

# بهینه سازی تولید دوغ حاوی آنزیم ترانس گلوتامیناز با استفاده از کنسانتره پروتئین شیر

حسینیه امینی<sup>۱</sup>، لیلا روفه‌گری نژاد<sup>۲\*</sup>

۱-دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم صنایع غذایی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

۲-گروه علوم و صنایع غذایی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۵/۰۸

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۳/۱۲

## چکیده

افزودن پروتئین‌های لبنی به دوغ علاوه بر افزایش ارزش تغذیه‌ای و سلامتی بخشی محصول می‌تواند منجر به تولید دوغ پایدار با خواص رئولوژیکی بهتر گردد. این پژوهش با هدف بهبود ویژگی‌های کیفی و پایداری دوغ با استفاده از کنسانتره پروتئینی شیر (در سطوح صفر، ۰/۵ و ۱ درصد) و آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی (در سطوح صفر، ۵ و ۱۰ واحد در گرم پروتئین) انجام شد. برای این منظور آزمون‌های فیزیکوشیمیایی، رئولوژیکی و حسی بر روی نمونه‌های دوغ انجام شد. سپس نمونه بهینه با استفاده از روش سطح پاسخ و در قالب طرح مرکب مرکزی انتخاب گردید و آزمون‌های توزیع اندازه ذرات و پتانسیل زتا از آن به عمل آمد. نتایج به‌دست آمده نشان داد استفاده از کنسانتره پروتئین شیر و آنزیم ترانس گلوتامیناز باعث افزایش معنی‌داری در محتوای اسیدیته و کاهش pH شد. هر دو متغیر باعث افزایش معنی‌داری در میزان ویسکوزیته و کاهش میزان دوفازه شدن نمونه‌های دوغ گردیدند. بر اساس نتایج بهینه‌یابی نهایی، بهترین غلظت کنسانتره پروتئینی شیر و آنزیم ترانس گلوتامیناز برای تولید دوغ با پایداری بالا و ویژگی‌های حسی مطلوب، به ترتیب ۰/۵۳ درصد و ۱۰ واحد در گرم پروتئین به‌دست آمد. نتایج تجزیه و تحلیل‌ها نشان داد که در نمونه بهینه اندازه ذرات کوچک‌تر بوده و به دلیل بالا بودن پتانسیل زتا، امکان کوآگولاسیون پروتئینی کم‌تر می‌باشد. در مجموع نتایج حاصل نشان داد با به-کارگیری کنسانتره پروتئین شیر و آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی می‌توان دوغ پایدار با ویژگی‌های مطلوب از نظر خواص فیزیکوشیمیایی و ارگانولپتیکی با قابلیت نگهداری طولانی مدت تولید نمود.

**واژه‌های کلیدی:** آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی، خواص رئولوژیکی، دوفاز شدن، دوغ، کنسانتره پروتئینی شیر

## ۱- مقدمه

دوغ، یک نوشیدنی ایرانی، به صورت سنتی با افزودن آب به ماست کامل و هم زدن در کیسه‌های سنتی به نام مشک و گرفتن چربی آن به دست می‌آید که در نهایت به دوغ نمک و گیاهان معطر اضافه شده و آماده‌ی مصرف می‌شود. به صورت صنعتی از شیر چربی گرفته شده ماست تهیه می‌کنند، سپس با افزودن آب، نمک و اسانس یا عرقیات گیاهی، ماست به دوغ تبدیل می‌شود [۳۰]. محصول‌های مشابه دوغ در کشورهای دیگر با نام‌های مختلف مانند آیران<sup>۱</sup> در ترکیه و لبن<sup>۲</sup> در کشورهای عربی موجود هستند [۳۷]. براساس گزارش کدکس<sup>۳</sup> در سال‌های اخیر، دوغ در بین فرآورده‌های لبنی بیشترین میزان تولید (در حدود ۶۷ درصد افزایش در سال) را داشته است [۱]. فرایند تخمیر سبب تولید انواع مختلف ترکیب‌های تغذیه‌ای مفید مانند اسیدهای آمینه ضروری، اسیدهای آلی، آنتی بیوتیک‌ها و باکتریوسین‌ها توسط باکتری‌های لاکتیک می‌شود. این مواد موجب کاهش و یا نابودی میکروب‌های مسمومیت‌زا و عفونت‌زا در دستگاه گوارش می‌شوند [۵]. دوغ محصول تخمیری بی‌ثبات است که کیفیت آن به علت افزایش اسیدیته و تفکیک فازی در طول نگهداری کاهش می‌یابد [۳۱]. تفکیک فازی<sup>۴</sup> در طول نگهداری، مهم‌ترین عیب در نوشیدنی‌های تخمیری شیر به ویژه دوغ می‌باشد که به صورت علمی جدایش سرم خوانده شده و عبارت از تفکیک محصول به دو قسمت، شامل لایه‌ای ته نشین شده از مولکول کازئین و لایه بالایی شفاف سرم می‌باشد [۲۸ و ۳۰]. پایین آوردن pH تا نقطه‌ی ایزوالکتریک پروتئین‌های شیر سبب به هم پیوستن مولکول‌های پروتئینی و تشکیل ژل در محصول می‌شود. با هم زدن و در هم شکستن این ساختار ژلی، این مولکول‌ها هنوز در محیط موجود هستند؛ ولی با افزودن آب از هم جدا شده و فاصله می‌گیرند. در نتیجه

آزادتر می‌شوند و به سادگی تحت تاثیر نیروی جاذبه و سنگینی خود ذرات ته‌نشین می‌شوند [۱۵]. استفاده از تیمار حرارتی [۲۲]، افزودن هیدروکلوئیدها به دلیل افزایش ویسکوزیته و رانش الکترواستاتیک [۱۹، ۲۴ و ۳۲] و افزودن آنزیم ترانس گلوتامیناز و ایجاد اتصال‌های کوالانسی جدید بین پروتئین‌های شیر با آنزیم و در نتیجه افزایش یکپارچگی مولکول‌های پروتئینی کازئین در برابر اسید [۳۰] از جمله راه‌های کاهش تفکیک فازی در طی نگهداری می‌باشند. آنزیم ترانس گلوتامیناز یک آسپیل ترانسفراز است که در محیط پروتئینی انتقال آسپیل را بین گروه‌های گاما کربوکسی آمید گلوتامین (به عنوان دهنده‌ی آسپیل) و گروه‌های اپسیلون آمینو لیزین (به عنوان گیرنده‌ی آسپیل) کاتالیز می‌کند [۲۶]. این واکنش منجر به ایجاد پیوندهای عرضی میان مولکول‌های پروتئینی، از جمله پروتئین‌های شیر می‌شود. امروزه آنزیم ترانس گلوتامیناز از یک گونه مهم باکتریایی به نام *استرپتوورتیسیلیوم*<sup>۵</sup> استخراج و خالص سازی می‌شود [۳۳]. استفاده از این آنزیم در فرآورده‌های تخمیری شیر سبب افزایش قدرت ژل‌های اسیدی، افزایش ویسکوزیته، کاهش آب اندازی و ایجاد بافتی صاف‌تر در ماست‌های قالبی و همزده شده است [۲۵ و ۴۲]. اثر آنزیم ترانس گلوتامیناز در شیر بدون چربی برای بهبود ویژگی‌های رئولوژیکی [۳۶]، ویژگی‌های بافتی ژل اسیدی تهیه شده با شیر بز [۱۷]، ویژگی‌های عملکردی و بافتی بستنی در جهت افزایش ویسکوزیته، استحکام، برش پذیری، مقاومت در برابر ذوب بالا [۴۱]، ماست کم چرب و بدون چربی برای کاهش سینرزیس و افزایش ویسکوزیته [۴۸]، خصوصیات بافتی و حسی پنیر فرا پالایشی [۶] مورد بررسی قرار گرفته است. یکی دیگر از روش‌های افزایش پایداری دوغ، تغییر نسبت پروتئین‌های شیر با افزودن کنسانتره‌ی پروتئین‌های مختلف شامل کنسانتره پروتئین آب پنیر (WPC)، کنسانتره پروتئین شیر (MPC)، کازئینات سدیم و غیره در محصولات تخمیری

- 1 Ayran
- 2 Laben
- 3 Codex Alimentarius
- 4 Phase Separation

5 *Stereptovercillium*

مقاوم به دماهای معمول پاستوریزاسیون می باشد [۳۸]. اضافه کردن WPC به نوشیدنی های تخمیری شیر باعث می شود که قطر ذرات کمتر شده و ضریب قوام افزایش یابد. نکته قابل توجه این است که تنها تا مقدار خاصی WPC را برای جلوگیری از ته نشینی می توان به کار برد و با افزایش این مقدار سرعت ته نشینی تشدید خواهد شد که دلیل اصلی تشدید ته نشینی تضعیف شکل گیری ساختارهای کازئینی و تجمع و توده ای شدن پروتئین های آب پنیر و اسرشته شده با همدیگر و با ذرات کازئین در درصدهای بالاتر WPC بیان شده است

شیر به منظور بهبود خواص فیزیکی شیمیایی و بالا بردن ارزش تغذیه ای این محصولات می باشد [۱۴]. امروزه پروتئین های شیر به دلیل خواص تغذیه ای و صنعتی آن مورد توجه قرار گرفته اند. پروتئین های شیر به دلیل دارا بودن اسیدهای آمینه ضروری فراوان و خاصیت هضم خوب ارزش تغذیه ای بیشتری در مقایسه با سایر پروتئین ها دارند [۴۴ و ۵۱]. افزودن پودرهای لبنی به خصوص پروتئین های شیر<sup>۱</sup> به فرمولاسیون محصولات لبنی علاوه بر بهبود بافت و خواص رئولوژیکی می تواند منجر به افزایش ارزش تغذیه ای آن ها شود [۱۸].

