بررسی امکان کاربری عصاره گیاه کارده (*Biarum carduchcorum*) به‌عنوان رنت گیاهی در تولید پنیر سفید ایرانی

حجت‌اله گلکاری[۱]، حمیدرضا قیصری[۲*]، سید شهرام شکرفروش[۳]، محمود امین‌لاری[٤]، محمد رئیسی[۱]

۱. دانشجوی دکتری تخصصی بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
۲. دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
۳. استاد گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
٤. استاد بخش بیوشیمی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
*نویسنده مسئول مکاتبات: ghaisari@shirazu.ac.ir
(دریافت مقاله: ۹٤/۷/٤ پذیرش نهایی: ۹٤/۹/۲۲)

چکیده

محدودیت تولید و قیمت بالای مایه پنیر حیوانی موجب گردیده که تاکنون تلاش‌های متعددی جهت جایگزینی آن با سایر پروتئازهای منعقد کننده شیر، انجام شود. گیاه کارده به‌دلیل فعالیت پروتئازی بالا می‌تواند یکی از گزینه‌های احتمالی این جایگزینی باشد. مطالعات چندانی در خصوص این گیاه و آنزیم‌های آن تا به‌حال صورت نگرفته است. هدف از تحقیق حاضر تهیه عصاره گیاه کارده، اندازه‌گیری فعالیت پروتئازی آن جهت انعقاد شیر و تولید پنیر سفید ایرانی و مطالعه خواص فیزیکوشیمیایی و ارگانولپتیکی محصول بود. پس از تولید پنیر توسط عصاره گیاهی به‌میزان ۰/۵٪، خصوصیات حسی، بافتی و شاخص حلالیت نیتروژن آن در مقایسه با نمونه شاهد در طی دوره رسیدن ٤۵ روزه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این بررسی نشان داد که اپتیمم فعالیت پروتئازی آنزیم‌های عصاره جهت انعقاد شیر در دمای ٤۵ °C، pH=۵ و غلظت ۱۵ mmol/ml نمک $CaCl_2$ بود. در نمونه پنیر تهیه شده با آنزیم گیاهی، طعم تلخ بیشتر و بوی پنیر تیزتر بود. در آنالیز بافتی، پنیر حاصل از سفتی کمتری برخوردار بود. ارزیابی فرآیند پروتئولیز طی دوره رسیدن پنیر با اندازه‌گیری شاخص نیتروژن محلول نشان داد که شدت پروتئولیز نمونه پنیر تهیه شده با آنزیم گیاهی، به‌طور معنی‌داری ($p< ۰/۰۵$) بیشتر از نمونه شاهد بود. لذا به‌نظر می‌رسد عصاره گیاه کارده در غلظت به‌کار رفته برای تولید پنیر سفید ایرانی جایگزین مناسبی برای رنت نباشد.

واژه‌های کلیدی: پروتئولیز، پنیر سفید ایرانی، رنت، عصاره گیاهی، کارده

مقدمه

یکی از مراحل مهم در فرآیند تولید پنیر، انعقاد سیستم کازئینی پروتئین شیر و تبدیل آن به شبکه ژلی است. این عمل با چندین روش امکان‌پذیر است که یکی از مهم‌ترین آن‌ها انعقاد به‌وسیله پروتئازهای اختصاصی می‌باشد (Farahnoodi, 1998).

از میان چندین آنزیم منعقد کننده شیر، رنت به‌دست آمده از شیردان گوساله شیرخوار به‌عنوان اولین مایه پنیر گزارش شده است. اما افزایش تولید جهانی پنیر و مصرف آن، ظهور بیماری‌های خطرناک مثل جنون گاوی، کاهش کشتار گوساله و محدودیت‌های مذهبی سبب کاهش تولید این نوع مایه پنیر شده است (Roserio *et al.*, 2003). از این‌رو تلاش جهت جایگزین نمودن آن با دیگر پروتئازهای منعقد کننده شیر افزایش یافته است. یک دسته از جایگزین شونده‌ها مایه پنیرهای میکروبی بوده که به‌رغم برخی مزایا، به‌واسطه ایجاد طعم تلخ در محصول و کاهش راندمان محصول نهایی، این منابع نیز مناسب نبوده و در برخی کشورها از آن‌ها استفاده نمی‌شود (Tripathi *et al.*, 2011). یکی دیگر از جایگزین‌های رنت، عصاره‌های گیاهی می‌باشند که از دیرباز به‌عنوان مایه پنیر برای تولید پنیرهای روستایی به‌طور سنتی استفاده شده‌اند. استفاده از این نوع مایه پنیرها امروزه به‌جهت مناسب بودن پنیرهای تولید شده با آنزیم‌های طبیعی گیاهی برای افراد گیاه‌خوار که از رنت حیوانی استفاده نمی‌کنند و هم‌چنین معرفی این‌گونه محصولات به‌عنوان محصولات حلال افزایش یافته است (Jacob *et al.*, 2011). بنابراین جستجو برای پروتئازهای گیاهی مناسب و استفاده صنعتی از آن‌ها هم‌چنان ادامه دارد (Piero *et al.*, 2002)، گرچه اغلب مایه پنیرهای گیاهی بررسی شده به‌دلیل فعالیت پروتئولیتیک شدید، جهت استفاده در صنعت مناسب نبوده‌اند (Pino *et al.*, 2009).

یکی از گیاهانی که به‌نظر می‌رسد دارای پروتئازهای منعقدکننده شیر باشد گیاه کارده با نام علمی *Biarum carduchcorum* است. کارده نوعی گیاه خوراکی، تردکننده با برگ‌های پهن می‌باشد که سه گونه آن در ایران رشد می‌کند. انتشار آن در غرب خوزستان بخش مرکزی (بختیاری)، شیراز، کازرون و روستای کافتر از توابع شهرستان اقلید می‌باشد. اسم کارده برگرفته از ویژگی برندگی برگ آن هنگام تازه‌خوری است که اصطلاحاً زبان را می‌بُرد. در طب سنتی برای درمان بیماری‌هایی مثل چربی خون، فشارخون، دیابت، یرقان و عفونت‌ها استفاده می‌شود و آش کارده نیز برای درمان سرماخوردگی به‌کار می‌رود (Ghahraman and Attar, 1999).

