استفاده از عصاره پنیرباد به عنوان جایگزین رنت و تأثیر آن بر ویژگی‌های رنگ و خواص فیزیکوشیمیایی پنیر سفید فراپالوده طی دوره نگه‌داری

حسین جوینده*[1]، احمد قاسمی[2]، محمد حجتی[1]، بهزاد ناصحی[1و3]

1- دانشیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان
2- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان
3- دانشیار گروه مهندسی و فناوری کشاورزی، دانشگاه پیام نور، ایران

(تاریخ دریافت: 98/08/19 تاریخ پذیرش: 98/12/03)

چکیده

این تحقیق به منظور بررسی امکان به‌کارگیری عصاره گیاه *ویتانیا کواگولانس* (WCE) به عنوان جایگزین رنت میکروبی تجاری در تولید پنیر سفید فراپالوده ایرانی انجام پذیرفت. WCE به دو روش آبی و الکلی استخراج شد و مقادیر 0/5، 1 و 1/5 درصد عصاره‌های استخراجی مذکور حاوی پروتئاز گیاهی جهت تولید پنیر مورد استفاده قرار گرفت. پارامترهای رنگ (روشنایی/*L، قرمزی/*a و زردی/*b)، خواص فیزیکوشیمیایی (pH، رطوبت، چربی، آب اندازی، پروتئین کل، پروتئین محلول در آب و محلول در تری کلرو استیک اسید (TCA) 12 درصد) و پذیرش‌کلی پنیرهای تولیدی با نمونه شاهد (تهیه شده با کیموزین و ترکیبی تجاری) طی مدت 60 روز نگه‌داری مقایسه گردید. نتایج نشان داد که نوع آنزیم و زمان نگه‌داری بر شاخص *L و *b نمونه‌های پنیر اثر معنی‌داری داشت، ولی متغیرهای مذکور بر شاخص *a تأثیر معنی‌داری نداشتند. با افزایش مقادیر WCE و زمان نگه‌داری، میزان شاخص‌های*L (p<0/01) و*b (p<0/05) نمونه‌های پنیر به ترتیب کاهش و افزایش یافتند. به طور کلی، نمونه‌های تهیه شده با WCEبه ویژه نوع استخراج آبی آن از مقادیر پروتئین و چربی پایین‌تر و رطوبت، pH، پروتئین محلول در آب و محلول در 12TCA درصد بیش‌تری نسبت به نمونه شاهد برخوردار بودند. هرچند نمونه‌های تهیه شده با WCE تا اواسط دوره نگه‌داری از قابلیت پذیرش قابل قبولی نسبت به نمونه شاهد برخوردار بودند، اما با گذشت زمان نگه‌داری این اختلافات افزایش یافت به‌نحوی که در پایان دوره 60 روزه نگه‌داری، نمونه‌های حاوی غلظت‌های 1 و 1/5 درصد WCE از پذیرش‌کلی پایین‌تری (p<0/01) نسبت به نمونه‌های تهیه شده از 0/5درصد WCEو شاهد برخوردار بودند. نتایج این تحقیق نشان داد که در صورت استفاده از مقدار 1 درصد WCE، به ویژه شکل الکلی آن، می‌توان پنیر سفید ایرانی فراپالوده‌ای قابل قبول تولید نمود. در هرحال، کاربرد تجاری این عصاره به‌عنوان جایگزین رنت میکروبی، نیازمند بررسی خطرات و آزمون‌های سم‌شناسی و اطمینان از عدم وجود ترکیبات مضر بر سلامتی است.

کلید واژگان: *ویتانیا کواگولانس*، استخراج آبی و الکلی، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، زمان نگه‌داری

*مسئول مکاتبات: hosjooy@asnrukh.ac.ir

1- مقدمه

یکی از پرمصرف‌ترین پنیرهای مورد استفاده در کشور، پنیر سفید تولید شده به روش فراپالایش است. فراپالایش، یک عملیات جداسازی غشایی است که به‌طور انتخابی پروتئین و چربی شیر را تغلیظ می‌کند. در این روش، شیر قبل از شکل‌گیری لخته تا حدود 35درصد مواد جامد آن به‌نام ناتراوه تغلیظ می‌گردد و سپس پنیر با انعقاد آنزیمی ناتراوه به‌دست می‌آید. بازده بالای تولید، مهمترین علت موفقیت آمیز بودن و توسعه تولید این نوع پنیر بوده است. پنیر فتای ایرانی فراپالایش از شیر گاو پاستوریزه شده در کارخانجات مدرن لبنی با ضریب تبدیل حدود 0/5± 5(تبدیل شیر به پنیر) تولید می‌شود؛ درحالی که این ضریب برای نوع غیرفراپالوده یا سنتی تولید پنیر ممکن است به بالای 10 نیز برسد. پنیر فراپالایش پنیری است با بافت نرم و مالش پذیر که با وجود pH نهایی 4/8، دوره رسیدن کوتاه‌تری نسبت به نوع سنتی آن دارد که مهمترین دلیل آن توسعه پروتئولیز و هیدرولیز ناقص پروتئین‌ها توسط آنزیم رنین به‌کار رفته در آن است[1 و 2].

به‌منظور تبدیل شیر به لخته و تشکیل دلمه، می‌توان از رنت و پروتئازهای مختلف با منشاء حیوانی، میکروبی و گیاهی استفاده نمود. تفاوت رنت یا مایه پنیر با سایر پروتئازها، اختصاصی عمل کردن آن است، به‌طوری که رنت سبب شکسته شدن پیوند مابین 105 و 106 (متیونین-فنیل‌آلانین) زنجیره پروتنین کاپاکازئینمی‌گردد؛ درحالی که سایر پروتئازها عمومی عمل کرده و به سایر نقاط مولکول پروتئین نیز حمله می‌کنند. امروزه، از عصاره‌ی گیاهان مختلف همانند زنجبیل، مارچوبه، خربزه درختی، کیوی چینی، آناناس، کنگر، استبرق، کنگر فرنگی و خار مریم به‌عنوان پروتئاز گیاهیدر تولید مواد غذایی به‌طور گسترده استفاده می‌گردد. درهرحال، جهت تولید پنیر غالباً از پروتئاز گیاهی سیناربن که از گیاه *Cynara cardunculus* از تیره *Compositae* به‌دست می‌آید، استفاده می‌گردد [3]. نتایج حاصل از تحقیقات انجام‌شده در سال‌های اخیر امکان استفاده از پروتئازهای گیاهی را به‌عنوان جایگزین مناسب، کم‌هزینه و ایمن برای مایه پنیرهای دیگر را نشان داده است[4]. علاوه بر این، با توجه به فعالیت پروتئولیتیکی بالاتر آنزیم‌های گیاهی می‌توان تا حدی بر مشکلاتی مانند بافت سخت و طعم ضعیف پنیرهای تولید شده با استفاده از شیر فراپالایش شده غلبه کرد [1 و 2].

گیاه *ویتانیا کواگولانس* با نام علمی ***coagulans (Stocks) Dun*** متعلق به خانواده می‌باشد. این درختچه در هند، ایران، افغانستان و پاکستان انتشار دارد[5]. میوه این گیاه آرام‌بخش، ضد استفراغ، ادرارآور و به عنوان یک ضد دیابت استفاده می‌شود[6]. میوه این گیاه همچنین دارای خاصیت ضد میکروبی، ضد قارچ، ضد بیماری‌های کبدی، کاهنده چربی و قند خون، مناسب برای قلب و عروق، مهار رادیکال‌های آزاد، ضدالتهاب، ضد تومور، تقویت کننده سیستم ایمنی وسرکوب کننده افسردگی می‌باشد[7]. میوه این گیاه برای درمان زخم استفاده می‌شود و از کپسول دور میوه در حالت تازه به‌عنوان یک استفراغ آور و هنگامی‌که خشک می‌شود از آن به‌عنوان یک اشتها آور استفاده می‌شود [8].

