تاثیر آنزیم ترانس گلوتامیناز بر زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس کازئی*، ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی و حسی ماست همزده بدون چربی

ساینا مویدزاده[۱]، اصغر خسرو شاهی اصل[۲*] و شهین زمردی[۳]

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۲/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۱/٤/۲۷

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه

[۲] استاد گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه

[۳] استادیار بخش فنی و مهندسی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان غربی

[*]مسئول مکاتبه: Email: a.khosrowshahi@gmail.com

چکیده

تاثیر غلظت ترانس گلوتامیناز میکروبی، میزان کازئینات سدیم و زمان نگهداری بر زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس کازئی* در ماست همزده بدون چربی و ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی و حسی آن با استفاده از روش سطح پاسخ بررسی گردید. غلظت آنزیم در محدوده ۲-۰ واحد در گرم پروتئین شیر، میزان کازئینات سدیم در دامنه ۱/۲۷-۰ درصد و زمان نگهداری بین ۱۹-۱ روز بود. نتایج تجزیه آماری داده‌ها نشان داد که با افزایش غلظت آنزیم زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* به طور معنی‌داری افزایش و درصد سینرسیس کاهش یافت ($P<0/05$). با افزودن کازئینات سدیم نیز، اسیدیته و رطوبت نمونه‌ها افزایش پیدا کرد. همچنین در طی زمان نگهداری، pH و رطوبت کاهش و اسیدیته نمونه‌ها افزایش معنی‌داری نشان داد ($P<0/05$). با توجه به نتایج ارزیابی حسی امتیاز رنگ با افزایش میزان کازئینات سدیم بطور معنی‌داری کاهش و امتیاز عطر و طعم با افزایش غلظت آنزیم افزایش یافت. غلظت آنزیم ۱/٤۱ واحد در گرم پروتئین شیر، میزان کازئینات سدیم ۰/۳۱ درصد و زمان نگهداری ۱۵ روز به عنوان شرایط بهینه تعیین گردید. در این شرایط تعداد *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* به ترتیب ۸/۳۳ و ۸/۳۵ سیکل لگاریتمی، درصد سینرسیس ٦/۷۲ درصد و امتیاز قوام و پذیرش کلی به ترتیب ۳/۳۷ و ۳/۸۷ از ۵ بود.

واژه‌های کلیدی: آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی، کازئینات سدیم، پروبیوتیک، ماست همزده بدون چربی

Effects of transglutaminase treatment on *Lactobacillus casei* viability, physicochemical and sensory properties of nonfat stirred yoghurt

S Moayedzadeh[1], A Khosrowshahi Asl[2*] and Sh Zomorodi[3]

Received: February 29, 2012 Accepted: July 17, 2012
[1] MSc Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Urmia, Iran
[2] Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Urmia, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Engineering, Agricultural Research Center, West Azarbijan, Urmia, Iran
*Corresponding author: E-mail: a.khosrowshahi@gmail.com

Abstract
The effect of microbial transglutaminase concentration, amount of sodium caseinate incorporation and storage time on *Lactobacillus casei* viability in nonfat stirred yoghurt and it`s physicochemical and sensory properties were investigated using response surface method (RSM). Enzyme concentration, amount of sodium caseinate and storage time were in the range of 0-2 Unit per gram of milk protein, 0-1.27 percent and 1-19 days, respectively. The statistical analysis of results showed that increase in enzyme concentration increased the viability of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus bulgaricus* viability significantly ($P<0.05$) and decreased the syneresis. Addition of sodium caseinate caused an increase in acidity and moisture content of samples. As well, during the storage time, pH and moisture content were decreased and acidity was significantly increased ($P<0.05$). According to sensory evaluation results, the higher the sodium caseinate content, the lower was the color score of treatments. As the concentration of transglutaminase increased, flavor scores for yogurt samples increased. The optimum conditions for the production of yogurt was obtained using 1.41 Unit enzyme per gram of milk protein, 0.13 percent sodium caseinate with a storage period of 15 days. Under these conditions the predicted *Lactobacillus casei and Lactobacillus bulgaricus* counts were 8.33 and 8.35 logarithmic cycle respectively, the percentage of syneresis was 6.72, color and overall acceptability rate were 3.37 and 3.87 out of 5, respectively.

Keywords: Microbial transglutaminase enzyme, Sodium caseinate, Probiotic, Nonfat stirred yoghurt

مقدمه

در سال‌های اخیر مصرف مواد غذایی فراسودمند، از جمله غذاهای حاوی پروبیوتیک، بسیار مورد توجه قرار گرفته است (مارتین و همکاران ۲۰۰۳). پروبیوتیک‌ها دارای ویژگی‌های سلامت‌بخشی هستند و مصرف آنها روشی برای بازسازی و اصلاح میکروفلور روده می‌باشد (لورنس و ویلژوئن ۲۰۰۱). از جمله اثرات سلامت‌بخش پروبیوتیک‌ها می‌توان به بهبود عارضه عدم تحمل لاکتوز، کاهش عوارض جانبی آنتی‌بیوتیک‌ها، جلوگیری از عفونت روده با تولید اسیدهای آلی و عوامل آنتی‌باکتریال، پیشگیری و درمان سرطان، تقویت سیستم ایمنی بدن و کاهش کلسترول اشاره کرد (آریانا و مک گرو ۲۰۰۷). کارایی باکتری‌های پروبیوتیک به مقدار و قابلیت زنده‌ماندن آنها بستگی دارد که باید در طول نگهداری و ماندگاری محصول در محیط روده حفظ شود (کایلاساپاتی و همکاران ۲۰۰۶). برای تأمین سلامتی، لازم است که تعداد باکتری‌های پروبیوتیک زنده در ماده غذایی دست کم 10^{7}–10^{6} واحد سازنده کلنی در

گرم یا در میلی‌لیتر باشد (کرمن و راسیک ۱۹۹۱؛ لورنس و ویلژوئن ۲۰۰۱).

در دو دهه اخیر تمایل به مصرف محصولات لبنی کم چرب یا بدون چربی، مخصوصا ماست بدون چربی، به دلیل تاثیرات سوء ناشی از چربی اضافی بر سلامتی انسان، به‌طور چشم‌گیری افزایش یافته است. مصرف کنندگان محصولات کم‌چربی را با کیفیت مشابه با محصولات پرچرب می‌طلبند (یونال و همکاران ۲۰۰٤). افزایش میزان کل مواد جامد بدون چربی شیر و یا افزودن صمغ‌های طبیعی یا سنتتیک به عنوان پایدار کننده به شیر، روش‌های معمول و متعارفی هستند که جهت بهبود بافت ماست کم‌چرب به کارگرفته شده‌اند. مقادیر مورد نیاز از این افزودنی‌ها برای رسیدن به میزان مواد جامد مشابه با ماست پرچرب، می‌تواند موجب بروز طعم نامطلوب، تولید بیش از حد اسید در طول دوره نگهداری و ایجاد بافت شنی در ماست شود (اوزر و همکاران ۲۰۰۷). لذا بررسی روش‌های جایگزین جهت دستیابی به بافت مطلوب در ماست کم‌چرب در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه واقع شده است.

