مهندسی بیوسیستم ایران، دوره ۴۵، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۳ (ص۴۳-۳۷)

اثر رسیدن تسریع‌شده با پروتئاز کپسوله و لیپاز بر بافت پنیر آب‌نمکی

مهرناز امینی‌فر[1*]، زهرا امام‌جمعه[2]

۱. استادیار گروه پژوهشی مواد غذایی، پژوهشکدهٔ صنایع غذایی و کشاورزی، پژوهشگاه استاندارد

۲. استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکدهٔ مهندسی و فناوری کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۲/۱۰- تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۱۱/۱)

چکیده

در این مطالعه، اثر رسیدن تسریع‌شده با کمک پروتئاز کپسوله‌شده و لیپاز بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، بافت، و ریزساختار پنیرهای آب‌نمکی بررسی شده است. اضافه‌کردن لیپاز با کاهش اندازهٔ گلبول‌های چربی و افزایش اتصالات کازئین سبب افزایش سختی و نیز با تجزیهٔ چربی‌ها که به‌عنوان روان‌ساز عمل می‌کردند، سبب کاهش نیروی لازم برای شکنندگی پنیرهای آب‌نمکی می‌شود. تعداد و قطر گلبول‌های چربی که در ماتریکس کازئینی به دام افتاده‌اند، تحت تأثیر غلظت آنزیم به‌کاربرده‌شده قرار می‌گیرد. پروتئازهای کپسوله‌شده با افزایش شکست کازئین‌ها به پپتیدهایی با وزن مولکولی پایین و اسیدهای آمینه، سبب کاهش سختی و نیروی لازم برای شکنندگی پنیرهای آب‌نمکی می‌شود.

کلیدواژگان: پنیر آب‌نمکی، رسیدن تسریع‌شده، سختی، شکنندگی.

مقدمه

پنیرهای آب‌نمکی[1] گروهی از انواع پنیر هستند که پس از طی مراحل آب‌گیری و قالب‌بندی، دوران رسیدن خود را در محلول آب نمک طی می‌کنند (Tamime, 2006) و در این دوران بنابر اصل انتشار برای رسیدن به تعادل فشار اسمزی مبادرت به جذب نمک و ازدست‌دادن آب می‌کنند (Guinee & Fox, 1993).

رسیدن پنیر فرایند آهسته‌ای -شامل واکنش‌های میکروبیولوژیکی، شیمیایی، و بیوشیمیایی- است که سبب بهبود ویژگی‌های عطر، طعم، و بافت در انواع گوناگون پنیر می‌شود (Singh *et al*., 2003). واکنش‌های بیوشیمیایی که در طول دوران رسیدن رخ می‌دهند عبارت‌اند از: لیپولیز، پروتئولیز، و گلیکولیز (Fox, 1993). محققان بسیاری دربارهٔ تغییراتی که در طول رسیدن انواع گوناگون پنیر رخ می‌دهد، مطالعه کرده‌اند(Aminifar *et al*., 2010; Ceruti *et al*., 2012). از آنجا که رسیدن پنیر، فرایند آهسته‌ای است و هزینه‌های برای تولیدکنندگان دارد، تلاش‌های زیادی برای کوتاه‌کردن این دوره صورت گرفته است که می‌توان به استفاده از آنزیم (Law, 1979) برای تسریع واکنش‌های بیوشیمیایی اشاره کرد.

اضافه‌کردن مستقیم آنزیم به شیر پنیرسازی چندان موفقیت‌آمیز نبوده است، زیرا مقداری از آنزیم با ورود به آب پنیر از دست می‌رود و همچنین توزیع غیر مناسب آنزیم در پنیر، بازده را کاهش می‌دهد و کیفیت پنیر را ضعیف می‌کند (Kheadr-Ehab *et al*., 2003). کپسوله‌کردن آنزیم، مشکلات اضافه‌کردن مستقیم آنزیم را، کاهش می‌دهد. استفاده از هیدروکلوئیدها مانند کاپا-کاراگینان برای پوشش‌دهی آنزیم مطلوب گزارش شده است (Kailasapathy & Lam, 2005). آنزیم‌هایی که برای کوتاه‌کردن دوران رسیدن به‌کار می‌روند، سبب افزایش تجزیهٔ چربی‌ها و پروتئین‌ها می‌شوند و بنابراین می‌توانند بر ویژگی‌های بافتی و ریزساختار پنیر مؤثر باشند (Karami *et al*. 2009)، از این‌رو مطالعهٔ اثر رسیدن تسریع‌شده با آنزیم بر ویژگی‌های بافتی و ریزساختار پنیر بسیار با اهمیت است. هدف از پژوهش انجام‌گرفته آن است تا اثر دو غلظت متفاوت از لیپاز و پروتئاز کپسوله‌شده بر ویژگی‌های بافتی و ریزساختار پنیر آب‌نمکی در طول رسیدن مطالعه، و مشخص شود که اضافه‌کردن غلظت‌های متفاوت آنزیم تا چه اندازه می‌تواند بافت پنیر را در مقایسه با وضعیت بدون آنزیم تحت تأثیر قرار دهد.

