نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۱، شماره ۴، مهر- آبان ۱۳۹۴، ص. ۳۳۶-۳۲۵

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 11, No. 4, Oct- Nov 2015, p. 325-336

تاثیر آنزیم ترانس‌گلوتامیناز بر پروتئولیز و خواص رئولوژیکی ماست بدون چربی

ساینا مویدزاده[۱]- اصغر خسروشاهی اصل[۲*]- شهین زمردی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۰/۱۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۴/۱۳

چکیده

در این تحقیق، تاثیر غلظت آنزیم ترانس‌گلوتامیناز میکروبی، میزان کازئینات سدیم و زمان نگهداری بر پروتئولیز، خواص رئولوژیکی و ظرفیت نگهداری آب در ماست همزده بدون چربی با استفاده از روش سطح پاسخ مورد بررسی قرار گرفت. غلظت آنزیم در محدوده ۲-۰ واحد در گرم پروتئین شیر، میزان کازئینات سدیم در دامنه ۱/۲۷-۰ درصد و زمان نگهداری بین ۱۹-۱ روز بود. نتایج تجزیه آماری داده‌ها نشان داد که با افزایش غلظت آنزیم ویسکوزیته و ظرفیت نگهداری آب در نمونه‌ها به طور معنی‌داری افزایش و میزان پروتئولیز در آنها کاهش یافت ($p\leq$ ۰/۰۵). با افزودن کازئینات سدیم نیز ویسکوزیته، ظرفیت نگهداری آب نمونه‌ها افزایش پیدا کرد. همچنین در طی نگهداری، ظرفیت نگهداری آب کاهش و میزان پروتئولیز افزایش معنی‌داری نشان داد ($p\leq$ ۰/۰۵). در شرایط بهینه، غلظت آنزیم ۱/۴۲ واحد در گرم پروتئین شیر، میزان کازئینات سدیم ۰/۴۷ درصد و زمان نگهداری ۱۵ روز تعیین گردید. مقدار مطلوبیت کلی برابر ۰/۸۳ بود. در شرایط مزبور درصد ظرفیت نگهداری آب، ویسکوزیته و پروتئولیز به ترتیب ۲۷/۵۱ درصد، ۵۲۲۰ سانتی پوآز و میزان جذب آن در طول موج ۳۴۰ نانومتر به عنوان شاخص پروتئولیز ۰/۳۴۹ بود.

واژه‌های کلیدی: آنزیم ترانس‌گلوتامیناز، پروتئولیز، پیوندهای عرضی، ماست بدون چربی

مقدمه

آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی (EC 2.3.3.13)، جزء آنزیم‌های ترانسفراز می‌باشد که واکنش انتقال آسیل، بین گاما-کربوکسی‌آمید اسیدآمینه گلوتامین و آمین‌های نوع اول از جمله گروه اپسیلون-آمین لیزین در پروتئین‌ها را کاتالیز می‌کند و در نتیجه پیوندهای عرضی کووالانسی درون و بین مولکولی موجب تشکیل پلی‌مرهایی با وزن مولکولی بالا می‌شود (Jaros *et al*., 2006; Bonisch *et al*., 2007b). چنین پیوندهایی می‌توانند ساختار و عملکرد پروتئین‌ها را اصلاح کنند (Ozer *et al.,* 2007). درواقع آنزیم با درهم‌تنیدن پروتئین‌های شیر منجر به اصلاحاتی در ویژگی‌های کارکردی پروتئین‌ها و تشکیل فرآورده‌هایی با ویژگی‌های حسی و رئولوژیکی بهتر می‌شود (Bonisch *et al.,* 2007b). امروزه در اصلاح پروتئین‌ها، روش‌های آنزیمی بر روش‌های شیمیایی ترجیح دارد زیرا در روش‌های آنزیمی تولید مواد سمی ناشی از روش‌های شیمیایی به حداقل می‌رسد (Sanli *et al.,* 2011).

اولین بار آنزیم ترانس گلوتامیناز از کبد خوک و سپس از خون گاو یا خوک استخراج گردید. آنزیم ترانس گلوتامیناز حاصل از کبد خوک برای فعالیت نیاز به کلسیم دارد که موجب رسوب پروتئین در سیستم‌های حاوی کازئین، گلوبولین سویا و میوزین می‌شود. همچنین کمیاب بودن و خالص‌سازی این آنزیم همراه با هزینه بالا موجب کاهش کاربرد آن در صنایع غذایی شده است (Jaros *et al.,* 2006; Motoki & Kumazawa, 2000). آنزیم ترانس گلوتامیناز استخراج شده از خون گاو نیز جهت فعالیت نیاز به ترومبین (پروتئاز خاص) دارد و پیگمان قرمز آن موجب تغییر رنگ محصول می‌گردد. لذا به ندرت در صنایع غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Motoki & Seguro, 1998). امروزه ترانس گلوتامیناز از میکرب *استرپتوورتیسیلیوم*[۴] استخراج می‌گردد. ترانس گلوتامیناز میکروبی برای فعالیت نیاز به کلسیم نداشته و اختصاصی بودن سوبسترا در آن کمتر بوده و هزینه تولید آن نیز پایین است. بنابراین در حال حاضر ترانس گلوتامیناز میکروبی به طور گسترده به عنوان آنزیم کارکردی در شاخه‌های مختلف صنعت غذا گسترش یافته است (Jaros *et al.,* 2006).

در دو دهه اخیر، به دلیل تاثیر سوء ناشی از چربی اضافی بر سلامتی انسان، تمایل به مصرف محصولات لبنی کم چرب یا بدون چربی، مخصوصا ماست بدون چربی، به‌طور چشم‌گیری افزایش یافته

۱و۲- به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و استاد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه.
۳- استادیار بخش فنی و مهندسی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان غربی ، ارومیه.
(*- نویسنده مسئول : Email: a.khosrowshahi@gmail.com)

4- Streptoverticillium

Archive of SID
www.SID.ir

است. با این وجود، مصرف‌کنندگان محصولات کم چرب با کیفیت مشابه با محصولات پر چرب می‌طلبند (Unal *et al.,* 2003). افزایش میزان کل مواد جامد بدون چربی شیر و یا افزودن صمغ‌های طبیعی یا سنتتیک به عنوان پایدار کننده به شیر، روش‌های معمول و متعارفی هستند که جهت بهبود بافت ماست کم چرب و کاهش سینرزیس به کارگرفته شده‌اند (Gauch *et al.,* 2009). مقادیر مورد نیاز از این افزودنی‌ها برای رسیدن به میزان مواد جامد مشابه با ماست پرچرب، می‌تواند موجب بروز طعم نامطلوب، تولید بیش از حد اسید در طول دوره نگهداری و ایجاد بافت شنی در ماست شود (Ozer *et al.,* 2007). لذا بررسی روش‌های جایگزین جهت دستیابی به بافت مطلوب و کاهش سینرزیس در ماست کم چرب در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه واقع شده است. پایداری شبکه سه بعدی ژل ماست با برقراری اتصالات عرضی بین زنجیره‌های پروتئینی توسط آنزیم ترانس گلوتامیناز از روش‌های نوین و موثر در جلوگیری از مشکلات رایج در تولید فراورده‌های لبنی می‌باشد (Gauch *et al.,* 2009).

