AF ۲۹۹

تحولات دوران رسیدن پنیر و عوامل مؤثر در آن

II - نقش آنزیم‌ها و میکروارگانیزمها در رسیدن پنیر (قسمت دوم)

- ثریا آذرنیا - کارشناس بخش تکنولوژی شیر مؤسسهٔ تحقیقات دامپروری
- محمدرضا احسانی - عضو هیئت علمی دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه تهران
- جلیل وندیوسفی - عضو هیئت علمی مؤسسهٔ تحقیقاتی سرم‌سازی رازی
- کیاناکازرونی - کارشناس بخش تکنولوژی شیر مؤسسهٔ تحقیقات دامپروری

چکیده

آنزیمهای مایه پنیر باقیمانده در لخته، پروتئازهای طبیعی شیر، پروتئازهای میکروبی ناشی از باکتریهای لاکتیک، قارچها، مخمرها و میکروارگانیزمهای ثانویه از عوامل مؤثر در رسیدن پنیر می‌باشند. با توجه به اهمیت مرحلهٔ رسیدن در ویژگی فرآوردهٔ نهایی به بررسی عوامل فوق‌الذکر و نقش آنها در تحولات دوران رسیدن می‌پردازیم.

انواعی از پنیرهای مهم بین‌المللی با اشکال و اندازه‌های استاندارد

مقدمه

تجزیهٔ پروتئین‌ها به وسیلهٔ پروتئازهای شیر، آنزیمهای منعقدکننده، باکتریهای لاکتیک و میکروارگانیزمهای دیگر بر روی قسمت کازئینی شیر انجام می‌شود.

پپتونها، پپتیدها و اسیدهای آمینه‌ایی که در اثر هیدرولیز پروتئین‌ها تولید می‌شوند، بر روی طعم، بو و حتی بافت پنیر نقش مؤثری دارند (۱۷).

به طور کلی پروتئازها به دو گروه آندوپپتیدازها و اگزوپپتیدازها طبقه‌بندی می‌شوند که ویژگی هر یک ازآنها به اختصار شرح داده می‌شود:

آندوپپتیدازها

این پروتئازها پیوندهای پپتیدی واقع در داخل زنجیره پلی‌پپتیدی را هیدرولیز می‌نمایند و باعث تجزیه پروتئین‌ها به پپتیدها می‌شوند، ویژگی قطع اتصالات به اسیدهای آمینه موجود بستگی دارد.

۵ گروه از آندوپپتیدازها به شرح زیر شناسایی شده‌اند:

- سرین - پروتئازها
- پروتئازهای گروه سولفیدریل (-SH)
- آسپارتات - پروتئاز
- متالوپروتئاز
- پروتئازهای دیگر

اگزوپپتیدازها

این پروتئازها، پیوند پپتیدی موجود در ابتدای زنجیره پلی‌پپتیدی را هیدرولیز می‌کنند که سبب آزادشدن اسیدهای آمینه انتهایی می‌گردد.

سه گروه اگزوپپتیداز را می‌توان در زیر ملاحظه نمود:

- کربوکسی پپتیدازها که به انتهای کربنه پلی‌پپتیدها حمله می‌کنند. (EC ۳.۴.۱۷.X.)
- آمینوپپتیدازها که به انتهای ازته پلی‌پپتیدها حمله می‌کنند. (EC ۳.۴.۱۱.X)
- دی‌پپتیدازها که دی‌پپتیدها را هیدرولیز می‌کند (EC۳.۴.۱۳.×X.).

عوامل مؤثر در رسیدن پنیر

۱- پروتئازهای طبیعی شیر

الف- پروتئاز قلیایی (پلاسمین)

پروتئاز قلیایی شیر از نظر خصوصیات مولکولی و آنزیمی با پلاسمین خون شباهت زیادی دارد (۲۱،۶،۵،۳) و در کنار یک پروتئاز اسیدی و یک آمینوپپتیداز در شیر یافت می‌شود.

این پروتئاز همراه با میسل‌های کازئین در لخته وجود دارد و با توجه به مقاومتش در برابر حرارت حتی در پنیر تهیه شده از شیر پاستوریزه نیز یافت می‌شود. پلاسمین شیر به گروه پروتئازهای سرین تعلق دارد و ویژگی آن مشابه آنزیم تریپسین است.

پروتئین‌های آب پنیر در مقابل این پروتئازها مقاوم بوده ولی کازئین نسبت به آن حساس می‌باشد، به طور ترجیحی کازئین β را به کازئین β_1، β_2، β_3 و کازئین α_{s2} را به پروتئوز - پپتون‌های PP5 و PP8F تجزیه می‌نماید. کازئین β دو یا سه برابر سریع‌تر از کازئین α_s تجزیه می‌شود ولی کازئین کاپا، مقاومترین کازئین در مقابل پروتئولیز می‌باشد (۶،۳).

حداکثر فعالیت آن در ۳۷ درجهٔ سانتیگراد و pH، ۷/۵ تا ۸ می‌باشد (۶)، بنابراین در پنیرهایی که لخته آنهادارای pH، ۶تا۷است، فعالیت آن افزایش می‌یابد (۷).

پلاسمین نقش مهمی را در تکنولوژی شیر ایفا می‌نماید و در واکنش‌های بیوشیمیایی در زمان رسیدن پنیر خصوصاً پنیرهای سخت شرکت می‌کنند. تأثیر پلاسمین در رسیدن بستگی به روش تهیه پنیر دارد، در پنیرهایی که رطوبت آنها بالاست و یا برای رسیدن خود نیاز به فلورهای سطحی دارند (مثل پنیر کاممبرت) این آنزیم اهمیت بیشتری دارد (۶).

فعالیت پلاسمین به شدت تحت تأثیر pH، غلظت نمک و درجهٔ حرارت می‌باشد لذا در پنیرهای با پوشش قارچی افزایش pH به ۶= pH محیط را برای فعالیت پلاسمین مساعد می‌سازد.

