نشریه فرآوری و نگهداری مواد غذایی
جلد پنجم، شماره اول، ۹۲
۵۹-۷۳
http://ejfpp.gau.ac.ir

بررسی نقش سیستم پلاسمین در پروتئولیز پنیر سفید فراپالایشی

سهیلا کرمانی زاده[۱] و جواد حصاری[۲]*

[۱]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه تبریز،
[۲]دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه تبریز

تاریخ دریافت : ۹۱/۱۲/۱۹ ؛ تاریخ پذیرش : ۹۲/۰۸/۱۶

چکیده

رسیدن پنیر به‌ویژه پنیرهای تهیه شده به روش فراپالایش فرآیند زمان‌بر، آهسته و مداومی است که هنوز مکانیسم آن به‌طور کامل شناخته نشده است. نقش سیستم پلاسمین به لحاظ پیچیدگی این سیستم آنزیمی و نسبتاً نوین بودن روش فراپالایش در این بین چندان روشن نیست. به‌علت هزینه بالای رسیدن پنیر در سطح تجاری تلاش‌هایی برای پیدا کردن راهی به‌منظور کاهش زمان رسیدن و تکوین سریع‌تر عطر و طعم خاص پنیر، به‌ویژه در پنیرهای تهیه شده به روش فراپالایش صورت گرفته است که از میان این روش‌ها می‌توان به استفاده از آنزیم‌های خارجی اشاره کرد. نمونه‌های پنیر سفید فراپالایشی با استفاده از رتنتیت تهیه شده از شیر گاو حاوی فعال‌کننده پلاسمینوژن از نوع اروکیناز تهیه شد. به‌منظور بررسی دقیق‌تر اثر فعالیت پلاسمین بر ویژگی‌های پنیر، هم‌زمان نمونه‌های پنیر حاوی بازدارنده فعالیت پلاسمین از نوع ٦-آمینو هگزانوئیک اسید نیز تهیه گردید. اثر حضور فعال‌کننده و بازدارنده پلاسمین بر پروتئولیز و فعالیت پلاسمین نمونه‌های پنیر سفید فراپالایشی در طول مدت رسیدن ٦٠ روزه بررسی شد. افزودن اروکیناز به رتنتیت با افزایش تبدیل پلاسمینوژن به پلاسمین فعالیت پلاسمین را به‌طور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) افزایش داد و در نتیجه پروتئولیز اولیه در پنیر تسریع شد. حضور بازدارنده و به‌خصوص فعال‌کننده در پنیر توانست تغییرات معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) در مقادیر ازت محلول در pH =٤/٦ و ازت محلول در تری‌کلرواستیک‌اسید ۱۲ درصد (ازت غیرپروتئینی) پنیرها ایجاد نماید. پروفیل پروتئینی که به روش اوره-پلی‌آکریل آمید ژل الکتروفورز بررسی شد از افزودن فعال کننده و بازدارنده متاثر گردید.

*مسئول مکاتبه: jhesari@tabrizu.ac.ir

نتایج به‌دست آمده از آزمایش‌ها نشان داد میزان فعالیت پلاسمین تاثیرات معنی‌داری ($P<0/05$) بر سرعت رسیدن پنیر فراپالایشی دارد و با افزایش فعالیت پلاسمین می‌توان ظهور و بروز علائم رسیدن را تشدید و تسریع نمود.

واژه‌های کلیدی: پنیر سفید فراپالایش، پلاسمین، اروکیناز، ٦-آمینوهگزانوئیک اسید، تسریع رسیدن

مقدمه

امروزه فرآوری شیر و تولید فرآورده‌های لبنی با کیفیت عالی، نیازمند دانش و فناوری پیشرفته است (رشیدی، ۲۰۰٦). یکی از روش‌های نوین تولید پنیر استفاده از سیستم فراپالایش است. مزایای قابل ملاحظه این پنیرها به‌ویژه بازده تولید بالا توجیه‌گر موفقیت سیستم اولترافیلتراسیون در زمینه تولید پنیر است (حصاری و همکاران، ۲۰۰٦). به‌کارگیری تکنولوژی فرآیندهای غشایی در صنعت پنیر، به‌طور گسترده‌ای مورد تحقیق قرار گرفته است (گرین و همکاران، ۱۹۸۱). مشکلات و معایبی مانند نواقص بافتی و ترکیبی در تولید پنیرهای سفت و نیمه‌سفت از شیر فراپالایش مشاهده شده است. (فاکس، ۱۹۸۹). پنیرهای فتای فراپالایشی تولیدی در ایران نیز در مقایسه با پنیرهای سنتی با معایب عدیده‌ای مانند رسیدن بسیار خفیف و بنابراین نداشتن طعم محسوس پنیرهای رسیده و ماندگاری پایین (به‌طور معمول کمتر از ۳ ماه) مواجه‌است که از بازارپسندی این فراورده به شدت می‌کاهند و خسارات مالی قابل ملاحظه‌ای را برای تولیدکنندگان به بار می‌آورند (فتح‌الهی، ۲۰۰۱). محتوای زیاد پروتئین‌های سرمی در پنیرهای فراپالایش، سبب بروز مشکلات و معایبی در روند رسیدن و ویژگی‌های بافتی می‌شود (کرمی و همکاران، ۲۰۰۹). شیر و پنیر حاوی سیستم پلاسمین هستند که سیستم پیچیده‌ای متشکل از پلاسمینوژن (PG)، پلاسمین (PL)، فعال کننده‌های پلاسمینوژن (PAs)، بازدارنده‌های پلاسمین (PIs) و بازدارنده‌های فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن (PAIs) است (وربرینک و هایس، ۲۰۰٦ب). زنجیره واکنش‌هایی که به فعال‌سازی پلاسمینوژن منتهی می‌شود، با شبکه تو در تو و پیچیده‌ای از واکنش‌های مولکولی بین فعال‌کننده‌ها و بازدارنده‌ها، سازماندهی می‌شود (پولیتیس، ۱۹۹٦). آنچه که در نهایت با ترکیبات شیر وارد عمل می‌شود خود پلاسمین (PL) است. پلاسمین به علت عملکرد هیدرولیتیکی بر روی کازئین، بر کیفیت تمامی فرآورده‌های لبنی به‌ویژه پنیر تأثیر دارد (کرودن و همکاران، ۲۰۰۵). تاثیر حضور پروتئین‌های آب پنیر بر توانایی پلاسمین در هیدرولیز کازئین‌ها توسط بررسی شده است. از نظر

تجاری سرعت عمل در مرحله رسیدن پنیر اهمیت زیادی دارد و افزایش آن می‌تواند کمک بزرگی به تولیدکنندگان باشد (مرتضوی، ۲۰۰۷).

