استفاده از شیره خرما در تولید آنزیم پروتئاز از باکتری *Bacillus coagulans* و کاربرد آن در تهیه پنیر پروبیوتیک

مرضیه موسوی نسب[1]، آنیتا رازقی[2]، مریم کلانتری[3]، نجمه خینور[4]، ساره بوستانی[5*]

۱استاد گروه علوم و صنایع غذایی و گروه پژوهشی آبزیان، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
۲دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
۳دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین پیشوا
٤دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
٥دانشجوی دکتری گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز

(تاریخ دریافت: ٩٤/٠٧/١٣ تاریخ پذیرش: ٩٤/١٢/٢٦)

چکیده

شیره خرما حاوی مقادیر بالایی از قندهای گوناگون می باشد که می تواند محیط کشت مناسبی برای رشد باکتری ها محسوب گردد. باسیلوس کواگولانس در سال‌های اخیر به عنوان پروبیوتیک مطرح شده و بدلیل دارا بودن خصوصیات مشترکی با باکتری های اسپور دار و لاکتوباسیل ها توجهات زیادی را به سوی خود جلب کرده است. لذا در این مطالعه شرایط فعالیت بهینه آنزیم پروتئاز، توسط سه باکتری باسیلوس (سرئوس، کواگولانس و سوبتیلیس) بررسی و مقایسه شد. نتایج بیشترین فعالیت تشکیل لخته را در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و pH:۷-۸ برای باکتری باسیلوس کواگولانس تأیید کرد. در ادامه از محیط های کشت مختلف جهت تعیین مناسب ترین محیط برای تولید پروتئاز از باکتری باسیلوس کواگولانس استفاده شد. نتایج نشان داد در محیط کشت حاوی شیره خرما و کلرید کلسیم بالاترین فعالیت آنزیم وجود دارد. از باکتری باسیلوس کواگولانس همچنین به عنوان پروبیوتیک در تولید پنیر آنالوگ استفاده گردید و خصوصیات فیزیکوشیمیایی پنیر تولیدی مناسب گزارش گردید.

کلید واژگان: باسیلوس کواگولانس، پروتئاز، پروبیوتیک، پنیر، شیره خرما

* مسئول مکاتبات: boostani.sareh@yahoo.com

۱- مقدمه

امروزه، فرآورده های لبنی و بخصوص پنیر از پرمصرف ترین محصولات غذایی به شمار می آیند و بیش از پانصد نوع فرآورده با اسامی مختلف وجود دارد، از طرفی با توجه به تمایل و علاقه مردم و به ویژه نسل جوان به استفاده از محصولات غذایی فراسودمند، تکنولوژی تولید فراورده های لبنی پروبیوتیک رو به گسترش است. پنیر در مقایسه با سایر محصولات لبنی تخمیری از قبیل ماست و شیرهای تخمیری بدلیل دارا بودن pH تقریباً خنثی، چربی بالا، بافت متراکم و منسجم به عنوان غذای حامل پروبیوتیک ها جهت ماندگاری و حفظ فعالیت زیستی آنها در تمام مراحل عبور از دستگاه گوارش و هضم بسیار مناسب می باشد [۱و ۲].

معمولاً از راه های تولید پنیرهای پروبیوتیک، استفاده از سوش های پروبیوتیک مرسوم لاکتوباسیلوس ها و بیفیدیو باکترها در این محصولات می باشد. این پروبیوتیکها به دلیل این که تمام شرایط محیطی و شرایط تولید را نمی توانند تحمل کنند، همچنین به علت هزینه بالای تولید آنها، محققان را به سمت استفاده از میکروارگانیسم هایی آورده اند که معایب فوق را نداشته باشند. بعلاوه تحقیقات نشان می دهد که در حال حاضر در کشورهای مختلفی از رنین استخراج شده از معده چهارم گوساله، در پنیر سازی استفاده می‌گردد، این در حالی ست که عواملی همچون کاهش تولید، متغیر بودن کیفیت و بالا بودن قیمت مایه پنیر حیوانی، موجب شده که تولیدکنندگان پنیر از مایه پنیرهای دیگری به عنوان جایگزین مایه پنیر حیوانی استفاده کنند [۲]. چالش های گفته شده صنایع لبنی، محققین را به سمت استفاده از نسل جدیدی از پروبیوتیک ها و منابع ایجادکننده لخته هدایت کرده است. از بین گزینه های موجود، اسپور فرم ها یکی از بهترین جایگزین ها می باشند و از بین اسپور فرمر ها، باسیلوس ها می توانند بهترین نقش پروبیوتیکی را ایفا کنند. از مزایای باسیل های پروبیوتیک قابلیت نگهداری در دمای اتاق، زنده مانی در طیف گسترده ای از pH و شرایط مختلف محیطی، نگهداری طولانی، حمل و نقل آسان، تولید آنزیم های موثر در هضم و جذب و کارکرد علیه پاتوژن ها می باشد. باسیلوس کواگولانس، باسیلوس کلوزی، باسیلوس سوبتیلیس و لیچنیفورمیس و باسیلوس سرئوس از باسیل های پروبیوتیک موجود می باشند [۳ و ٤].