برخلاف خصوصیات منحصربه‌فرد کارده، تاکنون مطالعاتی در خصوص بررسی فعالیت کاربردی آنزیم‌های آن انجام نشده است. لذا با توجه به پتانسیل مناسب پروتئازی موجود در این گیاه، عصاره‌گیری و کاربری آن جهت تولید پنیر و بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی و ارگانولپتیکی آن هدف اصلی مطالعه حاضر بود؛ تا در صورت کسب نتایج مناسب بتوان آن را به‌عنوان جایگزین رنت به صنعت پیشنهاد نمود.

مواد و روش‌ها

- جمع‌آوری نمونه و عصاره گیری از گیاه

گیاه کارده در فواصل زمانی اردیبهشت تا خردادماه از نواحی اطراف شهرستان کازرون واقع در استان فارس جمع‌آوری گردید و مورد تأیید بخش گیاه‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه شیراز قرار گرفت. نمونه‌ها بعد از جمع‌آوری با آب دیونیزه شسته شده و در محیط آزمایشگاه در دمای ۲۵ °C خشک گردیدند. استخراج عصاره آنزیمی در pH=٦/٨ و با محلول ۰/۸۵٪ کلریدسدیم به شرح زیر انجام گرفت:

مقدار ۱۰۰ گرم گیاه کارده به‌وسیله آسیاب آزمایشگاهی (Iran mark, Iran) پودر شد و پودر حاصله با ٦۰۰ میلی‌لیتر از محلول فوق‌الذکر مخلوط گردید. مخلوط حاصل به‌مدت ٢٤ ساعت در دمای اتاق به‌آرامی هم‌زده شد. پس از گذشت مدت زمان لازم به‌منظور جداسازی مواد جامد و نامحلول، ترکیب حاصل به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ٤ °C با سرعت g ۲۸۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع رویی تا زمان استفاده در دمای ٤ °C نگه‌داری شد (Chazarra *et al*., 2007). پروتئین‌های این مایع توسط محلول سولفات‌آمونیم ۸۰٪ رسوب‌دهی شد. میزان پروتئین رسوب یافته و فعالیت پروتئازی آن به‌ترتیب توسط روش برادفورد و انگلوند و گرایگ اندازه‌گیری شد (Englund and Graig, 1968; Bradford, 1976).

- تأثیر فاکتورهای مختلف انعقادی آنزیم در شیر

در این تحقیق از شیر پاستوریزه تجاری (۲٪ چربی و ۱۰/۸٪ ماده خشک) جهت پنیرسازی و آزمایش‌های مربوطه، استفاده گردید. به‌طوری‌که نمونه شاهد با استفاده از رنت معمولی (Christian Hansen, Denmark) به‌میزان ۰/۵٪ و نمونه تیمار با ۰/۵٪ از عصاره آبی کارده در سه تکرار مورد مقایسه قرار گرفتند.

به‌منظور اندازه‌گیری فعالیت انعقادی شیر، ابتدا سوبسترای مورد نیاز (شیر با pH=٦/٥ و دمای ۳۵ °C) تهیه گردید. سپس به ۲ میلی‌لیتر از سوبسترای فوق، ۱۰۰ میکرولیتر عصاره (۰/۹۸ واحد آنزیمی در میلی‌لیتر) اضافه و تشکیل لخته با چرخش لوله در فواصل زمانی کم مورد بررسی قرار گرفت (Tripathi *et al*., 2011). نقطه پایانی زمانی در نظر گرفته شد که ذرات رسوب یافته درون لوله آزمایش مشاهده شدند. آزمون در سه تکرار انجام شد و میانگین آن به‌عنوان زمان انعقاد گزارش گردید.

یک واحد انعقاد شیر (u)، مقدار آنزیمی است که باعث انعقاد ۱۰ میلی‌لیتر سوبسترا در مدت زمان ٤۰ دقیقه می‌گردد. فعالیت انعقادی شیر توسط روش زیر محاسبه شد (Tripathi *et al*., 2011):

$$\text{MCA (Milk Clotting Activity)} = 2400/T \times S/E$$

T: زمان انعقاد (ثانیه)

S: حجم سوبسترا

E: حجم عصاره آنزیمی

- تأثیر pH بر فعالیت انعقادی آنزیم

pH بهینه فعالیت آنزیم با اندازه‌گیری بیشترین فعالیت انعقادی شیر توسط عصاره گیاه در دامنه pH بین ۵ تا ۹ در بافرهای مختلف اندازه‌گیری شد. بافرهای مورد استفاده در مطالعه شامل ۵۰ میلی‌مولار

سیترات‌سدیم با pH= ۵، بافر ۵۰ میلی‌مولار فسفات‌سدیم با pH برابر با ٦ و ۷ بافر ۵۰ میلی‌مولار Tris-HCl با pH معادل ۸ و ۹ بودند. در این تحقیق از شیر با pH های ۵، ۵/۵، ٦، ٦/۵، ۷ و ۷/۵ استفاده گردید. فعالیت انعقادی شیر مشابه روش فوق اندازه‌گیری شد و در پایان pH مناسب انتخاب گردید.

- تأثیر غلظت‌های متفاوت عصاره آنزیمی بر فعالیت انعقادی شیر

جهت تعیین غلظت بهینه عصاره آنزیمی، حجم‌های متفاوتی از عصاره آنزیمی شامل ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ٤۰۰ میکرولیتر که به‌ترتیب دارای ۰/۹۸، ۱/۹٦، ۲/۹٤ و ۳/۹۲ واحد آنزیمی در هر میلی‌لیتر بودند، مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت انعقادی شیر اندازه‌گیری شد و در پایان غلظت مناسب انتخاب گردید.

- تأثیر دما بر فعالیت انعقادی آنزیم

به‌منظور تعیین دمای بهینه برای فعالیت آنزیم، زمان انعقاد شیر در دماهای ۲۵، ۳۵ و ٤۵ درجه سلسیوس همانند روش ذکرشده در بالا مورد بررسی قرار گرفت. به این صورت که ابتدا ۲ میلی‌لیتر نمونه شیر، به‌مدت ۱۰ دقیقه در هر یک از دماهای بالا قرار داده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی (۰/۹۸ واحد آنزیمی در میلی‌لیتر) به هر یک از نمونه‌ها اضافه گردید. تشکیل لخته با چرخش دستی لوله هرچند وقت یک‌بار مورد بررسی قرارگرفت (Chazarra *et al*., 2007).