طبق منابع موجود، ترانس گلوتامیناز به دو روش مختلف در تولید ماست به کار می‌رود. اول، گرمخانه‌گذاری شیر ماست‌سازی با آنزیم قبل از تخمیر (Lauber *et al.,* 2001; Lorenzen *et al.,* 2002; Kirmaci *et al.,* 2007) و روش دیگر، افزودن آنزیم همزمان با آغازگر می‌باشد (Bonisch *et al.,* 2007a; Yuksel & Erdem, 2010). روش اول نیازمند فرآیند اضافی، شامل گرمخانه‌گذاری و غیرفعال‌سازی حرارتی آنزیم است ولی pH در طی برقراری پیوندهای عرضی ثابت باقی می‌ماند. در مقابل، در روش دوم بدون نیاز به فرآیند اضافی، آنزیم به‌تدریج در طول تخمیر غیرفعال می‌شود. اگرچه pH محصول نهایی به دور از pH بهینه فعالیت آنزیم (۶ تا۷) می‌باشد ولی ممکن است آنزیم در محصول نهایی فعال باقی بماند و در طول نگهداری موجب تغییراتی منفی در ساختار ماست شود (Guyot & Kulozik, 2010). از جمله عوامل موثر بر واکنش ترانس گلوتامیناز، افت pH در طول تخمیر، غنی‌سازی پروتئین و تیمار حرارتی شیر ماست‌سازی می‌باشد. کازئینات سدیم، پودر شیر خشک بدون چربی و ایزوله‌های پروتئین سرمی معمولا برای غنی‌سازی پروتئین شیر ماست‌سازی به منظور به دست آوردن ماستی با ساختار مطلوب، ویسکوزیته بالا و ملایم استفاده می‌شود که در این بین، کازئینات سدیم بهترین سوبسترا برای ترانس گلوتامیناز میکروبی می‌باشد، در حالیکه پروتئین‌های سرمی سوبسترای ضعیفی هستند، مگر آنکه دناتوره شوند (Bonisch *et al.,* 2007b). Pavunc و همکاران (۲۰۱۱) تاثیر میکروانکپسولاسیون و ترانس گلوتامیناز را برزنده‌مانی *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* و قوام ماست قالبی بررسی کردند و گزارش نمودند که پیش‌تیمار شیر ماست‌سازی با ترانس گلوتامیناز موجب افزایش استحکام ژل ماست و کاهش سینرزیس و بهبود ظاهر و قوام نمونه‌ها گردید. Sanli و همکاران (۲۰۱۱) آنزیم را در مراحل مختلف تولید (بعد از هموژنیزاسیون، بعد از پاستوریزاسیون و همزمان با آغازگر) و در دو مدت زمان گرمخانه‌گذاری متفاوت (۱۰ دقیقه و ۱ ساعت) به شیر ماست‌سازی اضافه کردند و نشان دادند که افزودن آنزیم باعث افزایش سفتی بافت و کاهش سینرزیس ماست قالبی شد. Gauch و همکاران (۲۰۰۹) اثر ترانس گلوتامیناز را بر ویژگی‌های فیزیکی ماست تهیه شده از مخلوط شیر و آب پنیر ارزیابی کردند و نتیجه گرفتند که با تیمار آنزیمی قوام ماست افزایش می‌یابد و طبق نتایج بافتی و رئولوژیکی، آنزیم تغییرات فیزیکی ناشی از افزودن آب پنیر به ماست را جبران کرده است.

پروتئولیز ماست در نتیجه فعالیت پروتئولیتیکی باکتری‌های اسید لاکتیک[1] در ماست صورت می‌گیرد. پروتئینازهای باند شده با دیواره سلولی و پپتیدازهای داخل سلولی این باکتری‌ها مسئول هیدرولیز پروتئین‌ها هستند. پروتئولیز پروتئین‌های شیر، موجب افزایش سرعت آزاد شدن اسیدهای آمینه و پپتیدها می‌شود(Gonzalez-Gonzalez *et al.,* 2011). بنابراین به روشی سریع برای تعیین پروتئولیز در محصولات لبنی نیاز است. روش‌های زیادی از جمله روش فولین‌سیوکالتیو[2]، روش تری‌نیترو-بنزن-سولفونیک اسید[3]، روش pH-state، روش کلدال، روش اورتوفتال‌دی‌آلدهید (OPA)[4] جهت ارزیابی پروتئولیز محصولات لبنی مورد استفاده قرار گرفته است (Nielsen *et al.,* 2001). روش اسپکتروفوتومتریک اورتوفتال‌دی‌آلدهید، اسیدهای آمینه آزاد و پپتیدهای حاصل از پروتئولیز پروتئین‌های شیر را شناسایی می‌کند. معرف OPA با گروه‌های آمینو آزاد واکنش داده و کمپلکسی تشکیل می‌دهد که بیشترین جذب آن در طول موج ۳۴۰ نانومتر می‌باشد. این روش سریعتر، دقیقتر و آسانتر از سایر روش‌ها و دامنه کاربردی وسیعتری دارد به طوریکه، تهیه معرف OPA آسان و زمان آزمایش ۲ دقیقه در دمای محیط می‌باشد. روش دقیق و حساسی است و تا ۷ میکرومول آمین‌های اصلی را شناسایی می‌کند (Church *et al.,* 1983). از نکات برجسته این پژوهش پایداری شبکه سه بعدی ژل ماست با برقراری پیوندهای عرضی بین زنجیره‌های پروتئینی که از روش‌های نوین و موثر در افزایش ویسکوزیته و قوام ماست می‌باشد و غنی‌سازی پروتئین شیر ماست‌سازی با کازئینات سدیم به عنوان سوبسترای مناسب برای فعالیت آنزیم ترانس گلوتامیناز، به کارگیری تیمار آنزیمی با ترانس گلوتامیناز در تولید ماست همزده بدون چربی و همچنین بررسی پروتئولیز با استفاده از روش اورتوفتال‌دی‌آلدهید می‌باشد. هدف از این مطالعه، بررسی تاثیر پیوندهای عرضی ایجاد شده بین پروتئین‌های شیر توسط آنزیم ترانس‌گلوتامیناز بر پروتئولیز، خواص رئولوژیکی و ظرفیت نگهداری

1- Lactic acid bacteria (LAB)
2- Folin-Ciocalteau
3- Trinitro-benzene-sulfonic acid (TNBS)
4- The o-pthaldialdehyde (OPA) assay

Archive of SID

www.SID.ir

آب در ماست همزده بدون چربی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد

شیر ۰/۳ درصد چربی (شرکت شیر پاستوریزه آذربایجان غربی، پگاه)، شیر خشک بدون چربی (شرکت راماک، ایران)، کازئینات سدیم (شرکت کازئینات ایران، ایران)، آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی (ACTIVA YG) از *استرپتوورتیسیلیوم* با میانگین فعالیت ۸۰ واحد در گرم (شرکت آجینوموتو[1] فرانسه) که ترکیب آنزیم شامل ترانس گلوتامیناز (۱ درصد)، لاکتوز، عصاره مخمر، مالتودکسترین و روغن گیاهی می‌باشد. (مقدار مصرف آن بر اساس دستورالعمل شرکت برای ماست قالبی ۱-۰/۵ واحد در گرم پروتئین شیر و برای ماست همزده ۳-۱ واحد در گرم پروتئین شیر است). استارتر تجاری ماست YC-X11 (کشت مخلوط *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیر گونه *بولگاریکوس*، شرکت کریستین هانسن دانمارک)، متانول (HPLC grade، مرک آلمان)، فتال‌دی‌آلدهید (شرکت سیگما آلدریچ استرالیا)، سدیم‌تترابورات (شرکت مرک آلمان)، سدیم‌دودسیل-سولفات (شرکت مرک آلمان)، بتامرکاپتواتانول (شرکت سیگما آلدریچ استرالیا). ویژگی‌های شیمیایی شیر خام، شیر خشک بدون چربی و کازئینات سدیم در جدول ۱ نشان داده شده است.

