

## تأثیر عصاره هون بر روی سینتیک تغییرات فاکتورهای ازت در طی نگهداری در آب نمک و مرحله رسیدن در پنیر سنتی کوزه ای

بشیر بهرامی<sup>۱\*</sup>، محمد عزیزاده خالد آباد<sup>۲</sup> و حامد حسن زاده اوچتپه<sup>۳</sup>

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه ارومیه

۲- استاد گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه ارومیه

۳- فارغ التحصیل دوره دکتری تخصصی گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه ارومیه

(تاریخ دریافت: ۹۴/۰۸/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۲/۰۲)

### چکیده

در این تحقیق، سینتیک تغییرات فاکتورهای ازت (ازت محلول، ازت غیر پروتئینی و ازت کل) در پنیر سنتی حاوی عصاره‌ی بذره‌های گیاهان محلی به نام هون مورد ارزیابی قرار گرفته است. نمونه‌های پنیر به مدت ۵۶ روز درون آب نمک ۱۲ درصد و دمای ۱۰ درجه قرار گرفتند و سپس در کوزه‌های سفالی و زیر خاک در دماهای ۵، ۱۰ و ۱۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. هر ۱۴ روز یکبار فاکتورهای مذکور در نمونه‌های پنیر اندازه‌گیری شده و تغییرات حاصل برای محاسبه‌ی مدل‌های سینتیکی بکارگرفته شد. نتایج حاصله نشان داد که در طول نگهداری پنیرها درون آب‌نمک، نسبت ازت محلول و ازت غیر پروتئینی در همه نمونه‌های پنیر افزایش یافت. تغییرات ازت محلول، برای هر دو نوع پنیر (پنیر سنتی حاوی عصاره هون و نمونه‌های پنیر سنتی بدون عصاره) داخل کوزه‌ها از سینتیک درجه اول پیروی کرده و ثابت سرعت واکنش در هر دو نوع پنیر در دمای ۱۰ درجه بیشتر از ۵ و ۱۵ درجه بود. همچنین تغییرات ازت غیر پروتئینی داخل کوزه، در همه نمونه‌های پنیر از سینتیک درجه صفر پیروی کرد و سرعت واکنش در ۱۰ درجه بیشتر از ۵ و ۱۵ درجه بوده و ثابت سرعت در دمای ۱۰ درجه برای پنیر بدون عصاره (شاهد)، ۰/۱۸ و برای پنیر دارای عصاره ۰/۱۳ بود.

کلید واژگان: فاکتورهای ازت، ثابت سرعت، درجه ی واکنش، پنیر سنتی

\*مسئول مکاتبات: b\_bahrami2011@yahoo.com

## ۱- مقدمه

از آغاز تولید پنیر، تغییرات عمده‌ای در آن شروع می‌شود که در مجموع به آن رسیدن اطلاق می‌شود و به همین دلیل است که در بعضی منابع رسیدن پنیر را یک فرایند بیوشیمیایی دینامیک نامیده‌اند [۱]. در طول رسیدن پنیر تغییرات مهمی مانند تغییرات بیوشیمیایی مانند گلیکولیز، لیپولیز و پروتئولیز و همچنین تغییر در مزه و بافت ممکن است رخ دهد. می‌توان گفت که پیچیده‌ترین، متفاوت‌ترین و مهم‌ترین تغییرات بیوشیمیایی که در طول رسیدن پنیر اتفاق می‌افتد پروتئولیز است [۲].

پروتئولیز به دو مرحله اولیه و ثانویه تقسیم می‌شود. پروتئولیز اولیه را می‌توان به تغییراتی که روی بتا، گاما،  $\alpha_s$  کازئین ها، پپتیدها و سایر دسته‌های کوچک اتفاق می‌افتد، تعریف کرد که خود با استفاده از الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌امید قابل شناسایی هستند [۳]. در پروتئولیز ثانویه، پپتیدهای بزرگ بوسیله پروتئازها و پپتیدازهای استارت‌تری و غیراستارت‌تری به پپتیدهای کوچک و آمینواسیدهای آزاد تبدیل می‌شوند که این واکنش‌ها منجر به تولید ترکیبات مختلفی از قبیل آمونیاک، آمین‌ها، آلدهیدها، فنول‌ها، اندول‌ها و الکل‌ها می‌شوند [۴]. پروتئولیز بیشترین نقش را در ایجاد عطر و طعم در پنیر ایفا می‌کند که این امر در اثر تولید پپتیدها و اسیدهای آمینه آزاد و ترکیبات عطر و طعم داری مانند آمین‌ها، اسیدها، تیول‌ها و تیواسترها صورت می‌گیرد [۵].

رسیدن پنیر فرآیندی کند و تا حدودی پرهزینه و گاهی غیرقابل کنترل است. اما تلاش فراوانی در جهت تسریع روند پروتئولیز و رسیدن پنیر صورت گرفته و راه‌های مختلفی هم برای این کار پیشنهاد و مورد بررسی قرار گرفته است که شامل افزایش دمای رسیدن (مخصوصاً برای پنیرهای گونه‌ی چدار که در دمای ۶ تا ۸ درجه سانتی‌گراد رسانیده می‌شوند)، استفاده از پروتئینازها و پپتیدازهای خارجی، استارترهای اصلاح‌شده و استارترهای تولید شده به روش مهندسی ژنتیک است [۱].

نتایج حاصل از تحقیقات انجام شده در سالهای اخیر امکان استفاده از پروتئازهای گیاهی را به عنوان جایگزین مناسب، کم-هزینه و ایمن برای مایه‌پنیرهای دیگر نشان می‌دهد. یکی از امتیازات آنزیم‌های گیاهی، بالاتر بودن دمای بهینه‌ی فعالیت این آنزیم‌ها در مواردی است که عملیات پنی‌سازی با فرایند حرارتی

توأم است. علاوه بر این، دلمه‌ی تولیدی با مایه‌پنیر گیاهی در مقایسه با مایه حیوانی کمتر تحت تأثیر دما قرار می‌گیرد. هم چنین این پروتئازها واکنش بیشتری به افزایش فعالیت انعقادی با اضافه کردن کلسیم در شیر نشان می‌دهند. بطوری که با اضافه کردن ۰/۱ درصد کلسیم فعالیت این آنزیم‌ها تقریباً ۳ برابر می‌شود [۶].