در پنیرهای چدار[الف] و گودا[ب] مشاهده کازئین δ نشانه‌ای از فعالیت پلاسمین می‌باشد.

در پنیر گودا ۳ تا ۳/۵ درصد ازت محلول تشکیل شده در ۶ ماه بعد از نگهداری را به پلاسمین شیر نسبت داده‌اند (۶).

ب- پروتئاز اسیدی

حداکثر فعالیت پروتئاز اسیدی شیر در pHهای ۳/۵ تا ۴ می‌باشد.

این پروتئاز به میسل کازئین چسبیده است و حرارت مناسب برای فعالیت آن ۵۰ درجهٔ سانتیگراد و pH مطلوب آن ۴می‌باشد.این‌پروتئازدردمای ۷۰ درجهٔ سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه و pH=۴ غیرفعال می‌شود.

ویژگی عمل آن روی کازئین‌ها با کیموزین[پ] قابل مقایسه است.

ترکیباتی که از عمل پروتئاز اسیدی شیر روی کازئین‌های α_{s1} β و کاپا به وجود می‌آید شبیه بخشهای I-α_{s1} و I-β و پاراکاپای حاصل از عمل کیموزین روی همان‌کازئین‌هامی‌باشداماباااینحال‌عمل‌آن‌برروی کازئین α_{s1} ارجحیت دارد و در رسیدن پنیر نیز دخالت می‌کند.

علیرغم اسم آن، این پروتئاز در فرآورده‌های اسیدی دارای فعالیت کمی است، اما با این وجود به‌طور ترجیحی بر روی کازئین α_{s1} در pH پایین در پنیری به نام مشانجر[ت] فعال بود در حالی‌که در pH بالاتر کازئین β ترجیحاً به وسیلهٔ پروتئاز قلیایی تجزیه می‌شود (۶).

۲- مایهٔ پنیر (رنت)

امروزه مشخص شده است که آنزیمهای منعقدکننده شیر نقش مهمی را در رسیدن پنیر ایفا می‌نماید (۳،۱۶).

فعالیت آنها در حد تولید پپتیدهایی که بعداً به‌وسیلهٔ پروتئازهای میکروبی تجزیه می‌شوند، متوقف می‌گردد (۳) و با توجه به‌این‌که مقداری از آنها در لخته باقی می‌ماند در پروتئولیز در طی دوران رسیدن پنیر نیز دخالت می‌نمایند (۱۳).

آنزیمهای منعقدکننده (رنت) یا جانشین‌های آن، اندوپپتیدازهایی هستند که به گروه کربوکسیل- پروتئازها یا اسپارتات - پروتئازها تعلق دارند.

این آنزیمها دارای دو نوع فعالیت می‌باشند که یکی از آنها خیلی اختصاصی و بر روی کازئین کاپا می‌باشد و دیگری شرکت در پروتئولیز عمومی پروتئین‌ها است (۶). پپتیدهای آزاد شده در این پروتئولیز دارای وزن مولکولی بالایی هستند.

در لخته‌های آسپتیک، پپتیدهایی با وزن مولکولی پایین‌تر از ۳۰۰۰ دالتون معرف ۲۸ درصد ازت محلول هستند. مقدار اسید آمینه آزاد شده به وسیلهٔ مایهٔ پنیر عملاً صفر است. در لخته این آنزیم به سرعت کازئین α_{s1} را مورد حمله قرار می‌دهد و پیوند بین فنیل‌الانین‌های ۲۳ و ۲۴ و فنیل‌آلانین ۲۴- والین ۲۵ را می‌شکند، این عمل ۲۴ ساعت بعد از تولید لخته رخ می‌دهد به‌طوری‌که پپتید I-α_{s1} به وسیلهٔ الکتروفورز به روشنی قابل تشخیص می‌باشد.

این هیدرولیز در طی زمان نگهداری ادامه می‌یابد و با استفاده از روش الکتروفورز می‌توان کاهش کازئین α_{s1} و افزایش بخش I-α_{s1} را مشاهده نمود. ترکیبات حاصل از تجزیه کازئین β را به‌وسیلهٔ مایهٔ پنیر که I-β و II-β و III-β می‌باشند در طی زمان رسیدن با روش الکتروفورز نمی‌توان شناسایی نمود.

در لخته‌های آسپتیک که فاقد هر گونه میکروارگانیزم می‌باشند بیش از ۷۰ درصد کازئین β دست نخورده باقی می‌ماند و به نظر می‌آید که عمل مایهٔ پنیر بر روی کازئین β خیلی کمتر از کازئین α_{s1} است.

در پنیرهایی که در رسیدن آنها باکتریهای لاکتیک دخالت دارند، مایهٔ پنیر مسئول تولید بیشترین مقدار ازت محلول است. در جدول ۱ تأثیر مایهٔ پنیر بر روی تجزیهٔ پروتئین‌ها در طی زمان نگهداری نشان داده شده است.

جدول ۱- پراکندگی اشکال مختلف ازت بر حسب وزن مولکولی در pH =۴/۶ در چهلمین روز رسیدن (درصد تعیین شده نسبت به ازت کامل (۷).

ازت محلول در pH= ۴/۶ (۱۸ درصد)		ازت غیر محلول در pH= ۴/۶ (۸۲ درصد)	
فرآورده‌های حاصل‌ازهیدرولیزبا وزن‌مولکولی‌کمتراز ۳۰۰۰ (۵ درصد)	فرآورده‌های حاصل‌ازهیدرولیزبا با وزن مولکولی‌بیش از ۳۰۰۰ (۱۳ درصد)	فرآورده‌های‌حاصل‌از هیدرولیز با وزن‌مولکولی‌کمتر از ۱۶۰۰۰ دالتون (بیش از ۵۰ درصد)	کازئین‌های تجزیه شده (کمتر از ۳۲ درصد) (کمتر از ۳۲ درصد)

در بعضی موارد بسته به نوع پنیر، بیش از ۹۰ درصد از آنزیم‌های منعقدکننده شیر،همراه‌آب پنیر دفع می‌شوند و مقدار کمی در داخل لخته‌باقی می‌مانند (۷).

