آنزیم های موجود در شیر

Milk Enzymes

ماندانا زورمند*[۱]، مهناز هاشمی روان[۲]

دریافت:۱۴۰۱/۶/۲۷ پذیرش:۱۴۰۱/۱۰/۱۴

چکیده

تا کنون بیش از ۶۰ آنزیم بومی در شیر گونه های مختلف پستانداران شناسایی شده است. در این مقاله به بررسی آنزیم های شیر پرداخته شد. آنزیم های انعقادی شیر از منابع مختلفی تهیه می شوند که مهمترین و قدیمی ترین آن مایه پنیر (رنت) می باشد که با منشا حیوانی است. اما به دلیل کاهش میزان تولید آن سعی شده از جایگزین های میکروبی، گیاهی و طیور استفاده شود. که این جایگزین ها باید دارای پروتئاز اسیدی باشند. در شیرخام پروتئاز هایی نیز حضور دارند که دارای فعالیت آنزیمی پایینی هستند که البته در انعقاد نقشی ندارند زیرا سبب هیدرولیز Bکازئین به گاما کازئین می شوند. اما برخی باکتری های گرم منفی سایکروتروف گونه هایی از سودوموناس، آلکالیجنس و فلاوو باکتریوم در شیر خام حضور دارند که با پروتئاز های خود سبب هیدرولیز کازئین به ترکیبات پارا کاپا کازئین مانند و انعقاد می شوند. اساس انعقاد آنزیمی شیر به حساسیت کاپا کازئین و حضور یون کلسیم بستگی دارد. پس از شکسته شدن کاپا کازئین در حضور آنزیم و به هم ریختن ساختار آن میسل ها تجمع کرده ودر هم فرو می روند و تشکیل دلمه می دهند و انعقاد رخ می دهد.

کلمات کلیدی: آنزیم، شیر، لیپاز، پروتئاز، رنین

مقدمه

آنزیم ها، گروهی از پروتئین ها هستند که توسط موجودات زنده تولید می شوند. آن ها بدون آن که مصرف شوند انجام یک واکنش شیمیایی را میسر ساخته و سرعت آن را افزایش می دهند.به آن ها بیوکاتالیز نیز می گویند (مرتضویان و همکاران. ۱۳۸۰). فعالیت آنزیم ها اختصاصی است و هر آنزیم واکنش خاصی را کاتالیز می نماید. شیر گاو به صورت طبیعی حاوی تعداد زیادی آنزیم است که حدود ۶۰ تای آن ها تا کنون شناسایی شده اند. منشاء این آنزیم ها سلول های بافت غدد پستانی، پلاسمای خون و گلبول های سفید خون (لکوسیت ها) می باشد. البته علاوه بر آنزیم های طبیعی، شیر ممکن است حاوی تعداد دیگری آنزیم باشد که آنزیم های میکروبی نامیده می شوند. این آنزیم ها از طریق میکروب ها وارد شیر می شوند و فراوانی آن ها بستگی به فلور میکروبی شیر دارد. اگرچه آنزیم ها بخش کوچکی از کل پروتئین های شیر را شامل می شوند. آنزیم های موجود در شیر می توانند در ۴ قسمت مختلف

۱ دانشجوی دکتری تخصصی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، ایران، تهران، ورامین
۲ استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، ایران، تهران، ورامین
* نویسنده مسئول مکاتبات: mandana.zorman@gmail.com

قرار گیرند که عبارتند از فاز محلول، فاز میسلی، ترکیبات غشای گلبول های چربی و ترکیبات سلولی. محل قرار گرفتن آنزیم معمولا به منشا آن (سلول های ترشحی غدد پستانی، گلبول های سفید، پلاسمای خون) بستگی دارد. (احمدی و همکاران. ۱۳۸۷).

مواد و روش‌ها و یافته‌ها

آنزیم های موجود در شیر

آنزیم های موجود در شیر و فراورده های آن به چند گروه تقسیم بندی می شوند:

- هیدرولازها شامل (پروتئازها، آمیلازها، لیپازها و فسفاتازها)

-اکسیدوردوکتازها شامل (پراکسیدازها، کاتالازها)

۱- آنزیم ها پروتئولیتیک

پروتئینازهای شیر از جنبه های تکنولوژیکی مختلف در صنایع لبنیات مورد توجه قرار دارندکه از جمله می توان به ژله ای شدن شیرهای UHT، تشکیل اسیدهای آمینه در طی رسیدن پنیر چدار و ایجاد طعم تلخ در شیر و فراورده های لبنی اشاره کرد.

به طور کلی دو سیستم پروتئیناز طبیعی در شیر وجود داردکه اپتیمم فعالیت یکی از آن ها درpH های خنثی تا کمی قلیایی بوده و دیگری در pH های اسیدی بهتر فعالیت می کند(Cavalli *et al.*, 2008).

