تأثیر افزودن آنزیم پروتئاز تجاری بر پروتئولیز پنیر سفید فراپالایش ایرانی

راحله نژاد رزمجوی اخگر[1]، جواد حصاری[2*]، صدیف آزاد مرد دمیرچی[2]

١- دانشجوی دکترای صنایع غذایی، گرایش تکنولوژی مواد غذایی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
٢- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

(تاریخ دریافت: ٩٣/١١/٢٩ تاریخ پذیرش: ٩٤/٢/١٥)

چکیده

اثر افزودن آنزیم تجاری مشتق از *باسیلوس پلی میکسا* نوع IX بر روی پنیر فتای فراپالایش ایرانی در طول ٦٠ روز رسیدن بر روی ترکیب شیمیایی، pH و پروتئولیز نمونه های پنیر مورد بررسی قرار گرفت. تفاوت های معنی داری بین پنیر آزمایشی و کنترل از نظر ترکیب شیمیایی مشاهده نگردید. مقادیر pH در تمام طول دوره رسیدن به طور معنی داری ($P<$ ٠/٠٥) در پنیر آزمایشی بالاتر بود و در روز ٦٠ ام در پنیرهای کنترل و آزمایشی به ترتیب ٤/٦٢ و ٤/٧٧ بود. ازت محلول در pH = ٤/٦ در روز ٤٥ و٦٠ ام به طور معنی داری ($P<$ ٠/٠٥) در تیمار آزمایشی بیشتر بود. در روز ٦٠ام، این شاخص ٦/٣٨ و ٧/٧٣ ٪ به ترتیب در تیمارهای کنترل و آزمایشی بود. تفاوت معنی دار ($P<$ ٠/٠٥) در سطح ازت محلول در تری کلرو استیک اسید ١٢٪ نیز در روز ٤٥ و ٦٠ ام مشاهده گردید. اوره- پلی آکریل آمید ژل الکتروفورز اجزای نامحلول در pH = ٤/٦ نشان داد که αs_1- کازئین سریعتر از β- کازئین هیدرولیز شد. مقادیر هیدرولیز نشده αs_1- کازئین از ١٠٠٪ در روز اول به ٨٢/٩٣ ٪ و ٧١/٢٤٪ و در β- کازئین به ٩٠/٢٨ و ٩٠/٥٦ ٪ در روز ٦٠ ام به ترتیب در پنیرهای کنترل و آزمایشی رسید. غلظت های اسیدهای آمینه آزاد کل در تمام طول رسیدن در پنیر آزمایشی به طور معنی داری ($P<$ ٠/٠٥) بالاتر بود و در پایان دوره، ٠/٦٨ در مقابل ٠/٥٤ (میلی گرم گلایسین در گرم) پنیر کنترل بود. سطوح اسیدهای آمینه آزاد اختصاصی نیز بین تیمارها متفاوت بود.

کلید واژگان: اولترافیلتراسیون، پروتئاز تجاری، پروتئولیز، پنیر فراپالایش

* مسئول مکاتبات: jhesari@tabrizu.ac.ir

۱- مقدمه

پنیر از قدیمی ترین محصولات شیر می باشد که ارزش غذایی به سزایی در تغذیه انسان دارد. پنیر فتای فراپالایش یکی از پرمصرف ترین پنیرهای سفید آب نمکی تولیدی در ایران است که از شیر گاو تغلیظ شده تهیه می گردد [۱]. علیرغم مزایای بسیار بالای این پنیرها از جمله راندمان تولید بالا، در این نوع پنیرها به دلایلی از قبیل عدم فعالیت استارترهای لاکتیکی و به تعویق افتادن اتولیز سلولی استارترها که احتمالاً ناشی از ظرفیت بافری بالای پروتئین های آب پنیر می باشد، روند کلی رسیدن با تأخیر زیادی همراه بوده و در نتیجه از خصوصیات ارگانولپتیکی مطلوبی برخوردار نیستند [۲]. در پنیرهای فراپالایش، پروتئین های آب پنیر در داخل رتنتیت باقی می مانند و این پروتئین ها دارای ظرفیت نگهداری آب بالایی می باشند، لذا محتوای رطوبتی پنیرهای فراپالایش بالاتر از محتوای رطوبتی پنیرهای سنتی است [۳]. در طول فرآیند اولترافیلتراسیون اندازه میسل های کازئین کاهش یافته و از طریق پیوندهای هیدروفوبیک به یک ساختار متراکم تر آرایش مجدد پیدا می کنند [٤]. به طور کلی پذیرفته شده که به علت محتوای بالای پروتئین های آب پنیر در پنیرهای فراپالایش رسیدن این پنیرها کندتر از پنیرهای سنتی است.

