نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 10، شماره 3، پاییز 1393، ص. 195-188

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 10, No. 3, Fall 2014, p. 188-195

تاثیر مدت زمان رسیدگی بر پروفیل اسیدهای چرب و آمینو اسید آزاد پنیر محلی کردی

الناز میلانی[1*]- فخری شهیدی[2]- سید علی مرتضوی[3]- سید علیرضا وکیلی[4]

تاریخ دریافت:1390/10/4
تاریخ پذیرش:1391/4/19

چکیده

پنیرمحلی حاصل از شیر خام یکی از پرمصرف ترین پنیرهای موجود در دنیا می باشد. پنیر کردی، نوعی پنیر نیمه سخت بوده و بصورت سنتی در نواحی شرق ایران از شیر خام گوسفند و گاو تولید می شود. این پنیر دوره رسیدگی خود را داخل مشک می‌گذراند، در نتیجه اغلب دارای مجموعه ای از واریته های گوناگون میکروارگانیسم بوده و دارابودن ویژگی های حسی منحصر به فرد، این نمونه پنیر را ممتاز ساخته است. ویژگی های نهایی پنیر به شدت تحت تأثیر تغییرات آمینواسید و اسیدهای چرب آزاد حاصل از واکنش‌های لیپولیز و پروتئولیز در طول دوره رسیدگی پنیر می باشد. در پژوهش حاضر، تغییرات کمی اسید چرب آزاد و اسیدهای امینه آزاد در طول دوره رسیدگی 10، 30 ، 50 و 70 روز، در شرایط سنتی، بررسی گردید. نتایج بیانگر تأثیر معنی دار زمان رسیدگی بر پروفیل اسیدهای چرب آزاد بود($p<0.05$). بطوریکه میزان اسید اولئیک و پالمیتواولئیک در مقایسه با سایر اسیدهای چرب آزاد در انتهای دوره رسیدگی بیشینه بود. میزان کمی اسیدهای آمینه آزاد بویژه پرولین، آلفاآمینوبوتیریک اسید، لوسین، متیونین، گلایسین، آرژنین، ترئونین، فنیل آلانین وایزولوسین نیز در طول دوره رسیدگی، افزایش معنی دار داشت ($p<0.05$)؛ نتایج نشان داد سرعت فرایند پروتئولیز در انتهای دوره رسیدگی افزایش یافت، فعالیت لیپولتیک نیز، بدون تغییر در طول دوره رسیدگی ادامه یافت.

واژه‌های کلیدی: پنیر کردی، دوره رسیدگی، آمینواسید و اسید چرب آزاد

مقدمه

کیفیت پنیر به شدت تحت تأثیر غلظت ترکیبات پپتیدی، آمینواسید و اسیدهای چرب آزاد حاصل از واکنش‌های لیپولیز و پروتئولیز می‌باشد. لیپولیز و پروتئولیز از واکنش‌های بیوشیمیایی اصلی در طول دوره رسیدگی پنیر می باشند (McSweeney *et al.*,2000، Urbach *et al.*, 1993). فرایند پروتئولیز به واسطه عملکرد آنزیم‌های داخلی شیر، پلاسمین، آنزیم‌های رنت، پروتئیناز و پپتیداز باکتریهای آغازگر و میکروفلور ثانویه می باشد(Franco *et al.*, 2001 و Mallatou *et al.*, 2003). تفاوت در غلظت آمینواسیدها در پنیر، به روش تولید (نوع دلمه، آغازگر، افزودن آنزیم پروتئیناز)، مدت زمان و شرایط رسیدگی، میزان و نوع پروتئولیز ارتباط دارد (Pino *et al.*, 2009). از این رو، پروتئولیز نقش حیاتی در تعیین ویژگی‌های بارز حسی پنیر داشته و بیانگر شاخص کیفی پنیر می‌باشد (Guler *et al.*, 2004 و Fox *et al.*,1994). عوامل ایجاد لیپولیز در پنیر شامل آنزیم‌های چربی شکن که به طور طبیعی در شیر وجود دارند (لیپاز شیر)، رنت (پری گاستریک استراز) و فلور میکروبی بوده که سبب شکستن پیوند استری میان اسید چرب و هسته گلیسرول موجود در تری گلیسرید شده و به دنبال آن اسید چرب آزاد(FFA) و مونو دی گلیسرید تشکیل می‌شوند (Fox *et al.*, 2000، Collin *et al.*, 2003). لیپاز داخلی شیر بیشترین تأثیر را در لیپولیز پنیر حاصل از شیر خام داراست(Katsiari، 2009). لیپوپروتئین لیپاز (LPL) از موقعیت Sn-1, Sn-3 منو، دی و تری گلیسرید، اسیدچرب آزاد می‌کند (Collin *et al.*, 2003). مشارکت پروتئیناز و لیپاز شیر در فرایند پروتئولیز و لیپولیز به حرارت‌دهی شیر پنیرسازی بستگی دارد به گونه‌ای که پاستوریزاسیون باعث کاهش فعالیت آنها می‌شود. در فرایند پاستورایزاسیون (72°C به مدت 15 ثانیه)، فعالیت لیپاز به میزان 83% کاهش می‌یابد و پس از حرارت‌دهی در دمای 78° به مدت 15 ثانیه، 100% فعالیت آن از بین می‌رود (Driessen، 1989). مطابق پژوهش Atasoy و همکاران (2008)، میزان اسید چرب آزاد در پنیر

1- استادیار گروه فرآوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی جهاد دانشگاهی مشهد
2، 3- استادان گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
4- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(* - نویسنده مسئول: Email: : e_milani81@yahoo.com)