۱-۱- پروتئینازهای خنثی- قلیایی

آنزیم اصلی قرارگرفته در این دسته یک سرین پروتئاز بوده که دارای فعالیت مشابه با تریپسین می باشد.دامنه فعالیت آن در محدوده pH =۹-۶.۵ بوده و بازدارنده تریپسین بر روی آن اثر بازدارندگی شدید دارد.این آنزیم باندهای پپتیدی اسیدهای آمینه لیزین و آرژینین را از قسمت کربن انتهایی هیدرولیز می نماید در خصوص پایداری حرارتی پروتئیناز شیر نتایج بسیار متفاوتی گزارش شده است به گونه ای که حتی برخی از آن ها حاکی از باقی ماندن این آنزیم بعد از فرایند UHT(۱۴۲ درجه سانتیگراد، ۳ ثانیه)است و احتمالا این آنزیم یکی از عوامل ژله ای شدن شیر UHT در طی انبارداری می باشد. پروتئیناز شیر دمای پاستوریزاسیون را تحمل نموده و همچنین پس از ۱۰ دقیقه حرارت دهی در دمای ۷۰ -۶۰ درجه به ترتیب ۶۰ و ۲۰ ٪ از فعالیت آن باقی می ماند(طباطبایی و همکاران، ۱۳۹۵).

۱-۲ پروتئیناز اسیدی

اپتیمم فعالیت آن در شیر در pH = ۴ بوده و وزن مولکولی کمتری نسبت به پروتئیناز قلیایی دارا می باشد.این آنزیم آلفا کازئین را سریعتر از بتا و کاپا کازئین هیدرولیز می نماید.روی تمامی انواع کازئین اثر داشته و ترکیبات حاصل، مشابه محصولات به دست آمده از فعالیت کیموزین (رنین) می باشد.در صورت حرارت دهی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۰ و ۷۸ به ترتیب ۷۰ و کمتر از ۱ ٪ از فعالیت پروتئاز اسیدی باقی می ماند.

۲- لیپاز

لیپاز کاتالیزور تجزیه چربی به گلیسرول و اسید چرب می باشد و بر اثر فعالیت شدید آن محصول تند یا تلخ می شود. لیپاز به طور طبیعی در شیر وجود داشته ولی توسط میکروب های موجود در شیر نیز تولید می شود.سرما باعث کندی فعالیت لیپاز شده ولی قادر به از بین بردن کامل آن نیست. اسیدیته نیز اثری مشابه با سرما بر روی لیپاز دارد. فعالیت لیپاز در اثر حرارت دادن شیر کاهش می یابد. پاستوریزاسیون شیر خام در دمای ۷۲ درجه به مدت ۲۰-۱۰ ثانیه منجر به انهدام ۹۵-۹۰ ٪ لیپاز می شود. (Gupta *et al*., 2004).

لیپاز شیر به خاطر توانایی تولید اسید چرب آزاد از تری گلیسیریدها و در نتیجه ایجاد طعم نامناسب مورد توجه محققان قرار گرفته است. اپتیمم فعالیت آن pH = ۸.۵-۹ بوده و توسط آپو- لیپو پروتئین CII فعال میشود.از طرفی پیروفسفات، پروتامین، آپولیپوپروتئین های CII وCI، پلی آنیون ها، اسیدهای چرب آزاد و NaCl اثر بازدارندگی بر روی آن دارند.

عواملی نظیر دمای نگهداری شیر، pH شیر، دسترسی آنزیم به سوبسترای طبیعی (گلبول ها ی چربی سالم)و وجود بازدارنده ها و فعال کننده های طبیعی تعیین کننده فعالیت تولید اسید چرب آزاد توسط آنزیم لیپاز می باشد. عملکرد این آنزیم در اغلب موارد ضعیف است، اما بعضی از نژادهای گاو لیپاز فعال تولید می کنند. مقدار لیپاز در شیر در اواخر دوره شیر دهی افزایش می یابد. لیپاز تا حد زیادی در اثر پاستوریزاسیون غیر فعال می شود، اما برای غیر فعال کردن آن به دماهای بالاتری نیاز است. بمنظور جلوگیری از عملکرد لیپاز باید آن را توسط پاستورزاسیون با دمای بالا غیر فعال نمود. لیپازهای باکتریائی مقاومترند. (Moftah *et al*., 2002).

لیپاز تا وقتی که گلبول چربی صدمه نبیند نمی تواند عمل کند. در روشهای معمول فراوری شیر روش های نادرست زیادی وجود دارند که باعث صدمه دیدن گلبول چربی می شوند مانند: پمپ کردن، هم زدن، هموژنیزاسیون و پاشیدن شیر که بایستی مورد اجتناب قرار گیرند تا از ایجاد طعم تندی در شیر جلوگیری شود. لیپاز به حرارت مقاوم است مشکلات عدیده ای را می تواند در شیر ایجاد کند.

در تولید پودر شیر کامل فرایند حرارتی باید در شدتی باشد که تمام لیپازها غیرفعال شوند. چربی شیر در حالت خامه و کره محتوی کربوهیدرات، پروتئین و مواد معدنی می باشد که برای رشد میکروارگانیزم ها محیط مساعدی بوده و بنابراین این محصولات به لیپولیز و اکسیداسیون حساسترند. باکتری های تولید کننده لیپاز از طرق مختلف مانند کودها، علوفه و آب وارد شیر می شوند. (Ramachandran *et al*., 2009).