فرنی و همکاران (۲۰۰۳) در تحقیقاتی که بر روی فاکتورهای ازت SN و NPN در پنیر Serra da Estrela تولید شده با شیر خام میش و با استفاده از نوعی مایه منعقدکننده از نوعی خار-وحشی (*Cynara cardunculus*) در طول ۱۸۰ روز انجام دادند تمامی فاکتورهای مذکور افزایش یافتند و مقدار SN/TN از ۱ درصد در روز اول به ۴۳ درصد در روز ۱۸۰ رسید که بیانگر شدت پروتئولیز توسط آنزیم‌های ترشح شده از گیاه مذکور بوده است [۷]. همچنین در تحقیق دیگری که فرسنوا و همکاران (۲۰۰۳) بر روی نوعی پنیر برزیلی انجام دادند تمامی فاکتورهای ازت در طول ۶۰ روز رسیدن افزایش یافتند و همواره در تمامی تحقیقات مذکور میزان SN/TN بالاتر از NPN/TN بوده است [۸].

در بعضی از مناطق آذربایجان و کردستان مخصوصاً مناطق روستایی به شیوه‌ای سنتی معده‌ی گوساله‌ها را به قطعاتی کوچک تبدیل و پس از پاشیدن نمک آن را خشک می‌کنند. در هنگام مصرف، ابتدا قطعات شیردان گوساله را شسته و سپس در مقداری آب قرار می‌دهند تا عصاره‌ای تشکیل شود. سپس به طور تجربی چندین نوع بذر از جمله دانه‌های هل، رازیانه، سیاه‌دانه، میخک، کمی دارچین و زنجبیل به همراه مقداری زاج یا جوهرلیمو در این مایع که قطعات معده‌ی گوساله را در آن قرار داده‌اند، می‌ریزند یا مقدار مشخصی از بذره‌های مذکور را در مقداری آب ریخته و تقریباً پس از گذشت دو هفته بوی مطلوبی می‌گیرد که عصاره تشکیل شده را در مناطق کردنشین هون می‌نامند. در هنگام مصرف، مقداری از مایع هون را به همراه مقداری از مایه‌پنیرهای میکروبی یا مایه‌پنیر و عصاره‌ی حاصل از معده‌ی گوساله به شیر اضافه می‌کنند. احتمالاً به دلیل اینکه نحوه‌ی استفاده از معده‌ی گوساله بهداشتی و مناسب نیست مقدار کمی از آنزیم رنین تا هنگام مصرف فعال باقی می‌ماند لذا سعی می‌کنند با عصاره‌ی این بذرها (هون) قدرت لخته‌کنندگی رنین را تقویت کنند و در ضمن

گذشت ۱۵ دقیقه هم زدن آرام و پس دادن قسمت اعظم آب، دلمه‌ها داخل پارچه‌ی متقال گذاشته شده و وزنه‌ای معادل ۲ کیلو به ازای سه کیلو دلمه بر روی آن گذاشته شد و پس از یک و نیم ساعت، دلمه‌ها به قطعات مکعبی مشخص بریده شدند و مقداری نمک روی آنها پاشیده شد. سپس دلمه‌ها را بر روی هم گذاشته شده و حدود ۱۲ ساعت در همین حالت باقی ماندند و به همین ترتیب مقداری از آب خود را پس دادند. با احتساب میزان نمک مصرف شده و همچنین میزان آب پس داده شده پس از نمک پاشی با استفاده از آب جوشیده‌ی سرد شده غلظت آب نمک نهایی در ۱۲ درصد تنظیم شده و در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد درون یخچال به مدت ۵۶ روز نگهداری شد.

## ۲-۲- طرز تهیه‌ی عصاره‌ی هون (Haven)

مقدار ۱۰ گرم زنجبیل، ۵ گرم میخک، ۱۰ گرم هل، ۱۰ گرم سیاه دانه، ۵ گرم رازیانه، ۱۰ گرم نبات و ۳ گرم دارچین را در یک لیتر آب جوشانیده‌ی سرد ریخته شد و پس از یک هفته که بوی مطلوبی به خود گرفت، ۱۵۰ سی‌سی از آن را صاف کرده و به همراه مقدار لازم مایه پنیر میتو به شیر جهت تولید پنیر نوع B اضافه شد.

## ۲-۳- آماده سازی نمونه های پنیر برای گذاشتن

### داخل کوزه و زیر خاک

در روز ۵۶ ام قطعات مکعبی پنیر از آب نمک بیرون آورده شدند. پنیرها طبق روش سنتی، حدود ۵ دقیقه در آب جوشیده سرد شده قرار گرفته و شسته شدند. سپس قطعات پنیر کاملاً خردشده و در کوزه‌هایی از جنس سفال با ظرفیت حدود ۱۵۰ گرم ریخته شدند طوری که هوا داخل کوزه باقی نماند و مقداری نمک بروی قسمت بالایی پنیر داخل کوزه‌ها اضافه شده و با پارچه‌ای از جنس متقال سر کوزه‌ها بسته شدند و مقداری گل بر روی پارچه قرار داده و بصورت وارونه درون خاکی که در مناطق محلی مخصوص قرار دادن کوزه است، قرار داده شدند. در نهایت کوزه‌ها همراه خاکی که در آن قرار داده شده بودند در جعبه‌های مخصوص در سه دمای ۵، ۱۰ و ۱۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

