المجلة العراقية
لبحوث السوق وحماية المستهلك

المجلد (10) العدد (1)
لسنة 2018

إستخدام أنزيم Nattokinase في إنضاج جبن التشدر

أحمد سعدون عبيد[1*] أسوان حمدالله البيار[2] رياض عصام محمد صبري[3]
[1] قسم علوم الأغذية/ كلية الزراعة/ جامعة بغداد، بغداد ، العراق ahmed.sadoon19891987@gmail.com
[2] استاذ مساعد دكتور، قسم علوم الأغذية/ كلية الزراعة، جامعة بغداد، بغداد ، العراق aswanbayar@yahoo.com
[3] استاذ مساعد دكتور، قسم علوم الأغذية/ كلية الزراعة، جامعة بغداد، بغداد ، العراق reaadalani70@gmail.com

تاريخ استلام البحث: 2017/10/24 تاريخ قبول النشر: 2018/2/26

الخلاصة

استعمل أنزيم Nattokinase الخام المنتج من بكتريا *Bacillus subtilis* في إنضاج جبن التشدر، إذ أضيف بتراكيز 80 و160 و320 ملغم/ كغم من الخثرة فضلاً عن معاملة المقارنة الخالية من الأنزيم، وجرى متابعة المنتوج لمدة ثلاثة أشهر تم فيها تقدير الرطوبة والبروتين والدهن والنتروجين غير البروتيني والنتروجين الذائب والاس الهيدروجيني، وإجراء التقييم الحسي، لوحظ تباين نسبة البروتين في المعاملات وبلغت نسبة النتروجين الذائب في الشهر الثاني للانضاج للمعاملات T2، T3، T4 (11.2، 15.54، 18.48) على التوالي مقارنة بمعاملة السيطرة T1 والتي بلغت 7.6%، اما في الشهر الثالث للانضاج فكانت نسبة النتروجين للمعاملات الثلاث اعلاه (17.37، 20.67، 22.26) على التوالي مقارنة بمعاملة السيطرة البالغة 10%فقط، وارتفعت نسبة النتروجين غير البروتيني الى (2.39، 3.35، 5.37) على التوالي مقارنة بمعاملة السيطرة والبالغة 1.48، وأمكن الحصول على جبن تشدر مقبول بعد 2-3 شهر من الإنضاج أي تقليل فترة الإنضاج.

الكلمات المفتاحية: Nattokinase ، الأنزيمات المحللة للبروتين ، إنضاج جبن التشدر.

USING NATTOKINASE IN CHEDDAR RIPENING

Ahmed S. Obaid[*1] *Aswan Hamdullah Al-Bayyar*[2] *Riyadh Essam M. Sabry*[3]
[1] Dep. of Food Sci., Coll. of Agri., Univ. of Baghdad, Baghdad, Iraq. sadoon19891987@gmail.com
[2] Assis. Prof. Dr. Dep. of Food Sci., Coll. of Agri., Univ. of Baghdad, Baghdad, Iraq. aswanbayar@yahoo.com
[3] Assis. Prof. Dr. Dep. of Food Sci., Coll. of Agri., Univ. of Baghdad,Baghdad,Iraq.reaadalani70@gmail.com

ABSTRACT:

The crude enzyme Nattokinase produced by *Bacillus subtilis* was used in ripening cheddar cheese by adding three concentration of enzyme 80, 160 and 320mg/Kg beside the control treatment without enzyme, the product was checked for three months to determine humidity, protein, fat, non-protein nitrogen, soluble nitrogen and pH, sensory evaluation was conducted, it was noticed that the variety in protein percentages and the soluble nitrogen percentage during second month of ripening for T2, T3 and T4 treatments were (11.2, 15.54 and 18.48) respectively, in comparison with control which was 7.6%, while in the third month it was (17.37, 20.67 and 22.26) respectively, in comparison with control which was only 10%, on the other hand, non-protein nitrogen (NPN) increased to (2.39, 3.35 and 5.37) respectively, in comparison with control which was 1.48, it is possible to achieve acceptable cheddar cheese after 2-3 months which means reducing ripening period.

Key words: Nattokinase, Proteolytic enzymes, cheddar cheese ripening.

المقدمة INTRODUCTION:

تعد عملية إنضاج الأجبان عمليات كيميائية حيوية معقدة يحدُث خلالها تحليل للمواد الكربوهيدراتية والدهنية والبروتينية فضلاً عن تغيرات ثانوية أخرى تكون مسؤولة عن تكون النكهة والنسجة لأنواع الأجبان كافة **(Upadhyay, 2003)**، وتعد عملية الأنضاج للأجبان الجافة ونصف الجافة إحدى العمليات المعقدة التي تستغرق وقتاً طويلاً والذي بدوره يسبب زيادة في كلفة التصنيع، لذا فإن أي محاولة لإختصار مدة الانضاج دون المساس بالنوعية، يعود بفوائد إقتصادية كبيرة

* البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الاول.

