزی شدند (Sandhya *et al*., 2005).

- تخمیر به روش جامد به منظور تولید لیپاز بوسیله *آسپرژیلوس اوریزا*

این مرحله از آزمایش مطابق روش تخمیر به روش جامد به منظور تولید لیپاز بوسیله *آسپرژیلوس نایجر* انجام گردید.

- تهیه عصاره آنزیمی *لاکتوباسیلوس کازئی*

از آن‌جا که *لاکتوباسیلوس کازئی* آنزیم را بصورت درون سلولی و طی فاز لگاریتمی رشد تولید می‌نماید، پس از فعال‌سازی میکروارگانیسم طی دو بار کشت متوالی در MRS broth، جهت تولید آنزیم به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در ۸۰۰ میلی لیتر MRS broth رشد داده‌شد. پس از برداشت سلول‌ها بوسیله سانتریفوژ (۱۵min ,۴°C ,۵۰۰۰×g) و شستشوی آن‌ها طی دو مرحله بوسیله بافر سدیم فسفات نیم مولار (pH,۷)، سوسپانسیونی از سلول‌ها در بافر مشابهی تهیه شد. جهت خارج کردن آنزیم‌ها سلول‌ها بوسیله آنزیم لیزوزیم (۵ میلی لیتر سوسپانسیون/۳میلی گرم) و نیز دستگاه *اولتراسوند* (۵ دقیقه با فواصل زمانی ۳۰ ثانیه، شدت ۶۰٪ فرکانس ۲۰ مگا هرتز) تخریب شدند. مجددا بوسیله سانتریفوژ (min ۱۵ ,۴°C ,۱۰۰۰۰×g) عصاره حاوی آنزیم جداسازی شد (LEE and LEE, 1990).

- تولید پنیر

برای تولید پنیر ابتدا شیر مورد نظر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بمدت ۱۵ ثانیه پاستوریزه شد سپس تا دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد خنک گردید. در این مرحله مایه کشت آغازگر با نام تجاری CHOOZIT DVI lactic cultures (شرکت دنیسکو، کشور انگلستان) شامل *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris, Lactococcus lactis* subsp.*lactis Streptococcus thermophilus* و *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* به مقدار ۲٪ وزنی به آن اضافه شد و بخوبی مخلوط شده و به مدت ۵۵ دقیقه در این دما نگهداری گردید تا فرصت کافی برای فعالیت آغازگرها قبل از افزودن رنت فراهم شود. سپس کلریدکلسیم به میزان ۱۵ گرم در ۱۰۰ لیتر به شیر اضافه شد. بعد از آن مایه پنیر با نام تجاری CHOOZIT FLAV (شرکت دنیسکو، کشور انگلستان) به مقدار ۱گرم در ۱۰۰ لیتر استفاده گردید، بعد از بهم زدن، مخلوط فوق به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد به حال خود گذاشته شد تا دلمه تشکیل شود. بمنظور خروج آب بدام افتاده در لخته پنیر، بوسیله چاقوی سترون برش‌هایی به شکل طولی و عرضی در لخته ایجاد شد پس از جدا کردن آب پنیر از لخته، لخته حاصل درون یک پارچه مشبک تمیز قرار داده‌شد و تحت پرس به مدت ۱۲ ساعت قرار گرفت. لخته پرس شده توسط چاقوی سترون برش داده‌شد و در آب نمک ۲۰ درصد به مدت ۱۶ ساعت و متعاقبا در آب نمک۱۰ درصد در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ روز قرار گرفت. آب نمک مصرفی از قبل در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد و پس از خنک شدن از آن استفاده گردید (Farahnoodi, 1998).

- تهیه دوغاب پنیر به منظور تولید EMC1، EMC2 و EMC3

جهت تهیه cheese slurry ابتدا مواد (پنیر سنتی ایرانی تولیدی ۶۵ ٪، آب مقطر استریل جهت تولید EMC1 و EMC2 ۲۰ ٪ و جهت تولید EMC3 ۱۰ ٪، کلرید سدیم ۰/۲ ٪، تری سدیم سیترات ۰/۴۲ ٪، تری سدیم فسفات ۰/۵ ٪، دی هیدروژن سدیم فسفات ۰/۸ ٪) با هم ترکیب شد. سپس توسط هموژنایزر (ساخت شرکت مخازن استیل غرب، ایران) در فشار ۱۵۰ MPa بطور کامل یکنواخت گردید و در داخل ظروف درب‌دار شیشه‌ای ریخته

Archive of SID

www.SID.ir

شد و در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه حرارت داده شد. مخلوط حاصل تا دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد جهت افزودن عصاره‌های آنزیمی سرد شد (Wilkinson and Kilcawley, 2005).

- تهیه پنیر اصلاح شده آنزیمی بوسیله عصاره خام *لاکتوباسیلوس کازئی* (EMC1)

به میزان ۱۰٪ عصاره‌ی آنزیمی *لاکتوباسیلوس کازئی* که معادل ۸۰ U/ml فعالیت پروتئازی و ۱۰۳ U/ml فعالیت لیپازی بود، به مخلوط cheese slurry تهیه شده افزوده گردید و بعد از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری، جهت غیر فعال نمودن آنزیم‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. به میزان ۱۰ گرم از EMC های تولیدی تحت شرایط اسپتیک (زیر هود و کنار شعله) در فالکون‌های درب دار ۵۰ میلی لیتری استریل ریخته شد. و جهت انجام آزمایشات در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه داری گردیدند. به منظور اندازه‌گیری فعالیت لیپازی مخلوط واکنش بوسیله اضافه نمودن ۳ میلی لیتر محلول سوبسترا (امولسیونی از ۱۰٪ روغن زیتون و ۱۰٪ صمغ عربی که به مدت ۱۰ دقیقه بوسیله هموژنایزر بخوبی همگن شد)، ۱ میلی‌لیتر بافر تریس (۰/۵ مولار با pH = ۷)، ۲/۵ میلی لیتر آب مقطر و ۱ میلی لیتر عصاره حاوی آنزیم تهیه گردید سپس جهت انجام واکنش آنزیمی، مخلوط فوق۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم لرزاننده قرار گرفت. واکنش توسط اضافه نمودن ۱۰ میلی‌لیتر اتانول متوقف گردید و میزان اسیدهای چرب آزاد شده توسط تیتراسیون با KOH ۰/۰۵ نرمال در حضور فنل فتالئین اندازه¬گیری شد. نمونه کنترل به همین ترتیب ولی بدون اضافه نمودن عصاره آنزیمی تهیه گردید. یک واحد فعالیت لیپازی برابر با مقدار آنزیمی است که یک میکرومول اسید چرب را تحت شرایط آزمایش (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، مدت زمان ۲ ساعت و pH = ۷/۵) آزاد می‌نماید. در نهایت فعالیت آنزیم لیپاز بر اساس رابطه (۱) زیر محاسبه گردید (Nehad *et al.*, 2009).