باسیلوس کواگولانس بیشتر به نام لاکتوباسیلوس اسپوروژنز[1] معروف است و زیرگونه ای از آن به نام گاندن بی سی ۳۰[2]، به عنوان گراس[3] توسط اف دی ا[4] به تأیید رسیده است. این باکتری خصوصیات توأم لاکتوباسیلوس ها و باسیلوس ها را دارا می باشد، بعلاوه پروتئاز خارج سلولی تولید می کند که امکان استفاده از این باکتری را به عنوان ایجاد کننده لخته در پنیر فراهم می کند [٥].

استفاده مجدد از ضایعات در صنعت غذا از جنبه های اقتصادی، زیست محیطی و عملکردی مهم می باشد. خرما یکی از محصولات کشاورزی است که با داشتن مقادیر زیاد قند، املاح معدنی و ویتامین ها به عنوان یک ماده غذایی ارزشمند به شمار می آید. ایران یکی از بزرگترین کشورهای تولید کننده خرما است ولی متأسفانه مقادیر نسبتاً زیادی از خرمای تولیدی، در مراحل مختلف تولید و فرآوری محصول و به دلایل مختلف ضایع می شوند. قسمت عمده این ضایعات بدون استفاده باقی مانده و فقط بخش کوچکی از آن برای تولید فرآورده هایی نظیر شیره خرما مورد استفاده قرار می گیرد [٦ و ۷]. در صورتیکه به نظر می رسد امکان استفاده های مناسب تری از این ضایعات به ویژه در بخش بیوتکنولوژی وجود دارد. از جمله مطالعاتی که اخیراً در زمینه استفاده از شیره خرما و ضایعات خرما در بیوتکنولوژی صورت گرفته می توان به تحقیقات راشدی و مظاهری اسدی (۱۳۸۷)، موسوی نسب و همکاران (۱۳۸۷)، توکلی و همکاران (۱۳۸۷) و واعظی و همکاران (۱۳۸۹) اشاره کرد [٦-۹].

بنابر مقدمات گفته شده، هدف این مطالعه امکان استفاده از شیره خرما در تولید آنزیم پروتئاز از باکتری باسیلوس کواگولانس بوده، همچنین استفاده از این باکتری جهت تولید پنیر پروبیوتیک آنالوگ مورد بررسی قرار گرفت.

۲- مواد و روشها

۲-۱-مواد

باسیلوس کواگولانس زیر گونه GanedenBC30 (گندن بیوتک آمریکا)، WPC[5] و MPC[6] (NZMP نیوزیلند)،

1. *Lactobacilus sporogenes*
2. GanedenBC30
3. Generally recognized as safe (GRAS)
4. (FDA)Food and drug adminestration
5. Whey protein concentrate
6. Milk protein concentrate

SMP[7] (رامک شیراز)، استارتر *Lactococcus lactis sub sp. lactis* و *L. lactis sub sp. Cremoris* (DSM استرالیا) و مایه پنیر تجاری Halinase (کریستین-هانسن دانمارک) تهیه گردید. شیره خرما از بازار محلی و سایر مواد شیمیایی و محیط های کشت مورد استفاده از برند های معتبر مواد شیمیایی مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۲- بهینه سازی فعالیت آنزیم با بالاترین فعالیت پروتئولیتیکی و ایجاد لخته

سه باسیل (سرئوس، سوبتیلیس،کوآگولنس) جهت مقایسه فعالیت پروتئولیتیکی (مطابق بند۲-۲-۱) و ایجاد لخته (مطابق بند۲-۲-۲) آنزیم ها در دور ۱٦۰rpm، pH های(٦-۷-۸) و دماهای (۲۷،۳۷،٤۷ °C) بررسی شدند و نهایتاً باکتری دارای آنزیم با بیشترین فعالیت پروتئاز و ایجاد لخته، در شرایط بهینه pH و دما انتخاب شد [۱۰ و ۱۱].

