بررسی ویژگی‌های انعقادی عصاره گیاه مایه پنیر *Withania coagulans* L. بر الگوی الکتروفورتیک پروتئین‌های حاصل از آب‌پنیر و بهینه کردن شرایط انعقاد در مقایسه با مایه پنیر استاندارد (کیموزین)

مسعود علیرضایی[۱،۲*]، محمد حسین قارونی[۱]، آزاده خونساری[۲]، علی ولیزاده[۳]، کبری چهاری[۴]

۱- دانشیار گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران
۲- کارشناس مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران
۳- دانشجوی دکترای عمومی دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران
٤- کارشناس دانشکده دامپزشکی دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۶/ ۰۵/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۲/۰۳)

چکیده

عصاره گیاه مایه پنیر از زمان‌های قدیم جهت ساخت پنیر استفاده شده است. هدف از انجام این پژوهش، بررسی فعالیت‌های پروتئولیتیک پروتئازهای میوه *ویتانیا کوآگولانس* در مقایسه با کیموزین در تولید پنیر بود. پروتئازهای میوه *ویتانیا کوآگولانس* به صورت نسبی خالص‌سازی شدند و اثرات آنها بر سوبسترای شیر گاو مورد سنجش واقع شد. دما و pH مطلوب برای فعالیت پروتئازهای میوه *ویتانیا کوآگولانس* به ترتیب ۷۰ درجه سانتی‌گراد و ۵/۵ بود، هرچند کیموزین نسبتاً به دما حساس‌تر است و فعالیت انعقادی مطلوب آن در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد صورت می‌گیرد. افزایش دما منجر به تقویت فعالیت‌های انعقادی کیموزین و پروتئازهای میوه *ویتانیا کوآگولانس* گردید اما افزایش pH بالاتر از ۵/۵ نتوانست تاثیر مطلوبی بر کیفیت لخته داشته باشد. همچنین اضافه کردن مقادیر مختلف کلرید کلسیم تاثیری بر فعالیت انعقادی آنزیم‌های میوه *ویتانیا کوآگولانس* نداشت و تفاوت معنی‌داری در میزان ازت محلول و پروتئین تام در آب‌پنیر تولیدی توسط عصاره مایه پنیر گیاهی و کیموزین وجود نداشت. علاوه بر این، بررسی الگوی الکتروفورتیک پروتئین‌های حاصل از آب‌پنیر تولید شده توسط عصاره در مقایسه با کیموزین نشان داد که پپتیدهای کوچکی توسط عصاره تولید نمی‌شود و پنیر تلخی تولید نمی‌کند. بنابراین، آنزیم‌های میوه *ویتانیا کوآگولانس* و کیموزین فعالیت نسبتاً مشابهی در pH و دماهای متفاوت بر سوبسترای شیر گاو نشان دادند و مشخص شد که میوه‌های *ویتانیا کوآگولانس* پتانسیل استفاده به عنوان رنت را دارند و می‌توانند در تولید پنیر به عنوان آنزیم‌های جایگزین مورد استفاده قرار گیرند.

کلید واژگان: *ویتانیا کوآگولانس*، پروتئاز، پنیر، کیموزین

*مسئول مکاتبات: Alirezaei.m@lu.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-03]

۱- مقدمه

در طی دهه اخیر استفاده از پروتئین‌های پنیر و آب‌پنیر، مخصوصاً در فرآورده های غذایی ویژه مثل غذای کودک، رژیم‌ها و غذاهای سالم افزایش یافته است. پنیر یکی از فرآورده های مهم لبنی است که امروزه به صورت صنعتی و سنتی در سطح گسترده‌ای تولید می‌شود. یکی از مراحل اصلی در تولید این فرآورده، انعقاد کازئین‌های شیر در تولید پنیر است که به روش‌های مختلفی صورت می‌گیرد. یکی از مهم‌ترین روش‌ها، انعقاد به وسیله عمل پروتئازهای اختصاصی از جمله کیموزین (رنت) است [۱ و ۲]. امروزه تاکید بر نوشیدنی‌های پروتئینی آب‌پنیر است. در بازارهای رایج، پروتئین آب‌پنیر و محصولات اولیه آب‌پنیر، بسیار به کار برده می‌شود. آب‌پنیر فاز محلول شیر است که بعد از انعقاد کازئین در اثر عمل مایه پنیر یا باکتری‌های لاکتیکی از لخته جدا می‌شود. لخته (پنیر) شامل کازئین‌ها، چربی‌ها، برخی مواد معدنی و بعضی ویتامین‌ها است اما آب پنیر حاوی لاکتوز، پروتئین‌های محلول یا پروتئین‌های آب‌پنیر، مواد معدنی محلول، اسیدهای آلی، ویتامین‌ها و آنزیم‌ها می‌باشد [۱].