رسیدن پنیر یک فرآیند پیچیده و اجتناب ناپذیر جهت دستیابی به محصولی با خصوصیات بافتی و ارگانولپتیکی منحصر به فرد می باشد. در طی رسیدن، پنیر دستخوش تغییرات میکروبیولوژیکی و بیوشیمیایی مهم می گردد، این تغییرات شامل گلیکولیز، لیپولیز و پروتئولیز می باشد که تغییرات مزبور با تعدادی از تغییرات کاتابولیک ثانوی شامل دآمیناسیون، دکربوکسیلاسیون، دسولفوراسیون و برخی تغییرات سنتتیکی نظیر استریفیکاسیون همراه است [٥]. پروتولیز مهمترین و پیچیده ترین رویدادی است که در اغلب واریته های پنیر رخ می دهد [٦] و شدیداً بر روی خواص حسی پنیر رسیده تأثیر می گذارد [۷]. پروتئولیز به دو مرحله پروتئولیز اولیه و ثانویه تقسیم می گردد. پروتئولیز اولیه به آن دسته از تغییراتی که بر روی کازئین‌ها، پپتیدها و سایر ترکیباتی که با الکتروفورز با ژل پلی‌آکریل‌آمید[1] قابل شناسایی هستند، اطلاق می‌شود. سرعت، مقدار، ماهیت و مسیر پروتئولیز در هنگام رسیدن پنیر، بر اساس نوع آنزیم، نوع پنیر و شرایط محیطی رسیدن متغیر است [۸]. آنزیم‌های پلاسمین و کیموزین مسئول پروتئولیز اولیه و تولید مقادیر اعظم فراکسیون‌های ازت محلول در pH=٤/٦ هستند و موجب بهبود بافت پنیر به وسیله تجزیه آهسته αs_1- کازئین و به مقدار کمتر β- کازئین می‌گردند. بنابراین، در بسیاری از پنیرها هیدرولیز اولیه کازئین، توسط رنت باقی مانده و تا حد کمتر توسط پروتئازهای اصلی شیر (پلاسمین، کاتپسین دی[2] و پروتئازهای سلول‌های سوماتیکی) صورت می‌گیرد. این امر سبب تشکیل پپتیدهای بزرگ و متوسط می‌شود. در نهایت این پپتیدها در اثر آنزیم‌های استارتر موجود تجزیه شده و به اسیدهای آمینه تبدیل می‌گردند و در ادامه، کاتابولیسم اسیدهای آمینه منجر به تولید ترکیبات معطر می‌گردد [۹]. در پروتئولیز ثانویه، با پیشرفت پروتئولیز، ترکیبات با وزن مولکولی پائین ایجاد می‌شوند که نقش مهمی در ویژگی‌های عملکردی و عطر و طعم پنیر دارند. در این واکنش‌ها، پپتیدهای بزرگ به وسیله پروتئازها و پپتیدازهای استارتری و غیراستارتری به پپتیدهای کوچک و اسیدهای آمینه آزاد تبدیل می‌شوند. این واکنش‌ها منجر به تولید ترکیباتی از قبیل آمونیاک، آمین‌ها، آلدئیدها، فنول‌ها، اندول‌ها و الکل‌ها می‌گردند [۱۰].

رسیدن فرآیند پر هزینه ای است و بخش مهمی از هزینه های تولید را تشکیل می دهد. در پنیرهای فراپالایش بتالاکتوگلوبولین از فعالیت پلاسمین ممانعت کرده و تبدیل بتاکازئین به گاماکازئین و پروتئوز پپتون را بلوکه می کند. بنابراین، پروتئولیز به تعویق افتاده و برخی معایب بافتی و حسی می تواند در محصول نهایی مشاهده گردد [۱۱]. امروزه از انواع روش های تسریع رسیدن به منظور بهبود ویژگی های حسی و ارگانولپتیکی پنیر استفاده می گردد. این روش ها شامل افزایش درجه حرارت رسیدن، اصلاح کشت های آغازگر، استفاده از کشت های الحاقی، افزودن دوغاب یا

1. PolyAcrylamid Gel Eelectophoresis
2. Cathepsin D

اسیدهای آزاد، استفاده از آنزیم های خارجی و فراوری با فشار بالا می باشد[٦].

هدف از اجرای این تحقیق، ارزیابی اثر پروتئاز مشتق از *باسیلوس پلی میکسا* نوع IX، بر روی ترکیب شیمیایی و فرایند پروتئولیز پنیر فتای فراپالایش از طریق اندازه گیری ازت محلول در pH = ٤/٦، ازت محلول در تری کلرواستیک اسید ١٢٪، اوره- الکتروفورز، اسیدهای آمینه آزاد کل و اسیدهای آمینه آزاد اختصاصی در طول ٦٠ روز دوره رسیدن بود.

٢- مواد و روش ها

٢-١- مواد

استارتر مرکب از کشت های مزوفیل (*لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *کرموریس* و *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *لاکتیس*) و ترموفیل (*استرپتوکوکوس سالیواریوس* زیرگونه *ترموفیلوس*) از شرکت دنیسکوی دانمارک، مایه پنیر قارچی فروماز مشتق از *رایزوموکور میهی* (دی اس ام، شرکت سیلین فرانسه)[1]، پروتئاز *باسیلوس پلی میکسا* نوع IX با قدرت ١ واحد در میلی گرم ماده جامد، دارای فعالیت پروتئولیتیک و پپتیدولیتیک، ساخت شرکت آلدریچ آلمان تهیه شدند.

٢-٢- روش تهیه پنیر

نمونه های پنیر در ٣ تکرار در ٣ روز متوالی در شرکت پگاه آذربایجان غربی تهیه شدند. شیر خام با کیفیت میکربی بالا (بار میکربی کمتر از 10^5 cfu/ml)، پس از استاندارد کردن چربی (٣/٥ ٪) و میکروفیلتراسیون با غشاهای لوله ای از جنس سرامیکی در دمای ٥٠ درجه سانتی گراد و تحت فشار ٢- ١ بار و به مدت حدود ٤٠ دقیقه و سپس پاستوریزاسیون در دمای ٧٢ درجه سانتی گراد به مدت ١٥ ثانیه، وارد دستگاه اولترافیلتراسیون در دمای ٥٠ درجه سانتی گراد گردید. با استفاده از صافی های غشایی مارپیچی[2] از جنس سلولزی، آب، املاح و لاکتوز شیر گرفته شده و ماده خشک شیر افزایش یافت. فاکتور تغلیظ ١ به ٤/٨ بود. فشارهای ورودی و خروجی واحد اولترافیلتراسیون به ترتیب ٥/٦ و ١/٨ بار بودند. رتنتیت مجدداً در دمای ٧٨ درجه سانتی گراد به مدت ٦٠ ثانیه پاستوریزه شده، سپس تا دمای ٣٥ درجه سانتی گراد جهت مایه زنی سرد گردید. دو نوع پنیر تولید شدند: ١) پنیر کنترل محتوی استارتر (١٪) و مایه پنیر قارچی (٢٨ میلی گرم به ازای کیلوگرم رتنتیت) و ٢) پنیر آزمایشی حاوی پروتئاز میکربی (٢ میلی گرم به ازای کیلوگرم رتنتیت)، علاوه بر استارتر و مایه پنیر. رتنتیت به میزان ٤٠٠ گرم به داخل لیوان ها اضافه و سپس وارد تونل انعقاد با دمای ٣٠ درجه سانتی گراد به مدت ٤٥ دقیقه جهت تشکیل دلمه گردید. با رسیدن لیوان ها به انتهای تونل، کاغذ مخصوص پارچمنت بر روی آنها قرار گرفته، مقدار ٢/٥ درصد نمک گرانولی بر روی آنها پاشیده شد و نهایتاً درب بندی با فویل آلومینیومی صورت گرفت. جهت رسیدن pH پنیرها به پایین تر از ٤/٨، بسته های پنیر به مدت ٢٤ ساعت در دمای ٢٨-٢٦ درجه سانتی گراد قرار گرفته، سپس به سردخانه با دمای ٨ درجه سانتی گراد به مدت ٦٠ روز جهت مطالعه و انجام آزمایشات منتقل شدند.