هرچند استفاده از پروتئازهای گیاهی در پنیرسازی مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است، اما تا کنون تحقیقات کمی در مورد به‌کارگیری عصاره گیاه *ویتانیا کواگولانس* (WCE[1]) در تولید پنیر به ویژه پنیر سفید فراپالوده انجام شده است. پزشکی و همکاران در سال 2011 اثرات پروتئولیز میوه گیاه پنیرباد را بر پنیرسفید فراپالوده در مقایسه با کیموزین خالص رنت قارچی طی مدت رسیدن مورد بررسی قرار دادند [9] این محققین نشان دادند تفاوت معنی‌داری در بسیاری پارامترهای اندازه‌گیری شده نظیر رطوبت، چربی و محتوای نمکی در طول رسیدن میان پنیر تهیه شده با پروتئازهای مختلف مشاهده نشد. به جز pH که به طور معنی‌داری ($p<0/01$) در پنیرهای ساخته شده با ویتانیاکواگولانس بالاتر بود، پنیرتهیه شده با رنت گیاهی فاقد کازئین‌های α_{s1} و β بود و به علاوه مقدارنیتروژن محلول در 12 درصد اسید تری کلرو استیک (SNTCA) این پنیر در تمامی دوره رسیدن در مقایسه با دیگر رنت‌ها به دلیل فعالیت پروتئولیتیکی شدید بسیار بالاتر بود. نواز و همکاران (2011) ویژگی‌های پنیر موزارلای تولید شده از شیر گاومیش را با استفاده از عصاره پنیر باد استخراج شده در 3 شرایط بافر اسیدی، فسفات و محلول نمکی بررسی نمودند[10]. بر اساس نتایج این محققین، بهترین پنیر با طعم و بافت مناسب هنگام استفاده از مقدار 15 میکرولیتر آنزیم استخراج شده از بافر نمکی به ازای هر میلی‌لیتر شیر در دمای 37 °C به‌دست می‌آمد. به علاوه، پنیر موزارلای تهیه شده از عصاره گیاهی مذکور نسبت به مایه پنیر رنت گاوی از کیفیت قابل قبولی برخوردار

1. *Withanacoagulans* extract

بود. بیگمی و همکاران در سال 1392 پس از خالص‌سازی و جداسازی اجزای مختلف آنزیم استخراج شده از محلول نمکی، تأثیر عصاره آنزیمی گیاه ویتانیاکواگولانس (پنیرباد) به عنوان مایه پنیر را مورد بررسی قرار دادند[11]. آنزیم استخراج شده از مقاومت گرمایی بالایی برخوردار بود به‌طوری که آنزیم 74 درصد از فعالیت خود را در دمای 60 °C به مدت 30 دقیقه حفظ نمود. این محققین در تحقیق دیگر خود[12] نشان دادند که نوع مایه پنیر مورد استفاده اثر معنی‌داری بر ویژگی‌های بافتی و حسی پنیر تولیدی در تمام صفات اندازه‌گیری شده در طول 60 روز نگه‌داری داشت. در ارزیابی حسی به جز روز سوم نگه‌داری، نمره همه صفات اندازه‌گیری شده در پنیر تولید شده با مایه قارچی در مقایسه با عصاره گیاهی بالاتر بود و پنیر تهیه شده از پروتئاز گیاهی به‌ویژه در انتهای زمان نگه‌داری کاملاً تلخ مزه بود. در تحقیق انجام شده توسط صالحی و همکاران (2017)، خالص‌سازی آنزیم از WCEو خصوصیات پروتئولیتیکی آن جهت تولید پنیر را مورد بررسی قرار گرفت[13]. نتایج طیف‌سنجی جرمی و آزمایشات آنزیمی در حضور مهارکننده‌های پروتئاز نشان داد که پروتئاز آسپارتیک اسید عامل لخته شدن و انعقاد شیر می‌باشد. با بررسی تأثیر نمک‌ها بر فعالیت آنزیمی مشاهده شد که دو نمک NaCl و $CaCl_2$ باعث کاهش فعالیت آنزیمی می‌شوند و از این‌رو این محققین پیشنهاد نمودند که آنزیم استخراجی این گیاه برای تولید پنیر کم‌نمک مناسب‌تراست. قزلباش و همکاران (2018) تاثیر شرایط مختلف نگه‌داری عصاره گیاه پنیرباد را بر کمیت و کیفیت پنیر کاتیج تولید شده از شیر گاومیش بررسی نمودند[14]. نتایج این محققین نشان داد که روش لیوفیلیزیشن نسبت به سایر روش‌ها (نگه‌داری در دمای محیط، دمای یخچال و دمای انجماد) مناسبتر بوده و مقدار پنیر بیشتر و با کیفیت بالاتری تولید می‌گردد.

کاربردهای دارویی گیاه ارزشمند *ویتانیاکواگولانس* سبب شده است که این گیاه مورد توجه صنعت غذا به منظور تولید غذاهای عملگراقرار بگیرد. با وجود معدود تحقیقات انجام شده در زمینه به‌کارگیری عصاره گیاه *ویتانیا کواگولانس* (WCE) در تولید پنیر، تاکنون تحقیقی در مورد استخراج WCEبه دو روش آبی و الکلی و به‌کارگیری آن‌ها در تولید پنیر فراپالوده انجام نپذیرفته است. بنابراین این تحقیق به منظور بررسی امکان به‌کارگیری WCEالکلی و آبی به عنوان جایگزین رنت در تولید پنیر سفید فراپالوده و بررسی تأثیر آن بر پارامترهای رنگ و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی محصول انجام پذیرفت.

2- مواد و روش‌ها

2-1- مواد مورد استفاده

میوه گیاه پنیرباد از کوه‌های اطراف شهرستان زابل استان سیستان و بلوچستان جمع‌آوری و توسط اعضای هیات علمی دانشکده کشاورزی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی‌خوزستان مورد تائید قرار گرفت. میوه گیاه پنیرباد پس از شستشو در دمای محیط خشک شد. برای تهیه پنیر فراپالوده از شیر تازه ارسالی به کارخانه پگاه خوزستان (0/14 درصد اسید لاکتیک، 11/87 درصد ماده خشک، 3/4 درصد چربی و 3/17 درصد پروتئین) استفاده گردید. پودر استارتر مزوفیل CHOOZIT 230 حاوی مخلوط باکتری‌های *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *کرموریس* و *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *لاکتیس* و استارتر ترموفیل YO-MIX 532 حاوی *استرپتوکوکوس‌ترموفیلوس* و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیر گونه *بولگاریکوس* از شرکت دانیسکوی آلمان و رنت با نام تجاری کی‌مکس[1] از نوع کیموزین نوترکیب بیان شده توسط قارچ *آسپرژیلوس نیجر واریته آواموری*[2] از شرکت کریستین هانسن دانمارک خریداری گردید. سایر مواد شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق از درجه خلوص بالا برخوردار بود و از شرکت مرک آلمان خریداری گردید.

2-2- تهیه WCEبه روش استخراج الکلی و آبی

برای تهیه عصاره حاوی آنزیم به شیوه استخراج الکلی (WCE-AEM[3])،از روش دستور [15] با کمی تغییرات استفاده گردید. ابتدا 20 گرم از میوه گیاه ویتانیاکواگولانس با دستگاه آسیاب (مدلGR-123، ایران) خرد شد و سپس دانه‌های آن با مش 40 غربال گردید. سپس پودر تهیه شده با نسبت 1 به 10 (وزنی/حجمی) با آب مقطر مخلوط گردید. پس از نگه‌داری به مدت یک ساعت در دمای اتاق، محلول

1. Chey-Max
2. *Aspergillus niger var.Awamori*
3. *Withanacoagulans* extract-alcoholic extraction method

حاوی پودر با کاغذ صافی (واتمن، شماره 1) صاف شد. سپس محلول زیر صافی جهت جداسازی کامل ذرات، توسط دستگاه سانتریفیوژ (مدل Hermle Labortechnik Gmb Z 206، آلمان) با نیروی g 3000 به مدت نیم ساعت در دمای محیط (°C 25)کاملا صاف گردید. در ادامه، محلول رویی آن برداشته شد و به آناتانول اضافه گردید تا غلظت الکل در محلول به 85 درصد برسد. سپس به مدت 10 دقیقه در دمای اتاق در دور g 2500 مجدداً سانتریفیوژ گردید. در ادامه، به رسوب جدا شده (قرار گرفته در بخش پایینی لوله‌های سانتریفیوژ/ فالکون) اتانول تا رسیدن به غلظت 85 درصد الکل اضافه و به‌خوبی مخلوط گردید.افزودن الکل و سانتریفیوژ کردن محلول دو بار تکرار شد و سپس قسمت رسوب داده شده‌ی مرحله سوم حاوی آنزیم در دمای اتاق به مدت 48 ساعت خشک گردید. آنزیم تهیه شده تا زمان استفاده در دمای °C18- نگه‌داری شد.

