DOI: http://dx.doi.org/ 10.22104/IFT.2022.5781.2116

Innovative Food Technologies, 10(2), 119-133, Winter 2023

Research Article

Evaluation of effect of ultrasound and transglutaminase enzyme treatments on yield, physicochemical properties and microstructure of soy cheese

Hossein Jooyandeh[1•], Mohammad Amin Mehrnia[2], Mohammad Hojjati[1], Behrooz Alizadeh Behbahani[3]

1. Professor, Department of Food Science and Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran
2. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran
3. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

(Received 7 August 2022, Received in revised form 2 October 2022, Accepted 24 October 2022)

Introduction: Soy products consumption reduces the hazards of numerous chronic disorders such as cancer, arteriosclerosis, and osteoporosis syndromes. Among diverse soy products, soymilk has gained much popularity as an outstanding source of nutrients which is normally suggested as a less-expensive supernumerary instead of cow's milk. Soymilk is water extract of soybeans which is rich in functional components such as isoflavones and high quality proteins and it is lactose and cholesterol free as compare with cow's milk. The extent of extracted soybean components into the soymilk could be improved by ultrasound technique. In recent years, this non-thermal procedure has many applications in food industry such as extraction (plant substances), filtration, destroy of microorganisms, enzyme inactivation, emulsification, etc. High-power ultrasound thorough the shock waves and shear forces can improve the liquid/solid extraction of intracellular plant constituents by cavitation and bubbles interruption. On the other hand, the quality of food proteins like soymilk or soy cheese (tofu) could be improved by microbial transglutaminase (TG). TG-induced crosslinking handling in different food proteins have much studied. Transglutaminase (EC 2.3.2.13) is an acyltransferase that catalyzes the cross-linking of most food proteins including milk proteins through formation of ε-(γ-glutamyl)-lysine intra- and intermolecular isopeptide bonds. TG enzyme can form a gel with an appropriate structure by developing covalent connections between glutamine and lysine in protein systems. Soy-cheese is a quasi-dairy product that is prepared by coagulants through coagulation of soy milk. Although some investigations have studied the individual effect of TG enzyme or ultrasound on tofu quality, the simultaneous effects of both treatment on tofu has not yet been studied. Therefore, present study was conducted to investigate the effect of transglutaminase and ultrasound enzymatic treatments on the yield and physicochemical characteristics of tofu.

Materials and methods: After washing, soaking and grinding soybeans with water (1: 6 ratio), the mixture was sonicated (frequency of 37 KHz with power of 520 W and temperature of 40 °C) at three time levels (0, 15 and 30 minutes). The mixture was filtered through a cheese cloth to separate the soymilk material from the residue and heated at 95 °C for 5 min. Afterward, soymilk was cooled to 95 °C and enzymatic treatment of transglutaminase (TG) was performed at three levels (0, 0.35 and 0.7 Unit/g soymilk protein) for 150 min. For enzyme inactivation, treated soymilk heated at 95 °C for 1 min. After Tofu preparation with 0.4% calcium sulfate solution as coagulant, the effect of these treatments on the cheese yield and physicochemical parameters (pH, moisture, fat, protein, color values) of tofu were investigated during one month storage (0, 30 and 60 days)

• Corresponding Author E-Mail Address: hosjooy@asnrukh.ac.ir

DOI: http://dx.doi.org/ 10.22104/IFT.2022.5781.2116

Innovative Food Technologies, 10(1), 119-133, Winter 2023

under refrigeration conditions. Microstructure evaluation of cheese samples were measured by scanning electron microscopy (SEM) at the end of 60 days of the cold storage. Tofu samples were cut into cubes of approximately 5 mm^3 and dipped in 2.5% (w/w) gluteraldehyde for 3 h. The cheese blocks were fixed and washed with distilled water and dehydrated using ethanol. The samples were then defatted three times in chloroform and were covered with ethanol and kept refrigerated. Film samples were cryo-fractured by immersion in liquid nitrogen and fixed on stubs. The samples were coated with gold. Photomicrographs were recorded at different magnification levels operated at 20 kV.

Results and discussion: The results showed that with increasing enzyme concentration, moisture content and production yield of tofu meaningfully increased while protein and fat contents slightly increased ($p>0.05$). The yield of tofu at 0, 0.35 and 0.7 Unit/g protein were recorded as 19.80, 21.08 and 22.44%, respectively. Increasing the ultrasound time also significantly increased moisture content and yield of cheese making while considerably reduced the protein and fat content of the cheese analogues. The yield of tofu at different ultrasound time (0, 15 and 30 minutes) were recorded as 19.37, 21.24 and 23.26%, respectively. Moreover, the storage time had not significant effect on pH and chemical components of tofu samples. Evaluation of the color indexes of the product with a colorimeter showed that with increasing enzyme concentration, the amount of lightness (L*) increased and redness (a*) decreased significantly while yellowness (b*) insignificantly changed. Also, with increasing the ultrasound period and storage time, the amount of redness (a*) and yellowness (b*) parameters increased and the lightness (L*) decreased significantly. Microstructure of soy cheeses showed that TG treatment caused a compact structure in protein matrix of tofu samples while ultrasound process led to less compact and more voids form. The compact structure and rougher surface of tofu samples treated with TG might have resulted from microscopic pools of free water within the sample due to the increased hydration capacity of protein matrix.

Conclusions: The results of this study showed that by using 30 minute ultrasound time and 0.7 transglutaminase concentration (Unit/g protein), a tofu with the highest yield (23.73%) as compare with control sample (18.17%) could be produced. However, as the time of ultrasound increased, the cheese quality reduced significantly. Therefore to obtain a tofu sample with satisfactory quality and acceptable cheese yield (22.34%) treatment with 0.7 TG (Unit/g protein) and 15 minute ultrasound time is suggested.

Keywords: **Cheese analogue, Ultrasound, TG, Color indexes, Storage period**

How to cite this article:

Jooyandeh, H., Mehrnia, M.A., Mohammad Hojjati, M., Alizadeh Behbahani, B., (2023). Evaluation of effect of ultrasound and transglutaminase enzyme treatments on yield, physicochemical properties and microstructure of soy cheese . *Innov. Food Technol., 10(2)*, 119-133.

DOI: http://dx.doi.org/ 10.22104/IFT.2022.5781.2116

فصلنامه فناوری‌های جدید در صنعت غذا، دوره ۱۰، شماره ۲، صفحه ۱۳۳-۱۱۹، زمستان ۱۴۰۱

مقاله پژوهشی

بررسی تأثیر تیمارهای فراصوت و آنزیم ترانس‌گلوتامیناز بر میزان راندمان، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و ریزساختار پنیر سویا

حسین جوینده[۱*]، محمد امین مهرنیا[۲]، محمد حجتی[۱]، بهروز علیزاده بهبهانی[۳]

۱. استاد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان
۲.دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان
۳. استادیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان

(تاریخ ارسال: ۱۴۰۱/۰۵/۱۶، تاریخ آخرین بازنگری: ۱۴۰۱/۰۷/۱۰، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۰۲)

چکیده

پنیر سویا (توفو)، فرآورده شبه لبنی است که از طریق انعقاد شیر سویا به کمک مواد منعقدکننده تهیه می‌شود. پژوهش پیش‌رو با هدف بررسی تأثیر تیمارهای آنزیمی ترانس‌گلوتامیناز (TG) و فراصوت بر میزان راندمان تولید، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و ریزساختار توفو انجام شد. پس از خیساندن و خرد کردن لوبیا با آب (نسبت ۱:۶)، شیرابه در سه سطح زمانی (۰، ۱۵ و ۳۰ min) تحت تیمار فراصوت (فرکانس ۳۷ KHz، توان ۵۲۰ W و دمای ۴۰ °C) قرار گرفت. تیمار آنزیمی شیرسویا در سه سطح (۰، ۰/۳۵ و ۰/۷ واحد آنزیم TG به ازای هر گرم پروتئین شیرسویا) انجام پذیرفت. پس از تهیه توفو توسط ماده منعقدکننده سولفات کلسیم، تأثیر تیمارهای مذکور بر ویژگی‌های مورد بررسی طی مدت دو ماه نگهداری در یخچال (۰، ۳۰ و ۶۰ روز) بررسی گردید. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت آنزیم، مقادیر رطوبت و راندمان افزایش معنی‌داری یافت اما پروتئین و چربی تفاوت چندانی نکرد ($p>0/05$). افزایش زمان فراصوت نیز به‌طور معنی‌داری باعث افزایش رطوبت و راندمان پنیرسازی گردید اما سبب کاهش قابل‌توجه پروتئین و چربی نمونه‌های شبه‌پنیر گردید. همچنین زمان نگهداری تأثیر معنی‌داری بر pH و ترکیبات توفو نداشت ($p>0/05$). بررسی رنگ محصول با دستگاه رنگ‌سنج نشان داد که با افزایش غلظت آنزیم میزان روشنایی (L^*) افزایش و قرمزی (a^*) کاهش معنی‌داری یافت درحالی‌که زردی (b^*) تغییر معنی‌داری نکرد. به‌علاوه، با افزایش زمان فراصوت و زمان نگهداری، میزان پارامترهای قرمزی (a^*) و زردی (b^*) به‌طور قابل توجهی افزایش و میزان روشنایی (L^*) به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. ریزساختار پنیر سویا نشان داد که تیمار آنزیمی برخلاف تیمار فراصوت موجب فشرده‌شدن ساختار ماتریس پروتئینی نمونه‌های توفو گردید. نتایج این تحقیق نشان داد که در صورت استفاده از تیمار فراصوت به مدت ۱۵ min و غلظت ۰/۷ واحد آنزیم TG به ازای هر گرم پروتئین شیرسویا می‌توان پنیر سویایی با کیفیت قابل قبول و راندمان قابل‌توجه تولید نمود.

