

# 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<sup>1\*</sup>، احمد قاسمی<sup>2</sup>، محمد حجتی<sup>1</sup>، بهزاد ناصحی<sup>3</sup> و<sup>1</sup>

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 کوگولانس (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 پذیرش کلی 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 WCE به 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 به نحوی که در پایان دوره 60 روزه نگهداری، نمونه‌های حاوی غلظت‌های 1 و 1/5 درصد WCE از پذیرش کلی پایین‌تری (p<0/01) نسبت به نمونه‌های تهیه شده از 0/5 درصد WCE و 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 هر حال، 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 کوگولانس، استخراج آبی و الکلی، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، زمان نگهداری

## 1- مقدمه

یکی از پرمصرف‌ترین پنی‌های 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 35 درصد 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  $5 \pm 0/5$  (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-فنیل آلانین) زنجیره پروتئین کاپاکازئیمی‌گردد؛ 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. درحال، جهت تولید پنیر غالباً از پروتئاز گیاهی سینارین 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 پنی‌های 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 پنی‌های 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 و سرکوب 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 هنگامی که خشک می‌شود از آن به‌عنوان یک اشتها آور استفاده می‌شود [8].

هرچند استفاده از پروتئازهای گیاهی در پنی‌سازی مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است، اما تا کنون تحقیقات کمی در مورد به‌کارگیری عصاره گیاه ویتانیا کواگولانس (*WCE*) در تولید پنیر به ویژه پنیر سفید فراپالوده انجام شده است. پزشکی و همکاران در سال 2011 اثرات پروتئولیز میوه گیاه پنیرباد را بر پنی‌سفید 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 پنی‌های ساخته شده با ویتانیا کواگولانس بالاتر بود، پنی‌تهیه شده با رنت گیاهی فاقد کازئین‌های  $\alpha_{S1}$  و  $\beta$  بود و به علاوه مقدار نیتروژن 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 گاو میوه 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  $37^\circ\text{C}$  به‌دست می‌آمد. به علاوه، پنیر موزارلای تهیه شده از عصاره گیاهی مذکور نسبت به مایه پنیر رنت گاوی از کیفیت قابل قبولی برخوردار

آبی به عنوان جایگزین رنت در تولید پنیر سفید فرآپالوده 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 طبیعی خوزستان مورد تأیید قرار گرفت. میوه گیاه پنیرباد پس از شستشو در دمای محیط خشک شد. برای تهیه پنیر فرآپالوده 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 کر موریس و لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه لاکتیس و استارتر ترموفیل YO-MIX 532 حاوی استرپتوکوکوس ترموفیلوس و لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بولگاریکوس از شرکت دانیسکوی آلمان و رنت با نام تجاری کی مکس<sup>1</sup> از نوع کیموزین نوترکیب بیان شده توسط قارچ آسپرژیلوس نیجر وارپته آواموری<sup>2</sup> 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 WCE به روش استخراج الکلی و آبی

برای تهیه عصاره حاوی آنزیم به شیوه استخراج الکلی (WCE-AEM<sup>3</sup>) از روش دستور [15] با کمی تغییرات استفاده گردید. ابتدا 20 گرم از میوه گیاه ویتانیاکواگولانس با دستگاه آسیاب (مدل GR-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

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 به طوری 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 فارچی در مقایسه با عصاره گیاهی بالاتر بود و پنیر تهیه شده از پروتئاز گیاهی به ویژه در انتهای زمان نگه‌داری کاملاً تلخ مزه بود. در تحقیق انجام شده توسط صالحی و همکاران (2017)، خالص‌سازی آنزیم از WCE و 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<sub>2</sub> باعث کاهش فعالیت آنزیمی می‌شوند و از این رو این محققین پیشنهاد نمودند که آنزیم استخراجی این گیاه برای تولید پنیر کم‌نمک مناسب‌تر است. قزلباش و همکاران (2018) تأثیر شرایط مختلف نگه‌داری عصاره گیاه پنیرباد را بر کمیت و کیفیت پنیر کاتیج تولید شده از شیر گاو میش 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 عملگر اقرار بگیرد. با وجود معدود تحقیقات انجام شده در زمینه به‌کارگیری عصاره گیاه ویتانیاکواگولانس (WCE) در تولید پنیر، تاکنون تحقیقی در مورد استخراج WCE به روش آبی و الکلی و به‌کارگیری آن‌ها در تولید پنیر فرآپالوده انجام پذیرفته است. بنابراین این تحقیق به منظور بررسی امکان به‌کارگیری WCE الکلی و