جهت تهیه عصاره آبی (WCE-WEM[1])، از روش ناز و همکاران (2009) استفاده شد [16]. مقدار 20 گرم از میوه گیاه پنیرباد با 120 میلی‌لیتر محلول Nacl85%0مخلوط و توسط دستگاه اولتراکس (Ultra-Turrax T25، آلمان) به مدت سه دقیقه در دمای محیط همگن شد. سپس مخلوط حاصل به مدت 24 ساعت در دمای °C 4 قرار گرفت. برای جداسازی مواد نامحلول، محلول حاصل به مدت 15 دقیقه در دمای 4 درجه با دور g ×5000 سانتریفیوز شد. محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ تا زمان استفاده در دمای °C4 نگه‌داری شد.

2-3- تولید پنیر سفید ایرانی فراپالوده

پنیر فراپالوده مطابق روش دانش و همکاران (1396) در کارخانه شیر پگاه شوش خوزستان تولید گردید[17]. شیر با کیفیت و استاندارد بالا از لحاظ میکروبی و فیزیکوشیمیایی پس از خنک شدن در مبدل حرارتی با دمای °C4-6 وارد مخازن نگه‌داری شیر خام مخصوص تولید پنیر فراپالایش شد. پس از استاندارد کردن میزان چربی شیر در سپراتور، شیر با چربی استاندارد طی دو مرحله باکتریفوگاسیون گردید تا بیش از 99 درصد از بار میکروبی آن کاسته شود. سپس شیر در مبدل حرارتی صفحه‌ای در دمای °C76به مدت 15 ثانیه پاستوریزه و برای خنک‌سازی تا دمای °C6 به مخازن نگه‌داری شیر پاستوریزه فرستاده شد. جهت تغلیظ، شیر پاستوریزه ابتدا توسط مبدل حرارتی صفحه‌ای تا دمای °C50 گرم شد و پس از عبور از غشای فراپالایش به دو بخش تراوه و ناتراوه تقسیم گردید. در ادامه، دمای ناتراوه قبل از مایه‌زنی به°C 25 کاهش یافت و به آن مقدار 0/02 درصد مخلوط پودر استارتر مزوفیل و ترموفیل اضافه گردید. پس از افزودن مقادیر 0/5 و 1 و 1/5 درصد از هر یک از عصاره‌های WCEبه روش آبی یا الکلی به ناتراوه، نمونه‌ها در داخل بسته‌های پنیر $^{CC}200$ توزیع گردید. در مورد نمونه شاهد نیز بجای استفاده از WCE، از رنت قارچی نوترکیب استفاده شد. لازم به ذکر است که سطوح هر یک از عصاره‌های WCE مورد استفاده، پس از انجام آزمون‌های مقدماتی تعیین گردید. پس از عبور نمونه‌ها از تونل انعقاد و سپری شدن مدت زمان لازم و تشکیل لخته، عمل نمک زنی (2% وزنی/وزنی) و درب بندی ظروف پنیر در دستگاه روتامین انجام گرفت. در پایان، ظروف کارتن گذاری شده پس از گرمخانه گذاری در دمای °C37 و رسیدن pH نمونه‌ها به 4/8، نمونه‌های پنیر به سردخانه با دمای °C1± 7 منتقل شدند و پس از گذشت مدت 1، 15، 30 و 60 روز مورد آزمون‌های فیزیکوشیمیایی، حسی و میکروبی قرار گرفتند.

2-4- ارزیابی ویژگی‌های رنگ

رنگ نمونه‌های پنیر با استفاده از رنگ‌سنج[2] (سری CR-400، ساخت ژاپن) انجام گرفت که در آن *L، *b و*a به‌ترتیب نشان دهنده روشنایی، زردی و قرمزی می‌باشد.

2-5- ارزیابی فیزیکوشیمیایی پنیر

pH نمونه‌ها با استفاده از دستگاه pH متر دیجیتال (AZ، مدل 86502، تایوان)؛ اسیدیته از طریق تعیین مقدار اسیدلاکتیک قابل سنجش به وسیله تیتر کردن محلول رقیق شده از پنیر با محلول سود یک نهم نرمال در حضور معرف فنل‌فتائین؛ چربی توسط روش حجمی ژربرو استفاده از بوتیرویمتر؛ رطوبت نمونه‌های پنیر به روش آون‌گذاری در دمای °C105 در دمای حدود 2 ساعت و تا رسیدن به وزنی ثابت؛ و مقدار پروتئین کل از طریق حاصل‌ضرب مقدار نیتروژن به‌دست آمده به روش کلدال در فاکتور 6/38 مطابق روش‌های AOAC (2000) اندازه‌گیری شد [18]. میزان آب‌اندازی پنیر نیز از طریق نسبت وزنی آب‌پنیر جدا شده به وزن دلمه محاسبه شد. همچنین

1. *Withanacoagulans* extract-water extraction method

2. Chroma meter

نیتروژن محلول در آب (WSN[1]) و ازت محلول در تری کلرواستیک اسید 12 درصد (TCA-SN[2]) پنیربه روش کوچرو و فاکس (1982) اندازه‌گیری شد[19]. به منظور اندازه‌گیری ازت محلول، 30 گرم از نمونه پنیر به همراه 60 میلی‌لیتر آب مقطر در دمای محیط به وسیله دستگاه هموژنایزر (Ultra-Turrax T25 ساخت آلمان) با سرعت 9500 دوردر دقیقه در دو مرحله یک دقیقه‌ای به خوبی همگن شد وpH هرکدام از نمونه‌ها با استفاده از محلول HCl و یا 2NAOH نرمال در 4/6 تنظیم شد. پس از قرار گرفتن نمونه‌ها به مدت 30 دقیقه در دمای آزمایشگاه، مجدداً pH 1 محلول در 4/6 تنظیم گردید و به مدت 30 دقیقه در آون 40 درجه سانتی‌گراد قرارداده شد. در ادامه، محلول به مدت 30 دقیقه در 3500 دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی با کاغذ صافی واتمن شماره 42 صاف گردید و ازت محلول آن توسط روش کلدال تعیین شد. جهت ارزیابی ازت TCA-SN، به 20 میلی‌لیتر از محلول صاف شده در قسمت قبل 5 میلی‌لیتر محلول تری کلرواستیک اسید (TCA)60 درصد اضافه و نمونه‌ها به مدت نیم ساعت در دمای محیط قرار داده شدند، پس از قرار گرفتن به مدت ده دقیقه در سانتریفیوژ 5000×g، محلول رویی صاف و مقدار ازت آن با استفاده از روش کلدال محاسبه گردید.

2-6- ارزیابی پذیرش‌کلی

پذیرش‌کلی نمونه‌های پنیر از طریق یک آزمون ترجیحی[3] نه نقطه‌ای صورت پذیرفت. برای این منظور، نمونه‌ها توسط ارزیابان حسی که از دانشجویان و اساتید گروه صنایع غذایی بودند امتیازدهی شد. قبل از ارزیابی، نمونه‌ها به مدت 30 دقیقه از یخچال خارج و در دمای محیط نگه‌داری شدند. همچنین به هر تیمار پنیر یک کد 3 رقمی به شکلی تصادفی اختصاص یافت.