روش‌ها

طرح آزمایشی و تیمارهای آماری

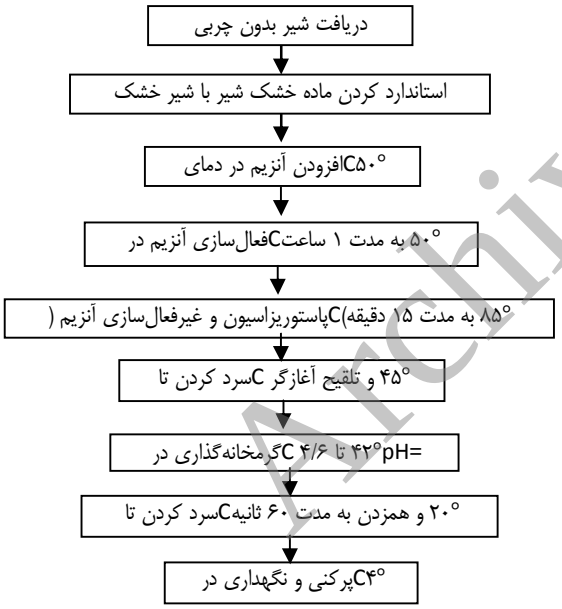
در این تحقیق، از روش سطح پاسخ [2] و از طرح مرکب مرکز وجه[3] استفاده شد. متغیرهای مستقل شامل غلظت آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی، غلظت کازئینات سدیم و زمان نگهداری در ۳ سطح بود نمایش طراحی آزمون‌ها در جدول ۲ آمده است. تعداد نمونه‌های آزمایشی ۲۰ عدد بود که در این میان ۶ آزمون تکرار در نقطه مرکزی بود که از این نقاط برای تعیین خطای آزمایش استفاده شد. داده‌ها توسط نرم افزار SAS 9.2 مدلسازی شد و شکل‌های سه بعدی این طرح (منحنی‌های سطح پاسخ) جهت بررسی رابطه میان پاسخ و متغیرهای مستقل رسم شد آنالیز رگرسیون با مدل درجه دوم (فرمول ۱) انجام گرفت:

$$Y = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 + \beta_{11}X_{21} + \beta_{22}X_{22} + \beta_{33}X_{23} + \beta_{12}X_1X_2 + \beta_{13}X_1X_3 + \beta_{23}X_2X_3 \quad (1)$$

در آن Y پاسخ پیش‌بینی شده، β_0 ضریب ثابت، β_1، β_2 و β_3 اثرات خطی، β_{11}، β_{22} و β_{33} اثر مربعات و β_{12}، β_{13} و β_{23} اثر متقابل می‌باشد.

روش تولید ماست

نمونه‌های ماست مطابق با روش مویدزاده و همکاران (۱۳۹۱) تهیه شدند. ابتدا درصد ماده خشک شیر پس‌چرخ (SNF) با افزودن ۲ درصد شیر خشک بدون چربی تنظیم گردید و پروتئین شیر پس‌چرخ با غلظت‌های متفاوت کازئینات سدیم (طبق جدول۲) غنی‌سازی شد. پس از رساندن دمای شیر به ۵۰°C، آنزیم در غلظت‌های متفاوت (طبق جدول۲) اضافه شد و به منظور فعال‌سازی آنزیم، نمونه‌ها در ۵۰°C به مدت ۱ ساعت در حمام آب گرم گرمخانه‌گذاری گردیدند. پاستوریزاسیون در دمای ۸۵°C به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب گرم انجام گرفت که طی آن آنزیم هم غیرفعال شد. آنگاه، شیر تا ۴۵°C سرد و آغازگر مطابق دستورالعمل شرکت تولیدکننده‌ی باکتری تلقیح شد. بعد ظروف دربندی و در دمای ۴۲°C تا رسیدن به pH معادل ۴/۶ گرمخانه‌گذاری گردیدند. بعد از گرمخانه‌گذاری ، نمونه ها تا ۲۰°C سرد و فرایند همزدن به مدت ۶۰ ثانیه با همزن دستی انجام شده و نمونه ها در لیوان پلاستیکی استریل پر، دربندی و در دمای ۴°C نگهداری شدند (شکل۱).



شکل ۱- فلوچارت تهیه ماست

1- Ajinomoto
2- Response Surface Methodology (RSM)
3- Face Centered Design (FCD)

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- ویژگی های شیمیایی شیر خام، شیر خشک بدون چربی و کازئینات سدیم مصرفی (برحسب درصد)

مواد	چربی	پروتئین	ماده خشک	اسیدیته	pH	خاکستر
شیر خام	۰/۳±۰/۱۵	۳/۲±۰/۰۵	۸/۵۸±۰/۲۷	۰/۱۴۵±۰/۰۶	۶/۸±۰/۰۳	–
شیر خشک	۱/۲۵±۰/۱۷	۲۸±۱/۰۴	۹۶±۱/۲۰	–	–	–
کازئینات سدیم	۲±۰/۴	۷۸/۹۵±۰/۷	۹۷/۳۵±۱/۱	–	۷±۰/۵	۷/۵±۰/۲۹

نتایج آنالیز شیرخام با استفاده از دستگاه میلکوتستر شرکت پگاه ارومیه

جدول۲- طراحی آزمون‌ها براساس مدل طرح مرکب مرکز وجه (CCF)

Run	آنزیم	کازئینات سدیم	زمان نگهداری	آنزیم (واحد در گرم پروتئین شیر)	کازئینات سدیم (درصد)	زمان نگهداری (روز)
۱	-۱	-۱	-۱	۰	۰	۱
۲	-۱	-۱	۱	۰	۰	۱۹
۳	-۱	۱	-۱	۰	۱/۲۷	۱
۴	-۱	۱	۱	۰	۱/۲۷	۱۹
۵	۱	-۱	-۱	۲	۰	۱
۶	۱	-۱	۱	۲	۰	۱۹
۷	۱	۱	-۱	۲	۱/۲۷	۱
۸	۱	۱	۱	۲	۱/۲۷	۱۹
۹	-۱	۰	۰	۰	۰/۶۳۵	۱۰
۱۰	۱	۰	۰	۲	۰/۶۳۵	۱۰
۱۱	۰	-۱	۰	۱	۰	۱۰
۱۲	۰	۱	۰	۱	۱/۲۷	۱۰
۱۳	۰	۰	-۱	۱	۰/۶۳۵	۱
۱۴	۰	۰	۱	۱	۰/۶۳۵	۱۹
۱۵	۰	۰	۰	۱	۰/۶۳۵	۱۰
۱۶	۰	۰	۰	۱	۰/۶۳۵	۱۰
۱۷	۰	۰	۰	۱	۰/۶۳۵	۱۰
۱۸	۰	۰	۰	۱	۰/۶۳۵	۱۰
۱۹	۰	۰	۰	۱	۰/۶۳۵	۱۰
۲۰	۰	۰	۰	۱	۰/۶۳۵	۱۰

بررسی پروتئولیز (با استفاده از روش اورتوفتال‌دی‌آلدهید[1])

پروتئولیز طی ۳ مرحله انجام شد: مرحله اول تهیه عصاره ماست: ابتدا ۱۰ گرم از نمونه‌های ماست با ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر همگن شد و pH آن با استفاده از اسید کلریدریک ۰/۱ مولار روی ۴ تنظیم و مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری ۴۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید. سپس با استفاده از سانتریفیوژ یخچال‌دار (Hettich UNIVERSAL 320R) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور 5000×g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. pH سرم جدا شده با سود ۰/۱ مولار روی ۷ تنظیم شد و مجددا با همان شرایط سانتریفیوژ گردید. سپس سرم جدا و در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد (Amirdivani & Salihin Baba, 2011).

مرحله دوم تهیه معرف OPA: ۲۵ میلی‌لیتر سدیم‌تترابورات ۱۰۰ میلی‌مولار، ۲/۵ میلی‌لیتر سدیم‌دودسیل‌سولفات ۲۰ درصد (w/w)، ۴۰ میلی‌گرم OPA (حل شده در ۱ میلی‌لیتر متانول) و ۱۰۰ میکرولیتر بتامرکاپتواتانول با هم مخلوط و با آب مقطر به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. محلول‌ها با استفاده از اولتراسونیک (UROSONIC 4D با فرکانس ۵۰ kHz) تهیه شدند. معرف OPA باید در روز آزمایش تهیه و تا ۲ ساعت استفاده شود (Church *et al.*, 1983).