حاصل از شیر خام بیشتر از پنیر حاصل از شیر حرارت دیده بود. همچنین پخت پنیر در انواع پنیر چدار و سوئیسی سبب غیر فعال شدن لیپاز میکروبی وکاهش لیپولیز فرآورده گردید. اسیدهای چرب آزاد به همراه ترکیبات فرار و محصولات حاصل از متابولیسم کربوهیدرات و آمینواسیدها، به طور مستقیم در توسعه عطر و طعم پنیر مؤثرند، بویژه زمانیکه توازن مناسب میان فرآورده‌های پروتئولیز، لیپولیز و سایر واکنش‌ها در پنیر موجود باشد(Urbach، 1993، fox،2000و McSweeney،2000). اسیدهای چرب آزاد بسته به غلظت و آستانه حسی در عطر و طعم پنیر دخیل می باشند. از پروفیل اسید چرب آزاد بلند، متوسط و کوتاه زنجیر به عنوان شاخص برای طبقه‌بندی انواع پنیر طی دوران رسانیدن استفاده می‌شود(Collin *et al*., 2003). افزون بر توسعه کارخانجات پنیرسازی، بسیاری از تولید کنندگان در سراسر دنیا روش‌های تولید سنتی خود را حفظ نموده؛ چنانکه در حال حاضر انواع پنیر صنعتی کمتر از پنیرهای سنتی می‌باشد(Guler *et al*., 2004). پنیر کردی، از انواع پنیرهای سنتی است که نواحی شرق ایران از شیر گوسفند، بز، گاو و یا مخلوط آنها تولید می‌شود؛ بافتی سفت داشته و دوره رسیدگی خود را داخل مشک می‌گذراند و به دلیل عطر و طعم منحصر به فرد خود از معروف‌ترین و پرطرفداران فرآورده های لبنی منطقه به شمار می رود. براساس مطالعات انجام شده، تاکنون هیچ گزارشی در خصوص تغییرات لیپولتیک، پروتئولیتیک در طول دوره رسیدگی پنیر سنتی کردی تدوین نشده است. بنابراین، هدف از پژوهش، بررسی فرآیند لیپولیز، پروتئولیز و ترکیب درصد اسیدهای چرب و آمینه آزاد طی رسانیدن 70 روزه پنیر محلی کردی در شرایط سنتی بود

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

نمونه برداری بصورت تصادفی و در فصل تابستان از نقاط مختلف منطقه کرمانج کلات، انجام گرفت. نحوه انتخاب مکان براساس بیشترین میزان دام و بیشترین میزان تولید پنیر کردی در میان افراد منطقه صورت گرفت. 3 نمونه پنیر، هریک به وزن 1 کیلوگرم داخل پوست و تحت شرایط سردخانه(دمای 4 درجه سانتی گراد) به آزمایشگاه منتقل شد.

نمونه برداری

شرایط سنتی ابتدا شیر تازه گوسفند پس از دوشش تا دمای حدود 5±40 درجه سانتی گراد گرم شده و رنت تجاری حاصل از کپک آسپرژیلوس نیجر واریته آواموری[1] به میزان 1% در دمای 5±30 درجه سانتی گراد به آن افزوده می شود، سپس شیر، به منظور انعقاد و تشکیل دلمه، برای 60 دقیقه در همین دما نگهداری می شود. پس از انعقاد، بر روی دلمه ها نمک پاشیده شده و برش دلمه ها انجام می گیرد. پس از این مرحله به منظور خروج آب اضافی، دلمه ها در داخل پارچه قرار گرفته و تحت فشار، به مدت یک ساعت در داخل یخچال نگهداری می شوند. سپس دلمه ها از پارچه خارج شده و درون آب نمک 15-12 درصد قرار می گیرند. دلمه های تولیدی به مدت 2 هفته داخل یخچال باقی مانده وسپس درون پوست بزغاله و آب نمک، در دمای یخچال تا پایان دوره رسیدگی نگهداری می شوند. لازم به ذکر است؛ پوست بزغاله قبل از استفاده کاملا تمیز و درآب جوش قرار گرفته و سپس نمک زنی و خشک می شود. در زمان استفاده، پوست مجددا توسط آب شسته و منافذ آن (قسمت های پا و دست) توسط نخ بسته می شود.

استخراج و اندازه گیری اسیدهای آمینه آزاد در پنیر

بدین منظور ابتدا 5 گرم از پنیر برحسب وزن مرطوب با 50 میلی لیتر پرکلریک اسید 0/6N، به مدت 5 دقیقه داخل استومکر هموژن گردید؛ محلول هموژن به مدت 20 دقیقه در 2000 g و 10 دقیقه در 5000 g سانترفیوژ شد و مایع شفاف رویی از کاغذ صافی واتمن 54 فیلتر گردید. پس از جداسازی، pH محلول توسط 30% NaOH برابر 7 تنظیم شد. سپس دمای نمونه به 2درجه سانتی گراد کاهش یافت و محلول از فیلتر غشایی 0/45 میکرومتر عبور داده شد. به منظور مشتق‌سازی آمینواسیدها؛ 400میکرولیتر از عصاره به کمک ازت مایع خشک گردید و در 20 میکرولیتر از مخلوط حاوی اتانول، تری اتیل آمین، آب و فنیل ایزوتیوسیانات به نسبت (7:1:1:1) و 800 میکرولیتر بافر فسفات (NaH_2PO_4 pH=7.3) حل گردید؛ سپس محلول حاصل به نسبت حجمی 6: 94 در استونیتریل حل شد و در 2000g برای 10 دقیقه مجدد سانترفیوژ گردید و 5 میکرولیتر از نمونه مشتق شده به داخل ستون کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا[2] تزریق گردید. دستگاه مذکور مدل واترز ODS با پمپ فشاری[3] w600، دارای سیستم حذف گاز هلیم و واحد آشکارساز نوع فلورسنس1775بوده و استاندارد اسید آمینه بر پایه روش Waters: AccQ.Tag تعیین گردید. همچنین سیستم حلال شامل بافراستات، استونیتریل و آب دیونیزه بود(Tavaria *et al*., 2003 و Nhuch *et al*.,2008).

استخراج و اندازه گیری اسیدهای چرب در پنیر

به منظور استخراج اسیدهای چرب آزاد (C10:0- C20:0) از پنیر، ابتدا نمونه های پنیر (10گرم) با اسید سولفوریک 50% حجمی-

1 - Aspergillus niger var. *awamori*

2 - High-performance liquid chromatography (HPLC)