مواد و روش‌ها

مواد

شیرگاو با مشخصات، درصد کل مادهٔ جامد: ۱/۱۴±۱۲/۶، درصد چربی: ۰/۶۶±۳/۶، درصد پروتئین: ۰/۳±۳/۲ از دامداری

* نویسندهٔ مسئول: aminifar.m@standard.ac.ir

1. Brined Cheese

دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه تهران تهیه شد. استارترهای استفاده‌شده عبارت‌اند از: استارترهای مزوفیل: Lactococcus lactis subsp. Lactis و Lactococcus lactis subsp. Cremoris (DM230, Dansico Deutschland GmbH, Germany) و استارترهای ترموفیل: Lactobacillus bulgaricus و (Streptococcus thermophilus) (Y502, Dansico Deutschland GmbH, Germany)

برای تولید لختهٔ پنیر آنزیم رنت (Rennet) به‌دست‌آمده از *Mucor miehei* با قدرت (IMCU[1]/g) ≥۲۲۰۰ ، برای تسریع لیپولیز آنزیم پالاتاز (Palatase) که لیپاز گرفته‌شده از *Rhizomucor miehei* ، با قدرت (U/g) ۲۰۰۰ ≥ است، و برای تسریع پروتئولیز از آنزیم پروتئاز *Aspergillus oryzea* با توان فعالیت $\frac{u}{g}$ ۲۵۰ استفاده شد. کلیهٔ آنزیم‌ها، کاپاکاراگینان و مونوگلیسرید تقطیرشده (Myverol) از شرکت Sigma-Aldrich دانمارک تهیه شدند.

روش تولید پنیر بدون آنزیم و پنیر دارای لیپاز و پروتئاز کپسوله‌شده

پنیر در کارگاه لبنیات دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه تهران بر این اساس تولید شد که ابتدا، استارترهای DM-۲۳۰ و Y-۵۰۲ (۳۰ به ۷۰) که در کمی آب حل شده بودند به شیر گاو پاستوریزه (۶۵ درجهٔ سانتیگراد، ۳۰ دقیقه) و خنک‌شده اضافه شدند. پس از رسیدن pH شیر به ۶/۳، آنزیم رنت به آن افزوده شد تا لخته‌های پنیر تشکیل شوند. سپس لخته ها به ابعاد (۴×۴cm) بریده شد و طی چند مرحله آبگیری شدند. روی کیسه‌های پنیر به مدت ۱۰ ساعت وزنه گذاشته شد و سپس مکعب‌های با ابعاد ۲۵ سانتی‌متر از پنیر تهیه شد و در آب نمک ۱۲ درصد در دمای ۸-۱۰ درجهٔ سانتیگراد به مدت ۹۰ روز نگهداری شدند.

روش تولید پنیرهای آنزیم‌دار مانند پنیرهای بدون آنزیم است، با این تفاوت که برای تسریع لیپولیز به ۱۰۰ کیلوگرم شیر پنیرسازی، مقادیر چهار و هشت گرم آنزیم لیپاز افزوده شد. اضافه‌کردن مستقیم آنزیم به شیر پنیرسازی، را محققان متعددی انجام داده‌اند (Yilmaz *et al.*,2005). برای تسریع پروتئولیز، آنزیم پروتئاز کپسوله‌شده با روش Kailasapathy & Lam (2005) به شیر افزوده شد. بر پایهٔ این روش ابتدا ۱/۵ گرم کاراگینان در ۵۰ میلی‌لیتر آب به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجهٔ سانتی‌گراد هم‌زده شد تا مخلوط یکنواختی از صمغ به‌دست آید. مخلوط حاصل تا دمای ۴۰ درجهٔ سانتیگراد سرد شد و به آن ۱۲/۷ میلی‌لیتر و یا ۱۶/۲ میلی‌لیتر از محلول ۱/۵ درصد پروتئاز آسپرژیلوس اُرایزه افزوده شد، تا دو سری کپسول تشکیل شود. مخلوط حاصل با سرعت به ۱۵۰ میلی‌لیتر روغن سویا حاوی ۰/۲ درصد امولسیفایر مایورول که در حمام ۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد در حال هم‌زدن بود، اضافه شد. امولسیون آب در روغن تشکیل و تا دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد سرد شد و زمان لازم برای تشکیل کپسول‌های صمغی در نظر گرفته شد. با سانتریفوژ، ژل کپسول‌های صمغی از فاز روغنی جدا و شستشو شدند. کپسول‌ها با کمک خیساندن در کلرید کلسیم ۲ درصد سخت شدند و سپس به شیر پنیرسازی افزوده شدند. برای تخمین میزان کپسول‌های به‌دام‌افتاده در لختهٔ پنیر، کپسول‌های واردشده به آب پنیر اندازه‌گیری شدند. برای این منظور، آب پنیر جداشده در حین تولید پنیر از غربال استیل با قطر ۱۲۰ میکرومتر عبور داده شد. آن گاه کپسول‌های روی غربال جمع‌آوریو در استوانهٔ مدرج ۵۰ میلی‌لیتری ریخته شدند. با توجه به درصد حجمی کپسول‌ها در آب پنیر، درصد آنها در لخته به میزان ۵/۵±۶۱ درصد گزارش شد.

اندازه‌گیری ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی

ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی ـدرصد نمک، رطوبت، و چربی- در ۱، ۳۰، و ۹۰ روز بعد از تولید پنیر ارزیابی شدند. برای اندازه‌گیری رطوبت از روش حرارت‌دهی نمونه‌های پنیر تا رسیدن به وزن ثابت از دستگاه رطوبت‌سنج مدل Sartorius (Sartorius Ltd., Epsom, UK) استفاده شد. برای تعیین مقدار نمک از روشی که Kirk & Sawyer (1991) ارائه کرده بودند، استفاده شد. استاندارد ISO (1975) برای اندازه‌گیری چربی استفاده شد. نسبت نیتروژن محلول در آب به نیتروژن کل به‌عنوان شاخصی از پروتئولیز در نمونهٔ شاهد و نمونه‌های حاوی پروتئاز مطابق روش Kuchroo & Fox (1982) و درصد اسیدچرب آزاد چربی استخراج‌شده با روش ISO (33433:1975) با استانداردISO (660: 2009) در نمونهٔ استاندارد و نمونه‌های حاوی لیپاز اندازه‌گیری شدند.