مرحله سوم اندازه‌گیری میزان جذب: مقدار ۱۵۰ میکرولیتر عصاره ماست به ۳ میلی‌لیتر معرف OPA در سل کوارتز ۵ میلی‌لیتری افزوده شد و مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. میزان جذب با اسپکتروفوتومتر (Double beam T80+pg) در طول موج ۳۴۰

1- The o-pthaldialdehyde (OPA) assay

Archive of SID

www.SID.ir

نانومتر اندازه‌گیری شد. برای نمونه شاهد، به جای نمونه از آب مقطر استفاده شد. میزان پروتئولیز نمونه‌ها بر اساس میزان جذب پپتیدها و اسیدهای آمینه آزاد اندازه‌گیری شده در ۳۴۰ نانومتر بیان گردید (Church *et al.,* 1983; Nielsen *et al.,* 2001; Gonzalez-Gonzalez *et al.,* 2011).

ویسکوزیته ظاهری

ویسکوزیته ظاهری با استفاده از ویسکومتر بروکفیلد (Brookfield DVII + Pro, U.S.A) با سرعت برشی ۳۰ rpm و اسپیندل ۶۴ اندازه‌گیری شد (Trachoo & Mistry, 1998). نمونه‌های ماست قبل از اندازه‌گیری به مدت ۱ دقیقه همزده شدند (Katsiari *et al.,* 2002). اندازه‌گیری ها با ml ۲۵۰ نمونه در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت.

ظرفیت نگهداری آب

۵ گرم نمونه (Y) در لوله های سانتریفیوژ وزن شد. سپس در سانتریفیوژ (Hettich EBA 20, Germany) با دور rpm ۴۵۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۰ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ گردید (Sahan *et al.,* 2008). سرم جدا شده (W) توزین شد. ظرفیت نگهداری آب (Sodini *et al.,* 2005) به طریق زیر محاسبه شد

$$WHC = (Y-W)/Y*100 \quad (۲)$$

نتایج و بحث

در جدول ۳ تجزیه واریانس پروتئولیز، ویسکوزیته و ظرفیت نگهداری نمونه های ماست آورده شده است.

جدول ۳-تجزیه واریانس پروتئولیز، ویسکوزیته و ظرفیت نگهداری نمونه های ماست

منابع متغیر	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		پروتئولیز (جذب در ۳٤۰ nm)	ویسکوزیته (cp)	ظرفیت نگهداری آب (٪)
(A)غلظت آنزیم	۱	**۰/۰۱۵۲۹	**۸۰۲۴۵۷۶	**۱۰/۸۷۶۲
(B)کازئینات سدیم	۱	ns۰/۰۰۰۶۰۸	**۲۴۲۶۷۴۰۸	**۸۳/۶۴۷۰۵
(C)زمان نگهداری	۱	**۰/۰۲۴۳۰۵	ns۳۶۰۰۰	**۱۰/۶۲۲۳۹
A^2	۱	ns۰/۰۰۲۷۹۲	**۱۴۸۷۸۲۵	ns۰/۵۰۵۰۷۳
AB	۱	ns۰/۰۰۱۴۰۴	**۳۴۵۵۸۲۱	ns۱/۱۲۲۳۷۷
AC	۱	*۰/۰۰۴۷۰۵	*۴۳۲۴۵۰	ns۱/۳۱۰۹۸۵
B^2	۱	ns۰/۰۰۰۰۸۷	*۷۰۲۸۳۴/۶	ns۰/۸۶۱۵۰۴
BC	۱	ns۰/۰۰۰۰۱۸	ns۱۱۲۵۰	ns۰/۳۷۸۴۹۴
C^2	۱	ns۰/۰۰۱۰۸۵	*۵۴۳۲۳۴/۶	**۵/۹۸۴۲۵۹
مدل	۹	**۰/۰۰۶۱۷۶	**۴۴۵۷۷۴۲	**۱۴/۶۱۲۱۱
خطی	۳	**۰/۰۱۳۴	**۱۰۷۷۵۹۹۵	**۳۵/۰۴۸۵۵
درجه دوم	۳	ns۰/۰۰۳۰۸۵	**۱۲۹۷۳۹۲	**۷/۸۵۰۴۹۵
خطا	۱۰	۰/۰۰۰۸۷۴	۷۲۰۱۵/۳۷	۰/۵۵۶۸۷۹
عدم برازش	۵	ns۰/۰۰۱۳۹۹	ns۱۱۶۶۰۴/۱	ns۰/۹۱۰۲۴۱
Pure Error	۵	۰/۰۰۰۳۵	۲۷۴۲۶/۶۷	۰/۲۰۳۵۱۷
R^2	–	٪۸۶/۴۱	٪۹۸/۲۴	٪۹۵/۹۴
R^2_{adj}	–	٪۷۴/۱۸	٪۹۶/۶۵	٪۹۲/۲۸
ضریب پراکندگی	–	۸/۵۹۳۰۳۳	۵/۴۸۰۱۳۶	۲/۷۷۷۶۴۳

*معنی دار در سطح ۰/۰۵ ،** معنی دار در سطح ۰/۰۱ ،ns غیر معنی دار

پروتئولیز

با توجه به جدول ۳، تاثیر خطی غلظت آنزیم و زمان نگهداری و همچنین تاثیر متقابل غلظت آنزیم و زمان نگهداری بر پروتئولیز نمونه‌ها معنی‌دار بود ($p\leq0.05$). در شکل ۲ تاثیر متقابل غلظت آنزیم و زمان نگهداری بر پروتئولیز نمونه‌ها نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود با افزایش غلظت آنزیم پروتئولیز نمونه‌ها در طول نگهداری کاهش یافت ($p\leq0.05$). در واقع آنزیم با برقراری پیوندهای عرضی بین پروتئین‌های شیر تاثیر منفی بر فعالیت پروتئولیتیک نمونه‌ها داشته است. کاهش پروتئولیز در اثر افزایش آنزیم می‌تواند به دو دلیل باشد: ۱) پروتئین‌های شیر درهم‌تنیده توسط آنزیم ترانس گلوتامیناز نسبت به پروتئین‌های اولیه شیر سوبسترای مناسبی برای آنزیم‌های پروتئولیتیک باکتری‌های اسید لاکتیک نیستند. ۲)آنزیم با برقراری پیوندهای عرضی بین پپتیدهای حاصل از پروتئولیز و پروتئین‌های شیر، آنها را از دسترس باکتری‌های اسید لاکتیک خارج

Archive of SID

www.SID.ir

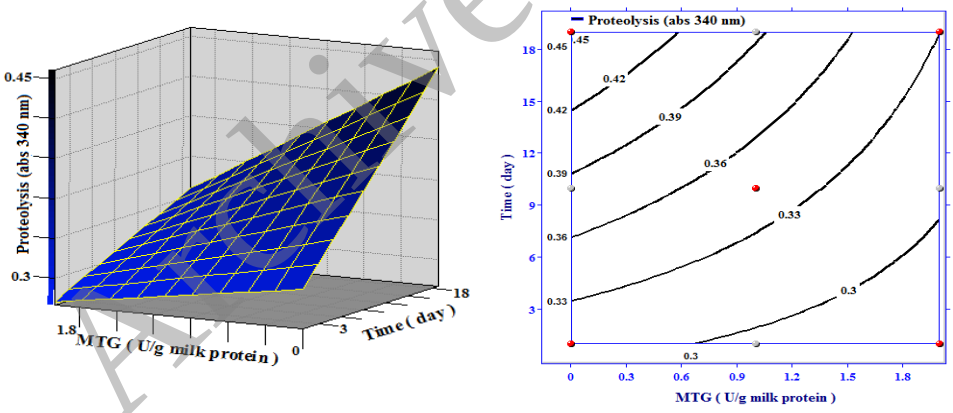
می‌کند (Yuksel & Erdem, 2010). Yuksel و Erdem (۲۰۱۰) تاثیر ترانس گلوتامیناز را بر پروتئولیز نمونه‌های ماست با اندازه‌گیری میزان تیروزین حاصل از پروتئولیز پروتئین‌های شیر با HPLC ارزیابی کردند و گزارش کردند میزان تیروزین نمونه‌های پیش‌تیمار شده با ترانس گلوتامیناز نسبت به نمونه کنترل در طول دوره نگهداری کاهش یافت و نتیجه گرفتند که ترانس گلوتامیناز سبب کاهش پروتئولیز در نمونه‌های ماست شده است. طبق نتایج به دست آمده، پروتئولیز نمونه‌ها با گذشت زمان افزایش یافت (شکل ۲) که نشاندهنده فعالیت پروتئولیتیکی باکتری‌های اسید لاکتیک در طول دوره نگهداری می‌باشد (Yuksel & Erdem, 2010).Yuksel و Erdem (۲۰۱۰)، Donkor و همکاران (۲۰۰۶)، Nielsen و همکاران (۲۰۰۱) و Lecrerc و همکاران (۲۰۰۲) نیز به نتایج مشابهی دست یافتند.

