مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال هفتم، ضمیمه شماره ۴، زمستان ۱۳۹۱، صفحات ۳۴-۲۵

کاربرد نانوحامل‌های لیپوزومی حاوی آنزیم در تولید و رسیدن پنیر

مهرداد محمدی[۱]، مهشید جهادی[۲]، محمدرضا احسانی[۳]، کیانوش خسروی دارانی[۴]

۱- کمیته تحقیقات دانشجویان، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۲- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان (اصفهان)، اصفهان، ایران
۳- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۴- نویسنده مسئول: دانشیار گروه تحقیقات صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی. پست الکترونیکی: kiankh@yahoo.com

چکیده

لیپوزوم‌ها ساختار دولایه‌ی پیوسته و بسته‌ای دارند که عمدتاً از مولکول‌های لیپیدی و فسفولیپیدها تشکیل شده است. امروزه، در صنایع شیر و به خصوص تولید و رسیدن انواع پنیر از لیپوزوم ها به عنوان نانو حامل آنزیم‌های مؤثر در تسریع رسیدن پنیر استفاده می‌شود. به‌کارگیری روش‌های جدید تولید لیپوزوم مانند پرولیپوزوم و روش حرارتی موجب شده تا بدون نگرانی از وجود بقایای ترکیبات مضر بتوان آنزیم های مؤثر در رسیدن پنیر را به ساختار لخته اضافه کرد. به این ترتیب، علاوه بر حمایت آنزیم در مقابل از دست رفتن درون آب پنیر با اتصال هدفمند لیپوزوم به مسیل کازئین، ضمن تسریع کنترل شده‌ی رسیدن پنیر از بروز معایبی چون تلخی جلوگیری می‌شود. استفاده از روش‌های نوین تولید لیپوزم باب جدیدی را برای پژوهشگران ایرانی معرفی می‌کند که توسط آن بتوانند با تأکید بر خصوصیات پنیرهای سنتی ایران، پروتئولیز و لیپولیز هدایت شده و هدفمندی را در رابطه با حقوق مصرف‌کنندگان عرضه کنند.

واژگان کلیدی: پنیر، لیپوزوم، رسیدن

مقدمه

در سال‌های اخیر استفاده از تکنولوژی تولید لیپوزوم‌ها توسط محققان بسیاری در زمینه‌های مختلف دارویی و صنایع غذایی مورد مطالعه قرار گرفته است. لیپوزوم‌ها ساختاری متشکل از یک یا چند دو لایه کروی بسته می‌باشد که از مناطق مایع جدا شده‌اند. اساس ساختار لیپوزوم‌ها مشابه غشاء سلولی بیولوژیک است، به‌طوری که گروه‌های آب‌گریز به سمت یکدیگر و گروه‌های آب‌دوست به سمت مواد محبوس شده و اطراف محیط مایع تجمع می‌یابد و چاهک‌های لیپیدی یا لیپوزم‌ها تشکیل می‌شوند. مظفری و همکاران در جدیدترین توصیف لیپوزوم در سال ۲۰۰۲ اظهار داشتند که لیپوزم‌ها ساختار دولایه پیوسته و بسته‌ای است که عمدتاً از مولکول‌های لیپیدی و فسفولیپیدی تشکیل شده‌اند (۲، ۱). با توجه به شکل و ابعاد، لیپوزوم‌ها به دو دسته کلی تقسیم می‌شوند.

الف) لیپوزوم‌هایی که فقط دارای دو لایه غشائی می‌باشند. این لیپوزوم‌ها در ابعاد کوچک (کمتر از ۳۰ نانومتر) و ابعاد بزرگ (۱۰۰-۳۰ نانومتر) وجود دارند.

ب) لیپوزوم‌هایی که شامل چندین دولایه غشائی می‌باشند. در این لیپوزم‌ها، دو لایه‌های غشائی به صورت متحدالمرکز و غیر متحدالمرکز وجود دارند (۳).

در ساختار لیپوزوم‌ها عمدتاً از انواع فسفولیپیدها و بخصوص از فسفاتیدیل کولین به عنوان مهمترین فسفولیپد موجود در تخم مرغ و لوبیای سویا استفاده می‌شود. این ترکیب به دلیل هم اندازه بودن سر و دم، باعث به وجود آمدن ساختاری یکنواخت در لیپوزوم می‌شود. افزودن کلسترول موجب افزایش پایداری و کاهش نفوذ پذیری غشاء لیپوزوم می‌شود. حضور این ترکیب موجب می‌شود که ساختار لیپوزوم فشرده‌تر و حجم ماده محصور کاهش یابد. حضور ترکیبات آنیونی مانند فسفاتیدیل سرین، فسفاتیدیل گلیسرول، فسفاتیدیل اینوزیتول و فسفاتیدیک اسید و ترکیبات کاتیونی مانند دی ستیل فسفات، فسفاتیدیل اتانول آمین و استنازیل آمین موجب دفع الکترواستاتیک، کاهش تجمع، بهبود پایداری و در نتیجه محبوس شدن بیشتر لیپوزوم درون لخته پنیر می‌شود (۴).

امروزه استفاده از نانو لیپوزوم به شدت مورد توجه قرار گرفته است. زیرا حامل های در ابعاد نانو مزایای متعددی دارند که عبارت است از:

- سطح تماس بیشتر
- احتمل افزایش حلالیت
- بهبود رهاسازی هدفمند و کنترل شده زمانی
- انتقال هدفمند ترکیبات به موضعی خاص
- کاهش مقدار مواد مورد نیاز درون نانو- حامل‌ها
- اطمینان از دز استفاده شده مناسب و در نتیجه بهبود تاثیر اجزاء در محصول (۵).

