Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Food Processing and Preservation

Print ISSN: 2423-3544
Online ISSN: 2423-3803

Iranian Association of Food Scientists and Technologists

Impact of Animal Lipase Enzymes on Development of Lipolysis in Iranian-White Brined Cheese during Storage Period

Hossein Jooyandeh[1]*, Mohammad Hojjati[1]

[1] Professor, Department of Food Science and Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran, Email: hosjooy@asnrukh.ac.ir

Article Info

Article type:
Research Full Paper

Article history:
Received: 2022-07-06
Revised: 2022-08-14
Accepted: 2022-08-23

Keywords:
White Brined cheese
Kid lipase
Calf lipase
Acid Value
Microstructure

ABSTRACT

Background and objectives: Cheese ripening is a complicated process that involves the breakdown of cheese compounds via proteolysis, lipolysis and other enzyme catalysis which causes typical changes in cheese flavour characteristics. Lipolysis is one of the most important biochemical reactions in cheese that through formation of short- and middle-chain fatty acids and finally converting them to flavour compounds such as methyl ketones, lactones, secondary alcohols, aldehydes and thioesters. Lipolysis plays an important role in cheese flavour and it also accelerates cheese ripening. Consequently, in order to increase cheese lipolysis in some cheese varieties, commercial lipases (of animal and microbial origins) is used. However, excessive levels of lipolysis may cause undesirable effects in cheese flavour, resulting in cheese rancidity. There is scarce investigation regarding to application of lipase enzymes (particularly animal lipases) in White Brined cheese. Therefore, this research was performed to evaluate the effect of calf and kid lipases on development of lipolysis in Iranian-White Brined cheese and to determine the best kind (calf or kid lipase) and appropriate levels of enzyme to produce a cheese with an acceptable quality.

Materials and methods: In this research, Iranian-white brined cheese samples were produced from fresh cow milk via enzymatic (rennet cheese) procedure according to conventional method of cheese making in Iran. After standardization of milk fat to 3%, applying homogenization and pasteurization to it, the milk was cold to 35 ˚C and the calf or kid lipases were added to the milk at levels of 0 (control sample), 1.5, 3, 4.5 and 6 g/100 Kg of milk before renneting stage. The extent of free fatty acids/lipolysis (acid value, AV) and sensory scores (odour, colour, taste and texture) of Iranian-White Brined cheese samples were measured during 90 days of the storage (1, 7, 14 and 21 days) at refrigerator and free fatty acid profile (FAP) analysis and microstructure assessment of cheese samples were measured at the end of 90 days of the cold storage. Analysis of fatty acid composition was carried out by gas chromatography with flame ionization detector.

Results: The results showed that increasing the amount of lipase

concentrations and storage time significantly caused an increase in cheese lipolysis ($p<0.01$). Kid lipase introduced more changes in the experimental parameters e.g, Fatty Acid Profile (FAP) and ADV, although it had no significant effect on sensory attributes of the cheese samples ($p>0.05$). Furthermore, based on FAP results, an increase in enzyme concentration produced a higher low-, medium-, long-chain and total free fatty acids (TFFA) ($p<0.01$). Even though this increase was more obvious for low-chain fatty acids. Among different treatments, control sample with 132.91 g/100 Kg TFFA had the lowest and cheese sample containing 6 g kid lipase with 309.51 g/100 Kg had the highest TFFA at end of the 90-day storage period. Sensory evaluation also showed that samples having lipase enzymes had higher mean sensory scores in terms of odour, taste and texture while compared to control samples (without lipase enzyme) ($p<0.001$). Microstructure results of White Brined cheese samples showed that by enzymatic treatment, an extensive lipolysis had occurred which subsequently caused a significant reduction in number and size of fat globules in the cheese structure. These changes, due to formation of new cross-linkages between caseins and casein network rearrangement, results in a condensed texture and an increase in cheese hardness.

Conclusion: According to the results, by using 4.5 g lipase enzyme (kid or calf, per 100 Kg of milk), |White Brined cheese with improved sensory characteristics could be produced. According to sensory results, no significant differences were found between two lipase enzymes, i.e. kid or calf lipases.

Cite this article: Jooyandeh, H., Hojjati, M. 2022. Impact of Animal Lipase Enzymes on Development of Lipolysis in Iranian-White Brined Cheese during Storage Period. *Food Processing and Preservation Journal*, 14 (4), 37-54.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/FPPJ.2022.20401.1707
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

فرآوری و نگهداری مواد غذایی
شاپا چاپی: ۳۵٤٤-۲٤۲۳
شاپا الکترونیکی: ۳۸۰۳-۲٤۲۳

تأثیر به‌کارگیری آنزیم‌های لیپاز حیوانی بر توسعه لیپولیز پنیر سفید آب‌نمکی طی دوره نگهداری

حسین جوینده[1*]، محمد حجتی[1]

[1] استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، رایانامه: hosjooy@asnrukh.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی-پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱٤۰۱/۰٤/۱۵
تاریخ ویرایش: ۱٤۰۱/۰۵/۲۳
تاریخ پذیرش: ۱٤۰۱/۰٦/۰۱

واژه‌های کلیدی:
پنیر سفید آب‌نمک
لیپاز بزغاله
لیپاز گوساله
عدد اسیدی
ریزساختار

چکیده

سابقه و هدف: رسیدن پنیر، یک فرایند پیچیده مرتبط با شکسته شدن ترکیبات پنیر از طریق واکنش‌های پروتئولیز، لیپولیز و سایر واکنش‌های آنزیمی است که سبب تغییرات خاص در ویژگی‌های طعم پنیر می‌گردد. لیپولیز، یکی از مهم‌ترین واکنش‌های بیوشیمیایی در پنیر است که با ایجاد اسیدهای چرب آزاد کوتاه و متوسط زنجیره و در نهایت تبدیل آن‌ها به ترکیبات مولد طعم از قبیل متیل‌کتون‌ها، لاکتون‌ها، الکل‌های ثانویه، آلدئیدها و تیواسترها، نقش مهمی را در طعم پنیر و همچنین تسریع در رسیدن پنیر ایفا می‌کند. در نتیجه، برای افزایش لیپولیز در برخی انواع پنیر، از آنزیم‌های تجاری لیپاز (با منشأ میکروبی و حیوانی) استفاده می‌شود. در هر حال، توسعه بیش از اندازه لیپولیز می‌تواند موجب اثرات نامطلوب در طعم پنیر و رنسید شدن آن گردد. تحقیقات اندکی در زمینه کاربرد آنزیم‌های لیپاز (به‌ویژه لیپازهای حیوانی) در پنیر سفید آب‌نمکی وجود دارد. بنابراین، این تحقیق به منظور بررسی اثر لیپازهای بزغاله و گوساله بر میزان توسعه لیپولیز در پنیر سفید آب‌نمکی ایرانی و تعیین بهترین نوع و میزان آنزیم (بزغاله یا گوساله) جهت تولید پنیری با کیفیت مطلوب انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، نمونه‌های پنیر سفید آب‌نمکی مطابق روش متداول پنیرسازی در ایران از شیر تازه گاو به روش آنزیمی (پنیر رنتی) تولید شدند. پس از استاندارد کردن چربی شیر به ۳ درصد و هموژنیزاسیون و پاستوریزاسیون آن، دمای شیر به ۳۵ درجه سانتی‌گراد سرد گردید و آنزیم لیپاز بزغاله یا گوساله قبل از مرحله رنت‌زنی هرکدام در سطوح ۰ (شاهد)، ۱/۵، ۳، ٤/۵ و ٦ گرم به ازای هر ۱۰۰ کیلوگرم شیر اضافه شدند. میزان لیپولیز (عدد اسیدی) و امتیازهای حسی (رایحه، رنگ، مزه و بافت) نمونه‌های پنیر سفید ایرانی در مدت ۹۰ روز نگهداری (زمان ۱، ۷، ۱٤ و ۲۱ روز) در یخچال و آزمون پروفایل اسیدهای چرب آزاد و ریزساختار نمونه‌های پنیر در پایان مدت ۹۰ روز نگهداری سرد اندازه‌گیری شد آزمون پروفایل اسیدهای چرب پنیر توسط کروماتوگرافی گازی متصل به آشکارساز یونیزاسیون شعله‌ای انجام شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که افزایش غلظت آنزیم و مدت زمان نگهداری به‌طور معنی‌داری باعث افزایش لیپولیز گردید ($p<۰/۰۱$). هرچند لیپاز بزی سبب تغییرات بیشتری در ویژگی‌های مورد

بررسی نظیر عدد اسیدی و پروفایل اسیدهای چرب گردید، اما از نظر خواص حسی تفاوت معنی‌داری میان دو آنزیم مشاهده نگردید ($p>0/05$). همچنین براساس نتایج آنالیز پروفایل اسیدهای چرب، هرچند افزایش غلظت هر دو آنزیم لیپاز سبب افزایش مقدار اسیدهای چرب کوتاه، متوسط، بلند زنجیره و مقدار کل اسیدهای چرب پنیر گردید ($p<0/01$)، اما این افزایش در اسیدهای چرب کوتاه زنجیره مشهودتر بود. در میان تیمارهای مختلف پنیر، نمونه شاهد با ۱۳۲/۹۱ کمترین و نمونه تیمار شده با ٦ گرم آنزیم لیپاز بزی (به ازای ۱۰۰ کیلو شیر) با ۳۰۹/۵۱ گرم به ازای ۱۰۰ کیلو پنیر دارای بالاترین مقدار کل اسیدهای چرب آزاد در پایان ۹۰ روز نگهداری در یخچال بودند. ارزیابی حسی نیز نشان داد که نمونه‌های محتوی آنزیم‌های لیپاز از میانگین امتیاز حسی رایحه، طعم و بافت بیشتری نسبت به نمونه شاهد (فاقد آنزیم لیپاز) برخوردار بودند ($p<0/001$). نتایج ریزساختار پنیرهای سفید آب‌نمکی نشان داد که تیمار آنزیمی با انجام لیپولیز گسترده سبب کاهش قابل توجه اندازه و تعداد گلبول‌های چربی در ساختار پنیر گردید. این تغییرات به دلیل شکل‌گیری اتصالات جدید میان کازئین و آرایش مجدد شبکه کازئین منجر به متراکم‌تر شدن بافت پنیر و افزایش سفتی آن گردید.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این تحقیق نشان داد که با استفاده از مقدار ٤/٥ گرم آنزیم لیپاز (بزغاله یا گوساله، به ازای هر ۱۰۰ کیلوگرم شیر) می‌توان پنیری با ویژگی‌های حسی مطلوب‌تر تولید نمود. بر اساس نتایج حسی، اختلاف معنی‌داری میان دو آنزیم لیپاز بزی و گاوی مشاهده نگردید.

