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

حسنیه امینی[1]، لیلا روفه‌گری نژاد[2]*

۱-دانش آموخته کارشناسی ارشد ،گروه علومو صنایع غذایی ،احد تبریز، دانشگاه آزاداسلامی، تبریز، ایران
۲-گروه علوم و صنایع غذایی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۳/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۵/۰۸

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 ترانس‌گلوتامیناز میکروبی (در سطوح صفر، ۵ و۱۰واحد 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 ترانس‌گلوتامیناز 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 بهینه یابی نهایی، بهترین غلظت کنسانتره پروتئینی شیر و آنزیم ترانس‌گلوتامیناز 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 به‌کارگیری کنسانتره پروتئین شیر و آنزیم ترانس‌گلوتامیناز میکروبی می‌توان دوغ پایدار با ویژگی‌های مطلوب از نظر خواص فیزیکوشیمیایی و ارگانولپتیکی با قابلیت نگهداری طولانی مدت تولید نمود.

واژه های کلیدی: آنزیم ترانس‌گلوتامیناز میکروبی، خواص رئولوژیکی، دوفاز شدن، دوغ، کنسانتره پروتینی شیر

*مسئول مکاتبات : l.roufegari@iaut.ac.ir

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[1] در ترکیه و لبن[2] در کشورهای عربی موجود هستند [۳۷]. براساس گزارش کدکس[3] 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[4] 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 ترانس‌گلوتامیناز 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 ترانس‌گلوتامیناز یک آسیل ترانسفراز است که در محیط پروتئینی انتقال آسیل را بین گروه‌های گاماکربوکسی آمید گلوتامین (به عنوان دهنده‌ی آسیل) و گروه‌های اپسیلون آمینو لیزین (به عنوان گیرنده‌ی آسیل) کاتالیز می‌کند [۲۶]. این واکنش منجر به ایجاد پیوندهای عرضی میان مولکول‌های پروتئینی، از جمله پروتئین‌های شیر می‌شود. امروزه آنزیم ترانس‌گلوتامیناز از یک گونه مهم باکتریایی به نام *استرپتوورتیسیلیوم*[5] استخراج و خالص سازی می‌شود [۳۳]. استفاده از این آنزیم در فراورده‌های 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 ترانس‌گلوتامیناز 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 افزیش 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 Alimentarious
4 Phase Separation
5 Stereptoverticillium

شیر به منظور بهبود خواص فیزیکوشیمیایی و بالا بردن ارزش تغذیه‌ای این محصولات می‌باشد [۱۴]. امروزه پروتئین‌های شیر به‌دلیل خواص تغذیه‌ای و صنعتی آن مورد توجه قرارگرفته‌اند. پروتئین‌های شیر به دلیل دارا بودن اسیدهای آمینه ضروری فراوان و خاصیت هضم خوب ارزش تغذیه‌ای بیشتری در مقایسه با سایر پروتئین‌ها دارند [۴۴ و ۵۱]. افزودن پودرهای لبنی به‌خصوص پروتئین‌های شیر[1] به فرمولاسیون محصولات لبنی علاوه بر بهبود بافت و خواص رئولوژیکی می‌تواند منجر به افزایش ارزش تغذیه‌ای آن‌ها شود [۱۸].

کنسانتره پروتئین شیر دارای محلولیت بالا و بدون طعم بد و مقاوم به دماهای معمول پاستوریزاسیون می‌باشد [۳۸]. اضافه کردن WPC به نوشیدنی‌های تخمیری شیر باعث می‌شود که قطر ذرات کمتر شده و ضریب قوام افزایش یابد. نکته قابل توجه این است که تنها تا مقدار خاصی WPCرا برای جلوگیری از ته‌نشینی می‌توان به‌کار برد و با افزایش این مقدار سرعت ته‌نشینی تشدید خواهد شد که دلیل اصلی تشدید ته‌نشینی تضعیف شکل‌گیری ساختارهای کازئینی و تجمع و توده‌ای شدن پروتئین‌های آب پنیر واسرشته شده با همدیگر و با ذرات کازئین در درصدهای بالاتر WPCبیان شده‌است

جدول۱- مشخصات شیر مورد استفاده در این تحقیق

ویژگی‌های شیر	مقدار
اسیدیته (درجه دورنیک)	۱۵/۰±۰۰/۰۰۵
ماده خشک بدون چربی (درصد)	۸/۰±۱۳/۰۰۳
چربی (درصد)	۱/۰±۵/۰۳
بار میکروبی (توتال‌کانت)	$۱۰^{۶}$cfu/ml