برقراری پیوندهای عرضی بین پروتئین‌ها در شیر، به عنوان یک روش کاربردی برای رسیدن به بافت مطلوب در ماست پیشنهاد شده است (اوزر و همکاران ۲۰۰۷). آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی (EC 2.3.3.13)، جزء آنزیم‌های ترانسفراز می‌باشد که واکنش انتقال آسیل را بین گاما-کربوکسیل گلوتامین و آمین‌های نوع اول از جمله گروه اپسیلون-آمین لیزین را کاتالیز می‌کند، در نهایت این عمل به تشکیل پیوندهای عرضی جدید درون مولکولی و بین مولکولی منتهی می‌شود (موتوکی و سگورو ۱۹۹۹). چنین پیوندهایی می‌توانند ساختار و عملکرد پروتئین‌ها را تغییر دهند (اوزر و همکاران ۲۰۰۷). اتصال عرضی پروتئین‌های شیر توسط ترانس گلوتامیناز میکروبی ویژگی‌های کارکردی مثل توانایی هیدراسیون، ویژگی‌های رئولوژیکی و امولسیفیکاسیون را بهبود می‌بخشد (شانلی و همکاران ۲۰۱۱). همچنین این شبکه پروتئینی متفاوت ممکن است رشد و زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها را تحت تاثیر قرار دهد (نیو و همکاران ۲۰۰۱؛ فارنس‌ورت و همکاران ۲۰۰٦). pH بهینه فعالیت آنزیم بین ٦ تا ۷ و دمای بهینه آن ۵۰ درجه سانتی‌گراد گزارش شده است (جاروس و همکاران ۲۰۰٦). ترانس گلوتامیناز میکروبی آنزیمی است که علاوه بر افت pH در طول تخمیر، غنی-سازی پروتئین و تیمار حرارتی شیر ماست سازی نیز بر واکنش آن موثر است (بونیش و همکاران ۲۰۰۷a). معمولا برای غنی‌سازی پروتئین شیر ماست سازی به منظور به دست آوردن ماستی با ساختار مطلوب، ویسکوز و ملایم از ترکیباتی مانند پودر شیر خشک بدون چربی، کنسانتره پروتئین‌های آب پنیر و کازئینات سدیم استفاده می‌شود (بونیش و همکاران ۲۰۰۷b). در میان پروتئین‌های شیر، کازئین به خصوص کازئینات سدیم بهترین سوبسترا برای ترانس گلوتامیناز میکروبی است (کورت و روگرس ۱۹۸٤؛ بونیش و همکاران ۲۰۰٦) در حالی که پروتئین‌های سرمی مگر آنکه دناتوره شوند، سوبسترای ضعیفی هستند (شارما و همکاران ۲۰۰۱). توانایی اتصال عرضی پروتئین‌های شیر عمدتاً به ساختار مولکولی آنها وابسته است (شانلی و همکاران ۲۰۱۱). ترانس گلوتامیناز تولید فراورده‌های لبنی مانند بستنی، پنیر و ماست با مقدار چربی یا ماده جامد غیرچرب کاهش یافته را ممکن می‌سازد (موتوکی و سگورو ۱۹۹۸). شانلی و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که آنزیم ترانس گلوتامیناز باعث افزایش سفتی بافت و کاهش سینرزیس ماست قالبی می‌شود. فارنس‌ورت و همکاران (۲۰۰٦) تأثیر ترانس گلوتامیناز را بر زنده‌مانی پروبیوتیک در ماست تهیه شده از شیر بز بررسی کردند و نشان دادند که درهم تنیدن آنزیمی پروتئین‌ها نقش مثبتی در زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها دارند. کوریشی و همکاران (۲۰۰۱) گزارش کردند که سفتی ژل ماست قالبی و ویسکوزیته ماست همزده تیمار شده با ترانس گلوتامیناز از لحاظ حسی مقبولیت بالایی داشت. ترانس

گلوتامیناز با بهبود ویژگی‌های نگهداری آب، باعث افزایش ویسکوزیته و بهبودی سفتی ژل شده است. گاچ و همکاران (۲۰۰۹) اثر ترانس گلوتامیناز را بر ویژگی‌های فیزیکی ماست تهیه شده از مخلوط شیر و آب پنیر ارزیابی کردند و نتیجه گرفتند که با تیمار آنزیمی قوام ماست افزایش یافت.

نظر بر اینکه اکثر تحقیقات در خصوص تاثیر آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی بر روی ماست قالبی صورت گرفته است اما تحقیقات کمتری در مورد تاثیر این آنزیم در ماست همزده انجام شده است، لذا در این تحقیق هدف بررسی اثر ترانس گلوتامیناز میکروبی و کازئینات سدیم بر زنده مانی *لاکتوباسیلوس کازئی* و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و حسی ماست همزده بدون چربی بوده است.

مواد و روش‌ها

مواد

شیر ۰/۳ درصد چربی (شرکت شیر پاستوریزه آذربایجان‌غربی، پگاه)، شیر خشک بدون چربی (شرکت راماک، ایران)، کازئینات سدیم (شرکت کازئینات ایران، ایران)، آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی (ACTIVA YG) از استرپتوورتیسیلیوم[1] با میانگین فعالیت ۸۰ واحد در گرم (شرکت آجینوموتو[2] فرانسه) که ترکیب آنزیم شامل ترانس گلوتامیناز (۱ درصد)، لاکتوز، عصاره مخمر، مالتو دکسترین و روغن گیاهی می‌باشد. استارتر تجاری ماست YC-X11 (کشت مخلوط *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و *لاکتوباسیلوس* دلبروکی زیر گونه *بولگاریکوس*، شرکت کریستین هانسن دانمارک)، باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* (LAFTI-L26، شرکت DSM استرالیا)، محیط کشت MRS و M17 آگار (شرکت مرک آلمان) و ونکومایسین هیدروکلراید (شرکت سیگما آلدریچ استرالیا). در جدول ۱ ویژگی‌های شیمیایی شیر خام، شیر خشک بدون چربی و کازئینات سدیم مصرفی آورده شده است.

روش‌ها

طرح آزمایشی و تیمارهای آماری

در این تحقیق، از روش سطح پاسخ[3] و از طرح مرکب مرکز وجه[4] استفاده شد. متغیرهای مستقل شامل غلظت آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی، غلظت کازئینات سدیم و زمان نگهداری در ۳ سطح بود. نمایش طراحی آزمون‌ها در جدول ۲ آمده است. تعداد نمونه‌های آزمایشی ۲۰ عدد بود که در این میان ۵ آزمون تکرار در نقطه مرکزی بود که از این نقاط برای تعیین خطای آزمایش استفاده شد. داده‌ها توسط نرم افزار SAS مدلسازی شد. آنالیز رگرسیون با مدل درجه دوم زیر انجام گرفت:

$$Y = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 + \beta_{11}X_{21} + \beta_{22}X_{22} + \beta_{33}X_{23} + \beta_{12}X_1X_2 + \beta_{13}X_1X_3 + \beta_{23}X_2X_3$$

در این فرمول Y پاسخ پیش‌بینی شده، β_0 ضریب ثابت، β_1، β_2 و β_3 اثرات خطی، β_{11}، β_{22} و β_{33} اثر مربعات و β_{12} ، β_{13} و β_{23} اثر متقابل می‌باشد.