2-7- تجزیه و تحلیل آماری

در این تحقیق، تعداد 6 تیمار پنیر با استفاده از سطوح مختلف WCEتهیه شده به دو روش الکلی و آبی(هرکدام در سه سطح 0/5، 1 و 1/5 درصد) تولید شدند و از نظر پارامترهای رنگ و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی با نمونه شاهد (حاوی آنزیم رنت میکروبی) طی مدت دو ماه نگه‌داری (در فواصل 1، ۱۵، ۳۰ و 60 روز از تولید) مقایسه شدند. بنابراین، با توجه به دو متغیر نوع تیمار (7 سطح) و زمان نگهداری (4 سطح)، تعداد 28 نمونه در 3 تکرار تولید گردید و نتایج توسط آزمون فاکتوریل (7×4) در قالب طرح کاملاً تصادفی با کمک برنامه آماری SPSS ویرایش 24 آنالیز و میانگین نتایج به کمک آزمون دانکن در سطح 5 درصد مقایسه گردیدند. از نرم افزار اکسل 2013 برای ترسیم نمودارها استفاده شد. شایان ذکر است سطوح مختلف غلظت WCE مورد استفاده در این تحقیق، پس از انجام آزمون‌های مقدماتی انتخاب گردید.

3- نتایج و بحث

3-1- پارامترهای رنگ

نتایج تجزیه واریانس تأثیر نوع و سطوح مختلف آنزیم بر میزان روشنایی نمونه‌های پنیر سفید فراپالوده طی مدت 2 ماه نگه‌داری در یخچال در جدول 1 نشان داده شده است. مطابق نتایج به‌دست آمده، متغیرهای مورد بررسی به جز شاخص*a، بر مقادیر شاخص‌های *L و*b نمونه‌های پنیر اثر معنی‌داری داشتند.

نتایج نشان داد که نوع آنزیم بر میزان شاخص *L اثر معنی‌داری (p<0/01) داشت (شکل 1). هرچند اختلاف معنی‌داری از این نظر میان تمامی نمونه‌های پنیر تولید شده در ابتدای زمان نگه‌داری وجود نداشت، اما با گذشت زمان نگه‌داری این اختلافات معنی‌دار گردید و نمونه‌های پنیر فراپالوده‌ی تولید شده با عصاره گیاه *ویتارا کوآگولانس* (WCE) به دوروش استخراج آبی و الکلی از میزان شاخص روشنایی کمتری نسبت به نمونه شاهد برخوردار بودند. از آنجایی که کاهش چربی باعث مات شدن نمونه‌های پنیر می‌شود[20]، مقادیر پایین‌تر روشنایی در نمونه‌های پنیر تهیه شده توسط عصاره‌های الکلی و آبی WCE نسبت به پنیر شاهد احتمالاً می‌تواند به دلیل مقادیر کمتر چربی در نمونه‌های تهیه شده با آنزیم گیاهی باشد (جدول 2). علت پایینتر بودن چربی در نمونه‌های تهیه شده با عصاره احتمالا می‌تواند به‌دلیل وجود آنزیم لیپاز و فعالیت لیپولینتیکی در عصاره باشد. به علاوه، علت پایین‌تر بودن شاخص*L در نمونه‌های تهیه شده با پروتئاز گیاهی به‌ویژه در نمونه‌های تهیه شده با عصاره الکلینسبت به نمونه شاهد می‌تواند به دلیل

1. Water soluble nitrogen
2. Trichloroacetic acid-soluble nitrogen
3. Hedonic

رطوبت بیشتر باشد، چراکه هیدراتاسیون پروتئین‌ها می‌تواند سبب کاهش پخش نور و سفیدی پنیر شود [21]. جوآن و همکاران [22] در مطالعه پنیر کم‌چرب تازه مشاهده کردند که با کاهش محتوای چربی، میزان روشنایی نمونه‌های پنیر کاهش یافت. ترتیب مقادیر شاخص L* نمونه‌های پنیر به صورت شاهد>WCE-WEM>WCE-AEM تعیین شد (شکل 1). با افزایش غلظت آنزیم در هر دو نوع نمونه‌های پنیر تهیه شده با آنزیم گیاهی به روش استخراج آبی و الکلی، شاخص L* به شکل قابل توجهی کاهش یافت. همچنین با گذشت زمان ماندگاری، میزان روشنایی در تمامی نمونه‌های پنیر کاهش معنی‌داری (p<0/01) یافت و همان‌گونه که در بالا اشاره شد، این کاهش در نمونه‌های تهیه شده با پروتئاز گیاهی به دلیل هیدراتاسیون بالاتر قابل توجه‌تر بود. بیش‌ترین میزان شاخص L* با مقدار 94/87 مربوط به نمونه شاهد در روز 1 نگه‌داری و کم‌ترین میزان با مقدار 79/33 مربوط به غلظت 0/15 درصد عصاره الکلی در روز 60 نگه‌داری تعیین شد.

Table 1 Result of analysis variance related to color parameters of different ultrafiltrated cheeses prepared with recombinant rennet and plant protease during 60 days of storage at refrigerator

L value	b value	a value	Degree of freedom	Changes sources
191.618**	31.252**	NS0.118	3	**Storage time**
41.757**	5.64**	NS0.023	6	**Treatments**
11.936**	2.634*	NS0.06	18	**Treatments×Time**
1.908	1.284	0.016		**Error**

*, ** and ns represent significant differences at level of P<0.05, P<0.01 and not-significant, respectively

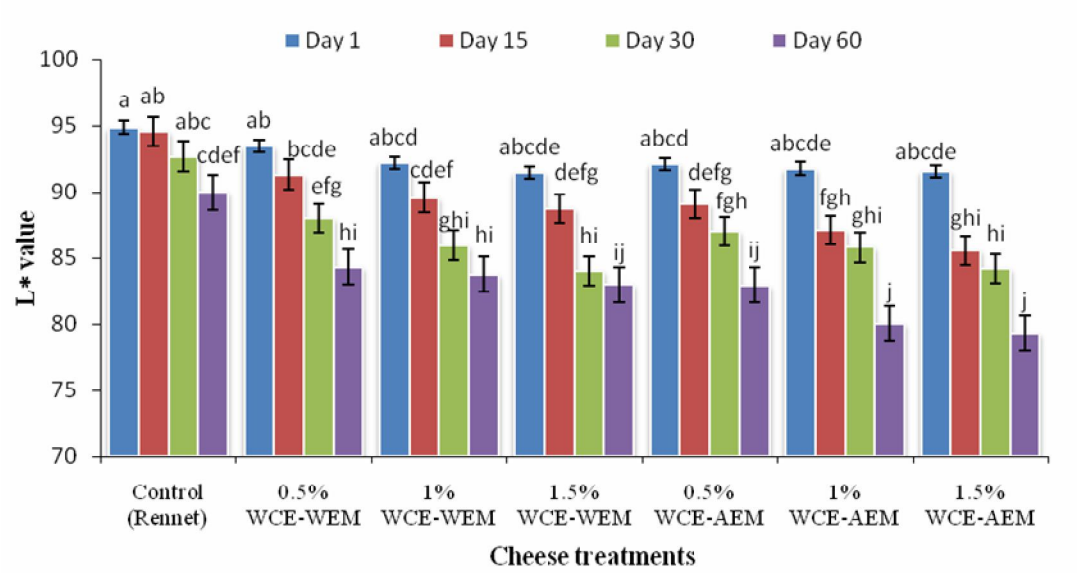

Fig 1 Comparison of L* values of ultrafiltrated cheese samples prepared with microbial rennet and different concentrations of WCE during 60 days of cold storage period. WCE: *coagulans* extract, WEM: water extraction method, AEM: alcoholic extraction method, different letters represent significant differences (p<0.05)

نتایج حاصل از تأثیر نوع آنزیم و میانگین غلظت WCE (الکلی و آبی) بر شاخص زردی (b*) تیمارهای مختلف پنیر در شکل 2 نشان داده شده است. به‌طورکلی هرچه مقدار b* به سمت منفی پیش رود رنگ ماده غذایی به آبی متمایل می‌شود و هرچه میزان آن به سمت مثبت پیش رود، محصول زردتر می‌گردد. مطابق شکل 2، استفاده از آنزیم گیاهی باعث افزایش میزان زردی نسبت به نمونه شاهد گردید و با افزایش غلظت آنزیم WCE، میزان زردی نیز افزایش یافت (p<0/05). همچنین این تغییرات در نمونه‌های تهیه شده با WCE الکلی نسبت به روش استخراج آبی نسبتاً بیشتر بود. همچنین با توجه

به شکل 2، با گذشت زمان نگه‌داری، میزان زردی افزایش یافت($p<0/05$). علت افزایش میزان زردی پنیر در اثر متغیرهای ذکر شده (نوع آنزیم، غلظت آنزیم گیاهی و گذشت زمان نگه‌داری) می‌تواند به دلیل واکنش‌های بیوشیمیایی مختلفی نظیر مایلارد باشد که در پنیر رخ می‌دهد [23]. بیش‌ترین میزان شاخص زردی (*b) با مقدار 13/81 مربوط به غلظت 1/5 درصد عصاره الکلی در پایان زمان 60 روز نگه‌داری و کم‌ترین میزان با مقدار 8/46 مربوط به نمونه کنترل در ابتدای زمان نگه‌داری تعیین شد. در مطابقت با نتایج به‌دست آمده در این تحقیق، فرناندز و همکاران (2018) افزایش نسبی زردی را در پنیر سرانا[1]تهیه شده از شیر بز طی مدت زمان نگه‌داری گزارش نمودند[24].

