مجله مهندسی بیوسیستم ایران
دوره ۳۹، شماره ۱، ۱۳۸۷ (۶۶-۵۹)

مقایسه تغییرات شاخص پروتئولیز در شیر خام و پاستوریزه تحت تاثیر درجه حرارت و زمان نگهداری

مهشید جهادی*[۱]، محمدرضا احسانی[۲] و سعیده سادات موسوی[۳]
۱، ۳، دانشجوی دکتری و کارشناس، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران
۲، استاد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: ۸۵/۹/۱۱- تاریخ تصویب: ۸۶/۸/۲۳)

چکیده

در این تحقیق به منظور ارزیابی اثر پاستوریزاسیون، دما و زمان نگهداری بر روند فعالیت پروتئولیتیکی شیر، از طرح فاکتوریل کامل ۲×۳×۳ استفاده شد. شیر خام و پاستوریزه در سه سطح درجه حرارت (۵، ۱۶، ۲۵?C) و در سه سطح زمان نگهداری (۱، ۲، ۳ روز) از نظر pH، نسبت کازئین به پروتئین (درصد وزنی) و نسبت ازت غیر کازئینی به پروتئین خام در مقایسه با ماده اولیه مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که پاستوریزاسیون، دما و زمان نگهداری با دامنه اطمینان ۹۵ درصد، بر pH و نسبت ازت غیر کازئینی به پروتیئن خام در مقایسه با نمونه اولیه موثر است. در حین نگهداری شیر، pH کاهش و نسبت ازت غیر کازئینی به پروتئین خام در مقایسه با ماده اولیه افزایش یافت. تغییرات پروتئین شیر بر روی ژل الکتروفورز SDS-PAGE (۱۰-۲۰٪ اکریل آمید) نشان دهنده تاثیر متغیرهای آزمون بر کاهش درصد کازئین و تولید فراکسیون‌های ناشی از پروتئولیز بود. شایان ذکر است که مقدار پروتئین α-لاکتآلبومین و β- لاکتوگلبولین نسبت به متغیرهای آزمون وابسته نبود. با مقایسه نتایج حاصله از بررسی ۲ متغیر فوق در شیر خام و پاستوریزه مشخص شد، درحالیکه تغییرات شاخصهای فوق در شیر پاستوریزه به علت مقاومت حرارتی آنزیم‌های پروتئازی همچنان ادامه داشت اما آهنگ تغییرات آن بسیار کندتر از تغییرات رخ داده در شیر خام بود.

واژه‌های کلیدی: پاستوریزاسیون، درجه حرارت، زمان نگهداری، شیر، پروتئولیز.

مقدمه

بعد از دوشش، شیر دارای درجه حرارتی حدود $۳۵^{\circ}c$ است، حتی در صورتی که دمای محیط کم باشد، شرایط جهت ازدیاد میکروارگانیسم‌ها مناسب می‌باشد. در چند دهه اخیر سرد کردن شیر در دامداری‌ها و مراکز جمع‌آوری و حمل و نقل شیر در سراسر دنیا عمومیت پیدا کرده است. در این راستا سرعت سرد کردن و درجه حرارت اولیه شیر نیز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار گشته است.

نگهداری شیر خام در دمای پائین منجر به افزایش انتخابی رشد باکتریهای سرمادوست می‌شود، به طوریکه بررسی نتایج برخی پژوهش‌ها نشان می‌دهد که با نگهداری شیر خام در دمای ۷-۴ ?C به مدت ۷۲ ساعت، شمارش باکتریهای سرماگرا از $۱۰^{۳}$ (CFU/mL) به $۱۰^{۶}$ افزایش می‌یابد (۵).

این باکتریها با تولید پروتئازهای خارج سلولی، باعث هیدرولیز فراکسیون های کازئین می‌گردند (۸، ۹، ۱۱).