در بین واکنش‌های بیوشیمیایی رسیدن پنیر، پروتئولیز اهمیت زیادی دارد. پروتئولیز را در این مرحله می‌توان به دو بخش تقسیم کرد: پروتئولیز اولیه و پروتئولیز ثانویه. در پروتئولیز اولیه میسل‌های کازئین توسط آنزیم‌های شیر مثل پلاسمین و کیموزین به پپتیدهای کوچکتر شکسته می‌شود (مرتضوی و همکاران، ۱۹۹۷). پروتئولیز اولیه کازئین‌ها توسط آنزیم‌های منعقد کننده انجام می‌شود و آنزیم‌های آغازگر تا حد کمی در پروتئولیز اولیه شرکت می‌کنند. پروتئولیز اولیه در پنیر به‌طور اساسی مربوط به فعالیت کیموزین روی α_{s1}-کازئین و اثر پلاسمین روی β-کازئین است (حصاری و همکاران، ۲۰۰٦). پروتئولیز اولیه منجر به تولید پپتیدهای درشت نامحلول در آب و پپتیدهای ریز محلول در آب می‌گردد. بسیاری از پپتیدهای محلول در آب جداسازی و شناسایی شده‌اند. پلاسمین در پروتئولیز اولیه‌ی کازئین‌ها در طول رسیدن بسیاری از پنیرها به‌ویژه انواعی از پنیر که متحمل دماهای بالای پخت می‌شوند مشارکت می‌کند (فاکس، ۱۹۹۳). پلاسمینوژن شکل غیرفعال پلاسمین است که توسط دو نوع فعال‌کننده به نام‌های "فعال‌کننده نوع اروکینازی" و "فعال‌کننده نوع بافتی" به‌صورت فعال (PL) تبدیل می‌شوند (بوربرینک و هایس، ۲۰۰٦). اروکیناز (۵۵ کیلو دالتون) یک نوع سرین پروتئاز است و از دو قسمت که توسط پیوند دی‌سولفید به‌هم اتصال یافته‌اند، تشکیل شده است. اروکیناز پلاسمینوژن را از دو ناحیه برش می‌دهد و تبدیل به پلاسمین فعال می‌نماید (گروفوتی و فاکس، ۱۹۸۸). افزودن اروکیناز به شیر پنیرسازی به‌طور مؤثری فعالیت پلاسمین را از طریق تبدیل پلاسمینوژن به‌صورت فعال آن، افزایش می‌دهد. فعال‌سازی پلاسمینوژن در اساس طی ایجاد لخته و در ٢٤ ساعت آغاز رسیدن انجام می‌پذیرد. بالا رفتن فعالیت پلاسمین منجر به تسریع پروتئولیز اولیه می‌شود که از میزان ازت محلول در آب و پروفیل پپتیدی قابل بررسی است (بارت و همکاران، ۱۹۹۹).

مواد و روش‌ها

روش تهیه پنیر: سه نوع پنیر سفید UF (دو تیمار و شاهد) در چهار تکرار (٤ روز پنیرسازی از چهار نوع شیر خام متفاوت) در کارخانه پنیر UF پگاه آذربایجان شرقی تهیه شد. در هر روز تولید پنیر، به ۵ لیوان رتنتیت، آنزیم اروکیناز (۱ U/ml) و به ۵ لیوان ٦-آمینوهگزانوئیک اسید (۱/۵درصد وزنی- وزنی) اضافه شد و ۵ لیوان نیز به‌عنوان شاهد بدون افزودن هیچ‌یک از این دو ترکیب تهیه شدند. سپس با افزودن مایه

پنیر فروماز (حاصل از قارچ موکور مهی، تولید فرانسه) به شکل محلول ۰/۰۸۵ درصد (وزنی- حجمی) و آغازگر ترموفیل-مزوفیل، مخلوط گونه‌های ترموفیل *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و گونه‌های مزوفیل *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *کرموریس* و *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *لاکتیس* به نسبت ۱ به ۷ (۱۰۰۰ ml/۱۰۰l) انعقاد رتنتیت و تولید پنیر انجام شد.