نتایج نشان داد که با افزایش غلظت WCE (الکلی و آبی) و نیز با گذشت زمان نگه‌داری، شاخص *a یا شدت سبزفامی به طور جزیی**($p>0/05$)** کاهش یافت. در حقیقت، تمامی تیمارها دارای شاخص *a منفی (رنگ سبز) بودند (نتایج نشان داده نشده است). به‌طور کلی، هرچه میزان *a به سمت منفی آن پیش رود، رنگ ماده غذایی به سبز متمایل میشود و در نقطه مقابل، هرچه مقدار *a به سمت مثبت آن پیش رود، محصول قرمزتر می‌گردد. از آنجایی که بروز سینرسیس در فراورده‌های لبنی موجب رها شدن سرم حاوی ریبوفلاوین (عامل القای رنگ سبز در فراورده) می‌گردد، می‌توان دلیل احتمالی کاهش *a (افزایش سبزفامی) در نمونه‌های حاوی WCE و یا با گذشت زمان نگه‌داری را به سینرسیس پایین‌تر در نمونه‌های پنیر نسبت داد [25]. شایان ذکر است که در نمونه شاهد برخلاف سایر نمونه‌های پنیر، میزان شاخص با گذشت زمان نگه‌داری افزایش یافت که دلیل آن احتمالا افزایش سینرزیس در این نمونه همگام با گذشت زمان می‌باشد (جدول 2). بیشترین میزان سبزفامی در نمونه‌های پنیر تهیه شده با آنزیم پروتئاز گیاهی استخراج شده به روش الکلی (WCE-AEM) با مقدار سبزفامی 2/94- و کمترین آن در نمونه پنیر کنترل با مقدار 2/28- در ابتدای زمان نگهداری تعیین شد؛ اما همان‌گونه که در بالا گفته شد، این تغییرات معنی‌دار ($p>0/05$) نگردید.

2-3- ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی

نتایج تجزیه واریانس تأثیر نوع و غلظت آنزیم بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی پنیر طی مدت 60 روز نگه‌داری در جدول 2 نشان داده شده است. همان‌طور که این جدول نشان می‌دهد، نوع تیمار آنزیمی و زمان نگه‌داری تأثیر معنی‌داری بر تمامی شاخص‌های pH، رطوبت، چربی، آب‌اندازی، پروتئین کل و محلول در آب و محلول 12 درصد تری کربوکسیلیک اسید (TCA 12%) داشت.

برخلاف نمونه شاهد، افزایش مقادیر مختلف عصاره آبی و الکلی پروتئاز گیاهی پنیرباد (WCE) به پنیر باعث افزایش pH آن به ویژه در نمونه استخراج الکلی عصاره طی دوره نگه‌داری شد؛ به طوری که بیشترین میزان pH (4/93) در روز 60 برای نمونه حاوی 1/5درصد WCE مشاهده شد. در حقیقت، روند تغییراتpH در نمونه‌ی شاهد با نمونه‌های تهیه شده با WCE کاملاً متفاوت بود. در نمونه‌ی شاهد با افزایش زمان نگه‌داری، مقدار pH تا روز 30 کاهش ولی پس از آن به طور معنی‌داری افزایش می‌یافت درحالی که در سایر نمونه‌های پنیر تهیه شده با WCE روند تغییرات pH در تمام دوره نگه‌داری به شکل معنی‌داری افزایش یافت. پروتئولیز در پنیر که در اثر عواملی مانند پروتئازهای باکتری‌های آغازگر و مایه پنیر رخ می‌دهد می‌تواند باعث تولید پپتیدهای کوچک و اسیدآمینه‌ها شود. در ادامه در اثر کاتابولیسم این پپتیدها و اسیدهای آمینه توسط میکروفلور پنیر، آمونیکو گروه‌های آمین تولید می‌شوند و این موجب افزایش pH در پنیرهای تولید شده باWCE می‌شود[26]. از طرف دیگر، با توجه به جدول 2، به دلیل بالاتر بودن مقدار رطوبت در نمونه‌های پنیر تهیه شده با WCE، غلظت یونH^+ در پنیر کاهش یافته و در نتیجه pH افزایش می‌یابد[27]. بیگمی و همکاران (1392) در تأیید این نتایج pH پنیرهای تولید شده با مایه پنیرگیاهی را به‌طور معنی‌داری بالاتر از پنیرهای تولید شده با مایه پنیر قارچی گزارش نمودند[12].

1. Serrana

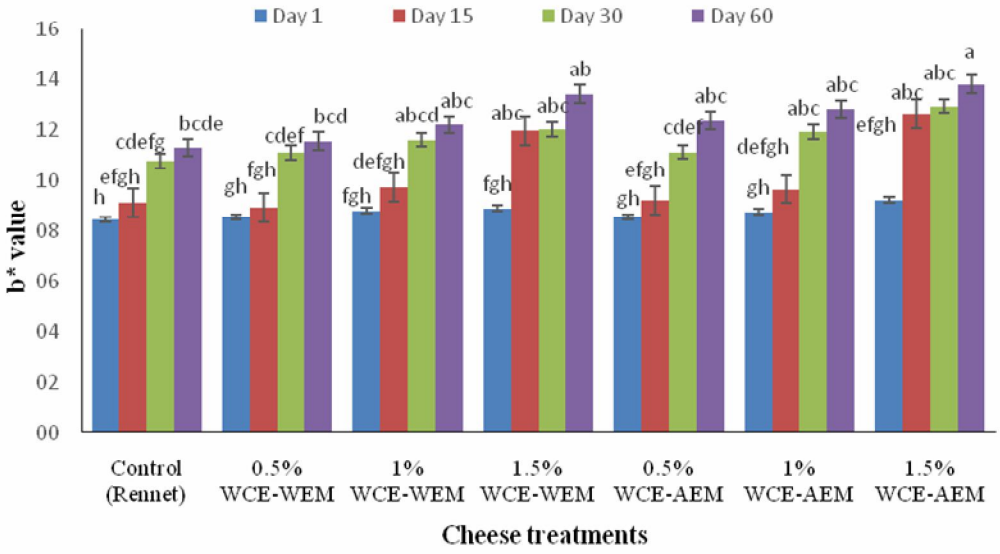

Fig 2 Comparison of b* values of ultrafiltrated cheese samples prepared with microbial rennet and different concentrations of WCE during 60 days of cold storage period. WCE: *coagulans* extract, WEM: water extraction method, AEM: alcoholic extraction method, different letters represent significant differences ($p<0.05$)

Table 2 Physicochemical parameters of ultrafiltrated Iranian white cheeses prepared with microbial rennet and different concentrations of WCE during 60 days of cold storage period