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

توسط مبدل حرارتی صفحه‌ای تا دمای  $50^{\circ}\text{C}$  گرم شد و پس از عبور از غشای فرآپالایش به دو بخش تراوه و ناتراوه تقسیم گردید. در ادامه، دمای ناتراوه قبل از مایه‌زنی به  $25^{\circ}\text{C}$  کاهش یافت و به آن مقدار 0/02 درصد مخلوط پودر استراتر مزوفیل و ترموفیل اضافه گردید. پس از افزودن مقادیر 0/5 و 1 و 1/5 درصد از هر یک از عصاره‌های WCE به روش آبی یا الکلی به ناتراوه، نمونه‌ها در داخل بسته‌های پنیر  $200^{\circ}\text{C}$  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  $37^{\circ}\text{C}$  و رسیدن pH نمونه‌ها به 4/8، نمونه‌های پنیر به سردخانه با دمای  $1^{\circ}\text{C} \pm 7$  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<sup>2</sup> (سری CR-400، ساخت ژاپن) انجام گرفت که در آن  $L^*$ ،  $a^*$  و  $b^*$  به ترتیب 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 تیتراژ کردن محلول رقیق شده از پنیر با محلول سود یک نهم نرمال در حضور معرف فنل‌فتالین؛ چربی توسط روش حجمی ژربرو استفاده از بوتیرومتر؛ رطوبت نمونه‌های پنیر به روش آون‌گذاری در دمای  $105^{\circ}\text{C}$  در مدت حدود 2 ساعت و تا رسیدن به وزنی ثابت؛ و مقدار پروتئین کل از طریق حاصل ضرب مقدار نیتروژن به دست 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

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 3000 g به مدت نیم ساعت در دمای محیط ( $25^{\circ}\text{C}$ ) کاملاً 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 2500 g 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  $18^{\circ}\text{C}$ - 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  $0\%/85\text{NaCl}$  مخلوط و توسط دستگاه اولتراس (Ultra-Turrax T25، آلمان) به مدت سه دقیقه در دمای محیط همگن شد. سپس مخلوط حاصل به مدت 24 ساعت در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  قرار گرفت. برای جداسازی مواد نامحلول، محلول حاصل به مدت 15 دقیقه در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  درجه با دور  $5000 \times \text{g}$  سانتریفیوژ شد. محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ تا زمان استفاده در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  نگهداری شد.

## 2-3- تولید پنیر سفید ایرانی فرآپالوده

پنیر فرآپالوده 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  $4-6^{\circ}\text{C}$  وارد مخازن نگهداری شیر خام مخصوص تولید پنیر فرآپالایش شد. پس از استاندارد کردن میزان چربی شیر در سپراتور، شیر با چربی استاندارد طی دو مرحله باکتریوگاسیون گردید تا بیش از 99 درصد از بار میکروبی آن کاسته شود. سپس شیر در مبدل حرارتی صفحه‌ای در دمای  $76^{\circ}\text{C}$  به مدت 15 ثانیه پاستوریزه و برای خنک‌سازی تا دمای  $6^{\circ}\text{C}$  به مخازن نگهداری شیر پاستوریزه فرستاده شد. جهت تغلیظ، شیر پاستوریزه ابتدا