۲-۲-۱- اندازه گیری فعالیت پروتئولیتیکی

فعالیت پروتئولیتیکی در pH: ٦ بوسیله هضم کازئین انجام می گیرد. ۵ سی سی از محلول ۱/۲٪ کازئین در بافر فسفات ۰,۰۵ مولار به ۱ سی سی از محلول حاوی آنزیم اضافه و مخلوط گردید و در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه نگهداری شد. سپس ۵ سی سی از تری کلرو استیک اسید (۰,٤٤) مولار برای توقف واکنش به آن اضافه و فیلتر شد و ۲ سی سی از محلول رویی به ۵ سی سی سود ۰,۲۸ نرمال اضافه گردید و ۱,۵ سی سی معرف فنل رقیق شده به نسبت ۱:۲ با آب، به آن اضافه وکاملاً مخلوط شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۵ °C نگهداری گردید، سپس OD[8] آن در ٦٦۰ نانومتر خوانده شد [۱۲].

۲-۲-۲-آزمون فعالیت لخته سازی

این آزمون مطابق روش شیه و همکاران (۲۰۰۹) انجام شد. مراحل کار بدین صورت بود که ۰,۵ سی سی از محلول سانتریفیوژ شده حاوی آنزیم را به ۵ سی‌سی از محلولی که شامل ۱۰گرم شیر خشک بدون چربی در ۱۰۰ سی سی آب به همراه ۰/۱مولار کلرید کلسیم می باشد و به مدت ۵ دقیقه در ۳۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بود، اضافه و کاملاً مخلوط شد، از هنگام اضافه کردن عصاره حاوی آنزیم تا دیدن اولین لخته زمان ثبت شد. سپس از فرمول زیر فعالیت لخته سازی محاسبه گردید.

$$SU^{9} = 2400\times5\times D/T\times0.5$$

که در آن T: زمان تشکیل لخته بر حسب ثانیه، D: فاکتور رقت می باشد و یک واحد SU به عنوان میزان آنزیمی که ۱ سی سی از محلول حاوی (۰,۱ گرم پودر شیر خشک و ۰,۰۰۱۱۱ گرم کلسیم کلرید) را در طی ٤۰ دقیقه و در دمای ۳۵ °C لخته می کند، تعریف می شود [۱۲].

۲-۳-تعیین محیط بهینه جهت بیشترین فعالیت پروتئولیتیکی و ایجاد لخته

باکتری دارای بیشترین فعالیت پروتئولیتیکی و بیشترین فعالیت ایجاد لخته در محیط های مختلف به شرح زیر رشد داده شد، بدین صورت که باکتری از قرص پروبیوتیک بعد از رقت سازی روی محیط کشت نوترینت آگار برده شد. با ظاهر شدن کلنی ها روی پلیت حدود یک سانتیمتر مربع آن را به ۵ میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت براث انتقال داده شد و در دمای ۳۷ °C به مدت ۲٤ ساعت قرار گرفت، بعد از گذشت زمان مورد نظر ۱ سی‌سی از آن به محیط های کشت انتقال داده شد و در شرایط بهینه بدست آمده در مرحله ۲-۲ قرار گرفت[۱۱].

شیره خرما ۱۵٪ قند + کلرید کلسیم ۰/۱٪ (KC)

شیره خرما ۱۵٪ قند + آب پنیر۲۰٪ + کلرید کلسیم ۰/۱٪ (KWC)

شیره خرما۱۵٪ قند + نمک ۰,۱٪ + کلرید کلسیم ۰/۱٪ (KNC)

آب پنیر۲۰٪ + کلرید کلسیم ۰/۱٪ (WC)

شیره خرما۱۵٪ قند + آب پنیر۲۰٪ + نمک ۰/۱٪ (KWN)

شیره خرما۱۵٪ قند + نمک ۰/۱٪ (KN)

۲-٤- آماده‌سازی پنیر آنالوگ

برای تولید پنیر آنالوگ: ٤٪ WPC +۱۲,۵٪ MPC + ۳,۵٪ پودر شیر خشک بدون چربی + ۳۷٪ خامه + ٤۳٪ شیر پس چرخ، مخلوط و به دمای ۵۰ درجه سانتیگراد رسانیده و هموژن شد، در ادامه به دمای ۷۰ °C رسانیده و۱۰ دقیقه نگهداری شد و سپس تا ۳۰ درجه سانتی گراد سرد شد. جهت آماده سازی نمونه پنیر شاهد، ۰/۰۰۳٪ رنین و ۰/۰۰۳٪

