نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۲۴ شماره ۲/ سال ۱۳۹۳

ایجاد اتصالات عرضی بین پروتئین‌های شیر و سویا در ماست بدون چربی توسط آنزیم ترانس گلوتامیناز و بررسی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آن

رعنا سلیمان پوری[۱]، فریبا زینالی[۲*]، اصغر خسروشاهی اصل[۲] و اشکان مددلو[۳]

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۶/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۱/۱۹

[۱]دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه
[۲] به ترتیب استادیار و استاد گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه
[۳]استادیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
*مسئول مکاتبه E mail: f_zeynali@yahoo.com

چکیده

هدف این مطالعه، بررسی تشکیل اتصالات عرضی بین پروتئین‌های شیر و پروتئین‌های سویا به وسیله آنزیم ترانس گلوتامیناز و تاثیر آن بر ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و ریزساختاری ماست بدون چربی است. چهار نمونه شاهد، غنی شده با ایزوله‌ی پروتئین سویا(SPI) ، تیمار شده با آنزیم ترانس‌گلوتامیناز و نمونه‌ی تواماً غنی شده با ایزوله‌ی پروتئین سویا و تیمار شده با آنزیم ترانس‌گلوتامیناز تهیه شد. بر اساس نتایج حاصل، کاهش شدت باندهای پروتئینی در الگوهای الکتروفورز نمونه‌های تواماً غنی شده با SPI و تیمار شده با آنزیم در مقایسه با نمونه‌های صرفا غنی شده با SPI، موید اتصال عرضی بین پروتئین‌های شیر و سویا توسط آنزیم ترانس‌گلوتامیناز و ایجاد پلیمرهای با وزن مولکولی بالاست. در آغاز دوره‌ی نگه‌داری، pH نمونه‌های تیمار شده با آنزیم کمتر از نمونه‌ی شاهد بود، در حالیکه تا انتهای دوره‌ی نگه-داری تاثیر ایزوله‌ی پروتئین سویا بر تغییرات pH قابل توجه بود($P<0/05$). غنی سازی با SPI اسیدیته را در تیمارهای ۲ و ٤ در مقایسه با تیمار شاهد افزایش داد، اما تاثیر آنزیم بر اسیدیته قابل توجه نبود($P>0/05$).در اولین روز از دوره‌ی نگه‌داری، بیشترین ظرفیت نگه‌داری آب (WHC) برای نمونه‌های تیمار شده با آنزیم (تیمارهای ۳ و٤) به‌دست آمد، اما در ادامه‌ی دوره نگه‌داری، تاثیر SPI بر افزایش WHC بیشتر بود و نمونه‌های تیمار ٤ بالاترین WHC را در کل دوره‌ی نگه‌داری نشان دادند($P<0/05$). غنی‌سازی با ایزوله‌ی پروتئین سویا همچنین منجر به ویسکوزیته‌ی بالاتر در نمونه‌های تیمار ۲ و ٤ در مقایسه با نمونه‌ی شاهد شد ($P>0/05$). حضور SPI منجر به ایجاد یک ساختار ویژه‌ی شبه اسفنج در نمونه‌های غنی شده گردید، و تیمار آنزیمی نمونه‌های غنی شده با SPI موجب ایجاد یک ساختار با تخلخل یکنواخت‌تر و ذرات ریزتر شد.

واژگان کلیدی: آنزیم ترانس‌گلوتامیناز، ایزوله‌ی پروتئین سویا، ماست بدون چربی

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

در سال ۱۹۹۹، FDA به دلیل تاثیر مشخص پروتئین-های سویا در کاهش بیماری‌های قلبی اجازه استفاده از برچسب سلامت در محصولات حاوی این پروتئین را صادر نمود (دریک و همکاران ۲۰۰۰). پروتئین‌های سویا حاوی ترکیبات باارزشی به نام ایزوفلاون‌ها هستند؛ این ترکیبات به عنوان آنتی‌اکسیدان در بدن عمل نموده (آکسوان۲۰۰۹) و به جهت تشابه ساختاری و عملکردی به استروژن انسانی می‌توانند نقش مهمی در کاهش بیماری‌های هورمونی، سرطان‌های سینه و پروستات، پوکی استخوان، دیابت نوع ۲ و بیماری‌های قلبی داشته باشند (خوراناو کاناوجیا۲۰۰۷). اثرات سلامت بخشی این پروتئین‌ها در کنار خواص عملکردی ویژه‌ی آنها در سیستم‌های غذایی، نظیر ظرفیت جذب آب، حلالیت، پایداری کلوئیدها، تشکیل ژل، تشکیل امولسیون، تشکیل کف و چسبندگی و پیوستگی و نیز استفاده از آن‌ها به عنوان جایگزین چربی، موجب شده است که این پروتئین‌ها به عنوان افزودنی عملگرا در فرآوری محصولات لبنی، گوشتی، ماهی، غلات و نیز در فرمولاسیون غذای نوزادان به شدت مورد توجه قرار گیرند (مارتینز و نتو ۲۰۰۶). ایزوله‌ی پروتئین سویا (SPI) بالاترین میزان پروتئین و بالاترین قابلیت هضم پروتئین را در میان محصولات سویا دارد (فام و شاه ۲۰۰۸). SPI در محصولات لبنی تخمیری تشکیل کف و امولسیون پایدار می‌دهد لذا به‌عنوان امولسیفایر در این محصولات استفاده می‌شود (فام و شاه ۲۰۰۸). ترکیب پروتئین‌های شیر و سویا می‌تواند مخلوطی با ارزش تغذیه‌ای استثنایی ایجاد نماید، زیرا پروتئین‌های سرمی شیر غنی از اسیدآمینه‌های گوگرددار بوده و می‌توانند اسیدآمینه‌ی محدود کننده‌ی پروتئین سویا (متیونین) را جبران نمایند (کامفورت و هاول ۲۰۰۲) ضمن آنکه با بهره‌گیری از تفاوت خصوصیات عملکردی این پروتئین-ها می‌توان محصولی با ریزساختار و بافت منحصر به فرد تولید نمود (رواسچ و همکاران ۲۰۰٤).