یکی از منابع جایگزین رنت، عصاره‌های گیاهی هستند که از دیرباز به عنوان مایه پنیر برای تولید پنیر در نواحی روستایی و به طور سنتی استفاده شده‌اند [۳]. مایه پنیر گیاهی (*ویتانیا کواگولانس*) متعلق به خانواده سولاناسه، گیاهی است درختچه‌ای با بوته‌های به ارتفاع ۱۰۰-۳ سانتی‌متر که در سراسر پاکستان و هم چنین جنوب غربی هند، افغانستان و در منطقه سیستان و بلوچستان در ایران می‌روید [٤]. قسمت‌های مختلف این گیاه در طب سنتی برای درمان اسهال، استفراغ و فشار خون تجویز می‌شود [٤ و ٥] یافته‌های جدید حاکی از تأثیر ضد سرطانی و تأثیرات آنتی‌دیابتیک و قلبی عروقی آن دارد [٥، ٦]. اگر چه مطالعه ای توسط پزشکی و همکاران [۷] در خصوص استخراج آنزیم، خالص‌سازی و توصیف ویژگی‌های آنزیم‌های آن انجام شده و اثرات پروتئولیتیک آن بررسی گردید، اما ویژگیهای آنزیمهای منعقد کننده میوه گیاه مایه پنیر با کیموزین مورد مقایسه قرار نگرفته است. بنابراین در این مطالعه، آنزیم‌های گیاه مایه پنیر به صورت جزئی خالص‌سازی شدند و اثرات دماها و pH های مختلف بر فعالیت آنزیمی و زمان و کیفیت لخته حاصل مورد بررسی قرار گرفت. همچنین میزان ازت محلول و پروتئین تام و الگوی الکتروفورتیک پروتئین‌های حاصل از آب‌پنیر تولید شده توسط عصاره میوه گیاه مایه پنیر و کیموزین بررسی شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱-جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی

نمونه‌های میوه گیاه *ویتانیا کواگولانس* توسط مرکز تحقیقات و پژوهش گیاهان دارویی در استان سیستان و بلوچستان جمع‌آوری و به مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی انتقال داده شد.

۲-۲- عصاره‌گیری ازمیوه گیاه

در ابتدا میوه گیاه مورد نظر از ساقه و برگ‌ها جدا گردید و دانه‌های گیاه جدا شدند. سپس دانه‌ها با آسیاب آزمایشگاهی با دور ۱۰۰۰ در دقیقه به اندازه کافی پودر شد. به پودر حاصل به ازای هر گرم، ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و در دمای اتاق به مدت ۱ ساعت با هموژنایزر (ایران ، Ultrasound *T*opsonics) هموژنیزه گردید. محلول هموژن حاصل با کاغذ صافی فیلتر گردید. عصاره فیلتر شده با دور RPM ۳۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شد. سپس لایه رویی جدا شد و با اتانول به غلظت حجمی/ حجمی ۸۵٪ رسید. سپس مجدداً با دور RPM۲۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ گردید و مایع رویی استخراج شد و این مرحله دو مرتبه تکرار گردید. در نهایت آنزیم‌های انعقادی در رسوب بدست آمده به مدت نیم ساعت در دمای اتاق خشک شد و سپس تا زمان استفاده در دمای ۱۸°C- نگهداری گردید [۷].

۲-۳- بررسی تشکیل لخته با استفاده از محلول‌های مراحل مختلف

در ابتدا، لخته پنیرهای حاصل از عصاره فیلتر شده عصاره سانتریفیوژ مرحله اول، عصاره سانتریفیوژ مرحله دوم و آنزیم‌های رسوبی در دو مرحله با غلظت ۱ به ۱۰ و ۱ به ۵ بررسی شد به نحوی که در یک مرحله نیم میلی‌لیتر از عصاره مرحله اول و دوم به ۵ میلی‌لیتر شیر با pH= ٦/٥ به عنوان سوبسترا اضافه گردید. در آزمایشی دیگر ۱ میلی‌لیتراز عصاره به ۵ میلی‌لیتر شیر افزوده شد و در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. همچنین ۲۰۰ میکرولیتر از آنزیم‌های رسوبی نیز به ۵ میلی‌لیتر شیر با pH= ٦/٥ اضافه شد و در نهایت کیفیت

