

## تأثیر استفاده از آنزیم ترانس گلوتامیناز بر برخی ویژگی‌های عملکردی شیر خشک بدون چربی

بنفشه آقامحمدی<sup>۱</sup>، سید محمد علی رضوی\*<sup>۲</sup>، مصطفی مظاهری تهرانی<sup>۲</sup> و مهدی فرهودی<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی دکتری گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

۲- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

۳- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه

علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱/۳۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۶/۳

### چکیده

در این پژوهش، تأثیر دوز مصرف آنزیم ترانس گلوتامیناز (+، ۱، ۳، ۵ و ۱۰ واحد/گرم پروتئین)، مدت زمان گرمخانه‌گذاری آنزیم (۱ و ۲ ساعت) و غلظت مواد جامد شیر برای تلقیح آنزیم (۹ و ۲۵ درصد) بر برخی ویژگی‌های فیزیکی و عملکردی شیر خشک (اندازه ذرات و چگالی واقعی، شاخص انحلال‌پذیری، قابلیت خیس شدن، قابلیت کف‌کنندگی و امولسیون‌کنندگی، و دمای گذر از حالت شیشه‌ای) بررسی شده است. نتایج بررسی‌ها نشان می‌دهد افزایش غلظت مواد جامد شیر پیش از خشک کردن باعث افزایش معنی دار اندازه ذرات ( $p < 0/01$ )، چگالی واقعی ( $p < 0/05$ ) و قابلیت خیس شدن ( $p < 0/01$ ) و کاهش انحلال‌پذیری ( $p < 0/01$ ) می‌شود. استفاده از آنزیم در هیچ سطحی بر چگالی واقعی، انحلال‌پذیری، قابلیت خیس شدن، ظرفیت کف‌کنندگی و امولسیون‌کنندگی تأثیر نداشته است، اما استفاده از ۳ و ۵ واحد آنزیم باعث افزایش معنی دار ( $p < 0/05$ ) دمای گذر از حالت شیشه‌ای و استفاده از ۱۰ واحد از آن نیز باعث افزایش معنی دار ( $p < 0/01$ ) اندازه ذرات شده است. افزایش مدت زمان گرمخانه‌گذاری نیز تنها باعث افزایش معنی دار ( $p < 0/01$ ) اندازه ذرات و چگالی واقعی می‌شود. نتایج اثرهای متقابل نشان می‌دهد تأثیر افزایش غلظت بر اندازه ذرات و دمای گذر از حالت شیشه‌ای، در دوز ۱۰ واحد آنزیم و همچنین ۲ ساعت گرمخانه‌گذاری چشمگیرتر و عملکرد آنزیم در شیر با غلظت مواد جامد کمتر (۹ درصد) نسبت به شیر با غلظت مواد جامد بیشتر (۲۵ درصد)، بهتر است.

### واژه‌های کلیدی

پروتاز، پودر شیر، گذر از حالت شیشه‌ای

### مقدمه

گونه‌های *Bacillus* و *Streptovercillium* استخراج می‌شود (Mirzaei, 2011) و جزء آنزیم‌های ترانس‌فراز است که واکنش انتقال آسیل را بین گروه‌های گاما کربوکسی آمید و گروه‌های آمین گلوتامین و لیزین کاتالیز می‌کند؛ این عمل به تشکیل پیوندهای عرضی جدید درون و بین مولکولی می‌انجامد. چنین پیوندهایی می‌توانند ساختار و عملکرد پروتئین‌ها را تغییر دهند (Iličić et al.,

اصلاح آنزیمی ساختار پروتئینی یکی از روش‌های بهبود ویژگی‌های عملکردی پروتئین‌های غذایی از جمله پروتئین‌های شیر است (Imm et al., 2000). آنزیم ترانس گلوتامیناز (TG) یکی از آنزیم‌هایی است که در دو دهه اخیر به طور وسیع برای اصلاحات و تغییرات پروتئینی به کار گرفته شده است. این آنزیم میکروبی از برخی

از کارخانه مانی ماس فسا، شرکت درشیمی مرجان (نماینده شرکت BDF Ingredients اسپانیا در ایران)، و شرکت Sigma Aldrich کشور فرانسه تهیه شدند.

#### روش تهیه شیرخشک

تهیه شیر خشک در این پژوهش شامل مراحل تهیه شیر بازسازی شده، تلقیح آنزیم و گرمخانه‌گذاری به مدت مشخص، و خشک کردن با استفاده از خشک‌کن پاششی است. برای این منظور ابتدا شیر در دو سطح ماده خشک ۹ و ۲۵ درصد (شیر تغلیظ شده) به روش بازسازی شیرخشک پس چرخ تهیه شد. دوزهای مختلف آنزیم ترانس گلوتامیناز (۰، ۱، ۳، ۵ و ۱۰ واحد/گرم پروتئین) در دمای ۴۰ درجه سلسیوس افزوده شدند. نمونه‌ها به مدت ۱ و ۲ ساعت در همین دما نگهداری شدند (Czernicka *et al.*, 2009). در مرحله بعد، نمونه‌های تیمار شده با آنزیم در یک خشک‌کن پاششی در مقیاس آزمایشگاهی (مدل Buchi Mini Spray Dryer B290 ساخت آلمان) با شرایط دمایی ورودی و خروجی ۸۰-۱۳۵/۷۵-۱۳۰ درجه سلسیوس و اسپراتور ۹۰ درصد خشک و سپس در کیسه‌های زیپ‌دار بسته‌بندی شدند.

#### اندازه‌گیری قطر ذرات

توزیع اندازه ذرات و قطر متوسط آنها در دستگاه آنالیز کننده اندازه ذرات (مدل Master Sizer 2000)، ساخت شرکت Malvern انگلستان اندازه‌گیری و بر اساس میانگین قطر حجمی بیان شد (Lay Ma *et al.*, 2008).

#### اندازه‌گیری چگالی واقعی (ذره‌ای)

این پارامتر با استفاده از پیکنومتر گازی (هلیوم) اندازه‌گیری شد (Lay Ma *et al.*, 2008).

#### اندازه‌گیری شاخص انحلال‌پذیری

این پارامتر بر اساس استاندارد ملی ایران به شماره ۵۰۱۱ اندازه‌گیری شد. بدین صورت که ۱۰ گرم شیرخشک با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر با دمای ۲۴ درجه سلسیوس به مدت ۹۰ ثانیه با مخلوط‌کن هم‌زده شد؛ کف ایجاد شده با

(2008). کارزین، پروتئین‌های تغییر شکل یافته (دنانوره یا واسرشت شده) آب پنیر، پروتئین‌های سویا، کونالومین، اکتین و میوزین و اووموسین پروتئین‌هایی هستند که سوپسترای مناسبی برای آنزیم TG به‌شمار می‌آیند (Mirzaei, 2011).

