

تأثیر زمان تیمار آنزیمی ترانس گلوتامیناز میکروبی بر خصوصیات فیلم خوراکی بر پایه ایزوله پروتئین آب پنیر

فرزانه کوراوند^۱، حسین جوینده^{۲*}، حسن برزگر^۳، محمد حجتی^۴

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان
۲. دانشیار، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان
۳. استادیار، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان
۴. دانشیار، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۳/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۳/۲۵)

چکیده

در این مطالعه، تأثیر زمان تیمار آنزیمی ترانس گلوتامیناز میکروبی (MTGase) بر خصوصیات فیلم خوراکی بر پایه ایزوله پروتئین آب پنیر بررسی شد. نتایج نشان داد که خصوصیات فیلم تیمار شده با آنزیم، متأثر از زمان تیمار آنزیمی محلول تشکیل دهنده فیلم است. تیمار با زمان کم (۱ ساعت) به طور معنی داری باعث افزایش مقاومت به کشش (TS) و کاهش درصد افزایش طول تا نقطه شکست (EB) در فیلم در مقایسه با نمونه شاهد شد. در فیلم‌های تیمار شده، میزان TS بتدریج با افزایش زمان از ۱ به ۳ ساعت، کاهش و میزان EB بتدریج افزایش یافت. نفوذپذیری به بخار آب فیلم شاهد در مقایسه با فیلم تیمار شده با آنزیم به مدت ۱ ساعت از $3/6 \times 10^{-1} \text{ gm}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ pa}^{-1}$ به $2/31 \times 10^{-1} \text{ gm}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ pa}^{-1}$ و حلالیت در آب آن از ۳۷/۰۷ به ۱۹/۹۷ درصد کاهش یافت؛ اما همزمان با افزایش زمان، حلالیت در آب و نفوذپذیری به بخار آب افزایش یافت.

واژه های کلیدی: فیلم خوراکی، خواص مکانیکی، آنزیم ترانس گلوتامیناز، ایزوله پروتئین آب پنیر

مقدمه

در سال‌های اخیر نگرانی در مورد آلودگی محیطی ناشی از پلاستیک‌ها منجر به تلاش جهت توسعه فیلم‌های خوراکی^۱ با ویژگی تخریب پذیر شده است (Pérez et al., 2011). ترکیبات اصلی پوشش‌های خوراکی پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها و لیپیدها هستند (Atarés et al., 2010). فیلم خوراکی، یک لایه نازک تشکیل شده از ماتریکس بیوپلیمری است که از پیوستگی و ویژگی فیزیکی مناسبی برخوردار می‌باشد. ضخامت چنین فیلم‌هایی عموماً ۱۰-۲۰ میلز^۲ (۰/۲۵-۰/۰۵ میلی‌متر) است (Jooyandeh, 2011). فیلم‌های خوراکی بر پایه پروتئین شیر دارای استحکام مکانیکی بالا و ممانعت‌کنندگی مناسب نسبت به اکسیژن، چربی و مواد معطر هستند. گرچه به دلیل طبیعت آبدوست، ممانعت‌کنندگی کمی نسبت به رطوبت دارند Seydim (2006) & Sarikus). پروتئین‌های شیر، پروتئین‌های آب پنیر و کازئینات‌ها به دلیل خصوصیات عملکردی بیشتر و ارزش تغذیه‌ای بالا جهت تشکیل فیلم‌های خوراکی مورد مطالعه

بیشتری قرار گرفته‌اند (Sabato et al., 2001).

آب پنیر محصول جانبی کارخانه‌های پنیرسازی است که به عنوان یک افزودنی و بویژه به شکل پودرهای پروتئینی تغلیظ شده WPC^۳ یا ایزوله WPI^۴ در بسیاری از مواد غذایی فرآوری شده مانند فرآورده‌های قنادی، نانواپی، بستنی و غذای کودک بکار برده می‌شود (Wakai & Almenar, 2015). پروتئین آب پنیر تغلیظ شده معمولاً حاوی ۳۰ تا ۷۰ درصد پروتئین و ایزوله پروتئین آب پنیر دارای حداقل ۹۰ درصد پروتئین می‌باشد. علاوه بر کاربرد پروتئین آب پنیر در فرمولاسیون مواد غذایی گوناگون، امروزه توجه خاصی به استفاده از چنین پروتئین‌هایی در تهیه فیلم‌های خوراکی صورت پذیرفته است (Jooyandeh, 2011). فیلم‌های خوراکی بر پایه پروتئین آب پنیر بدون طعم، بدون بو و انعطاف پذیر بوده و بسته به فرمولاسیون، شفاف تا نیمه شفاف هستند. تمام این ویژگی‌ها، آنها را برای کاربرد در صنعت غذا و تکنولوژی مناسب می‌سازد (Sabato et al., 2001). پتانسیل ایزوله پروتئین آب پنیر به عنوان ماده بسته‌بندی به شکل فیلم (Seydim & Sarikus, 2006; Yildirim et al., 1996; Wakai & Almenar, 2015; Tang & Jiang, 2007)، فیلم

