اثر آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی و اینولین بلند زنجیر بر ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی و حسی دوغ

مهری کریم[1*]، بهناز نادری [2]، معصومه میرزایی [3]

۱- دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی ، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- کارشناس ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد واحد آیت الله آملی، آمل، ایران

(تاریخ دریافت: ۹٤ /۱۰/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹٦/۱۲/۰٤)

چکیده

آنزیم ترانس گلوتامیناز با ایجاد اتصال عرضی در پروتئین‌ها و تقویت ساختار مبتنی بر پروتئین، تأثیر مثبتی بر ظرفیت نگهداری سرم و استحکام ژل در مواد غذایی دارد. اینولین به پلیمرهای فروکتوز با درجه پلیمریزاسیون ۲ تا ٦۰ اطلاق می‌شود که توسط پیوندهای فروکتوزیل (۱-۲) β به هم متصل شده‌اند. ویژگی‌های پری‌بیوتیکی و بیفیدوژنی این ماده سبب شده تا از آن به عنوان یک ماده فراسودمند در محصولات غذایی استفاده شود. این پژوهش با هدف بررسی اثر افزودن آنزیم ترانس گلوتامیناز و اینولین بلند زنجیر بر ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی و حسی دوغ انجام شد. در این پژوهش، اثر آنزیم ترانس گلوتامیناز در غلظت (۰/۳-۰ ٪) و اینولین بلند زنجیر در غلظت (۱/۵-۰٪) در قالب ۵ تیمار دوغ بر ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی (pH، اسیدیته، ماده خشک بدون چربی، دانسیته، میزان جدایی فاز سرم و ویسکوزیته) و ویژگی‌های حسی (قوام ، طعم، رنگ و پذیرش کلی) در ۲٤ ساعت و ۳۰ روز پس از تولید مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که با افزایش اینولین و آنزیم، هیچ تفاوت معنی‌داری در اسیدیته، pH و طعم میان نمونه کنترل و سایر تیمارها پس از ۲٤ ساعت و ۳۰ روز مشاهده نگردید (P>۰/۰۵). اما از لحاظ شاخص‌های دانسیته، ماده خشک بدون چربی، میزان جدایی فاز سرم، ویسکوزیته و پذیرش کلی نمونه‌های R۳ (۱/۵٪ اینولین و ۰/۳٪ آنزیم) و R٤ (۱/۵٪ اینولین و ۰/۱٪ آنزیم) نسبت به نمونه کنترل، برتری معنی‌داری نشان دادند (P<۰/۰۵).

