**مجله علوم و صنایع غذایی ایران**

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

**مقاله علمی_پژوهشی**

# ارزیابی پروتئولیز و لیپولیز پنیر سفید فراپالایشی در حضور کشت الحاقی تضعیف شده

**راحله نژاد رزمجوی اخگر** *

بخش تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان غربی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ارومیه، ایران.

**اطلاعات مقاله**

**تاریخ های مقاله :**

تاریخ دریافت: **1400 /08/16**

تاریخ پذیرش: **1400/12/18**

**کلمات کلیدی:**

تضعیف‌سازی،

شوک انجمادی،

رسیدن،

پنیر سفید فراپالایشی.

DOI: **10.22034/FSCT.19.125.89**

DOR: **20.1001.1.20088787.1401.19.125.9.8**

* مسئول مکاتبات:

r.razmjou@areeo.ac.ir

**چکیده**

**در این پژوهش از کشت تضعیف شده ترموفیل *لاکتوباسلوس هلوتیکوس* - $B0_2$، به عنوان کشت الحاقی، در تولید پنیر سفید فراپالایشی استفاده گردید و پروتئولیز و لیپولیز به عنوان شاخص‌های رسیدن، در طول 60 روزه دوره رسیدن مورد ارزیابی قرار گرفت. ترکیب شیمیایی و pH تحت تأثیر افزودن کشت تضعیف شده قرار نگرفت. ازت محلول در آب و ازت غیرپروتئینی در پنیر حاوی کشت الحاقی تضعیف شده به طور معنی‌داری بالاتر بود. urea-PAGE فراکسیون‌های نامحلول در آب‌پنیر نمونه‌های پنیر نشان داد که هیدرولیز $\alpha s_1$-کازئین در پنیر آزمایشی از روز 45 ام رسیدن افزایش یافته و به طور معنی‌داری بالاتر بود. مقادیر اسیدهای چرب آزاد با گذشت زمان رسیدن در هر دو تیمار افزایش یافت. اسید پالمتیک C16:0 و اسید اولئیک C18:1 بیشترین غلظت‌های اسیدهای چرب آزاد را در هر دو تیمار تشکیل می‌دادند. در پنیر حاوی استارتر تضعیف شده در روز 60 ام، مقادیراسیدهای چرب آزاد C6:0 - C4:0 و C18:0 و C18:1 در مقایسه با تیمار کنترل به طور معنی‌داری بالاتر بود (P<0/05). مقادیر سایر اسیدهای چرب در دو تیمار تفاوت معنی‌داری نشان نداد. افزودن کشت الحاقی تضعیف شده تأثیر مثبت بر توسعه پروتئولیز و تا حدی لیپولیز و به طور کلی رسیدن پنیر سفید فراپالایشی داشت.**

## 1- مقدمه

پنیر سفید فراپالایشی یکی از پرمصرف‌ترین پنیرهای ایرانی است که از شیر پاستوریزه تغلیظ شده گاو تهیه می‌شود. به دلایل مختلفی فرایند رسیدن در این نوع پنیرها آهسته‌تر از پنیرهای سنتی انجام می‌گیرد [1]. از جمله دلایل تأخیر در فرایند رسیدن، بالا بودن ظرفیت بافری پنیرهای فراپالایشی می‌باشد که سبب مهار اتولیز باکتری‌های اسیدلاکتیک استارتر و در نتیجه تأخیر در هیدرولیز شبکه کازئینی می‌گردد [2]. همچنین مقادیر بالای بتالاکتوگلوبولین موجود در این پنیرها ممکن است باعث مهار فعالیت پروتئولیتیکی مایه‌پنیر و پلاسمین طبیعی شیر گردد [1]. علاوه بر این، پروتئین‌های آب پنیر دناتوره نشده موجود در پنیرهای فراپالایشی، به پروتئولیز توسط پروتئازها مقاوم هستند. فرایند رسیدن طولانی باعث تحمیل هزینه‌های اضافی نگهداری و برودتی می‌گردد، بنابراین تسریع در رسیدن به علت کاهش هزینه‌های تولید برای صنعت پنیرسازی سودمند خواهد بود. یکی از روش‌های ارائه شده توسط محققان به منظور تسریع رسیدن پنیر، افزودن کشت الحاقی تضعیف شده به شیر پنیرسازی می‌باشد. برای تولید استارترهای تضعیف شده، روش‌های مختلفی از جمله اعمال فرایند حرارتی، شوک انجمادی، تیمار با لیزوزیم و تیمار فشار بالا مورد بررسی قرارگرفته شده است [3]. در اثر اعمال تضعیف، توانایی تولید اسید توسط استارتر از بین می‌رود، اما کمترین آسیب به آنزیم‌های سلولی وارد می‌شود. اولین آزمایش تولید پنیر با استفاده از سلول‌های تحت شوک انجمادی توسط Bartels و همکاران (1987) انجام شد. در این روش، پس از شستشو و تغلیظ برابر، سلول‌ها یک شب در دمای -20°C منجمد و قبل از افزودن به شیر پنیرسازی به سرعت در دمای 40 درجه سانتی‌گراد از حالت انجماد خارج شدند. گونه‌های مختلفی با این روش تضعیف شده‌اند، اما از *لاکتوباسلوس هلوتیکوس*[1] بیشترین بهره‌برداری انجام گرفته است. سطح تلقیح سلول‌ها از 0/2 تا 4% (وزنی/ وزنی) متغیر بوده است [4]. اثرات انجماد بر روی سلول‌های باکتریایی چندگانه و پیچیده است. سلول‌های باکتریایی پس از تیمار انجماد و خروج از انجماد، بسیاری از ترکیبات سلولی کوچک و بزرگ مولکول را در محیط آزاد می‌کنند. آسیب دیواره سلولی به دلیل انجماد در *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*[2] نیز مشاهده شده است. در مطالعه‌ای که توسط Bartels و همکاران (1987) بر روی پنیر گودا انجام شد، پروتئولیز و توسعه عطر و طعم پنیر گودا با افزودن سلول‌های *لاکتوباسلوس هلوتیکوس* تضعیف شده با شوک انجمادی به شیر پنیرسازی تسریع شد و سلول‌ها توانستند پپتیدهای تلخ را هیدرولیز کنند که نشان دهنده وقوع لیز سلولی و آزاد شدن پپتیدازهای درون سلولی به داخل پنیر بود. در همه‌مطالعات، سطح رطوبت و اسیدیته پنیرهای حاصل چندان تحت تأثیر کشت‌های تحت شوک انجمادی قرار نگرفت، اما پروتئولیز به طور قابل توجهی افزایش یافت [4]. عطازاده و همکاران (1391)، تأثیر استفاده از استارتر الحاقی تضعیف شده *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*[3] بر لیپولیز پنیر سفید فراپالایشی را در طول 60 روز رسیدن رسیدن مورد بررسی قرار دادند. نتایج پروفیل اسیدهای چرب پنیر سفید فراپالایشی نشان داد، به علت افزایش روند لیپولیز در طول 30 روز اول رسیدن در نمونه‌های حاوی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* تضعیف شده، درصد اسیدهای چرب کوتاه و متوسط زنجیر (C4: 0- C14:0) در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافت و درصد اسیدهای چرب با زنجیر بلند (C16: 0- C18:3) افزایش یافت [5].Gùrsoy (2009) اثر استفاده از کشت استارتر *لاکتوباسیلوس کازئی*[4] و *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* تضعیف شده به روش شوک انجمادی را بر روی پروتئولیز و لیپولیز پنیر کم‌چرب کاشار مورد مطالعه قرار داد. با توجه به نتایج، استفاده از کشت‌های تضعیف شده ترکیب کلی پنیرهای کم‌چرب را تغییر نداد، اما خواص حسی آنها را به میزان قابل‌توجهی بهبود بخشیده و با تسریع پروتئولیز، دوره رسیدن را کاهش داد که در پنیرهای حاوی کشت تضعیف شده