پنیر از قدیمی‌ترین فراورده‌های شیری تولید بشر شناخته می‌شود که جایگاه ویژه‌ای در تغذیه مردم دارد و با سپری کردن دوران رسیدن خصوصیات مطلوب عطر، طعم، بافت و خواص درمانی خاصی در محصول ایجاد می‌شود. دوران رسیدن پنیرهای رسیده در دنیا بر حسب نوع پنیر و مشخصات مختلف آن از چند هفته تا چند ماه و حتی سال به‌طول می‌انجامد (۶). فرایند رسیدن، فرایندی پیچیده، طولانی و پرهزینه‌ای می‌باشد. کوتاه کردن دوره رسیدن پنیر بدون آنکه به ویژگی‌های عطر، طعم و بافت آن لطمه‌ای وارد شود، از لحاظ اقتصادی بسیار مهم است (۷). افزایش مقدار آنزیم های لیپاز، پروتئاز و پپتیداز به درون لخته پنیر، کلیدی مؤثر در تسریع رسیدن پنیر است. اما عدم توزیع یکنواخت و هدر رفتن آنزیم در آب پنیر از جمله مهترین مشکلات استفاده آنزیم می‌باشد (۴). پوشش‌دار کردن آنزیم‌های فوق الذکر راه حل غلبه بر محدودیت فوق می‌باشد. به‌کارگیری صنعتی آنزیم‌های مؤثر در تسریع رسیدن پنیر به صورت محبوس درون لیپوزوم‌ها مزایایی دارد که عبارت است از:

- حمایت از آنزیم در مقابل از دست رفتن و کاهش فعالیت
- مخلوط کردن مواد در مکانیسم رهاسازی فعال
- محافظت از ترکیب در مقابل شرایط محیطی متفاوت
- تاثیر سلامت بخش فسفولیپیدهای به کار رفته در فرمولاسیون لیپوزم‌ها
- وجود طبیعی اجزاء لیپوزوم در شیر و پنیر
- نقش محافظتی پوشش لیپیدی در اطراف آنزیم و ممانعت از هیدرولیز سریع کازئین
- اتصال هدفمند لیپوزوم ها به مسیل کازئین و در نتیجه عملکرد بهتر ترکیب فعال (۵، ۴)

اولین مقاله در زمینه پوشش‌دارکردن آنزیم‌ها در لیپوزوم به وسیله سسا و ویسمن در سال ۱۹۷۰ به چاپ رسید. در این مطالعه کپسول‌پوشانی لیزوزیم در وزیکول‌های چربی با تغییر ترکیب چربی و بار کلی وزیکول‌های چربی مورد بررسی قرار گرفت (۸). استفاده از لیپوزوم‌ها به‌عنوان حامل جهت انتقال آنزیم‌ها سبب حفظ آنزیم در برابر غیرطبیعی شدن و کنترل سرعت واکنش بین آنزیم و سوبسترا می‌شود. این هدفی است که با کپسول‌پوشانی آنزیم‌های پروتئولیتیک در جریان تولید پنیر دنبال می‌شود. در این مقاله، روند تحقیقات انجام شده در زمینه مورد مطالعه قرار می‌گیرد.

بررسی روش‌های مختلف پوشش‌دار کردن آنزیم و تأثیر آن بر کارایی محبوس کردن آنزیم

روش‌های مختلفی برای پوشش‌دار کردن آنزیم ها و تولید لیپوزوم وجود دارد اما فقط تعداد محدودی از آنها جهت استفاده در رسیدن پنیر مورد استفاده قرار گرفته است (۴). از ویژگی‌های مهم و مورد بررسی در اغلب مقالات، بررسی کارایی پوشش‌دار کردن آنزیم درون لیپوزوم می‌باشد. کارایی پوشینه‌دار کردن آنزیم درون لیپوزوم به غلظت لیپید، نوع فسفولیپید و خلوص آنزیم وابسته است. بخشی از آنزیم‌ها در بین لایه‌های محفظه‌های چند لایه‌ای قرار گرفته و در نتیجه سریع‌تر از زمانی‌که در مرکز محفظه قرار داشته باشد رها می‌شود (۱۱-۹، ۴). پایداری فیزیکی لیپوزوم‌ها، به اندازه لیپوزوم، تعداد لایه، ساختار فسفولیپیدی و روش تولید وابسته می‌باشد. تجمع، امتزاج و نفوذپذیری این وزیکول‌ها موجب از بین رفتن ساختار فیزیکی لیپوزوم‌ها می‌شود. رهاسازی آنزیم از لیپوزوم‌ها با تغییرات دما، غلظت یونی، pH و فسفولیپاز انجام می‌گیرد (۱۲-۱۶، ۴). سطح محبوس شدن کپسول‌ها در لخته تحت تأثیر نوع لیپوزوم، فسفولیپید، فرایند تولید پنیر و ماهیت آنزیم محبوس شده است (۱۷). تحقیقات نشان داده است‌که بار لیپوزوم می‌تواند میزان بقای آنزیم در لخته را تحت تأثیر قرار دهد. زیرا در حین تولید لخته پیوندهای الکترواستاتیکی تشکیل می‌شود. لیپوزوم‌های با بار منفی با میسل کازئین در حین تشکیل لخته پیوند برقرار کرده و در حین رسیدگی پنیر به ساختاری مارپیچی تغییر شکل می‌یابند (۱۸). به‌نظر می‌رسد که اغلب لیپوزوم‌ها به غشای گویچه‌ها چربی متصل می‌شوند. البته برخی از آنها نیز در بسته‌های پروتئین‌های سرمی قرار می‌گیرند و یا در ماتریکس کازئین محبوس می‌شوند (۵، ۴). در جدول ۱ میزان درصد پوشش‌دار کردن انواع آنزیم‌های که جهت

تسریع رسیدن انواع پنیرها استفاده شده، نشان داده شده است. در برخی از تحقیقات جهت تولید کپسول‌های آنزیمی، از لیپوزوم دولایه کوچک استفاده شده است. برای تهیه این چاهک‌ها، کپسول‌های لیپوزومی بزرگ توسط روش فراصوت عمل‌آوری می‌شوند. کارایی پوشش‌دار کردن در این روش در حدود ۳-۱٪ می‌باشد و به علت کارایی ضعیف پوشینه‌دار کردن پروتئاز و بقای اندک لیپوزوم در لخته این روش در رسیدن پنیر مورد استفاده قرار نمی‌گیرد (۱۷، ۴).