تهیه ماست

ابتدا ماده خشک شیر با استفاده از ۲ درصد شیر خشک تنظیم شد و طبق جدول ۲ کازئینات سدیم اضافه گردید. پس از رساندن دمای شیر به ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی اضافه شد (طبق جدول ۲) و بمنظور بهینه‌سازی فعالیت آنزیم بمدت یکساعت در ۵۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس شیر در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه پاستوریزه شد. در طی عمل پاستوزیراسیون، آنزیم نیز غیرفعال گردید. آنگاه شیر تا دمای ۴۵ ^{o}C سرد و استارتر ماست و *لاکتوباسیلوس کازئی* (مطابق دستورالعمل تولید کننده) اضافه شد و در دمای ۴۲ ^{o}C تا

1. *Streptoverticillium*
2. Ajinomoto
3. Response Surface Methodology (RSM)
4. Central Composite Face (CCF)

رسیدن به pH ٤/٦ گرمخانه‌گذاری گردید. پس از سرد شدن تا دمای ^{o}C ۱۰ ، نمونه‌های ماست به مدت ٦۰ ثانیه هم زده شد و در لیوان پلاستیکی استریل پر و درب‌بندی گردید. پس از درب‌بندی تا دمای ^{o}C ٤ سرد و در یخچال نگهداری شد.

آزمایش‌ها

شمارش میکروبی

برای تهیه رقت ۰/۱، مقدار ٥ گرم از نمونه ماست به ٤٥ میلی‌لیتر آب پپتون ۰/۱ درصد استریل افزوده شد. سری بعدی رقت‌ها با افزایش یک میلی‌لیتر از هر رقت به ۹ میلی‌لیتر آب پپتون ۰/۱ درصد استریل تهیه گردید. برای شمارش *لاکتوباسیلوس کازئی* از محیط کشت MRS حاوی ونکومایسین استفاده شد. برای این منظور ۲ میلی‌لیتر از محلول ۰/۰٥ درصد ونکومایسین استریل شده توسط فیلتر سر سرنگی، به یک لیتر از محیط فوق قبل از ریختن در پلیت‌ها اضافه گردید. *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* در محیط MRS آگار که pH آن با استفاده از اسید کلریدریک یک نرمال به ٥/۲ تنظیم شده بود و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* در محیط M17 آگار به روش پورپلیت کشت داده شدند. *لاکتوباسیلوس کازئی* و *بولگاریکوس* در شرایط بی‌هوازی توسط گاز پک و استرپتوکوکوس ترموفیلوس تحت شرایط هوازی به مدت ۷۲ ساعت در دمای ^{o}C ۳۷ گرمخانه‌گذاری شدند. پلیت‌های حاوی ۳۰-۳۰۰ کلنی شمارش گردید (دیو و شاه ۱۹۹٦؛ تارماراج و شاه ۲۰۰۳ ؛ اوزر و همکاران ۲۰۰۷).

آزمایش‌های فیزیکی شیمیایی

تعیین pH با استفاده از pH متر (متروم ساخت سوئیس)، اسیدیته از طریق تیتراسیون با سود ۰/۱ نرمال در حضور فنل فتالئین و رطوبت از طریق خشک کردن در آون (ممرت ساخت آلمان) با دمای ^{o}C ۲±۱۰۳ انجام شد (AOAC ۱۹۹۷). برای تعیین سینرسیس نیز مقدار ۳۰ گرم از نمونه ماست در لوله‌های سانتریفیوژ توزین شد و در سانتریفیوژ یخچال دار (هتیچ یونیورسال آر۳۲۰) با دور ۲۲۲g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ^{o}C ٤ سانتریفیوژ گردید. سرم جدا شده از نمونه، توزین گردید و درصد سینرسیس محاسبه شد (کئوگ و کندی ۱۹۹۸).

ارزیابی حسی

رنگ، قوام، عطر و طعم و پذیرش کلی نمونه‌های ماست توسط گروه ارزیاب حسی با استفاده از آزمایش تمایل مصرف کننده و روش هدونیک ٥ نقطه‌ای تعیین شد. تعداد ۲٥ داور از اساتید، کارکنان و دانشجویان گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه ارومیه و اعضا هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان غربی با استفاده از آزمایش تشخیص درجه یا سطح کیفیت انتخاب شدند. از هر تیمار تعداد ۲٥ نمونه یکسان تهیه و همراه با فرم مخصوص به داوران داده شد تا با توجه به ذائقه خود فرم‌ها را تکمیل کنند. برای این منظور امتیاز ٥ برای کیفیت مطلوب و امتیاز ۱ برای کیفیت نامطلوب اختصاص داده شد. داوران برای شستشوی دهان خود بین نمونه‌ها از آب استفاده کردند.

جدول ۱- ویژگی‌های شیمیایی شیر خام، شیر خشک بدون چربی و کازئینات سدیم مصرفی (برحسب درصد)

مورد	چربی	پروتئین	ماده خشک	اسیدیته	pH	خاکستر
شیر خام	۰/۳±۰/۱٥	۳/۲±۰/۰٥	۸/٥۸±۰/۲۷	۰/۱٤٥±۰/۰٦	٦/۸±۰/۰۳	-
شیر خشک	۱/۲٥±۰/۱۷	۲۸±۱/۰٤	۹٦±۱/۲۰	-	-	-
کازئینات سدیم	۲±۰/٤	۷۸/۹٥±۰/۷	۹۷/۳٥±۱/۱	-	۷±۰/٥	۷/٥±۰/۲۹

نتایج آنالیز شیرخام با استفاده از دستگاه میلکوتستر شرکت پگاه ارومیه

جدول ۲- طراحی آزمون‌ها براساس مدل طرح مرکب مرکز وجه (CCF) با سه متغیر (آنزیم، کازئینات سدیم و زمان)

Run	آنزیم	کازئینات سدیم	زمان نگهداری	آنزیم (واحد در گرم پروتئین شیر)	کازئینات سدیم (درصد)	زمان نگهداری (روز)
۱	-۱	-۱	-۱	۰	۰	۱
۲	-۱	-۱	۱	۰	۰	۱۹
۳	-۱	۱	-۱	۰	۱/۲۷	۱
٤	-۱	۱	۱	۰	۱/۲۷	۱۹
٥	۱	-۱	-۱	۲	۰	۱
٦	۱	-۱	۱	۲	۰	۱۹
۷	۱	۱	-۱	۲	۱/۲۷	۱
۸	۱	۱	۱	۲	۱/۲۷	۱۹
۹	-۱	۰	۰	۰	۰/٦۳٥	۱۰
۱۰	۱	۰	۰	۲	۰/٦۳٥	۱۰
۱۱	۰	-۱	۰	۱	۰	۱۰
۱۲	۰	۱	۰	۱	۱/۲۷	۱۰
۱۳	۰	۰	-۱	۱	۰/٦۳٥	۱
۱٤	۰	۰	۱	۱	۰/٦۳٥	۱۹
۱٥	۰	۰	۰	۱	۰/٦۳٥	۱۰
۱٦	۰	۰	۰	۱	۰/٦۳٥	۱۰
۱۷	۰	۰	۰	۱	۰/٦۳٥	۱۰
۱۸	۰	۰	۰	۱	۰/٦۳٥	۱۰
۱۹	۰	۰	۰	۱	۰/٦۳٥	۱۰
۲۰	۰	۰	۰	۱	۰/٦۳٥	۱۰

نتایج و بحث

نتایج تجزیه آماری داده‌ها در جدول ۳ آورده شده است.