۳- استرازها

استرازها کاتالیزور هیدرولیز استرها می باشند.تفاوت کلی استرازها با لیپازها در این است که استرازها سوبسترای محلول را به سوبستراهای امولسفیه شده ترجیح می دهند.استرازها خود بر مبنای ویژگی سوبسترا و حساسیت بازدارنده ها به گروه های کوچکتر تقسیم می شوند، که شامل آریل استرازها، کلین استرازها و استیل کلین استرازها می باشند.تمامی استرازهای موجود در شیر دارای

pH اپتیمم فعالیت بین ۸-۷ می باشند و احتمالا از اهمیت تکنولوژیکی خاصی در شیر و محصولات لبنی برخوردار نیستند.تمامی این ها به جز استیل استراز شدیدا به حرارت حساس هستند و بنابراین فرایند پاستوریزاسیون باعث کاهش قابل توجهی در فعالیت آن ها می گردد. مقدار آریل استراز در شیر به طرز قابل توجهی تغییر می کند.

۴- فسفاتازها

این گروه از آنزیم ها استرهای اسید فسفریک را هیدرولیز نموده و بر مبنای نوع سوبسترایی که مورد تجزیه قرار می گیرد و یا pH اپتیمم فعالیت، طبقه بندی می شوند.

فسفاتاز اسیدی و فسفاتاز قلیایی به خاطر تاثیری که در پایداری بعضی از فراورده های لبنی دارند به صورت کامل مورد مطالعه محققان قرار گرفته اند. (Whitaker *et al*., 2003).

۴-۱- فسفاتاز قلیایی

این آنزیم که به فسفومونواستئاراز قلیایی نیز معروف است، کاتالیزور تجزیه فسفات های آلی (استرها یااسید فسفریک) به اسید فسفریک و الکل یا فنل می باشد.این آنزیم از آنزیم های طبیعی بوده و همیشه در شیر وجود دارد ولی در اثر فعالیت پاستوریزاسیون HTST غیر فعال می گردد.به همین دلیل از تست فسفاتاز به عنوان شاخص پاستوریزاسیون استفاده می شود.فسفاتاز فلیایی در مقابل حرارت بسیار حساس است ولی مقومت آن از میکروب های بیماریزایی نظیر سل، حصبه، تب مالت و... که ممکن است در شیر یافت شوند بیشتر است.بنابراین از بین رفتن آن دلیل قطعی برای از بین رفتن این میکروب ها می باشد.این آنزیم در ۶۲.۵ درجه پس از ۲۰ دقیقه ودر ۷۶ درجه پس از ۱.۵ ثانیه از بین می رود.البته پس از مدتی ممکن است مجددا فعال شود و تست فسفاتاز به اشتباه جواب مثبت دهد.فعالیت این آنزیم بر روی میسل های کازئین شیر بسیار کند است چرا که فسفات های غیر آلی، لاکتوز و بتا-لاکتوگلوبولین همگی بر روی این فعالیت اثر بازدارندگی دارند.وجود$Zn2+$ برای فعالیت این آنزیم ضروری بوده (کوفاکتور)و $Mg2+$ نیز نقش تحریک کنندگی دارد. (Neklyudov *et al*., 2002).

۴-۲- فسفاتاز اسیدی

این آنزیم قادر به هیدرولیز فسفومونواسترها در pH اسیدی (۴.۵) بوده و به فسفاتاز اسیدی معروف است.اهمیت تکنولوژیکی آن به خاطرتاثیر آن بر روی میسل کازئین و جداسازی گروه های فسفات از آن می باشد.بعضی از محققان معتقدند که فسفاتاز اسیدی احتمالا نقش مهمی را در تجزیه میسل های کازئین به اجزای کوچکتر آن ها در طی فرایند اسیدی کردن شیر دارد.فسفاتاز اسیدی شیر نسبت به حرارت بسیار مقاوم است به گونه ای که شرایط متداول پاستوریزاسیون را تحمل کرده و برای غیر فعال کردن کامل آن دمای ۸۸ به مدت ۳۰ دقیقه یا ۱۰۰ درجه به مدت ۱ دقیقه لازم است.البته مقاومت حرارتی این آنزیم تابع pH می باشد و با کاهش pH مقاومت آن افزایش می یابد و نیز نسبت به نور خورشید هم حساس بوده و تا ۶۰ ٪ فعالیت خود را بعد از ۳ روز در ۱۷ درجه از دست می دهد.این آنزیم در واقع یک گلیکوپروتئین است که حاوی گالاکتوز، مانوز و گلوکزآمین می باشد. (Ahmed *et al*., 2009).

آنزیم منعقد کننده شیر

انعقاد شیر عبارت از تجمع میسل های آن به صورت یک شبکه است. این شبکه نمایانگر فاز جامد می باشد و گلبولهای چربی در آن محصور می شوند. شیر در روشهای متداول پنیر سازی، با افزودن آنزیم های ویژه ای دلمه می شود. ماده پروتئینی عمده شیر موسوم به کازئینوژن به صورت لخته تشکیل می گردد. انعقاد شیر به صورت پنیر به وسیله ی عمل اسید حاصل از تخمیر لاکتوز به واسطه ی باکتری ها یا به وسیله مایه پنیر به دست آمده از معده چهارم نشخوارکنندگان شیر خوار و یا هر دو توأم با یکدیگر صورت می گیرد. اثر منعقد کننده ی پنیر مایه مربوط به آنزیم رنین است که پروتئین شیر را منعقد می کند و آن را به صورت لخته می سازد. در غالب موارد با این که برای انعقاد شیر مایه پنیر به کار می برند، مقداری باکتری نیز به منظور تولید اسید و کمک به تشکیل لخته ی پنیر اضافه می کنند، به علاوه از باکتری های تولید کننده بوی خوش و یا باکتری های تولید کننده گاز نیز استفاده می شود. (Ertugrul *et al.*, 2007).

