دانشکده کشاورزی

گروه علوم و صنایع غذایی

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته علوم و صنایع غذایی گرایش شیمی مواد غذایی

عنوان

تولید پنیر اصلاح شده آنزیمی از پنیر آب نمکی نیمه رس گاوی

استادان راهنما

دکتر جواد حصاری

دکتر صدیف آزادمرد

استادان مشاور

دکتر رضا رضایی مکرم

دکتر سید عباس رأفت

پژوهشگر

آیلار ناظمی

سال 1392

بسم الله الرحمن
الرحيم

تقدیم به

پدر و مادر مهربانم

و

همسر و برادر عزیزم

برخود وظیفه می‌دانم از زحمات بی‌دریغ، تلاش‌های بی‌وقفه و راهنمایی‌های ارزشمند اساتید ارجمندم آقای **دکترجواد حصاری** و آقای **دکتر صدیف آزادمرد** در راستای انجام این پروژه تشکر و قدردانی نمایم.

از زحمات استادان گرانقدر آقای **دکتر رضایی مکرم و آقای دکتر رافت** در امر مشاوره این پروژه کمال تشکر را دارم.

از آقای کاظم علیرضالو به‌دلیل یاری‌ها و راهنمایی‌های بی‌چشمداشت ایشان که بسیاری از سختی‌ها را برایم آسان‌تر نمودند سپاسگزاری می‌کنم.

از دوست عزیزم وحیده مهردل که در پیشبرد این پایان‌نامه از هیچ کمکی دریغ نکردند کمال تشکر را دارم.

از دوستان گران مایه‌ام خانم فاطمه کیوانی و زهره حاسبی که بودنشان و امیدشان راه‌گشای من بود سپاسگزارم.

و در پایان از ریاست محترم و کلیه کارکنان آزمایشگاه‌های گروه علوم و صنایع غذایی ساختمان تحصیلات تکمیلی دانشکده کشاورزی و مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز جهت همکاری در راستای پیشبرد این پایان‌نامه سپاسگزارم.

نام خانوادگی: ناظمی **نام**: آیلار

عنوان پایان نامه: تولید پنیر اصلاح شده آنزیمی از پنیر آب نمکی نیمه رس گاوی

استادان راهنما: دکتر جواد حصاری- دکتر صدیف آزادمرد دمیرچی

استادان مشاور: دکتر رضا رضایی مکرم- دکتر سید عباس رأفت

مقطع تحصیلی: کارشناسی ارشد **رشته**: علوم و صنایع غذایی **گرایش**: شیمی مواد غذایی

دانشگاه: تبریز **دانشکده**: کشاورزی **تاریخ فارغ التحصیلی**: تیر 1392 **تعداد صفحه**:88

کلید واژه ها: اصلاح آنزیمی پنیر، *لاکتوباسیلوس کازئی*، *لاکتوکوکوس لاکتیس*، *رایزوموکور مهی* و طعم پنیری

چکیده:

پنیر اصلاح شده آنزیمی به پنیری اطلاق می‌شود که جهت تشدید طعم تحت تیمار آنزیمی قرار می‌گیرد. استفاده از این نوع پنیر در تولید مواد غذایی می تواند بدون افزایش لاکتوز و چربی شدت طعم پنیری مورد نیاز را ایجاد کرده و موجب کاهش هزینه‌ی تولید تا 80-40 درصد شود. در این مطالعه عصاره پروتئازی سویه‌های *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوکوکوس لاکتیس* به روش اولتراسوند استخراج شد و به همراه لیپاز *رایزوموکور مهی* برای تشدید طعم پنیر آب‌نمکی نیمه‌رس گاوی مورد استفاده قرار گرفت. تیمارها ترکیبی از دو آنزیم لیپاز و عصاره پروتئازی هر کدام با غلظت‌های 0/001، 0/003 و 0/005 درصد بودند که بعد از گرمخانه‌گذاری به مدت 1، 3 و 6 روز تحت آزمایش‌های pH، لیپولیز، اسیدیته، ازت محلول و الکتروفورز قرار گرفتند. تجزیه واریانس داده‌ها در قالب طرح کرت خرد شده در زمان بر پایه طرح کاملاً تصادفی، افزایش معنی‌داری ($P<0/05$) را بین تیمارها از نظر اندیس لیپولیز، اسیدیته و درصد ازت محلول در pH 4/6 نشان دادند، همچنین زمان گرمخانه‌گذاری و اثر متقابل این دو فاکتور نیز معنی دار ($P<0/05$) بود. در مورد pH، زمان گرمخانه‌گذاری افزایش 2/7 درصدی نسبت به نمونه شاهد داشت در حالی که نوع تیمار و اثر متقابل آن با زمان غیر معنی‌دار بود. ارزیابی پروتئولیز با استفاده از ازت محلول در pH 4/6 و الکتروفورز روی ژل پلی آکریل آمید صورت گرفت. در همه تیمارها با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری و غلظت آنزیم مقادیر اندیس لیپولیز، اسیدیته و ازت محلول نمونه ها به ترتیب 16/16، 23/4 و 14/97 درصد نسبت به نمونه شاهد افزایش یافتند که نشانگر تأثیر آنزیم‌های به کار برده شده بر فرایند لیپولیز و پروتئولیز است. ارزیابی حسی توصیفی محصول‌گرا بر اساس شدت طعم توسط 14 پانلیست انجام شد و نتایج حاصل افزایش شدت طعم پنیری را با افزایش غلظت آنزیم و زمان گرمخانه‌گذاری نشان داد. بنابرین آنزیم‌های مذکور می توانند بدون ایجاد تلخی برای تشدید طعم پنیری مورد استفاده قرار گیرند.