کلید واژگان: شبه‌پنیر، فراصوت، TG، شاخص‌های رنگ، دوره نگهداری

*نویسنده مسئول: hosjooy@asnrukh.ac.ir

۱. مقدمه

مصرف فرآورده‌های غذایی سویا خطر بسیاری از ناهنجاری-های مزمن مانند سرطان، تصلب شرائین و پوکی استخوان را کاهش می‌دهد. در میان محصولات متنوع سویا، شیر سویا به‌عنوان یک منبع مغذی با ارزش و کم‌هزینه‌تر نسبت به شیر گاو از محبوبیت بیشتری برخوردار است. شیر سویا محصول استخراج آبی از لوبیای سویا است که غنی از مواد عملگرا همانند ایزوفلاون‌ها و نیز پروتئین‌های باکیفیت بالا می‌باشد و در مقایسه با شیر لبنی عاری از کلسترول و لاکتوز بوده و مقدار اسیدهای چرب اشباع آن بسیار پایین‌تر است [۱]. شیر سویا حاوی یک فیتواستروژن[1] غیراستروئیدی است که یک اثر محافظتی علیه پوکی استخوان و بیماری‌های مزمن مربوط به آن دارد [۲]. به‌دلیل مشکلات برخی مصرف-کنندگان در قبال پروتئین و لاکتوز شیر گاو ، تقاضا برای جایگزینی شیر سویا و فرآورده‌های آن به جای شیر گاو مطرح گردید است [۳]. درنتیجه، امروزه شیر سویا و محصولات مبتنی بر آن به‌عنوان جایگزین مناسبی برای لبنیات در میان کسانی که به شیر و فرآورده‌های آن آلرژی دارند تبدیل شده است [۴]. همچنین با توجه به عوارض و مضرات مصرف گوشت قرمز و بیماری‌های ناشی از آن به‌ویژه در افراد مسن یا بیمار، می‌توان از محصولات شبه لبنی سویا مانند پنیر سویا (توفو) به‌عنوان محصول گیاهی پروتئینی با کیفیت بالا استفاده نمود. بنابراین تولید و معرفی محصولات شبه لبنی سویا مانند توفو جهت ارتقای سلامت جامعه بسیار ضروری است.

توفو یک نوع غذای پروتئینی است که از لوبیای سویا به دست می‌آید. فرآیند تولید توفو معمولاً شامل مراحل شستشوی لوبیا، خیساندن و خرد کردن لوبیای سویا به همراه آب، فیلتر کردن، فرایند حرارتی، تشکیل لخته و پرس کردن می‌باشد [۵]. راندمان و ویژگی‌های توفو به عوامل مختلفی نظیر واریته و تازگی لوبیای سویا، روش تهیه شیر سویا، روش تولید پنیر سویا به‌ویژه نوع منعقدکننده و دمای انعقاد و شرایط نگهداری محصول می‌باشد. در میان این عوامل، فرایند حرارتی نقش مهمی در تولید محصول از نظر کیفی و تغذیه‌ای دارد که مهم‌ترین آن‌ها عبارت‌اند از: ۱) فرایند حرارتی مناسب با دناتوراسیون پروتئین‌های مهم سویا یعنی ۷ و ۱۱ سبب بهبود خواص انعقادی و سفتی ژل شده و از میزان سینرزیس یا آب‌اندازی ژل می‌کاهد [۶]، ۲) حرارت نقش مهمی در نابودی بازدارنده‌های تریپسین، ساپونین‌ها، و سایر مواد بازدارنده دارد [۷] و ۳) حرارت با نابودی آنزیم لیپوکسی‌ژناز شیر سویا، مانع از فعالیت این آنزیم و ایجاد طعم علفی در محصولات لبنی سویا می‌گردد [۸]. در مقیاس صنعتی معمولاً از سولفات کلسیم و گلوکونودلتا-لاکتون به-عنوان مواد منعقد کننده شیر سویا در تولید توفو استفاده می‌شود [۹].

در چند دهه اخیر، محققین تلاش فراوانی جهت تغییر خصوصیات کاربردی درشت مولکول‌های موجود در مواد و فرآورده‌های غذایی انجام داده‌اند، چرا که به این ترتیب قادرند به‌خوبی ویژگی‌های حسی و تغذیه‌ای محصولات غذایی را بهبود دهند. پروتئین‌ها، ازجمله ترکیبات اساسی و با اهمیت موجود در مواد و فرآورده‌های غذایی هستند که نقش مهمی را در کیفیت محصول ایفا می‌کنند. بنابراین، اصلاح این ترکیبات از طریق روش‌های مختلف ازجمله روش‌های آنزیمی، شیمیایی یا فیزیکی، سبب بهبود و یا توسعه ویژگی‌های عملکردی جدید در فرآورده می‌گردد [۱۰]. ازجمله آنزیم‌های مهم و پرکاربرد در چند دهه اخیر، آنزیم ترانس‌گلوتامیناز (TG[2]) میکروبی می‌باشد. این آنزیم قادر است واکنش‌هایی مانند ایجاد اتصالات عرضی، انتقال آسیل و دآمیداسیون را سرعت ببخشد. امروزه، نوع میکروبی آنزیم ترانس‌گلوتامیناز که مستقل از کلسیم عمل می‌کند از میکروارگانیسم‌های مختلف به‌خصوص *استرپتومایسس موبارنس* استخراج می‌گردد و به‌طور گسترده‌ای در صنایع مختلف ازجمله صنایع غذایی، صنایع دارویی و صنایع آرایشی استفاده می‌شود [۱۱]. ازجمله مواردی که این آنزیم در پژوهش‌های مرتبط با صنعت غذا استفاده شده است می‌توان به کاربرد آن در تهیه فیلم‌های خوراکی [۱۲]، محصولات پخت [۱۳]، تولید فراورده‌های لبنی مانند ماست [۱۰، ۱۴]، پنیر [۱۶،۱۵]، بستنی [۱۷]، کفیر [۱۸]، و فرآورده‌های شبه

1. Phytoestrogen

2. Transglutaminase

لبنی مانند ماست [۱۹] و توفو [۲۰] اشاره کرد. در تهیه توفو و جهت تبدیل شیر سویا به دلمه می‌توان بجای استفاده از مواد منعقد کننده، از تیمار آنزیمی TG (با غلظت بالای TG و درحدود ۱ واحد آنزیم به‌ازای هر میلی‌لیتر شیر سویا) در دمایی بسیار پایین‌تر (حدود ۳۷ °C بجای ۸۰ °C) استفاده نمود [۲۱]. مکانیسم تشکیل دلمه در روش تیمار آنزیمی TG، تشکیل اتصالات ایزوپپتیدی میان پروتئین‌های شیر سویا است. در این روش، با تغییر زمان تیمار آنزیمی می‌توان میزان سفتی بافت را کنترل نمود و توفویی نرم یا سفت تهیه کرد. به‌علاوه، کیفیت و میزان راندمان تولید پنیر سویا با کمک تیمار آنزیمی TG نسبت به روش‌های مرسوم تولید توفو بالاتر گزارش شده است [۲۲]. تیمار TG سبب افزایش مقدار ظرفیت نگهداری آب (WHC[1]) و بهبود ساختار توفو می‌گردد [۲۲]. به‌علاوه، با کمک آنزیم TG می‌توان میزان حساسیت یا آلرژی‌زایی به پروتئین‌های سویا را تا حد زیادی کاهش داد [۲۳،۲۲].