* نویسنده مسئول: مهشید جهادی
E-mail: mahshidjahadi@yahoo.com

تحقیقات کلمن در سال۱۹۹۰ نشان داد که درحین رشد باکتری *سودوموناس فلورسانس* M3/6 یا *سودوموناس فراژی* K12، فعالیت پروتئازی شیر نگهداری شده در دمای ۷?C افزایش یافته، بعد از حدود ۷ ساعت سرعت افزایش فعالیت پروتئازی در هر دو شیر شدت می‌یابد، اما این فعالیت در شیر حاوی *سودوموناس فلورسانس* M3/6 بیشتر از *سودوموناس فراژی* بود (۹). بر اثر فعالیت پروتئازی آنزیم‌های حاصل از میکروارگانیسم‌های سرماگرا، فراکسیون‌های کازئین تجزیه می‌شوند (۸، ۱۱)، اما برحسب سوش میکروبی موجود در شیر، یکی از فراکسیون های α، β، κ کازئین بیش از سایرین مورد تجزیه آنزیمی واقع می‌شود. هیدرولیز کاپا کازئین توسط پروتئازها، موجب ناپایداری کازئین می‌گردد (۱، ۸). میکروارگانیسم‌های سرماگرا به طور کامل با اعمال فرایند حرارتی از بین می‌روند. اما پروتئازهای حاصله به حرارت مقاوم هستند و بعد از اعمال حرارت$۶۲/۵^{\circ}C$ به مدت ۳۰ دقیقه فعالیت پروتئازی کاملا پایدار باقی می‌ماند و حتی در دمای$۱۴۹^{\circ}C$ به مدت ۱۰ثانیه، ۴۰ درصد از فعالیت پروتئولیتیکی پروتئازها باقی می‌ماند (۹). به طور معمول پروتئاز باکتریائی در$۳۷^{\circ}C$ و pH برابر ۷/۵ فعالیت بیشینه خود را دارد، اما در محدوده دمایی$۵-۵۲^{\circ}C$ و محدوده pH ۹-۵ همچنان به فعالیت خود ادامه می‌دهد (۱، ۹).

علاوه بر پروتئازهای خارجی حاصل از باکتریهای سرمادوست، پروتئازهای داخلی مانند پلاسمین نیز در شیر وجود دارند. پلاسمین (EC. ۳،۴،۲۱،۷) پروتئاز سرینی مقاوم به حرارت است که قادر به هیدرولیز β, α_{s2}, α_{s1} کازئین است. اما بر کاپا کازئین و پروتئین‌های سرمی شیر اثر ندارد (۲، ۶، ۱۳). به دنبال فعالیت سیستم پلاسمین، میزان γ -کازئین و پپتیدهای محلول در شیر افزایش می‌یابد و نسبت کازئین به پروتئین کل کاهش می‌یابد (۱۰، ۱۲). آنزیم پلاسمین نه تنها در طی نگهداری شیر سرد، بلکه در دمای بالا نیز فعالیت خود را از دست نداده و همچنان بر روی پروتئین‌های شیر موثر است (۳، ۱۴).

به طور کلی فعالیت پروتئازی در شیر موجب پروتئولیز پروتئین‌های شیر، افزایش تلخی و کاهش زمان ماندگاری شیر پاستوریزه، همچنین کاهش کیفیت پنیر، افزایش زمان انعقاد در برابر آنزیم مایه پنیر، افزایش میزان از دست رفتن ترکیبات پروتئینی و به ویژه کازئین در آب پنیر و افزایش میزان نرمی در پنیر رسیده اسمیر(Smear)، ژله‌ای شدن شیر UHT، افزایش انسداد در مبدلهای حرارتی، کاهش کیفیت و کاهش بازده در محصولات حاصل از آن می‌گردد (۳، ۵، ۷، ۱۳، ۱۴). این تحقیق با هدف بررسی اثر پاستوریزاسیون، دما و زمان نگهداری شیر بر میزان تغییرات نامطلوب رخ داده در شیر و شاخص پروتئولیز و نحوه پروتئولیز پروتئین‌های شیر انجام پذیرفت.

مواد و روشها

طراحی پروژه

ارزیابی اثر پاستوریزاسیون، دما و زمان نگهداری شیر بر میزان روند پروتئولیز شیری با مشخصات میکروبی و شیمیایی مطابق جدول (۱) صورت پذیرفت. نمونه شیر فوق پس از دوشش سریعا″ تا$۴^{\circ}C$ سرد شده و متعاقبا″ به آزمایشگاه انتقال یافت. سپس آنرا در دو بخش پاستوریزه شده (در دمای $۶۳^{\circ}C$ به مدت ۳۰ دقیقه) و غیر پاستوریزه، در سه سطح دمایی ۵، ۱۶و ۲۵ درجه سانتیگراد و در یک بازه زمانی سه روز طبق طرح فاکتوریل کامل (۲×۳×۳) از نظر تغییرات pH، درصد کازئین و تغییرات درصد ازت غیرکازئینی به پروتئین خام نسبت به روز آغازین مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه‌های شیر فوق بعد از دو روز نگهداری از نظر میزان پروتئولیز هر یک از پروتئین‌های شیر، توسط روش الکتروفورز سدیم دو دسیل سولفات پلی‌اکریل‌آمید ژل با نمونه روز صفر مورد مقایسه قرار گرفت.

آنالیز شیمیایی

درصدپروتئین خام و ازت غیرکازئینی‌طبق استانداردهای شماره ۹۹۱/۲۰ و ۹۹۱/۰۵ AOAC اندازه‌گیری شد (۴).

