نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۲۴ شماره ۲/ سال ۱۳۹۳

تاثیر لیپاز و پروتئاز میکروبی در تسریع توسعه عطر و طعم پنیر فتای ایرانی فراپالایش

پریسا صلحی*[۱]، علیرضا صادقی ماهونک[۲]، جواد حصاری[۳]، محمد قربانی[۲] و مهران اعلمی[۴]

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۹/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۱/۲۷

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
[۲] دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
[۳] دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
[۴] استادیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
*مسئول مکاتبه: Email:parisasolhi@yahoo.com

چکیده

به دلیل میزان بالای پروتئین آب پنیر در پنیر فراپالایش، رسیدن آهسته‌تری نسبت به پنیر سنتی دارد. استفاده از آنزیم‌ها در این نوع پنیر توسط بعضی از شرکت‌های تجاری پیشنهاد شده است ولی تاکنون در تولید پنیرهای فراپالایش به کار برده نشده است. تاثیر لیپاز و پروتئاز استارتری در توسعه عطر و طعم پنیر فتای ایرانی فراپالایش بررسی شد. آنزیم‌های حاصل از تجزیه سلولی *Lactococcus plantarum* به وسیله امواج فراصوت در ۲ غلظت ۲/۵ میلی‌لیتر در لیتر و ۵ میلی‌لیتر در لیتر و *Rizomoccur mehei* در ۲ غلظت ۰/۱۲ گرم در لیتر و ۰/۲٤ گرم در لیتر به ناتراوه افزوده شدند. ویژگی‌های فیزیکی‌شیمیایی (رطوبت، اسیدیته، چربی و نمک) نمونه‌ها در روزهای ۱۵، ۳۰، ٤٥ و ٦٠ ارزیابی شد. بررسی فرایند پروتئولیز به وسیله اندازه‌گیری درصد نیتروژن محلول در pH= ٤/٦ و Urea-PAGE انجام گرفت. نتایج نشان داد که در همه نمونه‌ها زمان و غلظت آنزیم به طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) باعث افزایش اسیدیته، ماده خشک، اندیس لیپولیز و درصد نیتروژن محلول در pH= ٤/٦ شد. این یافته‌ها تاثیر آنزیم‌های افزوده شده در فرایند لیپولیز و پروتئولیز را ثابت کرد. ارزیابی حسی توصیفی که بر اساس شدت طعم پنیر به وسیله ۱۰ ارزیاب انجام‌گرفت، نشان‌داد. که نمونه‌های بدون آنزیم میکروبی بالاترین امتیاز کلی را داشتند.

واژگان کلیدی: لیپاز و پروتئاز میکروبی، توسعه عطر و طعم، پنیر فتای فراپالایش، ، Urea-PAGE، اندیس لیپولیز

مقدمه

سه راه اصلی تغییرات در حین نگهداری پنیر تبدیلات لاکتوز، چربی و کازئین‌ها است. کشتهای استارتری که در این تخمیرها استفاده می‌شوند، منبع عمده آنزیم‌هایی هستند که در رسیدن پنیر دخالت می‌کنند (اسمیت و همکاران ۲۰۰۵). این سویه‌های استارتری برای آزادسازی آنزیم‌های داخل سلولی خود و ایفای نقش در رسیدن پنیر نیاز به لیز شدن دارند. با تحریک لیز کردن این سویه‌ها یا با افزودن آنزیم‌ها در فرایند اصلاح

Archive of SID
www.SID.ir

آنزیمی پنیر، تسریع رسیدن پنیر اتفاق می‌افتد (درویتر و همکاران ۱۹۹۷).

فاکس و همکاران (۱۹۹٦) و آذرنیا و همکاران (۲۰۰٦) به دلایل اقتصادی و تکنولوژیکی، روش‌های متفاوتی برای تسریع رسیدن پنیر چدار استفاده کردند. تحریک لیز شدن نیز یکی از روش‌های تسریع رسیدن بوده است. لیز شدن اسیدلاکتیک باکتری‌ها در پنیر سال‌های زیادی مبهم بوده است (سندبرگ و هاگلوند ۱۹۳۰)، اما گریپون و همکاران (۱۹۹٤) در پنیر چدار ابهامات موجود برای *لاکتوکوکوس* را رفع کردند.

استفاده از شوک حرارتی برای سلول‌های *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* DPC٤٥٧١ در تولید پنیر اصلاح شده آنزیمی منجر به پروتئولیز ثانویه بیشتر می شوند و همچنین طعم قوی در محصولات ایجاد می‌کند (لی و همکاران۲۰۰۷).

درویتر و همکاران نیز بر اساس این نتایج در سال ۱۹۹۷، به منظور تسهیل آزادسازی آنزیم داخل سلولی مؤثر در تشکیل طعم و تسریع رسیدن پنیر، از روش لیز کردن سویه *لاکتوکوکوس لاکتیس* استفاده کردند. کنترل و افزایش لیز شدن استارترهای باکتری‌های اسید لاکتیک به عنوان پارامتری در کنترل و تسریع رسیدن می باشد. در واقع استارتر های لاکتیکی، دارای آنزیم های درون سلولی نظیر پپتیداز، لیپاز و آنزیم‌های کاتابولیسم آمینواسید هستند که طی لیز شدن، این آنزیم‌ها آزاد شده و به توسعه طعم پنیر در طول رسیدن کمک می‌کنند.

در یک بررسی استفاده از آنزیم انکپسوله برای تسریع رسیدن پنیر مورد مطالعه قرار گرفت و از ژلان و کاپاکاراجینان برای کپسوله کردن آنزیم پروتئاز و تسریع در رسیدن پنیر چدار استفاده شد و بیشترین پروتئولیز در نمونه‌های حاوی کاپاکاراجینان دیده شد (کایلاسپدی و لام ۲۰۰۵).

علاوه بر روش گفته شده، روش‌های دیگری نیز برای تسریع رسیدن وجود دارد که ارزان‌تر و مؤثرتر می‌باشد. برای مثال در یک روش از دمای بالا برای سرعت بخشیدن به رسیدن پنیر استفاده می‌شود. بالا بردن دمای رسیدن باعث افزایش تجزیه β و α_{s1} کازئین می شود با این حال همه فرایندها بطور یکسان در دمای بالا سرعت نمی‌یابند و ممکن است پس مزه و طعم نامطلوب ایجاد کنند (فاکس و همکاران ۱۹۹٦).

پروتئولیز مهمترین واقعه بیوشیمیایی مقدماتی است که طی رسیدن پنیر رخ می‌دهد. به دلیل اهمیت این فرآیند، این موضوع به شکل وسیعی بررسی شده است (فاکس وهمکاران ۱۹۹٤).