مشخص شده است که ماست به علت اسیدی شدن بیش از حد و پروتئولیز حتی در دمای یخچال اسیدی و ترش می‌شود و پیشرفت این معایب موجب کاهش دوره نگهداری محصول می‌شود. نتایج این بررسی نشان داد که آنزیم با برقراری پیوندهای عرضی بین پروتئین‌ها، آنها را از دسترس باکتری‌های اسید لاکتیک خارج کرده و سبب کاهش پروتئولیز شده است. در نتیجه، با استفاده از آنزیم ترانس‌گلوتامیناز می‌توان دوره نگهداری ماست را افزایش داد. با توجه به جدول آنالیز واریانس پروتئولیز (جدول ۳)، معادله نهایی در عدد F دارای سطح معنی‌دار بسیار بالایی می‌باشد. همچنین، دارای عدم برازش غیر معنی‌دار و ضریب تبیین و ضریب اصلاح شده به ترتیب ۰/۸۶۴۱ و ۰/۷۴۱۸ می‌باشد. نتایج نشان می‌دهد که معادله نهایی بدست آمده، کارآمد بوده و قادر است بطور رضایت بخشی تغییرات ویژگی‌های مورد آزمون را توجیه نماید و در مراحل بعدی پیشگویی و بهینه‌سازی بعنوان یک شاخص اصلی مورد استفاده قرار گیرد. آنالیز داده‌های آزمایش نشان داد که میزان پروتئولیز در نمونه‌ها را می‌توان با معادله ۳ توصیف کرد:

$$Proteolysis=0.3015-0.01216\times MTG+0.0082\times TIME-0.0027\times MTG\times TIME \quad (۳)$$

ویسکوزیته ظاهری

در شکل ۳-الف تاثیر متقابل غلظت آنزیم و زمان نگهداری بر میزان ویسکوزیته نشان داده شده است. همانطور که در شکل مشاهده می‌شود در مقادیر کمتر از ۱ واحد آنزیم، ویسکوزیته با گذشت زمان تغییر معنی‌داری نداشت ($p\geq0.05$) اما با افزایش مقدار آنزیم به بیش از ۱ واحد، ویسکوزیته با گذشت زمان افزایش نشان داد ($p\leq0.05$). توانایی آنزیم در تشکیل پلی‌مرهایی با وزن مولکولی بالا از مونومرهای پروتئین، بدون تغییر ویژگی‌های شیمیایی ماست موجب افزایش میزان ویسکوزیته می‌شود (Gauche *et al.*, 2009).



شکل۲- تاثیر متقابل غلظت آنزیم و زمان نگهداری بر میزان پروتئولیز

Farnsworth و همکاران (۲۰۰۶) گزارش کردند که آنزیم ترانس گلوتامیناز با ایجاد پیوندهای کووالانسی جدید باعث درهم تنیدن پروتئین های شیر می‌شود در حالی‌که عمدتا در ماست، ژل با اتصالات غیرکووالانسی (برهمکنش هیدرواستاتیک، پیوندهای هیدروژنی و هیدروفوبی) پایدار می‌شود. لذا، این شبکه پروتئینی متفاوت موجب افزایش استحکام ژل و ویسکوزیته ماست قالبی و همزده می‌شود. Schorsch و همکاران (۲۰۰۰) نیز اظهار داشتند که ژل‌های حاصل از میسل‌های کازئینی تیمار شده با آنزیم با پیوندهای کووالانسی اتصالات عرضی برقرار می‌کنند که قوی‌تر از ژل‌های حاصل از اسیدیفیکاسیون می‌باشند. با توجه به نتایج تجزیه آماری تاثیر متقابل غلظت آنزیم و درصد کازئینات سدیم نیز بر میزان ویسکوزیته معنی‌دار بود ($p\leq0.05$). همانطوریکه از کانتور پلات ۳ ب مشخص است با افزایش مقدار آنزیم و کازئینات سدیم، ویسکوزیته افزایش یافت. بیشترین مقدار ویسکوزیته زمانی حاصل شد که مقدار آنزیم و درصد

Archive of SID

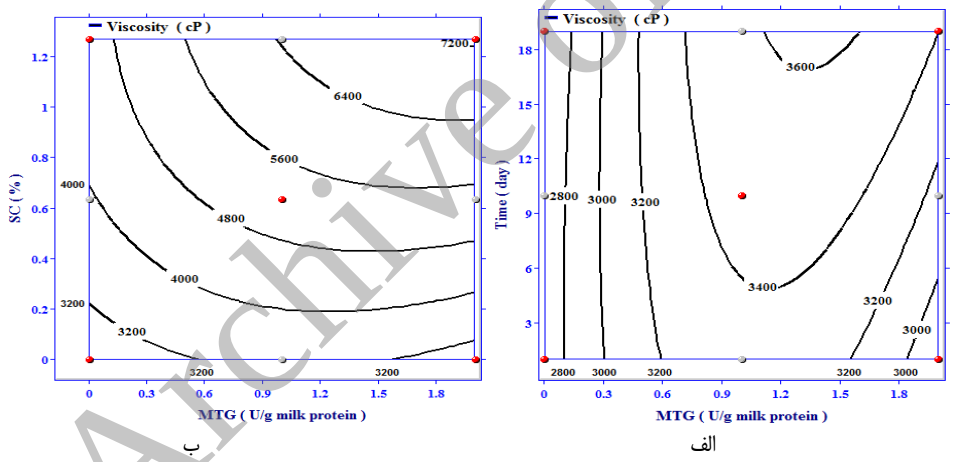
www.SID.ir

کازئینات سدیم بیشترین مقدار بود. طبق نتایج محققان، علاوه بر افت pH در طول تخمیر، غنی‌سازی پروتئین و تیمار حرارتی شیر ماست‌سازی نیز در فعالیت ترانس گلوتامیناز میکروبی نقش مهمی دارند (Bonisch *et al.*, 2007a). معمولا برای غنی‌سازی پروتئین شیر ماست‌سازی به منظور به دست آوردن ماستی با ساختار مطلوب، ویسکوز و ملایم از ترکیباتی مانند پودر شیر خشک بدون چربی، کنسانتره پروتئین های آب پنیر و کازئینات سدیم استفاده می‌شود که در این میان کازئینات سدیم بهترین سوبسترا برای ترانس گلوتامیناز شناخته شده است (Bonisch *et al.*, 2007b). که احتمالا به‌دلیل ساختار باز و دسترس‌پذیری بهتر لیزین در آن می‌باشد (Jaros *et al.*, 2006). طبق نتایج بدست آمده، ویسکوزیته نمونه‌های ماست با افزایش میزان کازئینات سدیم افزایش یافت ($p\leq0.05$). از آنجا که ژل ماست ژلی با پایه پروتئینی و عمدتا کازئینی است. از این رو به عنوان قاعده‌ای کلی افزایش درصد پروتئین موجب افزایش سفتی ژل در ماست قالبی و افزایش ویسکوزیته در ماست همزده می‌شود. به علاوه قابلیت نگهداری آب و مواد محلول نیز افزایش یافته و از این طریق قابلیت آب اندازی کمتر می‌شود. افزایش میزان پروتئین از یکسو بر تعداد رشته‌های پروتئینی شبکه ژل و از سوی دیگر بر نحوه توزیع رشته‌ها اثر می‌گذارد و در مجموع منتج به افزایش ویسکوزیته ژل می‌شود (Aziznia *et al.*, 2008). Sodini و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کردند، وقتی شیر اولیه با کازئینات سدیم یا WPC غنی‌سازی می‌شود، ماست حاصل در مقایسه با محصول غنی شده با SMP از ویسکوزیته بالاتری برخوردار است که علت آن افزایش محتوی پروتئین نسبت به ماده جامد عنوان شده است.