## ۲-۴- اندازه‌گیری ازت کل

چون عصاره‌ی هون بوی مطلوبی دارد تلاش می‌کنند بوی مطلوبی را به لخته و پنیر بدهند اما تاکنون تحقیقاتی در این باره صورت نگرفته است که نشان دهد در عصاره‌ی هون، آنزیم‌های فعال با قدرت لخته‌کنندگی یا پروتئولیتیکی وجود دارد. لذا در این مطالعه سعی شده است که تاثیر عصاره هون بر پروتئولیز (از طریق اندازه‌گیری فاکتورهای ازت) در پنیر سنتی بررسی گردد و سینتیک تغییرات فاکتورهای ازت و تولید مواد ازته حاصل در طی این فرایند مد نظر قرار گیرد. سینتیک واکنش‌های شیمیایی، ارتباط بین سرعت از بین رفتن واکنش دهنده یا سرعت تولید محصول در واکنش و غلظت مواد را در هر زمان تعیین می‌نماید. جهت طبقه‌بندی معادلات سرعت واکنش از کلمه مرتبه یا مفهوم ریاضی آن استفاده می‌شود. مرتبه واکنش عبارت است از مجموع توان‌هایی که در جملات غلظت در شکل دیفرانسیلی معادله سرعت واکنش دیده می‌شوند. بیشتر واکنش‌های صورت گرفته در مواد غذایی از مرتبه‌ی صفر یا اول برخوردارند [۹]. همچنین با توجه به این مسئله که پروتئولیز و درصد پیشرفت آن در طی رسیدن پنیر اهمیت ویژه‌ای در ایجاد طعم و بوی پنیر دارد، انجام چنین تحقیقی ضروری به نظر می‌رسد.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- آماده‌سازی نمونه‌های شیر و نحوه‌ی تهیه‌ی

#### پنیر

شیر مورد استفاده در اواخر پاییز از یک گاوداری محلی در شهرستان بوکان خریداری شد و اسیدیته و چربی آن اندازه‌گیری شد (اسیدیته ۱۴ درجه دورنیک، پروتئین ۳/۳۸ درصد و چربی ۳/۸ درصد). شیر پس از انتقال به محل تولید، تا دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد و سپس مقدار لازم مایه پنیر قارچی میتو (یک گرم در صد لیتر شیر) به شیر اضافه شد. پس از حدود دو دقیقه مخلوط کردن ملایم شیر، درب آن گذاشته شده و پس از ۸۰ دقیقه که زمان انعقاد تشخیص داده شد (یک میله شیشه‌ای با زاویه ۴۵ درجه در داخل دلمه قرار گرفته و به سمت بالا حرکت داده شده، در صورتی که دلمه به میله شیشه‌ی نچسبد زمان انعقاد به پایان رسیده است)، با استفاده از یک تیغه بصورت طولی و سپس عرضی دلمه‌ها به مکعب‌های کوچکی تبدیل شدند. پس از

خطای کمتر به عنوان مدل مناسب جهت پیش بینی تغییرات فاکتور مورد نظر در طی فرایند رسیدن پنیر، انتخاب گردید. لازم به ذکر است که کلیه آزمایشات در سه تکرار انجام شده و میانگین سه تکرار در محاسبات لحاظ شده است.

$$c=c_0+kt \quad (1) \text{ معادله } c$$

$$\ln c=\ln c_0+kt \quad (2) \text{ معادله } \ln c$$

$$1/c=1/c_0+kt \quad (3) \text{ معادله } 1/c$$

در معادلات فوق،  $c_0$  مقادیر یا غلظت اولیه ماده،  $c$  مقادیر یا غلظت ماده در زمان  $t$ ،  $k$  ثابت سرعت واکنش و  $t$  زمان هستند. سرعت واکنش مرتبه صفر را می توان با تعیین سرعت از بین رفتن واکنش دهنده ها و یا سرعت تولید محصول در واکنش مشخص کرد که البته میزان آن مستقل از غلظت واکنش دهنده هاست و در واکنش مرتبه یک، سرعت واکنش تابع غلظت مواد واکنش دهنده در واکنش است [۹].

### ۳- نتایج و بحث

#### ۳-۱- تغییرات ازت محلول

##### ۳-۱-۱- تغییرات ازت محلول در طی نگهداری در آب نمک

نتایج نشان می دهد که تا روز ۵۶ نگهداری پنیر داخل آب نمک، ازت محلول در هر دو نوع پنیر روندی رو به رشد داشت (شکل ۱) و در تحقیقاتی که علیزاده (۱۳۸۱)، فرنی و همکاران (۲۰۰۳) و همچنین فرسنوا (۲۰۰۳) بر روی پنیر انجام دادند مشخص شده است که در طول پروتئولیز، میزان نیتروژن محلول و ازت غیر پروتئینی افزایش پیدا می کند [۷، ۸ و ۱۲].

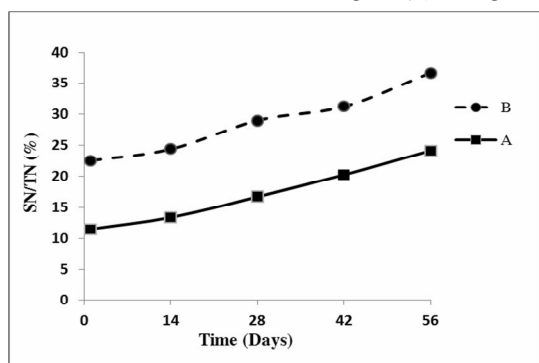


Fig 1 Soluble nitrogen changes in two types of chesses (A and B) in brine stage and at 10 °C

نیتروژن کل نمونه های پنیر مطابق روش استاندارد (AFNOR- chemieII- 10A) توسط دستگاه کلدال اتوماتیک اندازه گیری شدند.