روش الکتروفورز

نمونه شیر به نسبت ۱ به ۱۰ با بافر نمونه (۱۰ میلی مولار تریس ـ اسید کلریدریک با pH =۶/۸ ، ۱ درصد سدیم دو دسیل سولفات، ۲۰ درصد گلیسرول، ۰/۰۲ درصد برومو فنل بلو و ۵۰ میل مولار دی تیو تری تول) مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در آب جوش قرار داده تا پیوند SDS و پروتئین کامل شود. ۶ میکرولیتر از نمونهٔ فوق بر روی ژل SDS-PAGE منتقل شد.

جدول ۱- مشخصات میکروبی و شیمیایی شیر اولیه

تعداد پیکره یاخته‌ای CFU/mL	شمارش کلی میکروارگانیسم سرماگراCFU/mL	شمارش کلی میکروارگانیسم CFU/mL	درصد کازئین به پروتین خام	درصد پروتئین خام	درصد چربی	درصد رطوبت
۳۶۱۵۰۰±۷۰۷	۱۹۰۰۰±۷۰۷	۲۶۵۰۰±۲۱۲۱	۷۱/۷۵±۰/۰۴۲	۲/۹۴±۰/۰۲۸	۳/۲۵±۰/۰۷	۸۸/۹۲±۰/۰۸۴

شناسایی و جداسازی پروتئین بر روی ژل SDS-PAGE با غلظت متغیر ۱۰-۲۰ درصد اکریل آمید در ژل زیرین (۰/۵۳٪ بیس‌اکریل‌آمید و۲۰٪ اکریل آمید- ۰/۲۶۵٪ بیس اکریل آمید، ۱۰ ٪ اکریل آمید ۰/۱ SDS%، ۰/۰۳۶ ٪ آمونیوم پر سولفات، ۰/۰۰۰۳٪ **N,N,N,N**تترا متیلن دی آمید و ۰/۳۷۵ مولار تریس با۸/۸ =pH) و۳/۷۵ درصد اکریل آمید در ژل فوقانی (۳/۷۵٪ اکریل آمید، ۰/۱ ٪ بیس اکریل آمید، ۰/۱ ٪ سدیم دو دسیل سولفات، ۰/۰۷۵ ٪ آمونیوم پر سولفات، ۰/۰۰۰۵ ٪**N,N,N,N** - تترا متیلن دی آمید، ۰/۱۲۵ مولار تریس با۶/۸ =pH) انجام پذیرفت. نمونهٔ در ۳۶ آمپر در بافر تانک الکتروفورز (۳/۲۵ گرم پودر تریس و ۱۴/۴ گرم پودر گلیسین را به طور جداگانه در آب دو بار تقطیر حل گردید، پس از کنترل و تنظیم pH برروی ۸/۳ یک گرم پودر دودسیل سولفات در این محلول حل کرده به حجم یک لیتر رسانده می‌شود)، توسط دستگاه الکتروفورز صفحه‌ای (Vss.1100 ، اختریان، ایران) تفکیک شد. به مدت ۲۴ ساعت توسط محلول رنگی (۰/۰۲۵ در صد رنگ کوماسی بلو R250 , ۴۰ درصد متانول و ۷ درصد اسید استیک گلایشیال) رنگ آمیزی وسپس توسط محلول رنگ بر (۵ درصد متانول و ۷ درصد اسید استیک گلایشیال) رنگبری شد (۱۴). ژل فوق توسط دستگاه دانسیتومتر (process-24, Helena, USA) دوبار اسکن گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

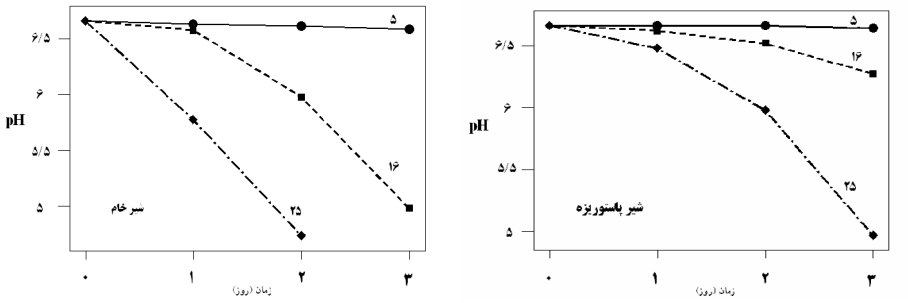
یافته‌های این تحقیق با استفاده از مقایسه میانگین چند گانه دانکن و تجزیه و تحلیل واریانس با استفاده از مدل خطی(General Linear Model) در طرح فاکتوریل کامل ۲×۳×۳ با استفاده از نرم افزار SPSS.13 مورد ارزیابی واقع شد. کلیه نمودارها با استفاده از این نرم افزار رسم گردید.

