بررسی تاثیر آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی و کازئینات سدیم بر بازیابی شبکه گلوتنی تخریب شده در آرد گندم سن زده

هادی بابائی امینلوئی [1]، مانیا صالحی فر [2*]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
(تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۰۷ تاریخ پذیرش: ۹٤/۰٥/۳۱)

چکیده

خاصیت ویسکوالاستیک گلوتن گندم، تحت تأثیر عوامل مختلف دستخوش تغییرات نامطلوب می‌شود. یکی از مهم ترین عوامل، آسیب دیدن گندم از طریق حشره سن است. حشرات سن به دانه های گندم در حال رشد حمله می کنند و به همراه بزاق خود آنزیم های پروتئولتیکی را به داخل دانه تلقیح می کنند. فعالیت پروتئولتیکی آنزیم های موجود در آرد گندم سن زده در خواص فیزیکی خمیر و پخت آن آشکار می شود. در اثر فعالیت آنزیم پروتئاز ساختمان گلوتن می‌شکند و در اثر آن خمیر نرم می‌شود که یک اثر تضعیفی بر گلوتن را نشان می دهد. در این پژوهش با توجه به اهمیت خسارت سن، تأثیر آنزیم ترانس‌گلوتامیناز میکروبی و کازئینات سدیم بر بهبود خواص شیمیایی و رئولوژیکی آرد گندم سن‌زده بررسی گردید. آنزیم ترانس-گلوتامیناز در سه سطح ۰/۳، ۰/٥ و ۰/۷ درصد و کازئینات سدیم در دو سطح ۲ و ٤ درصد به فرمولاسیون اضافه شدند. نتایج نشان داد افزودن ترانس گلوتامیناز میکروبی و کازئینات سدیم در کنار یکدیگر می‌تواند ویژگی های رئولوژیک خمیر حاصل را بهبود دهد. همچنین مشاهده شد عملکرد آنزیم ترانس‌گلوتامیناز، زمانی که به همراه کازئینات سدیم استفاده شد بمراتب بهتر از زمانی بود که به تنهایی در تیمارها مورد استفاده قرار گرفت.

کلید واژگان: ترانس گلوتامیناز، ، شبکه گلوتنی، کازئینات سدیم، گندم سن زده

* مسئول مکاتبات: salehifarmania@yahoo.com

۱- مقدمه

گندم به عنوان یکی از محصولات اساسی کشاورزی دارای اهمیت ویژه ای بوده و تامین این محصول برای جوامعی مانند ایران که گندم جایگاه خاصی در الگوی تغذیه دارد به معنی ایجاد امنیت غذایی بوده و رفاه اجتماعی طبقات متوسط و ضعیف شدیداً تحت تاثیر این محصول می باشد [۱]. یکی از مهمترین عوامل آسیب دیدن گندم با حشره سن است که در خاورمیانه، حوزه دریای مدیترانه، اروپای شرقی و شمال آفریقا به یک معضل تبدیل شده است [۲و۳]. گونه های سن از قبیل آلیا[1]، یوروگاستر[2]، نیسیوس[3] در مراحل پوره و بلوغ به دانه های گندم در حال رشد حمله می کنند و به همراه بزاق خود آنزیم های پروتئولتیکی را به داخل دانه تلقیح می کنند. این آنزیم در داخل دانه باقی می‌ماند و آردی که از این دانه تهیه می‌گردد تحت تاثیر بقایای آنزیم از کیفیت نانوایی مناسبی برخوردار نمی‌باشد[٤]. آرد بدست آمده به صورت یکنواخت با پروتئازها آلوده می‌شود که اینها به ویژه در خمیر فعال هستند، در اثر فعالیت آنزیم پروتئاز ساختمان گلوتن می‌شکند و در اثر آن خمیر نرم می‌شود که یک اثر تضعیفی بر گلوتن را نشان می‌دهد. چنانچه بیش از ۵-۲ درصد دانه های گندم سن زده باشد، از آن خمیری شل و بی قوام بدست می آید که مقاومت و پایداری کمی در برابر مخلوط شدن نشان می‌دهد و بدلیل کاهش تدریجی ظرفیت نگهداری آب، خمیر چسبنده شده و دست زدن و کار کردن با خمیر بسیار مشکل می شود در نتیجه خمیر تهیه شده از چنین آردی سیال و چسبنده است [۳و٤].

روشهای مختلفی برای مقابله با اثرات سن گندم پیشنهاد شده است. که شامل روشهای فیزیکی، استفاده از مواد بهبود دهنده و استفاده از آنزیم می‌باشد. از جمله روشهای فیزیکی، کاربرد نور خورشید برآرد، استفاده از رطوبت و سطوح دمای بالاتر حین تعدیل گندم، می‌باشد. تیمارهای هیدروترمال[4] (در آلمان به طور وسیعی بمنظور بهبود پخت گندم‌های ضعیف و سن‌زده استفاده شده است) و مایکروویو قبل از آسیاب نیز به منظور بهبود آرد گندم سن‌زده به کار رفته‌اند. تیمار دانه‌های سن‌زده، با بخار نیز می‌تواند انجام شود [۵].