#### ۲-۵- اندازه گیری ازت محلول

۴۰ میلی لیتر از محلول سترات سدیم نیم مولار با pH برابر ۷ را به ۱۰ گرم پنیر اضافه شده و در بن ماری ۴۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس توسط خردکن پنیرها در دو مرحله خرد شده و دمای آنها را به ۲۲ درجه سانتی گراد رسانیده و سپس با افزودن آب مقطر حجم محلول به ۲۰۰ میلی لیتر رسانیده شد. به ۱۵۰ میلی لیتر از محلول سترات فوق قطره قطره اسید کلریدریک نرمال افزوده شده تا pH به ۴/۴ برسد. پس از مخلوط کردن آهسته به مدت ۲۰ دقیقه در دمای محیط و تنظیم مجدد pH در صورت لزوم حجم محلول به ۲۰۰ میلی لیتر رسانده شد و با کاغذ صافی واتمن ۴۲ صاف شده و ازت محلول با روش کلدال اندازه گیری شد [۱۰].

#### ۲-۶- روش تعیین ازت غیر پروتئینی

۴ میلی لیتر محلول ۶۰ درصد تری کلرو استیک اسید را به ۱۶ میلی لیتر از محلول صاف شده حاوی ازت محلول اضافه و پس از یک ساعت تماس در دمای محیط رسوب حاصله توسط کاغذ صافی واتمن ۴۲ صاف شد. محلول صاف شده نمایانگر ازت غیرپروتئینی است که روی یک بهر از آن عمل هضم انجام شده و میزان ازت با روش کلدال اندازه گیری شد [۱۱].

#### ۲-۷- مدل سازی سینتیک و روش های آماری

##### مورد استفاده

در این مطالعه از مدل سازی تجربی و آنالیز رگرسیون با استفاده از برنامه Excel جهت بررسی روند تغییرات داده ها و سینتیک تغییرات فاکتورهای مورد مطالعه در طی زمان رسیدن و نگهداری پنیر در آب نمک استفاده شده است. داده های آزمایش با مدل های سینتیک درجه صفر، یک و دو که بصورت معادله های زیر نمایش داده شده اند (به ترتیب معادله های (۱)، (۲) و (۳) برای درجه واکنش صفر، یک و دو)، برازش داده شدند و بدین ترتیب ثابت سرعت واکنش تعیین گردید و در نهایت با مقایسه ضریب تبیین مدل های مذکور، مدل با ضریب تبیین بالاتر و مجموع مربعات

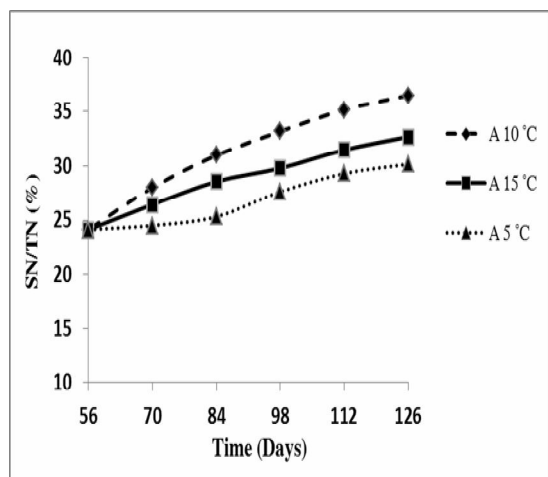
(پروتئین‌های پنیر) می باشد. هرچند ضریب تبیین دو نوع پنیر برای واکنش درجه‌ی اول تفاوت معنی داری با هم ندارند اما از مقایسه‌ی ثابت سرعت‌ها برای دو نوع پنیر در درجه اول پنیر A ( $k=0/013$ ) و پنیر نوع B ( $k=0/008$ ) احتمالاً می‌توان دریافت که به دلیل پروتئولیز بیشتر ناشی از آنزیم‌های گیاهی هون در پنیر نوع B و گسیختگی بافت، همزمان با تشکیل پپتیدهای محلول خروج آنها به داخل آب نمک هم بیشتر است و در نتیجه بخشی از ازت محلول از پنیر خارج شده و منجر به کمتر شدن ثابت سرعت واکنش در پنیر نوع B می‌شود.

بالتر بودن ازت محلول در پنیر نوع B احتمالاً به دلیل عمل آنزیم‌های ترشح شده از بذرهای بکار رفته برای تهیه‌ی هون می‌باشد زیرا آنزیم‌های گیاهی به کار رفته در تولید پنیر فعالیت پروتئولیتیکی و قدرت عمل کنندگی غیراختصاصی بیشتری نسبت به مایه پنیر فارچی میتو دارند [۱۰ و ۱۲].

نتایج حاصله نشان می‌دهد که سنتیک تولید ازت محلول برای هر دو پنیر نوع A و B نگهداری شده در داخل آب نمک با ضریب تبیین ( $R^2=0/99$ ) از واکنش درجه‌ی اول پیروی می‌کند (جدول ۱) و این وضعیت حاکی از آن است که سرعت واکنش شیمیایی و تولید ازت محلول در این مرحله وابسته به غلظت ماده اولیه

**Table 1** Kinetic factors of soluble nitrogen changes in two types of chesses (A and B) in brine stage and at 10 °C

(SN/TN)	Kinetic order	R <sup>2</sup>	Constant rate
Cheese A	$c=c_0+kt$	0.989	0.232
	$\ln c=\ln c_0+kt$	0.998	0.013
	$1/c=1/c_0-kt$	0.987	0.0008
Cheese B	$c=c_0+kt$	0.984	0.239
	$\ln c=\ln c_0+kt$	0.995	0.008
	$1/c=1/c_0-kt$	0.998	0.0003



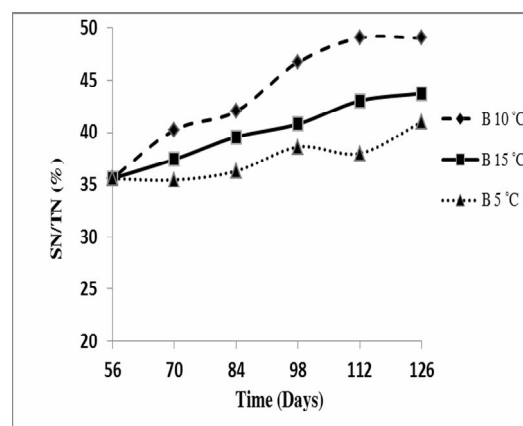
**Fig 2** Soluble nitrogen changes in two types of chesses (A and B) in the jar stage and underground at 5, 10 and 15 °C