* نویسنده مسئول : hosjooy@yahoo.com

1. Edible films
2. Mils

3. Whey protein concentrate

4. Whey protein isolate

چندلایه^۱ (Schmid *et al.*, 2012) و پوشش (Ramos *et al.*, 2012) بررسی شده است. به دلیل خصوصیات آبدوستی ذاتی اکثر پروتئین‌های غذایی و کاربرد وسیع نرم کننده‌های آبدوست در تهیه فیلم‌ها، خصوصیات ممانعت‌کنندگی به رطوبت این فیلم‌ها ضعیف است. در برخی موارد، بطور مثال تحت شرایط رطوبت نسبی بالا، خصوصیات مکانیکی و ممانعت‌کنندگی به گاز فیلم‌های پروتئینی بدتر خواهد شد. بنابراین اکثر تحقیقات بر بهبود خصوصیات متفاوت فیلم‌های پروتئینی متمرکز شده‌اند. تیمارهای فراوانی از جمله تیمار فیزیکی، شیمیایی و روش‌های آنزیمی به منظور بهبود خصوصیات مکانیکی فیلم‌های خوراکی بر پایه پروتئین شامل افزودن عوامل اتصال عرضی شیمیایی بطور مثال آلدئیدها (Ustunol & Mert, 2004)، تیمار حرارتی (Perez-gago & Krochta, 2001)، تیمار با اتصال عرضی توسط آنزیم ترانس‌گلوتامیناز (Yildirim & Hettiarachchy, 1998; Carvalho & Grosso, 2004; Tang *et al.*, 2005; Weng & Gama, 2016; Zheng, 2015; Rostamzad *et al.*, 2016)، تیمار با پرتوی گاما یا فرابنفش (Micard *et al.*, 2000) آزمون شده‌اند. در بین این تیمارها، تیمار آنزیمی به وسیله آنزیم ترانس‌گلوتامیناز به نظر می‌رسد که به دلیل رعایت اثربخشی و ایمنی، پتانسیل بیشتری برای بهبود خصوصیات مکانیکی فیلم‌های پروتئینی داشته باشد (Tang & Jiang, 2007).

آنزیم ترانس‌گلوتامیناز میکروبی (MTGase) که به نام EC 2.3.3.13 نیز شناخته می‌شود، جزء آنزیم‌های ترانسفراز بوده و به‌طور گسترده‌ای در طبیعت وجود دارد. این آنزیم پروتئینی دارای وزن مولکولی ۳۷۳۶۸ دالتون و حاوی ۳۳۱ اسیدآمینه است. آنزیم ترانس‌گلوتامیناز می‌تواند بین اسیدآمینه گلوتامیناز یک پروتئین و لایزین از پروتئین دیگر اتصال ایجاد کند. جالب توجه است که این آنزیم هیچ‌گونه اثر نامطلوبی بر دسترسی زیستی لایزین نداشته و ارزش تغذیه‌ای پروتئین حاصل را نیز تغییر نمی‌دهد (Trachoo & Mistry, 1998). اپتیمم pH فعالیت این آنزیم بین ۵ تا ۹ و بهترین دما برای عملکرد آن بین ۳۷ تا ۵۰ درجه سلسیوس است. بطور کلی، آنزیم MTGase در دامنه دمایی وسیعی پایدار است. این آنزیم فعالیت خود را در دمای ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه حفظ می‌کند (Kuraishi *et al.*, 2001). بنابراین با توجه به ویژگی‌های این آنزیم، تاکنون تحقیقات گوناگونی در زمینه استفاده از آنزیم MTGase در صنعت غذا از جمله تهیه فیلم‌های خوراکی صورت پذیرفته است.

پروتئین آب‌پنیر را به منظور ساخت فیلم بکار بردند و مشاهده کردند که آنزیم ترانس‌گلوتامیناز باعث کاهش حلالیت در آب فیلم تا ۲۵ درصد شد. Tang *et al.* (2005) تأثیر آنزیم ترانس‌گلوتامیناز را بر خصوصیات فیلم بر پایه ایزوله پروتئین سویا بررسی کرده و بیان داشتند که تیمار آنزیمی باعث افزایش معنی دار مقاومت به کشش و کاهش کشش‌پذیری و رطوبت فیلم بر پایه ایزوله پروتئین سویا شد. Yildirim & Hettiarachchy (1998) روی فیلم‌های برپایه پروتئین آب‌پنیر و گلوبولین ۱۱S کار کردند و مشاهده کردند که استحکام کششی در فیلم‌های اصلاح شده توسط آنزیم در مقایسه با فیلم‌های تیمار نشده افزایش یافت و مقدار آن برای استحکام کششی از ۵/۶۴ تا ۱۲/۵۳ مگاپاسکال برای فیلم‌های ایزوله پروتئین آب‌پنیر، از ۷/۶۱ تا ۱۶/۴۱ مگاپاسکال برای گلوبولین ۱۱S و از ۶/۲۶ تا ۱۷/۸۶ مگاپاسکال برای فیلم‌های مخلوط پروتئین آب‌پنیر با گلوبولین ۱۱S بود. همچنین محققین با به کارگیری این آنزیم در فیلم، شاهد کاهش نفوذپذیری به بخار آب (Carvalho & Grosso, 2004) و افزایش مقاومت به کشش به میزان ۱۰ تا ۲۰ درصد (Tang *et al.*, 2005) بوده‌اند. Jiang *et al.* (2007) تأثیر افزایش زمان تیمار آنزیمی توسط آنزیم ترانس‌گلوتامیناز روی خصوصیات فیلم بر پایه ایزوله پروتئین سویا را بررسی نمودند و زمان ۱ ساعت را به عنوان بهترین زمان تیمار آنزیمی معرفی کردند. این محققین نشان دادند که استفاده از زمان بیشتر تیمار آنزیمی هیچ بهبودی در خصوصیات فیلم حاصل ایجاد نمی‌نماید. در هر حال، (Truong *et al.*, 2004) در مطالعه‌ای دیگر در زمینه به کارگیری آنزیم MTGase بر ویژگی‌های ژل‌های حاصل از پروتئین‌های آب‌پنیر گزارش نمودند که در صورت استفاده از تیمار آنزیمی بیش از مدت ۳ ساعت، استحکام ژل کاهش می‌یابد.

با توجه به تأثیر زمان تیمار آنزیمی MTGase بر ایجاد اتصالات عرضی یا تجمع پروتئین‌ها (Jiang *et al.*, 2007)، در این تحقیق تأثیر زمان تیمار آنزیمی بر خصوصیات فیزیکی و مکانیکی فیلم بر پایه پروتئین آب‌پنیر مورد بررسی قرار گرفت و بهترین زمان تیمار آنزیمی جهت ایجاد اتصالات عرضی توسط آنزیم تعیین گردید.

مواد و روش‌ها

مواد اولیه

پودر ایزوله آب‌پنیر از شرکت Arla Food Ingredient دانمارک و آنزیم ترانس‌گلوتامیناز میکروبی با میزان فعالیت ۱۰۰ واحد به

1. Laminated
1. Microbial transglutaminase

درجه سلسیوس به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت قرار داده شدند.