1. Aelia
2. Eurygaster
3. Nysius
4. Hot Conditioning

بهبود دهنده‌های شیمیایی خواص فیزیکی گلوتن را در طول فرایند تخمیر اصلاح می‌کنند، به نحوی که نانی با کیفیت بهتر حاصل می‌شود. این بهبود کیفیت در اثر تبدیل گلوتن نرم با کشش زیاد (ویژگی آردهایی که قابلیت پخت نامطلوبی دارند مثل آرد گندم های سن‌زده) به گلوتن نوع سفت با الاستیسیته مطلوب (ویژگی آردهایی که قابلیت پخت مناسب و مطلوبی دارند)، حاصل می‌شود. خمیرهایی که در آنها مواد بهبود دهنده به کار رفته، الاستیسیته خوبی را نشان داده و دارای قدرت نگهداری گاز بیشتری می‌باشند. از میان بهبود دهنده‌های شیمیایی که به عنوان اکسید کننده عمل می‌کنند می‌توان این ترکیبات را نام برد: کلرید نیتروژن، پتاسیم برومات، پتاسیم یدات، آزودی کربن آمید، پراکسیدهای استن و اسکوربیک اسید [٦]. جهت بهبود شبکه گلوتنی از مواد شیمیایی نظیر پتاسیم برومات و اسید اسکوربیک بدلیل خصوصیات اکسید کنندگی بیشتر استفاده می‌کنند. این بهبود دهنده‌ها با اکسید گروه‌های تیول به باندهای دی‌سولفید، باعث تقویت شبکه گلوتنی می‌شوند [۷]. طی سالهای اخیر معلوم شده است که تشکیل پیوندهای کووالانسی در بین روتئین‌های گندم، خواص خمیر و محصول نهایی را بهبود می بخشد. آنزیم های ایجاد کننده پیوند عرضی در گلوتن در خواص عملکردی خمیر موثرند. از جمله مزیتهای استفاده از آنزیم‌ها، می‌توان به منشاء طبیعی آنها (از جنس پروتئین) اشاره نمود. این مسئله سبب می‌گردد آنزیم‌ها در طی پخت دناتوره شده و باقی مانده‌ای در محصول نهایی از خود باقی نگذارند [۸]. در مقایسه با کاتالیزورهای متداول شیمیایی آنزیم‌ها دارای دو ویژگی مهم نیز هستند: اولین ویژگی سرعت عمل آنزیم و ویژگی دوم اختصاصی عمل کردن فوق‌العاده زیاد اکثر آنها می‌باشد. همچنین آنزیم‌ها نسبت به بهبود دهنده‌های شیمیایی پیشنهاد جالبی هستند، بدلیل اینکه آنها بطور کلی از لحاظ ایمنی (*GRAS*[5]) ثابت شده‌اند و نمی‌توانند بعد از پخت در محصول باقی بمانند [۹و۱۰]. آنزیمها اختصاصی عمل می کنند و از تولید محصولات ناخواسته در طی واکنش جلوگیری می‌شود، افزونی‌های شیمیایی که برای بهبود آرد استفاده می‌شوند سبب ایجاد اختلالات گوارشی، پوکی استخوان و ... در بدن می شوند ولی آنزیم‌ها هیچ گونه عارضه‌ای در بدن ایجاد نخواهند کرد [۸]. از جمله این آنزیم ها، ترانس گلوتامیناز میکروبی می باشد، گزارشات متعددی در خصوص توانایی آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی در تشکیل پیوند عرضی در پروتئین

5. Generally Recognized As Safe

های غذایی مختلف ارائه شده است. آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی (M-TG) که به نام EC 2.3.2.13 نیز شناخته می شود فرایند آسیل ترانسفراز را کاتالیز می کند و باندهای کووالانسی بین پروتئین ها ایجاد می کند. این پیوندها شامل اتصالات عرضی بین لیزین از یک پروتئین و گلوتامین از پروتئین دیگر می باشد این آنزیم تجاری در محدوده ٩-٤ =pH و دمای ٥٠-٠ درجه سانتی گراد بطور موثری عمل می کنند [١١و٢]. پیوندهای جانبی کووالانسی بوجود آمده میان اجزاء پروتئینی بوسیله ترانس گلوتامیناز باعث تقویت خمیر، افزایش تحمل نسبت به اختلاط و کاهش چسبندگی خمیر می‌شود و در نهایت می‌تواند باعث بهبود خصوصیات ویسکوالاستیک گلوتن شود [٣و١٠]. همچنین کازئینات سدیم دارای خصوصیات سورفکتانت بسیار خوبی است، به عنوان یک عامل امولسیون کننده، قوام دهنده و ایجاد کف مورد استفاده قرار می‌گیرد و برای افزایش جذب آب در سیستم‌های آردی شناخته شده است و به طور کلی کازئینات سدیم تاثیر بسیار مثبتی بر خصوصیات پختی خمیر داشته و در نهایت باعث بهبود شبکه گلوتنی خمیر می‌شود. علاوه بر این عنوان شده است که در میان پروتئین‌های شیر، کازئین به خصوص کازئینات سدیم بهترین سوبسترا برای آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی می‌باشد[١٢]. بنابراین، در این تحقیق از آنزیم ترانس گلوتامیناز برای بازیابی شبکه گلوتنی تضعیف شده و ایجاد یک شبکه پروتئینی پیوسته استفاده می‌شود، همچنین از کازئینات سدیم استفاده می‌شود تا علاوه بر افزایش ارزش تغذیه-ای محصول بدلیل داشتن اسیدهای‌آمینه اساسی در ساختار خود، بتواند بعنوان یک سوبسترای مناسب نیز بر عملکرد آنزیم ترانس گلوتامیناز تاثیر گذار باشد.