WCE-WEM (%)			WCE-WAM (%)			Control	Time (Day)	Physichochemical properties
1.5	1	0.5	1.5	1	0.5			
4.59±0.11 ^{aB}	4.57±0.12 ^{aB}	4.54±0.14 ^{aB}	4.60±0.08 ^{aB}	4.59±0.14 ^{aB}	4.55±0.14 ^{aB}	4.52±0.08 ^{aAB}	1	pH
4.63±0.04 ^{aB}	4.62±0.04 ^{aAB}	4.60±0.05 ^{aAB}	4.66±0.05 ^{aB}	4.64±0.09 ^{aB}	4.62±0.04 ^{aB}	4.44±0.12 ^{bB}	15	
4.74±0.06 ^{abAB}	4.70±0.05 ^{abAB}	4.65±0.08 ^{bAB}	4.80±0.12 ^{aA}	4.73±0.04 ^{abAB}	4.69±0.07 ^{abAB}	4.40±0.06 ^{cB}	30	
4.88±0.15 ^{abA}	4.80±0.14 ^{abA}	4.73±0.12 ^{bcA}	4.92±0.09 ^{aA}	4.84±0.05 ^{abA}	4.80±0.06 ^{abA}	4.64±0.11 ^{cA}	60	
65.08±1.04 ^{aB}	64.93±0.84 ^{aA}	65.01±1.50 ^{aA}	65.11±0.88 ^{aB}	64.88±1.40 ^{aB}	64.68±1.16 ^{aB}	64.23±1.15 ^{aA}	1	Moisture
66.12±0.96 ^{abAB}	64.95±1.58 ^{bA}	65.21±0.94 ^{abA}	66.66±1.01 ^{aAB}	65.72±0.79 ^{abAB}	65.49±1.61 ^{abAB}	62.81±1.65 ^{cAB}	15	
66.22±1.28 ^{aAB}	66.13±1.13 ^{aA}	66.07±1.31 ^{aA}	66.70±1.33 ^{aAB}	66.81±1.26 ^{aA}	66.78±1.07 ^{aA}	61.97±1.05 ^{bB}	30	
66.95±1.09 ^{aA}	66.55±1.29 ^{aA}	66.44±0.88 ^{aA}	67.89±1.16 ^{aA}	67.09±1.49 ^{aA}	67.09±1.02 ^{aA}	62.44±0.95 ^{bAB}	60	
15.08±0.88 ^{aA}	15.13±1.22 ^{aA}	15.16±1.12 ^{aA}	15.07±1.03 ^{aA}	15.19±0.79 ^{aA}	15.12±0.87 ^{aA}	15.27±0.99 ^{aA}	1	Fat
14.88±0.92 ^{aAB}	14.95±1.16 ^{aA}	15.01±1.02 ^{aAB}	14.74±1.38 ^{aA}	14.72±1.02 ^{aAB}	14.89±1.29 ^{aAB}	14.97±0.70 ^{cA}	15	
14.03±1.14 ^{aAB}	14.44±0.91 ^{aA}	14.65±0.86 ^{aAB}	13.78±1.06 ^{aAB}	14.04±1.34 ^{aAB}	14.49±1.23 ^{aAB}	14.86±1.01 ^{aA}	30	
13.80±1.23 ^{abB}	14.00±1.05 ^{abA}	14.02±0.95 ^{abB}	13.12±1.22 ^{aB}	13.56±1.33 ^{abB}	13.71±0.96 ^{abB}	14.88±0.94 ^{bA}	60	
2.86±0.36 ^{aA}	2.94±0.28 ^{aA}	2.61±0.43 ^{aB}	3.01±0.39 ^{aA}	2.88±0.36 ^{aA}	2.81±0.30 ^{aA}	2.69±0.19 ^{aA}	1	Syneresis
2.93±0.63 ^{bcA}	3.11±0.40 ^{bA}	3.33±0.55 ^{bA}	2.26±0.68 ^{cB}	2.98±0.33 ^{bA}	3.03±0.42 ^{bA}	4.35±0.33 ^{aB}	15	
2.11±0.55 ^{dcB}	3.20±0.42 ^{bcA}	3.49±0.68 ^{bA}	1.73±0.31 ^{eB}	2.59±0.40 ^{cdA}	2.89±0.31 ^{bcdA}	6.29±0.49 ^{aC}	30	
1.04±0.34 ^{dC}	1.88±0.37 ^{bB}	2.28±0.36 ^{bB}	0.52±0.28 ^{dC}	1.31±0.29 ^{cB}	1.90±0.25 ^{bB}	5.17±0.51 ^{aD}	60	

WCE: *coagulans* extract, WEM: water extraction method, AEM: alcoholic extraction method. Different small and capital letters represent significant differences ($p<0.05$) in the rows and columns, respectively. Results are expressed as average of three independent replicate trials ± standard deviations.

همانند pH، نمونه‌های تهیه شده توسط WCE از مقدار رطوبت بالاتری نسبت به پنیر شاهد برخوردار بودند. براساس نتایج به‌دست آمده در این تحقیق، پنبرهای تهیه شده با WCE از مقادیر پروتئین کل پایین‌تر و پروتئین محلول در آب و محلول در 12 درصد تری کربوکسیلیک اسید (TCA 12%) بسیار بالاتری نسبت به نمونه‌ی شاهد به ویژه در اواسط و پایان دوره نگه‌داری برخوردار بودند (نتایج نشان داده نشده است) که بیانگر پروتئولیز بیشتر توسط آنزیم‌های پروتئاز گیاهی نسبت به نمونه شاهد بود. در مطابقت با نتایج این تحقیق، پزشکی و همکاران [9] افزایش شدت پروتئولیز را در نمونه‌های پنیر تهیه شده با آنزیم گیاهی گزارش کردند. با توجه به اینکه پروتئولیز با آزاد ساختن گروه‌های قطبی مثل گروهای آمین و کربوکسیل اسیدهای آمینه و پپتیدها باعث افزایش قابلیت حل شدن و جذب آب پروتئین‌ها می‌شود، به همین خاطر هر چه شدت پروتئولیز بالاتر باشد، میزان جذب آب بیشتر می‌شود[28]. همانند pH، روند تغییرات رطوبت در نمونه‌های پنیر تهیه شده با WCE در طی دوره نگه‌داری افزایش یافت که این تغییرات در سطوح بالای WCE معنی‌دار گردید. علت افزایش ماده خشک پنیر شاهد در ابتدا تا اواسط دوره نگه‌داری احتمالاً مربوط به جذب نمک توسط دلمه و خروج آب از آن می‌باشد. تبادل نمک تا زمان رسیدن به فشار اسمزی متعادل میان پنیر و آب‌پنیر ادامه دارد [29]. تعادل ایجاد شده بین کاهش چربی در اثر لیپولیز و افزایش آن در اثر سینرزیس توسط جوینده و همکاران (2018) نیز گزارش شده است [30].

همان‌طور که در جدول2 می‌توان ملاحظه نمود، افزودن پروتئاز گیاهی به پنیر باعث کاهش میزان چربی در آن گردید، اما تأثیرتیمار آنزیم به جز پایان مدت نگه‌داری در سایر دوره‌ها از لحاظ آماری معنی‌دار نگردید. بیش‌ترین میزان چربی با 15/27درصد برای نمونه‌ی شاهد و کم‌ترین میزان آن با13/12درصد برای نمونه تهیه شده با غلظت 1/5 درصد عصارهWCEبه روش استخراج الکلی تعیین شد. در مطابقت با نتایج این تحقیق، پزشکی و همکاران (2011) مقدار کمتر چربی را در نمونه‌های تهیه شده با WCEنسبت به پنیر تهیه شده با رنت میکروبی (*Rhizomucor miehei*) گزارش نمودند، این محققین نیز اختلاف معنی‌داری در میزان چربی در دو نمونه پنیر تولیدی از مایه‌پنیر قارچی (17/85درصد چربی) و مایه پنیر گیاهی (18/25درصد چربی) مشاهده نکردند. همچنین، هرچند مقدار چربی با گذشت زمان نگه‌داری در نمونه‌های پنیر تهیه شده با WCE به شکل معنی‌داری ($p<0/05$) کاهش یافت که دلیل آن می‌تواند هیدرولیز چربی باشد [31]؛ میزان چربی در نمونه‌ی کنترل در طول نگه‌داری تغییر چندانی ننمود که دلیل آن می‌تواند آب‌اندازی بیشتر در این پنیر و افزایش مواد جامد پنیر منجمله چربی در آن باشد.