جمع‌بندی منابع قبلی نشان می‌دهد که بخش اعظم تحقیقات درباره کاربرد TG در صنعت لبنیات مربوط به ماست، پنیر، و بستنی است (Han *et al.*, 2003; Iličić *et al.*, 2008; Rossa *et al.*, 2011) و درباره کاربرد آنزیم TG در شیرخشک تحقیقات بسیار اندک است و تنها مصرف دوزهای مختلف آنزیم را بر ویژگی‌های ژل حاصل بررسی کرده‌اند (Imm *et al.*, 2000; Guyot, & Kulozik, 2011). به همین دلیل بررسی تأثیر استفاده از آنزیم ترانس گلوتامیناز بر برخی ویژگی‌های فیزیکی و عملکردی شیرخشک بدون چربی که تاکنون در هیچ تحقیقی بررسی نشده است از اهداف ویژه و دارای اهمیت این تحقیق است. از طرف دیگر، این پژوهش علاوه بر فاکتور دوز مصرف آنزیم که در بسیاری پژوهش‌ها به آن پرداخته شده است، شرایط دیگر استفاده از آنزیم ترانس گلوتامیناز، از جمله مدت زمان گرمخانه‌گذاری و ماده جامد کل شیر برای تلقیح آنزیم را که در اندک تحقیقات به آنها پرداخته شده بررسی کرده است. علاوه بر آن، با توجه به بررسی‌های صورت گرفته در کارخانه‌های تولیدکننده شیرخشک در ایران و نیاز آنها به بهبود کیفیت و افزایش خواص عملکردی شیرخشک، بهبود کیفیت شیرخشک تولیدی با استفاده از آنزیم TG و کاهش مصرف شیرخشک در فرمولاسیون محصولات دیگر از اهداف کاربردی این تحقیق بوده است.

#### مواد و روش‌ها

شیرخشک بدون چربی با پروتئین ۳۳/۳ و رطوبت ۳/۳۲ درصد، آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی با فعالیت آنزیمی ۳۰۰ واحد به ازای هر گرم و گلوکونودلتالاکتون به ترتیب

### دمای گذر از حالت شیشه‌ای

دمای گذر از حالت شیشه‌ای ( $T_g$ ) به کمک دستگاه گرماسنج روبشی افتراقی (DSC) اندازه‌گیری شد (Lay Ma *et al.*, 2008).

### روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

این تحقیق در قالب طرح فاکتوریل با دو تکرار اجرا شد. غلظت آنزیم ترانس گلوتامیناز (در پنج سطح ۰، ۱، ۳، ۵ و ۱۰ واحد/گرم پروتئین)، ماده خشک شیر (در دو سطح ۹ و ۲۵ درصد)، و مدت زمان گرمخانه‌گذاری آنزیم (در دو سطح ۱ و ۲ ساعت) از فاکتورها و سطوح این تحقیق بود. با انجام یافتن آزمایش‌ها، آنالیز آماری با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطوح احتمال ۱ و ۵ درصد دنبال شد. برای رسم نمودارها نیز از نرم‌افزار اکسل (Excel, 2010) استفاده شد.

### نتایج و بحث

#### اندازه ذرات و چگالی واقعی

بررسی نتایج آنالیز واریانس حاصل از آزمون‌های اندازه ذرات و چگالی واقعی در جدول (۱) نشان می‌دهد که افزایش غلظت ماده جامد شیر پیش از خشک کردن از ۹ درصد به ۲۵ درصد به‌طور معنی‌دار باعث افزایش اندازه ذرات ( $p < 0.01$ ) و چگالی واقعی ( $p < 0.05$ ) می‌شود. نتایج همچنین نشان می‌دهد تأثیر متقابل غلظت، دوز مصرف آنزیم، و مدت زمان نگهداری بر اندازه ذرات معنی‌دار است. به‌طور کلی در سیستم خشک‌کن پاششی، اندازه ذرات به‌اندازه قطره پاشش شده بستگی دارد. معمولاً اندازه قطره‌ها با افزایش غلظت و ویسکوزیته محلول اولیه افزایش می‌یابد. از طرف دیگر، محققان گزارش کرده‌اند زمانی که ویسکوزیته شیر اولیه از طریق پیش تیمار حرارتی یا افزایش مقدار ماده خشک افزایش یابد، میزان ماده جامد هر ذره که از نازل خارج می‌شود و در نتیجه چگالی واقعی افزایش خواهد یافت (Lay ma *et al.*, 2008).

قاشق جدا و محلول حاصل به سانتریفیوژ منتقل گردید. بعد از سانتریفیوژ کردن به مدت ۵ دقیقه و با نیروی  $g$  ۵۰۰۰، محلول رویی جدا شد. رسوب باقی‌مانده مجدداً با ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط و با همان شرایط سانتریفیوژ شد. مقدار رسوب اندازه‌گیری و درصد انحلال‌پذیری محاسبه شد (استاندارد ملی ایران، ۱۳۸۷).

#### اندازه‌گیری قابلیت خیس شدن

این آزمون طبق روش فونسکا و همکاران (Fonseca *et al.*, 2011) اجرا شد. دو گرم شیر خشک بدون چربی داخل ۴۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر با دمای ۲۵ درجه سلسیوس ریخته و مدت زمان موردنیاز برای خیس شدن تمام پودر اندازه‌گیری شد.

#### اندازه‌گیری ظرفیت کف‌کنندگی

پنجاه میلی‌لیتر مخلوط ۳ درصد (w/v) نمونه شیر خشک در آب مقطر با استفاده از هوموژنایزر با سرعت دورانی بالا به مدت ۱ دقیقه مخلوط و بلافاصله به استوانه‌های مدرج منتقل شد. حجم قبل و بعد از کف کردن ثبت و ظرفیت کف‌کنندگی از رابطه (۱) محاسبه شد (Yang *et al.*, 2016).

=ظرفیت کف‌کنندگی

$$(1) \quad 100 \times (\text{حجم کل کف} / \text{حجم کف تولیدی})$$

#### اندازه‌گیری ظرفیت امولسیون‌کنندگی

نیم گرم نمونه شیر خشک در یک لوله سانتریفیوژ مدرج با ۳ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط و ۳ میلی‌لیتر روغن ذرت تصفیه‌شده به آن اضافه شد. محتوای لوله سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه به‌شدت مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد ( $g \times 1100$ ) (Yasumatsu *et al.*, 1972). ظرفیت امولسیون‌کنندگی طبق رابطه (۲) محاسبه شد:

=ظرفیت امولسیون‌کنندگی

$$(2) \quad 100 \times (\text{ارتفاع کل} / \text{ارتفاع لایه امولسیون شده})$$

شکل نمی‌گیرد و پیوندهای عرضی بیشتر از نوع درون میسلی هستند (Mounsey et al., 2005). نتایج افزایش مدت زمان گرمخانه‌گذاری آنزیم حاکی از افزایش معنی‌دار چگالی واقعی و اندازه ذرات ( $p < 0/01$ ) است (جدول ۱). روشن است که با افزایش مدت زمان گرمخانه‌گذاری، زمان بیشتری در اختیار آنزیم قرار داده شده تا فعالیت خود را در خصوص پلیمریزاسیون بیشتر پروتئین‌های کازئین و آب‌پنیر ادامه دهد (Mounsey et al., 2005).

