يَا اللَّهُ
وَعَلَى اللَّهِ فَلْيَتَوَكَّلِ الْمُتَوَكِّلُونَ

دانشکده کشاورزی

گروه علوم و صنایع غذایی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته علوم و صنایع غذایی

عنوان

بررسی تأثیر افزودن کازئینات سدیم و عصاره نعناع بر میزان فعالیت بازدارندگی ACEدر ماست پروبیوتیک بدون چربی

اساتید راهنما

پروفسور اصغر خسروشاهی اصل دکتر شهین زمردی

استاد مشاور

دکتر حسن ملکی نژاد

اساتید داور

دکتر محمد علیزاده خالد آباد دکتر میرخلیل پیروزی فرد

تنظیم و نگارش

عزیزه رضایی

شهریور ماه ۹۱

حق چاپ برای دانشگاه ارومیه محفوظ است.

الهی!

تاآموختنی راآموختم ،آموخته راجمله بسوختم !

اندوخته رابرانداختم و انداخته رابیندوختم !

نیست رابفروختم ،تاهست رابیفروختم !

الهی!

تایگانگی بشناختم ! درآرزوی شادی بگداختم

وازعلایق واپرداختم وبودخویش جمله درباختم !

سپاس خدای راکه سخنوران درستودن او بمانندو شمارندگان شمردن نعمت های او ندانند ،وکوشندگان، حق اوراگزاردن نتوانند ،وسلام ودرودبرمحمد(ص) وخاندان پاک او ،طاهران معصوم ،هم آنانکه وجودمان وامدار وجودشان است .

پروردگارابی کران سپاس به درگاه کبریایت که نعمت ورحمت بسیار بسیار بزرگ واهورایی وفراآسمانی به من بخشیدی که شعور وشرافتی یابم تاارزش مهردیگران به ویژه استادان وبزرگان رابه خودم بدانم وآنراپاس بدارم .

بدون شک جایگاه ومنزلت معلم اجل ازآنست که درمقام قدردانی اززحمات بی شائبه آنان بازبان قاصرودست ناتوان چیزی بنگارم ؛ اماازآنجاییکه تجلیل از معلم و استاد سپاس از انسانی است که هدف وغایت آفرینش راتامین می کندو سلامت انسان هایی که به دستش سپرده اند تضمین می کند، بر حسب وظیفه وازباب "من لم یشکر المنعم من المخلوقین لم یشکر الله عزوجل " سپاسگزارم از

استادفرهیخته جناب آقای پروفسور خسروشاهی که بانکته های دلاویزوگفته های بلند، صحیفه های سخن راعلم پرور نمودو همواره راهنماو راهگشای من در اتمام واکمال این رساله بوده است وهمچنین شایسته است از اساتید فرهیخته سرکارخانم دکترزمردی وجناب آقای دکترملکی نژادکه باکراماتی چون خورشید، سرزمین دل رارو شنی بخشیدندو گلشن سرای علم و دانش رابارا هنمایی های کارساز، بارورساختند تقدیروتشکر نمایم .

وباسپاس از استادباکمالات وشایسته جناب آقای دکترمحمد علیزاده که تاآخر عمرادعای شاگردیشان رابه دوش می کشم و دکترپیروزی فردکه درکمال سعه صدرباحسن خلق وفروتنی زحمت داوری این رساله رابرعهده داشتند .

و همچنین این رساله را تقدیم می کنم به روان پاک پدرم که نخستین تعلیم او به من بهای دانش و دانش اندوزی بود و به مادرم که در پیمودن مسیر دانش پیوسته یار و همراهم بوده است.
تقدیم به برادرم که وجودش همواره تکیه گاه من در راه پر فراز و نشیب زندگی و مایه دلگرمی می باشد.
تقدیم به خواهران و دوستان عزیزم، خواهرانی از جنس یاس و دوستانی که لحظه به لحظه ی این مسیر حس همراهیشان، مرا انگیزه می داد. آنقدر بزرگ دارم در میان دوستانم که به رسم ادب نام نمی برم، نکند کسی از ذهنم جا بماند. فقط سپاس...

خدایا مرا به علم توانگر ساز و به حلم زینت بخش و به تقوا عزیز کن و به عافیت زیبایی ده!
هر چند عاشقان قدیمی از روزگار پیشین تا حال از درس و مدرسه از قیل و قال بیزار بوده اند
اما اعجاز ما همین است: ما عشق را به مدرسه بردیم و در امتداد راهرویی کوتاه در یک کتابخانه کوچک
بر پله های سنگی دانشگاه و میله های سرد و فلزی گل داد و سبز شد.

