

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

پریسا صلحی<sup>۱\*</sup>، علیرضا صادقی ماهونک<sup>۲</sup>، جواد حصاری<sup>۳</sup>، محمد قربانی<sup>۴</sup> و مهران اعلمی<sup>۴</sup>

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

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

<sup>۲</sup> دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

<sup>۳</sup> دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

<sup>۴</sup> 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 استاترتری 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 ۰/۲۴ گرم در لیتر به ناتراوه افزوده شدند. ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی (رطوبت، اسیدیته، چربی و نمک) نمونه‌ها در روزهای ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ ارزیابی شد. بررسی فرایند پروتئولیز به وسیله اندازه‌گیری درصد نیتروژن محلول در pH= ۴/۶ و Urea-PAGE انجام گرفت. نتایج نشان داد که در همه نمونه‌ها زمان و غلظت آنزیم به طور معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) باعث افزایش اسیدیته، ماده خشک، اندیس لیپولیز و درصد نیتروژن محلول در pH= ۴/۶ 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 انجام گرفت، نشان داد 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

همکاران (۲۰۰۵). این سویه‌های استاترتری 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

سه راه اصلی تغییرات در حین نگهداری پنیر تبدیلات لاکتوز، چربی و کاربئن‌ها است. کشتهای استاترتری که در این تخمیرها استفاده می‌شوند، منبع عمده آنزیم‌هایی هستند که در رسیدن پنیر دخالت می‌کنند (اسمیت و

می‌باشد. برای مثال در یک روش از دمای بالا برای سرعت بخشیدن به رسیدن پنیر استفاده می‌شود. بالا بردن دمای رسیدن باعث افزایش تجزیه  $\beta$  و  $\alpha$  کازئین می‌شود 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 ۱۹۹۶).

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 و همکاران ۱۹۹۴).

محصولات تجزیه‌ای پروتئولیز غلظت پپتید و آمینواسید را افزایش می‌دهد (سود و کوسیوکیسکی ۱۹۷۹). آمینواسیدها عمده‌ترین اجزای پنیری محلول در آب می‌باشند 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 *باسیلیوس سوبتیلیس* و پروتئاز گیاهی ارزان‌ترین آنزیم‌ها برای هیدرولیز پروتئین می‌باشند (کیکاولی، 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 ۱۹۸۶). همچنین اسیدهای چرب آزاد می‌توانند به وسیله میکروارگانیسم‌ها به یکدیگر و اغلب به ترکیبات طعمی قوی تبدیل شوند، از جمله متیل کتون‌ها، لاکتون‌ها، استرها، الکل‌ها و آلدئیدهای 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 و اسیدهای آمینه تجزیه کرده و علاوه بر رفع نیازهای تغذیه‌ای خود به طعم

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

فاکس و همکاران (۱۹۹۶) و آذرنیا و همکاران (۲۰۰۶) 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 (۱۹۹۴) در پنیر چدار ابهامات موجود برای لاکتوکوکوس را رفع کردند.

استفاده از شوک حرارتی برای سلول‌های *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* DPC۴۵۷۱ در تولید پنیر اصلاح شده آنزیمی منجر به پروتئولیز ثانویه بیشتر می‌شوند و همچنین طعم قوی در محصولات ایجاد می‌کند (لی و همکاران ۲۰۰۷).

درویتز 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 می‌باشد. در واقع استارترهای لاکتیکی، دارای آنزیم‌های درون سلولی نظیر پپتیداز، لیپاز و آنزیم‌های کاتابولیسیم 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

افزودن لیپاز توسط بعضی شرکت‌ها مانند APV (APV Ltd., Silkeborg, Denmark) برای تسریع رسیدن پنیر UF پیشنهاد شده است (میستری و مایوس 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 می‌توان محصول مطلوب و ثابت بدست آورد. در تحقیق جاری بررسی اثرات آنزیم‌های لیپاز ریزوموکور مهی و پروتئاز لاکتوباسیلوس پلانتروم 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 پلانتروم لیوفیلیزه شده از روش کراسیکوپ و همکاران (۲۰۰۴) 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٪<sup>۱</sup> Amp<sup>۱</sup> و فرکانس ۲۰ کیلوهرتز با ۲۰ دور ۳۰ ثانیه‌ای داخل یخ انجام شد. پس از اولتراسوند، عمل سانتریفیوژ به منظور جدا کردن باکتری‌ها و سلول‌های لیز شده در دمای ۴ 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).