برای تولید لیپوزوم‌های به روش تبخیر فاز معکوس REV (Reverse- Phase Evaporation Vesicles) ، فسفولیپیدها در حلال حل شده و سپس محلول آنزیمی به آن اضافه خواهد شد. پس از خارج کردن حلال چاهک‌های لیپوزومی تشکیل می‌شوند (۸). این روش به دلیل حضور باقیمانده حلال جهت کاربرد در صنایع غذایی مناسب نمی‌باشد. ضمن آنکه در این روش حضور حلال موجب دناتوره شدن آنزیم می‌شود (۴). در تحقیقی که در سال ۱۹۸۸ بر کپسول‌پوشانی پروتئاز نوتراز EC:3.4.24.4 (Neutrase) با دو روش تولید لیپوزوم تبخیر فاز معکوس و چند لایه MLV (Neutrase) انجام پذیرفت. تحقیقات نشان داد که کارایی پوشینه‌دار کردن این آنزیم به روش REV بیشتر است، ولی میزان بقای لیپوزوم‌های حاصل به روش MLV در لخته پنیر بالاتر است. این درحالی است که میزان بقای پروتئاز حاصل به روش MLV، REV و آزاد در لخته پنیر به ترتیب ٪۶۰/۳، ٪۳۰/۸ و٪ ۲۰ می‌باشد (۱۹). البته به غیر از روش تولید، بار الکتریکی لیپوزوم‌های تولید شده به روش تبخیر فاز معکوس بر میزان کارایی کپسول‌پوشانی آنزیم نوتراز مؤثر می‌باشد. آنزیم نوتراز می‌تواند درون لیپوزوم‌های با بار منفی، مثبت و خنثی محصور شود و میزان کارایی کپسول‌پوشانی لیپوزوم‌های باردار بهتر از لیپوزوم‌های خنثی می‌باشد. میزان بقای لیپوزوم‌های حاوی آنزیم نوتراز با بار مثبت از لیپوزوم‌های با بار منفی و خنثی بیشتر است. علت این موضوع را به جذب الکتریکی لیپوزوم ها توسط میسل‌کازئین در طی ساخت پنیر نسبت می‌دهند. بررسی پایداری لیپوزوم‌های با بار الکتریکی مختلف در شیر نشان داده است که افزایش دما از ۱۰ تا ۵۰ درجه سانتیگراد، افزایش غلظت نمک از ۱ تا ۴ درصد و افزایش pH از ۵ به ۷، موجب افزایش خروج آنزیم نوتراز از لیپوزوم می‌شود و در این بین، لیپوزوم های با بار مثبت بیشترین پایداری را در مقابل شرایط فوق از خود نشان می‌دهند (۱۹، ۱۵).

جدول ۱. درصد پوشش‌دار کردن انواع آنزیم‌های مورد استفاده جهت تسریع رسیدن پنیر

آنزیم محبوس شده	درصد پوشش‌دار کردن	نوع لیپوزوم	منبع
نوتراز	۳۰.۵	*REV*	(۱۹)
	۱۷.۴	*MLV*	
نوتراز	۲۰-۱۶ (خنثی)	*REV*	(۱۵)
	۲۱ (مثبت)		
	۲۶-۲۲ (منفی)		
تریپسین	۱۰	چندلایه	(۲۰)
	۱۴	چندلایه	
	۱۲	میکروفلودایز	
	۱۳	میکروفلودایز	
α-کیموتریپسین	۷۹-۱۰	پرو-لیپوزوم	(۱۴, ۲۱)
کیموزین (*Kluveromyces lactis*)	۱۲.۶	آب‌گیری-آب‌دهی	(۲۲)
پروتئاز خنثی(*Bacillus subtilis*)	۲۱.۲	آب‌گیری-آب‌دهی	(۲۳)
سایپروسین(*Cynara cardunculus* L.)	۱۲.۷	آب‌گیری- آب‌دهی	(۲۴)
پروتئاز باکتریایی خنثی(*Bacillus subtilis*)	۳۱.۹	پرو-لیپوزوم	(۱۰, ۱۱)
پروتئاز قارچی(*Aspergillus oryzae*)	۳۳		
فلیورزیم	۲۰.۲		
پالاتاز (لیپاز قارچی *Mucor miehei*)	۳۵.۹		
لیپاز میکروبی ۵۰	۴۰.۳		
فلیورزیم	۱۶.۱	روش حرارتی	(۲۵)

استفاده از میکروفلودایزر نسبت به روش‌های فراصوت موجب افزایش کارایی پوشینه‌دار کردن می‌شود. لازم به‌ذکر در این جایگزینی، پایداری لیپوزوم‌های افزایش یافته اما تجمع و امتزاج رخ نمی‌دهد. ضمن آن‌که با افزایش فشار میکروفلودایزر می‌توان قطر هیدرودینامیکی لیپوزوم‌ها را تا ۱۰۰-۱۵۰ نانومتر کاهش داد (۲۶). تحقیق Larivière در زمینه پوشینه‌دار کردن نوتراز نشان داد که با استفاده از میکروفلودایزر (Microfludizer) کارایی پوشینه‌دار کردن این آنزیم درون لیپوزوم در حدود ۱۰٪ می‌باشد (۲۰).

به این ترتیب در این تحقیق با استفاده از میکروفلودایزر به کارایی پوشینه‌دار کردن بیشتری نسبت به محققان قبل از خود دست یافتند. در این روش که با به‌کارگیری نیروی برشی بالا، کاهش اندازه ذرات رخ می‌دهد، ساختار و عملکرد مواد پوشش‌دار شده مورد آسیب قرار می‌گیرد. از معایب این روش بالا بودن احتمال آلودگی، بالا بودن میزان از دست رفتن مواد و عدم قابلیت در تولید صنعتی می‌باشد (۲۸، ۲۷، ۸).

در روش تولید محفظه‌های چند لایه، یک لایه فیلم لیپیدی را به‌وسیله محلول کردن فسفولیپیدها در کلروفرم و سپس تبخیر حلال ایجاد کرده و سپس به لایه لیپیدی، محلول آنزیمی اضافه می‌شود. پس از همزدن شدید در دمای بالاتر از دمای انتقال شیشه‌ای، لیپوزوم‌های فسفولیپیدی تشکیل می‌شود. در تحقیقی که در سال ۱۹۹۵ توسط Fresat انجام شد چاهک‌های چند لایه تحت تأثیر انجماد و انجمادزدایی متوالی قرار گرفت. با افزایش تعداد دفعات انجماد و انجمادزدایی کارایی پوشینه‌دار کردن آنزیم افزایش می‌یابد. لیپوزوم‌های ایجاد شده از فیلترهای ۲۰۰ نانومتری پلی‌کربنات عبور داده می‌شود. در این پژوهش کارایی کپسول‌پوشانی نوتراز در بهترین شرایط ۶۵٪ گزارش شد (۲۹).