همچنین از آنالیز داده‌های سنتیکی برای دو نوع پنیر در سه دمای ۵، ۱۰ و ۱۵ درجه سانتی‌گراد می‌توان نتیجه گرفت که سنتیک تولید ازت محلول SN/TN یا پروتئولیز اولیه برای دو نوع پنیر در داخل کوزه‌ها از واکنش درجه‌ی صفر تبعیت می‌کند که این

### ۳-۱-۲- تغییرات ازت محلول در دو نوع پنیر در داخل

#### کوزه‌ها

نتایج این مرحله نیز نشان داد که تغییرات ازت محلول در دو نوع پنیر A و B در داخل کوزه‌ها همانند مرحله آب نمک روند افزایشی داشته است (شکل ۲) که با نتایج عزیزاده (۱۳۸۱) و مالکتا و همکاران (۲۰۰۳) مطابقت دارد [۷ و ۱۲].



احتمالا آنزیم‌های گیاهی داخل عصاره‌ی هون می باشد که توانسته‌اند پپتیدهای محلول بیشتری تولید کنند (جدول ۲ و ۳). در روز ۵۶م که پنیرها شسته شده و کاملاً خرد می‌شوند میزان نمک از ۶/۱ به ۴/۴ درصد و اسیدیته از ۰/۵۹ به ۰/۴۷ درصد بر حسب اسید لاکتیک کاهش یافته و همزمان با خرد کردن و آسیب بافت و تضعیف شبکه پروتئینی دوباره پروتئولیز و فاکتورهای ازت روند افزایشی داشته است. سرعت پروتئولیز در طول مدت داخل کوزه به ویژه در دو هفته‌ی آخر بتدریج رو به کاهش بود که این امر احتمالاً به دلیل از دست دادن تدریجی رطوبت و سفت شدن بافت پنیر است که باکتری‌ها و آنزیم‌های مرتبط با پروتئولیز را تحت تأثیر قرار می‌دهد (شکل ۲).

می‌تواند ناشی از تغییر شرایط نگهداری از داخل آب نمک به داخل کوزه باشد زیرا در داخل کوزه پنیرها خرد شده‌اند و شبکه‌ی ساختمانی پروتئین دچار آسیب شده است. در نتیجه میزان دسترسی آنزیم‌ها به پلی پپتیدها بیشتر می‌شود همچنین به دلیل خروج تدریجی رطوبت از داخل پنیر به خاک اطراف تراکم پپتیدهای محلول در داخل پنیر نیز بیشتر می‌شود که خود غلظت بیشتر پپتیدهای محلول را می‌رساند و در هر دو نوع پنیر ثابت سرعت واکنش در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد بیشتر از دو دمای دیگر است و مقایسه‌ی ثابت سرعت واکنش‌ها هم سرعت بیشتر تشکیل پپتیدهای محلول در پنیر B را نشان می‌دهد برای پنیر A ( $k=0.17$ ) و برای پنیر B ( $k=0.19$ ) که علت آن

**Table 2** Kinetic factors of SN/TN changes in cheese A in the jar stage and at 5, 10 and 15 °C.

Cheese	Order type	Temperature (°C)	R <sup>2</sup>	Geometric mean	Constant rate
Cheese A	c=c <sub>0</sub> +kt	5	0.955	0.969	0.095
		10	0.968		0.174
		15	0.985		0.12
	ln c=ln c <sub>0</sub> +kt	5	0.985	0.959	0.003
		10	0.945		0.005
		15	0.974		0.004
	1/c=1/c <sub>0</sub> -kt	5	0.960	0.944	0.00013
		10	0.915		0.00019
		15	0.958		0.00015

**Table 3** Kinetic factors of SN/TN changes in cheese B in the jar stage and at 5, 10 and 15 °C.

Cheese	Order type	Temperature (°C)	R <sup>2</sup>	Geometric mean	Constant rate
Cheese B	c=c <sub>0</sub> +kt	5	0.847	0.923	0.074
		10	0.942		0.199
		15	0.986		0.118
	ln c=ln c <sub>0</sub> +kt	5	0.855	0.921	0.001
		10	0.930		0.004
		15	0.982		0.002
	1/c=1/c <sub>0</sub> -kt	5	0.862	0.916	5.218
		10	0.915		0.0001
		15	0.976		7.564

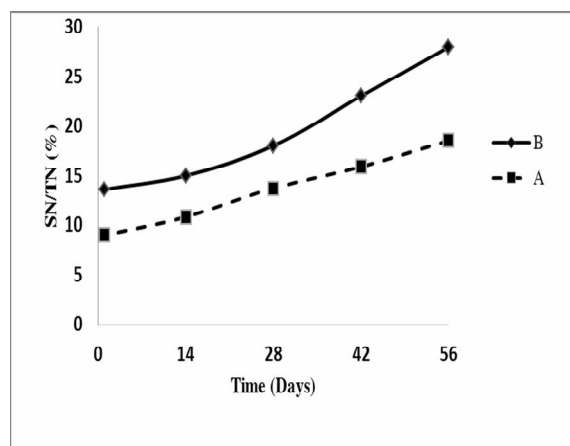
رشدی دارد. ازت غیر پروتئینی ماده‌ای با وزن مولکولی پایین تر از ۵۰۰ دالتون بوده که عموماً پپتیدهای کوچک و اسیدهای آمینه را شامل می‌شود. درصد NPN بالا در پنیر می‌تواند نشانه‌ی فعالیت پروتئولیتیک شدید و همچنین غیراختصاصی بودن ذاتی خود آنزیم لخته کننده باشد. در تحقیقات زیادی که بر روی مایه