1. *Lactobacillus helveticus*

2. *Lactobacillus acidophilus*
3. *Lactobacillus plantarum*
4. *Lactobacillus casei*

لاکتوباسیلوس *هلوتیکوس* مشهودتر بود [6].

هدف از مطالعه حاضر، ارزیابی اثرات افزودن لاکتوباسلوس *هلوتیکوس* ترموفیل (*LH*-B02) تضعیف شده تحت شوک انجمادی بر رسیدن پنیر سفید فراپالایشی از طریق ارزیابی پروتئولیز (ازت محلول در آب، ازت غیرپروتئینی و الکتروفورز اجزای نامحلول در pH =4/6 با استفاده از ژل‌های اوره- پلی‌آکریل‌آمید (urea- PAGE) و لیپولیز (پروفایل اسیدهای‌چرب آزاد) در طول 90 روز دوره رسیدن بود.

## 2- مواد و روش‌ها

### 2-1- مواد

شیرگاو مورد استفاده در پنیرسازی توسط شرکت پگاه ارومیه تأمین شد. لاکتوباسلوس*هلوتیکوس* - B02 (کشت لاکتیکی ترموفیل) به عنوان کشت الحاقی از نوع DVS از شرکت هانسن دانمارک، استارتر اصلی شامل مخلوطی از کشت‌های مزوفیل (لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه *کرموریس*[5] و لاکتیس[6]) و ترموفیل (*استرپتوکوکوس سالیواریوس* زیرگونه *ترموفیلوس*[7]) از شرکت دنیسکوی آلمان و مایه‌پنیر قارچی فروماز مشتق از *رایزوموکور میهی*[8]، از شرکت دی اس ام[9] فرانسه تهیه شدند.

### 2-2- روش تضعیف کشت *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس B02*

کشت استارتر لاکتوباسلوس *هلوتیکوس* FD- DVS B02 حاوی گونه‌های خالص لاکتوباسلوس *هلوتیکوس* بود. طبق دستورالعمل شرکت سازنده، 0/5 واحد از کشت فوق در 10 میلی‌لیتر شیر استریل پس‌چرخ حل شد. تیمار شوک انجمادی از طریق انجماد سوسپانسیون سلولی در دمای 20- درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت و سپس خروج از انجماد در یک بن‌ماری با دمای 40 درجه سانتی‌گراد در طول مدت 10 دقیقه انجام شد [7].

### 2-3- روش تهیه پنیر

نمونه‌های پنیر فراپالایشی در شرکت پگاه آذربایجان غربی طبق عرف کارخانه تولید شدند. پس از استاندارد کردن چربی شیر خام (3/5 %) و میکروفیلتراسیون با غشاهای لوله‌ای از جنس سرامیکی، شیر در دمای 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 15 ثانیه، پاستوریزه شد و وارد دستگاه اولترافیلتراسیون در دمای 50 درجه سانتی‌گراد گردید. با استفاده از صافی‌های غشایی مارپیچی، آب، املاح و لاکتوز شیر گرفته شده و ماده خشک شیر افزایش یافت. رتنتیت مجدداً در دمای 78 درجه سانتی‌گراد به مدت 60 ثانیه پاستوریزه و سپس تا دمای 35 درجه سانتی‌گراد جهت مایه‌زنی سرد گردید. پس از این مرحله، رتنتیت به داخل لیوان‌ها پر شده و سپس به منظور تشکیل لخته، وارد تونل انعقاد گردید. در انتهای تونل، کاغذ پارچمنت بر روی لیوان‌ها قرار گرفته، 2/5 درصد نمک گرانولی بر روی آنها پاشیده شد و نهایتاً درب‌بندی انجام گرفت. بسته‌های پنیر به مدت 24 ساعت در دمای 25 درجه سانتی‌گراد قرار گرفته، سپس به سردخانه با دمای 8 درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. تیمارها در 3 تکرار تهیه شدند که عبارت بودند از: 1) نمونه‌های کنترل حاوی استارتر (1%) و مایه‌پنیر میکروبی (30 میلی‌گرم بر کیلوگرم)، 2) نمونه‌های حاوی کشت الحاقی تضعیف شده (AAC) [10]که علاوه بر استارتر و مایه‌پنیر، سوسپانسونی از کشت الحاقی تضعیف‌شده در سطح 0/5 U/Kg به رتنتیت اضافه شد. نمونه‌ها به مدت 60 روز دوره رسیدن را سپری کردند. در طول زمان رسیدن در فواصل زمانی 1، 15، 30، 45 و 60 روز از آنها به طور تصادفی نمونه‌برداری شده و آزمایش‌های لازم انجام گردید.