کلید واژگان: آنزیم ترانس گلوتامیناز، اینولین بلند زنجیر، دوغ

*مسئول مکاتبات: mehri.karim@ag.iut.ac.ir

۱- مقدمه

دوغ یکی از نوشیدنی‌های سنتی ایرانیان و برخی ملل دیگر در اروپای شرقی، خاورمیانه و آسیا به شمار می‌آید. در این فرآورده، به دلیل pH پایین، پروتئین‌ها به نقطه ایزوالکتریک خود نزدیک می‌شوند و در نتیجه، شروع به تجمع و رسوب می‌کنند که این امر سبب ناپایداری بعد از تولید و درحین نگهداری می‌شود. افزودن هیدروکلوئیدها یا صمغ‌ها یکی از راه‌های افزایش پایداری، جلوگیری از دوفازه شدن و جلوگیری از رسوب پروتئین‌ها در فرآورده‌های تخمیری است. هیدروکلوئیدها یا صمغ‌ها با افزایش گرانروی ظاهری فرآورده یا در اثر برهم‌کنش‌های کلوئیدی از نوع ممانعت فضایی و دفع الکترواستاتیک، سبب پایداری سامانه‌های تخمیری می‌شوند [۱]. تاکنون از هیدروکلوئیدهای مختلفی چون کتیرا و ثعلب، صمغ لوبیای خرنوب، پکتین، گوار و صمغ ژلان در بهبود ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی، رئولوژیکی و پایداری فیزیکی دوغ توسط محققان مختلف استفاده شده است [۲]. آنزیم ترانس گلوتامیناز که به نام EC 2.3.3.13 شناخته می‌شود جزء آنزیم‌های ترانسفراز بوده که به طور گسترده‌ای در طبیعت وجود دارد. آنزیم ترانس گلوتامیناز (TGase) پروتئینی است با وزن مولکولی ۳۷۳۶۸ دالتون که حاوی ۳۳۱ اسیدآمینه است. این آنزیم می‌تواند بین اسیدآمینه گلوتامین از یک پروتئین و لایزین از پروتئین دیگر ایجاد اتصال کند. جالب توجه است که این آنزیم هیچ‌گونه اثر نامطلوبی بر دسترسی زیستی لایزین نداشته و ارزش تغذیه‌ای پروتئین حاصل را نیز تغییر نمی‌دهد [۳]. تا قبل از سال ۱۹۸۹ آنزیم TGase از کبد خوک استخراج می‌شد ولی پژوهش‌ها منجر به شناسایی یک منبع میکروبی برای تولید آنزیم مذکور گردید. این آنزیم از یک گونه باکتریایی به نام *استرپتوورتیسلیوم* (Streptoverticillium) استخراج و خالص‌سازی شد. TGase حاصل از این باکتری دارای pH ایزوالکتریک معادل ۸/۹ است. pH اپتیمم فعالیت این آنزیم بین ۵ و ۹ و بهترین دما برای عملکرد آن بین ۳۷ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد است. به طور کلی آنزیم TGase در دامنه دمایی وسیعی پایدار است. این آنزیم فعالیت خود را در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه حفظ می‌کند. TGase حاصل از میکروارگانیسم برخلاف TGase حاصل از کبد خوک که آنزیمی وابسته کلسیم است، غیروابسته به یون کلسیم می‌باشد [٤]. در واکنش ترانس گلوتامیناز علاوه بر افت pH در طول تخمیر، غنی‌سازی پروتئین و تیمار حرارتی شیر ماست-سازی نیز موثر است. در میان دو جزء پروتئینی اصلی شیر، کازئین‌ها سوبسترای خوبی برای ترانس گلوتامیناز هستند [۵]. اتصال عرضی پروتئین‌ها با آنزیم می‌تواند برخی ویژگی‌های عملکردی آن‌ها نظیر حلالیت، جذب آب، ویژگی‌های رئولوژیکی و امولسیون‌کنندگی را تحت تاثیر قرار دهد [٦]. پژوهش‌های متعدد انجام شده مبنی بر تاثیر آنزیم ترانس گلوتامیناز بر ویژگی‌های ماست و به ویژه ماست‌های کم‌چرب و بدون چربی نشان داده است که اتصال عرضی بین پروتئین-های شیر توسط آنزیم ترانس گلوتامیناز با وارد نمودن اتصالات کووالانسی جدید در ساختار ژل باعث افزایش استحکام ژل [۷] و کاهش سینرسیس می‌شود [٦]. بنکویچ و همکاران (۲۰۰۸) تاثیر اینولین و ترانس گلوتامیناز را بر ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی و حسی ماست قالبی بررسی کردند و گزارش کردند که نمونه‌های حاوی اینولین و ترانس گلوتامیناز نسبت به نمونه کنترل از سینرسیس کمتر و استحکام ژل بالاتری برخوردار بودند [۸]. جاروس و همکاران (۲۰۰٦) بیان کردند که پلیمریزاسیون پروتئین‌های شیر توسط ترانس گلوتامیناز موجب افزایش ظرفیت نگهداری آب و استحکام ژل ماست می‌شود [۹]. پیرو و همکاران (۲۰۱۰) مشاهده کردند که ترانس گلوتامیناز قادر است راندمان پنیرسازی را از راه حفظ رطوبت در دلمه افزایش دهد [۱۰]. کاربرد اینولین بلند زنجیر به عنوان یک ترکیب پری‌بیوتیک، ژل‌کننده و قوام‌دهنده در فرآورده‌های غذایی گسترش یافته است. این ترکیب علاوه بر نقش پری-بیوتیک می‌تواند نقش جایگزینی چربی را در غذاهای کم‌چرب داشته باشد [۱۱]. توانایی اینولین زنجیر بلند در ایفای این نقش‌ها به تشکیل میکروکریستال آن مرتبط است که طی واکنش با هم توده‌هایی کوچک را به وجود می‌آورند. این توده-ها مقدار زیادی آب را درون خود جمع کرده و سبب ایجاد احساس دهانی چرب، بافت نرم و ایجاد ویسکوزیته و پایداری بیشتر می‌شوند [۱۲]. اینولین ماندگاری کف‌ها وامولسیون‌ها را بهبود می‌بخشد و به همین علت می‌تواند جایگزین استابیلایزرها در مواد غذایی مختلف باشد [۱۳]. گنزالز و همکاران (۲۰۰۹) اثر اینولین کوتاه، متوسط و بلند زنجیر را در غلظت ۷/۵ درصد وزنی/وزنی در دسرهای لبنی بر پایه نشاسته با شیر کامل و شیر بدون چربی بررسی کردند. نتایج نشان داد که شیر بدون چربی با اینولین بلند زنجیر و شیر کامل بدون

اینولین سیالیت یکسانی داشتند. در هر دو، احساس دهانی خامه‌ای و قوام یکسانی وجود داشت اما نمونه‌های حاوی اینولین بلند زنجیر کیفیت حسی بهتری داشتند. دسرهای حاوی اینولین بلند زنجیر رنگ بهتری را نیز نسبت به نمونه‌های بدون اینولین نشان دادند. طعم نمونه‌های حاوی اینولین کوتاه زنجیر بهتر از بقیه دسرها بود در حالی که در نمونه‌های حاوی اینولین بلند زنجیر کمی اثر منفی در طعم دسرها مشاهده شد [۱٤]. افزودن اینولین در ماست سبب کاهش آب‌اندازی و افزایش ویسکوزیته نمونه‌های ماست شد [۱۵]. در این پژوهش تاثیر آنزیم ترانس گلوتامیناز و اینولین بلند زنجیر به عنوان ترکیب قوام‌دهنده بر ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی و رئولوژیکی دوغ و با هدف بهبود ویژگی‌های تغذیه‌ای آن بررسی شده است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

مواد در این پژوهش شیر حاوی ۳٪ چربی پاستوریزه (شرکت فرآورده‌های لبنی آلاشت)، نمک (تابان)، اسانس نعناع (گل-قطره)، اینولین بلند زنجیر با نام تجاری Frutafit TEX (سنسوس، هلند)، آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی (ACTIVA YG) از استرپتوورتیسیلیوم با میانگین فعالیت ۸۰ واحد در گرم (آجینوموتو، فرانسه) که ترکیب آنزیم شامل ترانس گلوتامیناز ۱ درصد، لاکتوز، عصاره مخمر، مالتو-دکسترین و روغن گیاهی می‌باشد. استارتر Harmony (هانسن، دانمارک)، هیدروکسید سدیم، اسید سولفوریک غلیظ، فنل فتالئین، الکل آمیلیک، نیترات نقره، دی کرومات پتاسیم (مرک، آلمان)، آب مقطر (مروارید پارس، ایران)، آب پاستوریزه استفاده شد.