استناد: جوینده، ح.، حجتی، م. (۱٤۰۱). تأثیر به‌کارگیری آنزیم‌های لیپاز حیوانی بر توسعه لیپولیز پنیر سفید آب‌نمکی طی دوره نگهداری. *فرآوری و نگهداری مواد غذایی*، ۱٤ (٤)، ٥٤-۳۷.

DOI: 10.22069/FPPJ.2022.20401.1707

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

مقدمه

پنیر نام عمومی گروهی از فرآورده‌های غذایی تخمیری بر پایه‌ی شیر است که در سرتاسر جهان با تنوع گسترده‌ای از نظر ویژگی‌هایی مانند رنگ، طعم، بافت و شکل تولید می‌شود (۱۸). با توجه به تنوع فراوان، ارزش غذایی بالا و وجود پپتیدهای زیست فعال، این محصول امروزه جایگاه ویژه‌ای در برنامه غذایی مردم دنیا دارد، به‌طوری که در حدود ۳۵ درصد از کل شیرهای تولیدی جهان به منظور تولید پنیر استفاده می‌شود (۱۰). در ایران نیز پنیر از دیرباز جایگاه خاصی بین مصرف‌کنندگان داشته است.

به‌کارگیری انواع رنت در تولید پنیر، احتمالاً قدیمی‌ترین روش تشکیل دلمه به شمار آمده و تا به امروز همچنان یکی از اصلی‌ترین کاربردهای صنعتی آنزیم‌ها محسوب می‌شود (۱۱). علاوه بر نقش مهم رنت در تولید پنیر، این آنزیم در طول رسیدن برخی انواع پنیر به‌همراه انواع باکتری‌های اسید لاکتیک با فعالیت خود می‌توانند تغییرات مطلوبی به‌ویژه در عطر و طعم و بافت پنیر طی دوره ذخیره‌سازی ایجاد نمایند. در این میان، جهت بهبود ویژگی‌های حسی پنیر می‌توان از آنزیم‌های مختلف هیدرولیتیکی/تجزیه‌کننده پروتئین، کربوهیدرات یا چربی استفاده نمود.

امروزه از آنزیم‌های مختلفی در صنعت لبنیات به‌ویژه در تولید پنیر استفاده می‌شود که از جمله آن‌ها می‌توان به آنزیم ترانس‌گلوتامیناز (۵، ۲۰ و ۲۹)، انواع پروتئازها (۱٤ و ۲۸) و لیپاز (۳ و ۳۲) اشاره کرد. آنزیم لیپاز (EC.3.1.1.3) پس از آنزیم پروتئاز و کربوهیدراتاز در رده سوم اهمیت قرار دارد و حدود ۵ درصد از بازار جهانی آنزیم را به خود اختصاص داده است (۲۲). اگرچه شیر به‌شکل طبیعی حاوی ۵ نوع لیپاز می‌باشد (۹)، این آنزیم‌ها به‌همراه بسیاری دیگر از آنزیم‌های ذاتی شیر غالباً در حین فرایند پاستوریزاسیون غیرفعال می‌شوند (۸). به‌علاوه، در تولید محصولاتی نظیر پنیر، استارترهای مورد استفاده فعالیت لیپولیتیک چندانی از خود نشان نمی‌دهند (۱۷). بنابراین جهت تسریع زمان رسیدگی پنیر[1] و بهبود و افزایش طعم پنیر و سایر فراورده‌های لبنی، می‌توان از آنزیم لیپاز با منشاء حیوانی، گیاهی یا میکروبی استفاده نمود.

هرچند امروزه از آنزیم لیپاز در تولید برخی انواع پنیر نظیر انواع پنیرهای ایتالیایی به‌طور گسترده استفاده می‌گردد، اما استفاده از این آنزیم در پنیر سفید (سنتی و فراپالوده) تنها به برخی تحقیقات انجام شده در این زمینه محدود شده است. آیدمیر و همکاران (۲۰۰۱) در مطالعه‌ای در مورد بررسی اثر آنزیم لیپاز با منشاء غدد اپی‌گلوت (پیش‌معده[2]) بره بر میزان رسیدگی پنیر سفید آب‌نمکی گزارش کردند که با افزایش مقدار آنزیم (از ۰/۵ به ۱۱ گرم در لیتر)، مقدار اسیدهای چرب آزاد و اسیدهای چرب فرار نظیر بوتیریک، کاپروئیک و کاپریلیک به‌طور قابل توجهی طی رسیدن پنیر افزایش می‌یابد (۳). آکین و همکاران (۲۰۰۳)، اثر افزودن آنزیم لیپاز حیوانی (پیش معده) را بر تغییرات اسیدهای چرب آزاد و خواص فیزیکوشیمیایی پنیر سفید نمکی[3] طی مدت یک ماه نگهداری در یخچال بررسی نمودند (۱). آنزیم لیپاز در مقادیر ۲، ٤ و ٦ گرم بر ۱۰۰ کیلوگرم شیر قبل از افزودن رنت به شیر اضافه گردید. براساس گزارش این محققین، هرچند با افزایش غلظت لیپاز ترکیبات اساسی پنیر نظیر ماده خشک، نیتروژن کل، نمک، اسیدیته و چربی تغییر قابل توجهی نکرد، اما مقادیر ترکیبات اسید چرب فرار و اسیدچرب آزاد آن به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافت. صلحی و همکاران (۲۰۱٤) تأثیر لیپاز و پروتئاز استارتری در توسعه عطر و طعم پنیر فتای ایرانی

1. Accelerated ripened cheese
2. Pre-gastric
3. White pickled cheese

فراپالوده را بررسی کردند (۲۸). نتایج این محققین نشان داد که زمان و غلظت آنزیم به‌طور معنی‌داری باعث افزایش اسیدیته، ماده خشک، اندیس لیپولیز و درصد نیتروژن محلول شد. در مطالعه‌ای یزدان‌پناه و همکاران (۲۰۱۵) نیز تأثیر افزودن لیپاز تجاری در شکل‌های متفاوت (لیپاز آزاد و پوشش‌دهی شده) را بر تسریع رسیدن پنیر فتای فراپالوده بررسی کردند (۳۱). نتایج حاکی از آن بود که شکل آزاد آنزیم لیپاز می‌تواند نقش بیشتری در هیدرولیز چربی نسبت به شکل پوشش‌دهی شده آن ایفا کند.

پنیر سفید ایرانی مهمترین نوع پنیر مصرفی در ایران است که به دو شکل سنتی[4] و فراپالوده[5] تولید می‌گردد. پنیر سفید آب‌نمکی ایرانی یکی از محبوب‌ترین پنیرهای مورد استفاده در ایران است که به‌طور سنتی از شیر گاو، بز، میش یا مخلوطی از آن‌ها در مناطق مختلف کشور تولید می‌شود. این محصول، یکی از انواع پنیر نرم است که برای بهبود ویژگی‌های بافت و طعم، عمل رسیدن آن در آب نمک انجام می‌شود. هرچند پنیر سفید آب‌نمکی تولید شده در کارخانجات از کیفیت عطر و طعم نسبتاً مطلوبی برخوردار است، اما به دلیل فرایند پاستوریزاسیون شیر و نابودی آنزیم‌های طبیعی شیر، روند رسیدن پنیر طولانی‌تر بوده و در مقایسه با برخی انواع پنیر نظیر پنیر لیقوان تهیه شده از شیر گاو از کیفیت عطرو طعم پایین‌تری برخوردار است. بنابراین با توجه به اهمیت مصرف پنیر و نقش آن در تغذیه مردم ایران، این تحقیق به منظور بررسی امکان ارتقای ویژگی‌های حسی پنیر سفید آب‌نمکی با استفاده از آنزیم لیپاز با دو منشاء بزغاله و گوساله و ارزیابی نمونه‌های پنیر طی مدت ۹۰ روز نگهداری در یخچال انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده: برای تولید نمونه‌های پنیر، از شیر تازه (با اسیدیته ۰/۱٤ درصد اسید لاکتیک و حاوی ۳/۲٪ پروتئین)، آغازگر مزوفیل (CHOOZIT 23) و ترموفیل (YO-MIX 532) شرکت لبنی دانیسکوی آلمان و رنت میکروبی (Chy-Max) شرکت لبنی هانسن دانمارک استفاده گردید. آنزیم‌های لیپاز مورد استفاده در این پژوهش نیز از شرکت کریستین هانسن دانمارک تهیه گردید. قدرت هر یک از آنزیم‌های مذکور مطابق اطلاعات بسته‌ها ۱۰ واحد به ازای هر گرم پودر آنزیم بود و ترکیب آن شامل آنزیم لیپاز، کلرید سدیم، پودر آب‌پنیر و پودر شیر کازئین پروتئین بود. طبق تعریف، هر واحد آنزیم لیپاز برابر با مقدار آنزیمی است که بتواند در شرایط استاندارد (pH برابر ۷ و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد) اسید بوتیریک را به میزانی آزاد کند که برای خنثی کردن آن مقدار ۱ میلی‌مول محلول سود به ازای هر دقیقه نیاز باشد (۳). آنزیم‌ها لیپاز مورد مصرف با منشاء غدد پیش‌معده گوساله و بزغاله شیرخوار به‌شکل پودر سفید رنگ متمایل به زرد در بسته‌های ۵۰۰ گرمی خریداری و تا زمان نگهداری در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد نگهداری گردیدند. تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده از خلوص بالایی (مرک، آلمان) برخوردار بودند.