کنسانتره پروتئین شیر دارای محلولیت بالا و بدون طعم بد و

جدول ۱- مشخصات شیر مورد استفاده در این تحقیق

مقدار	ویژگی های شیر
۱۵/۰±۰۰/۰۰۵	اسیدیته (درجه دورنیک)
۸/۰±۱۳/۰۰۳	ماده خشک بدون چربی (درصد)
۱/۰±۵/۰۳	چربی (درصد)
۱۰ <sup>۶</sup> cfu/ml	بار میکروبی (توتال کانت)

<sup>۱</sup> Milk Protein

در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد. جهت غیر فعال کردن آنزیم، در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد ۱۵ ثانیه حرارت دهی انجام گرفت. استارترزنی در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد انجام شد و به مدت ۷ ساعت در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد نگهداری شد و بعد از رسیدن pH نمونه های ماست به ۴/۲ به یخچال منتقل شدند. برای تهیه نمونه های دوغ به نسبت ۵۰ به ۵۰ آب مقطر و نمک استریل (۰/۵ درصد وزنی/حجمی) اضافه شد و در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه پاستوریزه گردید. دوغ های تولید شده در بطری های ۲۵۰ میلی لیتری ریخته و تا انجام آزمون ها در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

### ۲-۳-۳- آزمایشات

#### ۲-۳-۱- اندازه گیری اسیدیته و pH

اسیدیته و pH نمونه های دوغ بر اساس استاندارد ملی ایران به شماره ۲۸۵۲ (۱۳۸۵) و ماده خشک بدون چربی بر اساس استاندارد ملی ایران به شماره ۶۳۷ (۱۳۹۳) اندازه گیری شد [۲] و [۳].

#### ۲-۳-۲- اندازه گیری میزان دوفاز شدن

برای بررسی میزان دو فاز شدن، نمونه های دوغ، داخل فالكون های ۵۰ میلی لیتری در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ روز نگهداری شدند. سپس میزان فاز سرمی (فاز بالایی) توسط خط کش، اندازه گیری و مقدار جدایش فازها بر حسب درصد حجمی کل نمونه با استفاده از رابطه ۱ اندازه گیری شد [۱۱ و ۳۱].

#### ارتفاع آب شفاف

$$\text{درصد دوفازی} = \frac{\text{ارتفاع آب شفاف}}{\text{ارتفاع کل}} \times 100$$

#### ۲-۳-۳- اندازه گیری ویژگی های رئولوژیک

برای بررسی رفتار جریان دوغ و اندازه گیری گرانیوی ظاهری نمونه ها، از دستگاه رئومتر (Physica Anton Paar مدل MCR 301، اتریش) مجهز به رئومتری استوانه های هم

[۳۹]. با توجه به مطالب ذکر شده، هدف اصلی از این پژوهش بررسی امکان افزایش پیوندهای عرضی در ساختار پروتئین های شیر با استفاده از کسسانتره پروتئینی شیر و آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی به منظور افزایش پایداری دوغ در طی نگهداری بوده است.

### ۲- مواد و روش ها

#### ۲-۱- مواد

شیر پاستوریزه مورد استفاده از شرکت شیر پگاه آذربایجان شرقی تهیه شد (جدول ۱). کشت باکتریایی ماست از نوع کشت مستقیم و به صورت خشک شده انجمادی از شرکت لاکتینا (بلغارستان)، آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی تولید شده توسط باکتری استرپتومایسس موبارانسیس<sup>۱</sup> به حالت پودری لیوفیلیزه دارای فعالیت ۱۲۵-۸۰ واحد/گرم پروتئین از شرکت بی دی اف<sup>۲</sup> (اسپانیا) و کسسانتره پروتئینی شیر (MPC)، شامل کازئین و لاکتالبومین) حاوی ۷۰ درصد پروتئین از شرکت فونترا<sup>۳</sup> (نیوزیلند) خریداری شدند. سایر مواد شیمیایی مورد استفاده در آزمایش ها نیز از شرکت مرک<sup>۴</sup> آلمان تهیه شدند.

#### ۲-۲- روش تولید نمونه های دوغ

شیر خام مورد استفاده از نظر چربی به ۰/۶ درصد استاندارد شده و در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه پاستوریزه و در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد با فشار ۱۸۰ بار هموژنیزه شد. سپس در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد MPC در سطوح صفر، ۰/۵ و ۱ درصد به نمونه های شیر اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در همین دما هم زده شدند. با توجه به اینکه شیر دارای ۳/۳ درصد پروتئین بود، آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی (MTG) (واحد بر گرم پروتئین) نیز در سطوح صفر، ۰/۵ و ۱ درصد به نمونه های شیر افزوده و به مدت یک ساعت

<sup>1</sup> Streptomyces mobaraensis

<sup>2</sup> BDF Natural Ingredients

<sup>3</sup> Fonterra

<sup>4</sup> Merck

## ۲-۴- تجزیه و تحلیل آماری

به منظور بررسی اثر دو متغیر مستقل آنزیم ترانس گلو تامیناز میکروبی و کنسانتره پروتئین شیر بر خصوصیات مختلف دوغ صنعتی از روش سطح پاسخ (RSM) در نرم افزار 10 Design Expert نسخه 8.0.2.0 استفاده شد. طبق آزمایش‌های مقدماتی دامنه هر یک از متغیرهای مستقل تعیین (جدول ۲) و پس از آن، ۳ سطح از هر یک از متغیرهای مستقل با ۱۳ تیمار و ۵ تکرار در نقطه مرکزی طرح انتخاب و سپس تاثیر مستقل فاکتورها و اثرات متقابل آنها در سطح اطمینان ۹۵ درصد ( $P < 0.05$ ) مورد بررسی قرار گرفت. بر داده‌های حاصل از آزمایش‌ها مدل چند جمله‌ای درجه دوم برازش داده شد (رابطه ۲). در این رابطه  $Y$  پاسخ پیش بینی شده،  $b_0$  ضریب ثابت،  $b_i$  اثرات خطی،  $b_{ii}$  اثر مربعات و  $b_{ij}$  اثرات متقابل و  $x_i$ ،  $x_j$  متغیرهای مستقل کد بندی شده هستند. معنی داری ضرایب مدل با استفاده از آنالیز واریانس برای هر پاسخ تعیین شد. کفایت مدل با استفاده از  $R^2$ ،  $R^2$  اصلاح شده و آزمون Lack of fit مورد بررسی قرار گرفت.

رابطه (۲) 
$$Y = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_{ii} x_i^2 + \sum b_{ij} x_i x_j$$
 به منظور تعیین مقدار بهینه متغیرهای مستقل در دوغ و دستیابی به بهترین فرمولاسیون، حد بالا و پایین و مطلوب هر یک از ویژگی‌های اندازه گیری شده (پاسخ‌ها) و اهمیت آنها تعیین و سپس با روش بهینه سازی عددی نرم افزار Design Expert مقادیر بهینه متغیرهای مستقل تعیین گردید. به منظور اعتبارسنجی مدل ارائه شده، نمونه بهینه تهیه و پس از انجام آزمایش‌ها نتایج بدست آمده با مقادیر برآورده شده توسط نرم افزار SAS و آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد با یکدیگر مقایسه شد.

مرکز (CC27) در دمای محیط استفاده شد. ویسکوزیته در سرعت برشی  $1000s^{-1}$  - ۲ اندازه گیری شد [۴۳].

## ۲-۳-۴- تعیین توزیع اندازه ذرات

جهت بررسی اندازه ذرات یک روز بعد از تولید، از روش پراکنش نور استاتیک استفاده شد و قطر متوسط ذرات کلوئیدی در تیمارهای مختلف توسط دستگاه اندازه گیری ذرات (Malvern، مدل 2000s، انگلستان) تعیین گردید [۳۰]. اندازه گیری بر اساس اصل فرانوفر، پس از گذشت حداقل ۲۰ ساعت از زمان تولید نمونه‌ها انجام شد تا حالتی پایدار در نمونه‌ها حاصل شده باشد. جهت اطمینان بیشتر، پس از خارج شدن از یخچال دمای نمونه‌ها به دمای اتاق رسانده شد.