۲-۲- روش‌ها

۲-۲-۱- تهیه نمونه‌های دوغ

جهت تهیه ماست دوغ ابتدا دمای شیر پاستوریزه با چربی ۳ را به ۵۰ درجه سانتی‌گراد رسانده و آنزیم ترانس گلوتامیناز (طبق جدول ۱) در گرم پروتئین شیر اضافه شد و به مدت یک ساعت در ۵۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید. سپس شیر در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه پاستوریزه شد. در طی عمل پاستوریزاسیون، آنزیم نیز غیرفعال گردید. آنگاه شیر تا دمای ٤٥ درجه سانتیگراد سرد، استارتر ماست (مطابق دستورالعمل تولیدکننده) اضافه شد و در دمای ٤٢ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به اسیدیته ۷۰ درجه دورنیک گرمخانه‌گذاری گردید. برای تهیه تیمارهای دوغ، با توجه به این‌که میزان بچ تولیدی برای هر تیمار ۲۰۰۰ گرم در نظر گرفته شد، مقدار ۱۱۰۰ گرم ماست ۳٪ چربی (حاوی آنزیم ترانس گلوتامیناز) در بشر ۳ لیتری توزین شد. ماست همزده و یکنواخت شد و تدریجا آب محاسبه شده برای هر تیمار به آن افزوده شد. سپس در حالی که عملیات اختلاط با همزن هموژن کننده مدل DI18 Basic (Ika آلمان) بطور مداوم انجام می‌شد، توسط هیتر مدل F ۹۰ (Falc ایتالیا) دمای مخلوط به ۸۰ درجه سانتی‌گراد رسید. بعد ازآن اینولین تیمارهای مختلف و نمک (۱ درصد) که با ترازو توزین شده بودند به نمونه‌های دوغ داخل بن‌ماری مدل Wi4m-2 (Shellab آمریکا) افزوده شد. تیمارها ۱۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه توسط همزن-هموژنایزر با دور ۲٤۰۰ دور در دقیقه کاملا همزده و یکنواخت شدند. در نهایت پس از سرد کردن نمونه‌ها اسانس نعنا (به میزان ۰/۰۰۲ درصد) افزوده و در بطری‌هایی از جنس پلی‌اتیلن ترفتالات بسته‌بندی شدند و به یخچال ٦-٤ درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند. پس از ٢٤ ساعت و ۳۰ روز آزمایش‌های مربوطه هر یک در دو تکرار بر روی ۱۰ نمونه حاوی آنزیم ترانس گلوتامیناز و اینولین و نیز نمونه کنترل انجام شد.

Table 1 Introducing doogh samples

Samples	long-chain inulin (0-1.5 %)	Transglutaminase (0-0.3 %)
R1	0.5	0.1
R2	1	0.2
R3	1.5	0.3
R4	1.5	0.1
R5	0.5	0.3
Control	0	0

۲-۲-۳- pH و اسیدیته دوغ

pH نمونه‌های دوغ براساس استاندارد ملی ایران به شماره ۲۸۵۲ و با استفاده از دستگاه pH متر(WTW ۷۳۰ ساخت شرکت Inolab آلمان)، در ۲۵ درجه سانتیگراد اندازه‌گیری شد. عمل سنجش pH نمونه‌ها، ۲٤ ساعت و سی روز پس از تولید در دو تکرار اندازه‌گیری گردید. در خصوص اسیدیته نیز براساس استاندارد ملی ایران به شماره ۲۸۵۲، ابتدا به ۹ گرم از نمونه دوغ مقداری آب مقطر افزوده شد. سپس با سود یک دهم نرمال در حضور معرف فنل‌فتالئین، ۲٤ ساعت و ۳۰ روز پس از تولید در دو تکرار تیتر انجام شد.

$(N\times0.009\times100)/M$ =درصد اسیدیته

N = مقدار میلی‌لیتر سود ۰/۱ نرمال مصرف شده

M = وزن نمونه

۲-۲-٤-ماده خشک بدون چربی

ماده خشک بدون چربی نمونه‌های دوغ مطابق استاندارد ملی ایران به شماره ٦۳۷ انجام شد. در نهایت از فرمول‌های زیر ماده خشک بدون چربی دوغ محاسبه شد. این آزمون ۲٤ ساعت پس از تولید و در دو تکرار انجام شد.

۱۰۰ × (وزن قبل از خشک کردن) / (وزن پس از خشک کردن) = نسبت درصد ماده خشک

درصد چربی – درصد ماده خشک= میزان ماده خشک بدون چربی

۲-۲-۵- دانسیته دوغ (روش لاکتودانسیمتر)

ابتدا مطابق استاندارد ایران به شماره ٦۳۸ نمونه کاملاً همگن شد و به داخل پیمانه استوانه‌ای خشک و تمیز ریخته شد تا دو سوم استوانه از دوغ پر شود. سپس لاکتودانسیمتر وارد دوغ شد و مجدداً تا حدی دوغ داخل پیمانه استوانه‌ای ریخته شد تا سطح دوغ به دهانه پیمانه رسید و حتی از آن لبریز گردید. ۲ تا ۳ دقیقه که ترمولاکتودانسیمتر بی‌حرکت ایستاد. ابتدا دما قرائت شد و سپس روی ستون مدرج درجه‌ای را که همتراز دوغ بود یادداشت شد. این آزمون ۲٤ ساعت پس از تولید و در دو تکرار انجام شد.