٢-٣- آنالیز نمونه های پنیر

٢-٣-١- ترکیب شیمیایی نمونه های پنیر

pH نمونه های پنیر از طریق فروبردن مستقیم الکترود به داخل بافت پنیر همگن دستگاه pH متر کالیبره دیجیتال [١٢]، رطوبت به وسیله آون از طریق خشک کردن نمونه های پنیر در دمای ٢ ± ١٠٢ درجه سانتی گراد تا رسیدن به وزن ثابت [١٣]، چربی به روش ژربر [١٤] ، نمک به روش ولهارد [١٥] و پروتئین کل به روش کجلدال [١٦] اندازه گیری شدند.

٢-٣-٢- ارزیابی پروتئولیز

ارزیابی پروتئولیز در نمونه های پنیر با اندازه گیری ازت محلول در pH = ٤/٦، ازت محلول در تری کلرواستیک اسید ١٢٪، اوره - پلی آکریل آمید ژل الکتروفورز، اسیدهای آمینه

1. DSM FoodSpecialities, Seclin, France
2. KMS HpHT ™ - HFK ™ -131, United Kingdo

آزاد کل و اسیدهای آمینه آزاد اختصاصی انجام گرفت. اندازه گیری ازت محلول در pH = ٤/٦ و ازت محلول در تری کلرواستیک اسید ١٢٪ با استفاده از روش کوچرو و فاکس [١٧]، اصلاح شده توسط سوسا و مکسوئینی [١٨] انجام گرفت.

٢-٣-٣- الکتروفورز با استفاده از ژل های اوره - پلی اکریل آمید

الکتروفورز اجزای نامحلول در pH = ٤/٦ با استفاده از ژل های اوره- پلی اکریل آمید با استفاده از دستگاه الکتروفورز با ژل عمودی و مطابق روش آندرو [١٩] و اصلاح شده توسط شلابی و فاکس [٢٠] انجام شد. ولتاژ دستگاه بر روی ٣٠٠ تنظیم گردید و پروتئین‌ها بر اساس بار و اندازه مولکولی تفکیک شدند. رنگ آمیزی مطابق روش بلاکسیلی و بویزی در داخل محلول رنگ‌آمیزی کوماسی بلو جی- ٢٥٠[1]انجام گرفت [٢١]. برای اندازه‌گیری سطح باندهای αs_1- و β- کازئین در ژل، از نرم افزار ایمیج جی[2] نسخه ٤، استفاده گردید. بدین منظور سطح باندها را در روز اول، ١٠٠ در نظر گرفته و سطح باندها در هر تیمار نسبت به آن سنجیده شد.

٢-٣- ٤ - اسیدهای آمینه کل

غلظت اسیدهای آمینه کل به وسیله تری نیترو بنزن سولفونیک اسید[3] مطابق روش توضیح داده شده توسط کایلاسپاتی [٢٢] انجام گرفت. نتایج به صورت میلی گرم گلایسین در گرم پنیر گزارش شد.

٢-٣-٥ - اسیدهای آمینه آزاد اختصاصی

اسیدهای آمینه آزاد اختصاصی مطابق روش توضیح داده شده توسط هیال اوغلو و همکاران [٢٣] با استفاده از آمینو اسید آنالایزر٦٣٠٠ مدل بکمن [4] مجهز به ستون ١٢٠ × ٤ میلی متری تبادل کاتیونی (Na^+) آنالیز شدند. نتایج به صورت میلی گرم در ١٠٠ گرم پنیر بیان شدند.

1. CoomasieBrilliant Blue G250
2. Image J
3. TNBS
4.Beckman Instruments - Ltd.,High Wycombe, UK

٢-٣-٦- طرح آماری

طرح آزمایشی اسپلیت پلات در زمان، بر اساس طرح بلوک های کامل تصادفی بود. میانگین ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه[5] مورد مقایسه قرار گرفتند. آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SAS انجام شد و برای رسم نمودارها از اکسل ٢٠٠٧ استفاده گردید.

٣ - نتایج و بحث

٣-١- ترکیب شیمیایی و pH

ترکیب شیمیایی پنیرهای فتای فراپالایش کنترل و آزمایشی در جدول ١ نشان داده شده است. نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن پروتئاز بر روی ترکیب شیمیایی پنیر فتای فراپالایش تأثیری نداشته است. به عبارت دیگر پنیر کنترل و پنیر آزمایشی، از نظر درصد رطوبت، نمک، چربی و پروتئین اختلاف معنی داری ($P<$ ٠/٠٥) در طول ٦٠ روز دوره رسیدن نشان ندادند. ولی در تمام طول دوره رسیدن pH نمونه آزمایشی به طور معنی داری از pH پنیر کنترل بیشتر بود ($P<$ ٠/٠٥). افزایش pH ممکن است به علت تشکیل ترکیبات قلیایی مانند آمونیاک در اثر پروتئولیز بیشتر در پنیر آزمایشی باشد [٢٤].