اندازه گیری ضخامت فیلم‌ها

ضخامت فیلم‌های تولید شده با استفاده از میکرومتر دیجیتالی دستی (Mitutoyo, Japan) با دقت ۰/۰۰۰۱ میلی‌متر در پنج نقطه مختلف اندازه گیری شد (Khanzadi *et al.*, 2015).

اندازه گیری رنگ

به منظور تعیین رنگ فیلم‌ها از دستگاه رنگ سنج (Konica Minolta CR300Series) استفاده گردید. قبل از اندازه گیری رنگ، دستگاه با استفاده از صفحه سفید مخصوص استاندارد دستگاه (۹۴/۴۳ *L، ۰/۲۵ *a و ۲/۰۴ *b) کالیبره و تنظیم گردید. پارامترهای اندازه گیری شده توسط دستگاه رنگ سنج شامل شاخص L: شفافیت نمونه (۰=سیاه و ۱۰۰=سفید)، شاخص a: قرمز نمونه (۶۰=- سیاه و ۶۰+= قرمز) و شاخص b: زردی نمونه (۶۰=- آبی و ۶۰+= زردی) در سه تکرار صورت گرفت. مقدار ΔE با استفاده از رابطه ۱ محاسبه شد (Khanzadi *et al.*, 2015).

$$\Delta E = \sqrt{(l^* - l)^2 + (a^* - a)^2 + (b^* - b)^2} \quad (\text{رابطه ۱})$$

اندازه گیری نفوذپذیری به بخار آب

به منظور محاسبه نفوذپذیری به بخار آب از استاندارد مصوب ASTM^۱ E96 (ASTM, 2000) استفاده گردید. جهت انجام آزمون ابتدا درون ظروف شیشه‌ای (با مساحت دهانه‌ی ۰/۰۰۰۶۶ متر مربع) کلرید کلسیم بدون آب ریخته و سطح ظروف به وسیله فیلم پوشانده شد و سپس با استفاده از گریس درب بندی شدند. ظروف شیشه‌ای درون دسیکاتور حاوی محلول اشباع کلرید سدیم (رطوبت نسبی ۰/۷۵) قرار گرفتند. محلول اشباع کلرید سدیم در دمای ۲۵ درجه سلسیوس رطوبت ۷۵ درصد ایجاد خواهد کرد. اختلاف رطوبت نسبی در دو سمت فیلم در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، فشار بخار معادل ۱۷۵۳/۵۵ پاسکال ایجاد می‌کند. تغییرات وزن ظروف طی زمان با استفاده از یک ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۰۱± گرم اندازه گیری شد، منحنی تغییرات رسم و شیب هر خط رسم شده به وسیله رگرسیون خط (R=۰/۹۹۹) محاسبه گردید. نرخ انتقال بخار آب (WVTR^۲) از تقسیم شیب خط کشیده شده (Slope) بر سطح فیلم (A) به دست آمد:

$$WVTR = \text{Slope}/A \quad (\text{رابطه ۲})$$

ازاء هر گرم پروتئین از شرکت Ingredients BDF Natural اسپانیا خریداری شد. گلیسرول (به عنوان نرم کننده فیلم)، کلسیم کلرید و سایر ترکیبات شیمیایی مورد استفاده از شرکت مرک آلمان تهیه شد.

روش تهیه فیلم

جهت تهیه فیلم از روش (Tang & Jiang, 2007) استفاده شد. ابتدا محلول ۵ درصد وزنی حجمی پروتئین آب‌پنیر با انحلال‌پذیری پروتئین آب‌پنیر در آب مقطر تهیه و سپس ۲ گرم گلیسرول به عنوان نرم کننده به آن افزوده شد. سپس محلول توسط همزن مغناطیسی (IKA RH Basic 2، آلمان) با سرعت ۶۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه همزده شد. محلول پروتئینی در حمام آب در دمای ۸۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد و طی این زمان به طور مداوم همزده شد. حرارت دادن پروتئین‌های آب‌پنیر به منظور تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی بین مولکولی صورت پذیرفت، چرا که جهت به دست آمدن یک فیلم با ویژگی‌های انعطاف‌پذیری و پیوستگی مطلوب به اتصالات عرضی کوالانسی و غیرکوالانسی کافی نیاز است تا بتواند یک پارچگی فیلم را بویژه در محیط‌های با رطوبت بالا حفظ کند (Zinoviadou *et al.*, 2010). در ادامه، محلول پروتئینی در یک حمام آب یخ به منظور جلوگیری از دناتوراسیون بیش از اندازه پروتئین‌ها تا رسیدن به دمای ۴۵ درجه سلسیوس به سرعت سرد گردید. بر اساس نتایج تحقیقات انجام شده در زمینه استفاده از مقدار و زمان مناسب تیمار آنزیمی ترانس گلو تامیناز در تولید فیلم‌های بر پایه پروتئین (Carvalho & Grosso, 2004; Jiang *et al.*, 2007; Truong *et al.*, 2004) و نیز انجام آزمون‌های مقدماتی، در این تحقیق تیمار آنزیمی فیلم‌های پروتئینی با بکارگیری مقدار آنزیم ۱۰ پروتئین به مدت ۱، ۲ و ۳ ساعت در دمای ۴۵ درجه سلسیوس انجام پذیرفت. به منظور غیرفعال کردن آنزیم، پس از اتمام تیمار آنزیمی، محلول به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سلسیوس حرارت داده شد. پس از رسیدن دمای محلول در دمای محیط و به منظور خروج حباب‌های هوا، محلول در حمام آب التراسونیک (Elma, Elmasonic P 60H، آلمان) در فرکانس ۳۷ kHz به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد (Schmid *et al.*, 2014). سپس محلول فیلم درون قالب ریخته شد و در دمای محیط به مدت ۴۸ ساعت خشک شد.