## ۲-۳-۵- اندازه گیری پتانسیل زتا

برای تعیین پتانسیل زتای نمونه بهینه از دستگاه اندازه گیری پتانسیل زتا (Malvern، مدل MAL 1032660، انگلستان) استفاده شد. برای این منظور، هر یک از نمونه‌ها نخست با استفاده از آب مقطر ۵۰ برابر رقیق شده، سپس توسط سرنگی داخل لوله موئین (سل) منتقل و لوله موئین در محل مخصوص داخل دستگاه قرار گرفت. اندازه گیری پتانسیل زتا در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و توان ۱۴۹ وات انجام شد [۴۶].

## ۲-۳-۶- ارزیابی خواص حسی

برای ارزیابی ویژگی‌های حسی نمونه‌های دوغ، مهم‌ترین خصوصیات ارگانولپتیکی شامل رنگ، طعم، بافت به صورت پذیرش کلی توسط ۳۰ پانلیست (ارزیاب چشایی) غیر حرفه‌ای (۲۲ زن و ۸ مرد گروه سنی ۲۲ تا ۴۰) بر اساس آزمون هدونیک ۵ نقطه‌ای و با استفاده از پرسش‌نامه مورد ارزیابی قرار گرفتند [۱۲].

جدول ۲- نمایش متغیرهای مستقل فرآیند

متغیر مستقل	نماد ریاضی	کد و سطح مربوطه		
		-۱	۰	+۱
کنسانتره پروتئینی شیر	X1	۰	۰/۵	۱
آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی	X2	۰	۵	۱۰

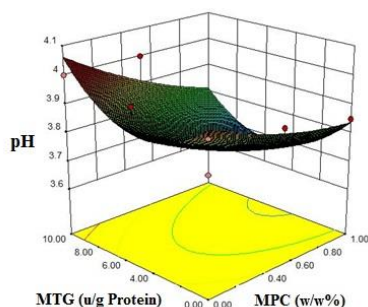
### ۳- نتایج و بحث

#### ۳-۱- اثر آنزیم ترانس گلوتامیناز و پروتئین شیر بر pH دوغ

با توجه به معنی دار بودن مدل و غیر معنی دار بودن عدم برازش داده‌ها می‌توان اعتبار و صحت مدل دو فاکتوری برازش شده را تایید کرد (جدول ۳). نتایج نشان داد که اثر خطی متغیر مستقل کنسانتره پروتئین شیر (X1) و همچنین اثر درجه دوم آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی (X2<sup>2</sup>) بر pH نمونه‌های دوغ در سطح احتمال ۵ درصد معنی دار بود (p>۰/۰۵) در حالی که اثر ساده آنزیم ترانس گلوتامیناز و اثر متقابل آن با پروتئین شیر بر تغییرات pH محصول نهایی معنی دار نبود (p>۰/۰۵)، بنابراین با حذف عبارات غیر معنی دار از مدل، رابطه ۳ نتایج مدل سازی فاکتورهای برازش مدل را بر میزان pH نمونه‌های تولید شده نشان می‌دهد. در این تحقیق مقدار pH نمونه‌های دوغ از ۳/۶۱ تا ۴/۱ متغیر بود (جدول ۴). مطابق با نتایج به دست آمده با افزایش غلظت کنسانتره پروتئین شیر تا ۱٪، pH نمونه‌های دوغ به طور چشمگیری کاهش یافت (p<۰/۰۵) که علت آن احتمالاً افزایش ماده خشک دوغ و تحریک فعالیت متابولیکی باکتری‌های استارتر اسیدزا در اثر افزودن کنسانتره پروتئین شیر می‌باشد. این یافته‌ها با نتایج غلامحسین پور و مظاهری (۱۳۹۰) همخوانی داشت، به طوریکه گزارش کردند با افزودن MPC در فرمولاسیون خامه کم چرب، pH به طور معنی‌داری کاهش یافته و از ۷/۲۳ در نمونه شاهد به ۶/۸۳ در نمونه حاوی ۹/۳ درصد MPC رسید [۹]. از سوی دیگر با

توجه به معنی دار بودن اثر توان دوم آنزیم ترانس گلوتامیناز اثر آن بصورت منحنی می‌باشد بدین معنی که با افزایش مقدار آنزیم تا میزان ۵ واحد بر گرم پروتئین، تغییرات pH روند کاهشی داشت ولی در ادامه با افزایش این آنزیم تا مقدار ۱۰ واحد در فرمولاسیون دوغ، روند pH افزایش یافته است (شکل ۱). در یک مطالعه نوعی ماست بدون چربی که با استفاده از ایزوله پروتئین سویا و MTG تولید شده بود، pH و اسیدیته بیشتری نسبت به نمونه‌های شاهد بعد از ۱۵ روز نگهداری داشتند [۲۳]. همچنین در گزارشات دیگر که ماست تیمار شده با آنزیم MTG تولید شد، تیمار آنزیمی تفاوت معنی‌داری در میزان pH و اسیدیته نمونه‌های تیمار شده و کنترل مشاهده نشد [۳۴، ۴۲ و ۵۲].

$$pH = 0.977 - 0.241x_1 + 0.563x_2^2$$



شکل ۱- اثر غلظت‌های مختلف کنسانتره پروتئین شیر (MPC) و آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی (MTG) بر میزان pH دوغ

جدول ۳- نتایج جدول آنالیز واریانس تاثیر آنزیم گلوتامیناز و پروتئین شیر بر ویژگی‌های دوغ

منبع تغییرات	pH		اسیدیته		ویسکوزیته		درصد دوفازه شدن		پذیرش کلی	
	Pr>F	مجموع	Pr>F	مجموع	Pr>F	مجموع	Pr>F	مجموع		
	مربعات	مربعات	مربعات	مربعات	مربعات	مربعات	مربعات	مربعات	مجموع	
مدل	۰/۰۲۱	۹/۱۴	۰/۰۰۸	۰/۰۰۰۰۴۵	۰/۰۰۰۰۳	۰/۰۰۰۰۰۴۵	۰/۰۰۰۰۱	۳۳۳۵/۶	۱۲/۷۳	۰/۰۱۱
(MPC)X <sub>1</sub>	۰/۰۱۱	۰/۵۶	۰/۰۰۲۲	۰/۰۰۰۰۰۵۴	۰/۰۰۵۰۶	۰/۰۰۰۰۰۵۴	۰/۰۰۰۳۳	۹۶/۰۰	۱/۵	۰/۰۷۹
(MTG)X <sub>2</sub>	۰/۰۱۳۵	۰/۰۰۱۳۵	۰/۰۳۷۸	۰/۰۰۰۰۰۴۱	۰/۰۰۰۰۱	۰/۰۰۰۰۰۴۱	۰/۰۰۰۰۱	۲۴۴۰/۱۷	۲/۶۷	۰/۰۲۹
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	۰/۰۰۱۸۴	۰/۰۰۱۸۴	۰/۰۸۴۸	۰/۰۰۳۶	-	-	۰/۱۲۰	۱۵/۶۴	۴/۳۸	۰/۰۱۰
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	۰/۰۰۵۵	۰/۰۰۵۵	۰/۰۱۷۸	۰/۰۰۱۷۸	-	-	۰/۰۰۰۰۱	۷۱۷/۷۵	۰/۱۶	۰/۵۲۴
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	۰/۰۰۳۲۰	۰/۰۰۳۲۰	۰/۰۰۳۳	۰/۰۰۳۳	-	-	۰/۰۰۳۱۶	۳۶/۰۰	۴/۰۰	۰/۰۱۲
فقدان برازش	۰/۰۲۴	۰/۰۲۴	۰/۰۶۸۱	۰/۰۶۸۱	۰/۰۵۵۲	۰/۰۰۰۰۰۶۴	۰/۰۳۶۷	۱۷/۹۳	۰/۵۱	۰/۸۰۱
خطای خالص	۰/۰۰۹۹۲	۰/۰۰۹۹۲	-	-	۰/۰۰۰۰۰۴۶	۰/۰۰۰۰۰۴۶	-	۱۷/۲۰	۲/۰۰	-