روش تولید پنیر: نمونه‌های پنیر سفید آب‌نمکی مطابق روش جوینده و مینهاس (۲۰۰۹) با کمی تغییرات تولید گردیدند (۱۹). شیر خام تازه استاندارد شده (۳ درصد چربی) توسط دستگاه هموژنایزر آزمایشگاهی (Ronghe machinary مدل JHG-Q60-P60 ساخت چین) هموژن گردید و به شیوه‌ی غیرمداوم در دمای ٦۳ درجه سانتی گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه در داخل وت آزمایشگاهی از جنس فولاد زنگ نزن که درون حمام آبی قرار گرفته بود پاستوریزه گردید. برای تولید هر تیمار پنیر، از مقدار ۱۰ کیلو

4.Traditional
5.Ultrafiltrated

شیر استفاده شد. قبل از افزودن رنت، کلرید کلسیم به میزان ۰/۰۲ درصد (وزنی/ وزنی) و به مقدار مساوی نیز پودر مایه کشت آغازگر مزوفیل و ترموفیل هرکدام به مقدار ۰/۰۲ گرم به ازای هر کیلوگرم شیر اضافه شد و پس از تلقیح به مدت حدود ٤٥ دقیقه در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد نگهداری شد تا آغازگرها فرصت کافی برای فعالیت و کاهش pH را داشته باشند. بعد از گذشت این مدت زمان و افزایش اسیدیته به میزان ۰/۰۵ درصد اسید لاکتیک، پودر آنزیم لیپاز در سطوح ۰ (شاهد)، ۱/۵، ۳، ٤/٥ و ٦ گرم به ازای هر ۱۰۰ کیلوگرم شیر و محلول رنت (میزان ۰/۱ گرم رنت حل شده در ۱۵ سی‌سی آب مقطر ولرم) به شیر افزوده و حدود ٤٥ دقیقه برای تشکیل لخته به آن فرصت داده شد. لخته ایجاد شده به مکعب‌های $1cm^3$ برش زده شد و پس از گذشت ۱۵ دقیقه، دلمه برش خورده جهت جلوگیری از چسبیدن دلمه‌ها و خروج بهتر آب‌پنیر به یکدیگر به آرامی به مدت ۵ دقیقه هم‌زده شد. پس از جداسازی آب پنیر، لخته به پارچه پنیر[6] منتقل و به مدت ۳ ساعت در داخل پرس پنیر با قطر ۲۵ سانتی‌متر قرار داده شد. فشار به صورت تدریجی از حدود ۰/۳ کیلوپاسکال تا تقریبا ۳ کیلوپاسکال (محاسبه براساس وزنه‌های پرس به مساحت دلمه) در دو ساعت اول افزایش یافت و سپس فشار تا پایان پرس به‌صورت ثابت باقی ماند. بعد از فرایند پرس کردن، دلمه از پرس خارج شده و پس از رسیدن pH لخته به ۵/۲، به ابعادی به اندازه ٤×٤×٤ بریده شد. سپس قطعات دلمه در ظروف شیشه‌ای یک لیتری غیرقابل نفوذ به هوا قرار داده شده و سطح آنها با آب نمک ۱۱ درصد (حدود ۲۵۰ سی‌سی برای هر ظرف) پوشانده شد. آب نمک مصرفی قبل از مصرف در دمای ۸۰ درجه‌سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه پاستوریزه و خنک می‌گردید. بعد از دربندی، رسیدن نمونه‌های پنیر با کمک انکوباتور یخچال‌دار (Binder، ساخت آلمان) در دمای ۱۵ درجه سانتی گراد به‌مدت دو هفته انجام پذیرفت و سپس ظروف پنیر به یخچال (دمای ۷ درجه سانتی‌گراد) منتقل و ارزیابی نمونه‌ها طی مدت ۳ ماه نگهداری انجام شد. میزان لیپولیز (عدد اسیدی) و ارزیابی حسی نمونه‌های پنیر سفید آب‌نمکی طی ۹۰ روز نگهداری و پروفایل اسیدهای چرب آزاد و ریزساختار نمونه‌های پنیر در پایان مدت ۹۰ روز نگهداری اندازه‌گیری و با یکدیگر مقایسه شد. لازم به ذکر است که سطوح هر یک از آنزیم‌های لیپاز بزغاله و گوساله مورد استفاده، پس از انجام آزمون‌های مقدماتی تعیین گردید.

عدد اسیدی: برای بررسی سرعت لیپولیز، عدد اسیدی نمونه‌های پنیر مطابق روش نونز و همکاران (۱۹۸٦) اندازه‌گیری شد (۲٦). به‌طور خلاصه، ۱۰ گرم نمونه پنیر به همراه ٦ گرم سولفات سدیم بدون آب (Na_2SO_4) کاملاً مخلوط گردید و پس از افزودن ٦۰ میلی‌لیتر دی اتیل اتر، محتویات به بطری ۱۰۰ میلی‌لیتری درب پوش دار منتقل شد. در ادامه، به کمک کاغذ صافی واتمن شماره ۱ محلول رویی صاف گردید و سپس محلول زیر صافی با محلول هیدرواکسید پتاسیم اتانولی (KOH) ۰/۱ نرمال در حضور فنیل‌فتالئین تیتر شد و عدد اسیدی برحسب میلی‌گرم هیدروکسید پتاسیم لازم برای خنثی کردن اسیدهای چرب آزاد (برمبنای اسید اولئیک) موجود در یک‌صد گرم روغن یا چربی (meq KOH/۱۰۰g) گزارش گردید.

ارزیابی پروفایل اسیدهای چرب: اندازه‌گیری مقدار اسیدهای چرب نمونه‌های پنیر مطابق روش دیوید و همکاران (۲۰۰۵) با کمی تغییرات انجام شد (٦). ابتدا مقداری نمونه از قسمت‌های مختلف پنیر برداشته شد و در داخل هاون ریخته و به‌طور کامل له گردید.

6.Cheese cloth

سپس ۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه به داخل لوله آزمایشگاهی درپوش‌دار ۲۰ میلی‌لیتری منتقل شد. به‌منظور جلوگیری از نفوذ نور، سطح لوله‌ها با چسب مشکی پوشانده شد. در ادامه، به میزان ۱۰ میلی‌لیتر n-هگزان برای متلاشی کردن غشای گلبول چربی و همچنین به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر هیدرواکسید پتاسیم ۲ نرمال (۱۱/۲ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر) به مواد داخل لوله آزمایشگاهی اضافه گردید. جهت جلوگیری از خروج مواد فرار، سرپوش لوله‌ها بسته شد. محتویات لوله‌ها طی مدت ۱ ساعت و در فواصل زمانی ۲۰ دقیقه توسط ورتکس به مدت ۵ دقیقه به‌خوبی هم‌زده شد. تمامی مراحل استخراج در دمای پایین انجام شد تا از دست رفتن اسیدهای چرب فرار بخصوص اسید بوتیریک و کاپروئیک جلوگیری شود. بعد از مرحله ورتکس، نمونه‌ها به یخچال منتقل شدند و به مدت ۵ ساعت در دمای ٤ درجه سلسیوس قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها از یخچال خارج شدند و توسط سمپلر، ۱۰۰۰ میکرولیتر از محلول رویی برداشته شد و به داخل میکروتیوب انتقال داده شد. سرانجام میکروتیوب‌های پوشانده شده با پارافیلم در داخل محل نگهداری میکروتیوب‌ها (رک[7]) قرار داده شد. برای اندازه‌گیری مقدار اسیدهای چرب آزاد نمونه‌ها از دستگاه گاز کروماتوگرافی Agilent 6890 GC مجهز به ستون سیانوپروپیل INNOWax-HP--88 به طول ۱۰۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت ۰/۲۵ میکرومتر استفاده شد. دمای ابتدایی ۱۰۰ درجه سلسیوس بود و با سرعت ۱۵ درجه در دقیقه به دمای ۲٦۰ درجه سلسیوس رسید و به مدت ۰/۵ دقیقه در این دما نگه‌داشته شد. از گاز حامل هلیم با فشاری ثابت و سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه به‌عنوان فاز متحرک استفاده شد. حجم تزریق ۲ میکرولیتر بود و برای تعیین اسیدهای چرب از آشکارساز یونیزاسیون شعله‌ای با دمای ۲٦۰ درجه سلسیوس استفاده گردید.