نتایج

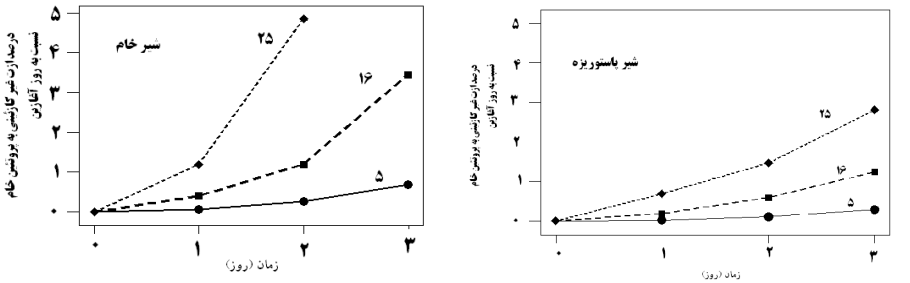
آنالیز واریانس تغییرات pH نسبت به سه متغیر دما، زمان نگهداری و پاستوریزاسیون حاکی از تاثیر معنادار دما، پاستوریزاسیون، اثر متقابل (دما×پاستوریزاسیون) به همراه زمان و اثر متقابل (زمان×پاستوریزاسیون) و (زمان×دما) و اثر متقابل هر سه فاکتور (زمان×پاستوریزاسیون×دما) بر تغییرات pH شیر بود ($P<0/05$).

pH نمونه‌های شیر در طول ۳ روز نگهداری شیر کاهش می‌یابد. همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است، این تغییرات با پاستوریزاسیون و نگهداری شیر در درجه حرارت پائین‌تر با آهنگ کندتری تغییر می‌یابد. به طوریکه این تغییرات در نمونه شیر پاستوریزه نگهداری شده در ۵ درجه سانتیگراد حداقل بوده و در طول ۳ روز نگهداری، میان تغییرات این پارامتر در روزهای مختلف اختلاف معناداری وجود نداشت ($P>0/05$). این در حالی است‌که نمونه شیر خام نگهداری شده در$25^{\circ}C$، بیشترین تغییرات pH را از خود نشان می‌دهد.

بررسی نسبت کازئین به پروتئین خام در طول نگهداری شیر نشان می‌دهد که این شاخص در طول نگهداری کاهش می‌یابد (داده‌های این بخش در مقاله آورده نشده است)، اما به دلیل آنکه در اثر فرایند حرارتی، پروتئین بتا لاکتوگلبولین دناتوره شده، قادر به برقراری پیوند دی سولفیدی با گروه‌های سولفیدریل آزاد کاپا- کازئین موجود در سطح میسل کازئین می‌باشد (۱۳).در نتیجه این پروتئین در حین اندازه‌گیری درصد کازئین در شیر پاستوریزه، به همراه میسل کازئین رسوب می‌کند، و مقدار کازئین بیش از حد واقعی خود اندازه‌گیری می‌شود. لذا در این مطالعه میان درصد کازئین به پروتئین خام در شیر پاستوریزه (۷۲/۸۴±۰/۰۶۸) و این فاکتور در شیر خام (۷۱/۷۵±۰/۰۴۲) در روز صفر تفاوت وجود داشته اما این اختلاف معنادار نمی‌باشد ($p>0/05$). به همین دلیل در این تحقیق جهت بررسی آنالیز واریانس و بررسی بهتر متغیرهای آزمون بر فعالیت پروتئولیتیکی شیر، از شاخص نسبت ازت غیرکازئینی به پروتئین خام نسبت به ماده اولیه، استفاده گردید.



شکل ۱- بررسی تغییرات pH در شیر خام وپاستوریزه در طی دوره نگهداری سه روزه در دمای ۵ (●)، ۱۶(■) و ۲۵(♦) درجه سانتیگراد



شکل ۲- بررسی تغییرات درصد ازت غیر کازئینی به پروتئین خام نسبت به روز آغازین در شیر خام وپاستوریزه در طی دوره نگهداری سه روزه در دمای ۵ (●)، ۱۶(■) و ۲۵(♦) درجه سانتیگراد

بررسی آنالیز واریانس تغییرات نسبت ازت غیرکازئینی به پروتئین خام، در مقایسه با ماده اولیه نشان می‌دهد که دما و پاستوریزاسیون و اثر متقابل (دما×پاستوریزاسیون) به همراه زمان و اثرات متقابل (زمان×پاستوریزاسیون) و (زمان × دما) اثر متقابل هر سه فاکتور (زمان×پاستوریزاسیون×دما) بر تغییرات این شاخص تاثیر دارد و این شاخص در طول نگهداری محصول تغییر می‌کند ($P<۰/۰۵$). مقایسه تغییرات درصد ازت غیر کازئین به پروتئین خام در مقایسه با ماده اولیه در شیر پاستوریزه و خام نگهداری شده در دماهای مختلف نشان می‌دهد (شکل ۲) که:

ـ در حین نگهداری شیر، نسبت ازت غیرکازئینی افزایش می‌یابد، اما آهنگ این تغییرات در دماهای بالاتر شدیدتر است. به طوریکه تغییرات شاخص فوق در شیرهای نگهداری شده در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد با سرعت بیشتری رخ می‌دهد.