مقدمه

پنیر و فراورده های شیری تخمیری از مهمترین محصولات صنعتی شیر هستند. پنیر دارای میزان چربی و پروتئین بالا و املاح قابل ملاحظه ای است و در کشورهای رو به رشد مواد غذایی اساسی را تشکیل می دهد.

در جهان سالانه بیش از 6810000 تن پنیر مصرف می شود که به طور گسترده در اشکال مختلف توسط مصرف کننده مورد استفاده قرار می گیرد، اما کنسانتره پنیری قوی در فرم خشک شده و در محصولات آماده نیز استفاده می شود. استفاده از پنیر طبیعی در این محصولات ممکن است باعث ایجاد شدت طعمی ناکافی، افزایش لاکتوز یا چربی و هزینه بالای تولید شود، در صورتیکه استفاده از پنیر اصلاح شده آنزیمی (EMC)[1] می تواند شدت طعم پنیری مورد نیاز را ایجاد کرده و موجب کاهش هزینه‌ی تولید تا 80-40 درصد شود (کیلکاولی و همکاران، 2000).

از آنجایی که تولید پنیر کامل هزینه قابل توجهی در صنعت پنیر دارد. هزینه تولید و تجهیزات نگهداری برای رساندن و زمان‌بر بودن آن موجب توجه به توسعه تسریع رساندن پنیر و تولید پنیر اصلاح شده آنزیمی شده است.

پنیر اصلاح شده آنزیمی به پنیری اطلاق می شود که جهت تشدید طعم آن تحت تیمار آنزیمی قرار گرفته است. شدت طعمی این نوع پنیر ۳۰-۱۵ برابر طعم پنیرهای طبیعی است و به صورت خمیری یا پودر در دسترس می باشد (موسکوویتز و همکاران، 1985).

اساس تکنولوژی اصلاح آنزیمی پنیر شامل استفاده از آنزیم‌های ویژه نظیر پروتئینازها، پپتیدازها، لیپازها، استرازها است که در شرایط اپتیمم رشد خود ایجاد عطر و طعم پنیری مطلوب از سوبسترای مناسب می کنند. دامنه گسترده‌ای از این آنزیم‌ها اکنون به طور تجاری از منابع میکروبی و حیوانی در دسترس هستند. تفاوت

1Enzyme Modified Cheese

کلی بین پنیر طبیعی و پنیر اصلاح شده آنزیمی در این است که پنیر اصلاح شده آنزیمی تقریباً شامل همه ی ترکیبات طعمی است که در طول عمل‌آوری پنیر طبیعی تولید می‌شوند اما غلظت نسبی آنها ممکن است با توجه به شرایط به کاربرده شده برای تولید محصول متفاوت باشد (کیلکاولی، ویلکینسون و فاکس، 1998). در فرایند تولید پنیر اصلاح شده آنزیمی ممکن است همزمان ترکیبات مفید تغذیه‌ای نظیر پپتیدهای زیست فعال[۲] تولید شوند که از نظر فیزیولوژیکی دارای اهمیت قابل توجهی هستند. در حقیقت با افزایش هوشیاری مصرف کنندگان از لحاظ سلامتی، بازار غذاهای عملگرا[۳] افزایش یافته است. پارامتر مهم دیگر در طول تولید پنیر اصلاح شده آنزیمی کاهش فضای انبار، حمل و نقل، افزایش ظرفیت تولید و ثبات طعمی محصول بوده است (چریستو، 1992-1993). از جمله آنزیم باکتری های استفاده شده برای اصلاح پنیر می توان به *لاکتوکوکوس ها*[۴]، *آسپرژیلوس نایجر*[۵]، *آسپرژیلوس ملوس*[۶]، *باسیلوس سوبتلیس*[۷]، *کاندیدا روکوسا*[۸]، *رایزوموکور مهی*[۹] و *پنیسیلیوم راکیوفورتی*[۱۰] *اشاره کرد* (کیلکاولی وهمکاران، 1998).

از جمله پنیرهای اصلاح شده آنزیمی که در حال حاضر به صورت تجاری تولید می شوند، می توان به چدار، کلبی، سوئیسی، پرووِلن، رومانو، موزارلا، پارمسان و بریک اشاره کرد (موسکوویتز و همکاران، 1987). در حقیقت با استفاده از تکنولوژی آنزیمی امکان تولید دامنه وسیعی از ترکیبات طعمی پنیر ها فراهم آمده است. پنیر اصلاح شده آنزیمی در محصولاتی نظیر سس های سالاد، پنیرهای تقلیدی[۱۱] ، سوپ ها، اسنکها، کراکر، خوراکی های مایکروویو، غذاهای کنسروی و منجمد، پیتزا، مغزها، محصولات خمیری، محصولات پنیری کم چرب یا بدون چربی و... کاربرد دارند (کیلکاولی، ویلکینسون و فاکس، 2000).