در خصوص تأثیر دوز مصرف آنزیم بر چگالی واقعی، آنزیم در هیچ سطحی بر چگالی واقعی اثر نداشته اما استفاده از ۱۰ واحد آنزیم تأثیر افزایشی معنی‌داری ( $p < 0/01$ ) بر اندازه ذرات گذاشته است و در سایر سطوح کاهش غیر معنی‌دار اندازه ذرات مشاهده می‌شود (شکل ۱). با استناد به نتایج تحقیقات سایر محققان، بی‌تأثیر بودن آنزیم در سطوح کمتر از ۱۰ واحد ممکن است به این دلیل باشد که در آن سطوح پیوندهای عرضی بین میسلی زیادی

جدول ۱- نتایج آنالیز واریانس داده‌های اندازه ذرات، چگالی واقعی، قابلیت خیس شدن و انحلال‌پذیری

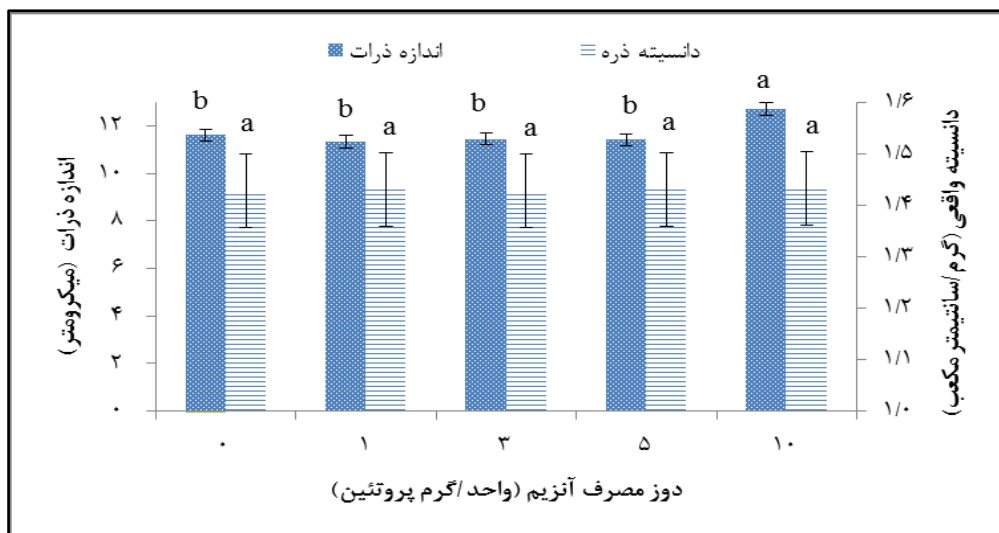
منابع تغییر	درجه آزادی	اندازه ذرات		چگالی واقعی		قابلیت خیس شدن		انحلال‌پذیری	
		مجموع مربعات	احتمال F	مجموع مربعات	احتمال F	مجموع مربعات	احتمال F	مجموع مربعات	احتمال F
غلظت مواد جامد شیر (A)	۱	۱۹/۷۸	۱۷۲/۶۱ **	۷/۱۹ *	۰	۸۲۹۹۲/۱	۳۳/۸۵ **	۰/۷۳	۲۷/۵۱ **
دوز مصرف آنزیم (B)	۴	۱۰/۴۶	۲۲/۸۳ **	۱/۲۶ ns	۰	۲۲۰۱۵/۶۵	۲/۲۵ ns	۰/۱۶	۱/۵۲ ns
مدت زمان گرمخانه‌گذاری (C)	۱	۵/۷۴	۵۰/۰۷ **	۱۷/۵۱ **	۰/۰۰۱	۳۸۰۲/۵	۱/۵۵ ns	۰/۰۱	۰/۳۴ ns
A×B	۴	۶/۰۸	۱۳/۲۷ **	۰/۴۸ ns	۸/۱۸E-۰۵	۴۲۴۳۱/۶۵	۴/۳۳ *	۰/۳۵	۳/۲۹ *
A×C	۱	۲۲/۱	۱۹۲/۸ **	۰/۶۶ ns	۲/۸۱E-۰۵	۳۴۵۹/۶	۱/۴۱ ns	۰	۰ ns
B×C	۴	۱۱/۹	۲۵/۹۷ **	۶/۶۳ **	۰/۰۰۱	۱۲۴۹۲/۷۵	۱/۲۷ ns	۰/۰۱	۰/۰۸ ns
A×B×C	۴	۲۸/۱۲	۶۱/۳۴ **	۱/۲۴ ns	۰	۲۲۱۸۳/۱۵	۲/۲۶ ns	۰/۰۲	۰/۱۶۵ ns
خطا	۲۰	۲/۲۹	۰/۰۰۱	۴۹۰۳۷	۰/۰۰۱	۰/۵۳			
کل	۴۰	۵۵۷۹/۰۴	۸۱/۷۳	۹۱۹۸۹۳۰	۳۸۵۱۸۱/۶۸				

\*\* وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد؛ \* وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد؛ ns نبود اختلاف معنی‌دار

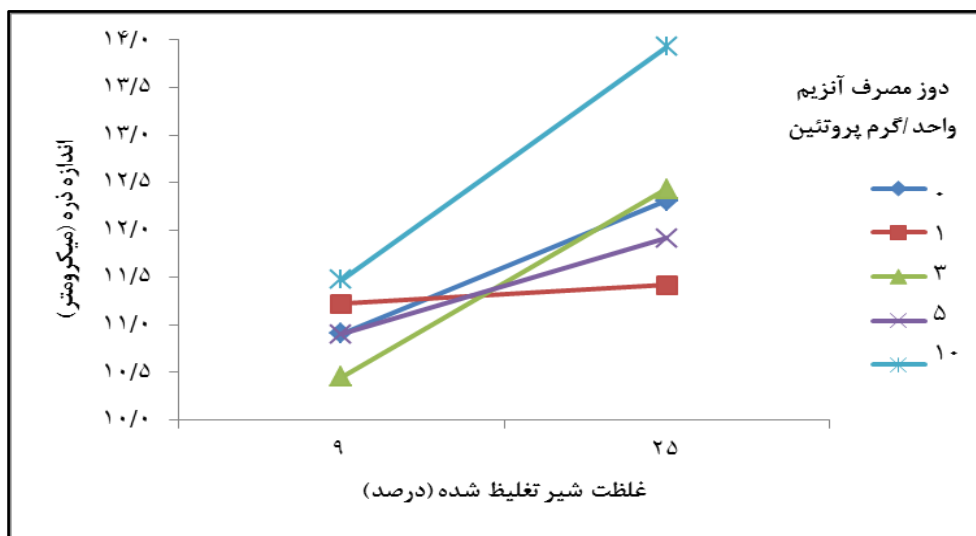
اکثر نمونه‌ها باعث افزایش معنی‌دار اندازه ذرات می‌شود و تأثیر این افزایش غلظت در دوز ۱۰ واحد آنزیم بیشتر از دوزهای دیگر است ( $p < 0/01$ ) (شکل ۲).