3 - Pressure Pump

حجمی تا رسیدن به pH معادل2، مخلوط گردید؛ سپس به منظور هموژن کردن و با هدف متلاشی کردن غشاء گلبول چربی، با 25 گرم سولفات سدیم بدون آب کاملا مخلوط گردید. استخراج چربی به مدت 2 ساعت در استخراج کننده مداوم (Twysselmann) توسط حلال هگزان در 60 درجه سانتی گراد پی گیری شد. پس از این مرحله توسط تیتراسیون با هیدروکسید سدیم آبی 0/1 نرمال، جداسازی اسیدهای چرب آزاد از تری آسیل گلیسرول انجام شد و لایه آبی حاوی نمک های سدیم اسیدهای چرب آزاد جهت خشک شدن تحت خلا تبخیر گردید(Garcia-Lopez، 1994). مشتق سازی نمک اسید چرب با افزودن 8 سی سی محلول اتانول- اسید سولفوریک (5% حجمی-حجمی) به نمک خشک با اعمال حرارت 70درجه سانتی گراد به مدت 1ساعت در لوله در پیچ دار پی گیری شد. سپس دمای نمونه ها تعدیل شد و به منظور تسهیل جداسازی بیشتر فازها، 6سی سی آب دوبار تقطیر به نمونه ها افزوده گردید. سپس جهت دستیابی به اتیل استرها، 1سی سی هگزان به نمونه ها افزوده گردید (Sukhija1988). سپس به کمک سرنگ همیلتون 1میکرولیتر از محلول بالایی به دستگاه گاز کروماتوگرافی(GC) تزریق شد. پروفیل اسیدهای چرب توسط دستگاه بر پایه روش اصلاح شده Nieuwenhof(1971) و برای هر نمونه با 3 تکرار تعیین شد. استاندارد اسید چرب شامل مخلوط متیل استر اسیدهای چرب[1] (سیگما) بود. اسیدهای چرب با استفاده از ستون Cp sil88 (0.25mm×0.25mm×100m) و دستگاه گاز کروماتوگرافی ساخت شرکت واریان مدل 3800 جداسازی شدند. از آشکار ساز یونیزاسیون شعله‌ای (FID) و گاز حامل، نیتروژن (N_2) با جریان 3/3 میلی‌لیتر بر دقیقه استفاده شد. دمای آشکار ساز275°C، دمای تزریق 220°C و نسبت تقسیم 52: 1 تعیین گردید. دمای آون در 50°C با نرخ دقیقه /10°C افزایش یافته و به 150°C رسید وبه مدت 3 دقیقه این دما حفظ شد. پس از آن دما با نرخ دقیقه/10°C افزایش یافته تا به دمای نهایی 230°C برسد و در نهایت به مدت 5 دقیقه این دما حفظ شد. نمونه‌ای از کروماتوگرام به دست آمده در این تحقیق در شکل 1 نشان داده شده است. فشار در بالای ستون معادل 22psi تعیین گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

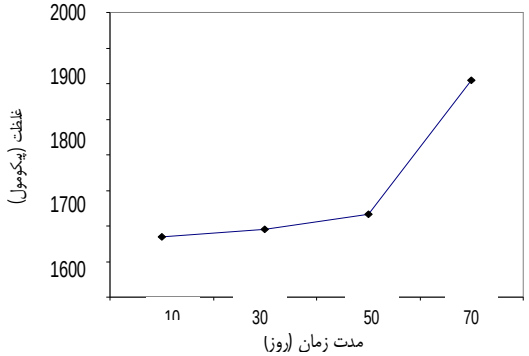
طرح مورد نظر در قالب فاکتوریل بر پایه کاملا تصادفی با 3تکرار انجام پذیرفت. برای تجزیه و تحلیل و انجام آنالیز واریانس داده ها از نرم‌افزار Minitab ver 13.1 با سطح اطمینان 95% و مقایسه میانگین‌ها از نرم‌افزارMstatc وآزمون چنددامنه ای دانکن استفاده شد. برازش خطوط و ترسیم منحنی‌ها نیز با استفاده از نرم‌افزارهای Slide Write و Excel 2007 انجام شد.

1 -FAME (Fatty Acid Methyl ster)

نتایج و بحث

پروفیل اسیدهای آمینه

در شکل1 میزان تغییرات کمی اسیدهای آمینه در طول دوره رسیدگی پنیر کردی، قابل مشاهده است، نتایج بیانگر تأثیر معنی دار زمان رسیدگی بر پروفیل آمینواسید بود($p<0.05$). نتایج پژوهش با نتایج Freitas و همکاران (1997)، مطابقت داشت. نامبردگان، تأثیر نوع شیر اولیه و زمان رسیدگی را بر تنوع فراکسیون های آمینواسید پنیر بررسی نمودند؛ نتایج حاکی از تأثیر بیشتر زمان رسیدگی بر پروفیل آمینواسید بود. نامبردگان هم چنین میزان کمی آمینواسید کل را در پنیر تولیدی از شیر گاو بیشتر از شیر میش گزارش نمودند. زمان دوره رسیدگی متأثر از کیفیت شیر خام، روش فرآوری پنیر و درجه حرارت محیط رسیدگی می‌باشد(Pino *et al*.,2009).



شکل 1- میزان تغییرات کمی اسیدهای آمینه در طول دوره رسیدگی پنیر کردی

در جدول1 پروفیل تغییرات اسیدهای آمینه آزاد (بر حسب پیکومول) در طول دوره رسیدگی پنیرمحلی کردی نشان داده شده است؛ بر این اساس در شروع دوره رسیدگی نمونه های پنیر کردی (10روز)، بیشترین میزان اسیدهای آمینه به ترتیب شامل پرولین(447/143)، آلفاآمینوبوتیریک اسید(188/912)، گلایسین(170/752)، لوسین(130/952)و متیونین (129/776) بود. اما در پنیر 70 روزه میزان اسیدهای آمینه به ترتیب غلظت شامل پرولین(620/787)، آلفاآمینوبوتیریک اسید(229/011)، گلایسین(207/350)، لوسین(185/091)و متیونین(177/515) بود. ویژگی منحصر به فرد آمینواسید هر نوع پنیر، متأثر از فعالیت آنزیمی و همچنین تغییرات داخلی آمینواسید و تجزیه آنهاست.

تفاوت در غلظت آمینواسیدها در پنیر به روش تولید (نوع دلمه، آغازگر، افزودن آنزیم پروتئیناز)، فعالیت باکتریایی، pH، غلظت نمک، مدت زمان و شرایط رسیدگی، میزان و نوع پروتئولیز ارتباط دارد. در اثر فرایند حرارتی شیر، آنزیم گلوتامیناز دناتوره شده و فعالیت آنها جهت تجزیه و تخریب اسیدآمینه متوقف می‌شود.