[1] Bioactive Peptide
[2] Functional Food
[3] *Lactococcus*
[4] *Aspergillus niger*
[5] *Aspergillus melleus*
[6] *Bacillus subtilis*
[7] *Candida rugosa*
[8] *Rhizomucor miehei*
[9] *Penicillium Roqueforti*
[10] Imitation Cheese

با توجه به مطالب بیان شده، تحقیق در این زمینه و شناسایی ترکیبات طعمی پنیر می تواند موضوع با اهمیتی باشد. از این رو هدف اصلی این تحقیق توسعه عطر و طعم پنیر نمکی گاوی با استفاده از آنزیم های لیپاز و پروتئاز می باشد. تولید صنعتی این محصول می تواند مشکلات مربوط به استفاده از پودر پنیر طبیعی در محصولات غذایی از جمله شدت طعمی ناکافی، افزایش لاکتوز یا چربی و هزینه بالای تولید را برطرف نماید.

فصل اول:

کلیات

1-1- رسیدن پنیر

رسیدن پنیر عبارتست از نگهداری آن به مدت 3-2 ماه در درجه حرارت 16-0 درجه سانتی گراد که در طی آن خصوصیات فیزیکی و شیمیایی و باکتریولوژیکی آن تغییر پیدا کرده و باعث ایجاد طعم و مزه و بافت و بدنه مشخص می شود.

مهمترین تغییرات بیوشیمیایی که در حین رسانیدن اتفاق می افتد شامل پروتئولیز، لیپولیز و گلیکولیز است (فاکس، 1989 و ویلکینسون، 1993). این فعل و انفعالات با یکسری واکنش های کاتابولیک ثانویه شامل دآمیناسیون، دکربوکسیلاسیون، دسولفوریزاسیون و استریفیکاسیون همراه می باشد.

1-1-1- پروتئولیز

پروتئولیز یا هیدرولیز پروتئین‌های شیر مهمترین و پیچیده ترین واکنشی است که در طول رسیدن پنیر اتفاق می افتد و به دو مرحله پروتئولیز اولیه و ثانویه تقسیم می شود (سوزا و همکاران، 2001).

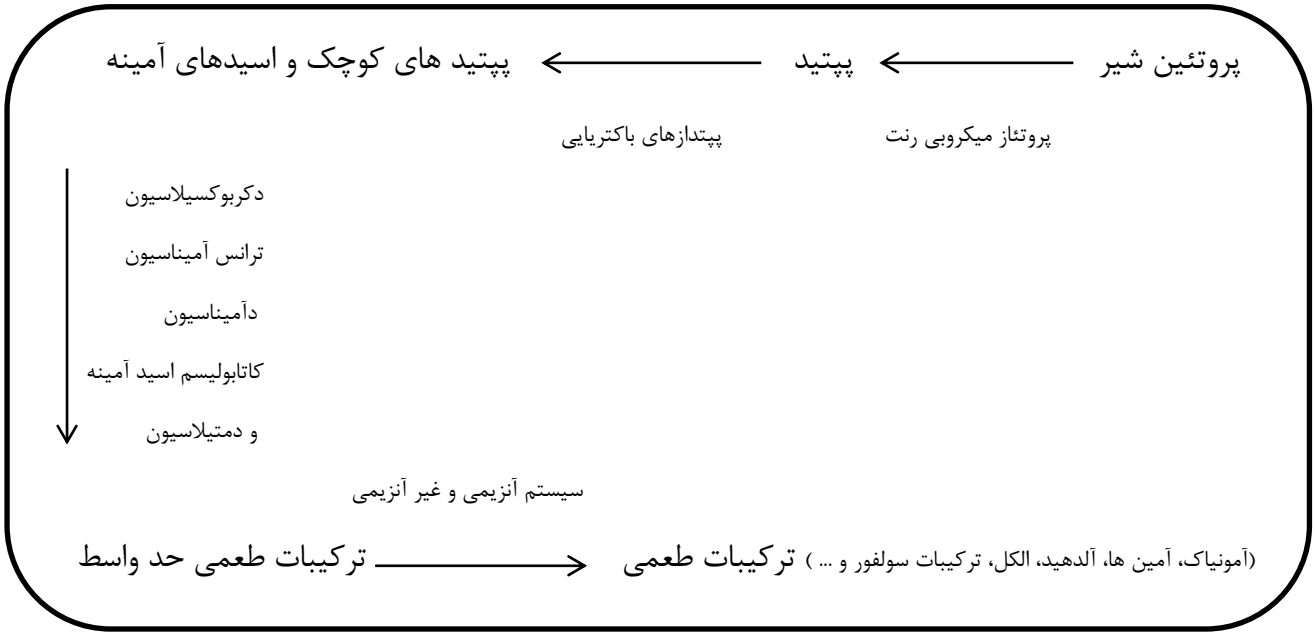
پروتئولیز اولیه را می توان به صورت آن دسته از تغییرات که روی γ ، β ،αs_1- کازئین ها، پپتیدها و سایر دسته های کوچک اتفاق می افتد تعریف کرد که با الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید (PAGE)[1] قابل شناسایی هستند.

محصولات پروتئولیز ثانویه شامل پپتیدها و آمینواسیدهای محلول در فاز آبی هستند و به صورت یک جزء محلول در آب (WSF)[2] قابل استخراج هستند. این اجزای محلول در آب به طور قابل توجهی در شدت طعم پنیری مؤثر هستند که عمدتاً شامل اسید های آمینه آزاد بوده و این اسید آمینه ها اساس طعم پنیری را تشکیل می دهند و می توانند برای واکنش های بعدی تشکیل طعم به عنوان سوبسترا عمل کنند (آستون و کرامر، 1986؛ فاکس و والاس، 1997).