### 2-4- آنالیز نمونه‌های پنیر

#### 2-4-1- ترکیب شیمیایی

رطوبت، pH، نمک و چربی نمونه‌های پنیر با استفاده از روش‌های استاندارد اندازه‌گیری شدند [8].

5. *Lc.lactis* subsp. *cremoris*
6. *Lc. lactis* subsp. *lactis*
7. *Str.salivarius* subsp. *thermophilus*
8. *Rhizomucor miehei*
9. DSM
10. Attenuated Adjunct Lactobacilli Culture

### 2-4-2- ارزیابی پروتئولیز

ارزیابی پروتئولیز در نمونه‌های پنیر از طریق اندازه‌گیری ازت محلول در pH =4/6، ازت محلول در تری‌کلرواستیک اسید12% و الکتروفورز اجزای نامحلول در pH =4/6 انجام گرفت. ازت کل و سطوح ازت محلول در آب و محلول در تری‌کلرواستیک اسید طبق روش توصیف شده توسط Hayaloglu و همکاران (2013) تعیین گردید [9]. الکتروفورز اجزای نامحلول در pH =4/6 با استفاده از ژل‌های اوره- پلی‌اکریل‌آمید (urea- PAGE) با دستگاه الکتروفورز مدل اختریان با ژل عمودی و طبق روش توضیح داده شده توسط Voigt و همکاران (2010) انجام شد [10].

### 2-4-3- ارزیابی لیپولیز

برای ارزیابی لیپولیز، درصد اسیدهای‌چرب آزاد در روزهای 30 و 60 ام دوره رسیدن اندازه‌گیری شدند. مشتق‌سازی روغن نمونه‌های پنیر و تعیین ترکیب ساختار اسیدهای‌چرب آزاد، طبق روش استاندارد ایزو 2-12966و 4-12966انجام گرفت [11و 12]. دستگاه کروماتوگرافی گازی مورد استفاده، با مارک تجاری DANI مدل 1000 مجهز به آشکارساز یونیزاسیون شعله‌ای[11] و ستون مویینی سیلیکایی BPX70 (SGE, Austin, USA) به طول120 متر، 0/25 میلی‌متر قطر داخلی و ضخامت لایه داخلی 0/25 میکرومتر بود. شرایط شامل تزریق انشعابی،[12] با جریان 3/3 میلی‌متر بر دقیقه فاز متحرک گاز حامل (نیتروژن)، دمای آشکارساز 250 درجه سانتی‌گرادو دمای تزریق 220 درجه سانتی‌گراد بود. دمای آون 50 درجه سانتی‌گراد به مدت 3 دقیقه و سپس با نرخ 10°Cدر دقیقه تا دمای نهایی250 درجه سانتی‌گراد افزایش یافته و به مدت 5 دقیقه در این دما حفظ شد. کل مراحل برای هر نمونه به مدت 28 دقیقه به طول انجامید. پیک‌های به دست آمده ثبت، انتگرال‌گیری و تعیین کمّی اسیدهای‌چرب با توجه به استاندارد 4091 با استفاده از نرم‌افزار مخصوص کروماتوگرافی گازی CLARITY2005 انجام شد. استخراج اسیدهای‌چرب و اندازه‌گیری آنها برای هر نمونه 3 بار تکرار شد.

### 2-5- طرح آماری

داده‌های حاصل از آزمایش‌ها، بر اساس مدل اسپلیت‌پلات در زمان، با طرح بلوک‌های کامل تصادفی آنالیز شدند. میانگین‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه در سطح معنی‌داری 0/05 مورد مقایسه قرار گرفتند. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه 24 آنالیز و نمودارها با استفاده از اکسل 2007 رسم گردید.

## 3- نتایج و بحث

### 3-1- ترکیب شیمیایی و pH

ترکیبات شیمیایی شامل محتوای رطوبت، نمک، چربی، پروتئین و pH نمونه‌های پنیر فراپالایشی طی 60 روز رسیدن در جدول 1 نشان داده شده است. نتایج نشان داد که از نظر ترکیب شیمیایی بین پنیر کنترل و پنیر حاوی AAC تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0.05$). به عبارت دیگر استفاده از کشت الحاقی تضعیف شده، تأثیری بر ترکیب شیمیایی پنیر فراپالایشی نداشت. این نتیجه، توسط محققان دیگر نیز برای پنیرهای مختلف گزارش شده است [7، 13 و 14]. در پایان دوره رسیدن، ترکیب شیمیایی برای پنیر کنترل و پنیر حاوی AAC در محدوده استاندارد پنیرهای فراپالایشی ایرانی بود.

استفاده از کشت الحاقی تضعیف شده تأثیری بر pH در مقایسه با پنیر کنترل نداشت. این امر یکی از پیش‌نیازهای اصلی برای موفقیت‌آمیز بودن فرایند تضعیف استارتر در نظر گرفته می‌شود [15]. اثر تضعیف بر روی آنزیم‌هایی می‌باشد که در فسفوریلاسیون یا حمل و نقل لاکتوز دخالت دارند [16]. pH هر دو نمونه‌پنیر تا روز 45 ام کاهش یافت و سپس در روز 60 ام به 4/62 و 4/61 به ترتیب در پنیر کنترل و پنیر حاوی AAC افزایش یافت. افزایش pH در پایان دوره رسیدن ممکن است به دلیل تولید آمونیاک به دنبال کاتابولیسم اسیدهای آمینه در فرایند پروتئولیز باشد [17]. نتایج به دست آمده از ترکیب شیمیایی و pH با نتایج سایر محققان در پنیر Caciocavallo Pugliese مطابقت دارد [13و14].