عن طريق مضاعفة الانتاج ومن ثم دوران رأس المال **(Ezat *et al.*, 1991)** وهناك عدد من الاجراءات التي تتخذ بهذا الجانب من بينها رفع درجة حرارة الإنضاج أو إحداث تحويرات في بكتريا البادئ أو إضافة الأنزيمات الخارجية التجارية **(Fox & Wallace, 1997)**، وبسبب الأهمية الاقتصادية لتقليل وقت إنضاج الأجبان إستعملت مستحضرات أنزيمية من أجل تسريع إنضاج الأجبان وأصبح بعضها متوافر في الأسواق بشكل تجاري مثل أنزيم flavourage المنتج في معامل Hansen في الدنمارك والذي يحتوي على أنزيمات البروتيزات واللايبيزات وكذلك أنزيم Naturage المنتج في معامل Miles الامريكية ويحتوي على البروتيز واللايبيز فضلاً عن الخلايا البكتيرية الحية، وأنزيم Accelase المنتج في معهد التقنية الحيوية (Imperial) في المملكة المتحدة UK والذي يحتوي على بروتيزات وببتيدات بكتريا حامض اللاكتيك **(Unrean & Nguyen, 2013)** تعمل الأنزيمات المستعملة في عمليات تسريع الإنضاج على زيادة تحليل كل من البروتين والدهن وتحسين الصفات الحسية للجبن المنتج كما يمكن بإستعمالها إنتاج جبن بصفات جيدة في وقت قصير على المستوى التجاري، وقد استعملت هذه الأنزيمات بإضافتها بشكل مباشر الى الخثرة بعد عملية تصريف الشرش وقد تم تغليف بعض الأنزيمات عن طريق لفها بليبوزومات فوسفوليبيدية من أجل زيادة توزيعها في خثرة الجبن وإعاقة تداخلها مع بروتينات الحليب **(Picon *et al.*, 1996)**، وعُرف بروتيز Nattokinase لأول مرة في عام 1980 من قبل الباحث **Dr.Hioryuki Sumi** ودُرست صفات الأنزيم الخام في عام **(Fujita *et al.*, 2011)** وتناولت العديد من الدراسات إنتاج هذا الأنزيم وإستخلاصه من مصادر مختلفة ونظراً لكون الأنزيم يعمل في مدى من الأرقام الهيدروجينية تتراوح بين (5 الى 10) ودرجات حرارة من 30الى 60م **(Paik, 2004)** وهذا ما يؤهله للإستعمال في مجالات صناعية وغذائية وطبية، وأكد **Andrews (1983)** إمكانية إستعمال هذا الأنزيم كمُخثر للحليب نظراً لقابليته العالية على تحليل بروتين الحليب وهو الكازين **(Meruvu *et al.*, 2011)** وإستناداً الى ما تقدم تم استعمال أنزيم Nattokinase **(Murakaim, 2012)** الخام المنتج من بكتريا *Bacillus subtilis* في إنضاج جبن التشدر وهو من الأجبان الجافة وبتراكيز مختلفة وتحديد التركيز الأمثل والصفات الكيميائية والحسية لها.

المواد وطرائق العمل MATRIALS AND METHODS:

صناعة جبن التشدر Manufacture of cheddar cheese:

تحضير وتنشيط البادئ preparation and activation of the starter:

حضر البادئ المستعمل قيد الدراسة بتعقيم 100 مل من الحليب الفرز في المؤصدة على درجة حرارة 121م ولمدة 5 دقائق وبعد التبريد لقح الحليب بنسبة 1% من البادئ النقي وحضن الحليب الملقح في درجة حرارة 32م ولمدة 24 ساعة لحين ألتخثر وكُررت هذه العملية ثلاث مرات على التوالي وإستعمل البادئ الناتج في التصنيع وهو بعمر 24 ساعة.

صناعة جبن التشدرالقياسي Manufacture of standard cheddar cheese:

صنع جبن التشدر حسب الطريقة الموصوفة من قبل **Al-Dahan (1983)** والتي تتضمن ما يأتي:

1. إستلام الحليب البقري الخام (10 كغم) وتصفيته من الشوائب ثم قُدرت فيه نسبة الحموضة والدهن والبروتين ومن ثم بسترته بطريقة البسترة البطيئة بدرجة حرارة 63م ولمدة 30 دقيقة وبُرد الى 31م.
2. أضيف البادئ المُجفد المُستعمل لصناعة جبن التشدر بنسبة 2% وهو خليط من بكتريا *Lactocuccs lactis ssp lactis* و *Lactococcus lactis ssp cremoris* إذ خُلط مع الحليب لمدة 5 دقائق وترك لمدة 30 دقيقة وهي مدة إنضاج الحليب.
3. أضيف محلول المنفحة المايكروبية Mucor miehei بالكمية المناسبة وحسب التعليمات التي تُصدرها الشركة المصنعة لها (1 غم/ 100 كغم حليب) مُزجت مع الحليب لمدة 3-4 دقائق وبدرجة حرارة 31م وتُرك حتى حدوث التخثر خلال 40-50 دقيقة.
4. قطعت الخثرة وطبخت برفع درجة حرارتها الى 39م خلال نصف ساعة تدريجياً وبمعدل 1 درجة مئوية لكل3-4 دقائق. تركت الخثرة بعد حوالي ساعة ونصف من نهاية التسخين لكي تركد في قعر الحوض ولمدة 1/2 ساعة.
5. صُرف الشرش من الحوض عندما وصلت حموضة الشرش (0.19-0.23) نسبة مئوية كحامض لاكتيك.
6. وضعت الخثرة على جانبي الحوض وعُمل ممر في الوسط لإزالة الشرش الذي يخرج من الخثرة وهي عملية (التشدرنة Cheddaring).
7. قُطعت الخثرة بوساطة سكاكين الى قُطع صغيرة بعرض حوالي 15سم ثم قُلبت في الحوض ووضعت فوق بعضها البعض بعد حوالي 15-20 دقيقة وإستمرت عملية التشدرنة حتى وصول نسبة الحموضة للشرش الى (0.45-0.50) نسبة مئوية كحامض لاكتيك.