مشروط سازی فیلم‌ها

نمونه‌ها قبل از تمامی آزمون‌ها در دسیکاتور حاوی نیتراژ منیزیم (به منظور ایجاد رطوبت نسبی ۵۳ درصد) و در دمای ۲۵

1. American Society for Testing Materials

2. Water vapor transmission rate

بررسی ریزساختار فیلم‌ها

بررسی ریز ساختار فیلم‌های تولیدی به وسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی (Philips XL30، هلند) انجام پذیرفت. به منظور بررسی تأثیر افزودن آنزیم بر ریزساختار نمونه‌های فیلم تولید شده، تصاویر میکروسکوپ الکترونی از سطح و مقطع عرضی فیلم‌ها گرفته شد. ابتدا فیلم‌ها به کمک چسب نقره بر روی پایه آلومینیومی چسبانده شدند. پایه‌ها در یک دستگاه پوشش‌دهنده/پاشنده تا نقطه بحرانی خشک شده و به مدت پنج دقیقه با طلا پوشش داده شدند. تصویر برداری از نمونه‌ها به وسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی با ولتاژ ۲۰ کیلووات و در بزرگنمایی‌های مختلفی انجام گرفت (Shojaee-Aliabadi *et al.*, 2013).

آنالیز آماری

اختلاف بین تیمارهای مختلف بر اساس طرح کاملاً تصادفی به روش تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد و با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۰ صورت پذیرفت. تمام آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد.

نتایج و بحث

ضخامت فیلم‌ها

ضخامت فیلم نقش مهمی در ویژگی‌های مکانیکی و خصوصیات ممانعت‌کنندگی پلیمرها دارد (Miller & Krochta, 1997). نتایج این تحقیق نشان داد تفاوت معنی‌داری ($p < 0.05$) میان ضخامت فیلم‌های تیمار شده با آنزیم در مقایسه با فیلم شاهد (بدون تیمار آنزیمی) وجود نداشت و ضخامت فیلم‌ها در دامنه ۰/۱۰۹ تا ۰/۱۱۱ میلی‌متر قرار داشت (جدول ۱). عدم تأثیر آنزیم بر ضخامت فیلم‌ها در زمان پایین تیمار آنزیمی می‌تواند نشان دهنده آن باشد که غالب اتصالات عرضی ایجاد شده توسط آنزیم از نوع پیوندهای درون مولکولی بوده است و کاهش جزئی ضخامت فیلم‌ها در زمان طولانی‌تر تیمار آنزیمی نیز می‌تواند به دلیل اتصالات عرضی شدید و ایجاد گسستگی در برخی نقاط شبکه پروتئینی باشد (Truong *et al.*, 2004).

درصد رطوبت و حلالیت در آب فیلم‌ها

حلالیت در آب فیلم‌های تیمار شده با آنزیم در مقایسه با فیلم شاهد بطور کاملاً معنی‌داری ($p < 0.05$) کاهش یافت (جدول ۱). افزایش اتصالات عرضی به دلیل تیمار آنزیمی MTGase و در

نفوذ پذیری به بخار آب (WVP^1) با ضرب کردن ضخامت فیلم (X) در نرخ انتقال بخار آب و تقسیم بر اختلاف فشار بین رطوبت نسبی درون سلول‌ها و رطوبت نسبی دسیکاتور بدست آمد (ASTM, 2000).

$$WVR = (WVTR \times X) / \Delta P \quad (\text{رابطه ۳})$$

اندازه گیری رطوبت

به منظور اندازه‌گیری رطوبت، ابتدا قطعاتی از فیلم (3×1 سانتی-متر مربع) در آون با دمای ۱۰۵ درجه سلسیوس تا رسیدن به وزن ثابت خشک شدند. سپس کاهش وزن فیلم‌ها قبل و بعد از آون‌گذاری بر حسب درصد محاسبه شد (Ghasemlou *et al.*, 2011).

اندازه گیری حلالیت در آب

به منظور اندازه‌گیری حلالیت در آب فیلم‌ها، ابتدا قطعاتی از فیلم (3×1 سانتی‌متر مربع) در آون با دمای ۱۰۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت خشک شد. نمونه‌های خشک شده در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر به مدت ۶ ساعت روی شیکر با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه تحت هم‌زدن قرار داده شد. بعد از این مدت، قطعات فیلم بوسیله کاغذ صافی که قبلاً به وزن ثابت رسیده و توزین شده بود از آب خارج گردید و پس از خشک کردن در آون ۱۰۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت، توزین شدند. میزان حلالیت در آب فیلم‌ها از تقسیم کردن تفاوت وزن ماده خشک قبل و بعد از غوطه‌وری بر وزن ماده خشک اولیه بر حسب درصد (رابطه ۴) بدست آمد (Ghasemlou *et al.*, 2011).

$$100 \times \frac{\text{وزن ماده خشک پس از غوطه‌وری} - \text{وزن ماده خشک اولیه موجود در فیلم}}{\text{وزن ماده خشک اولیه موجود در فیلم}} = \text{درصد حلالیت} \quad (\text{رابطه ۴})$$

اندازه گیری خواص مکانیکی

اندازه گیری میزان مقاومت کششی (TS^2) و درصد افزایش طول (EB^3) فیلم‌ها بر طبق روش استاندارد (ASTM, 2000) ASTM D882-00 با استفاده از دستگاه بافت سنج (Stable Micro System TA.XT.PLUS، انگلستان) به دست آمد. نمونه‌ها به ابعاد ۲۵/۴ میلی‌متر عرض و ۷۵ میلی‌متر طول بریده شد. فاصله بین دو فک از یکدیگر ۵۰ میلی‌متر و سرعت فک‌ها ۰/۸ میلی‌متر بر ثانیه تنظیم گردید. مقادیر EB براساس میزان افزایش طول تقسیم بر طول اولیه بر حسب درصد و TS بر حسب مگاپاسکال بدست آمد.

