

تأثیر دمای رسیدن و غلظت آب نمک بر سینتیک پروتئولیز پنیر لیقوان

بهاره شریعتی مرغ ملکی^۱، جواد حصاری*^۲ و ناصر همدمی^۳

تاریخ دریافت: ۹۲/۳/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۱/۲۱

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

^۲ استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

^۳ دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

*مسئول مکاتبه: Email: jhesari@tabrizu.ac.ir

چکیده

رسیدن یکی از مهم‌ترین مراحل تولید پنیر است. پس از ایجاد دلمه از شیر، برای دستیابی به خواص ارگانولپتیکی مطلوب، دلمه در شرایط محیطی مناسب قرار می‌گیرد تا فرآیند رسیدن کامل شود. اساسی‌ترین پدیده‌ای که در حین رسیدن رخ می‌دهد پروتئولیز است. از عوامل مؤثر بر این پدیده می‌توان به دما، غلظت نمک، فعالیت آبی لخته و میزان آنزیم‌های منعقد کننده باقی‌مانده در لخته اشاره نمود. در این تحقیق، به مطالعه اثر دما در سه سطح ۴، ۸ و ۱۲ درجه سانتی‌گراد در غلظت‌های نمک ۸ و ۱۰ و ۱۲ درصد در مدت دو ماه بر سینتیک پروتئولیز و ثابت سرعت آن پرداخته شده است. برای این منظور، هر دو هفته نمونه‌برداری انجام شده و نمونه‌ها تحت آزمایش‌های فیزیکی شیمیایی قرار گرفتند. به منظور بررسی سینتیک واکنش‌ها، میزان ازت محلول در $pH= 4/6$ ، ازت غیر پروتئینی و شدت لکه‌های آلفا و بتاکازئین در ژل الکتروفورز آکریل آمید-اوره اندازه‌گیری شد. با افزایش دما تجزیه آلفا و بتاکازئین و تولید ازت محلول در $pH= 4/6$ و ازت غیر پروتئینی تشدید گردید. همچنین نتایج نشان دادند که با افزایش دما در غلظت نمک ثابت، ثابت سرعت واکنش‌ها افزایش می‌یابد بطوری که میزان ثابت سرعت محاسبه شده در دمای ۱۲ درجه سانتی‌گراد در مورد همه شاخص‌ها بیشترین مقدار را به خود اختصاص داد. با بررسی سینتیک پروتئولیز در پنیر و اثر متقابل دما و زمان بر آن، شرایط بهینه رسیدن شامل دمای ۸ درجه سانتی‌گراد و غلظت نمک ۱۰ درصد و مدت زمان ۶ هفته برای دستیابی به محصولی مقرون بصرفه با خواص ارگانولپتیکی مناسب و بازارپسندی بالا تعیین گردید.

واژگان کلیدی: پنیر لیقوان، پروتئولیز، دما، سینتیک

مقدمه

پنیر لیقوان نوعی پنیر نیمه سخت با حدود ۶۰ درصد رطوبت است که به صورت سنتی از شیر خام گوسفند و بدون افزودن کشت آغازگر تهیه می‌شود (عدالتیان و همکاران ۲۰۱۰). پس از ایجاد دلمه برای دستیابی به خواص ارگانولپتیکی مطلوب، لخته به منظور رسیدن در شرایط محیطی مناسب قرار می‌گیرد. در این دوره باکتری‌های آغازگر، غیر آغازگر و همچنین آنزیم‌های باقیمانده در لخته به فعالیت خود ادامه می‌دهند. در نتیجه ویژگی‌های شیمیایی، فیزیکی و باکتریولوژیکی پنیر تغییر کرده و باعث توسعه و بهبود طعم، مزه و بافت ویژه در طول رسیدن می‌گردد (حصاری ۱۳۸۳).

پروتئولیز، گلیکولیز و لیپولیز سه واکنش اصلی هستند که در طول رسیدن رخ می‌دهند. پروتئولیز شامل دو مرحله پروتئولیز اولیه و ثانویه است. پروتئولیز اولیه به آن دسته از تغییراتی که بر روی کازئین‌ها، پپتیدها و سایر ترکیباتی که با الکتروفورز ژلی اوره-پلی‌اکریل‌آمید قابل شناسایی هستند، اطلاق می‌شود. در پروتئولیز ثانویه، پپتیدهای بزرگ بوسیله پروتئازها و پپتیدازهای استارت‌تری و غیراستارت‌تری به پپتیدهای کوچک و آمینواسیدهای آزاد تبدیل می‌شوند. این واکنش‌ها منجر به تولید ترکیبات مختلفی از قبیل آمونیاک، آمین‌ها، آلدهیدها، فنول‌ها، اندول‌ها و الکل‌ها می‌گردند (سیهوفه و همکاران ۲۰۰۵). دمای محیط عاملی است که رشد میکروارگانیسم‌ها و نیز واکنش‌های بیوشیمیایی لخته را تنظیم می‌کند. در دمای پائین، سرعت رشد میکروارگانیسم‌ها و همچنین سرعت واکنش‌های بیوشیمیایی کاهش می‌یابد. از طرف دیگر درجه حرارت-های بالا، طعم‌های نامطلوب و ناخواسته را گسترش می‌دهد (کوجاوسکی و همکاران ۲۰۰۳). مشخص شده است که دمای نگهداری بالا، بیشترین اثر را بر پروتئولیز دارد ولی تأثیر دما غیر اختصاصی است یعنی به همان اندازه که سرعت پروتئولیز را بالا می‌برد، سرعت واکنش‌های نامطلوب و همچنین احتمال رشد میکروارگانیسم‌های

آلوده‌کننده و ناخواسته مثل کپک‌ها را نیز بالا می‌برد (سیهوفه و همکاران ۲۰۰۵). مناسب‌ترین دمای رسیدن برای هر نوع پنیر، دمایی است که در آن واکنش‌های بیوشیمیایی مختلف به نسبت متعادل رخ می‌دهند و منجر به بروز عطر و طعم و ویژگی‌های مطلوب در پنیر رسیده می‌شوند.