11. Flame Ionisation Detector
12. Split

**Table 1** Chemical composition of Iranian UF white cheeses throughout 60 days ripening

| Measured Parameters | Cheese aging time, day | Treatments | |
|---|---|---|---|
| | | Control | Attenuated adjunct culture contained |
| Moisture (%) | 1 | 64.51± 0.29[a] | 65.27± 1.22[a] |
| | 15 | 64.73± 0.35[a] | 65.59± 0.97[a] |
| | 30 | 65.24± 0.44[a] | 65.08± 0.55 [a] |
| | 45 | 65.26± 1.18[a] | 65.38± 0.13[a] |
| | 60 | 65.41± 0.56[a] | 65.72± 1.06[a] |
| Salt (%) | 1 | 2.24±0.01[a] | 2.23±0.01[a] |
| | 15 | 2.28±0.005[a] | 2.28±0.005[a] |
| | 30 | 2.33±0.005[a] | 2.33±0.005[a] |
| | 45 | 2.43±0.02[a] | 2.42±0.08[a] |
| | 60 | 2.44±0.04[a] | 2.45±0.01[a] |
| Fat (%) | 1 | 14.80±0.10[a] | 14.50±0.86[a] |
| | 15 | 14.80±0.10[a] | 14.50±0.50[a] |
| | 30 | 15.06±0.40[a] | 15.50±0.50[a] |
| | 45 | 15.00±0.00[a] | 14.50±0.50[a] |
| | 60 | 15.03±0.20[a] | 15.16±0.57[a] |
| Protein (%) | 1 | 13.23±0.41[a] | 13.50±0.60[a] |
| | 15 | 13.23±0.35[a] | 13.50±0.55[a] |
| | 30 | 13.53±0.40[a] | 13.50±0.75[a] |
| | 45 | 13.53±0.45[a] | 13.46±0.25[a] |
| | 60 | 13.53±0.11[a] | 13.83±0.35[a] |
| pH | 1 | 4.71±0.04[a] | 4.69±0.01[a] |
| | 15 | 4.58±0.02[a] | 4.57±0.02[a] |
| | 30 | 4.57±0.01[a] | 4.56±0.01[a] |
| | 45 | 4.48±0.01[a] | 4.46±0.005[a] |
| | 60 | 4.62±0.00[a] | 4.61±0.005[a] |

a: Means within rows with common superscript letters are not significantly different ($P > 0.05$).The results are means of data from 3 independent replicate trials ± standard deviations.

## 3-2-پروتئولیز

### 3-2-1- ازت محلول در pH = 4/6 و ازت غیرپروتئینی

سطوح ازت محلول در pH = 4/6 و ازت غیرپروتئینی (NPN) نمونه‌های پنیر، به صورت درصدی از ازت کل در طی 60 روز دوره رسیدن، در جدول 2 نشان داده شده است. غلظت‌های ازت محلول در آب و ازت غیرپروتئینی در هر دو پنیر در طول رسیدن افزایش یافت. با این حال، این شاخص از ابتدای روز 15ام در پنیرهای حاوی AAC به طور معنی‌داری بالاتر از پنیر کنترل بود ($P<0.05$). افزایش معنی‌دار در ازت محلول در آب در پنیرهای تهیه شده با *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* تحت شوک انجمادی، ممکن است به علت فعالیت پپتیدولیتیک بالای آنها و میزان بالای اتولیز سلولی باشد. این نتایج نشان می‌دهد که باقی‌مانده ماده منعقدکننده، پلاسمین و پروتئازهای دیواره سلولی استارتر، عوامل پروتئولیتیک اصلی در هیدرولیز کازئین و تشکیل پپتیدهای محلول در آب در مراحل اولیه رسیدن پنیر می‌باشند [18]. نتایج آزمایش ازت محلول در آب با نتایج به دست آمده از تحقیقات Madkor و همکاران (2000) در پنیر چدار تهیه شده با سویه‌های لاکتوباسیلوس که جهت تضعیف تحت تیمارهای مختلف قرار گرفته بودند، مطابقت دارد [7]. در تحقیق حاضر، نمونه پنیر حاوی استارتر تضعیف شده دارای مقادیر معنی‌دار بالاتری از این دو شاخص بود ($P <0.05$). میزان افزایش ازت محلول در pH = 4/6 در روز 60 ام نسبت به روز اول، در تیمار کنترل 36% بود، در حالیکه این شاخص در تیمار حاوی استارتر تضعیف شده به میزان 98% افزایش یافت. میزان افزایش ازت غیر پروتئینی در روز 60 ام نسبت به روز اول، در تیمار کنترل 47/4% و در تیمار حاوی استارتر تضعیف شده 68/6% بود.

پروتئولیز همراه با لیپولیز ترکیباتی را در پنیر تولید می‌کنند که در طول رسیدن پنیر مهم بوده و در ایجاد طعم خاص پنیر نقش مهمی را ایفاء می‌کنند [19]. ترکیبات ازت‌دار شاخص‌های بسیار خوبی برای تعیین شدت پروتئولیز هستند، به ویژه ازت

محلول در pH = 4/6 به عنوان شاخص رسیدن پنیر و پروتئولیز اولیه استفاده می‌شود و NPN شاخص مقادیر اسیدهای آمینه آزاد می‌باشد که پیش‌ساز تولید ترکیبات طعم‌دار در پنیر می‌باشند [20]. ازت محلول در pH = 4/6 عمدتاً توسط مایه‌پنیر و پلاسمین تولید می‌گردد [21] و شامل پپتیدهای متوسط، کوچک و اسیدهای‌آمینه می‌باشد [22]. ازت محلول در اسید تری‌کلرواستیک یا NPN نیز به عنوان شاخص رسیدن پنیر در نظر گرفته می‌شود و شامل پپتیدهای کوچک و اسیدهای‌آمینه می‌باشد. پپتیدهای کوچک و اسیدهای‌آمینه عمدتاً به وسیله عمل میکروارگانیسم‌ها بر روی مولکول‌های کازئین و پپتیدهای حاصل از آنها تولید می‌شوند [23].