نتایج تحقیق نشان داده است که اثر متقابل غلظت مواد جامد شیر و دوز مصرف آنزیم بر چگالی ذره‌ای معنی‌دار نیست اما افزایش ماده خشک شیر از ۹ به ۲۵ درصد در

تأثیر استفاده از آنزیم ترانس گلوتامیناز ...



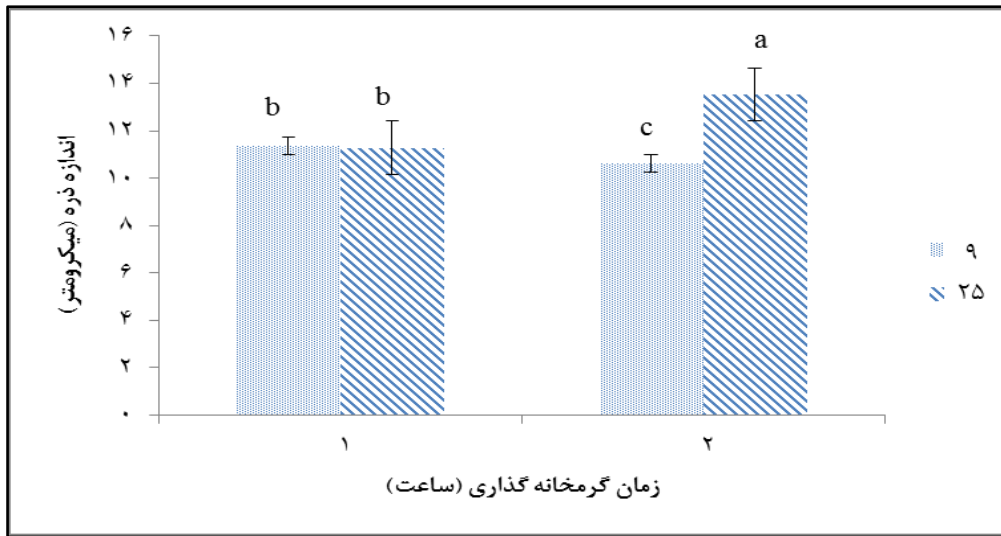
شکل ۱- تأثیر دوز مصرف آنزیم ترانس گلوتامیناز بر اندازه ذرات و چگالی واقعی شیر خشک بدون چربی (میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند)



شکل ۲- تأثیر متقابل ماده خشک شیر و دوز مصرف آنزیم بر اندازه ذرات شیر خشک تولیدی

۲ ساعت گرمخانه‌گذاری معنی‌دار ( $p < 0.01$ ) است. همان‌طور که از جدول آنالیز واریانس مشخص است، تأثیر متقابل غلظت مواد جامد شیر و مدت زمان گرمخانه‌گذاری بر چگالی ذره‌ای نیز معنی‌دار نیست (جدول ۱ و شکل ۳).

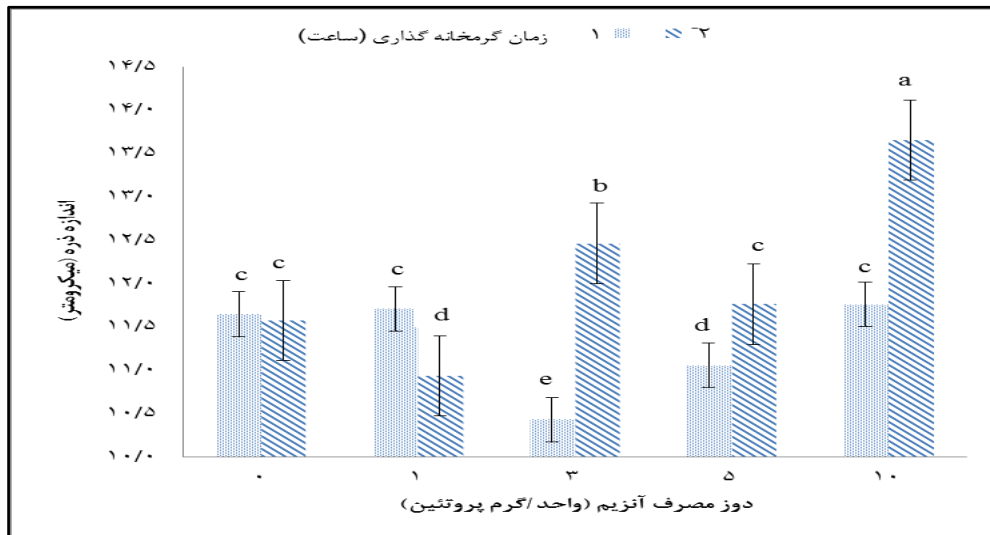
نتایج تأثیر متقابل غلظت مواد جامد شیر و مدت زمان گرمخانه‌گذاری حاکی از آن است که افزایش غلظت از ۹ به ۲۵ درصد با یک ساعت گرمخانه‌گذاری تأثیر معنی‌داری بر اندازه ذرات ندارد اما تأثیر افزایش غلظت بر اندازه ذرات با



شکل ۳- تأثیر متقابل ماده خشک شیر و مدت زمان گرمخانه گذاری آنزیم بر اندازه ذرات شیر خشک تولیدی (میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی داری ندارند).

معنی داری ایجاد نکرده است اما در نمونه‌های حاوی ۳، ۵ و ۱۰ واحد آنزیم، به طور معنی داری باعث افزایش اندازه ذرات شده و این تأثیر در نمونه‌های حاوی ۳ و ۱۰ واحد آنزیم چشمگیرتر است (شکل ۴).

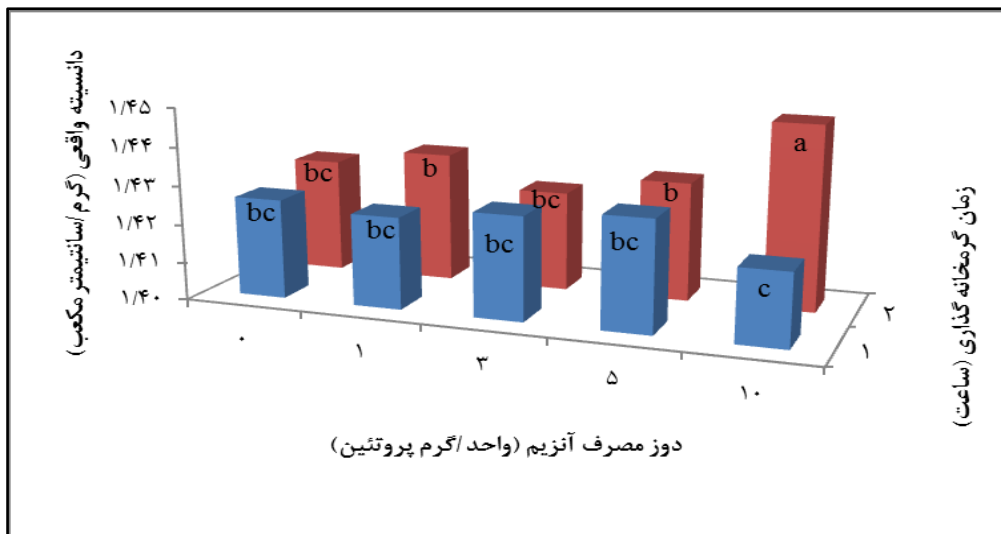
اثر متقابل دوز مصرف آنزیم و مدت زمان گرمخانه گذاری بر اندازه ذرات و چگالی واقعی معنی دار و تقریباً مشابه است ( $p < 0.01$ ) (جدول ۱)؛ در مورد اندازه ذرات، افزایش مدت زمان گرمخانه گذاری در نمونه‌های بدون آنزیم تأثیر