ترانس‌گلوتامیناز آنزیمی است که با کاتالیز واکنش انتقال آسیل بین گروه گاما کربوکسی آمید گلوتامین به عنوان دهنده‌ی آسیل و گروه اپسیلون آمینوی لیزین به عنوان گیرنده‌ی آسیل توانایی تشکیل اتصالات عرضی درون مولکولی و بین مولکولی را در بسیاری از پروتئین‌ها داشته (موتوکی و سگورو ۱۹۹۸) و در نتیجه می‌تواند پلیمرهایی با وزن مولکولی بالا ایجاد نماید که خصوصیات عملکردی متفاوتی داشته باشند (اونر و همکاران ۲۰۱۰). اتصال عرضی پروتئین‌ها با آنزیم می-تواند برخی خصوصیات عملکردی آنها نظیر حلالیت، جذب آب، خصوصیات رئولوژیکی و امولسیون کنندگی را تحت تاثیر قرار دهد (لورنزن ۲۰۰۲). در بین پروتئین‌های شیر، کازئین سوبسترای بسیار مناسبی برای آنزیم ترانس‌گلوتامیناز می‌باشد، مطالعات متعدد انجام شده مبنی بر تاثیر آنزیم ترانس‌گلوتامیناز بر خصوصیات ماست و به ویژه ماست‌های کم چرب و بدون چربی نشان داده است که اتصال عرضی بین پروتئین‌های شیر توسط آنزیم ترانس‌گلوتامیناز با وارد نمودن اتصالات کووالانسی جدید در ساختار ژل (فارنزورث و همکاران۲۰۰٦)، باعث افزایش استحکام ژل و کاهش سینرسیس می‌شود (لورنزن ۲۰۰۲). پروتئین‌های سویا نیز، به ویژه زمانی که دناتوره شوند، سوبسترای خوبی برای آنزیم ترانس‌گلوتامیناز هستند (بین ام دی یاسیر۲۰۰۷). گلوتامیک اسید جزء اسید آمینه‌هایی است که در پروتئین‌های سویا در مقادیر بالاتری نسبت به پروتئین‌های شیر یافت می‌شود (فام و شاه ۲۰۰۸)، لذا به نظر می‌رسد غنی‌سازی نمونه‌های ماست با ایزوله‌ی پروتئین سویا، آن را سوبسترای مناسب‌تری برای آنزیم ترانس‌گلوتامیناز نماید. مطالعه‌ی اتصال عرضی بین پروتئین‌ها ازمنابع مختلف با یکدیگر توسط آنزیم ترانس‌گلوتامیناز نشان داده است که پروتئین‌های حاصل از اتصالات کووالانسی، باعث ایجاد عملکردهای جدید و یا بهبود عملکردهای موجود می‌شوند. برای مثال یوکویاما و همکارانش (۲۰۰٤)

Archive of SID

www.SID.ir

گزارش کردند که اتصال آنزیمی کازئین شیر یا گلوبولین‌های سویا به اوموسین تخم‌مرغ باعث افزایش فعالیت امولسیون کنندگی ترکیب حاصل در مقایسه با پروتئین‌های آغازین استفاده شده گردید.

هدف این مطالعه بررسی تشکیل اتصالات عرضی بین پروتئین‌های سویا و شیر تحت تاثیر آنزیم ترانس-گلوتامیناز و بررسی تاثیر این اتصالات بر شاخص‌های مورد مطالعه، از جمله اسیدیته، pH، WHC، ویسکوزیته ظاهری و ریزساختار ماست بدون چربی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

شیرخشک بدون چربی (رامک شیراز)، ایزوله‌ی پروتئین سویا (۹۵۰M)، آنزیم ترانس‌گلوتامیناز میکروبی (۸۰ واحد/گرم- آجینوموتو-فرانسه)، استارتر تجاری X-11 (کریستین- هانسن، دانمارک)، گلوتارآلدهید (مرک آلمان) و ترکیبات استفاده شده برای الکتروفورز از قبیل آکریلامید، بیس آکریلامید، تمد(TEMED)، تریس، سدیم دودسیل سولفات(SDS)، کماسی بلو G250، برمو فنول بلو، آمونیوم پرسولفات، گلایسین، گلیسیرول، استیک اسید، متانول و... که همگی از شرکت سیگما- آلدریچ تهیه شده اند.

آماده سازی نمونه‌های ماست

در این مطالعه چهار تیمار، در سه تکرار به شرح زیر تهیه شد:

۱-نمونه‌ی شاهد

۲- نمونه‌ی غنی شده با ۱٪ ایزوله‌ی پروتئین سویا

۳- نمونه‌ی تیمار شده با ۱ واحد آنزیم ترانس‌گلوتامیناز به ازای هر گرم پروتئین

٤- نمونه‌ی تواماً غنی شده با ۱٪ ایزوله‌ی پروتئین سویا و تیمار شده با ۱ واحد آنزیم ترانس‌گلوتامیناز به ازای هر گرم پروتئین

نمونه‌ها از شیر باز ساخته‌ی بدون چربی با ۱۲/۵ درصد ماده جامد کل تهیه شدند. به تیمارهای ۲ و ٤ ایزوله پروتئین سویا اضافه شد (ایزوله‌ی پروتئین سویا در بخشی از آب مورد استفاده برای تهیه شیر باز ساخته به وسیله میکسر حل شده و به شیر باز ساخته اضافه شد) تمام تیمارها در دمای ۸۵°C به مدت ۱۵ دقیقه حرارت داده شدند (یوکسل و اردم ۲۰۱۰)، سپس تا دمای ٤۳ °C سرد و تیمارهای ۳ و ٤ با آنزیم ترانس-گلوتامیناز تلقیح شدند. نمونه‌ها در دمای ٤۳ °C به مدت ۹۰ دقیقه، جهت فعالیت آنزیم، گرم‌خانه‌گذاری شدند. غیرفعال‌سازی آنزیم طی فرآیند حرارتی در دمای ۸۰°C به مدت ٥ دقیقه انجام شد (یوکسل و اردم ۲۰۱۰)، سپس دمای شیر مجددا به ٤۳ °C رسانده شد و در این دما هر کدام از تیمارها با کشت آغازگر حاوی *استرپتوکوکوس ترموفیلوس و لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* به میزان ۰/۰۲٪ تلقیح و بلافاصله در ظرف‌های ۲۰۰ میلی لیتری پر و پس از درب‌بندی در دمای ٤۳ °C تا رسیدن به pH ٤/٦ ±۰/۱ گرمخانه‌گذاری شدند. پس از اتمام زمان گرمخانه‌گذاری نمونه‌های ماست بلافاصله در حمام آب یخ سرد شده و به مدت ۲۱ روز در یخچال در دمای ٤±۱ °C نگه‌داری شدند و در روزهای ۱، ۷، ۱٤ و ۲۱ مورد آزمایش قرار گرفتند.