شمارش میکروبی

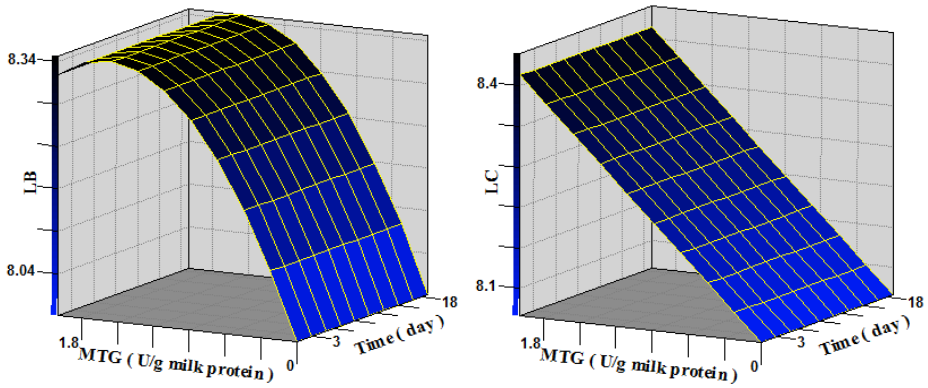
تاثیر مقادیر مختلف مقدار آنزیم ترانس گلوتامیناز، کازئینات سدیم و زمان نگهداری بر زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس کازئی*، *لاکتوباسیلوس* بولگاریکوس و *استرپتو* کوکوس *ترموفیلوس* در طی ۱۹ روز نگهداری مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت آنزیم، قابلیت ماندگاری *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* به ترتیب در حدود ۰/۸ و ۰/۵ سیکل لگاریتمی افزایش یافت (شکل ۱). آنزیم ترانس گلوتامیناز با درهم تنیدن پروتئین های شیر باعث ایجاد پیوندهای کوالان جدید می‌شود در حالی که عمدتا در ماست، ژل با اتصالات عرضی غیرکوالانی (برهمکنش هیدرواستاتیک، پیوندهای هیدروژنی و هیدروفوبی) پایدار می‌شود (نیو و همکاران ۲۰۰۱؛ فارنس‌ورت و همکاران ۲۰۰٦). بنابراین، این شبکه پروتئینی متفاوت موجب تقویت زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* شده است. اسکورش و همکاران (۲۰۰۰) نیز اظهار داشتند که ژل‌های حاصل از میسل‌های کازئینی تیمار شده با آنزیم با پیوندهای کوالانی اتصالات عرضی برقرار می‌کنند که قوی‌تر از

ژل‌های حاصل از اسیدیفیکاسیون می‌باشند. بونیش و همکاران (۲۰۰۷b) به این نتیجه رسیدند که عصاره مخمر موجود در ترکیب آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی که حاوی مقدار قابل توجهی گلوتاتیون می‌باشد، موجب بهبود رشد و زنده‌مانی باکتری‌های اسید لاکتیک می‌شود. عامل کاهنده گلوتاتیون ایزوپپتیدی متشکل از سیستئین، گلایسین و گلوتامیک اسید می‌باشد که به طور گسترده‌ای در حیوانات، گیاهان و میکرواورگانیسم‌ها موجود است (بونیش و همکاران ۲۰۰۷c) و نقش مهمی در حفاظت سلول‌ها در برابر اکسیداسیون، حفظ آنزیم‌ها و سایر اجزای سلولی دارد (بونیش و همکاران ۲۰۰۷c). محققان دریافتند که با افزودن گلوتاتیون به شیر خام پیش تیمار شده با آنزیم ترانس گلوتامیناز، ترکیبات با وزن مولکولی بالا افزایش می‌یابد و بیان کردند که به ویژه کاپاکازئین در سطح میسل نسبت به افزودن گلوتاتیون واکنش بالایی نشان می‌دهد. گلوتاتیون با افزایش دسترسی به ساختار میسل موجب بهبود برقراری اتصالات عرضی توسط ترانس گلوتامیناز در شیر حرارت ندیده می‌شود (میوا و همکاران ۲۰۰۲). لذا ممکن است گلوتاتیون به صورت خالص و یا به صورت عصاره مخمر حاوی گلوتاتیون، مورد استفاده قرار گیرد. باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* در طول مدت نگهداری ماست تغییرات معنی‌داری نداشت و مقدار آن بیش از میزان پیشنهادی مورد نیاز برای تامین سلامتی بود، که این امر پایداری باکتری‌ها را در ماست پروبیوتیکی تیمار شده با آنزیم نشان می‌دهد. فارنس-ورت و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند که تعداد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس کازئی* و *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* در نمونه‌های ماست پروبیوتیک تیمار شده با ترانس گلوتامیناز در طول ۸ هفته نگهداری در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد ثابت باقی مانده است. که تاییدی بر نتایج این بررسی است.

در جدول آنالیز واریانس عدم برازش (Lack of Fit) بالاتر از ۰/۰۵ نشان دهنده درستی مدل است. R^2 (ضریب تبیین) و R^2_{adj} (ضریب تبیین اصلاح شده) بالاتر از ۷۰ درصد نشان دهنده این است که داده‌های آزمایش با مدل به خوبی تطبیق داشته و مدل دارای اهمیت بالایی است (مونتگومری ۲۰۰۵). معادله‌های پیش گویی کننده زیر، به ترتیب برای مقدار *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* در نمونه‌های ماست با استفاده از برازش داده‌ها به دست آمد:

$LC=8.0596+0.19421MTG$

$LB=7.9807+0.5063MTG- 0.1745MTG^2$



شکل۱-تاثیر غلظت آنزیم بر تغییرات لاکتوباسیلوس کازئی (LC) و لاکتوباسیلوس بولگاریکوس (LB) در طول نگهداری ماست