امواج اولتراسوند، امواج صوتی با فرکانس فراتر از حد شنوایی انسان است. با تنظیم فرکانس، از اولتراسوند می‌توان در بسیاری از صنایع من‌جمله صنعت غذا استفاده کرد. تکنیک‌های اولتراسوند نسبتاً ارزان و ساده بوده و به‌دلیل صرفه‌جویی در مصرف انرژی به‌عنوان یک فناوری نوظهور در زمینه بررسی ویژگی‌های مواد غذایی، استخراج و اصلاح محصولات غذایی مورد توجه پژوهشگران و صنعت غذا قرار گرفته است. از اولتراسوند کم توان (با فرکانس بالا) برای بررسی ترکیب و خصوصیات فیزیکوشیمیایی ترکیبات مواد غذایی استفاده می‌شود درحالی‌که از اولتراسوند با قدرت بالا (فرکانس پایین) که از طریق کاویتاسیون یا ایجاد حفره سبب تغییرات فیزیکی، شیمیایی و بیوشیمیایی می‌شود جهت بهبود کیفیت محصولات غذایی استفاده می‌شود [۲۴]. با توجه به میزان انرژی امواج و فشار و دمای به کار برده شده، شدت نیروهای برشی تولیدشده متغیر است و بنابراین میزان تأثیرگذاری این روش بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی مواد غذایی و همچنین کاهش بار میکروبی یا آنزیمی متفاوت است [۲۵]. علاوه بر استفاده از روش اولتراسوند جهت بهبود ویژگی‌های محصولات لبنی نظیر پنیر [۲۶] و ماست [۲۷]، استفاده از این روش جهت تولید و ارزیابی محصولات شبه‌لبنی سویا مانند توفو نیز مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است [۲۸-۳۰]. هرچند تأثیر تیمار فراصوت بر کیفیت به‌ویژه سفتی پنیر سویا متفاوت گزارش شده است، اما افزایش میزان راندمان تولید توفو درنتیجه اولتراسوند توسط اکثر محققین گزارش شده است [۳۱،۳۰]. برای مثال، ژانگ و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که با تیمار فراصوت در ۱۱۰ W/cm^2 و افزایش زمان از صفر به ۴۰ min، سفتی توفوی تهیه‌شده با محلول ایزوله پروتئینی سویا (منعقدشده با ۲۰ واحد آنزیم TG به ازای هر گرم پروتئین ایزوله) از ۳۴/۵ به ۲۰۷/۱ g افزایش یافت [۳۱]. در مقابل، لین و همکاران (۲۰۱۶) در تحقیقی راجع به تأثیر اولتراسوند بر کیفیت توفوی تهیه‌شده با گلوکونودلتا-لاکتون گزارش کردند که هر چند با افزایش زمان فرایند فراصوت از ۵ تا ۲۵ min، سفتی تمامی نمونه‌های تیمار شده افزایش می‌یافت، اما تمامی نمونه‌های تیمار شده از سفتی کمتر و ریزساختار بازتری نسبت به نمونه شاهد (استفاده از دمای بالا بجای اولتراسوند) برخوردار بودند [۳۰]. به‌علاوه، این محققین بیان داشتند که با افزایش دما (از دمای ۲۵ °C به ۵۰ °C) و زمان تیمار فراصوت (از ۲۵ به ۳۰ min)، سفتی ژل و پارامترهای G' و G'' به‌طور معنی‌داری کاهش یافت.

هرچند همان‌گونه که در بالا اشاره گردید تحقیقات بسیار معدودی راجع به بررسی اثر تیمار فراصوت بر ویژگی‌های توفوی تهیه‌شده به روش انعقاد با آنزیم TG انجام پذیرفته است، اما تاکنون تحقیقی در مورد اثر محدود تیمار آنزیمی TG همراه با تیمار فراصوت شیر سویا بر ویژگی‌های پنیر سویا انجام نشده است. بنابراین پژوهش پیش‌رو با هدف بررسی تأثیر مستقل و توأم تیمارهای آنزیمی ترانس‌گلوتامیناز و فراصوت شیر سویا بر میزان راندمان تولید و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پنیر سویا انجام شد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. مواد مورد استفاده

1. Water-holding capacity

برای تهیه شیر سویا از لوبیای کامل تازه سویا (واریته سحر) استفاده گردید. مقدار آنزیم ترانس‌گلوتامیناز میکروبی (۳،۲ EC ۱۳،۲) متعلق به شرکت BDF Natural Ingredients اسپانیا خریداری و تا زمان استفاده در یخچال نگهداری گردید. مطابق اطلاعات بسته خریداری‌شده، قدرت آنزیمی هر گرم پودر ترانس‌گلوتامیناز، ۱۰۰ واحد (به ازای هر گرم پروتئین) مشخص شده بود. برای تبدیل شیر سویا به توفو، از ماده منعقد کننده سولفات کلسیم دوآبه ($CaSO_4.2H_2O$، مرک آلمان) استفاده شد. بی‌کربنات سدیم و سایر مواد شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق نیز با درجه خلوص بالا و متعلق به شرکت مرک آلمان خریداری شدند.

۲.۲. تهیه شیر سویا

شیر سویا به روش استخراج آبی از لوبیای سویا مطابق روش سارانی و همکاران (۲۰۱۵) [۵] و کائو و همکاران (۲۰۱۳) [۳۲] با کمی تغییرات تهیه شد. برای تهیه شیر سویا، مقدار ۳۰۰ g لوبیای تمیز شده سویا (واریته سحر) در داخل ml ۹۰۰ محلول ۰/۵٪ بی‌کربنات سدیم به مدت h ۹ در دمای اتاق خیسانده شد. پس از جداسازی آب خیساندن، لوبیاهای سویا با نسبت ۱ به ۶ (نسبت لوبیای خشک : آب) در داخل مخلوط کن با آب معمولی به مدت min ۳ خرد و هموژن گردید، به‌طوری که در مجموع حدود ml ۲۰۰۰ شیرابه به دست آمد. در ادامه جهت بهبود استخراج ترکیبات سویا، تیمار فراصوت شیرابه در سه زمان مختلف ۰، ۱۵ و min ۳۰ توسط دستگاه اولتراسوند Elmasonic مدل P60H (ساخت آلمان) انجام گرفت. تیمار فراصوت در شرایط ثابت فرکانس ۳۷ KHz، با ۸۰ ٪ توان دستگاه (۵۲۰ W) و در دمای °C ۴۰ انجام پذیرفت. سپس شیرابه با پارچه‌پنیر[1] به‌صورت سه لایه پارچه روی هم صاف گردید و پس از جداسازی تفاله (اوکارا)، شیر سویا در دمای °C ۹۵ به مدت min ۱ حرارت داده شد. در مورد نمونه‌های حاوی آنزیم، پس از فرایند حرارتی و خنک کردن شیر سویا به دمای °C ۴۳، تیمار آنزیمی TG شیر سویا با افزودن مقادیر مختلف ۰، ۰/۳۵، ۰/۷ واحد آنزیم به ازای هر گرم پروتئین) ترانس‌گلوتامیناز به شیر سویا برای مدت min ۱۵۰ انجام شد. در ادامه، با انجام فرایند حرارتی °C ۹۵ به مدت min ۱، آنزیم ترانس گلوتامیناز در نمونه‌های حاوی آنزیم غیرفعال شد. لازم به ذکر است که سطوح زمان فراصوت و غلظت آنزیم TG براساس آزمون‌های مقدماتی تعیین شد.

۳.۲. تولید پنیر توفو

پنیر سویا (توفو) به روش سنتی و براساس روش‌های ارائه شده توسط کائو و همکاران (۲۰۰۳) [۳۲] و لیو و همکاران (۲۰۰۴) [۳۳] با تغییراتی جزئی تهیه شد. پس از رساندن دمای شیر سویا از ۹۵ درجه به °C ۷۳، مقدار ۰/۴٪ سولفات کلسیم به‌صورت محلول یک مولار سولفات کلسیم به آن اضافه شد و برای مدت s ۱۰ به‌خوبی هم‌زده شد. سپس برای تکمیل فرآیند انعقاد، مخلوط به مدت min ۲۰ در دمای اتاق بدون هم‌زدن باقی ماند. پس از تشکیل دلمه، لخته به‌آرامی به پارچه پنیر منتقل و آب آن جداسازی شد. پس از آب-گیری نسبی لخته، عمل پرس کردن در دستگاه پرس از جنس استیل ضدزنگ به شکل استوانه‌ای (با قطر داخلی cm ۲۲ با کفی مشبک) در ۳ مرحله و به ترتیب تحت فشار تقریبی ۲۰، ۴۰ و g/cm^2 ۶۰ در مدت min ۲۰ برای هر مرحله انجام شد. سپس پارچه از پنیر جدا شد و جهت محاسبه راندمان، پنیر به‌دست‌آمده توزین گردید. توفوی تولیدشده در داخل ظروف پلی‌اتیلن قرار داده شد و با محلول سرد آب نمک ۹٪ پوشانده شد و برای مدت ۶۰ روز (۰، ۳۰ و ۶۰) در یخچال (دمای °C ۷) جهت انجام آزمایش‌ها نگهداری شد.

۴.۲. اندازه‌گیری راندمان تولید پنیر

میزان راندمان براساس نسبت وزن پنیر حاصل (وزن مرطوب) به وزن شیر مصرفی تعیین شد [۲۰].

۵.۲. ارزیابی برخی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پنیر

pH نمونه‌ها با استفاده از دستگاه pH متر دیجیتال Metrohm (مدل ۸۲۷، ساخت سوئیس) و کالیبره کردن دستگاه با دو بافر ۴ و ۷؛ چربی توسط روش حجمی ژربر و استفاده از بوتیرویمتر؛ رطوبت نمونه‌های پنیر به روش آون-

1. Cheesecloth

گذاری در دمای ۱۰۵ °C در دمای حدود ۵ h تا رسیدن به وزنی ثابت؛ و مقدار پروتئین کل از طریق حاصل‌ضرب مقدار نیتروژن به‌دست‌آمده به روش کلدال در فاکتور ۶/۲۵ مطابق روش‌های AOAC (۲۰۰۲) اندازه‌گیری شد [۳۴].

۵.۲. ارزیابی ویژگی‌های رنگ

برای سنجش رنگ از دستگاه رنگ‌سنج هانترلب (Minolta CR300 Series، ژاپن) استفاده گردید و شاخص‌های رنگ L* (روشنایی)، b* (آبی زردی) و a* (سبزی-قرمزی) تعیین شد [۳۵]. قبل از اندازه‌گیری رنگ، دستگاه با استفاده از صفحه سفید مخصوص استاندارد دستگاه (L*= ۹۴/۴۳، ۰/۲۵- = a* و ۲/۰۴ =b*) کالیبره و تنظیم گردید.