[1] Milk Protein

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

۲- مواد و روش‌ها

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 ترانس‌گلوتامیناز میکروبی تولید شده توسط باکتری *استرپتومایسس موبارنسیس*[1] به‌حالت پودری لیوفیلیزه دارای فعالیت ۱۲۵-۸۰ واحد/گرم پروتئین از شرکت بی دی اف[2](اسپانیا) و کنسانتره پروتئینی شیر (MPC، شامل کازئین و لاکتالبومین) حاوی ۷۰ درصد پروتئین از شرکت فونترا[3](نیوزیلند) خریداری شدند. سایر مواد شیمیایی مورد استفاده در آزمایش‌ها نیز از شرکت مرک[4]آلمان تهیه شدند.

۲-۲- روش تولید نمونه‌های دوغ

شیر خام مورد استفاده از نظر چربی به ۰/۶ درصد استاندارد شده و در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه پاستوریزه و در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد با فشار ۱۸۰ بار هموژنیزه شد. سپس در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد MPC در سطوح صفر، ۰/۵ و ۱ درصد به نمونه‌های 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 ترانس‌گلوتامیناز میکروبی (MTG) (واحد برگرم پروتئین) نیز در سطوح صفر، ۰/۵ و ۱ درصد به نمونه‌های شیر افزوده و به مدت یک ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. جهت غیر فعال کردن آنزیم، در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد ۱۵ ثانیه حرارت دهی انجام گرفت. استارترزنی در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد و به مدت ۷ ساعت در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و بعد از رسیدن pH نمونه‌های ماست به ۴/۲ به یخچال منتقل شدند. برای تهیه نمونه‌های دوغ به نسبت ۵۰ به ۵۰ آب مقطر و نمک استریل (۰/۵ درصد وزنی/حجمی) اضافه شد و در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه پاستوریزه گردید. دوغ‌های تولید شده در بطری‌های ۲۵۰ میلی لیتری ریخته و تا انجام آزمون‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

۲-۳- آزمایشات

۲-۳-۱- اندازه گیری اسیدیته و pH

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

۲-۳-۲- اندازه گیری میزان دوفاز شدن

برای بررسی میزان دو فاز شدن، نمونه‌های دوغ، داخل فالکون‌های ۵۰ میلی‌لیتری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ روز نگهداری شدند. سپس میزان فاز سرمی (فاز بالایی) توسط خط کش، اندازه‌گیری و مقدار جدایش فازها بر حسب درصد حجمی کل نمونه با استفاده از رابطه ۱ اندازه‌گیری شد [۱۱ و ۳۱].

$$\text{درصد دوفازی} = \frac{\text{ارتفاع آب شفاف}}{\text{ارتفاع کل}} \times ۱۰۰$$

۲-۳-۳- اندازه گیری ویژگی‌های رئولوژیک

برای بررسی رفتار جریانی دوغ و اندازه گیری گرانروی ظاهری نمونه‌ها، از دستگاه رئومتر(Physica Anton Paar، مدل MCR 301، اتریش) مجهز به رئومتری استوانه‌های هم

---

[1] Streptomyces mobaraensis
[2] BDF Natural Ingredients
[3] Fonterra
[4] Merck

مرکز (CC27) در دمای محیط استفاده شد. ویسکوزیته در سرعت برشی $۲-۱۰۰s^{-1}$ اندازه‌گیری 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]. اندازه‌گیری بر اساس اصل فرانهوفر، پس ازگذشت 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 اندازه‌گیری 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 سانتی‌گراد 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].

۲-۴- تجزیه و تحلیل آماری

به منظور بررسی اثر دو متغیر مستقل آنزیم ترانس‌گلوتامیناز میکروبی و کنسانتره پروتئین شیر بر خصوصیات مختلف دوغ صنعتی از روش سطح پاسخ (RSM) در نرم افزار Design Expert 10 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 هریک 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 ($P<۰/۰۵$) مورد بررسی قرار گرفت. بر داده‌های حاصل از آزمایش‌ها مدل چند جمله ای درجه دوم برازش داده شد (رابطه ۲). در این رابطه Yپاسخ پیش بینی شده، b_0ضریب ثابت، bi اثرات خطی، bii اثر مربعات وbij اثرات متقابل و xj، xi متغیرهای مستقل کدبندی 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.

$$Y = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_{ii} x_i^2 + \sum b_{ij} x_i x_j \qquad \text{رابطه (۲)}$$

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 وسپس 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.