- گر چه با پاستوریزاسیون شیر کلیه میکروب‌های سرمادوست به عنوان مهمترین منبع تولید آنزیم پروتئاز خارج سلولی کاملا از بین می‌روند (داده های این بخش در مقاله آورده نشده است) اما شاخص فعالیت پروتئولیتیک در شیر پاستوریزه همچنان افزایش یافته و در روز سوم نگهداری هر نمونه شیر، شاخص نسبت ازت غیرکازئینی به پروتئین خام در مقایسه با ماده اولیه در بیشینه خود قرار دارد.

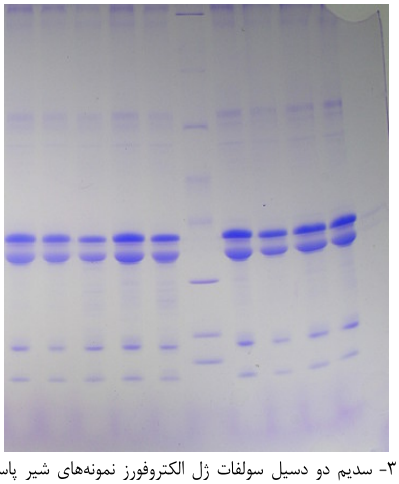
در حین نگهداری شیر، هیدرولیز کازئین در شیر ادامه یافته، اما تغییرات نسبت ازت غیر کازئین به پروتئین خام در مقایسه با ماده اولیه، در شیرهای غیرپاستوریزه با شدت بیشتری افزایش می‌یابد.

کمترین روند تغییرات تولید ازت غیر کازئینی در شیر پاستوریزه نگهداری شده در دمای $۵^{\circ}C$ صورت می‌گیرد، این تغییر در ۴۸ ساعت اولیه در حداقل خود می‌باشد. به

طوریکه بین درصد این شاخص طی دو روز نگهداری شیر پاستوریزه با روز صفر اختلاف آماری معناداری وجود ندارد.

بررسی آنالیز واریانس تغییرات درصدکازئین ومحصولات حاصل از پروتئولیز نشان می‌دهد که، دما و پاستوریزاسیون و اثر متقابل این دو عامل (دما×پاستوریزاسیون) بر این دو پارامتر اثر داشته است.

بعد از گرمخانه‌گذاری شیر در دمای ۵، ۱۶و ۲۵ درجه سانتیگراد بخشی از ترکیبات پروتئینی از پیکره میسل کازئین جدا شده، وارد فاز محلول می‌گردد. این ترکیبات بر روی SDS-PAGE در موقعیتی بالاتر از α-لاکتآلبومین ، بین α-لاکتآلبومین و β- لاکتوگلبولین، و در اغلب موارد بین β- لاکتوگلبولین و کاپا کازئین قرار گرفته است. ترکیبات حاصل از پروتئولیز بر روی SDS- PAGE در موقعیت وزن مولکولی های ۲۳۱۰۰، ۲۴۲۰۰و ۲۵۴۰۰ و ۲۶۰۰۰ دالتون ظاهرمی‌شوند. رفتار غیر معمول کازئین و مشتقات آن در صورت پیوند با SDS موجب قرار گیری این ترکیبات در موقعیتی با وزن مولکولی بالاتر می‌گردد (۱۴). در نمونه شیر پاستوریزه نگهداری شده در ۲۵°C و نمونه های شیر غیر پاستوریزه، پارا- کاپا کازئین ظاهر می‌شود. کاپا کازئین یکی از فراکسیون‌های کازئین است که نسبت به پروتئازهای درونی شیر مقاوم بوده اما در برابر پروتئازهای میکروبهای سرما دوست، پروتئولیز می‌شود به دلیل تولید این آنزیم در این تحقیق، پروتئین کاپا کازئین بر روی SDS-PAGE در موقعیتی بین α-لاکتوآلبومین و β- لاکتوگلبولین ظاهر شد. درصد تغییرات هر یک از ترکیبات به صورت منفرد، روند افزایشی و یا کاهشی ثابتی را طی نمی‌کند، زیرا در طول نگهداری شیر، این ترکیبات خود به طور مجدد در معرض پروتئولیز ثانویه قرار می‌گیرند (شکل ۳). تنوع در قرارگیری محصولات حاصل از پروتئولیز بر روی ژل در نمونه‌های مورد بررسی، به دلیل حضور تنوع آنزیم‌های پروتئازی ناشی از سلولهای سوماتیک و پروتئازهای حاصل از سوشهای مختلف میکروارگانیسم‌های سرمادوست است. اما همانطور که در شکل ۳ ملاحظه می‌شود، با افزایش دما، درصد کل این ترکیبات در نمونه پروتئینی افزایش می‌یابد.