8. تم فرم الخثرة الى قُطع صغيرة بسكاكين وأضيف الملح بنسبة 3% من وزن الخثرة وخلط جيداً، ثم وُضعت الخثرة في قوالب معقمة وتم كبسها جيداً لمدة 16 ساعة ثم أُخرجت من القوالب في اليوم التالي وتُركت الأجبان على رفوف حتى جفاف السطح .غُلفت الأجبان بشمع البرافين المنصهر في 118م لمدة 4 أشهر وقد أجريت الفحوص الكيميائية للنماذج شهرياً فضلاً عن التقييم الحسي.

صناعة جبن التشدر بأضافة أنزيم Nattokinase

Manufacture of cheddar cheese by adding Nattokinase

تم تصنيع الجبن بالطريقة التي وردت سابقاً عدا إضافة الأنزيم بواقع 80 و160و320 ملغم /كغم من الخثرة، أخذت النماذج من جبن التشدر للمدد المختلفة (0 و1 و2 و3) أشهر لغرض إجراء الفحوص الكيميائية وذلك بقطع شريحة من الجبن مع إهمال القشرة السطحية وإحكام غلقها وحفظها في أكياس من البولي أثيلين في درجة حرارة 20م حتى إجراء التحاليل المطلوبة ،أما نماذج التقييم الحسي فقد أخذت على شكل شرائح وقطعت الى قطع ووضعت في صحون زجاجية وأُجري لها التقييم الحسي من لجنة مكونة من سبعة من الأساتذة المختصين في مجال تصنيع الألبان في قسم علوم الاغذية وبحسب إستمارة أُعدت لهذا الغرض (الجدول، 1).

جدول (1): إستمارة التقييم الحسي لجبن التشدر-**(AL-Dahan, 1983)**.

المعاملة	عمر الجبن (شهر)	اللون	النكهة	القوام	النماسك	الفتحات	المرارة

الفحوصات الكيميائية للحليب Chemical tests of milk

1. تقدير نسبة الدهن حسب طريقة بابكوك المذكورة في **A.O.A.C (1980).**
2. تقدير نسبة حامض اللاكتيك حسب الطريقة المذكورة في **A.O.A.C (1980).**
3. تقدير نسبة البروتين حسب طريقة مايكروكلدال وحسب الطريقة الموصوفة من قبل **Joslyn (1970)** والمعدلة من قبل **Egan (1985)**.
4. تقدير الرقم الهيدروجيني حسب ما تم ذكره في **A.O.A.C (1980).**
5. تقدير نسبة الرطوبة حسب طريقة **Joslyn (1970)**.

الفحوصات الكيميائية للجبن Chemical tests of cheese:

1. تقدير نسبة الرطوبة Determination of moisture content

أخذ وزن الجفنة المستعملة لتقدير الرطوبة وهي فارغة ثم تم وزن 5غم من الجبن في الجفنة ووضعت في الفرن الكهربائي بدرجة حرارة 105م ولمدة 24ساعة بعدها تم وزن العينة مع الجفنة وقُدرت نسبة الرطوبة.

2. تقدير النتروجين الكلي Total Nitrogen Determination (TN)

قُدر النتروجين الكلي TN حسب الطريقة التي ذكرها **ling (1956)**.

3. تقدير النتروجين الذائب Determenation of Soluble Nitrogen (SN) Soluble Nitrogen

قُدر النتروجين الذائب SN حسب الطريقة المذكورة في **ling (1956)**.

4. تقدير النتروجين غير البروتيني Determination of non - protein (NPN) Non- protein ntitrogen nitrogen: قدر النتروجين غير البروتيني NPN حسب الطريقة الموصوفة في **ling (1956)**.

5. تقدير الرقم الهيدروجيني Determination of pH

قُدرالرقم الهيدروجيني للجبن بحسب الطريقة المذكورة في **ling (1956)**.

النتائج والمناقشة RESULTS AND DISCUSSION:

استخدام أنزيم Nattokinase في إنضاج جبن التشدر Using of Nattokinase in Cheddar cheese ripening

يوضح (الجدول، 2) التركيب الكيميائي للحليب المستعمل في صناعة جبن التشدر وهي تمثل النسب المعروفة للحليب البقري.

جدول (2): التركيب الكيميائي للحليب البقري المستعمل في صناعة جبن التشدر.