1 Poly Acrylamid Gel Electrofores
2Water Soluble Fraction

هنگامی که پروتئین‌های شیر عمدتاً کازئین‌ها بوسیله کیموزین و پپسین اضافه شده با رنت هیدرولیز شوند، پپتیدهایی با وزن مولکولی بالا آزاد شده و به وسیله پپتیدازهای خارج سلولی باکتریایی به پپتیدهای کوچکتر تجزیه می‌شوند. پروتئولیز در عمل‌آوری پنیر حداقل با 4 روش ایفای نقش می کند: 1- مستقیماً بوسیله آمینواسیدها و پپتیدهای تولیدی و غیرمستقیم بوسیله کاتابولیسم اسیدآمینه 2- آزاد کردن طعمی در طول هضم 3- با تغییر pH توسط NH_3 4- تغییر در بافت توسط شکست شبکه‌ی پروتئین (کیلکاولی و همکاران، 2000).

عوامل پروتئولیتکی عمده در پنیر عبارتند از: 1- پروتئاز طبیعی شیر خصوصاً پلاسمین 2- کیموزین یا جایگزین‌های رنت 3- پروتئیناز استارتری و پپتیدازهای آزاد شده از لیز شدن سلول 4- آنزیم‌های ناشی از باکتری غیراستارتر 5- پروتئینازها و پپتیدازهای ناشی از میکروارگانیسم‌های ثانویه اضافه شده به پنیر می‌باشند (فاکس ،1981 و گریپون، 1991).



شکل1-1- تشکیل طعم پنیری ناشی از پروتئولیز (موسکویتز و نولک، 1987)

1-1-2- لیپولیز

یکی دیگر از مکانیسم های توسعه طعم در پنیر لیپولیز می باشد، لیپولیز به هیدرولیز تری ـ مونوودی گلسیریدها اشاره دارد که توسط آنزیم‌های لیپولیتیک منجر به تولید اسیدهای چرب آزاد (FFA)[1] و طعم می‌شوند. ترکیبات طعمی عمده که طی لیپولیز ایجاد می شوند، اسیدهای چرب آزاد هستند که مستقیماً بر طعم پنیر اثر دارند. اسیدهای چرب آزاد همچنین می توانند به وسیله میکروارگانیسمها به یکدیگر و اغلب به ترکیبات طعمی قوی تبدیل شوند از جمله متیل کتونها، لاکتونها، استرها، الکلها و آلدهیدهای ثانویه که اثر مستقیم بر طعم پنیرهای مختلف دارند اسیدچرب آزاد و الکل‌ها می‌توانند به استراسید چرب زنجیر کوتاه نظیر اتیل استات یا اتیل بوتیرات توسط *لاکتوکوکوس لاکتیس* استراز[2] تبدیل شوند. در فرایند لیپولیز حدود 20 درصد از چربی ممکن است به اسید چرب کوتاه زنجیر و متوسط بین C_8- C_{14} هیدرولیز شده و به متیل‌کتون اکسید شده و در پایان به الکل نوع دوم احیا شوند (موسکوویتز و نولک، 1987). پروفایل طعمی یا شدت طعمی، متناسب با درجه لیپولیز و آزاد شدن ترکیبات اسیدچرب با وزن مولکولی پایین بوده است (هایلسس و همکاران، 1999)، که در مورد پنیر اصلاح شده آنزیمی نوع پرووولون و رومانو بسیار مهم می باشد (موسکوویتز و نولک، 1987).

اسید آمینه ها، اسید چرب های کوتاه زنجیر و محصولات فرار تولید شده در اثر واکنش های پروتئولیز و لیپولیز اثر قابل توجهی در آرومای پنیری دارند (انگلز و ویسر، 1994).

1-1-3- گلیکولیز

این فرایند مربوط به تبدیل لاکتوز به لاکتیک اسید توسط باکترهای استارتری است. دلمه پنیر تازه حاوی 1/5- 0/8٪ لاکتوز است که سریعاً به L– لاکتات متابولیز می‌شود با این حال L– لاکتات توسط باکتری

[1] Free Fatty Acid
[2] *Lactococcus lactis* esterase

غیر استارتری (NSLAB)[1] به دلتا لاکتات تبدیل می‌شود که ممکن است به استیک اسید یا ترکیبات دیگر اکسید شود که طعم‌های متفاوتی ایجاد می‌کند. ترکیبات طعمی نظیر دی‌استیل، استیک و پروپیونیک اسید به طور جزئی می‌توانند از کربوهیدرات‌ها تشکیل شوند (کیلکاولی و همکاران، 1998).

متابولیسم کامل لاکتوز باقی مانده و ترکیبات مونوساکارید آن برای تولید پنیر با کیفیت خوب ضروری است. لاکتوز باقیمانده می تواند به وسیله راسمیزاسیون L-لاکتات تبدیل به D-لاکتات شود.

کلسیم D-لاکتات نسبت به کلسیم L-لاکتات کم محلولتر است و ممکن است در پنیر کریستالیزه شود که لکهای سفید نامطلوب به ویژه در سطح برش را سبب می شود (مک سوینی، 2000).