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 پلانتروم 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 مایوس 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 می‌کنند (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. مطمئناً 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 مگر اینکه به شیر تغلیظ شده، لیپاز افزوده شود و یا فلور میکروبی پنیر آن را تولید کند (دیت ۲۰۰۶). استراژهای 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 مایوس ۱۹۹۳).

<sup>۱</sup> - Amplitude

### آزمایشات فیزیکی شیمیایی

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 ۷۶۰). ازت کل نمونه‌های پنیر به روش کلدال اندازه‌گیری شد. مقدار نمونه برای هر یک از پنیرها ۰/۵ گرم بود. مقدار پروتئین کل از حاصل ضرب مقدار ازت اندازه‌گیری شده در ضریب تبدیل ۶/۳۸ محاسبه گردید (IDF) (۱۹۶۴).

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 ۴۰۰ گرمی حاوی رتنیت در ۳ 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 حصار، احسانی، خسروشاهی و مک سوونی (۲۰۰۶) 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 ۴۸-۲۴ ساعت طول کشید. بعد از این مرحله پنیرها وارد سردخانه شده و در هر ۲ هفته آزمایشات مربوطه انجام شد.

جدول ۱- غلظت آنزیم در نمونه‌های پنیر

تیما	غلظت آنزیم
A	شاهد
B	۰/۱۲ گرم در لیتر لیپاز تجاری ۲/۵ میلی‌لیتر در لیتر عصاره آنزیمی استخراج شده از لاکتوباسیلوس پلاننتاروم
C	۰/۲۴ گرم در لیتر لیپاز تجاری و ۵ میلی‌لیتر در لیتر عصاره آنزیمی استخراج شده از لاکتوباسیلوس پلاننتاروم
D	۰/۱۲ گرم در لیتر لیپاز تجاری
E	۰/۲۴ گرم در لیتر لیپاز تجاری

ازت محلول در  $\text{pH} = 4/6$ 

آماده سازی و استخراج ازت محلول در  $\text{pH} = 4/6$  طبق روش اصلاح شده کوچورو و فاکس (۱۹۸۲) صورت گرفت. نمونه‌های ۳۰ گرمی پنیر پس از افزودن ۶۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آنها، همگن گردیدند. پس از آن  $\text{pH}$  نمونه‌ها با استفاده از محلول  $\text{HCl}$  و  $\text{NaOH}$  ۰/۱ نرمال در ۴/۶ تنظیم شد. سپس نمونه‌ها نیم ساعت به حال خود رها گردیدند. پس از آن مجدداً  $\text{pH}$  نمونه‌ها در ۴/۶ تنظیم شدند و سپس سانتریفوژ گردیدند (۴۰۰۰g به مدت نیم ساعت). پس از سانتریفوژ، نمونه‌ها با استفاده از کاغذ صافی واتمن ۴۲ و پشم شیشه صاف و ازت محلول با روش کجدال مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. قسمت رسوبات در لوله‌های آزمایش منجمد شد و برای آزمایش‌های الکتروفورز نگهداری گردید (کوچورو و فاکس ۱۹۸۲).

## اندازه‌گیری شدت لیپولیز

نمونه‌های پنیر (۱۰ گرم) با ۶ گرم سولفات سدیم بدون آب کاملاً همگن شد و با ۶۰ 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  $\text{KOH}$  اتانولی ۰/۱ نرمال در حضور معرف فنل فتالین تیترا گردید. بعد از تیتراسیون حلال در زیر هود تبخیر شد. چربی باقی‌مانده توزین و مقدار کل اسیدهای چرب آزاد در پنیر با واحد میلی‌اکی والان در ۱۰۰ گرم چربی ( $\text{meq}/100\text{g}$ ) بیان گردید (نونز و همکاران ۱۹۹۶).