مقدار آنزیم باقیمانده در لخته به بعضی از شرایط تکنولوژیکی تهیه پنیر مثل طبیعت آنزیم، نوع پنیر، pH لخته در زمان آبگیری و pH شیر در زمان مایه‌زنی بستگی دارد.

آنزیمهای به دست آمده از *Mucor miehei* و *Mucor pusillus* نسبت به آنزیم مایهٔ پنیر (رنت) بهتر در لخته نگهداری می‌شوند.

وقتی که pH اولیه شیر کاهش می‌یابد میزان مایهٔ پنیر باقیمانده در لخته افزایش می‌یابد و در درجهٔ حرارت پخت بالا، میزان آن در لخته کم می‌شود. در مورد لخته‌های پخته شده در حرارتهای بین ۵۲ تا ۵۵ درجهٔ سانتیگراد مانند پنیر امنتال[ث] به‌علت دناتوره شدن آنزیمهای موجود در داخل پنیر، مقدار مایهٔ پنیر باقیمانده کم و حتی صفر می‌باشد(۶).

شرایط فیزیکی و شیمیایی پنیر، این امکان را برای مایهٔ پنیر فراهم می‌سازد که در زمان نگهداری پنیر، فعال و پایدار باشد، این موضوع یعنی پایداری مایهٔ پنیر در طول رسیدن با اندازه‌گیری آن در شروع و ختم رسیدن و همچنین با افزایش محصولات حاصل از تجزیه کازئین در طول رسیدن، تأیید شده است.

مایهٔ پنیر معمولی کازئین β را خیلی کم تجزیه می‌نماید در صورتی که جانشین‌های میکروبی آن سبب تجزیه بیشتر و سریع‌تر آن می‌گردند (۷،۱). کازئین α_{s2} و پاراکازئین کاپا در مقابل مایهٔ پنیر (رنت) خیلی مقاوم هستند. تفاوت پروتئولیز کازئین‌های α_{s1} و β به‌وسیلهٔ مایهٔ پنیر از طریق غلظت بالای نمک در پنیر بیان می‌شود. نمک از پروتئولیز کازئین β بیشتر از پروتئولیز کازئین α_{s1} جلوگیری می‌کند.

قابلیت کازئین β در مقابل پروتئولیز به فعالیت آب بستگی دارد و به وسیلهٔ ۵ درصد کلرور سدیم یا غلظت بالای قند، متوقف می‌شود ولی غلظت ۵ درصد کلرور سدیم برای هیدرولیز کازئین α_{s1} مناسب می‌باشد، غلظت بالای نمک در پنیر مانع از پروتئولیز کازئین‌های β و α_{s1} می‌شود. در پنیر چدار رسیده کازئین α_{s1} توسط مایهٔ پنیر (رنت) کاملاً به I-α_{s1} و سپس به V-α_{s1} VII-α_{s1} تجزیه شده و مقدار کمی -α_{s1} تولید می‌شود.

در پنیر گودا و سوئیس، کازئین α_{s1} به I-α_{s1} تجزیه می‌شود و در پنیر آبی[ج] سریعاً به I-α_{s1} (۷) و سپس به VII-α_{s1} و VII-α_{s1} تجزیه می‌گردد (۷) و در پایان زمان رسیدن این پپتیدها و نیز کازئین β به‌وسیلهٔ آنزیمهای میکروبی به پپتیدهای کوچک تجزیه می‌شوند.

مایهٔ پنیر (رنت) در زمان رسیدن پنیر کاممبرت بر روی کازئین β غیرفعال است (۷،۵) ولی کازئین α_{s1} را سریعاً تجزیه می‌کند.

در رابطه با فعالیت پروتئولیتیکی مایهٔ پنیر حیوانی (رنت) یا جانشین‌های آن در طول رسیدن و نقش احتمالی آنزیمهای آنها در تولید تلخی (ناشی از پپتیدهای آزادشده) بحث زیادی شده است، به عنوان مثال استفاده از مایهٔ پنیر به دست آمده از *Endothia parasitica* در تولید پنیر چدار توصیه نمی‌شود.

تمام پروتئازها از جمله مایهٔ پنیر به دست آمده از گوساله و جانشین‌های آن می‌توانند از کازئین‌های α_{s1} و β پپتیدهای تلخ آزاد نمایند. شدت و گسترش مزه تلخ در پنیر بستگی به عوامل تکنولوژیکی دارد، هر چه میزان آنزیمهای منعقدکننده باقیمانده در لخته بیشتر باشد این گرایش شدیدتر می‌شود.

لازم به توضیح است که ظاهر شدن پپتیدهای تلخ غیر از آنزیمهای منعقدکننده، منشأهای دیگری نیز دارد (۷). به طور خلاصه عواملی مانند اسیدیته بالای لخته که موجب نگهداری پروتئازهای بیشتری می‌شود موجب تلخی بیشتر و عواملی مانند پخت که اثر عکس دارند تلخی کمتری ایجاد می‌کنند.

۳- میکروارگانیزمها و آنزیمهای آنها باکتریهای لاکتیک

سیستم پروتئولیتیک باکتریهای لاکتیک

آنزیمهای سیستم پروتئولیتیک باکتریهای لاکتیک به دو گروه تقسیم می‌شوند:

الف - پروتئینازهایی که به دیوارهٔ خارج سلول باند شده‌اند که این گروه کازئین را به پپتیدهایی با طول زنجیرهٔ متفاوت تجزیه می‌کنند.