بررسی وی‌ژگی‌های بافت[2]

بافت نمونه‌های پنیر در ۱، ۳۰، و۹۰ روز پس از تولید، در سه تکرار با دستگاه (Testometric, M355-10CT, UK) ارزیابی شد. برای ارزیابی بافت با روش Awad (2006) روی مکعب‌های پنیر با ابعاد (۲۰×۲۰×۲۰mm) در دمای $12 \pm 5^{\circ}C$ تست فشردگی انجام شد. شکنندگی پنیر براساس میزان نیروی لازم

1. International Milk-Clotting Units

2. Texture profile Analysis

برای ایجاد شکست در نمونه، که درواقع نیروی لازم برای ایجاد اولین شکست در منحنی فشردگی است، (Fredrick *et al*., 1986) تعریف می‌شود. هرچه میزان نیروی لازم برای ایجاد شکست بیشتر باشد، شکنندگی نمونه کمتر است (Lamond, 1976). سختی پنیر براساس نیرویی که لازم است تا نمونهٔ پنیر به اندازه ۷۰ درصد ارتفاع اولیه خود تغییر شکل دهد، تعریف می‌شود (Szczesniak, 1963).

ارزیابی ریزساختار نمونه‌های پنیر

برای ارزیابی ریزساختار، نمونه‌های پنیر در ۱ و ۹۰ روز پس از تولید با میکروسکوپ الکترونی (XL series, model XL30, Philips, Eindhoven, the Netherlands) عکسبرداری شدند

برای آماده‌سازی نمونه‌ها پیش از عکسبرداری با میکروسکوپ الکترونی، از روش Madadlou *et al*. (2007) استفاده شد. اساس این روش تثبیت مکعب‌های پنیر در محلول ۲/۵ درصد گلوترآلدئید (Merck، آلمان)، آبگیری در سری‌های متوالی محلول‌های اتانول، و در پایان چربی‌گیری باکلروفرم است. (فقط در نمونهٔ حاوی لیپاز برای بررسی اثر آنزیم بر چربی، مرحلهٔ چربی‌گیری حذف شد). نمونه‌ها بر اثر انجماد در نیتروژن مایع شکسته، در دستگاه خشک‌کن تحت خلاء خشک، و در دستگاه طلاافشانی (Type SCD 005,BalTec Inc., Balzers, Switzerland) با طلا پوشش داده شدند. در میکروسکوپ با ایجاد خلاء، بمباران الکترونی با ۱۵KV انجام شد و تصاویری با بزرگنمایی ۱۰۰۰ تهیه شد. از نرم‌افزار اندازه‌گیری مسافت که در دانشگاه فردوسی مشهد طراحی شده است (Manual microstructure distance measurement, Nahamin pardazane Asia, university of mashhad, Iran) برای اندازه‌گیری برخی ذرات مشخص‌شده استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

از روش آنالیز واریانس LSD برای بررسی اثر روزهای متفاوت رسانیدن (۱، ۳۰، و۹۰ روز) بر خواص فیزیکوشیمیایی (درصد ماد، خشک، نمک، و چربی)، سختی، و شکنندگی استفاده شد. برای این منظور از نرم‌افزار (SAS Version 8.2, SAS institute Inc., Cary, NC) استفاده شد و کلیهٔ آزمایش‌ها و اندازه‌گیری‌ها در سه تکرار انجام شد. برای ترسیم نمودارها از نرم‌افزار آفیس، اکسل (Office, Excel, 2007) استفاده شد.

نتایج و بحث

اثر افزودن آنزیم بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی

تغییرات درصد رطوبت، نمک، و چربی نمونه‌های پنیر بدون آنزیم و نیز حاوی آنزیم لیپاز و پروتئاز کپسوله‌شده در طول رسیدن، در جدول ۱ نشان داده شده است.

رطوبت همهٔ نمونه‌های پنیر-با آنزیم یا بدون آنزیم اضافه‌شده– در طول ماه اول رسیدن به‌صورت معناداری کاهش می‌یابد که دلیل آن خروج رطوبت از بلوک‌های پنیر به‌دلیل فشار اسمزی ناشی از نمک موجود در آب نمک است (Zerfiridis, 2001). از روز ۳۰ تا ۹۰ به‌دلیل ایجاد تعادل میان خروج آب ناشی از فشار اسمزی و جذب آب به‌وسیلهٔ گروه‌های آمین تولیدشده توسط پروتئولیز، در همهٔ نمونه‌ها رطوبت تغییر معناداری نشان نمی‌دهد (Creamer & Olson, 1982). اضافه‌کردن لیپاز اثر معنی‌داری بر درصد رطوبت پنیر ندارد (L1, L2) در حالی‌که، به‌دلیل تولید بالاتر محصولات پروتئولیز در نمونه‌های پنیر دارای پروتئاز کپسوله‌شده (Kailasapathy & Lam, 2005) (P1, P2) در مقایسه با سایر نمونه‌ها، جذب رطوبت به میزان بیشتری رخ می‌دهد و همان‌طور که جدول ۱ نشان می‌دهد، رطوبت نمونه‌های دارای پروتئاز کپسوله در روزهای ۳۰ و ۹۰ به‌صورت معناداری بالاتر از سایر نمونه‌ها است.