به طور کلی روابط سرعت، ارتباط بین سرعت از بین رفتن واکنش دهنده یا سرعت تولید محصول در واکنش و غلظت مواد را در هر زمان تعیین می‌نمایند. مرتبه واکنش عبارتست از مجموع توان‌هایی که در جملات غلظت در شکل دیفرانسیلی معادله سرعت واکنش دیده می‌شوند. در جدول ۱ قوانین مربوط به سرعت و مرتبه واکنش‌ها ذکر شده‌است.

جدول ۱- قوانین مربوط به سرعت واکنش

مرتبه واکنش	معادله واکنش
۰	$\frac{dx}{dt} = (a-x)^0 = k$
۱	$\frac{dx}{dt} = k(a-x)$
۲	$\frac{dx}{dt} = (a-x)^2$
۳	$\frac{dx}{dt} = k(a-x) - (b-x)$
۴	$\frac{dx}{dt} = k(a-x) - (b-x)^2$

به طور معمول از رابطه آرنیوس به منظور تعیین میزان وابستگی دمایی واکنش‌ها استفاده می‌شود.

$$K = K_0 \exp\left[-\frac{E_a}{RT}\right] \quad [1]$$

که E_a انرژی اکتیواسیون (کیلوکالری/کیلوگرم)، R ثابت گازها

(کیلومول × کلورین / ۸/۳۱۴)، T ، دما (درجه کلورین) است. طبق

مطالعاتی که توسط سیهوفه و همکاران (۲۰۰۳) انجام شد، ثابت‌های سینتیکی بدست آمده برای تجزیه α_1 -کازئین در محدوده (روز) 0.002 تا 0.016 بود و انرژی

اکتیواسیون واکنش در حدود $26 \frac{\text{کیلوکالری}}{\text{مول گرم}}$ محاسبه گردید.

تولید شده در دمای ۴، ۸ و ۱۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲ ماه نگهداری شدند.

اندازه‌گیری ازت محلول در pH=۴/۶

مقدار ۶۰ میلی لیتر آب مقطر به ۳۰ گرم نمونه های پنیر در دمای آزمایشگاه اضافه و همگن شد. سپس pH آنها با استفاده از محلول HCl و سود ۲ نرمال در ۴/۶ تنظیم گردید و اجازه داده شد که به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه باقی بمانند. پس از آن مجدداً pH تنظیم شده و در آن با دمای ۴۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفته و در مرحله بعد سانتریفوژ انجام شد (۴۰۰۰g) به مدت نیم ساعت). پس از سانتریفوژ، نمونه‌ها با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۴۲ و پشم شیشه صاف و ازت محلول با روش کجلدال مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. رسوبات نیز در ظروف اپندوروف منجمد شده و برای آزمایش‌های الکتروفورز نگهداری گردید (زکوچور و همکاران ۱۹۸۲).

اندازه‌گیری ازت محلول در تری کلرواستیک‌اسید (NPN) به ۲۰ میلی لیتر از محلول صاف شده برای اندازه‌گیری ازت محلول، ۵ میلی لیتر از محلول تری کلرواستیک‌اسید (TCA) با غلظت ۶۰ درصد اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت نیم ساعت در دمای معمولی قرار گرفتند و پس از سانتریفوژ (۵۰۰۰g) به مدت ۱۰ دقیقه، محلول رویی صاف و مقدار ازت آن با روش کجلدال اندازه‌گیری شد (کوچور و همکاران ۱۹۸۲).

اندازه‌گیری درجه هیدرولیز سیستم کازئینی پنیر طی رسیدن

به منظور ارزیابی میزان هیدرولیز کازئین‌ها از الکتروفورز ژلی اوره پلی‌آکریل‌آمید استفاده شد که یک روش متداول برای اندازه‌گیری تجزیه پروتئین‌ها است (شلابی و همکاران ۱۹۸۷). اساس جداسازی در این روش، تفاوت در وزن مولکولی، بار الکتریکی و ساختمان پروتئین‌ها می باشد. برای اندازه‌گیری شدت رنگ لکه‌های ایجاد شده در الکتروفورز از نرم افزار Image J استفاده گردید.

از آنجایی که دما و زمان از مهم‌ترین عوامل بیرونی قابل کنترل در رسیدن پنیر محسوب می‌شوند، در این تحقیق به مطالعه اثر این عوامل بر رسیدن پنیر ليقوان پرداخته شد و با محاسبه درجه واکنش‌ها و انرژی اکتیواسیون، تغییرات کمی و کیفی ایجاد شده به عنوان تابعی از عوامل مذکور با هدف کنترل فرآیند و تعیین بهترین شرایط رسیدن بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

مواد اولیه

شیر گوسفندی از گوسفندداری‌های اطراف منطقه ليقوان تهیه گردید. کلیه مواد آزمایشگاهی مورد استفاده در این پژوهش ساخت کارخانه مرک آلمان و با درجه خلوص تجزیه‌ای بودند.

جدول ۲- ویژگی‌های شیمیایی شیر گوسفندی مورد استفاده

آب (%)	۸۳
پروتئین (%)	۵/۲۵
چربی (%)	۶/۵
کربوهیدرات (%)	۵/۲

روش تولید پنیر

برای تهیه پنیر ليقوان، به شیر دردمای ۲۶-۲۰ درجه سانتیگراد، مایه پنیر (رنت) اضافه شده و بعد از گذشت ۱/۵-۲ ساعت لخته تولید گردید. سپس لخته‌ها را برش زده و بعد از خروج آب پنیر و فشردن لخته‌ها، دومرتبه بوسیله برش‌های عمودی و افقی به قطعات کوچکتری تقسیم شدند. در مرحله بعد، دلمه‌ها در آب نمک اشباع ۲۳-۲۵ درصد در دمای ۱۶-۱۳ درجه سانتیگراد بمدت ۱۲ ساعت قرار گرفتند (حصاری ۱۳۸۳). در نهایت نمونه‌ها در بسته‌های حاوی آب نمک پاستوریزه با غلظت ۸، ۱۰ و ۱۲ درصد بسته بندی شدند. در پایان نمونه‌های