### ۳-۲- اثر آنزیم ترانس گلوتامیناز و پروتئین شیر بر میزان اسیدیته دوغ

با توجه به نتایج حاصل از آنالیز واریانس (جدول ۳)، مدل در سطح احتمال ۰/۰۱ معنی دار بود. از بین متغیرهای تاثیرگذار بر محتوای اسیدیته نمونه‌های دوغ، اثر خطی کنسانتره پروتئین شیر و آنزیم ترانس گلوتامیناز، اثر توان دوم آنزیم و همچنین اثر متقابل دو فاکتور مورد بررسی (X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>) بر تغییرات اسیدیته نمونه‌های دوغ معنی دار بود (p<۰/۰۵). نمودار سطح پاسخ اثر متغیرهای فرایند بر تغییرات اسیدیته دوغ در شکل ۲ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود با افزایش MPC میزان اسیدیته نمونه‌های دوغ نیز افزایش پیدا کرد که یکی از دلایل آن بالاتر بودن اسیدیته MPC نسبت به دوغ می‌باشد. افزایش اسیدیته نمونه‌ی حاوی MPC می‌تواند به دلیل اثر متفاوت آن بر رشد باکتری‌های آغازگر ماست و تولید اسید به وسیله آن‌ها نیز باشد. این در حالی بود که افزودن آنزیم ترانس گلوتامیناز منجر به تغییر انحناداری در اسیدیته دوغ گردید بدین معنی که برخلاف میزان pH، افزودن آنزیم تا میزان ۵ واحد منجر به افزایش اسیدیته نمونه‌ها گردید ولی در ادامه تا سطوح ۱۰ واحد آنزیم از میزان اسیدیته محصول نهایی کاسته گردید (شکل ۲). بدین ترتیب بالاترین میزان اسیدیته

در نمونه حاوی ۱ درصد MPC و ۵ واحد بر گرم پروتئین آنزیم و نمونه حاوی ۱ درصد MPC و ۱۰ واحد بر گرم پروتئین آنزیم مشاهده گردید که به ترتیب برابر با ۰/۶۸ و ۰/۷۰ درصد بر حسب لاکتیک به دست آمد (جدول ۴).

به‌طور کلی با افزایش غلظت آنزیم در ماست، افزایش اسیدیته قابل تیترا و افت pH کاهش یافت و در بالاترین غلظت آنزیم اضافه‌شده به شیر پیشرفت اسیدیته در دوغ حین نگهداری کندتر شد. یکی از دلایل مهم برای رشد کند استراتر با افزودن آنزیم ترانس گلوتامیناز، این است که پپتیدهای با وزن مولکولی کم و یا اسید آمینه‌ای که برای رشد استریپتوکوکوس ترموفیلوس مورد نیاز هستند، توسط آنزیم ترانس گلوتامیناز دچار اتصالات عرضی شده و تا حدودی برای استریپتوکوکوس غیر قابل دسترس می‌شود [۱۰ و ۴۰].

اثر متقابل MPC و MTG بیانگر این است که با وجود اینکه هر دوی این مواد باعث افزایش اسیدیته می‌شوند، ولی آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی در حضور کنسانتره پروتئین شیر منجر به کاهش مضاعف اسیدیته می‌شود که مشابه با نتایج جوینده و همکاران (۲۰۱۵) است [۲۷] ولی اوزرا و همکاران (۲۰۰۶) و سانلی و همکاران (۲۰۱۱) بیان کردند افزودن آنزیم ترانس گلوتامیناز در فرآورده‌های لبنی اثر معنی‌داری بر اسیدیته

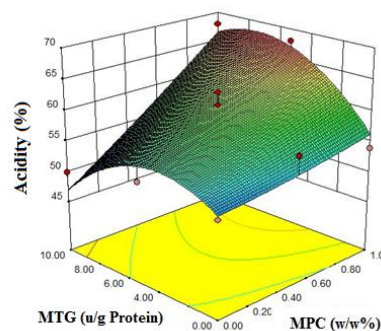
آنالیز واریانس (جدول ۳) مدل سطح پاسخ در سطح احتمال ۰/۰۱ معنی دار و عدم برآزش مدل غیر معنی دار بود که نشان دهنده مناسب بودن مدل می باشد. همانطور که مشاهده می شود در بین متغیرها فقط اثر خطی آنزیم ترانس گلوتامیناز بر تغییرات ویسکوزیته نمونه های دوغ معنی دار بود ( $p < 0/05$ )، البته اثر خطی پروتئین شیر به رغم غیر معنی دار بودن در سطح احتمال ۵ درصد، اما نزدیکی بالایی به معنی داری داشت ( $p = 0/0506$ )، بنابراین اثر آن قابل توجه می باشد. بررسی اثرات درجه دوم و اثر متقابل دو فاکتور نیز حاکی از عدم معنی داری آن بر تغییرات ویسکوزیته دوغ می باشد. بنابراین مدل پیشنهادی توسط نرم افزار به صورت رابطه ۵ با  $R^2 = 0/686$  ارایه شد.

$$Viscosity(Pa.s) = 4740.12 - 1912.181x_1 + 5186.48x_2$$

بررسی رفتار جریانی دوغ توسط دستگاه رئومتر نشان داد که نمونه های دوغ دارای آنزیم ترانس گلوتامیناز در مقایسه با نمونه شاهد، در سرعت های برشی ثابت دارای تنش های برشی و در نتیجه ویسکوزیته ظاهری بالاتری بودند (شکل ۳). تاثیر افزایش آنزیم ترانس گلوتامیناز بر افزایش ویسکوزیته تیمارها را می توان ناشی از عملکرد MTG در ایجاد پلیمریزاسیون و تشکیل شبکه پروتئینی سه بعدی با قدرت نگهداری آب بالا دانست. پژوهش آندو و همکاران (۱۹۸۹) نیز گواه بر این است که استفاده از MTG موجب افزایش ویسکوزیته محلول های پروتئینی می شود [۲۰]. گوچی و همکاران (۲۰۰۹) نیز ایجاد اتصالات عرضی بین پروتئین آب پنیر تحت تاثیر عمل MTG را بررسی نمودند و نتیجه گرفتند که رفتار سودوپلاستیک نمونه ها، به علت تشکیل پلی مرهایی با وزن مولکولی بالا ناشی از عمل MTG بوده است [۲۳]. MTG با برقراری اتصالات عرضی درون مولکولی بین مولکول های پروتئین پلی مرهایی با وزن مولکولی بالا تشکیل می دهد. از سوی دیگر تنش برشی بالاتر منجر به تبدیل ذرات بزرگ به ذرات کوچک اولیه در دوغ حاوی آنزیم ترانس گلوتامیناز می شود که این مساله منجر به ایجاد ویسکوزیته بالا در

ندارد [۴۰ و ۴۲]. اسیدیته قابل تیت در فرآورده های لبنی به مقدار آلومین، فسفات، سترات و دی اکسید کربن موجود در آن ها بستگی دارد. با افزودن MPC به نمونه دوغ، مقدار ماده خشک بدون چربی، پروتئین و به دنبال آن آلومین در مخلوط افزایش یافته و این امر موجب افزایش اسیدیته مخلوط می شود. در تحقیقی که توسط بیرقی طوسی و همکاران (۱۳۸۵) انجام شد، نتایج حاکی از این بود که اسیدیته ماست های غنی شده با WPC در طی ۲۱ روز نگهداری افزایش یافت. همچنین اسیدیته این ماست ها نسبت به نمونه شاهد با سرعت بیشتری افزایش یافت که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد [۴]. مدل پیشنهادی نرم افزار برای پیش بینی میزان اسیدیته نمونه های دوغ با ضریب تبیین ۰/۷۲۶۸ به صورت رابطه ۴ به دست آمد.

$$Acidity(\%) = 52.62 + 2.231x_1 - 22.55x_2^2 + 16x_1x_2$$



شکل ۲- اثر غلظت های مختلف کنسنتره پروتئین شیر (MPC) و آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی (MTG) بر تغییرات اسیدیته دوغ

### ۳-۳- اثر آنزیم ترانس گلوتامیناز و پروتئین شیر بر میزان ویسکوزیته دوغ

ویسکوزیته دوغ تحت تاثیر عوامل متعددی مانند ترکیبات تشکیل دهنده بخصوص چربی و پایدارکننده، نوع و کیفیت اجزاء، فراوری مخلوط، غلظت و دما می باشد. مطابق با نتایج



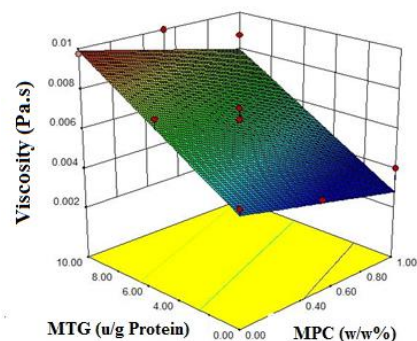
### ۳-۴- اثر آنزیم ترانس گلوتامیناز و پروتئین شیر بر درصد دوفاز شدن دوغ

طبق نتایج آنالیز واریانس مشخص شد که عبارات معنی دادر مدل شامل اثر خطی MPC و MTG و همچنین اثر متقابل این دو متغیر مستقل و اثر توان دوم MTG بود و در این بین فقط اثر توان دوم MPC بر تغییرات دوفاز شدن دوغ اثر معنی داری نداشت (جدول ۳). رابطه ۶ با همبستگی بالا ( $R^2=0.9793$ ) برای پیش بینی میزان دوفاز شدن نمونه‌های دوغ به دست آمده است.