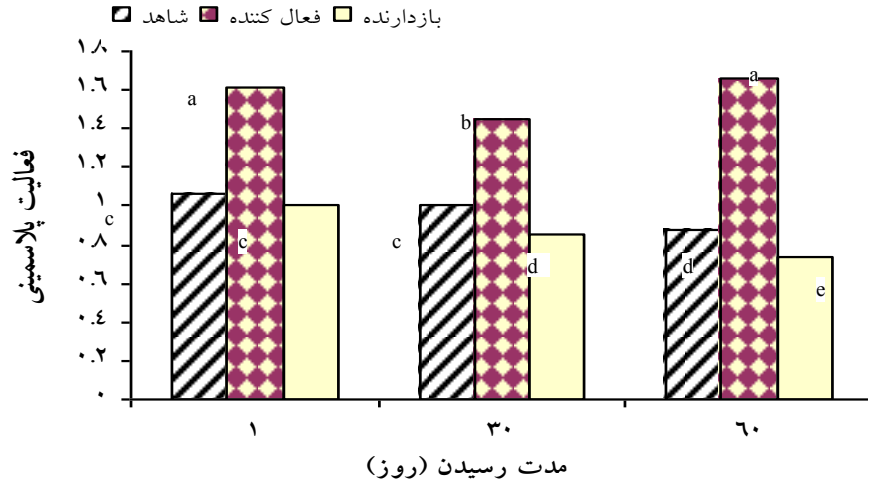
ارزیابی پروتئولیز: نیتروژن محلول در pH=٤/٦ و نیتروژن محلول در تری‌کلرواستیک‌اسید (ازت غیرپروتئینی) پنیر به روش کوچرو و فاکس (۱۹۸۲) اندازه‌گیری شد. جهت اندازه‌گیری SN نمونه‌های ۳۰ گرمی در آب مقطر همگن شد و pH نمونه‌ها با استفاده از محلول HCl (مرک، آلمان) و NaOH (مرک، آلمان) ۲ نرمال در pH= ٤/٦ تنظیم شد. پس از تنظیم مجدد pH، نمونه‌ها در گرم‌خانه ٤٠ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده و سپس سانتریفوژ (۳۵۰۰×g) گردیدند. نمونه‌ها با استفاده از کاغذ صافی واتمن ٤٢ صاف شدند و SN به روش کجلدال اندازه‌گیری شد. به ۲۰ میلی‌متراز محلول صاف شده ۵ میلی‌لیتر محلول تری‌کلرواستیک‌اسید ٦٠ درصد اضافه و پس از ۱۰ دقیقه سانتریفوژ در ۵۰۰۰×g محلول رویی صاف و مقدار ازت غیرپروتئینی به روش کجلدال اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری ازت کل هم از روش کجلدال استفاده شد. درجه هیدرولیز سیستم کازئینی پنیر طی دوره رسیدن به روش الکتروفورز (شلابی و فاکس، ۱۹۸۷) ارزیابی شد.

فعالیت پلاسمین: فعالیت پلاسمین به روش فلوریمتری در طول‌موج برانگیزاننده ٤٦٠ نانومتر و طول‌موج نشری ۳۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. با تطابق دادن داده‌های حاصل از فلوریمتری نمونه‌ها با منحنی استاندارد، غلظت AMC (7-amido-4-methyl coumarin) موجود در نمونه در بازه‌ی زمانی سپری شده بدست آمد. یک واحد فعالیت پلاسمین، فعالیت لازم جهت آزاد شدن یک نانومول AMC در هر دقیقه در هر میلی‌لیتر از نمونه (تحت شرایط آزمایش) تعریف گردید (ریچاردسون و پیرسن، ۱۹۸۱).

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های حاصل از آزمایش‌ها براساس طرح اسپلیت پلات بر پایه بلوک‌های کامل تصادفی تجزیه شدند. آزمون مقایسه میانگین‌ها با روش LSD در سطح احتمال یک درصد انجام گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها و مقایسه میانگین تیمارها توسط نرم‌افزار MSTAT-C و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel صورت گرفت.

نتایج و بحث

فعالیت پلاسمین: نتایج اندازه‌گیری فعالیت پلاسمین در نمونه‌های پنیر آزمایشی بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار ($P<0/01$) بین تیمارها و روزهای رسیدن از لحاظ فعالیت پلاسمین بود. اثر افزودن فعال‌کننده در افزایش فعالیت پلاسمین محسوس‌تر از اثر بازدارنده در کاهش فعالیت پلاسمین بوده است. بیشترین تغییر در فعالیت پلاسمین در روزهای آغازین دوره رسیدن به وقوع پیوسته بود و در ادامه دوره رسیدن عموما همان سطح ابتدایی حفظ شده و یا اندکی کاهش یافته بود، غیر از نمونه‌های حاوی فعال‌کننده که پس از کاهش رخ داده تا روزه ۳۰، در سی روزه بعدی اندکی افزایش فعالیت پلاسمینی مشاهده شد. مطابق نتایج (شکل ۱) به‌دست آمده افزودن مقدار جزیی فعال‌کننده پلاسمین توانسته است در همان روزهای آغازین رسیدن فعالیت پلاسمین را در نمونه‌های حاوی فعال‌کننده افزایش دهد و عدد این فعالیت را در روز اول اندازه‌گیری به بیش از ۱/٦۰ رساند. آنچه در نمونه‌ها بوقوع پیوسته است را می‌توان این‌گونه شرح داد که در نمونه‌های پنیرِ شاهد سیستم پلاسمین به‌علت فرایندهای اعمال شده و به‌ویژه به‌دلیل حضور پروتئین‌های آب‌پنیری دچار نقصان عملکرد می‌باشد، به‌عبارتی پروتین‌های درشت سرمی پیوندهایی هم با کازئین‌ها از جمله بتاکازئین، و هم با اجزای سیستم پلاسمین، از جمله فعال‌کننده‌ها به‌ویژه اروکیناز و خود پلاسمین ایجاد نموده و به این ترتیب امکان دسترسی هر یک از این آنزیم‌ها را به سوبسترای خود محدود نموده و با موانعی روبرو می‌سازد که در نهایت پایین بودن فعالیت پلاسمین را در پنیرهای فراپالایش در مقایسه با دیگر انواع پنیر به دنبال دارد. در نمونه‌های حاوی فعال‌کننده افزودن مقدار ناچیزی اروکیناز پس از فرایندهای حرارتی و تغلیظ اعمال شده، توانسته بود پلاسمینوژن قابل دسترس را که در رتنتیت مقدار قابل‌توجهی دارد فعال نموده و با بالا بردن درصد پلاسمین که صورت فعال پلاسمینوژن است فعالیت پلاسمینی را افزایش دهد. کاهش مشاهده شده در ادامه رسیدن در تمامی تیمارها و نیز در پنیرهای شاهد کاملا طبیعی و قابل انتظار است و این به‌دلیل کاهش pH در طی رسیدن و دیگر واکنش‌های دوره رسیدن است که در مجموع رفته‌رفته شرایط کلی و از جمله pH را برای فعالیت پلاسمین و بقیه اجزای سیستم پلاسمین نامساعد می‌سازد. پلاسمین، فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن و غالب اجزای سیستم پلاسمین در محیط‌های قلیایی و خنثی بیشترین فعالیت را از خود بروز داده (کرودن و همکاران، ۲۰۰۵) و با کاهش pH به سمت اسیدی شدن، از فعالیت همگی به میزان چشمگیری کاسته می‌شود.