۲-۲-٦- میزان جدایی سرم

برای تعیین میزان جداسازی سرم از لوله‌های آزمایش مدرج ۵۰ میلی‌لیتری هم‌شکل استفاده شد. پس از ریختن نمونه‌ها در لوله آزمایش مدرج، دربندی انجام گردید. نمونه‌ها به یخچال منتقل شد و در دمای ٤ ^{o}C به مدت ۳۰ روز نگهداری شدند. برای ثبت میزان جدایی فازها، در زمان معین (ابتدا ۲٤ ساعت و سپس ۳۰ روز) حجم فرآورده از انتهای لوله آزمایش مدرج تا خط فاصل جدایی فاز بعدی بر حسب میلی‌لیتر گزارش شد و سپس بر اساس فرمول زیر میزان جدایی فازی محاسبه گردید [۱٦]. این آزمون ۲٤ ساعت و سی روز پس از تولید و در دو تکرار در هر نوبت انجام شد.

۱۰۰× حجم کل/ (حجم کل – حجم ماست) = درصد جدایی فازی

۲-۲-۷- ویسکوزیته

جهت اندازه‌گیری ویسکوزیته نمونه‌های دوغ تولیدی، از دستگاه ویسکومتر دورانی (Viscotech، اسپانیا) مدل استوانه-ای با اسپیندل TL5 با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه استفاده گردید. در این آزمون ابتدا نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط قرار گرفتند و سپس نمونه‌ها قبل از انجام آزمون به مدت ۲۰ ثانیه تکان داده شده و ۲۰ ثانیه ساکن ماندند. بعد از آن نمونه‌ها در سیلندر آزمون ریخته شده و پس از ۲ دقیقه چرخش اسپیندل داخل نمونه‌ها برای یکنواخت کردن دما و حذف کردن اثرات وابستگی به زمان، سنجش آغاز شد و ویسکوزیته پس از ۱۵ دقیقه در نرخ برشی S^{-1} ۱۳۲ ثبت گردید. این آزمون ۲٤ ساعت و سی روز پس از تولید و در دو تکرار انجام شد [۱۷].

۲-۲-۸- ارزیابی حسی

ارزیابی حسی نمونه‌ها توسط ۱۰ نفر ارزیاب آموزش دیده، سی روز پس از تولید نمونه‌های دوغ با استفاده از روش هدونیک پنج نقطه‌ای برای پارامترهای قوام، رنگ، بو و مزه (طعم)، بافت و پذیرش کلی انجام شد. امتیازدهی به نمونه‌ها با انتخاب یکی از گزینه‌های بسیار ضعیف، ضعیف، متوسط، خوب و بسیار خوب، توسط داوران که به ترتیب از ۱ تا ۵ امتیاز داده شده بودند انجام گرفت [۱٦].

۲-۲-۹- تجزیه و تحلیل آماری

تولید نمونه‌ها و تمامی آزمون‌ها در سه تکرار انجام گرفت. به منظور تجزیه و تحلیل آماری نتایج به دست آمده از آزمون‌های مختلف، از نرم‌افزار مینی‌تب ۱٦ استفاده شد و تجزیه و تحلیل داده‌ها مطابق با طرح کاملاً تصادفی متعادل و در سطح احتمال خطای ۰/۰۵ انجام گرفت. با استفاده از این نرم‌افزار ابتدا نرمال بودن نتایج نمونه‌ها بررسی شد. سپس اگر نتایج بر منحنی توزیع نرمال منطبق بودند، از آزمون پارامتری آنالیز واریانس یا انووا و در صورت عدم انطباق، از آزمون غیرپارامتری کروسکال والیس جهت بررسی تفاوت معنی‌دار بین داده‌ها استفاده گردید.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- pH و اسیدیته

pH و اسیدیته تیمارهای مختلف مورد آزمون در ۲٤ ساعت و سی روز پس از تولید (جدول شماره ۲) تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند (P >۰/۰۵) و در محدوده مجاز استاندارد ملی دوغ بود. با افزایش غلظت آنزیم در ماست، پیشرفت اسیدیته قابل تیتر و میزان نزول pH کاهش یافت و در بالاترین غلظت آنزیم اضافه شده به شیر، پیشرفت اسیدیته در ماست در حین نگهداری کندتر شد. یکی از دلایل محکم برای رشد کند استارتر، این است که پپتیدهای با وزن مولکولی کم و یا اسیدآمینه‌هایی که برای رشد *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* مورد نیاز هستند، توسط آنزیم MTGase دچار اتصالات عرضی شده و تا حدودی برای استرپتوکوکوس غیرقابل دسترس می‌شوند. البته این تأثیر باعث اختلاف معنی‌دار در نتایج نمونه‌ها نگردید. سانلی و همکاران (۲۰۱۰) نیز گزارش کردند که حضور ترانس گلوتامیناز در ماست قالبی، اثر قابل توجهی بر pH و اسیدیته نداشت [۱۸].

Table 2 Effect of adding Transglutaminase and long-chain inulin on PH, Acidity, SNF and Density of dough samples

Samples	Density, one day after producing	SNF, one day after producing	Acidity, one day after producing	Acidity, thirty day after producing	pH, one day after producing	pH, thirty day after producing
Control	18.60 ±0.00^{e}	2.45±0.01^{e}	56 ± 0.00^{a}	58.8± 0.00^{a}	3.75± 0.00^{a}	3.72± 0.00^{a}
R1	20.05± 0.07^{d}	3.29±0.02^{d}	55.1± 0.00^{a}	57.5± 0.23^{a}	3.75± 0.00^{a}	3.71± 0.00^{a}
R2	21.55 ±0.21^{c}	4.28±0.00^{d}	55.1± 0.00^{a}	56.4± 0.03^{a}	3.75± 0.00^{a}	3.74± 0.00^{a}
R3	23.00±0.00^{a}	4.89±0.14^{a}	54.2± 0.00^{a}	55.4± 0.00^{a}	3.74± 0.00^{a}	3.73± 0.00^{a}
R4	22.70± 0.14^{b}	4.75±0.09^{b}	55.1± 0.01^{a}	58.5± 0.01^{a}	3.74± 0.00^{a}	3.71± 0.00^{a}
R5	20.85 ±0.07^{d}	3.54±0.12^{d}	54.1± 0.00a	55.4± 0.00^{a}	3.74± 0.00^{a}	3.73± 0.00^{a}

- Mean ± SD of treatments with the same letters are not significantly different at any time (P>0.05).