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-03]

لخته‌های تشکیل شده با چرخش دستی بررسی گردید که لخته‌های حاصل از عصاره سانتریفیوژ مرحله اول با نسبت ۱ از عصاره به ۵ از شیر از کیفیت و قوام بهتری برخوردار بود. بنابرین در تمام مراحل بعدی از این عصاره با غلظت ۱ به ۵ به عنوان مایه پنیر استفاده شد. بنابراین عصاره به عنوان واکنش‌گر با غلظت ۲۰٪ در مراحل بعدی استفاده شد [۸].

۲-٤- بررسی تشکیل لخته توسط کیموزین

در این مرحله، شیر خام تهیه شده از کارخانه شیر پگاه لرستان (محتوای چربی و درصد پروتئین به ترتیب ۳/۳ و ۳/۱ بود) به مدت ۲۰ دقیقه جوشانده شد. سپس به ۱۰ میلی‌لیتر از هر نمونه شیر با pH= ۵/۵ به میزان ۳ میلی‌لیتر مایه پنیر (کیموزین) افزوده شد و در دمای ۵۰°C انکوبه شد و در فواصل زمانی کیفیت لخته‌ها با چرخش دستی بررسی گردید.

۲-۵- بررسی تشکیل لخته توسط عصاره

یک واحد انعقاد شیر، مقدار آنزیمی است که باعث انعقاد ۱۰ میلی‌لیتر سوبسترا در مدت زمان ۳۰ دقیقه شود. فعالیت انعقادی عصاره برای شیر توسط فرمول زیر محاسبه شد؛

MCA (Milk Clotting Activity) (units) = ۲٤۰۰/T × S/E

زمان انعقاد (ثانیه)=T حجم سوبسترا= E S= عصاره حجم

بدین منظور، مانند مرحله فوق، ۳ میلی‌لیتر از عصاره در ۱۰ میلی‌لیتر سوبسترا در دمای بهینه ۷۰ درجه سانتی‌گراد و pH بهینه ۵/۵ انکوبه شد که زمان انعقاد حدود ۲ دقیقه محاسبه شد که با توجه به فرمول بالا MCA پروتئازهای موجود در عصاره Unit ٦٦/٦٦ است [۷]. لازم به ذکر است که در مراحل مذکور pH شیر با استفاده از پتاسیم فسفات۵۰ میلی مولار تنظیم شد.

۲-٦- بررسی pH بهینه در دمای ٦۰°C

جهت بررسی اثر pH بر کیفیت لخته در دمای ٦۰°C شیرها انکوبه شدند و در این مرحله نیز کیفیت و قوام لخته‌های تشکیل شده در فواصل زمانی با چرخش دستی بررسی شد که در pH= ۵/۵ بهترین لخته از نظر قوام و پایداری به دست آمد.

۲-۷- بررسی دمای بهینه در pHهای ۵/۵ و ۵

در این مرحله، کیفیت لخته‌ها در در دماهای ۵۰ ، ۵۵، ٦۰، ٦۵ و ۷۰ درجه سانتی‌گراد بررسی گردید که کیفیت و قوام آنها از ضعیف تا عالی با اعداد ۱ تا ٦ درجه‌بندی شده به طوری‌که بهترین لخته عدد ٦ و ضعیف‌ترین لخته عدد یک را دریافت کردند.

۲-۸-اندازه‌گیری نیتروژن محلول

اندازه‌گیری نیتروژن محلول آب‌پنیر با روش ماکروکلدال انجام شد [۱] و درصد نیتروژن محلول و پروتئین آن از فرمول زیر محاسبه گردید؛

درصد نیتروژن = ۱٤× نرمالیته × حجم اسید مصرف شده × ۱۰۰ / وزن مایع رویی × ۱۰۰۰

درصد پروتئین نیز با توجه به درصد نیتروژن محلول × ٦/۲۵ محاسبه گردید.