1. Water vapor permeability

2. Tensile strength

3. Elongation at break

نفوذپذیری به بخار آب

عوامل بسیاری همچون میزان ماده نرم‌کننده، مورفولوژی فیلم و میزان اتصالات عرضی روی نفوذپذیری به بخار آب فیلم‌ها تأثیرگذار هستند. فیلم‌های پروتئینی معمولاً نفوذپذیری به بخار آب خوبی ندارند که به دلیل طبیعت آبدوست آن‌ها می‌باشد (Yildirim & Hettiarachchy, 1998). نفوذپذیری به بخار آب فیلم‌های تیمار شده با آنزیم در مقایسه با فیلم شاهد کاهش معنی‌دار ($p < 0.05$) یافت (جدول ۱). سایر محققین نیز به نتایج مشابه در این زمینه دست یافتند (Carvalho & Grosso, 2004; Tang *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2015; Rostamzad *et al.*, 2016). علیرغم کاهش نفوذپذیری به بخار آب فیلم‌های تیمار شده با آنزیم در مقایسه با فیلم شاهد، همزمان با افزایش زمان تیمار آنزیمی، نفوذپذیری به بخار آب فیلم‌های تیمار شده افزایش یافت، که این امر ممکن است به دلیل پلیمریزاسیون شدید و تشکیل ژل ضعیف با افزایش زمان باشد. در تحقیقی مشابه روی پلیمریزاسیون محلول بتالاکتوگلوبولین توسط آنزیم ترانس گلوتامیناز مشاهده شد که پلیمریزاسیون شدید محلول بتالاکتوگلوبولین باعث تشکیل ژل ضعیف می‌گردد (Tanimoto & Kinsella, 1986). در مطالعات دیگر نیز ایجاد اتصالات عرضی محدود عامل افزایش استحکام ژل و اتصالات عرضی شدید عامل تضعیف ژل پروتئینی معرفی شده است (Wilcox & Swaisgood, 2002; Jooyandeh *et al.*, 2015).

نتیجه افزایش وزن مولکولی اجزاء پروتئینی می‌تواند علت کاهش حلالیت در آب فیلم‌ها باشد (Carvalho & Grosso, 2004). کاهش در حلالیت فیلم‌ها در نتیجه تیمار آنزیمی توسط آنزیم ترانس گلوتامیناز در سایر فیلم‌های پروتئینی نیز گزارش شده است (Yildirim & Hettiarachchy, 1998; Carvalho & Grosso, 2004; Tang *et al.*, 2005; Weng & Zheng, 2015; Rostamzad *et al.*, 2016). در هر حال نتایج نشان داد که با افزایش زمان تیمار آنزیمی از ۱ تا ۳ ساعت، میزان حلالیت در آب فیلم‌ها افزایش می‌یابد. این وضعیت ممکن است به دلیل ایجاد اتصالات عرضی شدید درون و برون مولکولی میان پروتئین‌ها باشد که می‌تواند منجر به تشکیل زنجیره‌های پلیمری با وزن مولکولی بسیار بالا گردد. چنین زنجیره‌هایی قادر به تشکیل شبکه پروتئینی با پیوستگی مناسب نبوده و سبب گسستگی شبکه در برخی نقاط می‌گردند و به این ترتیب حلالیت فیلم افزایش می‌یابد (Truong *et al.*, 2004). تأثیر منفی زمان بالای تیمار آنزیمی ترانس گلوتامیناز بر خصوصیات فیلم بر پایه ایزوله پروتئین سویا توسط Jiang *et al.* (2007) نیز گزارش گردیده است. این محققین همانند نتایج این پژوهش بهترین زمان تیمار آنزیمی را زمان ۱ ساعت معرفی کرده و زمان بیش از این را به منظور بهبود خصوصیات فیلم حاصل بی‌تأثیر دانستند.

جدول ۱. مقادیر میانگین ضخامت، حلالیت به آب و نفوذپذیری به بخار آب فیلم‌ها به همراه انحراف معیار

میزان آنزیم (واحد بر گرم پروتئین)	زمان تیمار (ساعت)	ضخامت (میلی‌متر)	حلالیت در آب (درصد)	رطوبت (درصد)	نفوذپذیری به بخار آب ($\times 10^{-10} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ pa}^{-1}$)
۱۰	۰	0.110 ± 0.005^a	37.07 ± 4.30^a	28.93 ± 1.02^a	3.60 ± 0.125^a
۱۰	۱	0.110 ± 0.005^a	19.97 ± 1.68^c	24.2 ± 1.37^b	2.31 ± 0.29^b
۱۰	۲	0.111 ± 0.004^a	22.23 ± 1.75^{bc}	24.63 ± 0.85^b	2.55 ± 0.32^b
۱۰	۳	0.109 ± 0.005^a	26.87 ± 3.18^b	24.97 ± 0.74^b	3.25 ± 0.35^a

اعداد با حروف انگلیسی متفاوت در هر ستون حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

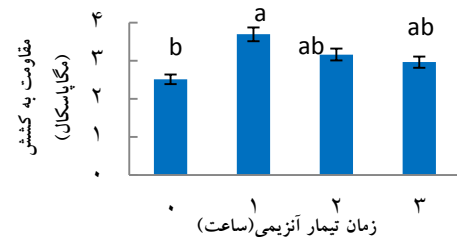
خصوصیات مکانیکی

کشش در نتیجه تیمار آنزیمی به ایجاد اتصالات عرضی درون ساختار فیلم و تشکیل بیوپلیمرهایی با وزن مولکولی زیاد نسبت داده شده است (Tang *et al.*, 2005). تشکیل پیوند کوالانسی بین مولکول‌های پروتئین توسط آنزیم ترانس گلوتامیناز در شکل‌گیری شبکه مؤثر است. ایجاد پیوندهای ایزوپپتیدی درون ساختار پروتئین باعث استحکام شبکه می‌شود (Yildirim & Hettiarachchy, 1998).