2. Chroma meter

1. *Withanacoagulans* extract-water extraction method

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 (4×7) 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 فرپالوده طی مدت 2 ماه نگهداری در یخچال در جدول 1 نشان داده شده است. مطابق نتایج به دست 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 فرپالوده‌ی 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 احتمالاً می‌تواند به دلیل وجود آنزیم لیپاز و فعالیت لیپولیتیکی در عصاره باشد. به علاوه، علت پایین‌تر بودن شاخص  $L^*$  در نمونه‌های تهیه شده با پروتئاز گیاهی به ویژه در نمونه‌های تهیه شده با عصاره الکلی نسبت به نمونه شاهد می‌تواند به دلیل

نیترژن محلول در آب ( $WSN^1$ ) و ازت محلول در تری کلرواستیک اسید 12 درصد ( $TCA-SN^2$ ) پنیر به 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 دور در دقیقه در دو مرحله یک دقیقه‌ای به خوبی همگن شد و pH هرکدام از نمونه‌ها با استفاده از محلول HCl و یا 2N NaOH 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 آن 40 درجه سانتی‌گراد قرار داده 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 پذیرش کلی

پذیرش کلی نمونه‌های پنیر از طریق یک آزمون ترجیحی<sup>3</sup> 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 WCE تهیه 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، ۳۰، ۱۵ و

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

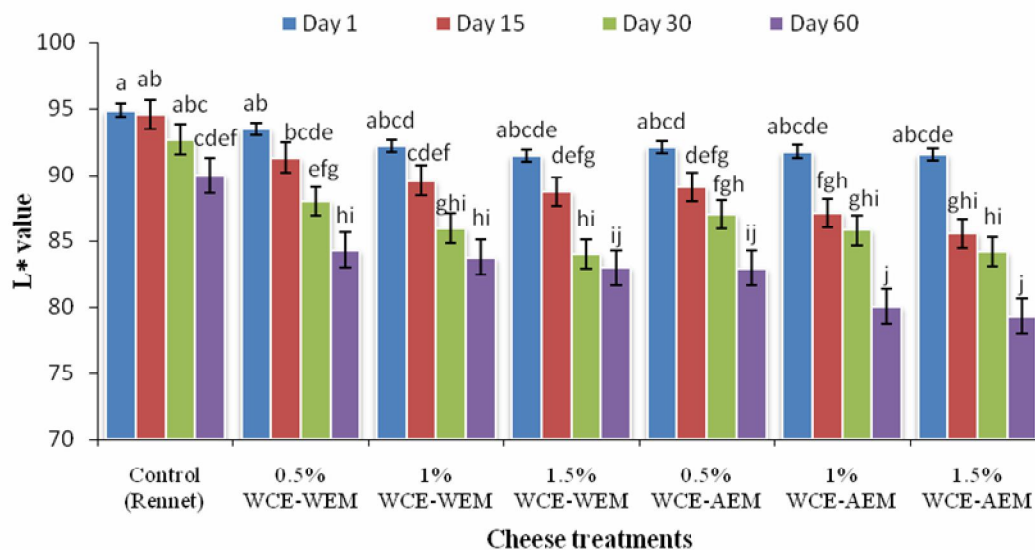
آبی و الکلی، شاخص  $L^*$  به شکل قابل توجهی کاهش یافت. همچنین با گذشت زمان ماندگاری، میزان روشنایی در تمامی نمونه‌های پنیر کاهش معنی‌داری ( $p < 0/01$ ) یافت و همان‌گونه که در بالا اشاره شد، این کاهش در نمونه‌های تهیه شده با پروتئاز گیاهی به دلیل هیدراتاسیون بالاتر قابل توجه‌تر بود. بیش‌ترین میزان شاخص  $L^*$  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.

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  $WCE < WCE-WEM < AEM$  تعیین شد (شکل 1). با افزایش غلظت آنزیم در هر دو نوع نمونه‌های پنیر تهیه شده با آنزیم گیاهی به روش استخراج

**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 ( $p < 0.05$ )

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

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

همان‌گونه که در بالا گفته شد، این تغییرات معنی‌دار ( $p > 0/05$ ) نگردید.