پروتئینازهای باکتریهای لاکتیک را براساس نوع فعالیت آنها به دو گروه تقسیم کرده‌اند:

۱- نوع AP_1 که ابتدا بر روی کازئین β عمل می‌نماید.

۲-نوع AP_m که‌روی کازئین‌های α_{s1} K و β فعالیت دارد.

ب - پپتیدازها که هیدرولیز پپتیدها راکاتالیز

می‌نمایند.

پروتئینازها، پپتیدازها، اسیدهای آمینه و سیستم حمل پپتید، به منظور تأمین اسیدهای آمینه لازم جهت رشد باکتریها، ضروری می‌باشند (۱۵).

اغلب پپتیدهایی که توسط پروتئینازها از کازئین حاصل شده‌اند، مولکول بزرگ داشته بوده و قادر به عبور از دیواره سلولی نمی‌باشند بنابراین به منظور عبور پپتیدها از غشاء سیتوپلاسمی وجود پپتیدازهای خارج سلولی ضروری می‌باشد.

جایگاه سلولی پپتیدازهای مختلف مورد بررسی قرار گرفته است که اغلب مطالعات بر روی سلولهای لیزو یا شکسته شده‌ج بوده است.

جایگاههای برون و درون سلولی تعدادی از پپتیدازها (PepN, GAP) گزارش شده است اما با این‌حال اطلاعات به دست آمده از بررسیهای فوق قابل نتیجه‌گیری نمی‌باشند چراکه جهت مقایسه فقط از آنزیمهای نشانگر درون سلولیح استفاده شده است.

اخیراً موقعیت پپتیدازهای GAP,PepO,TRP,PepX,PepC,PepN به وسیلهٔ ایمینوبلاتینگ‌خ و میکروسکپ‌الکترونی مورد مطالعه قرار گرفته است، نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد که تمام پپتیدازهای فوق در داخل سلول قرار گرفته‌اند.

وجود پپتیدازها در داخل سلول به طور قطع بیانگر عدم وجود آنها در خارج سلولی نمی‌باشد و به طور کلی هیچ دلیل مولکولی مبنی بر وجود پپتیدازهای خارج سلولی ارائه نشده است. احتمال دارد بعضی از پپتیدازها از طریق مکانیزمی که هنوز ناشناخته است از میان غشاء سلولی جابجا شوند.

نقش باکتریهای لاکتیک در رسیدن پنیر

نقش اولیه باکتریهای لاکتیکی، تخمیر لاکتوز به اسیدلاکتیک می‌باشد که منجر به کاهش pH می‌گردد و شرایط فیزیکی و شیمیایی مناسبی را برای تولید فرآورده‌های شیری فراهم می‌کند (۱۲،۶).

در ابتدای دوران رسیدن این باکتریها، فلور غالب را تشکیل می‌دهند. توانایی پروتئولیز از مهمترین ویژگی‌های آنها است که در طول رسیدن پنیر دخالت می‌نمایند (۱۰،۶،۲).

باکتریهای لاکتیک، میکروارگانیزمهای پرتوقعی‌اند (۱۸،۱۲،۲) و لازم است که برای رشد آنها اسیدهای آمینه و پپتیدهای کوچک در محیط وجود داشته باشد (۲۲،۱۹،۶). قسمت غیرپروتئینی شیر ۱۰ تا ۲۵ درصد احتیاج سلولی آنها را فراهم می‌سازد که طبعاً برای آنها کافی نمی‌باشد، به همین دلیل استارترهای مورد استفاده، آنزیمهای پروتئولیتیک را برای ادامه رشد تولید می‌نمایند که در صنایع شیر، این مرحله را رسیدن پنیر[د] می‌نامند.

در مقایسه با باکتریهای دیگر مثلاً پسودوموناس‌ها، قدرت پروتئولیتیک باکتریهای لاکتیک ضعیف می‌باشد ولی پروتئازهای آنها متغیر و پیچیده است و شامل پروتئازها و پپتیدازهای خارج و داخل سلولی می‌باشند (۲۱،۶،۲).

باکتریهای لاکتیک تکمیل کننده عمل مایهٔ پنیر در زمان رسیدن پنیر هستند. در حقیقت مایهٔ پنیر (رنت) اولین تجزیه محدود کازئین‌ها به پپتیدهایی با وزن مولکولی بالا را سبب می‌شود که این پپتیدها عموماً تلخ نیستندوبه‌وسیلهٔباکتریهای‌لاکتیک‌به‌پپتیدهای‌کوچکتر و سپس به اسیدهای آمینه آزاد تجزیه می‌شوند.

در پنیر گودا مشخص شده است که سوشهای غیر تلخ زودتر از سوشهای تلخ، اسیدهای آمینه را آزاد می‌کنند و نیز سوشهای تلخ دارای آنزیمهایی هستند که قادر به تجزیه پپتیدهای تلخ می‌باشند (۷،۶) و هنوز به طور مشخصی تأثیر محصولات حاصل از این پروتئولیز بر روی بافت و طعم پنیر، روشن نشده است. تغییراتی که در بافت پنیر ایجاد می‌شود به‌وسیله پروتئولیز کازئین α_{s1} می‌باشد که این پروتئین بر اثر یک واکنش قوی، تشکیل شبکه‌ای را می‌دهد که در زمان هیدرولیز پیوندهای کازئین α_{s1} و یا فرآورده‌های حاصل از تجزیه آن به‌وسیلهٔ مایهٔ‌پنیر، مورد حمله باکتریهای لاکتیک قرارمی‌گیرند(۷،۶،۲).عقایدمختلفی‌روی‌نقش‌با کتریهای لاکتیک در تولید تلخی در زمان رسیدن ارائه شده است.