درصد نمک پنیرهای آب‌نمکی –با آنزیم یا بدون آنزیم اضافه‌شده- در طول ماه اول رسیدن افزایش معناداری دارد که به‌دلیل نفوذ نمک از آب نمک به ماتریکس کازئینی بافت پنیر است (Guinee & Fox, 1993). از روز ۳۰ تا ۹۰، درصد نمک در نمونه‌های پنیر-با آنزیم یا بدون آنزیم اضافه‌شده- به‌دلیل ایجاد تعادل تغییر معنی‌داری نشان نمی‌دهد. اضافه‌کردن لیپاز اثر معناداری بر درصد نمک نمونه‌های پنیر ندارد، در حالی‌که نفوذ نمک در بافت پنیر پروتئازدار کپسوله (P1, P2) به‌دلیل شدت تجزیهٔ کازئین‌ها و نرم‌شدن بافت بالاتر است (Guinee & Fox, 1993).

درصد چربی در همهٔ نمونه‌ها از روز ۱ تا ۳۰ افزایش معنی‌داری نشان می‌دهد که ناشی از کاهش درصد رطوبت در طول این دوره است. مطالعات محققان دیگر نیز افزایش درصد چربی در طول رسیدن را به کاهش درصد رطوبت نسبت داده‌اند (Madadlou *et al*., 2007). نمونهٔ دارای ۸ گرم لیپاز اضافه‌شده به ۱۰۰ کیلوگرم شیر (L2) از درصد چربی پایین‌تری بعد از ۳۰ و ۹۰ روز رسیدن، در مقایسه با سایر نمونه‌ها برخوردار است که می‌توان آن را به شدت لیپولیز در این نمونه و ایجاد اسیدهای چرب کوتاه‌زنجیر محلول و فرآر نسبت داد (Karami *et al*., 2009). نسبت نیتروژن محلول در آب به کل نیتروژن از روز ۱ تا ۳۰ افزایش معنی‌داری نشان می‌دهد که این امر ناشی از فعالیت پروتئولتیک آنزیم‌هاست (Karami *et al*., 2009). از روز ۳۰ تا ۹۰ به علت اثر بازدارندگی نمک بر فعالیت پروتئازها(Guinee & Fox 1993)، این نسبت تغییر معناداری

نشان نمی‌دهد. شدت پروتئولیز در نمونه‌های دارای آنزیم (P1, P2) بالاتر از نمونهٔ بدون آنزیم است، در حالی‌که افزایش غلظت آنزیم اثر معناداری بر شدت پروتئولیز ندارد. زیادنشدن شدت پروتئولیز با افزایش غلظت آنزیم را می‌توان ناشی از استفادهٔ کپسول‌های صمغی برای رهایش کنترل‌شدهٔ آنزیم‌ها و نیز اثر بازدارندگی نمک بر فعالیت پروتئازها دانست. درصد اسید چرب آزاد از روز ۱ تا پایان رسیدن افزایش معناداری نشان می‌دهد که به علت فعالیت آنزیم‌های لیپاز و هیدرولیز تری‌گلیسیریدها است. با افزایش غلظت آنزیم لیپاز، شدت لیپولیز و درصد اسیدچرب آزاد افزایش می‌یابد.

جدول ۱. اثر اضافه‌کردن آنزیم بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پنیر آب‌نمکی

ویژگی	نمونه	روز رسیدن* ۱	۳۰	۹۰
درصد رطوبت (وزنی/وزنی)				
	S	۷۳/۵۹±۱/۲۱a	۶۶/۳۷±۱/۷۱b	۶۶/۶۳±۱/۹۳b
	L1	۷۳/۸۴±۰/۳۲a	۶۶/۵۷±۱/۳۴b	۶۶/۷۰±۱/۱۲b
	L2	۷۳/۰۳±۱/۲۱a	۶۶/۷۲±۱/۹۱b	۶۶/۹۵±۱/۲۱b
	P1	۷۳/۱۱±۰/۱۸a	۷۰/۴۳±۰/۷۳b	۷۰/۹۰±۱/۵۲b
	P2	۷۳/۷۲±۰/۹۱a	۷۰/۱۲±۰/۹۹b	۷۰/۹۵±۰/۱۶b
درصد نمک (وزنی/وزنی)				
	S	۵/۰۲±۰/۱۷b	۷/۰۱±۰/۰۹a	۷/۱۰±۰/۰۲a
	L1	۵/۰۱±۰/۲۰b	۷/۰۹±۰/۱۱a	۷/۰۷±۰/۲۱a
	L2	۵/۱۲±۰/۱۰b	۷/۱۰±۰/۰۲a	۷/۱۳±۰/۰۶a
	P1	۵/۱۴±۰/۱۵b	۱۰/۱۵±۰/۱۱a	۱۰/۴۵±۰/۲۲a
	P2	۵/۳۴±۰/۵۷b	۱۰/۹۵±۰/۶۶a	۱۰/۹۰±۰/۹۲a
درصدچربی (وزنی/وزنی)				
	S	۱۰/۱۱±۰/۲۷b	۱۵/۰۸±۰/۵۴a	۱۵/۰۰±۰/۴۴a
	L1	۱۰/۳۱±۰/۳۲b	۱۵/۶۴±۰/۷۲a	۱۵/۵۷±۰/۸۰a
	L2	۱۰/۳۴±۰/۲۱b	۱۲/۱۵±۰/۰۲a	۱۲/۰۳±۰/۱۱a
	P1	۱۰/۲۵±۰/۳۰b	۱۵/۱۵±۰/۰۲a	۱۵/۰۰±۰/۱۴a
	P2	۱۰/۳۰±۰/۱۶b	۱۵/۹۶±۰/۸۲a	۱۵/۴۴±۰/۷۲a
درصد نیتروژن محلول در آب/کل نیتروژن (وزنی/وزنی)				
	S	۱۳/۰۹±۰/۰۷b	۱۸/۱۰±۰/۱۰a	۱۸/۱۶±۰/۲۵a
	P1	۱۶/۱۴±۰/۱۵b	۲۲/۰۵±۰/۱۱a	۲۲/۰۸±۰/۲۲a
	P2	۱۶/۳۷±۰/۱۷b	۲۱/۹۵±۰/۳۶a	۲۱/۹۷±۰/۱۲a
درصداسیدچرب آزاد (وزنی/وزنی)				
	S	۰/۲۵±۰/۰۲c	۰/۳۶±۰/۰۲b	۰/۴۰±۰/۰۱a
	L1	۰/۳۵±۰/۰۱c	۰/۴۰±۰/۰۱b	۰/۴۵±۰/۰۲a
	L2	۰/۳۹±۰/۰۲c	۰/۴۵±۰/۰۱b	۰/۴۹±۰/۰۱a

*حروف انگلیسی متفاوت در هر سطر از نظر آماری اختلاف معناداری دارند ($p<۰/۰۵$).