ت	المكونات	النسبة
1	البروتين %	3.32
2	الدهن %	3.73
3	المواد الصلبة الكلية T.S	12.60
4	المواد الصلبة غيرالدهنية S.N.F	8.96
5	الحموضة %	0.14
6	الرقم الهيدروجيني	6.7
7	الوزن النوعي	1.028
8	الرطوبة	87.32

يوضح (الجدول، 3) نتائج التحليل الكيميائي لجبن التشدر المعامل بتراكيز مختلفة من أنزيم Nattokinase المنتج من بكتريا *Bacillus subtilis* والمتمثلة بالمعاملات الأربعة T1، T2، T3، T4 وتمثل المعاملة (T1) جبن المقارنة الخالي من الأنزيم، والمعاملة (T2) تمثل جبن التشدر مضافاً إليه الأنزيم Nattokinase بتركيز 80 ملغم/ كغم، والمعاملة (T3) تمثل جبن التشدر مضافاً إليه الأنزيم Nattokinase بتركيز 160ملغم/ كغم، والمعاملة (T4) تمثل جبن التشدر مضافاً إليه الأنزيم Nattokinase بتركيز 320ملغم/ كغم ولمدة ثلاثة أشهر.

جدول(3): نتائج التحليل الكيميائي لجبن التشدر المعامل بتراكيز مختلفة من أنزيم Nattokinase.

المكونات	المعاملة	الشهر الأول	الشهر الثاني	الشهر الثالث
الرطوبة %	T1	38.48	36.47	35.42
	T2	40.37	39.42	38.34
	T3	41.34	39.48	38.29
	T4	41.78	40.25	39.27
البروتين %	T1	25.00	23.50	21.68
	T2	22.45	21.18	20.24
	T3	19.48	18.54	18.32
	T4	18.34	17.79	17.32
الدهن %	T1	35.52	33.90	30.29
	T2	33.64	31.27	29.47
	T3	31.72	29.78	28.36
	T4	30.89	29.63	28.18
الرقم الهيدروجيني	T1	5.30	5.18	5.20
	T2	5.38	5.25	5.27
	T3	5.24	5.15	5.18
	T4	5.21	5.11	5.19
النتروجين الذائب SN	T1	2.00	7.60	10.00
	T2	4.78	11.22	17.37
	T3	7.68	15.54	20.67
	T4	11.96	18.48	22.26
النتروجين غير البروتيني NPN	T1	1.48	2.00	2.24
	T2	2.39	3.85	4.32
	T3	3.35	4.20	5.58
	T4	5.37	7.47	9.42

T1: جبن المقارنة الخالي من الأنزيم.
T2: جبن التشدر مضافاً إليه الأنزيم Nattokinase بتركيز 80 ملغم/ كغم.
T3: جبن التشدر مضافاً إليه الأنزيم Nattokinase بتركيز 160ملغم/ كغم.
T4: جبن التشدر مضافاً إليه الأنزيم Nattokinase بتركيز 320ملغم/ كغم.

1. المحتوى الرطوبي Moisture content

توضح النتائج المبينة في (الجدول، 3) المحتوى الرطوبي للمعاملات الأربعة على مدى ثلاثة أشهر، إذ كانت قيم المحتوى الرطوبي لكل من المعاملة T1 (جبن المقارنة) والمعاملة T2 (إضافة الأنزيم بنسبة 80 ملغم/ 1كغم) والمعاملة T3 (إضافة الأنزيم بنسبة 160 ملغم/ 1 كغم) والمعاملة T4 (إضافة الأنزيم بنسبة 320 ملغم/ 1كغم) في الشهر الأول 38.48 و40.37 و41.34 و41.78 على التوالي، وكانت هذه النسب ضمن نسبة الرطوبة التي حددتها المواصفات القياسية الأمريكية لجبن التشدر والتي تتراوح بين 30- 40%، ويلاحظ إن إضافة الأنزيمات الى الخثرة لا تؤثر في المحتوى الرطوبي إلا إن الأختلافات ناتجة عن عدم تجانس عملية الكبس للمعاملات المختلفة **(Sultana, 2008)** كما يلاحظ تغيير وإنخفاض نسب الرطوبة بتقدم مراحل الإنضاج، إذ وصلت القيم للمحتوى الرطوبي عند نهاية مرحلة الإنضاج الى 35.42 للمعاملة T1 و38.34 للمعاملة T2 و38.29 للمعاملة T3و39.27 للمعاملة T4 على الرغم من إنخفاض المحتوى الرطوبي فإن المعاملة T4 بقيت مرتفعة وذلك لأن زيادة التحلل البروتيني تؤدي الى تحرر مجاميع أمينية وكاربوكسيلية مشحونة لها القابلية على عمل ترابطات كيميائية مع الماء ومن ثم إحتجاز كميات كبيرة من الماء داخل الخثرة **(Ofarrell *et al.*, 2002)**.