تعیین درجه واکنش

برای توصیف ریاضی تغییرات پارامترهای کیفی اندازه گیری شده به عنوان تابعی از زمان در دماهای گوناگون از معادلات سینتیکی درجه صفر، درجه اول و معادله ویبل^۱، استفاده شد.

$$Y = kt + b \quad [۲] \text{ معادله درجه صفر}$$

$$Y = A \exp(kt) \quad [۳] \text{ معادله درجه یک}$$

$$Y = A \exp(k \times t^B) \quad [۴] \text{ معادله ویبل}$$

در معادلات فوق ضرایب A و B مربوط به متغیرهای وابسته اندازه‌گیری شده، t همان زمان و K، ثابت سرعت واکنش می‌باشند.

در ابتدا با توجه به داده‌های آزمایشگاهی، نمودار شاخص مورد نظر در مقابل زمان برای هر تیمار رسم شد و با توجه به ضریب تصحیح معادلات خط به دست آمده، بهترین و ساده‌ترین مرتبه واکنش برای هر شاخص در تیمار مورد نظر تعیین گردید. بر اساس معادله خط بدست آمده ثابت سرعت و سایر ضرایب معادلات محاسبه شد. قابل ذکر است که با استفاده از دستور سلور در نرم‌افزار اکسل ضرایب مربوط به معادلاتی که از مدل ویبل پیروی می‌کنند، مشخص شد. به منظور تأیید مدل، مقدار ضرایب با استفاده از انرژی اکتیواسیون و ضریب A بدست آمده از داده‌های تجربی، محاسبه شده و در نهایت با استفاده از این اعداد، داده‌های مربوط به شاخص مورد نظر را با استفاده از مدل محاسبه نموده و با داده‌های آزمایشگاهی مقایسه شد. به منظور مقایسه داده‌های حاصل از مدل با داده‌های آزمایشگاهی از RSME و ضریب تصحیح استفاده شد.

$$RSME = \left[\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (MR_{exp,i} - MR_{pre,i})^2 \right]^{1/2}$$

آنالیز آماری

طرح آزمایشی مورد استفاده از نوع فاکتوریل بر پایه طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی بود و مقایسه حداقل میانگین مربعات (LSM)، اثرات تیمارها با نرم افزار SAS و آزمون دانکن صورت گرفت.

نتایج و بحث

تغییرات ازت غیر پروتئینی به ازت کل

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها در جدول ۳ نشان داد که اثر دما، غلظت نمک و زمان بر روی میزان ازت غیرپروتئینی و همچنین اثر متقابل دوگانه و اثر متقابل سه‌گانه آنها بر تغییرات این شاخص معنی‌دار است ($P < 0.05$). با توجه به مقایسه حداقل میانگین مربعات اثر متقابل سه‌گانه می‌توان نتیجه‌گیری نمود که بالا رفتن دما در غلظت نمک یکسان، موجب افزایش ازت غیرپروتئینی شده است (جدول ۴). علت آن را می‌توان به فعالیت بیشتر آنزیم‌ها در دمای بالاتر و همچنین لیز شدن سریعتر میکروارگانیزم‌ها و آزاد شدن آنزیم‌های آنها نسبت داد. از روز اول تا هفته چهارم، تفاوت معنی داری بین دمای ۸ و ۱۲ درجه سانتی‌گراد در مقدار ازت غیرپروتئینی مشاهده نشد. اما از هفته چهارم تا هفته هشتم تفاوت‌ها معنی دار بود و بالا رفتن دما موجب افزایش بیشتری در مقدار ازت غیر پروتئینی گردیده است. تأثیر زمان نیز بر روی این شاخص مثبت بوده و گذشت زمان موجب افزایش ازت غیر پروتئینی شده است. گایا و همکاران (۱۹۹۰)، علیزاده و همکاران (۱۳۸۴)، عباسی منفرد و همکاران (۱۳۸۶) نیز نتایج مشابهی گزارش نموده‌اند.

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس ویژگی‌های اندازه‌گیری شده در پنیر لیقوان در تیمارهای مختلف (حداقل میانگین مربعات)

منبع تغییرات	ازت محلول	ازت غیر پروتئینی	بتاکازئین	آلفاکازئین
دما	۰/۶۲۶۰۸۴	۳/۴۵۲۷۸*	۳۳۲/۲۷۳*	۴۷۸/۳۹۲*
زمان	۱۶/۰۰۶*	۲/۰۰۴۹۸*	۱۳۳۹/۸۷*	۱۵۶۶/۱۳۷*
نمک	۰/۴۲۱۲*	۰/۰۱۸۴۵	۷۷۸/۸۶*	۱۱۵۹/۷۶۵*
نمک×دما	۰/۰۲۷۰*	۰/۰۷۱۱۹*	۱۹/۸۷۰*	۰/۵۵۱*
نمک×زمان	۰/۲۰۴۵*	۰/۱۰۰۰۳*	۱۰/۷۲۶*	۲۰/۴۴۲۲*
دما×زمان	۰/۰۳۰۷*	۰/۱۰۳۷۱۸	۱۸/۵۷۰*	۱۰/۳۷۴۶*
دما×نمک×زمان	۰/۰۱۶۳۹	۰/۰۸۲۵۹*	۱۸/۶۵۱۳*	۰/۴۸۵۸۸*
خطا	۰/۰۰۹	۰/۰۰۱	۰/۰۳۸	۰/۰۰۶*

* معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد

جدول ۴- مقایسه LSM اثر متقابل سه گانه دما، غلظت نمک و زمان بر شاخص‌های اندازه‌گیری شده