### ۲-۳- تغییرات ازت غیر پروتئینی

#### ۱-۲-۳- تغییرات ازت غیر پروتئینی در دو نوع پنیر داخل

##### آب نمک

همانطور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود ازت غیر پروتئینی در هر دو نوع پنیر در مرحله‌ی نگهداری داخل آب نمک روند رو به



**Fig 3** Non-protein nitrogen changes in two types of chesses A (without extract) and B (containing extract) in brine stage and at 10 °C

پنیرهای قارچی و گیاهی صورت گرفته میزان NPN در پنیرهای تولیدی با این مایه پنیر همواره بیشتر از پنیرهای تولید شده با مایه پنیرهای حیوانی بوده زیرا مایه پنیرهای قارچی و گیاهی قدرت پروتئولیتیکی بیشتری دارند و عمل کنندگی غیراختصاصی آنها بالاتر است [۱۰ و ۱۲]. همچنین طبق داده‌های جدول ۴ سنتتیک واکنش‌های منجر به تولید NPN در پنیر A واکنش درجه‌ی صفر و در پنیر B از نوع واکنش درجه‌ی دو است که چنین حالتی می‌تواند حاکی از شدت بیشتر پروتئولیز (که منجر به تولید ازت غیر پروتئینی بیشتری شده است) به دلیل وجود آنزیم‌های گیاهی در پنیر نوع B باشد.

**Table 4** Kinetic factors of non-protein nitrogen changes in two types of chesses (A and B) in brine stage and at 10 °C

	NPN/TN	Kinetic order	R2	Constant rate
Cheese A		$c=c_0+kt$	0.997	0.174
		$\ln c=\ln c_0+kt$	0.990	0.013
		$1/c=1/c_0-kt$	0.965	0.001
Cheese B		$c=c_0+kt$	0.960	0.267
		$\ln c=\ln c_0+kt$	0.984	0.013
		$1/c=1/c_0-kt$	0.993	0.0007

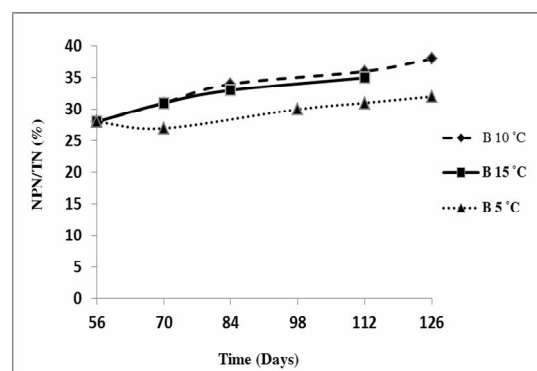
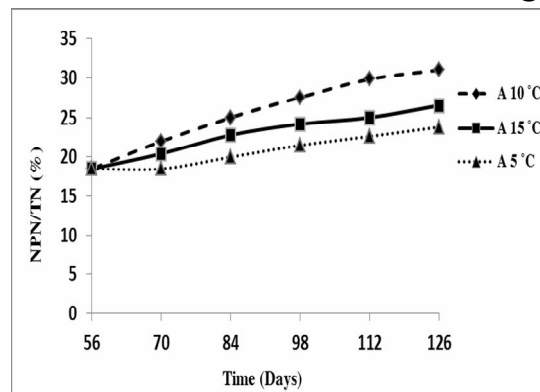
همگی بر روی میزان پروتئولیز نقش تعیین کننده دارند از جمله گامز و همکاران (۱۹۹۸) در مطالعه بر روی تاثیر دما و رطوبت نسبی بر میزان پروتئولیز پنیر در دو دمای ۵ و ۱۰ درجه سانتی-گراد دریافتند که افزایش دما نسبت به افزایش رطوبت نسبی تاثیر بیشتری بر روی فاکتورهای ازت داشته است [۱۳]. همچنین لکلرگ و همکاران (۲۰۱۲) در بررسی نقش دما و رطوبت نسبی بر روی پنیر کاممبرت در سه دمای (۸، ۱۲ و ۱۶) درجه سانتی‌گراد با رطوبت نسبی (۹۲، ۸۸ و ۹۸ درصد) نشان دادند که مناسب‌ترین دما برای دستیابی به بهترین حالت از نظر رشد فلور میکروبی و سنتتیک واکنش‌های بیوشیمیایی دمای ۱۳ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۹۴ درصد می‌باشد [۱۴]. همچنین در تحقیقی که مونتانهینی و همکاران (۲۰۱۲) بر روی رشد ۸۶ زیرگونه‌ی باکتری سایکروتروف باسیلوس سرئوس (تولید کننده ی آنزیم‌های لیپاز و پروتئاز) در پنیر در دماهای (۷، ۱۰، ۳۰) درجه سانتی‌گراد انجام دادند و گزارش کردند که در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد، ۷۲ درصد سویه‌ها فعالیت پروتئولیتیکی داشتند درحالی‌که در دمای

### ۲-۲-۳- تغییرات ازت غیرپروتئینی در دو نوع پنیر داخل کوزه و زیر خاک

افزایش قابل توجه سرعت پروتئولیز در دمای ۱۰ نسبت به ۵ درجه سانتی‌گراد را می‌توان از یک طرف به تاثیر دما در افزایش سرعت واکنش‌های شیمیایی و از طرفی به نقش فلور میکروبی موجود در پنیر نسبت داد زیرا با افزایش دما به ۱۵ درجه نه تنها میزان و سرعت پروتئولیز (که بطور مستقیم با تولید ازت غیر پروتئینی مرتبط است) افزایش نمی‌یابد بلکه کاهش هم داشته است بنابراین این احتمال وجود دارد که باکتری‌هایی که بهینه‌ی دمای رشد آنها ۱۰ درجه سانتی‌گراد بوده (باکتری‌های سایکروتروف لیپولیتیک از جمله گونه‌هایی از سودوموناس) فلور غالب این پنیر را تشکیل داده اند (شکل ۴) زیرا تحقیقاتی که تاکنون بر روی نقش میکرو ارگانیسم‌ها در پروتئولیز صورت گرفته حاکی از آن است که مجموعه‌ی فلور میکروبی موجود در پنیر به همراه رطوبت نسبی، میزان چربی و شرایط بسته‌بندی