عزیزه رضایی

مهرماه ۹۱

چکیده

تأثیر افزودن کازئینات سدیم (٪۴- ۰)، عصاره نعناع فلفلی (٪۰/۴- ۰) و مدت زمان نگهداری (۲۰-۴ روز) بر شاخص های کیفی و خاصیت آنتی اکسیدانی، پروتئولیز و فعالیت بازدارندگی آنزیم مبدل آنژیوتنسین (ACE) در ماست پروبیوتیک بدون چربی با استفاده از روش سطح پاسخ بررسی گردید؛ به این ترتیب مدل درجه دو برای هریک از شاخص های کیفی ارائه شد. در تیمارهای بدون عصاره با گذشت زمان pH و اسیدیته تقریباً ثابت اما در مقادیر بالای عصاره نعناع pH کاهش و اسیدیته افزایش یافت($P<۰/۰۵$).با افزایش مقدار کازئینات سدیم آب اندازی و ظرفیت نگهداری آب کاهش و با گذشت زمان ماندگاری، آب اندازی کاهش اما ظرفیت نگهداری آب ابتدا کاهش و سپس افزایش یافت($P<۰/۰۵$).حداقل میزان آب اندازی در بیشترین مقدار کازئینات سدیم و مدت زمان نگهداری بالا مشاهده شد($P<۰/۰۵$).با افزایش میزان کازئینات سدیم، عصاره نعناع و مدت زمان نگهداری ویسکوزیته ظاهری افزایش نشان داد($P<۰/۰۵$). ماست حاوی مقدار بالای کازئینات و زمان نگهداری بالا بیشترین ویسکوزیته را داشت. در طول ۲۰ روز دوره نگهداری تعداد *لاکتوباسیلوس کازئی* کاهش و سپس افزایش و با افزایش مقدار کازئینات سدیم تعداد این باکتری افزایش یافت؛ بیشترین رشد پروبیوتیک در میزان کازئینات بالاتر و اواخر دوره نگهداری مشاهده شد($P<۰/۰۵$).با افزایش درصد عصاره نعناع شاخص*b افزایش و با گذشت زمان کاهش یافت. تأثیر عصاره بر شاخص *b قوی تر از مدت زمان نگهداری و زمان تنها فاکتور مؤثر بر فعالیت آنتی اکسیدانی بود($P<۰/۰۵$). با افزایش مدت زمان نگهداری میزان O-phthaldialdehayde (OPA) افزایش و در مقادیر کم عصاره نعناع با افزایش درصد کازئینات سدیم میزان OPA افزایش یافت اما در مقادیر بالای عصاره با افزایش سدیم کازئینات میزان OPA ابتدا افزایش و سپس کاهش نشان داد($P<۰/۰۵$).در اوایل دوره نگهداری با افزایش درصد کازئینات سدیم بازدارندگی افزایش و در اواخر این دوره کاهش یافت($P<۰/۰۵$).در زمان های نخست با افزایش مقدار عصاره نعناع بازدارندگی تقریباً ثابت اما در اواخر این دوره با افزایش میزان عصاره نعناع فلفلی بازدارندگی افزایش یافت($P<۰/۰۵$).

واژه های کلیدی: پروبیوتیک، کازئینات سدیم، عصاره نعناع فلفلی، فعالیت آنتی اکسیدانی، OPA، ACE

فهرست مطالب

فصل اول:

کلیات ۲

فصل دوم:

بررسی ادبیات موضوع و سابقه تحقیق ۶

۲-۱- بخش اول..... ۶

۲-۱-۱- خواص فیزیکو شیمیایی شیر ۶

۲-۲- بخش دوم ۱۲

۲-۲-۱- فرآوری شیر :.....۱۲

۲-۲-۲- اسیدیفیکاسیون شیر ۱۲

۲-۲-۳- تأثیر دناتوراسیون پروتئین های آب پنیر بر خصوصیات ژل ۱۳

۲-۲-۴- تأثیرات فیزیولوژیکی پپتیدها ۱۴

۲-۳- بخش سوم ۱۴

۲-۳-۱- ماست.....۱۴

۲-۳-۲- پروبیوتیک ها.....۱۵

۲-۳-۳- نعناع فلفلی ۱۸

۲-۳-۴- آنزیم مبدل آنژیوتنسین.....۲۰

۲-۳-۵- تعیین پروتئولیز با روش OPA.....۲۲

۲-۳-۶- خاصیت آنتی اکسیدانی: ۲۵

۲-۴-بخش چهارم ۲۷

۲-۴-۱- تحقیقات انجام شده ۲۷

فصل سوم:

روش تحقیق ۳۰

۳-۱- مواد و تجهیزات آزمایشگاهی مورد استفاده..... ۳۰

۳-۲- روش ها:..... ۳۰

۳-۲-۱- طرح آزمایشی و تیمارهای آماری: ۳۰

۳-۲-۲- تهیه ی ماست: ۳۱

۳-۲-۳- تهیه‌ی کازئینات سدیم هیدراته: ۳۱

جدول۲- نمایش طراحی آزمون ها بر اساس روش سطح پاسخ، طرح مرکب مرکزوجه با سه متغیر (کازئینات سدیم(A)، عصاره نعناع فلفلی(B) و مدت زمان نگهداری(C)). ۳۲

۳-۲-۴- شمارش باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی*:..... ۳۳

۳-۲-۵- آماده سازی عصاره ماست: ۳۳

۳-۲-۶- تعیین pH و اسیدیته قابل تیتراسیون کل: ۳۳

۳-۲-۷- ارزیابی رنگ:..... ۳۳

۳-۲-۸- اندازه گیری میزان ویسکوزیته ظاهری: ۳۳

۳-۲-۹- اندازه گیری میزان آب اندازی و ظرفیت نگهداری آب: ۳۴

۳-۲-۱۰- تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی ماست با استفاده از ارزیابی مهار رادیکال های ۱،۱-دی فنیل-۲-پیکریل هیدرازیل (DPPH):..... ۳۴

۳-۲-۱۱- ارزیابی پروتئولیز توسط روش(O-Phthaldialdehyde(OPA: ۳۴

۳-۲-۱۲- اندازه گیری فعالیت ACE-inhibitory: ۳۵

فصل چهارم:

تجزیه و تحلیل اطلاعات ۳۸

۴-۱-pH و اسیدیته قابل تیتراسیون کل ۳۸

۴-۲- آب اندازی و ظرفیت نگهداری آب ۴۱

۴-۳- ویسکوزیته ظاهری ۴۳

۴-۴- شمارش پروبیوتیک ۴۴

۴-۵- رنگ سنجی ۴۶

۴-۶- ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی..... ۴۷

۴-۷- ارزیابی OPA ۴۹
۴-۸- ارزیابی فعالیتACE-inhibitory ۵۰
۴-۹- بهینه سازی ۵۲
جدول ۱۱-۴ شرایط بهینه آزمایش ۵۲
۴- ۱۰- نتیجه گیری کلی..... ۵۳
۴-۱۱- پیشنهادات ۵۳