$$PhaseSeparation = 75.87 + 7.52x_1 - 9.88x_2 + 0.64x_2^2 - 1.2x_1x_2$$

اثر غلظت‌های مختلف کنسانتره پروتئین شیر و آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی بر میزان دوفاز شدن دوغ در شکل ۴ آورده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود افزایش کنسانتره پروتئین شیر و آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی منجر به کاهش میزان دوفاز شدن در تیمارهای دوغ شده است. این امر ممکن است ناشی از تاثیر MPC بر ویژگی‌های رفتار جریان و کاهش منافذ محتوی آب در شبکه‌های پروتئینی باشد. آمینگو و همکاران (۲۰۰۹) نیز بیان کردند که MPC باعث افزایش قابلیت جذب آب در محصولات لبنی مانند ماست، سس کم چرب و غیره می‌شود و از طریق کاهش آب اندازی و همچنین افزایش ویسکوزیته محصولات حاوی این ترکیب اثر خود را نشان می‌دهد [۱۶]. امام جمعه و همکاران (۲۰۰۸) نیز بدین نتیجه رسیدند که با افزایش میزان کنسانتره پروتئینی آب پنیر میزان آب انداختگی خامه کاهش می‌یابد [۲۱]. همچنین ثابت شده است که تیمار آنزیمی منجر به ایجاد اتصالات عرضی بخصوص کازئین‌ها و افزایش ظرفیت نگهداری آب در شبکه‌های ژلی می‌شود [۳۶] که مجموع این عوامل منجر به کاهش دوفاز شدن دوغ می‌گردد. با توجه به نتایج میانگین تیمارها که در جدول ۴ آورده شده است، پایدارترین نمونه با کمترین درصد دوفاز شدن (۲۲ درصد) مربوط به نمونه دوغ حاوی ۱ درصد MPC و ۱۰ واحد بر گرم پروتئین MTG و ناپایدارترین نمونه با بیشترین

سرعت‌های برشی پایین می‌شود. نتایج مشابهی روی ماست هم‌زده توسط Jaros و همکاران (۲۰۰۷) گزارش شده است مبنی بر اینکه نوشیدنی‌های تخمیری شیر حاوی استابلایزر و فاقد استابلایزر، رفتار جریانی سودوپلاستیک دارند. تیمار آنزیمی، منجر به افزایش خاصیت رقیق شونده با برش (سودوپلاستیک) در نمونه‌های دوغ شده است [۲۵]. نتایج مشابهی روی ماست هم‌زده حاوی آنزیم ترانس گلوتامیناز توسط سانلی و همکاران (۲۰۱۱) گزارش شده است [۴۲]. همچنین نتایج نشان داد که در دوغ‌های تیمار شده با آنزیم ترانس گلوتامیناز، تنش‌های برشی بالاتری لازم است تا ساختار تکه‌های ژلی از هم گسیخته شود که نتیجه آن مقدار ویسکوزیته‌های بالاتر در سرعت‌های برشی پایین‌تر است. مطابق با جدول ۴ بیشترین ویسکوزیته مربوط به نمونه حاوی ۰/۵ درصد MPC و ۱۰ واحد MTG با مقدار ۰/۰۱۶۳ سانتی پواز و کمترین آن به تیمار ۶ (حاوی ۱٪ MPC و ۵ واحد آنزیم) با مقدار ۰/۰۱۱ سانتی پواز بود. در تحقیقی که توسط مهدیان و همکاران (۱۳۹۱) روی بستنی کم‌چرب انجام شد، نمونه‌های حاوی کنسانتره پروتئینی شیر ویسکوزیته ظاهری بالاتری نسبت به نمونه حاوی اینولین داشتند که با یافته‌های این پژوهش تناقض دارد [۱۳].

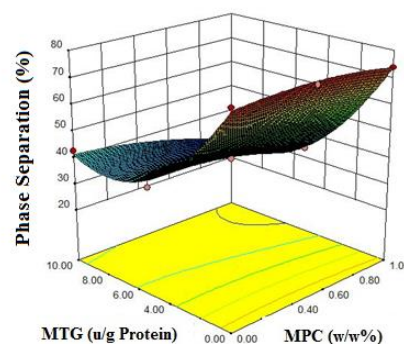


شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف کنسانتره پروتئین شیر (MPC) و آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی (MTG) بر میزان ویسکوزیته دوغ

$$Overall\ Acceptance = 2.75 - 4.63x_2 - 5.03x_1^2 + 4x_1x_2$$

مطابق با شکل ۵، افزایش MPC و MTG باعث بهبود ویژگی های حسی نمونه های دوغ تهیه شده داشتند بطوریکه با افزایش MPC تا میزان ۰/۵٪ و همچنین MTG تا مقدار ۱۰ واحد بر گرم پروتئین، بر میزان امتیاز ارزیابان به خواص حسی دوغ افزوده گردید. آنزیم ترانس گلوتامیناز با تأثیر اندک بر رشد استارتر ماست، باعث اختلاف کم در بو و طعم نمونه های تیمارشده با MTG و نمونه های فاقد آن می شود و همانطور که در شکل هم مشاهده می شود هر چه دز مصرف آنزیم افزایش می یابد شیب افزایش نمودار سطح پاسخ کاسته می شود بطوریکه بیشترین تأثیر مربوط به همان دوز ۱۰ واحد می باشد. این نتایج با یافته های وروبلسکا و همکاران (۲۰۰۹) همخوانی داشت که نشان دادند پذیرش کلی کفیر حاوی MTG به طور چشمگیری بیشتر از نمونه های کنترل (بدون MTG) بود [۵۰]. دوماگالا و همکاران (۲۰۱۳) نیز با تهیه ماست از شیر حاوی MTG، دریافتند این آنزیم خواص بافتی و کیفی محصول را تحت تأثیر قرار داده و میزان سینریزس را کاهش می دهد [۲۰]. طبق نتایج، افزودن مقادیر بیشتر MPC (>۱٪) نیز منجر به کاهش امتیاز پذیرش کلی نمونه های دوغ شد که یکی از دلایل آن میتواند دانه ای شدن بافت دوغ باشد که برخی از داوران حسی نیز به آن اشاره کرده بودند. نتیجه مشابهی نیز توسط بیرقی طوسی و همکاران (۱۳۸۵) در نتیجه کاربرد کنسانتره پروتئینی شیر در ماست گزارش شده است. آن ها عنوان کردند که دانه ای شدن بافت ماست در اثر افزودن مقادیر بالاتر مکمل پروتئینی شیر یکی از عوامل اصلی کاهش امتیاز پذیرش نمونه های ماست بود. دانه ای شدن بافت می تواند به دلیل لخته ای شدن دو مرحله ای باشد، بدین صورت که انعقاد پروتئین های آب پنیر در pH=۵/۲ رخ میدهد در حالیکه انعقاد ذرات کازئین شیر هنگامی که pH به کمتر از ۴/۸ می رسد، آغاز می گردد که این تأخیر زمانی، باعث بی نظمی و فشارهای موضعی در شبکه

درصد دو فازه شدن (۷۸ درصد) مربوط به نمونه ی کنترل یا شاهد فاقد MTG و MPC ارزیابی شد که حاکی از اثر مثبت این دو متغیر در سطوح مورد استفاده بر کاهش دو فازه شدن نمونه های دوغ می باشد.



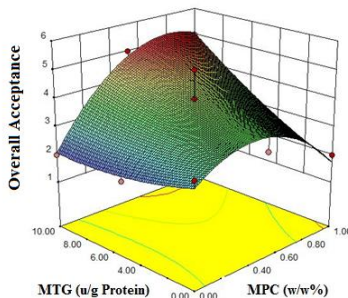
شکل ۴- اثر غلظت های مختلف کنسانتره پروتئین شیر (MPC) و آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی (MTG) بر درصد دو فازه شدن دوغ

### ۳-۵- اثر آنزیم ترانس گلوتامیناز و پروتئین شیر بر پذیرش کلی محصول نهایی

خواص حسی از عوامل اساسی پذیرش بسیاری از فرآورده ها و کسب رضایت از مصرف آنهاست. با توجه به اهمیت این خواص، بررسی و شناخت عوامل موثر بر آنها به منظور دستیابی به خواص حسی بهینه و جلوگیری از ایجاد خواص حسی نامطلوب ضروری است [۴۷]. نتیجه حاصل از ارزیابی حسی حاکی از آن بود که در بین اثرات خطی دو فاکتور مورد بررسی تنها MTG در سطح احتمال ۰/۰۵ تأثیر معنی دار بر پذیرش کلی نمونه های دوغ تهیه شده داشت ( $p < 0/05$ ). همچنین مشخص شد که اثر متقابل این دو متغیر مستقل و اثر درجه دوم MPC نیز بر پذیرش و مقبولیت کلی نمونه ها معنی دار بوده است (جدول ۳). بالا بودن ضریب تبیین (۰/۹۷۹۳) و معنی دار نبودن آماری فاکتور عدم برآزش در مورد مدل های رگرسیونی پذیرش کلی نشان از صحت پیش گویی مدل دارد (رابطه ۷).