پروتئازها نسبت به آنزیم های دیگر برای کنترل انعقاد شیر ترجیح داده می شوند. پروتئازهای موجود در پنیر مایه که در انعقاد شیر دخیل می باشند و باعث تشکیل لخته در پنیر سازی می شوند. شامل: کیموزین، پپسین و پروتئازهای میکروبی بوده و عموماً برای تولید پنیرهای مختلف کاربرد دارند. میزان کیموزین تحت تاثیر تغذیه دام قرار می گیرد. میزان کیموزین از عصاره استخراج شده ۷۵ تا ۱۰۰ درصد متغیر می باشد وهمچنین میزان پپسین از عصاره استخراج شده حداقل ۳۰ درصد می باشد لذا رنت شامل دو ترکیب کیموزین وپپسین می باشدکه در گوساله تازه متولد شده (calf) نسبت کیموزین به پپسین ۹۵ درصد به ۵درصد می باشد. (Fickers *et al.*, 2014).

آنزیم های منعقد کننده شیر شامل:

۱- آنزیم های حیوانی مانند: رنین، کیموزین، پپسین، تریپسین، کیموتریپسین

۲- آنزیم های گیاهی مانند: پاپائین، فیسین، بروملین

۳- آنزیم های میکروبی مانند: باکتری ها و قارچ های سنتز کننده آنزیم

۴- پروتئازهای طبیعی شیر (قلیایی یا پلاسمی- اسیدی)

۱- آنزیم های حیوانی

الف- رنین (Rennin)

شکل خالص آنزیم موجود در رنت (Rennet) یا مایه پنیر است که در پنیر سازی از آن استفاده می شود همانطور که اشاره شد این آنزیم از معده چهارم گوساله شیر خوار استخراج می گردد. پس از اینکه گوساله شروع به مصرف علف می کند به جای رنین پپسین ترشح می شود.در روش سنتی شیردان یا معده چهارم گوساله جوان را خشک کرده و نمک می زنند و سپس آن را به ذرات کوچک بریده و عصاره آنزیمی را به وسیله محلول نمک ۱۰درصد استخراج کرده و سپس با اضافه کردن اسید، pHس آن را تنظیم کرده و

سپس با افزودن نمک(۱۶-۲۰درصد) و مواد نگهدارنده رنین را صاف می کنند.اغلب کارامل برای استاندارد کردن رنگ و گهگاهی نیز مواد طعم دهنده برای پوشش بوهای تند حاصل از معده استفاده می شود. این آنزیم به صورت پودرهای هیدراته، گرانول و یا مایع عرضه می شود. (Deman *et al*., 1990).

مکانیزم عمل رنین: این آنزیم به حالت غیر فعال به نام پرورنین (Prorennin) ترشح می گردد. ماده استخراج شده از معده خشک شده، هم دارای رنین و هم دارای پرورنین می باشد.تبدیل پرورنین به رنین با افزودن اسید تسریع می گردد. این فرایند به صورت اتوکاتالیتیک است، یعنی با تولید مقداری رنین این ماده بقیه پرورنین را به رنین فعال تبدیل می کند. پپسین نیز می تواند کار تبدیل پرورنین به رنین را انجام دهد.عمل تبدیل پرورنین به رنین همراه با آزاد شدن پپتیدهایی از قسمت انتهای N ملکول پرورنین می باشد که طی آن وزن مولکولی از ۳۶۰۰۰ به ۳۱۰۰۰ کاهش می یابد. سه پیوند دی سولفید قسمت های مختلف پرورنین را به هم متصل می کنند که بعد از تبدیل به رنین نیز بدون تغییر باقی می مانند. pH مناسب برای فعالیت رنین ۳/۵ است اما بیشترین پایداری آن در۵ = pHمشاهده می شود. آنزیمها در شیر هم از خود غدد پستانی و هم از باکتری ها ناشی می شوند. اولی آنزیم های اصلی نامیده می شوند و جزء ترکیبات طبیعی شیر هستند و دومی آنزیم های باکتریائی نام دارند و در نوع و فراوانی به جمعیت و نوع میکروب های شیر بستگی دارند. (Cardoza *et al*., 2010).

ب- کیموزین:

حساسیت به هیدرولیز در حضور آنزیم کیموزین یا لخته دادن به وسیله کلسیم از جمله خواص کازئین به شمار می رود. کیموزین به باند پپتیدی بین فنیل آلانین ۱۰۵ و متیونین ۱۰۶ واقع در کاپا کازئین به سرعت حمله ور شده، آن را هیدرولیز می کند در نتیجه کاپا کازئین قدرت تثبیت کنندگی خود را در قبال ممانعت از رسوب میسل های کازئین از دست داده، میسل ها در حضور کلسیم متراکم می شوند.

کیموزین از منابع میکروبی نیز به دست می آید. کیموزین استحصالی از اشرشیاکلای در سال ۱۹۹۰ میلادی در آمریکا مهمترین نوع مایه پنیر محسوب می شده است.همچنین کیموزین استحصالی از Kluyeromyces lactic در بعضی از کشور های اروپایی نظیر آلمان، دانمارک، پرتقال برای پنیرسازی استفاده می شود.