ضمائم ..... أ

جدول۱-۲ فواید درمانی نعناع فلفلی..... أ
جدول ۲-۲ جذب در**nm** ۳۴۰ در واکنش معرف **OPA** با آمینواسیدها و پپتیدها..... ب
جدول۱-۴ تجزیه واریانس متغیرهای وابسته و اثرات مربعی و متقابل آنها برای pH ..... ج
جدول ۲-۴ تجزیه واریانس متغیرهای وابسته و اثرات مربعی و متقابل آنها برای اسیدیته..... د
جدول ۳-۴ تجزیه واریانس متغیرهای وابسته و اثرات مربعی و متقابل آنها برای سینرزیس ..... ه
جدول ۴-۴ تجزیه واریانس متغیرهای وابسته و اثرات مربعی و متقابل آنها برای ظرفیت نگهداری آب..... و
جدول ۵-۴ تجزیه واریانس متغیرهای وابسته و اثرات مربعی و متقابل آنها برای زنده مانی باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی*..... ز
جدول ۶-۴ تجزیه واریانس متغیرهای وابسته و اثرات مربعی و متقابل آنها برای ویسکوزیته..... ح
جدول ۷-۴ تجزیه واریانس متغیرهای وابسته و اثرات مربعی و متقابل آنها برای اندیس $\mathbf{b^*}$ ..... ط
جدول ۸-۴ تجزیه واریانس متغیرهای وابسته و اثرات مربعی و متقابل آنها برای خاصیت آنتی اکسیدانی ..... ی
جدول ۹-۴ تجزیه واریانس متغیرهای وابسته و اثرات مربعی و متقابل آنها برای **OPA** ..... ک
جدول ۱۰-۴ تجزیه واریانس متغیرهای وابسته و اثرات مربعی و متقابل آنها برای بازدارندگی **ACE** ..... ل

فصل اول

کلیات

کلیات

(Fundamental)

لبنیات از مغذی ترین و ضروری ترین مواد غذایی محسوب می شوند در سال های اخیر مصرف کنندگان به مسأله سلامتی اهمیت بیشتری داده و به دنبال مصرف مواد غذایی با خاصیت عملکردی بالاتر افزون بر ارزش تغذیه ای می باشند. شیر و محصولات آن در طول تاریخ توسط بشر مصرف شده است. شیر ترشح پستانی پستانداران و حاوی مواد مغذی مورد نیاز است. شیر گاو، گوسفند و بز و در مقیاس کوچکتر شیر شتر و اسب به عنوان منبع مغذی توسط انسان به مصرف می رسد .

در هلند حدود ۱۱ بیلیون کیلو گرم شیر تولید می شود (در سال ۲۰۰۰) در اتحادیه اروپا این مقدار ۱۴ بیلیون کیلو گرم و در سراسر جهان حداقل ۲۸۰ بیلیون کیلوگرم می باشد(Tamaoki et al, 1995, 89). در هلند حدود ۱۰٪ شیر به صورت پاستوریزه و استریلیزه مصرف می شود قسمت عمده آن به صورت مستقیم مصرف نمی شود و به صورت فرآوری شده و تولید محصولات لبنی مانند پنیر ، کره ، شیر خشک ، شیر کندانس شده ، کوارک و ماست مصرف می شود حدود ۵۰٪ شیر برای تولید پنیر و ۵٪ برای تولید ماست استفاده می شود .

ماست با تخمیر شیر توسط *استرپتو کوکوس سالیواروس* زیر گونه *ترموفیلوس* و *لاکتو باسیلوس دلبروکی* زیر گونه *بولگاریکوس* تهیه می شود. با تولید اسید کازئین ها ناپایدار شده، تجمع می یابند و ژل سفت تشکیل می دهند. اتصال میسل های کازئین و به دام انداختن پروتئین های آب پنیر که با پیوند هیدروژنی بهم وصل شده اند تشکیل یک ماتریکس پروتئینی را می دهند .ساختار ماست حاصل پیوند دی سولفیدی میان کاپا-کازئین و پروتئین های آب پنیر دناتوره شده و تجمع پروتئین های کازئین به محض رسیدن pH به نقطه ایزوالکتریک پروتئین کازئین در طول تخمیر است(Damin et al, 2009, 42). ماست همیشه به عنوان محصولی سلامتی بخش مورد توجه بوده و به دلیل تنوع در محصولات شبه ماست[1] مانند ماست های

[1]Yogurt-like product

نوشیدنی[1]، ماست های کم چرب، ماست های پروبیوتیک و غیره با افزایش تقاضا روبرو است (Dello Staffolo et al, 2004, 14; Bitaraf et al, 2010).

غذای عملگرا اصطلاحی است برای معرفی غذاهایی که ترکیبات بیواکتیو طبیعی را برای رژیم غذایی انسان به منظور تأمین مواد مغذی پایه تولید می کنند؛ این مواد مغذی اغلب برای سلامتی و جلوگیری از بروز بیماریها مفید هستند(Kris-Etherton et al, 2004, 24)