۶.۲. بررسی ریزساختار توفو

بررسی ریزساختار نمونه‌های توفوی تولیدی توسط دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل XL30 شرکت فیلیپس (آمستردام، هلند) انجام پذیرفت. به‌منظور بررسی تأثیر فرایند فراصوت و تیمار آنزیمی ترانس‌گلوتامیناز بر ریزساختار نمونه‌های پنیر تولیدی، تصاویر میکروسکوپ الکترونی مطابق روش جوینده و همکاران (۲۰۱۷) گرفته شد. ابتدا نمونه‌های توفو به کمک چسب نقره بر روی پایه آلومینیومی چسبانده شدند. نمونه‌ها به مدت ۶ min با استفاده از دستگاه اسپاترکوتر[1] (مدل A450X، شرکت EMITECH، ساخت انگلیس) تا نقطه بحرانی خشک‌شده و به مدت ۵ min طلا-افشانی شدند. تصویربرداری از نمونه‌ها به‌وسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی با ولتاژ ۲۰ KW و در بزرگنمایی‌های مختلفی انجام گرفت [۳۶].

۷.۲. تجزیه‌وتحلیل آماری

در این تحقیق با توجه به دو متغیر درصد آنزیم (در ۳ سطح ۰، ۰/۳۵ و ۰/۷ واحد آنزیم به ازای هر گرم پروتئین) و زمان اولتراسوند (در ۳ سطح ۰، ۱۵ و ۳۰ min)، تعداد ۹ تیمار در سه تکرار تولید شد و نمونه‌های پنیر سویا طی مدت یک ماه نگهداری (در ۳ سطح ۰، ۳۰ و ۶۰ روز) در یخچال ارزیابی شدند. نمونه پنیر تهیه‌شده از شیر سویا (فاقد آنزیم و تیمار اولتراسوند) به‌عنوان نمونه شاهد در نظر گرفته شد. تجزیه و نتایج توسط آزمون فاکتوریل (۳×۳) در قالب طرح کاملاً تصادفی با کمک برنامه آماری SPSS ویرایش ۲۴ آنالیز و میانگین نتایج به کمک آزمون دانکن در سطح ۵٪ مقایسه گردیدند. از نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۳ برای ترسیم نمودارها استفاده شد.

۳. نتایج و بحث

۱.۳. راندمان تولید توفو

نتایج تجزیه واریانس تأثیر تیمارهای فراصوت و آنزیم TG شیر سویا بر میزان راندمان تولید نمونه‌های پنیر سویا طی مدت یک ماه نگه‌داری در یخچال در جدول (۱) و نیز شکل (۱) نشان داده شده است. مطابق نتایج به‌دست‌آمده، به غیر از زمان نگهداری، دو متغیر تیمار فراصوت و TG تأثیر معنی-داری بر مقادیر راندمان تولید نمونه‌های پنیر داشتند.

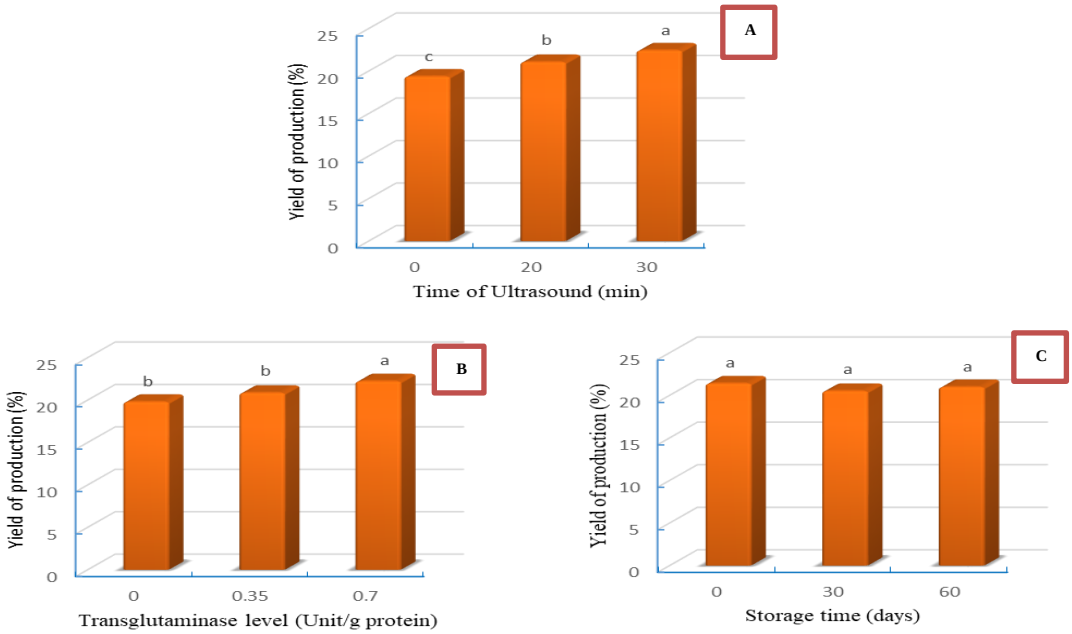
مطابق شکل (۱-الف)، با افزایش زمان تیمار فراصوت، مقدار راندمان تولید توفو به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($p<0/001$). افزایش ۲۰ درصدی راندمان تولید توفو می‌تواند به‌دلیل افزایش درصد استخراج ترکیبات سویا به‌داخل شیر سویا و در نهایت ورود آن‌ها به توفو می‌باشد. فهیم و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که هنگام تیمار فراصوت شیرابه سویا (شدت ۳۵ KHz در دمای ۴۰ °C)، با افزایش زمان از ۲۰ به ۶۰ min، میزان درصد مواد جامد شیر سویا از ۵/۸۶٪ به ۶/۱۱٪ افزایش یافت، درحالی‌که مقدار مواد جامد در نمونه شاهد (بدون تیمار فراصوت) تنها ۳/۱۸٪ تعیین گردید [۳۷]. همچنین، این محققین افزایش درصد استخراج پروتئین شیر سویا را درنتیجه تیمار فراصوت و نیز افزایش زمان آن اعلام کردند. درهرحال، علاوه بر افزایش میزان استخراج ترکیبات سویا به داخل شیر سویا، علت افزایش راندمان تولید توفو در تحقیق حاضر به‌دلیل رطوبت بالاتر نمونه‌ها می‌باشد، چرا که همان‌گونه که در جدول (۱) می‌توان مشاهده نمود، افزایش زمان تیمار فراصوت اثر معنی‌داری بر درصد رطوبت نمونه-های توفو داشت ($p<0/001$) و در این میان تیمار مذکور

1. Sputter-coater

سبب کاهش معنی‌دار مقادیر چربی و پروتئین نمونه‌های توفو گردید.

علاوه بر زمان فراصوت، تیمار آنزیمی TG شیر سویا سبب افزایش قابل توجه ($p<۰/۰۱$) راندمان تولید گردید (شکل ۱-ب). افزایش ۱۳ درصدی راندمان تولید توفو درنتیجه تیمار آنزیمی TG احتمالاً به‌دلیل افزایش WHC و رطوبت پنیر می‌باشد که توسط بسیاری از محققین گزارش شده است [۱۰، ۱۶، ۲۲]. آنزیم TG با ایجاد اتصالات جانبی درون و برون مولکولی میان ε-لیزین و γ-گلوتامیل به‌شکل مؤثری سبب افزایش قابلیت نگهداری آب در فرآورده می‌شود.

نتایج این تحقیق نشان داد زمان نگهداری تأثیر معنی‌داری ($p>۰/۰۵$) بر میزان راندمان تولید توفو نداشت (جدول ۱). مطابق شکل (۱-ج)، هرچند با گذشت ۳۰ روز از زمان نگهداری محصول در یخچال، میزان راندمان تولید کمی کاهش یافت؛ اما در ادامه و در انتهای مدت ۶۰ روز نگهداری، مقدار راندمان مجدداً به‌طور جزئی افزایش یافت. علت کاهش راندمان در اواسط زمان نگهداری احتمالاً به‌دلیل نگهداری توفو در محلول آب‌نمک و خروج آب از محصول به علت پدیده انتشار می‌باشد [۳۸]. توفو غالباً در آب معمولی نگهداری می‌شود اما با توجه به ذایقه مردم ایران، محصول شبه‌لبنی تولیدشده در این تحقیق در محلول آب نمک نگهداری شد. افزایش جزئی راندمان در پایان مدت ۶۰ روز نگهداری نیز می‌تواند به دلیل پروتئولیز و شکسته شدن پروتئین‌ها به پپتیدهای با زنجیره کوتاه و اسیدهای آمینه توسط برخی میکروب‌ها به‌واسطه آلودگی ثانویه توفو باشد چراکه درصد نسبتاً پایین نمک نمی‌تواند به شکل مؤثری مانع از فعالیت میکروب‌های عامل فساد گردد. فرایند هیدرولیز مذکور سبب افزایش رطوبت پنیر می‌گردد [۳۸]. افزایش راندمان و مقدار رطوبت توفو در این تحقیق درنتیجه هیدرولیز اشاره شده بسیار جزئی بود که دلیل آن می‌تواند مقاومت بالاتر شبکه پروتئینی سویا در برابر هیدرولیز به‌واسطه تیمار آنزیمی TG باشد [۳۹] و علت اصلی تغییرات راندمان درنتیجه گذشت زمان نگهداری همان‌طور که بیان شد به دلیل تغییرات رطوبت نمونه‌ها می‌باشد. در هرحال همان‌گونه که اشاره گردید تغییرات راندمان و رطوبت درنتیجه گذشت زمان نگهداری غیرمعنی‌دار بود.