الگوی الکتروفورتیک پروتئین‌های حاصل از آب‌پنیر توسط SDS-PAGE به روش لاملی و همکاران (۱۹۷۰) انجام گرفت [۸]. در دو میکروتیوب مجزا آب‌پنیر حاصل از عصاره با غلظت‌های ۲/۱ و ٤/۱ (دو نسبت از آب‌پنیر به یک نسبت از بافر نمونه حاوی ۲-مرکاپتو اتانول) و در دومیکروتیوب جداگانه آب‌پنیر حاصل از کیموزین با غلظت‌های ۲/۱ و ٤/۱ از بافر نمونه مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در آب جوش قرار داده شد و آنگاه پس از سرد شدن در هر چاهک ٤۰ میکرولیتر نمونه با سرنگ هامیلتون ریخته و در چاهک مارکر تنها ۵ میکرولیتر از مارکر سیناکلون ریخته شد. دستگاه در سیستم بافری پیوسته تریس-گلیسین با شدت جریان ثابت ۲۵ میلی-آمپر به جریان برق وصل گردید و به مدت تقریباً دو ساعت الکتروفورز انجام شد. در پایان الکتروفورز ژل از دستگاه جدا گردید و در محلول رنگ (حاوی کوماسی بلو R-250 ۰/۱ گرم، استات سدیم ۰/۱ گرم، ایزوپروپانول ۲۵ میلی‌لیتر و اسید استیک ۱۰ میلی‌لیتر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شده) به مدت یک ساعت قرار گرفت و سپس از محلول رنگبر (حاوی متانول ٦۰۰ میلی‌لیتر و اسید استیک ۱٤۰ میلی لیتر) به مدت ۲٤ ساعت قرار گرفت و سپس اسکن ژل انجام شد.

۲-۹-آنالیز آماری

میانگین‌های حاصل از کیفیت لخته در pH و دماهای متفاوت و میزان ازت محلول و پروتئین تام آب‌پنیر با استفاده از نرم افزار آماری SPSS ورژن ۱۹ و تست آماری غیرپارامتریک من- وتینی در سطح آماری $p < 0.05$ مورد مقایسه قرار گرفت.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-03]

۳- نتایج و بحث

نتایج حاصل از تاثیر دما و pH های مختلف بر کیفیت لخته (برای سه تکرار در هر آزمایش) در زمان‌های متفاوت در جداول ۵-۱ نشان داده شده است. همچنین شکل ۱ بهترین کیفیت لخته را در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و pH ۵/۵ در زمان ۱۵ دقیقه نشان می‌دهد.

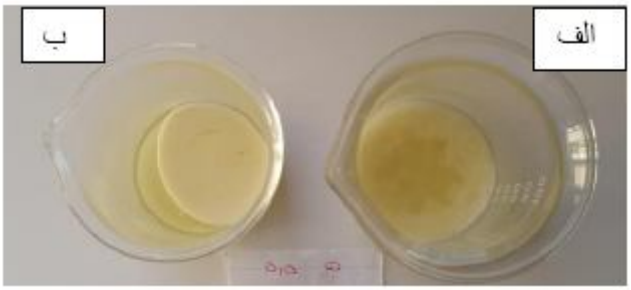

Fig 1 Clotting quality induced by coagulative enzymes from *Withania coagulans* in 70 °C at 15 minute for pH=5 (a) and pH=5.5 (b). The best clotting quality was seen in pH=5.5

Table 1 The pH effect at 50 °C constant temperature on clotting quality. Values represent mean of clotting quality for triplicate of each experiment

Time (min)	pH 5.5	pH5
5	2	1
15	2.5	2
30	3	*3.5

*It was seen the best clotting quality at 30 min.

Table 2 The pH effect at 55 °C constant temperature on clotting quality. Values represent mean of clotting quality for triplicate of each experiment

Time (min)	pH 5.5	pH5
5	2	1
10	4	3
15	5.2	5.3
20	5	3
30	*5.4	2

* It was seen the best clotting quality at 30 min.

Table 3 The pH effect at 60 °C constant temperature on clotting quality. Values represent mean of clotting quality for triplicate of each experiment

Time (min)	pH 5.5	pH5
5	2	1
10	3	2
15	*5.2	*5.2
20	4	3

* It was seen the best clotting quality at 15 min.

Table 4 The pH effect at 65 °C constant temperature on clotting quality. Values represent mean of clotting quality for triplicate of each experiment

Time (min)	pH 5.5	pH5
5	3	2
10	5.3	5.2
15	4	3
20	*5.4	5.3

* It was seen the best clotting quality at 20 min.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-03]

Table 5 The pH effect at 70 °C constant temperature on clotting quality. Values represent mean of clotting quality for triplicate of each experiment

Time (min)	pH 5.5	pH5
10	4	2
15	*5.4	5.2
20	5	3

* It was seen the best clotting quality at 15 min.