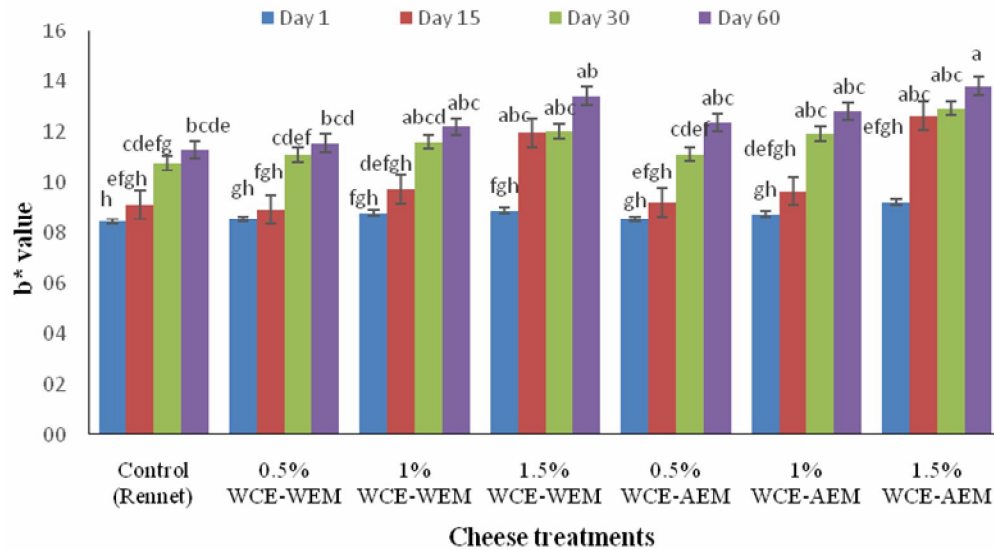
### 3-2- ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی

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 (12% TCA) 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 1/5 درصد WCE مشاهده شد. در حقیقت، روند تغییرات pH 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 اسیدآمینها 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 با WCE می‌شود [26]. از طرف دیگر، با توجه به جدول 2، به دلیل بالاتر بودن مقدار رطوبت در نمونه‌های پنیر تهیه شده با WCE، غلظت یون  $H^+$  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 به طور معنی‌داری بالاتر از پنیرهای تولید شده با مایه پنیر قارچی گزارش نمودند [12].

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 به-دست آمده در این تحقیق، فرناندز و همکاران (2018) افزایش نسبی زردی را در پنیر سرانا<sup>1</sup> 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 سبزیابی به طور جزئی ( $p > 0/05$ ) 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 ریوبلاوین (عامل القای رنگ سبز در فراورده) می‌گردد، می‌توان دلیل احتمالی کاهش  $a^*$  (افزایش سبزیابی) 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 احتمالاً افزایش سینرسیس در این نمونه همگام با گذشت زمان می‌باشد (جدول 2). بیشترین میزان سبزیابی در نمونه‌های پنیر تهیه شده با آنزیم پروتئاز گیاهی استخراج شده به روش الکلی (WCE-AEM) با مقدار سبزیابی 2/94- و کمترین آن در نمونه پنیر کنترل با مقدار 2/28- در ابتدای زمان نگهداری تعیین شد؛ اما