ج- پپسین

این آنزیم به صورت غیر فعال موسوم به پپسینوژن در مخاط پوششی سطح معده تولید می گردد که در pH پایین معده با جداشدن پپتید های کوچک از قسمت انتهایN مولکول به پپسین فعال تبدیل می گردد. پپسین از۳۲۱ اسید آمینه تشکیل شده است.پپسین در pHبیشتر از ۵ دناتوره می شود وفعالیت خود را از دست می دهد.این آنزیم ترجیها اتصالات مجاور فنیل آلانین، تیروزین وتریپتوفان را می شکند.این پروتئاز که در pH پایین واسیدی عمل می کند در تولید پنیر استفاده می شود اما کیفیت پنیر تولیدی به خوبی پنیر تولید شده توسط رنین نیست چراکه امکان تولید پپتید های تلخ مزه وجود دارد.تلخی حاصله را می توان با به کار گیری کربن فعال،

آنزیم کربوکسی پپتیداز A و یا اولترافیلتراسیون کاهش داد و یا حذف نمود.پپسین طیور: پپسین طیور می تواند پروتئین شیر را در pH اسیدی منعقد نماید. چنانچه میزان کشتار طیور در کشتارگاه ها خیلی زیاد باشد جایگزینی پپسین طیور به جای مایه پنیر رنین مقرون به صرفه است. (Badiefar *et al*., 2000).

د- ترپسین و کیموترپسین

این دو آنزیم از پانکراس در روده ترشح می شوند.تریپسین پیوند پپتیدی تشکیل شده توسط گروه کربوکسیل اسید آمینه لیزین یا آرژنین با سایر اسیدهای آمینه را می شکند. کیمو تریپسین در واقع شامل چندین نوع آنزیم شبیه به هم است که با پیشوند آلفا، بتا، گاما، دلتا وپی مشخص می شوند. اینها پیوند مجاور اسید های آمینه تیروزین، فنیل آلانین و تریپتوفان را می شکنند و pH مناسب برای فعالیت آنها حدود۸ است. (Byrd *et al*., 1982).

۲- آنزیم های گیاهی

این آنزیم ها دارای ریشه گیاهی هستند. محل فعال این آنزیم ها دارای یک سیستئین و یک هیستیدین است که برای فعالیت آنها ضروری می باشد. به عنوان مثال پرتئازهای گیاهی به کار گرفته شده برای تولید پنیر در نواحی مختلف جهان شامل پاپائین، بروملین، فیسین، اوریزاسین (Oryzasin) از گیاه (Oriza sativa)، کاکامیسین (Cucumisin) از(Cucumis melo ssp) ، پروتئاز سیب فاسد شده از (Calotropis)و پروتئاز کاهو از (Lactuca sativa) استحصال می شود. دانه گیاه علفیSolanum dubium fresen که بومی سودان است، توانایی انعقاد شیر را به خاطر حضور پروتئاز های سرینی پایدار دارد.

الف- فیسین

فیسین (Ficin)از شیره سفیدرنگ یا لاتکس درخت انجیر (Ficus Carica) تهیه می شود. فیسین می تواند پروتئین های شیر رادرpH ۷ الی ۸ کواگوله نماید.

ب- پاپائین

پاپائین (Papain)که از خربزه درختی (Carica Papaya) که کاملا رسیده نباشد، به دست می آید. این آنزیم در pH ۷-۴ و درجه حرارت ۷۰-۴۰ درجه سانتیگراد فعال می باشد.

ج-بروملین

بروملین (Bromelain) که از آناناس (Ananas Comosus) استحصال می شود. قدرت انعقادی این مایه پنیر در مقایسه با فیسین و پاپائین بسیار ناچیز است. (Ahmed *et al*., 2009).

۲-۱- معایب آنزیم های گیاهی منعقد کننده شیر

- در پنیر تولید شده توسط این نوع از آنزیم ها طعم ومزه تلخ ایجاد می شود. آمونیاک ←NH3(اسید آمینه← مایه پنیر گیاهی ← پپتید در شیر

- راندمان تولید پنیر در مقایسه با مایه پنیر حیوانی کاهش می یابد.
- کیفیت پنیر تولید شده از لحاظ ارگانولپتیکی کاهش می یابد.

۳- آنزیم های میکروبی

مایه پنیر های میکروبی (microbial rennet) پس از جنگ جهانی دوم مصرف آن در پنیر سازی به سرعت افزایش یافته که از قارچ های Mucor Miehei و Mucor Pusilus و Endothia parasitica استخراج و به صورت تجارتی عرضه می شوند. آنزیم های میکروبی انعقاد شیر به طور مطلوب جایگزین مایه پنیر های حیوانی در صنعت پنیر سازی شده اند. آسپرژیلوس اوریزه (Aspergillus oryzae) از بین ۱۶ نژاد قارچ برای تولید بیشترین فعالیت انعقادی شیر، انتخاب شده است.

از باکتری های تولید کننده آنزیم های منعقد کننده شیر می توان به استرپتوکوکسی های مزوفیل، نظیر استرپتوکوکوس لاکتیس و استرپتوکوکوس کرموریس اشاره کرد.اما به دلیل خاصیت پروتئولیتیکی نسبتا پایین اینها، توصیه می شود از استرپتوکوکوس فکالیس و استرپتوکوکوس دورانس استفاده شود. همچنین از محیط کشتهای ویژه ای بدین منظور استفاده می شود مثلا فعالیت قابل توجه آنزیم حاصل از باسیلوس سوبتیلیس زمانی فراهم می شود که باکتری در محیط کشتی با پایه نمکی در pH= ۶ و درجه حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد با شیک کردن ۱۷۵ rpm در طی یک روز، کشت داده شود. (Ahmed *et al*., 2009).