آزمون حسی: ارزیابی حسی نمونه‌های پنیر براساس آزمون ترجیحی[8] ۹-نقطه‌ای انجام پذیرفت. ویژگی‌های حسی نمونه‌های پنیر سفید آب‌نمکی شامل الف) رایحه، ب) رنگ، ج) بافت و د) طعم توسط ۲۰ ارزیاب (اساتید و دانشجویان) در طی مدت ۹۰ روز نگهداری (۱، ۱۵، ۳۰، ٦۰ و ۹۰ روز) بررسی شد و میانگین امتیازات حسی مربوط به ۵ دوره نگهداری محاسبه و نتایج ویژگی‌های حسی بر اساس آن آنالیز و مقایسه گردید.

آزمون ریزساختار: بررسی ریزساختار نمونه‌های پنیر در پایان زمان ۹۰ روزه نگهداری به‌وسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی[9] (شرکت Tescan، مدل Vega\TESCAN-XMU، ساخت جمهوری چک) با جریان ٤ کیلوولت انجام شد. جهت ارزیابی ریزساختار، قطعه‌های پنیر با کاردی برنده به‌مکعب‌هایی به طور تقریبی پنج میلی‌متر بریده و درگلوترآلدهید ۲/۵ درصد به مدت سه ساعت غوطه‌ور شدند. مکعب‌ها شش بار با آب مقطر شستشو و با استفاده از اتانول در غلظت‌های مختلف ٤۰، ۵۵، ۷۰، ۸۵، ۹۰ و ۹٦ درجه (به مدت ۳۰ دقیقه برای هر درجه) آبزدایی گردیدند. در ادامه، نمونه ها سه بار (ده دقیقه در هربار) در کلروفرم چربی‌زدایی و پس از سرد شدن در یخچال با اتانول پوشانده و در دمای °C ٤ نگهداری شدند. پس از خشک کردن انجمادی، قطعات پنیر با چسب نقره روی پایه‌های آلومینیومی نصب و در یک پوشش دهنده پاشنده (Blazers, type K450x, Bal Tec، ساخت انگلیس) تا نقطه بحرانی خشک گردیدند و به مدت شش دقیقه با طلا پوشش داده شدند. ریزساختار نمونه‌های پنیر در

7.Racks

8.Hedonic test

9.Scanning Electron Microscopy

سه بزرگنمایی ۱۰۰۰، ۲۵۰۰ و ۵۰۰۰ برابر عکس‌برداری شدند (۲۱ و ۳۰).

تجزیه و تحلیل آماری: در این پژوهش با توجه به استفاده از دو نوع آنزیم لیپاز گاوی و بزی (هر کدام در ٤ سطح) به همراه یک نمونه شاهد (فاقد آنزیم)، تعداد ۹ تیمار تولید گردید. تمامی ۹ تیمار در سه تکرار تولید و آزمون‌ها طی مدت ۹۰ روز نگهداری مورد ارزیابی قرار گرفتند. آنالیز داده‌ها از طریق آزمون ANOVA ساده انجام شد و میانگین صفات مورد بررسی با کمک آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ مقایسه گردید. برای این منظور از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ استفاده شد (٢٤).

نتایج و بحث

عدد اسیدی: میانگین اندیس اسیدی (AV) پنیر سفید آب‌نمکی دارای سطوح مختلف آنزیم لیپاز بزی و گاوی طی ۹۰ روز نگهداری در جدول ۱ ارائه شده است. بررسی نتایج نشان داد که عدد اسیدی نمونه‌های تولیدی حاوی لیپاز بزی و گاوی در تمامی دوره‌های نگهداری به‌طور معنی‌داری بالاتر از نمونه شاهد (فاقد آنزیم لیپاز) بود ($p<۰/۰۱$) و میزان عدد اسیدی نمونه‌های پنیر تیمار شده با آنزیم لیپاز بزی نیز بیش از نمونه‌های پنیر حاوی لیپاز گاوی بود ($p<۰/۰۵$). علاوه بر این، بررسی تغییرات عدد اسیدی نمونه‌های پنیر طی مدت ۹۰ روز نگهداری نشان داد که میزان عدد اسیدی تا پایان مدت زمان ٦۰ روز نگهداری افزایش و پس از آن به مقدار جزیی ($p>۰/۰۵$) کاهش یافت.

جدول ۱- عدد اسیدی (میلی‌اکی‌والان KOH در ۱۰۰ گرم) نمونه‌های پنیر سفید آب‌نمکی حاوی مقادیر مختلف لیپاز بزغاله و گوساله طی دوره ۹۰ روز نگهداری در یخچال

Table 1- Acid values (meq KOH/100g) of brined white cheese samples containing different concentraions of kid goat and calf lipases at the end of 90 days of storage at refrigerator

تیمار پنیر Cheese treatments	مقدار آنزیم Enzyme levels (g/100 Kg)	روز نگهداری Storage day				
		1	15	30	60	90
شاهد Control	0	2.44 ±0.39 ^{cE}	3.96 ±0.35 ^{bC}	6.20 ±0.56^{aG}	6.83 ±0.63^{aD}	6.04 ±0.90^{aE}
لیپاز بزغاله Kid goat lipase	1.5	3.23 ±0.44 ^{cCDE}	5.47 ±0.52 ^{bB}	8.28 ±0.70 ^{aDE}	8.99 ±0.92 ^{aC}	8.32 ±0.77 ^{aCD}
	3	3.81 ±0.63 ^{dBCD}	6.35 ±0.71^{cABC}	9.18 ±1.09 ^{bCD}	10.79 ±0.82 ^{aB}	9.97 ±0.91 ^{abBC}
	4.5	4.24 ±0.55 ^{cABC}	6.73 ±0.66 ^{bAB}	9.98 ±1.16 ^{aBC}	11.12 ±0.79 ^{aAB}	10.55 ±0.79 ^{aAB}
	6	4.96 ±0.63 ^{cA}	7.11 ±0.84 ^{bA}	11.15 ±0.73 ^{aA}	11.94 ±0.88 ^{aA}	10.99 ±0.94 ^{aA}
لیپاز گوساله Calf lipase	1.5	3.06 ±0.46 ^{dDE}	5.24 ±0.47 ^{cB}	6.93 ±0.79 ^{bFG}	8.37 ±0.95 ^{aC}	7.71 ±0.88 ^{abCD}
	3	3.70 ±0.56 ^{dBCD}	5.82 ±0.65 ^{cBC}	7.86 ±1.04 ^{bEF}	8.88 ±0.84 ^{aC}	7.96 ±0.61 ^{abCD}
	4.5	3.95 ±0.31^{cABCD}	6.17 ±0.58^{bABC}	9.03 ±0.77 ^{aCD}	9.44 ±0.79 ^{aC}	8.81 ±0.80 ^{aCD}
	6	4.59 ±0.44 ^{cAB}	7.06 ±0.82 ^{bA}	10.48 ±0.83^{aAB}	10.99 ±0.94^{aAB}	10.20 ±1.12 ^{aAB}

حروف کوچک متفاوت در هر ردیف و حروف بزرگ متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) می‌باشد

Small letters in each row and capital letters in each column indicate significant differnces ($p<0.05$)

در طی دوره رسیدن یا نگهداری پنیر، آنزیم لیپاز با تبدیل چربی شیر به اسیدهای چرب آزاد نقش مهمی در توسعه عطر و طعم پنیر ایفا می‌کند. عدد اسیدی شاخص لیپولیز پنیر بوده و نشانگر میزان اسیدهای چرب پنیر است. کاهش عدد اسیدی در انتهای دوره‌ی نگهداری می‌تواند به دلیل تجزیه و تبدیل اسیدهای چرب به ترکیباتی مانند متیل‌کتون‌ها باشد (۱۰). بنابراین، در طول دوره نگهداری، بالاترین میزان عدد اسیدی مربوط به نمونه پنیر حاوی غلظت ٦ گرم آنزیم لیپاز بزی به ازای هر ۱۰۰ کیلوگرم شیر

(meq KOH ۱۱/۹٤) پس از ٦۰ روز نگهداری و کمترین میزان آن (meq KOH ۲/۷٤) مربوط به نمونه شاهد در ابتدای نگهداری بود. یزدان‌پناه و همکاران (۲۰۱٤) در بررسی تسریع رسیدن پنیر فراپالایش با کمک آنزیم لیپاز نشان دادند که درطول دوره نگهداری، میزان عدد اسیدی در ابتدای نگهداری افزایش و پس از آن تا پایان زمان نگهداری کاهش یافت که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد (۳۱). در هرحال، جئورگالا و همکاران (۲۰۰۵) در بررسی میزان سرعت لیپولیز در پنیر فتا، افزایش AV نمونه‌های پنیر را طی مدت ۱۲۰ روز نگهداری گزارش نمودند، هر چند این محققین نیز افزایش AV پس از ٦۰ روز نگهداری را غیرمعنی‌دار گزارش کردند (۱۵).