شکل ۴- تأثیر متقابل دوز مصرف آنزیم و مدت زمان گرمخانه گذاری بر اندازه ذرات شیر خشک تولیدی (میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی داری ندارند).

و در ۲ ساعت گرمخانه گذاری نیز تنها در دوز ۱۰ واحد آنزیم افزایش معنی دار ایجاد شده است (شکل ۵).

در خصوص چگالی ذره‌ای نیز افزایش دوز آنزیم در یک ساعت گرمخانه گذاری اختلاف معنی دار ایجاد نکرده است

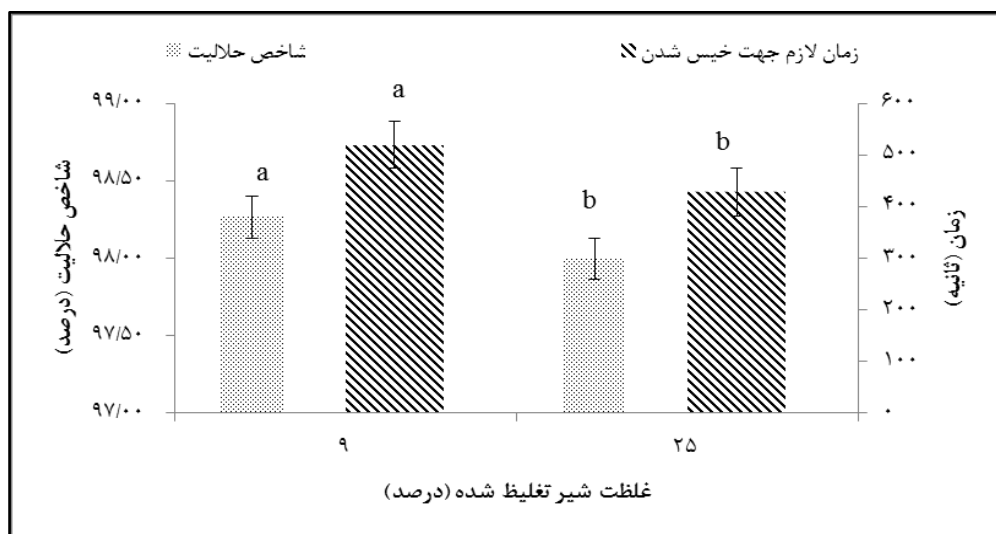


شکل ۵- تأثیر متقابل دوز مصرف آنزیم و مدت زمان گرمخانه‌گذاری بر چگالی واقعی شیرخشک تولیدی (میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند)

انحلال‌پذیری پودر شده است (شکل ۶). از آنجایی که افزایش غلظت مواد جامد شیر باعث افزایش معنی‌دار اندازه ذرات شده است، می‌توان کاهش انحلال‌پذیری را با افزایش اندازه ذرات مرتبط دانست، زیرا همان‌گونه که برخی محققان اشاره کرده‌اند، افزایش اندازه ذرات بر انحلال‌پذیری تأثیر منفی دارد (Buckton and Beezer, 1992; Carr, 1999; Chu *et al.*, 2012).

#### شاخص انحلال‌پذیری

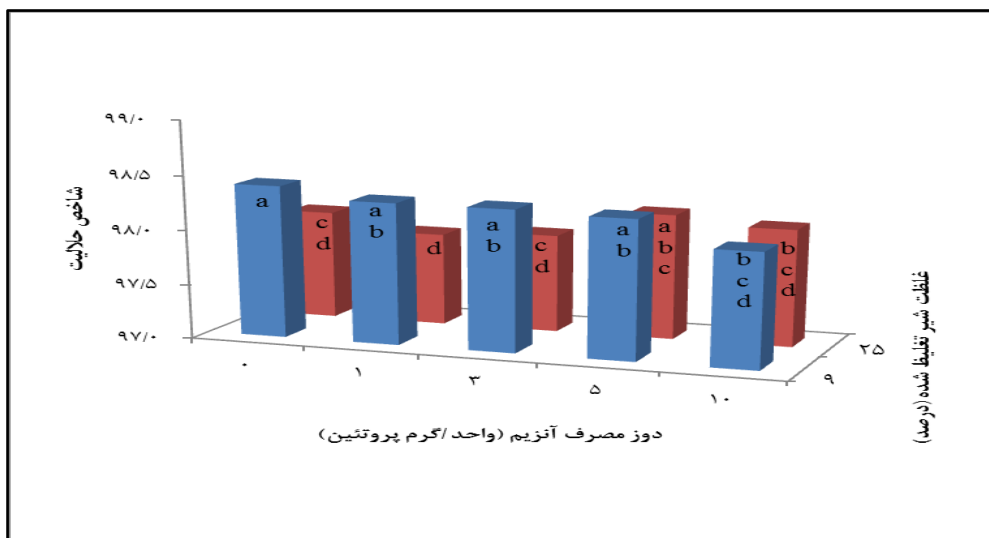
بررسی نتایج آنالیز واریانس انحلال‌پذیری نمونه‌ها در جدول (۱) حاکی از آن است که تنها فاکتور غلظت مواد جامد شیر ( $p < 0.01$ ) و اثر متقابل آن با دوز مصرف آنزیم ( $p < 0.05$ ) تأثیر معنی‌داری بر انحلال‌پذیری داشته‌اند. نتایج تحقیق نشان می‌دهد افزایش غلظت مواد جامد شیر از ۹ به ۲۵ درصد به‌طور معنی‌دار باعث کاهش میزان



شکل ۶- تأثیر غلظت مواد جامد شیر بر انحلال‌پذیری و قابلیت خیس شدن شیرخشک تولیدی (میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند)

دلیل تشکیل پیوندهای عرضی کووالانسی و تبدیل پروتئین‌های انحلال‌پذیر به پلیمرهای با وزن مولکولی بالا و انحلال‌ناپذیر، باعث کاهش انحلال‌پذیری می‌شود. در غلظت ۲۵ درصد نیز با افزایش دوز مصرف آنزیم تغییر معنی‌داری در انحلال‌پذیری ایجاد نشده است. این امر می‌تواند به دلیل عملکرد بهتر آنزیم در غلظت‌های پایین‌تر مواد جامد شیر باشد.