در مورد آب‌اندازی یا سینرزیس پنیر نیز نتایج مبیّن تأثیر معنی‌دار روش انعقاد آنزیمی و زمان نگه‌داری بر مقادیر این پارامتر در نمونه‌های پنیر بود ($p<0/05$). به طور کلی میزان آب‌اندازی در نمونه‌ی شاهد به جز ابتدای نگه‌داری بیشتر از نمونه‌های تهیه شده با WCE بود. به علاوه، برخلاف نمونه‌ی شاهد که با گذشت زمان میزان آب‌اندازی آن افزایش می‌یافت، در نمونه‌های تهیه شده با WCEاین پارامتر به‌شکل معنی‌داری در پایان زمان نگه‌داری کاهش یافت. همان‌گونه که در بالا اشاره گردید، علت تغییر ننمودن این پارامتر در نمونه‌های تهیه شده با WCE به دلیل پروتئولیز بیشتر در این نمونه‌هاست چرا که پروتئولیز با آزاد ساختن گروه‌های قطبی مثل گروه‌های آمین و کربوکسیل اسیدهای آمینه و پپتیدها باعث افزایش قابلیت حل شدن و جذب آب توسط پروتئین‌هاو جلوگیری از خروج آب از دلمه می‌شود[28].

3-3- پذیرش‌کلی

میانگین نتایج تأثیر نوع آنزیم و غلظت WCE بر مقادیر امتیازات پذیرش‌کلی نمونه‌های پنیر طی مدت 60 روز نگه‌داری در شکل3 نشان داده شده است. هرچند نمونه‌های تهیه شده با WCE در ابتدا تا اواسط دوره نگه‌داری از قابلیت پذیرش قابل قبولی نسبت به نمونه شاهد برخوردار بودند، اما با گذشت زمان نگه‌داری این اختلافات افزایش یافت به نحوی که در پایان دوره 60 روزه نگه‌داری، نمونه‌های حاوی غلظت‌های 1 و 1/5درصد WCE از پذیرش‌کلی بسیار پایین‌تری($p<0/01$) نسبت به سایر نمونه‌ها به‌ویژه شاهد برخوردار بودند. ارزیابان علت کاهش قابل توجه امتیاز پذیرش‌کلی پنیر در این نمونه‌ها را به تلخ‌تر بودن این نمونه‌ها نسبت دادند. این نتایج مطابق با نتایج گزارش شده توسط بیگمی و همکاران (2014) است که کاهش خواص حسی محصول در پنیر تهیه شده توسط پروتئاز گیاهی پنیرباد را در مقایسه با نمونه‌ی تهیه شده با مایه پنیر قارچی طی مدت زمان نگه‌داری گزارش نمودند[12]. همچنین نتایج پژوهش حاضر نشان داد که علاوه بر نمونه‌های تهیه شده با عصاره حاوی پروتئاز گیاهی پنیرباد، مقدار امتیاز پذیرش کلی نمونه شاهد (تهیه شده با کیموزین نوترکیب قارچی) نیز با گذشت زمان نگه‌داری به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($p<0/01$).

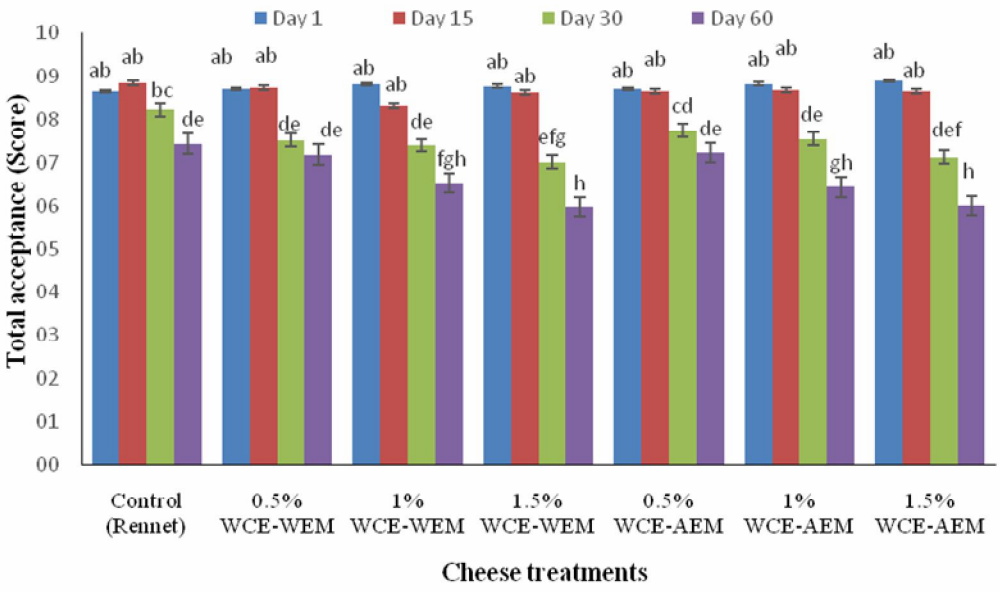

Fig 3 Total acceptance of ultrafiltrated cheese samples prepared with different WCE concentrations during 60 days of cold storage period. WCE: *coagulans* extract, WEM: water extraction method, AEM: alcoholic extraction method, different letters represent significant differences ($p<0.05$)

4- نتیجه‌گیری

در ایران با وجود توسعه چشمگیر صنعت پنیر سازی در دهه گذشته، هنوز مایه‌پنیر مورد نیاز این صنعت از خارج وارد می‌شود و سالانه مقادیر قابل‌توجهی ارز صرف واردات مایه پنیر از خارج می‌گردد که در صورت استفاده از آنزیم‌های گیاهی بومی منطقه می‌توان مانع از خروج ارز از کشور شد. همچنین، باتوجه به خواص درمانی و سلامت‌بخش گیاه پنیرباد، در صورت به‌کارگیری عصاره آن در تولید پنیر می‌توان محصولی با خواص سلامت بخش تولید نمود. با توجه به نتایج به دست‌آمده در این تحقیق می‌توان بیان نمود که با استفاده از عصاره‌های استخراجی آبی یا الکلی گیاه *ویتانیا کواگولانس* می‌توان پنیر فراپالوده‌ای با خواص فیزیکوشیمیایی مشابه پنیر تولیدی در بازار تهیه نمود و از آن به‌عنوان یک جایگزین مناسب برای رنت‌های حیوانی و میکروبی استفاده کرد. در این میان، غلظت عصاره گیاهی به‌کار رفته با توجه به زمان ماندگاری محصول متفاوت می‌باشد چرا که در صورت استفاده از مقدار 0/5 و 1 درصد عصاره، زمان ماندگاری پنیر تولیدی به‌ترتیب 1 و 2 ماه خواهد بود. درهرحال، استفاده از این آنزیم نیاز به بررسی کامل‌تر موضوعاتی از قبیل خالص‌سازی، ایمنی و تأثیر این آنزیم بر فعل و انفعالات فیزیکوشیمیایی طی رسیدن پنیر دارد.

5- سپاسگزاری

نویسندگان مقاله مراتب سپاس خود را از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان بابت پشتیبانی مالی از این تحقیق اعلام می‌دارند.

6- منابع

[1] Low, Y.H., Agboola, S., Zhao, J., Lim, M.Y. (2006). Clotting and proteolytic properties of plant coagulants in regular and ultrafiltered bovine skim milk. *International Dairy Journal*,16(4), 335-43.

[2] Agboola, S.O., Chan, H.H., Zhao, J., Rehman, A. (2009). Can the use of Australian cardoon (*Cynara cardunculus* L.) coagulant overcome the quality problems associated with cheese made from

paneer bad (*Withania coagulans*) protease and fungal rennet. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*,8(1), 253-262[In Persian].

[13] Salehi, M., Aghamaali, M.R., Sajedi, R.H., Asghari, S.M., Jorjani, E. (2017). Purification and characterization of a milk-clotting aspartic protease from *Withania coagulans* fruit. *International Journal of Biological Macromolecules*, 98, 847-854.

[14] Qazalbash, M.A., Masud, T., Sammi, Sh., Sanaullah Khan, R., LATIF, A. (2018). Effect of different storage conditions on coagulating properties and cheese quality of *Withania coagulans* extract.*International Journal of Dairy Technology*. 71 (3), 654-662.

[15] Dastur, N.N. (1948). *Milk Clotting Enzymes from Plants*. Indian Dairy Research Institute, Bangalore.