نتایج حاصل از سه تکرار پیاپی آزمایش در خصوص میانگین نیتروژن محلول و میزان پروتئین آب‌پنیر برای کیموزین (۰/۳۲۶درصد و ۲/۰۳ درصد) و عصاره میوه گیاه مایه پنیر (۰/۳۷۳ و ۲/۳۳ درصد) نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین آنها وجود نداشت.

۳-۱-بررسی الگوی الکتروفورز پروتئین‌های حاصل از آب‌پنیر

همان‌طور که ستون‌های دوم و سوم نشان می‌دهد تنها باند کوچکی به اندازه حدود ۱۷ کیلودالتون در آب‌پنیر حاصل از عصاره دیده می‌شود در حالی‌که باند حاصل از آب‌پنیر تولید شده توسط کیموزین حدود ۳۰ کیلودالتون است. بنابراین پپتیدهای کوچک با وزن‌های ۵-٤ کیلودالتون که اصولاً سبب تلخی پنیر می‌گردند در هیچ‌کدام از آب پنیرها مشاهده نگردید.

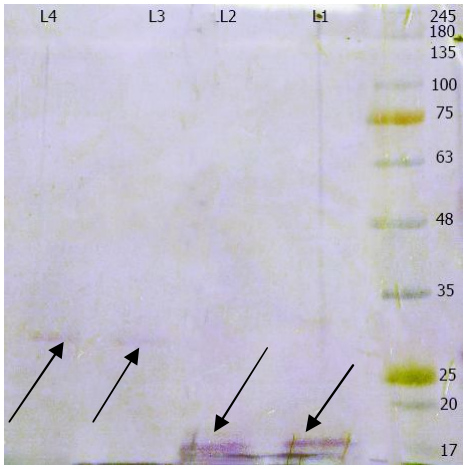

Fig 2 Electerophoretic profile of whey proteins using Lameli SDS-PAGE method. The first column indicates marker. L_1 and L_2 indicate whey proteins induced by *Withania coagulans* enzymes with various concentrations of whey and sample buffer (4/1 and 2/1). L3 and L4 represent whey proteins induced by chymosin with various concentrations of whey and sample buffer (4/1 and 2/1).

یکی از عوامل موثر روی فرآیند انعقاد، غلظت آنزیم منعقدکننده است. استورچ و همکاران (۱۸۷٤) وجود رابطه معکوس بین زمان انعقاد شیر با غلظت آنزیم را گزارش کردند به طوری‌که با افزایش غلظت آنزیم، فعالیت انعقادی شیر افزایش و زمان انعقاد کاهش یافت [۱۰]. در این مطالعه، عصاره خالص‌سازی شده *ویتانیا کواگولانس* به عنوان جایگزین رنت، از نظر حساسیت به دما و pH مورد ارزیابی قرار گرفت. در بررسی انجام شده، pH بهینه برای بیشترین عملکرد انعقادی این گیاه در۵/۵=pH مشاهده شد. یعنی آنزیم موجود در عصاره گیاه مایه پنیر یک پروتئاز اسیدی است و همان‌طور که در جداول دیده شد با افزایش pH از میزان فعالیت انعقادی آنزیم‌های پروتئاز کم شده و کیفیت و قوام لخته‌های حاصل نیز کاهش یافت که با نتایج حاصل از مطالعه بیگمی و همکاران (۲۰۱۳) همخوانی دارد [۱۱].

ارزیابی مشابهی در مورد دمای بهینه برای بیشترین عملکرد انعقادی عصاره مایه پنیر صورت گرفته است و مشاهده شده که لخته‌های تشکیل شده در دمای ۷۰°C بالاترین کیفیت و قوام را داشتند [۱۲]، در حالی‌که بهترین دما برای آنزیم کیموزین ۵۰ درجه سانتی‌گراد است. بنابرین با توجه به اینکه بیشتر آنزیم‌ها در دماهای بالا به طور کامل یا نسبی دناتوره می‌شوند و عملکرد آنها کاهش می‌یابد، پایداری آنزیم‌های این عصاره می‌تواند از مزیت‌های آن نسبت به رنت‌های دیگر به شمار رود.