رابطه (۱)

$$U/ml = \frac{\text{میکرومول اسید چرب تولید شده}}{\text{یک میلی لیتر محلول حاوی آنزیم}}$$

همچنین به منظور آزمایش کمی جهت بررسی فعالیت پروتئاز، به ۵۰ میکرولیتر از عصاره حاوی آنزیم ۵۰۰ میکرولیتر کازئین (۱٪)، اضافه گردید، سپس جهت انجام واکنش گرمخانه‌گذاری (۵۰ °C، ۳۰min) صورت گرفت. واکنش آنزیمی بوسیله اضافه کردن ۵۰۰ میکرولیتر تری کلرو استیک اسید متوقف گردید، مخلوط حاصل سانتریفوژ (۱۵min, ۴°C, ۱۰۰۰۰×g) و سپس جذب محلول رویی در طول موج ۲۸۰nm جهت بدست آوردن فعالیت آنزیم قرائت گردید. یک واحد فعالیت پروتئازی برابر با مقدار آنزیمی است که یک میکرومول محصول (فنیل آلانین) تحت شرایط آزمایش تولید می‌نماید. (Lee, 1990).

- تهیه پنیر اصلاح شده آنزیمی بوسیله عصاره خام *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلوس اوریزا* (EMC2)

به میزان ۵٪ عصاره آنزیمی *آسپرژیلوس اوریزا* و ۵٪ عصاره آنزیمی *آسپرژیلوس نایجر* که به ترتیب معادل ۱۵۵ IU/ml فعالیت پروتئازی و ۲۴۰ U/ml فعالیت لیپازی بودند، به مخلوط cheese slurry تهیه شده افزوده گردید. بعد از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری، جهت غیر فعال نمودن آنزیم‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. به میزان ۱۰ گرم از EMC های تولیدی تحت شرایط اسپتیک در فالکون‌های درب دار ۵۰ میلی لیتری استریل ریخته شد. و جهت انجام آزمایشات در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه داری شدند.

- تهیه پنیر اصلاح شده آنزیمی بوسیله عصاره خام *لاکتوباسیلوس کازئی*، *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلوس اوریزا* (EMC3)

به میزان ۵٪ عصاره‌ی آنزیمی *آسپرژیلوس اوریزا* و ۵٪ عصاره آنزیمی *آسپرژیلوس نایجر* و ۱۰٪ عصاره‌ی آنزیمی *لاکتوباسیلوس کازئی*، به مخلوط cheese slurry تهیه شده افزوده شد. و بعد از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری، جهت غیر فعال نمودن آنزیم‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. به میزان ۱۰ گرم از EMC های تولیدی تحت شرایط اسپتیک در فالکون‌های درب‌دار ۵۰ میلی لیتری استریل ریخته شد و جهت انجام آزمایشات در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه داری شدند.

Archive of SID
www.SID.ir

- اندازه‌گیری ازت محلول در pH ٤/٦

اندازه‌گیری ازت محلول در pH ۴/۶ بـه روش Fox و Kuchroo ۶ روز بعد از تولید پنیر انجام شد (Kuchroo and Fox, 1982).

- اندازه‌گیری ازت غیر پروتئینی (NPN) (ازت محلول در تری کلرو استیک اسید)

اندازه‌گیری ازت غیر پروتئینی (NPN) (ازت محلول در تری کلرو استیک اسید) ۶ روز بعد از تولید پنیـر بـه روش Fox و Kuchroo انجـام شـد (Kuchroo and Fox, 1982).

- اندازه‌گیری میزان اسید آمینه‌های آزاد کل

اندازه‌گیری میزان اسید آمینه‌های آزاد کل ۶ روز بعد از تولیـد پنیـر بـه روش Folkertsma وFox انجـام شـد (Folkertsma and Fox, 1992).

- انـدازه‌گیـری عـدد اسـیدی Acid degree value (ADV)

اندازه‌گیری عدد اسـیدی طبـق روش AOAC ۶ روز بعد از تولید پنیر انجام شد (AOAC, 2002).

_ اندازه‌گیری اسیدهای چرب بوسیله کروماتوگرافی گازی

به منظور استخراج چربی جهت انجام آزمایش GC ابتدا ۱۰گرم نمونه، ۶ روز بعد از تولید پنیر بوسیله حلال کلروفرم و متانول با نسبت حجمی (۵۰ :۵۰) مخلوط گردید، سپس با دور ۴۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید در ادامه در دستگاه روتاری (مدل R-3, BUCHI, شرکت فلاویل، کشور سوئیس) حلال آن تبخیر شد و آنچه باقی ماند چربی بود. سپس ۰/۱ گرم چربی استخراج شده با ۵ میلی لیتر هگزان و ۰/۲ میلی لیتر پتاس متانولی (۱۱/۲ گرم پتاس و ۱۰۰ میلی لیتر متانول) به مدت ۱ دقیقه به‌خوبی مخلوط گردید و از فاز بالایی آن جهت تزریق به دستگاه (دستگاه کروماتوگرافی گازی، مدل 17Appf- Ver 3، ساخت SHIMADZU ژاپن) و اندازه‌گیری اسیدهای چرب استفاده گردید. ۰/۵ میکرولیتر نمونه توسط سرنگ همیلتون به دستگاه تزریق شد. دمای اولیه ستون ۱۷۰ درجه سانتی-گراد، دمای قسمت تزریق کننده ۲۱۰ درجه سانتی‌گراد و دمای آشکار ساز ۲۳۰ درجه سانتی‌گراد بود. شرایط دمایی دستگاه به این صورت بود که در ۱۷۰ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه بماند و با سرعت ۵ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه به دمای ۱۹۰ درجه سانتی‌گراد برسد و ۱ دقیقه در این دما بماند و سپس با سرعت ۱/۵ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه به ۲۱۵ درجه سانتی‌گراد برود و حدود ۱۰ دقیقه در این دما بماند که کل زمان لازم ۳۳ دقیقه بود (Karali *et al.*, 2013).