جدول ۲- نمایش متغیرهای مستقل فرآیند

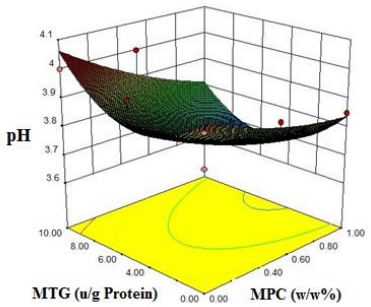
متغیر مستقل	نماد ریاضی	کد و سطح مربوطه		
		-۱	۰	+۱
کنسانتره پروتئینی شیر	X1	۰	۰/۵	۱
آنزیم ترانس‌گلوتامیناز میکروبی	X2	۰	۵	۱۰

۳- نتایج و بحث

۳-۱- اثر آنزیم ترانس‌گلوتامیناز و پروتئین شیر بر pH دوغ

با توجه به معنی‌دار بودن مدل و غیر معنی‌داربودن 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 (x_1) و همچنین اثر درجه دوم آنزیم ترانس‌گلوتامیناز میکروبی (x_2^2) بر pH نمونه‌های دوغ در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود ($p>۰/۰۵$) در حالی‌که اثر ساده آنزیم ترانس‌گلوتامیناز و اثر متقابل آن با پروتئین شیر بر تغییرات pH محصول نهایی معنی‌دار نبود ($p>۰/۰۵$)، نابراین با حذف عبارات غیر معنی‌دار 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 به‌طور چشمگیری کاهش یافت ($p<۰/۰۵$) که علت آن احتمالا افزایش ماده خشک دوغ و تحریک فعالیت متابولیکی باکتری‌های استارتر اسیدزا در اثر افزودن کنسانتره پروتئین شیر می‌باشد. این یافته‌ها با نتایج غلامحسین‌پور و مظاهری (۱۳۹۰) همخوانی داشت، به طوریکه گزارش کردند با افزودن MPC در فرمولاسیون خامه کم‌چرب، 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 معنی‌داربودن اثر توان دوم آنزیم ترانس‌گلوتامیناز 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 (شکل۱). 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 ترانس‌گلوتامیناز میکروبی (MTG) بر میزان pH دوغ

جدول۳- نتایج جدول آنالیز واریانس تاثیر آنزیم گلوتامیناز و پروتئین شیر بر ویژگی‌های دوغ

منبع تغییرات	pH		اسیدیته		ویسکوزیته		درصد دوفازه شدن		پذیرش کلی	
	مجموع مربعات	Pr>F	مجموع مربعات	Pr>F	مجموع مربعات	Pr>F	مجموع مربعات	Pr>F	مجموع مربعات	Pr>F
مدل	۹/۱۴	۰/۰۲۱	۳۷۴/۴۳	۰/۰۰۸	۰/۰۰۰۰۴۵	۰/۰۰۰۳	۳۳۳۵/۶	<۰/۰۰۰۱	۱۲/۷۳	۰/۰۱۱
$(MPC)X_1$	۰/۵۶	۰/۰۱۱	۲۰۴/۱۷	۰/۰۰۲۲	۰/۰۰۰۰۰۵۴	۰/۰۵۰۶	۹۶/۰۰	۰/۰۰۳۳	۱/۵	۰/۰۷۹
$(MTG)X_2$	۰/۰۰۱۳۵	۰/۶۱۳	۸/۱۷	۰/۳۷۸	۰/۰۰۰۰۴۱	۰/۰۰۰۱	۲۴۴۰/۱۷	<۰/۰۰۰۱	۲/۶۷	۰/۰۲۹
X_1^2	۰/۰۰۱۸۴	۰/۵۵۶	۰/۳۶	۰/۸۴۸	–	–	۱۵/۶۴	۰/۱۲۰	۴/۳۸	۰/۰۱۰
X_2^2	۰/۰۵۵	۰/۰۱۲	۸۷/۷۹	۰/۰۱۷۸	–	–	۷۱۷/۷۵	<۰/۰۰۰۱	۰/۱۶	۰/۵۲۴
X_1X_2	۰/۰۰۳۲۰	۰/۴۵۴	۶۴/۰۰	۰/۰۳۳	–	–	۳۶/۰۰	۰/۰۳۱۶	۴/۰۰	۰/۰۱۲
فقدان برازش	۰/۰۲۴	۰/۱۴۴	۵۲/۰۰	۰/۰۶۸۱	۰/۰۰۰۰۶۴	۰/۵۵۲	۱۷/۹۳	۰/۳۶۷	۰/۵۱	۰/۸۰۱
خطای خالص	۰/۰۰۹۹۲	–	۱۲/۸۰	–	۰/۰۰۰۰۴۶	–	۱۷/۲۰	–	۲/۰۰	–