جدول1- پروفیل تغییرات اسیدهای آمینه آزاد (بر حسب پیکومول PMOL) در طول دوره رسیدگی پنیرمحلی کردی

اسید آمینه	زمان رسیدن (روز)			
(درصد)	۱۰	۳۰	۵۰	۷۰
گلوتامیک	<۱۰	<۱۰	۱۲/۶۱±۰/۰۹^{b}	۱۸/۴۹±۰/۱^{a}
آلانین	<۱۰	<۱۰	<۱۰	<۱۰
گلایسین	۱۷۰/۷۵±۰/۱^{c}	۲۰۴/۹۳±۰/۴^{ab}	۲۰۵/۱۴±۰/۳^{a}	۲۰۷/۳۵±۰/۵^{a}
فنیل آلانین	۵۵/۰۳±۰/۱^{bc}	۵۸/۵۴±۰/۴ ^{b}	۵۹/۰۲±۰/۸^{b}	۷۴/۱۲±۰/۰^{a}
پرولین	۴۴۷/۱۴±۰/۱^{c}	۴۴۹/۴۶±۱/۳^{bc}	۴۵۰/۳۹±۰/۹^{bc}	۶۲۰/۷۸±۱/۰^{a}
سیستئین	<۱۰	<۱۰	<۱۰	<۱۰
تیروزین	۳۰/۶۹±۰/۱^{c}	۳۶/۰±۰/۲^{b}	۳۶/۱۶±۰/۹^{b}	۵۰/۸۱±۰/۳^{a}
والین	<۱۰	<۱۰	<۱۰	<۱۰
متیونین	۱۲۹/۷۷±۰/۶^{c}	۱۳۲/۵۶±۰/۷ ^{b}	۱۳۳/۴۶±۰/۵^{b}	۱۷۷/۵۱±۰/۱^{a}
لیزین	۲۹/۷۲±۰/۲^{bc}	۳۴/۰۱±۰/۲^{b}	۳۵/۲۸±۰/۱^{b}	۴۹/۸۵±۰/۹^{a}
لوسین	۱۳۰/۹۵±۰/۷^{c}	۱۳۶/۴۰±۰/۳^{b}	۱۳۷/۷۸±۰/۴^{b}	۱۸۵/۰۹±۰/۵^{a}
ایزولوسین	۳۸/۳۰±۰/۰۴^{c}	۴۹/۱۰±۰/۳۶^{b}	۴۹/۸۶ ±۰/۸^{b}	۶۵/۶۳±۰/۳^{a}
آلفاآمینو بوتیریک	۱۸۸/۹۱±۰/۸^{c}	۲۱۵/۹۳±۰/۸^{b}	۲۱۷/۴۵±۰/۱^{b}	۲۲۹/۰۱±۰/۵^{a}
آرژنین	۷۱/۸۸±۰/۱^{bc}	۸۶/۱۷±۰/۴^{b}	۸۶/۶۴±۰/۳^{b}	۱۰۰/۶۴±۱/۲^{a}
ترئونین	۵۸/۹۰±۰/۲^{c}	۷۲/۸۴±۰/۱^{bc}	۷۳/۰۶±۰/۷^{b}	۸۵/۶۹±۰/۲^{a}
آسپارژین	<۱۰	<۱۰	۱۳/۸۳±۰/۴^{b}	۱۹/۷۷±۰/۱^{a}

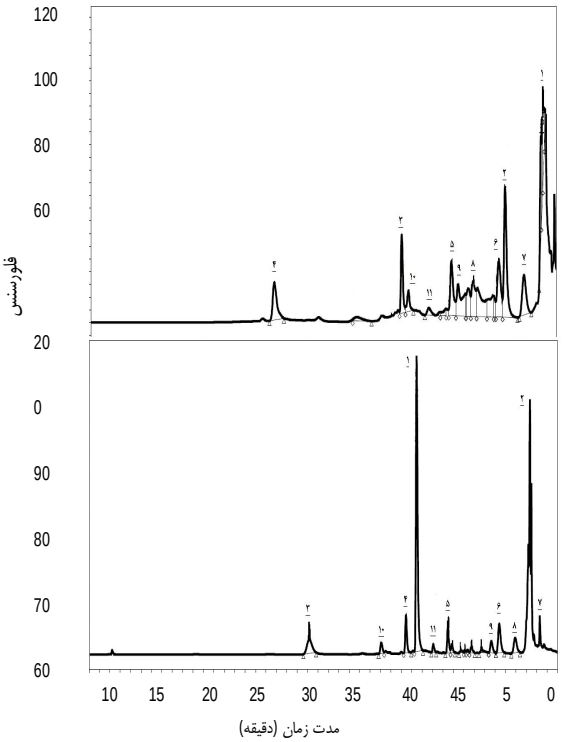
* در هر ردیف میانگین هایی (میانگین سه تکرار) که دارای حروف مشترک هستندتفاوت معنی داری در سطح 5% با هم ندارند

سایر محققین نیز میزان بالاتر اسید گلوتامیک را در پنیر تهیه شده از شیر پاستوریزه در مقایسه با پنیر حاصل از شیر خام گزارش نمودند(Nhuch، 2008). در حالیکه فعالیت آبی، دمای نگهداری و مدت زمان رسیدگی تأثیر غیر مستقیمی در تشکیل آمین دارند(Subramanian، 2011). در شکل2 (الف و ب)، نمونه ای از کروماتوگرام اسیدهای آمینه مربوط به پنیر تازه و رسیده قابل مشاهده است. نتایج تحقیق مشابه گزارش Pino و همکاران(2009) و Subramanian و همکاران (2011) بود؛ نامبردگان در شروع دوره رسیدگی پنیر چدار، اسیدهای آمینه پرولین، لوسین، لیزین و گلوتامیک را به ترتیب غلظت گزارش نمودند و در پنیر 73روزه نیز میزان آلانین، گلایسین، پرولین، لیزین، آسپارژین، والین، اسید گلوتامیک و لوسین بیشترین بود. در شروع دوره رسیدگی پنیر ماهو، تجزیه کازئین، سبب افزایش غلظت لوسین، والین و فنیل آلانین گردید(Frou *et al.*,1997 وTavaria *et al.*, 2003)، در مطالعه خود بر روی پنیر سراوا مشاهده نمودند در انتهای زمان رسیدگی پنیر، اسیدهای آمینه گلوتامیک، والین، لوسین و لیزین تقریباً 70%ـ56 از کل آمینواسیدها را تشکیل دادند. در پژوهشTarakci(2009)، مهمترین آمینواسید در پنیر رسیده 60 روزه به ترتیب غلظت شامل تریپتوفان، تیروزین، لیزین و ایزولوسین بودند. همچنین، Dallarosa و همکاران (2008)، در پنیر 60 روزه به ترتیب غلظت، اسیدهای آمینه گلوتامیک، لیزین، آلانین، لوسین و آسپارژین و آرژنین را گزارش نمودند. مقادیر کل اسیدآمینه گزارش شده توسط Izcoو همکاران (2000)، Tavaria و همکاران (2003)، Tarakci(2009)، Pino و همکاران (2009) بیشتر از نتایج این پژوهش بود؛ امPappa (2009)،در مطالعه خود بر روی پنیر تلمه مقادیر پایین‌تر آمینواسید را گزارش نمود. مطابق گزارشTuncturk (2002)، در پنیرهایی که توسط نمک زنی خشک تهیه می‌شوند پدیده پروتئولیز بیشتر از پنیر آب نمکی نظیر پنیر کردی و لیقوان است؛ این پدیده بواسطهٔ مهاجرت بیشتر ترکیبات نیتروژنی به داخل آب نمک قابل توجیه است. غلظت نیتروژن محلول در آب، در طول دوره رسیدگی درون آب نمک افزایش می‌یابد.