مقاومت به کشش فیلم‌های تیمار شده با آنزیم MTGase در مقایسه با فیلم شاهد بطور معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۱). افزایش مقاومت به کشش فیلم‌های پروتئینی در نتیجه تیمار آنزیمی توسط آنزیم ترانس گلوتامیناز در سایر مطالعات نیز مشاهده شده است (Yildirim & Hettiarachchy, 1998; Carvalho & Grosso, 2004; Tang *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2015; Rostamzad *et al.*, 2016). افزایش مقاومت به

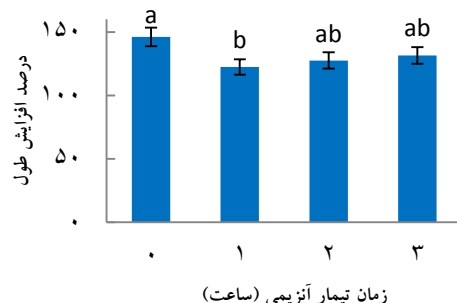
مصرف کننده می باشد (Zolfiet *et al.*, 2014). با افزایش زمان تیمار آنزیمی MTGase پارامتر b افزایش و a کاهش یافت. به عبارت دیگر میزان زردی و سبزی فیلم های تیمار شده نسبت به فیلم شاهد افزایش نشان داد که با نتایج Weng & Zheng (2015) همخوانی داشت. با توجه به اینکه آنزیم ترانس گلوتامیناز ساختار مولکولی و کریستالی ماتریکس فیلم را تغییر می دهد، می تواند باعث تغییر در پاسخ های روشنایی^۲ شود (Bae *et al.*, 2009). در هر حال نتایج نشان داد که تیمار آنزیمی تأثیر معنی داری روی پارامتر L فیلم ها ندارد که با نتایج Weng & Zheng (2015) مطابقت دارد. مقدار افزایش جزئی شفافیت فیلم در اثر افزایش زمان تیمار آنزیمی احتمالاً مربوط به منافذ جدید ایجاد شده در فیلم یا بزرگتر شدن منافذ به دلیل اتصالات شدید عرضی میان پروتئین های آب پنیر باشد (Yildirim & Hettiarachchy, 1998). همانند پارامتر L، پارامتر ΔE فیلم های تیمار شده در مقایسه با فیلم شاهد اگرچه مقدار کمی افزایش یافت، اما این اختلافات معنی دار نبود که با نتایج Bae *et al.* (2009) که تأثیر ایجاد اتصالات عرضی با آنزیم ترانس گلوتامیناز بر فیلم نانوکامپوزیت ژلاتین ماهی را بررسی کردند همخوانی دارد.

ارزیابی ریزساختار فیلم ها با میکروسکوپ الکترونی روبشی
آنالیز ریزساختار نشان داد که فیلم های تیمار شده با آنزیم MTGase دارای سطح یکنواخت تر و مقطع عرضی فشرده تر نسبت به نمونه شاهد هستند. مقطع عرضی فشرده تر فیلم های تیمار شده افزایش مقاومت به کشش و کاهش میزان کشش فیلم ها را در مقایسه با نمونه شاهد توجیه می کند (Tang *et al.*, 2005). با توجه به حالت ترک خوردگی و ساختار گسسته تر فیلم شاهد (شکل ۳)، نفوذپذیری به بخار آب و حلالیت به آب بالاتر این فیلم نسبت به فیلم های تیمار شده قابل توجیه است. هر چند تمامی نمونه های تیمار شده با آنزیم از پیوستگی و تراکم شبکه پروتئینی بالاتری نسبت به نمونه شاهد برخوردار بودند، اما افزایش زمان تیمار آنزیمی از ۱ به ۳ ساعت (شکل ۴ و ۵) سبب ایجاد شکاف هایی در شبکه پروتئینی می گردد. به نظر می آید که ترک های موجود بویژه در فیلم تیمار شده به مدت ۳ ساعت به دلیل افزایش بیش از حد اتصالات عرضی میان پروتئین ها باشد، به طوری که این ساختار ویژگی مکانیکی و فیزیکی فیلم را تحت تاثیر قرار داده و سبب افزایش نفوذپذیری به بخار آب و حلالیت در آب بالاتر فیلم می گردد.



شکل ۱. تأثیر افزایش زمان تیمار حرارتی بر مقاومت به کشش فیلم ها

نتایج تحقیق همچنین نشان داد که میزان کشش پذیری فیلم های تیمار شده با آنزیم MTGase در مقایسه با فیلم شاهد کاهش می یابد (شکل ۲). نتایج تقریباً مشابهی توسط محققین دیگر در این زمینه گزارش شده است (Carvalho & Grosso, 2004; Tang *et al.*, 2005). که دلیل تفاوت جزئی در نتایج میتواند به علت شرایط متفاوت تیمار آنزیمی باشد. کاهش کشش پذیری فیلم در نتیجه تیمار آنزیمی احتمالاً به دلیل ایجاد اتصالات عرضی است که می تواند باعث کاهش حرکت ماتریکس فیلم گردد (Carvalho & Grosso, 2004). در فیلم های پروتئینی معمولاً افزایش مقاومت به کشش فیلم با کاهش کشیدگی آن همراه است (Tang & Jiang, 2007). همانند نتایج مشاهده شده در سایر پارامترهای اندازه گیری شده، در اینجا نیز مشاهده گردید که با افزایش زمان تیمار آنزیمی و افزایش ایجاد اتصالات عرضی، مقاومت به کشش کاهش و کشش پذیری فیلم ها افزایش می یابد. (شکل ۱ و ۲). افزایش میزان تجمع پروتئین در نتیجه افزایش زمان تیمار آنزیمی می تواند دلیل این تغییرات باشد (Jiang *et al.*, 2007). تشکیل ژل ضعیف پروتئین آب پنیر در اثر پلیمریزاسیون شدید پروتئین و ایجاد اتصالات عرضی شدید در نتیجه افزایش زمان تیمار آنزیمی ترانس-گلوتامیناز توسط برخی محققین گزارش شده است (Wilcox & Swaisgood, 2002; Truong *et al.*, 2004).