S : پنیر بدون آنزیم، (L1): پنیر دارای ۴ گرم لیپاز در ۱۰۰ کیلوگرم شیر، (L2): پنیر دارای لیپاز ۸ گرم در ۱۰۰ کیلوگرم شیر، (P1) : پنیر دارای ۱۲/۷ میلی‌لیتر پروتئاز کپسوله، (P2): پنیر دارای ۱۶/۲ میلی‌لیتر پروتئاز کپسوله.

اثر افزودن آنزیم بر بافت پنیر در طول رسیدن

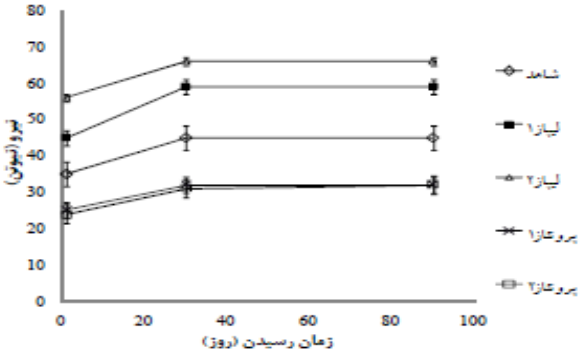
تغییرات سختی و شکنندگی نمونه‌های پنیر بدون آنزیم و نمونه‌های دارای آنزیم لیپاز و پروتئاز کپسوله در طول رسیدن در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل ۱ مشخص است، در طول ماه اول رسانیدن سختی همهٔ نمونه افزایش پیدا می‌کند که این افزایش را می‌توان ناشی از نگهداری پنیرها در آب نمک دانست. نگهداری پنیرها در آب نمک سبب خروج رطوبت از آنها می‌شود (Zerfiridis, 2001) که این مسئله سبب افزایش سختی آنها می‌گردد.

از روز ۳۰ تا ۹۰ سختی نمونه‌ها تغییر معنی‌داری نشان نمی‌دهد که این مسئله از ایجاد تعادل میان کاهش سختی ناشی از پروتئولیز و افزایش سختی تحت تأثیر خروج رطوبت به وجود می‌آید. مطالعات برخی محققان (Guizani *et al.* 2002) نشان داده است که سختی بعضی از انواع پنیر به علت پروتئولیز کاهش می‌یابد. پروتئولیز با شکست کازئین‌ها به پپتیدهایی با وزن مولکولی پایین و اسیدهای آمینه که محلول در آب نمک هستند، از سختی پنیر می‌کاهد. این مسئله در حالی است که نگهداری در آب نمک و خروج رطوبت، سختی پنیرهای آب‌نمکی را افزایش می‌دهد. در فاصلهٔ روز ۳۰ تا ۹۰ این دو پدیده با یکدیگر در تعادل هستند، ازاین‌رو سختی پنیر ثابت می‌ماند.

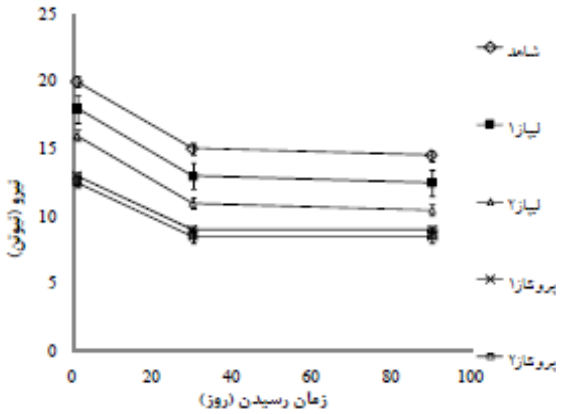
ویژگی‌های بافتی پنیر تحت تأثیر اتصالات عرضی و برهم‌کنش میان ماتریکس کازئینی و فاز چربی و نیز ویژگی پلاستیکی‌کنندگی (Plasticizing effect) چربی قرار می‌گیرد (Madadlou *et al.*, 2007). سختی نمونه‌های حاوی لیپاز در مقایسه با نمونه بدون آنزیم افزایش معنی‌داری نشان می‌دهد که این مسئله ناشی از تجزیهٔ گلبول‌های چربی است. به نظر می‌رسد که با اضافه‌کردن لیپاز، هیدرولیز تری‌گلیسریدها به اسیدهای چرب آزاد افزایش می‌یابد که این مسئله سبب ازبین‌رفتن و یا کوچکترشدن اندازهٔ گلبول‌های چربی می‌شود (Karami *et al.*, 2009). با کاهش اندازه و تعداد گلبول‌های چربی، اتصالات عرضی بین زنجیره‌های کازئینی افزایش می‌یابد و ساختمان پنیر به‌هم‌فشرده و سخت می‌شود (Gunasekaran and Ak, 2003). زمانی‌که غلظت آنزیم لیپاز از ۴ به ۸ گرم در ۱۰۰ لیتر شیر افزایش می‌یابد، سختی پنیر نیز به‌صورت معناداری افزایش می‌یابد. استفاده از پروتئازهای کپسوله سبب کاهش معنی‌دار سختی پنیر می‌گردد که این مسئله به علت تجزیهٔ پروتئین و جذب رطوبت به‌وسیلهٔ محصولات پروتئولیز (گروه‌های کربوکسیل و آمین) است (Creamer & Olson,