محصولات تجزیه‌ای پروتئولیز غلظت پپتید و آمینواسید را افزایش می‌دهد (سود و کوسیکویسکی ۱۹۷۹). آمینواسیدها عمده‌ترین اجزای پنیری محلول در آب می باشند که پایه و اساس طعم پنیری بوده و غیرفرار هستند و به عنوان سوبسترا برای واکنش‌های مختلف تشکیل طعم عمل می‌کنند (فاکس و والانس ۱۹۹۷).

پروتئاز حاصل از *باسیلوس‌سوبتلیس* و پروتئاز گیاهی ارزان‌ترین آنزیم‌ها برای هیدرولیز پروتئین می‌باشند (کیلکاولی، ویلکینسون و فوکس ۱۹۹۸).

لیپولیز، فرآیند هیدرولیز چربی شیر نیز در اکثر پنیرها نقش مهمی در افزایش طعم ایفا می‌کند. ترکیبات طعمی عمده که طی لیپولیز ایجاد می‌شود اسیدهای چرب آزاد هستند که مستقیماً بر طعم پنیر اثر دارند (آستون و کرامر ۱۹۸٦). همچنین اسیدهای چرب آزاد می‌توانند به وسیله میکروارگانیسم‌ها به یکدیگر و اغلب به ترکیبات طعمی قوی تبدیل شوند، از جمله متیل کتون‌ها، لاکتون-ها، استرها، الکل‌ها و آلدهیدهای ثانویه که اثر مستقیمی بر طعم پنیرهای مختلف دارند.

تحقیقات نشان داده است که *لاکتوباسیلوس‌ها* توانایی تشدید پروتئولیز و بهبود طعم پنیرهای مختلف را دارند (هینز و همکاران ۲۰۰۳). اسیدلاکتیک باکتری‌ها وقتی در شیر رشد می‌کنند، سیستم پروتئولیتیک پیچیده آنها اکثر کازئین‌ها را به پپتیدهای کوچک واسیدهای آمینه تجزیه کرده و علاوه بر رفع نیازهای تغذیه‌ای خود به طعم

Archive of SID

www.SID.ir

محصولات لبنی تخمیری کمک می‌کنند (اسمیت و همکاران ۲۰۰۵).

توسعه‌ی تکنولوژی پیشرفته برای بهبود طعم پنیر چدار با کشف لیپازها و پروتئیناز قارچی جدید توسط کوسیکویسکی (۱۹۷۷) آغاز شد. در حقیقت با استفاده از تکنولوژی آنزیمی امکان تولید بسیاری از ترکیبات طعمی پنیرها فراهم آمده است. تحقیقات زیادی نشان داده است که کشت‌های حاوی *لاکتوباسیلوس پلانتارم* و *لاکتوباسیلوس کازئی* موجب افزایش پپتیدولیز پنیر و بهبود خواص حسی آن می‌شود (یوان ۲۰۰۶).

کاربرد الترافیلتراسیون در تولید پنیر فتا به طور گسترده‌ای مطالعه شده است (میستری و مابیوس ۱۹۹۳). به دلیل ظرفیت بالای نگهداری آب توسط پروتئین‌های آب پنیر در پنیرهای UF، محتوای رطوبت آنها نسبت به پنیرهای تولید شده به روش سنتی بالاتر است . تعدادی معایب بافتی و ترکیبی برای پنیرهای UF گزارش شده است (کرمی و همکاران ۲۰۰۹). در حین فرایند الترافیلتراسیون، اندازه میسلها کاهش یافته و توسط پیوندهای هیدروفوبیک ساختا فشرده‌ای پیدا می-کنند (اردم ۲۰۰۵). شرکت لیپاز شیر در لیپولیز پنیر بستگی به دمای به کار رفته در شیر دارد (دیت ۲۰۰۶). فعالیت لیپاز در حین پاستوریزاسیون (۷۲°C، ۱۵s) ۸۳٪ کاهش می‌یابد و بعد از حرارت ۷۸°C به مدت ۱۵s، ۱۰۰٪ از بین می‌رود . مطمئنا حرارت دادن شیر تغلیظ شده UF باید مسئول کاهش فعالیت لیپولیتیک در مرحله نهایی تولید پنیر باشد (کرمی و همکاران ۲۰۰۹). بنابراین میزان لیپولیز در حین نگهداری محدود می‌باشد مگراینکه به شیر تغلیظ شده، لیپاز افزوده شود و یا فلور میکروبی پنیر آن را تولید کند (دیت ۲۰۰۶). استرازهای مقاوم به حرارت آزاد شده از باکتری‌های سایکروتروف نیز می‌توانند نقش لیپولیتیک در پنیر داشته باشند (کولینز و همکاران ۲۰۰۳). به دلیل میزان بالای پروتئین آب پنیر در پنیر UF، رسیدن آهسته‌تری نسبت به پنیر سنتی دارد (میستری و مابیوس ۱۹۹۳).

افزودن لیپاز توسط بعضی شرکت‌ها مانندAPV (APV Ltd., Silkeborg, Denmark) برای تسریع رسیدن پنیر UF پیشنهاد شده است (میستری و مابیوس ۱۹۹۳) ولی هنوز در تولید پنیر فتای UF ایرانی به کار برده نشده است.

با توجه به وجود مسیرهای تشکیل طعم پنیری و ترکیبات طعمی گوناگون، طعم‌های پنیری خیلی زیادی ممکن است در تکنولوژی پنیر اصلاح شده آنزیمی تولید شود. با این حال با داشتن دانش همه جانبه در مورد واکنش‌های آنزیمی تحت شرایط مورد استفاده، قبل از تولید می توان محصول مطلوب و ثابت بدست آورد. در تحقیق جاری بررسی اثرات آنزیم‌های لیپاز *رایزوموکور مهی* و پروتئاز *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بر روی شدت طعم پنیر و تسریع رسیدن پنیر سفید فراپالایش صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

برای فعال کردن سویه محتویات آمپول حاوی باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم لیوفیلیزه شده از روش کراسیکوپ و همکاران(۲۰۰٤) استفاده شد. سویه‌ی کشت داده شده، سانتریفیوژ شد. رسوبات نهایی توسط ورتکس حل شده و در داخل ارلن ریخته شد، به رسوب باقی مانده حدود ۱۰ میلی‌لیتر بافر سدیم فسفات با pH=۷ اضافه گردید، سپس عمل اولتراسوند با شدت ۸۰٪ Amp[1] و فرکانس۲۰ کیلوهرتز با ۲۰ دور۳۰ ثانیه‌ای داخل یخ انجام شد. پس از اولتراسوند، عمل سانتریفوژ به منظور جدا کردن باکتری‌ها و سلول‌های لیز شده در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد و این بار رسوبات که حاوی لاشه باکتری‌ها بود دور ریخته شد و مایع رویی به عنوان عصاره آنزیمی خام برای تهیه پنیر سفید فراپالایش مورد استفاده قرار گرفت (ویلیامز و همکاران، ۲۰۰۲).