- آزمون حسی

ارزیابی حسی با استفاده از آزمون چشایی به روش هدونیک ۵ امتیازی (۱ خیلی بد، ۵ خیلی خوب) انجام شد نمونه‌های پنیر اصلاح شده آنزیمی، نمونه کنترل و پنیر چدار تجاری توسط ۱۵ نفر از دانشجویان تحصیلات تکمیلی رشته‌ی علوم و صنایع غذایی دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه شیراز ارزیابی شد. تمامی نمونه‌های پنیر به روش تصادفی کدبندی شدند. شرایط سنجش برای ارزیاب‌های حسی کاملاً یکسان بود و برای افزایش دقت، از ارزیاب‌ها خواسته شد بین هر دو نمونه آب معدنی بنوشند. نمونه‌های مکعبی ۱۰ گرمی در اختیار ارزیاب‌ها قرار گرفت و آن‌ها هر سه پنیر اصلاح شده آنزیمی، نمونه کنترل و پنیر چدار تجاری را از لحاظ وضعیت‌ظاهری، طعم، عطروبو، بافت و پذیرش کلی ارزیابی کردند.

- تجزیه و تحلیل آماری

در این پژوهش از طرح کاملا تصادفی با سـه تکـرار در قالب فاکتوریل استفاده شد و از آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای مقایسه میانگین در سـطح ۵ ٪ اسـتفاده شـد. آنـالیز واریانس داده‌ها و رسم نمودارها بـا اسـتفاده از نـرم افـزار SPSS 16 و Excel 2013 انجام شد.

یافته‌ها

تایید قدرت پروتئولیتیکی و لیپازی میکروارگانیسم های *آسپرژیلوس اوریزا* و *آسپرژیلوس نایجر* از طریق کشت در محیط‌های کشت حاوی پروتئین و لیپد آن‌ها انجام شد و نتایج آن در شکل‌های ۱ و ۲ ارائه شده است. سپس ارزیابی روند هیدرولیز پروتئین‌ها و لیپیدها در محصولات EMC1، EMC1، EMC1 و نمونه کنترل با استفاده از بررسی

Archive of SID

www.SID.ir

نسبت ازت محلول به ازت کل در pH ۴/۶ (شکل ۳)، ازت غیر پروتئینی به ازت کل، آمینواسید آزاد و اندیس اسیدی نیز اندازه‌گیری شد و نتایج آن به ترتیب در شکل‌های ۳، ۴، ۵ و ۶ مشاهده می‌شود و نتایج آن با پنیر چدار به عنوان پنیر سنتی که زمان رسیدن و عطر و طعم دار شدن آن طولانی است و از لحاظ عطر و طعم حائز اهمیت است مقایسه گردید و تاثیر عصاره‌های آنزیمی در سرعت رسیدگی و عطر و طعم‌دار کردن پنیر مشاهده شد.

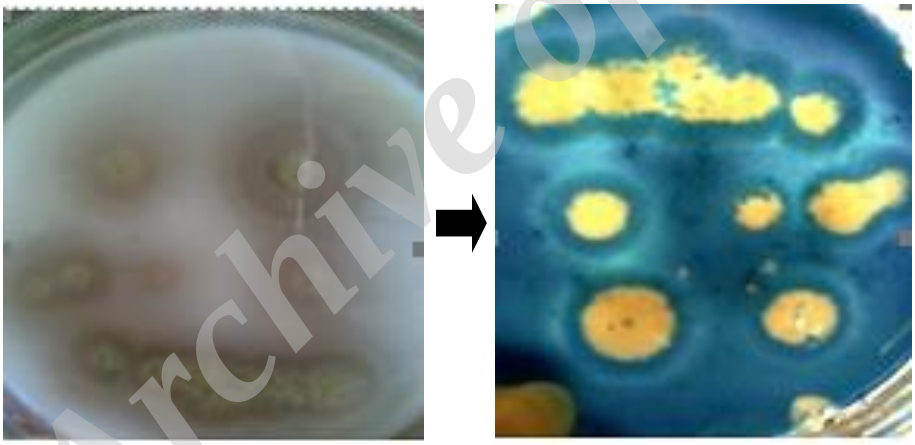
همان‌گونه که در شکل ۱ مشاهده می‌شود در اطراف پرگنه‌ها قدرت پروتئولیتیکی قدرت میکروارگانیسم تایید گردید. همچنین قدرت لیپولیتیکی آسپرژیلوس نایجر با مشاهده هاله در در اطراف پرگنه‌ها موجود در محیط کشت (شکل ۲) تایید کننده قدرت لیپولیتیکی این میکروارگانیسم است.

در ارزیابی مقادیر WSN/TN که شاخص پروتئولیز و فاکتوری برای ارزیابی رسیدن پنیر محسوب می‌شود، مشاهده شد که با افزودن آنزیم به پنیرها مقدار WSN/TN افزایش یافته و بیشترین مقدار آن در EMC3 مشاهده شد که ترکیبی از عصاره‌های آنزیمی هر سه نوع میکرو اورگانیسم است.

از آنجایی که مقادیر NPN/TN نشان‌دهنده ازت غیرپروتئینی است، همانطور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود افزودن عصاره آنزیمی با افزایش میزان پروتئولیز ارتباط خطی مثبت وجود دارد.

شکل ۵ نیز حاکی از افزایش میزان اسیدهای آمینه آزاد با افزودن عصاره‌های آنزیمی می‌باشد که این گزینه هم خود تایید کننده تاثیر افزودن عصاره آنزیمی به ویژه به صورت ترکیبی بر افزایش سرعت رسیدگی پنیر است.