2. النسبة المئوية للبروتين Percentage of protein

يتضح من (الجدول، 3) الى أن النسب المئوية للبروتين بدأت بالأنخفاض تدريجياً مع تقدم مراحل عملية الإنضاج وبزيادة تركيز الأنزيم، إذ نُلاحظ أن النسبة المئوية للبروتين للمعاملات T1 و T2 وT3 وT4 كانت عند الشهر الأول 25 و22.45 و 19.48 و18.34على التوالي ونُلاحظ أن نسبة البروتين تنخفض بزيادة تركيز الأنزيم والذي يؤدي الى زيادة الفعالية التحللية للبروتين فعند معاملة T1 كانت النسبة 25 (جبن المقارنة) بينما معاملة T4 وصلت النسبة فيها الى 18.34 عند الشهر الأول من الإنضاج لكن وصلت النسب عند الشهر الثالث للمعاملات T1 و T2 و T3 و T4 الى 21.68 و 20.24 و 18.32 و 17.32 إن سبب التباين في نسب البروتين بين معاملة T1 وبقية المعاملات يعود الى أن جبن المقارنة يكون فيه التحلل البروتيني عالياً بفعل أنزيم chymosin و plasmin الأنزيمات المحللة لبروتين الكازين في الحليب **(Sugimoto, 2007)** بينما في المعاملات فيعود السبب الى فعالية أنزيم Nattokinase في تحليل الكازين كذلك يعود السبب الى الإختلاف في نسب الرطوبة بين المعاملات **(El-Batawy *et al.*, 1992)**.

3. النسبة المئوية للدهن Percentage of fat

تشير النتائج المدونة في (الجدول، 3) الى أن النسبة المئوية للدهن في جبن التشدر للشهر الأول من الإنضاج للمعاملات كافة T1، T2، T3، T4 كانت 35.5 و33.64 و31.72 و30.89 على التوالي، إن سبب تفاوت نسبة الدهن للمعاملات الأربعة يعود الى فعالية اللايبيزات التي تحلل الدهن وإعطاء مركبات دهنية قصيرة السلسلة تكون مسؤولة عن إعطاء النكهة للجبن، لكن بتقدم مرحلة الإنضاج إنخفضت نسبة الدهن للمعاملات الأربعة الى 30.29 و29.47 و28.36 و28.18 على التوالي، كما إن بعض الحوامض الدهنية الناتجة من التحلل الدهني لها القابلية على الذوبان في الماء ومن ثم تفقد مع الشرش وإتفقت هذه النتائج مع ما ذكره **Lane & Fox (1996)**.

4. الاس الهيدروجيني pH

يلاحظ من (الجدول، 3) إنخفاض الاس الهيدروجيني للجبن الناتج للمعاملات المختلفة T1 وT2 وT3 وT4، إذ إنخفض الاس الهيدروجيني من الشهر الأول الى الشهر الثاني للمعاملة T1 من 5.30 الى 5.18، والمعاملة T2 من 5.38 الى 5.25، وT3 من 5.24 الى 5.15، وT4 من 5.21 الى 5.11، ويعود السبب في ذلك الى تحول سكر اللاكتوز المتبقي في الجبن الى حامض لاكتيك أثناء الشهر الاول والثاني من الانضاج **(Hofi *et al.*, 1991)**، لكن من ناحية أخرى نلاحظ حدوث إرتفاع بسيط في الاس الهيدروجيني للمعاملات الثلاث (T1 و T2 وT3) في الشهر الثالث من الأنضاج، إذ بلغت 5.18 و5.27 و5.19 على التوالي والسبب في ذلك يعود الى أن التحلل البروتيني العالي بفعل أنزيم Nattokinase الذي يؤدي الى تحرر مركبات أمينية قاعدية التفاعل تسبب إرتفاع الاس الهيدروجيني في مراحل متأخرة **Al-omar *et al.*, (1990)**، لكن في معاملة السيطرة (T1) يعود السبب في التحلل البروتيني الى الأنزيمات المتحررة من بكتريا البادئ.

التغيرات في المادة النتروجينية Changes in substance nitrogens

تعد سرعة تحلل البروتين من المؤشرات الدالة على نجاح عملية الإنضاج، إذ يتحول البروتين الى نواتج أبسط، وببتيدات كبيرة ومتوسطة الحجم تعمل على تطوير قوام ونسجة الجبن فتكسبه ليونة ونعومة اكثر فضلاً عن تأثيره في الطعم تؤدي الأجزاء الذائبة من البروتين دوراً مهماً في تطور نكهة الجبن **(Mukherjee, *et al.*, 2012)**.

يوضح (الجدول، 3) النسب المئوية للنتروجين الذائب والنتروجين غير البروتيني لكل من المعاملة T1 عينة السيطرة والمعاملات الأخرى T1 وT2 وT3 التي عوملت بتراكيز مختلفة من الأنزيم قيد الدراسة، وقد وجدت إختلافات واضحة بين جميع المعاملات خلال مدة الإنضاج، ويعزى سبب ذلك الى الفعالية التحللية العالية للأنزيم المُضاف في تحليل

بروتين الكازين الى ببتيدات صغيرة الحجم وتحرير كميات كبيرة من النتروجين الذائب والنتروجين غير البروتين **Picon *et al.*, (1996)**.