[1] - Aamplitude

Archive of SID

www.SID.ir

برای افزودن آنزیم لیپاز به نمونه‌های پنیر ابتدا ۱ گرم از آنزیم در مقدار مشخصی از ناتراوه حل شده و سپس غلظت‌های مورد نظر به لیوان های ٤۰۰ گرمی حاوی رتنتیت در۳ تکرار افزوده شدند. بعد از آن لیوان‌ها وارد بقیه مراحل تولید شدند. تولید پنیر در کارخانه پگاه آذربایجان شرقی و مطابق روش پیشنهادی شرکت تترا پک (Bylund, 1995) همراه با اصلاحات توسط حصاری، احسانی، خسروشاهی و مک سوونی (۲۰۰٦) انجام گرفت. که شامل مایه‌زنی و عبور از تونل انعقاد و سپس نمک‌زنی و درب‌بندی و گرمخانه‌گذاری بود. گرمخانه‌گذاری به منظور کاهش pH بوده و ٤۸-۲٤ ساعت طول کشید. بعد از این مرحله پنیرها وارد سردخانه شده و در هر ۲ هفته آزمایشات مربوطه انجام شد.

آزمایشات فیزیکی‌شیمیایی

اندازه‌گیری ماده خشک با دستگاه رطوبت‌سنج (Sartorius Ltd., Epsom, UK) انجام‌گرفت. به طوری که ۱ گرم از نمونه پنیر روی کاغذ به طور یکنواخت مالیده شد و در دستگاه قرارگرفت. دستگاه پس از تبخیر شدن آب، درصد ماده خشک را نشان داد.

اندازه‌گیری درصد اسیدیته به روش سازمان ملی استاندارد، شماره ۲۸۵۲ انجام شد.

اندازه‌گیری مقدار نمک طبق روش مور و مطابق با سازمان ملی استاندارد، شماره ۱۸۰۹، انجام گرفت.

میزان چربی نمونه‌های پنیر با استفاده از روش ژربر تعیین شد (سازمان ملی استاندارد ، شماره ۷٦۰).

ازت کل نمونه‌های پنیر به روش کلدال اندازه‌گیری شد. مقدار نمونه برای هر یک از پنیرها ۰/۵گرم بود. مقدار پروتئین کل از حاصل ضرب مقدار ازت اندازه‌گیری شده در ضریب تبدیل ٦/۳۸ محاسبه گردید (IDF ۱۹٦٤).

جدول۱- غلظت آنزیم در نمونه‌های پنیر

تیمار	غلظت آنزیم
A	شاهد
B	۰/۱۲ گرم در لیتر لیپاز تجاری ۲/۵ میلی‌لیتر در لیترعصاره آنزیمی استخراج شده از لاکتوباسیلوس پلانتاروم
C	۰/۲٤ گرم در لیتر لیپاز تجاری و ۵ میلی‌لیتر در لیتر عصاره آنزیمی استخراج شده از لاکتوباسیلوس پلانتاروم
D	۰/۱۲ گرم در لیتر لیپاز تجاری
E	۰/۲٤ گرم در لیتر لیپاز تجاری

Archive of SID

www.SID.ir

ازت محلول در pH = ۴/۶

آماده سازی و استخراج ازت محلول در pH=٤/٦ طبق روش اصلاح‌شده کوچورو و فاکس (۱۹۸۲) صورت گرفت. نمونه‌های ۳۰ گرمی پنیر پس از افزودن ٦۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آنها، همگن گردیدند. پس از آن pH نمونه‌ها با استفاده از محلول HCl و NaOH ۰/۱ نرمال در ٤/٦ تنظیم شد. سپس نمونه‌ها نیم ساعت به حال خود رها گردیدند. پس از آن مجدداً pH نمونه‌ها در ٤/٦ تنظیم شدند و سپس سانتریفوژ گردیدند (٤۰۰۰g به مدت نیم ساعت). پس از سانتریفوژ، نمونه‌ها با استفاده از کاغذ صافی واتمن ٤۲ و پشم شیشه صاف و ازت محلول با روش کجلدال مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. قسمت رسوبات در لوله‌های آزمایش منجمد شد و برای آزمایش‌های الکترفورز نگهداری گردید (کوچورو و فاکس ۱۹۸۲).

اندازه‌گیری شدت لیپولیز

نمونه‌های پنیر (۱۰ گرم) با ٦ گرم سولفات سدیم بدون آب کاملا همگن شد و با ٦۰ میلی‌متر دی اتیل اتر به یک ظرف در پیچ‌دار منتقل شدند و با بهم‌زن مغناطیسی کاملاً مخلوط شدند و سپس با کاغذ واتمن شماره ۱ صاف شدند. رسوب باقی‌مانده دوبار متوالی و هر بار با ۲۰ میلی‌لیتر دی اتیل اتر شسته شد. محلول زیر صافی با محلول KOH اتانولی ۰/۱ نرمال در حضور معرف فنل فتالئین تیتر گردید. بعد از تیتراسیون حلال در زیر هود تبخیر شد. چربی باقی‌مانده توزین و مقدار کل اسیدهای چرب آزاد در پنیر با واحد میلی اکی والان در ۱۰۰ گرم چربی (meq/100g) بیان گردید (نونز و همکاران ۱۹۹٦).

بررسی درجه هیدرولیز سیستم کازئینی پنیر در طی رسیدن

روش مورد استفاده برای انجام الکتروفورز، روش Urea-PAGE بود که اساس جداسازی آن، تفاوت در وزن مولکولی، بار الکتریکی و ساختمان پرتئین‌های مختلف می‌باشد (شلابی و فاکس ۱۹۸۷).

ارزیابی حسی

به منظور ارزیابی حسی، ۱۰ پانلیست به طور تصادفی از گروه‌های سنی مختلف که دارای سطح تحصیلات مختلف بوده و شامل هر دو جنس مرد و زن بودند، انتخاب شدند. سپس پرسشنامه‌ای در اختیار آن‌ها قرار داده شد، نمونه‌های پنیر در یک تکرار از لحاظ رنگ و شکل ظاهری، بافت، شدت طعم، تندی، شوری، تلخی وارزیابی کلی بررسی شدند و به هر یک از این ویژگی‌ها از ۱ تا ٥ امتیاز داده شد به طوری که امتیاز ۱ مربوط به نمونه بسیار بد و امتیاز ٥ مربوط به نمونه بسیار خوب بود و سپس نتایج حاصل آنالیز شد.