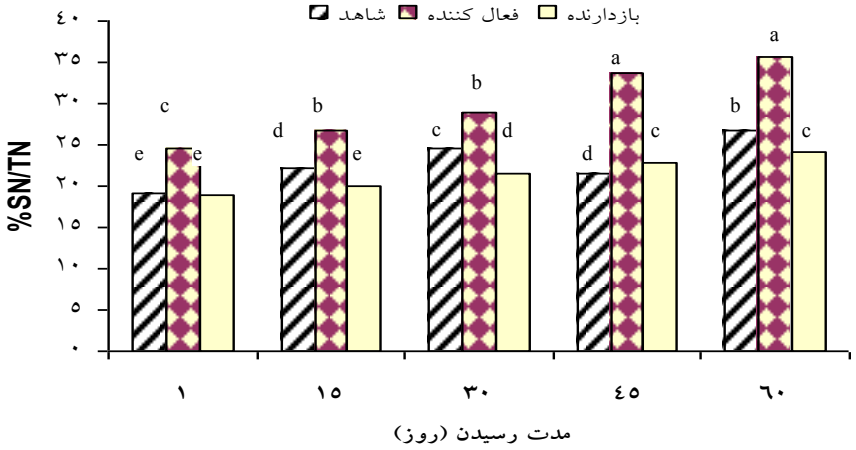
شکل ۱- تغییرات فعالیت پلاسمین در طول رسیدن

اما دلیل بازدارندگی کمتر از انتظار ٦-آمینوهگزانوئیک اسید در نمونه‌های پنیر حاوی بازدارنده را می‌توان این‌گونه توضیح داد که هرچند در این نمونه‌ها در مقایسه با نمونه‌های پنیر شاهد اندکی کاهش در فعالیت پلاسمین رخ داده بود، ولی در واقع در مقایسه با پتانسیل فعالیت پلاسمینی موجود در پنیر کاهش فاحشی را به‌دنبال داشته است. به‌عبارت دیگر فعالیت پلاسمینی در نمونه‌های شاهد که خود پنیرهایی فراپالایشی هستند آنقدر کم است که از لحاظ کاستن از فعالیت پلاسمینی با نمونه‌هایی که بازدارنده پلاسمینِ افزوده دارند قرابت بسیار نزدیکی نشان دادند. باستین و همکاران پنیر سوئیسی را از شیر معمولی و شیر حاوی اروکیناز در سطح کم و شیر حاوی اروکیناز در سطح زیاد تولید کردند و مشاهده نمودند که فعالیت پلاسمینی در پنیر سوئیسی که از شیر با اروکیناز افزوده‌ی زیاد تولید شده بود افزایش یافت. باستین و همکاران (۱۹۹۱) در پژوهش دیگری پنیرهای سنت پالین و هاوارتی را به دو روش مرسوم و UF تولید نمودند و قبل از تولید هر دو پنیر به رتنتیت اروکیناز افزودند. تحقیقات آنها نشان داد که فعالیت پلاسمین در پنیرهای سنتی بیشتر از پنیرهای UF است. در پنیرهای سنتی فعالیت پلاسمین در طول رسیدن ثابت باقی ماند در حالی که در نوع UF حتی با افزودن اروکیناز، فعالیت پلاسمین با سپری شدن دوره رسیدن کاهش یافت و این کاهش در دو ماه اول خیلی سریع‌تر از دو ماه بعدی بود. بارت و همکاران (۱۹۹۹) طی پژوهشی در تولید پنیر چدار، آنزیم اروکیناز را در مقادیر

مختلف به شیر افزودند تا امکان تسریع پروتئولیز طی رسیدگی پنیر را از طریق تبدیل پلاسمینوژن شیر به پلاسمین بررسی کنند. افزودن اروکیناز به شیر به میزان قابل توجهی فعالیت پلاسمینی را در پنیر افزایش داد و به‌دنبال آن سطح پلاسمینوژن و نسبت پلاسمینوژن به پلاسمین کاهش یافت.

تغییرات درصد ازت محلول در pH= ٤/٦ به ازت کل (فاکتور رسیدن پنیر): سطح ازت محلول در pH=٤/٦، به‌عنوان معیاری از میزان پروتئولیز اولیه و فاکتور رسیدن در پنیر اندازه‌گیری می‌شود [بارت و همکاران، ١٩٩٩]. نتایج حاصل (شکل ٢) از تجزیه واریانس داده‌های مربوطه نشان داد که اثر نوع تیمار و زمان رسیدن (P<٠/٠١) و هم‌چنین اثر متقابل این دو فاکتور تأثیر معنی‌داری (P<٠/٠٥) روی تغییرات درصد ازت محلول در pH=٤/٦ به ازت کل (pH=٤/٦-SN/TN) طی ٦٠ روز رسیدن سه نمونه پنیر آزمایشی داشت. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین ازت محلول متعلق به روز ٦٠ رسیدن پنیرهای حاوی اروکیناز و کمترین متعلق به روز اول رسیدن تیمار حاوی بازدارنده بود. فاکتور رسیدن در نمونه‌های پنیر شاهد تا روز ٣٠ رسیدن دارای روند صعودی بود. این روند پس از روز ٣٠ آهنگ آهسته‌تری یافت و تقریبا به روند ثابت رسید. ولی در نمونه پنیر حاوی فعال‌کننده سیر صعودی همچنان تا روز ٦٠ رسیدن ادامه داشته است. ازت محلول در تمامی نمونه‌ها در طول رسیدن افزایش یافت ولی میزان و شدت افزایش در تیمارها و نمونه‌های شاهد یکسان نبوده است. در نمونه‌های حاوی فعال‌کننده سرعت افزایش بسیار بیشتر از سایر نمونه‌ها بوده است. در رابطه با ازت محلول نیز همچون فعالیت پلاسمینی که قبلا شرح داده شد تاثیر حضور فعال‌کننده و بازدارنده از روزهای آغازین رسیدن مشهود است. به‌عنوان مثال ١٥ روز پس از تولید درصد ازت محلول در پنیرهای حاوی فعال‌کننده ٢٦/٦٥، در نمونه‌های شاهد ٢٢/٢٤ و در پنیرهای حاوی بازدارنده ٢٠/٠٤ مشاهده شد. در روزه ٦٠ رسیدن در نمونه‌های حاوی فعال‌کننده، شاهد و حاوی بازدارنده درصد ازت محلول به‌ترتیب ٣٥/٧٠ ، ٢٦/٦٩ و ٢٤/١٥ بود که نمایانگر تفاوت در سرعت افزایش در نمونه‌های مختلف است. بازدارنده موجود در نمونه‌ها نتوانسته است فعالیت پایین پلاسمین در پنیر فراپالایش را چندان کاهش دهد. هر چند که تفاوت موجود در درصد ازت محلول نمونه‌های شاهد و بازدارنده معنی‌دار (P<٠/٠٥) بود. در همه نمونه‌ها و حتی در تیمار حاوی بازدارنده‌ی فعالیت پلاسمین، از روز اول تا روزه ٦٠ درصد ازت محلول افزایش یافته است. و در همه‌ی تیمارها روند افزایش در ابتدا (٣٠ روزه اول) سریعتر بوده است. در تیمار آنزیمی افزایش درصد ازت محلول در مقایسه با نمونه‌های شاهد و نمونه‌های حاوی بازدارنده شتاب بیشتری داشته است. تاثیر بازدارنده در نمونه‌های حاوی ٦-آمینوهگزانوئیک اسید در طول رسیدن شدت بیشتری یافته