این باکتری ها در مقایسه با استرپتوکوکسی های لاکتیس و کرموریس، از حداکثر دمای رشد بالاتری برخوردارمی باشند (بیش از ۴۵ درجه سانتیگراد)

از آنجایی که کپک ها، خصوصا سویه های پنی سیلیوم در تولید پنیر آبی و انواعی که کپک ها در سطح آنها رشد می کنند به کار می روند.

۱- غلظت ۰/۰۵ تا ۶ ppm آلکالوئید را کوفورتین در پنیر آبی برای ایجاد مسمومیت، بسیار پایین می باشد.

۲- توکسین توسط تعداد اندکی از سویه های پنی سیلیوم راکوفورتی وآن هم در محیط کشت های مصنوعی تشکیل می شود. بنابراین، ترکیب فوق، به هیچ وجه در پنیر یافت نمی شود.

۳- توکسین (پاتولین) که ماده ای سرطان زا در موشهاست، توسط آن دسته از سویه های پنی سیلیوم راکوفورتی که در پنیر سازی به کار برده می شوند، تولید نمی گردد.

۴- پروتئازهای طبیعی شیر

آنزیم های طبیعی یا به طور طبیعی در شیر خام وجود دارندیا از برخی از باکتری های سرمادوست که به میزان زیادی پروتئینازهای فعال تولید می کنند ناشی می شود. Auclair و Lenoir در سال ۱۹۸۰ خاطر نشان کردند که سرد مردن شیر خام سبب انتقال پروتئیناز قلیایی (پلاسمین) از فاز کلوئیدی به فاز سرمی می شود. بتا کازئین در دمای پایین ممکن است به دو جزء گاما کازئین و پروتئوزپپتون هیدرولیز شود این دو بعد ها در حضور پروتئینازهای دیگر به پپتیدهای تلخ تبدیل شده مزه ای تلخ به شیر می دهند در

نتیجه راندمان پنیر در اثر این تبدیل پایین می آید. پروتئینازهای شیر از جنبه های تکنولوژیکی مختلف در صنایع لبنیات مورد توجه قرار دارندکه از جمله می توان به ژله ای شدن شیرهای UHT، تشکیل اسیدهای آمینه در طی رسیدن پنیر چدار و ایجاد طعم تلخ در شیر و فراورده های لبنی اشاره کرد.به طور کلی دو سیستم پروتئیناز طبیعی در شیر وجود داردکه اپتیمم فعالیت یکی از آن ها درpH های خنثی تا کمی قلیایی بوده و دیگری در pH های اسیدی بهتر فعالیت می کند. (El-Sohaimy *et al*., 2010).

مکانیزم انعقاد به وسیله مایه پنیر

کازئین شیر حدود ۷۵تا۸۵ درصد پروتئین شیر را کازئین تشکیل می دهد. معمولا کازئین به صورت خالص درشیر موجود نیست بلکه ابتدا به صورت کازئینات کلسیم است و سپس با جذب فسفات کلسیم فسفو کازئینات کلسیم تشکیل می شود که شبیه دانه های تمشک است در پروتئین کازئین حدود ۲۰ اسید آمینه شرکت دارند. اندازه کازئین حدود ۲۰-۱۰ میلی میکرون است و حرارت های پایین اصولا تاثیری روی کازئین ندارد. حرارت از ۱۳۰ درجه سلسیوس بالاتر روی کازئین اثر می گذارد و ممکن است تغییراتی در بافت پروتئینی کازئین به وجود آورد کازئین به ۴ قسمت تقسیم می شود (آلفا۱، آلفا۲)، بتا، کاپا و گاما که به نسبت های متفاوتی در کازئین شیر وجود دارند کاپا کازئین را فاکتور پایدار کننده (Stabilizing Factor)گویند، زیرا موجب می شود میسل ها در شیر به صورت معلق درآیند و رسوب نکنند، اگر کاپا کازئین را جدا کنند حالت پایدار از بین می رود وپروتئین کازئین در کنار یون کلسیم رسوب می کند ماده ای به نام رنین می تواند کاپا کازئین را از شیر بیرون بکشد، اگر یون کلسیم در شیر نباشد حتی اگر کاپا کازئین بیرون کشیده شود، رسوب نمی کند. (Fox *et al*., 1998).

۷-۱۰درصد رنین داخل شیر می ریزند و تا دمای ۵۰-۴۲ درجه سلسیوس حرارت میدهند شیر رسوب می کند (لخته رنینی تشکیل می شود)، انعقاد شیر توسط اسید هم انجام می شود. pH شیر ۶/۶-۶/۴ است لخته ای که توسط اسید به وجود می آید اسید –کازئین ولخته ای که توسط رنین به وجود می آید رنین –کازئین است لخته رنین-کازئین بهتر است چون کلسیم و فسفر بالاتری نسبت به لخته اسید-کازئین دارد بهترین اسید برای ایجاد لخته، لاکتیک اسید است) در مورد رنین برای ایجاد لخته حتما یون کلسیم را نیاز داریم ولی در مورد اسید یون کلسیم را نیاز نداریم (از آبلیمو، سرکه و...) نیز می توان استفاده پس از جداشدن کازئین آنچه می ماند آب پنیر است(whey protein) این مایع که پس از رسوب دادن کازئین و صاف کردن آن به دست می آید حاوی گلوبولین ها، لاکتوفرین‌ها، سرولو آلبومین، ایمیونوگلوبین ها، پروتئوپپتو فرکشن و لاکتوفرین می باشد لاکتوفرین از پروتئین های آهن دار است پروتئین های بالا برخلاف کازئین به حرارت حساسند و اگر دما از ۶۰ درجه سلسیوس بالاتر رود رسوب می کنند ولی در مقابل اسید و رنین مقاومند .(Gupta *et al*., 2004).