با توجه به اینکه در این مطالعه خالص‌سازی عصاره میوه گیاه *ویتانیا کواگولانس* بصورت نسبی انجام گرفت، مشاهده گردید که عصاره حاصل از سانتریفیوژ مرحله اول، بیشترین عملکرد انعقادی را دارا هست. لذا می‌توان چنین برداشت کرد که با افزایش سطح خالص‌سازی، میزان غلظت آنزیم‌های پروتئاز کاهش یافت. ضمن اینکه خالص‌سازی بیشتر آنزیم‌های عصاره سبب از بین رفتن طعم و مزه مطبوع در پنیر تولیدی شده و علاوه براین سبب کاهش غلظت عناصر معدنی سودمند از جمله کلسیم و منیزیم در پنیر تولید شده می‌گردد. بنابرین از این عصاره با غلظت ٪۲۰ به عنوان واکنش‌گر در تمامی مراحل آزمایش استفاده شد.

در این پژوهش، فعالیت انعقادی عصاره آنزیمی در شیر گاو مورد بررسی قرار گرفت و از شیر گاو به عنوان سوبسترا استفاده شد که از این نظر با مطالعه بیگمی و همکاران [۱۱] و

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-03]

پزشکی و همکاران [۷] که به ترتیب از شیر بازسازی شده از شیر خشک و شیر پاستوریزه به عنوان سوبسترا استفاده کردند، متفاوت است. درخصوص استفاده از غلظت مناسب کلرید کلسیم، اضافه نمودن مقادیر مختلف کلرید کلسیم (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میلی مولار) در مراحل اول آزمایش تاثیری بر زمان انعقاد و کیفیت لخته حاصل نداشت که می‌تواند مربوط به غلظت بالای کلسیم یونیزه در عصاره این گیاه باشد [٦]. در مطالعه جیسوال و همکاران (۲۰۰۹) غلظت بالایی از کلسیم و منیزیم موجود در عصاره میوه گیاه مایه پنیر گزارش شد و مشخص شد که بسیاری از اثرات آنتی‌دیابتیک عصاره میوه این گیاه مربوط به میزان بالای کلسیم و منیزیم آن می‌باشد. بنابراین بنظر می‌رسد که غلظت بالای کلسیم باعث انعقاد و تشکیل لخته در زمان مناسب گردید و اضافه کردن کلرید کلسیم در غلظت‌های مختلف نتوانست تاثیر معنی‌داری بر تشکیل و کیفیت لخته بگذارد. در حالی‌که، در مطالعه قبلی علیرضایی و همکاران (۲۰۱۱) غلظت ۱۵ میلی‌مولار کلرید کلسیم توانست باعث افزایش کیفیت لخته حاصل از آنزیم‌های فیسین و اکتینیدین در شیر پاستوریزه گردد [۸]. بنابراین به نظر می‌رسد که غلظت بالای کلسیم یونیزه در عصاره میوه این گیاه قادر است در تشکیل لخته کمک کند و تا حدودی رسوب کلسیم در زمان جوشاندن شیر را پوشش دهد.

یکی از نکات مهم در زمینه تولید پنیر، کنترل پروتئولیز کازئین-های شیر است که در این رابطه چندین تکنیک مختلف برای تخمین پروتئولیز مشخص شده است و الکتروفورز یکی از آنهاست که بسیار دقیق پروتئولیز اولیه را مشخص می‌کند [۸]. بررسی الگوی الکتروفورتیک پروتئین‌های حاصل از آب‌پنیر تولید شده توسط عصاره میوه گیاه مایه پنیر در مقایسه با کیموزین نشان داد که پپتیدهای کوچکی توسط عصاره تولید نمی‌شوند و پنیر تولیدی تلخ نیست. همچنین تفاوت معنی‌داری از نظر محتوی پروتئین آب‌پنیر و میزان نیتروژن محلول در آب‌پنیر تولیدی توسط عصاره و کیموزین وجود نداشت. آنالیز پپتیدهای کوچک در آب‌پنیر تخمین مستقیمی از پروتئولیز کلی کازئین را نشان می‌دهد و این اطلاعات مهم در خصوص کیفیت پنیر تولیدی خیلی باارزش است [۱۳]. اگر پروتئولیز با درجه بالا اتفاق بیافتد باعث نرم شدن پنیر میگردو با غلظت زیادی از پروتئین‌ها از جمله پپتیدهای با وزن مولکولی کم در پنیر همراه است که سبب تلخی پنیر می‌گردند و برعکس اگر پروتئولیز خفیف اتفاق بیافتد باعث محکم شدن و سفت بودن بافت پنیر می‌گردد و طعم و مزه خوبی به آن نمی‌دهد [۸].