7. Skim milk powder
8. Optical density
9. Soxhlet units

استارتر اضافه شد و جهت آماده سازی پنیر با استفاده از پروتئاز باسیلوس بدین صورت عمل شد که: محیط بهینه انتخاب شده در بند ۲-۳ که حاوی باکتری است به میزان ۵ برابر بیش از آنزیم رنین اضافه شده در مورد نمونه شاهد اضافه گردید تا فعالیتی مشابه رنین داشته باشد (واحد آنزیمی پنیر شاهد و پنیر منعقد شده توسط باسیلوس یکسان باشد) به عنوان مثال: اگر ۱ گرم آنزیم رنین استفاده شود بایستی ۵ گرم محیط کشت حاوی آنزیم پروتئاز را به مخلوط آنالوگ اضافه کرد، که این محیط کشت حاوی آنزیم پروتئاز و نیز دارای اسپورهای باسیلوس می باشد که به آن خاصیت پروبیوتیکی می دهد. در نهایت هر دو نمونه در بسته بندی ریخته شد و بعد از عمل انعقاد در دمای ۳۰ °C به میزان ۲/۵٪ نمک به آن اضافه گردید و تا رسیدن pH به ٤/٨ نگهداری شد و سپس به یخچال انتقال داده شد [۱۳ و ١٤].

۲-۵- شمارش تعداد اسپور باکتری پروبیوتیک باسیلوس کواگولانس

به منظور شمارش تعداد اسپور باکتری پروبیوتیک باسیلوس کواگولانس در نمونه های پنیر از روش تهیه سریال رقت در محلول نرمال سیلین (نمک ۰/۹ درصد) و کشت پورپلیت استفاده گردید. در این مرحله پس از تهیه رقت های مورد نظر، در دمای ۸۰ °C به مدت ۱۰ دقیقه حرارت داده تا با از بین رفتن سلولهای رویشی بتوان اسپور باکتری پروبیوتیک باسیلوس کواگولانس را شمارش کرد. شمارش تعداد اسپور باکتری پروبیوتیک باسیلوس کواگولانس در محیط کشت NYSM آگار با pH:6.7 تحت شرایط هوازی ایجاد و در دمای ۳۷ °C انجام شد [١٤].

۲-٦- ارزیابی بافت

ارزیابی بافت توسط دستگاه تحلیلگر بافت[10] انجام شد. برای این آزمون قسمتی از پنیر به شکل مکعب برش داده وآزمون فشاری دو مرحله ای به روی آن انجام شد و پارامتر های نیرو یا سفتی (برحسب نیوتون بر ثانیه) و پیوستگی (بدون واحد) از نمودار ها استخراج و آنالیز گردید [۱۵].

۲-۷- آنالیز آماری

به منظور آنالیز آماری داده ها و بررسی اطلاعات به دست آمده از آزمون های مختلف از طرح کاملاً تصادفی استفاده گردید. آزمونها حداقل در سه تکرار انجام شده و سپس میانگین و انحراف معیار بدست آمد. به منظور تعیین وجود اختلاف بین میانگین اعداد، از آنالیز واریانس و برای گروه بندی آنها از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح ۰/۰۵استفاده شد. در تمام مراحل، تجزیه و تحلیل آماری داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS صورت پذیرفت.

۳-نتایج و بحث

۳-۱-تعیین فعالیت پروتئولیتیکی و فعالیت تشکیل لخته

طبق نتایج بدست آمده در جداول ۱و ۲ و نمودارهای ۱ و ۲، در بین سه گونه باسیل، پروتئاز حاصل از باسیلوس کواگولانس بالاترین فعالیت پروتولیتیکی و فعالیت لخته سازی را در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و pH: ۷ و دور ۱٦۰ داشت.