با توجه به این که آنزیمهای متعددی در تغییرات دوران رسیدن پنیر شرکت دارند ارزیابی نقش پروتئولیتیک باکتریهای لاکتیک در گسترش تلخی مشکل می‌باشد. به نظر می‌رسد که مایه‌های لاکتیکی در ظهور تلخی نسبت به مایهٔ پنیر مؤثرتر باشند. تمام سوشهای باکتریهای لاکتیک به صورت بالقوه دارای قدرت ایجاد تلخی می‌باشند و رفتار هر سوشی به شرایط تولید پنیر بستگی دارد، مثلاً درجهٔ حرارت پخت که تعیین کننده تعداد نهایی استرپتوکوکهای لاکتیکی در پنیر است احتمالاً در گسترش تلخی نیز مؤثر است.

غلظت بالای باکتریهای لاکتیک در پنیر منجر به افزایش پروتئازها و پپتیدهای تلخ می‌شود. تعداد پپتیدهای تلخ موجود در پنیر به سرعت تشکیل و تجزیه آنها بستگی دارد. کنترل تلخی در پنیر به طور اساسی کنترل فعالیت پروتئولیتیک کل می‌باشد و این در عمل به‌وسیله مجموعه‌ای از روشها انجام‌پذیر است که شامل محدودیت عمل عوامل تخمیر به وسیلهٔ تنظیم درجهٔحرارت پخت، انتخاب عوامل تخمیر با یک فعالیت پروتئولیتیک ضعیف بر روی کازئین β و نگهداشتن بالای غلظت نمک در آب و استفاده محدود از مایهٔ پنیر می‌باشد (۶).

در تهیهٔ پنیرهای با تخمیر پروپیونیکی، باکتریها نقش مهمی را ایفا می‌نمایند. بعد از فرآیند نمک‌زنی، در طول فرآیند رسیدن، نمک به آهستگی به داخل قطعات پنیر نفوذ می‌کند.

لاکتوز باقیمانده توسط باکتریهای لاکتیک تجزیه می‌شود. در اثر تجزیه لاکتوز توسط باکتریهای مولد اسید پروپیونیک، اسید پروپیونیک و مقداری اسید استیک تولید می‌شود که سبب ایجاد کمی مزه تلخ در پنیر کهنه می‌گردد. دی‌اکسیدکربن تولید شده در اثر این تخمیر در قطعات پنیر حفره ایجاد می‌نماید.

میکروارگانیزمهای ثانوی

نقش دقیق میکروارگانیزمهای ثانوی در تجزیه پروتئین‌ها خیلی کم مطالعه شده است و به این دلیل این نقش زیاد شناخته شده نمی‌باشد ولی با این‌حال پپتیدازهای خارج سلولی موجود در بعضی از گونه‌ها در آزاد کردن اسیدهای آمینه در پنیر شرکت می‌نمایند (۶ و ۷).

در زیر به بررسی نقش میکروارگانیزمهای ثانوی مهم در رسیدن پنیر پرداخته می‌شود.

الف - کورینه باکتریها

ویژگیهای فیزیولوژی و بیوشیمی، کورینه باکتریها مشابه میکروکوکها می‌باشد.

Brevibacterium linens تنهاگونه‌ای است که در صنایع پنیرسازی مورد توجه می‌باشد و مورد مطالعه قرار گرفته است. هیدرولیزپپتیدهای مختلف توسط شش سوش از این باکتری مورد بررسی و مقایسه قرار گرفته است. این میکروارگانیزمها دارای پروتئازهای داخل و خارجی سلولی هستند (۱۰،۶) و فعالیت مناسب آنها بین pHهای ۷/۵ تا ۸ می‌باشد. این باکتری دارای استعداد نسبتاً بالای پروتئولیز و تجزیه اسیدهای آمینه است (۱۲،۶) و نقش بسیار مهمی را در رسیدن و گسترش طعم پنیرهایی مانند کاممبرت که سطح آنها شسته می‌شود، ایفا می‌نمایند.

تعیین نقش آنها در پروتئولیز مرحلهٔ نهایی رسیدن پنیر مشکل می‌باشد (۱۲،۱۰،۶).

Brevibackerium linens قادر به متابولیزه کردن متیونین و تولید متان - تیول از آن می‌باشد که این ترکیب در گسترش عطر و طعم پنیرهایی نظیر ترا‌پیست[ذ]، گرویر[ر] و پنیرهای کپکی مهم می‌باشد (۱۲).

ب - میکروکوکها

میکروکوکها در اکثر پنیرها بیشترین جمعیت غیرلاکتیکی را تشکیل می‌دهند و بیشتر در سطح پنیر رشد می‌نمایند و فلور مسلط مایعات حاوی آب‌نمک، مواد رنگی، باکتریهای پروتئولیزکننده، مواد ضدعفونی‌کننده و ... را تشکیل می‌دهند (با آنها سطح پنیر را شستشو می‌دهند) (۶).

این میکروارگانیزمها در پنیر چدار تهیه شده از شیر خام یا در پنیر پاستوریزه، فلور ثانوی غالب را تشکیل می‌دهد (۲۰). *Micrococcus caseolyticus* دارای آنزیم داخل سلولی است و کازئینی راکه قبلاً به‌وسیلهٔ مایهٔپنیر پروتئولیز شده است را تجزیه می‌نماید.

بعضی از سوشها دارای متالوپروتئاز خارج سلولی می‌باشند که بر روی کازئین تجزیه نشده خصوصاً کازئین β فعال می‌باشند.

pH مناسب آن ۷/۴ است و این آنزیم در مرحلهٔ نهایی دوران رسیدن پنیر فعالیت مؤثری دارد.

Micrococcus freudenreichii دارای پروتئاز خارج سلولی است و فعالیت مناسب آن بین pHهای ۵/۵ تا ۶/۵ به حداکثر می‌رسد و با توجه به فعالیت لیپولتیک، پروتئولیتیک و استرولیتک و نیز توانایی آنها در تولید متاتیول، در رسیدن پنیر مؤثر می‌باشند.