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، تند، شوری، تلخی و ارزیابی کلی بررسی شدند و به هر یک از این ویژگی‌ها از ۱ تا ۵ امتیاز داده شد به طوری که امتیاز ۱ مربوط به نمونه بسیار بد و امتیاز ۵ 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<sup>۲</sup> استفاده شد و اثر دو آنزیم لیپاز و پروتئاز در روزهای (۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰) در طول رسیدن مورد بررسی قرار گرفت. 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 ۵٪ در نظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل آماری با نرم افزار SAS (SAS institute Inc., version 8.2, Cary., NC) و رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel صورت گرفت.

## نتایج و بحث

## ماده خشک

ماده خشک نمونه‌های پنیر در روزهای ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ 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 ۶۰ افزایش

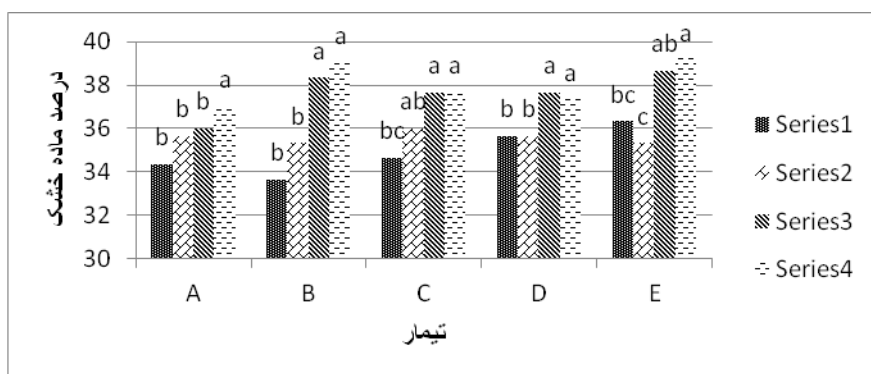
2. Split plot in time

افزایش اسیدیته مربوط به تولید اسیدلاکتیک حاصل از تخمیر می‌باشد (فاکس و همکاران ۲۰۰۰) که همگی این عوامل موجب افزایش pH بعد از ۴۵ روز از رسیدن می‌شوند (مک سوئینی ۲۰۰۴). در حین رسیدن و یا نگهداری پنیر، باقی‌مانده لاکتوز تخمیر شده و pH به ۴/۲ کاهش می‌یابد. مواد معدنی متصل به میسل‌های کازئینی با این‌که موجب افزایش ظرفیت بافری ناتراوه می‌شوند ولی می‌تواند سینتیک اسیدیفیکاسیون باکتری-های اسید لاکتیک را تغییر دهند (میستری و مایوس 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 ۵/۵ ساب‌میسل‌ها به تجمعات کوچک کازئینی تجزیه می‌شوند. وقتی pH به نقطه ایزوالکتریک می‌رسد ماتریکس پروتئینی فشرده و کوتاه می‌شود. همچنین در pH کمتر از ۴/۸ تجمعات کازئینی به رشته‌های غیر خطی تبدیل می‌شوند (کریمی و همکاران ۲۰۰۹).

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).

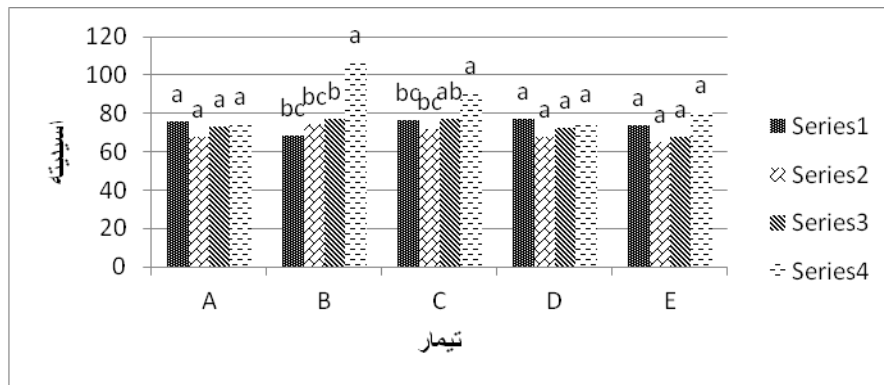
در مورد تغییرات اسیدیته نیز در طی مدت رسیدن، اثر نوع تیمار و زمان رساندن و تاثیر متقابل این دو فاکتور معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) بود، به طوری که در طی مدت رساندن، اسیدیته نمونه‌ها افزایش یافت. در بین تیمارها نیز نمونه‌های دارای عصاره آنزیمی بیشترین اسیدیته را نشان دادند.