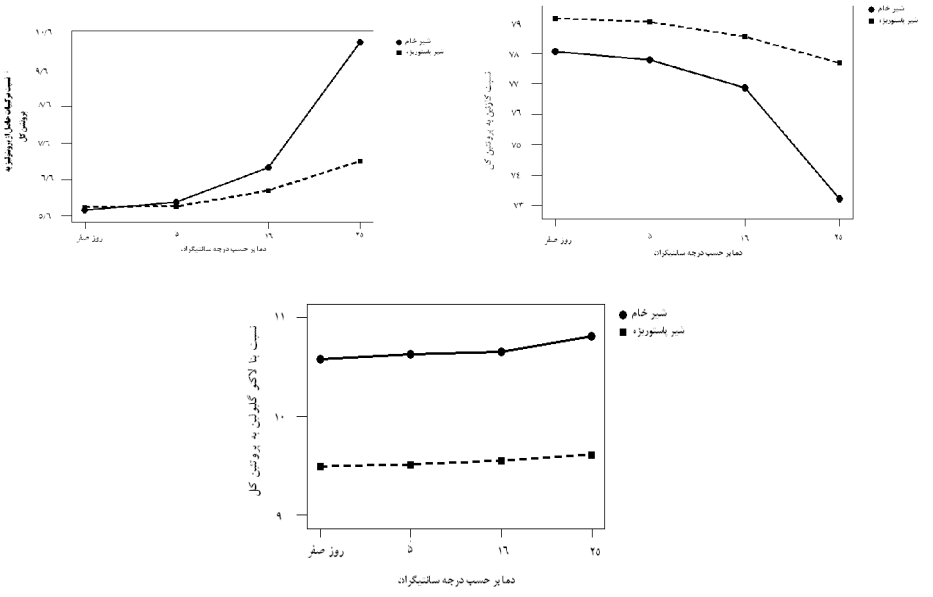


شکل ۳- سدیم دو دسیل سولفات ژل الکتروفورز نمونه‌های شیر پاستوریزه نگهداری شده در دمای۲۵. ۵ و ۱۶ درجه سانتیگراد و نمونه شیرپاستوریزه روز صفر، پروتئین استاندارد (بتاـگالاکتوزیداز (۱۱۶۰۰۰)، سرم آلبومین گاوی (۶۶۲۰۰)، اوالبومین (۴۵۰۰۰)، لاکتات دهیدروژناز(۳۵۰۰۰)، اندونوکلئاز (۲۵۰۰۰)، بتا لاکتوگلوبولین(۱۸۴۰۰)، الفا لاکتالبومین(۱۴۴۰۰))، نمونه شیر خام نگهداری شده در ?δC و شیر خام روز صفر، شیر خام نگهداری شده در ۲۵ و ۱۶ درجه سانتیگراد به ترتیب از سمت راست به چپ.

نمودار کاهش درصد کازئین و افزایش محصولات پروتئولیز طی نگهداری در درجه حرارت‌های مختلف نشان می‌دهد که با افزایش درجه حرارت نگهداری شیر، میزان تولید محصولات پروتئولیز با آهنگ سریعتری افزایش می‌یابد. کلمن و همکاران در سال (۱۹۹۱) نشان دادند که فعالیت پروتئازهای خارج سلولی میکروبی با افزایش دمای نگهداری افزایش می‌یابد (۹). در این تحقیق (مطابق شکل ۴) به طور مشابهی، افزایش درصد محصولات پروتئولیز و کاهش درصد کازئین طی افزایش دمای نگهداری شیرمشاهده شد.

همانطور که در جدول ۲ نشان داده شده است دو فاکتور درصد کازئین و درصد ترکیبات حاصل از پروتئولیز، با ارتباطی منفی (۰/۹۸) به یکدیگر وابسته می‌باشند. این نکته ضمن تفسیر شکل ۴ نشان می‌دهد که ترکیبات فوق، ناشی از هیدرولیز فراکسیون‌های کازئین بوده و عوامل فوق موجب هیدرولیز پروتئین α-لاکتآلبومین و β- لاکتوگلبولین نمی‌گردد.

β- لاکتوگلبولین در مقابل پروتئازها مقاوم بوده و در حین نگهداری شیر تحت تاثیر آن واقع نمی‌شود.