تجزیه و تحلیل آماری

در این تحقیق از طرح کرت خرد شده در زمان[2] استفاده شد واثر دو آنزیم لیپاز و پروتئاز در روزهای (۱٥، ۳۰، ٤٥ و٦۰) در طول رسیدن مورد بررسی قرارگرفت. همه اندازه‌گیری‌ها به جز آزمون حسی در سه تکرار انجام گرفت و آزمون مقایسه میانگین‌ها به روش توکی صورت گرفت و سطح معنی داری در سطح احتمال کمتر از ٥٪ در نظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل آماری با نرم افزار SAS (version 8.2, SAS institute Inc., Cary., NC) و رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel صورت گرفت.

نتایج و بحث

ماده خشک

ماده خشک نمونه‌های پنیر در روزهای ۱٥، ۳۰، ٤٥ و ٦۰ دوره رسیدن اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان می‌دهد که اثر نوع تیمار و همچنین اثر زمان رسیدن و اثر متقابل این دو فاکتور معنی‌دار بودند ($P<0.05$). مقایسه میانگین‌ها به روش توکی مشخص کرد که تیمار کنترل دارای کمترین ماده خشک و تیمار E دارای بیشترین ماده خشک می‌باشد. درصد ماده خشک در طی رسیدن تا روز ٦۰ افزایش

[2]. Split plot in time

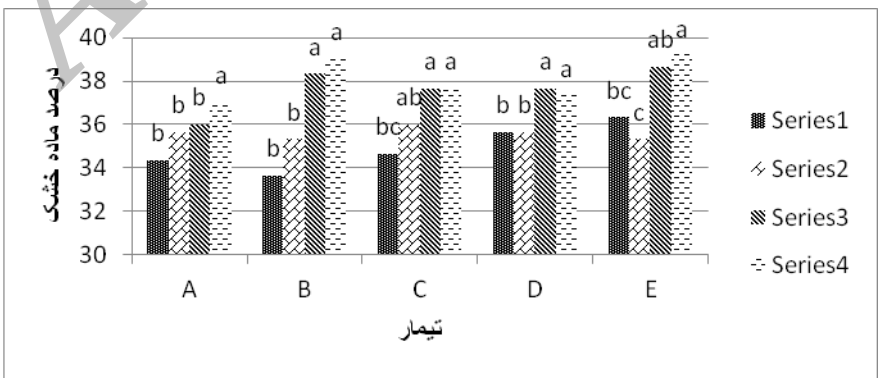
Archive of SID

www.SID.ir

یافت. علت این افزایش می‌تواند از یک طرف به جذب نمک و از سوی دیگر خارج شدن آب پنیر جهت حفظ فشار اسمزی مربوط باشد. در پنیرهای با فعالیت پروتئازی شدید که نقش مهمی در آزادسازی اسیدآمینه‌ها، پپتیدها، گروه‌های آمینی و کربوکسیل دارند، منجر به افزایش قابلیت حل شدن پروتئین‌ها می‌گردد و در نهایت درصد ماده خشک افزایش می‌یابد (برگامینی و همکاران ۲۰۰۶).

در مورد تغییرات اسیدیته نیز در طی مدت رسیدن، اثر نوع تیمار و زمان رساندن و تاثیر متقابل این دو فاکتور معنی‌دار ($P<0/05$) بود، به طوری که در طی مدت رساندن، اسیدیته نمونه‌ها افزایش یافت. در بین تیمارها نیز نمونه‌های دارای عصاره آنزیمی بیشترین اسیدیته را نشان دادند.

pH و اسیدیته از فاکتورهایی هستند که تاثیر زیادی بر روی پایداری پنیر و شرایط رشد میکرواورگانیسم‌ها، فعالیت آنزیمی و سرعت واکنش‌های بیوشیمیایی در طی رسیدن دارند. افزایش اسیدیته با کاهش pH طی دوره رسیدن ناشی از تخمیر لاکتوز و تولید اسیدهای‌آمینه و اسیدهای چرب در اثر پروتئولیز و لیپولیز می‌باشد. تولید اسیدهای‌آمینه در ماه اول رسیدن با شدت زیادی ادامه دارد، ولی با این حال عامل مهم در کاهش pH یا افزایش اسیدیته مربوط به تولید اسیدلاکتیک حاصل از تخمیر می‌باشد (فاکس و همکاران ۲۰۰۰) که همگی این عوامل موجب افزایش pH بعد از ٤٥ روز از رسیدن می‌شوند (مک سوئینی ۲۰۰٤). در حین رسیدن و یا نگهداری پنیر، باقی‌مانده لاکتوز تخمیر شده و pH به ٤/۲ کاهش می‌یابد .مواد معدنی متصل به میسل‌های کازئینی با این‌که موجب افزایش ظرفیت بافری ناتراوه می‌شوند ولی می‌تواند سینتیک اسیدیفیکاسیون باکتری‌های اسید لاکتیک را تغییر دهند (میستری و مابیوس ۱۹۹۳). همچنین در حین رسیدن، آمینواسیدهای آزاد شده از واکنش‌های پروتئولیز موجب افزایش اندکی در pH می‌شوند (واگنر ۱۹۹۳). pH پایین نمونه‌های پنیر موجب ساختار فشرده‌تری می‌شود زیرا جذب آب در پنیرهای با pH بالا، بسیار بیشتر است (فاکس و همکاران ۲۰۰۰). در pH پایین کلسیم فسفات کلوئیدی از میسل‌های کازئینی جدا شده و در pH کمتر از ٥/٥ ساب‌میسل‌ها به تجمعات کوچک کازئینی تجزیه می‌شوند. وقتی pH به نقطه ایزوالکتریک می‌رسد ماتریکس پروتئینی فشرده و کوتاه می‌شود. همچنین در pH کمتر از ٤/٨ تجمعات کازئینی به رشته‌های غیر خطی تبدیل می‌شوند (کرمی و همکاران۲۰۰۹).