است و سرعت افزایش در نمونه‌های حاوی بازدارنده بسیار کمتر از نمونه‌های شاهد بود، بنابراین برعکس فعال‌کننده که از همان ساعات آغازین رسیدن اثرات حضور خود را نشان داده است، در تیمار محتوی بازدارنده هر چه که به انتهای رسیدن پیش رفته‌است بازداری تاثیر بیشتری داشته است.

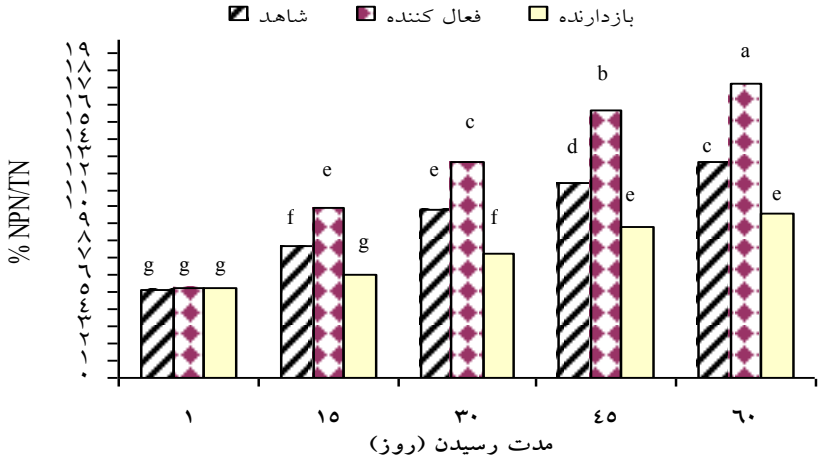


شکل ۲-تغییرات ازت محلول در طول رسیدن

افزایش pH ٤/٦-SN در پنیرهای با اروکیناز افزوده، بیش از پنیرهای شاهد بود و این موضوع نشان می‌دهد که سرعت تولید pH ٤/٦SN با افزایش فعالیت پلاسمین، بالاتر می‌رود. این نتیجه در تطابق کامل با نتایجی است که بارت و همکاران در سال ۱۹۹۹ گزارش کردند. پلاسمین به‌عنوان عاملی در تولید - pH ٤/٦SN در پنیر شناخته شده است (مک‌سووینی و همکاران، ۱۹۹٤) و افزودن پلاسمین به شیر پنیرسازی موجب افزایش متناسبی در سطح WSN می‌شود [فارکی و فاکس، ۱۹۹۲]. پروتئولیز اولیه در پنیر عموماً مربوط به فعالیت کیموزین روی α_{s1}-کازئین و اثر پلاسمین روی β-کازئین است و آنزیم‌های آغازگر تا حد کمی در پروتئولیز اولیه شرکت می‌کنند (حصاری و همکارن، ۲۰۰٦).

تغییرات درصد ازت محلول در تری کلرو استیک اسید ۱۲ درصد به ازت کل (ازت غیرپروتئینی): یکی از روش‌های متداول برای بررسی پروتئولیز ثانویه در پنیر اندازه‌گیری کمی پپتیدهای محلول در تری کلرواستیک اسید ۱۲درصد (ازت غیرپروتئینی) است. مهم‌ترین مواد تشکیل دهنده ازت غیرپروتئینی، اوره، اسیدهای آمینه و پپتیدها هستند که در طول پروتئولیز ثانویه پنیر تولید می‌شوند، بنابراین افزایش

این عامل طی رسیدن پنیر نشان‌دهنده تولید ترکیبات مذکور در نتیجه افزایش روند پروتئولیز ثانویه در پنیرهای آزمایشی است. این ترکیبات به‌عنوان پیش‌ساز ترکیبات عطر و طعم به‌طور مستقیم و غیرمستقیم در ایجاد عطر و طعم نهایی پنیر شرکت می‌کنند (میکائیلید و همکاران، ۲۰۰۳). نتایج نشان داد که میان سه نوع پنیر از نظر درصد ازت غیرپروتئینی به ازت کل (NPN/TN) تفاوت معنی‌داری ($P<0/01$) وجود داشت به‌طوری‌که در هر مقطع زمانیِ رسیدن پنیر حاوی فعال‌کننده بیشترین میزان ازت غیرپروتئینی و پنیر حاوی بازدارنده کمترین مقدار ازت غیرپروتئینی را داشت.