٢- مواد و روشها

٢-١- مواد مورد استفاده

در این تحقیق جهت تهیه تیمارها گندم‌هایی که دارای اثرات سن‌زدگی بودند از گندم‌های سالم جداسازی شد. گندم های مورد استفاده از واریته زرین بود.

آنزیم ترانس‌گلوتامیناز میکروبی با نام تجاری Arteezyme TG تولید شده توسط شرکت آرتین شیمی ایران و کازئینات سدیم ساخت کمپانی AL TROIKA ترکیه جهت تهیه تیمارها مورد استفاده قرار گرفت.

٢-٢- روش ها

روش تولید آرد از گندم سن زده

گندم‌های سن‌زده جدا شده از گندم‌های سالم به بوسیله آسیاب آزمایشگاهی چکشی مدل ٣١٠٠ ساخت شرکت پرتن سوئد تبدیل به آرد گردید و به میزان ٧ درصد با آرد گندم سالم و بدون سن‌زدگی مخلوط شد. درجه استحصال آرد تولیدی از گندم سن زده و گندم سالم در آزمایشات ٧٨ درصد بود، که ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن مورد ارزیابی قرار گرفت.

آزمایش‌های رطوبت، خاکستر و پروتئین آرد مطابق روش‌های متداول AACC انجام شد (روش‌های شماره A ١٤-٤٤ و ٠١-٠٨ و ١٢-٤٦).

برای اندازه گیری میزان گلوتن از استاندارد AACC (روش شماره ١٢-٣٨) و دستگاه گلوتن شوی مدلGM 20 ساخت شرکت پرتن سوئد استفاده شد و آزمایش ارزیابی فعالیت آلفا آمیلازی آرد مطابق استاندارد AACC ٨١-٥٦ و توسط دستگاه فالینگ نامبر مدل ١٦٠٠ ساخت شرکت پرتن سوئد انجام شد.

آزمایشهای رئولوژی خمیر توسط دستگاه فارینوگراف ٣٠٠ گرمی ساخت شرکت برابندر آلمان با روش AACC ٢١-٥٤ و آلوئوگراف ساخت شرکت چوپن فرانسه طبق استاندارد ملی ایران شماره ١١٥٤٥ انجام شد.

برای تهیه تیمارها از آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی در سه سطح (٠/٣، ٠/٥، ٠/٧ درصد) و از کازئینات سدیم در دو سطح (٢ و ٤ درصد) بر پایه وزن آرد استفاده شد. آرد مورد استفاده برای تیمارها بجز تیمار شاهد بدون سن‌زدگی، همگی حاوی مقدار ٧ درصد آرد گندم‌های سن‌زده بوند. برای تجزیه داده‌های بدست آمده از تحقیق از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد. نرم افزار SAS 9.1 برای تحلیل داده‌های تحقیق مورد استفاده قرار گرفت.

٣- نتایج و بحث

٣-١- نتایج

نتایج ارزیابی خصوصیات آرد حاصل از گندم سن زده و گندم سالم در جدول ١ خلاصه شده است.

Table 1 Composition of damaged wheat flour samples used in the test in comparison with undamaged ones

Flour type	Moisture (%)	Ass (%)	Falling Number (sec)	Protein (%)	*Gluten* Index	*Wet gluten (%)*
undamaged	13.35	0.665	409	12.24	54.71	22.23
damaged	13.18	0.602	475	11.57	8.52	22.03

همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود میزان پروتئین در نمونه سن‌زده کمتر از نمونه آرد سالم می‌باشد ولی همچنان درصد پروتئین آرد سن‌زده در محدوده طبیعی می‌باشد در نتیجه درصد پروتئین در آرد حاصل از گندم‌های سن‌زده نمی‌تواند شاخص مناسبی برای تشخیص سن‌زدگی باشد چون با آردهای معمولی تفاوت چندانی ندارد. همچنین گندم نان با متوسط فعالیت آلفا آمیلاز دارای عدد فالینگ حدود ۲۵۰ ثانیه می باشد. بالاترین حد برای آزمون عدد فالینگ حدود ٤٠٠ ثانیه و برای آردی در نظر گرفته می شود که عاری از فعالیت آلفا آمیلاز باشد [۱۳]. از آنجایی که نتیجه آزمون عدد فالینگ نمونه های آرد سن‌زده و سالم بالاتر از ٤٠٠ می‌باشد لذا میتوان عنوان کرد که فعالیت آلفا آمیلازی در هر دو آرد سالم و سن زده بسیار اندک می‌باشد. و این فاکتور نیز نمی‌تواند بعنوان شاخص تاثیرگذار مورد توجه قرار گیرد. همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود میزان اندیس گلوتن است که می‌تواند به عنوان یک معیار جهت تشخیص آسیب دیدگی آرد استفاده شود. نتایج نشان داد که میزان اندیس گلوتن آرد گندم سن‌زده بسیار پایین‌تر از آرد گندم معمولی است.