۳-۲- اثر آنزیم ترانس‌گلوتامیناز و پروتئین شیر بر میزان اسیدیته دوغ

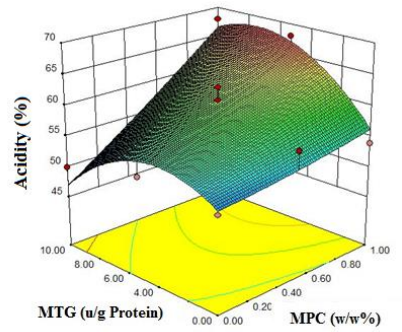
با توجه به نتایج حاصل از آنالیز واریانس (جدول ۳)، مدل در سطح احتمال ۰/۰۱ معنی‌دار بود. از بین متغیرهای تاثیرگذار بر محتوای اسیدیته نمونه‌های دوغ، اثر خطی کنسانتره پروتئین شیر و آنزیم ترانس‌گلوتامیناز، اثر توان دوم آنزیم و همچنین اثر متقابل دو فاکتور مورد بررسی (x_1x_2) بر تغییرات اسیدیته نمونه‌های دوغ معنی‌داربود ($p<۰/۰۵$). 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 دلیل آن بالاتر بودن اسیدیته MPC نسبت به‌دوغ می‌باشد. افزایش اسیدیته نمونه‌ی حاوی MPC می‌تواند به‌دلیل اثر متفاوت آن بر رشد باکتری‌های آغازگر ماست و تولید اسید به وسیله آن‌ها نیز باشد. این در حالی بود که افزودن آنزیم ترانس‌گلوتامیناز 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 ۱درصد 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 تیتر 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 استارتر با افزودن آنزیم ترانس‌گلوتامیناز، این است که پپتیدهای با وزن مولکولی کم و یا اسیدآمینه‌ای که برای رشد *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* مورد نیاز هستند، توسط آنزیم ترانس‌گلوتامیناز دچار اتصالات عرضی شده و تا حدودی برای *استرپتوکوکوس* 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 ترانس‌گلوتامیناز 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 ترانس‌گلوتامیناز در فراورده‌های لبنی اثر معنی‌داری بر اسیدیته

ندارد [۴۰ و ۴۲]. اسیدیته قابل تیتر در فرآورده‌های لبنی به مقدار آلبومین، فسفات، سیترات و دی اکسید کربن موجود در آن‌ها بستگی دارد. با افزودن MPC به نمونه دوغ، مقدار ماده خشک بدون چربی، پروتئین و به دنبال آن آلبومین در مخلوط افزایش یافته و این امر موجب افزایش اسیدیته مخلوط می‌شود. در تحقیقی که توسط بیرقی طوسی و همکاران (۱۳۸۵) انجام شد، نتایج حاکی از این بود که اسیدیته ماست‌های غنی شده با WPC در طی ۲۱ روز نگهداری افزایش یافت. همچنین اسیدیته این ماست‌ها نسبت به نمونه شاهد با سرعت بیشتری افزایش یافت که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد [۴]. مدل پیشنهادی نرم افزار برای پیش‌بینی میزان اسیدیته نمونه‌های 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 غلظت‌های مختلف کنسانتره پروتئین شیر (MPC) و آنزیم ترانس‌گلوتامیناز میکروبی (MTG) بر تغییرات اسیدیته دوغ

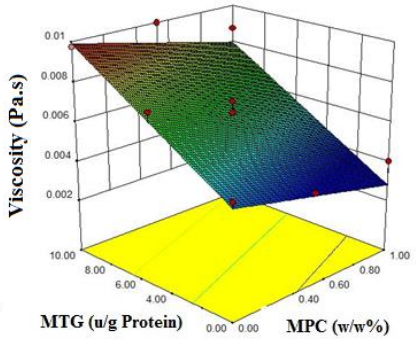
۳-۳- اثر آنزیم ترانس‌گلوتامیناز و پروتئین شیر بر میزان ویسکوزیته دوغ