شکل ۳-تغییرات ازت غیرپروتئینی در طول رسیدن

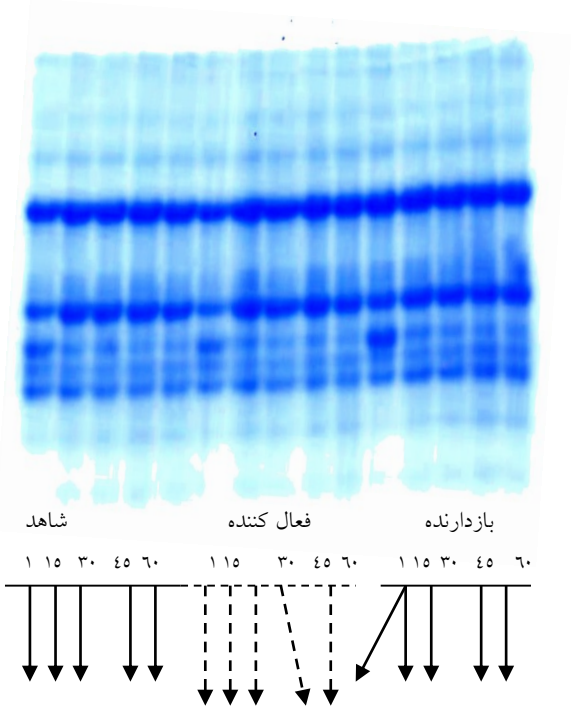
هم‌چنین فواصل زمانی مختلف طی رسیدن و اثر متقابل این دو فاکتور تأثیر معنی‌داری ($P<0/01$) بر این فاکتور داشتند. به‌طوری‌که در شکل ۳ مشاهده می‌شود درصد ازت غیرپروتئینی پنیرها در طی دوره رسیدن به‌تدریج افزایش یافت. افزایش قابل ملاحظه NPN در پنیر حاوی اروکیناز را می‌توان به تقویت فعالیت پلاسمین نسبت داد. این نتایج در تطابق کامل با فعالیت پلاسمینی بیشتری است که در پنیرهای تولید شده از شیر حاوی اروکیناز از سوی بارت و همکاران (۱۹۹۹) گزارش شده است.

تفاوتی که در اندازه‌گیری درصد ازت غیرپروتئینی نسبت به نتایج حاصل از اندازه‌گیری‌های قبلی مهم‌تر جلوه می‌کند میزان تقریبا برابر ازت غیرپروتئینی موجود در روز اول در هر دو تیمار و حتی در

نمونه شاهد است. افزایش فعالیت پلاسمین و در پی آن افزایش درصد ازت محلول که حتی در روز اول رسیدن نمود داشت، افزایشی در درصد ازت غیرپروتئینی درپی نداشته است.

در ادامه روند رسیدن در روزهای ۱۵، ۳۰، ٤٥ و ٦٠ همواره درصد ازت غیرپروتئینی گزارش شده برای نمونه‌های حاوی فعال‌کننده در مقایسه با نمونه‌های شاهد در سطح بالاتری بود و در مقابل درصد ازت غیرپروتئینی گزارش شده برای نمونه‌های حاوی بازدارنده در مقایسه با نمونه‌های شاهد و مسلماً در مقایسه با نمونه‌های حاوی فعال‌کننده نیز کمتر بوده است و در مورد درصد ازت غیرپروتئینی نیز، درصد افزایش در اثر حضور اروکیناز بسیار شدیدتر و محسوس‌تر از درصد کاهش ناشی از حضور ٦-آمینوهگزانوئیک اسید بود. مثلا در روز ٤٥ رسیدن درصد ازت غیرپروتئینی برای نمونه‌های حاوی فعال‌کننده، شاهد و حاوی بازدارنده به‌ترتیب ۱۵/٦۲، ۱۱/٤۰و ۸/۸۳ گزارش شد. که علت این پدیده از یک سو خاصیت خود کاتالیزی اروکیناز و پلاسمین در سیستم پلاسمین و از سوی دیگر پایین بودن فعالیت پلاسمین و به‌دنبال آن پایین بودن درصد ازت غیر پروتئینی در پنیر فراپالایشی (شاهد) است.

بررسی درجه هیدرولیز سیستم کازئینی: ساختار لخته‌ی پنیرهای تازه را شبکه‌ی پروتئینی تشکیل می‌دهد. شبکه پروتئینی قسمتی از ساختار اصلی خود را در طی رسیدن پنیر از دست می‌دهد. الکتروفورز می‌تواند برای اندازه‌گیری وضعیت پروتئین در مراحل مختلف رسیدن مفید باشد. این روش باعث شناسایی پروتئین‌های تجزیه شده، و به مقدار کمتر پروتئازهای موجود می‌شود. استفاده مهم دیگر شناسایی ترکیبات مختلف با درصدهای مختلف در طی مراحل رسیدن است. به‌نظر می‌رسد که شدت آرومای پنیر با ترکیبات نیتروژنی محلول به‌ویژه پپتیدهای کوچک و اسیدهای آمینه در ارتباط است (گروپین و همکاران، ۱۹۸۵). به‌منظور ارزیابی فرآیند پروتئولیز از الکتروفورز روی ژل اوره پلی‌آکریل‌آمید استفاده شد. برای این کار کازئین سه نوع پنیر آزمایشی در پنج فاصله زمانی رسیدن شامل روز اول، روزهای ۱۵، ۳۰، ٤٥ و ٦٠ استخراج شد. همان‌طورکه در شکل ٤ مشخص است، در طی مدت رسیدن پنیر حاوی فعال‌کننده نسبت به پنیر شاهد دارای پروتئولیز شدیدتر و تجزیه بیشتر کازئین‌ها بود. افزون بر این، β-کازئین در نمونه پنیر حاوی فعال‌کننده، متحمل هیدرولیز بیشتری گردید. چرا که در پنیرهای شاهد پروتئین‌های سرمی و در پنیرهای حاوی بازدارنده، هم پروتئین‌های سرمی و هم بازدارنده از فعالیت پلاسمین جلوگیری می‌کنند. در حالی که عاملی به‌منظور جبران این ممانعت‌ها وجود ندارد.