غلظت نمک	دما	زمان	ازت غیرپروتئینی	سطح لکه آلفاکازئین	سطح رنگ لکه بتاکازئین
درصد	C°	روز	درصد		
	۴	۱۴	۲/۰۱ ^a	۸۶/۶۴۵ ^a	۹۰/۹۶ ^a
	۴	۲۸	۲/۲۱۳ ^b	۷۹/۲۳۳ ^b	۸۲/۵۸ ^b
	۴	۴۲	۲/۲۵ ^b	۷۳/۵۴۸ ^c	۷۷/۱۷۷ ^c
	۴	۵۶	۲/۵۳ ^c	۶۷/۶۵۲ ^d	۷۳/۰۴۳ ^d
	۸	۱۴	۲/۱۳ ^d	۸۴/۵۰۴ ^e	۸۶/۷۹۹ ^{ev}
	۸	۲۸	۲/۵۳ ^c	۷۶/۹۹۸ ^f	۸۰/۱۹۸ ^f
۸	۸	۴۲	۲/۹ ^f	۷۰/۴۷۹ ^g	۷۴/۶۵۴ ^g
	۸	۵۶	۳/۱ ^g	۶۳/۱۷۸ ^h	۷۰/۰۷۸ ^h
	۱۲	۱۴	۲/۳۳ ^b	۸۰/۹۸۹ ⁱ	۸۳/۸۷۶ ⁱ
	۱۲	۲۸	۲/۵۶ ^c	۷۳/۵۸۱ ^c	۷۶/۹۱۳ ^j
	۱۲	۴۲	۳/۱۳ ⁱ	۶۶/۰۵۸ ^j	۶۸/۹۸ ^k
	۱۲	۵۶	۳/۳۵ ^j	۵۸/۲۰۷ ^k	۶۳/۷۳۳ ^l
	۴	۱۴	۱/۹۸ ^a	۸۹/۶۰۸ ^l	۹۳/۰۸ ^m
	۴	۲۸	۲/۱۷ ^k	۷۸/۳۷۷ ^m	۸۶/۹۵۸ ^{ev}
	۴	۴۲	۲/۳۵ ^b	۷۸/۳۷۷ ⁿ	۸۲/۴۱ ^b
	۴	۵۶	۲/۴۸ ^l	۷۳/۱۵۱۷ ^o	۷۶/۳۹۵ ^j
	۸	۱۴	۲/۳۹ ^m	۸۶/۸۴۴ ^p	۸۸/۹۶۶ ^a
۱۰	۸	۲۸	۲/۶۶ ⁿ	۸۰/۷۴۳ ^q	۸۳/۹۸۸ ⁱ
	۸	۴۲	۲/۸۵ ^o	۷۵/۵۵۹۳ ^r	۷۹/۳۰۵ ⁿ
	۸	۵۶	۲/۹۵ ^p	۶۸/۴۴۳ ^s	۷۴/۱۱۸ ^g
	۱۲	۱۴	۲/۵ ^l	۸۳/۶۳۳ ^t	۸۶/۸۵۷ ^{ev}
	۱۲	۲۸	۲/۷ ^e	۷۶/۹۳۳ ^u	۸۰/۹۸۷ ^o
	۱۲	۴۲	۳/۰۹ ^g	۷۰/۳۸۹ ^v	۷۵/۰۱۳ ^p
	۱۲	۵۶	۳/۳۷ ^q	۶۳/۰۳ ^w	۶۹/۰۷۷ ^k
	۴	۱۴	۱/۹۶ ^a	۹۴/۶۳۳ ^x	۹۴/۶۳۳ ^q
	۴	۲۸	۲/۱۶ ^k	۸۹/۰۵۳ ^y	۹۱/۵۵۷ ^m
	۴	۴۲	۲/۳۳ ^b	۸۴/۶۶ ^z	۸۸/۲۱۵ ^r
	۴	۵۶	۲/۴۳ ^r	۸۳/۴ ^ā	۸۴/۹۱۹ ^s
	۸	۱۴	۲/۳۳ ^b	۹۱/۸۳۴ ^ē	۹۳/۲۸۷ ^t
۱۲	۸	۲۸	۲/۶۳ ⁿ	۸۷/۵۱۷ ^ī	۹۰/۴۶ ^ū
	۸	۴۲	۲/۸۱ ^s	۸۳/۷۷۳ ^ō	۸۶/۴۱۳ ^v
	۸	۵۶	۲/۹۴ ^p	۷۹/۰۵۲ ^ū	۸۲/۰۷۸ ^b
	۱۲	۱۴	۲/۵ ^l	۸۸/۹۸۳ ^ī	۹۲/۳۷ ^w
	۱۲	۲۸	۲/۵۸ ^t	۸۳/۹۴۵ ^α	۸۷/۳۵۹ ^e
	۱۲	۴۲	۳/۰۳ ^ū	۷۷/۸۳۳ ^β	۸۱/۴۴۷۳ ^o
	۱۲	۵۶	۳/۱۹ ^v	۷۳/۰۶۶ ^c	۷۹/۰۷۱ ⁿ

حروف مشابه، غیرمعنی دار بودن تفاوت‌ها را نشان می‌دهد ($p < 0.05$)