۳-۲- بررسی نتایج مربوط به اندیس گلوتن

نتایج مربوط به اندیس گلوتن نمونه‌های حاوی مقادیر متفاوت آنزیم ترانس گلوتامیناز (**TG**) و کازئینات سدیم (**SC**) در جدول ۲ خلاصه شده است. بررسی نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان داد که میزان اندیس گلوتن آرد گندم سن‌زده بسیار پایین‌تر از آرد گندم معمولی است. شاخص گلوتن نشان دهنده نسبت گلوتن مرغوب به گلوتن نامرغوب و در واقع گویای کیفیت گلوتن می‌باشد. این مسئله بدلیل هیدرولیز پروتئین در آرد گندم سن زده می باشد که سهم گلوتن باقیمانده بر الک را کاهش می دهد. بر اساس نتایج بدست آمده از این پژوهش با استفاده از آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی و کازئینات سدیم و افزایش مقدار آنها در فرمولاسیون، میزان اندیس گلوتن تیمارها نسبت به نمونه شاهد سن‌زده افزایش معنی داری را نشان داد. به طوری که تیمار حاوی ۰/۷ درصد آنزیم ترانس‌گلوتامیناز و ٤ درصد کازئینات سدیم بالاترین میزان و تیمار شاهد پایین‌ترین میزان اندیس گلوتن را دارا بودند. نتایج این بررسی نشان داد که آنزیم ترانس‌گلوتامیناز می‌تواند باعث افزایش معنی داری در میزان اندیس گلوتن تیمارها شود و زمانیکه کازئینات سدیم بهمراه آنزیم ترانس‌گلوتامیناز به کار برده شد افزایش بیشتری در اندیس گلوتن تیمارها مشاهده شد. دلیل این امر را می‌توان به قابلیت آنزیم ترانس گلوتامیناز در بازیابی شبکه گلوتنی تخریب شده در اثر پروتئاز حشره سن و ایجاد یک شبکه پروتئینی پیوسته بوسیله اتصالات عرضی بین اسیدهای آمینه لایزین و گلوتامین و تشکیل شبکه گسترده پروتئینی نسبت داد. که این امر می تواند ساختار شبکه گلوتنی را بهبود ببخشد. همچنین از آنجایی که آنزیم ترانس گلوتامیناز برای فعالیت و ایجاد پیوندهای عرضی بین اسیدهای آمینه نیاز به اسید آمینه لایزین دارد لذا حضور کازئینات سدیم بعنوان منبع سرشار از این اسید آمینه، در کنار آنزیم ترانس گلوتامیناز می تواند بمانند سوبسترایی برای عملکرد بهتر آنزیم در ایجاد اتصالات عرضی باشد. لذا کازئینات سدیم با بهبود عملکرد آنزیم ترانس گلوتامیناز می تواند در بازیابی شبکه گلوتنی تخریب شده و بالابردن میزان اندیس گلوتن تیمارها موثر باشد.

Table 2 Gluten index of samples containing different doses of Transglutaminase (TG) and Sodium Caseinate (CS)

tretmrants Ingredients (%)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Insect Damaged	0	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
TG	0	0	0.3	0.5	0.7	0.3	0.5	0.7	0.3	0.5	0.7
SC	0	0	0	0	0	2	2	2	4	4	4
Gluten Index	54.71d	8.52i	10.13i	15.94h	39.15f	19.78g	56.44d	64.58c	47.56e	70.57b	74.78a

۳-۳- نتایج مربوط به خصوصیات رئولوژیکی خمیر

۳-۳-۱- بررسی نتایج حاصل از دستگاه فارینوگراف

جذب آب: با توجه به نتایج حاصل از جدول (۳) با افزودن ۲ و ٤ درصد کازئینات سدیم به همراه ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷ درصد آنزیم ترانس‌گلوتامیناز میزان جذب آب تیمارها به طور معنی داری افزایش پیدا کرد. با افزایش سطح آنزیم ترانس‌گلوتامیناز و کازئینات سدیم در تیمارها جذب آب نیز افزایش پیدا کرد به طوری که تیمار (۱۱) با ٤ درصد کازئینات سدیم و ۰/۷ درصد آنزیم ترانس گلوتامیناز بالاترین میزان جذب آب را در بین تیمارها دارا بود. این امر می‌تواند مربوط به اثر این آنزیم در تشکیل پیوند عرضی در پروتئین‌های گلوتن باشد که منجر به افزایش قوت گلوتن و ظرفیت نگهداری آب می‌شود [١٤]. همچنین می‌تواند بعلت اثر فعالیت هیدرولیکی آنزیم بر اجزای گلوتامینی باشد که باعث افزایش خاصیت هیدروفیلی گلوتن و در نتیجه پیوستگی بیشتر آب شود [١٥]. افزایش جذب آب تیمارها با افزودن کازئینات سدیم بهمراه آنزیم ترانس‌گلوتامیناز را می توان به ایجاد اتصالات بیشتر و قویتر، و در نتیجه شبکه پروتئینی گسترده‌تر توسط آنزیم مذکور نسبت داد. ایجاد شبکه پروتئینی قوی‌تر باعث می‌شود آب راحت‌تر و بیشتر درون شبکه گلوتنی جذب شود. همچنین کازئینات سدیم علاوه بر اینکه می‌تواند تاثیر مثبتی بر فعالیت آنزیم ترانس‌گلوتامیناز داشته باشد، با بهبود شبکه گلوتنی خمیر بعنوان عامل افزایش جذب آب در سیستم های آردی نیز شناخته شده است [١٦ و١٢].