۴ و بیشتر را دریافت کردند در حالیکه در بیشتر تیمارهای حاوی این متغیرها بصورت تکی در غلظتی مشابه امتیاز پذیرش کلی کمتر از ۴ می باشد و این مسئله اثر سینرژیستی این دو ترکیب در بهبود خواص حسی محصول نهایی را تایید می کند.

پروتئینی و در نتیجه شکستگی های کوچک درون ژل و دانه ای شدن ماست می شود [۴]. نتایج میانگین تیمارها (جدول ۴) نشان می دهد که اثر ترکیبی MPC و MTG بر بهبود خواص حسی دوغ تولید شده بیشتر از اثر هر یک از این ترکیبات بود بطوری که نمونه های حاوی ترکیبی از ۱-۰/۵ درصد MPC و ۱۰ واحد بر گرم پروتئین آنزیم MTG امتیاز



شکل ۵- اثر غلظت های مختلف کنسانتره پروتئین شیر (MPC) و آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی (MTG) بر خواص حسی (پذیرش کلی) دوغ

جدول ۴- میانگین نتایج ویژگی های فیزیکی، شیمیایی و حسی دوغ های تهیه شده با استفاده از آنزیم MTG و MPC

تیمار	MPC (%)	MTG (%)	pH	اسیدیته (اسید لاکتیک)	ویسکوزیته (سانتی پواز)	دوفازه شدن (%)	ویژگی های حسی (پذیرش کلی)
۱	۰	۰	۳/۸۲	۰/۴۷	۰/۰۰۲۰	۷۸	۳
۲	۱	۰	۳/۷۲	۰/۴۵	۰/۰۰۱۵	۷۴	۳
۳	۰	۱۰	۴/۰۳	۰/۴۵	۰/۰۰۹۸	۴۲	۳
۴	۱	۱۰	۳/۶۴	۰/۷۰	۰/۰۰۸۸	۲۲	۴
۵	۰	۵	۳/۹۷	۰/۴۸	۰/۰۰۷۸	۴۲	۳
۶	۱	۵	۳/۶۱	۰/۶۸	۰/۰۰۱۱	۳۴	۳
۷	۰/۵	۰	۳/۸۷	۰/۵۵	۰/۰۰۳۹	۷۶	۳
۸	۰/۵	۱۰	۴/۱	۰/۴۶	۰/۰۱۶۳	۷۵	۴
۹	۰/۵	۵	۳/۶۱	۰/۶۵	۰/۰۰۶۰	۴۲	۴
۱۰	۰/۵	۵	۳/۶۶	۰/۶۵	۰/۰۰۷۰	۳۸	۵
۱۱	۰/۵	۵	۳/۵۷	۰/۶۵	۰/۰۰۷۱	۳۷	۴
۱۲	۰/۵	۵	۳/۶۷	۰/۶۳	۰/۰۰۵۸	۳۸	۳
۱۳	۰/۵	۵	۳/۶۱	۰/۶۲	۰/۰۰۶۵	۳۵	۴

### ۳-۶- بهینه سازی و تأیید آماری مدل های رگرسیونی

شرایط عملیاتی بهینه برای فرمولاسیون دوغ با استفاده از متغیرهای مستقل شامل غلظت های مختلف کنسانتره پروتئین شیر (صفر، ۰/۵ و ۱ درصد) و آنزیم ترانس گلوتامیناز (صفر، ۵ و ۱۰ واحد بر گرم پروتئین) بر روی پارامترهای pH، اسیدیته، ویسکوزیته، درصد دوفاز شدن و پذیرش کلی با استفاده از تکنیک بهینه سازی عددی<sup>۱</sup> نرم افزار

Design Expert جستجو شد. بدین منظور، در ابتدا اهداف بهینه سازی را مشخص کرده و سپس سطوح پاسخ ها و متغیرهای مستقل تنظیم شد که نتایج بهینه سازی با بالاترین مطلوبیت در جدول ۵ ارائه شده است. همانطور که مشاهده می شود مقدار بهینه برای متغیرهای مستقل MPC و MTG به ترتیب ۰/۵۳ درصد و ۱۰ واحد بر گرم پروتئین بدست آمد که با نتایج بررسی خواص فیزیکوشیمیایی و حسی دوغ مطابقت دارد.

جدول ۵- نتایج به دست آمده برای متغیرهای مستقل و پاسخ مربوطه

مقدار بهینه	اهمیت	سطح بالا	سطح پایین	هدف	نام
۰/۵۳	۳	۱	۰	محدوده	MPC (% وزنی)
۱۰	۳	۱۰	۰	محدوده	MTG (واحد بر گرم پروتئین)
۴	۳	۴	۳/۶۵	۴	pH
۴۵	۳	۷۸	۲۲	حداقل	دو فازه شدن (درصد)
۰/۰۰۹۹۹	۳	۰/۰۱۶۳	۰/۰۰۳۹	حداکثر	ویسکوزیته (پاسکال ثانیه)
۰/۵۲	۳	۰/۶	۰/۵۵	محدوده	اسیدیته (اسید لاکتیک)
۵/۰۰	۳	۵	۲	حداکثر	مقبولیت کلی (۱-۵)
۰/۸۳۴					حد مطلوبیت

<sup>۱</sup>-Numerical optimization

در ادامه جهت تایید مقدار بهینه بدست آمده و صحت مدل‌های رگرسیونی تیمار بهینه با شرایط یکسان همانند سایر تیمارها تولید و نتایج پیشگویی شده توسط مدل مقایسه گردید. نتایج حاصل از ارزیابی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی نمونه‌های دوغ (نمونه شاهد، نمونه بهینه) در جدول ۶ نشان داده شده است. بررسی میزان دوفازه شدن تیمارهای دوغ نشان داد که نمونه شاهد دارای بیشترین دوفاز شدن می‌باشد و با افزودن سطوح بهینه کنسانتره پروتئین شیر و آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی میزان دوفازه شدن به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ( $p < 0.05$ ). این نتایج احتمالاً به دلیل جذب آب به‌وسیله کنسانتره پروتئین شیر و اتصالات عرضی MPC با کازئین‌های شیر توسط آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی می‌باشد. نتایج حاصل از ویسکوزیته ظاهری اختلاف معنی‌داری را بین نمونه شاهد و نمونه بهینه در سرعت برشی  $10 \text{ VS}^{-1}$  نشان داد. این در حالی بود که از نظر pH و اسیدیته نمونه بهینه انتخاب شده اختلاف معنی‌داری با نمونه شاهد نداشت ( $p > 0.05$ ). بررسی ویژگی‌های ارگانولپتیکی توسط ۳۰ نفر ارزیاب غیر حرفه‌ای نیز نشان داد نمونه بهینه تفاوت معنی‌داری با نمونه شاهد دارد.

### ۲-۳- تاثیر تیمارهای مورد بررسی بر اندازه ذرات و پتانسیل زتا

در یک سیستم کلوئیدی، اختلاف پتانسیل بین لایه‌ی یونی غیر متحرک (لایه استرن) و لایه متحرک (لایه انتشار) در اتمسفر یونی اطراف ذرات باردار، پتانسیل زتا نامیده می‌شود. پتانسیل زتا بهترین شاخص برای تعیین وضعیت الکتریکی سطح ذرات است چون نشان دهنده‌ی میزان تجمع بار در لایه‌ی غیر متحرک و شدت جذب یون‌های مخالف بر روی سطح ذره است. بنابراین بار ذرات، اغلب بر حسب پتانسیل زتا گزارش می‌شوند. بالا بودن پتانسیل زتای ذرات کلوئیدی موجب بالا رفتن نیروی دافعه الکترواستاتیک و در نتیجه افزایش پایداری فیزیکی سیستم می‌شود. عوامل مختلفی از جمله pH، دما، قدرت یونی، نوع و غلظت ماکرومولکول‌های پلی ساکاریدی