۱- انعقاد شیر توسط مایه پنیر در دو مرحله انجام می شود:

در مرحله اول که آنزیمی است آنزیم روی کاپا- کازئین که دارای ۱۶۹ اسید آمینه می باشد اثر می کند و پیوند میان فنیل آلانین و متیونین را که به ترتیب اسیدهای آمینه شماره ۱۰۵ و ۱۰۶ در این پروتئین هستند می شکند در نتیجه کاپا- کازئین به دو بخش کازئینو- ماکرو پپتید محلول و پارا کاپا کازئین نامحلول شکسته می شود.به دنبال این اثر حفاظت کننده کاپا – کازیین روی -α s کازئین ازبین می رود .این واکنش آنزیمی حتی ممکن است در درجه حرارت ۵درجه سانتیگراد نیز اتفاق افتد .در مرحله دوم که غیر آنزیمی است، کازئین تغییر یافته تحت اثر یون کلسیم رسوب می کند.سایر آنزیم های تجزیه کننده پروتئین، نظیر پپسین و پروتئازهای میکروبی نیز می توانند همان پیوند ذکر شده را بشکنند .انعقاد شیر با افزودن آنزیم های منعقد کننده، تنها در حضور یون کلسیم عملی می گردد. (Neklyudov *et al*., 2002).

نتیجه گیری

تفاوت کلی بین آنزیم های حیوانی و گیاهی منعقد کننده شیر اینست که مایه پنیر های حیوانی حاوی ۸- ۴ درصد پروتئازهای فعال و ناخالصی هایی نظیر ماده لزج و نمک می باشد. اما مایه پنیر های میکروبی حاوی ۸۰- ۹۰ درصد پروتئاز فعال است. عصاره های گیاهی در مقادیر زیاد سبب پروتئولیز شدید و ایجاد طعم تلخ می شوند ولی مقادیر پایین آن محصولی با کیفیت بالا می دهد. منعقده کنندهای گیاهی در مقایسه با کیموزین زمان تشکیل ژل کوتاه تری دارند. فعالیت ضعیف پروتئیناز در شیر پاستوریزه یا پنیر عملا هیچ اهمیتی ندارد، با این وجود نگهداری شیر UHTبه مدت طولانی در دمای اتاق منجر به آن می شود که آنزیم فوق محصول را لخته و طعم تلخی به آن می دهد.

سپاسگزاری

با سپاس و تقدیم به گلهای یاس بهشت آرزوهایم پدر، مادر و برادر عزیزم که عطرشان پایدار و مهرشان ستودنی است.

منابع: **References**

- **احمدی زیدآبادی، میثم. احمدیان، غلامرضا. سروری، رحیم .۱۳۸۷.** تولید کیموزین کامل و پردازش یافته ارزیابی میزان بیان پری پلاسمایی و فعالیت آنزیمی آنها مجله. علمی دانشگاه علوم پزشکی سمنان .جلد ۹، شماره ۳
- **بهبود، مهدی. رضوی، علیرضا. زارع، میثم. ۱۳۹۲.** بررسی تولید کیموزین نوترکیب تولید شده در سیستم باکتریایی و مقایسه آن با آنزیمهای لخته کننده شیر بدست آمده از منابع میکروبی و گیاهی .بیست و یکمین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی ایران
- **حسینی. ف. رضوی پور. ر، ۱۳۸۸.** بهینه سازی تولید لیپاز توسط سویه های باسیلوس جدا شده از لجن فعال، دانش میکروب شناسی: ۱۳۸۸، دوره ۱، شماره ۳؛ ۱ تا ۵.