زمان گسترش خمیر: شاخص زمان گسترش خمیر بیانگر قدرت نسبی خمیر می‌باشد که افزایش این فاکتور نشان دهنده قدرت خمیر است، به این معنی که زمان‌های گسترش کوتاه نشانه ضعیف بودن خمیر است [١٧]. در سطوح ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷ درصد آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی تفاوت معنی داری در زمان گسترش خمیر بین تیمارها مشاهده نشد. اما با افزودن ۲ و ٤ درصد کازئینات سدیم به همراه ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷ درصد آنزیم ترانس گلوتامیناز زمان گسترش تیمارها به طور معنی داری افزایش پیدا کرد. بنابر نتایج بدست آمده در این تحقیق با افزایش سطح آنزیم ترانس گلوتامیناز و کازئینات سدیم در تیمارها زمان گسترش نیز افزایش پیدا کرد به طوری که تیمار (۱۱) با ٤ درصد کازئینات سدیم و ۰/۷ درصد آنزیم ترانس گلوتامیناز بالاترین زمان گسترش و تیمار شاهد دارای کمترین زمان گسترش بود. افزایش مدت زمان گسترش خمیر در اثر افزودن ترکیبات لبنی از جمله کازئینات سدیم را می‌توان به اثر رقابتی آنها با سایر ترکیبات در جذب آب نسبت داد. همچنین افزودن کازئینات سدیم باعث فراهم آمدن سوبسترای بیشتر برای آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی شده و در نتیجه لایزین و گلوتامین بیشتری می توانند با یکدیگر اتصال برقرار کنند و شبکه گسترده‌تر و قوی‌تری را بوجود آورند [١٠]. با توجه به اینکه زمان گسترش خمیر بیانگر قدرت نسبی خمیر می باشد و با افزایش قدرت خمیر زمان گسترش افزایش می‌یابد در نتیجه می توان گفت که با افزایش سطح آنزیم ترانس‌گلوتامیناز و کازئینات سدیم و قوی‌تر شدن خمیر، زمان گسترش خمیر افزایش می‌یابد.

مقاومت خمیر: ثبات خمیر به طور عمده‌ای تحت تاثیر شبکه گلوتنی خمیر قرار می‌گیرد که بیان کننده مقاومت خمیر به نیروی اختلاط است. پایداری خمیر نشان دهنده میزان قدرت آرد می‌باشد [١٧]. مقاومت و پایداری خمیر متأثر از قدرت آرد است و هرچه میزان پایداری بیشتر باشد، قدرت خمیر بیشتر است. پایداری خمیر تحت تأثیر افزودن آنزیم ترانس‌گلوتامیناز و کازئینات سدیم بهبود یافت و با افزایش غلظت آنها پایداری به طور معنی داری افزایش پیدا کرد. همان طور که در این تحقیق نیز مشاهده شد میزان مقاومت خمیر حاصل از تیمار شاهد در برابر مخلوط کردن از همه کمتر و خمیر در اثر مخلوط کردن شل می‌شود. با افزودن آنزیم ترانس‌گلوتامیناز و کازئینات سدیم ، به دلیل تأثیر آنزیم در بازیابی شبکه گلوتنی تخریب شده خمیر و ایجاد یک شبکه پروتئینی پیوسته استحکام و پایداری خمیر افزایش می‌یابد و خمیر تقویت می‌شود. همچنین افزودن کازئینات سدیم می‌تواند باعث فراهم آمدن سوبسترای بیشتر برای آنزیم ترانس گلوتامیناز شده و در نتیجه لایزین و گلوتامین بیشتری می توانند با یکدیگر اتصال برقرار کنند و شبکه گسترده‌تر و قوی‌تری را بوجود آورند. همچنین کازئینات سدیم می تواند بدلیل داشتن خاصیت آمفی

فیلیکی باعث بهبود شبکه گلوتنی شود [۱۸]. نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت داشت با یافته های کینی و همکاران که در سال ۲۰۰۱ بواسطه تصاویر CLSM[6] نشان دادند که کازئینات سدیم باعث بهبود شبکه گلوتنی می‌شود و خمیرهای حاوی کازئینات سدیم دارای یک شبکه گلوتنی تقویت شده نسبت به نمونه شاهد بودند و خمیر حالت الاستیکی‌تر، قوی و مستحکم‌تر داشته و پایداری آن نسبت به نمونه شاهد بهتر بود [۱۲].

درجه سست شدن خمیر: با افزایش سطوح استفاده از آنزیم ترانس‌گلوتامیناز و کازئینات سدیم درجه سست شدن خمیر بعد از ۱۰ دقیقه به میزان بیشتری کاهش یافت. از آنجایی که خمیر تهیه شده از تیمار شاهد سن‌زده شبکه ضعیف‌تری دارد، در مقابل اعمال نیروی مکانیکی و مخلوط شدن مقاومت چندانی از خود نشان نداده و شبکه پروتئینی آن سریعتر شروع به درهم شکستن نموده و بعد از ۱۰ و ۱۲ دقیقه درجه نرم شدن بالاتری نسبت به سایر تیمارها نشان داد. علت کاهش درجه نرم شدن خمیر در اثر افزودن آنزیم ترانس گلوتامیناز و کازئینات سدیم را می‌توان به توانایی آنها در بازیابی شبکه گلوتنی تخریب شده و تشکیل شبکه پروتئینی مشابه شبکه گلوتنی نسبت داد. همچنین تشکیل پلیمرهای پروتئینی در اثر اتصال اسیدهای آمینه آزاد توسط آنزیم ترانس‌گلوتامیناز نیز می‌تواند سبب تقویت بافت خمیر و استحکام آن شود [۱۹]. در نتیجه می توان گفت که با افزودن کازئینات سدیم به تیمارها میزان اسیدهای آمینه آزاد در تیمارها افزایش یافته، و همانطور که گفته شد این امر می‌تواند باعث ایجاد پلیمرهای پروتئینی در اثر اتصال اسیدهای‌آمینه آزاد توسط آنزیم‌ترانس‌گلوتامیناز شود و در نتیجه موجب کاهش درجه سست شدن خمیر گردد.