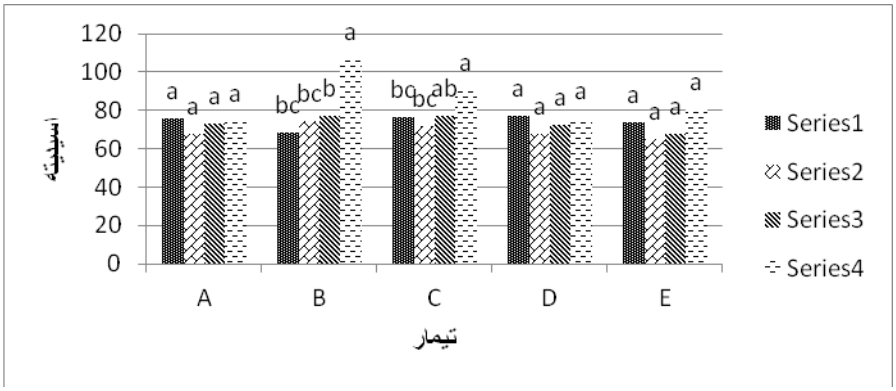


شکل۱- تغییرات درصد ماده خشک در نمونه‌های مختلف در طی دوره نگهداری

(A: شاهد، B: ۰/۱۲ گرم در لیتر لیپاز و ۲/٥ میلی‌لیتر در لیتر عصاره آنزیمی، C: ۰/۲٤ گرم در لیتر لیپاز و ٥ میلی‌لیتر در لیتر عصاره آنزیمی، D: ۰/۱۲ گرم در لیتر لیپاز تجاری، E: ۰/۲٤ گرم در لیتر لیپاز تجاری)

Archive of SID

www.SID.ir



شکل۲- تغییرات اسیدیته بر حسب درجه دورنیک در نمونه‌های مختلف در طی دوره نگهداری

(A: شاهد، B: ۰/۱۲ گرم در لیتر لیپاز و ۲/۵ میلی‌لیتر در لیتر عصاره آنزیمی، C: ۰/۲٤ گرم در لیتر لیپاز و ۵ میلی‌لیتر در لیتر عصاره آنزیمی، D: ۰/۱۲ گرم در لیتر لیپاز تجاری، E: ۰/۲٤ گرم در لیتر لیپاز تجاری)

نتایج حاصل از بررسی میزان نمک و میزان چربی نمونه‌های پنیر نشان داد که تاثیر نوع تیمار و زمان رسیدن و همچنین اثر متقابل این دو فاکتور معنی‌دار نبودند (P>۰/۰۵).

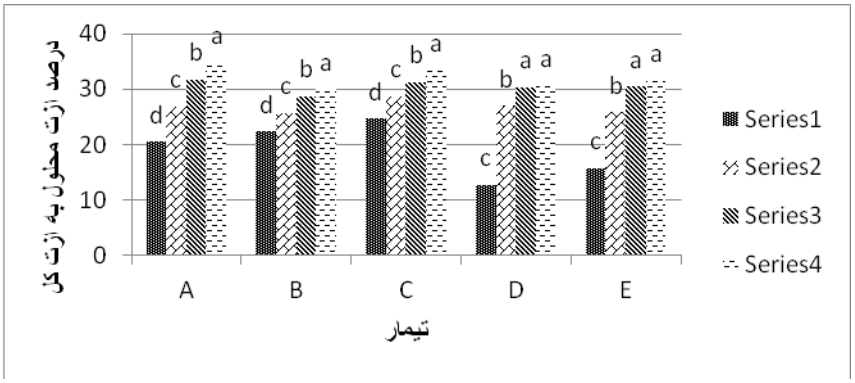
تغییرات درصد ازت محلول به ازت کل (فاکتور رسیدن)

بررسی حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوطه نشان می‌دهد که اثر نوع تیمار و زمان رسیدن و همچنین اثر متقابل این دو فاکتور تاثیر معنی‌داری (P<۰/۰۵) بر روی تغییرات درصد ازت محلول به ازت کل (SN/TN%)[3] در طی ٦۰ روز رسیدن نمونه‌های آزمایشی داشت و فاکتور رسیدن در طی دوره رسیدن افزایش یافت. مقایسه میانگین‌ها به روش توکی نشان داد که بیشترین مقدار فاکتور رسیدن مربوط به نمونه دارای عصاره آنزیمی می‌باشد که با نتایج فرانکو و همکاران (۲۰۰۱) مطابقت داشت. همچنین کمترین مقدار مربوط به نمونه بدون عصاره آنزیمی و حاوی آنزیم لیپاز بود. سرعت افزایش فاکتور رسیدن در نمونه دارای عصاره آنزیمی در۳۰ روز اول بیشتر از نمونه کنترل بود ولی در ۳۰ روز بعدی تقریبا با نمونه کنترل یکسان بوده و حتی نمونه کنترل دارای بیشترین مقدار فاکتور رسیدن بود. بر اساس مقایسه میانگین‌ها به روش توکی، سرعت افزایش فاکتور رسیدن در طی دوره رسیدن کاهش یافته است که نشان می‌دهد اصلی ترین مرحله رسیدن در پنیر فراپالایش، ۳۰ روز اول می‌باشد. افزایش تدریجی ازت محلول، توام با گذشت زمان موجب افزایش فاکتور رسیدن می‌شود که به دلیل تجزیه قسمت عمده مواد پروتئینی از شکل غیر محلول به شکل محلول (واحدهای کوچکتر) می‌باشد (مندیا و همکاران ۲۰۰۰).

[3]. Soluble Nitrogen/ Total Nitrogen

Archive of SID

www.SID.ir



شکل۳- درصد نسبت ازت محلول به ازت کل نمونه‌های مختلف درطی دوره نگهداری

(A: شاهد، B: ۰/۱۲ گرم در لیتر لیپاز و ۲/۵ میلی‌لیتر در لیتر عصاره آنزیمی، C: ۰/۲٤ گرم در لیتر لیپاز و ۵ میلی‌لیتر در لیتر عصاره آنزیمی، D: ۰/۱۲ گرم در لیتر لیپاز تجاری، E: ۰/۲٤ گرم در لیتر لیپاز تجاری)

بررسی درجه هیدرولیز سیستم کازئین

الکتروفورز بر روی ژل پلی آکریل آمید مطابق شکل٤، هیدرولیز کازئین‌ها در نمونه‌های پنیر را نشان می‌دهد که با کمرنگ شدن تدریجی باندهای مربوط به α_{s1}- کازئین و β- کازئین و تولید ترکیبات حاصل از تجزیه آن‌ها قابل تشخیص می‌باشد. افزایش شدت رنگ باندهای محصولات حاصل از تجزیه α_{s1}کازئین و β کازئین طی زمان رسیدن در نمونه‌های پنیر تولید شده با استفاده از عصاره آنزیمی نشان‌دهنده افزایش شدت پروتئولیز طی زمان نگهداری است. این امر با نتایج داده‌های به دست آمده از ازت محلول که حاکی از معنی‌دار بودن (P<۰/۰۵) اثر زمان رسیدن و نوع تیمار بر شدت پروتئولیز بود، مطابقت داشت. بطوری‌که با افزایش غلظت عصاره آنزیمی بیشترین تجزیه دیده شد. در تیمارهای مورد آزمایش به دلیل pH بالا تجزیه β کازئین بیشتر انجام گرفت. در این تحقیق به دلیل استفاده از سویه‌های لیز شده، پروتئولیز اولیه و ثانویه تقویت شده و تجزیه کازئین‌ها بیشتر انجام گرفته است که با نتایج کیرنان و همکاران (۲۰۰۰) مطابقت دارد.