pH و اسیدیته از فاکتورهای هستند که تاثیر زیادی بر روی پایداری پنیر و شرایط رشد میکرواورگانیزم‌ها، فعالیت آنزیمی و سرعت واکنش‌های بیوشیمیایی در طی رسیدن دارند. افزایش اسیدیته با کاهش pH طی دوره رسیدن ناشی از تخمیر لاکتوز و تولید اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب در اثر پروتئولیز و لیپولیز می‌باشد. تولید اسیدهای آمینه در ماه اول رسیدن با شدت زیادی ادامه دارد، ولی با این حال عامل مهم در کاهش pH یا



شکل ۱- تغییرات درصد ماده خشک 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: ۰/۲۴ گرم در لیتر لیپاز و ۵ میلی‌لیتر در لیتر عصاره آنزیمی، D: ۰/۱۲ گرم در لیتر لیپاز تجاری، E: ۰/۲۴ گرم در لیتر لیپاز تجاری)



شکل ۲- 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: ۰/۲۴ گرم در لیتر لیپاز و ۵ میلی‌لیتر در لیتر

عصاره آنزیمی، D: ۰/۱۲ گرم در لیتر لیپاز تجاری، E: ۰/۲۴ گرم در لیتر لیپاز تجاری)

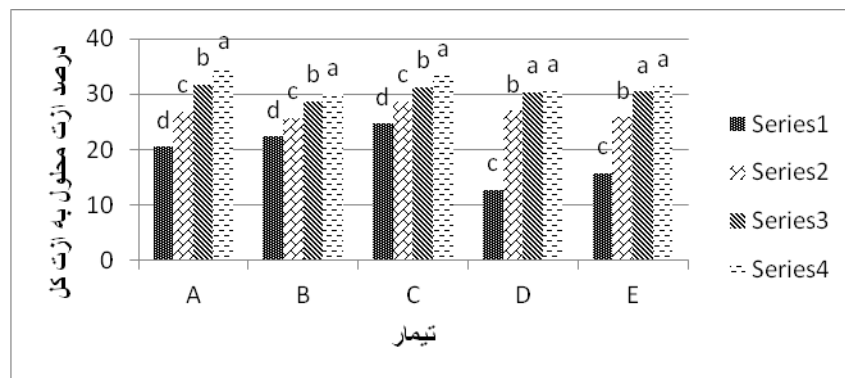
فاکتور رسیدن بود. بر اساس مقایسه میانگین‌ها به روش توکی، سرعت افزایش فاکتور رسیدن در طی دوره رسیدن کاهش یافته است که نشان می‌دهد اصلی‌ترین مرحله رسیدن در پنیر فرآپالایش، ۳۰ روز اول می‌باشد. افزایش تدریجی ازت محلول، توام با گذشت زمان موجب افزایش فاکتور رسیدن می‌شود که به دلیل تجزیه قسمت عمده مواد پروتئینی از شکل غیر محلول به شکل محلول (واحدهای کوچکتر) می‌باشد (مندیا و همکاران ۲۰۰۰).

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 ( $P > 0.05$ ).

#### 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 ( $P < 0.05$ ) بر روی تغییرات درصد ازت محلول به ازت کل ( $SN/TN\%$ )<sup>۳</sup> در طی ۶۰ 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 در ۳۰ روز اول بیشتر از نمونه کنترل بود ولی در ۳۰ روز بعدی تقریباً با نمونه کنترل یکسان بوده و حتی نمونه کنترل دارای بیشترین مقدار