به خوبی مشخص شده است که کیموزین و آنزیم‌های گیاهی هر دو این توانایی را دارند که روی برخی جایگاه‌ها روی αs_1 و β کازئین اثر بگذارند [١٤]. با این حال نشان داده شده است که کیموزین و پروتئازهای گیاهی ویژگی‌های متفاوتی و یا سرعت هیدرولیز متفاوتی برای باندهای کازئین دارند [۱۵]. در شرایط یکسان در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انعقاد کننده‌های گیاهی و کیموزین ویژگی یکسانی علیه بتا کازئین داشته‌اند ولی انعقادکننده های گیاهی بتاکازئین را با سرعت بیشتری نسبت به کیموزین تجزیه می‌کنند. در خصوص پروتئولیز αs_1 کازئین مشخص شده است که آنزیم‌های گیاهی قسمت c ترمینال این پروتئین را مورد حمله قرار می‌دهند ولی در مورد کیموزین این‌طور نیست [۸]. در مطالعه حاضر، محصول تجزیه αs_1 بوسیله کیموزین و پروتئازهای میوه گیاه مایه تنها باند متوسطی تولید کرد که در ناحیه ۱۷ کیلودالتون قرار داشت و باندهای با وزن مولکولی ۵-٤ کیلودالتون که سبب تلخی پنیر می‌گردند تولید نشد. بنابراین پروتئازهای گیاه مایه پنیر ممکن است در تولید پنیر مناسب باشند به خصوص زمانی‌که لازم است دمای تولید پنیر بالا باشد زیرا آنزیمهای میوه گیاه مایه پنیر، برخلاف کیموزین در دمای بالا ۷۰ درجه سانتی‌گراد بهترین فعالیت را نشان دادند و آنزیم‌های پایداری می‌باشند.

٤- نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که فعالیت آنزیم‌های موجود در عصاره میوه گیاه مایه پنیر سبب پروتئولیز شدید و تولید پپتیدهای کوچک در آب‌پنیر حاصل و تلخی آن نمی‌گردد و میزان پروتئین و ازت محلول آب‌پنیر حاصل از عصاره گیاه مایه پنیر با آب‌پنیر ناشی از لخته حاصل از کیموزین تفاوت معنی‌داری نداشت ($p<0.05$). علاوه بر این، عصاره حاصل از میوه گیاه مایه پنیر در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و pH۵/۵ در مدت زمان ۱۵ دقیقه بهترین فعالیت آنزیمی جهت تولید پنیر با کیفیت لخته خوب را در مقایسه با کیموزین تجاری دارد و می‌تواند جایگزین رنت گردد. در مجموع می‌توان چنین نتیجه گرفت که عصاره میوه این گیاه با خالص‌سازی جزیی می‌تواند به عنوان یک منبع خوب و جایگزین در تهیه پنیر استفاده گردد گرچه لازم است آزمون‌های بیشتری در خصوص بررسی اثر

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-03]

آنزیمی آن در تولید پنیر بر روی پروتین‌های حاصل از آب پنیر و بررسی ویژگی‌های ارگانولپتیک و آزمایشات رئولوژیکی آن در مقایسه با پنیر تولیدی حاصل از کیموزین صورت گیرد.

٤- تشکر و قدردانی

منابع مالی این مطالعه از محل طرح تحقیقاتی شماره ۹۰/۱۳ مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی لرستان تامین شده است.

٥- منابع

[1] Beigomi M, Mohammadifar MA, Hashemi M, Ghodsrohani M, Senthil K, Valizadeh M. (2014). Biochemical and Rheological Characterization of a Protease from Fruits of *Withania coagulans* with a Milk-clotting Activity. *Food Sci. Biotechnol*. 23(6): 1805-1813.

[2] Roseiro LB, Barbosa M, Ames JM, Wilbey RA. (2003). Cheese making with vegetable coagulants the use of Cynara L. for the production of ovine milk cheeses. *Int. J Dairy Technol*. 56(2):76-85.

[3] Jacob M, Jaros D, Rohm H. (2011). Recent advances in milk clotting enzymes. *Int J Dairy Technol.* 64(1):14-33.