در تولید لیپوزوم‌ها با محفظه‌های چندلایه با استفاده از تکنیک آب‌زدایی-آب‌دهی[1] (DRM)، ابتدا با استفاده از روش‌های REV یا MF محفظه‌های چند لایه تهیه می‌شود، سپس چاهک‌های فوق را همگن کرده و در مرحله بعد محلول آنزیمی به آن اضافه می‌شود. سپس مخلوط حاصل را خشک و با مقدار اندکی آب مجدداً آب‌دهی می‌کنند تا محفظه‌های چندلایه ایجاد شود. با استفاده از این روش آنزیم فلیورزیم[2] و SP446 به‌طور جداگانه پوشش‌دار شدند. کارایی کپسول‌پوشانی آنزیم‌های فوق به این روش حدود ۳۵٪ می‌باشد (۳۰). آنزیم نوتراز توسط Skeie و همکاران در لیپوزوم‌های DRV[3] با استفاده از روش میکروفلودایزر در فشار ۹۰ اتمسفر پوشش‌دار شد (۱۳). به این ترتیب این محققیقن توانستند به کارایی محبوس کردن ۳۰٪ دست یابند.

Picon و همکاران با تحقیق بر روی پوشینه‌دار کردن کیموزین[4] درون لیپوزوم‌های تولید شده به روش DRV موفق به محصور کردن این آنزیم با کارایی ۱۲/۶٪ شدند (۲۲). این در شرایطی است که پروتئاز خنثی حاصل از *باسیلوس سوبتیلیس*[5] با استفاده از همین روش با کارایی ۲۱/۲ درصد و آنزیم ساپروسین[6] به میزان ۱۲/۷ درصد درون لیپوزومDRV کپسول می‌شود (۲۴، ۲۳). در تحقیقی توسط Perols و همکاران در سال ۱۹۹۷ بر محصور کردن آنزیم پروتئاز بر ژل با نقطه ذوب پایین[7] کنجاک[8] با هدف استفاده در تسریع رسیدن پنیر انجام پذیرفت، نشان داده شد که گویچه‌های کروی حاوی پروتئاز *B500* ابعاد ۵۰-۵۰۰ میکرومتر دارد و کارایی محبوس کردن آن ۵۰٪ می‌باشد. البته رهاسازی آنزیم در دمای ۴ درجه سانتیگراد طی ۲۴ ساعت بسیار اندک (حدود ۷٪) بوده بنابراین مشخص شود که طی مرحله رسیدن پنیر میزان آزادسازی آنزیم کم است (۳۱).

در سال‌های اخیر چاهک‌های چند لایه را با استفاده از روش پرو- لیپوزوم[9] با نام تجاری (Pro-Lipo) تولید می‌کنند. در این روش با استفاده از فسفولیپیدهای دولایه در محیط آب‌دوست (اتانول) ژلی نیمه آماده تولید کرده و با افزودن بافر در سطح مناسب می‌توان لیپوزوم‌های چند لایه (MLV) ایجاد نمود. با این روش کیموتریپسین درون پرو- لیپوزوم‌های فوق با توزیع ابعاد ۲-۰/۱ میکرومتر و میانگین ۸۰۰-۷۲۵ نانومتر محبوس شد. این تحقیق نشان داد با افزایش قدرت یونی محلول قطر ذرات لیپوزومی افزایش می‌یابد (۲۱). آنزیم آلفا-کیموتریپسین[10] (EC: 3.4.21.1) با کارایی ۶۳٪ درون لیپوزوم‌های پرولیپوزوم به منظور استفاده نهایی در لخته پنیر محبوس شد (۱۴). Kheader و همکاران نشان دادند که میزان کارایی محبوس

[1] Dehydration- Rehydration Method
[2] Flavourzyme
[3] Dehydrated Rehydrated vesicles
[4] Chymosin
[5] *Bacillus subtilis*
[6] Cyprosin
[7] Cold-melting gel
[8] Konjac
[9] Pro-liposome
[10] α- chymotrypsin

کردن پروتئاز باکتریایی[1]، پروتئاز قارچی[2]، فلیوروزیم[3] و پلاتاز ام[4] به ترتیب ۳۱/۹٪، ۳۳٪، ۲۰/۲٪ و ۳۵/۹٪ برحسب برحسب فعالیت آنزیم و ۳۵/۹٪، ۳۶/۶٪ ، ۲۳٪ و ۳۸/۱٪ برحسب میزان پروتئین می‌باشد (۱۰، ۹). در این تحقیقات نشان داده شد که استفاده از پرولیپوزوم جهت پوشینه‌دار کردن آنزیم‌های پروتئاز نسبت به روش‌های گذشته بهتر بوده و کارایی فرایند در این روش بیشتر است.

آخرین تحقیقات حاکی از اختراع روش حرارتی در سال ۲۰۰۵ جهت پوشینه دار کردن ترکیبات دارویی مختلف است (۳۲). این روش بدون استفاده از حلالها و دترجنت‌های سمی قادر به محبوس کردن ترکیبات می‌باشد. Jahadi و همکاران در سال ۲۰۱۲ برای اولین بار موفق به پوشینه دار کردن آنزیم فلیورزیم جهت تسریع رسیدن پنیر شدند (۲۵). محصور شدن فلیورزیم درون لیپوزوم تولید شده به روش حرارتی موجب افزایش ثابت مکائیلس-منتن و V_{max} شد (۳۳).