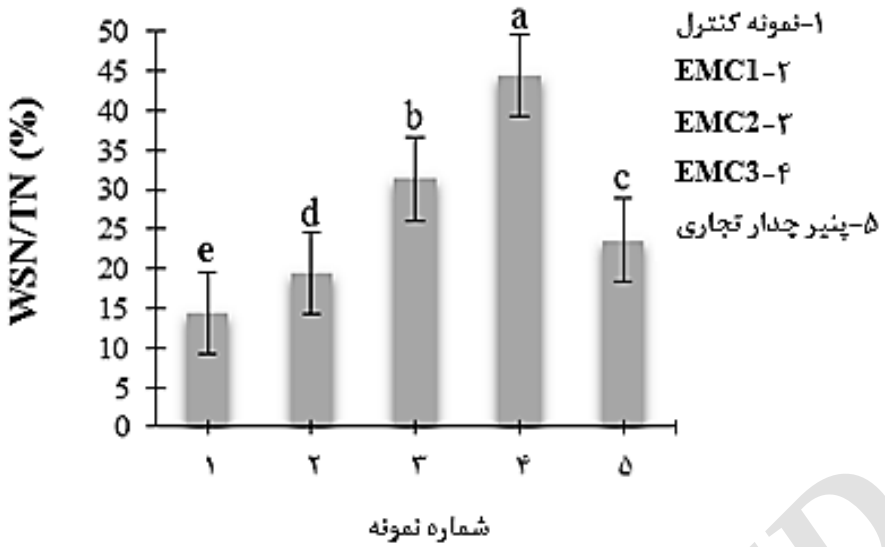
همان‌طور که در شکل ۶ مشاهده می‌شود اثر همزمان هر سه عصاره آنزیمی بیشترین تاثیر را بر لیپولیز دارد.



شکل ۱- تشکیل هاله اطراف کلونی *آسپرژیلوس اوریزا* به دلیل تولید پروتئاز و هیدرولیز پروتئین

شکل ۲- تشکیل هاله اطراف کلونی *آسپرژیلوس نایجر* به دلیل تولید لیپاز و هیدرولیز چربی

Archive of SID
www.SID.ir

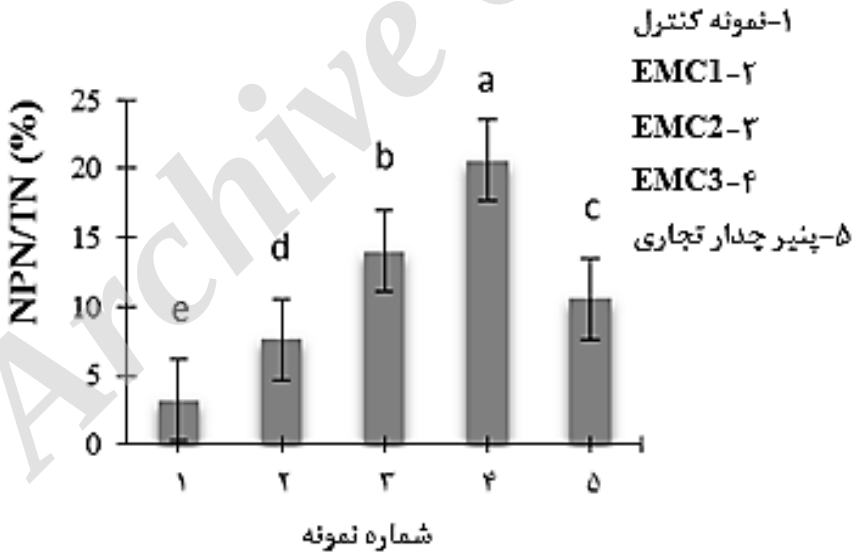


شکل ۳- مقایسه نسبت ازت محلول به ازت کل در pH ٤/٦ در EMCها با پنیر تجاری چدار و پنیر تولیدی (حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین نمونه‌ها در سطح ۵ درصد است)

EMC1: دوغ‌آب پنیر تیمار شده با عصاره لاکتوباسیلوس کازئی

EMC2: دوغ‌آب پنیر تیمار شده با عصاره آسپرژیلوس ارزیرا و آسپرژیلوس نایجر

EMC3: دوغ‌آب پنیر تیمار شده با عصاره آسپرژیلوس ارزیرا، آسپرژیلوس نایجر وعصاره لاکتوباسیلوس کازئی



شکل ٤- مقایسه نسبت ازت غیرپروتئینی محلول در استیک اسید به ازت کل در EMCها با پنیر تجاری چدار و پنیر تولیدی (حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین نمونه‌ها در سطح ۵ درصد است)

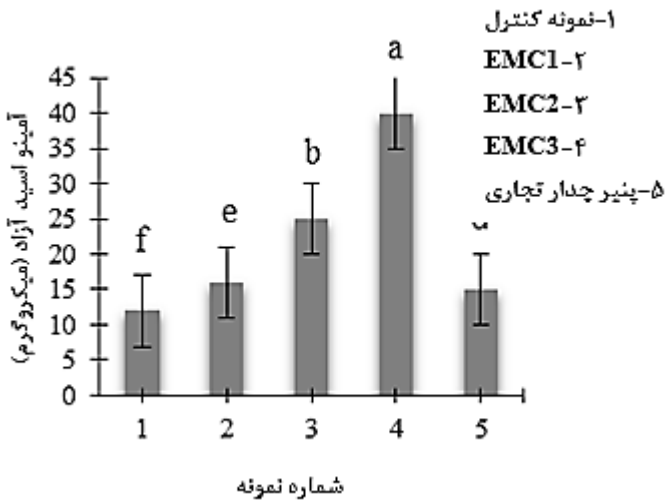
EMC1: دوغ‌آب پنیر تیمار شده با عصاره لاکتوباسیلوس کازئی

EMC2: دوغ‌آب پنیر تیمار شده با عصاره آسپرژیلوس ارزیرا و آسپرژیلوس نایجر

EMC3: دوغ‌آب پنیر تیمار شده با عصاره آسپرژیلوس ارزیرا، آسپرژیلوس نایجر وعصاره لاکتوباسیلوس کازئی