التغير في محتوى الجبن من النتروجين الذائب Change in cheese content of soluble nitrogen

تمثل النسبة المئوية للمركبات النتروجينية الذائبة خير دليل لمتابعة التحلل البروتيني في أثناء مدة الإنضاج، إذ نلاحظ من خلال (الجدول، 3) إرتفاع نسب النتروجين الذائب SN/TN في المعاملات (T2 وT3 وT4) عما هو عليه في عينة المقارنة (T1) مع وجود تباين بين المعاملات كافة بعد التصنيع مباشرة وخلال مرحلةالإنضاج، إذ بلغت نسب SN/TN للمعاملات T1 وT2 وT3 وT4 للشهر الاول من الإنضاج هي 2.00 و4.78 و7.68 و11.96، ولكن نجد أن نسب النتروجين الذائب زادت أكثر بين الشهر الثاني والثالث للإنضاج، إذ بلغت النسب للمعاملة T1 من 7.60-10، والمعاملة T2 من 11.2-17.37 والمعاملة T3 من 15.54-20.67 والمعاملة T4 من 18.48-22.26، إن سبب زيادة المركبات النتروجينية الذائبة في عينة السيطرة للجبن (T1) هو بسبب فعالية الأنزيمات المخثرة الموجودة في الجبن والتي مصدرها الحليب وليست مضافة مثل أنزيم Chymosin الذي يعمل على تحليل αs1-casein بينما أنزيم Plasmin يعمل على تحليل β-casein بينما في المعاملات الثلاث الأخرى فيعود سبب إرتفاع النتروجين الذائب الى فعالية أنزيم Nattokinaseالذي يعمل على تحليل بروتين الكازين الموجود في الحليب وتحرير النتروجين **(UPadhaya & McSweeney, 2003)**، ويتضح مما سبق ان أعلى نسبة نتروجين ذائب نتجت من المعاملة T4، إذ وصلت الى 22.26%.

التغير في محتوى الجبن من النتروجين غير البروتيني

Change in cheese content of non- protein nitrogen

يتضح من خلال (الجدول، 3) أن هناك تباين في نسبة NPN/TN بين المعاملة T1 والمعاملات T2 وT3 وT4 بعد التصنيع مباشرة وخلال مرحلة الإنضاج، ويلاحظ إرتفاع قيم NPN للمعاملات T2 وT3 وT4 عما هو عليه في معاملة T1، إذ بلغت نسب النتروجين غير البروتيني للمعاملات الأربعة على التوالي هي 1.48 و2.39 و3.35 و5.37، ويعود سبب تطور قيم NPN في أثناء إنضاج جبن التشدر الى فعل بقايا الأنزيمات المخثرة في الجبن وكذلك البروتيزات التي مصدرها البادئ بالنسبة للمعاملة T1أما بقية المعاملات الثلاث فيعود الى فعالية الأنزيم المضاف قيد الدراسة Nattokinase إذ بلغت قيم NPN عند الشهر الثالث للأنضاج لكافة المعاملات 2.24 و4.32 و5.58 و9.42 على التوالي، وجاءت هذه النتائج مقاربة لما وجده **Adity *et al.*, (1997)** والذي أشار الى أن النسب المئوية للنتروجين غيرالبروتيني المتحررة عند إنضاج جبن التشدر بوساطة بروتيزات من نوع Cathpsein D هي 1.98 و4.08 و6.17 و9.19 لمعاملة المقارنة والمعاملات الأخرى على التوالي.

التقييم الحسي لجبن التشدر Sensory evaluation of cheddar cheeses

يوضح (الجدول، 4) نتائج التقييم الحسي لجبن التشيدرالمعامل بتراكيز مختلفة من أنزيم Nattokinase من ناحية الصفات الحسية مثل اللون والنكهة والقوام والتماسك والفتحات والمرارة لجبن التشدر المنتج من المعاملات المختلفة بعمر 0 و1 و2 و3 شهر من الإنضاج، إذ يوضح الجدول وجود فروق معنوية في متوسطات الدرجات الممنوحة لصفة اللون وبلغت قيمة الفرق المعنوي (*1.76)، فقد تراوحت متوسطات الدرجات الممنوحة بين 9.40-10.00 للمعاملات كافة في أثناء مدة الإنضاج، كما يوضح الجدول نفسه تفوق الدرجات الممنوحة لصفة النكهة للمعاملات التي أضيف إليها الأنزيم، وقد كان هذا التفوق معنوياً عند مستوى إحتمالية 0.05 وبنسبة بلغت (*2.56) مع تميزها بالنكهة النظيفة الخالية من أي طعوم غريبة، إذ مُنحت أعلى الدرجات لنكهة جبن المعاملة T2 وT3 وT4 وأخيراً جبن المقارنة، كما يوضح الجدول نفسهُ تفوق الدرجات الممنوحة لصفة النكهة للمعاملات التي أضيف إليها الأنزيم في مراحل متاخرة من الإنضاج ولا سيما في الشهر الثالث للإنضاج للمعاملات T2 وT3 على التوالي أما في المعاملة T4 فنلاحظ أن النكهة لم تظهر بوضوح إلا في الشهر الثالث أما بالنسبة لمعاملة T1(Control) فلم يحصل الجبن على نكهة واضحة إلا بعد مرور ثلاثة أشهر من الإنضاج، وجاءت هذه النتائج مقاربة لما أشار إليه **WU (2005)** عند إستعماله انزيمات مايكروبية للأسراع في إنضاج جبن التشدر، كما أشار **Ammar *et al.* (1991)** الى أن تطور نكهة الجبن يعود الى زيادة التحلل البروتيني والدهني في الجبن الذي أضيفت إليه أنزيمات محللة للبروتين والدهن من أجل الإسراع في عملية الإنضاج، كما يلاحظ من الجدول نفسهُ إرتفاع الدرجات الممنوحة لصفة القوام مع تقدم مدة الإنضاج لجميع المعاملات، وقد أشار **Majeed *et al.* (2007)** الى أن صفة القوام تتأثر بشكل مباشر بتحلل الكازينات والدهن فضلاً عن تأثير التغيرات الفيزيائية التي يسببها تغير الحموضة وتوزيع جزيئات الملح في الجبن وبلغت قيمة الفرق المعنوي للمعاملات (2.74)، وأوضح الجدول نفسه تراوح متوسطات الدرجات الممنوحة لصفة التماسك بين 8.60-10.0 ولوحظت فروق معنوية للمعاملات ولمدة الإنضاج عند مستوى إحتمال 0.05 وبلغت قيمة