الکتروفورز

تشکیل اتصالات عرضی بین پروتئین‌های شیر و سویا توسط آنزیم ترانس‌گلوتامیناز، با ژل الکتروفورز سدیم دو دسیل پلی آکریلامید با ٤ درصد ژل ذخیره و ۱۲ درصد ژل جدا کننده با روش لاملی (۱۹۷۰) با استفاده از ژل صفحه‌ای عمودی (Bio-Rad Laboratories Ltd., Watford, UK) بررسی شد. ابتدا فاصله ۱ میلی‌متری ۲ صفحه شیشه‌ای مخصوص الکتروفورز که از سه طرف مسدود شده بود توسط ژل جدا کننده پر شد، به نحوی که ۲ سانتی متر فضای خالی در سطح بالای ژل برای ژل ذخیره باقی بماند. به منظور صاف بودن سطح ژل و نیز محافظت مخلوط ژل از اکسیژن هوا، قبل از بستن ژل، یک لایه‌ی ۱ میلی‌متری از بوتانول

Archive of SID

www.SID.ir

روی ژل جداساز اضافه شده و اجازه داده شد تا پلیمریزاسیون کامل شود. بعد از بستن ژل، محلول ژل ذخیره جایگزین بوتانول شد و شانه داخل آن قرار گرفت و اجازه داده شد تا پلیمریزاسیون کامل گردد. بعد از بستن ژل ذخیره شانه خارج و نوار پایینی جدا شده و صفحات محتوی ژل در محفظه‌ی الکتروفورز قرار داده شدند و محفظه‌ی بالایی و پایینی دستگاه با بافر الکترود پر شد. ۰/۰۱ گرم از نمونه ماست با ۱ میلی لیتر از بافر نمونه مخلوط (دیو ۱۹۹۸) و ۱۵ میکرولیتر از نمونه آماده شده در دیواره ژل تزریق شد و عمل الکتروفورز به مدت حدود ۳ ساعت با جریان برق ۳۰ میلی آمپر و ۲۸۰ ولت تا رسیدن رنگ بروموفنول بلو به قسمت پایین ژل انجام شد، سپس ژل از دستگاه جدا شده و در محلولCoomassie blue R250 با سرعت ۱۰ دور در دقیقه به مدت ۳ ساعت رنگ‌آمیزی و در محلول (حاوی ٤۰۰ میلی لیتر متانول، ۱۰۰ میلی لیتر استیک اسید و ۵۰۰ میلی لیتر آب) به مدت ۱ ساعت و پس از آن در آب مقطر به مدت ۱ شب بی رنگ شد.

pH و اسیدیته

اندازه‌گیری pH (با pHمتر متروم، مدل ٦۹۱، ساخت کشور سوئیس) و اسیدیته‌ی نمونه‌های ماست (با تیتراسیون ۹ گرم نمونه و ۹ گرم آب مقطر با محلول سود ۰/۱ نرمال در حضور معرف فنل فتا لئین تا ظهور رنگ ارغوانی) مطابق استاندارد شماره ۲۸۵۲ ایران انجام شد (میلانی و همکاران ۱۳۹۰).

ظرفیت نگه داری آب (WHC)

ظرفیت نگه‌داری آب با سانتریفوژ کردن ۵ گرم از نمونه‌های ماست (با استفاده از سانتریفوژ مدل EBA20، ساخت شرکت هتیش، آلمان) با سرعت ۱۹۴۹gدر دمای ۱۰°C به مدت ۳۰ دقیقه از رابطه‌ی زیر به دست آمد:

$$WHC=\frac{(Y-W)}{Y}\times 100$$

که در آن Y وزن اولیه نمونه‌ی ماست و W وزن سرم خارج شده از ژل ماست می باشد (ساهان و همکاران ۲۰۰۷).

ویسکوزیته‌ی ظاهری

ویسکوزیته‌ی ظاهری نمونه‌های ماست در دمای ۱۰°C با ویسکومتر بروکفیلد (مدل +DVII – ساخت آمریکا) با اسپیندل نوع LV2 شماره ٦٤ در گشتاور بین ۱۰ تا ۱۰۰ و سرعت ۳۰ دوردردقیقه اندازه‌گیری شد. نمونه-های ماست قبل از تعیین ویسکوزیته با همزن دستی به مدت ٦۰ ثانیه به آرامی همزده شدند (تراچو و میستری ۱۹۹۸).

ریز ساختار

برش‌هایی با ابعاد ۱×۳×۳ با تیغ تیز از قسمت مرکزی نمونه‌های ماست جدا و در محلول ۲/۵ درصد گلوتارآلدهید حدود ٤ ساعت تثبیت شدند. نمونه‌های تثبیت شده در دوره‌های ۱۰ دقیقه‌ای (حداقل ۳ بار) با آب مقطر شسته شده و سپس آب‌گیری نمونه‌ها با استفاده از محلول های ۲۰، ٤۰، ٦۰، ۷۰ و۹۰ درصد اتانول انجام و با آبگیری در الکل خالص ادامه یافت (پووانتیران ۲۰۰۲) نمونه‌های آماده شده در دستگاه coater sputter (ساخت شرکتBAL-TEC، کشور سوئیس) با لایه‌ی نازکی از طلا پوشانده شدند. در این دستگاه مولکول‌های گاز آرگون سطح طلا را بمباران و آن را یونیزه می‌کنند. مخلوطی از مولکول‌های گاز و یون‌های طلا پلاسمایی با بار مثبت تشکیلمی‌دهند که بطور فیزیکی روی نمونه‌ی دارای بار منفی می‌نشیند (باند شیمیایی تشکیل نمی‌شود). لایه‌های تشکیل شده دارای ضخامتی در حدود ۱۰۰ آنگستروم (چند لایه اتمی) می‌باشند. نمونه‌های آماده شده در میکروسکوپ الکترونی XL30 با خلاء بالا قرار داده شدند و ریز ساختار آنها در ولتاژ 25 kv بررسی شد (پووانتیران ۲۰۰۲).

Archive of SID

www.SID.ir

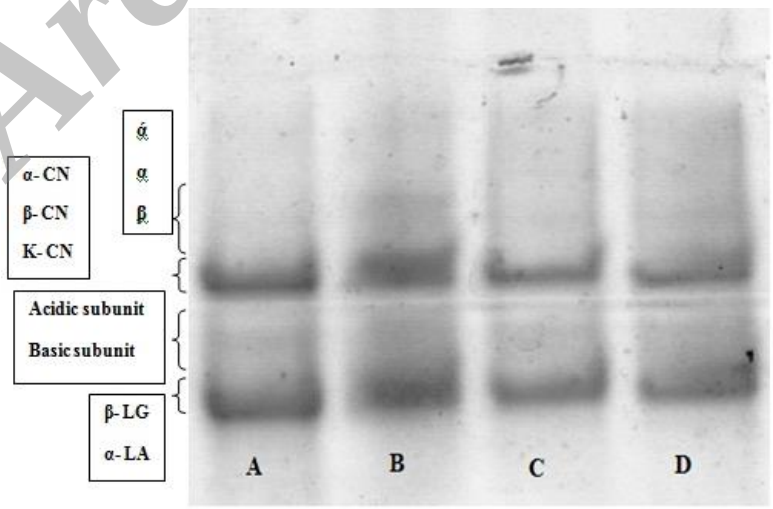
تجزیه و تحلیل آماری

در این مطالعه از طرح splitplot استفاده شد، ٤ تیمار (شاهد، پروتئین، آنزیم و پروتئین و آنزیم) کرت کامل در نظر گرفته شدند و شاخص‌های کیفی در طول ٤ زمان (روزهای ۱، ۷، ۱٤ و ۲۱) اندازه‌گیری و بررسی شد. نتایج با استفاده از نرم افزار SAS تجزیه شد.