تغییرات لیپولیز

براساس نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اندازه‌گیری اندیس لیپولیز طی دوره رسیدن نمونه‌های آزمایشی، نوع تیمار آزمایشی، فاصله زمانی و همچنین اثر متقابل این دو فاکتور دارای تاثیر معنی‌داری (P<۰/۰۵) بر روی اندیس لیپولیز پنیرها بود.

مقایسه میانگین‌ها به روش توکی نشان داد که بیشترین و کمترین مقدار اندیس لیپولیز به ترتیب مربوط به روز ٦۰ و روز اول رسیدن نمونه‌های آزمایشی بود. همچنین تیمار حاوی بیشترین غلظت عصاره آنزیمی و آنزیم لیپاز دارای بیشترین مقدار اندیس لیپولیز و تیمار کنترل دارای کمترین مقدار آن بوده است. نتایج نشان داد که نمونه‌های دارای عصاره آنزیمی نسبت به نمونه‌های بدون عصاره آنزیمی، اندیس لیپولیز بالاتری داشتند با وجودی‌که دارای مقادیر مساوی از آنزیم لیپاز بودند. ولی در بررسی آماری این تفاوت معنی‌دار نبود (P<۰/۰۵).

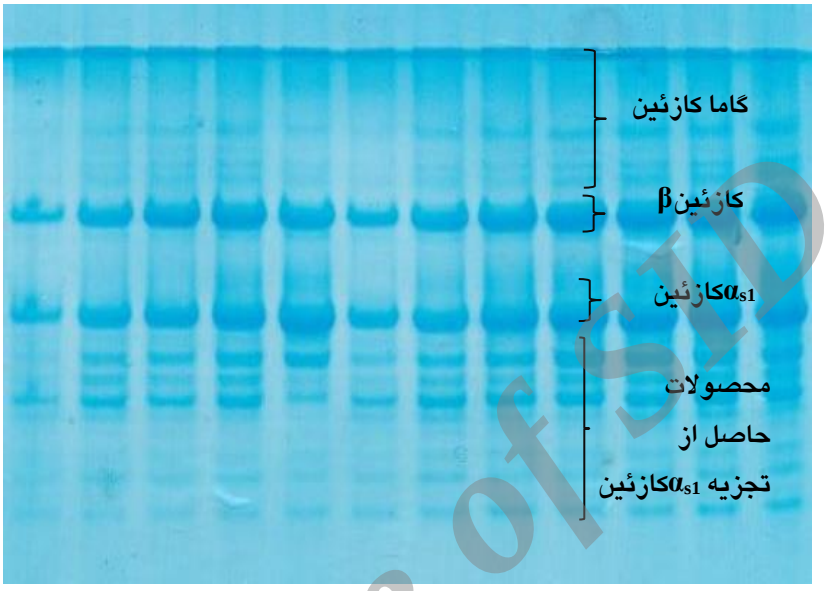
میزان لیپولیز در همه تیمارها در طول زمان افزایش نشان داد که مطابق نتایج مکسوئینی (۱۹۹۷) می‌باشد و نشان‌دهنده افزایش فعالیت لیپازی لاکتوباسیل با گذشت زمان می‌باشد. فعالیت لیپولتیکی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* همراه با رنت به عنوان یکی از فاکتورهای اصلی و مهم لیپولیز در طول رسیدن پنیر موجب افزایش مقدار اسیدهای چرب آزاد می‌شود (کالینز و همکاران ۲۰۰۳). گوئینی و فاکس (۱۹۸۷) گزارش کردند

Archive of SID

www.SID.ir

که پنیر حاصل با غلظت بالای نمک، فعالیت لیپاز سویه‌ها را تحت تأثیر قرار داده و باعث کاهش میزان لیپولیز می‌گردد.

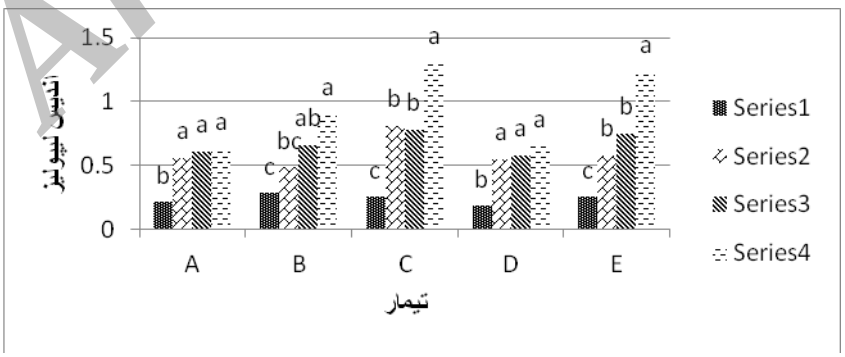
تیمارA	تیمارC	تیمارB



روز نمونه برداری	۱۵	۳۰	٤٥	۱۵	۳۰	٤٥	٦٠	۱	۱۵	۳۰	٤٥	٦٠

شکل۴- الگوی الکتروفورز تیمارهای A، B و C در طی دوره نگهداری

(A: شاهد، B: ۰/۱۲ گرم در لیتر لیپاز و ۲/۵ میلی‌لیتر در لیتر عصاره آنزیمی، C: ۰/۲٤ گرم در لیتر لیپاز و ۵ میلی‌لیتر در لیتر عصاره آنزیمی)



شکل۵- اندیس لیپولیز نمونه‌های پنیر در طی دوره نگهداری

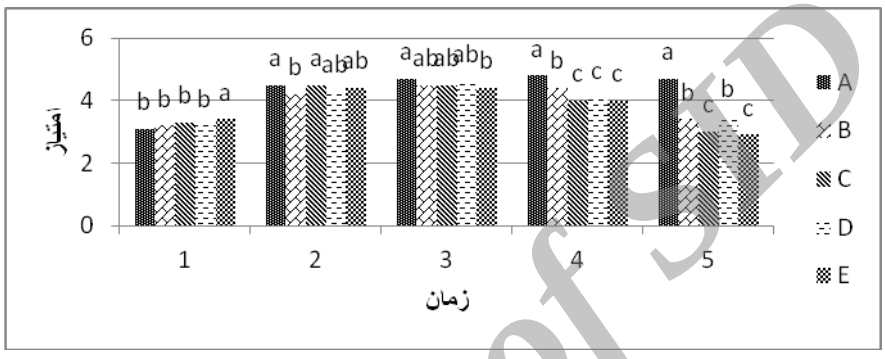
(A: شاهد، B: ۰/۱۲ گرم در لیتر لیپاز و ۲/۵ میلی‌لیتر در لیتر عصاره آنزیمی، C: ۰/۲٤ گرم در لیتر لیپاز و ۵ میلی‌لیتر در لیتر عصاره آنزیمی، D: ۰/۱۲ گرم در لیتر لیپاز تجاری، E: ۰/۲٤ گرم در لیتر لیپاز تجاری)