(1982. زمانی که غلظت پروتئاز افزایش می‌یابد، اثر معنی‌داری بر سختی پنیر مشاهده نمی‌شود که می‌توان آن را ناشی از اثر بازدارندگی نمک بر فعالیت آنزیم‌های پروتئاز (Guinee & Fox 1993) دانست. با وجود استفاده از کپسول‌های صمغی برای آهسته‌ترشدن روند پروتئولیز، سختی پنیر به شدت تحت تأثیر حضور پروتئازها قرار می‌گیرد.

شکل ۲ نشان می‌دهد که بریتلنس (Brittleness) -نیروی لازم برای شکست اولیه- در نمونه‌های پنیر در طول ماه اول کاهش می‌یابد که نشان‌دهندهٔ افزایش شکنندگی نمونه‌ها (Larmond, 1976) است. کاهش رطوبت پنیرهای آب‌نمکی در طول ماه اول نگهداری در آب نمک، سبب افزایش شکنندگی این نمونه‌ها می‌شود (Bertola *et al.*, 2000). از روز ۳۰ تا ۹۰ شکنندگی همهٔ نمونه‌ها تغییر معنی‌داری نشان نمی‌دهد که این مسئله به علت ایجاد تعادل در عوامل مؤثر در شکنندگی – خروج رطوبت و پروتئولیز- است. با افزودن آنزیم لیپاز، بریتلنس کاهش می‌یابد که نشان‌دهندهٔ افزایش شکنندگی نمونه‌ها در حضور آنزیم است. اضافه‌کردن آنزیم لیپاز سبب افزایش شکست گلبول‌های چربی می‌شود و ازاین‌رو با تجزیهٔ چربی‌ها که به‌عنوان روان‌ساز عمل می‌کردند، سبب کاهش انعطاف و افزایش شکنندگی نمونه‌ها می‌گردد (Karami *et al.* 2009). با افزایش غلظت آنزیم لیپاز، شکنندگی پنیر نیز به‌صورت معناداری افزایش می‌یابد. افزودن آنزیم پروتئاز به پنیر سبب افزایش تجزیهٔ پروتئین‌هاست و با ازهم‌گسیختگی شبکهٔ کازئینی، باعث افزایش شکنندگی پنیر می‌شود. نتایج به‌دست‌آمده که حاکی از افزایش شکنندگی با تشدید پروتئولیز با کمک آنزیم است، با نتایج محققان روی تسریع رسیدن پنیر چدار با پروتئاز کپسوله‌شده (Kheadr-Ehab *et al.*, 2000) هم‌سو است. افزایش غلظت آنزیم پروتئاز در کپسول اثر معناداری بر شکنندگی نمونه‌های پنیر ندارد که می‌توان آن را به اثر بازدارندگی نمک بر فعالیت پروتئاز نسبت داد. از آنجا که آنزیم پروتئاز در کاپاکاراگینان کپسوله می‌شود، روند تغییرات شکنندگی در طول زمان آهسته‌تر است.



شکل ۱. اثر اضافه‌کردن آنزیم بر سختی پنیر آب‌نمکی (p<۰/۰۵)



شکل ۲. اثر اضافه‌کردن آنزیم بر شکنندگی پنیر آب‌نمکی (p<۰/۰۵)

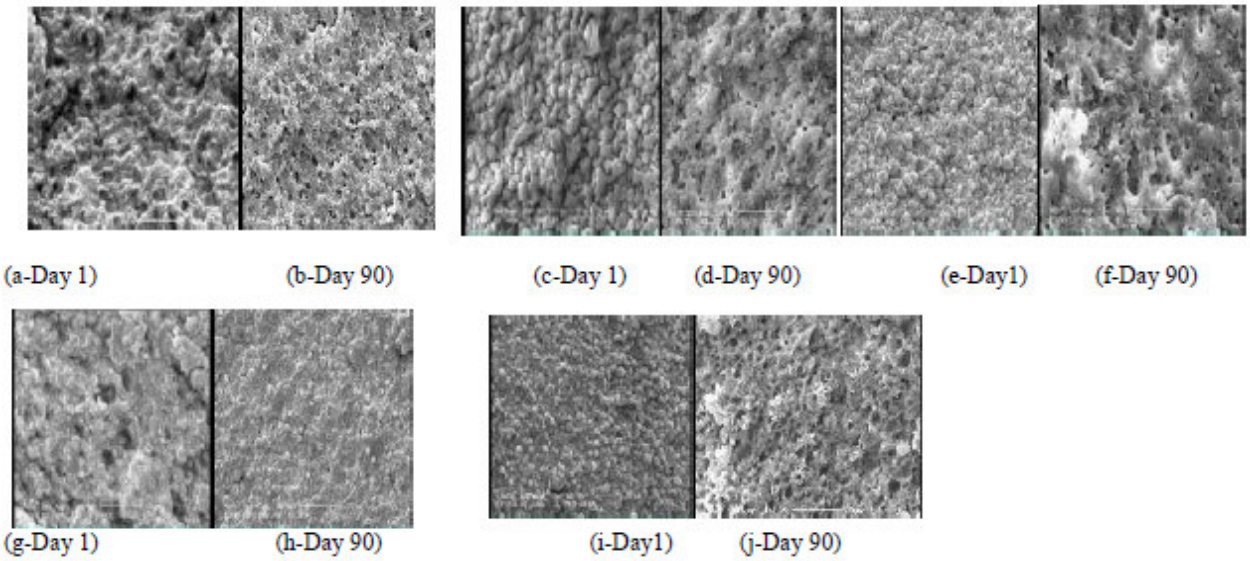
اثر اضافه‌کردن آنزیم بر ریزساختار پنیر در طول رسیدن