شکل (۱) مقایسه راندمان توفو تحت تأثیر: الف) مدت زمان فراصوت، ب) غلظت آنزیم ترانس‌گلوتامیناز و ج) زمان نگهداری در یخچال. حروف انگلیسی مختلف نشان‌دهنده اختلافات معنی‌دار می‌باشد ($p<۰/۰۵$).

Fig 1. Comparison of yield of tofu as affected by: A) time duration of ultrasound, B) transglutaminase (TG) concentration and C) storage time at refrigerator. Different letters represent significant differences ($p<0.05$).

۲.۳. ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی

نتایج تجزیه واریانس و میزان معنی‌داری تأثیر تیمار فراصوت و غلظت آنزیم بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی پنیر سویا طی نگهداری در یخچال در جدول (۱) نشان داده شده است. همان‌طور که این جدول می‌توان مشاهده نمود، هرچند تیمار فراصوت به‌غیراز pH بر ترکیبات شیمیایی توفو تأثیر معنی‌داری داشت، اما تیمار آنزیم TG تنها بر مقدار رطوبت تأثیر معنی‌داری داشت و زمان نگه‌داری نیز تأثیری بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی مذکور نداشت. به‌علاوه، براساس نتایج آنالیز واریانس داده‌ها، میان متغیرهای مورد بررسی اثر متقابل معنی‌داری بر pH و ترکیبات پنیر سویا مشاهده نگردید (جدول ۱).

نتایج نشان داد که با افزایش غلظت آنزیم، مقدار رطوبت ($p<۰/۰۵$) و راندمان ($p<۰/۰۰۱$) افزایش و مقادیر pH، پروتئین و چربی تفاوت معنی‌داری نکرد ($p>۰/۰۵$). افزایش زمان فراصوت نیز به‌طور معنی‌داری باعث افزایش رطوبت و راندمان پنیرسازی ($p<۰/۰۰۱$) و کاهش پروتئین ($p<۰/۰۵$) و چربی ($p<۰/۰۱$) نمونه‌های شبه‌پنیر گردید (جدول ۱). همچنین با گذشت زمان نگهداری هرچند به‌طور کلی مقادیر راندمان و رطوبت نمونه‌ها کاهش و pH افزایش یافت اما این تغییرات معنی‌داری نبود. مقدار رطوبت نمونه‌های توفو در زمان‌های ۰، ۳۰، ۶۰ روز نگهداری به‌ترتیب ۶۹/۷۳، ۶۹/۱۲ و ۶۹/۳۹ درصد و pH به‌ترتیب ۶/۹۸، ۷/۱۸ و ۷/۲۴ تعیین شد. مقادیر چربی و پروتئین نیز تا اواسط زمان نگهداری به مقدار جزئی افزایش و سپس در پایان زمان نگهداری کاهش یافتند ($p>۰/۰۵$). مقدار چربی در دوره‌های ۰، ۳۰، ۶۰ روز نگهداری به‌ترتیب ۳/۵۶، ۳/۷۵ و ۳/۶۶٪ و پروتئین ۱۵/۲۵، ۱۵/۴۱ و ۱۵/۲۳٪ تعیین شد.

تیمار آنزیمی سبب افزایش مقادیر رطوبت نمونه‌های توفو گردید که دلیل آن پیوندهای ایزوپپتیدی میان پروتئین‌ها و به‌دام افتادن رطوبت در شبکه پروتئینی می‌باشد. مقدار رطوبت در نمونه‌های توفوی شاهد، و تیمار شده با ۰/۳۵ و ۰/۷ واحد آنزیم به ازای هر گرم پروتئین به‌ترتیب ۶۸/۹۱، ۶۹/۴۴ و ۶۹/۸۸ ٪ تعیین شد. در مطابقت با نتایج این پژوهش، دیکینسون و یاماموتو (۱۹۹۶) افزایش نسبت رطوبت به پروتئین را در پنیر سفید کم‌چرب حاوی ترانس گلوتامیناز (۱۵ واحد TG در هر لیتر شیر) نسبت به نمونه‌ی شاهد (فاقد آنزیم) گزارش کردند [۴۰]. کائو و همکاران (۲۰۱۷) نیز کاهش سفتی ژل را در توفوی تهیه شده با استفاده از آنزیم گزارش کردند [۴۱].

جدول (۱) آنالیز واریانس (ANOVA) برخی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نمونه‌های پنیر سویای تیمار شده با فراصوت و ترانس‌گلوتامیناز طی مدت دو ماه نگهداری سرد.

Table 1. Analysis Variance (ANOVA) for some of physicochemical parameters of soy cheese samples treated with ultrasound and transglutaminase during 2 months cold storage period.

Changes sources	Degree of freedom	Mean square				
		Yield	pH	Moisture	Protein	Fat
Enzyme levels	2	26.78^{***}	0.06^{NS}	4.29^{*}	0.55^{NS}	0.12^{NS}
Time of ultrasound	2	42.49^{***}	0.13^{NS}	29.80^{***}	2.36^{*}	0.56^{**}
Storage time	2	3.62^{NS}	0.33^{NS}	1.66^{NS}	1.17^{NS}	0.17^{NS}
Enzyme × Time of Ultrasound	4	0.01^{NS}	0.00^{NS}	0.01^{NS}	0.01^{NS}	0.00^{NS}
Storage time × Time of Ultrasound	4	0.01^{NS}	0.02^{NS}	0.08^{NS}	1.53^{NS}	0.01^{NS}
Enzyme × Storage time	4	0.03^{NS}	0.00^{NS}	0.02^{NS}	0.01^{NS}	0.00^{NS}
Enzyme × Time of Ultrasound × Storage time	8	0.04^{NS}	0.00^{NS}	0.07^{NS}	0.00^{NS}	0.00^{NS}
Error	27	2.46	0.15	1.21	0.65	0.09

NS، *، ** و *** به‌ترتیب نشان‌دهنده غیرمعنی‌دار و معنی‌دار بودن در سطوح ۹۵، ۹۹ و ۹۹/۹ درصد می‌باشد.

NS, *, **, and *** represent non significant, significant at $p<0.05$, significant at $p<0.01$ and significant at $p<0.001$; respectively.

همان‌طور که قبلاً اشاره گردید، با افزایش زمان تیمار فراصوت انتظار می‌رفت که مقدار استخراج ترکیبات لوبیای سویا و درنتیجه میزان آن‌ها در شیر و درنهایت در پنیر سویا افزایش - یابد و بنابراین نمونه‌های توفوی تیمار شده با فراصوت از مقادیر چربی و پروتئین بالاتری نسبت به نمونه شاهد برخوردار باشند. اما نتایج این تحقیق نشان داد که با انجام تیمار فراصوت و افزایش زمان آن، مقادیر چربی و پروتئین نمونه‌ها کاهش معنی-داری یافت. مقدار پروتئین نمونه‌های توفوی تیمار شده با فراصوت در زمان ۰ (شاهد)، ۱۵ و ۳۰ min به‌ترتیب ۱۵/۵۹، ۱۵/۴۱ و ۱۴/۸۹٪ تعیین شد. این مقادیر برای چربی نمونه-های توفوی تیمار شده با فراصوت به‌ترتیب ۳/۸۲، ۳/۶۷ و ۳/۴۷٪ تعیین شد. کاهش مقادیر پروتئین و چربی نمونه‌های توفو درنتیجه تیمار فراصوت می‌تواند به علت افزایش معنی‌دار رطوبت فرآورده باشد. حسینی بهری و اسماعیل‌زاده کناری (۲۰۱۸) در تحقیقی در مورد تأثیر تیمار فراصوت بر پنیر سفید ایرانی گزارش کردند که فراصوت سبب کوچک شدن میسل‌های کازئین می‌گردد و به دنبال آن به دلیل افزایش جذب سطحی رطوبت توسط کازئین‌های خردشده، مقدار رطوبت پنیر افزایش می‌یابد [۴۲]. همچنین تأثیر فراصوت در این زمینه می‌تواند به‌دلیل کاهش اندازه ترکیبات نظیر چربی و پروتئین سویا باشد [۴۳] که طبیعتاً حالت اخیر می‌تواند تأثیر بسزایی در کاهش به دام افتادن این ترکیبات در دلمه در هنگام فرایند تبدیل شیر به پنیر سویا داشته باشد.