٣-٢ - سطوح ازت محلول در pH = ٤/٦ و ازت غیر پروتئینی

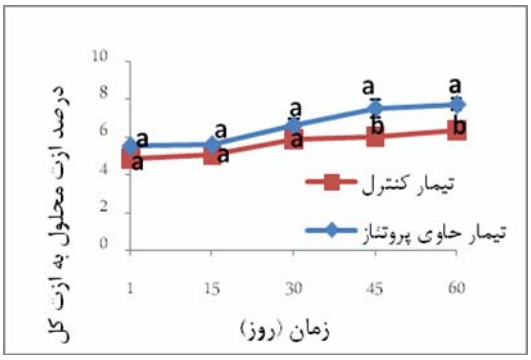
سطوح ازت محلول در pH = ٤/٦ و ازت غیر پروتئینی به صورت درصدی از ازت کل در طول ٦٠ روز دوره رسیدن در شکل های ١ و ٢ نشان داده شده است. درصد ازت محلول در pH = ٤/٦ به ازت کل یکی از شاخص های رسیدن پنیر است و عمدتاً توسط رنت و پلاسمین تولید می گردد [٢٥].

5. ANOVA

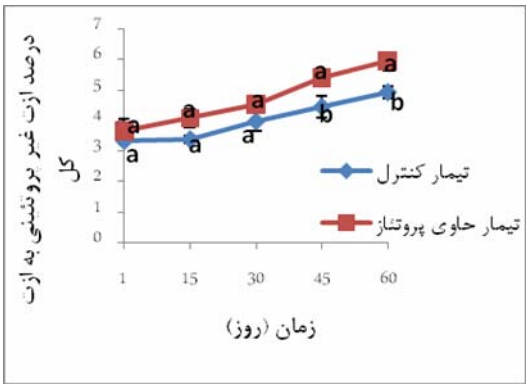
جدول ١ ترکیب شیمیایی پنیرهای فتای فراپالایش کنترل و آزمایشی

زمان رسیدن پنیر	تیمارهای پنیر	pH	رطوبت(٪)	نمک (٪)	چربی(٪)	پروتئین(٪)
روز ١	پنیر کنترل	٤/٧١± ٠/٠٤ b	٦٤/٥١±٠/٢٩ a	٢/٢٤ ±٠/٠١ a	١٤/٨٠ ±٠/١ a	١٣/٢٣ ±٠/٤١ a
	پنیر حاوی پروتئاز	٤/٨٠± ٠/٠١ a	٦٤/٠٠±٠/٣٤ a	٢/٢٤ ±٠/٠١ a	١٥/٠٠ ±٠/٠٠ a	١٣/٤٢ ±٠/٠٦ a
روز ١٥	پنیر کنترل	٤/٥٨± ٠/٠٢ b	٦٤/٧٣±٠/٣٥ a	٢/٢٨ ±٠/٠٠ a	١٤/٨٠ ±٠/١٠ a	١٣/٢٣ ±٠/٣٥ a
	پنیر حاوی پروتئاز	٤/٧٥±٠/٠٩ a	٦٤/٩٣ ±٠/٥٦ a	٢/٢٧ ±٠/٠١ a	١٤/٩٠ ±٠/٥٢ a	١٣/٢٠ ±٠/١٠ a
روز ٣٠	پنیر کنترل	٤/٥٧± ٠/١٩ b	٦٥/٢٤±٠/٤٤ a	٢/٣٣ ±٠/٠٠ a	١٥/٠٦ ±٠/٤٠ a	١٣/٥٣ ±٠/٤٠ a
	پنیر حاوی پروتئاز	٤/٧٧± ٠/٠٦ a	٦٥/١٩±٠/٦٤ a	٢/٣٣ ±٠/٠١ a	١٥/٢٣ ±٠/٢٠ a	١٣/١٠±٠/٣٠ a
روز ٤٥	پنیر کنترل	٤/٤٨± ٠/٠١ b	٦٥/٢٦±١/١٨ a	٢/٤٣ ±٠/٠٢ a	١٥/٠٠ ±٠/٠٠ a	١٣/٥٣ ±٠/٤٥ a
	پنیر حاوی پروتئاز	٤/٧٨± ٠/٠٢٦ a	٦٥/٢٨±٠/٧٠ a	٢/٤٣ ±٠/٠١ a	١٤/٨٨ ±٠/٤٠ a	١٣/٢٦ ±٠/٤٥ a
	پنیر کنترل	٤/٦٢± ٠/٠٠٥ b	٦٥/٤١±٠/٥٦ a	٢/٤٤ ±٠/٠٤ a	١٥/٠٣ ±٠/٢٠ a	١٣/٥٣ ±٠/١١ a
روز ٦٠	پنیر حاوی پروتئاز	٤/٧٧± ٠/١٧ a	٦٥/٤٨±٠/٥٦ a	٢/٤٦ ±٠/٠٢ a	١٥/٠٣ ±٠/٢٠ a	١٣/٢٠ ±٠/٧٠ a

حروف غیر مشابه در هر ستون (مربوط به یک ویژگی شیمیایی) و مربوط به یک روز رسیدن، بیانگر وجود اختلاف معنی دار (P< ٠/٠٥) بین تیمار کنترل و تیمار آزمایشی می باشد.



شکل ١ تغییرات ازت محلول به ازت کل در طول ٦٠ روز رسیدن



شکل ٢ تغییرات ازت غیر پروتئینی به ازت کل در طول ٦٠ روز رسیدن

حروف غیر مشابه در هر روز، بیانگر وجود اختلاف معنی دار (P< ٠/٠٥)در همان روز بین تیمار کنترل و تیمار آزمایشی می باشد.