پروفایل اسیدهای چرب آزاد: پروفایل اسیدهای چرب آزاد پنیر سفید آب‌نمکی براساس آنالیز نمونه‌ها با دستگاه کروماتوگرافی گازی پس از گذشت ۹۰ روز نگهداری در یخچال در جدول ۲ نشان داده شده است. ترکیب اسیدهای چرب پنیر سفید آب‌نمکی محتوی آنزیم لیپاز بزی و گوساله و فاقد آنزیم به‌صورت متیل استر اسید بوتیریک (C4:0)، کاپروئیک (C6:0)،کاپریلیک (C8:0)، کاپریک (C10:0)، اندکانوئیک[10] (C11:0)، لوریک (C12:0)، تریدکانیک[11] (C13:0)، مریستیک[12] (C14:0)، مریستولئیک[13] (C14:1)، پنتادکانویک[14] (C15:0)، سیس-۱۰ پنتادکانویک[15] (C15:1)، پالمتیک (C16:0)، پالمیتولئیک (C16:1)، هپتادکانیک[16] (C17:0)، سیس-۱۰ هپتادکانیک (C17:1)، استئاریک[17] (C18:0)، ترانس-۱۰-اوکتادکانوئیک[18] (C18:ln10t)، اولئیک (C18:ln9c)، لینولولیدیک[19] (C18:2n6t)، لینولئیک[20] (C18:2n6c)، گاما-لینولنیک[21] (C18:3n6)، لینولنیک (C18:3n3)، سیس-۱۱-ایکوزونیک[22] (C20:1)، هینیکوسانوئیک[23] (C21:0)، سیس-ایکوسادینوئیک[24] (C20:2)، سیس-۸،۱۱،۱٤-ایکوزاتریئنوئیک[25] (C20:3n6)، سیس-۱۱،۱٤،۱۷-ایکوزاتریئنوئیک-(C20:3n3)، اراشیدونیک[26] (C20:4n6)، تریکوزانیک[27] (C23:0)، سیس-ایکوزاپنتانوئیک[28] (C20:5n3)، نرونیک[29] (C24:1n9) و سیس-دکوزاهگزاوانیک[30] اسید (C22:6n3) مشخص گردید. لازم به ذکر است که همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، در این جدول تنها عمده‌ترین اسیدهای چرب آورده شده است و آن‌هایی که مقدارشان بسیار جزیی بوده است اشاره‌ای نشده است.

در اثر هیدرولیز کامل چربی، یک مولکول گلیسرول و سه اسید چرب آزاد تولید می‌گردد. نقش اسیدهای چرب آزاد در عطر و طعم پنیر بسیار زیاد است و بعضی از آن‌ها فرار بوده و قادرند بوی بسیار تندی در پنیر ایجاد نمایند. در این میان، اسیدهای چرب متوسط و بلند زنجیره اهمیت چندانی ندارند (۱۲) و این اسیدهای چرب کوتاه زنجیره (C4:0-C8:0) هستند که دارای آستانه حسی پایینی بوده و هرکدام که دارای عطر و طعم خاصی هستند می‌توانند به‌طور مستقیم در عطر و طعم انواع پنیر

10. *Undecanoic*
11. *Tridecanoic*
12. Myristic
13. Myristoleic
14. Pentadecanoic
15. *cis-10-pentadecenoic*
16. Heptadecanoic
17. Stearic
18. Trans-10 *octadecenoic acid*
19. *linolelaidic*
20. *Linoleic*
21. *Gamma-linolenic acid*
22. *cis-11-Eicosenoic acid*
23. Heneicosanoic
24. *cis*-Eicosadienoic
25. Eicosatrienioc
26, Arachidonic
27. *Tricosanoic*
28. *Eicosapentaenoic*
29. *Nervonic*
30. *Docosahexaenoic*

دخالت کنند (٤). مطابق جدول ۲، از بین اسیدهای متوسط و بلند زنجیره، بیشترین مقدار مربوط به اسیدهای چرب لوریک و پالمتیک می‌باشد که با وجود آن که این دو مجموعاً حدود یک سوم کل اسیدهای چرب آزاد را شامل می‌شوند، اما نقش چندانی در طعم پنیر ندارند. براساس نتایج امینی‌فر و امام جمعه (۲۰۱٤)، اسید پالمتیک و پس از آن اولئیک و میرستیک اسید به ترتیب بیشترین اسیدهای چرب آزاد در میان اسیدهای چرب متوسط و بلند زنجیره پنیر لیقوان را به خود اختصاص دادند (۲). گائو و همکاران (۲۰۲۲) نیز در بررسی تأثیر تیمار آنزیمی لیپاز بر کیفیت عطر و طعم و میزان اسیدهای چرب آزاد پنیر اصلاح شده با آنزیم[31] نشان دادند که تیمار آنزیمی لیپاز سبب افزایش قابل‌توجه میزان اسیدهای کوتاه و متوسط زنجیره می‌شود. در هر حال، این محققین برخلاف نتایج این تحقیق گزارش نمودند که در نتیجه تیمار آنزیمی لیپاز، مقدار اسیدهای بلند زنجیره افزایش می‌یابد (۱۳).

اسید بوتیریک یکی از مهم‌ترین اسیدهای چرب شیر است که نقش مهمی در رایحه فراورده‌های لبنی به‌ویژه کره و پنیر دارد. املاح و استرهای اسید بوتیریک تحت عنوان بوتیرات[32] و بوتانوئات[33] شناخته می‌شوند و در میان آن‌ها، اسید بوتانوئیک تأثیر مهمی در طعم پنیر و تندی آن دارد. مشابه بسیاری از انواع پنیر، اسیدهای چرب کوتاه زنجیره به‌ویژه بوتیریک و کاپروئیک نقش مهمی در عطر و طعم پنیر سفید ایرانی دارند. همان‌طور که در جدول ۲ می‌توان مشاهده نمود، غلظت اسید بوتیریک و کاپروئیک در نمونه‌های محتوی آنزیم بسیار بیشتر از نمونه فاقد آنزیم یا نمونه شاهد بود که نتایج حسی به‌دست آمده توسط ارزیاب‌ها در مورد رایحه و طعم پنیر نیز این موضوع را تأیید نمود (جدول ۳). در پایان ۹۰ روز نگهداری، بیشترین مقدار اسید بوتیریک مربوط به نمونه پنیر حاوی بالاترین غلظت آنزیم لیپاز بزغاله و گوساله (٦ گرم آنزیم به ازای ۱۰۰ کیلوگرم شیر) به‌ترتیب با مقدار ٤٨/٤١ و ٤٤/١٧ و کمترین مقدار آن مربوط به نمونه شاهد با مقدار ۱۷/۱۱ گرم در ۱۰۰ کیلوگرم پنیر بود. همچنین بیشترین درصد اسید کاپروئیک مربوط به نمونه حاوی بالاترین غلظت آنزیم لیپاز بزغاله و گوساله (٦ گرم آنزیم به ازای ۱۰۰ کیلوگرم شیر) به‌ترتیب با مقدار ٤۲/۲٥ و ۳۸/۸۲ و کمترین مقدار آن مربوط به نمونه شاهد با مقدار ۱٤/۱۳ گرم در ۱۰۰ کیلوگرم پنیر بود. آیدمیر و همکاران (۲۰۰۱) در نتایجی مشابه، افزایش قابل توجه مقادیر اسید بوتیریک و کاپروئیک در پنیر سفید آب‌نمکی تیمار شده با آنزیم لیپاز پیش‌معده گوسفندی را در مقایسه با نمونه فاقد آنزیم پس از ۹۰ روز نگهداری در دمای ۸ درجه سانتی گراد گزارش نمودند (۳). این محققین مقادیر اسید بوتیریک و کاپروئیک در نمونه‌های پنیر سفید آب‌نمکی تیمار شده با آنزیم لیپاز را به‌ترتیب ٤۱/٤۱ و ۲۲/۷٦ و نمونه پنیر فاقد آنزیم را به‌ترتیب ۰/٦۹ و ۰/٤۷ گرم در ۱۰۰ کیلوگرم پنیر گزارش کردند. دلیل پایین‌تر بودن اسیدهای چرب کوتاه زنجیره توسط این محققین در مقایسه با پژوهش حاضر، احتمالاً به دلیل روش تولید پنیر به‌خصوص تفاوت در نوع باکتری‌های آغازگر می‌باشد. برخلاف این نتایج، آکین و همکاران (۲۰۰۳) مقادیر اسید بوتیریک و کاپروئیک در نمونه‌های پنیر سفید آب‌نمکی تیمار شده با آنزیم لیپاز را بسیار پایین‌تر و حدود ۱۰ درصد نتایج به‌دست آمده در تحقیق حاضر گزارش نمودند (۱).

مطابق جدول ۲، هر چند با افزایش مقدار آنزیم لیپاز بزغاله یا لیپاز گوساله در نمونه‌های پنیر، مقدار تمامی اسیدهای چرب کوتاه، متوسط و بلند زنجیره

31. Enzyme modified cheese
32. Butyrates
33. Butanoates

افزایش یافت، اما این افزایش در اسیدهای چرب کوتاه زنجیره مشهودتر بود که با نتایج امینی‌فر و امام جمعه (۲۰۱٤) مطابقت داشت (۲). دلیل افزایش بیشتر اسیدهای چرب آزاد کوتاه زنجیره در نتیجه تیمار آنزیمی لیپاز چربی شیر آن است که اکثر اسیدهای چرب کوتاه زنجیره شیر در موقعیت SN-3 استری شده‌اند (۱٦) و این آنزیم به‌طور اختصاصی تمایل بیشتری در حمله به موقعیت SN-3 تری‌گلیسیرید اسیدهای چرب دارد (۱۱). به‌علاوه، سطوح مختلف آنزیم در هر دو گروه پنیر تیمار شده با آنزیم بزغاله و گوساله سبب اختلافات معنی‌داری در پروفایل اسیدهای چرب گردید. با افزایش غلظت آنزیم، مقدار اسیدهای چرب آزاد (کوتاه زنجیر، متوسط زنجیر، بلند زنجیره و مقدار کل) افزایش معنی‌داری یافت و این تغییرات به‌ویژه در نمونه‌های تیمار شده با آنزیم بزی بارزتر بود.