عدد کیفی فارینوگراف: عدد کیفی فارینوگراف یک برآورد کلی از شاخص های مختلف فارینوگراف ارائه نموده و کار تحلیل داده های فارینوگراف را ساده تر می کند. هرچه میزان این پارامتر بیشتر باشد، خصوصیات رئولوژیکی خمیر مورد بررسی بهتر است. به طور کلی میتوان گفت که عدد کیفی فارینوگراف عددی است که بیانگر کیفیت آرد از نظر قوی و یا ضعیف بودن می باشد. عدد کیفی فارینوگراف در نمونه شاهد سن‌زده نسبت به نمونه شاهد بدون سن‌زدگی بسیار پایین‌تر می‌باشد. این به دلیل تخریب شبکه گلوتنی در نمونه های سن-زده می‌باشد. باتوجه به رابطه مستقیم بین عدد کیفی فارینوگراف و قوی بودن خمیر می توان گفت هر چقدر میزان آنزیم ترانس گلوتامیناز و کازئینات سدیم در تیمارها بالاتر می-رود بدلیل ایجاد اتصالات بیشتر و قویتر، و در نتیجه شبکه پروتئینی گسترده تر عدد کیفی فارینوگراف افزایش می یابد و برعکس.

۳-۳-۲- بررسی نتایج حاصل از دستگاه آلوئوگراف

فشار وارد بر خمیر (p): میزان فشار وارد بر خمیر در نمونه شاهد سن‌زده نسبت به نمونه شاهد بدون سن‌زدگی بسیار کمتر می‌باشد. . با افزودن ۲ و ٤ درصد کازئینات سدیم به همراه ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷ درصد آنزیم ترانس گلوتامیناز میزان فشار وارد بر تیمارها در مقایسه با تیمارهایی که فقط از آنزیم ترانس‌گلوتامیناز استفاده شده بود به طور معنی داری افزایش پیدا کرد. و به طور کلی با افزایش سطح آنزیم ترانس‌گلوتامیناز و کازئینات سدیم در تیمارها فشار وارد بر خمیر نیز افزایش پیدا کرد به طوری که تیمار (۱۱) با ٤ درصد کازئینات سدیم و ۰/۷ درصد آنزیم ترانس گلوتامیناز بالاترین میزان فشار را در بین تیمارها دارا بود. با توجه به نتایج بدست آمده می توان گفت که اتصالات عرضی تشکیل شده توسط آنزیم ترانس-گلوتامیناز و تاثیر مثبت کازئینات سدیم بر عملکرد آنزیم، بر ساختار شبکه‌ی گلوتنی و در نتیجه ویژگی‌های ویسکوالاستیکی خمیر تاثیر مثبت می گذارد. نتایج افزایش مقاومت به کشش در آرد گندم های آسیب دیده با یافته های پیشین بسمن و همکاران در سال ۲۰۰۲، بائر و همکاران در سال ۲۰۰۳، کابالرا و همکاران در سال ۲۰۰۵ در رابطه با تاثیر اتصالات عرضی تشکیل شده توسط آنزیم ترانس‌گلوتامیناز بر مقاومت به گسترش خمیرها تطابق داشت.

الاستیسیته خمیر (L): نتایج نشان می‌دهد که الاستیسیته در نمونه شاهد سن‌زده نسبت به نمونه شاهد بدون سن‌زدگی بیشتر است. که این بدلیل ضعیف بودن خمیر می‌باشد که مقاومت زیادی در برابر کشش نمی‌تواند از خود نشان دهد. در سطوح ۰/۳، ۰/۵ و ۰/۷ درصد آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی تفاوت معنی داری در الاستیسیته بین تیمارها مشاهده شد. با

6. Confocal Scanning Laser Microscopy

افزودن ۲ درصد کازئینات سدیم به همراه ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷ درصد آنزیم الاستیسیته تیمارها در مقایسه با تیمارهایی که فقط از آنزیم ترانس‌گلوتامیناز استفاده شده بود تفاوت معنی داری نشان نداند. با افزودن ٤ درصد کازئینات سدیم به همراه ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷ درصد آنزیم ترانس گلوتامیناز میزان الاستیسیته تیمارها کمی افزایش پیدا کرد ولی این افزایش الاستیسیته نسبت به تیمارهای دیگر معنی دار نبود. که این افزایش کم در الاستیسیته می‌تواند ناشی از خصوصیات سورفکتانتی کازئینات سدیم باشد، که می‌تواند بعنوان امولسیفایر و عامل فوم ساز در سیستم های آردی عمل نماید [۱۲].