- تأثیر غلظت کلرید کلسیم بر فعالیت انعقادی آنزیم

به‌منظور تعیین غلظت بهینه کلرید کلسیم برای فعالیت آنزیم، غلظت‌های متفاوتی از این نمک شامل ۰، ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌مول در میلی‌لیتر مورد بررسی قرار گرفت. به این صورت که ابتدا ۲ میلی‌لیتر نمونه شیر به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۵ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردید. سپس به هریک از غلظت‌های نمک کلریدکلسیم، عصاره گیاه کارده اضافه شد و تشکیل لخته با چرخش دستی لوله هرچند وقت یک‌بار مورد بررسی قرار گرفت (Alirezae *et al*., 2011).

پس از آن‌که بهترین تیمار از لحاظ pH، دما، غلظت و کلریدکلسیم جهت انعقاد شیر انتخاب گردید، از آن به‌عنوان مرجع برای تولید لخته پنیر و مقایسه آن با شاهد، طی زمان‌های ۱، ۱۵ و ٤۵ روز استفاده شد. برای تولید لخته، ابتدا pH شیر پاستوریزه توسط اسید لاکتیک به ۵ رسید و سپس دمای شیر به ٤۵ °C رسانده شد. آن‌گاه غلظت ۰/۵٪ عصاره و رنین به‌همراه ۱۵ میلی‌مول در میلی‌لیتر کلریدکلسیم به نمونه‌ها اضافه گردید. پس از انعقاد و آبگیری، لخته‌ها در محلول ۲۰٪ نمک طعام به‌مدت ۱٦ ساعت در دمای ۱۳ °C قرار گرفتند. سپس لخته‌ها به محلول ۱۱٪ نمک طعام منتقل شده و در دمای ٤ °C تا ٤۵ روز نگه‌داری شدند. آن‌گاه آزمون‌های زیر در طی روزهای ۱، ۱۵ و ٤۵ نگه‌داری بر روی پنیرهای تولیدی انجام شد.

- تعیین شاخص حلالیت نیتروژن (NSI: Nitrogen Soluble Index)

به ۱۰ گرم از نمونه‌های پنیر تولیدی، ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه گردید. سپس مخلوط حاصل به‌مدت ٤ دقیقه در هموژنایزر همگن‌شده (IKA, Germany)، در دمای ۲۵ °C به‌مدت ۳۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری و با سرعت ٦۰۰۰ g به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی از رسوب جدا گردید. برای تعیین شاخص حلالیت نیتروژن، میزان نیتروژن محلول رویی و نیز میزان نیتروژن کل هر نمونه پنیر به روش کلدال

اندازه‌گیری شد. آنگاه با استفاده از فرمول زیر میزان شاخص حلالیت نیتروژن برای هر تیمار محاسبه گردید (AOAC, 2010).

$$\text{شاخص حلالیت نیتروژن (NSI)} = \frac{\text{درصد نیتروژن مایع رویی تیمار}}{\text{درصد نیتروژن نمونه پنیر}}$$

- ارزیابی بافت

از نمونه‌های پنیر تولید شده طی زمان‌های ۱، ۱۵ و ٤٥ روز ارزیابی بافت توسط Texture analyzer (Brookfield, USA) صورت گرفت. جهت بررسی شاخص‌های بافتی از جمله سفتی و چسبندگی ابتدا قطعاتی از پنیر به ابعاد ۲ × ۲ × ۲ سانتی‌متر تهیه گردید. سپس با استفاده از پروب استوانه‌ای با قطر ٦ mm و طول ۳۵ mm و با سرعت ۲ میلی‌متر در ثانیه توسط تست TPA مورد آنالیز بافتی واقع شدند.

- ارزیابی حسی

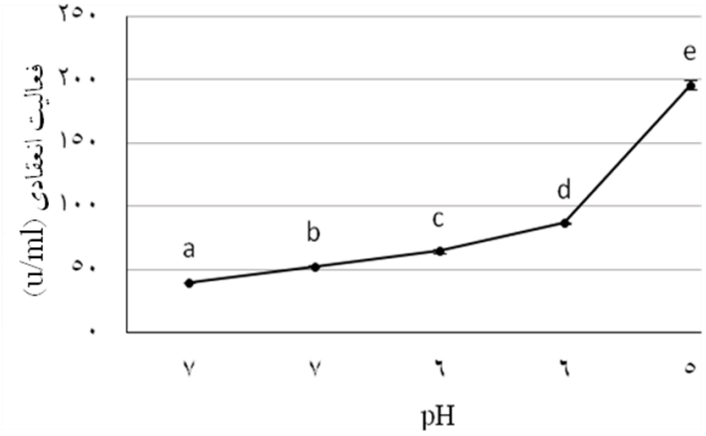
جهت ارزیابی حسی از یک گروه ۱۵ نفری براساس سیستم امتیازدهی ٤ مرتبه‌ای استفاده گردید. برای این منظور از بین دانشجویان دانشکده دامپزشکی ۱۵ نفر انتخاب شدند. نمونه‌های پنیر به‌طور تصادفی در اختیار افراد گروه قرار داده شد. سپس از آن‌ها درخواست شد نمونه‌ها را از نظر رنگ، بافت، ظاهر، طعم و بو مورد ارزیابی قرار داده و در فرم مربوطه امتیاز آن را درج کنند (Maynard and Marie, 1965).

- تجزیه و تحلیل آماری

آنالیز آماری داده‌های جمع‌آوری شده توسط نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۰ انجام شد. مقایسه دو گروه شاهد و نمونه توسط آزمون تی مستقل (Two independent sample t- test) صورت گرفت و به‌منظور بررسی تغییرات در تیمارهای مختلف از روش آنالیز واریانس استفاده گردید. در صورت وجود معنی‌داری، مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Compare means test-Duncan) انجام گردید. جهت بررسی ارزیابی حسی از آزمون‌های ناپارامتری کروسکال والیس (Kruskal-Wallis) و من‌ویتنی‌یو (Mann-Whitney U) استفاده شد. معنی‌داری آزمون‌ها در سطح ۵٪ ارزیابی گردید.