جدول ۲- پروفایل اسیدهای چرب نمونه‌های پنیر (گرم در ۱۰۰ کیلوگرم) حاوی مقادیر مختلف لیپاز بزغاله و گوساله پس از گذشت ۹۰ روز نگهداری در یخچال

Table 2- Fatty acid profile (FAP) of cheese samples (g/100 Kg) containing different concentraions of kid goat and calf lipases at the end of 90 days of storage at refrigerator

پنیر حاوی آنزیم لیپاز گوساله (گرم در ۱۰۰ کیلو شیر) Cheese with calf lipase (g/100 Kg milk)				پنیر حاوی آنزیم لیپاز بزغاله (گرم در ۱۰۰ کیلو شیر) Cheese with kid goat lipase (g/100 Kg milk)				شاهد (فاقد لیپاز) Control (without lipase)	اسید چرب Fatty acid
٦	٤/٥	۳	۱/٥	٦	٤/٥	۳	۱/٥	۰	
44.17[a]	35.99[b]	34.09[b]	26.57[c]	48.41[a]	36.87[b]	33.96[b]	28.24[c]	17.11[d]	C4: 0
38.82[b]	25.77[d]	19.61[e]	14.19[f]	42.25[a]	33.28[c]	23.09[d]	16.68[ef]	14.13[f]	C6: 0
22.52[bc]	20.38[cd]	16.44[e]	14.93[e]	31.22[a]	24.70[b]	21.53[bc]	17.60[de]	15.18[e]	C8: 0
12.28[ab]	9.69[cd]	7.11[de]	3.81[g]	14.40[a]	11.02[bc]	6.71[ef]	4.33[fg]	3.28[g]	C10: 0
23.01[b]	21.94[bc]	20.66[bc]	19.87[cd]	26.98[a]	23.04[b]	22.61[bc]	19.73[cd]	16.49[e]	C12: 0
19.09[ab]	18.03[abc]	17.53[bc]	11.48[d]	20.04[a]	19.59[ab]	16.36[c]	10.95[d]	10.32[d]	C14: 0
78.45[ab]	67.60[c]	54.32[d]	42.71[ef]	83.05[a]	74.33[b]	56.08[d]	46.19[e]	38.07[f]	C16: 0
19.55[a]	17.75[ab]	14.66[cd]	13.98[cd]	20.02[a]	18.93[a]	15.97[bc]	14.15[cd]	12.30[d]	C18: 0
11.38[b]	7.96[c]	5.61[de]	4.23[ef]	14.16[a]	11.80[b]	7.41[cd]	3.05[f]	2.83[f]	C18:1
9.37[a]	8.06[ab]	7.11[b]	6.95[bc]	8.98[a]	8.41[ab]	7.90[ab]	5.57[c]	3.20[d]	C18:2
105.51[b]	82.14[d]	70.14[ef]	55.69[gh]	121.88[a]	94.85[c]	78.58[de]	62.52[fg]	46.42[h]	کوتاه زنجیر (C4-C8) Short chain
54.38[ab]	49.66[bc]	45.30[c]	35.16[d]	61.42[a]	53.65[b]	45.68[c]	35.01[d]	30.09[d]	متوسط زنجیر (C10-C14) Medium chain
118.75[ab]	101.37[c]	81.70[d]	67.87[e]	126.21[a]	113.47[b]	87.36[d]	68.96[e]	56.40[f]	بلند زنجیر (C16-C18:2) Long chain
278.64[b]	233.17[c]	197.14[d]	158.72[ef]	309.51[a]	261.97[b]	211.62[cd]	166.49[e]	132.91[f]	مقدار کل اسیدهای‌چرب Total fatty acids

حروف کوچک متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($p<0.05$) می‌باشد

Small letters in row indicate significant differnces ($p<0.05$)

در بالاترین سطح آنزیم مورد استفاده (٦ گرم آنزیم به ازای ۱۰۰ کیلو شیر)، هر چند میان اسیدهای چرب متوسط و بلند زنجیره نمونه‌های پنیر تیمار شده با آنزیم بزغاله و گوساله تفاوت معنی‌داری وجود نداشت، اما مقدار اسیدهای چرب کوتاه زنجیره و غلظت کل اسیدهای چرب نمونه پنیر حاوی آنزیم بزی بالاتر بود ($p<۰/۰۵$). در میان نمونه‌های مختلف پنیر، نمونه شاهد با ۱۳۲/۹۱ کمترین و نمونه تیمار شده با ٦ گرم آنزیم لیپاز بزی (به ازای ۱۰۰ کیلو شیر) با ۳۰۹/۵۱ گرم به ازای ۱۰۰ کیلو پنیر دارای بالاترین مقدار کل اسیدهای چرب آزاد در پایان ۹۰ روز نگهداری در یخچال بودند.

نتایج حسی: میانگین نتایج حسی نمونه‌های پنیر سفید آب‌نمکی طی مدت ۹۰ روز نگهداری در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که افزودن آنزیم‌های لیپاز بزغاله و گوساله به جز رنگ محصول سبب افزایش مقبولیت نمونه‌های پنیر آب‌نمکی شد که دلیل آن توسعه لیپولیز چربی و تأثیر آن بر ویژگی‌های حسی محصول نظیر عطر و طعم و بافت پنیر است (جدول ۳). با این وجود، همانند نتایج ارایه شده توسط دی‌لوکا و همکاران (۲۰۱۹)، اختلاف معنی‌داری از نظر ویژگی‌های حسی میان نمونه‌های پنیر حاوی سطوح پایین آنزیم و کنترل مشاهده نگردید (۷). بر اساس نتایج به‌دست آمده، تمامی امتیازات حسی محصول با افزایش آنزیم لیپاز به غیر از بیشترین سطح آن (٦ گرم به ازای ۱۰۰ کیلوگرم شیر) بهبود یافت و تأثیر افزودن لیپاز بزی در این زمینه بیشتر از لیپاز گاوی بود. در هر حال، در تمامی ویژگی‌های مورد بررسی، تفاوت معنی‌داری میان سطوح متناظر لیپاز بزغاله و گوساله مشاهده نگردید (جدول ۳).

جدول ۳- میانگین امتیازهای حسی نمونه‌های پنیر سفید آب‌نمکی حاوی مقادیر مختلف لیپاز بزغاله و گوساله در پایان ۹۰ روز نگهداری در یخچال

Table 3- Sensory scores of white brined cheese samples (g/100 Kg) containing different concentraions of kid goat and calf lipases at the end of 90 days of storage at refrigerator

تیمار پنیر Cheese treatments	مقدار آنزیم Enzyme levels (g/100 Kg milk)	امتیازهای حسی Sensory scores			
		Odour	Colour	Taste	Texture
شاهد Control	0	7.82 ±0.45 ^{c}	8.20 ±0.33 ^{a}	7.89 ±0.51 ^{c}	8.02 ±0.47 ^{c}
لیپاز بزغاله Kid goat lipase	1.5	8.23±0.49 ^{abc}	8.25 ±0.32 ^{a}	8.13 ±0.46 ^{bc}	8.33 ±0.33 ^{abc}
	3	8.45 ±0.42 ^{ab}	8.24 ±0.46 ^{a}	8.42±0.43 ^{ab}	8.49±0.31 ^{abc}
	4.5	8.64 ±0.31 ^{a}	8.44 ±0.54 ^{a}	8.78 ±0.42 ^{a}	8.68 ±0.48 ^{a}
	6	8.53 ±0.50 ^{ab}	8.28±0.36 ^{a}	8.46±0.29 ^{ab}	8.54 ±0.45 ^{ab}
لیپاز گوساله Calf lipase	1.5	8.10 ±0.38 ^{bc}	8.11 ±0.38 ^{a}	8.07 ±0.44 ^{bc}	8.16±0.32 ^{bc}
	3	8.34 ±0.39 ^{ab}	8.29±0.44 ^{a}	8.14±0.38 ^{bc}	8.19±0.46 ^{bc}
	4.5	8.55 ±0.28 ^{ab}	8.34 ±0.38^{a}	8.53±0.40 ^{ab}	8.47±0.43 ^{abc}
	6	8.39 ±0.48 ^{ab}	8.32±0.29 ^{a}	8.28±0.35 ^{abc}	8.28±0.39 ^{abc}