Archive of SID

www.SID.ir

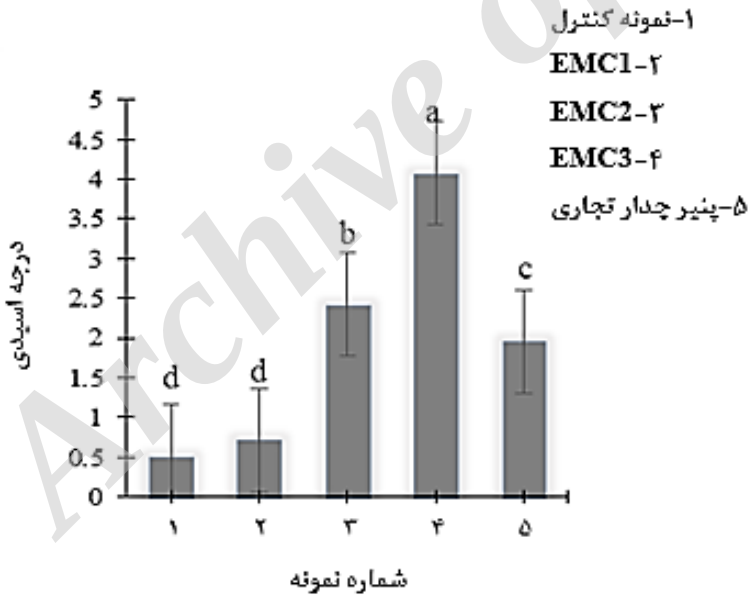


شکل ۵- مقایسه میزان آمینواسیدهای آزاد در EMCها با پنیر تجاری چدار و پنیر تولیدی (حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین نمونه‌ها در سطح ۵ درصد است)

EMC1: دوغ‌آب پنیر تیمار شده با عصاره لاکتوباسیلوس کازئی

EMC2: دوغ‌آب پنیر تیمار شده با عصاره آسپرژیلوس ارزیرا و آسپرژیلوس نایجر

EMC3: دوغ‌آب پنیر تیمار شده با عصاره آسپرژیلوس ارزیرا، آسپرژیلوس نایجر وعصاره لاکتوباسیلوس کازئی



شکل ٦- مقایسه میزان درجه‌ی اسیدی EMCها با پنیر تجاری چدار و پنیر تولیدی (حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین نمونه‌ها در سطح ۵ درصد است) (حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین نمونه‌ها در سطح ۵ درصد است)

EMC1: دوغ‌آب پنیر تیمار شده با عصاره لاکتوباسیلوس کازئی

EMC2: دوغ‌آب پنیر تیمار شده با عصاره آسپرژیلوس ارزیرا و آسپرژیلوس نایجر

EMC3: دوغ‌آب پنیر تیمار شده با عصاره آسپرژیلوس ارزیرا، آسپرژیلوس نایجر وعصاره لاکتوباسیلوس کازئی

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱-درصد وزنی اسیدهای چرب نمونه کنترل، EMC1، EMC2، EMC3 و پنیر تجاری چدار

شماره پیک	اسید چرب	نمونه کنترل	EMC1	EMC2	EMC3	پنیر تجاری چدار
۱	C4	۴/۶۰±۰/۲۲^{d}	۸/۵۴±۰/۰۳^{a}	۹/۲۴±۰/۳۱^{b}	۱۰/۱۲±۰/۰۴^{c}	۸/۵۱±۱/۱۱^{a}
۲	C6	۳/۵۶±۰/۲۲^{a}	۶/۹۷±۰/۲۳^{b}	۸/۴۶±۰/۲۶^{c}	۸/۴۷±۰/۱۱^{c}	۶/۹۰±۰/۵^{b}
۳	C8	۲/۸۴±۰/۱۹^{a}	۵/۲۷±۰/۲۷^{b}	۶/۱۳±۰/۴۱^{c}	۶/۲۸±۰/۱۳^{c}	۵/۱۴±۰/۵۶^{b}
۴	C10	۴/۲۰±۰/۰۸^{a}	۸/۲۱±۰/۲۴^{c}	۹/۴۴±۰/۵۵^{d}	۹/۷۰±۰/۷۰^{e}	۷/۸۴±۰/۰۹^{b}
۵	C12	۴/۱۴±۰/۱۶^{a}	۶/۲۲±۰/۳۰^{b}	۷/۴۴±۰/۳۵^{c}	۷/۲۴±۱/۰۱^{c}	۵/۸۱±۰/۲۴^{b}
۶	C14	۱۱/۲۴±۰/۴۹^{a}	۱۷/۴۰±۰/۲۱^{d}	۱۹/۵۵±۰/۵۰^{c}	۲۰/۲۷±۰/۱۸^{c}	۱۵/۴۱±۰/۴۰^{b}
۷	C16	۱۷/۱۳±۱/۰۵^{c}	۲۳/۱۱±۰/۲۰^{b}	۳۵/۴۱±۰/۷۹^{d}	۳۵/۶۰±۰/۹۱^{d}	۲۷/۴۲±۰/۴۲^{a}
۹	C18	۱۰/۵۹±۰/۳۰^{b}	۱۶/۱۱±۰/۱۳^{c}	۱۸/۰۵±۰/۱۶^{d}	۱۹/۲۹±۰/۳۸^{e}	۸/۱۰±۰/۱۵^{a}
۱۰	C18:1	۱۴/۲۱±۰/۲۲^{c}	۱۷/۰۹±۰/۱۰^{b}	۲۳/۵۶±۰/۵۱^{d}	۲۸/۷۳±۰/۷۷^{e}	۱۹/۲۸±۰/۳۰^{a}
۱۱	C18:2	۰/۸۴±۰/۶۷^{b}	۲/۰۹±۰/۱۱^{ab}	۳/۱۷±۰/۲۲^{c}	۳/۹۳±۰/۲۶^{d}	۱/۸۳±۰/۱۷^{a}

* اعداد میانگین سه تکرار بوده و بصورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است.