۳.۳. ویژگی‌های رنگ

در جدول (۲)، نتایج مربوط به آنالیز رنگ پنیرهای سویای مختلف طی دوره ۶۰ روزه نگهداری نشان داده شده است. نتایج نشان داد که تیمار آنزیمی TG بر میزان شاخص *L اثر معنی‌داری ($p<۰/۰۱$) داشت (جدول ۲) و سبب روشن‌تر شدن توفو گردید. درهرحال، اختلاف معنی‌داری از این نظر غالباً میان نمونه‌های توفوی حاوی TG آنزیم وجود نداشت، مقدار شاخص *L نمونه‌های توفوی تیمار شده با ۰، ۰/۳۵ و ۰/۷ واحد آنزیم به ازای هر گرم پروتئین به‌ترتیب ۸۱/۵۰، ۸۲/۶۵ و ۸۳/۴۴ ٪ تعیین شد. میزان روشنایی پنیر علاوه بر ترکیبات پنیر مانند گلبول‌های چربی، بستگی به عوامل متعددی دارد که مهمترین آن‌ها میزان تخلخل پنیر و هیدراتاسیون یا میزان آب موجود در دلمه می‌باشد. با افزایش میزان منافذ پنیر و کاهش آب دلمه، مقدار شاخص *L افزایش می‌یابد [۳۵]. بنابراین با توجه به افزایش شاخص *L نمونه‌های توفوی تیمار شده با آنزیم TG، می‌توان عنوان نمود که اثر مثبت افزایش منافذ دلمه بر روشنایی پنیر بیش از تأثیر منفی افزایش آب دلمه بر این شاخص است. نتایج ریزساختار مؤید افزایش منافذ شبکه پروتئینی پنیر سویا درنتیجه تیمار آنزیمی TG بود (شکل ۲). دانش و همکاران [۴۴] در نتایجی مشابه روی پنیر لبنی فراپالوده نشان دادند که تیمار آنزیمی به‌همراه تلفیق پروتئین‌های آب پنیر سبب افزایش تعداد حفره‌های سرمی و ایجاد بافتی متخلخل در پنیر می‌گردد. به‌علاوه، میزان روشنایی در تمامی نمونه‌های تولیدی طی دوره رسیدن کاهش یافت ($p<۰/۰۵$). افزایش هیدراتاسیون پروتئین ها و کاهش قطرات آب آزاد در طی دوره رسیدن می‌تواند دلیل اصلی کاهش بازتاب نور و میزان سفیدی نمونه‌های پنیر باشد [۴۵]. برخلاف تیمار آنزیمی، تیمار فراصوت سبب کاهش مقدار روشنایی نمونه‌های پنیر توفو گردید که دلیل آن همان‌گونه که اشاره شد احتمالاً مقدار رطوبت بالاتر فرآورده می‌باشد. همان-طور که در جدول (۲) می‌توان ملاحظه نمود، شاخص‌های رنگ *a و *b نیز تحت تأثیر تیمارهای آنزیمی و فراصوت قرار گرفتند ($p<۰/۰۵$). به‌طورکلی هرچه مقدار *b به سمت منفی پیش رود رنگ ماده غذایی به آبی متمایل می‌شود و هرچه میزان آن به سمت مثبت پیش رود، محصول زردتر می‌گردد. همچنین هرچه میزان *a به سمت منفی پیش برود، رنگ ماده غذایی به سبز متمایل می‌شود و در نقطه مقابل، هرچه مقدار *a به سمت مثبت آن پیش رود، محصول قرمزتر می-گردد. نتایج نشان داد با افزایش مقدار زمان تیمار فراصوت، شاخص *a و *b افزایش یافت که دلیل آن می‌تواند افزایش نسبت ترکیباتی به‌غیر از چربی و پروتئین در فرآورده باشد. همان‌گونه که قبلاً اشاره شد، تیمار فراصوت سبب کاهش قابل توجه مقادیر پروتئین و چربی در نمونه‌های پنیر توفو گردید. در مورد تیمار آنزیمی نیز با افزایش غلظت TG، شاخص *a و *b کاهش معنی‌داری یافت. در نتایجی مشابه، حبیشی و همکاران (۲۰۲۲) در مطالعه‌ای در مورد تأثیر تیمار آنزیمی TG بر ویژگی‌های پنیر موزارلا شبه‌لبنی افزایش شاخص *L و کاهش شاخص‌های *a و *b را در نتیجه تیمار آنزیمی TG گزارش کردند [۴۶]. درهرحال، ترابی و همکاران هرچند افزایش

شاخص *L را در پنیر سفید فراپالوده سین‌بیوتیک حاوی آنزیم TG گزارش کردند، اما تفاوت معنی‌داری در مقادیر شاخص‌های *a و *b با نمونه پنیر فاقد آنزیم مشاهده نکردند [۳۵]. عباباف و همکاران (۲۰۱۸) نیز در مطابقت با نتایج این تحقیق افزایش شاخص *L و کاهش شاخص *a را در نمونه‌های ماست سویا درنتیجه تیمار آنزیمی (۰/۰۴۵درصد TG) شیرسویا گزارش کردند [۴۷].

جدول (۲) نتایج آنالیز واریانس مربوط به ویژگی‌های رنگ نمونه‌های مختلف پنیر سویای تیمار شده با فراصوت و ترانس‌گلوتامیناز طی مدت دو ماه نگهداری سرد.

Table 2. Result of analysis variance related to color parameters of different soy cheeses treated with ultrasound and transglutaminase during 2 months cold storage period.

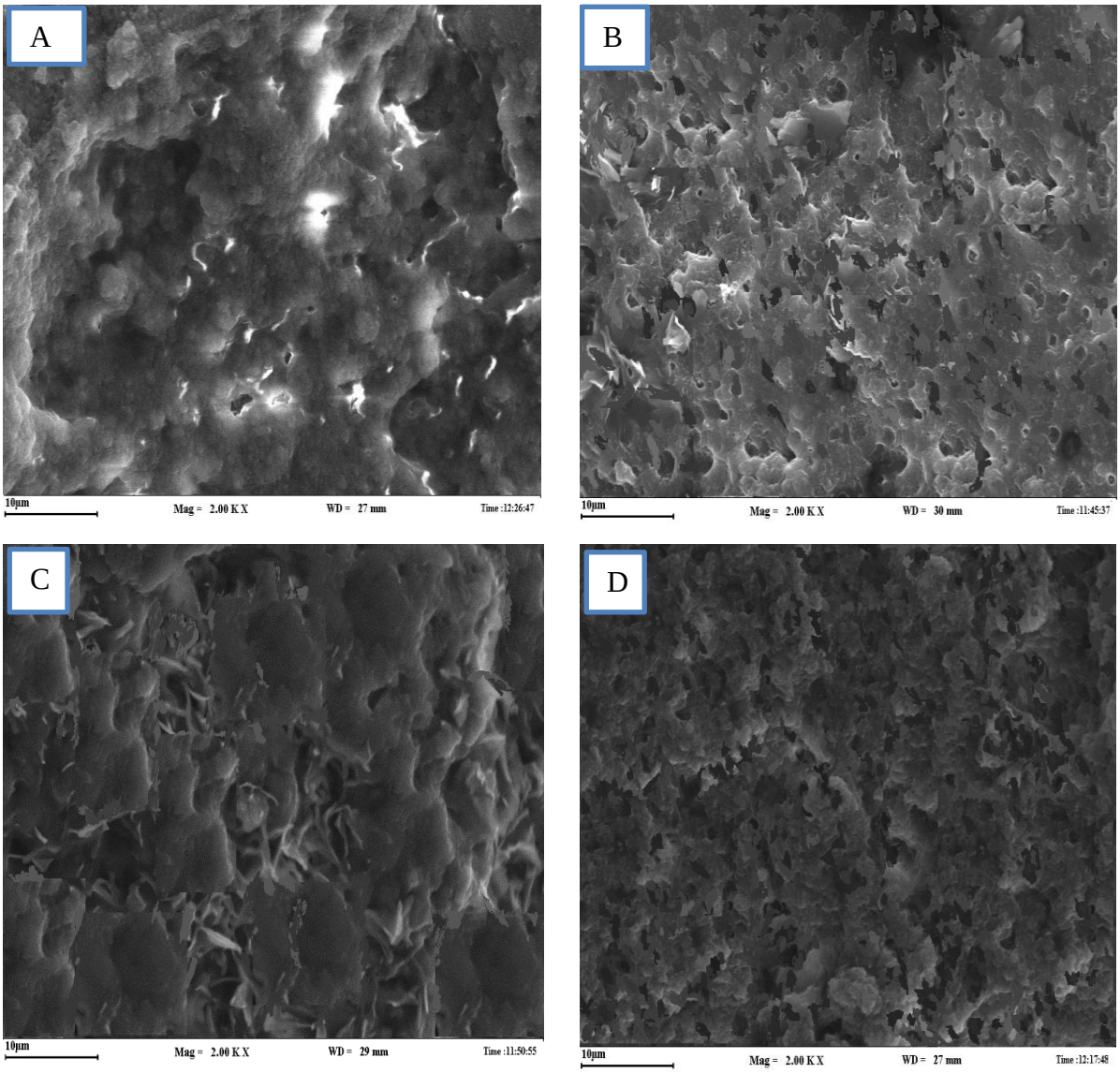
Color Index	Enzyme concentration (Unit/g soymilk protein)	Time duration of ultrasound (min)		
		0	15	30
L*	0	83.19 ±1.96^{abc}	82.08 ±2.11^{cd}	79.22 ±2.19^{e}
	0.35	84.45 ±2.01^{ab}	82.96 ±1.83^{bcd}	80.54 ±2.15^{de}
	0.7	85.16 ±1.70^{a}	83.41 ±2.31^{abc}	81.77 ±2.33^{cd}
a*	0	2.40 ±0.41^{cd}	2.87 ±0.29^{ab}	3.22 ±0.38^{a}
	0.35	2.39 ±0.33^{cd}	2.72 ±0.40^{bc}	3.02 ±0.44^{ab}
	0.7	2.01 ±0.36^{d}	2.41 ±0.36^{cd}	2.88 ±0.39^{ab}
b*	0	7.99 ±0.50^{cd}	8.48 ±0.39^{abcd}	9.37 ±0.65^{a}
	0.35	7.65 ±0.65^{d}	8.18 ±0.42^{bcd}	9.03 ±0.39^{ab}
	0.7	7.61 ±0.53^{d}	8.03 ±0.51^{cd}	8.64 ±0.35^{abc}

حروف مختلف انگلیسی برای هر شاخص رنگ نشان‌دهنده اختلافات معنی‌دار در سطح p<۰/۰۵ می‌باشد.