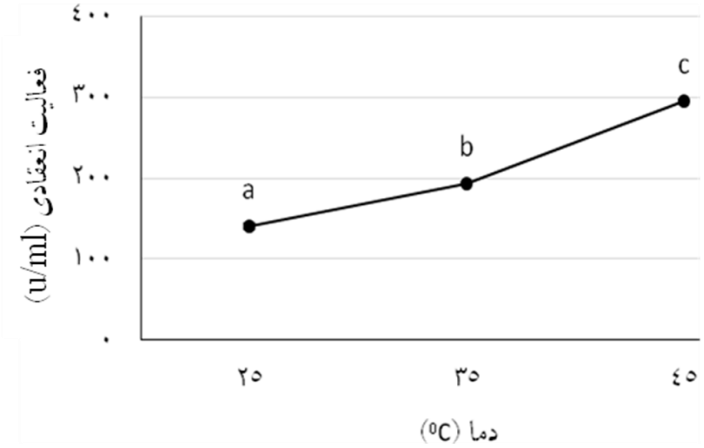
یافته‌ها

بر اساس نتایج به‌دست آمده، میزان پروتئین عصاره آبی گیاه کارده ٤/۸۵ mg/ml و میزان فعالیت آنزیمی آن ۹/۸u/ml بود. همان‌طور که در نمودار (۱) مشاهده می‌شود با کاهش pH شیر از ۷ به ۵ فعالیت انعقادی عصاره آنزیمی به‌طور معنی‌داری ($p<$ ۰/۰۵) افزایش یافت.



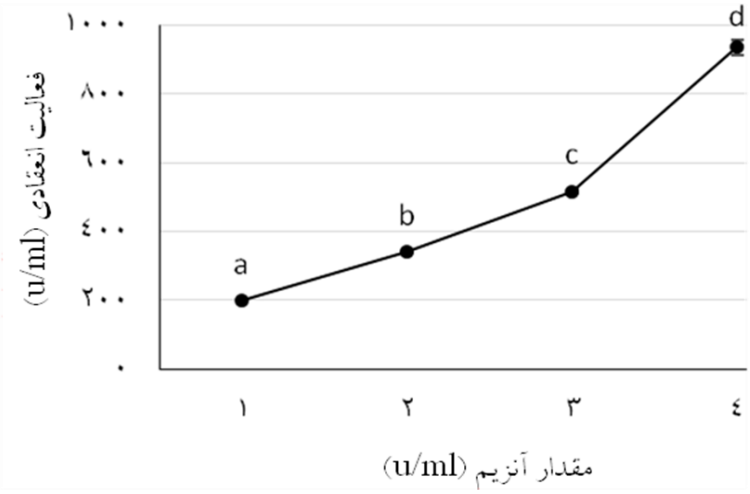
نمودار (۱)- تأثیر pHهای مختلف شیر بر فعالیت انعقادی عصاره آبی کارده در دمای ۳۵ °C؛ a, b, c, d, e: حروف متفاوت نشانگر تفاوت آماری معنی‌دار (p< ۰/۰۵) می‌باشد.

با توجه به نمودار (۲)، با افزایش دمای شیر میزان فعالیت انعقادی عصاره به‌طور معنی‌داری (p<۰/۰۵) افزایش یافت. به‌طوری‌که در دمای ۴۵ °C بیشترین فعالیت انعقادی مشاهده گردید.



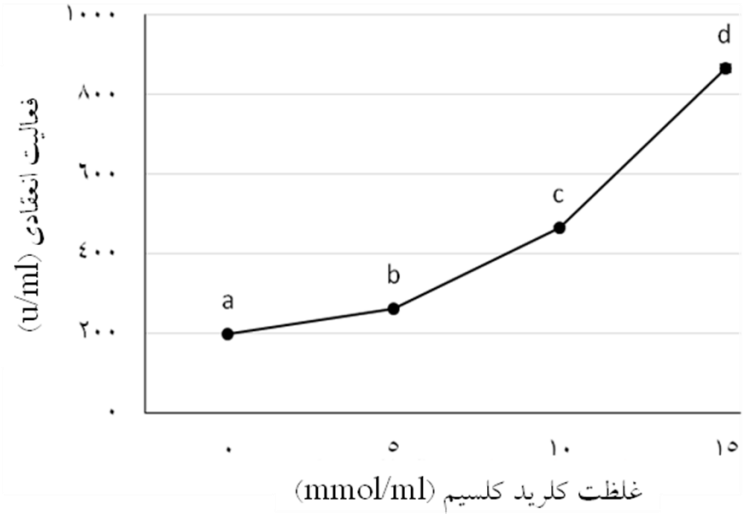
نمودار (۲)- تأثیر دماهای مختلف شیر بر فعالیت انعقادی عصاره آبی کارده در pH= ۵؛ a, b, c: حروف متفاوت نشانگر تفاوت آماری معنی‌دار در سطح (p< ۰/۰۵) می‌باشد.

نتایج به‌دست آمده از اثر مقادیر مختلف واحد آنزیمی عصاره آبی گیاه کارده در نمودار (۳) نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود با افزایش حجم عصاره از ۱۰۰ میکرولیتر (۰/۹۸ u/ml) تا ۴۰۰ میکرولیتر (۳/۹۲ u/ml) فعالیت انعقادی آن افزایش معنی‌داری داشت.



نمودار (۳)- تأثیر مقادیر مختلف آنزیم عصاره آبی کارده در انعقاد شیر در دمای ۴۵ °C و pH= ۵؛ a, b, c, d: حروف متفاوت نشانگر تفاوت آماری معنی‌دار (p< ۰/۰۵) می‌باشد.

نتایج حاصل از اثر غلظت‌های متفاوت کلریدکلسیم در نمودار (۴) نشان داده شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود با افزایش غلظت این نمک از صفر تا ۱۵ mmol/ml فعالیت انعقادی عصاره افزایش معنی‌داری (p< ۰/۰۵) داشته است.