Archive of SID

www.SID.ir

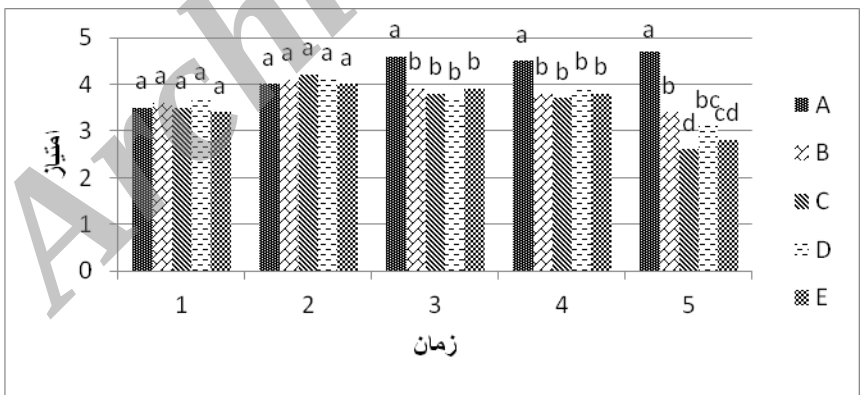
ارزیابی حسی

آنالیز آماری داده‌های مربوط به ویژگی ظاهری، بافت، تلخی و شوری تفاوت معنی‌داری نشان نداد ($P<0/05$) ولی امتیازات مربوط به عطر و طعم، طعم رنسید و ارزیابی کلی دارای تفاوت معنی‌داری بودند ($P<0/05$). به‌طوری‌که در هر ۳ ویژگی، تیمار A (کنترل) دارای بیشترین امتیاز و تیمار E (دارای غلظت بالای لیپاز) دارای کمترین امتیاز بود. امتیازات عطر وطعم، طعم رنسید و ارزیابی کلی نمونه‌های حاوی آنزیم تا روز ۳۰-ام دوره نگهداری افزایش داشته ولی در طی روزهای ٤٥ و ٦٠ کاهش یافته است که احتمالا به دلیل فعالیت بیش از حد آنزیمی بوده است. ولی امتیاز تیمار کنترل تا روز ۱۵ام افزایش یافته و سپس ثابت مانده است.



شکل ۶- امتیازات مربوط به طعم رنسید نمونه‌های مختلف در طی دوره نگهداری

(A: شاهد، B: ۰/۱۲ گرم در لیتر لیپاز و ۲/۵ میلی‌لیتر در لیتر عصاره آنزیمی، C: ۰/۲٤ گرم در لیتر لیپاز و ٥ میلی‌لیتر در لیتر عصاره آنزیمی، D: ۰/۱۲ گرم در لیتر لیپاز تجاری، E: ۰/۲٤ گرم در لیتر لیپاز تجاری)

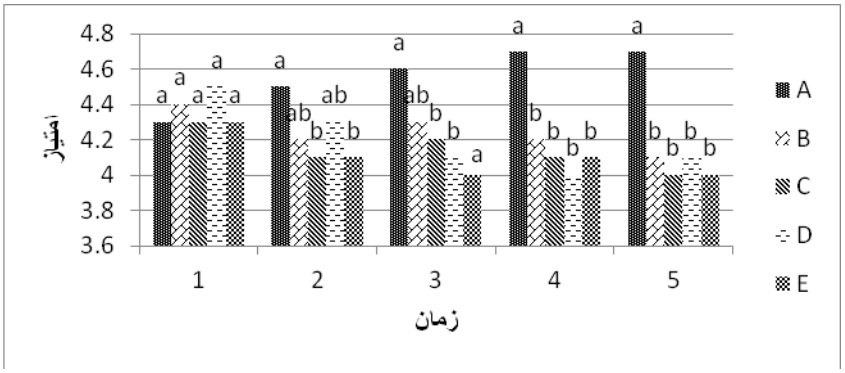


شکل ۷- امتیازات مربوط به عطروطعم نمونه‌های مختلف در طی دوره نگهداری

(A: شاهد، B: ۰/۱۲ گرم در لیتر لیپاز و ۲/۵ میلی‌لیتر در لیتر عصاره آنزیمی، C: ۰/۲٤ گرم در لیتر لیپاز و ٥ میلی‌لیتر در لیتر عصاره آنزیمی، D: ۰/۱۲ گرم در لیتر لیپاز تجاری، E: ۰/۲٤ گرم در لیتر لیپاز تجاری)

Archive of SID

www.SID.ir



شکل۸- امتیازات مربوط به ارزیابی کلی نمونه‌های مختلف در طی دوره نگهداری

(A: شاهد، B: ۰/۱۲ گرم در لیتر لیپاز و ۲/۵ میلی‌لیتر در لیتر عصاره آنزیمی، C: ۰/۲٤ گرم در لیتر لیپاز و ۵ میلی‌لیتر در لیتر عصاره آنزیمی، D: ۰/۱۲ گرم در لیتر لیپاز تجاری، E: ۰/۲٤ گرم در لیتر لیپاز تجاری)

منابع مورد استفاده

سازمان ملی استاندارد، اندازه گیری مقدار نمک پنیر، شماره ۱۸۰۹.

سازمان ملی استاندارد، اندازه گیری ازت کل پنیر شماره ٦۳۹.

سازمان ملی استاندارد، اندازه گیری چربی پنیر شماره ۷٦۰.

سازمان ملی استاندارد، اندازه گیری مقادیر pH و اسیدیته پنیر شماره ۲۸۵۲.

سازمان ملی استاندارد، ارزیابی حسی پنیر شماره ٤۹۳۸.

Aston JW, and Creamer LK, 1986. Contribution of the components of the water soluble fraction to the flavor of Cheddar cheese. J Dairy Science and Technology 21: 229-248.

Azarnia S, Robert N and Lee B, 2006. Biotechnological methods to accelerate Cheddar cheese ripening. Critical Reviews in Biotechnology 26: 121–143.