شکل ۴- تغییرات پروتئین های شیر پاستوریزه و خام نگهداری شده در دمای ۵، ۱۶ و ۲۵ درجه سانتیگراد ۴۸ ساعت بعد از تولید

جدول ۲- میزان همبستگی تغییر ترکیبات پروتئینی شیر

		α- لاکتآلبومین	β-لاکتوگلبولین	کازئین	محصولات حاصل از پروتئولیز
α- لاکتآلبومین	وابستگی پیرسون	۱	-۰/۰۱۴	-۰/۰۴۳	-۰/۰۲۱
	تعداد	۱۶	۱۶	۱۶	۱۶
β-لاکتوگلبولین	وابستگی پیرسون	-۰/۰۱۴	۱	-۰/۶۸۴**	۰/۴۴۹
	تعداد	۱۶	۱۶	۱۶	۱۶
کازئین	وابستگی پیرسون	-۰/۰۴۳	-۰/۶۸۴**	۱	-۰/۹۵۶**
	تعداد	۱۶	۱۶	۱۶	۱۶
محصولات حاصل از پروتئولیز	وابستگی پیرسون	-۰/۰۲۱	۰/۴۴۹	-۰/۹۵۶**	۱
	تعداد	۱۶	۱۶	۱۶	۱۶

** وابستگی در سطح p <۰،۰۱ با دو تکرار معنادار است.

و در این تحقیق درحین نگهداری شیر میزان این پروتئین افزایش یافت (شکل ۴). این پدیده ناشی از قرارگیری پروتئوزپپتون ۵ (شامل ۱۰۵-۱ و ۱۰۷-۱ اسید آمینه β- کازئین با وزن مولکولی ۱۲۱۵۸ و ۱۲۴۲۳ دالتون) در موقعیت قرارگیری β- لاکتوگلبولین در ژل SDS-PAGE می‌باشد. پروتئوز پپتون ۵ نیز مانند سایر مشتقات کازئین بر روی این ژل در موقعیتی بیشتر از وزن مولکولی خود قرار می‌گیرد. از اینرو در طی نگهداری شیر در دماهای مختلف به دلیل پروتئولیز کازئین و تولید پروتئوزپپتون ۵ درصدی از ترکیبات پروتئینی ناشی از هیدرولیز، در وزن مولکولی۱۸۰۰۰ دالتون قرار می‌گیرد. به همین دلیل وابستگی این پروتئین با درصد کازئین، وابستگی منفی و محدودی دارد (جدول ۲). درصد α-لاکتآلبومین هیچ تغییر معناداری نشان نداد و جداول تحلیل واریانس حاکی از عدم وجود ارتباط بین این فاکتور با متغیرهای آزمایش دارد. این پروتئین به میزان ۵/۵ درصد در نمونه‌های یاد شده حضور دارد و با تغییر شرایط آزمون این مقدار ثابت بود.

بحث

فلور میکروبی شیر خام سرد شده و سرد نشده با یکدیگر تفاوت عمده‌ای دارد. به طوریکه درشیری که تا ۶-۴ درجه سانتیگراد سرد شده است، رشد باکتریهای لاکتیکی متوقف می‌شود. این عامل باعث می‌گردد تا روند تغییرات pH در شیر خام نگهداری شده در دمای ۲۵°C با سرعت بالایی تغییر نماید، در این تحقیق طی نگهداری شیر در°C ۲۵ به مدت ۲ روز شیر به طور کامل فاسد شد.

با سرد کردن شیر تا دمای°C ۵ میکروارگانیسم‌های سرمادوست فلور غالب شیر را تشکیل می‌دهند (۵). این باکتریها در شیر قادر به تولید آنزیم‌های پروتئولیتیکی هستند با رشد آنها در شیر خام نگهداری شده در سرما به میزان این آنزیمها و در نتیجه فعالیت پروتئولیتیکی حاصل از آن افزوده می‌گردد. این آنزیم‌ها بسته به سوش میکروبی تولید کننده آن، انواع فراکسیون‌های α، β و κ کازئین را مورد تهاجم قرار می‌دهد. در شیر علاوه بر آنزیم پروتئازهای میکروبی خارج سلولی تولید شده توسط میکروارگانیسم‌های سرمادوست، پروتئاز داخلی و پلاسمین ناشی از سلولهای سوماتیک نیز حضور دارند. هر دو نوع این آنزیم‌های پروتئولیتیکی، به حرارت مقاوم بوده و با اعمال فرایند حرارتی مقدار قابل توجهی از فعالیت این آنزیم‌ها باقی می‌ماند (۶، ۹). در این تحقیق علیرغم نابودی میکروارگانیسم‌های سرمادوست دراثرحرارت پاستوریزاسیون (۶۳°C، ۳۰ دقیقه)، شاخص پروتئولیز در شیر پاستوریزه به مرور افزایش یافت. به دلیل تداوم در تولید پروتئازهای میکروبی در شیر خام روند تغییرات ازت غیرکازئینی در شیر پاستوریزه کندتر بود. گزارشات موجود نشان می‌دهند که، مناسب‌ترین درجه حرارت فعالیت آنزیم‌های پروتئازی موجود در شیر ۳۷°C است (۶، ۹). لذا در این مطالعه افزایش درجه حرارت نگهداری شیر پاستوریزه موجب تشدید فعالیت پروتئولیتیکی و افزایش شاخص پروتئولیزشد. در شیر پاستوریزه نگهداری شده در ۲۵ درجه سانتیگراد بیشترین درصد محصولات هیدرولیز کازئین بر روی SDS-PAGE مشاهده شد. شکسته شدن کازئین به فراکسیونهای کوچک محلول در آب و افزایش محصولات هیدرولیز ناشی از فعالیت پروتئولیتیکی شیر موجب کاهش کیفیت محصولات حاصل از آن می‌شوند. از آنجائی که در طی پاستوریزاسیون، غیرفعال‌سازی آنزیم‌های پروتئولیتیکی موجود در شیر به وقوع نمی‌پیوندد، اعمال اقداماتی در جهت کاهش حضور آنزیم‌های پروتئولیتیکی در شیر، اعمال فرایند حرارتی و سپس نگهداری شیر در دمای پائین به منظور نابودی هر چه سریع‌تر میکروارگانیسم‌های سرمادوست تولید کننده پروتئازهای مقاوم به حرارت توصیه می‌گردد.