پروفیل اسیدهای چرب بلند زنجیر

اسیدهای چرب بلند زنجیر C_{14}-C_{20}بواسطه آستانه حسی بالای خود نقش کمتری در عطر پنیر دارند(Molimard، 1996)، با این

حال، بعنوان ملکول های پیشرو برای مجموعه ای از واکنش های متابولیک منجر به تولید ترکیبات مولد عطرو طعم نظیر متیل کتون ها، لاکتون ها، استرها، آلکان ها و الکل های ثانویه در فرآورده می شوند(Mcsweeny، 2000). در شکل2 میزان تغییرات کمی اسیدهای چرب بلند زنجیر در طول دوره رسیدگی پنیر کردی، قابل مشاهده است، مطابق نتایج غلظت کل اسیدچرب بطور معنی‌داری در طول دوره رسیدگی3 نمونه بچ پنیر افزایش یافت ($p<0.05$).



شکل2- نمونه ای از کروماتوگرام اسیدهای آمینه مربوط به پنیرکردی تازه 30روزه ((الف) و رسیده 70روزه (ب)

راهنمای شکل: پرولین (1)، آلفاآمینوبوتیریک اسید (2)، گلایسین (3)، لوسین (4)، متیونین (5)، آرژنین(6)، ترئونین(7)، فنیل آلانین (8)، ایزولوسین (9)، تیروزین(10)، لیزین(11)

نتایج پژوهش اخیر، مشابه نتایج موسوی پورو همکاران(1388)، Mallatou (2003)، Atasoy(2008) بود. درصد تغییرات اسیدهای چرب بلند زنجیر طی دوران رسانیدن پنیر کردی ایرانی به صورت اسید مریسیتیک، پالمیتیک، پالمیتواولئیک، مارگاریک، استئاریک، اولئیک، لینولئیک، لینولنیک و ایکوزا پنتانوئیک اسید[1](EPA) در جدول 2 قابل مشاهده است. بر این اساس در روزهای نخست دوره رسیدگی، اسیدهای چرب اولئیک (29/15%)، پالمیتواولئیک (28/985%)و استئاریک(11/07%) به ترتیب بالاترین میزان اسید چرب بلندزنجیر پنیر کردی را شامل بودند و در پنیر رسیده 70 روزه نیز به ترتیب اسید های چرب اولئیک (31%)، پالمیتواولئیک (31/11%)، استئاریک (15/206%) و پالمتیک (10/78) بالاترین مقادیر را به خود اختصاص دادند. با افزایش زمان، میزان اسیدهای چرب تک و چند غیر اشباعی در مقایسه با اسید چرب اشباعی افزایش یافت.افزون بر مطالب اخیر، میزان 2 اسید چرب ضروری اسید لینولئیک ($C_{18:2}$) و آلفا اسید لینولنیک ($C_{18:3}$) در پنیر رسیده کردی قابل توجه بود؛ انواع اسیدهای چرب ضروری قابل سنتز در بدن انسان و حیوان نبوده و با مصرف مواد غذایی دریافت می شوند (Zhangّ، 2006). به همین طریق طی زمان رسانیدن پنیر اورفا[2] نیز درصد اسیدهای چرب تک غیر اشباعی از 18/65% در روز سوم تا26/92% درروز شصتم و چند غیر اشباعی از 2/4 تا 2/9% در همین فاصله زمانی افزایش یافت (Atasoy، 2008). نتایج تحقیق اخیر، مشابه گزارش Ayar(2002)، Mallatou (2003)، Atasoy(2008)، Atasoy(2009) و کرمی و همکاران(1388) بود؛ براین اساس، در شروع دوره رسیدگی پنیرو همچنین در پنیر رسیده 60 روزه، در میان اسیدهای چرب بلند زنجیربه ترتیب اسید پالمتیک، اولئیک و مریستیک در حد بیشینه بودند. بطور کلی میزان اسیدهای چرب بلند زنجیر در جریان دوره رسیدگی بیشتر از انواع کوتاه و متوسط زنجیر بود. در شکل3- نمونه ای از کروماتوگرام مربوط به پروفیل اسیدهای چرب بلند زنجیرپنیر کردی، قابل مشاهده است.

جدول2- پروفیل تغییرات اسیدهای چرب آزاد(بر حسب درصد) در طول دوره رسیدگی پنیرمحلی کردی* (میانگین سه تکرار)