حروف کوچک متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) می‌باشد

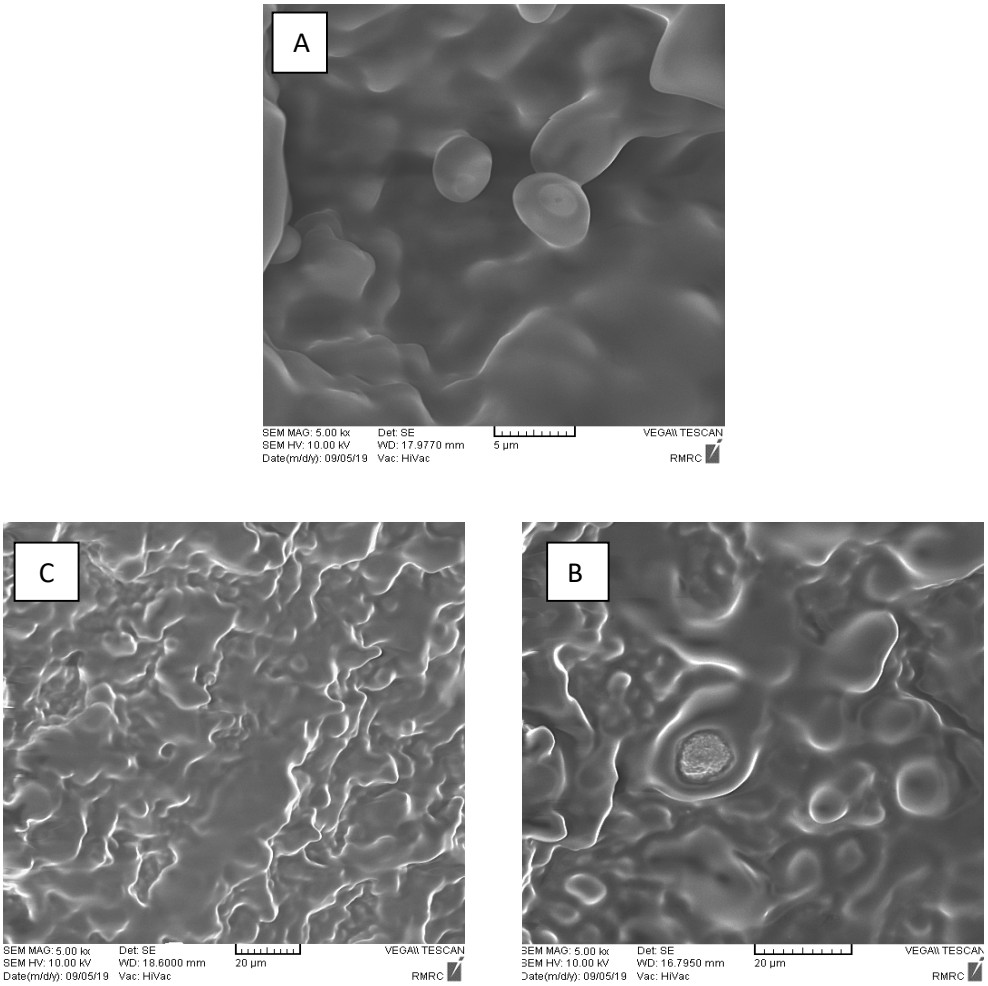
Small letters in row in column indicate significant differnces ($p<0.05$)

اسیدهای چرب آزاد فرار با توجه به آستانه‌های حسی و غلظت موجود در محصول می‌توانند در عطر و طعم پنیر تأثیر مطلوب یا نامناسب داشته باشند. مطابق نتایج این تحقیق، لیپولیز چربی و افزایش غلظت اسیدهای چرب آزاد و به تبع آن واکنش‌های بیوشیمیایی مرتبط با تجزیه آن‌ها سبب ارتقای عطر و طعم پنیر گردید. به‌علاوه، تیمار آنزیمی لیپاز و در نتیجه لیپولیز چربی سبب بهبود بافت نمونه‌های چربی در مقایسه با نمونه شاهد گردید. همان‌گونه که انتظار می‌رفت، به‌دلیل آن که چربی به عنوان ماده نرم‌کننده

بین زنجیره‌های پروتئین عمل کرده و مانع اتصال آن‌ها به یکدیگر می‌شود، بنابراین به‌علت بالاتر بودن چربی در نمونه کنترل، این نمونه از بافت نرم‌تری نسبت به نمونه‌های تیمار شده با آنزیم برخوردار بود. درنتیجه، نمونه‌های پنیر تیمار شده با سطوح بالای آنزیم به‌ویژه آنزیم بزی بافتی سفت‌تر از کنترل و با توجه به اظهارات ارزیابان بافتی مشابه پنیر لیقوان داشتند. در مطابقت با نتایج این تحقیق، آکین و همکاران (۲۰۰۳)، بهبود تمامی خواص حسی پنیر آب‌نمکی سفید را همگام با افزایش غلظت لیپاز گوسفندی (استخراج شده از غدد اپی‌گلوت پیش‌معده بره) گزارش نمودند (۱). در مقابل، بر اساس نتایج رضایی و همکاران (۲۰۱۵)، ویژگی‌های حسی تمامی نمونه‌های پنیر متال (حاوی آنزیم لیپاز میکروبی یا فاقد آنزیم) در پایان ۹۰ روز نگهداری در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد به‌طور قابل توجهی کاهش یافت و این کاهش به‌خصوص در سطوح بالای آنزیم (۰/۱۱ گرم در لیتر) قابل توجه بود (۲۷). در تحقیق حاضر نیز کاهش کیفیت طعم و رایحه پنیر در پایان ۹۰ روز نگهداری در یخچال به‌ویژه در نمونه‌های حاوی سطوح بالاتر آنزیم لیپاز مشاهده گردید (نتایج آورده نشده است) که دلیل آن تند و تیز (رنسید شدن) پنیر در نتیجه افزایش بیش از حد لیپولیز در محصول است (۲۵). براساس نتایج حسی، با توجه به کاهش قابل توجه کیفیت طعم و رایحه نمونه‌های پنیر حاوی بالاترین سطح آنزیم (٦ گرم آنزیم لیپاز به ازای ۱۰۰ کیلوگرم شیر) در پایان ۹۰ روز نگهداری، استفاده از مقدار ٤/٥ گرم لیپاز (بزغاله یا گوساله) توصیه می‌گردد.

ریزساختار پنیر: همان‌گونه که در شکل ۱-A نشان داده شده است، به دلیل میزان لیپولیز کمتر در نمونه کنترل، گلبول‌های چربی با گذشت زمان تجمع کرده و تشکیل گلبول‌های درشت‌تری را می‌دهند. ضمن آن که با گذشت بیشتر زمان نگهداری، هیدرولیز چربی سبب محو شدن برخی گلبول‌ها و ایجاد حفره‌هایی با نام اثر انگشت[34] در پنیر می‌گردد (شکل ۱-A). با افزودن آنزیم لیپاز، به دلیل لیپولیز گسترده (هاله‌های سفید رنگ در شکل ۱-B و C)، تعداد و اندازه گلبول‌های چربی به‌طور قابل توجهی کاهش می‌یابد و در این شرایط کازئین با برقراری اتصالات جدید و آرایش مجدد[35] سبب ایجاد ساختاری متراکم‌تر در پنیر می‌گردد. همان‌طور که به وضوح در شکل ۱ نشان داده شده است، نمونه حاوی لیپاز بزغاله (۱-C) از ساختار متراکم‌تری نسبت به نمونه شاهد و حتی پنیر تیمار شده با لیپاز گوساله (۱-B) برخوردار است که دلیل آن همان‌طور که اشاره گردید آرایش مجدد میسل‌های کازئین می‌باشد. این موضوع بیانگر فعالیت بالاتر این آنزیم نسبت به لیپاز گوساله است. نتایج ریزساختار مؤید نتایج حسی است چرا که براساس نتایج حسی نیز مشخص گردید که نمونه‌های حاوی آنزیم از بافت سفت‌تری نسبت به شاهد برخوردار بودند. امینی‌فر و امام جمعه (۲۰۱٤) نتایج مشابهی را در مورد تأثیر تیمار آنزیمی لیپاز بر ریزساختار پنیر لیقوان طی مدت ۹۰ روز رسیدن پنیر گزارش کردند (۲). بر اساس نتایج این محققین، میانگین قطر گلبول‌های چربی در پنیر هنگام تیمار شیر با مقادیر ٤ و ۸ گرم آنزیم لیپاز (به ازای ۱۰۰ کیلوگرم شیر) به ترتیب از ٥/۲ (نمونه فاقد آنزیم) میکرومتر به ۳/۷۱ و ۲/٤٥ میکرومتر کاهش یافت. علاوه بر این، در غلظت بالای آنزیم (۸ گرم)، تعداد گلبول‌های چربی نیز به‌طور مشخصی کاهش یافت. کریمی و همکاران (۲۰۰۹) نیز افزایش سفتی پنیر سفید فراپالوده را در نتیجه لیپولیز چربی گزارش نمودند و دلیل آن را به فعالیت گسترده لیپاز باکتری‌های اسید لاکتیک اضافه شده به‌عنوان آعازگر نسبت دادند (۲۳).