ویسکوزیته دوغ تحت تاثیر عوامل متعددی مانند ترکیبات تشکیل دهنده بخصوص چربی و پایدارکننده، نوع و کیفیت اجزا، فراوری مخلوط، غلظت و دما می‌باشد. مطابق با نتایج آنالیز واریانس (جدول ۳) مدل سطح پاسخ در سطح احتمال ۰/۰۱ معنی‌دار و عدم برازش مدل غیر معنی‌دار بود که نشان دهنده مناسب بودن مدل می‌باشد. همانطور که مشاهده می‌شود در بین متغیرها فقط اثر خطی آنزیم ترانس‌گلوتامیناز بر تغییرات ویسکوزیته نمونه‌های دوغ معنی‌داربود ($p<۰/۰۵$)، البته اثر خطی پروتئین شیر به رغم غیرمعنی‌دار بودن در سطح احتمال ۵ درصد، اما نزدیکی بالایی به معنی داری داشت ($p=۰/۰۵۰۶$)، بنابراین اثر آن قابل توجه می‌باشد. بررسی اثرات درجه دوم و اثر متقابل دو فاکتور نیز حاکی از عدم معنی‌د اری آن بر تغییرات ویسکوزیته دوغ می‌باشد. بنابراین مدل پیشنهای توسط نرم افزار به صورت رابطه ۵ با $R^2=۰/۶۸۶$ ارایه شد.

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

بررسی رفتار جریانی دوغ توسط دستگاه رئومتر نشان داد که نمونه‌های دوغ دارای آنزیم ترانس‌گلوتامیناز در مقایسه با نمونه شاهد، در سرعت‌های برشی ثابت دارای تنش‌های برشی و در نتیجه ویسکوزیته ظاهری بالاتری بودند (شکل ۳). تاثیر افزایش آنزیم ترانس‌گلوتامیناز بر افزایش ویسکوزیته تیمارها را می‌توان 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 محلول‌های پروتئینی می‌شود [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 نمونه‌ها، به‌علت تشکیل پلی‌مرهایی با وزن مولکولی بالا ناشی از عمل MTG بوده است [۲۳]. MTG با برقراری اتصالات عرضی درون مولکولی بین مولکول‌های پروتئین پلی‌مرهایی با وزن مولکولی بالا تشکیل می‌دهد. از سوی دیگر تنش برشی بالاتر منجر به تبدیل ذرات بزرگ به ذرات کوچک اولیه در دوغ حاوی آنزیم ترانس‌گلوتامیناز می‌شود که این مساله منجر به ایجاد ویسکوزیته بالا در

سرعت‌های برشی پایین می‌شود. نتایج مشابهی روی ماست هم‌زده توسط Jaros و همکاران (۲۰۰۷) گزارش شده‌است مبنی بر اینکه نوشیدنی‌های تخمیری شیر حاوی استابلایزر و فاقد استابلایزر، رفتار جریانی سودوپلاستیک دارند. تیمار آنزیمی، منجر به افزایش خاصیت رقیق شوندگی با برش(سودوپلاستیک) در نمونه‌های دوغ شده است [۲۵]. نتایج مشابهی روی ماست هم زده حاوی آنزیم ترانس‌گلوتامیناز توسط سانلی و همکاران (۲۰۱۱) گزارش شده‌است [۴۲]. همچنین نتایج نشان داد که در دوغ‌های تیمار شده با آنزیم ترانس‌گلوتامیناز، تنش‌های برشی بالاتری لازم است تا ساختار تکه‌های ژلی ازهم 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 پوآز و کمترین آن به تیمار ۶ (حاوی ۱٪ MPC و ۵ واحد آنزیم) با مقدار ۰/۰۰۱۱ 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 ترانس‌گلوتامیناز میکروبی (MTG) بر میزان ویسکوزیته دوغ

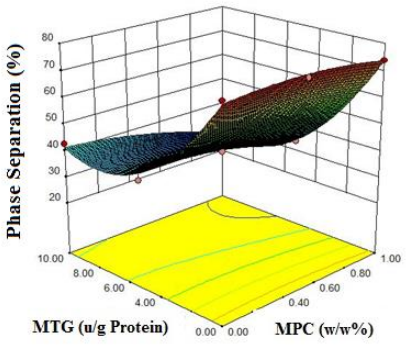
۳-۴- اثرآنزیم ترانس‌گلوتامیناز و پروتئین شیر بر درصد دوفاز شدن دوغ