1-1-3-1- متابولیسم لاکتات

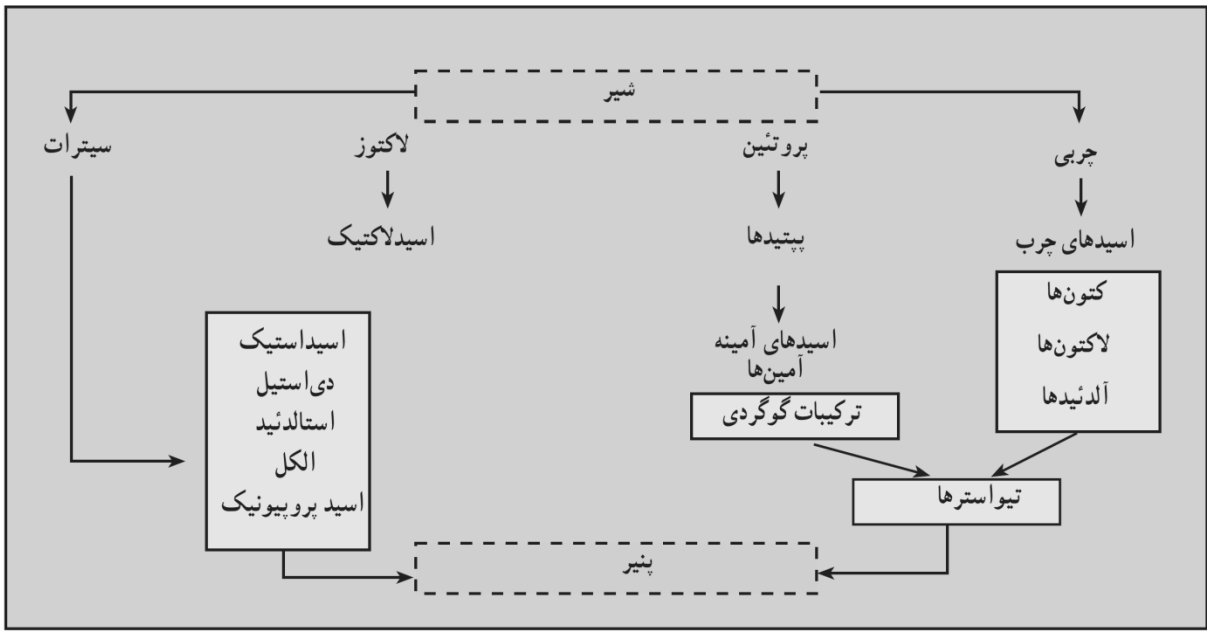
اکسیداسیون لاکتات می تواند در پنیر رخ دهد. باکتری های استارتر و غیر استارتری ایزوله شده از پنیر در اکسیداسیون لاکتوز، لاکتات، سیترات، اسیدهای آمینه آزاد و پپتیدها نقش دارند. در بین لاکتوباسیلوس ها فقط *لاکتوباسیلوس کازئی* سیترات را اکسید می کند در حالیکه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *بریویس* لاکتوز وL و D-لاکتات را اکسید می کنند. بنابرین اکسیداسیون لاکتات به استات، در پنیر به جمعیت NSLAB و وجود O_2 که به وسیله اندازه حفره و اکسیژن گیر افتاده وابسته است. استات همچنین ممکن است به وسیله باکتریهای استارتری از لاکتوز یا سیترات یا اسیدهای آمینه که اغلب در غلظتهای بالا در پنیر چدار موجودند و به طعم پنیر کمک می کنند تولید شود، غلظتهای بالا ممکن است بد طعمی را سبب شوند. بنابراین اکسیداسیون لاکتات به استات به طعم پنیر به خصوص پنیر چدار کمک می کند (فاکس و همکاران، 2000).

1-1-3-2- متابولیسم سیترات

سیترات ممکن است به یک سری ترکیبات طعمی فرار به وسیله استارترهای مزوفیلیک ویژه متابولیزه شود. تحقیقات بسیاری نشان داده اند که سیترات به وسیله *لاکتوکوکوس لاکتیس* یا *لاکتوکوکوس*

1Non Starter Lactic acid bacteria

کرموریس متابولیزه نمی شود اما به وسیله *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیر گونه *دی استی لاکتیس* و *لوکونوستوک* با تولید دی استیل وCo_2 متابولیزه می شود، حضور لاکتوز بر مقدار فرمات تشکیل شده اثر دارد. متابولیسم سیترات به ویژه در پنیرهای نوع هلندی که Co_2 تولید شده برای تشکیل چشمکها لازم است، مهم است. دی اکسید کربن تولید شده بوسیله تخمیر سیترات نیز می تواند سبب ایجاد یک بافت باز نامطلوب و عیب شناور ماندن لخته در پنیرهای چدار و کاتیج شود (مک سوینی، 2000).



شکل 1-2- تولید ترکیبات طعم زا در فرایند رسیدن پنیر (هایلسس و همکاران، 1999)

1-2- روش های کنترل و تسریع رسیدن پنیر

برای کنترل و تسریع رسیدن پنیر بایستی روش هایی به کار برده شوند که به لحاظ علمی مطابق با تکنولوژی رسیدن پنیر بوده و از لحاظ عملی قابل استفاده و در دسترس باشد. در این راستا لاو (2001) راه حل هایی را جهت کنترل و تسریع رسیدن پنیر پیشنهاد کرد که این روش ها عبارتند از: 1) افزایش دمای نگه داری (فاکس و همکاران، 2000)، 2) استفاده از فناوری فشار بالا (لاو، 2001)، 3) افزودن آنزیم

(فاکس و همکاران، 2000)، 4) استفاده از کشت های استارتری لیز شده (لاو، 2001) و 5) استفاده از کشت های الحاقی.