همچنین فرگمند و همکاران (۱۹۹۹) نیز در پژوهش مشابهی که بر روی ماست انجام دادند، همین نتایج را به‌دست آوردند [۱۹]. این نتایج با نتایج حاصل از تحقیقات گاگیسبرگ و همکاران (۲۰۰۹) در خصوص استفاده از اینولین در ماست و عدم تاثیر هیدروکلویید مذکور بر روی pH در مقایسه با نمونه کنترل با گذشت زمان مطابقت دارد [۱۲].

۳-۲- ماده خشک بدون چربی و دانسیته

نتایج حاصل از اندازه‌گیری ماده خشک بدون چربی در ۲٤ ساعت پس از تولید در جدول ۲ بیان می‌کند که نمونه کنترل کمترین ماده خشک را داشته و با افزودن اینولین و آنزیم ترانس گلوتامیناز محتوای ماده خشک در اکثر تیمارها به طور معنی‌داری افزایش یافته است. به‌طوری که تیمار R۳ و پس از آن تیمار R٤ بیشترین محتوای ماده خشک بدون چربی را به خود اختصاص دادند و از آن‌جایی که ترکیبات مذکور جزء ترکیبات افزودنی می‌باشند افزایش آن‌ها سبب افزایش ماده خشک بدون چربی دوغ گشت [۱۲]. با افزایش مقدار اینولین و آنزیم ترانس گلوتامیناز در ۵ تیمار مورد بررسی در این پژوهش، میزان وزنی ماده خشک تیمارها افزایش یافت و به تبع آن دانسیته یا جرم حجمی نمونه‌ها هم به طور معنی‌داری در اغلب تیمارها افزایش یافت. طوری‌که همانند نتایج آزمون محتوای ماده خشک بدون چربی، تیمار R۳ بیشترین دانسیته و نمونه کنترل کمترین دانسیته را نشان دادند (P<۰/۰۵). با افزایش آنزیم ترانس گلوتامیناز دانسیته نمونه‌ها نیز افزایش یافت. از آنجا که عملکرد اصلی آنزیم ترانس گلوتامیناز، اتصال عرضی پروتئین‌های شیر به صورت کوالانسی و در نتیجه، تشکیل یک ژل قوی‌تر است که در ساختار متفاوت می‌باشد این نتایج تا حدی قابل انتظار بود [۲۰]

۳-۳- میزان جداسازی فاز سرم

نتایج جدایی فاز سرم نمونه‌های دوغ در جدول شماره ۳ ارائه شده است. تفاوت معنی‌داری میان میزان فاز سرم جدا شده از نمونه کنترل با تیمارهای R۱ و R۵ پس از ۲٤ ساعت و سی روز وجود نداشت اما با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری مشاهده گردید (P<۰/۰۵). با افزایش اینولین و آنزیم، جداسازی فاز سرم تمامی تیمارها کاهش، ولی بهرحال با گذشت زمان افزایش یافت. آب‌اندازی، انقباض ژل است به‌طوری که منجر به جدا شدن آب از محصول می‌شود. دلایل

شایع برای وقوع آب‌اندازی عبارتند از؛ استفاده از دمای گرمخانه‌گذاری بالا، نسبت زیاد پروتئین‌های آب پنیر به کازئین، محتوای کم مواد جامد و صدمات فیزیکی محصول در حین ذخیره‌سازی و توزیع [۲۱]. افزایش ماده خشک و یا افزایش محتوای پروتئینی و همچنین افزودن هیدروکلوئیدهایی مانند ژلاتین و نشاسته، روش‌های معمول در جلوگیری از آب‌اندازی در محصولات تخمیری لبنی است. اتصالات عرضی در زنجیره پروتئینی برای ایجاد ثبات در شبکه سه‌بعدی ژل این محصولات می‌تواند تأثیر برابر و مشابه داشته باشد [۲۲]. استفاده از آنزیم ترانس گلوتامیناز و کاهش در نفوذپذیری ژل و اندازه منافذ آن منجر به ساختار متراکم‌تر و پایدارتر با فضاهای کوچک‌تر می‌شود و از این رو، بیشتر آب آزاد در شبکه ژلی به دام می‌افتد [۲۳].

Table 3 Results of serum phase separation in doogh samples

Sample	Serum phase separation one day after producing (%)	Serum phase separation 30days after producing (%)
Control	60±0.03[a]	72±0.02[a]
R1	58.2±0.03[a]	67.3±0.82[a]
R2	53.8±1.72[b]	58.50±0.51[b]
R3	47.8±0.00[c]	53.50±0.67[c]
R4	49.5±0.01[c]	55.20±0.43[c]
R5	57±0.01[ab]	62.50±0.22[ab]

* Mean ± SD of treatments with the same letters are not significantly different at any time (P>0.05).