Madkor و همکاران نیز (2000) نیز، افزایش در ازت محلول را در طول رسیدن، در پنیر چدار تهیه شده با استفاده از لاکتوباسیل‌های تضعیف شده، نسبت به نمونه کنترل گزارش کردند [7].

**Table 2** Formation of water soluble nitrogen (SN/TN) and non protein nitrogen (NPN/TN) in control and attenuated adjunct culture contained Iranian UF white cheeses during 60 days ripening.

| Treatments | | Cheese aging time, day | Measured Parameters |
|---|---|---|---|
| Attenuated adjunct culture contained | Control | | |
| $5.18\pm 0.19^{aA}$ | $4.66\pm 0.47^{bD}$ | 1 | Soluble nitrogen (%) |
| $7.01\pm 0.07^{aA}$ | $5.043\pm 0.20^{bCD}$ | 15 | |
| $7.28\pm 0.09^{aA}$ | $5.90\pm 0.10^{bC}$ | 30 | |
| $9.68\pm 0.15^{aA}$ | $6.03\pm 0.31^{bAB}$ | 45 | |
| $10.30\pm 0.04^{aA}$ | $6.38\pm 0.17^{bA}$ | 60 | |
| $4.50\pm0.37^{aA}$ | $3.35\pm0.11^{bDE}$ | 1 | Non protein nitrogen (%) |
| $5.30\pm0.43^{aA}$ | $3.40\pm0.12^{bD}$ | 15 | |
| $5.47\pm0.86^{aA}$ | $3.99\pm0.041^{bC}$ | 30 | |
| $7.17\pm0.38^{aA}$ | $4.46\pm0.34^{bAB}$ | 45 | |
| $7.59\pm0.05^{aA}$ | $4.94\pm0.31^{bA}$ | 60 | |

$^{a, b}$: Means in a row with no common superscript letters are significantly different ($P > 0.05$).
$^{A,B}$ : Means in a column, with no common superscript letters are significantly different ($P > 0.05$).

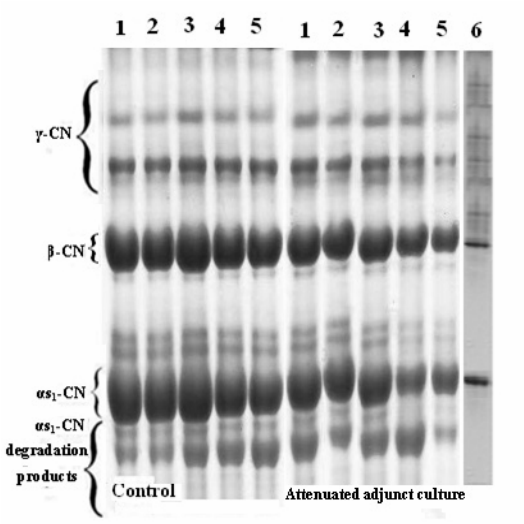


**Fig 1** Urea -PAGE electrophoretograms of the pH 4.6-insoluble fractions of experimental UF white cheeses. Lanes 1 to 5 = cheeses after 1, 15, 30, 45 and 60d of ripening, respectively; lane 6: sodium caseinate.

### 3-2-2- پلی‌آکریل‌آمید ژل الکتروفورز

الکتروفوروگرام‌های ژل اوره- پلی‌آکریل‌آمید جزء نامحلول در pH = 4/6 پنیر کنترل و پنیر حاوی AAC در طول 60 روز رسیدن در شکل 1 نشان داده شده است. در ابتدای رسیدن، تا روز 30 ام تفاوت معنی‌داری بین دو نمونه در هیدرولیز $\alpha s_1$ - کازئین مشاهده نشد (جدول 3). از روز 45 ام هیدرولیز $\alpha s_1$ - کازئین در پنیرهای حاوی AAC افزایش یافت و به طور معنی‌داری هیدرولیز بالاتر $\alpha s_1$ -کازئین در این نمونه پنیر مشاهده شد ($P <0.05$). در پایان دوره رسیدن، باقی‌مانده $\alpha s_1$-کازئین در پنیر کنترل 82/93 و در پنیر حاوی AAC 82/93 و 69/35 % (به عنوان درصدی از سطح $\alpha s_1$- کازئین در روز اول) بود و هر دو پنیر، به‌ویژه پنیر تهیه شده با AAC باندهای کم‌رنگ‌تری از پلی‌پپتیدها را در الکتروفوروگرام نشان دادند. بنابراین، تأثیر مستقیم یا غیرمستقیم کشت الحاقی تضعیف شده در طول پروتئولیز اولیه مشاهده شد. این اثر توسط Di cagno و همکاران نیز (2012) گزارش شده است [14].

**Table 3** Mean Values of Residual $\alpha_{s1}$- Casein and β-Casein in UF white Cheeses

| Residual β-casein, % | | Residual $\alpha_{s1}$-casein, % | | |
|---|---|---|---|---|
| Attenuated Adjunct Culture Contained | Control | Attenuated Adjunct Culture Contained | Control | Cheese aging time, day |
| 100 | 100 | 100 | 100 | 1 |
| 97.63[a] | 97.69[a] | 94.61[a] | 94.23[a] | 15 |
| 96.49[a] | 96.82[a] | 93.57[a] | 93.62[a] | 30 |
| 93.47[a] | 93.01[a] | 76.93[b] | 90.76[a] | 45 |
| 89.96[a] | 90.28[a] | 69.35[b] | 82.93[a] | 60 |

[a, b]: The mean values within rows with different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$).