[4] Ghahreman A, Attar F. (1999). Biodiversity of plant species in Iran: Central Herbarium of Tehran University,Faculty of Science. p.379. [in persian].

[5] Hemalatha S, Wahi A, Singh P, Chansouria J. (2006). Hypolipidemic activity of aqueous extract of *Withania coagulans* Dunal in albino rats. *Phytotherapy Res*. 20(7):614-7.

[6] Jaiswal D, Rai PK, Watal G. (2009). Antidiabetic effect of Withania coagulans in experimental rats. *Ind J Clin Biochem*. 24(1):88-93.

[7] A. Pezeshki, J. Hesari, A. Ahmadi Zonoz, B. Ghambarzadeh. (2011). Influence of *Withania coagulans* Protease as a Vegetable Rennet on Proteolysis of Iranian UF White Cheese. *J.Agr. Sci. Tech*. 13: 567-576.

[8] Alirezaei M, Aminlari M, Gheisari HR, Tavana M. (2011). Actinidin: A Promising Milk Coagulating Enzyme, *Europ. J Food Res. Rev*. (2): 43-51.

[9] Tripathi P, Tomar R, Jagannadham MV. (2011). Purification and biochemical characterization of a novel protease streblin. *Food Chem.* 125(3):1005-12.

[10] Storch V, Segelcke T. Milchforsch, Milchprax. (1874). Milk coagulation time: linear relationship with inverse of rennet activity. *J Dairy Sci*. 66: 341-344.

[11] Beigomi M, Mohammadifar MA, Ghods Rohani M, Hashemi M, Valizadeh M. (2013). Partial purification and characterization of milk-clotting enzyme extracted from *Withania coagulans* fruit. *Iran J Nutr. Sci. Food Technol*. 8(2):31-40 [in persian]

[12] Tucker GA, Woods L. (1995). Enzymes in food processing, london: Springer;340-345.

[13] Maubois JL, Mocquot G. (1975). Application of membrane ultrafiltration to preparation ofvarious types of cheese. *J Dairy Sci.* 58:1001.

[14] Esteves CLC, Lucey JA, Wang T, Pires EMV. (2003). Effect of pH on the gelation properties of skim milk gels made from plant coagulants and chymosin. *J Dairy Sci*. 86: 2558-2567.

[15] Macedo QI, Faro CJ, Pires EM. (1993). Specificity and kinetics of the milk-clotting enzyme from Cardoon (*Cynaracardunculus*L.) toward bovine κ-casein. *J Agric Food Chem.* 10: 1537–1540.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-03]

Evaluation of coagulative features from *Withania coagulans* L. extract on electerophoretic profile of whey proteins and optimizing of coagulation condition in comparison with rennet (chymosin)

Alirezaei, M. [1, 2*], Gharouni, M. H. [1], Khonsari, A. [2], Valizadeh, A. [3], Chehari, K. [4]

1. Associate Professor, Department of Basic Sciences, School of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Iran
2. MSc ,Razi Herbal Medicines Research Center, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran
3. DVM student, School of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Ira
4. MSc, School of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Ira

(Received: 2017/08/02 Accepted:2018/04/23)

Withania coagulans extract has been used for cheese making since ancient times. The aim of this study was to evaluate proteolytic activities of *Withania coagulans* fruit proteases (WP) in comparison with chymosin for cheese making. Proteases from *Withania coagulans* fruits purified partially were evaluated on bovine milk substrate. The optimum temperature and pH for WP activities were 70°C and 5.5, respectively. However, chymosin was relatively more sensitive to temperature and the optimum clotting activity of chymosin was at 50°C. Increasing of temperature resulted in an enhancement of the clotting activities for chymosin and WP enzymes, however elevation of pH above 5.5 was unable to affect favorite of clotting quality. Also, addition of various $CaCl_2$ concentrations did not affect on the clotting activity of WP. There was also no significant difference between WP and chymosin for soluble nitrogen and total protein of whey. In addition, electerophoretic protein profile of the whey induced by extract in comparison with chymosin showed no small peptide and this resulted less of bitterness of flavor in produced cheese. The WP enzymes and chymosin gave similar relative activity at different pH values and temperatures for bovine milk substrate, indicating that *W. coagulans* fruits have potential activity for use as rennet and the fruits could be potential alternative enzymes in cheese making.

Keywords: Withania coagulans, Protease, Cheese making, Chymosin

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-05-03]

* Corresponding Author E-Mail Address: Alirezaei.m@lu.ac.ir