نتایج و بحث

نمایش اتصالات عرضی بین پروتئین‌ها

الگوهای الکتروفورز نمونه‌های ماست در شکل ۱ نشان داده شده است. مقایسه‌ی بین نمونه‌های تیمار شده با آنزیم و بدون آنزیم نشان داد که باندها در نمونه‌های تهیه شده از شیر تیمار شده با آنزیم شدت کمتری دارند که به دلیل اتصالات عرضی بین پروتئین‌ها توسط آنزیم ترانس گلوتامیناز می‌باشد ابومحمود و ساولو (۱۹۹۰) گزارش کردند که اتصال عرضی پروتئین‌های سرمی با ترانس‌گلوتامیناز باندهای پروتئینی معمول را ناپدید و در نتیجه‌ی تجمع پلیمرهای پروتئینی بی‌حرکت در بالای ژلSDS-PAGE باند جدید ظاهر می‌شود. اوزر و همکارانش (۲۰۰۷) نیز یک کاهش تدریجی را در شدت باند پروتئین‌های سرمی و کازئین با افزایش مقدار ترانس‌گلوتامیناز در ماست گزارش کردند. گوچ و همکارانش (۲۰۰۸) گزارش کردند که پلیمریزاسیون پروتئین‌های سرمی با ترانس‌گلوتامیناز اندازه‌ی باندهای مربوط به β-لاکتوگلوبولین و α- لاکتولبومین را کاهش داد. در نتیجه‌ی اتصال عرضی پروتئین‌ها توسط آنزیم ترانس‌گلوتامیناز، پلیمرهای با وزن مولکولی بالا تشکیل و در بالای ژل تجمع می‌کنند و وارد ژل ذخیره نمی شود، لذا شدت باندهای معمول کاهش می‌یابد. کاهش شدت باند در نمونه‌های ماست تواما غنی شده با SPI و تیمار شده با آنزیم (تیمار ٤) در مقایسه با نمونه‌ی غنی شده با SPI بدون تیمار آنزیمی (تیمار ۲) نشان داد که پروتئین‌های حرارت دیده‌ی سویا سوبسترای خوبی برای آنزیم ترانس‌گلوتامیناز هستند. پروتئین‌های سویا به صورت کووالانسی با پروتئین‌های سرمی و کازئین ایجاد اتصالات عرضی نموده و شدت هر دو باند پروتئینی را در ژل الکتروفورز کاهش دادند (ماگروما و همکاران ۲۰۰۳). مقایسه‌ی نمونه شاهد با نمونه صرفا تیمار شده با آنزیم نیز موید اتصال عرضی بین پروتئین‌های شیر و در نتیجه کاهش شدت باندهای پروتئینی می‌باشد.



شکل ۱ – الگوی الکتروفورتیک نمونه‌های ماست

(A) نمونه‌ی شاهد، (B) نمونه‌ی غنی شده با ایزوله‌ی پروتئین سویا، (C) نمونه‌ی تیمار شده با آنزیم ترانس گلوتامیناز و (D) نمونه‌ی تواماً غنی شده با ایزوله‌ی پروتئین سویا و تیمار شده با آنزیم ترانس گلوتامیناز

Archive of SID

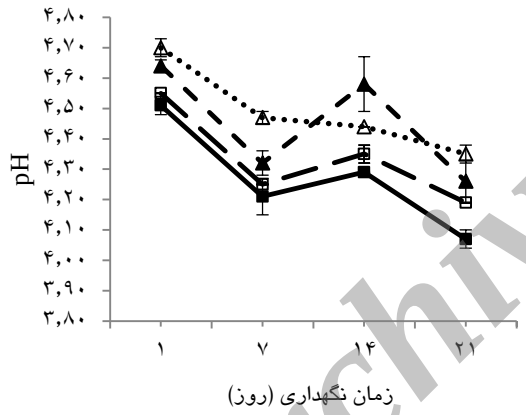
www.SID.ir

ماگروما و همکارانش (۲۰۰۳) با اتصال عرضی بین پروتئین‌های سویا و ایزوله‌ی پروتئین‌های سرمی(WPI) و پروتئین‌های سویا و کازئین بیوپلمرهایی با خصوصیات امولسیون‌کنندگی و پایداری حرارتی بالا تهیه کردند و آنها را با هدف کاهش افزودنی‌های شیمیایی سنتتیک، جایگرین بخشی از سدیم تری پلی فسفات(STPP) در فرمولاسیون سوسیس مرغ نموده و گزارش کردند که بیوپلیمرهای حاصل با ایجاد ساختار شبکه‌ای در سوسیس‌های با مقادیر پایین STPP خصوصیات رئولوژیکی را بهبود بخشید.

pH و اسیدیته

تغییرات pH نمونه‌های ماست در طول زمان نگه‌داری در شکل ۲ نشان داده شده است. در روز ۱ و ۱٤ اختلاف معنی‌داری میان pH نمونه‌ی شاهد و سایر نمونه‌ها مشاهده نشد. در حالیکه در روز ۷ نمونه‌های تیمار شده با آنزیم (تیمارهای ۳ و ٤) pH کمتری را در مقایسه با نمونه‌ی شاهد نشان دادند و تیمار ٤ در طول دوره‌ی نگه‌داری دارای کمترین pH بود، هر چند این اختلاف به جز در روز ۲۱ معنی‌دار نبود. مقایسه‌ی pH نمونه‌ها در طول دوره‌ی نگه‌داری نشان داد که تاثیر آنزیم در کاهش pH قابل توجه‌تر از پروتئین سویا بوده است. این در حالیست که اوزر و همکارانش (۲۰۰۷) مقادیر بالاتر pH را برای نمونه‌های تیمار شده با ترانس گلوتامیناز در مقایسه با نمونه‌ی شاهد گزارش کردند و فارنزورث و همکارانش (۲۰۰٦) تفاوت معنی‌داری را بین pH نمونه‌ی تیمارشده با آنزیم و نمونه‌ی شاهد مشاهده نکردند. به نظر می‌رسد آنزیم با تحریک رشد باکتری‌های آغازگر ماست (فارنزورث ۲۰۰٦)، به ویژه استرپتوکوکوس‌ها، باعث کاهش pH شده است. در این مطالعه، SPI به تنهایی نتوانست pH نمونه‌های غنی شده را کاهش دهد در حالیکه فام و شاه(۲۰۰۸) pH کمتری را برای نمونه‌های ماست غنی شده با ٤ درصد ایزوله‌ی پروتئین سویا در مقایسه با نمونه‌ی شاهد گزارش کردند، اما دریک و همکارانش (۲۰۰۰) هیچ اختلافی را میان pH نمونه‌های غنی شده با کنسانتره‌ی پروتئین سویا و نمونه شاهد گزارش نکردند.