شکل ۲. تأثیر افزایش زمان تیمار حرارتی بر میزان کشش پذیری فیلم ها

رنگ

رنگ فیلم یکی از خصوصیات مهم در پذیرش محصول از طرف

جدول ۲. اثر تیمار آنزیمی بر میانگین شاخص‌های رنگ فیلم‌ها به همراه انحراف معیار

ΔE	b	a	L	زمان تیمار حرارتی (ساعت)	میزان آنزیم (واحد بر گرم پروتئین)
۹/۶۳±۰/۸ ^a	۲/۴۸±۰/۵۳ ^b	-۱/۱۵±۰/۲۸ ^a	۸۴/۸۷±۰/۸۴ ^a	۰	۱۰
۱۰/۱۲±۱/۰۳ ^a	۲/۸۱±۱/۰۷ ^{ab}	-۱/۴±۰/۵۹ ^{ab}	۸۴/۷۸±۰/۴۷ ^a	۱	۱۰
۱۰/۳۷±۱/۱۵ ^a	۳/۶۲±۰/۷۱ ^{ab}	-۱/۳۲±۰/۶۳ ^{ab}	۸۴/۲۵±۰/۹۹ ^a	۲	۱۰
۱۰/۸۸±۰/۸۳ ^a	۳/۹۸±۰/۴۱ ^a	-۲/۲۱±۰/۴۹ ^b	۸۳/۸۹±۰/۸۳ ^a	۳	۱۰

اعداد با حروف انگلیسی متفاوت در هر ستون حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

پروتئین‌ها سبب بهبود خصوصیات فیزیکی و مکانیکی فیلم‌های تهیه شده بر پایه ایزوله پروتئینی آب‌پنیر گردید. تیمار آنزیمی MTGase فیلم‌ها به مدت ۱ ساعت سبب افزایش پیوستگی و یکنواختی فیلم و در نتیجه کاهش نفوذپذیری به بخار آب و حلالیت آن شد، هرچند با افزایش زمان تیمار آنزیمی از ۱ به ۳ ساعت حلالیت در آب و نفوذپذیری به بخار آب افزایش یافت. با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش، به نظر می‌رسد که تیمار آنزیمی MTGase (۱۰ U/g پروتئین، دمای ۴۵ درجه سلسیوس) به مدت ۱ ساعت به منظور تولید فیلمی با خصوصیات مکانیکی و فیزیکی مطلوب مناسب باشد. بنابراین بکارگیری تیمار آنزیمی ترانس گلوتامیناز در تولید فیلم‌های تهیه شده بر پایه پروتئین آب‌پنیر توصیه می‌گردد و به نظر می‌رسد با توجه به ویژگی‌های فیزیکی و مکانیکی مناسب چنین فیلم‌هایی بتوان از آن‌ها به عنوان پوشش‌دهنده به منظور جلوگیری از تغییر کیفی و افزایش مدت ماندگاری محصولات غذایی همانند کیک استفاده کرد.

سپاسگزاری

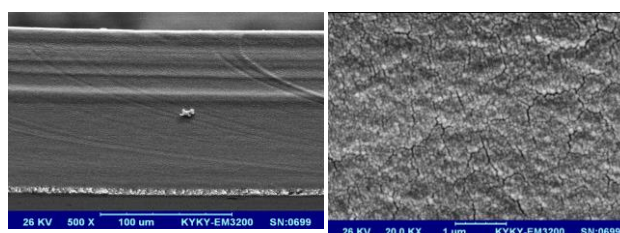
بدینوسیله نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان بابت حمایت مالی انجام این پایان‌نامه کارشناسی ارشد که مقاله حاضر بخشی از نتایج آن بود، تقدیر و قدردانی می‌نمایند.

REFERENCES

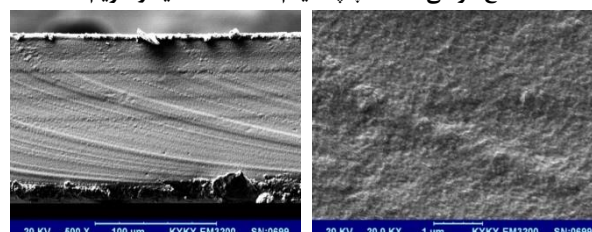
ASTM (2000). Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. Designation: D882-00. In: *Annual book of ASTM standards* (pp. 160–168). Philadelphia, PA: ASTM.

Atarés, L., Bonilla, J., & Chiralt, A. (2010). Characterization of sodium caseinate-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. *Journal of Food Engineering*, 100(4), 678-687.

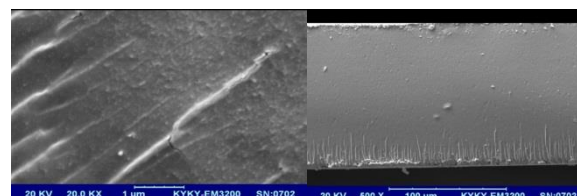
Bae, H. J., Darby, D. O., Kimmel, R. M., Park, H. J., & Whiteside, W. S. (2009). Effects of



شکل ۳. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از سطح (سمت راست) و مقطع عرضی (سمت چپ) فیلم شاهد (فاقد تیمار آنزیم)



شکل ۴. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از سطح (سمت راست) و مقطع عرضی (سمت چپ) فیلم تیمار شده با آنزیم به مدت ۱ ساعت



شکل ۵. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از سطح (سمت راست) و مقطع عرضی (سمت چپ) فیلم تیمار شده با آنزیم به مدت ۳

نتیجه‌گیری کلی

تیمار آنزیمی MTGase از طریق ایجاد اتصالات عرضی میان

transglutaminase-induced cross-linking on properties of fish gelatin-nanoclay composite film. *Food chemistry*, 114(1), 180-189.

Carvalho, de R. A., & Grosso, C. R. F. (2004). Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde. *Food hydrocolloids*, 18(5), 717-726.