شکل٤- الکتروفروگرام نمونه‌های یکی از تکرارها در طول رسیدن (روزهای ۱، ۱۵، ۳۰، ٤٥ و ٦۰)

دست‌یابی به فعالیت پلاسمینی بیشتر منجر به شتاب‌گیری پروتئولیز اولیه می‌شود. همان‌طورکه در شکل ٤ می‌توان مشاهده کرد، تجزیه β-کازئین در نمونه‌های شاهد و نمونه‌های حاوی بازدارنده طی ٦۰ روز رسیدن چندان محسوس نبود. پلاسمین که بیشترین نقش را در تجزیه β- کازئین برعهده دارد در پنیرهای UF تحت تاثیر عوامل بازدارنده موجود به‌ویژه بتالاکتوگلوبولین مهار می‌شود و همین عامل مسئول کاهش تجزیه β-کازئین در این پنیرها است. در سال ۱۹۹۳ بچ نتایج مشابهی گزارش نموده است. درحالی‌که در نمونه حاوی فعال‌کننده، هیدرولیز بیشتری در این زمینه مشاهده می‌شود. به‌نظر می‌رسد که تشدید فعالیت پلاسمین توسط فعال‌کننده‌ی به‌کار رفته در این آزمایش تا حدی توانسته است مهار فعالیت پلاسمین را جبران نموده و تجزیه بیشتر β-کازئین را در پی داشته است. همان‌طور که مشخص است α_{s1}- کازئین نسبت به β-کازئین در تمامی نمونه‌های پنیر هیدرولیز بیشتری نشان داد. ترکیبات مولکولی

با حرکات الکتروفورزی زیادتر که از تجزیه α_{s1}- کازئین مشتق شده‌اند، از فعالیت پلاسمین شیر، آنزیم‌های میکروبی و آنزیم‌های موجود در مایه پنیر حاصل می‌شوند. به‌طور کلی میزان هیدرولیز بتا-کازئین تقریبا در تمام انواع پنیرها به‌خصوص پنیر UF آهسته‌تر از α_{s1}- کازئین صورت می‌گیرد (دیدری و فرهنودی، ۲۰۰۰). هیدرولیز α_{s1}-کازئین که اساسا توسط آنزیم‌های مایه پنیر صورت می‌گیرد در پنیرهای UF کمتر مهار می‌شود. رنت باقی‌مانده در لخته پس از آب‌گیری آب پنیر شاید مسئول تجزیه اولیه کازئین‌ها به‌ویژه α_{s1}- کازئین باشد. این نوع کازئین منجر به تشکیل پپتیدهای با وزن ملکولی بالا می‌شود (گروپین و همکاران، ۱۹۸۵؛ الیفه و دالی، ۱۹۷٦). مقدار زیاد رنت افزوده شده به پنیر برای تسریع کوآگولاسیون یا شرایط ضعیف اسیدی منجر به تجزیه زیاد α_{s1}-کازئین می‌شود (فوتنچا و همکاران، ۱۹۸۹). باستین و همکاران (۱۹۹٦) مشاهده کردند که هیدرولیز بتاکازئین در ابتدا (هفته‌ی ششم) در پنیرهایی که از شیر با اروکیناز افزوده‌ی زیاد تولید شده بودند بسیار سریع بود ولی در پایان هفته ٢٤ (ماه ششم) بین تیمارها و پنیر شاهد از نظر میزان بتاکازئین دست نخورده تفاوتی وجود نداشت. افزون بر این در طول هفته‌ی ششم تا هفته بیست و چهارم، تغییر قابل ملاحظه‌ای در میزان گاماکازئین مشاهده نشد. گاماکازئین در طول زنجیره‌ی واکنش‌های پروتئولیتیکی رسیدن پنیر، پپتیدی حد واسط، هم به لحاظ اندازه و هم به لحاظ سوبسترایی به‌شمار می‌رود. گاماکازئین، از بتاکازئین تولید می‌شود و در ادامه‌ی واکنش‌های پروتئولیتیکی خود به پپتیدهای بسیار کوچکتر و اسیدهای آمینه هیدرولیز می‌شود (باستین و همکاران، ۱۹۹٦).

نتیجه‌گیری

با درنظرگرفتن نتایج حاصل از این پژوهش، نقش سیستم پلاسمین در فرآیند رسیدن پنیرهای فراپالایشی غیر قابل اغماض و تاثیرگذار می‌نماید. افزودن مقدار جزیی فعال‌کننده پلاسمین توانست در همان روزهای آغازین رسیدن فعالیت پلاسمین را در نمونه‌های حاوی فعال‌کننده افزایش دهد. افزایش pH ٤/٦-SN به‌عنوان شاخص رسیدن در پنیرهای با اروکیناز افزوده، بیش از پنیرهای شاهد بود و این موضوع نشان می‌دهد که سرعت تولید pH ٤/٦-SN با افزایش فعالیت پلاسمین، شدت می‌یابد و این نویدی بر امکان بهبود پنیرهای تولید شده به روش فراپالایش و رفع معایب این دسته از پنیرها از طریق دست‌کاری حساب شده و علمی این سیستم پیچیده است.

منابع

Barrett, F.M., Kelly, A.L., Mcseweeney, P.H., and Fox, P.F. 1999. Use of exogenouse urokinase to accelerate proteolysis in cheddar cheese during ripening, *International Dairy Journal*, 9: 421-427.

Bastian, E.D., Hansen, K.G. & Brown, R.J. 1993. Inhibition of plasmin by β-lactoglobulin using casein and a synthetic substrate. *Journal of Dairy Science*, 76: 3354-3361.

Bastian, E.D., Hansen, K.G., and Browm, R.J. 1991. Activation of plasmin with urokinase in ultrafiltered milk for cheese manufacture. *Journal of Dairy Science*, 74: 3669-3676.

Bastian, E.D., Lo, C.G., and David, K.M.M. 1996. Plasminogen activation in cheese milk: Influnce on Swiss cheese ripening. Journal of Dairy Science, 80, 245-251.

Bech, A.M. 1993. Characterising ripening in UF-cheese. *International Dairy Journal,* 3: 329-342.