34. Fingerprint
35. Rearrangement



شکل ۱- تصویر ریزساختار نمونه‌های پنیر آب‌نمکی تیمار شده با آنزیم لیپاز در پایان مدت ۹۰ روز نگهداری در یخچال با بزرگنمایی ۵۰۰۰ برابر. A) نمونه شاهد، B و C) به‌ترتیب نمونه‌های حاوی ٦ گرم لیپاز گوساله و بزغاله (به ازای ۱۰۰ کیلوگرم شیر مورد استفاده در پنیرسازی)

Figure 1- microstructural images of white brined cheese samples treated with animal lipases at the end of 90 days of storage at refrigerator at 500 magnification level. A) control sample, B and C) are cheese samples containing 6 g kid goat and calf lipases per 100 Kg milk used for cheese making, respectively

نتیجه‌گیری کلی

پنیر، متنوع‌ترین و شاید از نظر علمی جالب‌ترین و چالش‌برانگیزترین گروه از فرآورده‌های لبنی به شمار می‌آید. فرآیند تولید و رسیدن پنیر شامل مجموعه‌ی متعادلی از رویدادهای بیوشیمیایی پیوسته و هم‌زمان است که در صورت هماهنگ و متعادل بودن منجر به تولید فرآورده‌ای با طعم و آرومای بسیار مطلوب می‌شود. نتایج این تحقیق نشان داد که افزودن لیپاز به شیر مورد استفاده در تولید پنیر سفید آب‌نمکی سبب تغییرات معنی‌داری در ویژگی‌های مورد بررسی گردید. عدد اسیدی نمونه‌های تولیدی حاوی لیپاز بزغاله و گوساله در تمامی دوره‌های نگهداری به‌طور معنی‌داری بالاتر از نمونه شاهد (فاقد آنزیم لیپاز) بود ($p<۰/۰۱$) و در این میان، میزان عدد اسیدی نمونه‌های پنیر تیمار شده با آنزیم لیپاز بزی نیز بیش از نمونه‌های پنیر حاوی لیپاز گوساله بود ($p<۰/۰۵$). با افزایش مقدار آنزیم لیپاز بزغاله و گوساله در نمونه‌های پنیر، مقدار تمامی اسیدهای

چرب کوتاه، متوسط و بلند زنجیره افزایش یافت، اما این افزایش در اسیدهای چرب کوتاه زنجیره مشهودتر بود. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که استفاده از آنزیم لیپاز در تولید پنیر سفید ایرانی به‌ویژه در دو ماه ابتدایی نگهداری موجب بهبود بافت و افزایش قابل توجه خواص حسی رایحه و طعم محصول می‌شود. در هرحال، با توجه به نتایج حسی مشخص گردید کیفیت طعم و رایحه نمونه‌های پنیر حاوی بالاترین سطح آنزیم (٦ گرم آنزیم لیپاز به ازای ۱۰۰ کیلوگرم شیر) در پایان ۹۰ روز نگهداری به‌طور محسوسی کاهش می‌یابد که بر این اساس، استفاده از مقدار ٤/٥ گرم لیپاز (بزی یا گاوی) در تولید پنیر سفید آب‌نمکی توصیه می‌گردد.

سپاسگزاری

مقاله حاضر مستخرج از طرح پژوهشی با کد ۹۸۱/٦۲ می‌باشد. لذا نویسندگان مقاله بر خود لازم میدانند از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به دلیل حمایت های مادی و معنوی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

Refrences

1. Akın, N., Aydemir, S, Koça, C., and Yıldız, M.A. 2003. Changes of free fatty acid contents and sensory properties of white pickled cheese during ripening. Food Chemistry. 80(1): 77-83.
2. Aminifar, M., and Emam-Djomeh, Z. 2014. Changes of Texture, Microstructure and Free Fatty Acid Contents of Lighvan Cheese during Accelerated Ripening with Lipase. Journal of Agricultural Science and Technology. 16: 113-123.
3. Aydemir, S., Akın, N. and Kocak, C. 2001. Effect of lipase enzyme on the ripening of white pickled cheese. Journal of Food Lipids. 8: 205-213.
4. Barbieri, G., Bolzoni, L., Careri, M., Mangia, A., Parolari, G., Spagnoli, S. and Virgili, R. 1994. Study of the Volatile Fraction of Parmesan Cheese. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 42: 1170-1176.
5. Danesh, E., Goudarzi, M., and Jooyandeh, H. 2018. Transglutaminase-mediated incorporation of whey protein as fat replacer into the formulation of reduced-fat Iranian white cheese: physicochemical, rheological and microstructural characterization. Journal of Food Measurement and Characterization. 12(4): 2416-2425.
6. David, F., Sandra, P., and Vickers, A.K. 2005. Column selection for the analysis of fatty acid methyl esters. *Research Institute for Chromatography*, Agilent Technology, USA, Available from: URL: https://www.agilent.com/cs/library/applications/5989-3760EN.pdf. Accessed 2020 March 18.
7. De Luca, V., Perottii, M.C., Wolf, I.V., Meinardi, C.A., and Mandrich L. 2019. The addition of the thermophilic esterase EST2 influences the fatty acids and volatile compound profiles of semi hard cheeses. Food Science and Technology. 39 (3): 711-720.
8. Deeth, H.C. 2006. Lipoprotein lipase and lipolysis in milk. International Dairy Journal; 16: 555–562.
9. Downey, W.K., and Andrews, P. 1969. Evidence for the presence of several lipases in cow's milk. The Biochemical Journal. 112 (5): 559–562.
10. Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., and McSweeney, P.L.H. 2017. Editors. Fundamentals of Cheese Science. 2nd eds, Springer, New York, p. 7.
11. Fox, P.F., Law, J., McSweeney, P.L.H., and Wallace, J. 1993. Biochemistry of Cheese Ripening. In: Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology", ed.: Fox, P.F. Chapman and Hall, London, UK, PP. 389-421.
12. 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.

13. Gao, P., Su, Y., Zhang, W., Pang, X., Xie, N., Zhang, M., Lv, J., and Zhang, S. 2022. Chemical and Flavor Characteristics of Enzyme-Modified Cheese Made by Two-Stage Processing. Gels. 8(3): 160, 1-13.
14. Gavaric, D.D.J., Caric, M., and Kalab, M. 1989. Effects of protein concentration in ultrafiltration milk retentates and the type of protease used for coagulation on the microstructure of resulting gels. Food Microstructure. 8: 53–66.
15. Georgala, A., Moschopoulou, E., Aktypis, A., Massouras, Th., Zoidou, E., Kandarakis, I., and Anifantakis, E. 2005. Evolution of lipolysis during the ripening of traditional Feta cheese. Food Chemistry. 93: 73–80.
16. Ha, J.K., and Lindsay, R.C. 1993. Release of Volatile Branched-Chain and Other Fatty Acids from Ruminant Milk Fats by Various Lipases. Journal of Dairy Science. 76: 677-690.
17. 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.
18. Jooyandeh, H. 2022. Application of enzymes in dairy products. 1st ed., Khuzestan Agricultural Sciences and Natural Resources University Press. (In Persian)
19. Jooyandeh, H., and Minhas, K.S. 2009. Effect of addition of fermented whey protein concentrate on cheese yield and fat and protein recoveries of Feta cheese. Journal of Food Science and Technology. 46(3): 221-224.
20. Jooyandeh, H., and Mortazavi, S.A. 2019. Impact of addition of milk powder and microbial transglutaminase on the sensory and textural properties of set yogurt. Food Processing and Preservation Journal. 10(2): 121-136. (In Persian)
21. Jooyandeh, H., Goudarzi, M., Rostamabadi, H., and Hojjati, M. 2017. Effect of Persian and almond gums as fat replacers on the physicochemical, rheological, and microstructural attributes of low- fat Iranian White cheese. Food Science and Nutrition. 5: 669-677.
22. Jooyandeh, H., Kaur, A., and Minhas, K.S. 2009. Lipases in Dairy Industry. Journal of Food Science and Technology. 46(3): 181-189.
23. Karami, M., Ehsani, M.R., Mousavi, S.M., Rezaei, K., and Safari, M. 2009. Changes in the rheological properties of Iranian UF-Feta cheese during ripening. Food Chemistry. 112: 539-544.
24. Kouravand, F., Jooyandeh, H., Barzegar, H., and Hojjati, M. 2018. Characterization of cross-linked whey protein isolate-based films containing *Satureja khuzistanica* Jamzad essential oil. Journal of Food processing and preservation. 42(3): e13557, 1-10.
25. McSeweeney, P.L.H. 2004. Biochemistry of cheese ripening. International Journal of Dairy Technology. 2/3: 127-144.
26. Nunez, M., Garcia-Aser, C., Rodriguez-Martin, M.A., Medina, M., and Gaya, P. 1986. The effect of ripening and cooking temperatures on proteolysis and lipolysis in Manchego cheese. Food Chemistry. 21(2): 115-123.
27. Rezaei, A., Mousakhani, A.R., and Azadmard Damirchi, S. 2015. Effect of microbial Lipase on Physicochemical and sensory properties of Motal Traditional cheese. Iranian Journal of Food Science and Technology. 13(1): 193-202. (In Persian)
28. Solhi, P., Sadeghi Mahoonak, A., Hesari, J., Ghorbani, M., and Alami, M. 2014. Effect of microbial lipase and protease on the flavor development of Iranian UF Feta cheese. Journal of Food Research, 24(2): 201-213. (In Persian)
29. Torabi, F., Jooyandeh, H., and Noshad, M. 2021. Evaluation of physicochemical, rheological, microstructural, and microbial characteristics of synbiotic ultrafiltrated white cheese treated with transglutaminase. Journal of Food Processing and Preservation, 45: e15572, 1-11.
30. Veiskarami, M., Jooyandeh, H., Hojjati, M., Noshad, M., and Mehrnia, M.A. 2020. Textural and microbial properties of cheese analog based on sweet corn extract containing whey- and milk- protein concentrates. Iranian Journal of Biosystem Engineering. 52(2): 183-195. (In Persian)

31. Yazdanpanah, S., Ehsani, M.R., and Mizani, M. 2015. Water Mobility in Accelerated Ripening of UF Feta Cheese. Journal of Agricultural Science and Technology. 17(3): 663-674.
32. Yilmaz, G., Ayar, A., and Akın, N. 2005. The effect of microbial lipase on the lipolysis during the ripening of Tulum cheese. Journal of Food Engineering. 69(3): 269-274.