تأثیر کپسول‌های آنزیمی بر خصوصیات شیمیایی لخته پنیر

حضور آنزیم پروتئاز به صورت آزاد به شدت بر خصوصیات لخته پنیر مؤثر است. پروتئاز به دلیل هیدرولیز کازئین طی مرحله تولید موجب کاهش راندمان پنیرسازی می‌شود (۷). کپسول‌های محتوی پروتئاز نیز بسته به نوع آنزیم، میزان کارایی کپسول کردن و سطح لیپوزوم محبوس شده درون لخته بر خصوصیات لخته پنیر تأثیر می‌گذارد. سطح لیپوزوم محبوس شده در لخته پنیر وابسته به نوع لیپوزوم، نوع فسفولیپید، فرایند تولید پنیر و ماهیت آنزیم کپسول شده می‌باشد (۳۴، ۱۰، ۴، ۳، ۱).

استفاده از پروتئاز در سیستم لیپوزومی REV در پنیر Saint-Paulin در مقایسه با استفاده از آنزیم آزاد، موجب کنترل بهتر کاهش pH و کاهش از دست رفتن کلسیم در آب پنیر به‌عنوان عوامل مؤثر در بافت می‌شود (۱۵). با بررسی تأثیر لیپوزوم‌های حاوی آنزیم کیموزین بر تولید پنیر مانچیگو نشان داده شد که حضور لیپوزوم‌های حاوی کیموزین تأثیر معنی‌داری بر ترکیبات پنیر و آب پنیر حاصل از آن و بازده ترکیبات خشک نداشته است (۲۲). در حالی‌که با حضور لیپوزوم‌های حاوی پروتئاز خنثی حاصل از *باسیلوس سوبتیلیس* در تولید پنیر مانچیگو اگرچه ترکیبات آب پنیر حاصل، تأثیر معنی‌داری با نمونه شاهد نداشتند، اما ترکیب پنیر حاوی لیپوزوم محتوی پروتئاز خنثی، به‌طور معنی‌داری دارای درصد پروتئین و ماده خشک بیشتر و بازده تولید کمتر می‌باشد و از نظر pH با نمونه شاهد مشابه است (۲۳). با حضور لیپوزوم حاوی پروتئاز سیپروسین در پنیر فوق، ترکیب پنیر تغییر کرده است. چنین پنیری محتوی درصد ماده خشک و پروتئین کمتر و pH بالاتر نسبت به نمونه شاهد بود (۲۴). حضور پروتئاز باکتریایی و قارچی محصور شده درون لیپوزوم در پنیر چدار موجب افزایش رطوبت و کاهش پروتئین و چربی لخته شد (۹, ۱۰). علت این مشاهده را به توانایی اتصال فسفولیپیدهای لیپوزوم نسبت می‌دهند.

تأثیر کپسول‌های آنزیمی بر دوره رسیدن پنیر

حضور پروتئاز در ساختار لخته پنیر و رهاسازی آرام آن در طی دوران رسیدن پنیر بر شدت پروتئولیز تأثیر می‌گذارد و البته شدت این تأثیر به میزان کارایی محبوس کردن و چگونگی آزادسازی لیپوزوم وابسته می‌باشد. تحقیقات بر روی مقایسه تأثیر پروتئازهای محصور شده به دو روش MLV و REV بر چگونگی پروتئولیز در پنیر Saint-Paulin نشان داده است که استفاده از آنزیم محبوس شده به روش REV، سرعت پروتئولیز در پنیر را کندتر می‌کند (۱۹). با توجه به اینکه تلخی معمولا به آب‌گریزی اسیدهای‌آمینه موجود در پپتیدهای نسبت داده می‌شود (۳۶، ۳۵). یکی از اهداف پوشش‌دار کردن لیپوزومی آنزیم‌ها اجتناب از ایجاد تلخی در پنیر است. لیپوزوم‌های حاوی پروتئاز از کاهش pH در مرحله آبگیری جلوگیری کرده و موجب بقای بیشتر آنزیم در لخته پنیر می‌شوند. این در حالی است که بروز طعم تلخ در پنیر به تعویق می‌افتد. به علاوه این امر موجب می‌شود که پروتئاز در پنیر به آرامی آزاد شود. لذا علیرغم تسریع در پروتئولیز از تجمع پپتیدهای تلخ در پنیر جلوگیری می‌شود. به کارگیری سیستم لیپوزومی REV حاوی پروتئاز طی دوره رسیدن پنیر Saint-Paulin موجب تسریع رسیدن پنیر شده ولی نقصی در بافت و طعم محصول ایجاد نمی‌شود و بروز تلخی در پنیر نسبت به زمانی‌که از آنزیم پروتئاز به حالت آزاد استفاده می شود به تعویق می‌افتد (۱۹).

مقایسه اثر حضور لیپوزوم‌های محتوی کیموزن و پروتئاز خنثی و پروتئاز ساپروسین بر پنیر مانچیگو نشان داده است که تجزیه α_s-Casein و β-Casein در پنیرهای