طبق نتایج آنالیز واریانس مشخص شد که عبارات معنی‌داردر 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 دوفازه شدن دوغ اثر معنی داری نداشت (جدول۳). رابطه ۶ با همبستگی بالا (R2=۰/۹۷۹۳) برای پیش بینی میزان دوفازه 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 ترانس‌گلوتامیناز میکروبی بر میزان دوفازه‌شدن دوغ در شکل ۴ آورده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود افزایش کنسانتره پروتئین شیر و آنزیم ترانس‌گلوتامیناز میکروبی منجر به کاهش میزان دوفازه‌شدن در تیمارهای دوغ شده‌است. این امر ممکن است ناشی از تاثیر MPC بر ویژگی‌های رفتار جریانی 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 می شود 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 ا فزایش میزان کنسانتره پروتئینی آب پنیر میزان آب انداختگی خامه کاهش می یابد [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 دوفازه شدن (۲۲ درصد) مربوط به نمونه دوغ حاوی ۱ درصد MPC و ۱۰ واحد بر گرم پروتئین MTG و ناپایدارترین نمونه با بیشترین

درصد دو فازه‌شدن (۷۸ درصد) مربوط به نمونه‌ی 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 نمونه‌های دوغ می‌باشد.



شکل ۴- اثر غلظت‌های مختلف کنسانتره پروتئین شیر (MPC) و آنزیم ترانس‌گلوتامیناز میکروبی (MTG) بر درصد دوفازه شدن دوغ

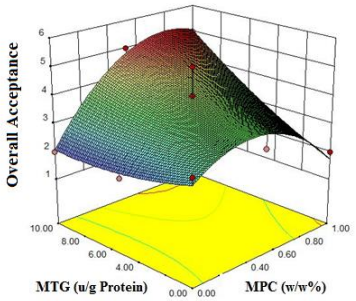
۳-۵- اثر آنزیم ترانس‌گلوتامیناز و پروتئین شیر بر پذیرش کلی محصول نهایی

خواص حسی از عوامل اساسی پذیرش بسیاری از فرآورده‌ها 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 تاثیر معنی‌دار بر پذیرش کلی نمونه‌های دوغ تهیه شده داشت ($p<۰/۰۵$). همچنین مشخص شد که اثر متقابل این دو متغیر مستقل و اثر درجه دوم MPC نیز بر پذیرش و مقبولیت کلی نمونه‌ها معنی‌دار بوده است (جدول۳). بالا بودن ضریب تبیین (۰/۹۷۹۳) و معنی‌دار نبودن آماری فاکتور عدم برازش در مورد مدل‌های رگرسیونی پذیرش کلی نشان از صحت پیش گویی مدل دارد (رابطه ۷).

$$OverallAccep\tan ce = 2.75 - 4.63x_2 - 5.03x_1^2 + 4x_1x_2$$

مطابق با شکل ۵، افزایش MPC و MTG باعث بهبود ویژگی‌های حسی نمونه‌های 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 ترانس‌گلوتامیناز با تأثیر اندک بر رشد استارتر ماست، باعث اختلاف کم در بو و طعم نمونه‌های تیمارشده با MTG و نمونه‌های فاقد آن می‌شود و همانطور که در شکل هم مشاهده می‌شود هر چه دز مصرف آنزیم افزایش می یابد شیب افزایش نمودار سطح پاسخ کاسته می شود بطوریکه بیشترین تاثیر مربوط به همان دوز ۱۰ واحد می‌باشد. این نتایج با یافته‌های وروبلسکا و همکاران (۲۰۰۹) همخوانی داشت که نشان دادند پذیرش کلی کفیر حاوی MTG به طور چشمگیری بیشتر از نمونه‌های 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 تاثیر قرار داده و میزان سینرزیس را کاهش می‌دهد [۲۰]. طبق نتایج، افزودن مقادیر بیشتر MPC (>۱٪) نیز منجر به کاهش امتیاز پذیرش کلی نمونه‌های دوغ شد که یکی از دلایل آن میتواند دانه‌ای 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. آن‌ها عنوان کردند که دانه‌ای شدن بافت ماست در اثر افزودن مقادیر بالاتر مکمل پروتئینی شیر یکی از عوامل اصلی کاهش امتیاز پذیرش نمونه‌های ماست بود. دانه‌ای شدن بافت می‌تواند به دلیل لخته‌ای شدن دومرحله‌ای باشد، بدین صورت که انعقاد پروتئین‌های آب پنیر در pH=۵/۲ رخ میدهد در حالیکه انعقاد ذرات کازئین شیر هنگامی‌که pH به کمتر از ۴/۸ می‌رسد، آغاز می‌گردد که این تاخیر زمانی، باعث بی نظمی و فشارهای موضعی در شبکه