با توجه به جدول آنالیز واریانس ویسکوزیته ظاهری (جدول ۳) معادله نهایی دارای عدد F معنی‌دار، عدم برازش غیر معنی‌دار و ضریب تبیین و ضریب اصلاح شده به ترتیب ۰/۹۸۲۴ و ۰/۹۶۶۵ است. نتایج نشان می‌دهد که معادله نهایی بدست آمده، کارآمد بوده و قادر است بطور رضایت‌بخشی تغییرات ویژگی‌های مورد آزمون را توجیه نماید و در مراحل بعدی پیشگویی و بهینه‌سازی بعنوان یک شاخص اصلی مورد استفاده قرار گیرد.

معادله پیشگویی‌کننده برای مقدار ویسکوزیته ظاهری در نمونه‌های ماست در معادله ۴ آمده است.

$$\text{Viscosity} = 2687.798 + 1183.087 * \text{MTG} + 2462.488 * \text{SC} - 561.5649 * \text{MTG}^2 + 1035.039 * \text{MTG} * \text{SC} + 17.85922 * \text{MTG} * \text{TIME} - 822.2825 * \text{SC}^2 - 0.2407 * \text{TIME}^2 \quad (۴)$$



شکل۳- تاثیر متقابل آنزیم ترانس گلوتامیناز با الف) زمان نگهداری ب) کازئینات سدیم بر میزان ویسکوزیته ظاهری

ظرفیت نگهداری آب

یکی دیگر از فاکتورهای مهم در تعیین کیفیت ماست ظرفیت نگهداری آب می‌باشد. نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان داد که تاثیر خطی تمامی فاکتورهای مورد مطالعه (غلظت آنزیم، میزان کازئینات سدیم و زمان نگهداری) و همچنین تاثیر مربعی زمان نگهداری بر میزان ظرفیت نگهداری آب معنی‌دار بود ($p\leq0.05$). همانطور که در شکل۴-الف نشان داده شده است، افزایش میزان آنزیم موجب افزایش ظرفیت نگهداری آب نمونه‌ها گردید ($p\leq0.05$). کاهش نفوذپذیری ژل در نتیجه برقراری پیوندهای عرضی دائمی بین پروتئین‌های شیر توسط ترانس گلوتامیناز را می‌توان علت این امر دانست. کاهش در نفوذپذیری ژل باعث ایجاد ریز ساختار پایدار با اجزاء بهم پیوسته و یکنواخت در ماست می‌شود که نتیجه آن محصور شدن آب آزاد بیشتر در شبکه ژل ماست می‌باشد و در نهایت منجر به بهبود ظرفیت نگهداری آب در شبکه ژل ماست می‌شود (Lorenzen *et al.*, 2002). همانطور که Lucey (۲۰۰۴) نیز بیان کرد، نفوذپذیری اطلاعاتی درباره غیریکنواختی شبکه ژل می‌دهد و نفوذپذیری بالا با ظهور سینرزیس و جداشدن سرم در ارتباط است. Ozerو همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که ترانس گلوتامیناز باعث

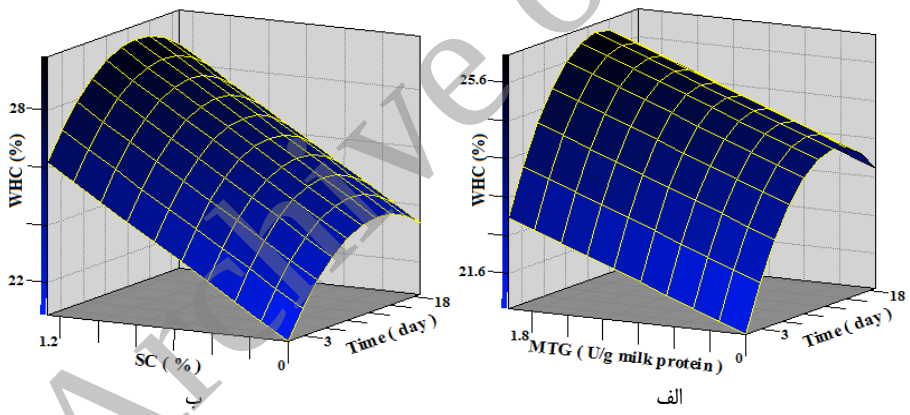
Archive of SID

www.SID.ir

کاهش میزان سرم جدا شده و درنتیجه افزایش ظرفیت نگهداری آب ماست می‌شود. همچنین Yuksel و همکاران (۲۰۱۰) افزایش ظرفیت نگهداری آب را در نمونه‌های ماست پیش‌تیمار شده با ترانس گلوتامیناز نسبت به نمونه‌های شاهد گزارش کردند. Kurishi و همکاران (۲۰۰۱) بیان کردند که تشکیل ژل ماست با باندهای گاماکربوکسی‌آمید گلوتامین و اپسیلون‌آمین لیزین سبب بهبود ظرفیت نگهداری آب می‌شود و ماست قالبی تولید شده با ترانس گلوتامیناز از ظرفیت نگهداری آب بالایی برخوردار بوده و مانع از جداسازی سرم می‌شود. طبق نتایج به‌دست آمده، میزان ظرفیت نگهداری آب نمونه‌ها در روزهای اولیه دوره نگهداری افزایش و سپس با گذشت زمان از میزان آن کاسته شد ($p\leq0.05$). کاهش میزان ظرفیت نگهداری آب در روزهای انتهایی دوره نگهداری را می‌توان به فعالیت آنزیم‌های تولیدشده توسط آغازگرها بر روی میسل‌های کازئین به مرور زمان نسبت داد (Sahan *et al.*, 2008). طبق نتایج حاصل از این تحقیق، افزایش کازئینات سدیم موجب افزایش ظرفیت نگهداری آب شده است (شکل ۴-ب).

در میزان بالاتر پروتئین، شبکه پروتئینی متراکم شده و با آب بیشتری در حجم معین باند می‌شود (Imm *et al.*, 2000). همچنین Amatayakul و همکاران (۲۰۰۶) عنوان کردند که افزایش میزان پروتئین بر همکنش بین ذرات را افزایش داده و در نتیجه توانایی ماست به نگه داشتن آب افزایش می‌یابد. ژل‌های اسیدی با افزایش نسبت پروتئین به ماده خشک، ظرفیت نگهداری آب بالاتری را از خود نشان می‌دهند (Aguilera & Kessler, 1989). Yuksel و Erdem (۲۰۱۰) گزارش کردند که افزایش میزان پروتئین، میزان آب محصور شده در شبکه ژلی را افزایش می‌دهد. Sodini و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند که با افزایش درصد پروتئین در ماده خشک، برهمکنش باندهای پروتئینی بیشتر شده و قابلیت نگهداری آب محصول افزایش می‌یابد. با توجه به جدول آنالیز واریانس ظرفیت نگهداری آب، معادله نهایی دارای عدم برازش غیر معنی‌دار و ضریب تبیین و ضریب اصلاح شده به ترتیب ۰/۹۵۹۴ و ۰/۹۲۲۸ است (جدول۳). لذا معادله نهایی بدست آمده، کارآمد بوده و قادر است بطور رضایت بخشی تغییرات ویژگی‌های مورد آزمون را توجیه نماید و در مراحل بعدی پیشگویی و بهینه‌سازی بعنوان یک شاخص اصلی مورد استفاده قرار گیرد. معادله ی پیشگویی‌کننده برای مقدار ظرفیت نگهداری آب در نمونه‌های ماست با استفاده از برازش داده‌ها در معادله ۵ آورده شده است.