بررسی تغییرات pH در طول دوره‌ی نگه‌داری یک کاهش معنی‌دار را برای تمام نمونه‌ها در روز ۷ نشان داد که این مقدار برای نمونه‌ی شاهد و نمونه‌ی تیمار شده با آنزیم تا انتهای دوره‌ی نگه‌داری ثابت بود، در حالیکه برای نمونه‌ی غنی شده با پروتئین یک افزایش در روز ١٤ و یک کاهش مجدد در روز ۲۱ و برای نمونه‌ی تواما غنی شده با پروتئین و تیمار شده با آنزیم یک کاهش مجدد در روز ۲۱ نیز گزارش شد.



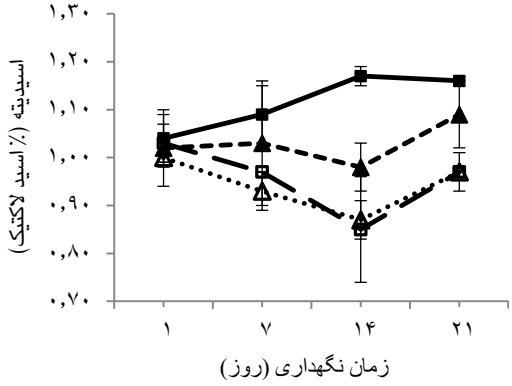
شکل۲- تغییرات pH در طول دوره‌ی نگه‌داری در دمای ۴°C
(Δ) نمونه‌ی شاهد، (▲) نمونه‌ی غنی شده با ایزوله‌ی پروتئین سویا، (□) نمونه‌ی تیمار شده با آنزیم ترانس گلوتامیناز ، (■) نمونه‌ی تواماً غنی شده با ایزوله‌ی پروتئین سویا و تیمار شده با آنزیم ترانس گلوتامیناز.

شکل۳ اسیدیته‌ی قابل تیتر نمونه‌های ماست را در طول ۲۱ روز نگه‌داری در دمای ٤ °C نشان می‌دهد. اسیدیته‌ی نمونه‌های ماست در روز ۱ نگه‌داری اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند (P>۰/۰۵) در حالیکه در روز ۷ و بعد از آن نمونه‌های تیمار ۲ و ٤ اسیدیته‌ی بالاتری را در مقایسه با نمونه‌ی شاهد و تیمار ۳ نشان دادند (P<۰/۰۵)؛ اثر محرک ایزوله‌ی پروتئین سویا بر

Archive of SID

www.SID.ir

رشد لاکتوباسیلوس دلبروکی با تامین ترکیبات مغذی مورد نیاز و در نتیجه افزایش متابولیسم و تولید بیشتر اسید ، باعث افزایش بیشتر اسیدیته در نمونه‌های حاوی پروتئین سویا شد. با توجه به اینکه غنی سازی با SPI تاثیری بر pH نمونه‌ها نداشته اما توانسته اسیدیته را به میزان قابل توجهی افزایش دهد، می‌توان نتیجه گرفت که با وارد شدن ایزوله‌ی پروتئین سویا، و افزایش میزان پروتئین، ظرفیت بافری کل محیط افزایش یافته است. اسیدیته‌ی نمونه‌های تهیه شده از شیر تیمار شده با آنزیم اختلاف معنی‌داری را با نمونه‌ی شاهد نشان نداد ($P>0/05$)، مشابه نتایج حاضر، فارنورث و همکارانش (۲۰۰۷) اختلاف معنی‌داری را میان اسیدیته‌ی نمونه ماست‌های تیمار شده با ترانس گلوتامیناز و نمونه‌ی شاهد گزارش نکردند، در مقابل لورنزن و همکارانش (۲۰۰۲) و یوکسل و اردم (۲۰۱۰) کاهش قابل توجه اسیدیته را برای ماست‌های بدون چربی و با چربی کامل تیمار شده با آنزیم در مقایسه با نمونه‌های تیمار نشده گزارش کردند. احتمالا مقادیر کمتر آنزیم استفاده شده در این مطالعه در مقایسه با مطالعات گفته شده منجر به اختلاف مشاهده شده گردید.



شکل ۳- تغییرات اسیدیته در طول دوره‌ی نگه‌داری در دمای ۴ °C

(Δ) نمونه‌ی شاهد، (▲) نمونه‌ی غنی شده با ایزوله‌ی پروتئین سویا، (□) نمونه‌ی تیمار شده با آنزیم ترانس گلوتامیناز ، (■) نمونه‌ی تواماً غنی شده با ایزوله‌ی پروتئین سویا و تیمار شده با آنزیم ترانس گلوتامیناز.

اسیدیته‌ی نمونه‌های تیمار ٤ افزایش تدریجی را تا پایان دوره‌ی نگه‌داری نشان داد، در حالیکه اسیدیته نمونه-های غنی شده با ایزوله‌ی پروتئین سویا تا انتهای دوره ثابت بود اما نمونه های تیمار شده با آنزیم یک کاهش ملایم ($P<0/05$) را تا روز ١٤ و یک افزایش ملایم بعدی ($P<0/05$) را تا انتهای دوره نگه‌داری نشان دادند. ایزوله‌ی پروتئین سویا به عنوان منبع ترکیبات مغذی نظیر پپتیدها و اسیدهای آمینه (فام و شاه ۲۰۰۹) همراه با عمل ایجاد اتصالات عرضی آنزیمی با ایجاد یک شبکه‌ی ژلی یکنواخت ممکن است با کمک به رشد باکتری‌های استارتر منجر به افزایش اسیدیته در طول دوره‌ی نگه‌داری در نمونه‌های ماست تیمار ٤ شده باشد. شوری (۲۰۱۳) افزایش اسیدیته را در ماست تهیه شده از مخلوط شیر سویا و شیر گاو در مقایسه با ماست تهیه شده از شیر گاو گزارش کرد.

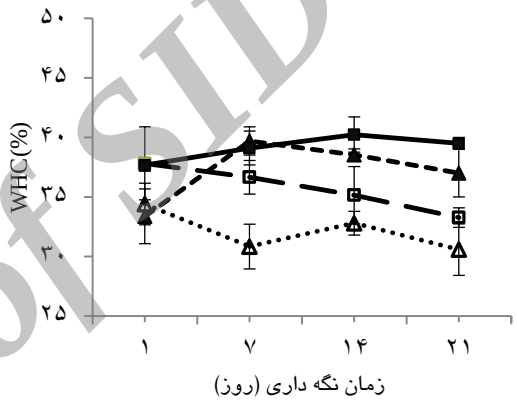
ظرفیت نگه داری آب (WHC)

شکل ٤ ظرفیت نگه‌داری آب نمونه‌های ماست نگه‌داری شده در٤°C به مدت ۲۱ روز را نشان می‌دهد. WHC نمونه‌ی غنی شده با ایزوله‌ی پروتئین سویا در روز ۱ نگه‌داری اختلاف معنی‌داری با نمونه‌ی شاهد نداشت ($P>0/05$)، اما با افزایش و تکمیل آب‌گیری پروتئین‌ها با گذشت زمان، یک افزایش چشمگیر ($P<0/05$) در روز ۷ نشان داد که تا انتهای دوره‌ی نگه‌داری ثابت بود. کمترین WHC در بین تمام نمونه‌ها و در تمام طول دوره‌ی نگه‌داری برای نمونه‌ی شاهد به‌دست آمد. در روز ۱ نگه‌داری نمونه‌های تیمار شده با آنزیم (تیمار ۳ و ٤) WHC بالاتری را در مقایسه با شاهد نشان دادند. WHC بالا در نمونه‌ی تیمار شده با آنزیم حاصل اتصالات عرضی ایجاد شده در درون ساختار ژل ماست می‌باشد که موجب افزایش استحکام شبکه‌ی سه بعدی ژل (لورنزن ۲۰۰۲)، کاهش اندازه‌ی منافذ و توزیع منظم‌تر رشته‌های پروتئینی در ساختار ژل (تمیم و رابینسون ۲۰۰۷) و در نتیجه، مقاوم‌تر شدن آن در برابر خروج سرم گردیده است.