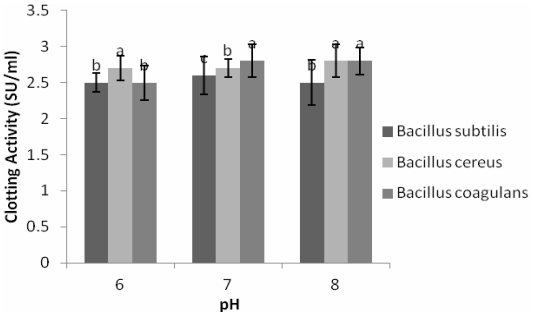

Fig 1 Clotting activity of various Bacillus species at different pH(Data represent means ± standard deviations from triplicate analysis. The different small letters indicate significant difference ($p < 0.05$)

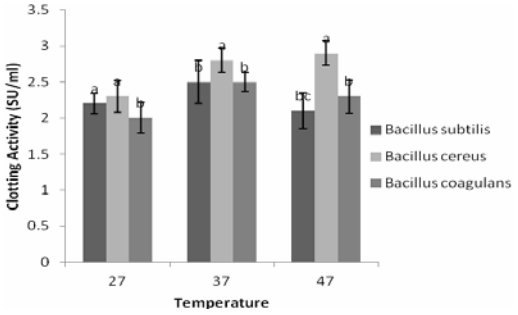

Fig 2. Clotting activity of various Bacillus species at different temperature (Data represent means ± standard deviations from triplicate analysis. The different small letters indicate significant difference ($p < 0.05$)

10. TA-XT2 Stable Micro Systems Ltd, England

تأثیرات دما نشان می دهد که پروتئاز تولیدی به دما مقاوم نیست. اکثر گونه های باسیلوس مزوفیل اند و بهینه دمای رشدشان °C ٣٠-٤٠ می باشد [١٠ و ١١]. کمی افزایش دما باعث افزایش فعالیت کاتالیزوری آنزیم می شود و در نتیجه فعالیت پروتئولیتیکی افزایش می یابد، در حالی که در دماهای بالاتر آنزیم سریعاً دناتوره شده و فعالیتش را از دست می دهد [١٦ و ١٧].

بالاترین فعالیت پروتئولیتیکی و تشکیل لخته برای آنزیم حاصل از باسیلوس کواگولانس و در pH ٧ مشاهده شد، که با نتایج بدست آمده از بومیدناهان و همکاران (٢٠٠٩) و ندیم و همکاران (٢٠٠٧)، مشابهت دارد، اغلب پروتئازهای حاصل از باسیل ها در محدوده خنثی تا بازی بهترین فعالیت را دارند می باشد که امکان استفاده از آنها را در محصولات با pH نزدیک به خنثی مثل پنیر فراهم می کند [١٨ و ١٩].

Table 1. Proteolytic activity of various Bacillus species at different pH

pH	Proteolytic activity (OD 660 nm)		
	Bacillus subtilis	Bacillus cereus	Bacillus coagulans
6	0.006 ± 0.04^{Cb}	0.008 ± 0.07^{Ca}	0.008 ± 0.02^{Ba}
7	0.013 ± 0.03^{Ab}	0.012 ± 0.04^{Bc}	0.014 ± 0.01^{Aa}
8	0.011 ± 0.05^{Bb}	0.014 ± 0.06^{Aa}	0.015 ± 0.03^{Aa}

*Data represent means ± standard deviations from triplicate analysis. The different small letters indicate significant difference within the same row and the different capital letters indicate significant difference within the same column ($p < 0.05$)

Table 2 Proteolytic activity of various Bacillus species at different temperature

Temperature	Proteolytic activity (OD 660 nm)		
	Bacillus subtilis	Bacillus cereus	Bacillus coagulans
27°C	0.008±0.01Ba	0.007±0.08Bb	0.007±0.03Bb
37°C	0.014±0.03Aa	0.011±0.05Ab	0.014±0.02Aa
40°C	0.004±0.05Cb	0.007±0.07Ba	0.002±0.05Cc

*Data represent means ± standard deviations from triplicate analysis. The different small letters indicate significant difference within the same row and the different capital letters indicate significant difference within the same column ($p < 0.05$)