1-3- نقش آنزیم ها در توسعه طعم پنیری

1-3-1- لیپازها

همانطور که گفته شد لیپولیز واکنش مهمی در توسعه طعم پنیر است. استرازهای بدست آمده از دهانه شیردان گوساله[1] و بره به منظور ایجاد اسیدهای چرب آزاد در طول تولید پنیر ایتالیایی نظیر رومانو به شیر اضافه می شوند که این اسیدهای چرب آزاد متشکله طعمی مهمی در پنیر می باشند. ترکیب اسیدچرب با کیفیت طعم مرتبط است (وو و لیندسی، 1984).

لیپولیز توسط لیپاز شیر و یا لیپاز تولیدی توسط باکتری‌ها انجام می گیرد. لیپاز استارتری تری گلیسیریدها را هیدرولیز نمی کند، این نوع لیپاز به مونوگلیسیریدها و دی گلیسیریدهای تولیدی توسط لیپاز شیر یا لیپازهای میکروبی حمله کرده و منجر به توسعه طعم چداری می شوند.

لیپاز در شیر از شش منبع سرچشمه می گیرد: شیر، رنت، استارتر، استارترهای الحاقی، باکتریهای غیر استارتری و در صورت استفاده لیپازهای اگزوژناز (هلند، 2005).

واکنش اولیه کاتالیز شده به وسیله استرازها و لیپازها، هیدرولیز است. به هر حال چهار نوع واکنش تشکیل استر ممکن است به وسیله استرازها ولیپازها تحت شرایط خاص کاتالیزمی شود:

- استریفیکاسیون
- الکولیز
- اسیدولیز
- ترانس استریفیکاسیون

1 Glottal region of calf

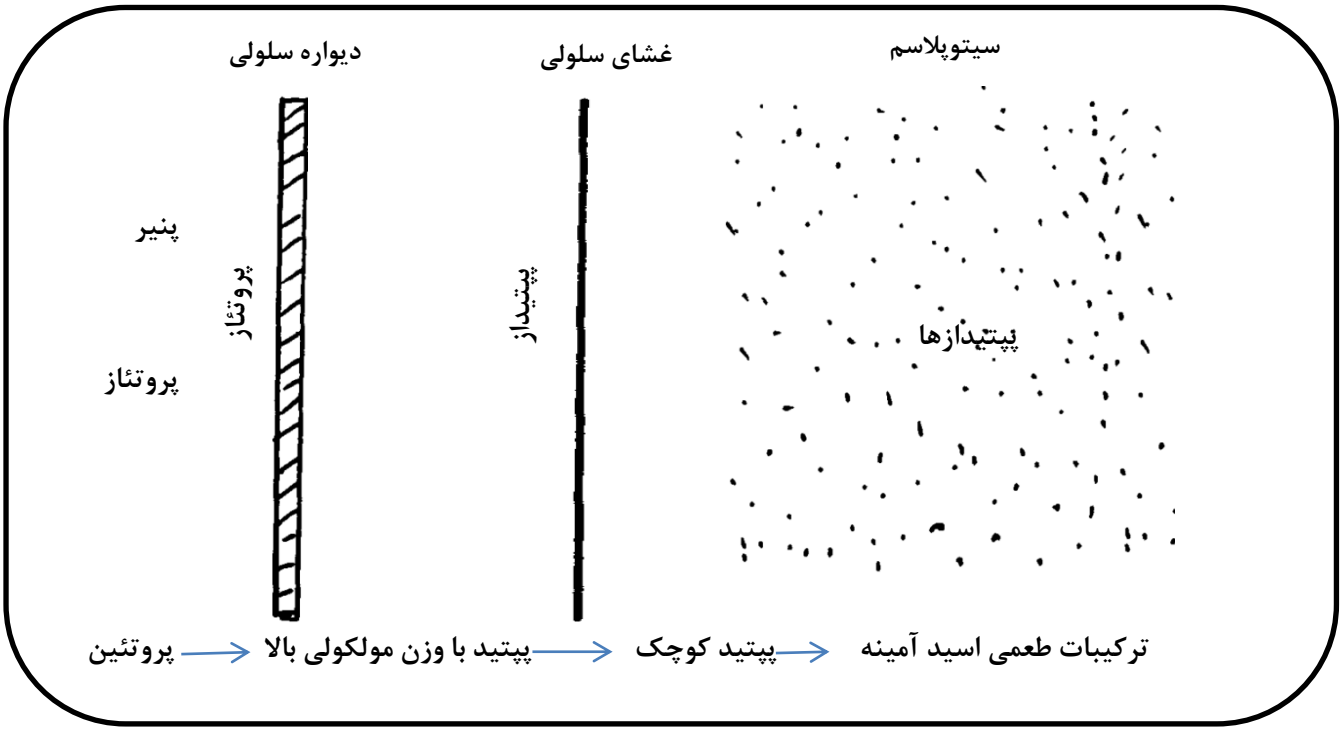
اسیدهای چرب آزاد و استرها ترکیبات طعمی مهمی در پنیر هستند. اسید چرب های عمده در پنیر زنجیر کربنی مستقیم C_2 تا C_{18} دارند که آستانه درک نسبتاً بالایی (در سطح میلیون) دارند و طعم های رنسیدیتی، پنیری، تندی، بزی، صابونی و واکسی را ایجاد می کنند. در مقابل، آستانه درک طعم بسیاری از استرهای دارای طعم که از اسیدهای چرب متناظرشان مشتق شده اند خیلی پایین است (در سطح بیلیون) و طعم شبیه میوه مثل سیب، موز، هلو، آناناس، توت فرنگی، استر، اتری ایجاد می کنند. پس استرهای فعال طعمی می توانند مستقیم یا غیر مستقیم بر طعم پنیر در سطوحی زیر سطح آستانه اختصاصی اثر بگذارند زیرا آستانه درک پایینی دارند. استرها ممکن است بدطعمی (تندی و گوسفندی) حاصل از سطوح بالای اسیدهای چرب زنجیر کوتاه را بپوشانند. به هر حال سطوح بالای استرهای اتیل اسیدهای چرب زنجیر کوتاه می تواند سبب عیب طعم میوه ای در پنیرهایی مثل پنیر چدار شود (هلند، 2005).