نمودار (۴)- تأثیر غلظت‌های مختلف کلریدکلسیم بر فعالیت انعقادی عصاره آبی کارده در شیر در دمای ۴۵ °C و pH= ۵؛ a, b, c, d: حروف متفاوت نشانگر تفاوت آماری معنی‌دار (p< ۰/۰۵) می‌باشد.

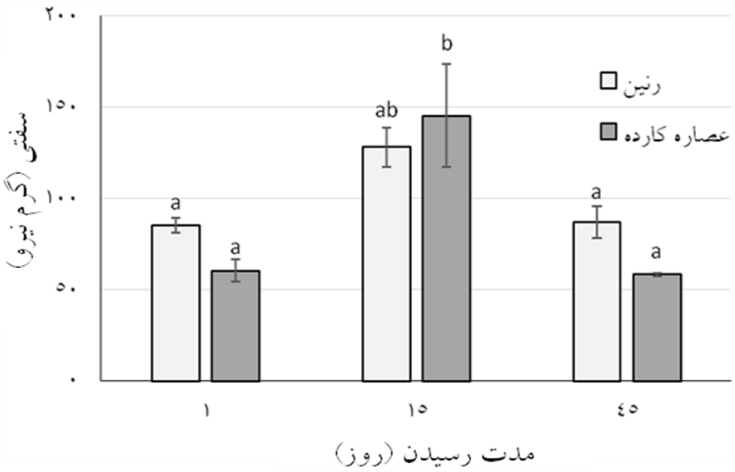
همان‌طور که در جدول (۱) نشان داده شده است میزان NSI در گروه عصاره کارده به‌طور معنی‌داری ($p< ۰/۰۵$) بیشتر از گروه شاهد در هر بازه زمانی بوده است و در هر گروه با افزایش مدت زمان نگه‌داری، شاخص NSI به‌طور معنی‌داری ($p< ۰/۰۵$) افزایش یافته است.

جدول (۱)- شاخص حلالیت نیتروژن در پنیرهای تولیده شده با عصاره آبی کارده (تیمار) و رنین (شاهد) در مدت ٤٥ روز نگه‌داری در دمای ٤ °C

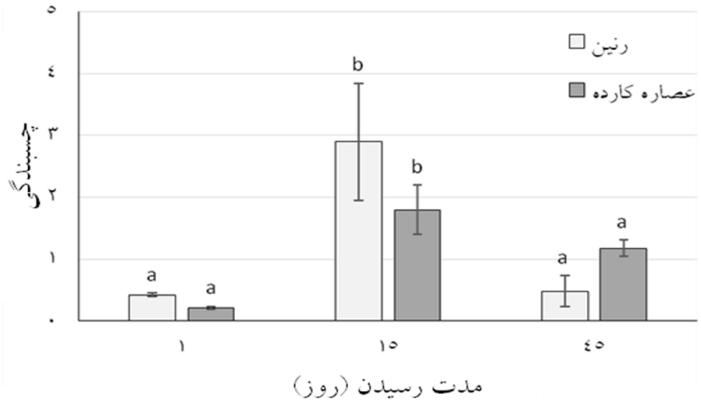
زمان (روز)	حلالیت نیتروژن (میانگین ± انحراف‌معیار)	
	نمونه تیمار	**نمونه شاهد**
۱	۲/۸٦ ± ۰/۰۳ aB	۲/۵۸ ± ۰/۰٤ aA
۱۵	۷/۲۹ ± ۰/۰۹ bB	٦/۷۱ ± ۰/۱۰ bA
٤٥	۷/۵۵ ± ۰/۰٦ cB	۷/۰۵ ± ۰/ ۱۲ cA

اعداد میانگین سه تکرار می‌باشند. a, b, c: حروف متفاوت نشانگر تفاوت آماری معنی‌دار در ستون؛ A, B: حروف نشانگر تفاوت آماری معنـی‌دار در هـر ردیـف می‌باشد ($p< ۰/۰۵$).

نتایج مربوط به سفتی و چسبندگی بافت پنیر در نمودارهای (۵) و (٦) مشخص گردیده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، سفتی بافت در گروه شاهد و گروه تیمار در روز ۱۵ به‌طور معنی‌داری ($p< ۰/۰۵$) بیشتر از روزهای ۱ و ٤٥ دوره رسیدن بود، یعنی بافت پنیرها از سفتی بیشتری برخوردار بودند. هم‌چنین در روزهای ۱ و ٤٥ دوره رسیدن پنیرهای تولید شده با عصاره گیاهی نسبت به گروه شاهد از سفتی بافت کمتری برخوردار بودند که عکس این حالت در روز ۱۵ رخ داد. چسبندگی بافت پنیرهای دو گروه مورد بررسی نیز در روز ۱۵ به‌طور معنی‌داری ($p< ۰/۰۵$) بیشتر از روزهای ۱ و ٤٥ دوره رسیدن بود. پنیرهای تولیدی توسط عصاره کارده در روز یک در مقایسه با گروه شاهد از چسبندگی کمتری برخوردار بودند.



نمودار (۵)- مقایسه سفتی بافت پنیر تولید شده با عصاره آبی گیاه کارده و رنین در طی ٤٥ روز نگه‌داری در دمای ٤°C. a, b: حروف متفاوت نشانگر تفاوت آماری معنی‌دار بین دو نمونه پنیر در هر روز می‌باشد (p< ۰/۰۵).



نمودار (٦)- مقایسه چسبندگی بافت پنیر تولید شده با عصاره آبی گیاه کارده و رنین در طی ٤٥ روز نگه‌داری در دمای ٤°C؛ a, b: حروف متفاوت نشانگر تفاوت آماری معنی‌دار بین دو نمونه پنیر در هر روز می‌باشد (p< ۰/۰۵).

همان‌طور که در جدول (۲) نشان داده شده است، نوع مایه پنیر و مدت زمان رسیدن پنیر اثر معنی‌داری (p< ۰/۰۵) بر خواص حسی آن داشتند. نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها نشان داد که در امتیازدهی، روز اول رسیدن، پنیر تولید شده با رنین دارای بالاترین امتیاز و در روز ٤٥ دوره رسیدن، پنیر تولید شده با عصاره کارده دارای کمترین امتیاز بود. در رنگ، پنیر تولیدی با عصاره کارده و رنین تفاوت معنی‌داری نداشتند. اما در دیگر متغیرها همچون طعم، بو و بافت، به‌استثنای روز اول تفاوت معنی‌دار(p< ۰/۰۵) بود به‌طوری‌که نمونه شاهد از امتیاز بالاتری برخوردار بود.