٣-٢- محیط کشت مناسب برای بیشترین فعالیت پروتئولیتیکی و تشکیل لخته

مطابق نتایج ارائه شده در نمودار ٣ و جدول ٣، فعالیت لخته سازی و پروتئولیتیکی پروتئاز باسیلوس کواگولانس در محیط کشت حاوی شیره خرما و کلرید کلسیم نسبت به محیط کشت های دیگر بالاتر بود. شیره خرما غنی از قندها، مواد ازته و سایر ترکیبات است که محیط مناسبی برای میکروب ها می باشد. واعظی و همکاران (١٣٨٩)، جهت تولید بیواتانول از محیط بر پایه شیره خرما با استفاده از ساکارومایسس سرویزیه نتایج مطلوبی بدست آوردند. راشدی و اسدی (١٣٨٧)، نیز نتایج مطلوبی از تولید اسید سیتریک از شیر خرما بدست آوردند که به دلیل خالص تر بودن این منبع قندی در مقایسه با ملاس، کمتر بودن یونهای فلزی و ترکیبات مزاحم و نیز کمتر بودن احتمال آلودگی محیط می باشد. موسوی نسب وهمکاران (١٣٨٩)، گزارش کردند شیره خرما به عنوان یک سوبسترا قابلیت بالایی برای تولید صمغ زانتان با استفاده از زانتاموناس کمپتریس[11] دارد. خسروی و همکاران (١٣٨٨)، مشاهده کردند، استفاده از ضایعات خرما در مقایسه با ملاس نیشکر تأثیر بسیار بهتری بر تولید صمغ زانتان با استفاده از زانتاموناس کمپتریس دارد. موسوی نسب و همکاران (١٣٨٧)، به تولید بیوپلیمر کردلان از دو محیط بر پایه ساکارز و شیره خرما پرداختند و بازده تولید در محیط حاوی شیره خرما جهت بسیار بالاتر بود.

11. *Xanthomonas campestris*

Table 3 Proteolytic activity of various Bacillus species in different media

Media	KC	KWC	KNC	WC	KWN	KN
Proteolytic activity (OD 660 nm)	0.033±0.03[a]	0.009±0.08[c]	0.005±0.03[c]	0.003±0.06[c]	0.024±0.04[b]	0.007±0.05[c]

*Data represent means ± standard deviations from triplicate analysis. The different small letters indicate significant difference ($p < 0.05$)

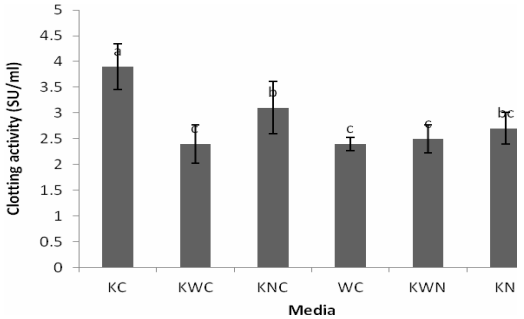

Fig 3 Clotting activity of various Bacillus species in different media (Data represent means ± standard deviations from triplicate analysis. The different small letters indicate significant difference ($p < 0.05$)

۳-۳-فعالیت پروبیوتیکی

پروبیوتیک ها میکروارگانیسم های زنده ای هستند که اگر به تعداد کافی مصرف شوند موجب سلامت مصرف کننده می شوند، برای این منظور باید تعداد پروبیوتیکهای زنده مانده حداقل 10^6، 10^7 یا 10^8کلنی در گرم محصول باشد [۱ و ۲۲]. شمارش باکتری های پروبیوتیک در این مطالعه، حدود ٦ میلیون اسپور در هر گرم باکتری بود که این میزان جهت ماندگاری مناسب و بروز اثرات مطلوب سلامتی حاصل از مصرف فرآورده های پروبیوتیکی مناسب می باشد [۱۰ و ۲۳]. شیره خرما منبع کربوهیدراتی با ارزش غذایی بالاست که بستر مناسبی را برای رشد میکروبها فراهم میکند [۲۱ و ۲٤].

۳-٤- ارزیابی بافت

همانطور که در جدول ٤ مشاهده می شود میزان نیرو برا ی فشردن پنیر در نمونه شاهد بیش از پنیر پروبیوتیکی است که نشان می دهد، الاستیسیتی پنیر پروبیوتیکی کمتر و این پنیر نرم تر است. همچنین میزان پیوستگی در نمونه پنیر شاهد بالاتر است. واتکینسون و همکاران (۲۰۰۱) با مطالعه روی عوامل مؤثر بر ویژگیهای بافتی پنیر نشان دادند یکی از اصلی ترین عوامل رطوبت و سپس pH است. نتایج اندازه گیری فاکتورهای فیزیکوشیمیایی نشان داد که رطوبت و pH بین نمونه شاهد و پنیر پروبیوتیک تفاوت معناداری ندارد (نتایج گزارش نشده است)، در حالی که از لحاظ کمی این مقادیر در نمونه پنیر پروبیوتیکی بالاتر بود، که این احتمالاً به دلیل پروتئولیز بیشتر در پنیر حاصل از پروتئاز باسیلوس کواگولانس و در نتیجه افزایش نرمی بافت می باشد [۲۵]. فروزان و همکاران (۱۳۸۸) و علیزاده و همکاران (۱۳۸۲)، گزارش کردند رنت میکروبی در مقایسه با رنت تجاری خصوصیات بافتی و کیفی ضعیف تری را در پنیر ایجاد می کند، که این ضرورت تصفیه و تخلیص پروتئاز را جهت کاستن میزان پروتئازهای مزاحم و افزایش قدرت لخته کنندگی ایجاد می کند.