- رستگار، مینو. فدوی، ابولفضل .فدوی، سید اسماعیل .۱۳۹۳. تولید و استخراج رنت از قارچ کپکی بیست و دومین کنگره علوم و صنایع غذایی ایران*miehei* .
- **طباطبایی یزدی. ف، علیزاده بهبهانی. ب، وسیعی. ع، ۱۳۹۵.** جداسازی و شناسایی مخمر تریکوسپورون آساهی تولید کننده آنزیم لیپاز از کیمچی و بهینه سازی پارامترهای موثر بر تخمیر و تولید لیپاز، مجله علوم و صنایع غذایی : دوره ۱۳، شماره ۵۴ ; ۳۵ تا۵۰
- **فاطمی، ح. ۱۳۷۸.** شیمی مواد غذائی. شرکت سهامی انتشار.۲۶۳ و ۲۸۱ - ۲۷۸.
- **مرتضوی علی .قدس روحانی، محسن .جوینده، حسین .۱۳۸۰.** تکنولوژی شیر و فرآوردههای لبنی .انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.
- **Ahmed, I. A/ M., Morishima, I., Babiker, EE. and Mori, N. 2009.** Characterisation of partially purified milk-clotting enzyme from Solanum dubium Fresen seeds. *Food Chemistry*, 116(2): 395-400. 10- Arima, KYJ.
- **Badiefar L, Ahmadian, G., Asgarani, E., Ghandili, S., Salek Esfahani, M., Khodabandeh, M. 2009.** Optimization of conditions for expression and activation of a splice variant of prochymosin lacking exon 6 in Escherichia coli. International Journal of Dairy Technology, 62(2): 265-271.
- **Bylund, G. 2000.** Dairy processing hand book. Tetra Pak Processing Systems AB S-221 86 Lund, Sweden. P: 29-32, 58, 59, 71, 197, 206, 210, 219, 291, 292, 365.
- **Byrd, JC., Tarentino, AL., Maley, F., Atkinson, PH., Trimble, RB. 1982.** Glycoprotein synthesis in yeast. Identification of Man8GlcNAc2 as an essential intermediate in oligosaccharide processing. The Journal of Biological Chemistry, 257(24): 14657-14666.
- **Cardoza RE., S. Gutiérrez, N. Ortega, A. Colina, J. Casqueiro, JF.** Martín. Expression of a synthetic copy of the bovine chymosin gene inAspergillus awamorifrom constitutive and pHregulated promoters and secretion using two different pre-pro sequences. Biotechnology and Bioengineering, 83(3): 249–259.
- **Cavalli, S. V., Silva, SV., Cimino, C., Malcata, FX. Priolo, N. 2008.** Hydrolysis of caprine and ovine milk proteins, brought about by aspartic peptidases from Silybum marianum flowers. Food Chemistry, 106(3): 997-1003.
- **Deman, J. M. 1990.** Principles of food chemistry,2nd ed. Van Nostrand Reinhold, New York. 380-385.
- **El-Sohaimy, SA. and El-Saadani, MA. 2010.** Cloning and In Vitro-Transcription of Chymosin Gene in E. coli. The Open Nutraceuticals Journal, 3(1): 63-68.
- **Ertugrul, S., Donmez, G. and Takaç, S. 2007.** Isolation of lipase producing Bacillus sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. Journal of Hazardous Materials, 149(3): 720-724.
- **Fickers, P. 2014.** Pichia pastoris: a workhorse for recombinant protein production. Journal of Current Research in Microbiology and Biotechnology, 2: 354-363.
- **Fox, P. F. 1991.** Enzymology. Elsevier Science Publishers LTD. P: 62-78, 158, 241- 245, 466-467.

- **Godfrey, T. & West,A. 1998.** Industrial enzymology. Second edition.Macmillan press LTD. P: 6, 93, 100, 140, 142, 212-218, 407.
- **Gupta, R., N. Gupta and P. Rathi (2004).** Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. Applied Microbiology and Biotechnology, 64(6): 763-781.
- Moftah.omar., Grbavcic. sanja., moftah. walid., lukovic. Nevena., prodanovic. olivera.,jakovetic. **sonja.,knezevic jugovic.zorica., 2013,** Lipase production by *Yarrowia lipolytica* using olive oil processing wastes as substrates. Journal of the Serbian chemical society. 78(6): 781-794.
- **Neklyudov, A.D & Ivankin, A. N. 2002.** Biochemical Processing of Fats and Oils As a Means of Obtaining Lipid Products with Improved Biological and Physicochemical Properties: A Review. Applied Biochemistry and Microbiology, Vol. 38, No. 5, 2002, pp. 399–409
- **Ramachandran, S., Singh،S. K., Larroche, Ch., Soccol, C. R., and Pandey, A. 2007.** Oil cakes and their biotechnological applications–a review. Bioresource Technology, 98: 2000– 2009
- **Whitaker, J. R & Voragen, A.G. 2003.** Handbook of food enzymology.Marcel Dekker,Inc.p: 125- 145, 237-241,667-677.

Milk Enzymes

Mandana Zormand[*1], Mahnaz Hashemi Ravan[2]

Received:2022/09/18 **Accepted:2023/01/04**

ABSTRACT

More than 60 types of endogenous enzymes of milk have been identified in the milk of different species of mammals so far. This study has investigated milk enzymes. Milk clotting enzymes are made from different sources that rennet with animal origin is the most important and the oldest of all. But due to the reduction of its production, attempt has been made to use microbial, herbal and poultry substituents that such substituents must have acidic protease. There are some proteases in raw milk with low enzymatic activity which don't play a role in coagulation because they cause B casein hydrolysate to Gama casein. But there are some psychrotroph gram-negative bacteria and some species of pseudomonas, alcaligenes and flavobacterim in raw milk that cause casein hydrolysate to para kappa-casein compounds and coagulation with their proteases. Milk enzymatic coagulation basically depends on the sensitivity of kappa-casein and the presence of calcium. After kappa-casein breaking at the presence of enzyme and disorganization of its structure, the micelles have accumulated and entangled into each other and form curd and coagulation occurs.

Keywords: enzyme, milk, protease, rennet

[1] Ph.D. Ph.D. student in Food Industry Engineering, Food Technology Field of Study, Islamic Azad University, Varamin-Pishva Branch
[2] Assistant Professor, Department of Food Industries, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Varamin-Pishva Branch
*** Corresponding Author**: mandana.zorman@gmail.com