جدول (۲)- مقایسه شاخص‌های حسی(میانگین ± انحراف‌معیار) پنیرهای تولید شده با عصاره کارده و رنین در طی ٤٥ روز نگه‌داری در دمای ٤°C (n=١٥)

زمان (روز)	مایه مورد استفاده	شاخص‌ها			
		رنگ	طعم	بو	قوام بافت
١	کارده	٣/٣ ± ٠/٦٣^{a}	٣/١ ± ٠/٨٣^{a}	٢/٩ ± ٠/٦٧^{a}	٢/٩ ± ٠/٧٠^{a}
	رنین	٣/٢ ± ٠/٦٧^{a}	٢/٩ ± ٠/٥٩^{a}	٣/١ ± ٠/٧٤^{a}	٣/٢ ± ٠/٥٩^{a}
١٥	کارده	٣/٢ ± ٠/٦٧^{a}	٢/٢ ± ٠/٧٧^{b}	٢/١ ± ٠/٧٩^{b}	٢/٤ ± ٠/٧٩^{b}
	رنین	٣/١ ± ٠/٧٤^{a*}	٣/١ ± ٠/٨٣^{b*}	٣/١ ± ٠/٧٩^{a*}	٣/٢ ± ٠/٨٤^{a*}
٤٥	کارده	٣/١ ± ٠/٧٤^{a}	١/٨ ± ٠/٧٢^{c}	١/٨ ± ٠/٩١^{c}	٢/٢ ± ٠/٧٩^{b}
	رنین	٣/١ ± ٠/٧٩^{a*}	٢/٩ ± ٠/٧٩^{a*}	٣/٠ ± ٠/٨٦^{a*}	٢/٨ ± ٠/٧٤^{b*}

a, b, c: حروف متفاوت نشانگر تفاوت آماری معنی‌دار در هر نمونه پنیر در روزهای مختلف می‌باشد. * نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین دو نمونه پنیر در هر روز می‌باشد (p< ٠/٠٥).

بحث و نتیجه‌گیری

همان‌طور که در قسمت نتایج نیز ذکر گردید بیشترین میزان فعالیت انعقادی عصاره گیاه کارده در pH= ٥ مشاهده شد. این مطلب نشان‌دهنده آن است که آنزیم موجود در این عصاره پروتئازی است اسیدی و به‌همین دلیل در محیط قلیایی از میزان فعالیت آن کاسته می‌شود، به‌طوری‌که هر چه pH بافر استخراج کمتر شده و به pH فعالیت بهینه نزدیک می‌گردد، سرعت منعقد شدن شیر توسط آن افزایش می‌یابد. از این نظر عصاره آنزیمی گیاه کارده مشابه سایر آسپارتیک پروتئینازهای دیگر می‌باشد (Hashim *et al*., 2011; Chitpinityol and Crabbe, 1998). چنین الگوی رفتاری در اکثر مایه‌های پنیرهای تجاری موجود نیز مشاهده می‌شود که با کاهش pH میزان MCA آن‌ها افزایش می‌یابد. نتایج این پژوهش با یافته‌های مطالعه‌ای که مناسب‌ترین pH گیاه خرشوف (*Cynara cardunculus*) در تولید پنیر را بین ٥-٣ گزارش نمودند، مطابقت دارد (Macedo *et al*., 1993).

نظر به این‌که انعقاد شیر به‌شدت تحت تأثیر دما می‌باشد (Najera *et al*., 2003)، با افزایش دما بین ٢٠ تا ٤٠ درجه سلسیوس سرعت تشکیل لخته افزایش و در دماهای بالاتر سرعت تشکیل لخته کاهش یافت. با کاربرد آنزیم رنت در دمای ٥٢ درجه سلسیوس سرعت انعقاد به نحو محسوسی کاهش یافت و در دمای بالاتر از ٦٥ درجه سلسیوس انعقاد انجام نگرفت (Azrnia *et al*., 1997). نتایج حاصل از تأثیر دمای شیر بر زمان انعقاد توسط عصاره گیاه کارده نشان داد که با افزایش دما تا ٤٥ درجه سلسیوس فعالیت انعقادی به‌طور قابل‌توجهی افزایش می‌یابد. از این‌رو دمای ٤٥ درجه سلسیوس دمای اپتیمم فعالیت آنزیم گیاه کارده در نظر گرفته شد. در حقیقت می‌توان عنوان نمود، تسریع در انعقاد همراه با افزایش دما بر اثر گسترش دامنه فعالیت آنزیم است. در تحقیقی حداکثر دما برای فعالیت

انعقادی آنزیم آسپارتیک پروتئین از استخراج شده از *رایزوپوس اوریزا* را دمای ٦٠ درجه سلسیوس گزارش کرده و عنوان نمودند که این آنزیم به‌سرعت در دماهای بالاتر غیرفعال می‌گردد (Kumar *et al*., 2006).

یکی دیگر از عوامل مؤثر بر فرآیند انعقاد شیر، غلظت آنزیم منعقد کننده می‌باشد. به‌طوری‌که با افزایش غلظت آنزیم، فعالیت انعقادی شیر افزایش و زمان انعقاد کاهش می‌یابد. این تغییرات به افزایش سرعت هیدرولیز کاپاکازئین نسبت داده می‌شود. بدین معنی که در زمان کم‌تری مقدار بیشتری کاپاکازئین تبدیل به پاراکاپا کازئین می‌شود و در نتیجه به هم خوردن تعادل الکترواستاتیکی محیط، انعقاد شیر در زمان کوتاه‌تری انجام می‌پذیرد (Hashim *et al*., 2011; Najera *et al*., 2003). این موضوع در استفاده از عصاره آنزیمی گیاه کارده نیز مشاهده گردید. بدین صورت که با افزایش غلظت آنزیم، فعالیت انعقادی شیر افزایش قابل‌توجهی داشت. مطالعه انجام شده توسط در خصوص گیاه کنگر فرنگی (*Cynara scoolymus*) نیز نشان داده است که با افزایش غلظت عصاره آنزیمی، فعالیت انعقادی شیر افزایش یافته و از این نظر با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت دارد (Chazarra *et al*., 2007). افزودن کلریدکلسیم به‌دلیل مشارکت یون‌های کلسیم در تشکیل و سفتی لخته کازئینی موجب ازدیاد فعالیت انعقادی شیر می‌گردد. در بررسی حاضر و کاربرد عصاره گیاه کارده نیز این مورد مشاهده شد که از این لحاظ با نتایج مطالعه مشابه، مطابقت دارد (Alirezaei *et al*., 2011).