اوزر و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که ترانس گلوتامیناز باعث کاهش میزان سرم جدا شده و در نتیجه افزایش ظرفیت نگهداری آب ماست می‌شود [۵]. همچنین یوکسل و همکاران (۲۰۱۰) افزایش ظرفیت نگهداری آب را در نمونه‌های ماست پیش‌تیمار شده با ترانس گلوتامیناز نسبت به نمونه‌های کنترل گزارش کردند [۲٤]. کوریشی و همکاران (۲۰۰۱) بیان کردند که تشکیل ژل ماست با باندهای گاماکربوکسی آمید گلوتامین و اپسیلون آمین 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 گردید [٤]. در خصوص اثر اینولین در کاهش آب‌اندازی، مکانیسمی که باعث کاهش آب‌اندازی و افزایش پایداری نسبی دو نمونه مذکور شده، افزایش گرانروی و به دام افتادن ذرات پروتئینی در یک شبکه ویسکوز بود که این پدیده در خصوص هیدروکلوئیدهای غیرجاذب مانند گوار و ثعلب در پژوهش‌های پیشین نیز مشاهده گردیده است. هیدروکلوئیدهای غیرجاذب معمولا با افزایش غلظت باعث افزایش و هیدروکلوئیدهای جاذب با افزایش غلظت موجب کاهش گرانروی سیستم می‌شوند [۲۵]. درخصوص اینولین و کاربرد آن در سیستم‌های لبنی، دلو استافلو و همکاران (۲۰۰٤) طی کاربرد چندین فیبر ازجمله اینولین در فرمولاسیون ماست گزارش کردند که کاربرد اینولین به میزان ۱/۳٪ طی ۲۱ روز نگهداری ماست، موجب بهبود پایداری فیزیکی و ممانعت از سینرسیس یا آب‌اندازی ماست می‌گردد [۱۵].

۳-٤- ویسکوزیته

نتایج ویسکوزیته نمونه‌های دوغ در ۲٤ ساعت و سی روز پس از تولید در جدول شماره ٤ ارائه شده است. تفاوت معنی‌داری میان ویسکوزیته نمونه کنترل با تیمارهای R۱ وR۵ پس از ۲٤ ساعت و سی روز وجود نداشت اما با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری مشاهده گردید (P<۰/۰۵). با افزایش مقادیر آنزیم و اینولین بلند زنجیر در فرمولاسیون نمونه‌های دوغ ویسکوزیته پس از ۲٤ ساعت و ۳۰ روز افزایش یافت. از آنجا که عملکرد اصلی آنزیم ترانس گلوتامیناز، اتصال عرضی پروتئین‌های شیر به صورت کوالانسی و در نتیجه تشکیل یک ژل قوی‌تر است که در ساختار متفاوت می‌باشد، این نتایج تا حدی قابل انتظار بود [۲۰]. در واقع تیمار با آنزیم می‌تواند خواص تشکیل ژل در کازئین را توسط اتصالات عرضی بین مولکولی بهبود بخشد [۷]. اسکوروش و همکاران (۲۰۰۰) 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 اینولین بلند زنجیر نیز بر ویسکوزیته معنی‌دار بود (P<۰/۰۵) [۲۰].

Table 4 The results of viscosity of doogh samples (mpa.s)

Samples	One day after producing	Thirty days after producing
Control	7.9±0.11[a]	9.89±1.51[a]
R1	10.23±0.98[ab]	12.71±1.70[ab]
R2	15.35±0.65[c]	17.55±1.48[cd]
R3	17.83±1.10[de]	19.40±0.56[e]
R4	17.07±0.51[cd]	18.63±0.88[d]
R5	12.95±0.85[abc]	14.52±4.23[abc]

-Mean ± SD of treatments with the same letters are not significantly different at any time (P>0.05).

ضمنا با توجه به اینکه اینولین بلند زنجیر معمولا در غلظت‌های بالای ۱۵٪ توانایی تشکیل یک شبکه ژل ذره‌ای را داشته و در غلظت‌های پایین‌تر (خصوصا ۷/۵٪) تنها یک محلول آبی با ویسکوزیته پایین از آن به دست می‌آید و پدیده تشکیل ژل در این هیدروکلوئید برخلاف بسیاری از هیدروکلوئیدها که از طریق باندهای ضعیف یا قوی میان زنجیره‌های بیوپلیمر است در اینولین در قالب یک شبکه ژل ذره‌ای می‌باشد [۲٦] بنابراین در پژوهش حاضر با توجه به اینکه محدوده غلظت مورد استفاده اینولین بلند زنجیر در تیمارها (پایین‌تر از محدوده تشکیل ژل و ایجاد قوام) بوده، هدف از کاربرد اینولین، بیشتر بهینه‌سازی فرمولاسیون دوغ از لحاظ ویژگی‌های تغذیه‌ای و برهم‌کنش آن با آنزیم ترانس گلوتامیناز به عنوان ترکیب قوام‌دهنده و میسل‌های کازئین مورد نظر بوده است [۲۵]. یکی از علل افزایش ویسکوزیته با افزایش مقدار آنزیم و اینولین می‌تواند احتمالا مربوط به توانایی اینولین در اتصال با مولکول‌های آب و واکنش میان برخی پروتئین‌های لبنی با اینولین باشد. این واکنش می‌تواند منجر به افزایش وزن مولکولی پروتئین‌های شیر و افزایش ویسکوزیته فاز پیوسته محصول گردد [۲۷]. این نتایج با تحقیقات مندوزا و همکاران (۲۰۰۱) در سوسیس‌های تخمیری [۲۸]، آمیس و همکاران (۱۹۹۵) در بررسی هیدروکلوئیدها و اثرات آن‌ها [۲۹] و گالیسبرگ و همکاران (۲۰۰۹) در ماست [۱۲] مطابقت داشت.