3. Soluble Nitrogen/ Total Nitrogen



شکل ۳- درصد نسبت ازت محلول به ازت کل نمونه‌های مختلف در طی دوره نگهداری

(A: شاهد، B: ۰/۱۲ گرم در لیتر لیپاز و ۲/۵ میلی‌لیتر در لیتر عصاره آنزیمی، C: ۰/۲۴ گرم در لیتر لیپاز و ۵ میلی‌لیتر در لیتر عصاره آنزیمی، D: ۰/۱۲ گرم در لیتر لیپاز تجاری، E: ۰/۲۴ گرم در لیتر لیپاز تجاری)

آزمایشی، نوع تیمار آزمایشی، فاصله زمانی و همچنین اثر متقابل این دو فاکتور دارای تاثیر معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) 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 ۶۰ 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 وجودی که دارای مقادیر مساوی از آنزیم لیپاز بودند. ولی در بررسی آماری این تفاوت معنی‌دار نبود ( $P < 0.05$ ).

میزان لیپولیز در همه تیمارها در طول زمان افزایش نشان داد که مطابق نتایج مکسونینی (۱۹۹۷) می‌باشد و نشان‌دهنده افزایش فعالیت لیپازی لاکتوباسیل با گذشت زمان می‌باشد. فعالیت لیپولیتیکی لاکتوباسیلوس پلانتروم 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

### بررسی درجه هیدرولیز سیستم کازئین

الکتروفورز بر روی ژل پلی آکریل آمید مطابق شکل ۴، هیدرولیز کازئین‌ها در نمونه‌های پنیر را نشان می‌دهد که با کم‌رنگ شدن تدریجی باندهای مربوط به  $\alpha_1$  - کازئین و  $\beta$  - کازئین و تولید ترکیبات حاصل از تجزیه آن‌ها قابل تشخیص می‌باشد. افزایش شدت رنگ باندهای محصولات حاصل از تجزیه  $\alpha_1$  کازئین و  $\beta$  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 ( $P < 0.05$ ) 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  $\beta$  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.

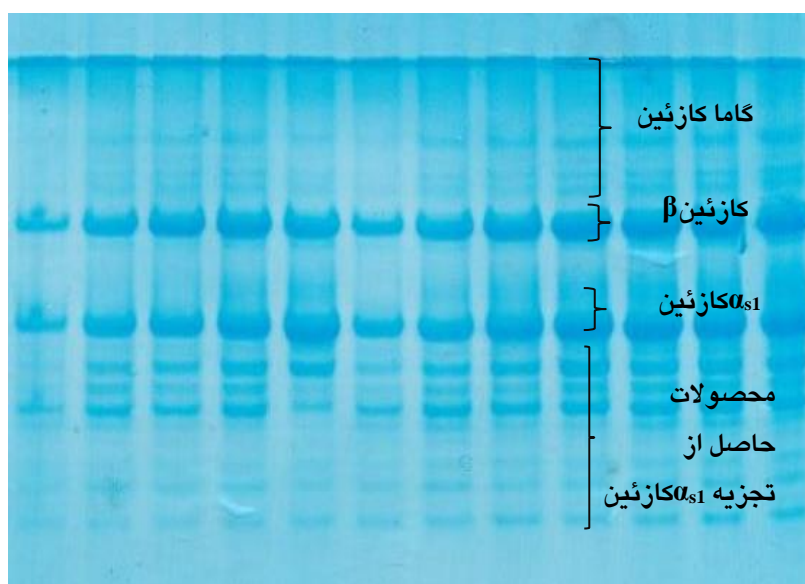
### تغییرات لیپولیز

بر اساس نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اندازه‌گیری اندیس لیپولیز طی دوره رسیدن نمونه‌های



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

تیما ر A	تیما ر C	تیما ر B
----------	----------	----------

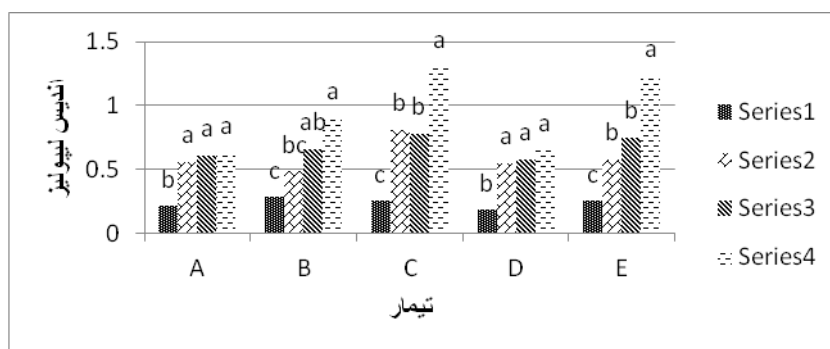


روز نمونه برداری

۱۵	۳۰	۴۵	۱۵	۳۰	۴۵	۶۰	۱	۱۵	۳۰	۴۵	۶۰
----	----	----	----	----	----	----	---	----	----	----	----