سپاسگزاری

از پایلوت پژوهشی شرکت صنایع شیر ایران به منظور تأمین امکانات اجرایی آزمایشات سپاسگزاری می‌شود.

REFERENCES

1. Adams, D. M., J. T. Barach, & M. L. Speck. 1976. Heat resistant proteases produced in milk by psychrotrophic bacteria of dairy origin, J Dairy Sci , Vol.58 , No 6, pp 828- 834.
2. Andrews, A. 1983. Proteinase in bovine milk and action on casein, J. Dairy Research, Vol. 50, pp 45-55.
3. AOAC, "Official methods of analysis" .17th ed. Association of Official Analytic.
4. Creamer, L., & T. Richardson. 1984. Anomalous behavior of bovine αs1- and β-casein on gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate buffers. Arch. Biochem. Biophys. Vol. 234, pp 476-481.
5. Fajardo-Lira, C., M. Oria, K. D. Hayes, & S. S. Nielsen. 2000. Effeact of psychrotrophic bacteria and of an isolated protease from Pseudomonase Fluorescencs m3/6 on the plasmin system of fresh milk, J. Dairy Sci., Vol. 83, No 10, pp. 2190-2199.
6. Fox, P. F,. & P. L. H. McSweeney. 2003. Advanced Dairy Chemostry_1 Proteins 3rd Edition" , Part A, Kluwer Academic.
7. Garcia-Risco, M. R., L. Recio, E. Molina, & R. Lopez-Fandino. 2003. Plasmin activity in pressurized milk, J. Dairy Sci., Vol.86, No 3, pp 728-734.

8. Guamis, B., T. Huerta, & E. Gary. 1987. SDS-PAGE of milk proteolysis by selected psychrotrophs from raw milk , Milchwissenschaft, Vol. 42, No 2, pp. 89-91.
9. Kohlman, K. L., S. S. Nielsen, L. R. Steenson, & M. R. Ladisch. 1991. Production of proteases by psychrotrophic microorganisms, J. Dairy Sci., Vol. 74, No 10, pp. 3275-3283.
10. Ma, Y., C. Ryan, D. M. Barbano, D. M. Galton, M. A. Rudan, & K. Boor. 2000. Effect of somatic cell count on quality and shelf life of pasteurized fluid milk, J. Dairy Sci., Vol. 83, No 2, pp 264-274.
11. Mitchell, S. L., & R. T. Marshall. 1989. Properties of heat stable proteases of pseudomonas flurescans: Characterization and hydrolysis of milk protein, J. Dairy Sci, Vol. 72, No 4, pp. 864-874.
12. O-Farrell, I. P., J. J. Sheehan, M. G. Wilkinsin, D. Harrington, & A.L. Kelly. 2002, Influence of addition of plasmin or mastitic milk to cheesemilking on quality of smear- ripened cheese, Lait, Vol. 82, pp 305-316.
13. Santos, M. V., Y. Ma, & D. M. Barbano. 2003. Effect of somatic cell count on proteolysis and lipolysis in pasteurized fliud milk during shelf life storage, J. Dairy Sci. Vol. 86, No 8, pp 2491-2503.
14.Verdi, R. J., D. M. Barbano, M. E. Dellavalle, & G. F. Senyk. 1987. Variability in true protein casein, nonprotein nitrogen, and proteolysis in high and low somatic cell milks, J. Dairy Sci, Vol. 70, No 2, pp 230-242

This document was created with Win2PDF available at http://www.daneprairie.com.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.