الفرق المعنوي للمعاملات (*2.85) أما فيما يتعلق بالفتحات فقد كانت الدرجات الممنوحة لها مرتفعة التقييم الحسي للمعاملات كافة منذ بداية الإنضاج وحتى نهايته، مما يدل على أن هذه الصفة كانت من الصفات الجيدة لجبن التشدر ولم تلاحظ فروق واضحة عند مستوى إحتمال 0.05 ووصلت الى (*1.63) بين القيم المعطاة للمعاملات المختلفة، وقد تراوحت متوسطات هذه الصفة بين 8.60-10.00، وهذا يشير الى عدم تكون فتحات ميكانيكية وعدم حدوث تلوث بالأحياء المجهرية المنتجة للغاز مثل بكتريا القولون (coliform).

أما فيما يتعلق بصفة الطعم المر في الأجبان المنتجة قيد الدراسة، فقد تراوحت متوسطات الدرجات الممنوحة لصفة المرارة بين 8.12-10.0، ووجد هناك فروق معنوية عند مستوى إحتمال 0.05 بين المعاملات ووصلت قيمة الفرق المعنوي بين المعاملات الى (*2.41)، إن سبب تكون الطعم المر في الجبن هو بسبب الأنزيمات المحللة للبروتين سواء كان مصدرها من بكتريا البادئ أو أنزيمات المنفحة المايكروبية بالنسبة لمعاملة T1(control) أو الأنزيم المضاف بالنسبة للمعاملات البقية حيث تقوم هذه الأنزيمات بتحطم البروتينات وإنتاج ببتيدات، وفي حالة إحتواء واحدة أو أكثر من هذه الببتيدات على حوامض أمينية طرفية مرة يظهر الطعم المر ويزال بتكسير هذه الببتيدات **(Zhu, 2008)**.

جدول (4): نتائج التقييم الحسي لجبن التشدر Cheddarالمعامل بأنزيم Nattokinase.

المعاملة	عمر الجبن (شهر)	اللون	النكهة	القوام	التماسك	الفتحات	المرارة
T1	0	9.75	5.76	9.20	9.20	9.50	10.00
	1	9.80	6.20	7.40	8.60	9.25	10.00
	2	10.00	6.40	9.00	9.20	9.68	9.30
	3	10.00	8.20	9.00	9.73	9.00	8.80
T2	0	10.00	7.60	9.40	9.20	9.40	10.00
	1	9.86	8.36	8.40	8.80	9.50	10.00
	2	10.00	9.40	9.75	9.60	10.00	10.00
	3	10.00	9.68	9.80	9.85	10.00	9.60
T3	0	9.80	7.86	8.24	8.80	9.00	10.00
	1	9.60	8.47	8.76	8.60	8.60	9.50
	2	9.52	8.24	9.18	9.25	10.00	8.45
	3	10.00	9.25	9.25	9.50	9.00	8.24
T4	0	9.60	8.25	8.62	8.85	8.85	10.0
	1	9.40	8.50	8.76	7.90	9.00	9.50
	2	9.50	8.75	8.24	8.70	10.00	8.25
	3	10.00	9.00	7.82	9.20	9.25	8.20
قيمة LSD	---------	1.76*	2.56*	2.74*	2.85	1.63*	2.41*

T1: جبن المقارنة الخالي من الأنزيم.
T2: جبن التشدر مضافاً إليه الأنزيم Nattokinase بتركيز 80 ملغم/ كغم.
T3: جبن التشدر مضافاً إليه الأنزيم Nattokinase بتركيز 160ملغم/ كغم.
T4: جبن التشدر مضافاً إليه الأنزيم Nattokinase بتركيز 320ملغم/ كغم.

المصادرREFERENCES:

I. Adity, S., Barbano, D. M, Joseph, J. Y., Klei, L. R., Oltenacu, P. A., & Bandler, D. K. (1997). Cheddar cheese: Influence of milking frequency and stage of Lactation on Composition and yield. *J. Dairy Sci., 80,* 437-446.