پروبیوتیک ها به عنوان میکروارگانیسم های زنده ای تعریف می شوند که اگر به اندازه کافی مصرف شوند باعث سلامت مصرف کننده می شوند (FAO/WHO 2002). محصولات پروبیوتیک حاوی *لاکتوباسیلوس کازئی*، *اسیدوفیلوس* و زیرگونه های *بیفیدوباکتریوم* در حال افزایش هستند و ماست حاوی این میکروارگانیسم ها را می توان به عنوان محصولات پروبیوتیک عملگرا در نظر گرفت (Shah, 2007, 17). به منظور اعمال تأثیرات سودمند بر سلامتی، غلظت پروبیوتیک ها در هر محصول باید بالا باشد (Donkor et al, 2007a, 134). برای اینکه پروبیوتیک ها بتوانند تأثیرات سودمند خود را نشان دهند باید زنده باشند و غلظتی برابر حداقل $۱۰^{۶}$(Shah, 2007, 17) $۱۰^{۷}$ یا $۱۰^{۸}$ کلنی در گرم محصول (Lourens-Hattingh, 2001, 11) داشته باشند. از میان پروبیوتیک ها *لاکتوباسیل* ها بطور وسیعی در محصولات لبنی استفاده شده اند و به خاطر تأثیرات مفیدشان بر سلامتی درخور توجه هستند (Shah, 2000, 19 & Shah, 2000, 55). اما شاه در سال ۲۰۰۷ گزارش کرد که اغلب محصولات حاوی پروبیوتیک جمعیت پروبیوتیکی کمی دارند و این ارگانیسم ها نمی توانند در طول دوره نگهداری ماست زنده بمانند؛ بنابراین در این تحقیق افزودن کازئینات سدیم و عصاره نعناع زنده مانی *لاکتوباسیلوس کازئی* مورد بررسی قرار گرفت.

در سال های اخیر تقاضای مصرف کننده ها برای محصولات کم چرب یا بدون چربی افزایش یافته است، به هر حال کاهش چربی می تواند باعث نقص در بافت و ویژگی حسی ماست شود (Passephol et al, 2008, 39).مطالعات زیادی برای بهبود خصوصیات ماست کم چرب انجام گرفته است (Mistry et al, 1992, 1997, 80 ;75Hess et al,et al, 2000, 10; ;SanchezSandoval-castilla et al, 2004, 14Amatayakol et al, 2006a, 16 (Amatayakol et al, 2006b,20;. به طور متداول برای تولید ماست، محتوای مواد جامد شیر را افزایش می دهند. سه روش معمول برای رسیدن به این منظور شامل افزودن پودرهای پروتئینی مانند پودر شیر خشک بدون چربی،پروتئین آب پنیر تغلیظ شده و کازئین، اواپراسیون آب از شیر تحت خلأ و جدا کردن آب با فیلتراسیون غشایی می باشد (Damin et al, 2009, 42; Tamime

[1]Drinkable yogurt

et al, 2001, 43). به هر حال غنی سازی ماست می تواند ویژگی های فیزیکی و حسی ماست را تغییر دهد (Sodini et al, 2005, 15).

در سال های اخیر مصرف کنندگان به مسأله سلامتی اهمیت بیشتری داده و به دنبال مصرف مواد غذایی با خاصیت عملکردی بالاتر افزون بر ارزش تغذیه ای می باشند در این میان ماست همیشه به عنوان محصولی سلامت افزا مورد توجه بوده است و از طرفی عصاره نعناع نیز از نظر ترکیبات پلی فنلی غنی بوده بنابراین دارای اثرات آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی است؛ لذا آنزیم های پروتئولیتیک به طور طبیعی درون شیر ، آنزیم های حاصل از باکتری های اسید لاکتیک و یا منابع خارجی وجود دارند و در تولید مواد بیواکتیو دخیل هستند همچنین شرایط فرایند هم می تواند دخیل باشد (Smacchi et al 2010, 22).

در این تحقیق با افزودن کازئین و عصاره نعناع، میزان فعالیت ACE-inhibitory مورد بررسی قرار گرفت. افزون بر ارزش تغذیه ای ناشی از حضور باکتری پروبیوتیک ، غنی شدن از نظر پروتئینی و بدون چربی بودن این محصول ، خاصیت عملکردی آن به دلیل حضور بازدارنده ها و خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره نعناع از ویژگی های دیگر این محصول می باشد.

افزودن کازئینات سدیم و عصاره نعناع می تواند خصوصیات طعمی و بافتی محصول را تحت تأثیر قرار دهد؛ همچنین ترکیب و غلظت افزودنی ها پروتئولیز ماست را تحت تأثیر قرار می دهد و در نهایت موجب بهبود و توسعه فعالیت بازدارندگی آنزیم مبدل آنژیوتنسین گردد.

اندازه گیری فعالیت بازدارندگی ACE محصول در طول نگهداری و همچنین یافتن ماده مطلوب جهت تولید بازدارنده ها و غلظت و نسبت بهینه افزودنی جهت تولید بازدارنده ACE از جمله اهداف این مطالعه می باشد.
در فصول آتی نحوهی انجام آزمایشات و تولید ماست پروبیوتیک بدون چربی ارائه، سپس تأثیر هرکدام از فاکتورهای مورد بررسی بر شاخص های کیفی بحث و مدل درجه دو برای هریک از شاخص های کیفی ارائه و در نهایت نتیجه گیری کلی و پیشنهادات گزارش می شود.

فصل دوم

بررسی ادبیات موضوع و سابقه تحقیق

بررسی ادبیات موضوع و سابقه تحقیق

(Literature review and background research)

۲-۱- بخش اول

۲-۱-۱- خواص فیزیکو شیمیایی شیر

شیر ماهیت فیزیکوشیمیایی پیچیده ای دارد که علت آن وجود ترکیبات متنوع در شیر می باشد. در شیر بالغ بر صد هزار مولکول مختلف وجود دارد. از آنجایی که هر یک از خصوصیات فیزیکوشیمیایی شیر ناشی از شرکت و همکاری ترکیبات گوناگون است، بالطبع هر گونه تغییر در ترکیبات موجود در شیر، خواص آن را نیز تغییر خواهد داد. آب در شیر به عنوان فازی است که سایر ترکیبات در آن حل شده و یا پراکنده می باشند. لاکتوز و بخشی از املاح و احتمالا بخشی از لاکتالبومین به صورت محلول واقعی در شیر وجود دارند در حالی که پروتئین ها و بعضی از املاح به صورت سوسپانسیون کلوئیدی در آن پراکنده می باشند. کازئین بزرگترین و آلبومین و گلوبولین کوچکترین ذرات پروتئینی شیر هستند. گلبول های چربی نیز به صورت امولسیون در فاز پیوسته (آب) پراکنده شده اند و به همین دلیل شیر به عنوان یک امولسیون چربی درآب محسوب می شود (قدس روحانی، ۱۳۸۴)