در غلظت نمک ثابت، افزایش دما، موجب افزایش نسبی در مقدار ازت محلول در $pH = 4/6$ گردید بطوری که دمای ۴ درجه سانتی‌گراد کمترین مقدار و دمای ۱۲ درجه سانتی‌گراد بیشترین شاخص رسیدن را طی دوره رسیدن از خود نشان دادند. شایان ذکر است که مقدار بالای شاخص رسیدن در روزهای ابتدایی رسیدن، به باقی‌ماندن زیاد پروتئین‌های آب پنیر در دلمه ارتباط دارد. این پروتئین‌ها در $pH = 4/6$ محلول هستند. از آنجایی که پروتئین‌های آب پنیر به تجزیه توسط همه پروتئازها مقاوم هستند لذا افزایش شاخص رسیدن و ازت محلول در $pH = 4/6$ مربوط به هیدرولیز کازئین‌ها خواهد بود. همانطور که قابل مشاهده است تفاوت معنی داری بین دمای ۸ و ۱۲ درجه سانتی‌گراد تا روز ۴۵ وجود نداشت ولی از روز ۴۵ تا روز ۶۰ تفاوت‌ها معنی دار بود ($P < 0/05$). این نتایج، گزارشات آذرینیا و همکاران (۱۳۷۵)، فولکرتسما و همکاران (۱۹۹۶)، شکیل و همکاران (۲۰۰۰)، کوچاوسکی و همکاران (۲۰۰۳)، هانون و همکاران (۲۰۰۵)، مبنی بر افزایش ازت محلول در $pH = 4/6$ با افزایش دما و گذر زمان را تأیید می‌کند. عباسی منفرد و همکاران (۱۳۸۶) بیان کردند در دماهای بالا در هفته ششم و نهم میزان ازت محلول در پنیر فرآپالایشی کمتر بود که دلیل آن را احتمال خروج پروتئین‌های آب پنیر باقی مانده در پنیر و شرایط نامساعد برای فعالیت پروتئازها بیان کرده اند.

اثر دما بر سینتیک تولید ازت غیرپروتئینی

در تمام تیمارها، واکنش از مدل ویبل پیروی می‌کند (جدول ۵). می‌توان چنین نتیجه گرفت که با افزایش دما از ۴ درجه سانتی‌گراد به ۱۲ درجه سانتی‌گراد، ثابت سرعت واکنش‌ها افزایش یافت که دلیل آن افزایش نرخ پروتئولیز در دماهای بالا می‌باشد. کمترین ثابت سرعت در غلظت نمک ۱۲ درصد و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد محاسبه $\frac{\text{کیلوکالری}}{\text{مول گرم}}$ مشاهده شد که مقدار آن $0/0203$ است.

گردید. همچنین بالاترین ثابت سرعت به میزان $0/0592$ است.

در دمای ۱۲ درجه سانتی‌گراد و غلظت نمک ۸ $\frac{\text{کیلوکالری}}{\text{مول گرم}}$

درصد مشاهده شد.

جدول ۵- اثر دما بر سینتیک تغییرات ازت غیر پروتئینی

غلظت نمک (درصد)	دما C°	نوع واکنش	ثابت سرعت $\frac{1}{\text{روز}}$	انرژی اکتیواسیون $\frac{\text{کیلوکالری}}{\text{مول گرم}}$
۴	۴	ویبل	$0/0287$	
۸	۸	ویبل	$0/0452$	۱۴۹/۸۴۰۸
۱۲	۱۲	ویبل	$0/0592$	
۴	۴	ویبل	$0/025$	
۸	۸	ویبل	$0/0394$	۱۳۲/۷۷۴۶
۱۲	۱۲	ویبل	$0/0542$	
۴	۴	ویبل	$0/0203$	
۸	۸	ویبل	$0/0353$	۱۲۴/۲۶۴۹
۱۲	۱۲	ویبل	$0/0486$	

تغییرات ازت محلول در $pH = 4/6$ به ازت کل (شاخص رسیدن)

تجزیه واریانس مربوط به تغییرات ازت محلول در $pH = 4/6$ در جدول ۳ نشان داده شده است. اثر متقابل سه‌گانه دما، غلظت نمک و زمان بر روی این شاخص معنی دار نبود ($P < 0/05$). ولی اثر متقابل دوگانه آنها و اثر هر کدام از این عوامل بصورت جداگانه بر روی این فاکتور معنی دار بود ($P < 0/05$). شکل‌های ۱، ۲ و ۳ تغییرات این شاخص را در دماهای مختلف نشان می‌دهد.

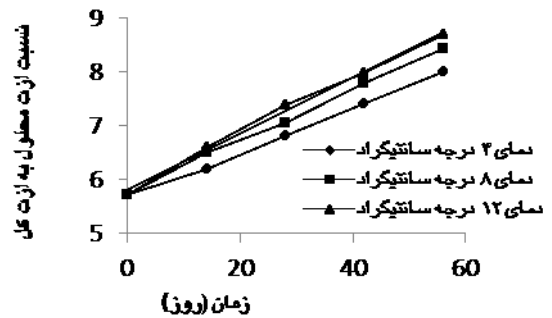
کردند که افزایش دما موجب کاهش ضرایب واکنش‌ها می‌گردد.

جدول ۶- اثر دما بر سینتیک تولید ازت محلول در $\text{pH}=4/6$

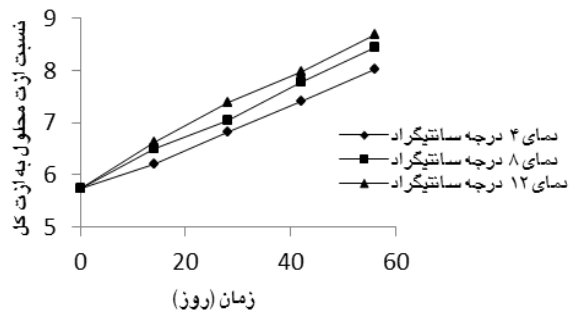
غلظت نمک درصد	دما $^{\circ}\text{C}$	درجه واکنش	ثابت سرعت $\frac{1}{\text{روز}}$	انرژی اکتیواسیون $\frac{\text{کیلوکالری}}{\text{مول گرم}}$
۸	۴	درجه اول	۰/۰۴۶۴	۱۳/۱۰۸۸۱
		درجه اول	۰/۰۴۸۳	
		درجه صفر	۰/۰۵۰۱	
۱۰	۸	درجه اول	۰/۰۴۴۹	۹/۶۵۱۳۴۲
		درجه اول	۰/۰۴۶۱	
		درجه صفر	۰/۰۴۷۵	
۱۲	۸	درجه اول	۰/۰۴۳۶	۷/۳۲۱۵۱۶
		درجه اول	۰/۰۴۴۸	
		درجه صفر	۰/۰۴۵۵	