جدول۳- تجزیه واریانس خواص میکروبی و فیزیکی شیمیایی نمونه‌های ماست

منابع متغیر	درجه آزادی	میانگین مربعات						
		LC (log cfu/g)	LB (log cfu/g)	St (log cfu/g)	رطوبت (٪)	pH	اسیدیته (٪)	سینرزیس (٪)
غلظت آنزیم (A)	۱	۰/۳۷۷۲**	۰/۲۴۷۲**	۰/۰۳۸۹ ns	۰/۰۰۰۷ ns	۰/۰۰۰۶ ns	۰/۰۰۰۷ ns	۵۰۴/۹۱**
کازئینات سدیم (B)	۱	۰/۰۶۱۰ ns	۰/۰۳۵۰ ns	۰/۰۱۲۴ ns	۲/۴۵۴۲**	۰/۰۰۱ ns	۰/۰۴۴۷**	۰/۰۱۱۶ ns
زمان نگهداری (C)	۱	۰/۰۲۹۴ ns	۰/۰۳۷۴ ns	۰/۰۱۹۴ ns	۰/۱۵۹۶**	۰/۲۵۶**	۰/۰۰۴۸*	۰/۵۹۰۰ ns
A^2	۱	۰/۰۲۳۴ ns	۰/۱۰۵۷*	۰/۰۰۰۹ ns	۰/۰۰۷۲ ns	۰/۰۰۱۲ ns	۰/۰۰۲۷ ns	۵۱/۹۰**
AB	۱	۰/۰۰۳۶ ns	۰/۰۳۹۶ ns	۰/۰۰۴۶ ns	۰/۰۰۷۰ ns	۰/۰۰۰۱ ns	۰/۰۰۰۱ ns	۲/۱۲۹۵ ns
AC	۱	۰/۰۳۰۱ ns	۰/۰۱۸۹ ns	۰/۰۰۲۵ ns	۰/۰۰۵۲ ns	۰/۰۰۲۱ ns	۰/۰۰۰۸ ns	۹/۰۷۶۱*
B^2	۱	۰/۰۶۴۵ ns	۰/۰۱۷۹ ns	۰/۰۰۰۱ ns	۰/۰۲۵۸*	۰/۰۰۸۶ ns	۰/۰۰۶۳*	۰/۳۹۳۱ ns
BC	۱	۰/۰۷۰۳ ns	۰/۰۳۵۱ ns	۰/۰۱۵۲ ns	۰/۰۰۰۳ ns	۰/۰۰۰۱ ns	۰/۰۰۰۱ ns	۰/۰۰۷۴ ns
C^2	۱	۰/۰۶۳۱ ns	۰/۰۳۷۴ ns	۰/۰۰۳۷ ns	۰/۰۲۴۵*	۰/۰۴۳۷**	۰/۰۱۱۸**	۱۱/۱۶۷**
مدل	۹	۰/۰۷۸۴**	۰/۰۶۷۵**	۰/۰۱۱۹ ns	۰/۳۰۳۱**	۰/۰۴۷۰**	۰/۰۰۸۱**	۶۴/۹۸۵۱**
خطی	۳	۰/۱۵۵۹**	۰/۱۰۶۵**	۰/۰۲۳۶ ns	۰/۸۷۱۵**	۰/۰۸۵۸**	۰/۰۱۶۷**	۱۶۸/۵۰۳**
درجه دوم	۳	۰/۰۴۴۸ ns	۰/۰۶۴۷*	۰/۰۰۴۹ ns	۰/۰۳۳۶**	۰/۰۵۴۴**	۰/۰۰۷۴**	۲۲/۷۱۴۲**
خطا	۱۰	۰/۰۱۵۱	۰/۰۱۰۹	۰/۰۱۱۱	۰/۰۰۴۹	۰/۰۰۳۰	۰/۰۰۰۳	۱/۰۰۷۹
عدم برازش	۵	۰/۰۱۹۵ ns	۰/۰۱۵۲ ns	۰/۰۱۱۱ ns	۰/۰۰۳۱ ns	۰/۰۰۳۱ ns	۰/۰۰۰۷ ns	۰/۱۸۹۲ ns
Pure Error	۵	۰/۰۱۰۷	۰/۰۰۶۶	۰/۰۱۱۲	۰/۰۰۶۷	۰/۰۰۲۸	۰/۰۰۰۶	۱/۸۲۶۷
R^2	–	٪۸۲/۳۸	٪۸۴/۷۵	٪۴۹/۱۷	٪۹۸/۲۳	٪۹۳/۴۳	٪۹۱/۸۶	٪۹۸/۳۱
R^2_{adj}	–	٪۷۶/۵۳	٪۷۱/۰۲	٪۳/۴۲	٪۹۶/۶۴	٪۸۷/۵۱	٪۸۴/۵۳	٪۹۶/۷۸
ضریب پراکندگی	–	۱/۴۸۸۸	۱/۲۷۱۳	۱/۱۴۰۳	۰/۶۷۶۵	۱/۲۴۳۸	۲/۶۶۳۲	۹/۶۹۸۳

*معنی‌دار در سطح ۰/۰۵، ** معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ و ns غیر معنی‌دار

خواص فیزیکی شیمیایی

بر اساس نتایج تجزیه واریانس، تاثیر خطی و مربعی مقدار کازئینات سدیم و زمان نگهداری بر درصد رطوبت و اسیدیته و تاثیر خطی و مربعی زمان نگهداری بر pH معنی‌دار بود ($P<0/05$). افزایش میزان کازئینات سدیم، موجب افزایش درصد رطوبت در نمونه‌ها گردید (شکل ۲-الف). در حقیقت پروتئین افزوده شده باعث تشدید ظرفیت باند کردن آب در ماتریکس شده که در نتیجه آن میزان رطوبت نمونه‌ها افزایش یافته است (ولیکاکیس و همکاران ۲۰۰۴). همچنین میزان رطوبت نمونه‌ها با گذشت زمان کاهش یافت (شکل ۲-الف). نتایج یازیجی و همکاران (۲۰۰۴) نیز نشان داد که در طول زمان نگهداری رطوبت نمونه‌های ماست چکیده کاهش یافت که نتایج این بررسی را تایید می‌کند. با افزایش میزان کازئینات سدیم، اسیدیته نمونه‌های ماست بطور معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۲-ب). افزایش مقدار کازئینات سدیم از طریق افزایش میزان پروتئین‌های شیر و ظرفیت بافری مخلوط، تاثیر مطلوب بر رشد استارترهای ماست و تولید اسید به وسیله آنها داشته است اما از تغییرات pH جلوگیری کرده است که نتایج این بررسی نیز موید آن است (آماتایاکول و همکاران ۲۰۰۴؛ عزیزنیا و همکاران ۲۰۰۸). سالون و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کردند که ظرفیت بافری فاکتور اصلی موثر در تغییرات pH فراورده‌های لبنی می‌باشد. دربرابندر و دی بیردمیکر (۱۹۹۹) نشان

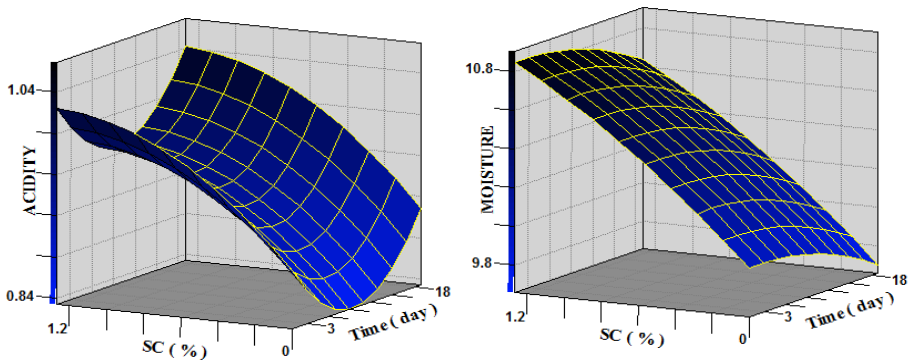
دادند غنی کردن شیر پس چرخ با کازئینات سدیم یا پودر آب پنیر (۱/۵ درصد) بر pH ماست اثری نداشته است که نتایج این تحقیق را تایید می‌کند. مقدار pH نمونه‌های ماست تا روز ۱۴ کاهش (از ٤/٦٣ به ٤/٢٦) و درصد اسیدیته تا روز ۱۰ افزایش (از ۰/۹۲ به ۰/۹۸ درصد) نشان داد و سپس pH افزایش و اسیدیته کاهش یافت. در طی نگهداری *لاکتوباسیلوس‌بولگاریکوس* و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* حتی در دمای یخچال هم فعال هستند و با تخمیر لاکتوز، اسید لاکتیک تولید می‌کنند و اسیدیته را افزایش و pH را کاهش می‌دهند (کایلاساپاتی ۲۰۰٦). نتایج مشابهی توسط اوزر و آکین (۲۰۰۵) و شاه و رامچندران (۲۰۱۰) گزارش شده است. دلیل افزایش pH و کاهش اسیدیته در انتهای زمان نگهداری در اثر تولید بعضی متابولیت‌های اساسی توسط *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* در مراحل پایانی نگهداری است (تینسون و همکاران ۱۹۸۲؛ شاه و رامچندران ۲۰۱۰). همچنین گزارش شده است با اتمام منابع قندی، میکروارگانیسم‌ها پروتئین‌های موجود در محیط و نیز اسیدهای آلی را مصرف کرده و این باعث افزایش pH و کاهش اسیدیته محصول می‌گردد (جی ۱۹۹۰). تاثیر افزایش آنزیم ترانس گلوتامیناز بر خواص فیزیکوشیمیایی ماست معنی‌داری نبود. این نتایج با نتایج فارنس‌ورت و همکاران (۲۰۰٦) و گاچ و همکاران (۲۰۰۹) مطابقت دارد.