** حروف مخالف در هر ردیف نشان دهنده معنی دار بودن اختلاف در سطح ۵٪ می‌باشد.

جدول ۲-نتایج ارزیابی حسی نمونه کنترل، EMC1، EMC2، EMC3 و پنیر تجاری چدار *

نمونه پنیر	وضعیت ظاهری	طعم	عطر و بو	بافت	پذیرش کلی
کنترل	۲/۰۰±۰/۶۵^{b}	۱/۴۶±۰/۵۲^{c}	۱/۷۳±۰/۷۳^{d}	۱/۲۷±۰/۴۵^{d}	۱/۴۰±۰/۵۰^{c}
EMC_1	۲/۴۰±۰/۹۱^{b}	۱/۷۳±۰/۷۱^{c}	۲/۶۰±۰/۷۵^{c}	۲/۳۰±۰/۷۰^{c}	۱/۶۷±۰/۶۱^{c}
EMC_2	۳/۸۰±۰/۷۷^{a}	۳/۰۰±۰/۶۵^{b}	۲/۷۳±۰/۷۰^{b}	۲/۸۰±۰/۶۷^{b}	۲/۳۳±۰/۴۸^{b}
EMC_3	۴/۲۶±۰/۵۹^{a}	۴/۴۰±۰/۵۰^{a}	۳/۴۶±۰/۶۱^{a}	۴/۴۷±۰/۶۴^{a}	۳/۸۰±۰/۵۶^{a}
پنیر چدار تجاری	۳/۷۳±۰/۵۹^{a}	۳/۲۰±۱/۸۶^{b}	۳/۰۰±۰/۶۵^{ab}	۴/۲۰±۰/۶۷^{a}	۳/۲۰±۰/۶۷^{a}

* اعداد درون جدول به صورت (انحراف استاندارد ± میانگین) می باشد. حروف کوچک متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار می‌باشد ($p< ۰/۰۵$).

EMC_1: دوغ‌آب پنیر تیمار شده با عصاره *لاکتوباسیلوس کازئی*

EMC_2: دوغ‌آب پنیر تیمار شده با عصاره *آسپرژیلوس ارزیرا* و *آسپرژیلوس نایجر*

EMC_3: دوغ‌آب پنیر تیمار شده با عصاره *آسپرژیلوس ارزیرا*، *آسپرژیلوس نایجر* وعصاره *لاکتوباسیلوس کازئی*

درصد اسیدهای چرب در EMC1، EMC2، EMC3 در مقایسه با پنیر تجاری چدار و نمونه کنترل در جدول ۱ آمده است. به طور کلی میزان تمام اسیدهای چرب در نمونه‌های تیمار شده بوسیله افزودن عصاره‌های آنزیمی افزایش معنا داری داشته‌است.

نتایج حاصل از آنالیز واریانس مربوط به داده‌های آزمون

Archive of SID

www.SID.ir

حسی در جدول ۲ آورده شده است. بررسی پذیرش کلی نشان داد که بیشترین پذیرش کلی مربوط به نمونه EMC_3 است و این نمونه تفاوت معناداری با نمونه‌های EMC_1، EMC_2 و نمونه کنترل دارد در حالی‌که با پنیر تجاری چدار تفاوت معنی ندارد.

بحث

- تایید قدرت پروتئولیتیکی و لیپازی

همانگونه که در شکل ۱ مشاهده می‌گردد بعد از رشد میکروارگانیسم در محیط skim milk agar با مشاهده هاله ناشی از هیدرولیز پروتئین‌های موجود در محیط کشت در اطراف پرگنه‌ها قدرت پروتئولیتکی میکروارگانیسم تأیید گردید. Sandhya و همکاران (۲۰۰۵) نیز از این روش جهت ارزیابی قدرت پروتئولیتکی چندین سویه از آسپرژیلوس استفاده نمودند. همچنین بعد از فعال‌سازی میکروارگانیسم *آسپرژیلوس نایجر* و رشد آن در محیط yolk egg agar با مشاهده هاله ناشی از هیدرولیز لیپیدهای موجود در محیط کشت در اطراف پرگنه‌ها (شکل ۲) قدرت لیپولیتیکی میکروارگانیسم تأیید گردید.

- ارزیابی روند پروتئولیز و لیپولیز در محصولات تولید شده

- نسبت ازت محلول به ازت کل (SN/TN) در ٤/٦ pH

پروتئولیز در پنیر به دو مرحله اولیه و ثانویه تقسیم می‌شود. برای ارزیابی پروتئولیز ثانویه طی رسیدن پنیر، مقادیر NPN و SN اندازه‌گیری می‌شود. همانگونه که در شکل ۳ مشاهده می‌گردد، نسبت ازت محلول در pH۴/۶ به ازت کل (شاخص پروتئولیز و فاکتور رسیدن) در هر سه نوع پنیر آنزیم زده شده با عصاره‌های مختلف افزایش یافت و EMC3 بیشترین میزان نسبت SN/TN داشت و بین تیمارها از نظر درصد ازت محلول به ازت کل اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۵ درصد وجود دارد. علت اصلی این امر تجزیه قسمت عمده مواد پروتئینی از شکل غیر محلول به شکل محلول (واحدهای کوچک‌تر) می‌باشد (Mendia *et al.*, 2000). در تحقیقاتی مشابه در این زمینه، Azarnia و همکاران (۲۰۱۰) پروتئولیز را در EMC، بوسیله عصاره آنزیمی حاصل از *Lactobacillus rhamnosus S93*، آمینوپپتیداز نوترکیب حاصل از همین میکروارگانیسم، پروتئاز تجاری نوتراز[1] و ترکیبی از آن‌ها مورد ارزیابی قرار دادند و به نتیجه مشابهی دست یافتند.

- نسبت ازت غیر پروتئینی (ازت محلول در تری کلرو استیک اسید) به ازت کل (NPN/TN)

یکی دیگر از روش‌های متداول برای بررسی پروتئولیز ثانویه در پنیر، اندازه گیری پپتیدهای محلول در تری کلرواستیک اسید یا ازت غیر پروتئینی است. در اثر افزودن آنزیم، پپتیدهای درشت مولکول که تحت تأثیر آنزیم رنین تولید شده اند به اسیدهای آمینه و پپتیدهای با وزن مولکولی کم، که در تری کلرواستیک اسید محلول می‌باشند، شکسته شده و در نتیجه درصد ازت غیر پروتئینی افزایش می یابد. مطابق با شکل ۴ نسبت ازت غیر پروتئینی به ازت کل (شاخص پروتئولیز و فاکتور رسیدن) در هر سه نوع پنیر اصلاح شده آنزیمی افزایش یافت و کمترین نسبت ازت غیر پروتئینی به ازت کل مربوط به نمونه تیمار شده با عصاره آنزیمی *لاکتوباسیلوس کازئی* و بیشترین آن مربوط به نمونه تهیه شده با استفاده از هر سه عصاره آنزیمی بود. که این مقدار به میزان زیادی بیشتر از پنیر تجاری چداری است که به طور طبیعی دوره رسیدگی را طی کرده است. در تحقیقی Wilkinson و همکاران (۱۹۹۲) اثر آنزیم‌های تجاری را بر روی میزان پروتئولیز و رسیدن پنیر تجاری چدار با اندازه‌گیری میزان پروتئین محلول در آب بررسی نمودند و به نتایج مشابهی دست یافتند.