و پروتئینی مورد استفاده، نسبت بین آن‌ها و غیره بر روی میزان بار سطحی، تحرک الکتروفوریتیک و پتانسیل زتای کمپلکس حاضر موثر است [۷]. پتانسیل زتا به عنوان شاخص بار الکتریکی گلبول‌های چربی شیر و میسل‌های کازئین استفاده می‌شود و به‌عنوان یک گزینه مناسب جهت توضیح مکانیسم پایداری مطرح می‌شود. میزان پتانسیل‌های زتای میسل کازئین در pH طبیعی (۶/۷)، از ۸- میلی‌ولت تا ۲۲- میل‌ولت گزارش شده است [۴۵]. لازم به ذکر است که روش‌های اندازه‌گیری و شرایط آزمایش، نتایج را به‌طور چشم‌گیری تحت تاثیر قرار می‌دهد. مقادیر پتانسیل زتای تیمارهای دوغ پایدار شده با کنسانتره پروتئین شیر و آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی (جدول ۶) نشان داد پتانسیل زتای نمونه شاهد (۹/۶۶ میلی‌ولت) کمتر از پتانسیل زتای نمونه بهینه (۱۳/۳ میلی‌ولت) بود. این نتایج با نتایج پژوهشی که در آن قدر مطلق پتانسیل زتا در فرآورده‌های شیر زیر ۲۵ میلی‌ولت برآورد شده است همخوانی دارد [۴۹]. اندازه ذرات بر بسیاری از خواص امولسیون مانند جدایی فاز، پایداری در طی نگهداری، مقاومت به رویه بستن، خصوصیات ظاهری، گرانروی، ویژگی‌های حسی و ارگانولپتیکی و غیره تأثیر بسیاری دارد. با افزایش نسبت پروتئین، اندازه ذرات کاهش می‌یابد [۲۹]. دلیل این امر افزایش نسبت پروتئین است که به دلیل برخورداری از فعالیت سطحی بیشتر و نیز شکل کروی و کوچک‌تر باعث کاهش اندازه ذرات می‌گردد. برای اهداف کاربردی در صنایع غذایی- دارویی، هر چقدر اندازه ذرات تشکیل شده کوچک‌تر باشد و در محدوده‌ی مقیاس نانو قرار گیرد، بهتر است زیرا با کاهش اندازه ذرات، نسبت سطح به حجم، دسترسی زیستی، پایداری کلوئیدی و شفافیت محلول‌های حاوی ذرات افزایش می‌یابد [۷]. همان‌طور که در نتایج به- دست آمده مشاهده می‌شود نمونه بهینه تولید شده با کنسانتره پروتئین شیر و آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی اندازه ذرات کوچک‌تری نسبت به نمونه شاهد (بدون پروتئین شیر و آنزیم ترانس گلوتامیناز) داشت. دلیل این امر حضور بیش‌تر پروتئین

کاهش دو فاز شدن می شود. همچنین با توجه به پتانسیل زتا در نمونه بهینه، احتمال تجمع ذرات پروتئین به هم کاهش می یابد و اندازه ذرات کوچکتر می شود.

هاست که به علت بر خورداری از فعالیت سطحی بیش تر و نیز شکل کروی کوچک تر باعث کاهش اندازه ذرات می گردد [۸]. کوچک تر بودن اندازه ذرات باعث افزایش جذب آب و

جدول ۶- نتایج مقایسه نمونه شاهد با نمونه ی بهینه ی تولید شده

پارامتر	نمونه شاهد	نمونه بهینه تولید شده
دو فازه شدن (درصد)	۷۷ <sup>a</sup>	۴۵ <sup>b</sup>
ویسکوزیته (پاسکال ثانیه)	۰/۰۰۵۰۳ <sup>b</sup>	۰/۰۰۹۹۹ <sup>a</sup>
اسیدیته (درصد اسید لاکتیک)	۰/۵۵ <sup>a</sup>	۰/۵۲ <sup>a</sup>
pH	۳/۹۵ <sup>a</sup>	۴/۰۰ <sup>a</sup>
مقبولیت کلی (۱-۵)	۳ <sup>b</sup>	۵ <sup>a</sup>
اندازه ذرات (نانومتر)	۷۲۴۳ <sup>a</sup>	۴۷۲۱ <sup>b</sup>
پتانسیل زتا (میلی ولت)	۹/۶۶ <sup>b</sup>	۱۳/۳ <sup>a</sup>

حروف غیر مشابه در هر ردیف نشان دهنده معنی داری در سطح ۰۰۵ P است.

#### ۴- نتیجه گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد افزودن غلظت های مختلف MTG و MPC بر میزان pH، اسیدیته، ویسکوزیته، دو فازه شدن و ویژگی های حسی نمونه های دوغ موثر بود، به طوریکه با افزایش غلظت کنسانتره پروتئین شیر، pH نمونه ها کاهش و اسیدیته آنها افزایش یافت. در مقابل اثر درجه دوم آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی، منجر به افزایش pH و کاهش اسیدیته تیمارها به خصوص در مقدار میانی ۵ درصد شد. افزودن MTG و MPC به صورت معنی داری منجر به افزایش ویسکوزیته و کاهش میزان دو فازه شدن در تیمارهای دوغ گردید. همچنین این دو فاکتور سبب بهبود ویژگی های حسی در تیمارهای دوغ شد. نتایج بهینه سازی نیز گویای این مطلب بود که با افزودن ۰/۵۳ درصد کنسانتره پروتئین شیر و ۱۰ واحد بر گرم پروتئین آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی طبق داده های نرم افزار می توان به نمونه دوغ صنعتی با ویژگی های مطلوب دست یافت. چرا که افزودن MTG و MPC در نمونه

بهینه منجر به کاهش اندازه ذرات و پتانسیل زتا نسبت به نمونه شاهد و افزایش پایداری آن در طی زمان نگهداری گردید.

#### ۵- منابع

۱. احتیاطی، الف.، شهیدی، ف.، محبی، م. و یاورمنش، م. ۱۳۹۱. بررسی تاثیر WPC و آغازگرهای تولید کننده EPS بر برخی خصوصیات فیزیکی دوغ. نشریه پژوهش های علوم و صنایع غذایی ایران، جلد ۹، شماره ۴، ۲۹۵-۳۰۳.
۲. بیرقی طوسی، ش.، شاکری، م. و مرتضوی، س. ع. ۱۳۸۵. اثر مکمل های کنسانتره پروتئینی آب پنیر و کازئین هیدرولیز شده روی برخی ویژگی های فیزیکی شیمیایی و حسی ماست. فصلنامه علوم و صنایع غذایی ایران، جلد ۳، شماره ۴، ۶۵-۷۴.

۳. جمالی فر، ح.، شاهوردی، ا.، صمدی، ن. و فاضلی، م. ۱۳۸۸. بقا اشرفیاکلی در دوغ‌های صنعتی، سنتی و دوغ پروبیوتیکی حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس. مجله علمی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی، شماره دوم، ۲۹-۲۵.
۴. حسینی اقدم، س.، دزیانی، م.، عزتی، ر.، اردکانی، ع.، دانشی، م.، لاری پور هرات، ر. و بهادری منفرد، الف. ۱۳۹۱. تاثیر آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی بر خصوصیات بافتی و حسی پنیر فرا پالایش. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران. شماره ۵، ۴۸۷-۴۸۱.
۵. خوش منظر، م.، قنبرزاده، ب.، همیشه‌کار، ح.، صوتی خیابانی، م. و رضایی مکر، ر. ۱۳۹۱. بررسی عوامل موثر بر اندازه ذرات، پتانسیل زتا و ویژگی‌های رئولوژیکی پایا در سامانه کلوئیدی حاوی نانوذرات کاپاکاراگینان-کازئینات سدیم. نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی. جلد ۱، شماره ۴، ۲۷۲-۲۵۵.
۶. علی‌پور، آ.، کوچکی، آ.، کدخدایی، ر. و وریدی، م. ۱۳۹۴. بررسی اثر مخلوط صمغ قدومه شیرازی- پروتئین آب پنیر تغلیظ شده بر پایداری امولسیون روغن ذرت در آب. فصلنامه علوم و صنایع غذایی، شماره ۴۸، دوره ۱۲، ۱۷۴-۱۶۳.
۷. غلامحسین‌پور، ع. و مظاهری تهرانی، م. ۱۳۹۰. استفاده از کنسانتره پروتئینی شیر در تولید خامه ی کم چرب و ارزیابی خواص فیزیکوشیمیایی و حسی آن. نشریه پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران. جلد ۷، شماره ۲، ۱۷۸-۱۷۲.
۸. فدایی نوغانی، و.، مفیدی، ا. و زارعی، م. ۱۳۹۳. اثر آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی به عنوان بخشی از کنسانتره پروتئین شیر بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و حسی ماست اسفناج. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران. سال نهم، شماره ۳، ۱۰۰-۹۳.
۹. فروغی نیا، س.، عباسی، س. و حمیدی اصفهانی، ز. ۱۳۸۵. تأثیر افزودن تکی و ترکیبی صمغ‌های کتیرا، ثعلب و گوار در پایداری دوغ. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران. شماره ۲، ۲۵-۱۵.
۱۰. کارآموز، ن.، محمدی ثانی، ع. و رشیدی، ح. ۱۳۹۵. تأثیر افزودن هیدروکلئیدهای ژلان، کتیرا و پکتین با متوکسیل بالا در پایداری دوغ. فصلنامه علوم و صنایع غذایی. شماره ۵۲، دوره ۱۳، ۹۱-۹۹.
۱۱. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۱۳۸۵. شیر و فرآورده‌های آن- تعیین اسیدیته و pH. استاندارد ملی ایران، شماره ۲۸۵۲، چاپ اول.
۱۲. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۱۳۹۳. تعیین ماده خشک شیر. استاندارد ملی ایران، شماره ۶۳۷، چاپ اول.
۱۳. مهدیان، الف.، کاراژیان، ر. و صبری، س. ۱۳۹۱. بررسی اثر جایگزینی چربی شیر با اینولین و کنسانتره پروتئینی شیر بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی و حسی بستنی کم چرب. مجله نوآوری در علوم و فناوری غذایی. سال پنجم، شماره ۴، ۵۱-۴۳.
14. Amatayakul, T., Sherkat, F. and Shah, N. 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.
15. Amice-Quemeneur, N., Haluk, J.P. and Hardy, J., 1995. Influence of the acidification process on the colloidal