[1] Bacterial protease
[2] Fungal protease
[3] Flavourzyme
[4] Palatase M

دارای آنزیم های پوشینه‌دار شده توسط لیپوزوم سریعتر صورت می‌گیرد (۲۴-۲۲). در طول رسیدگی پنیر مانچیگو میزان کل پپتیدهای تولید شده، پپتیدهای آب‌گریز و پپتیدهای آب‌دوست افزایش یافت، اما حضور لیپوزوم حاوی کیموزین در پنیر مانچیگو موجب افزایش حضور پپتیدها نشد. با رسیدن پنیر حاوی لیپوزوم فوق، مطلوبیت و شدت طعم به‌طور معنی‌داری بهتر از نمونه شاهد بود (۲۲). در حالی که تحقیقات Alkhalaf و همکاران بر روی پنیر بیانگر افزایش شدت تلخی در پنیر Saint-Paulin است. در این تحقیق شدت میزان تلخی در دو نمونه پنیر اختلاف معنی‌دار نداشت (۲۲، ۱۹). این در حالی است‌که مقدار پپتیدهای آب‌گریز و آب‌دوست و نسبت این دو به شدت تحت تأثیر رسیدگی پنیر و حضور لیپوزوم‌های حاوی پروتئاز خنثی و لیپوزوم حاوی سیپروسین می‌باشد و نسبت این ترکیبات در پنیر حاوی لیپوزوم حاوی پروتئاز خنثی ۲-۱/۵ برابر بیشتر از نمونه پنیر شاهد است (۲۴، ۲۳). شدت طعم در پنیر دارای لیپوزوم حاوی پروتئاز خنثی و لیپوزوم محتوی سیپروسین بیشتر از نمونه شاهد می‌باشد. درحالیکه در پنیر حاوی پروتئاز خنثی احساس تلخی توسط ارزیابان گزارش نشد. در پنیر دارای سیپروسین شدت تلخی احساس شده توسط ارزیابان کمتر از نمونه شاهد بود (۲۴، ۲۳). غلظت نیتروژن محلول در pH برابر۴/۶ ، نیتروژن محلول در تری‌کلرواستیک اسید و نیتروژن محلول در فسفوتانگوستیک اسید به شدت افزایش می‌یابد. اختلاف افزایش غلظت این ترکیبات در نمونه پنیر حاوی لیپوزوم محتوی کیموزین، لیپوزوم حاوی پروتئاز خنثی، لیپوزوم محتوی سیپروسین و نمونه شاهد پس از ۲۴ ساعت نگهداری پنیر مشاهده می‌شود. لذا می‌توان نتیجه گرفت که باز شدن لیپوزوم‌ها و ورود آنزیم کیموزین به محیط پنیر پس از یک شبانه روز رخ می‌دهد (۲۴-۲۲). در طول رسیدن پنیر دارای لیپوزوم حاوی سیپروسین به دلیل کم بودن فعالیت اگزوپپتیداز پس از روز ۳۰، میزان نیتروژن محلول در تری‌کلرواستیک اسید و نیتروژن محلول در فسفوتانگوستیک اسید با شدت کمتری افزایش یافته و مقدار آن کمتر از نمونه پنیر شاهد می‌باشد (۲۴). بررسی تأثیر حضور لیپوزوم‌های حاوی نوتراز بر پنیر هلندی کم چرب کم نمک و معمولی طی دوره رسیدگی نشان داد که پنیرهای حاوی لیپوزوم‌های محتوی نوتراز به‌طور معنی‌داری حاوی میزان ازت محلول در pH =۴/۶، استالدئید، اسید استیک، اسید پیروگلوتامیک بالاتر و اسید فرمیک کمتر نسبت به نمونه شاهد می‌باشد. البته میزان استالدئید در پنیرهای حاوی نمک معمولی بیشتر از پنیرهای کم نمک می‌باشد. از نظر خصوصیات ظاهری پنیرهای حاوی لیپوزوم حاوی آنزیم بعد از ۱۶ هفته رتبه بالاتری داشتند. از طرف دیگر نمونه شاهد تلخ‌تر و میزان تلخی با کاهش میزان نمک افزایش یافت (۱۳).

در تحقیقی که در سال ۲۰۰۰ بر تأثیر پروتئاز باکتریایی و قارچی محصور شده درون لیپوزوم، بر رسیدن پنیر چدار انجام پذیرفت، نشان داده شد که بهبود بافت و پروتئولیز در پنیر سریع‌تر از نمونه‌ی کنترل اتفاق می‌افتد. مشاهده ریزساختار الکترونی که با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری[1] (TEM) انجام پذیرفت نشان داد که ریزساختار پنیرهای حاوی لیپوزومی کمتر فشردگی داشته و لیپوزوم‌ها در سطح مشترک چربی-کازئین قرار گرفته‌اند. مطالعه الگوی پپتیدهای نشان داد پپتیدهای تلخ و گس در پنیرهای چدار حاصل از لیپوزوم‌های حاوی پروتئاز تجمع‌یافته و میزان آن به نوع و غلظت آنزیم اضافه شده بستگی دارد. بررسی خصوصیات ارگانولپتیک طی دوره رسیدن پنیر آشکار ساخت عطر و طعم کلیه نمونه‌های پنیر بهبود یافته و هیچ‌گونه تلخی و بد طعمی (مگر مواردی که غلظت آنزیم زیاد باشد) طی دوره سه ماه رسیدن ملاحظه نشد (۹).در حین رسیدن پنیر چدار با تخریب برخی لیپوزوم‌ها بخشی از آنزیم از لیپوزوم خارج شده و بر حسب نوع آنزیم و غلظت آن رسیدن پنیر شدت می‌یابد. لذا بر حسب زمان رسیدن پنیر، کازئین و پپتیدهای با وزن مولکولی بالا به پپتیدهای محلول در آب شکسته شده و پس از آن به پپتیدهای کوچک و اسیدهای آمینه تبدیل می‌شوند. در نتیجه کلیه شاخص‌های عمق پروتئولیز افزایش می‌یابد. به این ترتیب گرچه میزان ترکیبات تشکیل دهنده طعم گس در لحظه آغاز صفر است، اما حین رسیدن پنیر میزان این ترکیبات افزایش یافته و مقدار آن در پنیرهای دارای لیپوزوم‌های حاوی آنزیم و نمونه شاهد مشابه یکدیگر می‌گردد. نکته در خور توجه این است‌که میزان این ترکیبات به میزان آنزیم افزوده شده وابسته است و می‌توان با تنظیم غلظت مناسب آنزیم، توسعه ترکیبات ایجاد کننده طعم گس را تحت کنترل قرار داد. البته به دلیل تسریع پروتئولیز در پنیرهای چدار دارای لیپوزوم‌های حاوی آنزیم، میزان ترکیبات ایجاد کننده طعم

[1] Transmission- electron microscopy

تلخ بیشتر از شاهد است و طی دو ماه اول میزان این ترکیبات افزایش و پس از آن کاهش می‌یابد (۱۰).

بررسی شدت میزان لیپولیز در پنیر چدار نشان داده است که میزان اسیدهای چرب آزاد فرار و غیرفرار طی دوره رسیدن در نمونه‌های حاوی لیپوزوم‌های آنزیمی به میزان بیشتری نسبت به نمونه شاهد افزایش می‌یابد. در میان آنزیم‌های مختلف به‌کار رفته آنزیم پالاتاز ام[1] لیپولیز را با شدت بیشتری تسریع کرد که در نتیجه اسیدهای چرب آزاد بیشتری تولید شد. در این میان کاپریک اسید، اسید چرب فرار غالب را تشکیل می‌دهد (۱۱).