مزه تلخ در پنیر تهیه شده با *M. caseolyticum* گزارش شده است.

این میکروارگانیزم در افزایش ازت غیرپروتئینی در طی رسیدن پنیر ادام[ز] تأثیری ندارد (۴).

ج - استرپتوکوکهای گروه D یا آنتروکوکها

این میکروارگانیزمها از نظر ویژگیهای فیزیولوژی وبیوشیمیایی به باکتریهای لاکتیک شباهت دارند.

آنتروکوکها در پروتئولیز پنیر شرکت می‌نمایند.

بریدین لخته پرس شده به قطعات ۱۲-۱۰ سانتیمتری (کارگاه پنیرسازی کارخانجات شیرپاستوریزه تهران)

Str. faecalis و *Str. durans* دارای یک فعالیت داخل سلولی قابل مقایسه با استرپتوکوکهای لاکتیکی می‌باشند و pH مطلوب فعالیت آنها ۵/۵ است (۶).

د- باکتریهای پروپیونیک

از گروه باکتریهای پروپیونیک می‌توان *Propionibacterium freudenreichii*، *P. jensenii* و *P. phermanii* را نام برد.

این باکتریها به مقدار بسیار زیاد در پنیرهای امنتال و کنته[۵] وجود دارند و فعالیت تجزیهٔ کازئین و پپتیدی داخل سلولی آنها مشخص شده است.

pH مطلوب فعالیت آنها بین ۵/۵ تا ۶ می‌باشد(۶).

این باکتریها برای تشکیل سوراخهای چشمی در پنیرهای امنتال و کنته وجودشان ضروری است و نقش مهمی را در طعم آنها ایفا می‌نمایند (۱۲).

مخمرها

در ده روز اول دوران رسیدن، مخمرها به طور فعال در سطح پنیر رشد می‌نمایند. مخمرها دارای فعالیت پروتئولیتیکی داخل سلوی قابل توجهی می‌باشند که البته بر حسب گونه و نژادهای مختلف متفاوت است (۶ و ۱۰) و نقش پیچیده و قابل توجهی را در رسیدن بعضی از پنیرها ایفا می‌نمایند و با توجه به‌این‌که به تعداد بسیار زیادی در پنیر وجود دارند در تغییراتی که در بافت و کیفیت ارگانولپتیک پنیر ایجاد می‌شود، شرکت می‌کنند. جنس‌های تریکوسپورون و دبارئومیسس از پنیر تراپیست جدا شده‌اند.

آنزیمهای جدا شده از گونه‌های کلوورومیسس[۵] و کاندیدا از پنیر سنت پولن به ترتیب دارای pH مطلوب ۷/۵ و ۶/۳ می‌باشند.

سیستم پروتئولیتیک مخمرها قادر به آزاد کردن پپتیدهای کوچک و اسیدهای آمینه می‌باشد (۶).

گونهٔ *Kloyveromyces marxianus* در بین‌گونه‌های دیگر دارای فعالیت پروتئولیتیک بیشتر می‌باشد این گونه سه پروتئاز داخل سلولی تولید می‌نماید که شامل پروتئازهای قلیائی II,I با pH مطلوب ۹ و یک پروتئاز اسیدی III با pH مطلوب ۳ می‌باشد در pHهای ۵/۵ تا ۶/۵ کلیهٔ آنزیمها بیش از ۵۰ درصد فعالیت خود را حفظ می‌نمایند که این pH معادل pH پنیر است.

K. lactis دارای یک فعالیت کربوکسی پپتیدازی خنثی با pH مطلوب ۷ و سه آمینوپپتیداز با pHهای مطلوب ۵ و ۷/۱ می‌باشد.

قارچها

برحسب دو گونه استارترهای قارچی به سه گروه تقسیم می‌شوند:

Penicillium camemberti, P. roqueforti, Geotrichum candidum

قارچها نقش مضاعفی را به وسیله آنزیمهای خود در طول رسیدن پنیر، ایفا می‌نمایند و در پنیرهای کپکی دارای فعالیت پروتئولیتیکی قوی می‌باشند (۱۲،۶). این میکروارگانیزمها به وسیلهٔ اسیدزدایی پنیر را خنثی و با تولید آنزیم در طی فرایند پنیرسازی شرکت می‌کنند و بر عطر، طعم و بافت محصول تأثیر می‌گذارند. قارچهای جنس پنی‌سیلیوم دارای سیستم پروتئولیتیک پیچیده‌ای می‌باشند.

در مطالعهٔ با لخته‌های شاهد مشخص شده که آنها، اسید آمینه همراه با پپتیدهایی با وزن مولکولی بالا و پایین تولید می‌نمایند (۱۰،۷،۶).

آنها مسئول تغییرات شدید ایجاد شده در بافت پنیر می‌باشند که در نتیجهٔ تجزیه کازئین‌ها است.

پنی‌سیلیومها دارای فعالیت شدید آندوپپتیدازی می‌باشند که باعث افزایش ازت محلول در pH=۴/۶ و ازت غیرپروتئینی می‌شود (۱۰،۹،۶) و نیز دارای فعالیت اگزوپپتیدازی می‌باشند (۱۱،۶) که سبب آزاد شدن اسیدهای آمینه به مقدار زیاد می‌گردند.

آندوپپتیدازهای خارج سلولی تولید شده توسط پنی‌سیلیومها کازئین α_{s1} و β را تجزیه می‌کنند، پروتئاز اسیدی پپتیدهای Val_{98} Lys_{99}-Glu_{100} و Lys_{29}-Tle_{30} را در زنجیرهٔ کازئین β قطع می‌نماید و پپتیدهایی آزاد می‌شود که به مقدار زیادی داخل پنیرهای رسیده قابل تشخیص می‌باشند.