پروتئولیز اولیه در پنیر عموماً مربوط به فعالیت کیموزین بر آلفا کازئین و اثر پلاسمین بر روی آلفا کازئین است. آنزیم‌های گیاهی باعث رها شدن پلاسمین از میسل کازئین و افزایش نیتروژن محلول می‌گردند (Hesari *et al*., 2006). مقادیر بالای ازت محلول در پنیرهای با مایه گیاهی را می‌توان به فعالیت پروتئولیتیکی بالای پروتئاز گیاهی نسبت به دیگر پروتئازهای موجود دانست. به این علت که این دسته آنزیم‌های اسیدی در pH پنیر دارای ماکزیمم فعالیت خود می‌باشند (Tejeda *et al*., 2002). نتایج مطالعه حاضر ضمن تأیید این مورد، با یافته‌های پژوهش دیگری مطابقت دارد (Prados *et al*., 2006).

در ارزیابی بافت پنیر، نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها، تفاوت معنی‌داری در میزان سفتی بافت پنیر تهیه شده از پروتئاز کارده به‌علت پروتئولیز شدید کازئین و تخریب شبکه پروتئینی توسط این آنزیم در مقایسه با نمونه شاهد نشان داد. بررسی ویژگی‌های حسی پنیر تهیه شده با مایه پنیر حیوانی و گیاهی نشان داد پنیرهایی که با مایه حیوانی تهیه می‌شوند به‌طور معنی‌داری دارای بافتی سفت‌تر نسبت به پنیرهای با مایه گیاهی هستند. پروتئولیز شدید و سریع در پنیرهای تهیه شده با مایه گیاهی، شبکه کازئینی را می‌شکافد و سبب حصول بافت نرم در پنیر می‌شود (Tejada *et al*., 2002). هم‌چنین در مطالعه دیگری نشان دادند که آنزیم‌های گیاه خورشوف دارای فعالیت قوی هستند و سبب ایجاد بافت نرم می‌شوند (Galan *et al*., 2008; Prados *et al*., 2006).

علت عمده افزایش چسبندگی، افزایش میزان پروتئولیز می‌باشد. به‌طوری که پروتئین‌های کوچک ایجاد شده آب بیشتری جذب می‌کنند و قدرت

چسبندگی پنیر را افزایش می‌دهند. نتایج تحقیقی نشان داد که با طی شدن زمان رسیدن پنیر، چسبندگی آن افزایش می‌یابد و از این لحاظ نتایج این مطالعه با نتایج آن‌ها مطابقت دارد (Irudayaraj and Chen, 1999).

فرآیند پروتئولیز و تجزیه پروتئین‌ها طی دوره رسیدن، منجر به ایجاد اسید آمینه‌های آزاد و پپتیدهای کوچک می‌شوند که خود باعث طعم تلخی در فرآورده نهایی می‌گردند. خواص حسی پنیر تولید شده با دو نوع مایه پنیر حیوانی و گیاهی مقایسه و یافته‌ها نشان می‌داد که پنیر حاصل از مایه پنیر حیوانی دارای شدت عطر و طعم ملایم‌تر و تندی کمتر نسبت به پنیر تولید شده با مایه گیاهی بود (Tejada *et al*., 2007). پنیرهای با مایه پنیر گیاهی به‌دلیل تأثیر قوی‌تر پروتئازهای گیاهی بر روی کازئین در مقایسه با کیموزین، دارای طعم تلخ‌تر نسبت به نوع حیوانی آن بود. نتایج مشابهی در مطالعه‌ای مشابه (Galan *et al*., 2008) و بررسی حاضر مشاهده گردید.

در مجموع یافته‌های این پژوهش مشخص کرد که شدت پروتئولیز نمونه پنیر تهیه شده با آنزیم گیاه کارده طی دوره رسیدن بیش از نمونه شاهد بوده و به‌دنبال آن بافت پنیر نرم‌تر گردیده است، لذا به‌نظر می‌رسد عصاره گیاه کارده در غلظت به‌کار رفته برای تولید پنیر سفید ایرانی جایگزین مناسبی برای رنت نمی‌باشد و مطالعات بیشتر بر روی عملکرد اختصاصی عصاره آنزیمی کارده بر فراکسیون‌های کازئین و پپتیدهای زیست‌فعال در ژل‌های تولیدی با عصاره، پیشنهاد می‌گردد.

سپاسگزاری

از سرکار خانم معصومه آغازی و سرکار خانم مریم توانا کارشناسان محترم دانشکده دامپزشکی شیراز به‌خاطر همکاری در انجام آزمایش‌ها قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

منابع

- Alirezaei, M., Aminlari, M., Gheisari, H.R. and Tavana, M. (2011). Actinidin: a promising milk coagulating enzyme. European Journal of Food Research and Review, 1(2): 43-51.
- Azarnia, S., Ehsani, M. and Mirhadi, S. (1997). Evaluation of the physicochemical characteristics of the curd during the ripening of Iranian brine cheese. International Dairy Journal, (6): 473-478.
- AOAC. (2010). Official Methods of Analysis. 18th edition, 3rd revision, Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C, pp. 248-256.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilization the principle of protein dye binding. Analytical Biochemistry, 72(1-2): 248-254.
- Chazarra, S., Sidrach, L., Lopez-Molina, D. and Rodriguez-Lopez, J.N. (2007). Characterization of milk clotting properties of extracts from artichoke (*cynara scolymus,L.*) flowers. International Dairy Journal,17(12): 1393-1400.
- Chitpinityol, S. and Crabbe, M.J.C. (1998). Chymosin and aspartic proteinases. Journal of Food Chemistry, 61(4): 395-418.