در این مطالعه تفاوت معنی‌داری در هیدرولیز β -کازئین بین دو نمونه پنیر مشاهده نشد و در پایان رسیدن میزان زیادی ازβ-کازئین به صورت هیدرولیز نشده در هر دو پنیر باقی ماند. محققان گزارش کردند که در طول رسیدن پنیر فراپالایشی و سایر پنیرهای آب‌نمکی هیدرولیز بتا-کازئین بسیار آهسته بود [24]. طبق گزارش محققان، درصد بالای نمک و pH پایین پنیر فتا، هیدرولیزβ- کازئین توسط مایه‌پنیر و پلاسمین را به میزان قابل‌توجهی کاهش داد، اما اثر ممانعت‌کنندگی بر هیدرولیز $\alpha s_1$-کازئین نداشت [25]. در پنیرهای سفید آب‌نمکی، عوامل اصلی دخیل در پروتئولیز، باقی‌مانده‌ی مایه‌پنیر و آنزیم‌های باکتری‌های آغازگر یا آنزیم‌های میکروفلور طبیعی شیر هستند. از طرفی، پروتئین‌های آب‌پنیر موجود در غلظت‌های بالا در پنیرهای فراپالایشی، ممکن است از فعالیت کیموزین، مایه‌پنیرهای میکروبی و سایر عوامل پروتئولیتیک و پپتیدولیتیک ممانعت به عمل آورند [1].

## 3-3- لیپولیز

تغییرات در غلظت اسیدهای‌چرب آزاد اختصاصی به عنوان شاخص شدت لیپولیز در تیمار کنترل و تیمار حاوی AAC در طول رسیدن در روزهای30ام و 60ام در جدول 4 نشان داده شده است. اسیدهای‌چرب آزاد در طول فرایند لیپولیز آزاد می‌شوند و مستقیماً با طعم پنیر ارتباط دارند. برخی از عوامل اصلی که در تولید اسیدهای چرب آزاد در پنیر دخالت دارند، شامل نوع و کیفیت شیر، عملیات حرارتی، استارتر مورد استفاده، دمای رسیدن و نگهداری، غلظت آب‌نمک، لیپاز شیر (در صورت استفاده از شیر خام) و لیپازهای موجود در مایه‌پنیر می‌باشد [26].

بیشتر لیپازهای باکتری‌های اسیدلاکتیک دارای pH اپتیمم 7 و 8/5 و دمای بهینه 37°C هستند و فعالیت آنها به وسیله غلظت‌نمک تحت تأثیر قرار می‌گیرد [27]. محصولات لیپولیز همراه با محصولات پروتئولیز در ایجاد طعم ویژه پنیر فتا نقش مهمی را ایفا می‌کنند [19]. شیر حاوی لیپاز طبیعی و لیپوپروتئین لیپاز می‌باشد. لیپوپروتئین لیپاز در شیر خام بیشترین مقدار فعالیت را دارد و عمدتاً توسط فرایند پاستوریزاسیون غیرفعال می‌شود و تیمار حرارتی 78°C به مدت 10 ثانیه برای غیرفعال کردن کامل این آنزیم کافی است [18]. بنابراین pH پایین و مقدار بالای غلظت نمک در پنیر سفید ممکن است فعالیت لیپولیتیک لیپاز شیر و لیپاز باکتریایی را کاهش دهد [28].

نتایج این تحقیق نشان داد که مقادیر اسیدهای‌چرب آزاد با گذشت زمان رسیدن در هر دو تیمار افزایش یافت. غلظت‌های اسیدهای‌چرب آزاد اختصاصی در تیمارها در هر دو روز نمونه‌برداری با هم تفاوت معنی‌داری داشتند (P<0/05). اسید پالمتیک (C16:0) و پس از آن اسید اولئیک (C18:1)، بیشترین غلظت‌های اسیدهای‌چرب آزاد را در هر دو تیمار و در هر دو زمان نمونه‌برداری تشکیل می‌دادند و غلظت‌هایC8:0- C4:0 در هر دو تیمار پایین‌تر از سایر اسیدهای چرب بود. در تیمار حاوی استارتر تضعیف شده الحاقی، در هر دو روز 30 و 60 ام، اسیدهای‌چرب استئاریک C18:0 و اولئیک C18:1 به طور معنی‌داری بالاتر از تیمار کنترل بود (P<0/05) به طور کلی در پنیر حاوی استارتر تضعیف شده در روز 60 ام، مقادیر اسیدهای‌چرب آزاد C6:0 - C4:0 و C18:0 و C18:1 در مقایسه با تیمار کنترل به طور معنی‌داری بالاتر بود (P<0/05). مقادیر سایر اسیدهای‌چرب در دو تیمار تفاوت معنی‌داری نشان نداد. اسیدهای‌چرب غالب در پنیر کنترل، اسیدهای‌چرب پالمتیک C16:0، استئاریک C18:0 و اولئیک C18:1 بودند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که استارتر تضعیف شده الحاقی فعالیت لیپولیتیک مختصری را علاوه بر فعالیت پروتئولیتیک از خود نشان داد. احتمالاً pH

پایین و غلظت بالای نمک در پنیر، فعالیت لیپولیتیک آنزیم‌های استارتر تضعیف شده را کاهش می‌دهد. در مطالعه Kondyli و همکاران (2002) که اثر افزودن کشت الحاقی تجاری حاوی *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *لاکتیس* و *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *کرموریس* به شیر پنیرسازی بر روی پروفیل اسیدهای‌چرب پنیر فتای کم‌چرب مورد بررسی قرار گرفت، اسیداستیک و اسید پالمتیک، اسیدهای‌چرب غالب بودند. آنها افزایش جزئی در مقادیر اسیدهای‌چرب آزاد را بین روزهای 120 و 180 مشاهده کردند، ولی گزارش نمودند که افزودن کشت الحاقی تأثیری روی تولید اسیدهای‌چرب آزاد نگذاشت، زیرا این کشت‌ها عمدتاً دارای فعالیت پپتیدولیتیک بودند [29]. اسیدهای‌چرب 2 تا 8 کربنه از هیدرولیز تری‌گلیسرول‌ها توسط آنزیم استراز و اسیدهای چرب 10 کربنه و بالاتر توسط لیپاز به طور اختصاصی انجام می‌گیرد که هر یک از این اسیدهای‌چرب آزاد موجب ایجاد طعم‌های ویژه و ترکیبات پیش‌ساز طعم می‌گردند [27]. در مطالعه عطازاده و همکاران (1391)، استفاده از استارتر الحاقی تضعیف شده *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* باعث افزایش روند لیپولیز شد، به علت افزایش روند لیپولیز در طول 30 روز اول رسیدن در نمونه‌های حاوی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* تضعیف شده، درصد اسیدهای‌چرب کوتاه و متوسط‌زنجیر ( C4:0 -C14:0) در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافت. مطابق گزارش این محققان، کاهش بیشتر درصد اسیدهای‌چرب کوتاه و متوسط‌زنجیر در پنیرهای تیمار شده در مقایسه با گروه کنترل، به تأثیر فعالیت استرازی و لیپازی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* تضعیف شده و سرعت بخشیدن به روند لیپولیز از طریق هیدرولیز اسیدهای‌چرب (C4:0 -C14:0) و تولید فرآورده‌های طعمی نسبت داده شد [5].