[16] Naz, S., Masud, T., Nawaz, M. A. (2009). Characterization of milk coagulating properties from the extract of *Withania coagulans*. *International Journal of Dairy Technology*, 62(3), 315-320.

[17] Danesh, E., Jooyandeh, H., Goudarzi, M. (2017). Improving the rheological properties of low-fat Iranian UF-Feta cheese by incorporation of whey protein concentrate and enzymatic treatment of transglutaminase. *Iranian Journal Food Science Technology.*, 14(67), 285-298 [In Persian].

[18] AOAC. (2000). *Official Methods of Analysis*. 17th ed, Association of official Analytical chemists, Gaithersburg, Maryland, USA**.**

[19] Kuchroo, C.N., Fox, P.F. (1982). Soluble nitrogen in cheddar cheese: comparison of extraction procedures. *Michwissenchaft*, 37(6), 331-335.

[20] Koca, N., Metin, M. (2004). Textural, melting and sensory properties of low-fat fresh kashar cheeses produced by using fat replacers. *International Dairy Journal*, 14(4), 365-373.

[21] Rostamabadi, H., Jooyandeh, H., Hojjati, M. (2017). Optimization of physicochemical, sensorial and color properties of ultrafiltrated low-fat Iranian white cheese containing fat replacers by Response Surface Methodology. *Iranian Journal Food Science Technology.*, 14(63), 91-106 [In Persian].

[22] Juan, B., Zamora, A., Quintana, F., Guamis, B., Trujillo, A.J. (2013). Effect of inulin addition on the sensorial properties of ultrafiltered milk?.*LWT-Food Science and Technology*, 42(8), 1352-1359.

[3] Foruzan, S., Khosroshahi asl, A., Taslimi, A., Madadadloo, A., Mashayekh, M. (2009). Study of the effects of microbial, recombinant and animal rennets on some of the qualitative and quantitative properties of iranian white cheese. *Iranian Journal Food Science Technology.*, 6(3), 63-72 [In Persian].

[4] Faro, C., Verissimo, P., Lin, Y., Tang, J., Pires, E. (1995). *Aspartic proteinases: structure, function, biology and biomedical implications*, Takahashi, K. New York: Plenum Press.

[5] Mirheydar, H. (1996).*Plant Cultivation: application of plant in preventing and curing of diseases*. 4th edition, Daftar-e Nashr-e Farhang-e Islami, Tehran, Iran. 328-331 [In Persian].

[6] Hemalatha, S., Kumar, R., Kumar, M. (2008). *Withania coagulans* Dunal, A Review. *Phcog.Rev*. 2, 351-358.

[7] Gupta, V.,Keshari, B.B. (2013). *Withania coagulans Dunal* (paneer doda): A review. *International Journal of Ayurvedic and Herbal Medicine*, 3(5), 1130-1136.

[8] Bakhthavar S., Mughal T., Naeem I. (2010) Chemical Composition of the Essential Oil of *Withania coagulans. Asian Journal of Chemistry*. 22, 122-126.

[9] Pezeshki, A., Hesari, J., Ahmadi Zonoz, A., Ghambarzadeh, B. (2011). Influence of *Withania coagulans* Protease as a Vegetable Rennet on Proteolysis of Iranian UF White Cheese. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 13(4), 567-576.

[10] Nawaz, M.A., Masud, T.,Sammi, Sh. (2011). Quality evaluation of mozzarella cheese made from buffalo milk by using paneer booti (*Withania coagulans*) and calf rennet. *International Journal of Dairy Technology*, 64(2),218-226.

[11] Beigomi, M., Mohammadifar, M.A., Qhods Rohani, M., Hashemi, M., Valizadeh, M. (2013). Partial purification and characterization of milk-clotting enzyme extracted from *Withania coagulans* fruit.*Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 8(2), 31-40[In Persian].

[12] Beigomi, M., Mohammadifar, M.A., Hashemi, M., Qhods Rohani, M., Senthil, K.,Valizadeh, M. (2014). Comparison of textural and sensory characteristics of ultrafiltrated white cheese produced by

reduced‐fat fresh cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 66(4), 478-483.

[23] Fresno, M., Álvarez, S., Rodríguez, V., Castro, N., Argüello, A. (2006). Evaluation of the effect of rennet type on the texture and color of goat cheese. *Journal of Applied Animal Research*, 30,157–160.

[24] Fernandes, A., Barreira, J.C.M., Barros, L., Mendonça, A., FerreiraIsabel, C.F.R., de Sousa, F.R. (2018). Chemical and physicochemical changes in Serrana goat cheese submitted to extra-long ripening periods. *LWT Food Science and Technology*, 87, 33–39.

[25] Kim, S.H., Lee, S.Y., Palanivel, G., Kwak, H.S. (2010).Effect of Discorea opposita thunb. (yam) supplementation on Physicochemical and sensory characteristics of yogurt. *Journal of Dairy Science*, 94, 1705-1712.

[26] McSweeney, P.L.H. (2004). Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 57(23),127‐44.

[27] Adams, M.R., Moss, M.O. (2008). *Food Microbiology*. 3rd ed., The Royal Scoiety of Chemistry, Cambridge, 463p.

[28] Brunner, J.R. (1981). Cow milk proteins: Twenty-five years of progress. *Journal of Dairy Science*, 64, 1038-1050.

[29] Geurts, T.J., Walstra, P., Mulder, P. (1974). Transport of salt and water during salting of cheese. I. Analysis of the processes involved. *Neth. Milk Dairy Journal*, 28,102–129.

[30] Jooyandeh, H., Danesh, E., Goudarzi, M. (2017). Influence of Transglutaminase Treatment on Proteolysis and Lipolysis of Low-Fat White-Brined Cheese Incorporated with Whey Proteins during Ripening. *Journal ofFood Technology and Nutrition*, 15(4), 31–44 [In Persian].

[31] Robinson R.K., Tamime,A.Y. (eds). (1991). *Feta and related cheeses*. Ellis Horwood Ltd, England.

Utilization of *Withania coagulans* extract as rennet replacer on color and physicochemical characteristics of ultrafilterated Iranian white cheese

Jooyandeh, H.[1*], Ghasemi, A. [2], Hojjati, M. [1], Nasehi, B. [1,3]

1. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran
2. M.Sc., Department of Food Science and Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran
3. Associate Professor, Department of Agricultural Engineering and Technology, Payame Noor University (PNU), Iran

(Received: 2019/11/10 Accepted:2020/02/22)

In this study, the possibility of application of *Withania coagulans*extract (WCE) as a microbial rennet substituent in production of ultrafiltrated Iranian white cheese was evaluated. WCE was extracted by two water and alcoholic extraction methods and the levels of 0.5, 1 and 1.5% of mentioned extractscontained plant proteinase were used in cheese making. The color parameters (brightness/L*, redness/a* and yellowness/b*),physicochemical properties (pH, moisture, fat, syneresis, total protein, soluble protein inwater and in 12% TCA) and total acceptance of produced cheeses were compared with the control sample (prepared with commercial recombinant chymosin) during 60 days of storage. Results showed that the type of enzyme and the time of storage had significant effect on L* and b* index values of the cheese samples but these variables haven't significant effect on the a* index. By increasing the amount of WCE and storage period, the L* ($p<0.01$) and b* values($p<0.05$) weresignificantly decreased and increased, respectively. Generally,WCE-cheeses, especially the kind of water extraction, had the lower protein and fat and thehigher moisture, pH, and soluble protein in water and 12% TCA as compared to control sample. Although all the cheeses till the middle of the storage had adequate acceptability,WCE-cheeses containing 1 and 1.5% WCE had significantly ($p<0.01$) lower acceptability than 0.5% WCE-cheese and control after 60 days of the storage.The results of this study showed that by using1% WCE, especially in its alcoholic form, an ultrafiltrated Iranian white cheese with an acceptable quality can be produced. However, commercial application of this extract in order toreplacewith microbial rennet requiresthe risk assessmentand toxicity teststo convince that the WCE is harmless for the human health.

Keywords:*Withania coagulans,* Water and alcoholic extraction,Physicochemical properties, Storage period

[*] Corresponding Author E-Mail Address: hosjooy@asnrukh.ac.ir