Archive of SID

www.SID.ir

WHC نمونه‌های تیمار ٤ مشابه نمونه‌ی شاهد تغییرات قابل توجهی را در طول دوره‌ی نگه‌داری نشان نداد، تیمار ۳ نیز تا انتهای دوره ثابت بود و فقط یک کاهش جزئی در انتهای دوره (در روز ۲۱) نشان داد (P>۰/۰۵). افزایش اسیدیته‌ی نمونه‌ی تیمار شده با آنزیم در روز ۲۱ نگه‌داری با افزایش برهم‌کنش‌های پروتئین-پروتئین منجر به انقباض شبکه‌ی ژل و کاهش WHC در این نمونه‌ها در انتهای دوره‌ی نگه‌داری شد (یوکسل و اردم ۲۰۱۰).



شکل۴- تغییرات WHC در طول دوره‌ی نگه‌داری در دمای ۴ °C

(Δ) نمونه‌ی شاهد، (▲) نمونه‌ی غنی شده با ایزوله‌ی پروتئین سویا، (□) نمونه‌ی تیمار شده با آنزیم ترانس گلوتامیناز ، (■) نمونه‌ی تواماً غنی شده با ایزوله‌ی پروتئین سویا و تیمار شده با آنزیم ترانس گلوتامیناز.

غنی‌سازی شیر با ایزوله‌ی پروتئین سویا با افزایش مقدار ماده خشک و در نتیجه با اتصال مقادیر بیشتر آب در شبکه‌ی ژل، منجر به مقادیر بالاتر WHC در این نمونه‌ها شد و تمایل به سینرسیس را کاهش داد. تیمار آنزیمی نمونه‌های غنی شده با ایزوله‌ی پروتئین سویا، WHC نمونه‌های ماست را باز هم افزایش داد هر چند این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). نمونه‌های غنی شده با ایزوله‌ی پروتئین سویا و تیمار شده با آنزیم بیشترین WHC را بین تمام نمونه‌ها و در تمام طول دوره‌ی نگه‌داری نشان داد که این افزایش، دلالت بر مشارکت پروتئین‌های سویا در ساختار ژل ماست از طریق ایجاد اتصالات عرضی بین این پروتئین‌ها با پروتئین‌های شیر با عمل آنزیم ترانس گلوتامیناز دارد، یعنی ایزوله‌ی پروتئین سویا صرفا به عنوان عامل پرکننده در فرمولاسیون ماست عمل نکرده است. فرض بر این است که حرارت دادن شیر غنی شده با ایزوله‌ی پروتئین سویا در طول آماده سازی ماست، منجر به دناتوره شدن پروتئین‌های سرمی شیر و پروتئین‌های سویا شده، در نتیجه گروه‌های سولفیدریلی و هیدروفوبی که قبلا در داخل ساختار پروتئین بودند را در معرض آنزیم ترانس گلوتامیناز قرار داده است.

ویسکوزیته‌ی ظاهری

شکل۵ ویسکوزیته‌ی نمونه‌های ماست را در طول دوره‌ی نگه‌داری نشان می‌دهد. اختلاف بین زمان‌های مختلف نگه‌داری و نیز اثر متقابل زمان و تیمارها معنی-دار نبود (P>۰/۰۵)، اما مقایسه‌ی ویسکوزیته‌ی ظاهری بین نمونه‌ها نشان داد که نمونه‌های غنی شده با ایزوله-ی پروتئین سویا (تیمار ۲ و ٤) ویسکوزیته‌ی بالاتری نسبت به نمونه‌ی شاهد داشتند (P<۰/۰۵). نمونه‌ی تیمار شده با آنزیم تفاوت معنی‌داری با نمونه‌ی شاهد نداشت. ایزوله‌ی پروتئین سویا به جهت ظرفیت اتصال و نگه‌داری آب و توانایی تشکیل ژل، آزادی حرکت مولکول‌های آب در سیستم را کاهش و ویسکوزیته را افزایش داد (آکسوان ۲۰۰۹). مشابه نتایج این مطالعه دریک و همکارانش (۲۰۰۰) نیز افزایش ویسکوزیته را برای نمونه‌های ماست غنی شده با کنسانتره‌ی پروتئین سویا گزارش کردند.

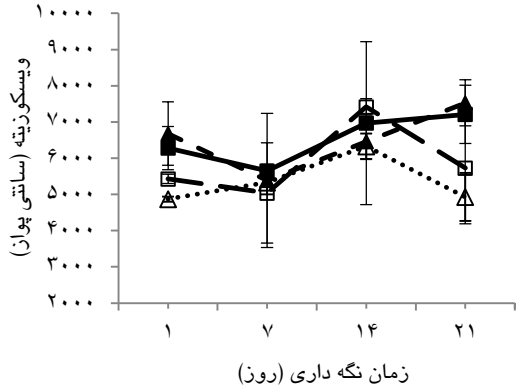
ریزساختار

میکروگراف‌های اسکن الکترونی نمونه‌های ماست نگه-داری شده در دمای ٤ °C به مدت ۲۱ روز در شکل ٦ نشان داده شده است. حضور SPI باعث ایجاد یک ساختار ویژه‌ی شبه اسفنج در ژل ماست شد؛ اتصال بین ذره‌ای پروتئین‌های شیر با SPI منجر به تشکیل زنجیره‌های بلند و باریکی شد که مشابه این ساختار

Archive of SID

www.SID.ir

توسط رامچاندران (۲۰۰۹) برای ماست‌های غنی شده با کنسانتره‌ی پروتئین‌های سرمی (WPC) گزارش شده است. توزیع منظم این رشته‌ها در شبکه‌ی پروتئینی ایجاد یک ژل مشبک با منافذ ریزنموده و استقرار مولکول‌های آب در ساختار ژل را بهبود بخشید. زنجیره‌های حاصل از تجمع پروتئین‌های شیر و سویا توسط حرارت باعث افزایش WHC نمونه‌های غنی شده با SPI شد (ریموف ۲۰۰۳). ریز ساختار نمونه های تیمار شده با آنزیم بسیار فشرده و متراکم با ذرات کوچکتر و تخلخل کمتر بود، به نظر می‌رسد که افزایش تعداد اتصالات و افزایش قدرت آنها باعث متراکم شدن شدیدتر ساختار و در نتیجه کاهش WHC در این نمونه‌ها، به ویژه در انتهای دوره‌ی نگه‌داری شده است، در حالیکه در دیگر مطالعات مشابه، WHC بالاتر برای نمونه‌های تیمار شده با آنزیم ترانس گلوتامیناز به دلیل اصلاح ساختار شبکه‌ی پروتئینی با آنزیم گزارش شده بود (تمیم و رابینسون ۲۰۰۷). تیمار آنزیمی نمونه‌های غنی شده با SPI موجب ایجاد یک ساختار با تخلخل یکنواخت‌تر و با منافذ کوچکتر در مقایسه با نمونه‌ی صرفا غنی شده با SPI شد که این ساختار ویژه خروج سرم را باز هم کمتر نمود.