شکل ۳ ریزساختار نمونه‌های پنیر بدون آنزیم، حاوی لیپاز و پروتئاز کپسوله‌شده را در روزهای اول و ۹۰ دورهٔ رسیدن در بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰ نشان می‌دهد. در روز اول، تصویر میکروسکوپ الکترونی نمونهٔ بدون آنزیم (a) نشان‌دهندهٔ ماتریکس پروتئینی با حفره‌های اندک (ناشی از تولید گاز میکروارگانیزم‌ها) است. ازآنجا که در مرحلهٔ آماده‌سازی از کلروفرم برای شستشوی چربی‌ها استفاده شد، ازاین‌رو گلبول‌های چربی در تصویر مشاهده نمی‌شوند. به‌دلیل اهمیت تغییر وضعیت گلبول‌های چربی در نمونه‌های حاوی لیپاز، مرحلهٔ شست‌وشو با کلروفرم در آماده‌سازی نمونه‌های دارای لیپاز حذف شد. تصویر(c) گلبول‌های چربی به‌دام‌افتاده در میسل کازئین در نمونهٔ حاوی ۴ گرم لیپاز را در روز اول نشان می‌دهد (گلبول‌های چربی با پیکان مشخص شده‌اند)، که قطر متوسط گلبول‌های چربی که با کمک نرم‌افزار سنجش اندازهٔ اجزای ریزساختار اندازه‌گیری شده‌اند، ۵/۳۳ میکرومتر است. با افزایش غلظت لیپاز از تراکم گلبول‌های چربی در پنیر کاسته می‌شود و متوسط قطر گلبول‌ها به ۳/۳۳ میکرومتر کاهش می‌یابد (e). چربی موجود در پنیر به‌عنوان انعطاف‌دهنده (Plasticizer) تشکیل اتصالات عرضی بین زنجیره‌های کازئینی را محدود می‌کند (McKenna, 2003). آنالیز بافت پنیر امنتال[1] با روش پراکنش نور نشان داد که گلبول‌های چربی قطر متوسطی در حدود۰/۱±۴/۵ میکرومتر دارند (Lopez *et al.*, 2007). در روز اول، تصاویر پنیرهای دارای پروتئاز کپسوله‌شده نیز کپسول‌هایی با قطر متوسط دو میکرومتر نشان می‌دهد که حاوی آنزیم است (g, i).

در پایان ۹۰ روز رسیدن، پنیر بدون آنزیم به علت خروج رطوبت بافت فشرده‌تری با حفره‌های بیشتری به‌دلیل تخمیر

1. Emmental

دارد (b). تصاویر میکروسکوپ الکترونی از نمونه‌های حاوی لیپاز نشان می‌دهد که در پایان دورهٔ رسیدن، اکثر گلبول‌های چربی تخریب شده‌اند و فقط ردپای برخی از آنان مشاهده می‌شود (d,f). گلبول‌های چربی تخریب‌شده به شکل چربی آزاد در حفره‌های داخل ماتریکس کازئینی می‌شوند (Lopez *et al.*, 2007). ناپدیدشدن گلبول‌های چربی تحت تأثیر لیپاز سبب افزایش اتصالات کازئینی می‌شود که این مسئله به ایجاد بافت یکنواخت ونیز افزایش سختی پنیر می‌انجامد. حفره‌های ناشی از تخمیر نیز در بافت پنیرهای لیپازدار مشاهده می‌شود که دی‌اکسیدکربن و سایر گازهای اتمسفری در داخل آنها به دام می‌افتند (Fox, 1993). بعد از ۹۰ روز، آثاری از کپسول‌ها در نمونه‌های حاوی پروتئاز کپسوله مشاهده نمی‌شود که نشان می‌دهد آنزیم‌ها در طول زمان از آنها خارج و وارد بافت پنیر شده‌اند (g,h). در حضور پروتئاز به‌دلیل شدت تجزیهٔ کازئین‌ها، از فشردگی بافت پنیر کاسته می‌شود. با افزایش مقدار آنزیم پروتئولیز با شدت بیشتری صورت گرفته است (i,j).



شکل ۳. ریزساختار نمونه‌های پنیر با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰. (a,b): پنیر بدون آنزیم، (c,d): پنیر دارای ۴ گرم لیپاز در ۱۰۰ کیلوگرم شیر، (e,f): پنیر دارای لیپاز ۸ گرم در ۱۰۰ کیلوگرم شیر، (g,h) : پنیر دارای ۱۲/۷ میلی‌لیتر پروتئاز کپسوله؛ و (i,j): پنیر دارای ۱۶/۲ میلی‌لیتر پروتئاز کپسوله

نتیجه‌گیری

براساس مطالعات انجام‌گرفته می‌توان گفت آنزیم لیپاز و پروتئاز کپسولهٔ اضافه‌شده به پنیر، باوجود تأثیرات مثبتی که با تسریع واکنش‌های بیوشیمیایی در کوتاه‌کردن دورهٔ رسیدن دارند، بافت و ریزساختار پنیر را تحت‌تأثیر قرار می‌دهند. آنزیم لیپاز با کاهش اندازه و تعداد گلبول‌های چربی و نیز افزایش اتصالات عرضی کازئین سبب افزایش سختی پنیر می‌شود در حالی‌که پروتئازها با شکست شبکهٔ کازئینی سبب نرم‌شدن بافت آن می‌گردند. شکنندگی پنیر نیز با تشدید لیپولیز و پروتئولیز کاهش می‌یابد. بنابراین، هنگام استفاده از آنزیم‌ها تأثیرات جانبی آنها بر بافت و ریزساختار باید ارزیابی شود و بهترین غلظت با کمترین تأثیرات نامطلوب، باید انتخاب شود. باوجود کپسوله‌کردن آنزیم‌های پروتئاز، این آنزیم تأثیرات نامطلوبی بر بافت پنیر دارد و بنابراین استفاده از آن توصیه نمی‌شود.