به این دلیل باشد که در پنیر نوع B پروتئولیز در مراحل قبل (نگهداری در آب نمک) نسبت تقریباً بالایی از ازت پروتئینی را تولید کرده و در واقع بیشتر این فرآیند در مرحله نگهداری در آب نمک رخ داده و در نتیجه تولید ازت غیر پروتئینی در داخل کوزه با روند آرامتری رخ داده و منجر به ثابت سرعت واکنش کمتر در این مرحله شده است. با مقایسه روند تولید ازت غیر پروتئینی برای دو نوع پنیر در شکل ۴ می توان مشاهده کرد که در روز ۵۶ ام (آغاز ورود پنیر ها به داخل کوزه) پنیر نوع B دارای نسبت ازت غیر پروتئینی بیشتری است (حدود ۳۰ درصد) در حالی که این نسبت برای پنیر نوع A حدود ۲۰ درصد می باشد. همچنین در روزهای پایانی نیز پنیر نوع B دارای نسبت ازت غیر پروتئینی بیشتری در هر سه دمای نگهداری می باشد که این شواهد نشان می دهد که پنیر نوع B بیشتر فرآیند تولید ازت غیر پروتئینی را در مرحله آب نمک گذرانده و در نتیجه در مرحله نگهداری در داخل کوزه این روند رو به کاهش بوده است. در مقایسه‌ی روند سینتیکی تشکیل ازت غیر پروتئینی دو نوع پنیر در داخل کوزه هر چند واکنش از نوع درجه‌ی صفر است اما ضریب تبیین در پنیر نوع A ( $R^2=0/97$ ) بیشتر از پنیر نوع B ( $R^2=0/92$ ) است و در هر دو نوع پنیر ثابت سرعت در دمای ۱۰ درجه بیشتر از ۱۵ و سپس ۵ درجه است. 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 حرارت‌های بالا، طعم‌های نامطلوب و ناخواسته را افزایش می‌دهد [۱۶]. همچنین مشخص شده است که دمای نگهداری بالا، بیشترین اثر را بر پروتئولیز دارد ولی تأثیر دما غیراختصاصی 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 [۴]. 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 [۱۷].

۷ درجه سانتی‌گراد تنها ۴/۶ درصد سویه‌ها دارای فعالیت پروتئولیتیکی بودند. در مقایسه همزمان قدرت پروتئولیتیکی و لیپولیتیکی در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، ۱/۲ درصد سویه‌ها همزمان این توانایی را داشتند در حالی‌که در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد، ۱۵ درصد سویه‌ها دارای این توانایی بودند [۱۵] که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد.



**Fig 4** Non-protein nitrogen changes in two types of chesses A (without extract) and B (containing extract) in jar and underground stage and at 5, 10 and 15 °C

تولید NPN در پنیر نوع A از درجه واکنش صفر پیروی می‌کند و ثابت سرعت واکنش ( $k=0/18$ ) برای دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد بیشتر از دمای ۱۵ و ۵ درجه سانتی‌گراد است (جدول ۵). تولید NPN نیز در پنیر نوع B از درجه واکنش صفر پیروی می‌کند و ثابت سرعت واکنش ( $k=0/13$ ) برای دمای ۱۰ درجه بیشتر از دمای ۱۵ و ۵ درجه سانتی‌گراد است (جدول ۶). پایین تر بودن ثابت سرعت واکنش پنیر B نسبت به پنیر A می‌تواند



**Table 5** Kinetic factors of non-protein changes in cheese A in the jar stage and at 5, 10 and 15 °C.

Cheese	Order type	Temperature (°C)	R <sup>2</sup>	Geometric mean	Constant rate
Cheese A	c=c <sub>0</sub> +kt	5	0.968	0.973	0.082
		10	0.978		0.18
		15	0.974		0.112
	lnc=lnc <sub>0</sub> +kt	5	0.969	0.96	0.003
		10	0.953		0.007
		15	0.958		0.005
	1/c=1/c <sub>0</sub> -kt	5	0.967	0.941	0.0001
		10	0.920		0.0003
		15	0.938		0.0002

**Table 6** Kinetic factors of non-protein changes in cheese B in the jar stage and at 5, 10 and 15 °C.

Cheese	Order type	Temperature (°C)	R <sup>2</sup>	Geometric mean	Constant rate
Cheese B	c=c <sub>0</sub> +kt	5	0.887	0.923	0.067
		10	0.953		0.133
		15	0.929		0.12
	lnc=lnc <sub>0</sub> +kt	5	0.879	0.909	0.002
		10	0.937		0.004
		15	0.911		0.003
	1/c=1/c <sub>0</sub> -kt	5	0.870	0.893	0.000077
		10	0.917		0.00012
		15	0.892		0.00012

#### ۴- نتیجه گیری کلی

پنیر بلافاصله پس از تولید دچار تغییراتی می‌شود که مهم‌ترین تغییر از لحاظ بیوشیمیایی پروتئولیز است. همچنین عوامل زیادی بر سرعت و میزان پروتئولیز اثر می‌گذارند. نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره‌ی هون در مرحله‌ی آب نمک هم درجه‌ی واکنش و هم ثابت سرعت را تغییر می‌دهد بطوریکه تغییرات SN/TN در پنیر A از درجه‌ی یک و در پنیر B از درجه‌ی دو، NPN/TN در پنیر A از درجه صفر و در پنیر B از درجه‌ی دو تبعیت می‌کند و میزان پروتئولیز اولیه و ثانویه در پنیر نوع B بیشتر از پنیر نوع A بود که می‌تواند به دلیل فعالیت پروتئولیتیکی آنزیم‌های گیاهی موجود در عصاره‌ی هون باشد. اما در پنیرهای داخل کوزه تغییرات سنتیک SN/TN و NPN/TN برای هر دو نوع پنیر A و B مشابه و از درجه صفر بود و در هر دو نوع پنیر سرعت پروتئولیز در ۱۰ درجه سانتی‌گراد بیشتر از ۵ و ۱۵ درجه سانتی‌گراد بود. اما در هر سه دما، ثابت سرعت بیشتری برای پنیر B بدست آمد که این مسئله نشان می‌دهد که تاثیر دما بر روی پروتئولیز بصورت خطی نبوده و اگر از مقدار مشخصی بالاتر برود پروتئولیز روند کاهشی خواهد داشت.