در صنعت لبنیات، اندازه گیری خصوصیات فیزیکوشیمیایی شیر و محصولات شیری با اهداف مختلف صورت می گیرد. از جمله، استفاده از ویژگی هایی نظیر ویسکوزیته و ضریب هدایت الکتریکی در طراحی تجهیزات لبنی، استفاده از ثقل ویژه برای تخمین مواد جامد بدون چربی، نقطه انجماد برای پی بردن به وجود آب اضافی در شیر و یا اسیدیته قابل تیتر برای پی بردن به فعالیت باکتری ها و تازگی و کهنگی شیر (همان).

برای ایمنی میکروبیولوژی و بهداشتی، تمام شیر ها قبل از مصرف حرارت داده می شوند اما این کار باعث تغییرات در خصوصیات عملکردی محصولات می شود . تیمارهای حرارتی مختلف برای تولید محصولات مختلف لبنی لازم است برای مثال حرارت ۶۵ درجه سانتی گراد برای چند ثانیه که بسیاری از باکتری های سایکروتروف را از بین می برد . این باکتری ها قادرند لیپازها و پروتئازهای بسیار مقاوم به حرارت تولید کنند این غیر فعال سازی از فساد شیر در طول دوره نگهداری جلوگیری می کند پاستوریزاسیون کوتاه[1]، حرارت دادن ۷۲درجه سانتی گرادبه مدت ۱۵ ثانیه بسیاری از میکروارگانیسم های رویشی را از بین می برد اما تغییرات دائمی (ثابت ،

[1]Low pasteurisation

پایدار) کمی هم بر جای می گذارد. پاستوریزاسیون بالای[1] شیر (۲۰ ثانیه در ۸۵ درجه سانتی گراد) برای تولید ماست استفاده می شود و حرارت های بسیار بالا[2](UHT) ۱ ثانیه در ۱۴۵ درجه سانتی گراد برای پاستوریزاسیون شیر استفاده می شود.

شیر بدون هم زدن لایه خامه ای خامی تشکیل می شود که با هم زدن مداوم این مشکل برطرف می شود . به عنوان یک دیسپرسیون کلوئیدی شیر به شدت پایدار است شیر می تواند بدون تغییرات قابل مشاهده در پایداری جوشانده ، فریز و یا خشک شود و مجددا دیسپرس (پراکنده) شود.

۲-۱-۱-۱-اسیدیته

شیر تازه، در برابر کاغذ تورنسل حالت آمفوتریک دارد، بدین معنی که تغییر رنگی در کاغذ تورنسل ایجاد نمی کند. اما در صورت تیتراسیون با یک ماده قلیایی نظیر هیدروکسید سدیم و در حضور معرف فنل فتالئین، خاصیت اسیدی از خود نشان می دهد. این اسیدیته که به خاطر مشخص شدن توسط تیتراسیون به اسیدیته قابل تیتر معروف است اسیدیته طبیعی یا اسیدیته ظاهری شیر نیز نامیده می شود. با توجه به اینکه شیر تازه دارای اسید لاکتیک نیست، علت اسیدیته طبیعی شیر، سایر ترکیبات خاصی است که واکنش اسیدی از خود نشان می دهند. از جمله این ترکیبات می توان به فسفات های اسیدی، پروتئین ها (کازئین و آلبومین ها) و تا حد کمی سیترات ها و دی اکسید کربن اشاره نمود.اسیدیته طبیعی شیر دوشیده شده از یک گاو به مقدار قابل توجهی تحت تأثیر عواملی نظیر گونه، نژاد، خصوصیات فردی، مرحله شیردهی، شرایط فیزیولوژیکی پستان و... قرار می گیرد اما اسیدیته طبیعی شیر تازه حاصل از یک گله، بسیار با ثبات تر می باشد. هرچه میزان مواد جامد بدون چربی در شیر بالاتر باشد، اسیدیته طبیعی نیز بالاتر است و برعکس.اسیدیته طبیعی شیر گاو حدود ۱۴٪ تا ۱۵٪ برحسب اسید لاکتیک می باشد. اسیدیته واقعی یا اسیدیته گسترش یافته شیر، اسیدیته ای است که در نتیجه تولید اسید لاکتیک در شیر حاصل می شود. تولید اسید لاکتیک در شیر حاصل فعالیت باکتری ها بر روی لاکتوز می باشد. بنابراین اسیدیته قابل تیتر در مورد شیر کهنه، عبارتست از حاصل جمع اسیدیته طبیعی و اسیدیته گسترش یافته. اسیدیته قابل تیتر معمولا بر اساس در صد اسید لاکتیک بیان می شود (قدس روحانی، ۱۳۸۴).

pH شیر طبیعی و تازه، در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، بین ۶/۵ تا ۶/۷ (متوسط۶/۶)می باشد. pHبالاتر از ۶/۷ در شیر تازه، نشانگر عفونت غدد پستانی (ماستیتیس) و پائین تر بودن از ۶/۵ بیانگر فساد باکتریایی و یا وجود