پروتئینی و در نتیجه شکستگی‌های کوچک درون ژل و دانه‌ای شدن ماست می‌شود [۴]. نتایج میانگین تیمارها (جدول ۴) نشان می‌دهدکه اثر ترکیبی MPC و MTG بر بهبود خواص حسی دوغ تولید شده بیشتر از اثر هر یک از این ترکیبات بود بطوری‌که نمونه‌های حاوی ترکیبی از ۱-۰/۵ درصد MPC و ۱۰ واحد بر گرم پروتئین آنزیم MTG امتیاز 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 می‌باشد و این مسئله اثر سینرژیستی این دو ترکیب در بهبود خواص حسی محصول نهایی را تایید می‌کند.



شکل ۵- اثر غلظت‌های مختلف کنسانتره پروتئین شیر (MPC) و آنزیم ترانس‌گلوتامیناز میکروبی (MTG) بر خواص حسی (پذیرش کلی) دوغ

جدول ۴- میانگین نتایج ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و حسی دوغ‌های تهیه شده با استفاده از آنزیم MTG و MPC

تیمار	MPC (٪)	MTG (٪)	pH	اسیدیته (اسید لاکتیک)	ویسکوزیته (سانتی پوآز)	دوفازه شدن (٪)	ویژگی‌های 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

۶-۳- بهینه سازی و تأئید آماری مدل‌های رگرسیونی

شرایط عملیاتی بهینه برای فرمولاسیون دوغ با استفاده از متغیرهای مستقل شامل غلظت‌های مختلف کنسانتره پروتئین شیر (صفر، ۰/۵ و ۱ درصد) و آنزیم ترانس‌گلوتامیناز (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[1] نرم افزار Design Expert جستجو شد. بدین منظور، در ابتدا اهداف بهینه سازی را مشخص کرده و سپس سطوح پاسخ‌ها و متغیرهای مستقل تنظیم شد که نتایج بهینه سازی با بالاترین مطلوبیت در جدول ۵ ارائه شده است. همانطور که مشاهده می‌شود مقدار بهینه برای متغیرهای مستقل MPC و MTG به ترتیب ۰/۵۳ درصد و ۱۰ واحد بر گرم پروتیین 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

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

[1]-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 ترانس‌گلوتامیناز میکروبی میزان دوفازه شدن به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($p<۰/۰۵$). این نتایج احتمالا به دلیل جذب آب به‌وسیله کنسانتره پروتئین شیر و اتصالات عرضی MPC با کازئین‌های شیر توسط آنزیم ترانس‌گلوتامیناز میکروبی می‌باشد. نتایج حاصل از ویسکوزیته ظاهری اختلاف معنی‌داری را بین نمونه شاهد و نمونه بهینه در سرعت برشی $۱۰/۷s^{-1}$ نشان داد. این در حالی بود که از نظر pH و اسیدیته نمونه بهینه انتخاب شده اختلاف معنی‌داری با نمونه شاهد نداشت ($p>۰/۰۵$). بررسی ویژگی‌های ارگانولپتیکی توسط ۳۰ نفر ارزیاب غیر حرفه‌ای نیز نشان داد نمونه بهینه تفاوت معنی‌داری با نمونه شاهد دارد.