Table 4 Textural properties of cheese

Parameter	Hardness (N/s)	Cohesiveness
Probiotic cheese	0.26±0.03[b]	0.61±0.05[b]
Control cheese	0.34±0.05[a]	0.77±0.07[a]

*Data represent means ± standard deviations from triplicate analysis. The different small letters indicate significant difference within the same column ($p < 0.05$)

٤- نتیجه گیری

در این پروژه امکان استفاده از ضایعات شیره خرما در تولید آنزیم پروتئاز از باسیلوس کواگولانس مورد بررسی قرار گرفت. پروتئاز حاصل دارای بیشترین فعالیت پروتئولیتیکی و لخته کنندگی در pH:۷-۸ دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و دور ۱٦۰، در محیط بر پایه شیره خرما و کلرید کلسیم بود. از باکتری و آنزیم حاصل از آن در تهیه پنیر پروبیوتیک استفاده شد و شمارش کلنی ها پتانسیل خوب این باکتری ها را جهت ایجاد خاصیت پروبیوتیکی تأیید کرد.

۵- منابع

[1] Ehsani, A., Mahmudi, R., Tokmechi, A., Pajohi, M., 1390. Iranian white cheese as a food carrier for probiotic bacteria. Journal of Food Science and Technology 8, 77-83.

[2] Fox, P.F., McSweeney, P.L., Cogan, T.M., Guinee, T.P., 2004. Cheese: chemistry, physics and microbiology: general aspects. Academic Press.

[3] Sathishkumar, R., Ananthan, G., Arun, J., 2015. Production, purification and characterization of alkaline protease by ascidian associated Bacillus subtilis GA CAS8 using agricultural wastes. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 4, 214-220.

[4] Ramesh, D., Vinothkanna, A., Rai, A.K., Vignesh, V.S., 2015. Isolation of potential probiotic Bacillus spp. and assessment of their subcellular components to induce immune responses in Labeo rohita against Aeromonas hydrophila. Fish Shellfish Immunol. 45, 268-276..

[5] Fares, C., Menga, V., Martina, A., Pellegrini, N., Scazzina, F., Torriani, S., 2015. Nutritional profile and cooking quality of a new functional pasta naturally enriched in phenolic acids, added with β-glucan and Bacillus coagulans GBI-30, 6086. Journal of Cereal Science 65, 260-266.

[6] Tavakkoli, M., Hamidy Esfahani, Z., Azizi, M. H., 1387. Study of various air flow rate levels on glutamic acid production from date waste under submerged fermentation, I8th National Congress on Food Technology, Mashhad.

[7] Rashedi, H., Mazaheri asadi, M., 1387. Optimization of citric acid for the production of palm waste, using liquid phase. Quarterly Journal of Microbiology Knowledge 1, 1-10.

[8] Moosavi Nasab, M., Askari, H., Bakhtiyari, M., 1387. Production of curdlan biopolymer from Date fruit extract by *Agrobacterium radiobacter* and investigation of its rheological properties, I8th National Congress on Food Technology, Mashhad.

[9] Vaezi zadeh, M., Ghazanfari moghadam, A., Fooladi, M. H., 1389. Review and modeling of sugar, bioethanol and carbon dioxide produced in the fermentation process dates. Iranian Journal of Biosystem Engineering 41, 121-126.

[10] Boominadhan, U., Rajakumar, R., Sivakumaar, P.K.V., Joe, M.M., 2009. Optimization of protease enzyme production using Bacillus sp. isolated from different wastes. Bot Res Int 2, 83-87.

[11] Olajuyigbe, F.M., Ehiosun, K.I., 2013. Production of thermostable and organic solvent-tolerant alkaline protease from Bacillus coagulans PSB-07 under different submerged fermentation conditions. African Journal of Biotechnology 12, 3341.

[12] Shieh, C.-J., Thi, L.-A.P., Shih, L., 2009. Milk-clotting enzymes produced by culture of Bacillus subtilis natto. Biochemical Engineering Journal 43, 85-91.

[13] Ramark dairy industries group, Shiraz, R & D department.

[14] Cutting, S.M., 2011. Bacillus probiotics. Food Microbiology 28, 214-220.