[1]High pasteurisation

[2]Ultra High Temprature

کلستروم در شیر می باشد. حرارت دادن باعث کاهش pHشیر می شود که علت اصلی آن تغییر حالت فسفات کلسیم از شکل محلول به فرم کلوئیدی می باشد. با افزایش دما ار ۲۰ به ۶۰ درجه سانتی گراد، pH شیر ۰/۴ واحد کاهش می یابد. همچنین مشاهده شده است که در دامنه بین ۱۰ تا ۳۰ درجه سانتی گراد به ازای هر درجه افزایش دما، pH شیر در حدود ۰/۰۱ واحد کاهش می یابد. این اثر اهمیت کنترل دما در اندازه گیری pHرا نشان می دهد. در فرایندهای شدید حرارتی نظیر استریلیزاسیون، در اثر تجزیه لاکتوز، اسید تولید شده و کاهشpH مشهودتر خواهد بود. تغلیظ حرارتی شیر نیز به علت تشکیل فسفات های کلسیم کلوئیدی، باعث کاهش pHمی شود در حالیکه تغلیظ به روش اولترافیلتراسیون تأثیری در pHشیر ندارد. انجماد کند نیز pH شیر را به حدود ۵/۸ کاهش می دهد، در حالی که در طی انجماد سریع تغییر کمی در pHروی می دهد. تأثیر انجماد به علت غیر محلول شدن نمک های شیر می باشد.

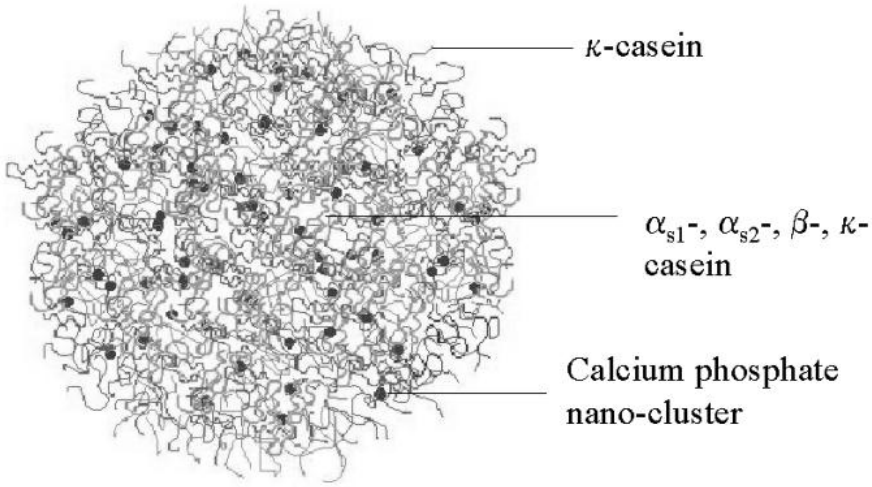
ذکر این نکته نیز لازم است که شیر به علت داشتن ترکیباتی چون اسید لاکتیک (ولاکتات ها)، اسیدسیتریک (وسیترات ها) و اسید فسفریک (وفسفات ها) مانند یک بافر پیچیده عمل می کند. حداکثر خاصیت بافری شیر در pH بین ۵ تا ۶ می باشد (قدس روحانی، ۱۳۸۴).

۲-۱-۱-۲- میزان نیتروژن پروتئین ها :

میزان نیتروژن موجود در پروتئین ها از حدود ۱۴ تا ۱۸ درصد متغیر بوده ودر اغلب پروتئین ها میزان نیتروژن نزدیک به ۱۶ درصد است و معمولا از این مقدار متوسط ۱۶ درصد برای تبدیل نیتروژن محتوی مواد خوراکی به پروتئین موجود در آنها استفاده می شود . میزان نیتروژن به وسیله روش کجلدال اندازه گیری شده و با ضرب آن در فاکتور ۶/۲۵ (یعنی ۱۰۰ گرم پروتئین حاوی ۱۶ گرم نیتروژن است) ، میزان پروتئین خام به دست می آید (فاطمی، ۱۳۷۸).

۲-۱-۱-۳- پروتئین های شیر :

دو پروتئین مهم موجود در شیر عبارتند از کازئین و لاکتالبومین . وقتی که شیر جوشانده می شود ، کازئین رسوب داده می شود . کازئین در هیدروکسید سدیم رقیق ، محلول است . آب پنیر که بعد از رسوب کازئین به دست می آید حاوی لاکتالبومین است . اگر آب پنیر تا دمای ۷۰ حرارت داده شود لاکتالبومین منعقد می گردد (همان).



شکل ۱- تصویر شماتیک میسل کازئین حاوی چهار نوع کازئین متفاوت αs_1، αs_2 و k و β-کازئین لینک شده با کلسیم فسفات، کلسیم فسفات عمدتاً در بخش های بیرونی مانند اجسام مو مانند قرار گرفته اند. تصویر از Holt (Carling et al, 1989, 34).

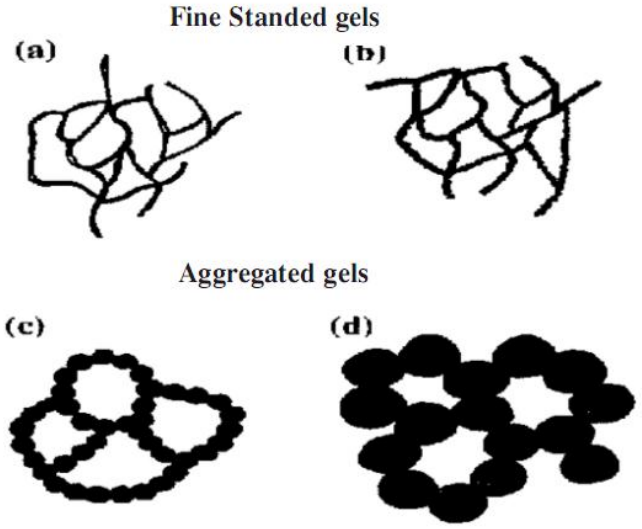
۲-۱-۲- دناتوره شدن پروتئین ها (دگرگونی پروتئین ها)