Ghasemlou, M., Khodaiyan, F., Oromiehie, A., & Yarmand, M. S. (2011). Characterization of edible emulsified films with low affinity to water

- based on kefir and oleic acid. *International Journal of Biological Macromolecules*, 49(3), 378-384.
- Jiang, Y., Tang, C. H., Wen, Q. B., Li, L., & Yang, X. Q. (2007). Effect of processing parameters on the properties of transglutaminase-treated soy protein isolate films. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(2), 218-225.
- Jooyandeh, H. (2011). Whey protein films and coatings: A review. *Pakistan Journal of Nutrition*, 10 (3), 296-301.
- Jooyandeh, H., Mortazavi, A., Farhang, P., and Samavati, V. (2015). Physicochemical properties of set-Style yoghurt as effected by microbial transglutaminase and milk solids contents. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*, 4(11S), 59-67
- Khanzadi, M., Jafari, S. M., Mirzaei, H., Chegini, F. K., Maghsoudlou, Y., & Dehnad, D. (2015). Physical and mechanical properties in biodegradable films of whey protein concentrate-pullulan by application of beeswax. *Carbohydrate polymers*, 118, 24-29.
- Kuraishi, C., Yamazaki, K., & Susa, Y. (2001). Transglutaminase: its utilization in the food industry. *Food Reviews International*, 17(2), 221-246.
- Micard, V., Belamri, R., Morel, M. H., & Guilbert, S. (2000). Properties of chemically and physically treated wheat gluten films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(7), 2948-2953.
- Miller, K. S., & Krochta, J. M. (1997). Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 8(7), 228-237.
- Pérez, L. M., Balagué, C. E., Rubiolo, A. C., & Verdini, R. A. (2011). Evaluation of the biocide properties of whey-protein edible films with potassium sorbate to control non-O157 shiga toxin producing *Escherichia coli*. *Procedia Food Science*, 1, 203-209.
- Perez-gago, M. B., & Krochta, J. M. (2001). Denaturation time and temperature effects on solubility, tensile properties, and oxygen permeability of whey protein edible films. *Journal of Food Science*, 66(5), 705-710.
- Ramos, Ó. L., Pereira, J. O., Silva, S. I., Fernandes, J. C., Franco, M. I., Lopes-da-Silva, J. A & Malcata, F. X. (2012). Evaluation of antimicrobial edible coatings from a whey protein isolate base to improve the shelf life of cheese. *Journal of Dairy Science*, 95(11), 6282-6292.
- Rostamzad, H., Paighambari, S. Y., Shabanpour, B., Ojagh, S. M., & Mousavi, S. M. (2016). Improvement of fish protein film with nanoclay and transglutaminase for food packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 7, 1-7.
- Sabato, S. F., Ouattara, B., Yu, H., D'aprano, G., Le Tien, C., Mateescu, M. A., & Lacroix, M. (2001). Mechanical and barrier properties of cross-linked soy and whey protein based films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(3), 1397-1403.
- Schmid, M., Dallmann, K., Bugnicourt, E., Cordoni, D., Wild, F., Lazzeri, A., & Noller, K. (2012). Properties of whey-protein-coated films and laminates as novel recyclable food packaging materials with excellent barrier properties. *International Journal of Polymer Science*, 2012, 1-7.
- Schmid, M., Krimmel, B., & Noller, K. (2014). Effects of thermally induced denaturation on technological-functional properties of whey protein isolate-based films. *Journal of Dairy Science*, 97(9), 5315-5327.
- Seydim, A. C., & Sarikus, G. (2006). Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Research International*, 39(5), 639-644.
- Shojaee-Aliabadi, S., Hosseini, H., Mohammadifar, M. A., Mohammadi, A., Ghasemlou, M., Ojagh, S. M. & Khaksar, R. (2013). Characterization of antioxidant-antimicrobial κ -carrageenan films containing *Saturejahortensis* essential oil. *International Journal of Biological Macromolecules*, 52, 116-124.
- Tang, C. H., & Jiang, Y. (2007). Modulation of mechanical and surface hydrophobic properties of food protein films by transglutaminase treatment. *Food Research International*, 40(4), 504-509.
- Tang, C. H., Jiang, Y., Wen, Q. B., & Yang, X. Q. (2005). Effect of transglutaminase treatment on the properties of cast films of soy protein isolates. *Journal of Biotechnology*, 120(3), 296-307.
- Trachoo, N., & Mistry, V. V. (1998). Application of ultrafiltered sweet buttermilk and sweet buttermilk powder in the manufacture of nonfat and low fat yogurts. *Journal of Dairy Science*, 81(12), 3163-3171.
- Truong, V. D., Clare, D. A., Catignani, G. L., & Swaisgood, H. E. (2004). Cross-linking and rheological changes of whey proteins treated with microbial transglutaminase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5), 1170-1176.
- Ustunol, Z., & Mert, B. (2004). Water Solubility, Mechanical, Barrier, and Thermal Properties of Cross-linked Whey Protein Isolate-based Films. *Journal of Food Science*, 69(3), FEP129-FEP133.
- Wakai, M., & Almenar, E. (2015). Effect of the presence of montmorillonite on the solubility of whey protein isolate films in food model systems with different compositions and pH. *Food Hydrocolloids*, 43, 612-621.
- Wang, Y., Liu, A., Ye, R., Wang, W., & Li, X. (2015). Transglutaminase-induced crosslinking of gelatin-calcium carbonate composite films. *Food Chemistry*, 166, 414-422.
- Weng, W., & Zheng, H. (2015). Effect of transglutaminase on properties of tilapia scale gelatin films incorporated with soy protein isolate. *Food Chemistry*, 169, 255-260.

- Wilcox, C. P., & Swaisgood, H. E. (2002). Modification of the rheological properties of whey protein isolate through the use of an immobilized microbial transglutaminase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(20), 5546-5551.
- Yildirim, M., & Hettiarachchy, N. S. (1998). Properties of Films Produced by Cross-linking Whey Proteins and 11S Globulin Using Transglutaminase. *Journal of Food Science*, 63(2), 248-252.
- Yildirim, M., Hettiarachchy, N. S., & Kalapathy, U. (1996). Properties of Biopolymers from Cross-linking Whey Protein Isolate and Soybean 11S Globulin. *Journal of Food Science*, 61(6), 1129-1132.
- Zinoviadou, K. G., Koutsoumanis, K. P., & Biliaderis, C. G. (2010). Physical and thermo-mechanical properties of whey protein isolate films containing antimicrobials, and their effect against spoilage flora of fresh beef. *Food Hydrocolloids*, 24(1), 49-59.
- Zolfi, M., Khodaiyan, F., Mousavi, M., & Hashemi, M. (2014). The improvement of characteristics of biodegradable films made from kefiran-whey protein by nanoparticle incorporation. *Carbohydrate Polymers*, 109, 118-125.