متالوپروتئازها کازئین β را تجزیه می‌کنند، محصولات حاصل از این تجزیه در آغاز رشد پنی‌سیلیومها قابل شناسایی است.

الف- *P. camemberti*

مطالعه سیستم پروتولیتیک خارج سلولی *P. camemberti* وجود دو آندوپپتیداز را مشخص کرده است.

۱- پروتئازاسیدی‌با فعالیت ثابت در pHهای ۳/۵ و ۵/۵ که pH مطلوب فعالیت‌آن‌برروی‌کازئین‌حدود ۵ می‌باشد.

در حرارت ۶۰ درجهٔ سانتیگراد به مدت ۱۳ دقیقه و در pH=۴ ۹۰درصداز فعالیت خود را از دست می‌دهد.

۲- متالوپروتئاز یا پروتئاز خنثی که pH مطلوب برای فعالیت آن بر روی کازئین، ۶ می‌باشد.

وزن مولکولی آن حدود ۲۰/۰۰۰ دالتون است و در درجهٔ حرارت مطلوب برای فعالیت آن حدود ۵۰ درجهٔ سانتیگراد می‌باشد.

متالوپروتئازها، پپتیدهایی با وزن مولکولی پایین و در مقادیر زیاد تولید می‌نمایند اما در اثر فعالیت آنها اسیدآمینه آزاد نمی‌شود.

P. caseicolum موتان سفید *P. camemberti* است (۱۷،۶) که روی پنیرهایی مثل کاممبرتی و برئی[ش] مشاهده می‌شود.

آندوپپتیداز *P. caseicolum*، کازئین αs_1 را بیشتر از کازئین β یا کازئین کاپا تجزیه می‌نماید.

فعالیت متالوپروتئازهای *P. caseicolum* بر روی کازئین β بعد از رشد قارچها در هفتمین روز رسیدن پنیر کاممبرت شناسایی شده است.

فعالیت کربوکسی پپتیدازها و آمینوپپیتدازها در *P. camemberti* مشخص شده است. این پنی‌سیلیوم همچنین دارای فعالیت لیپازی مهم نیز می‌باشد و وجود یک همکاری مشترک بین فعالیت پروتئولیتیک، لیپولیتیک و B-اکسیداتیو در آن شناسایی شده است.

ب- *P. roqueforti*

در اثر پروتئولیز کازئین به وسیلهٔ پروتئازهای *P. roqueforti* تغییراتی در بافت و طعم پنیر ایجاد می‌شود در پنیرهای رسیده عمل سیستم پروتئازی خارج سلولی آن مشابه عمل آنزیم *P. camemberti* می‌باشد (۶،۳).

سیستم پروتئولیتیک داخل سلولی *P. roqueforti* و *P. camemberti* قدری مشابه می‌باشد، سیستم پروتئولیتیک هر دو ترکیبی از متالوپروتئیاز و پروتئیناز و پروتئیناز اسپارتات و نیز کربوکسی‌پپتیداز و یک آمینوپپتیداز قلیائی می‌باشد (۶، ۷ و ۱۲).

همچنین *P. roqueforti* ترکیبی از یک یا چند کربوکسی‌پپتیداز قلیایی است و بعضی از آنها پروتئیناز قلیایی نیز تولید می‌نمایند (۱۲).

اسپارتیل-پروتئاز *P. roqueforti*، کازئین α_{s1} را سریع‌تر تجزیه می‌نماید.

در پنیرهای آبی پروتئیناز اسیدی *P. roqueforti* غالب است و پپتیدازهای خارج سلولی آن به‌شدت پپتیدها را تجزیه کرده و تعداد زیادی اسیدآمینه در پنیر آبی تولید می‌نمایند (۶).

ج- *Geotricum candidum*

سیستم پروتئولیتیک خارج سلولی آن دارای pH مطلوب ۵/۵ تا ۶ و حرارت ۵۵ درجهٔ سانتیگراد می‌باشد.

این سیستم دارای آندوپپتیدازهای فراوانی است و در افزایش ازت محلول در پنیر تأثیر بسزایی دارد.

سیستم پروتئولیتیک داخل سلولی آن دارای حداکثر فعالیت در pHهای ۵/ تا ۶ و درجهٔ حرارت ۵۰ تا ۵۵ درجهٔ سانتیگراد می‌باشد و نمک‌زنی از فعالیت زیاد آنها جلوگیری می‌کند.

وجود *G. candidum* در سطح پنیر کاممبرت pH سطح را به شدت افزایش می‌دهد (۶، ۷ و ۱۰) و رشد *P. caseicolum* را محدود و به شدت تلخی را کاهش می‌دهد.

۴- آنزیمهای تجزیه کننده اسیدهای آمینه

در اثر هیدرولیز پروتئین‌ها و پپتیدها، اسیدهای آمینه تولید می‌شوند، این ترکیبات به‌وسیلهٔ آنزیمهای بعضی از میکروارگانیسم‌ها تجزیه می‌گردند.

آنزیمهایی که در تجزیهٔ اسیدهای آمینه دخالت دارند متعلق به گروههای مختلفی که در زیر آورده شده است، می‌باشند.

الف- دکربوکسیلازها

دکربوکسلازها منشأ تشکیل آمین‌ها هستند. این آنزیمها در میکروکوکها، برروی باکتریوم و استرپتوکوکهای گروه D وجود دارند.

دکربوکسیلازها به‌طور وسیع مطالعه شده‌اند و در زمان رسیدن پنیرهای نرم تولید آمین و گازکربنیک می‌نمایند. اسیدهای آمینه لیزین، آرژنین، اُرنیتین، تیروزین، هیستیدین، اسیدگلوتامیک به این آنزیمها حساس می‌باشند.

pH مطلوب فعالیت برای تجزیهٔ اسیدهای آمینه فوق ۴ تا ۵ می‌باشد و به جز L- لیزین دکربوکسیلاز که pH مطلوب فعالیت آن ۲/۵ تا ۳ است.