REFERENCES

Aminifar, M., Hamedi, M., Emam Djomeh, Z. and Mehdinia, A. (2010). Microstructural, compositional and textural properties during ripening of Lighvan cheese, a traditional raw sheep cheese. *Journal of Texture Studies,* 41, 579-593.

Awad, S. (2006). Texture and flavor development in Ras cheese made from raw and pasteurized milk. *Food Chemistry*, 97, 394-400.

Bertola, N. C., Califano, A. N., Bevilacqua, A. E. and Zaritzky, N. E. (2000). Effects of ripening conditions on the texture of Gouda cheese. *International Journal of Food Science and Technology*, 35(2), 207-214.

Ceruti, R. J., Zorrilla, S. E. and Sihufe, G. A. (2012).The influence of elevated initial ripening temperature on the proteolysis in Reggianito cheese. *Food Research International,* 48, 34-40.

Creamer, L. K. and Olson, N. F. (1982). Rheological evaluation of maturing Cheddar cheese. *Journal of Food Science*, 47, 631-636.

Fox, P. F. (1993) Cheese: An overview. In P. F. Fox (Ed.), Cheese chemistry, physics and microbiology. (pp. 1-36). London: Chapman and Hall

Fredrick, I. A., Atson, J. W., Nottingham, S. M. and Dulley, J. (1986). The effect of neutral fungal protease in Cheddar cheese ripening. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology,* 43**,** 35-39.

Guinee, T. P. and Fox, P. F. (1993). Sodium chloride and moisture changes in Romano-type cheese during salting. *Journal of Dairy Research,* 50, 511-518.

Gunasekaran, S. and Ak, M. M. (2003) *Cheese rheology and texture*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press

Guizani, N., Kasapis, S., Al-Attabi, Z. and Al-Ruzeiki, M. (2002). Microbiological, physicochemical and biochemical changes during ripening of camembert cheese made of pasteurized cow's milk. *International Journal of Food Properties,* 5, 438-494.

ISO (33433:1975). Determination of fat content, Van Gulik Method. Geneva.

ISO (660: 2009). Animal and vegetable fats and oil-determination of acid value and acidity- test methods. Geneva.

Kailasapathy, K. and Lam, S. H. (2005). Application of encapsulated enzymes to accelerate cheese ripening. *International Dairy Journal*, 15, 929-939.

Karami, M., Ehsani, M. R., Mousavi, S. M., Rezaei, K. and Safari, M. (2009). Microstructural properties of fat during the accelerated ripening of Ultrafiltered-Feta cheese. *Food Chemistry,* 113, 424-434.

Kheadr-Ehab, E., Vuillemard, J. C. and El-Deeb, S. A. (2003). Impact of liposome-encapsulating enzyme cocktails on Cheddar cheese ripening. *Food Research International,* 36, 241-252.

Kirk, R. S. and Sawyer, R. (1991) *Pearson's composition and analysis of foods* (9th ed.). London: Longman Science and Technical.

Kuchroo, C. N. and Fox, P. F. (1982) Soluble nitrogen in cheddar cheese: comparison of extraction procedures. *Milchwissenschaft,* 37, 331-335.

Larmond, E. (1976) The texture profile. In J. M. de Man, P. W. Voisey, V. F. Rasper and D. W. Stanley (Eds.), Rheology and texture in food quality. (pp. 546-553). Westport, Ireland: AVI Publishing

Law, B. A. (1979). Review of the progress of dairy science: enzymes of psychrotrophic bacteria and their effects on milk and milk products. *Journal of Dairy Research,* 46 (3), 573-588.

Lopez, C., Camier, B. and Gassi, G. Y. (2007). Development of milk fat microstructure during the manufacture and ripening of Emmental cheese observed by confocal laser scanning microscopy. *International Dairy Journal,* 17 (3), 235-247.

Madadlou, A., Khosrowshahi, A., Mousavi, M. E., Emam-Djomeh, Z. and Zargaran, M. (2007). The influence of brine concentration on chemical composition and texture of Iranian white cheese. *Journal of Food Engineering,* 81, 330-335.

Mckenna, B.M. (2003) *Texture in food* (vol. 1). Boca Raton, FL, USA: CRC Press

Singh, T. K., Drake, M. A. and Cadwallader, K. R. (2003). Flavor of cheddar cheese: a chemical and sensory perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety,* 2, 139-162.

Szczesniak, A. S. (1963). Classification of textural characteristics. *Journal of Food Science,*38, 385-389.

Tamime, A. Y. (2006) *Brined cheeses*. UK: Blackwell publishing

Yilmaz, G., Ayar, A. and Akin, N. (2005). The effect of microbial lipase on the lipolysis during the ripening of Tulum cheese. *Journal of Food Engineering,* 69, 269-274.

Zerfiridis, G. K. (2001) Soft cheeses. In: G. K. Zerfiridis (Ed.), Technology of dairy products, I: *Cheese-making*. (pp. 155–198). Thessaloniki, Greece: Giaxoudi-Giapouli.