Burbrink, C.N., and Hayes, K.D. 2006. Effect of thermal treatment on the activation of bovine plasminogen. *International Dairy Journal*, 16: 580–585.

Crodden, A., Fox, P.F., and Kelly, A. 2005. Factors affecting the hydrolytic action of plasmin in milk. *International Dairy Journal*, 15: 305-313.

Didri, M. and Farahnoodi, F. 2000. Usage of ultrafiltration in dairy industry. Dairy industries of Iran Co.

Farkye, N.Y., and Fox, P.F. 1992. Contribution of plasmin to Cheddar cheese ripening: Effect of added plasmin. *Journal of Dairy Research*, 59: 209-216.

Fatholahi, E. 2001. Evolution of UF feta cheese softening phenomenon. M.S thesis of Tabriz University. Dairy industries of Tehran Co.

Fontecha, J., Pelaez, C., Juarez, M., Requena, T. and Gomez, C. 1989. Biochemical and microbiological characteristics of Artisanal hard goat's cheese. *Journal of Dairy Science*, 73: 1150-1157.

Fox P.F. 1993. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Chapman and Hall, London. Vol. 1, pp. 414.

Fox, P.F. 1989. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *Journal of Dairy Science*, 72: 1379–1400.

Green, M.l., Glover, F.A., Scurlock, E.M.W., Marshall, R.J., and Hatfield, D.S. 1981. Effect of use of milk concentrated by ultrafiltration on the manufacture and ripening of cheddar cheese. *Journal of Dairy Research*, 48: 333-337.

Groppin, R., Rank, T.C., and Olson, N.F. 1985. Primary proteolysis of cheese during ripening-a review. *Journal of Dairy Science*, 68: 531-540.

Grufferty, M.B. and Fox, P.F. 1988. Factors affecting the release of plasmin activity from the casein micelles. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 23: 153–163.

Hesari, J., Ehsani, R.M., Khosroshahi, A. and Mcseweeny, P.L. 2006. Contribution of rennet and starter to proteolysis in Iranian UF white cheese, 86: 291-302.

Hesari, J., Ehsani. M., Khosrowshahi, A., Ebrahimzadh, M., Jodeiri, H. and McSweeney, P.L.H. 2005. Effect of whey proteins on the proteolysis pattern and enzymatic activity of UF cheese in compare whit traditional Feta cheese. 2th congress of Food Industry. Esfahan.

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.

Kuchroo, C.N. and Fox, P.F. 1982. Soluble nitrogen in cheddar cheese. Comparison of extraction procedures. Michwissenchaft, 937: 331-335.

McSweeney, P.L.H., Pochet, S., Fox, P.F. and Healy, A. 1994. Proteolysis of bovin α_{s2}–casein by chymosin, Z. lebensm. unters Forsch, 119: 429-432.

Michaelidou, A., Katsisri, M.C, Voutsinas, L.P., Kondyli, E. and Alichanidis, E. 2003. Effect of a commercial adjunct culture of proteolysis in low-fat Kefalograviera-type cheese. *International Dairy Journal*, 13: 743-753.

Mortazavi, E. 2006. New technologies in dairy industry. First printing. Ferdowsi University of Mashhad Press.

Mortazavi, E., Ghods Roohani, M. and Jooyandh, H. 1995. Milk and Dairy Products technology. Ferdowsi University of Mashhad Press. No. 185.

O'keeffe, P.F. and Daly, C. 1976. Contribution of rennet and starter proteases to proteolysis in cheddar cheese. *Journal of Dairy Research*, 43: 97-107.

Politis, I., 1996. Plasminogen activator system: Implications for mammary cell growth and involution. *Journal of Dairy Science*, 79: 1097–1107.

Rashidi, H. 2005. Principles of cheese and whey products. Institute for higher education applied science of agricultural ministry.

Richardson, B.C. and Pearce, K.N. 1981. The determination of plasmin in dairy products. *New Zealand Journal of Dairy Science Technology*, 16: 209–220.

Shalabi, S.L. and Fox P.F. (1987). Electrophoretic analysis of cheese: Competition of methods, *Irish Journal of Food Science and Technology,* 11: 135-151.

EJFPP, Vol. 5 (2): 59-73
http://ejfpp.gau.ac.ir

Study of contribution of Plasmin system in Ultra-filtered white cheese proteolysis

S. Kermanizade[1] and J. Hesari[2*]

[1]Former M.Sc student, Dept. of Food Science and Technology University of Tabriz
[2]Associate Prof., Dept. of food science and Technology University of Tabriz

Abstract

Cheese ripening especial ripening of Ultra-filtered white cheese is, gradual, continuous and so slaw process that not probed completely. In commercial levels have been efforts in order to increase ripening speed and accelerate the formation of ripened cheese flavor and aroma's especial in Ultra-filtered white cheeses. The addition of exodigenouse activator and accelerator enzymes in this between is one of the usuale tryes. The Ultra-filtered white cheeses was made from cow's milk retentive. Plasminogen activator, urokinase, was added to treatment samples. In order to exactly investigate the effects of plasmin activity on cheese properties, samples contain inhibitor of plasmin activity, 6-Amino hexanoic acid, was prepared. The effects of presence activator and inhibitor in treatment samples on proteolysis and plasmin activity was investigated during 60 days. The addition of activator, urokinas, to retentate significantly ($P<0.05$) increase plasmin activity whit conversion of plasminogen's to plasmins and at the result initial proteolysis of cheese was accelerated. Presence of inhibitor and especial urokinase in cheese, could have significant ($P<0.05$) influences in the amount of pH=4/6 soluble nitrogen and in %12 3-Chloro acetic acid soluble nitrogen. The protein profile's was investigated using urea-Poly acrylamide gel electrophoresis was affected by addition of activator and inhibitor. The results obtained this research, showed that amount of plasmin activity had significant ($P<0.05$) effects on UF white cheese ripening speed. So increased plasmin activity, could accelerate UF white cheese ripening.

***Keywords*:** UF white cheese, Plasmin, Urokinase, 6-Amino hexanoic acid, accelerate ripening

*Corresponding author; jhesari@tabrizu.ac.ir