تأثیر کپسول‌های آنزیمی بر خصوصیات رئولوژیکی پنیر

رسیدن پنیر، وقوع واکنش‌های بیوشیمیایی (پروتئولیز، گلیکولیز و لیپولیز) و انحلال قسمتی از فسفات کلسیم کلوئیدی موجب می‌شوند تا پنیر از حالت لاستیکی خارج شده و به پنیر رسیده با عطر و طعم و بافت مطلوب تبدیل گردد. مقایسه خصوصیات رئولوژیکی، توسط اینسترون بر پنیرهای مانچیگو، نشان داده که سختی[2]، الاستیسیته[3] و شکنندگی[4] در پنیرهای حاوی لیپوزوم‌های محتوی کیموزین کمتر از نمونه‌های پنیر شاهد بود (۲۲). در مقابل در پنیرهای حاوی لیپوزوم‌های محتوی پروتئاز خنثی بیشتر از نمونه شاهد است (۲۳). اما در پنیرهای حاوی لیپوزوم محتوی سیپروسین الاستیسته و شکنندگی به‌طور معنی‌داری از نمونه شاهد کمتر بوده و حضور لیپوزوم محتوی سیپروسین تأثیر معنی‌داری بر سختی نداشت (۲۴).

در بررسی میزان تغییرات سفتی[5] و شکنندگی در پنیر چدار که توسط Kheader و همکاران انجام پذیرفت نشان داده شد که این دو عامل تحت تأثیر زمان رسیدن، نوع و میزان آنزیم پوشینه دار شده می‌باشند. در آغاز تولید پنیر، میزان سفتی در پنیرهای چدار دارای لیپوزوم‌های حاوی آنزیم به دلیل بیشتر بودن میزان رطوبت و پروتئولیز اولیه، بیش از نمونه شاهد می‌باشد. به دلیل تأثیر هیدرولیز کازئین (به‌عنوان عامل غالب برای نرم شدن پنیر) در طی دوره رسیدن پنیر چدار حاوی آنزیم بر حسب میزان آنزیم موجود، نرم‌تر از پنیر شاهد می‌شود (۱۰). شکنندگی در پنیرهای دارای لیپوزوم‌های حاوی آنزیم بیشتر از نمونه شاهد است، اما این ویژگی طی دوره رسیدن بر حسب نوع و مقدار آنزیم به کار رفته روند نزولی را طی می‌کند (۱۰).

نتیجه‌گیری

تولید لیپوزوم و نانولیپوزوم‌های حاوی آنزیم‌های لیپاز، پروتئاز و پپتیداز روش مناسب جهت حفاظت و رهاسازی کنترل شده آنزیم در طول رسیدن پنیر می‌باشد. رهاسازی هدفمند آنزیم های مسئول تسریع رسیدن پنیر موجب شده است که علاوه بر تسریع کنترل شده رسیدن انواع پنیرها، از هیدرولیز سریع کازئین نیز ممانعت شود. در نتیجه علاوه بر تسریع سرعت رسیدن پنیر و کاهش هزینه های مربوط به نگهداری پنیر، ویژگیهای بافت، عطر، طعم و خواص فراسودمند پنیر توسعه می‌یابد. به کارگیری روش‌های جدید مانند روش حرارتی در تولید لیپوزوم‌ها، نگرانی‌هایی از بابت وجود باقیمانده حلال و دترجنت در محصول وجود داشت را رفع کرده و به این ترتیب مسیر جدیدی برای پژوهشگران صنایع غذایی جهت به‌کارگیری انواع آنزیم های پوشینه دار شده در صنایع لبنی و سایر جوانب صنایع غذایی فراهم آورده است.

سپاسگزاری

این مقاله از پایان‌نامه دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی استخراج شده است. بدینوسیله از کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی به دلیل حمایت های مالی تشکر می‌شود.