[15] Watkinson, P., Coker, C., Crawford, R., Dodds, C., Johnston, K., McKenna, A., White, N., 2001. Effect of cheese pH and ripening time on model cheese textural properties and proteolysis. International Dairy Journal 11, 455-464.

[16] Asokan, S., Jayanthi, C., 2010. Alkaline protease production by Bacillus licheniformis and Bacillus coagulans. Journal of cell and Tissue Research 10, 2119.

[17] Nadeem, M., Qazi, J.I., Baig, S., Syed, Q.-U.-A., 2007. Studies on commercially important alkaline protease from Bacillus lichniformis N-2 isolated from decaying organic soil.Turkish Journal of Biochemistry 32, 171–177.

[18] Ahmad, J., Ansari, T.A., 2013. Alkaline protease production using proteinaceous tannery solid waste. J Pet Environ Biotechnol. Petroleum & Environmental Biotechnology 4, 136-138.

[19] Hong, H.A., Duc, L.H., Cutting, S.M., 2005. The use of bacterial spore formers as probiotics. FEMS Microbiol. Rev. 29, 813-835.

[20] Khosravani Darani, K., Farhadi, G. H., Mohammadi Far, M. A., Hadiyan, Z., Ahmadiyan, F., Komeyli Fonud, R., 1388. Compare xanthan production by Xanthomonas campestris in solid state fermentation and submerged in a laboratory scale. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology 12, 49-56.

[21] Moosavi-Nasab, M., Shekaripour, F., Alipoor, M., 1389. Use of Date Syrup as Agricultural Waste for Xanthan Production by Xanthomonas campestris, Iran Agricultural Research 27, 89-98

[22] Shah, N. P., 2001. Functional foods from probiotics and prebiotics: Functional Foods from Probiotics and Prebiotics. Food Technology 55, 46-53.

[23] Adinarayana, K., Ellaiah, P., Prasad, D.S., 2003. Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolatedBacillus subtilis PE-11. AAPS PharmSciTech 4, 440-448.

[24] Foruzan, S., Khosroshahi Asl, A., Taslimi, A., Madadadloo, A., Mashayekh, M., 1388. Study of the effects of microbial, recombinant and animal rennets on some of the qualitative and quantitative properties of Iranian white cheese. Journal of Food Science and Technology 6, 63-72.

[25] Beigomi M., Ghods Rohani, M., Mohammadifar M., Hashemi, M., Valizadeh, M., Ghanati, K., 1391. Comparison of textural and sensory characteristics of ultrafiltrated white cheese produced by paneer bad (*Withania coagulans*) protease and fungal rennet, Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology 8, 253-262.

[26] Alizadeh, M., Ehsani, M. R., 1382. Comparsion of *Mucor.miehei*'s Rennet With Animal and Commercial Rennet, Iranian Journal of Agricultural Sciences 34, 207-212.

Use of date syrup in production of protease by *Bacillus Coagulanse* and its application in preparation of probiotic cheese

Moosavi-nasab, M. [1], Razeghi, A. [2], Kalantari, M. [3], Kheynoor, N. [4], Boostani, S. [5*]

1. Professor, Department of Food Science and Technology and sea food processing research group, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran
2. M.S.c. graduated, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran
3. M.S.c. graduated, Department of Food Science and Technology, Islamic Azad University, Varamin-Pishva Branch, Varamin, Iran
4. M.S.c. student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran
5. Ph.D Candidate, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

(Received: 2015/08/08 Accepted: 2016/03/16)

Date syrup contains high amount of sugars which can be considered as a appropirate medium for bacterial growth. *Bacillus Coagulase* has been introduced as a potential probiotic strain due to the joint characteristics of both lactobacillus and spore formers. So, In this study, different treatment conditions (pH, temperature and medium type) were compared by different *Bacillus* strains (*Cereus, Coagulase* and *Subtilis*). Results confirmed the highest proteolytic activity and milk clotting activity (protease) for *B. coagulans* at 37 °C and pH:7-8. In the second step different media were compared to determine the most appropriate media for the production of protease from *Bacillus Coagulase*. Highest proteolytic and milk clotting activity was observed for date syrup and $CaCl_2$. *Bacillus Coagulase* was used as probiotic strain for analogue cheese production, physicochemical properties of the final cheese was desirable.

Keywords: *Bacillus Coagulase*, Cheese, Date syrup, Protease, Probiotics

*Corresponding Author: Email Address: boostani.sareh@yahoo.com