Bergamini CV, Hynes E and Zalazar CA, 2006. Influence of probiotic bacteria in the proteolisis profile of a semi-hard cheese. J Dairy Science 16: 856-866.

Collins YF, McSweeney PLH and Wilkinson MG, 2003. Evidence for a relationship between autolysis of starter bacteria and lipolysis in Cheddar cheese. J Dairy Research 70: 105–113.

Deeth HC, 2006. Lipoprotein Lipase and Lipolisis in milk. J Dairy 16: 555-562.

DeRuyter PG, Kuipers OP, Meijer WC and de Vos WM, 1997. Foodgrade controlled lysis of Lactococcus lactis for accelerated cheese ripening. Nat Biotechnology 15: 976–979.

Fox PF, Guinee TP and Cogan TM, 2000. Fundamentals of cheese science. Aspen Publishers, Maryland.

Fox PF, Singh TK, and McSweeney PLH, 1994. Proteolysis in cheese during ripening. In A. T. Andrews., & J. Varley (Eds.), Biochemistry of Milk Products 1–3.

Fox PF, Wallace JM, Morgan S, Lynch CM, Niland EJ and Tobin J, 1996. Acceleration of cheese ripening. Antonie Van Leeuwenhoek 70: 271–297.

Fox PF, and Wallace JM, 1997. Formation of flavour compounds. Advances in Applied Microbiology 45: 17–85.

Gripon JC, 1993. Mould-ripened cheeses. London: Chapman and Hall. In P F Fox, Cheese: Chemistry, physics and microbiology 2: 111–136.

Archive of SID

www.SID.ir

Guinee TP, Fox PF, 1987. Salt in cheese: physical, chemical and biological aspects. In P F Fox (Ed) General aspects: Vol. 1. Cheese: chemistry physics and microbiology Elsevier Applied Science 1: 251-297.

Hynes E, Bach C, Lamberet G, Ogier JC, Son O and Delacroix-Buchet A, 2003. Contribution of starter Lactococci and adjunt Lactobacilli to proteolysis, volatile profiles and sensory characterisics of washed-cured cheese. Lait 83:31-43.

IDF, 1964. Determination of protein content of cheese products standard 25. Brusseels, Belgum. International Dairy Federation.

Kailasapathy K and Lam SH, 2005. Application of encapsulated enzymes to accelerate cheese ripening. International Dairy Journal 15: 929–939.

Karami M, Ehsani MR, Mousavi SM, Rezaei K and Safari M, 2009. Microstructural properties of fat during the accelerated ripening of Ultrafiltered-Feta Cheese. Food Chemistry 113: 424-434.

Kiernan RC, Beresford TP, O'Cuinn G and Jordan KN, 2000. Autolysis of lactobacilli during Cheddar cheese ripening. J Agriculture and Food Research 39: 95–106

Kosikowski FV, 1977. Cheese and fermented milk foods 437-440.

Krasaekoopt W, Bhandari B and Deeth H, 2004. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. J Dairy 14: 737-743.

Lee BH, Kilcawley KN, Hannon JA and Park SY, 2007. The use of viable and heat-shocked Lactobacillus helveticus DPC 4571 in enzyme-modified cheese production. Food Biotechnology 21: 129–143.

McSweeney PLH, 1997. The flavour of milk and dairy products: cheese taste. J Dairy Technology 50: 123–128.

Mcsweeny PLH, 2004. Biochemistry of cheese ripening. Journal of Dairy Science and Technology 57:127-144.

Mendia C, Ibanez FJ, Torre P and Barcina Y, 2000. Effect of pasteurization and use of a nativestarter culture on proteolysis in a ewe's milk cheese. Food Control 11: 195-200.

Mistry VV and Maubios JL, 1993. Application of membrane separation technology to cheese production. In P F Fox (Ed.). Cheese: chemistry, physics and microbiology 1: 493-522.

Sandberg E, Haglund E and Barthel C, 1930. L'analyse du jus de fromagecommemoyen de de´terminer le degre´ de maturation. Le Lait 10: 1–21.

Shalabi SI, and Fox PF, 1987. Electrophoretic analysis of cheese, comparison of methods. J Food Science and Technology 11:135-151.

Smit G, Smit BA, Engels WJM, 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. FEMS Microbiology Reviews 29: 591-610.

Sood VK, Kosikowski FV, 1979. Accelerated Cheddar cheese ripening by added microbial enzymes. J Dairy Science 62: 1865-1872.

Williams AG, Noble J, Tammam J, Lloyd D and Banks JM, 2002. Factors affecting the activity of enzymes involved in peptide and amino acid catabolism in non-starter lactic acidbacteria isolated from Cheddar cheese. J Dairy 12: 841–852.

Yvon M, 2006. Key enzymes for flavor formation by lactic acid bacteria. Journal of Dairy Science and Technology 61: 16-24.

Archive of SID

www.SID.ir

Effect of microbial lipase and protease on the flavor development of Iranian UF Feta cheese

P Solhi[1*], A Sadeghi Mahoonak[2], J Hesari[3], M Ghorbani[2] and M Alami[4]

Received: December 03, 2013 Accepted: February 16, 2014
[1]MSc Student, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran
[2]Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran
[3]Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran
[4]Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran
[*]Corresponding author: Email:parisasolhi@yahoo.com

Abstract
UF cheese ripens more slowly than the traditional cheeses, because of high contents of whey proteins. The addition of enzymes has been recommended by some corporations to accelerate the ripening of UF cheeses, but it has not yet been included for the production of Iranian UF Feta cheese. The influence of microbial protease and lipase on the acceleration of flavor development of ultra-filtered Feta cheese was assessed. Enzymes of *Lactococcus plantarum* extracted via ultrasound as protease and *Rizomoccur mehei* lipase was used as lipase. Enzymes were added to cheese samples in two different concentrations: 0.12 g/lit and 0.24 g/lit of lipase and 2.5 ml/lit and 5 ml/lit protease. Physicochemical properties of samples were analyzed in days 15, 30, 45 and 60 of cheese ripening. Evaluation of proteolysis process was performed by measuring percentage of soluble nitrogen at pH=4.6 and urea polyacrylamide gel electrophoresis. The results showed that in all samples, ripening time and enzyme concentration significantly ($P<0.05$) increased the acidity, dry matter, lipolysis index and soluble nitrogen percentage at pH=4.6. These findings proved the effect of applied enzymes in lipolysis and proteolysis process. Descriptive sensory analysis based on cheese flavor intensity that was performed with ten panelists, showed that control samples had the highest total score.

Key words: Microbial proteases and lipases, Flavor development, Ultra-filtered Feta cheese, Urea-PAGE, Lipolysis index

Archive of SID

www.SID.ir