شکل ۵- تغییرات ویسکوزیته در طول دوره‌ی نگه‌داری در دمای ۴ °C

(Δ) نمونه‌ی شاهد، (▲) نمونه‌ی غنی شده با ایزوله‌ی پروتئین سویا، (□) نمونه‌ی تیمار شده با آنزیم ترانس گلوتامیناز ، (■) نمونه‌ی تواماً غنی شده با ایزوله‌ی پروتئین سویا و تیمار شده با آنزیم ترانس گلوتامیناز.

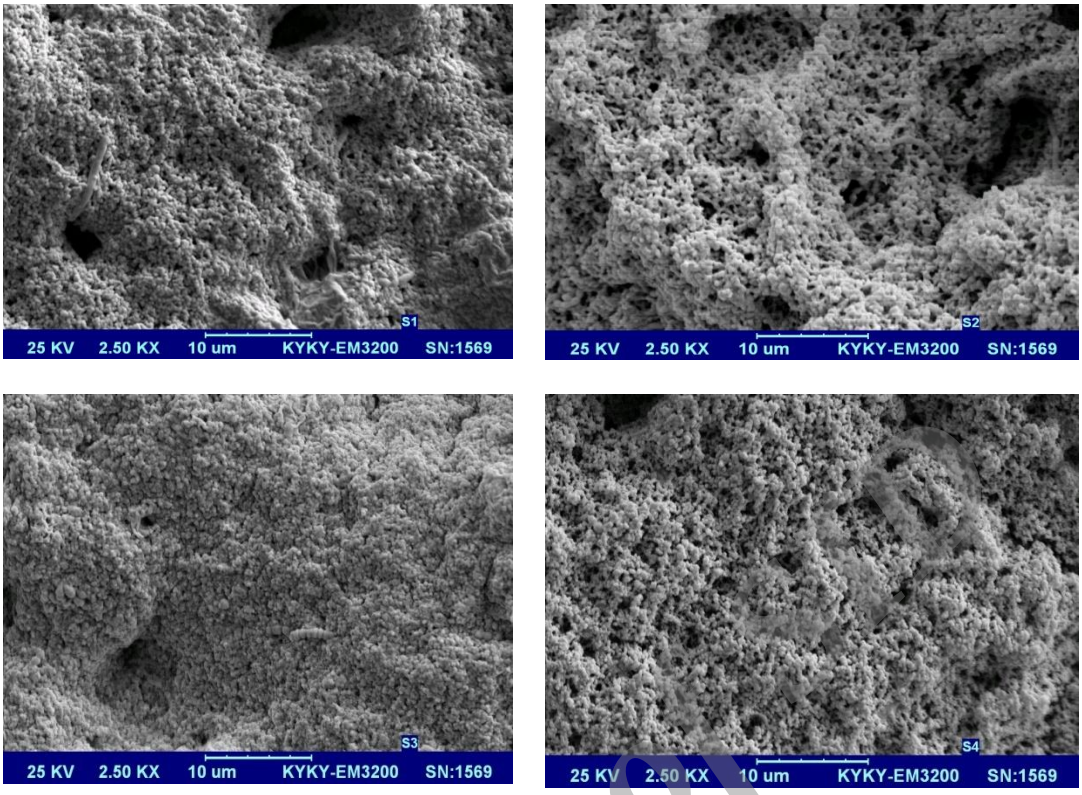
نتیجه گیری

نتایج SDS-Page با نشان دادن کاهش شدت باند پروتئینی موید اثر آنزیم ترانس گلوتامیناز در اتصال عرضی پروتئین‌های شیر و سویا در نمونه‌های تیمار ٤ و ایجاد پلیمرهای با وزن مولکولی بالاست. اتصال عرضی بین پروتئین‌های شیر و سویا با ایجاد یک شبکه‌ی ژلی با منافذ ریز و یکنواخت باعث افزایش قابل توجه WHC در نمونه‌های تیمار ٤ گردید، این شبکه‌ی ژلی یکنواخت همچنین با کمک به رشد باکتری‌های استارتر و افزایش متابولیسم آنها منجر به افزایش قابل توجه اسیدیته‌ی قابل تیتراسیون در این تیمار در مقایسه با سایر تیمارها شد.

ایزوله‌ی پروتئین سویا به تنهایی و نیز تواماً با تیمار آنزیمی توانست ویسکوزیته‌ی ظاهری را به میزان قابل توجهی افزایش دهد.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل۶ - میکروگراف‌های اسکن الکترونی نمونه‌های ماست بعد از ۲۱ روز نگه‌داری سرد

S1 (نمونه‌ی شاهد)، S2 (نمونه‌غنی شده با ایزوله‌ی پروتئین سویا)، S3 (نمونه‌ی تیمار شده با آنزیم ترانس گلوتامیناز)، S4 (نمونه‌ی تواما غنی شده با ایزوله‌ی پروتئین سویا و تیمار شده با آنزیم ترانس گلوتامیناز).

Archive of SID

منابع مورد استفاده

استاندارد ملی ایران شماره ۲۸۵۲ ، شیر و فرآورده‌های آن- تعیین اسیدیته و pH

میلانی الف، بقایی ه و مرتضوی س ع، ۱۳۹۰ . اثر جایگزینی عسل، خرما و گوار بر ویژگی های فیزیکوشیمیایی، بافت و ویسکوزیته دسر بستنی ماستی کم چرب پرتقالی. نشریه پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران، ج ۷، ش ۲، ص ۱۱۵ تا ۱۲۰.

Aboumahmoud R and Savello P, 1990.Crosslinking of Whey Protein by Transglutamlnase. Journal of Dairy Science 73: 256–263.

Akesowan A, 2009. Influence of soy protein isolate on physical and sensory properties of ice cream. Thai Journal of Agricultural Science 42(1):1-6.

Bin Md Yasir S, Sutton H K, Newberry P M, Andrews R N and Gerrard A J, 2007. The impact of transglutaminase on soy proteins and tofu texture.Food Chemistry 104: 1491–1501.