$$WHC = 20.2666 + 1.0429 * MTG + 4.5546 * SC + 0.6252 * TIME - 0.0255 * TIME^2 \quad (۵)$$



شکل٤- تاثیر غلظت آنزیم بر تغییرات ظرفیت نگهداری آب در طول نگهداری ماست (الف) تاثیر کازئینات سدیم بر تغییرات ظرفیت نگهداری آب در طول نگهداری ماست (ب)

بهینه‌سازی

با توجه به تحلیل نمودارها و این نکته که شرایط بهینه یک پاسخ، ممکن است برای پاسخ دیگر نامساعد باشد، بنابراین بایستی الگوی ساختی را معرفی کرد که تا حد امکان تمامی پاسخ‌ها را به نحو رضایت بخشی بهینه نماید. برای این منظور کانتور پلات‌های مختلف بر روی هم قرار گرفته و منطقه‌ای که مشخصات تمامی پاسخ ها را برآورد کند، به عنوان منطقه بهینه معرفی می‌گردد. مبنای بهینه سازی در این بررسی به حداکثر رساندن میزان ویسکوزیته، ظرفیت نگهداری آب و زمان نگهداری و به حداقل رساندن غلظت آنزیم، مقدار کازئینات سدیم و پروتئولیز بود. در شرایط بهینه، غلظت آنزیم ۱/۴۲ واحد در گرم پروتئین شیر، میزان کازئینات سدیم ۰/۴۷ درصد و زمان نگهداری ۱۵ روز تعیین گردید. در این شرایط ظرفیت نگهداری آب ۲۷/۵۱ درصد، میزان ویسکوزیته ۵۲۲۰ سانتی پوآز، پروتئولیز در جذب ۰/۳۴۹ نانومتر بود. برای بهینه سازی چند منظوره، مطلوبیت کلی به شرح زیر محاسبه گردید:

ابتدا مقدار مطلوبیت جزء (di) برای به حداکثر و حداقل رساندن

Archive of SID

www.SID.ir

شاخص ها به ترتیب از فرمول‌های زیر محاسبه شد.

$$d_i = \frac{Y - Y_{min}}{Y_{Max} - Y_{min}} \quad (۶)$$

$$d_i = \frac{Y_{Max} - Y}{Y_{Max} - Y_{min}} \quad (۷)$$

که در این فرمول‌ها Y عدد حاصل از معادله‌ی پیشگویی‌کننده شاخص‌ها، Y_{min} کوچکترین و Y_{Max} بزرگترین داده‌ها است.

سپس میانگین هندسی مطلوبیت اجزاء ($D_{General}$) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$D = (d_{i1} * d_{i2} * \dots * d_{in})^{\frac{1}{n}} \quad (۸)$$

در نهایت با استفاده از Solver اکسل، مقدار مطلوبیت کلی به دست آمد که مقدار آن ۰/۸۳ بود.

نتیجه گیری

بر اساس نتایج حاصل از این بررسی آنزیم ترانس‌گلوتامیناز با تشکیل پلی‌مرهایی با وزن مولکولی بالا از مونومرهای پروتئین موجب افزایش میزان ویسکوزیته نمونه‌ها شد. همچنین با کاهش نفوذپذیری ژل در نتیجه برقراری پیوندهای عرضی دائمی بین پروتئین‌های شیر منجر به افزایش ظرفیت نگهداری آب در شبکه ژل ماست گردید. میزان پروتئولیز به خوبی توسط روش اورتوفتال‌دی‌آلدهید اندازه‌گیری شد. آنزیم با برقراری پیوندهای عرضی بین پروتئین‌ها، آنها را از دسترس باکتری‌های اسید لاکتیک خارج کرده و سبب کاهش پروتئولیز شده است. بنابراین می‌توان از آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی با موفقیت در تهیه ماست همزده بدون چرب استفاده کرد.

منابع

Aguilera, J.M., Kessler, H.G., 1989. Properties of mixed and filled type dairy gels. Journal of food science. 5, 1213-1217.

Amatayakul, T., Sherkat, F., Shah, N. P., 2006. Physical characteristics of set yoghurt made with altered casein to whey protein ratios and EPS-producing starter cultures at 9 and 14% total solids. Food Hydrocolloids. 20, 314-324.

Amirdivani, S.H., Salihin Baba, A., 2011. Changes in yogurt fermentation characteristics, and antioxidant potential and in vitro inhibition of angiotensin-1 converting enzyme upon the inclusion of peppermint, dill and basil. LWT - Food Science and Technology. 44, 1458-1464.

Aziznia, S., Khosrowshahi, A., Madadlou, A., Rahimi, J., 2008. Whey protein concentrates and gum tragacanth as fat replacers in non-fat yogurt: chemical, physical, and microstructural properties. Journal of Dairy Science. 91, 2545–2552.

Bonisch, M.P., Huss, M., Lauber, S., Kulozik U., 2007a. Yoghurt gel formation by means of enzymatic protein cross-linking during microbial fermentation. Food Hydrocolloids. 21, 585–595.

Bonisch, M.P., Huss, M., Weitl, K., Kulozik, U., 2007b. Transglutaminase cross-linking of milk proteins and impact on yoghurt gel properties. International Dairy Journal. 17, 1360–1371.

Church, F.C., Swaisgood, H.E., Porter, D.H., Catignani, G.L., 1983. Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. Journal of Dairy Science. 66, 1219-1227.

Donkor, O.N., Nilmini, S.L.I., Stolic, P., Vasiljevic, T., Shah, N.P., 2006. Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage. International Dairy Journal. 17, 657–665.

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

Gauche, C., Tomazi, T., Barreto, P.L.M., 2009. Physical properties of yoghurt manufactured with milk whey and transglutaminase. LWT. 42, 239–243.

Gonzalez-Gonzalez, C.R., Tuohy, K.M., Jauregi, P., 2011. Production of angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity in milk fermented with probiotic strains: Effects of calcium, pH and peptides on the ACE-inhibitory activity. International Dairy Journal. 21, 615-622.

Guyot, C., Kulozik, U., 2010. Effect of transglutaminase-treated milk powders on the properties of skim milk yoghurt. International Dairy Journal. 1-8.

IMM, J.Y., LIAN, P., LEE, C.M., 2000. Gelation and Water Binding Properties of Transglutaminase-treated Skim Milk Powder. Food Chemistry and Toxicology. 65, 200-205.

Jaros, D., Partschefeld, C., Henle, T., Rohm, H., 2006. Transglutaminase in dairy products: chemistry, physics, applications. Journal of Texture Studies. 37, 113–155.

Katsiari, M. C., Voutsinas, L. P., Kondyli, E., 2002. Manufacture of yogurt from stored frozen sheep's milk. Food Chemistry. 77, 413–420.

Kuraishi, C., Yamazaki, K., Susa, Y., 2001. Transglutaminase: its utilization in the food industry. Food Reviews International. 17, 221–246.