1-3-2- پروتئازها

آنزیم های پروتئاز شرکت کننده در این فرایند به همراه رنت و پروتئاز شیر باعث هیدرولیز نسبی کازئین می شوند و در اصلاح بافت و عطر و طعم پنیر رسیده مؤثر هستند. انواع زیادی از باکتریهای اسید لاکتیک (LAB)[1]، بزرگترین شرکت کنندگان در سیستم آنزیمی پنیر هستند. ترکیب اصلی سیستم پروتئولیتیک باکتری‌های اسید لاکتیک شامل پروتئینازها (عمدتاً CEP[2]، لاکتوسپین و . . .)، اسیدهای آمینه، سیستم های انتقال پپتید و یک رنج پپتیدازهای خارج سلولی است.

همانطور که در شکل 1-3 مشاهده می شود پروتئازها در سلول های موجود در دیواره سلولی یا در فضای بین سلولی وجود دارند. پپتیدازها نیز در غشای سلولی و همچنین در سیتوپلاسم باکتری های استارتری موجود هستند (توماس و همکاران، 1987).

1Lactic Acid Bacteria
[2]Cell Envelope Proteinase



شکل 1- 3- تجزیه پروتئین توسط باکتری های استارتری پنیر (موسکویتز و نولک، 1987)

1-3-2-1- لاکتوسپین ها

لاکتوسپین یک نوع پروتئیناز متصل به دیواره سلولی است. نقش اصلی لاکتوسپین تخریب کازئینها برای ایجاد پپتیدهای کوتاه است. در هر حال، نقش لاکتوسپین در رسیدن پنیر متفاوت است. محققان معتقدند که کیموزین یا پلاسمین ابتدا عمل کرده و سپس لاکتوسپین پپتیدهای ایجاد شده با اندازه متوسط را هیدرولیز می کند (اوپادهای و همکاران، 2003).

1-3-2-2- پپتیداز ها

تحقیقات زیادی در مورد سیستمهای انتقال پپتید و اسیدهای آمینه صورت گرفته است. وارد شدن پپتیدها با یک یا دو سیستم انتقال الیگوپپتدی (opt)[1] و یک یا دو انتقال دهنده دی/تری پپتید رخ می دهد. به دنبال جذب، پپتیدها در داخل سلولها به وسیله انواع پپتیدازها تخریب می شوند. این پپتیدازهای

[1]Oligo Peptide Transferase

LAB می تواند بر اساس نوع سوبسترا به انواع اندوپپتیدازها، آمینوپپتیدازها، دی وتری پپتیدازها و پپتیدازهای پرولین تقسیم شوند (کرانبورگ و همکاران، 2003).

1-4- لیز شدن و اهمیت آن در توسعه طعم پنیری

نتایج مطالعاتی که در مورد پپتیدازهای باکتریهای لاکتیک اسید انجام گرفته، نشان داده است که پپتیدازها در اکثر موارد داخل سلولی بوده اند (کوک، 1990)، که بایستی در طول رسیدن پنیر به داخل دلمه آزاد شوند و موجب ایجاد عطر و طعم پنیر شوند.

توانایی گونه ها به لیز شدن و پس از آن خروج آنزیم های درون سلولی آن ها یک ویژگی مطلوب در رسیدن پنیر محسوب می شود. آنزیم های خروجی طی لیز شدن نقش کلیدی در تشکیل اسیدهای آمینه مولد ترکیبات طعمی بازی می کنند و این دسته از گونه ها برای تشکیل طهم در محصولات لبنی تخمیری مورد توجه هستند (لورتال و همکاران، 2005).

اهمیت سرعت بخشیدن رسیدن پنیر موجب توجه به تحریک لیز کردن سویه های استارتری به منظور کمک به آزاد سازی آنزیم های درون سلولی مؤثر در تشکیل عطر و طعم شده است.