**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)	Physicochemical properties
15	1	05	15	1	05			
4.59±0.11 <sup>aB</sup>	4.57±0.12 <sup>aB</sup>	4.54±0.14 <sup>aB</sup>	4.60±0.08 <sup>aB</sup>	4.59±0.14 <sup>aB</sup>	4.55±0.14 <sup>aB</sup>	4.52±0.08 <sup>aB</sup>	1	pH
4.63±0.04 <sup>aB</sup>	4.62±0.04 <sup>aAB</sup>	4.60±0.05 <sup>aAB</sup>	4.66±0.05 <sup>aB</sup>	4.64±0.09 <sup>aB</sup>	4.62±0.04 <sup>aB</sup>	4.44±0.12 <sup>bB</sup>	15	
4.74±0.06 <sup>abAB</sup>	4.70±0.05 <sup>abAB</sup>	4.65±0.08 <sup>abAB</sup>	4.80±0.12 <sup>aA</sup>	4.73±0.04 <sup>abAB</sup>	4.69±0.07 <sup>abAB</sup>	4.40±0.06 <sup>bB</sup>	30	
4.88±0.15 <sup>abA</sup>	4.80±0.14 <sup>abA</sup>	4.73±0.12 <sup>bcA</sup>	4.92±0.09 <sup>aA</sup>	4.84±0.05 <sup>abA</sup>	4.80±0.06 <sup>abA</sup>	4.64±0.11 <sup>ca</sup>	60	
65.08±1.04 <sup>aB</sup>	64.93±0.84 <sup>aA</sup>	65.01±1.50 <sup>aA</sup>	65.11±0.88 <sup>aB</sup>	64.88±1.40 <sup>aB</sup>	64.68±1.16 <sup>aB</sup>	64.23±1.15 <sup>aA</sup>	1	Moisture
66.12±0.96 <sup>abAB</sup>	64.95±1.58 <sup>ba</sup>	65.21±0.94 <sup>abA</sup>	66.66±1.01 <sup>aAB</sup>	65.72±0.79 <sup>abAB</sup>	65.49±1.61 <sup>abAB</sup>	62.81±1.65 <sup>aB</sup>	15	
66.22±1.28 <sup>aAB</sup>	66.13±1.13 <sup>aA</sup>	66.07±1.31 <sup>aA</sup>	66.70±1.33 <sup>aAB</sup>	66.81±1.26 <sup>aA</sup>	66.78±1.07 <sup>aA</sup>	61.97±1.05 <sup>bB</sup>	30	
66.95±1.09 <sup>aA</sup>	66.55±1.29 <sup>aA</sup>	66.44±0.88 <sup>aA</sup>	67.89±1.16 <sup>aA</sup>	67.09±1.49 <sup>aA</sup>	67.09±1.02 <sup>aA</sup>	62.44±0.95 <sup>abAB</sup>	60	
15.08±0.88 <sup>aA</sup>	15.13±1.22 <sup>aA</sup>	15.16±1.12 <sup>aA</sup>	15.07±1.03 <sup>aA</sup>	15.19±0.79 <sup>aA</sup>	15.12±0.87 <sup>aA</sup>	15.27±0.99 <sup>aA</sup>	1	Fat
14.88±0.92 <sup>aAB</sup>	14.95±1.16 <sup>aA</sup>	15.01±1.02 <sup>aAB</sup>	14.74±1.38 <sup>aA</sup>	14.72±1.02 <sup>aAB</sup>	14.89±1.29 <sup>aAB</sup>	14.97±0.70 <sup>ca</sup>	15	
14.03±1.14 <sup>aAB</sup>	14.44±0.91 <sup>aA</sup>	14.65±0.86 <sup>abAB</sup>	13.78±1.06 <sup>abAB</sup>	14.04±1.34 <sup>aAB</sup>	14.49±1.23 <sup>aAB</sup>	14.86±1.01 <sup>aA</sup>	30	
13.80±1.23 <sup>abB</sup>	14.00±1.05 <sup>abA</sup>	14.02±0.95 <sup>abB</sup>	13.12±1.22 <sup>abB</sup>	13.56±1.33 <sup>abB</sup>	13.71±0.96 <sup>abB</sup>	14.88±0.94 <sup>ba</sup>	60	
2.86±0.36 <sup>aA</sup>	2.94±0.28 <sup>aA</sup>	2.61±0.43 <sup>aB</sup>	3.01±0.39 <sup>aA</sup>	2.88±0.36 <sup>aA</sup>	2.81±0.30 <sup>aA</sup>	2.69±0.19 <sup>A</sup>	1	Syneresis
2.93±0.63 <sup>ba</sup>	3.11±0.40 <sup>ba</sup>	3.33±0.55 <sup>ba</sup>	2.26±0.68 <sup>cb</sup>	2.98±0.33 <sup>ba</sup>	3.03±0.42 <sup>ba</sup>	4.35±0.33 <sup>bB</sup>	15	
2.11±0.55 <sup>db</sup>	3.20±0.42 <sup>bcA</sup>	3.49±0.68 <sup>ba</sup>	1.73±0.31 <sup>cb</sup>	2.59±0.40 <sup>cdA</sup>	2.89±0.31 <sup>bcdA</sup>	6.29±0.49 <sup>C</sup>	30	
1.04±0.34 <sup>cC</sup>	1.88±0.37 <sup>bb</sup>	2.28±0.36 <sup>bb</sup>	0.52±0.28 <sup>dc</sup>	1.31±0.29 <sup>bb</sup>	1.90±0.25 <sup>bb</sup>	5.17±0.51 <sup>dD</sup>	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  $\pm$  standard deviations.