همانطور که در شکل ١ مشاهده می شود، مقدار ازت محلول در pH = ٤/٦ طی دوره رسیدن، در هر دو پنیر کنترل و آزمایشی افزایش تدریجی داشته است. همچنین در طول رسیدن، درصد ازت محلول در پنیر آزمایشی حاوی پروتئاز در روزهای ٤٥ و ٦٠ ام به طور معنی داری (P< ٠/٠٥) بیشتر از پنیر کنترل بود. نتایج این آزمایش نشان داد که پروتئاز استفاده شده، بر روی ازت محلول در pH = ٤/٦ اثر معنی دار افزایشی داشته است. با گذشت مدت زمان رسیدن ازت محلول در pH = ٤/٦ افزایش پیدا کرد و این روند افزایشی در پنیرهای تیمار شده با پروتئاز *باسیلوس پلی میکسا* بیشتر از پنیر کنترل بود. نتایج حاصل از اندازه گیری ازت محلول در pH = ٤/٦ با گزارشات ویلکینسون و همکاران [٢٦] مطابقت دارد. آنها اثرات پروتئازهای FR FlavourAge و DCA50 را بر روی پروتئولیز پنیر چدار مورد بررسی قرار دادند و به نتایج مشابهی دست یافتند. اسکلاری و همکاران [٢٧] نیز، پروتئولیز را در پنیر تهیه شده با استفاده از آنزیم های پروتئولیتیک انکپسوله شده در لیپوزوم مورد بررسی قرار دادند. آنزیم های مورد استفاده، پروتئاز تجاری خنثی آزاد و انکپسوله شده و عصاره آنزیمی انکپسوله شده لاکتوباسیلوس هلوتیکوس بود. نتایج نشان داد که فراکسیون های ازت در پنیرهای آزمایشی در طول رسیدن بالاتر از پنیر کنترل بودند.

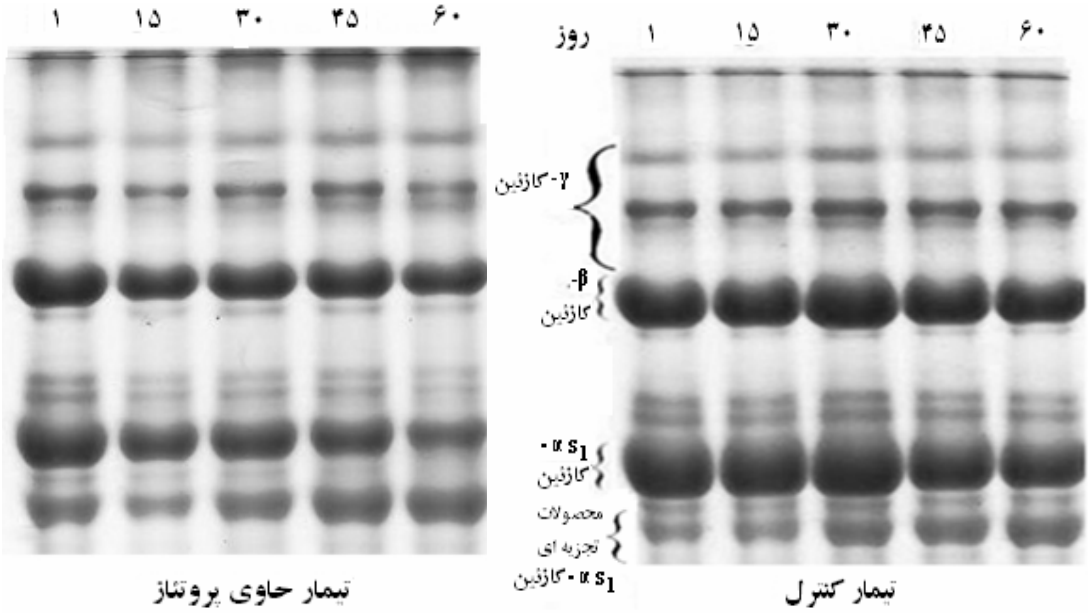
ازت غیر پروتئینی نیز شاخص پپتیدهای کوچک و مقادیر اسیدهای آمینه آزاد می باشد که پیش ساز تولید ترکیبات طعم دار در پنیر می باشند. پپتیدهای کوچک و اسیدهای آمینه عمدتاً

توسط میکروارگانیسم ها بر روی مولکول های کازئین و پپتیدهای حاصل از آنها تولید می شوند [۲۸]. مقدار این اندیس نیز در طول رسیدن پنیر روند افزایشی داشت و در روز ٤٠ و٦٠ام به طور معنی داری ($P>$ ۰/۰۵) در پنیر آزمایشی بیشتر بود که بیانگر فعالیت پپتیدولیتیک پروتئاز باسیلوس پلی میکسای افزوده شده می باشد (شکل ۲).

۳-۳- اوره- پلی آکریل آمید ژل الکتروفورز

الکتروفورگرام های ژل اوره- پلی آکریل آمید در پنیر کنترل و آزمایشی در شکل ۳ نشان داده شده است. در تیمار حاوی پروتئاز *باسیلوس پلی میکسا* نوع IX دارای فعالیت پروتئولیتیک و پپتیدولیتیک از همان ابتدای رسیدن، هیدرولیز αs_1- کازئین به طور معنی داری ($P<$۰/۰۵) بالاتر از تیمار کنترل بود که نشان دهنده مشارکت پروتئاز *باسیلوس پلی میکسا* نوع IX در پروتئولیز اولیه بود. در پنیرهای رسیده αs_1 - کازئین و -β کازئین توسط کیموزین، پلاسمین و پروتئازهای دیواره سلولی باکتری های استارتر به پپتیدهای بزرگ و متوسط هیدرولیز می شود. این پپتیدها نیز به پپتیدهای کوچک تر و اسیدهای آمینه توسط باکتری های استارتر تجزیه می شوند [۲۹]. هیدرولیز β- کازئین توسط پلاسمین منجر به تشکیل کازئین های γ_1،γ_2 و γ_3 و پروتئوز پپتون می گردد [٦].