۷-۳- 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 وغیره بر روی میزان بار سطحی، تحرک الکتروفورتیک 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)، از۸- میلی‌ولت تا ۲۲- میل ولت 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 ترانس‌گلوتامیناز میکروبی (جدول ۶) نشان داد پتانسیل زتای نمونه شاهد (۹/۶۶ میلی‌ولت) کمتر از پتانسیل زتای نمونه بهینه (۱۳/۳میلی‌ولت) 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 به‌دست آمده مشاهده می‌شود نمونه بهینه تولید شده با کنسانتره پروتئین شیر و آنزیم ترانس‌گلوتامیناز میکروبی اندازه ذرات کوچک‌تری نسبت به نمونه شاهد (بدون پروتئین شیر و آنزیم ترانس‌گلوتامیناز) داشت. دلیل این امر حضور بیش‌تر پروتئین

هاست که به علت برخورداری از فعالیت سطحی بیش‌تر و نیز شکل کروی کوچک‌تر باعث کاهش اندازه ذرات می‌گردد [۸]. کوچک‌تر بودن اندازه ذرات باعث افزایش جذب آب و کاهش دو فازشدن می‌شود. همچنین با توجه به پتانسیل زتا در نمونه بهینه، احتمال تجمع ذرات پروتئین به هم کاهش می‌یابد و اندازه ذرات کوچکتر می‌شود.

جدول ۶- نتایج مقایسه نمونه شاهد با نمونه‌ی بهینه‌ی تولید شده

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

حروف غیر مشابه در هر ردیف نشان دهنده معنی داری در سطح ۰/۰۵ $p<$ است.

۴- نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد افزودن غلظت‌های مختلفMTG و MPC بر میزان pH، اسیدیته، ویسکوزیته، دوفازه شدن و ویژگی‌های حسی نمونه‌های دوغ موثر بود، به طوریکه با افزایش غلظت کنسانتره پروتئین شیر، pH نمونه‌ها کاهش و اسیدیته آنها افزایش یافت. در مقابل اثر درجه دوم آنزیم ترانس‌گلوتامیناز میکروبی، منجر به افزایش pH و کاهش اسیدیته تیمارها به خصوص در مقدار میانی ۵ درصد شد. افزودن MTG وMPC به صورت معنی‌داری منجر به افزایش ویسکوزیته و کاهش میزان دوفازه شدن در تیمارهای دوغ گردید. همچنین این دو فاکتور سبب بهبود ویژگی‌های حسی در تیمارهای دوغ شد. نتایج بهینه‌سازی نیز گویای این مطلب بود که با افزودن ۰/۵۳ درصد کنسانتره پروتین شیر و۱۰ واحد بر گرم پروتئین آنزیم ترانس‌گلوتامینازمیکروبی طبق داده‌های نرم افزار می‌توان به نمونه دوغ صنعتی با ویژگی‌های مطلوب دست یافت. چرا که افزودن MTG وMPC 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 پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران، جلد ۹، شماره ۴، ۳۰۳-۲۹۵.

۲. بیرقی طوسی، ش.، شاکری، م. و مرتضوی، س. ع. ۱۳۸۵. اثر مکمل‌های کنسانتره پروتئینی آب پنیر و کازئین هیدرولیز شده روی برخی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و حسی ماست. فصلنامه علوم و صنایع غذایی ایران، جلد۳، شماره ۴، ۶۵-۷۴.

۳. جمالی فر، ح.، شاهوردی، ا.، صمدی، ن. و فاضلی، م. ۱۳۸۸. بقا اشرشیاکلی 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 ترانس‌گلوتامیناز 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 مکرم، 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. جلد۷، شماره۲، ۱۷۸-۱۷۲.

۸. فدایی نوغانی، و.، مفیدی، ا. و زارعی، م. ۱۳۹۳. اثر آنزیم ترانس‌گلوتامیناز 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 پایدارسازی دوغ. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران. شماره ۲، ۲۵-۱۵.

۱۰. کارآموز، ن.، محمدی ثانی، ع. و رشیدی، ح. ۱۳۹۵. تاثیر افزودن هیدروکلوئیدهای ژلان، کتیرا و پکتین با متوکسیل بالا در پایدارسازی دوغ. فصلنامه علوم و صنایع غذایی. شماره ۵۲، دوره ۱۳، ۹۱-۹۹.

۱۱. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۱۳۸۵. شیر و فراورده‌های 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. مجلّه‌ی نوآوری در علوم و فنّاوری 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

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 probıotıc 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 Ruminan 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 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

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. Intenational Jurnal 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. Ozera, 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. Food Science and Technologhy, 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.Availableat: 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. Ttransglutaminase 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., Ko1akowski, P., Pawlikowska, K., Troszynska, A. and

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.

52. Yüksel, Z. and Erdem, Y.K. 2010. The influence of transglutaminase treatment on functional properties of set yoghurt. International jouranal of Dairy Technology, 63.86-97.