II. Al-Dahan, A. (1983). *Cheese Making and its Types in the World*. Dar Al-Hikma, Mousel, Iraq.

III. Ammar, E. M. A., Mohamed, S. G., & Mohamed, B. A. (1991). Effect of cheese slurry on the fatty acids and protein breakdown of ras cheese during ripening period. Egypt. *J. Food Sci., 19*(3), 375-382.
IV. Andrews A. T. (1983). Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins, *J. Dairy. Res., 50*, 45-50.
V. A.O.A.C**.** (1980). *Official Methods of Analysis*. 13th Ed Association of Official Analysis Chemists, Washington D.C.
VI. Egan, H, KirK, R. S., & Sawy, R. (1985). *Pearsones Cemical Analysis of Food*. 8th Ed. London. Churchill-Livingstone.
VII. El-Batawy, M. A., El-Abd, M. M., Younes, N. A., & El-Tawel, H. S. (1992). Effect of salting method on the ripening of ras cheese made from mixed goats and cow's milk. Egyptian. *J. Dairy Sci., 20*, 341-353.
VIII. FOX, P. F., & Wallace, J. M. (1997). Formation of Flavour Compounds in Chees Advances in Applied microbiology, VOL. 45, Academic Press, Cork, Ireland.
IX. Fujita, M., Ohnishi, K., Takaoka, S., Ogasawara, K., Fukuyama, R., & Nakamuta, H. (2011). Antihypertensive effects of continuous oral administration of nattokinase and its fragments in spontaneously rats. *Biol. Pharm. Ball., 34*, 1696-1701.
X. Hofi, A. A., Abd El-Hamid, L. B., Ahmed, N. S., & Abbas, H. M. (1991). Acceleration of ras cheese ripening by relevant slurry. *Egyptian J.Dairy Sci., 19*, 337-349.
XI. Joslyin, M. A. (1970). Method in Food Analysis, Physical, Chemical and Instrumental Method of Food Analysis is 2nded. Academic Press. New York.
XII. Lane, C. N., & Fox, P. F. (1996). Contribution of starter and adjunct Lactobacilli to proteolysis in cheddar cheese during ripening. *Int. Dairy Journal, 6*, 715-722.
XIII. Ling, E. R. (1956). Atextbook of Dairy Chemistry. Vol. 2. Chapman and Hall, Ltd, London.
XIV. Majeed, G. H., Nasir, A. K., & Al-Rikabi, A. K. (2007). Extraction of camel pepsin and its using in manufacturing Iraqi fresh white cheese. *Al-Basrah J. of Agri. Sci., 7*(2), 128-137.
XV. Meruvu, H., & Vangalapati, M. (2011). Nattokinase: A review on fibrinolytic enzyme. *Int. J. Chem. Environ. Pharm Res., 2*(1), 61-66.
XVI. Mukherjee, A., Rai, S., Thakur, R., Chattopadhyay, P., & Kar, S. (2012). Bafibrinase: A non hemorrhagic, direcacting fibrinolytic serine protease from Bacillus sp. strain As-s20-Iexhibits in vivo anticoagulant activity and thrombolytic potency. *Biochimie, 94*(6), 300-308.
XVII. Murakaim, K. (2012). Inhibition of Angitension I Conveting Enzyme by Subtilisin NAT (Nattokinase) in Natto, A Japanese Traditional Fermented Food. Food Funct.
XVIII. O'Farrell, I. P., Jeremiah, J. S., Martin, G. W., Dermot, H., & Kelly, A. L. (2002). Influence of addition of plasmin or mastitis milk to cheese milk on quality of smear ripened cheese. *INRA, EDPS Science, 10*, 1051-1059.
XIX. Paik, H. D., Lee S. K., Heo, S., Kim, S. Y., Lee, H., & Kwon, T. J. (2004). Purification and characterization of the fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus subtilis* KCK-7 from chungkookjang. *J. Microbial. Biotechnol., 14*, 829-835.
XX. Picon, A., Serrano, C., Gaya, P., Medina, M., & Nunez, M. (1996). The effect of liposomes encapsulated cyprosins on manchego cheese ripening. *J. Dairy Sci.,79*, 16- 29.
XXI. Sugimoto, S. (2007). The fibrinolytic avtivity of anovel protease derived from a tempeh producing fungus , *Fusarium sp*. *BLB Biosci Biotechnol Biochem.32*, 76-85.

XXII. Sultana, A. A. (2008). Dipeptide YY derived from royal jelly proteins inhibits renin activity. *Int. J. Mol. Med., 93*, 143-149.

XXIII. Unrean, P., & Nguyen, N. H. A. (2013). Metabolic pathway analysis and kinetic studies for production of nattokinase in *Bacillus subtilis. Bioprocess and Biosystems Engineering, 36*(1), 45-56.

XXIV. Upadhyay, V. K., & McSweeney P. L. H. (2003). *Acceleration of Ceese Ripening*. In: Smit G.(Ed.), Dairy Processing: Improving Quality, Woodhead Publishing, Cambridge, England, p: 419-447.

XXV. Visser, S., Slangen, K. J., Hup, G., Exterkate, F. A., & Stadhouders, J. (1983). A bitter flavour in cheese. 2. Model studies on the formation and degradation of bitter peptides by proteolytic enzymes from calf rennet, starter cells and starter cell fractions. *Neth. Milk Dairy J., 37*, 169-175.

XXVI. Wu, S. Y. (2005). *Optimization of Nutritional Condtion for Nattokinase Production by an Isolated Bacillus subtilis from Natto Health Food*. A Master of Science Thesis, Tatung University.

XXVII. Zhu, Y. P., Fan, J. F., Cheng, Y.Q., & Li, L.T. (2008). Improvement of the antioxidant activity of chinese traditional fermented okara (Meitauza) using *Bacillus subtilis* B2. *Food Control, 19*(7), 654-661 .