**Table 4** Fatty acid composition (g/100g cheese fat) in control and attenuated adjunct culture contained UF white cheeses during 60 days ripening.

| | Time (day) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 30 | | 60 | |
| FFA | Control | Attenuated Adjunct Culture Contained | Control | Attenuated Adjunct Culture Contained |
| Butyric (C4:0) | 0.41±0.31[a] | 0.45±0.01[a] | 0.49±0.02[b] | 0.67±0.02[a] |
| Caproic (C6:0) | 0.27±0.20[a] | 0.34±0.01[a] | 0.37±0.01[b] | 0.45±0.02[a] |
| Caprylic (C8:0) | 0.31±0.01[a] | 0.30±0.01[a] | 0.33±0.02[a] | 0.32±0.00[a] |
| Capric (C10:0) | 1.12±0.01[a] | 1.15±0.01[a] | 1.14±0.01[a] | 1.16±0.01[a] |
| Lauric (C12:0) | 1.71±0.01[a] | 1.70±0.02[a] | 1.72±0.01[a] | 1.74±0.01[a] |
| Myristic (C14:0) | 6.80±0.02[a] | 6.84±0.02[a] | 6.85±0.01[a] | 6.87±0.01[a] |
| Palmitic (C16:0) | 33.14±1.47[a] | 33.35±0.02[a] | 33.99±0.02[a] | 33.38±0.01[a] |
| Stearic (C18:0) | 10.51±0.01[b] | 10.71±0.01[a] | 10.52±0.02[b] | 10.72±0.02[a] |
| Oleic (C18:1) | 24.04±0.02[b] | 24.58±0.03[a] | 24.28±0.02[b] | 24.78±0.03[a] |
| Linoleic (C18:2) | 7.78±0.02[a] | 7.82±0.02[a] | 7.90±0.02[a] | 7.97±0.01[a] |
| Linolenic (C18:3) | 1.15±0.03[a] | 1.16±0.02[a] | 1.17±0.01[a] | 1.21±0.02[a] |

[a-b]; means in the same row and the same day with different letters for each fatty acid, are significantly different (P<0.05).

## 4- نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج مطالعه حاضر، کشت الحاقی تضعیف شده با شوک انجمادی ترکیب شیمیایی پنیر سفید فراپالایشی را تغییر نداد. کشت الحاقی تضعیف شده *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس-B02*، فعالیت پروتئولیتیکی و تا حدی فعالیت لیپولیتیکی را در پنیر افزایش داد. این کشت، فرایند رسیدن پنیر فراپالایشی را بدون تأثیر منفی بر ترکیب شیمیایی و ویژگی‌های کیفی پنیر و تحت شرایط کنترل شده تسریع کرد. بنابراین، استفاده از این

کشت به منظور تسریع رسیدن یا بهبود طعم پنیر فراپالایشی توصیه می‌شود.

## 5- منابع


[1] 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.

[2] Karami, M., Ehsani, M.R. Mousavi, S.M. Rezaei, K. Safari, M. 2009. Changes in the rheological properties of Iranian UF-Feta cheese during ripening, Food Chemistry,Volume 112: 539-544.

[3] Upadhyay, V.K., Huppertz, T., Kelly, A.L. and McSweeney, P.L.H. 2007. Use of high pressure treatment to attenuate starter bacteria for use as adjuncts for Cheddar cheese manufacture. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 8: 485-492.

[4] Bartels, H.J., Johnson, M.E. and Olson, N.F. 1987. Accelerated ripening of Gouda cheese. II. Effect of freeze-shocked Lactobacillus helveticus on proteolysis and flavor development. Milchwissenschaft, 42: 139-144.

[5] Atazadeh, R., Karim, G., Hesari, J., Hanifian, S. 2012. Effect of attenuated lactobacillus plantarum as adjunct starter on lipolysis and organoleptic characteristics of UF white cheese. Journal of Food Hygiene, 2: 715-28.

[6] Gùursoy, A. 2009. Effect of using attenuated lactic starter cultures on lipolysis and proteolysis in low ft Kasar cheese. TARIM BİLİMLERİ DERGİSİ, 15 (3): 285-292.

[7] Madkor, S.A., Tong, P.S. and El Soda, M. 2000. Ripening of Cheddar cheese with added attenuated adjunct cultures of lactobacilli. Journal of Dairy Science, 83: 1684–1691.

[8] AOAC. 2019. Official Methods of Analysis of AOAC International, 21st ed.; AOAC International: Arlington, VA, USA.

[9] Hayaloglu, A.A., Tolu, C., Yasar, K. and Sahingil, D. 2013. Volatiles and sensory evaluation of goat milk cheese Gokceada as affected by goat breeds (Gokceada and Turkish Saanen) and starter culture systems during ripening. Journal of Dairy Science, 96: 2765–2780.

[10] Voigt, D. D., Chevalier, F., Qian, M., and Kelly, A. L. 2010. Effect of high-pressure treatment on microbiology, proteolysis, lipolysis and levels of flavour in mature blue-veinedcheese. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 11, 68–77.

[11] ISO 12966-2. 2017. Animal and vegetable fats and oils — Gas chromatography of fatty acid methyl esters — Part 2: Preparation of methyl esters of fatty acids. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 15p.

[12] ISO 12966-4. 2015. Animal and vegetable fats and oils — Gas chromatography of fatty acid methyl esters — Part 4: Determination by capillary gas chromatography. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 21p.