در غلظت ۹ درصد، افزایش دوز آنزیم تا ۵ واحد اختلاف معنی‌داری در انحلال‌پذیری ایجاد نکرده اما در ۱۰ واحد آنزیم، کاهش معنی‌دار میزان انحلال‌پذیری مشاهده می‌شود (شکل ۷). این نتایج با نتایج حاصل از آزمون اندازه ذرات تطابق کامل دارد. علاوه بر آن، لی و همکاران (Lee *et al.*, 2016) نیز که تأثیر استفاده از آنزیم TG را بر شیر بدون چربی مطالعه کرده‌اند نشان داده‌اند تیمار آنزیمی، به



شکل ۷- تأثیر متقابل غلظت مواد جامد شیر و دوز مصرف آنزیم بر انحلال‌پذیری شیرخشک تولیدی (میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند)

دانست؛ زمانی که توده ذرات درون آب ریخته می‌شود، اولین ذره‌ای که در تماس با آب قرار می‌گیرد در آن حل می‌شود و لایه‌ای نفوذناپذیر ایجاد می‌کند که موجب توقف خیس شدن بیشتر می‌شود. این امر پخش شدن بقیه ذرات روی سطح آب را با مشکل روبه‌رو می‌کند و هر چه ذرات کوچک‌تر باشند، این اتفاق بیشتر رخ می‌دهد؛ بنابراین با کاهش سطح مخصوص ذرات (بزرگ‌تر شدن اندازه ذرات) از این پدیده جلوگیری می‌شود و قابلیت خیس شدن افزایش می‌یابد (Tamime, 2009). علاوه بر آن، قابلیت خیس شدن با افزایش اندازه ذرات و جذب مویرگی آب افزایش می‌یابد (Lewis, 2006)، زیرا ذرات کوچک به دلیل

### قابلیت خیس شدن

نتایج بررسی‌ها نشان می‌دهد تنها فاکتور غلظت مواد جامد شیر ( $p < 0.01$ ) و اثر متقابل غلظت مواد جامد شیر و دوز مصرف آنزیم ( $p < 0.05$ ) بر قابلیت خیس شدن معنی‌دار است (جدول ۱ و شکل ۶). این نتایج با نتایج اندازه ذرات و چگالی واقعی تقریباً منطبق است. از آنجاکه قابلیت خیس شدن توانایی پودر در نفوذ به سطح آرام و بی‌حرکت آب است (Smithers & Augustin, 2012) و به پارامترهای مختلفی از جمله اندازه ذرات، چگالی، خلل و فرج، مساحت سطح، و ... بستگی دارد (Kim *et al.*, 2002)، بنابراین می‌توان این نتایج را به اندازه ذرات و چگالی مرتبط



آنزیمی، ظرفیت کف کنندگی کازئین‌های شیر میش را افزایش می‌دهد اما در مورد کازئین‌های شیر گاو اختلاف معنی‌داری ایجاد نمی‌کند.

در خصوص تأثیر آنزیم ترانس گلوتامیناز بر ظرفیت امولسیون کنندگی نیز تاکنون نتایج متفاوتی به دست آمده است. یانگ و همکاران و احمدی و همکاران (Ahmadi *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2017) به این نتیجه رسیده‌اند که افزودن آنزیم ترانس گلوتامیناز ظرفیت امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون را تقویت می‌کند. در مقابل، تحقیقاتی نیز وجود دارد که اثر منفی آنزیم ترانس گلوتامیناز را بر ظرفیت امولسیون کنندگی نشان می‌دهد (Davaatseren & Hong, 2014; Hu *et al.*, 2014). بنابراین، هنگام به کار بردن آنزیم برای اصلاح و دستیابی به ویژگی‌های

فشرده‌شدن بیشتر، از نفوذ آب جلوگیری می‌کنند. به گونه‌ای که مدت زمان لازم برای خیس شدن کامل ذرات افزایش و قابلیت خیس شدن آن کاهش می‌یابد.

### ظرفیت کف کنندگی و امولسیون کنندگی

نتایج آنالیز واریانس داده‌ها در جدول (۲) نشان می‌دهد اثر فاکتورهای مورد بررسی و اثر متقابل آنها بر ظرفیت کف کنندگی و امولسیون کنندگی پودر شیر معنی‌دار نیست. در خصوص تأثیر آنزیم ترانس گلوتامیناز بر ظرفیت کف کنندگی پروتئین‌ها تاکنون نتایج متفاوتی به دست آمده است. احمدی و همکاران (Ahmadi *et al.*, 2017) به این نتیجه رسیده‌اند که افزودن آنزیم ترانس گلوتامیناز به ظرفیت کف کنندگی پروتئین‌های آب‌پنیر آسیب می‌زند. یانگ و همکاران (Yang *et al.*, 2016) نشان دادند اصلاح

جدول ۲- نتایج آنالیز واریانس داده‌های ظرفیت کف کنندگی، امولسیون کنندگی و دمای گذر از حالت شیشه‌ای

منابع تغییر	درجه آزادی	ظرفیت کف کنندگی		ظرفیت امولسیون کنندگی		دمای گذر از حالت شیشه‌ای
		مجموع مربعات	احتمال F	مجموع مربعات	احتمال F	
غلظت مواد جامد شیر (A)	۱	۱۴۰/۶۳	۲/۹ <sup>ns</sup>	۱۱۰/۸۹	۱/۹۶ <sup>ns</sup>	۲/۳۹ <sup>ns</sup>
دوز مصرف آنزیم (B)	۴	۹۷	۰/۵ <sup>ns</sup>	۳۸۰/۵۶	۱/۶۸ <sup>ns</sup>	۲/۹۴*
مدت زمان گرمخانه‌گذاری (C)	۱	۱۵/۶۳	۰/۳۲ <sup>ns</sup>	۲۵/۵۰	۰/۴۵ <sup>ns</sup>	۰/۰۲ <sup>ns</sup>
A×B	۴	۴۱۹	۲/۱۶ <sup>ns</sup>	۵۶۷/۵۲	۲/۵۰ <sup>ns</sup>	۱/۵۶ <sup>ns</sup>
A×C	۱	۳۰	۰/۶۳ <sup>ns</sup>	۲۶/۸۰	۰/۴۷ <sup>ns</sup>	۲/۷۲ <sup>ns</sup>
B×C	۴	۲۲۴	۱/۱۶ <sup>ns</sup>	۱۹۱/۳۶	۰/۸۴ <sup>ns</sup>	۰/۷۶ <sup>ns</sup>
A×B×C	۴	۲۶۷	۱/۳۸ <sup>ns</sup>	۲۸۵/۸۹	۱/۲۶ <sup>ns</sup>	۷/۰۲**
خطا	۲۰	۹۶۸/۵		۱۱۳۳/۷۳		۱۹۲/۰۴
کل	۴۰	۶۰۳۰۳		۸۴۶۸۹/۹۱		۱۶۶۵۶۴/۶۳

\*\* اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد؛ \* اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد؛<sup>ns</sup> نبود اختلاف معنی‌دار

پروتئین را اصلاح کند (Davaatseren & Hong, 2014) علاوه بر آن پیوندهای عرضی اضافه نیز ممکن است ظرفیت و پایداری امولسیون را کاهش دهد (Feargemand *et al.*, 1998).