تغییرات آلفا-کازئین بر اساس الگوی الکتروفورز

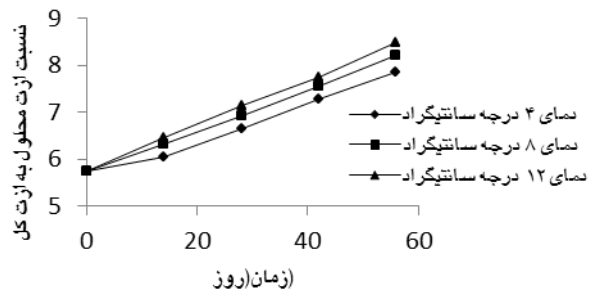
تجزیه واریانس مربوط به تغییرات این شاخص در جدول ۳ آورده شده است. تصویر ژل الکتروفورز در هفته هشتم نیز در شکل ۴ وجود دارد. دما، غلظت نمک و زمان دارای اثر متقابل دوگانه و سه‌گانه معنی داری بر این فاکتور هستند ($P < 0/05$). همانطور که در جدول ۴ مربوط به مقایسه حداقل میانگین مربعات اثر متقابل سه-گانه دما، غلظت نمک و زمان قابل مشاهده است، با افزایش دما از ۴ درجه سانتیگراد به ۱۲ درجه سانتیگراد شدت رنگ لکه‌های مربوط به آلفا-کازئین در ژل الکتروفورز کاهش پیدا کرد که نشان دهنده تجزیه بیشتر آلفاکازئین در دمای بالا می‌باشد. همچنین کاهش شدت رنگ لکه‌ها در دمای ۱۲ درجه سانتیگراد بیش از دماهای پائین بود. که نتایج مربوط به ازت محلول و ازت غیر پروتئینی را مبنی بر اثر مثبت افزایش دما بر میزان پروتئولیز، تأیید می‌کند. مطابق با داده‌های بدست آمده، گذشت زمان نیز باعث کاهش شدت رنگ لکه‌های مربوط



شکل ۱- تغییرات ازت محلول در $\text{pH}=4/6$ در غلظت ۸ درصد نمک



شکل ۲- تغییرات ازت محلول در $\text{pH}=4/6$ در غلظت ۱۰ درصد نمک



شکل ۳- تغییرات ازت محلول در $\text{pH}=4/6$ در غلظت ۱۲ درصد نمک

اثر دما بر سینتیک تولید ازت محلول در $\text{pH}=4/6$

در کلیه تیمارها تغییرات ازت محلول در $\text{pH}=4/6$ از واکنش‌های درجه صفر تبعیت نمود. همانطور که در جدول ۶ مشاهده می‌شود با افزایش دما ثابت سرعت واکنش‌ها افزایش یافت. این نتیجه با نتایج عباسی منفرد و همکاران (۱۳۸۶) مطابقت نمی‌کند. این محققان بیان

درجه اول در نظر گرفت. شایان توجه می‌باشد که با افزایش دما، در غلظت ثابت نمک، ثابت سینتیکی افزایش یافته است. همانگونه که قابل مشاهده است اثر افزایش دما بر ثابت سرعت واکنش‌ها در غلظت‌های کمتر نمک شدیدتر بود. بیشترین ثابت سرعت در دمای ۱۲ درجه سانتی‌گراد و غلظت نمک ۸ درصد به میزان $0.0094 \frac{\text{کیلوکالری}}{\text{مول گرم}}$ مشاهده گردید.

جدول ۷ - اثر دما بر سینتیک تجزیه آلفا-کازئین

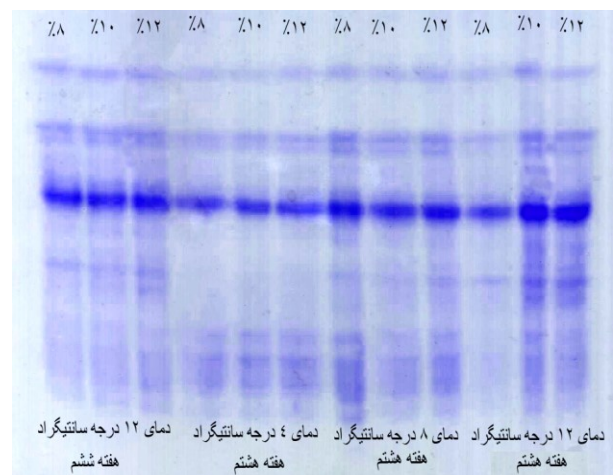
غلظت نمک درصد	دما C°	نوع واکنش	ثابت سرعت $\frac{1}{\text{روز}}$	انرژی اکتیواسیون $\frac{\text{کیلوکالری}}{\text{مول گرم}}$
	۴	درجه اول	۰/۰۰۶۶	
۸	۸	درجه اول	۰/۰۰۷۹	۶۰/۶۴۸۹۵۷
	۱۲	درجه اول	۰/۰۰۹۴	
	۴	درجه اول	۰/۰۰۵۴	
۱۰	۸	درجه اول	۰/۰۰۶۱	۵۰/۸۹۶۵۲۱
	۱۲	درجه اول	۰/۰۰۷۸	
	۴	درجه صفر	۰/۳۲۲۶	
۱۲	۸	درجه صفر	۰/۳۵۶۸	۳۱/۲۱۷۳۳
	۱۲	درجه صفر	۰/۴۷۵۷	

تغییرات بتا-کازئین بر اساس الگوی الکتروفورز

توجه به جدول ۳ مشاهده می‌شود که اثر دما، غلظت نمک، زمان، اثر متقابل دوگانه و سه‌گانه آنها بر تغییرات بتاکازئین اندازه‌گیری شده توسط الکتروفورز در سطح احتمال ۵ درصد معنی دار بود ($P < 0.05$).