نتایج ژل اوره- پلی آکریل آمید نشان داد که تجزیه αs_1-کازئین در تمام طول مدت رسیدن در پنیر حاوی پروتئاز به طور معنی داری ($P<$ ۰/۰۵) شدیدتر از پنیر کنترل بود و با افزایش مدت زمان رسیدن باندهای αs_1- کازئین در هر دو نوع پنیر کم رنگ تر شدند. همانطور که از جدول ۲ مربوط به میانگین αs_1- کازئین و β- کازئین در طول رسیدن، قابل مشاهده است، افزودن پروتئاز اثر مثبت بر کاهش سطح باندهای αs_1- کازئین داشته است. به طوری که میزان αs_1-کازئین پس از روز اول رسیدن، روند نزولی داشته و به کمترین مقدار خود در روز ٦٠ ام رسیده است. سطح باندهای αs_1-کازئین از ۱۰۰ درصد در روز اول به به ترتیب به ۸۲/۹۳ و ۷۱/۲٤ درصد در روز ٦٠ ام در پنیر کنترل و پنیر حاوی پروتئاز کاهش یافت. تفاوت معنی داری در هیدرولیز β- کازئین بین تیمار حاوی پروتئاز و تیمار کنترل مشاهده نگردید. کاهش در سطح باندهای β- کازئین از ۱۰۰ درصد در روز اول به ترتیب ۹۰/۲۸ و ۹۰/٥٦ درصد در روز ٦٠ ام در پنیر کنترل و پنیر حاوی پروتئاز بوده است. شدت تجزیه αs_1- کازئین در طول رسیدن بیشتر از β- کازئین بود. این نتیجه، با یافته های سایر محققان که گزارش کردند غلظت بالای نمک و pH پایین پنیر فتا، به طور قابل توجهی مانع از تجزیه β- کازئین می گردد، مطابقت دارد [۸ و ۳۰].



شکل۳ الکتروفورگرام های نمونه های پنیر فتای فراپالایش آزمایشی حاوی پروتئاز در مقایسه با نمونه کنترل.

به طور کلی نتایج به دست آمده از ژل اوره- پلی آکریل آمید با نتایج ویلکینسون و همکاران [٢٦] که در تهیه پنیر چدار از دو نوع پروتئاز تجاری استفاده کرده بودند، مطابقت دارد.

جدول ٢ میانگین β- کازئین و αs_1- کازئین در پنیرسفید فراپالایش ایرانی، پنیر کنترل و پنیر حاوی پروتئاز

زمان (روز)	β- کازئین باقی مانده(٪)		αs_1- کازئین باقی مانده(٪)	
	پنیر کنترل	پنیر محتوی پروتئاز	پنیر کنترل	پنیر محتوی پروتئاز
١	١٠٠	١٠٠	١٠٠	١٠٠
١٥	٩٧/٦٩ a	٩٦/٨٢ a	٩٤/٢٣ a	٨٥/٠٦ b
٣٠	٩٦/٨٢ a	٩٦/٠٦ a	٩٣/٦٢ a	٨٢/٩٥ b
٤٥	٩٣/٠١ a	٩٢/٦١ a	٩٠/٧٦ a	٧٦/٧٤ b
٦٠	٩٠/٢٨ a	٩٠/٥٦ a	٨٢/٩٣ a	٧١/٢٤ b

حروف غیر مشابه در هر ردیف بیانگر وجود اختلاف معنی دار (P< ٠/٠٥) بین تیمار کنترل و تیمار آزمایشی می باشد.

٣-٤- اسیدهای آمینه آزاد کل

غلظت اسیدهای آمینه آزاد کل (بر حسب میلی گرم گلایسین در گرم پنیر)، در جدول ٣ نشان داده شده است. همانطور که از شکل قابل مشاهده است، غلظت اسیدهای آمینه آزاد در هر دو پنیر کنترل و آزمایشی در طول ٦٠ روز دوره رسیدن تدریجاً افزایش پیدا کرده است. پنیر آزمایشی به طور معنی داری (P< ٠/٠٥) محتوی غلظت های بیشتری از اسیدهای آمینه آزاد کل در طول دوره رسیدن بود. نتایج حاصل از غلظت اسیدهای آمینه آزاد کل با نتایج سایر محققان که از آنزیم های پروتئاز جهت تسریع رسیدن پنیر استفاده کرده بودند، مطابقت دارد [٢٦]. هیال اوغلو و همکاران نیز به نتایج مشابهی دست یافتند [٣١].

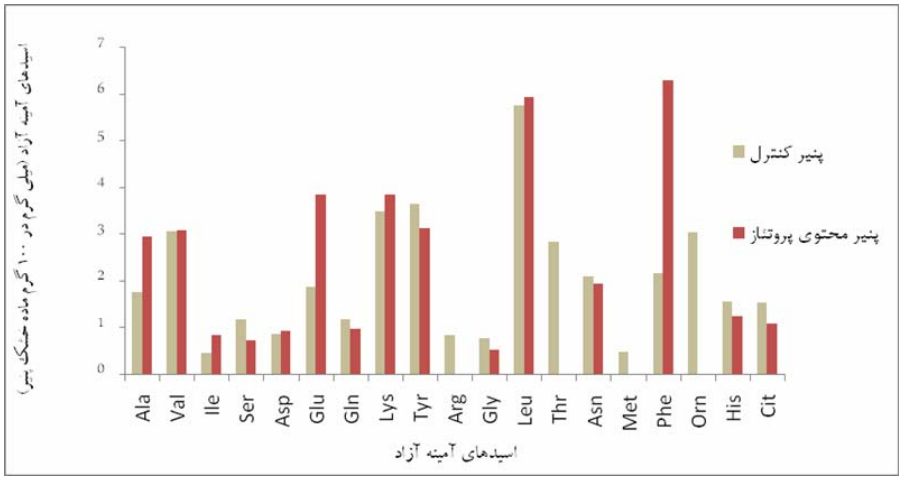
جدول ٣ میانگین اسیدهای آمینه آزاد کل (میلی گرم گلایسین در گرم نمونه) در پنیر سفید فراپالایش ایرانی، پنیر کنترل و پنیر حاوی پروتئاز