پروتئین های موجود در بافت های گیاهی و حیوانی ، پروتئین های طبیعی نامیده می شوند . این پروتئین ها دارای تعدادی خواص مشخص نظیر حلالیت ، ویسکوزیته ، چرخش نوری ، سرعت رسوب گذاری ، حرکت الکتروفورزی و غیره می باشند . وقتی که پروتئین های طبیعی تحت اثر حرارت، نور فرابنفش یا ارتعاشات اولتراسونیک قرار گیرند و یا اینکه اسیدها ، قلیاها ،نمک های فلزی سنگین ، اوره و اتانول بر آنها اثر کنند ، خواص آنها دچار تغییراتی شده و اصطلاحا پروتئین ها دناتوره می گردند . اثر این عمل ، تجمع مولکول های پروتئین و رسوب آنها می باشد . اصطلاح دناتوراسیون برگشت پذیر تنها در مورد تغییرات جزئی خواص پروتئین ها به کار می رود که پروتئین های مذکور بعد از عمل آوری مناسب به حالت طبیعی خودشان باز می گردند . اگر دناتوراسیون شدید باشد ، تغییرات ایجاد شده در پروتئین ها دائمی بوده و برگشت ناپذیر نامیده می شود . دناتوراسیون ، یعنی از دست رفتن ساختمان طبیعی پروتئین که در نهایت منجر به از بین رفتن پیچ خوردگی مولکول می شود . یکی از اثرات آن ، تشکیل گروه های سولفیدریل زیادی از گروه های دی سولفیدریل می باشد . همچنین شواهدی وجود دارد که نشان می دهد یکی از اثرات باز شدن پیچش مولکول پروتئین در تماس قرار گرفتن بیشتر گروه فنلی موجود در تیروزین و گروه اندول موجود در تریپتوفان می باشد . اگر پروتئین ، یک آنزیم با یک آنتی بادی باشد ، دناتوراسیون منجر به از دست رفتن فعالیت آن می شود . به طور کلی پروتئین های دناتوره شده نسبت به پروتئین های طبیعی ، به طور سریعتری توسط آنزیم های پروتئولیتیک هیدرولیز می شوند . (حیدری، ۱۳۸۰). اثرات مهم دناتوراسیون به شرح زیر است :

۱. باندهای پپتیدی موجود در پروتئین ، راحت تر در دسترس آنزیم های پروتئولیتیک قرار گرفته و هیدرولیز می شوند .
۲. حلالیت پروتئین کاهش می یابد .
۳. پروتئین نمی تواند کریستالیزه شود .
۴. ویسکوزیته داخلی افزایش می یابد .

۲-۱-۳- القاء واکنش میان میسل های کازئین و پروتئین های آب پنیر با حرارت

عمدتاً تیمار حرارتی شیرجهت افزایش کیفیت نگه داری با از بین بردن میکروارگانیسم ها و رسیدن به ویژگی های مطلوب در محصول نهایی است(Sighn 1993). به محض تیمار حرارتی شیر فرآیندهایی در آن رخ می دهد؛ بیشترین اثر بدیهی و آشکار، دناتوراسیون پروتئین های آب پنیر است . پروتئین های آب پنیر دچار تغییرات ساختاری (کنفورماسیونی) می شوند که به طور عمده فرآیندهای بازگشت پذیر هستند؛ اما در عمل این قضیه فقط برای محلولα-lacصادق است.



شکل ۲- دیاگرام انواع مختلف شبکه های ژلیa و b به صورت ماکرومولکول، c و d به صورت ژلهای با ذرات بسیار ریز(Phadungath, 2005, 27)

در موردβ-lgتغییرات ساختاری (کنفورماسیونی) مولکول، در نتیجه ی در معرض واکنش قرار گرفتن گروه تیولواکنش پذیر این مولکول است.گروه تیول فعال با گروه های تیول فعال دیگر پیوند دی سولفیدی می دهند و از طریق این اتصالات گروه های تیول، واکنش ها ی تبادلی انجام می پذیرد. تفاوت های حاصله در اثر تیمار

حرارتی در پروتئین های آب پنیراز آن ناشی می شود کهα-lac حاوی اتصالات دی سولفیدی است در حالی که β-lgعلاوه بر دو اتصال دی سولفیدی یک گروه تیول آزاد هم دارد.

بنابراین α-lac وقتی به تنهایی حرارت داده شود می تواند دوباره به صورت کامل به حالت اولیه برگردد اما در حضورβ-lg دناتوراسیون غیر قابل بازگشت است که به دلیل واکنش های تبادلی باند دی سولفیدی گروه تیول است . تیمار حرارتی شیر باعث تشکیل توده هایپروتئینی آب پنیر می شود که حاوی β-lg وهم α-lac است.

تیمار حرارتی ۱۰۰ –۷۰ درجه سانتی گراد تأثیر قابل ملاحظه ای بر فراکسیون میسل کازئین ندارد . کازئین عمدتا ساختار مارپیچی تصادفی دارد بنابراین به فرآیندهای دناتوراسیون حساس نیست . همچنین تیمار حرارتی باعث رسوب کلسیم فسفات سرمی می شود که بعد از سرد کردن مجددا حل می شود اما این پروسه کند است .اگرچه فسفات کلسیم یک جزء مهم میسل کازئین است اما پایداری شیر عمدتاً تحت تأثیر این رسوب دهی نیست.