شکل ۴- 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: ۰/۲۴ گرم در لیتر لیپاز و ۵ میلی‌لیتر در لیتر عصاره آنزیمی)



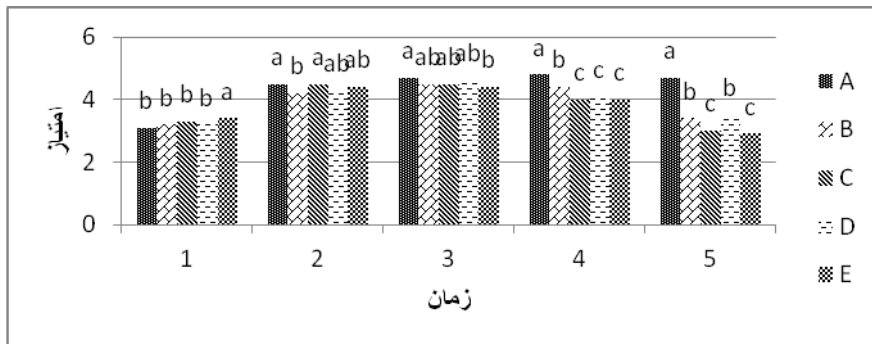
شکل ۵- اندیس لیپولیز نمونه‌های پنیر در طی دوره نگهداری

A): شاهد، B: ۰/۱۲ گرم در لیتر لیپاز و ۲/۵ میلی‌لیتر در لیتر عصاره آنزیمی، C: ۰/۲۴ گرم در لیتر لیپاز و ۵ میلی‌لیتر در لیتر عصاره آنزیمی، D: ۰/۱۲ گرم در لیتر لیپاز تجاری، E: ۰/۲۴ گرم در لیتر لیپاز تجاری)

**ارزیابی حسی**

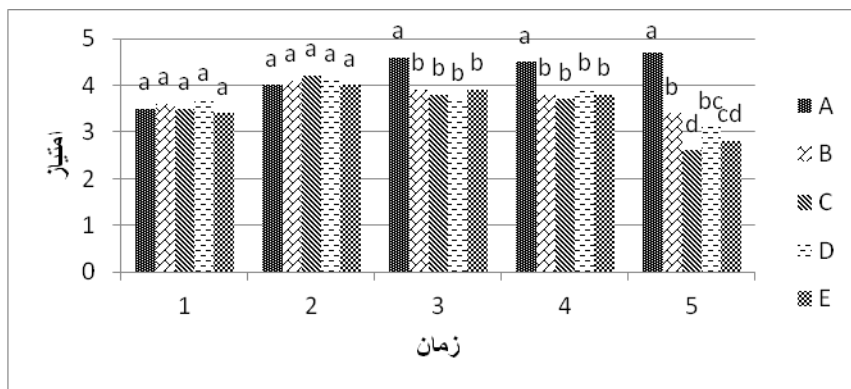
آنالیز آماری داده‌های مربوط به ویژگی ظاهری، بافت، تلخی و شورری تفاوت معنی‌داری نشان نداد ( $P < 0.05$ ) ولی امتیازات مربوط به عطر و طعم، طعم رنسید و ارزیابی کلی دارای تفاوت معنی‌داری بودند ( $P < 0.05$ ). به‌طوری‌که در هر ۳ ویژگی، تیمار A (کنترل) دارای بیشترین امتیاز و تیمار E (دارای غلظت بالای لیپاز)

دارای کمترین امتیاز بود. امتیازات عطر و طعم، طعم رنسید و ارزیابی کلی نمونه‌های حاوی آنزیم تا روز ۳۰-ام دوره نگهداری افزایش داشته ولی در طی روزهای ۴۵ و ۶۰ کاهش یافته است که احتمالاً به دلیل فعالیت بیش از حد آنزیمی بوده است. ولی امتیاز تیمار کنترل تا روز ۱۵ام افزایش یافته و سپس ثابت مانده است.