اسید چرب	زمان رسیدن (روز) ۱۰	۳۰	۵۰	۷۰
C14:0	۲/۱۲۲± ۰/۱^{d}	۳/۰۵± ۰/۲^{c}	۴/۱۵۲±۱/۲^{b}	۵/۹۰۳±۰/۲^{a}
C16:0	۱/۶۶۹±۰/۲^{d}	۱/۸۸۸±۰/۱^{c}	۸/۱۵۲±۰/۶^{b}	۱۰/۷۸±۳/۱^{a}
C16:1	۲۸/۹۸۵±۰/۴^{c}	۲۸/۵۷۷±۰/۱^{b}	۳۰/۵۳۶±۱/۳^{ab}	۳۱/۱۱±۰/۸^{a}
C17:0	۱/۹۶۸±۱/۱^{b}	۱/۸۱۹± ۰/۵^{b}	۲/۰۳۶±۰/۱۲^{b}	۲/۷۹۰±۰/۵^{a}
C17:1	۰/۹۸±۰/۸۹^{b}	۱/۱۱±۰/۴^{b}	۱/۹۴۱± ۱/۶^{a}	۲/۱۵۸±۰/۶۸^{a}
C18:0	۱۱/۰۷±۰/۲^{d}	۱۳/۴۱±۰/۵^{c}	۱۴/۳۶۲±۲/۲^{b}	۱۵/۲۰۶±۰/۳^{a}
C18:1	۲۹/۱۵±۰/۶^{c}	۲۹/۸۲±۰/۶^{b}	۳۰/۱۱۵±۰/۶۳^{b}	۳۰/۹۹۹±۰/۱^{a}
C18:2	۲/۷۱±۰/۷^{d}	۳/۰۴±۰/۷^{c}	۳/۶۶۳±۰/۰۲^{b}	۳/۸۹۲±۰/۰۲^{a}
C18:3	۰/۴۶۲±۰/۴^{c}	۰/۷۳۳±۰/۸^{b}	۰/۹۷۰±۰/۰۶^{a}	۱/۱± ۱/۴^{a}
C20:5 (EPA)	۰/۷۶۳±۰/۳^{c}	۰/۹۰۱±۰/۲^{bc}	۰/۹۸± ۰/۷۰^{b}	۱/۰۷۳±۰/۵^{ab}

* در هر ردیف میانگین هایی که دارای حروف مشترک هستند، تفاوت معنی داری در سطح 5% با هم ندارند.

1- Eicosapentaenoic acid (Omega-3

2 -Urfa

زمردی و همکاران (1389)، تاثیر لاکتوباسیلوس کازئی را به عنوان آغازگر الحاقی بر روند پروتئولیز و لیپولیز پنیر فراپالایش بررسی نمودند، در این پژوهش مقدار اسید آمینه تیروزین به عنوان انديس پروتئولیز ثانویه در طول دوره رسیدگی 60 روزه افزایش یافت. همچنین میزان اسید چرب آزاد پنیر از 3/67 تا 8/92 میلی اکی والان در 100 گرم چربی پنیر افزایش یافت.

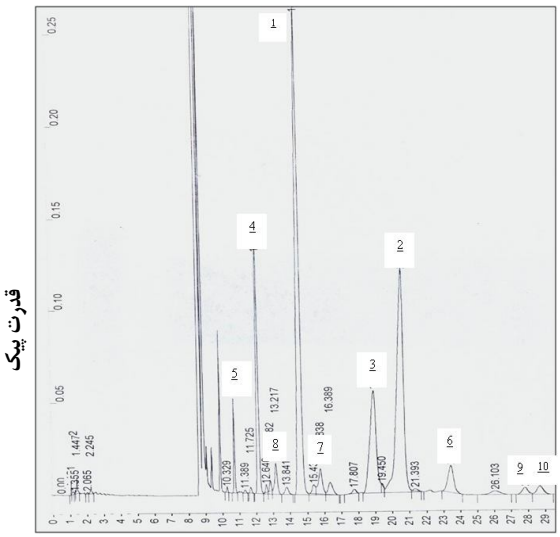
مقادیر کل اسیدآمینو گزارش شده توسطIzco (2003) زمردی و همکاران (1388)، Atasoy(2008)، Atasoy (2009)، بیشتر از نتایج این پژوهش بود. اما کرمی (1388)، در مطالعه خود بر روی پنیرفتای فراپالایش مقادیر پایین‌تر اسید چرب بلند زنجیررا گزارش نمود. از عوامل مهم دخیل در میزان اسید چرب آزاد شامل نوع و کیفیت شیر خام، فرایند حرارتی، دما و زمان نگهداری، غلظت نمک و لیپاز شیر و لیپاز حاصل از رنت می باشد(Delgado، 2009).

بر این اساس، میزان اسید چرب کل در پنیر حاصل از شیر گوسفندی کمتر از پنیر حاصل از شیر گاو می باشد؛ دلیل این پدیده به واسطه توزیع بیشتر لیپوپروتئین لیپاز شیر گوسفندی داخل سرم شیر است و تنها بخش ناچیزی با مسیل کازئین، اتصال می یابد. هم‌چنین برهمکنش کازئین با لیپاز داخلی در شیر گاو بیشتر از شیر گوسفند می‌باشد(Guler،2004 و Tarakci، 2009).

از آنجا که بیشتر لیپاز طبیعی شیر در فرآیند حرارتی، غیرفعال می شود، حضور اسیدهای چرب در فراورده می‌تواند به عنوان شاخصی از فعالیت لیپولیتیکی ریز زنده‌های آغازگر، آنزیم‌هایی با منشأ میکروبی، مانند استرازهای باکتری‌های اسید لاکتیک یا لیپاز مقاوم به حرارت باکتری‌های سرماگرا، مانند سودوموناس‌ها، باشد؛ این آنزیم‌ها دارای عمل اختصاصی بر روی منو و دی گلیسریدهایی هستند که در مراحل اولیه پنیرسازی توسط لیپو پروتئین لیپاز یا آنزیم‌های چربی‌شکن دیگر تولید می‌شوند(Meyers *et al*., 1996،Collins *et al*., 2003). رابطه مستقیمی بین یک گونه آغازگراتولیز شونده و تولید اسید چرب در پنیر چدار گزارش شده است، افزون بر مطلب اخیر، باکتری‌های اسید لاکتیک غیر آغازگر (NSLAB) استرازهایی تولید می‌کنند که به طور اختصاصی در آزادسازی اسیدهای چرب دخالت می‌کنند(Shakeel *et al*.,2000). احتمالا لیپاز و استراز باکتری‌های اسیدلاکتیک، ترکیبات چربی شکن اصلی در پنیرهای چدار و هلندی ساخته شده از شیر پاستوریزه می باشند (Fox *et al*.,2000).