همانطور که از جدول ۴ مربوط به مقایسه حداقل میانگین مربعات اثر متقابل سه‌گانه قابل مشاهده است، افزایش دما اثر مثبت بر کاهش شدت رنگ لکه‌های بتاکازئین داشته به طوری که در دمای ۱۲ درجه سانتی-گراد، شدت رنگ لکه‌ها کمترین مقدار را به خود اختصاص داده و سرعت کاهش این شاخص در این دما بیش از دمای ۴ و ۸ درجه سانتی‌گراد بود. که این امر

به آلفا-کازئین در الکتروفورز شد که اثر زمان در دماهای بالاتر شدیدتر بود. بطوری که شدت رنگ لکه‌ها از ۱۰۰ درصد در روز اول به ۸۲/۴ درصد در روز شصتم در غلظت نمک ۱۲ درصد و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد رسید. کمترین مقدار α_{S1} -کازئین در غلظت نمک ۸ درصد و دمای ۱۲ درجه سانتی‌گراد در روز شصتم بود که مقدار آن به ۵۸/۲ درصد میزان اولیه رسید. لورنس و همکاران (۱۹۸۳)، میزان هیدرولیز α_{S1} -کازئین به مقدار ۸۵ درصد در پنیر کامبورت، ۸۰ درصد در پنیر فتای رسیده به مدت ۲۴۰ روز، ۷۴/۲۵ درصد در پنیر تلمبه، ۶۸/۸ - ۷۲/۴ درصد در پنیر امنتال تولید شده از شیر گاو و ۴۶ درصد در پنیر نرم حاصل از شیر بز و رسیده در مدت ۲۸ روز، را گزارش نمودند.



شکل ۴- الگوی الکتروفورز بدست آمده در هفته هشتم

اثر دما بر تجزیه آلفا-کازئین

در جدول ۷ اطلاعات مربوط به نوع واکنش و انرژی فعالسازی در مورد تجزیه آلفاکازئین آورده شده است. همانطور که در این جدول ذکر شده است، در همه دماها، در غلظت نمک ۸ و ۱۰ درصد واکنش‌ها از معادلات درجه اول و در غلظت ۱۲ درصد از درجه صفر پیروی نمودند. برای مقایسه ثابت سرعت لازم شد که واکنش‌های درجه صفر را که از درجه اول هم پیروی می‌کنند، به عنوان

درجه اول در نظر گرفته شده و ثابت سرعت آن محاسبه گردید. از داده‌های آزمایشی این نتیجه حاصل شد که با افزایش دما بر مقدار ثابت سرعت واکنش‌ها افزوده شده است. قابل ذکر می‌باشد که اثر افزایش دما بر ثابت سرعت واکنش‌ها در غلظت‌های کمتر نمک شدیدتر بود که این امر اثر بازدارندگی غلظت‌های بالای نمک بر تجزیه بتاکازئین را تصدیق می‌نماید.

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که با افزایش دما از ۴ درجه سانتی‌گراد به ۱۲ درجه سانتی‌گراد با گذشت زمان، تجزیه آلفا و بتاکازئین، تولید ازت غیر پروتئینی و ازت محلول در pH= ۴/۶ افزایش یافت. سینتیک تولید ازت غیر پروتئینی در کلیه تیمارها از مدل ویبل، تولید ازت محلول، تجزیه آلفاکازئین و بتاکازئین در همه دماها و غلظت نمک ۸ و ۱۰٪ از مدل درجه یک و در غلظت نمک ۱۲٪ از مدل درجه صفر، تبعیت کرد. همچنین مشاهده گردید که با افزایش دمای رسیدن، ثابت سرعت واکنش‌ها افزایش یافت.

بطور مثال با افزایش دما از ۴ به ۱۲ درجه سانتی‌گراد، ثابت سرعت واکنش تولید ازت محلول، ازت غیرپروتئینی، تجزیه آلفا و بتا-کازئین به ترتیب از ۰/۰۴۴۹ به ۰/۰۴۷۵، از ۰/۰۲۵ به ۰/۰۵۴۲، از ۰/۰۰۵۴ به ۰/۰۰۷۸ و از ۰/۰۰۴۶ به ۰/۰۰۶۳ $\frac{1}{\text{روز}}$ رسید.

قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی خود را از دانشگاه تبریز به جهت حمایت مالی از این پژوهش اعلام می‌دارند.

مبین اثر دماهای بالا بر افزایش پروتئولیز و تجزیه بتا-کازئین می‌باشد. می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که میزان بتا-کازئین از روز اول رسیدن، روند نزولی داشته و به کمترین مقدار خود در روز ۶۰ ام رسیده است. میزان کاهش بتاکازئین در هفته‌های اول به دلیل مساعد بودن شرایط از نظر pH، رطوبت و حضور سوبسترای بیشتر و همچنین فعالیت بیشتر باقی‌مانده آنزیم‌های منعقدکننده بیشتر از هفته‌های آخر رسیدن بود.

جدول ۸- اثر دما بر سینتیک تجزیه بتا-کازئین

غلظت نمک درصد	دما C°	نوع واکنش	ثابت سرعت $\frac{1}{\text{روز}}$	انرژی اکتیواسیون $\frac{\text{کیلوکالری}}{\text{مول محرم}}$
	۴	درجه اول	۰/۰۰۵۵	
۸	۸	درجه اول	۰/۰۰۶۲	۵۹/۸۵۲۱۳
	۱۲	درجه اول	۰/۰۰۷۸	
	۴	درجه اول	۰/۰۰۴۶	
۱۰	۸	درجه اول	۰/۰۰۵۱	۵۳/۸۷۱۲۵۵
	۱۲	درجه اول	۰/۰۰۶۳	
	۴	درجه صفر	۰/۲۷۴۱	
۱۲	۸	درجه صفر	۰/۳۰۲۱	۳۴/۷۹۴۰۹
	۱۲	درجه صفر	۰/۳۷۲۳	

اثر دما بر سینتیک تجزیه بتاکازئین

در جدول ۸ درجه واکنش، ثابت سرعت و انرژی اکتیواسیون در مورد تجزیه بتاکازئین در دماهای متفاوت ذکر گردیده است. همانگونه که از این جدول مشخص است در غلظت نمک ۸ و ۱۰ درصد واکنش‌ها از معادلات درجه اول و در غلظت ۱۲ درصد از درجه صفر پیروی نمودند. برای مقایسه ثابت‌های سینتیکی واکنش‌ها با هم، لازم است که درجه تمام واکنش‌ها یکسان باشد. بنابراین جهت مقایسه، معادلات درجه صفر، نیز به عنوان

منابع مورد استفاده

آذرنیا ث و احسانی م. ۱۳۷۵. تأثیر درجه حرارت نگهداری پنیر سفید آب نمکی بر بروی خصوصیات فیزیکوشیمیایی آن. مجله علوم کشاورزی ایران. ۲۷. شماره ۲. ۱-۷.