زمان (روز)	تیمارهای پنیر	
١٥	پنیر کنترل	٠/١٠±٠/٠٠٥ g
	پنیر حاوی پروتئاز	٠/٢٩±٠/٠٤٦ e
٣٠	پنیر کنترل	٠/٢٢±٠/٠٠٤ f
	پنیر حاوی پروتئاز	٠/٣٤±٠/٠٣٠ de
٤٥	پنیر کنترل	٠/٣٦±٠/٠٤٢ d
	پنیر حاوی پروتئاز	٠/٤٧±٠/٠٦٢ c
٦٠	پنیر کنترل	٠/٥٤±٠/٠٢٨ b
	پنیر حاوی پروتئاز	٠/٦٨±٠/٠٤٠ a

حروف غیر مشابه در ستون بیانگر وجود اختلاف معنی دار (P< ٠/٠٥)بین تیمار کنترل و تیمار آزمایشی در کل دوره رسیدن می باشد.
نتایج میانگین ٣ تکرار ± انحراف استاندارد می باشد.

٣-٥- اسیدهای آمینه آزاد اختصاصی

شدت پروتئولیز در نمونه های پنیر به وسیله تعیین سطوح اسیدهای آمینه اختصاصی نیز ارزیابی شد و نتایج در شکل ٤ نشان داده شده است. اسیدهای آمینه اصلی در پنیرهای ٦٠ روزه آلانین، والین، گلوتامین، لیزین، تیروزین، لوسین و فنیل- آلانین بودند. در پنیر کنترل بیشترین غلظت اسیدهای آمینه را لوسین تشکیل می داد، در صورتی که در پنیر حاوی پروتئاز، فنیل آلانین، لوسین، گلوتامین و لیزین غالب بودند. بنابراین می توان به فعالیت پپتیدولیتیک آنزیم مشتق از *باسیلوس پلی میکسا* علاوه بر فعالیت پروتئولیتیک آن پی برد.



شکل ٤ تغییرات اسیدهای آمینه آزاد در طول ٦٠ روز دوره رسیدن

پپتیدازهای باکتری های استارتر نیز مسئول تولید اسیدهای آمینه هستند. با وجود این، استارترهای مختلف سطوح مختلفی از اسیدهای آمینه آزاد اختصاصی را بر اساس سیستم آنزیمی و سیستم اتولیز در پنیر آزاد می کنند [۳۲]. سایر محققان [۳۰ و۳۳] پی بردند که لوسین، گلوتامین، والین و لیزین اسیدهای آزاد عمده در پنیر تولید شده از شیر گاو هستند.

٤ – نتیجه گیری

در مجموع با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق می توان بیان نمود که استفاده از آنزیم پروتئاز *باسیلوس پلی میکسا* نوع IX در تسریع پروتئولیز پنیر فتای فراپالایش ایرانی مؤثر واقع گردید. پیشنهاد می گردد، جهت حصول بهترین نتیجه از نظر خصوصیات ارگانولپتیکی، سطوح پایین تر این آنزیم نیز در تولید این نوع پنیر مورد بررسی قرار گیرد.

٥– سپاسگزاری

نگارندگان مقاله از شرکت شیر پگاه ارومیه و اداره کل دامپزشکی آذربایجان غربی به دلیل همکاری در اجرای این تحقیق تشکر و قدردانی می نمایند.

٦– منابع

[1] Hesari, J., Ehsani, M.R., Mosavi, M.A.E., and McSweeney, P.L.H. (2007). Proteolysis in ultra-filtered and conventional Iranian white cheese during ripening. International Journal of Dairy Technology, 60(3): 211-220.

[2] Saboya, L.V., Goudedranche, H., Maubois, J.L., Lerayer, A.L.S., and Lortal, S. (2001). Impact of broken cells of lactococci or propionibacteria on the ripening of sant-paulin UF cheese: extent of proteolysis and GC-MS profiles. Lait, 81: 699-713.

[3] El Soda, M., and Abd El-Salam, M. H. (2002). Cheese matured in brine. In H. Roginski et al., (Eds.). Encyclopedia of dairy science (Vol. 1, pp. 406–410). Academic Press.

[4] Mistry, V. V., and Maubios, J. L. (1993). Application of membrane separation technology to cheese production. In P.F. Fox (Ed.). Cheese: Chemistry, physics and microbiology (Vol. 1, pp. 493–522). London, UK: Chapman and Hall.

[5] Gripon, J-C., Monnet, V., Lamberet, G., and Desmazeaud, M. J. (1991). Microbial enzymes in cheese ripening. In Food Enzymology, ed. P. F. Fox, Vol. 1, pp. 131-169. Elsevier Applied Science, London.

[6] Fox, P.F., O'Connor, T.P., McSweeney, P.L.H., Guinee, T.P., and O'Brien, N.M. (1996). Cheese: physical, biochemical and nutritional aspects. Advances in Food Nutrition and Research. 39: 164–328.

[7] Rank, T.C., Grappin, R., and Olson, N.F. (1985). Secondary proteolysis of cheese during ripening: a review, Journal of Dairy Science, 68: 801–805.

[8] Moatsou, G., Massouras, T., Kadarikis, I., and Anifantakis, E. (2002). Evaluation of proteolysis during the riprning of traditional Feta cheese. Lait, 82: 601-611.

[9] Hesari, J. Ehsani, M. R., Khosroshahi, A., and MCSweeney, P.L.H. (2006). Contribution of rennet and starter to

proteolysis in Iranian UF white cheese. Lait, 86: 291-302.

[10] Sihufe, G.A., Zorrilla, S.E., and Rubiolo, A.C. (2006). Secondary proteolysis of Fynbo cheese salted with NaCl/KCl brine and ripened at various temperatures. Food Chemistry, 96: 297-303.

[11] Rao, D. V., and Renner, E. (1989). Studies on the application of ultrafiltration for the manufacture of Cheddar cheese. 3. Ripening characteristics. Milchwissenschaft, 44: 51–354.