عملکردی مناسب پروتئین‌ها، باید میزان بهینه پیوندهای عرضی را در نظر گرفت (Feargemand *et al.*, 1998). به عبارت دیگر، ممکن است شدت واکنش‌ها و اتصالات عرضی به میزانی نباشد که قابلیت امولسیون کنندگی

جدول (۲) نشان‌دهنده تأثیر معنی‌دار دوز مصرف آنزیم ( $p < 0.05$ ) و اثر متقابل غلظت مواد جامد شیر، دوز آنزیم، و مدت زمان گرمخانه‌گذاری بر دمای گذر از حالت شیشه‌ای است ( $p < 0.01$ ). داده‌های مقایسه میانگین دانکن (شکل ۸) نشان می‌دهد، افزایش آنزیم تا سطح ۱ واحد تغییر معنی‌داری در  $T_g$  ایجاد نمی‌کند اما در سطوح ۳ و ۵ واحد اختلاف معنی‌دار  $T_g$  با نمونه شاهد و همچنین بیشترین میزان  $T_g$  مشاهده می‌شود.

نتیجه دیگری که برخی تحقیقات در مورد تأثیر آنزیم ترانس گلوتامیناز بر امولسیون‌کنندگی پروتئین‌ها نشان داده‌اند، این است که وقتی گرمخانه‌گذاری آنزیم قبل از امولسیون شدن اتفاق افتد (شرایط تحقیق حاضر)، تأثیری بر قابلیت امولسیون‌کنندگی پروتئین‌ها ندارد (Feargemand *et al.*, 1998; Sharma *et al.*, 2002).

### دمای گذر از حالت شیشه‌ای

نتایج آنالیز واریانس حاصل از اندازه‌گیری دمای  $T_g$  در



شکل ۸- تأثیر دوز مصرف آنزیم بر دمای گذر از حالت شیشه‌ای شیرخشک تولیدی

(میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند)

اندازه‌گیری  $T_g$  نشان داده‌اند فیبریل‌های کولاژن پیوند داده‌شده به کمک آنزیم TG، به دلیل پیوندهای عرضی بیشتر، پایداری حرارتی بالایی دارند. میزونو و همکاران (Mizuno *et al.*, 1999) نیز در تحقیقات خود نشان دادند  $T_g$  آلفا کازئین تیمار شده با آنزیم نسبت به آلفا کازئین تیمار نشده بیشتر است و به این نتیجه رسیدند که پلیمری شدن (پلیمریزاسیون) آلفا کازئین به دلیل پیوندهای عرضی درون مولکولی کووالانسی ایجادشده موجب بی‌حرکی مولکولی شده و  $T_g$  آلفا کازئین را افزایش داده است. این محققان به این نتیجه نیز رسیده‌اند

به‌طور کلی تأثیر معنی‌دار دوز آنزیم برافزایش  $T_g$  می‌تواند ناشی از افزایش وزن مولکولی پروتئین‌های تشکیل‌دهنده باشد، زیرا  $T_g$  پلیمرهای سنتزی به وزن مولکولی آنها بستگی دارد. در حقیقت با افزایش وزن مولکولی،  $T_g$  افزایش می‌یابد که می‌تواند بیانگر پایداری حرارتی بالای آنها به دلیل پیوندهای عرضی اضافه آنها باشد (Erwanto *et al.*, 2003). نتایج این تحقیق منطبق با نتایج به‌دست‌آمده از تحقیقات میزونو و همکاران و اروانتو و همکاران (Mizuno *et al.*, 1999; Erwanto *et al.*, 2003) است. اروانتو و همکاران (Erwanto *et al.*, 2003) با

استفاده از آنزیم باعث افزایش معنی‌دار دمای گذر از حالت شیشه‌ای و اندازه ذرات و نیز افزایش مدت زمان گرمخانه‌گذاری باعث افزایش اندازه ذرات و چگالی واقعی می‌شود. در حقیقت، افزایش اندازه ذرات باعث بهبود قابلیت خیس شدن شیرخشک تولیدی می‌شود. افزایش دمای گذر از حالت شیشه‌ای نشان‌دهنده پایداری بهتر شیرخشک تولیدشده در دوره نگهداری است. نتایج اثر متقابل نشان می‌دهد در شیر با غلظت کمتر، عملکرد آنزیم بهتر است. علاوه بر آن، تأثیر افزایش غلظت در دوز ۱۰ واحد آنزیم و ۲ ساعت گرمخانه‌گذاری چشمگیرتر است؛ بنابراین، بهتر است برای دستیابی به نتیجه بهتر در هر سیستم پروتئینی، مقدار بهینه آنزیم و مدت زمان گرمخانه‌گذاری برای آن سیستم به‌کار گرفته شود.

که تفاوتی بین نمونه‌های تیمار شده با آنزیم وجود ندارد که بیانگر این حقیقت است که میزان افزایش  $T_g$  آلفا کارئین به میزان و درجه پلیمری شدن (پلیمریزاسیون) در اثر تیمار آنزیمی بستگی ندارد (Mizuno *et al.*, 1999; Erwanto *et al.*, 2003).

## نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد علاوه بر دوز مصرف آنزیم، دیگر شرایط استفاده از تیمار آنزیمی (غلظت مواد جامد شیر برای تلقیح آنزیم و مدت زمان گرمخانه‌گذاری) نیز بر نتایج به‌دست‌آمده تأثیر دارند. به‌گونه‌ای که افزایش غلظت مواد جامد شیر باعث افزایش اندازه ذرات، چگالی واقعی، قابلیت خیس شدن، و کاهش انحلال‌پذیری می‌شود.