دی‌آمین‌های تشکیل شده در اثر این واکنش‌ها در گسترش عطر پنیر شرکت می‌نمایند (۶).

ب- دزآمینازها

دزآمیناز‌ها سبب آزاد شدن آمونیاک، اسیدهای آلی و آلدئیدها می‌شوند.

دزآمیناز‌ها در *L. casei* و *G. candidum* مشاهده شده است.

این سیستم آنزیمی خصوصاً در پنیرهای نرم مهم می‌باشند. فعالیت مطلوب آنها بین pHهای ۷ و ۸ است (یعنی در زمانی‌که لخته به دلیل فعالیت قارچها به سمت pH خنثی متمایل می‌شود).

اسیدهای آمینه در اثر حمله این آنزیمها، آمونیاک تولید می‌نمایند و از راه اکسیداتیو به یک اسید α ستونیک و از راه احیا به یک اسید آلی تبدیل می‌شود.

۵۰ درصد آنتروکوکها دارای سرین دزآمیناز با pH مطلوب ۸/۱ می‌باشند و فعالیت دزآمیناسیون‌سرین، سیستئین آسپارژین در *L. casei* ثابت شده است.

ج- ترانس‌آمینازها

ترانس آمینازها باعث به‌وجود آمدن اسیدهای آمینه جدید می‌شوند.

این آنزیمها در باکتریهای لاکتیک بعضی میکروکوکها و استرپتوکوکهای گروه D وجود دارند.

د- لیازها

لیازها، زنجیرهٔ جانبی بعضی از اسیدهای آمینه را تجزیه کرده و تولید فنل، اندول یا ترکیبات گوگردی می‌نمایند.

دمتیولازها بر روی متیونین فعال هستند و متان-تیول و ترکیبات فرار گوگردی تشکیل می‌دهند و در *B. linens*، پسودوموناسها و *P. camemberti* وجود دارند (۶).

پاورقی‌ها

1. Cheddar 2. Gouda 3. Cheymosin 4. Meshanger 5. Emmemtal 6. Blue cheese 7. Lysates or broken cells 8. Intracellular Marker Enzynes 9. Immunoblotting 10. Maturation of milk 11. Trapist 12. Gruyere 13. Edam 14. Conte 15. Kloyveromyces 16. Brie 17. Lyases

منابع مورد استفاده

1. Abd El-Salam, M. H.et al., 1972, Changes in proteins of domiati cheese during ripening. J.Dairy Res., 39,219.
2. Abraham, A.G. et al., 1993, Proteolytic activity of *lactobacillus bulgaricus* grown in milk. J. Dairy Sci., 76, 1498.
3. Alais, C., 1984, Science du Lait, Sep. Paris.
4. Bhowmik, T. et al., 1990, Role of micrococcus and pediococcus species in cheese ripening. (A Review). J. Dairy Sci., 73, 859.
5. Cuot, P.T. et al., 1982, A study of proteolysis during Camembert cheese ripening using isoelectric focusing and two dimensional electrophoresis. J. Dairy Res., 49, 501.
6. Desnouveaux, R. et al. (1985) Les enzymes non coagulantes dans IA filiére lait: Proprietés utilisations Industrieues Et développements futurs. Ministére l´Agriculture, Edition Apria, N°37.
7, Eck, A., 1987, Le Fromage, 2 ed, Tec et Doc, Paris.
8. Edwards, S.T., 1981, Symposium: Microbial metabolites of importance in dairy products. J. Dairy Sci., 65, 2431.
9. Gripon. J. C. et al., 1977, Role of proteolytic enzymes of *streptococcus lactis, penicillium roqueoforti*, and *penicillium caseicolum* during cheese ripening. J. Dairy Sci., 60,1532.
10. Gripon, J.C., 1987, In: P.F. Fox (ed.) Cheese: Chemistry, physics and microbiology-major cheese groups, vol. 2, Elsevier Applied Science, London, UK, P.121.
11. Kristoffersen, T. et al., 1970,. Cheddar flavour. IV. Directed and accelerated ripening process. J. Dairy Sci., 50,292.
12. Law, B.A., 1982, In: P.F.Fox and J.J. Condon (ed.) Food proteins. Applied Science Publishers LTD, UK, P.307.
13. Law, B.A. et al., 1992, Proteolysis and flavour development in Cheddar cheese made with the single starter strains *Lactococcus lactis* spp. Lactis UC 317 or *Lactococcus lactis* spp. cremoris HP. J. Dairy Sci., 75, 1173.
14. Macedo, A. C. et al., 1992, The technol., chemistry and microbiol. of Serra cheese, (A Review). J. Dairy Sci., 76, 1725.
15. Macfaddin, J.F. et al., 1983, Biochemical tests for identification of medical bacteria. Second Edition, Williams and Wilkins, London, UK.
16. O´Keeffe, R.B. et al., 1976, Contribution of rennet and starter proteases to proteolysis in Cheddar cheese. J. Dairy Res., 43,97.
17. Scott, R., 1986, Cheesemaking practice, 2nd Edn, Elseveir Applied Science, London, UK.
18. Shahbal, S., 1993, Characterization of a cell envelope associated proteinase activity from *Streptococcus thermophilus* H-Strains. Applied and Environmental Microbiology, 59, 177.
19. Tjwantan, P.S. et al., 1993, Proteolytic enzymes of *Lactococcus lactis*. Review Article. J. Dairy Res., 60,269.
20. Vafopoulou, A., 1989, Accelerated ripening of Feta cheese with heat shocked cultures or microbial proteinases. J. Dairy Res., 56,285.
21. Visser, S., 1993, Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavour: An Overview. J. Dairy Sci., 76,329.
22. Whitehead, W.E. et al., 1993, Symposium: Recent developments in dairy starter Cultures: microbiology and physiology. J. Dairy Sci., 76,2344.