۳-۵- ارزیابی حسی

نتایج حاصل از ارزیابی حسی نمونه‌های حاوی آنزیم ترانس گلوتامیناز و اینولین بلند زنجیر و نمونه کنترل نشان داد که تفاوت معنی‌دار آماری در قوام، رنگ و پذیرش کلی میان نمونه کنترل با تیمارهای R۲، R۳ و R٤ پس از ۳۰ روز تولید وجود داشت (P < ۰/۰۵) (جدول۵). با افزایش مقادیر آنزیم و اینولین در نمونه‌ها فاکتورهای رنگ، قوام و پذیرش کلی از نظر ارزیاب‌ها بهبود یافتند به‌طوریکه نمونه R۳ بیشترین امتیاز فاکتورهای رنگ، قوام و پذیرش کلی را کسب کرد (P<۰/۰۵). از آنجا که عملکرد اصلی آنزیم ترانس گلوتامیناز، اتصال عرضی پروتئین‌های شیر به صورت کوالانسی و در نتیجه، تشکیل یک ژل قوی‌تر است که در ساختار متفاوت می‌باشد [۲۰] کسب امتیاز بالاتر فاکتور قوام با افزایش اینولین و آنزیم تائید کننده تاثیر آن‌ها در تشکیل شبکه ژلی توسط آنزیم در فاز پیوسته و اینتراکشن میان کازئین و اینولین بوده که منجر به دام انداختن آب و افزایش گرانروی محصول شده و همگی در آزمون‌های قبلی نیز به اثبات رسیدند [۳۰].

Table 5 Sensory properties of doogh samples after thirty days of storage

Samples	Color	Odor	Taste	Consistency	Overall acceptability
Control	2.28±0.12[c]	2.92±0.32[a]	2.84±0.65[a]	1.47±0.11[c]	1.33±0.06[d]
R1	2.89±0.24[b]	3.01±0.54[a]	2.95±0.02[a]	3.01±0.00[ab]	3.21±0.65[c]
R2	3.26±0.00[ab]	3.02±1.91[a]	2.88±0.34[a]	3.85±1.76[ab]	3.86±1.22[b]
R3	3.45±0.43[a]	3.01±0.03[a]	2.86±0.54[a]	4.23±0.31[a]	4.22±1.06[a]
R4	3.34±0.37[a]	2.96±1.97[a]	2.76±0.87[a]	4.01±2.77[a]	4.01±1.43[a]
R5	3.06±0.01[b]	2.94±1.27[a]	2.92±2.57[a]	3.35±0.47[bc]	3.57±1.07[c]

Mean ± SD of treatments with the same letters are not significantly different at any time (P>0.05).

٤- نتیجه‌گیری

افزودن اینولین بلند زنجیر و آنزیم ترانس گلوتامیناز سبب بهبود ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی و ارگانولپتیکی دوغ گردید. طوری‌که از لحاظ شاخص‌های دانسیته، ماده خشک بدون چربی، میزان جدایی فاز سرم، ویسکوزیته، قوام و

پذیرش کلی نسبت به نمونه کنترل برتری معنی‌داری (P<۰/۰۵) مشاهده شد و اسیدیته و pH نمونه‌های حاوی اینولین بلند زنجیر و آنزیم هیچ تفاوت معنی‌داری (P>۰/۰۵) با نمونه کنترل نشان ندادند. با توجه به نتایج حاصله، نمونه-های R۳ وR٤ به عنوان نمونه‌های دوغ فراسودمند و پری‌بیوتیک برگزیده، با ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی، رئولوژیکی و حسی برتر در این پژوهش معرفی می‌شوند.

۵- منابع

[1] Foroughinaia, S., S. Abbasi., Z. Hamidi Esfahani. (2007). Effect of individual and combined addition of salep, tragacantin and guar gums on the stabilisation of iranian Doogh. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 2(2): p. 15-25.

[2] Koksoy, A., M. Kilic. (2004). Use of hydrocolloids in textural stabilization of a yoghurt drink, ayran. *Food hydrocolloids*, 18(4): p. 593-600.

[3] Zhu, Y., Rinzema,A., Tramper, J., Bol, J. (1995). Microbial transglutaminase—a review of its production and application in food processing. *Applied microbiology and biotechnology*, 44(3-4): p. 277-282.

[4] Kuraishi, C., K. Yamazaki., Y. Susa. (2001). Transglutaminase: its utilization in the food industry. *Food Reviews International*, 17(2): p. 221-246.

[5] Ozer, B., Avni Kirmaci, H., Oztekin, S., Hayaloglu,A., Atamer, M. (2007). Incorporation of microbial transglutaminase into non-fat yogurt production. International dairy journal, 17(3): p. 199-207.

[6] 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(3): p. 152-157.

[7] Farnsworth, J., Li, J. (2006). Effects of transglutaminase treatment on functional properties and probiotic culture survivability of goat milk yogurt. Small Ruminant Research, 65(1): p. 113-121.

[8] Benković, M., Probiotik, d.o.o., Croatia, Z. (2008). Influence of probiotic strain Bifidobacterium animalis subsp. lactis lafti® b94, inulin and transglutaminase on the properties of set-style yoghurt. *Mljekarstvo*, 58(2): p. 95-115.

[9] Jaros, D., Partscchefeld, C., Henle, T., Rohm, H. (2006). Transglutaminase in dairy products: chemistry, physics, applications. *Journal of texture studies*, 37(2): p. 113-155.

[10] Pierro, P.D., Marinello, L., Sorrentino, A. (2010). Transglutaminase-induced chemical and rheological properties of cheese. *Food Biotechnology*, 24(2): p. 107-120.

[11] Villegas, B., E. Costell. (2007).Flow behaviour of inulin–milk beverages. Influence of inulin average chain length and of milk fat content. *International Dairy Journal,* 17(7): p. 776-781.

[12] Guggisberg, D., Cuthbert-Steven, J., Piccinali, P., Bütikofer, U., Eberhard, P. (2009). Rheological, microstructural and sensory characterization of low-fat and whole milk set yoghurt as influenced by inulin addition. *Internati*onal Dairy Journal, 19(2): p. 107-115.