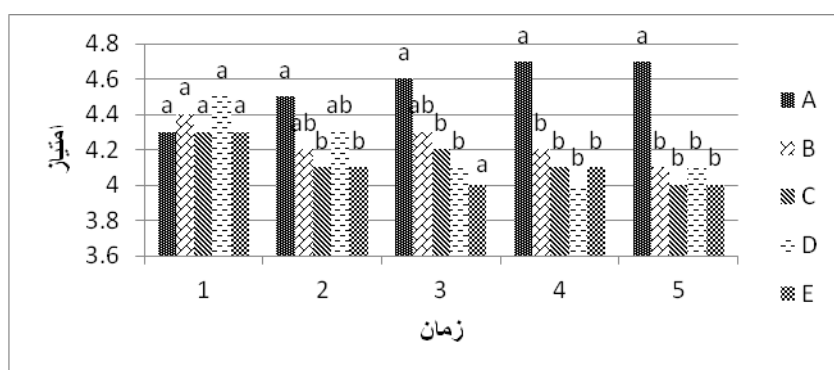
شکل ۶- امتیازات مربوط به طعم رنسید نمونه‌های مختلف در طی دوره نگهداری

(A: شاهد، B: ۰/۱۲ گرم در لیتر لیپاز و ۲/۵ میلی‌لیتر در لیتر عصاره آنزیمی، C: ۰/۲۴ گرم در لیتر لیپاز و ۵ میلی‌لیتر در لیتر عصاره آنزیمی، D: ۰/۱۲ گرم در لیتر لیپاز تجاری، E: ۰/۲۴ گرم در لیتر لیپاز تجاری)



شکل ۷- امتیازات مربوط به عطر و طعم نمونه‌های مختلف در طی دوره نگهداری

(A: شاهد، B: ۰/۱۲ گرم در لیتر لیپاز و ۲/۵ میلی‌لیتر در لیتر عصاره آنزیمی، C: ۰/۲۴ گرم در لیتر لیپاز و ۵ میلی‌لیتر در لیتر عصاره آنزیمی، D: ۰/۱۲ گرم در لیتر لیپاز تجاری، E: ۰/۲۴ گرم در لیتر لیپاز تجاری)



شکل ۸- 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: ۰/۲۴ گرم در لیتر لیپاز و ۵ میلی‌لیتر در لیتر عصاره آنزیمی، D: ۰/۱۲ گرم در لیتر لیپاز تجاری، E: ۰/۲۴ گرم در لیتر لیپاز تجاری)

#### منابع مورد استفاده

- سازمان ملی استاندارد، اندازه‌گیری مقدار نمک پنیر، شماره ۱۸۰۹.
- سازمان ملی استاندارد، اندازه‌گیری ازت کل پنیر شماره ۶۳۹.
- سازمان ملی استاندارد، اندازه‌گیری چربی پنیر شماره ۷۶۰.
- سازمان ملی استاندارد، اندازه‌گیری مقادیر pH و اسیدیته پنیر شماره ۲۸۵۲.
- سازمان ملی استاندارد، ارزیابی حسی پنیر شماره ۴۹۳۸.
- 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 proteolysis 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 Lipolysis 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.

- 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 adjunct Lactobacilli to proteolysis, volatile profiles and sensory characteristics of washed-cured cheese. *Lait* 83:31-43.
- IDF, 1964. Determination of protein content of cheese products standard 25. Brussels, Belgium. 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.
- Mcsweeney 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.

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

P Solhi<sup>1\*</sup>, A Sadeghi Mahoonak<sup>2</sup>, J Hesari<sup>3</sup>, M Ghorbani<sup>2</sup> and M Alami<sup>4</sup>

Received: December 03, 2013 Accepted: February 16, 2014

<sup>1</sup>MSc Student, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran

<sup>2</sup>Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran

<sup>3</sup>Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran

<sup>4</sup>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