#### ۵- منابع

- [1] Fox, P.F., and. McSweeney, P.L.H . 2004. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Third edition - Volume 1: General Aspects, Elsevier Ltd, Overview.
- [2] Paul, H. M. 2004. Biochemistry of cheese ripening. International journal of dairy technology, 57 (3) 127-145.
- [3] Dorosty, S., Bazmi, A., Ghanbarzadeh, B., Ayase, A. 2010. Effect of partial replacement of sodium chloride with potassium chloride in the brine cheese on the Iranian white cheese properties. Journal of food science and technology, 5 (3): 67-74 [In Persian]
- [4] Sihufe, GA., Zorrilla, S., and Rubiolo A. C. 2005. Kinetics of proteolysis of  $\beta$ -casein during ripening of Fynbo cheese salted with NaCl or NaCl/KCl and ripened at different temperatures. Journal of Food Science, 70: 151-156.
- [5] Attaie. R. 2005. Effects of aging on rheological and proteolytic properties of goat milk Jack Cheese produced according to cow milk procedures. Small Ruminant Research, 57: 19-29. [In Persian]
- [6] Beigmy, M., Ghodsrohani, M., Mohamadifar, M. A., Hashemi, M., Valizadeh, M., Ghanati,

- [12] Alizadeh, M., Ehsani M. 2003. Comparison of rennet from the mold (*Mucor. miehei*) with animal rennet and renilase commercial cheese. *Journal of Iranian agricultural science*, 34 (1): 207-212. [In Persian]
- [13] Gomes, A. M. P., and Silva, M. P. 1998. The effects of ripening temperature and relative humidity on proteolysis and lipolysis. *Zlebens Munters Forsch A*, 207: 386- 394.
- [14] Leclercq-Perla, M. N. 2012. Temperature and relative humidity influence the microbial and physicochemical characteristics of Camembert-type cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, 95 (8) : 4666-4682.
- [15] Montanhini, M. T. M. 2013. Effect of temperature on the lipolytic and proteolytic activity of *Bacillus cereus* isolated from dairy products. *International Food Research Journal*, 20 (3): 1417-1420.
- [16] 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.
- [17] Shariati M. B., Hesari, J., Hamdami, N. 2011. The effect of ripening temperature and brine concentration on kinetic of Lighvan chesse proteolysis. *Journal of food science research*, 52 (1): xx-xx.[In Persian].
- K. 2013. Study on texture and sensory characteristics of white Feta cheese produced by *Withania protease* compared with fungal rennet. *Journal of food science and technology*, 8 (1): 253-262. [In Persian]
- [7] Freni K. T., Inmaculada F., Javier C. F., Xavier M. F. 2003. Amino acid and soluble nitrogen evolution throughout ripening of Serra da Estrela cheese. *International Dairy Journal*, 13 (7) 537–545.
- [8] Francesco, A. 1992. Characterization of the 12% trichloroacetic acid-insoluble oligopeptides of Parmigiano-Reggiano cheese. *Journal of Dairy Research* , 59: 401-411.
- [9] Abasimonfared, H., Hamdami, N., Hesari, J. 2013. Kinetic modeling of proteolysis and Lipolysis during ultrafiltered white cheese ripening at different temperatures. *Journal of Iranian biosystem engineering*, 43 (2): 181-186. [In Persian]
- [10] Kuchroo, C.N., and Fox, P. F. 1982. Fractionation of water activity soluble nitrogen from cheddar cheese, chemical methods. *Milchweissenschatt*, 37:331-xxx.
- [11] Des Mazeaud, J. M., and Grophen, D. 1976. Etude de role de microorganismes et des enzymes au course de la maturation du fromages. *Le Lait*, 56: 379-385.

## The effect of Haven extracts addition on kinetics changes of nitrogen factors during storage in brine and ripening stage in traditional jar cheese

Bahrami, B.<sup>1\*</sup>, Alizadeh, M.<sup>2</sup>, Hassanzadeh Ochtappeh, H.<sup>3</sup>

1. Msc in Food technology, food technology department, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
2. Ph.D in Food technology, food technology department, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
3. Professor in Food technology, food technology department, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

(Received: 2015/11/17 Accepted:2017/04/22)

In this research, kinetic changes of nitrogen factors (soluble nitrogen, non-protein nitrogen and total nitrogen) were evaluated in traditional jar cheese containing extract of local vegetable seed, namely Haven. Cheese samples were immersed in brine (12 %) for 56 days at 10 °C and then were filled in the jars and stored at temperatures of 5, 10 and 15 °C. The nitrogen factors was measured every 14 days and used as data for kinetic models. Obtained results showed that soluble nitrogen and non-protein nitrogen were increased during storage of cheese samples in the brine. Kinetic changes of soluble nitrogen were followed first order reaction and the rate constant at 10 °C was higher than 5 and 15 °C for both types of cheeses (samples with Haven and blank samples without it). Also, kinetic changes of non-protein nitrogen were followed zero order reaction and rate constant at 10 °C was higher than 5 and 15 °C in two types of cheeses. Reaction rate constants at 10 °C for traditional cheese without Haven and traditional cheese containing Haven were 0.18 and 0.13, respectively.

**Keywords:** Nitrogen factors, Constant rate, Reaction order, Traditional cheese

---

\* Corresponding Author E-Mail Address: b\_bahrami2011@yahoo.com