[13] Franck, A. (2002). Technological functionality of inulin and oligofructose. British journal of Nutrition, 87(S2): p. S287-S291.

[14] González - Tomás, L., Bayarri, S., Marques, J., Costell, E. (2009). Flow behaviour of inulin - enriched dairy desserts: influence of inulin average chain length. International journal of food science & technology, 44(6): p. 1214-1222.

[15] Staffolo, M.D., N. Bertola., M. Martino. (2004). Influence of dietary fiber addition on sensory and rheological properties of yogurt. *International Dairy Journal*, 14(3): p. 263-268.

[16] Gorji, E.G., M.A. Mohammadifar., H. Ezzatpanah. (2011). Influence of gum tragacanth, Astragalus gossypinus, addition on stability of nonfat Doogh, an Iranian fermented milk drink. *International Journal of Dairy Technology*, 64(2): p. 262-268.

[17] Azarikia, F., S. Abbasi. (2010). On the stabilization mechanism of Doogh (Iranian yoghurt drink) by gum tragacanth. *Food Hydrocolloids*, 24(4): p. 358-363.

[18] Şanlı, T., Sezgin, E., Deveci, O., Şenel, E., Benli, M. (2011). Effect of using transglutaminase on physical, chemical and sensory properties of set-type yoghurt. *Food Hydrocolloids*, 25(6): p. 1477-1481.

[19] Faergemand, M., Sorensen, M. V., Jorgensen, U., Bulodfsen, G., Qvist, K. B. (1999). Transglutaminase: effect on instrumental and sensory texture of set style

yoghurt. *Milchwissenschaft*, 54(10): p. 563-566.

[20] Schorsch, C., H. Carrie., I. Norton. (2000). Cross-linking casein micelles by a microbial transglutaminase: influence of cross-links in acid-induced gelation. International Dairy Journal, 10(8): p. 529-539.

[21] Lucey, J.A. (2004). Cultured dairy products: an overview of their gelation and texture properties. International Journal of Dairy Technology, 57(2 - 3): p. 77-84.

[22] Lorenzen, P.C., E. Schlimme. (1998). Properties and potential fields of application of transglutaminase preparations in dairying. International Dairy Federation.

[23] Moon, J., Y. Hong. (2003). Electron microscopic property of transglutaminase added milk. Korean J Food Sci Animal Res, 23(4): p. 350-55.

[24] Yuksel, Z., Erdem, Y. K. (2010). The influence of transglutaminase treatment on functional properties of set yoghurt. *International journal of dairy technology*, 63(1): p. 86-97.

[25] Everett, D.W., R.E. McLeod. (2005). Interactions of polysaccharide stabilisers with casein aggregates in stirred skim-milk yoghurt. *International Dairy Journal,* 15(11): p. 1175-1183.

[26] Imeson, A. (2011). *Food stabilisers, thickeners and gelling agents*: John Wiley & Sons.

[27] Tárrega, A., E. Costell. (2006). Effect of inulin addition on rheological and sensory properties of fat-free starch-based dairy desserts. *International Dairy Journal*, 16(9): p. 1104-1112.

[28] Mendoza, E., García, M. L., Casas, C., Selgas, M. D. (2001). Inulin as fat substitute in low fat, dry fermented sausages. *Meat science*, 57(4): p. 387-393.

[29] Amice-Quemeneur, N., Haluk, J. K ., Hardy, J., Kravtchenko, T.P. (1995). Influence of the acidification process on the colloidal stability of acidic milk drinks prepared from reconstituted nonfat dry milk. *Journal of dairy science*, 78(12): p. 2683-2690.

[30] Kip, P., D. Meyer., R. Jellema. (2006). Inulins improve sensoric and textural properties of low-fat yoghurts. *International Dairy Journal*, 16(9): p. 1098-1103.

Effect of Using microbial Transglutaminase and long-chain Inulin on Physicochemical and Sensory Properties of Doogh

Karim, M. [1*], Naderi, B. [2], Mirzaei, M. [3]

1. Ph.D. Student of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
2. Ph.D. Student of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
3. M. Sc. Graduate ,Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Ayatollah Amoli Branch, Amol, Iran

(Received: 2016/01/20 Accepted:2018/02/23)

The transglutaminase enzyme has a positive effect on serum storage capacity and gel strength in food products by creating a crosslinking effect on proteins and enhancing the protein-based structure. Inulin is fructose polymers with 2 to 60 degree of polymerization that linked by β (2-1) fructosyl bonds. Prebiotic and bifidogenic features of this matter have caused it uses as a functio nal ingredient in food products. The purpose of this study was to study the effect of the addition of MTGase and long-chain inulin on the physicochemical and sensory properties of doogh. In this study, the effect of using MTGase (0-0.3%) and long-chain inulin (0-1.5%) in 5 samples of doogh was examined on physicochemical (pH, titratable acidity, density, SNF, viscosity and phase separation) and organoleptic properties (consistency, flavor, color and overall acceptability). Evaluations were performed at 24 hours and 30 days of storage. The results revealed that with increase of transglutaminase and inulin no significant difference in pH, acidity and flavor between the control sample and other treatments containing inulin and MTGase after 24 hours and 30 days was observed (P>0.05). The viscosity, SNF, density, serum phase separation and overall acceptability of samples R3 (1.5% inulin and 0.3% MTGase) and R4 (1.5% inulin and 0.1% MTGase) shown superior physicochemical and sensory properties.

Keywords: Transglutaminase enzyme (MTGase), Long-chain inulin, Doogh

*Corresponding Author E-Mail Address: mehri.karim@ag.iut.ac.ir