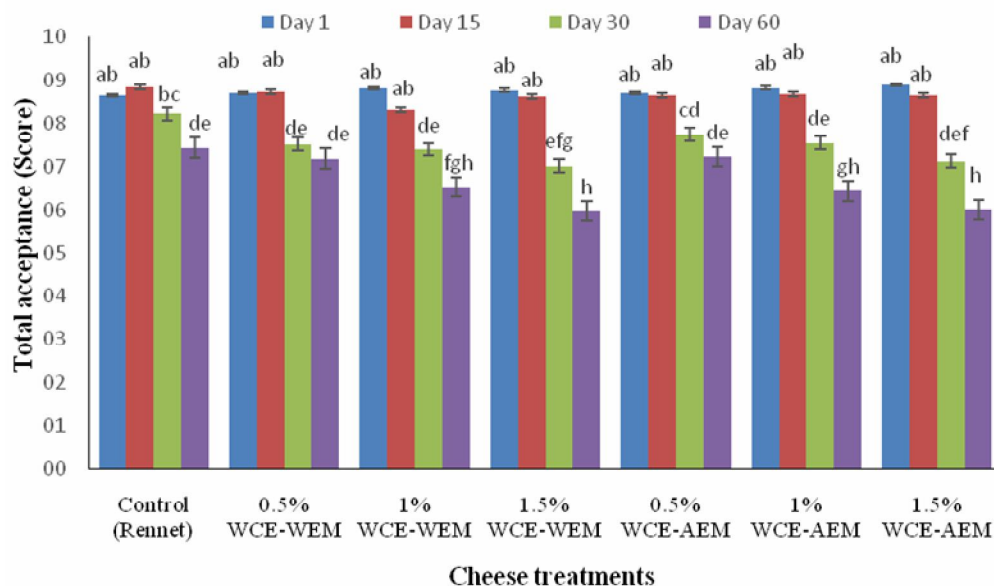


داری ( $p < 0/05$ ) کاهش یافت که دلیل آن می‌تواند هیدرولیز چربی باشد [31]؛ میزان چربی در نمونه‌ی کنترل در طول نگهداری تغییر چندانی نمود که دلیل آن می‌تواند آب‌اندازی بیشتر در این پنیر و افزایش مواد جامد پنیر منجمده چربی در آن باشد. در مورد آب‌اندازی یا سینرزیس پنیر نیز نتایج مبین تأثیر معنی‌دار روش انعقاد 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 WCE این پارامتر به شکل معنی‌داری در پایان زمان نگهداری کاهش یافت. همان‌گونه که در بالا اشاره گردید، علت تغییر نمودن 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 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].

### 3-3- پذیرش کلی

میانگین نتایج تأثیر نوع آنزیم و غلظت WCE بر مقادیر امتیازات پذیرش کلی نمونه‌های پنیر طی مدت 60 روز نگهداری در شکل 3 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 1/5 درصد WCE از پذیرش کلی بسیار پایین‌تری ( $p < 0/01$ ) نسبت به سایر نمونه‌ها به‌ویژه شاهد برخوردار بودند. ارزیابان علت کاهش قابل توجه امتیاز پذیرش کلی 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 ( $p < 0/01$ ).