باکتریهای اسید لاکتیک از نوع باکتریهای گرم مثبت هستند که بطور گسترده ای در بسیاری از فرایند های تخمیری لبنی مورد استفاده قرار می گیرند، آنها در تشکیل عطر و طعم و توسعه بافت شرکت می کنند در حالی که از فساد محصول نیز ممانعت می کنند. در بین باکتری های اسید لاکتیک سویه *لاکتوکوکوس لاکتیس* استفاده گسترده ای داشته و از لحاظ اقتصادی نیز مهم می باشد. لیز شدن این سویه در پنیر در طول رسیدن اتفاق می افتد و با آزاد کردن آنزیم های درون سلولی پروتئولایتیک و استرولایتیک موجب توسعه عطرو طعم می شود این فرایند نسبتاً آهسته بوده و بالا بردن سرعت لیز شدن می تواند موجب تسریع رسیدن پنیر شود. لیز شدن می تواند با استفاده از یکسری اتولیزهای خاص و یا فعالیت باکتریوفاژهای لاکتیکی ایجاد شود هر دو فرایند نیاز به آنزیم های هیدرولایتیک نظیر آمیدازها یا

مورامیدازها دارد که برای دسترسی به دیواره سلولی یا بصورت مستقیم نفوذ می کنند و یا با شکست غشای سلولی توسط ژن مخصوص این کار را انجام می دهند.

کنترل لیز شدن غشای سلول می تواند به عنوان یک حصار بین آنزیمهای درون سلولی و سوبستراهای پپتیدی یا لیپیدی شان در ماتریکس پنیر عمل کند. فعالیت انتقالی کشتهای استارتری در جهت انتقال پپتیدها به درون سلول کافی نبوده و لیز شدن برای افزایش واکنشهای سوبسترا- آنزیم ضروری است. لیز شدن تنها آنزیم‌ها را خارج نمی کند بلکه سایر ترکیبات درون سلولی مثل اسیدهای نوکلئیک، ویتامین‌ها و غیره را نیز خارج می کند. همه این مولکولها می توانند مستقیم یا غیر مستقیم با تحریک رشد فلور میکروبی یک نقش بازی کنند (هلند، 2005).

لیز شدن استارترهای لبنی لازمه رسیدن بهینه پنیر می باشد، که طی آن آنزیم‌های استارتری درون سلولی، به ویژه پپتیدازها می توانند نقش مهمی را ایفا نمایند. اهمیت لیز شدن در رسیدن پنیر مخصوصاً به علت سهولت لیز شدن و کاهش تلخی به وسیله هیدرولیز پپتیدهای هیدروفوبیک بزرگ است . اگرچه لیز شدن سلولها عموماً فعالیت پپتیدازها را افزایش می دهد، در مقابل ممکن است بر آنزیم‌هایی که به کوفاکتور یا کوسوبسترا نیاز دارند اثر منفی داشته باشد.

1-4-1- روش های کنترل لیز شدن

چندین روش برای کنترل لیز شدن استارترهای *لاکتوکوکوس لاکتیس* در پنیر پیشنهاد شده است:

- انتخاب گونه هایی که به طور طبیعی خصوصیت اتولیتیکی بالایی دارند.
- ساختن گونه های اصلاح شده ژنتیکی *لاکتوکوکوس لاکتیس* با لیز شدن اجباری. این استراتژی با قرار دادن ژن تحت کنترل یک پروموتور اجباری انجام می گردد. اما افزایش این استارترها در همه کشورها مجاز نیست و به وسیله سدهای قانونی محدود شده است. همچنین ساخت استارترهای GM[1] نیاز به

[1]Genetically Modified

تکنیکهای مولکولی پیچیده ای دارد که وسعت گونه هایی که قادرند در ساخت پنیر استفاده شوند را کاهش می دهد در حالیکه در طبیعت گونه های زیادی با خواص اتولیتیکی بالا وجود دارند.

- همراه کردن استارتر با گونه های تولید کننده باکتریوسین. اثر باکتریولوژیک بعضی باکتریوسین ها به خوبی به ثبت رسیده است. روش دیگر جهت افزایش لیز شدن *لاکتوکوکسی* ها به وسیله افزودن یک گونه تولید کننده باکتریوسین به استارتر اصلی پیشنهاد شده است. کنترل این سیستم لیزکننده جدید به وسیله 3 گونه استارتری انجام می شود: یک گونه اسیدی کننده مقاوم به باکتریوسین، یک گونه حساس به باکتریوسین، و یک تولید کننده باکتریوسین. یک گونه باکتریوسین دیگر، لاکتسین 481، که برای لیز شدن یک استارترغیراتولیتیک می تواند استفاده شود که موجب تحریک خروج آنزیمهای درون سلولی بدون جلوگیری کامل از رشد می شود، بنابراین استفاده از این باکتریوسین قابلیت تولید اسید توسط استارتر را حفظ می کند (اسمیت، 2005).

- غیر فعال شدن ژنهای ان کد کننده برای بعضی دهیدروژنازها می تواند استفاده بهتر α- کتواسیدها را برای تولید ترکیبات طعمی اجازه دهد. بیان بالای اسید D- هیدروکسی ایزوکاپروئیک دهیدروژناز محصولات تخریب غیرآنزیمی α -کتواسیدها در پنیرهای کم چرب را کاهش می دهد و موجب تشکیل طعم کند در این پنیرها می شود.

- افزودن لاکتیک اسید باکتری های رقیق شده به شیر پنیر یک روند ابداعی است که مکمل آنزیمی پنیر افزایش می یابد. این باکتریها با روشهای رقیق سازی مختلف تحت کنترل قرار می گیرند تا خصوصیت اسیدیفیکاسیونشان غیر فعال و فعالیت آنزیمهای پروتئولیتیکی شان حفظ شود. پروتئولیز بالا و افزایش طعم از طریق افزودن لاکتیک اسید باکتری های رقیق شده با آزاد شدن آنزیمها از طریق شکست یا اتولیز همراه است (ویلکینسون و همکاران، 2005).