در حضور هر دوپروتئین آب پنیر و کازئین در شیر فعل و انفعالاتی میان این دو رخ می دهد؛ از طریق واکنش های تبادلی باند دی سولفیدی گروه تیول ، پروتئین های آب پنیر می توانند با k-کازئین موجود در قسمت های بیرونی میسل کازئین واکنش دهند.

اعتقاد بر این است که مرحله اول این پروسه شامل تغییرات فیزیکی در ماهیت پروتئین باشد اماواکنش نهایی اغلب تشکیل پیوند کووالانسی مانند پیوند دی سولفیدی است (Futami et al, 1984, 83) که نتیجه آن، پایداری میسل های کازئین با اجسام مو مانند k-کازئین با پروتئین های آب پنیراست که عمدتا کوالانسی هستند. در یک محلول پروتئین های آب پنیرخالص β-lg مانند یک اتصال دهنده ی عرضی میان میسل های کازئین و α-lac عمل می کنند. تیمار حرارتی شیر باعث ایجاد ترکیبی مخلوط از پروتئین آب پنیر های دست نخورده ، توده های پروتئینی آب پنیر و میسل های کازئینی پوشانده شده با پروتئین های آب پنیر می شود. تحقیقاتی که بر روی تیمار حرارتی شیر انجام شد نشان داد ترکیب نهایی مخلوط پروتئین های آب پنیر ومیسل های کازئین به pH و دمای نهایی تیمار بستگی دارد (Packman, 1980, 110; Dew, 1984, 38; Eccles, 1988, 102; Morice, 1994, 49; Haffamn, 1996;Naito et al, 1997; Blumenthal, 1998).هر دو این پارامترها در عمل متفاوتند و بنابراین بسیار مرتبط با کنترل و پیش بینی فرآیندها هستند. pHشیر در فصل های شیردهی بین ۶/۹۸ – ۶/۵۵ متغیر است. (Naito et al, 1997; Dew, 1984, 38)و همچنین سن شیر دوشی نیز بر pHموثر است. فعالیت آنزیمی ومیکروبی هم pH شیر را تحت تأثیر قرار می دهد. تحقیقات نشان دادند که تغییر در ترکیب شیر ساخته شده و یا مدل سیستم های مورد استفاده همچنین غلظت نمک و ترکیبات، نسبت میان میسل های کازئین و پروتئین های آب پنیر و غلظت پروتئین کل، سینتیک دناتوراسیون را تعیین می کنند. تیمار حرارتی شیر یک روش استاندارد است که مقدم بر فرآیندهای دیگر است.

کنترل و بررسی تأثیرات دما، pH و ترکیبات شیر در طول تیمار حرارتی بر خصوصیات محصول لبنی نهایی بسیار پیچیده است.همان طور که قبلا ذکر شد مطالعات قابل توجهی روی دناتوراسیون پروتئین هایآب پنیرحاصل از تیمار حرارتی شیر انجام گرفته است اما هنوز ابهامات در این زمینه زیاد است.ترکیب پیچیده میسل های کازئین وپروتئین هایآب پنیر دناتوره در شیر حرارت دیده هنوز ناشناخته است.

پیشرفت تکنیک های جداسازی در سال های اخیر بسیار کم بوده و برای حل کردن ترکیب پروتئین هایآب پنیر متصل به میسل های کازئین و پروتئین هایآب پنیر موجود در توده های محلول مناسب نیستند .بنابراین تشکیل توده ها هنوز هم به سختی تأئید شده و توده ها به آن صورت که برای پروتئین های اساسی مثل اندازه و ترکیب اشاره شده،شناسایی نشده اند.توزیع پروتئین هایآب پنیربر سطح میسل های کازئین و تأثیر شرایط حرارتی مانند دما و pH، نمک ، غلظت و ترکیب هنوز ناشناخته اند.

۲-۲- بخش دوم

۲-۲-۱- فرآوری شیر :

میسل های کازئین به خاطر وجود اجسام مو مانند k-کازئین در pHشیر ۶/۷ پایدار هستند .همین طور تغییرات القا شده توسط حرارت تأثیری بر پایداری شیر در دماهای محدود ندارد اما pH، رنت زنی، نمک، اتانول و افزودنی های دیگر اجسام مو مانند را تحت تأثیر قرار می دهد و قادر به ناپایدار کردن میسل ها هستند و باعث لخته و ژلاسیون شیر می شوند.معمولا در صنعت لبنیات تشکیل ژل با اسیدیفیکاسیون و رنت زنی شیر به منظور تهیه محصولات لبنی مانند ماست و شیر همراه است.

معمولاً ماست از شیر حرارت دیده با حرارت بالا تهیه می شود و افزودن میکروارگانیسم ها بخصوصLABها باعث آغاز تخمیر می شوند .لاکتوز موجود در شیر منبع اصلی کربن به لاکتیک اسید تبدیل می شود و باعث کاهش تدریجی pH می شود و در نهایت ژل تشکیل می گردد (همان).

تیمار حرارتی شیر عامل بسیار مهمی در تعیین کیفیت ماست است ، ماست های تهیه شده از شیرهای با دمای پاستوریزاسیون بالا سینرزیس کمتر و ویسکوزیته بالایی دارند . تولید EPSدرخصوصیات رئولوژیکی ماست اهمیت دارد . این پلی ساکارید ها از برخی از گونه هایLABداخل محیط ماست ترشح می شوند و باعث افزایش ویسکوزیته و کاهش سینرزیس و افزایش ropinessماست می شوند (Burrow, 1983, 96).

۲-۲-۲- اسیدیفیکاسیون شیر :

پایداری اجسام مومانند k-کازئین تاpH حدود ۵ در ۲۵ درجه سانتی گرادبدون تغییر می ماند .اما در پایین تر از این محدوده اجسام متلاشی شده و میسل های کازئین قادر به حفظ پایداری نیستند و شروع به تجمع می کنند