[12] Anonomous. (1366). Iranian standards Institute and Industrial Researches. Determination of pH in cheese. No 2852.

[13] IDF. (1982). Determination of the total solid content (cheese and processed cheese). IDF Standard 4a, Int Dairy Fed., Brussels, Belgium.

[14] British Standards Institution. (1995). Gerber method for the determination of fat in milk and milk products. British standard, 696. London, UK: British Standards Institution.

[15] Marshall, T.R. (2005). Standard methods for the examination of dairy products(450 pp.). Washington, DC: American Public Health Association.

[16] IDF. (1993). Determination of nitrogen content, standard 20B. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.

[17] Kuchroo, C.N., and Fox. P.F. (1982). Soluble nitrogen in cheddar cheese: Comparison of extraction procedures. Milchwissenschaft, 37:331–335.

[18] Sousa, M.J., and McSweeney, P.L.H. (2001). Studies on the ripening of Cooleeney, an Irish farmhouse Camembert-type cheese, Irish Journal of Agriculture Food Research, 40: 83–95.

[19] Andrew, A.T. (1983). Proteinases in normal bovine milk and their activity on casein. Journal of Dairy Research, 50: 45-55.

[20] Shalabi, S.I., and Fox, P.F. (1987). Electrophoretic analysis of cheese, comparison of methods. Irish Journal of Food Science Technology, 11:135-151.

[21] Blakesley, R.W., and Boezi, J.A. (1977). A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using Coomassie Brilliant Blue G250. Analitical Biohemistry , 82: 580-581.

[22] Kailasapathy, K., and Lam, S.H. (2005). Application of encapsulated enzymes to accelerate cheese ripening. International Dairy Journal, 15: 929–939.

[23] Hayaloglu, A. A., Guven, M,, Fox, P. F., Hannon, J. A., and McSweeney, P.L.H.(2004). Proteolysis in Turkish White-brined cheese made with defined strains of Lactococcus. International Dairy Journal, 14:599–610.

[24] Guinee, T.P., and Fox, P.F. (1993). In PF. Fox (Ed.), Cheese: chemistry, physics and microbiology, general aspects (Vol. 1, pp. 257–302). London: Chapman and Hall.

[25] Molina, E., Ramos, M., Alonso, L., and Lopez-Fandino, R. (1999). Contribution of low molecular weight water soluble compounds to the taste of cheeses made of cows, ewe's and goat's milk International Dairy Journal, 9: 613-621.

[26] Wilkinson, M.G., Guinee, T.P., Q'Callaghan, D.M., and Fox, P.F. (1992). Effects of commercial enzymes on proteolysis and ripening in Cheddar cheese. Lait, 82: 601-611.

[27] Scolari, G., Vescovo, M., Sarra, P.G., and Bottazzi, V. (1993). Proteolysis in cheese made with liposorne-entrapped proteolytic enzymes. Lait, 73: 281-292.

[28] Tarakci, Z. (2004). The influence of Helis (Prangossp.) on ripening characteristics of vacuum-packed Van Herby cheese during ripening. Milchwissenschaft, 11/12: 619–623.

[29] Vanden Berg, G., and Exterkate, F. A. (1993). Technological parameters involved in cheese ripening. International Dairy Journal, 3: 485–507.

[30] Alichanidis, E., Anifantakis, E.M., Polychroniadou, A., and Nanou, M. (1984). Suitability of some microbial coagulants for Feta cheese manufacture . Journal of Dairy Research, 51:141-147.

[31] Hayaloglu, A. A., Guven, M., Fox, P.F., and McSweeney, P.L.H. (2005). Influences of starters on chemical, and sensory changes in Turkish White-brined cheese during ripening. Journal of Dairy science, 88: 3460–3474.

[32] Broome, M. C., and Limsowtin, G. K. Y. (1998). Starter peptidase activity in maturing cheese. Australian Journal of Dairy Technology, 53:79–82.

[33 Katsiari, M. C., Alichanidis, E., Voutsinas, L.P., and Roussis, I.G. (2000). Proteolysis in reduced sodium Feta cheese made by partial substitution of NaCl by KCl. International Dairy Journal, 10:635–646.

Effect of Commercial Protease Enzyme on Proteolysis of Iranian UF-Feta Cheese

Nezhad Razmjoui Akhgar, R. [1], Hesari, J. [2*], Azadmard Damirchi, S. [2]

1. Ph.D Student of Food Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
2. Professor, Department of Food Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

(Received: 93/11/29 Accepted: 94/2/15)

The effect of addition of a commercial enzyme derived from *Bacillus Polymyxa* type IX on Iranian UF-Feta cheese during a 60- day ripening period on chemical composition, pH and proteolysis of cheese samples was investigated. No Significant differences were observed in the chemical composition between experimental and control cheeses. In experimental cheese, pH values were significantly ($P< 0.05$) higher throughout whole ripening period and at 60d it was 4.6 and 4.77 in control and experimental cheeses, respectively. Soluble nitrogen in pH=4.6 was significantly ($P< 0.05$) higher in experimental cheese at 45 and 60d. At 60d, this index was 6.38 and 7.73% in the control and experimental treatments, respectively. Significant difference in the level of trichloroacetic acid (TCA) 12% was also observed at 45 and 60d. Urea- polyacrylamide gel electrophoresis of the pH 4.6-insoluble fractions showed that αs_1-casein was hydrolysed faster than the β-casein. Intact αs_1-casein values from 100 % on the first day reached to 82.93 % and 71.24 % and in β- casein reached to 90.28 and 90.56% at 60d in control and experimental cheeses, respectively. The concentration of total free amino acids in whole ripening period was significantly ($P< 0.05$) higher in experimental cheese and at the end of the ripening period was 0.68 versus 0.54 in control cheese (mg Glycine/g cheese). Levels of individual free amino acids were also different between treatments.

Key words: Commercial Protease, Proteolysis, UF cheese, Ultrafiltration

* Corresponding Autor E-Mail Address: jhesari@tabrizu.ac.ir