[1] Palatase M
[2] Hardness
[3] Elasticity
[4] Fracturability
[5] Firmness

• References

1. Mozafari MR, Johnson C, Hatziantoniou S, Demetzos C. Nanoliposomes and Their Applications in Food Nanotechnology. Journal of Liposome Research.2008: 18(4):309-327.
2. Mozafari MR, Mortazavi SM. Nanoliposomes From Fundamentals to Recent Developments. Trafford Publishing;2005.
3. Taylor TM, Davidson PM, Bruce BD, Weiss J. Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2005; 45(8-7):587-605.
4. Wilkinson MG, Kilcawley KN. Mechanisms of incorporation and release of enzymes into cheese during ripening. International Dairy Journal. 2005; 15(9-6):817-830.
5. Mozafari MR, Khosravi-Darani K, Borazan GG, Cui J, Pardakhty A, Yurdugul S. Encapsulation of Food Ingredients Using Nanoliposome Technology. International Journal of Food Properties. 2008; 11(4): 833-844.
6. Fox PF. Proteolysis During Cheese Manufacture and Ripening. Journal of Dairy science. 1989; 72 (6):1379-1400.
7. Azarnia S, Robert N, Lee B. Biotechnological methods to accelerate cheddar cheese ripening . Critical Reviews in Biotechnology. 2006 Jul-Sep;36(3):121-143.
8. Walde P, Ichikawa S. Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications. Biomolecular Engineering. 2001; 18(4):143-177.
9. Kheadr EE, Vuillemard JC, El Deeb SA. Accelerated Cheddar cheese ripening with encapsulated proteinases. International Journal of Food Science and Technology. 2000; 35(5):483-495.
10. Kheadr EE, Vuillemard JC, El-Deeb SA. Impact of liposome-encapsulated enzyme cocktails on cheddar cheese ripening .Food Research International. 2003; 36(3):241-252.
11. Kheadr EE, Vuillemard LC, El-Deeb SA. Acceleration of cheddar cheese lipolysis by using liposome-entrapped lipases. Journal of Food Science. 2002; 67(2):485-495.
12. Laridi R, Kheadr EE, Benech RO, Vuillemard JC, Lacroix C, Fliss I. Liposome encapsulated nisin Z: optimization, stability and release during milk fermentation. International Dairy Journal. 2003;13(4):325-326
13. Skeie S, Narvhus JA, Ardo Y, Thorvaldsen K, Abrahamsen RK. The effect of reduced salt content on the funtion of liposome-encapsulated Nueutrase and heat- treated lactobacilli in rindless low-fat cheese. Lait. 1997;85: 575-577.
14. Laloy E, Vuillemard J-C, Dufour P, Simard R. *Release of enzymes from liposomes during cheese ripening*. Journal of Controlled Releas. 1998;22:213-254.
15. Alkhalaf W, Soda ME, Gripon J-C, Vassal L. Acceleration of Cheese Ripening with Liposomes-Entrapped Proteinase: Influence of liposomes Net Charge. Journal of Dairy science. 1989;8:2233-2272.
16. Skeie S, Aamodt S, Abrahamsen RK. Poster D ۲ Liposome-encapsulated neutrase, function in cheese milk. International Dairy Journal. 1993;3(6-4):572-573.
17. Piard JC, El-Soda M, Alkhalaf W, Rousseau M, Gripon JC, Desmazeaud M. Accelerated ofcheese ripening with liposomes entrapped proteinase. Biotechnology Letters. 1986; 6-8:241
18. Laloy E, Vuillemard JC, Simard R. Characterization of liposomes and their effect on the properties of Cheddar cheese during ripening. Lait. 1998;78(4): 401-412.
19. Alkhalaf W, Piard J-C, El Soda M, Gripon J-C, Desmazeaud M, Vassal L. Liposomes as Proteinase Carriers for the Accelerated Ripening of Saint-Paulin Type Cheese. Journal of Food Science. 1988; 53(6): 1674-1679.
20. Larivière B, El Soda M, Soucy Y, Trépanier G, Paquin P, Vuillemard JC. Microfluidized liposomes for the acceleration of cheese ripening. International Dairy Journal. 1991:1(2):111-124.
21. Dufour P, Vuillemard JC, Laloy E, Simard RE. Characterization of enzyme immobilization in liposomes prepared from proliposomes. Journal of Microencapsulation. 1996;13(2): 185-194.
22. Picon A, Gaya P, Medina M, Nuaez M. The Effect of Liposome Encapsulation of Chymosin Derived by Fermentation on Manchego Cheese Ripening. Journal of Dairy science.1994 ;16:23-77.
23. Picon A, Gaya P, Medina M, Nunez M. The effect of liposome-encapsulated Bacillus- subtilis netural proteinase on Manchego cheese rippening. Journal of Dairy science. 1995;78(6):1238-1247.
24. Picon A, Serrano C, Gaya P, Medina M, Nunez M. The effect of liposome-encapsulated cyprosins on Manchego cheese ripening. Journal of Dairy science. 1996; 79(10):1699-1705.
25. Jahadi M, Khosravi-Darani K, Ehsani MR, Mozafari MR, Saboury AA, Seydahmadian F, et al. Evaluating the effects of process variables on protease-loaded nano-liposome production by

Plackett-Burman design for utilizing in cheese ripening acceleration. Asian Journal of Chemistry. 2012;24(9):3891-3894.

26. Thompson AK, Singh H. Preparation of liposomes from milk fat globule membrane phospholipids using a Microfluidizer. Journal of Dairy science. 2006; 89(2):409-410.
27. Maa YF, Hsu CC. Performance of Sonication and Microfluidization for Liquid-liquid Emulsification Pharm Dev Technol. 1999;4:233-240.
28. Kasaai MR, Charlet G, Paquin P, Arul J. Fragmentation of Chitosan by Microfluidization Process. Innovative Food Sci Emerging Tech. 2003; 4(4)403-413.
29. Fresta M, Wehrli E, Puglisi G. Neutrase entrapment in stable multilamellar and large unilamellar vesicles for the acceleration of cheese ripening. Journal of Microencapsulation. 1995; 12(3) 307-315.
30. Skeie S, Narvhus JA, Abrahamsen RK. Addition of liposome-encapsulated enzymesSP 446 and Flavourzyme to low-fat Gouda-type cheese. Milchwiss-Milk Sci Int. 1995; 50(3):134-138
31. Pérols C, Piffaut B, Scher J, Ramet JP, Poncelet D. The potential of enzyme entrapment in konjac cold-melting gel beads. Enzyme and Microbial Technology. 1997; 20(1):57-60
32. Mozafari MR. Inventor Method and appartuse for producing carrier complex. 2005.
33. Vafabakhsh Z, Khosravi-Darani K, Mortazavivian SAM, Khajeh K, Jahadi M. Flavourzyme immobilization and found that by liposome encapsulation the enzymatic kinetics. Biochemical Engineering Journal. 2013. In press.
34. Law BA. Controlled and accelerated cheese ripening: the research base for new technology. International Dairy Journal. 2001; 11(7-4):383-398.
35. Korhonen H, Pihlanto A. Bioactive peptides: Production and functionality. International Dairy Journal. 2006; 16(9):945-960.
36. Gomez MJ, Garde S, Gaya P, Medina M, Nuz M. Relationship between level of hydrophobic peptides and bitterness in cheese made from pasteurized and raw milk. Journal of Dairy Research. 1997; 64(2):289-297.

Application of liposome nano carrier in cheese production and ripening

Mohammadi M[1], Jahadi M[2], Ehsani MR[3], Khosravi-Darani K[*4]

1- Students` Research Committee, Dept. of Food Technology Research, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2- Assistant Prof. Dept. of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Khorasgan (Isfahan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

3- Prof, Dept. of Food Science and Technology, Research and Science Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

*4- *Corresponding author: Associate prof (in Research), Dept. of Food Technology Research, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Email: kiankh@yahoo.com*

Abstract

Liposomes are closed continuous bilayer structures made mainly of lipid and/or phospholipid. Nowaday, application of liposomes as a nano carrier of ripening accelerated cheese enzyme in cheese production and ripening are suggested. Application of recent methods of liposome production such as Pro-liposome and Heating methods caused addition of encapsulation acceleration of cheese ripening enzyme in the curd without any worry about harmful residue in liposome. Utilization of enzyme-loaded liposome caused protection of enzyme from loss in whey, target association of liposome with casein micelles. Therefore, without any bitterness and yield reduction, control ripening acceleration was achieved. Usage of recent production of liposome method introduce a new research to Iranian researcher about target proteolysis and lipolysis in traditional Iranian cheese with emphasis about consumer right

Keywords: Liposome, Cheese, Ripening