[13] Di Cagno, R., De Pasquale, I., De Angelis, M., Buchin, S., Calasso, M., Fox, P.F., and Gobbetti M. 2011. Manufacture of Italian Caciotta type cheeses with adjuncts and attenuated adjuncts of selected non-starter lactobacilli. International Dairy Journal, 21: 254–260.

[14] Di Cagno, R., De Pasquale, I., De Angelis, M. and Gobbetti, M. 2012. Accelerated ripening of Caciocavallo Pugliese cheese with attenuated adjuncts of selected nonstarter lactobacilli. Journal of Dairy Science, (95): 4784–4795.

[15] Upadhyay, V.K. and McSweeney, P.L.H. 2003. Acceleration of cheese ripening. In: Smit G. (eds) Dairy Processing: Improving Quality, Cambridge, UK, Woodhead Publishing, pp. 419–447.

[16] Casal, V. and Gomez, R. 1999. Effect of high pressure on the viability and enzymatic activity of mesophilic lactic acid bacteria isolated from caprine cheese. Journal of Dairy Science, 82: 1092–1098.

[17] Mane, A. and McSweeney, P.L. 2020. Proteolysis in Irish farmhouse Camembert cheese during ripening. Journal of Food Biochemistry, 44 (1): 13101.

[18] Ardö, Y., McSweeney, P.L., Magboul, A.A., Upadhyay, V.K. and Fox, P.F. 2017. Biochemistry of cheese ripening: Proteolysis. In Cheese (pp. 445-482). Academic Press.

[19] Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. H. 2017. Fundamentals of cheese science. Aspen Publishers, Inc Gaithersburg, MD, USA: Aspen Publishers Inc.

[20] Wolf, I.V., Perotti, M.C., Bernal, S.M.

and Zalazar, C.A. 2010. Study of the chemical composition, proteolysis, lipolysis and volatile compounds profile of commercial Reggianito Argentino cheese: Characterization of Reggianito Argentino cheese. Food Research International, 43: 1204–1211.

[21] Tejada, L., Abellán, A., Cayuela, J.M., Martínez-Cacha, A, Fernández-Salguero, J. 2008. Proteolysis in goat's milk cheese made with calf rennet and plant coagulant. International Dairy Journal, 18:139–146.

[22] Barac, M., Pesic, M., Zilic, S., Smiljanic, M., Stanojevic, S., Vasic, M., Despotovic, S., Vucic, T. and Kostic, A. 2016. Protein profiles and total antioxidant capacity of water soluble and water insoluble fractions of white brined goat cheese at different stages of ripening. International Journal of Food Science and Technology, 51 (5): 1140-1149.

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

[24] Rasouli Pirouzian, H., Hesari, J., Farajnia, S., Moghaddam, M. and Ghiassifar, S. 2012. Effects of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium, isolated from traditional Lighvan cheese, on physicochemical and sensory characteristics of Iranian UF white cheese. Journal of Agricultural Science and Technology, 14 (5): 1023-1034.

[25] Fathollahi, I., Hesari, J., Azadmard, S. and Oustan, S. 2010. Influence of proteolysis and soluble calcium levels on textural changes in the interior and exterior of Iranian UF white cheese during ripening. World Academy of Science, Engineering and Technology, 66: 844-849.

[26] De Wit, M. Osthoff, G., Viljoen, B.C. and Hugo, A. 2005. A comparative study of lipolysis and proteolysis in Cheddar cheese and yeast-inoculated Cheddar cheeses during ripening. Enzyme and Microbial Technology, 37: 606–616.

[27] Xia, Y., Yuan, R., Weng, S., Wang, G., Xiong, Z., Zhang, H., Song, X., Liu, W. and Ai, L. 2020. Proteolysis, lipolysis, texture and sensory properties of cheese ripened by Monascus fumeus. Food Research International, 137:109657.

[28] Melilli, C., Barbano, D.M., Manenti, M., Lynch, J.M., Carpino, S. and Licitra, G. 2004. Lipolysis and proteolysis in Ragusano cheese during brine salting at different temperatures. Journal of dairy science, 87 (8): 2359-2374.

[29] Kondyli, E., Katsiari, M.C., Masouras, T. and Voutsinas, L.P. 2002. Free fatty acids and volatile compounds of low-fat Feta-type cheese made with a commercial adjunct culture. Food Chemistry, 79:199-205.

Iranian Journal of Food Science and Technology

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

# Evaluation of proteolysis and lipolysis of ultrafiltered white cheese in the presence of attenuated adjunct culture

**Nezhad Razmjoui Akhgar, R.***

1. Department of Animal Science Research, West Azarbaijan Agricultural and Natural Resources Research Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Urmia, Iran.

**ARTICLE INFO**

**Article History:**

Received 2021/ 11/ 07
Accepted 2022/ 03/ 09

**Keywords:**

Attenuation,
Freezing shock,
Ripening,
Ultrafiltered white cheese.

**DOI: 10.22034/FSCT.19.125.89**
**DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.125.9.8**

*Corresponding Author E-Mail:
m.varidi@um.ac.ir

**ABSTRACT**

In this research, attenuated culture of thermophilic *lactobacillus helveticus* - B02 was used as an adjunct culture in the production of UF white cheese and proteolysis and lipolysis were evaluated as indicators of ripening during a 60-day period. The chemical composition and pH were not affected by the addition of attenuated culture. Water-soluble nitrogen and Non-protein nitrogen in experimental cheese were significantly higher. Urea-PAGE of insoluble fractions of cheese samples showed that the hydrolysis of $\alpha s_1$-casein in experimental cheese increased from the 45$^{th}$ day of ripening and was significantly higher. The amount of free fatty acids increased over time in both treatments. Palmitic acid (C16: 0) and oleic acid (C18: 1) had the highest concentrations of free fatty acids in both treatments. In cheese containing attenuated starter on the 60$^{th}$ day, the levels of free fatty acids of C4: 0, C6:0, C18:0 and C18:1 were significantly higher, compared to the control treatment ($P < 0.05$). The levels of other fatty acids in the two treatments did not show a significant difference. Addition of attenuated adjunct culture had a positive effect on the development of proteolysis and to some extent lipolysis in UF white cheese.