از آنجا که مهمترین قسمت تشکیل دهنده ازت غیر پروتئینی پپتیدهایی با وزن مولکولی خیلی پایین، اسیدهای آمینه و اوره می‌باشد. لذا افزایش درصد ازت غیر پروتئینی پنیرهای اصلاح شده آنزیمی بیانگر افزایش مقادیر ترکیبات مذکور است. از آنجا که این ترکیبات طی فرآیند پروتئولیز ثانویه حاصل می‌شوند می توان نتیجه گرفت که استفاده از ترکیبی از آنزیم‌های کپکی و لاکتیک اسید باکتری‌ها به مقدار زیادی روند پروتئولیز ثانویه را افزایش می دهد.

[1] Neutrase

Archive of SID
www.SID.ir

-اسیدآمینه‌های آزاد

شکل ۵ تأثیر افزودن عصاره‌های آنزیمی را بر میزان تشکیل اسیدآمینه‌های آزاد در انواع تیمارها نشان می‌دهد. میزان اسید آمینه‌های آزاد در هر سه نمونه آنزیم زده شده با نمونه کنترل و پنیر تجاری چدار اختلاف معنی‌داری داشتند. میزان تشکیل اسیدهای آمینه در پنیر اصلاح شده آنزیمی تولید شده با عصاره آنزیمی هر سه میکروارگانیسم بیش از دو برابر اسید آمینه‌های آزاد موجود در پنیر تجاری چدار بود. در تحقیقی مشابه، Lee و همکاران (۲۰۰۷) با استفاده از *Lactobacillus helveticus DPC 4571* تضعیف شده توانستند میزان اسید امینه‌های آزاد را در پنیر اصلاح شده آنزیمی افزایش دهند.

-اندیس اسیدی[1]

تغییرات مقدار اسیدهای چرب آزاد به عنوان شاخص بررسی روند لیپولیز در نمونه‌های پنیر انتخاب گردید. مطابق شکل ۶ بطور کلی مقدار کل اسیدهای چرب آزاد (ADV) با افزودن عصاره آنزیمی به نمونه‌ها افزایش یافت، بین نمونه کنترل و EMC1 اختلاف معنی‌داری وجود نداشت، اما بین نمونه کنترل، EMC2 و EMC3 میزان اختلاف معنی‌دار بود. با شرایط دمایی و زمان گرمخانه‌گذاری برابر در نمونه‌های پنیر تیمار شده، در نهایت بین سه نمونه پنیر اصلاح شده آنزیمی تولید شده، نمونه حاصل بوسیله عصاره آنزیمی حاصل از کپک‌های *آسپرژیلوس اوریزا* و *آسپرژیلوس نایجر* و عصاره خام *لاکتوباسیلوس کازئی* (EMC3) دارای بیشترین مقدار ADV (۴/۰۷۷) بود. پنیر اصلاح شده آنزیمی تولید شده بوسیله عصاره آنزیمی *لاکتوباسیلوس کازئی* (EMC1) کمترین مقدار ADV (۰/۷۲۴) را داشت. مشاهده گردید که اثر همزمان هر سه عصاره آنزیمی تأثیر بیشتری بر تری گلیسریدها داشت و لیپولیز به میزان بیشتری صورت گرفت. در تحقیقی Yilmaz و همکاران (۲۰۰۵) لیپاز میکروبی تجاری را به شیر مورد استفاده در تهیه پنیر افزودند و پس از بررسی میزان اسیدهای چرب آزاد در زمان‌های مختلف رسیدن پنیر، این محققین توصیه نمودند که از لیپاز میکروبی می‌توان جهت تسریع رساندن پنیر استفاده نمود.

- پروفایل اسید چرب

درصد اسیدهای چرب در EMC1، EMC2، EMC3 در مقایسه با پنیر تجاری چدار و نمونه کنترل شامل اسیدبوتیریک، کاپریلیک، کاپریک، لوریک، مریسیتیک، پالمیتیک، استئاریک، اولئیک، لینولئیک، در جدول ۱ آمده است. همانطور که ملاحظه می‌شود به طور کلی میزان تمام اسیدهای چرب در نمونه‌های تیمار شده بوسیله افزودن عصاره‌های آنزیمی در مقایسه با نمونه کنترل و پنیر چدار معمولی افزایش معناداری داشته‌است. اسیدهای چرب زنجیر کوتاه و متوسط با تعداد کربن زوج (C4:0-C12:0) به طور قابل توجهی دارای آستانه حسی پایین بوده و هر کدام عطر و طعم بخصوصی دارند: اسیدبوتانوئیک در طعم تندی[2] و پنیری[3] دخالت دارد، هگزانوئیک اسید دارای طعم سوزاننده[4] و با طعم پنیر رگه آبی[5] احساس می‌شود. اطلاعات مربوط به نقش اسیدهای چرب آزاد در عطر و طعم پنیر بسیار گسترده و گاهی اوقات متناقض اند. باتوجه به جدول ۱ میزان افزایش اسیدهای چرب کوتاه زنجیر در هر سه نوع EMC نسبت به اسیدهای چرب بلند زنجیر و متوسط زنجیر پایین‌تر است، این پدیده را می توان ناشی از تجزیه اسیدهای چرب کوتاه زنجیر و تبدیل آن‌ها به ترکیبات عطری و طعمی مانند گاما و دلتالاکتون‌ها، الکل‌ها و متیل-کتون‌ها و دیگر ترکیبات طعمی دانست. Wilkinson و همکاران در سال ۲۰۰۵ نتایج مشابهی را در بررسی میزان اسیدهای چرب ۱۵ نوع EMC تجاری در مقایسه با انواع مختلفی از پنیر تجاری چدار بیان کردند. این محققین اظهار کردند اگر چه میزان اسیدهای چرب در EMC شرکت‌های مختلف متفاوت است اما به میزان زیادی بیشتر از پنیرهای چدار مورد مطالعه می‌باشد.