با توجه به جدول آنالیز واریانس، ضریب تبیین و ضریب تبیین اصلاح شده رطوبت، اسیدیته و pH در حد قابل قبول است. بنابراین معادله پیش گویی کننده رطوبت، اسیدیته و pH نمونه‌های ماست بدست آمده با استفاده از برازش داده‌ها به شرح زیر است:

$$Moisture=9.9085+1.0250SC + 0.0045Time-0.1928SC^2-0.0009Time^2$$

$$Acidity=0.9068+0.2196SC - 0.0166Time - 0.0901SC^2+0.0009Time^2$$

$$pH=4.6902-0.0604Time + 0.0021Time^2$$



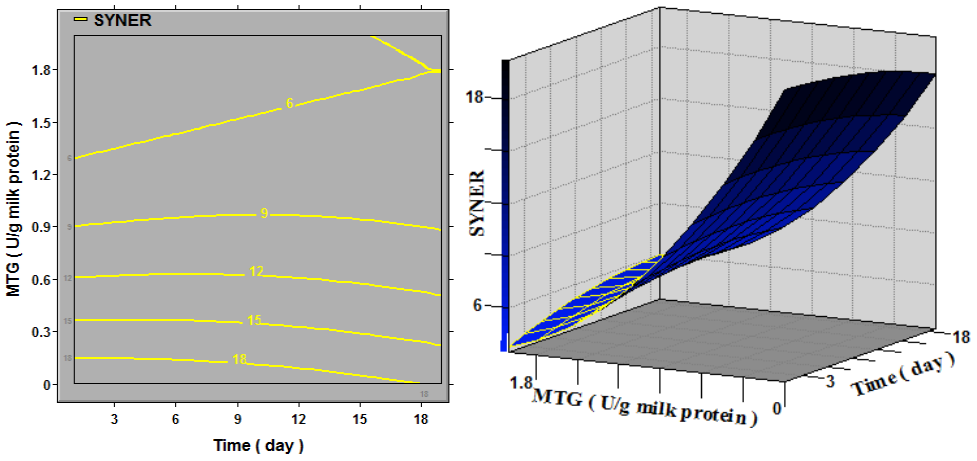
(ب) (الف)

شکل۲- تاثیر کازئینات سدیم و زمان نگهداری بر رطوبت (الف) و اسیدیته (ب) نمونه‌های ماست

تغییرات میزان سینرسیس

یکی از معایب عمده ماست آب اندازی است که در واقع به ظهور سرم یا آب پنیر در سطح ماست اطلاق می‌شود. آب اندازی در ماست به دلیل چروکیدگی ساختار سه بعدی شبکه پروتئینی رخ می‌دهد که منجر به کاهش قدرت اتصال پروتئین‌های آب پنیر و خروج آن از ماست می‌گردد (لوسی ۲۰۰٤). نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان داد که تاثیر خطی مقادیر مختلف غلظت آنزیم و اثر متقابل غلظت آنزیم و زمان نگهداری و همچنین تاثیر مربعی غلظت آنزیم و زمان نگهداری بر میزان سینرسیس معنی‌دار (P<۰/۰۵) بود (شکل ۳ الف). دلیل کاهش سینرسیس ماست در اثر افزودن آنزیم را

می‌توان به ایجاد پیوندهای عرضی دائمی بین پروتئین-های شیر و کاهش نفوذپذیری ژل حاصله دانست (فارگیمند و همکاران ۱۹۹۹؛ لابر و همکاران ۲۰۰۰؛ اوزر و همکاران ۲۰۰۷). کاهش نفوذپذیری ژل باعث به هم پیوستگی شیر و ایجاد ریز ساختار پایدار در ماست می-شود که نتیجه آن محصور شدن آب آزاد در شبکه ژل ماست می‌باشد (مون و هونگ ۲۰۰۳؛ اوزر و همکاران ۲۰۰۷).



(ب) (الف)

شکل۳-اثر متقابل تاثیر غلظت آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی و زمان نگهداری بر سینرسیس

علاوه بر آن آنزیم ظرفیت نگهداری آب را در شبکه ژل ماست افزایش می‌دهد (موتوکی و شگیرو ۱۹۹۸؛ اوزر و همکاران ۲۰۰۷). لورنزن و همکاران (۲۰۰۲) نشان دادند که افزایش استحکام ژل ماست تیمار شده با ترانس گلوتامیناز مربوط به کاهش اندازه حفرات و توزیع منظم شبکه پروتئینی می‌باشد که متعاقب آن، سینرسیس کاهش می‌یابد. همچنین موتوکی و سگیرو (۱۹۹۸) و کوریشی و همکاران (۲۰۰۱) بیان کردند ممکن است در اثر تغییرات دمایی یا فیزیکی مشکلاتی نظیر سینرسیس یا جدا شدن سرم در ماست به وجود آید که با تیمار آنزیم ترانس گلوتامیناز بهبود می‌یابد. زیرا آنزیم با کاتالیز اتصالات عرضی باعث بهبود ظرفیت نگهداری آب و سینرزیس می‌شود. که نتایج این بررسی را تایید می‌کنند. همانطوریکه از نمودار کنتور پلات سینرزیس مشخص است (شکل ۳ب) با افزایش میزان آنزیم در طول زمان نگهداری سیرزیس کاهش یافت. کمترین درصد سینرسیس با افزایش بیش از ۱ واحد آنزیم حاصل شد.

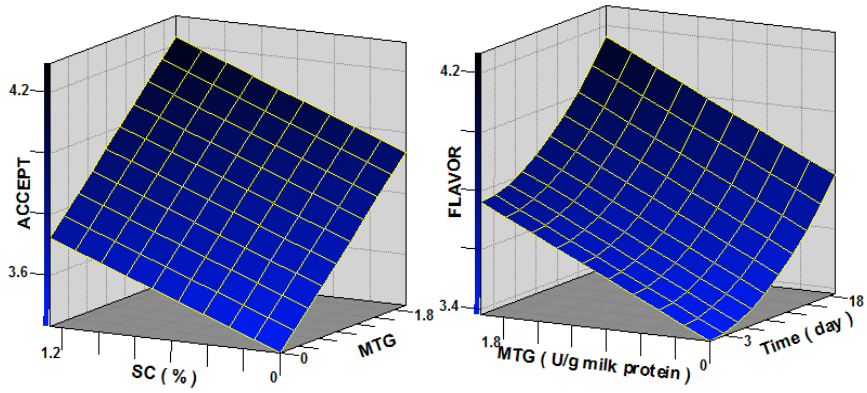
با توجه به جدول آنالیز واریانس، مدل نهایی دارای عدم برازش غیرمعنی‌دار، ضریب تبیین و ضریب تبیین اصلاح شده بالا است. بنابراین مدل نهایی بدست آمده، کارآمد بوده و قادر است بطور رضایت بخشی تغییرات ویژگی‌های مورد آزمون را توجیه کند و حتی در مراحل بعدی پیشگویی و بهینه‌سازی بعنوان یک شاخص مورد استفاده قرار گیرد. معادله پیشگویی سینرسیس بشرح زیر است:

$$Syneresis=20.2809-15.9493MTG + 3.6989MTG^2 + 0.1446MTGTime-0.0069Time^2$$

ارزیابی حسی

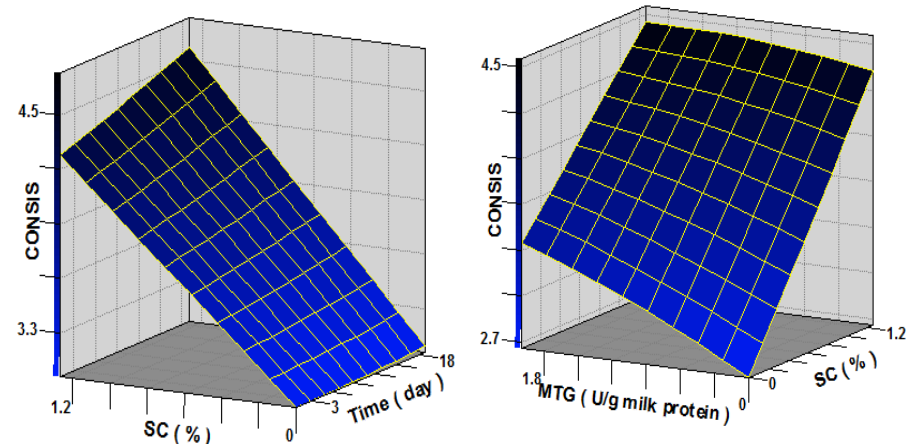
خواص حسی از عوامل اساسی پذیرش بسیاری از فراورد ها و کسب رضایت از مصرف آنها است. با توجه به اهمیت این خواص، بررسی و شناخت عوامل موثر بر آنها به منظور دستیابی به خواص حسی بهینه و جلوگیری از ایجاد خواص حسی نامطلوب ضروری است

(عزیزنیا و همکاران ۲۰۰۸). نتایج حاصل از ارزیابی حسی نمونه‌های ماست نشان داد که تاثیر خطی مقدار کازئینات سدیم بر امتیاز رنگ و پذیرش کلی، تاثیر خطی غلظت آنزیم و تاثیر مربعی زمان نگهداری بر امتیاز عطر و طعم و پذیرش کلی معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$). بطوری که امتیاز رنگ با افزایش مقدار کازئینات سدیم بطور معنی-داری کاهش و امتیاز عطر و طعم با افزایش غلظت آنزیم افزایش یافت. به‌علاوه افزایش غلظت آنزیم و میزان کازئینات سدیم به طور معنی‌داری موجب افزایش امتیاز پذیرش کلی شد (شکل ٤).



(ب) (الف)

شکل۴- تاثیر فاکتورهای مورد مطالعه بر عطر و طعم (الف) و پذیرش کلی (ب) نمونه‌ها



شکل۵- تاثیر متقابل فاکتورهای مورد مطالعه بر امتیاز قوام

همچنین تاثیر متقابل غلظت آنزیم و مقدار کازئینات سدیم و تاثیر متقابل مقدار کازئینات سدیم و زمان نگهداری بر امتیاز قوام معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) بود (شکل۵).

ماست با قوام بالا و خامه‌ای و سینرسیس کم از جمله نظریاتی بود که ارزیاب‌ها در مورد این نمونه‌ها بیان کردند. بهبود خواص حسی در اثر افزایش ترانس گلوتامیناز می‌تواند به علت برقراری پیوندهای عرضی بین پروتئین‌ها باشد که موجب کاهش تعداد گروه‌های آمینی آزاد تولید شده در طول تخمیر می‌شود (وربلبسکا و همکاران ۲۰۰۹). همچنین لورنزن و همکاران (۱۹۹۸) نشان دادند که ترانس گلوتامیناز از طریق اثر بر کازئینات سدیم هیدرولیز شده موجب بهبود خواص

حسی شده است. میلانویچ و همکاران (۲۰۰۸) نیز نشان دادند که فعال سازی آنزیم در تولید ماست پروبیوتیک به طور معنی‌داری خواص حسی را بهبود می‌بخشد که مطابق با نتایج سابق است. معادله پیش گویی کننده زیر، به ترتیب برای قوام، عطر و طعم و پذیرش کلی در نمونه‌های ماست با استفاده از برازش داده‌ها به دست آمد:

$$Consistency=2.6465 + 0.4585MTG + 1.2944SC - 0.0449MTG^2-0.2624MTGSC+0.0133SCTime+ 0.0001Time^2$$

$$Flavor=3.3794 + 0.2073MTG + 0.0013Time^2$$

$$Acceptance=3.4085+0.2729MTG+0.2493SC+ 0.0002Time^2$$

بهینه‌سازی

برای بهینه‌سازی کانتور پلات‌های مختلف بر روی هم قرار داده شد و منطقه‌ای که مشخصات تمامی پاسخ-ها را برآورد می‌کند، به عنوان منطقه بهینه معرفی گردید. مبنای بهینه‌سازی به حداکثر رساندن زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس*، زمان نگهداری و قابلیت پذیرش کلی و به حداقل رساندن غلظت آنزیم، مقدار کازئینات سدیم و درصد سینرسیس بود. نقاط بهینه جزء آزمایشات انجام شده نبود لذا آزمایش دیگری در شرایط بهینه انجام گرفت. نتایج آزمایشات و مقدار حاصل از مدل بسیار نزدیک به هم بودند. در شرایط بهینه، غلظت آنزیم ۱/٤۱ واحد در گرم پروتئین شیر، میزان کازئینات سدیم ۰/۳۱ درصد و زمان نگهداری ۱۵ روز تعیین گردید. در این شرایط تعداد *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* به ترتیب ۸/۳۳ و ۸/۳۵ سیکل لگاریتمی، درصد سینرسیس ٦/۷۲ درصد و امتیاز قوام و پذیرش کلی به ترتیب ۳/۳۷ و ۳/۸۷ از ۵ بود.

نتیجه‌گیری

با توجه به مدل تجربی به دست آمده توسط روش سطح پاسخ ارتباط بین متغییرهای مورد مطالعه مناسب تشخیص داده شد. بر اساس نتایج حاصله افزایش غلظت آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی تاثیر معنی‌داری بر خواص شیمیایی ماست نداشت اما موجب افزایش قابلیت زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* به ترتیب در حدود ۰/۸ و ۰/۵ سیکل لگاریتمی گردید. همچنین موجب کاهش درصد سینرسیس و افزایش خواص حسی (عطر و طعم، قوام و پذیرش کلی) نمونه‌های ماست شد. لذا می‌توان از آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی با موفقیت در تهیه ماست همزده بدون چرب پروبیوتیک بهره برد.

سپاسگزاری

نگارندگان مقاله مراتب سپاس خود را از همکاری آزمایشگاه صنایع غذایی بخش فنی و مهندسی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان غربی به دلیل قرار دادن امکانات آزمایشگاهی و شرکت آجینوموتو فرانسه به منظور تامین آنزیم ترانس گلوتامیناز تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع مورد استفاده

Amatayakul T, Halmos AL, Sherkat F and Shah NP, 2006. Physical characteristics of yoghurts made using exopolysaccharid-producing starter culture and varying casein to whey protein ratios. International Dairy Journal 16: 40-51.

Aryana KJ and McGrew P, 2007. Quality attributes of yogurt with *Lactobacillus casei* and various prebiotics. LWT- Food Science and Technology 40: 1808–1814.

Association of Official Analytical Chemists, 1997. Official Methods of Analysis, 16th ed, 3rd rev, AOAC, Arlington, VA.

Aziznia S, Khosrowshahi A, Madadlou A and Rahimi J, 2008. Whey protein concentrates and gum tragacanth as fat replacers in non-fat yogurt: chemical, physical, and microstructural properties. Journal of Dairy Science 91: 2545–2552.