کاهش میزان لیپولیز و اسیدهای چرب آزاد در پنیرکردی متاثر از pH فراورده، دمای پایین دوره رسیدگی و نگهداری در محلول نمکی بود (Atasoy *et al*.,2000) ؛ در سایر پژوهش ها نیز به اثر ممانعت کنندگی نمک و درجه حرارت بر فعالیت لیپولتیک اشاره شده است(Azarinia، 1997 وMallatou، 2003). به عنوان مثال لیپولیز در پنیر آب نمکی نگهداری شده در دمای 5 درجه سانتی گراد کمتر از پنیر انبار شده در دمای 10درجه سانتی گراد بود (Abd El salam، 1993). سایر محققین نیز اثر ممانعت کنندگی نمک و pH را بر فعالیت لیپوپروتئین لیپاز گزارش نمودند(Guamis، 2000).

pH بهینه برای فعالیت آنزیم لیپاز داخلی شیر حدود 9 می‌باشد(Fox، 1994)؛ مطابق گزارش Vloemynck (1992) فعالیت لیپاز شیر در pH3/5 حدود 85%ـ80 کاهش می‌یابد. با این حال اغلب آنزیم‌های لیپولتیک تولیدی توسط باکتریهای اسیدلاکتیک دارای بیشترین فعالیت در محدوده pH خنثی می‌باشند. براین اساس، pH پنیر کردی در طول دوره رسیدگی در محدوده 5 بود و شرایط مذکور سبب ممانعت فعالیت لیپاز باکتریایی در طول دوره رسیدگی گردید(Pavia، 2000).



شکل3- نمونه ای از کروماتوگرام اسیدهای چرب بلندزنجیر پنیرمحلی کردی با استفاده از روش گازکروماتوگرافی
C16:1 (1) ، C14:0 (6)، C16:0 (5)، C18:0 (4)، C18:1 (3)، C18:3 (2)، C17:1 (9)، C17:0 (8)، C18:2 (7)، C20:5 (10)

نتیجه گیری

فرایند پروتئولیزو لیپولیز نقش حیاتی در تعیین ویژگی‌های بارز حسی پنیر داشته و بیانگر شاخص کیفی پنیر می باشند. هر نوع پنیر، دارای ویژگی منحصر به فرد آمینواسید خود بوده که متأثر از فعالیت آنزیمی و همچنین تغییرات داخلی آمینواسید و تجزیه آنهاست. مطابق نتایج به دست آمده، مهمترین آمینواسید در پنیر رسیده70 روزه شامل پرولین، آلانین، آسپارژین، لوسین، گلایسین، متیونین، ایزولوسین، فنیل آلانین بود. همچنین اسید اولئیک و پالمتیک مهمترین اسید

چرب آزاد در پنیر رسیده70 روزه بود. اسیدهای چرب آزاد رها شده توسط فرایند لیپولیزویا متابولیسم کربوهیدرات ها و آمینواسیدها توسط باکتریها، مستقیماً در توسعه طعم پنیر مؤثرند، به ویژه زمانی که نوعی توازن مناسب میان فرآورده‌های پروتئولیز و لیپولیز و سایر واکنش‌ها در پنیر موجود باشد. از این رو می توان دریافت؛ عطر و طعم پنیر ارتباط نزدیکی با اسیدیته، میزان چربی در ماده خشک و مقدار آمینواسید و اسید چرب آزاد دارد. عطر و طعم منحصر به فرد پنیرهای سفید نظیر پنیر کردی ناشی از میزان نمک و اسیدیته بالای آن است که سبب محدودیت پیشرفت فرایندهای لیپولیز وپروتئولیز در بروز عطروطعم نامطلوب فرآورده نهایی می گردد. این تحقیق نشان داد، در مراحل انتهای دوره رسیدگی پنیر کردی، پیشرفت لیپولیز و پروتئولیز بسیار سریع تر از مراحل اولیه بود.

تشکر و قدردانی

نگارندگان مقاله مراتب سپاس خود را از همکاری آزمایشگاه گروه علوم دامی و بویژه سرکار خانم مهندس طباطبایی بدلیل همکاری مجدانه در اجرای این پروژه تشکر و قدردانی می نمایند.

منابع

زمردی، ش.، خسروشاهی اصل، الف.، رضوی روحانی، م.، تاجیک، ح.، میرآقایی، س.، 1389، تاثیر لاکتوباسیلوسکازئی به عنوان مایه کشت الحاقی به دو صورت آزاد و کپسوله بر الگوی پروتئولیز و لیپولیز در پنیر سفید ایرانی فراپالایش. مجله پژوهشهای صنایع غذایی. دوره 20 شماره 1. صفحات 117-133

کرمی، م.، احسانی، م.، ابراهیم زاده موسوی، م. ع.، رضایی، ک.، صفری، م.، 1388، تاثیر مدت زمان رسسیدن بر پروفیل اسیدهای چرب، ریز ساختار و خواص حسی پنیرUF فتا. مجله مهندسی بیوسیستم ایران. دوره40شماره 1. صفحات 101-110

موسوی پور، ف.، برازجانی ، م. وحسامی راد، ر.، 1388، بررسی تاثیر منطقه تولید وزمان نگهداری برتغییرات ماده خشک، چربی و اسیدهای چرب پنیرکوزه ای آذربایجان غربی. مجله پژوهشهای علوم دامی کشور. شماره3. صفحات 49-55.

Abd El-Salam, M. H., Alichanidis, E., and Zerfiridis, G. K. 1993. Domiati and feta type cheese. In P. F. Fox (Ed.), Cheese: Chemistry, physics and microbiology Applied Science. London, 301–335.

Akin, N., Aydemir, S., Kocak, C., and Yildiz, M. A. 2003. Changes of free fatty acid content and sensory properties of white pickled cheese during ripening. Food Chemistry, 80: 77–83

Alonso, M.L., Álvarez, M.I. and Zapico, J. 1994. Rapid analysis of free amino acids in infant foods. J. Liquid Chromatog. 17: 4019-4030.

Atasoy, A. F., and Turkog˘lu, H. 2008. Changes of composition and free fatty acid content of Urfa cheeses (a white brined Turkish cheese) during ripening: Effects of heat treatments and starter cultures. Food Chemistry, 110: 598–604.

Atasoy, A. F., and Turkog˘lu, H. 2009. Lipolysis in Urfa cheese produced from raw and pasteurized goats' and cows' milk with mesophilic or thermophilic cultures during ripening. Food Chemistry 115: 71–78

Ayar, A. 2002. Effect of some herb essential oils on lipolysis in white cheese. Journal of Food Lipids. 9: 225–237.

Azarnia, S., Ehsani, M. R., and Mirhadi, S. A. 1997. Evaluation of the physico-chemical characteristics of the curd during the ripening of Iranian brine cheese. International Dairy Journal, 7: 473–478.