Different letters for each color index represent significant differences at level of P<0.05.

۴.۳. ارزیابی ریزساختار توفو

تأثیر تیمار فراصوت و تیمار آنزیمی ترانس‌گلوتامیناز بر ریزساختار پنیر سویا در شکل (۲) نشان داده شده است. همان‌گونه که در تصاویر میکروسکوپ الکترونی مشاهده می‌گردد، ماتریکس پروتئینی پنیر تحت تأثیر تیمار فراصوت قرار گرفت و این فرایند سبب ایجاد ساختار پروتئینی بازتری به‌همراه فضاهای خالی بیشتر در بافت پنیر (شکل ۲-ب) نسبت به نمونه شاهد (شکل ۲-الف) گردید. در مقابل، تیمار آنزیمی ترانس‌گلوتامیناز به‌شکل قابل توجهی موجب فشرده‌شدن ماتریس پروتئینی نمونه پنیر سویا گردید (شکل ۲-ج). در نتایجی مشابه، دانش و همکاران (۱۳۹۶b) در بررسی تأثیر آنزیم ترانس‌گلوتامیناز بر ویژگی‌های پنیر فراپالوده گزارش کردند که افزایش آنزیم ترانس‌گلوتامیناز به دلیل افزایش اتصال‌های درون و برون مولکولی پروتئین‌های شبکه کازئینی، سبب تغییرات قابل توجه در بافت و ریزساختار پنیر می‌گردد. با توجه به تصاویر میکروسکوپ الکترونی (شکل ۲)، مشخص شد که با تلفیق تیمار فراصوت و تیمار آنزیم ترانس‌گلوتامیناز، نمونه پنیر (شکل ۲-د) از ساختاری مشابه با نمونه شاهد برخوردار گردید و اتصالات ایجادشده توسط آنزیم، توانست ساختار ماترسی پروتئینی پنیر را که درنتیجه تیمار فراصوت آسیب دیده بود به‌خوبی بهبود بخشد.



شکل (۲) تأثیر فرایند فراصوت و تیمار آنزیمی ترانس‌گلوتامیناز بر ریزساختار پنیر سویا. الف) پنیر بدون تیمار فراصوت و تیمار آنزیمی، ب) پنیر تیمار شده با فراصوت (به مدت ۳۰ min) و بدون تیمار آنزیمی، ج) تیمار بدون فراصوت و با تیمار آنزیمی (۰/۷ واحد به ازای هر گرم پروتئین)، و د) پنیر تیمار شده با فراصوت (۳۰ min) و تیمار آنزیمی (۰/۷ واحد به ازای هر گرم پروتئین).

Fig. 2. Effect of treatments of ultrasound and transglutaminase on microstructure of soy cheese. A) Cheese without of treatments of ultrasound and transglutaminase, B) cheese treated with ultrasound (for 30 min) without transglutaminase, C) cheese treated with transglutaminase (0.7 Unit/g protein) without ultrasound and D) cheese treated with ultrasound (for 30 min) and transglutaminase (0.7 Unit/g protein) treatments

۴. نتیجه‌گیری

توفو یک ژل تشکیل‌شده بر پایه سوسپانسیون آبی است که غالباً به روش اسیدی یا توسط املاح منعقد کننده تهیه می‌شود. همانند پنیر لبنی، مهمترین مواد تشکیل‌دهنده پنیر شبه‌لبنی سویا دو ترکیب پروتئین و چربی است که سایر ترکیبات با ارزش مابین شبکه پروتئینی قرار می‌گیرند. امروزه به‌دلیل ارزش بالای غذایی و دارویی محصولات سویا من‌جمله فرآورده‌های شبه‌لبنی آن، توجه عموم مردم به مصرف این محصولات جلب شده است. علاوه بر پروتئین با ارزش و چربی فاقد کلسترول، به دلیل وجود ترکیباتی مانند املاح، ویتامین‌ها و ایزوفلاون‌ها مصرف شیر سویا و توفو طی سالیان اخیر در نقاط مختلف دنیا افزایش یافته است. بنابراین لازم

است جهت تولید و معرفی این محصولات در کشورمان اقدام مناسبی صورت گیرد. این تحقیق به‌منظور بررسی امکان استفاده از فرایند فراصوت و تیمار آنزیمی ترانس‌گلوتامیناز شیر سویا بر راندمان و کیفیت توفو انجام پذیرفت. نتایج مطالعات انجام‌شده در این زمینه کاربرد جداگانه تیمارهای مذکور مؤید آن بوده است که راندمان و کیفیت پنیر سویا با کمک هر یک از آن‌ها بهبود می‌یابد. نتایج این تحقیق نشان داد که با افزایش سطوح هر دو تیمار، مقدار راندمان پنیر افزایش می‌یابد به‌طوری که بالاترین راندمان توفو به میزان ۲۳/۷۳٪ درصورت به‌کارگیری ۰/۷ واحد آنزیم TG به ازای هر گرم پروتئین همراه با ۳۰ min تیمار فراصوت به دست می‌آید؛ اما درهرحال با افزایش زمان تیمار فراصوت، کیفیت محصول کاهش می‌یابد. بنابراین، برای به دست آوردن راندمان و کیفیتی مناسب، پیشنهاد می‌گردد که زمان تیمار فراصوت به‌مدت ۱۵ min کاهش یابد و میزان راندمان (۲۲/۳۴٪) در چنین شرایطی بالاتر از راندمان نمونه شاهد (۱۸/۱۷٪) به‌دست می‌آید.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب سپاس خود را از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان بابت پشتیبانی از این تحقیق اعلام می‌دارند.

منابع

[1] Jooyandeh, H. (2011). Soy Products as Healthy and Functional Foods. *Middle East J. Sci. Res*, *7*(1), 71-80.

[2] Matthews, V. L., Synnove, F., Knutsen, W., Lawrence, B., & Gary, E. F. (2011). Soy milk and dairy consumption is independently associated with ultrasound attenuation of the heel bone among postmenopausal women: the Adventist Health Study. *Nutr. Research*, *31*, 766-775.

[3] Ferragut, V., Cruz, N. S., Trujillo, A., Guamis, B., & Capellas, M. (2009). Physical characteristics during storage of soy yogurt made from ultra-high pressure homogenized soymilk. *J. Food Eng*., *92*, 63-69.

[4] Morell, P., Hernando, I., lorcat, E. L., & Fiszman, S. (2015). Yogurts with an increased protein content and physically modified starch: rheological, structural, oral digestion and sensory properties related to enhanced satiating capacity. *Food Res. Int.*, *70*, 64-73.

[5] Sarani, R., Mohtadinia, J., & Asghari Jafarabadi, M. (2015). The Use Of The Withania Coagulans As A Coagulant In The Production Of Soya Cheese And The Effect Of Various Additives On The Sensory Properties. *J. Food Res.*, *25*(4), 677-687. [In Persian]

[6] Guo, J., Yang, X. Q., He, X. T., Wu, N. N., Wang, J. M., Gu, W., & Zhang, Y. Y. (2012). Limited aggregation behavior of *β*-conglycinin and its terminating effect on glycinin aggregation during heating at pH 7.0. *J. Agric. Food Chem.*, *60*(14), 3782–3791.

[7] Avilés-Gaxiola, S., Chuck-Hernández, C., & Serna Saldivar, S. O. (2018). Inactivation methods of trypsin inhibitor in legumes: A review. *J. Food Sci.*, *83*(1), 17–29.

[8] Borhan, M. & Snyder, H. E. (1979). Lipoxygenase destruction in whole soybeans by combinations of heating and soaking in ethanol. *J. Food Sci.*, *44*(2), 586-590.

[9] Lim, B., Deman, J., Deman, L., & Buzzel, R. (2006). Yield and quality of tofu as affected by soybean and soymilk characteristics Calcium sulfate coagulant. *J. Food Sci.*, *55*, 1088-1092.

[10] Jooyandeh, H., Mortazavi S. A., Farhang P. & Samavati V. (2015). Physicochemical Properties of Set-Style Yoghurt as Effect by Microbial Transglutaminase and Milk Solids Contents. *J. Appl. Environ. Biol. Sci.*, *4*(11S), 59-67.

[11] Jooyandeh, H. (2022). *Application of enzymes in dairy products*. (*1st ed.*), Khuzestan Agricultural Sciences and Natural Resources University Press. [In Persian]

[12] Kouravand, F., Jooyandeh, H., Barzegar, H. & Hojjati, M. (2018). Characterization of cross- linked whey protein isolate- based films containing *Satureja khuzistanica* Jamzad essential oil. *J. Food Process. Preserv*., *42*(3), e13557, 1-10.