Bonisch MP, Tolkach A and Kulozik U, 2006. Inactivation of an indigenous transglutaminase inhibitor in milk serum by means of UHT-treatment and membrane separation techniques. International Dairy Journal 16: 669–678.

Bonisch MP, Huss M, Lauber S and Kulozik U, 2007a. Yoghurt gel formation by means of enzymatic protein cross-linking during microbial fermentation. Food Hydrocolloids 21: 585–595.

Bonisch MP, Huss M and Kulozik U, 2007b. Transglutaminase cross-linking of milk proteins and impact on yoghurt gel properties. International Dairy Journal 17: 1360–1371.

Bonisch MP, Lauber S and Kulozik U, 2007c. Improvement of enzymatic cross-linking of casein micelles with transglutaminase by glutathione addition International Dairy Journal 17: 3–11.

Dave RI and Shah NP, 1996. Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and Bifidobacteria. Journal of Dairy Science 79: 1529–1536.

Debrabandere AG and Debaerdemaeker JG, 1999. Effects of process conditions on the pH development during yogurt fermentation. Journal of Food Engineering 41: 221-227.

Faergemand M, Sorensen MV, Jorgensen U, Budolfsen G and Qvist KB, 1999. Transglutaminase: Effect on instrumental and sensory texture of set style yoghurt. Milchwissenschaft 54: 563–566.

Farnsworth JP, Li J, Hendricks GM and Guo MR, 2006. Effects of transglutaminase treatment on functional properties and probiotic culture survivability of goat milk yogurt. Small Ruminant 65: 113-121.

Gauche C, Tomazi T and Barreto PLM, 2009. Physical properties of yoghurt manufactured with milk whey and transglutaminase. LWT- Food Science and Technology 42: 239–243.

Jai JM, 1990. Modern Food Microbiology.Chapman and Hall.

Jaros D, Partschefeld C, Henle T and Rohm H, 2006. Transglutaminase in dairy products: chemistry, physics, applications. Journal of Texture Studies 37: 113–155

Kailasapathy K, 2006. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. LWT- Food Science and Technology 39: 1221–1227.

Keogh MK and O'Kennedy BT, 1998. Rheology of stirred yogurt as affected by added milk fat, protein and hydrocolloids. Journal of Food Science 63: 108–112.

Kuraishi C, Yamazaki K and Susa Y, 2001. Transglutaminase: its utilization in the food industry. Food Reviews International 17: 221–246.

Kurmann JA and Rasic JL, 1991. The health potential of products containing bifidobacteria. In RK Robinson (Ed.), Therapeutic properties of fermented milks 117–158.

Kurth L and Rogers PJ, 1984. Transglutaminase catalyzed crosslinking of myosin to soya protein, casein and gluten. Journal of Food Science 49: 573–576.

Lauber S, Klostermeyer H and Henle T, 2000. Influence of irreversible casein crosslinking on the gel strength of yoghurt. Czech Journal of Food Sciences 18: 69–71.

Lorenzen PC, Schlimme E and Roos N, 1998. Crosslinking of sodium caseinate by a microbial transglutaminase. Nahrung 42: 151–154.

Lorenzen PC, Neve H, Mautner A and Schlimme E, 2002. Effect of enzymatic cross-linking of milk proteins on functional properties of set-style yoghurt. International Journal of Dairy Technology 55: 152–157.

Lourens-Hattingh A and Viljoen BC, 2001. Yogurt as probiotic carrier food. International Dairy Journal 11: 1–17.

Lucey JA, 2004. Cultured dairy products: An overview of their gelation and texture properties. International Journal of Dairy Technology 57: 77–84.

Martin-Diana AB, Janer C, Pelaez C and Requena T, 2003. Development of a fermented goat's milk contaning probiotic bacteria. International Dairy Journal 13: 827-833.

Milanović S, Carić M, Đurić M, Iličić M and Duraković K, 2007. Physico-chemical properties of probiotic yoghurt produced with transglutaminase. Acta Periodica Technologica 38: 45-52.

Miwa N, Kumazawa Y, Nakagoshi H, Sakaguchi S, inventors; Ajinomoto Co., Inc., assignee. 2002. Method for modifying raw material milk and dairy product prepared by using the modified raw material milk. European patent. 1: 197 152 A2.

Montgomery DC, 2005. Design and Analysis of Experiments: Response surface method and designs. New Jersey: John Wiley and Sons, Inc.

Moon JH and Hong YH, 2003. Electron microscopic property of transglutaminase added milk. Korean Journal for Food Science of Animal Resources 23: 350–355.

Motoki M and Seguro K, 1998. Transeglutaminase and it's use for food processing, Trends In Food Science and Technology 9: 204-210

Neve H, Lorenzen PC, Mautner A, Schlimme E and Heller KJ, 2001. Effects of transglutaminase treatment on the production of set skim milk yoghurt: microbiological aspects. Kiel. Milchwirtsch. Forschungsber 53: 347–361.

Ozer D, Akin S and Ozer B, 2005. Effect of inulin and lactulose on survival of *Lactobacillus acidophilus LA-5* and *Bifidobacterium bifidum BB-02* in acidophilusbifidus yogurt. Food Science and Technology International 11: 19–24.

Ozer B, Kirmaci HA and Oztekin S, 2007. Incorporation of microbial transglutaminase into non-fat. International Dairy Journal 17: 199–207.

Ramchandran L and Shah NP, 2010. Characterization of functional, biochemical and textural properties of symbiotic low-fat yogurts during refrigerated storage. LWT- Food Science and Technology 43: 819–827

Salaun F, Mietton B and Gaucheron F, 2005. Buffering capacity of dairy products. International Dairy Journal 15: 95–109.

Sanli T, Sezgin E, Deveci O, Senel E and Benli M, 2011. Effect of using transglutaminase on physical, chemical and sensory properties of set-type yoghurt. Food Hydrocolloids 25: 1477-1481.

Schorsch C, Carrie H and Norton IT, 2000. Cross-linked casein micelles by a microbial transglutaminase: influence of cross-links in acid-induced gelation. International Dairy Journal 10: 529–539.

Sharma R, Lorenzen PC and Qvist KB, 2001. Influence of transglutaminase treatment of skim milk on the formation of epsilon-(gamma-glutamyl) lysine and the susceptibility of individual proteins towards crosslinking. International Dairy Journal 11: 785–793.

Tharmaraj N and Shah NP, 2003. Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, Bifidobacteria, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* and Propionibacteria. Journal of Dairy Science 86: 2288–2296.

Tinson W, Broome MC, Hillier AJ and Jago GR, 1982. Metabolism of *Streptococcus thermophilus*. 2. Production of CO_2 and NH_3 from urea. Australian Journal of Dairy Technology 37: 14–16.

Unal B, Metin S and Isıklı ND, 2003. Use of response surface methodology to describe the combined effect of storage time, locust bean gum and dry matter of milk on the physical properties of low-fat set yogurt. International Dairy Journal 13: 909–916.

Volikakis P, Biliaderis CG, Vamvakas C and Zerfiridis GK, 2004. Effects of a commercial oat-ß-glucan concentration on the chemical, physico-chemical and sensory attributes of a low-fat white-brined cheese product. Food Research International 37: 83-94.

Wroblewska B, Kolakowski P and Pawlikowska K, 2009. Influence of the addition of transglutaminase on the immunoreactivity of milk proteins and sensory quality of kefir. Food Hydrocolloids 23: 2434-2445.

Yazici F and Akgun A, 2004. Effect of some protein based fat replacers on physical, chemical, textural, and sensory properties of strained yoghurt. Journal of Food Engineering 62: 245–254.