Collins, Y. F., McSweeney, P. L. H., and Wilkinson, M. G. 2003. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: A review of current knowledge. International Dairy Journal, 13: 841–866.

Dallarosa, T., Wassermann, E. 2008. Microbiological and physicochemical characteristics and aminopeptidase activities during ripening of Serrano cheese. International Journal of Dairy Technology. 61 (1): 70-79

Driessen, F.M. 1989. Heat inactivation of lipases and proteinases (indigenous and bacterial). In F.M. Driessen (Ed.), Heat induced changes in milk, Brussels: International Dairy Federation.(Bulletin 238). 71–93.

Fox, P. F. 2000. Influence of ripening temperature on the volatiles profile and flavour of Cheddar cheese made from raw or pasteurized milk. International Dairy Journal, 10: 55 65.

Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., and McSweeney, P. L. H. 2000. Fundamentals of cheese science. Gaithersberg, MD: Aspen Publishers.

Fox, P. F., Lucey, J. A., and Cogan, T. M. 1994. Glycolysis and related reactions during cheese manufacture and ripening. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 29: 237–253.

Freitas, A. C., and Malcata, F. X. 1998. Lipolysis in Picante cheese: Influence of milk type and ripening time on free fatty acid profile. Lait, 78: 251–258.

Freitas, A. C., Pintado, A. E., Pintado, M. E., and Malcata, F. X. 1999. Role of dominant microflora of Picante cheese on proteolysis and lipolysis. International Dairy Journal, 9: 255–263.

Garcia-Lopez, S., Echeverria, E., Tsui, I., and Balch, B. 1994. Changes in the content of conjugated linoleic acid (CLA) in processed cheese during processing. Food Research International, 27: 61–64.

Guler, Z and Uraz, T. 2004. Relationships between proteolytic and lipolytic activity and sensory properties (taste–

odour) of traditional Turkish white cheese, International Journal of Dairy Technology. 57(4): 237-242

Izco, J.M., Irigoyen, A., Torre, P. and Barcina, Y. 2000. Effect of the activity levels of the added proteolytic enzyme mixture on free amino acids in ripening Ossau-Iraty cheese. Journal Chromatography, 881: 69–79.

Katsiari, M. C., Kondyli, E., and Voutsinas, L. P. 2009. The quality of Galotyri-type cheese made with different starter cultures. Food Control, 20: 113–118.

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.

Mallatou, H., Pappa, E., and Massouras, T. 2003. Changes in free fatty acids during ripening of Teleme cheese made with ewes', goats', cows' or a mixture of ewes' and goats' milk. International Dairy Journal, 13: 211–219.

McSweeney, P. L. H., and Sousa, M. J. 2000. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheese during ripening. A review. Lait, 80: 293–324.

McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Lucey, J. A., Jordan, K. N., and Cogan, T. M. 1993. Contribution of the indigenous microflora to the maturation of Cheddar cheese. International Dairy Journal, 3: 613–634.

Meyers, S. A., Cuppett, S. L., and Hutkins, R. W. 1996. Lipase production by lactic acid bacteria and activity on butter oil. Food Microbiology, 13(5): 383–389.

Molimard, P., and Spinnler, H. E. 1996. Review: Compounds involved in the flavour of surface mould-ripened cheeses: Origins and properties. Journal of Dairy Science, 79: 169–184.

Nhuch, E. Prieto, B Franco, I Bernardo, A and Carballo, J. 2008. Biochemical changes during the ripening of San Simón da Costa cheese (PDO) manufactured from pasteurised milk, The Australian Journal of Dairy Technology. 63(2): 68-76

Pappa, E.C. and Sotirakoglou, K. 2008. Changes of free amino acid content of Teleme cheese made with different types of milk and culture. Food Chemistry, 111: 606–615.

Pino, A., Prados, F Galan, E Vivo, R and Salguero, J .2009. Amino acids evolution during ripening of goats' milk cheese manufactured with different coagulants. International Journal of Food Science and Technology, 44: 2062–2069

Sengul M, Gurses M, Dervisoglu M and Yazici F .2006. A survey on the some chemical and biochemical properties of civil cheese, a traditional Turkish cheese. International Journal of Food properties 9:791–801.

Shakeel-Ur-Rehman, Banks, J. M., Brechany, E. Y., Muir, D. D., McSweeney, P. L. H., and Fox, P. F. 2000. Influence of ripening temperature on the volatiles profile and flavour of Cheddar cheese made from raw or pasteurized milk. International Dairy Journal, 10(1–2): 55–65.

Subramanian, Anand., Alvarez, Valente,. James Harper, W., Luis E. Rodriguez-Saona. 2011. Monitoring amino acids, organic acids, and ripening changes in Cheddar cheese using Fourier-transform infrared spectroscopy. International Dairy Journal 21:434-440

Sukhija, P. S., and Palmquist, D. L. 1988. Rapid method for determination of total fatty acid content and composition of feedstuffs and feces. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 36: 1202–1206.

Tarakci, Z., Temiz, H. 2009. A review of the chemical, biochemical and antimicrobial aspects of Turkish Otlu (herby) cheese. International Journal of Dairy Technology. 62(3): 354- 360

Tavaria, F.K., Franco, I., Carballo, F.J. and Malcata, F.X. 2003. Amino acid and soluble nitrogen evolution throughout ripening of Serra da Estrela cheese. International Dairy Journal, 13: 537–545.

Temiz, H., Tarakci, Z., Ykut, U and Turhan, S. 2008. The fatty acid levels and physicochemical properties of herby brined cheese, a traditional Turkish cheese. International Journal of Dairy Technology. 62: 56-62

Tuncturk Y and Coskun H .2002. The effects of production and ripening methods on some properties of the herby cheese Otlu Peynir. Milchwissenchaft 57: 638–640.

Urbach, G. 1993. Relations between cheese flavour and chemical composition. International Dairy Journal, 3: 389-422.

Vlaemynck, G. 1992. Study of lipolytic activity of the lipoprotein lipase in lunch cheese of Gouda type. Milchwissenschaft, 47: 164–167.

Zhang, R. H., Mustafa, A. F., Ng-Kwai-Hang, K. F., and Zhao, X. 2006. Effects of freezing on composition and fatty acid profiles of sheep milk and cheese. Small Ruminant Research, 64: 203–210