با افزودن سطوح ۰/۳، ۰/۵ و ۰/۷ درصد آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی و همینطور کازئینات سدیم در سطح ۲ درصد به همراه آنزیم ترانس‌گلوتامیناز میزان الاستیسیته تیمارها نسبت به یکدیگر و نمونه شاهد سن‌زده کاهش معنی داری را نشان داد. دلیل کاهش کشش پذیری در خمیرها می‌تواند به دلیل اتصالات بیشتر و قوی‌تر بین پروتئین‌ها و در نتیجه ایجاد خمیر قویتر باشد که باعث سریعتر پاره شدن خمیر می‌شود. در واقع در اثر اتصالات شدیدتر و قوی‌تر، خمیر بیشتر همانند یک جسم نیمه جامد عمل می‌کند تا یک ماده ویسکوالاستیک. همچنین در این حالت به دلیل کاهش ویژگی‌های ویسکوز خمیر، کرنش غیر قابل بازگشت، نسبت به کرنش برگشت پذیر کاهش می یابد [۲۰]. نتایج کاهش قابلیت کشش در آرد گندم-های آسیب دیده که یک افزایش قابل توجه در مقاومت به گسترش و کاهش قابلیت کشش در خمیر تیمار شده با آنزیم ترانس‌گلوتامیناز میکروبی رخ داد. با یافته های پیشین بسمن و همکاران در سال ۲۰۰۲، بائر و همکاران در سال ۲۰۰۳، کابالرا و همکاران در سال ۲۰۰۵ تطابق داشت.

اندیس تورم خمیر (G): با توجه به اینکه اندیس تورم یا بادکردگی خمیر ضریبی از میزان کشش خمیر می‌باشد و محاسبه این اندیس توسط دستگاه آلوئوگراف مطابق رابطه ($G= 2/226\ L$) محاسبه می گردد. مشخص می‌شود که ارتباط مستقیمی بین کشش خمیر (L) با میزان تورم خمیر (G) برقرار است و هر قدر کشش خمیر بیشتر باشد ضریب تورم خمیر نیز افزایش می یابد. با توجه به اینکه با افزایش سطح استفاده از آنزیم ترانس گلوتامیناز کشش خمیر کاهش می‌یابد بنابراین با افزایش غلظت این آنزیم اندیس تورم نیز کاهش خواهد یافت. هرقدر آنزیم ترانس گلوتامیناز افزایش یابد در اثر ایجاد اتصالات عرضی و در نتیجه شبکه‌ی پروتئینی قوی‌تر، گلوتن الاستیسیته خود را از دست می‌دهد و به دلیل سفت شدن بیش از حد اجازه بالا آمدن و تورم را به خمیر نمی‌دهد. نتایج این تحقیق در مورد تاثیر آنزیم ترانس‌گلوتامیناز بر روی اندیس تورم خمیر با تحقیقات انجام شده توسط روسل در سال ۲۰۰۳ و کابالرا در سال ۲۰۰۵ و بونت در سال ۲۰۰٦ مطابقت دارد.

میزان انرژی وارد بر خمیر (W): با مقایسه نمونه شاهد سن‌زده با سایر نمونه‌ها مشاهده می‌شود که میزان انرژی لازم برای تغییر شکل دادن خمیر در نمونه شاهد سن‌زده (A_1) نسبت به تیمارهایی که دارای ترکیب آنزیم ترانس گلوتامیناز و کازئینات هستند کمتر است که دلیل این مسئله قویتر شدن خمیر تحت تاثیر ترکیب آنزیم ترانس گلوتامیناز و کازئینات سدیم می باشد. جرارد و همکاران، در سال ۱۹۹۸ مشاهده کردند که تغییر شکل انرژی با افزودن آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی در آرد آسیب دیده پس یک دوره انکوباسیون افزایش پیدا کرد. همچنین با توجه به نتایج بدست آمده در جدول (۳) زمانیکه آنزیم ترانس گلوتامیناز به همراه کازئینات سدیم استفاده شد افزایش بیشتری در میزان انرژی وارد بر خمیر مشاهده شد. دلیل افزایش میزان انرژی لازم برای تغییر شکل دادن خمیر تحت تاثیر آنزیم ترانس‌گلوتامیناز و کازئینات سدیم را می توان به قوی تر شدن خمیر تحت تاثیر آنزیم ترانس گلوتامیناز و کازئینات سدیم نسبت داد. زیرا هرقدر که قدرت خمیر بالاتر باشد برای تغییر شکل دادن آن نیاز است از انرژی بیشتری استفاده شود. [۲]. نتایج این تحقیق در مورد افزایش میزان انرژی لازم برای تغییر شکل دادن خمیر با تحقیقات انجام شده توسط جرارد و همکاران ، در سال ۱۹۹۸ کابالرا و همکاران در سال ۲۰۰۵ و روسل و همکاران در سال ۲۰۰۳، بونت و همکاران سال ۲۰۰٦، بسمن و همکاران سال ۲۰۰۲ مطابقت داشت.