- حصاری ج. ۱۳۸۳. بررسی عوامل مختلف شامل مواد اولیه، عوامل فرآیند و شرایط رسانیدن بر روی ویژگی های کیفی پنیر سنتی لیقوان و پنیر صنعتی ایران. طرح پژوهشی بین دانشگاهی.
- عباسی منفرد ح و همدمی، ن. ۱۳۸۶. شبیه سازی و بهینه سازی پروتئولیز و لیپولیز در طی رسیدگی پنیر سفید ایرانی تولید شده به روش UF. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.
- Alizadeh M, Hamed M, Khosroshahi A, 2006. Modeling of proteolysis and lipolysis in Iranian white brine cheese, *Food Chemistry* 97: 294-301.
- Edalatian MR, Habibi MB, Mortazavi SA, Nasiri MR, Basami MR, and Hashemi MH, 2010. Isolation and identification the indigenous Lactic flora from Lighvan, as an Iranian raw milk cheese from milk to ripened cheese, *World Academy of Science, Engineering and Technology* 68: 1346-1351.
- Folkertsma B, Fox PF and McSweeney PLH, 1996. Acceleration ripening of Cheddar cheese at elevated temperatures, *International Dairy Science* 6: 1117- 1134.
- Gaya P, Medina M, Rodriguez-Marin MA and Nufiez M, 1990. Accelerated ripening of ewes milk Manchego cheese: the effect of elevated temperature, *Journal of Dairy Science* 73: 26-32.
- Hannon JA, Wilkinso MG, Delahunty CM, and Wallace JM, 2005. Application of descriptive sensory analysis and key chemical indices to assess the impact of elevated ripening temperatures on the acceleration of cheddar cheese ripening, *International Dairy Journal* 15: 263-273.
- Kuchoor CN and Fox PF, 1982. Soluble nitrogen in Cheddar cheese comparison of extraction procedures, *Milcheissenschaft* 37: 331- 335.
- Kujawski M, Cichosz G, Podhajna E, and Sanko B, 2003. Effect of temperature on proteolysis and organoleptic properties of Edam-type cheese, *Food Science and Technology* 6: 207-219.
- Lawrence RC, Gilles J, and Creamer LK, 1983. The relationship between cheese texture and flavor, *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* 18: 175-190.
- Shakeel- Ur- Rehman, Banks JM, Brechany EY, Muir DD, McSweeney PLH, and Fox PF, 2000. Influence of ripening temperature on the flavor and volatile profiles of Cheddar cheese made from raw or pasteurised milk, *International Dairy Journal*, In press.
- Sihufe GA, Zorrilla SE, and Rubiolo AC, 2005. Kinetics of proteolysis of β -casein during ripening of Fynbo cheese salted with NaCl or NaCl/KCl and ripened at different temperatures, *Journal of Food Science* 70: 151-156.
- Sihufe GA, Zorrilla SE, and Rubiolo AC, 2006. Secondary proteolysis of Fynbo cheese salted with NaCl/KCl brine and ripened at various temperatures, *Food Chemistry* 96: 297-303.
- Shalabi SI, Aand Fox PF, 1987. Electrophoretic analysis of cheese: comparison of methods, *Irrish Journal of Food Science and Technology* 11: 135- 151.
- Vitro M, Chavarri F, Bustamante M, Barron LJR, Aramburu M, and Santisteban A, 2003. Lamb rennet past in ovin cheese manufacture, lipolysis and flavor, *International Dairy Journal* 13(5): 391-399.

Effects of ripening temperature on the kinetics of proteolysis in Lighvan cheese

B Shariati Morghmaleki¹, J Hesari^{*2} and N Hamdami³

Received: June 11, 2013

Accepted: February 10, 2015

¹MSc Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

²Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

³Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Industrial University of Esfahan, Tabriz, Iran

*Corresponding author: Email: jhesari@tabrizu.ac.ir

Abstract

Cheese ripening is one of the most important stages during cheese production. After milk coagulation, in order to achieve the appropriate organoleptic properties, it should be exposure to the suitable environmental conditions. Proteolysis is the most substantial stage during cheese ripening. Several parameters are effected the proteolysis in cheese production process such as temperature, salt concentration, water activity and the amount of retentate coagulant enzymes in curd. The goal of present study was to investigate effect of temperature (4, 8, 12°C) and salt concentration (8, 10, 12%) on kinetic of proteolysis during two monthes. Samples were exposed to physicochemical experiments each two weeks. In order to investigate kinetic reactions, the amounts of soluble nitrogen in pH= 4/6, non protein nitrogen, color intensity of α -casein and β -casein taint in Urea poly acryl-amide gel electrophoresis were measured. By increasing the temperature, degradation of α -casein and β -casein and production of soluble nitrogen in pH= 4/6, and non protein nitrogen were intensified. Results are also showed that, rising the temperature in constant salt concentration, leads to increase the kinetic constant, whilst the calculated amounts of kinetic constant at 12°C for all of parameters were the highest. By investigation of proteolysis kinetic in cheese and reciprocal effects of temperature and time, optimum ripening conditions were determined at 8 °C and 10% salt concentration for 6 weeks to obtainig the product with suitable organoleptic properties and high quality.

Keywords: Lighvan cheese, kinetics, proteolysis, temperature