- transglutaminase. *Food Science and Technology*, 42:239–243.
24. Gorji, E. G., Mohammadifar, M. A. and Ezzatpanah, H. 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):262-268.
  25. Jaros, D., Heidig, C. and Rohm, H. 2007. Enzymatic modification through microbial transglutaminase enhances the viscosity of stirred yogurt. *Journal of texture studies*, 38:179-198.
  26. Jiang, S.J. and Zhao, X.H. 2011. Transglutaminase-induced crosslinking and glucosamine conjugation of casein and some functional properties of the modified product. *International Dairy Journal*, 21:198-205.
  27. Jooyandeh, H., Mortazavi, S.H., Farhang, P. and Samavati, V. 2015. Physicochemical Properties of Set-Style Yoghurt as Effect by Microbial Transglutaminase and Milk Solids Contents. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*, 4(11): 59-67.
  28. Joudaki, H., Mousavi, M., Safari, M., Razavi, S.H. and Emam-Djomeh, Z., Taghi Gharibzahedi, S.M. 2013. A practical optimization on salt/high-methoxyl pectin interaction to design a stable formulation for Doogh. *Carbohydrate Polymer*, 97:376-383.
  29. Jurado E., Bravo V., Camacho F., Vicaria J.M. and Fernandez- Arteaga A., 2007. Estimation of the distribution of droplet size, international area and volume in emulsions. *Journal of Colloids and Surfaces*, 295: 91-98.
  30. Kiani H., Mousavi M.E., Razavi H. and Morris E.R., 2010. Effect of gellan, alone and in combination with high-methoxy pectin, on the structure and stability of Doogh, a yoghurt-based Iranian drink. *Food Hydrocolloids*, 24: 744-754.
  31. Koksoy, A. and Kilic, M. 2003. Effects of water and salt level on rheological properties of ayran, a Turkish yogurt stability of acidic milk drinks prepared from reconstituted nonfat dry milk. *Journal of Dairy Science*, 78: 2683-2690.
  16. Aminigo, E.R., Metzger, L. and Lehtola, P.S., 2009, Biochemical composition and storage stability of a yogurt-like product from African yam bean (*Sphenostylis stenocarpa*). *International Journal of Food Science and Technology*, 44:560–566.
  17. Ardelean, A.I., Otto, C., Jarous, D. and Rohm, H. 2012. Transglutaminase treatment to improve physical properties of acid gels from enriched goat milk. *Small Ruminant Research*, 106: 47– 53.
  18. Ayar, A. and Buruchu, H. 2013. Effect of whey fractions on microbial and physicochemical properties of probiotic ayran (drinkable yogurt). *International Food Research Journal*, 20(3): 1409-1415.
  19. Azarikia, F. and Abbasi, S. 2010. On the stabilization mechanism of Doogh (Iranian yoghurt drink) by gum tragacanth. *Food Hydrocolloids*, 24(4):358-63.
  20. Domagala, J., Wszolek, M., Tamime, A.Y. and Kupiece-Teahan, B. 2013. The effect of transglutaminase concentration on the texture, syneresis and microstructure of set-type goat's milk yoghurt during the storage period of time. *Small Ruminant Research*, 112: 154-161.
  21. Emam Djome, Z., Mousavi, M.E. and Ghorbani, A.V., 2008, Effect of WPC addition on the physical properties of homogenized sweetened dairy cream. *International Journal of Dairy Technology*, 67(2):183-191.
  22. Erkaya, T., Bashlar, M., Shengul, M. and Ertugay, M. 2014. Effect of thermosonication on physicochemical, microbiological and sensorial characteristics of ayran during storage. *Ultrasonics Sonochemistry*, 23:406-412.
  23. Gauchi, C., Tomazi, T. and Ogliari, P.G. 2009. Physical properties of yoghurt manufactured with milk whey and



- Food Science and Technology, 48: 224-230.
42. Sanli, T., Sezgin, E., Deveci, O. and Shenel, E. 2011. Effect of using transglutaminase on physical, chemical and sensory properties of set-type yoghurt. *Food Hydrocolloids*, 25: 1477-1481.
  43. Shirkhani, M. and Khosrowshahi, asl, A. 2011. Influence of enzymatic treatment on stabilization of traditional Iranian yoghurt drink, Doogh. Iranian Research Organization for Science & Technology. Available at: [onfnews.um.ac.ir/images/41/conferences/iecfp2013/196\\_2.pdf](http://onfnews.um.ac.ir/images/41/conferences/iecfp2013/196_2.pdf) (accessed: April 2017)
  44. Sindayikengera, S. and Xia, W.S. 2006. Nutritional evaluation of caseins and whey proteins and their hydrolysates from Protamex. *Journal of Zhejiang University Science*, 7(2):90-98.
  45. Smithers, G.W. 2008. Whey and whey proteins--From 'gutter-to-gold'. *International dairy journal*, 18(7):695-704.
  46. Tholstrup, S., Salomonsen, T., Ipsen, R., Clark, R. and Rolin, C. 2007. Zeta potential of pectin-stabilised casein aggregates in acidified milk drinks. *International Dairy Journal*, 17: 302-307.
  47. Torre, L., Tamime, A. Y. and Muir, D.D. 2003. Rheology and sensory profiling of set-type fermented milks made with different commercial probiotic and yoghurt starter cultures. *International journal of Dairy technology*, 56(3): 163-170.
  48. Tsevdou M, Eleftheriou E and Taoukis P, 2013. Transglutaminase treatment of thermally and high pressure processed milk; Effects on the properties and storage stability of set yoghurt, innovative. *Food Science and Emerging Technologies* 17: 144-152.
  49. Walstra, P. Colloidal interactions. 2003. In: Walstra P editor. *Physical Chemistry of Foods*. New York: Marcel Dekker Inc; 2003. p 437-476.
  50. Wroblewska, B., Kolakowski, P., Pawlikowska, K., Troszynska, A. and drink. *International Dairy Journal*, 13:835-839.
  32. Koksoy, A. and Kilic, M. 2004. Use of hydrocolloids in textural stabilization of a yoghurt drink, ayran. *Food Hydrocolloids*, 18:593-600.
  33. Kuraishi C., Yamazaki K. and Susa Y., 2001. Transglutaminase: its utilization in the food industry. *Food Review International*, 17: 221-246.
  34. Lorenzen, P.C., Neve, H., Mautner, A. and Schlimme, E. 2002. Effect of enzymatic cross-linking of milk protein on functional properties of set style yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 55: 152-157.
  35. Miwa N., Ykoyama K., Wakabashi H. and Nio N., 2010. Effect of deamidation by protein-glutaminase on physicochemical and functional properties of skim milk. *International Dairy Journal*, 20(6): 393-399.
  36. Motoki, M. and Seguro, K. 1998. Transglutaminase and its use for food processing. *Trends in Food Science and Technology*, 9(5):204-210.
  37. Nilsson L., Lyck S. and Tamime A.Y., 2006. Production of drinking products, in fermented milks. Blackwell Publishing, Oxford. Chapter 5.
  38. Novak, A. 1992. Milk protein concentrate. In *New applications of membrane processes*. Brussels, Belgium: International Dairy Federation, 51-56.
  39. Ozen, A.E. and Kilic, M. 2009. Improvement of physical properties of nonfat fermented milk drink by using whey protein concentrate. *Journal of texture studies*, 40:288-299.
  40. Ozer, B., Kirmacia, H.A., Oztekin, S., Hayaloglu, A. and Atamer, M. 2006. Incorporation of microbial transglutaminase into non-fat yogurt production. *International Dairy Journal*, 17:199-207.
  41. Priscilla N.R., Burin V.M. and Bordignon-Luiz M. 2012. Effect of microbial transglutaminase on functional and rheological properties of ice cream with different fat contents.

52. Yüksel, Z. and Erdem, Y.K. 2010. The influence of transglutaminase treatment on functional properties of set yoghurt. *International journal of Dairy Technology*, 63:86-97.

Kaliszewska, A. 2009. Influence of the addition of transglutaminase on the immunoreactivity of milk proteins and sensory quality of kefir. *Food Hydrocolloids*, 23:2434-2445.

51. Ye, A. 2010. Functional properties of milk protein concentrates: Emulsifying properties, adsorption and stability of emulsions. *International Dairy Journal*, 21:14-20.