- Englund, P.T. and Graig, L.C. (1968). Studies on ficin. Its isolation and characterization. Journal of Biochemistry, 163-175.
- Farahnoodi, F. (1998). Dairy industries. Tehran Research and Education Jahad Company, 98-100. [In Persian]
- Ghahreman, A. and Attar, F. (1999). Biodiversity of plant species in Iran. Central Herbarium of Tehran University, Faculty of Science, 379. [In Persian].
- Galan, E., Prados, F., Pino, A., Tejada, L. and Fernandez-Salguero, J. (2008). Influence of different amounts of vegetable coagulant from cardoon *cynara cardunculus* and calf rennet on the proteolysis and sensory characteristics of cheese made with sheep milk. International Dairy Journal, 18(1): 93-98.
- Hashim, M.M., Mingsheng, D., Iqbal, MF. and Xiaohong, C. (2011). Ginger rhizome as a potential source of milk coagulating cysteine protease. Journal of Phytochemistry, 72(6): 458-464.
- Hesari, J., Ehsani, M.R., Khosroshahi, A. and McSweeney, P.L.H. (2006). Contribution of rennet and starter to proteolysis in Iranian UF white cheese. Lait, 86(4): 291-302.
- Irudayaraj, J. and chen, M. (1999). Texture development in cheddar cheese during ripening. Agriculture Engineering, 41: 253-258.
- Jacob, M., Jaros, D. and Rohm, H. (2011). Recent advance in milk clotting enzymes. International Journal of Dairy Technology, 64(1): 14-33.
- Kumar, A., Sharma, J., Mohanty, A.K., Grover, S. and Batish, V.K. (2006). Purification and characterization of milk Clotting enzyme from goat (*Capra hircus*). 145(1): 108-113.
- Macedo, I.Q., Faro, C.J. and Pires, E.M. (1993). Specificity and kinetics of the milk clotting enzyme from cardoon (*Cynara cardunculus*) toward bovine kappa casein. Journal of Agricultural Food Chemistry, 41(10): 1537-1540.
- Maynard, A.A., and Marie, R. (1965). Principles of Sensory Evaluation of Food. Academic Press, NewYork, pp. 53-63.
- Najera, A.I., Renobales, M. and Baroon, L. (2003). Effects of pH, temperature, $CaCl_2$ and enzyme concentration on the rennet-clotting properties of milk: a multifactorial study. Journal of Food Chemistry, 80(3): 345-352.
- Piero, A.R.L., Puglisi, I. and Petrone, G. (2002). Characterization of "Lettucine", a serine-like protease from *Lactuca sativa* leaves, as a novel enzyme for milk clotting. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 50 (8): 3439-3443.
- Pino, A., prados, F., Galan, E., Mcsweeney. and P.L.H, Fernandez-Salguero, J. (2009). Proteolysis during the ripening of goats milk cheese made with plant coagulant or calf rennet. Internationa Journal of Food Research, 42 (3): 3230-3240.
- Prados, F., Pino, A., Rincon, F., Vioquie, M. and Fernandez- Salguero, J. (2006). Influence of the frozen storge on some characteristic of ripened Mancheco type cheese manufactured with a powdered egetable rennet. Journal of Food Chemistry, 64: 177-183.
- Roserio, L.B., Barsoa, M. and Wilbey, R.A. (2003). Cheese making **w**ith vegetable coagulants the use of *Cynara L* for the production of ovine milk cheese. International Journal of Dairy technology, 56(2): 76- 85.
- Tejada, L., Abellan, A., Cayuela, J.M., Martinez-cacha, A. and Fernandez-salguero, J. (2007). Proteolysis in goats milk cheese made with calf rennet and plant coagulant. International Dairy Journal, 21: 48-54.
- Tejeda, L., Gomez, R. and Fernandez-Salguero, J. (2002). Sensory characteristicts of ewe milk cheese made with three types of coagulant: calf rennet, Powdered vegetable coagulant and crude aqueous extract from *Cynara cardunculus*. Journal of Food Quality, 30(1): 91-103.
- Tripathi, P., Tomar, R. and Jagannadham, M.V. (2011). Purification and biochemical characterisation of a novel protease streblin. Journal of Food Chemistry, 125 (3): 1005-1012.

Possibility of Biarum carduchcorumapplication as vegetable rennet in production of Iranian white cheese

Golkari , H.[1], Gheisari, H.R.[2*], Shekarforoush, S.S.[3], Aminlari, M. [4], Raeisi, M.[1]

1. Ph.D. Student of Food Hygiene, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
2. Associate Professor of Food Hygiene Department, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
3. Professor of Food Hygiene Department, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
4. Professor of Biochemistry Department, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

[*] &RUUHVSRQGLQJ $XWKRU¶V H PDLO JKDLVDUL#VKLUD

(Received: 2015/9/26 Accepted: 2015/12/13)

Abstract

Numerous attempts have been made to replace calf rennet with another milk-clotting protease because of limited supply and the high price of calf rennet. Biarum carduchcorumis rich in protease activities, therefore it is a probable candidate for substitution. No systematic study on the Biarum carduchcorum and its enzyme characteristics have been conducted so far. The purpose of this study was to prepare Biarum extract, determination of its protease activity for milk clotting and production of Iranian white cheese and study on the physicochemical and organoleptic properties of the product. After the cheese production by the vegetable extract (0.5% concentration) organoleptic, textural properties and nitrogen solubility index (NSI) were analyzed during 45 days of ripening compared to the control sample. The results of this study showed that the optimal protease activity of the extracted enzymes for milk clotting was at 45 ^{o}C, pH= 5 and 15 mmol/ml concentration of $CaCl_2$.The cheese sample that was manufactured with vegetable enzyme had a bitter flavor and sharper odor. At textural analysis, the cheese had a lower hardness. Assessment of proteolysis during the cheese ripening by NSI measurement showed that the proteolysis severity of cheese sample produced with vegetable enzyme was significantly higher than the control sample. Therefore, it seems that aqueous extract of Biarum in concentration used for the production of Iranian white cheese cannot be a suitable substitute for rennet.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Biarum carduchcorum, Iranian white cheese, Proteolysis, Rennet, Vegetable extract