Comfort S and Howell N K, 2002. Gelation properties of soya and whey protein isolate mixtures. Food Hydrocolloids 16: 661-672.

Dave J I, 1998. Factors affecting viability of yoghurt and probiotic bacteria in commercial starter cultures, A thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy. Centre for Bioprocessing and Food Technology School of Life Sciences and Technology Victoria University of Technology Werribee Campus, Victoria, Australia.

Drake AM, Chen Q X, Tamarapu S and Leenanon B, 2000. Soy protein fortification affects sensory. Chemical and microbiological properties of dairy yogurts. Journal of Food Science 65: 1244-1247.

Farnsworth J P, Li J, Hendricks G M and Guo M R, 2006. Effects of transglutaminase treatment on functional properties and probiotic culture survivability of goat milk yogurt. Small Ruminant Research 65: 113–121.

www.SID.ir

Farnworth ER Mainville I Desjardins MP Gardner N Fliss I and Champange C, 2007.Growth of probiotic bacteria and bifidobacteria in a soy yogurt formulation.International Journal of Food Microbiology 116: 174–181.

Gauche C, Tomazi T, Barreto PLM, Ogliari PJ and Bordignon- Luiz MT, 2009. Physical properties of yoghurt manufactured with milk whey and Transglutaminase. LWT - Food Science and Technology 42: 239–243.

Khurana K H and Kanawjia K S, 2007. Recent trends in development of fermented milks. Current Nutrition & Food Science 3: 91-108.

Laemmli U K, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680–685.

Lorenzen C P, Neve H, Mautner A and Schlimme E, 2002.Effect of enzymatic cross-linking of milk proteins on functional properties of set-style yogurt. Socity of Dairy Technology 55: 152-157.

Martins V B and Netto F M, 2006. Physicochemical and functional properties of soy protein isolate as a function of water activity and storage. Food Research International 39: 145–153.

Motoki M and Seguro K, 1998.Transglutaminase and its use for food processing.Trends in Food Science & Technology 9: 204–210.

Muguruma M, Tsuruoka K, Katayama K, Erwanto Y, Kawahara S, Yamauchi K, Sathe K S and Soeda T, 2003. Soybean and milk proteins modified by transglutaminase improves chicken sausage texture even at reduced levels of phosphate, Meat Science 63:191-197.

Oner Z, Karahan A G, Aydemir S and SanlidereAloglu H, 2008. Effect of transglutaminase on physicochemical properties of set-style yogurt. International Journal of Food Properties 11: 196–205.

Ozer B, Kirmaci H A, Oztekin S, Hayaloglu A and Atamer M, 2007.Incorporation of microbial transglutaminase into non-fat yogurt production. International Dairy Journal 17: 199–207.

Pham T T and Shah N P, 2008.Fermentation of Reconstituted Skim Milk Supplemented with Soy Protein Isolate by probiotic organisms. Journal of Food Science 73: 62-66.

Pham T T and Shah N P, 2009. Effects of skim milk powder supplementation to soy yogurts on biotransformation of isoflavone glycosides to biologically active forms during storage. World Academy of Science, Engineering and Technology 49: 107–113.

Puvanenthiran A, Williams W P R and Augustin A. M, 2002. Structure and visco-elastic properties of set yoghurt with altered casein to whey protein ratios. International Dairy Journale 12: 383-391.

Ramchandran L, 2009. Physico-chemical and therapeutic properties of low-fat yoghurt as influenced by fat replacers, exopolysaccharides and probiotics. A thesis submitted for the degree of doctor of philosophy, Victoria University, Werribee Campus, VIC, Australia.

Remeuf F, Mohammed S, Sodini I and Tissier P J, 2003. Preliminary observations on the effects of milk fortification and heating on microstructure and physical properties of stirred yogurt, International Dairy Journal 13: 773–782.

Roesch R, Juneja M, Monagle C and Corredig M, 2004. Aggregation of soy/milk mixes during acidification. Food Research International 37: 209–215.

Sahan N, Yasar K and Hayaloglu A A, 2008. Physical, chemical and flavor quality of non-fat yogurt as affected by a β-glucanhydrocolloidal composite during storage, Food Hydrocolloids 22:1291-1297.

Shori A B, 2013. Antioxidant activity and viability of lactic acid bacteria in soybean-yogurt made from cow and camel milk. Journal of Taibah University for Science 7: 202–208.

Tamime Y A and Robinson K R, 2007. Yoghurt: science and technology. (3th ed.) England, Cambridge: Woodhead Publishing Limited, Chapter 5, page 384.

Trachoo N and Mistry V V, 1998. Application of ultrafiltered sweet buttermilk and sweet buttermilk powder in the manufacture of non-fat and low-fat yogurts. Journal of Dairy Science 81: 3163–3171.

Yokoyama K, Nio N and Kikuchi Y, 2004. Properties and applications of microbial transglutaminase. Appl Microbiol Biotechnol 64: 447–454.

Yüksel Z and Erdem Y K, 2010. The influenc of transglutaminase treatment on functional proteins of set yogurt .International Journal of Dairy Technology 63: 86-97.

Archive of SID

www.SID.ir

Influence of cross-linking between milk and soy proteins by transglutaminase on physicochemical properties of nonfat yoghurt

R Soleymanpouri[1], F Zeynali[2*], A Khosrowshahi asl[2] and A Madadlou[3]

Received: September 03, 2013 Accepted: April 08, 2014
[1]MSc Graduated, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Urmia, Iran
[2]Assistant Professor and Professor, respectively, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Urmia, Iran
[3]Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj Campus, Karaj, Iran
[*]Corresponding author: E mail: f_zeynali@yahoo.com

Abstract
In order to investigate of cross-linking of milk and soy proteins by transglutaminase and its influence on physicochemical properties of nonfat yoghurt and 4 treatments including (control, Soy Protein Isolate (SPI) enriched, Enzyme treated and SPI enriched with enzyme treated) were prepared from reconstituted milk. Decreasing of protein bands intense in electrophoretic patterns of yoghurt samples SPI enriched with enzyme treated in contrast to samples of SPI enriched improved the cross-linking of soy and milk proteins by transglutaminase and formation of high molecular polymers. In the beginning of storage time, the pH values for enzyme treated sample was lower than control while during storage period, the influence of SPI on pH variations was significant ($P<0.05$).The sample with SPI enrichment increased acidity value but the effect of enzyme on acidity was not significant ($P>0.05$). At the first day of storage period, the highest content of WHC was obtained for enzyme treated samples but during storage time, the sample containing SPI showed more effect on WHC enhancement. The SPI enriched with enzyme had maximum WHC in whole storage time ($P<0.05$). The sample with SPI enrichment caused higher viscosity ($P>0.05$). The presence of SPI resulted in a sponge like structure in enriched samples; SPI enriched with enzyme treated samples caused a structure with a more homogeneous porosity and smaller particles.

Keywords: Nonfat yoghurt, Soy Protein Isolate, Transglutaminase

Archive of SID

www.SID.ir