Lauber, S., Noack, I., Klostermeyer, H., Henle, T., 2001. Stability of microbial transglutaminase to high pressure

Archive of SID

www.SID.ir

treatment. Eur. Food Res. Technol. 213, 273–276.
Leclerc, P.L., Gauthier, S.F., Bachelard, H., Santure, M., Roy, D., 2002. Antihypertensive activity of casein-enriched milk fermented by *Lactobacillus helveticus*. International Dairy Journal. 12, 995–1004.
Lorenzen, P.C., Neve, H., Mautner, A., Schlimme, E., 2002. Effect of enzymatic cross-linking of milk proteins on functional properties of set-style yoghurt. International Journal of Dairy Technology. 55, 152–157.
Lucey, J.A., 2004. Cultured dairy products: An overview of their gelation and texture properties. International Journal of Dairy Technology. 57, 77–84.
Moayedzadeh, S., Khosrowshahi asl, A., Zomorodi, Sh., 2012. Effect of transglutaminase treatment on *Lactobacillus casei* viability, physicochemical and sensory properties of nonfat stirred yoghurt. Journal of Food Research. 21 (2), 201-214.
Motoki, M., Kumazawa, Y., 2000. Recent research trends in transglutaminase technology for food processing. Food Science Technology Research. 6, 151–160.
Motoki, M., Seguro, K., 1998. Transeglutaminase and it's use for food processing. Trends In Food Science and Technology. 9, 204-210.
Nielsen, P.M., Petersen, D., Dambmann, C., 2001. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. Food Chemistry and Toxicology. 5, 642-646.
Ozer, B., Kirmaci, H.A., Oztekin, S., 2007. Incorporation of microbial transglutaminase into non-fat. International Dairy Journal. 17, 199–207.
Pavunc, A.l., Beganović, J., Kos, B., Buneta, A., Beluhan, S., Suskovic, J., 2011. Influence of microencapsulation and transglutaminase on viability of probiotic strain *Lactobacillus helveticus M92* and consistency of set yoghurt. International Journal of Dairy Technology. 64, 254-261.
Sahan, N., Yasar, K., Hayaloglu, A.A., 2008. Physical, chemical and flavor quality of non-fat yogurt as affected by a b-glucan hydrocolloidal composite during storage. Food Hydrocolloids. 22, 1291–1297.
Sanli, T., Sezgin, E., Deveci, O., Senel, E., Benli, M., 2011. Effect of using transglutaminase on physical, chemical and sensory properties of set-type yoghurt. Food Hydrocolloids. 25, 1477-1481.
Schorsch, C., Carrie, H., Norton, I.T., 2000. Cross-linked casein micelles by a microbial transglutaminase: influence of cross-links in acid-induced gelation. International Dairy Journal. 10, 529–539.
Sodini, I., Montella, J., Tong, P.S., 2005. Physical properties of yogurt fortified with various commercial whey protein concentrates. Journal of the Science of Food and Agriculture. 85, 853–859.
Trachoo, N., 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.
Unal, B., Metin, S., Isıklı, N.D., 2003. Use of response surface methodology to describe the combined effect of storage time, locust bean gum and dry matter of milk on the physical properties of low-fat set yogurt. International Dairy Journal. 13, 909–916.
Yuksel, Z., Erdem, Y., 2010. The influence of transglutaminase treatment on functional properties of set yoghurt. International Journal of Dairy Technology. 63, 86-97.

Archive of SID

www.SID.ir

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 11, No. 4, Oct- Nov 2015, p. 325-336

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۱، شماره ۴، مهر - آبان ۱۳۹۴، ص. ۳۳۶-۳۲۵

Effect of transglutaminase on proteolysis and rheological properties of nonfat yoghurt

S. Moayedzadeh[1], A. Khosrowshahi asl[*2], S. Zomorodi[3]

Received: 2013.01.06
Accepted: 2013.07.05

Introduction: Microbil transglutaminase (MTG, E.C. 2.3.2.13) is a transferase enzyme that catalyses the acyl transfer reaction between γ-carboxyamide groups of peptide-bound glutamine residues and the primary amino groups including ε-amino groups of lysine residues. This will lead to the formation of new intra- and intermolecular crosslinks between proteins in order to formation of polymers with high molecular weight. Such crosslinks can modify the structure and functionality of proteins. Actually, crosslinking of milk proteins caused by enzyme leads to improvement in functional characteristics of proteins and formation of products with desirable sensory and rheological properties. Nowadays enzymatic cross-linking is widely used to improve the functional properties of proteins. Because undesirable side reactions that could lead to produce of toxic co-products by chemical modification may be minimized by enzyme catalysis. In last twenty years, consumer trends towards low or non-fat dairy products especially nonfat yoghurt have increased because of harmful effects of excess fat on human health. However, many consumers prefer low-fat products with a similar sensory quality to full-fat ones. The traditional methods used to improve yoghurt texture and decrease syneresis include the enrichment of dry matter (total solids) and/or protein content, as well as the addition of natural or synthetic gums. The polymerization of milk protein chains by transglutaminase for three-dimensional net stabilization in yoghurt provides new technology to prevent common problems in dairy product processing. In this study, the effect of microbial transglutaminase concentration, incorporation amount of sodium caseinate into milk and storage time on proteolysis, rheological properties and water holding capacity of nonfat stirred yoghurt was investigated using response surface method (RSM).

Materials and methods: Twenty treatments were carried out according to a face-central composite design with three factors and three levels for each variable. The independent variables of the design were Enzyme concentration, amount of sodium caseinate and storage time. They were in the range of 0-2 Unit per gram of milk protein, 0-1.27 percent and 1-19 days, respectively. For preparation of samples, first of all the SNF and protein content of milk were fortified by addition of skim milk powder and sodium caseinate. The milk was tempered to 50°C in a water bath and subsequently transglutaminase was added at different concentration. It was incubated for 1 hour at 50°C in the water bath. Then it was pasteurized at 85°C for 15 min to inactive the enzymatic reaction and cooled to 45°C. After inoculation with the appropriate inoculum type according to the commercial recommendation, incubated at 42°C until the pH value of 4.6 was obtained. The yogurt samples were cooled in ice-water bath and stirred for 60 second using manual stirrer. Samples were distributed into sterilized plastic containers; they were sealed and stored at 4°C until examined. Characteristics of all yoghurt samples were evaluated, such as: proteolysis by using o-pthaldialdehyde (OPA) assay, apparent viscosity by Brookfield viscometer and water holding capacity. Proteolysis was carried on 3 steps including preparation of yoghurt water extracts, preparation of OPA reagent and absorbance measurements. Briefly, 150 µl of yogurt serum was added directly to 3 ml of OPA reagent in a 5 mL quartz cuvette and the solutions were mixed briefly by inversion prior to 2 min incubation at room temperature followed by absorbance measurement at 340 nm.

Results and discussion: The statistical analysis of results showed that increase in enzyme concentration increased viscosity and water holding capacity of samples and decreased the proteolysis ($p \leq 0.05$). The presence of transglutaminase contributed to an increase in the viscosity due to its ability to form high molecular weight polymers from protein monomers. Crosslinking of protein chains stabilized the three-dimensional network of yoghurt gel and prevented yoghurt whey expulsion as a result of a decrease in gel permeability; thus, increasing water holding capacity. The lesser proteolytic activity with using transglutaminase may be explained by a combination of these two factors: 1) transglutaminase-induced cross-linked milk proteins were less suitable

1 And2. Former MSc Student and Professor Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Engineering, Agricultural Research Center, West Azarbijan, Urmia, Iran.
(*- Corresponding Author Email: a.khosrowshahi@gmail.com)

Archive of SID

www.SID.ir

substrates for proteolytic enzymes in starter culture than native milk proteins and, 2) Proteolytic products such as peptides were crosslinked into the milk proteins by transglutaminase. It is known that the yoghurt may become too acidic and bitter due to excessive acidification and proteolysis even at refrigerator temperatures. The development of these defects generally determines the shelf life. Our results indicate that it may be possible to produce yoghurts with longer shelf life when using transglutaminase. Addition of sodium caseinate resulted in the increased viscosity and water holding capacity of samples. Also, during the storage period, water holding capacity was decreased and proteolysis of samples was significantly increased ($p \leq 0.05$).

Conclusion: The optimum conditions for the production of yoghurt was obtained using 1.42 Unit enzyme per gram of milk protein, 0.47 percent sodium caseinate with a storage period of 15 days. The overall desirability value was equal to 0.83. Under these conditions the predicted percentage of water holding capacity, viscosity and proteolysis being 27.51, 5220 cp and the absorbance at 340nm was 0.349 nm (as proteolysis index), respectively.

Keywords: Transglutaminase, Proteolysis, Cross linking, Non-fat yoghurt.

Archive of SID

www.SID.ir