همانند pH، نمونه‌های تهیه شده توسط WCE از مقدار رطوبت بالاتری نسبت به پنیر شاهد برخوردار بودند. براساس نتایج به‌دست آمده در این تحقیق، پنیرهای 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 گروه‌های 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 جدول 2 می‌توان ملاحظه نمود، افزودن پروتئاز گیاهی به پنیر باعث کاهش میزان چربی در آن گردید، اما تأثیر تیمار آنزیم به جز پایان مدت نگهداری در سایر دوره‌ها از لحاظ آماری معنی‌دار نگردید. بیش‌ترین میزان چربی با 15/27 درصد برای نمونه‌ی شاهد و کم‌ترین میزان آن با 13/12 درصد برای نمونه تهیه شده با غلظت 1/5 درصد عصاره WCE به روش استخراج الکلی تعیین شد. در مطابقت با نتایج این تحقیق، پزشکی و همکاران (2011) مقدار کمتر چربی را در نمونه‌های تهیه شده با WCE نسبت 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 (17/85 درصد چربی) و مایه پنیر گیاهی (18/25 درصد چربی) مشاهده نکردند. همچنین، هرچند مقدار چربی با گذشت زمان نگهداری در نمونه‌های پنیر تهیه شده با WCE به شکل معنی-



**Fig 3** Total acceptance of ultrafiltered 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- نتیجه گیری

و تأثیر این آنزیم بر فعل و انفعالات فیزیکوشیمیایی طی رسیدن پنیر دارد.

در ایران با وجود توسعه چشمگیر صنعت پنیر سازی در دهه گذشته، هنوز مایه پنیر مورد نیاز این صنعت از خارج وارد می شود و سالانه مقادیر قابل توجهی ارز صرف واردات مایه پنیر از خارج می گردد که در صورت استفاده از آنزیم های گیاهی بومی منطقه می توان مانع از خروج ارز از کشور شد. همچنین، با توجه به خواص درمانی و سلامت بخش گیاه پنیرباد، در صورت به کارگیری عصاره آن در تولید پنیر می توان محصولی با خواص سلامت بخش تولید نمود. با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق می توان بیان نمود که با استفاده از عصاره های استخراجی آبی یا الکلی گیاه ویتانیا کوآگولانس می توان پنیر فرآپالوده ای با خواص فیزیکوشیمیایی مشابه پنیر تولیدی در بازار تهیه نمود و از آن به عنوان یک جایگزین مناسب برای رنت های حیوانی و میکروبی استفاده کرد. در این میان، غلظت عصاره گیاهی به کار رفته با توجه به زمان ماندگاری محصول متفاوت می باشد چرا که در صورت استفاده از مقدار 0/5 و 1 درصد عصاره، زمان ماندگاری پنیر تولیدی به ترتیب 1 و 2 ماه خواهد بود. در هر حال، استفاده از این آنزیم نیاز به بررسی کامل تر موضوعاتی از قبیل خالص سازی، ایمنی

#### 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 می دارند.

#### 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*. 17<sup>th</sup> 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. *Michwisenchaft*, 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*. 4<sup>th</sup> 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

- [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*. 3<sup>rd</sup> ed., The Royal Society 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 of Food 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.
- 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., Ferreira Isabel, 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.

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

Jooyandeh, H.<sup>1\*</sup>, Ghasemi, A.<sup>2</sup>, Hojjati, M.<sup>1</sup>, Nasehi, B.<sup>1,3</sup>

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 ultrafiltered 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 extracts contained 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 in water 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) were significantly decreased and increased, respectively. Generally, WCE-cheeses, especially the kind of water extraction, had the lower protein and fat and the higher 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 using 1% WCE, especially in its alcoholic form, an ultrafiltered Iranian white cheese with an acceptable quality can be produced. However, commercial application of this extract in order to replace with microbial rennet requires the risk assessment and toxicity tests to 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