[13] Saeidi, Z., Nasehi, B., & Jooyandeh, H. (2018). Optimization of gluten-free cake formulation enriched with pomegranate seed powder and transglutaminase enzyme. *J. Food Sci. Technol.*, *55*(8), 3110–3118.

[14] Jooyandeh, H., Mahmoodi, R., Samavati, V., & Hojjati, M. (2015). Effect of cold enzymatic treatment of milk by transglutaminase on textural properties of yogurt. *J. Food Sci. Technol. (Iran)*, *13*(1), 91-99. [In Persian]

[15] Danesh, E., Goudarzi, M., & Jooyandeh, H. (2018). Transglutaminase-mediated incorporation of whey protein as fat replacer into the formulation of reduced-fat Iranian white cheese: physicochemical, rheological and microstructural characterization. *J. Food Meas. Charact.*, *12*(4), 2416-2425.

[16] Torabi, F., Jooyandeh, H., & Noshad, M. (2021). Evaluation of physicochemical, rheological, microstructural, and microbial characteristics of synbiotic ultrafiltrated white cheese treated with transglutaminase. *J. Food Process. Preserv.*, *45*, e15572, 1-11.

[17] Danesh, E., Goudarzi, M., & Jooyandeh, H. (2017). Effect of whey protein addition and transglutaminase treatment on the physical and sensory properties of reduced-fat ice cream. *J. Dairy Sci.*, *100*, 5206–5211.

[18] Beirami F., Hojjati M. & Jooyandeh H. (2021). The effect of microbial transglutaminase enzyme and Persian gum on the characteristics of traditional kefir drink. *Int. Dairy J.*, *112*, 1-13 (104843).

[19] Ababaf, Kh., Jooyandeh, H., & Nasehi, B. (2019). Effect of transglutaminase enzyme treatment on the physicochemical and microbial properties of synbiotic soy yogurt. *J. Food Res.*, *30*(3), 189-201. [In Persian]

[20] Jooyandeh, H. (2014). Production of soy cheese according to irannian preferences. In: Proceeding of the *2nd Natl. Cong. Food Sci. & Technol. (pp. 1-6)*, 28-29 April, Gorgan, Iran. [In Persian]

[21] Tang, C. H., Li, L., Wang, J. L., & Yang, X. Q. (2007). Formation and rheological properties of 'cold-set' tofu induced by microbial transglutaminase. *LWT-Food Sci. Technol.*, *40*(4), 579–586.

[22] Zhu, J., Deng, H., Yang, A., Wu, Z., Li, X., Tong, P., & Chen, H. (2019). Effect of microbial transglutaminase cross-linking on the quality characteristics and potential allergenicity of tofu. *Food Funct.*, *10*(9), 5485–5497.

[23] Xing, G., Giosafatto, C. V. L., Rui, X., Dong, M., & Mariniello, L. (2019). Microbial transglutaminase-mediated polymerization in the presence of lactic acid bacteria affects antigenicity of soy protein component present in bio-tofu. *J. Funct. Foods*, *53*, 292–298.

[24] Jooyandeh, H., & Habibi, A. (2019). Application of ultrasound in food industry. In: Proceeding of the *4th Int. Conf. on Agr. Eng. Nat. Resour. Environ. (pp. 1-16)*, 11 Feb, Tehran, Iran. [In Persian]

[25] Bermudez-Aguirre, D., Mawson, R., & Barbosa-Canovas, G. V. (2008). Microstructure of fat globules in whole milk after thermosonication treatment. *J. Food Sci.*, *73*(7), E325–E332.

[26] Telis-Romero, J., Váquiro, H. A., Bon, J., & Benedito, J. (2011). Ultrasonic assessment of fresh cheese composition. *J. Food Eng.*, *103*(2), 137–146.

[27] Körzendörfer, A., Schäfer, J., Hinrichs, J., & Nöbel, S. (2019). Power ultrasound as a tool to improve the processability of protein-enriched fermented milk gels for Greek yogurt manufacture. *J. Dairy Sci.*, *102*(9), 2826-7837.

[28] Bhardwaj, H., Bhagsari, A., Joshi, J., Rangappa, M., Sapra, V., & Rao, M. (1999). Yield and quality of soymilk and tofu made from soybean genotypes grown at four locations. *Crop Sci.*, *39*(2), 401–405.

[29] Kuo, F. J., Lien, Ch. Ch., Huang, Y. Y., & Ting, Ch. H. (2011). Use of Ultrasound for Measuring Tofu Texture. *Eng. Agric. Environ. Food*, *4*(3), 83-89.

[30] Lin, H. F., Lu, C. P., Hsieh, J. F., & Kuo, M. I.. (2016). Effect of ultrasonic treatment on the rheological property and microstructure of tofu made from different soybean cultivars. *Innov Food Sci Emerg Technol.*, *37*, 98–105.

[31] Zhang, P., Hu, T., Feng, S., Xu, Q., Zheng, T., Zhou, M., et al. (2016). Effect of high intensity ultrasound on transglutaminasecatalyzed soy protein isolate cold set gel. *Ultraso. Sonochem.*, *29*, 380–387

[32] Kao, F. J., Su, N. W., & Lee, M. H. (2003). Effect of calcium sulfate concentration in soymilk on the microstructure of firm tofu and the protein constitutions in tofu whey. *J. Agric. Food Chem.*, *51*(21), 6211–6216.

[33] Liu, Z. S., Chang, S. K., Lio, T., & Tatsumi, E. (2004). Effect of selective thermal denaturation of soybean proteins on soymilk viscosity and tofu's physical properties. *Food research international*, *37*, 815-822.

[341] AOAC. (2002). *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 17th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD.

[35] Torabi, F., Jooyandeh, H., Noshad, M., & Barzegar, B. (2019). Texture, color and total acceptance of synbiotic ultrafiltrated white cheese treated with microbial transglutaminase enzyme during storage period. *J. Food Sci. Technol. (Iran)*, *17*(98), 135-145. [In Persian]

[36] Jooyandeh, H., Goudarzi, M., Rostamabadi, H., & Hojjati, M. (2017). Effect of Persian and almond gums as fat replacers on the physicochemical, rheological, and microstructural attributes of low- fat Iranian White cheese. *Food Sci. Nutr.*, *5*, 669-677.

[37] Fahmi, R., Khodaiyan, F., Pourahmad, R. & Emam-Djomeh, Z. (2011). Effect of ultrasound assisted extraction upon the protein content and rheological properties of the resultant soymilk. *Adv. J. Food Sci. Technol. 3*(4), 245-249.

[38] Fox, P. F., Cogan, T. M., Guinee, T. P., & McSweeney, P. L. H. (2017). *Fundamentals of Cheese Science*. (*2nd eds.*), Springer publication, USA.

[39] Zheng, L., Regenstein, J. M., Teng F., & Li, Y. (2020). Tofu products: A review of their raw materials,

processing conditions, and packaging. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf., 19*, 3683–3714.
[40] Dickinson, E., & Yamamoto, Y. (1996). Rheology of milk protein gels and protein-stabilized emulsion gels cross-linked with transglutaminase. *J. Agric. Food Chem., 44*, 1371- 77.
[41] Cao, F. H., Li, X. J., Luo, S. Z., Mu, D. D., Zhong, X. Y., Jiang, S. T., et al. (2017). Effects of organic acid coagulants on the physical properties of and chemical interactions in tofu. *LWT-Food Sci. Technol., 85*, 58–65.
[42] Hosseini Bahri, S. M., & Esmaeilzadeh Kenari, R. (2018). The effects of ultrasound waves on yield, texture and some qualitative characteristics of cheese. *Iran. Food Sci. Technol. Res. J*., *14*(3), 41-51.
[43] O'Sullivan, J., Park, M., & Beevers, J. (2016). The effect of ultrasound upon the physicochemical and emulsifying properties of wheat and soy protein isolates. *J. Cereal Sci., 69*, 77–84
[44] Danesh, E., Jooyandeh, H., & Goudarzi, M. (2017). Improving the rheological properties of low-fat Iranian UF-Feta cheese by incorporation of whey protein concentrate and enzymatic treatment of transglutaminase. *J. Food Sci. Technol. (Iran), 14*(67), 285-298. [In Persian]
[45] Rostamabadi, H., Jooyandeh, H., & Hojjati, M. (2017). Optimization of physicochemical, sensorial and color properties of ultrafiltrated low-fat Iranian white cheese containing fat replacers by Response Surface Methodology. *J. Food Sci. Technol. (Iran), 14*(63), 91-106. [In Persian]
[46] Hebishi, E., Nagarajah, J., Thompson, L., Shennan, S., Best, L., Ajayi, O. M. et al. (2022). Impact of microbial transglutaminase and cooking time on functional properties of Mozzarella cheese analogues. *Int. J. Dairy Technol.*, 75(1), 201-213.
[47] Ababaf, Kh., Jooyandeh, H., & Nasehi, B. (2018). *Application of transglutaminase enzyme in production of synbiotic soy yogurt and its effect on the physicochemical, textural, sensorial and microbial properties of product*. M.Sc. Thesis, Agriculture Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.