-ویژگی‌های حسی

مطابق جدول ۲ بیشترین امتیاز طعم، و عطروبو مربوط به نمونه EMC3 است که بیشترین لیپولیز و پروتئولیز نیز در بین نمونه‌های مورد ارزیابی، در آن رخ داده است و ایجاد این عطر و طعم را می‌توان ناشی از تجزیه اسیدهای چرب کوتاه زنجیر و تبدیل آن‌ها به ترکیبات عطر و طعمی دانست (Adham and Ahmed, 2009). این در حالی

[1] Acid Degree Value [2] Rancid [3] Cheesy [4] Pungent [5] Blue Cheese

Archive of SID

www.SID.ir

است که سطوح اسیدهای چرب کوتاه زنجیر به اندازه‌ای افزایش نداشته است که سبب تنزل آرومای محصول شود (Miri and Habibi Najafi, 2011). با وجود بالاتر بودن امتیاز پذیرش کلی در EMC3 در مقایسه با نمونه پنیر تجاری چدار، این تفاوت معنادار نبود و ارزیاب‌ها هم قادر نبودند میان این دو نمونه تمایزی قائل شوند.

نتیجه‌گیری

نتایج آزمایشات پروتئولیتکی محصولات نشان داد که عصاره آنزیمی *آسپرژیلوس اوریزا* خاصیت پروتئولیتیکی مؤثرتری نسبت به عصاره آنزیمی *لاکتوباسیلوس کازئی* دارد، اما در مجموع عصاره آنزیمی *لاکتوباسیلوس کازئی* تأثیر زیادی در افزایش پروتئولیز محصول نهایی داشته است. علاوه بر این نتایج آزمایشات لیپولیتکی محصولات (نمونه کنترل، EMC1، EMC2 و EMC3) حاکی از این بود که عصاره آنزیمی *آسپرژیلوس نایجر* نسبت به عصاره آنزیمی *لاکتوباسیلوس کازئی* تأثیر زیادی بر خاصیت لیپولیتیکی پنیرهای تولیدی دارد و بطور کلی می توان از عصاره آنزیمی باکتری‌های لاکتیک اسید جهت افزایش طعم به نحو مؤثری در پنیرهای اصلاح شده آنزیمی استفاده نمود. همچنین بهترین نتایج زمانی حاصل شد که هر سه آنزیم در تولید پنیر به کار گرفته شدند و باعث رسیدن زودتر و طعم بهتر محصول شدند ضمن این‌که این محصول بالاترین امتیاز پذیرش کلی، در مقایسه با سایر نمونه‌های مورد ارزیابی را به خود اختصاص داد.

سپاسگزاری

نویسندگان برخود لازم می‌دانند از شرکت زیست فناوری فرآوری سلامت بنیان آلا برای همکاری در انجام آزمایش‌های میکروبی قدردانی نمایند.

منابع

Adham, N. Z. & Ahmed, E. (2009). Extracellular lipase of Aspergillus niger NRRL3; production, partial purification and properties. Indian Journal of Microbiology, 49, 77.

Farahnoodi, F. (1998). Dairy Industries. Tehran: Research and Education Jahad company, 98-100.

Folkertsma, B. & Fox, P. F. (1992). Use of the Cd-ninhydrin reagent to assess proteolysis in cheese during ripening. Journal of Dairy Research, 59, 217-224.

Hasan, F., Shah, A. A. & Hameed, A. (2009). Methods for detection and characterization of lipases: a comprehensive review. Biotechnology Advances, 27, 782-798.

Karali, F., Georgala, A., Massouras, T. & Kaminarides, S. (2013). Volatile compounds and lipolysis levels of Kopanisti, a traditional Greek raw milk cheese. Journal of the Science of Food and Agriculture, 93, 1845-1851.

Kilcawley, K., Nongonierma, A., Hannon, J., Doolan, I. & Wilkinson, M. (2012). Evaluation of commercial enzyme systems to accelerate Cheddar cheese ripening. International Dairy Journal, 26, 50-57.

Kuchroo, C. & Fox, P. (1982). Soluble nitrogen in Cheddar cheese: comparison of extraction procedures. Milchwissenschaft. Milk science international.

Lee, S. Y. & Lee, B. H. (1990). Esterolytic and Lipolytic Activities of Lactobacillus Casei-subsp-Casei LLG. Journal of Food Science, 55, 119-122.

Mahadik, N. D., Puntambekar, U. S., Bastawde, K. B., Khire, J. M. & Gokhale, D. V. (2002). Production of acidic lipase by Aspergillus niger in solid state fermentation. Process Biochemistry, 38, 715-721.

Mendia, C., Ibanez, F., Torre, P. & Barcina, Y. (2000). Effect of pasteurization and use of a native starter culture on proteolysis in a ewes' milk cheese. Food Control, 11, 195-200.

Miri, M. A. & Habibi Najafi, M. B. (2011). The effect of adding enzyme-modified cheese on sensory and texture properties of low-and high-fat cream cheeses. International journal of dairy technology, 64, 92-98.

Moskowitz, G. J. & Noelck, S. S. (1987). Enzyme-modified cheese technology. Journal of Dairy Science, 70, 1761-1769.

Noronha, N., Cronin, D. A., O'riordan, E. D. & O'sullivan, M. (2008). Flavouring of imitation cheese with enzyme-modified cheeses (EMCs): Sensory impact and measurement of aroma active short chain fatty acids (SCFAs). Food Chemistry, 106, 905-913.

Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G. & Pandey, A. (2005). Comparative evaluation of neutral protease production by Aspergillus oryzae in submerged and solid-state fermentation. Process Biochemistry, 40, 2689-

Archive of SID

www.SID.ir

2694.

Wilkinson, M. & Kilcawley, K. (2005). Mechanisms of incorporation and release of enzymes into cheese during ripening. International Dairy Journal, 15, 817-830.

Wilkinson, M. G., Guinee, T. P., O'callaghan, D. & Fox, P. (1992). Effects of commercial enzymes on proteolysis and ripening in Cheddar cheese. Le Lait, 72, 449-459.

Archive of SID

www.SID.ir