## مراجع

- Ahmadi, Z., Razavi, S.M.A. and Varidi, M. 2017. Sequential ultrasound and transglutaminase treatments improve functional, rheological, and textural properties of whey protein concentrate. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 43, 207-215.
- Anon. 2009. Determination of Insolubility Index. Institute of Standards and Industrial Research of Iran (ISIRI). Standard No. 5011. (in Persian)
- Buckton, G. and Beezer, A. E. 1992. The relationship between particle size and solubility. *International journal of pharmaceutics*. 82(3):R7-10.
- Carr, A. J. 1999. The functional properties of milk protein concentrates. Doctor of Philosophy thesis, Massey University.
- Chu, K.R., Lee, E., Jeong, S.H. and Park, E. S. 2012. Effect of particle size on the dissolution behaviors of poorly water-soluble drugs. *Archives of pharmacal research*. 35(7):1187-95.
- Czernicka, M., Domagała, J., Sady, M. and Wieteska, I. 2009. Functional properties of milk proteins modified by transglutaminase depending on incubation conditions with the enzyme. *Biotechnology in Animal Husbandry*. 25 (5-6): 737-743.
- Davaatseren, M. and Hong, G.P. 2014. Effect of NaCl, gum arabic and microbial transglutaminase on the gel and emulsion characteristics of porcine myofibrillar proteins. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*. 6(34):808-814.
- Erwanto, Y., Kawahara, S., Katayama, K., Takenoyama, S., Fujino, H., Yamauchi, K., Morishita, T., Kai, Y., Watanabe, S. and Muguruma, M. 2003. Microbial transglutaminase modifies gel properties of porcine collagen. *Asian-Australian Journal of Animal Sciences*. 2(16): 269-276.
- Feargemand, M., Otte, J. and Qvist, K. B. 1998. Emulsifying properties of milk proteins crosslinked with microbial transglutaminase. *International Dairy Journal*. 8(8):715-723.
- Fonseca, C. R., Bento, M. S. G., Quintero, E. S. M., Gabas, A. L. and Oliveira, C. A. F. 2011. Physical properties of goat milk powder with soy lecithin added before spray drying. *International Journal of Food Science & Technology*. 3(46):608-611.

- Guyot, C. and Kulozik, U. 2011. Effect of transglutaminase-treated milk powders on the properties of skim milk yoghurt. *International Dairy Journal*. 21(9):628-635.
- Han, X. Q., Pfeifer, J. K., Lincourt, R. H. and Schuerman, J. M. 2003. Process for making a cheese product using transglutaminase. United State Patent. Patent Number: 6572901 B2.
- Hu, X., Zhao, M., Li, L., Yang, B., Yang, X., Wang, H. and Ren, J. 2014. Emulsifying properties of cross-linking between proteins extracted from cold/hot pressed peanut meal and hydrolysed fish (decapterus maruadsi) proteins. *International Journal of Food Properties*. 17(8):1750-1762.
- Iličić, M. D., Carić, M. Đ., Milanović, S. D., Dokić, L. P., Đurić, M. S., Bošnjak, G. S. and Duraković, K. G. 2008. Viscosity changes of probiotic yoghurt with transglutaminase during storage. *Acta Periodica Technologica*. 39: 11-19.
- Imm, J.Y., Lian, P. and Lee, C.M. 2000. Gelation and water binding properties of transglutaminase-treated skim milk powder. *Journal of Food Science*. 2(65): 200-204.
- Kim, E. H. J., Dong Chen, X. and Pearce, D. 2002. Surface characterization of four industrial spray-dried dairy powders in relation to chemical composition, structure and wetting property. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*. 26(3): 197-212.
- Lay Ma, U.V., Ziegler, G. R. and Floros, J. D. 2008. Effect of sucrose on physical properties of spray-dried whole milk powder. *Journal of Food Science*. 73(9): 431-438.
- Lee, S. Y., Choi, M. J., Cho, H. Y. and Davaatseren, M. 2016. Effects of high-pressure, microbial transglutaminase and glucono- $\delta$ -lactone on the aggregation properties of skim milk. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*. 3(36): 335-342.
- Lewis, M. J. 2006. *Physical Properties of Foods And Food Processing Systems*. Woodhead Publishing Limited. 195-196.
- Mirzaei, M. 2011. Microbial transglutaminase application in food industry. *International Conference on Food Engineering and Biotechnology, IPCBEE vol.9*.
- Mizuno, A., Mitsuiki, M., Motoki, M. 1999. Glass transition temperature of casein as affected by transglutaminase. *Journal of Food Science*. 64(5): 796-799.
- Mounsey, J. S., O'kenedy, B. T. and Kelly, P. M. 2005. Influence of transglutaminase treatment on properties of micellar casein and products made therefrom. *Le Lait, INRA Editions*. 85(4-5), 405-418.
- Rossa, P. N., deSá, E. M. F., Burin, V. M. and Bordignon-Luiz, M. T. 2011. Optimization of microbial transglutaminase activity in ice cream using response surface methodology. *LWT - Food Science & Technology*. 44(1): 29-34.
- Sharma, R., Zakora, M. and Qvist, K. B. 2002. Characteristics of oil-water emulsions stabilised by an industrial  $\alpha$ -lactalbumin concentrate, cross-linked before and after emulsification, by a microbial transglutaminase. *Food Chemistry*. 79(4): 493-500.
- Smithers, G. W. and Augustin, M. A. 2012. *Advances in Dairy Ingredients (Institute of Food Technologists Series)*. 1<sup>st</sup> Edition. Wiley-Blackwell.
- Tamime, A. Y. 2009. *Dairy Powders and Concentrated Products*. Wiley-Blackwell. 180-233.
- Yang, M., Shi, Y. and Liang, Q. 2016. Effect of microbial transglutaminase crosslinking on the functional properties of yak caseins: a comparison with cow caseins. *Dairy Science & Technology*. 96(1): 39-51.
- Yasumatsu, K., Sawada, K., Moritaka, S., Mikasi, M., Toda, T., and Tshi, K. 1972. Whipping and emulsifying properties of soybean products. *Agricultural and Biological Chemistry*. 36(5): 719-727.



## **Effect of Transglutaminase Treatment on Some Functional Properties of Skim Milk Powder**

**B. Aghamohammadi, S. M. Ali Razavi<sup>\*</sup>, M. Mazaheri Tehrani and M. Farhoodi**

\* Corresponding Author: Professor, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad (FUM), POBox: 91775-1163, Mashhad, Iran.

Email: s.razavi@um.ac.ir

Received:20 April 2018, Accepted: 25 August 2018

In this paper, the effects of transglutaminase (MTG) enzyme dosage (0, 1, 3, 5 and 10 U/g pr), incubation time (1 and 2 hr) and milk solids concentration (9 and 25 %) on some physical and functional properties of milk powder (particle size, true density, solubility, wettability, foaming and emulsifying properties and glass transition temperature) were investigated. Increasing milk solids concentration caused a significant increase in particle size ( $p<0.01$ ), true density ( $p<0.05$ ) and wettability ( $p<0.01$ ) and a significant decrease in solubility ( $p<0.01$ ). MTG treatment had no significant effect on true density, solubility, wettability and foaming and emulsifying properties. Using 3 and 5 units enzyme caused a significant increasing effect on glass transition temperature ( $p<0.05$ ) and applying 10 units of enzyme increased particle size significantly ( $p<0.01$ ). Increasing incubation time caused a significant increase ( $p<0.01$ ) in particle size and true density. The results showed that the effect of increasing the concentration of 10 units of enzyme and also 2 hr of incubation was more impressive on particle size and glass transition temperature. Moreover, the efficiency of MTG treatment was higher in lower milk concentration (9%) rather than the higher one (25%).

**Keywords:** Glass transition, Powdered milk, Protease