نسبت فشار بر کشش (P/L): با توجه به معنی دار بودن اثر آنزیم ترانس گلوتامیناز بر روی نسبت فشار بر کشش، افزایش سطح آنزیم ترانس‌گلوتامیناز و کازئینات سدیم سبب افزایش فشار لازم جهت باد کردن خمیر خواهد شد. بنابراین

هرچه میزان آنزیم ترانس‌گلوتامیناز و کازئینات بیشتر شود به دلیل افزایش فشار لازم برای باد کردن خمیر، نسبت فشار بر کشش نیز افزایش خواهد یافت. بنا به دلایلی که توضیح داده شد افزایش آنزیم ترانس‌گلوتامیناز و کازئینات سبب افزایش فشار وارد بر خمیر و کاهش الاستیسیته خواهد شد. بنابر توضیحات ارائه شده رابطه نسبت فشار بر کشش نیز تحت تاثیر آنزیم ترانس گلوتامیناز و کازئینات سدیم قرار خواهد داشت. نتایج این تحقیق در مورد افزایش نسبت فشار بر کشش در نتیجه تقویت خمیر با یافته‌های پیشین بسمن و همکاران در سال ۲۰۰۲، بائر و همکاران در سال ۲۰۰۳، کابالرا و همکاران در سال ۲۰۰۵، تطابق داشت.

Table 3. Results obtained from Alveograph and Farinograph apparatus associated with different doses of Transglutaminase (TG) and Sodium Caseinate (CS)

Treatment	TG	SC	Insect Damaged (%)	farinograph					Alveograph				
				Water absorption (%)	development time (%)	stability (min)	Degree of softening (min)	Farinograph quality number	P	L	G	W	P/L
1	-	-	-	57.20de	2.00c	3.40c	103e	41c	65.66b	33.33b	12.86bc	81.33a	1.98bc
2	-	-	7	56.05f	1.40e	1.50g	186a	22f	33.00g	44.00a	14.76a	38.66f	0.76g
3	0.3	-	7	56.65ef	1.40e	1.60gf	186a	22f	38.00f	32.33bcd	10.51a	29.33e	1.17ef
4	0.5	-	7	56.65ef	1.40e	1.70f	155bc	23f	39.00f	33.00bc	13.23b	43.33ed	1.12f
5	0.7	-	7	56.70ef	1.50e	1.70f	152c	23f	40.00f	28.00ed	11.80d	40.33e	1.43ed
6	0.3	2	7	57.70cd	1.75d	2.50e	163b	34de	48.00e	31.00bcd	12.40bcd	41.33e	1.55d
7	0.5	2	7	58.00c	1.70d	3.00d	147c	33e	52.00d	28.33cde	11.86d	48.66cd	1.85c
8	0.7	2	7	58.00c	1.70d	3.10d	129d	36d	55.33c	25.66e	11.93c	51.00c	2.27ab
9	0.3	4	7	59.15b	1.95c	3.30c	163b	41c	65.66b	33.33b	12.70bcd	66.66b	1.97bc
10	0.5	4	7	62.00a	2.45b	3.95b	147c	50b	67.00b	30.00bcd	12.80bcd	69.66b	2.24ab
11	0.7	4	7	62.25a	4.00a	4.40a	121d	54a	81.00a	34.00b	12.96bc	82.66a	2.40a

Experimental conditions are described in Section 3. TG transglutaminase,SC Sodium Caseinate; P, tenacity or resistance to extension; G index of swelling; L dough extensibility, P/L curve configuration ratio; and W, deformation energy

٤- نتیجه گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که آنزیم ترانس‌گلوتامیناز میکروبی و کازئینات سدیم قابلیت بازیابی شبکه گلوتنی تخریب شده بوسیله پروتئاز حشره سن در خمیر حاصل از گندم‌های سن‌زده را دارا می باشند. این دو ترکیب در کنار یکدیگر می‌توانند خواص ویسکوالاستیک گلوتن را در این آردها بهبود دهند. بر اساس نتایج بدست آمده از آزمون‌های انجام شده بر روی نمونه‌های آرد سن‌زده مشخص شد که با افزایش سطح آنزیم ترانس‌گلوتامیناز و کازئینات سدیم در تیمارها میزان اندیس گلوتن نمونه‌ها به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد. بر اساس نتایج بدست آمده از آزمون‌های انجام شده توسط دستگاه فارینوگراف و آلوئوگراف مشاهده شد که استفاده از آنزیم ترانس‌گلوتامیناز میکروبی و کازئینات سدیم در فرمولاسیون آردهای سن‌زده تاثیر مثبتی بر روی ویژگیهای رئولوژیکی خمیر حاصل از این آردها داشت، به طوری که ترکیب این دو در خمیر باعث افزایش میزان جذب آب، زمان گسترش خمیر، مقاومت خمیر در برابر مخلوط شدن و عدد کیفی فارینوگراف خمیر شد ($P<۰/۰۵$). همچنین فشار وارد بر خمیر (P)، الاستیسیته (L)، اندیس تورم (G)، میزان انرژی وارد بر خمیر (W) و نسبت فشار بر کشش (P/L) در این تیمارها نسبت به نمونه شاهد سن‌زده بهبود یافت. ($P <۰/۰۵$). درجه سست شدن خمیر نیز بعد از ۱۲ دقیقه نسبت به نمونه شاهد سن‌زده کاهش پیدا کرد($P <۰/۰۵$). عملکرد آنزیم ترانس گلوتامیناز، زمانیکه بهمراه کازئینات سدیم استفاده شد بمراتب بهتر از زمانی بود که به تنهایی در تیمارها مورد استفاده قرار گرفت، که این نشان دهنده اثر مثبت کازئینات سدیم بر عملکرد آنزیم ترانس‌گلوتامیناز می‌باشد. همچنین با افزایش غلظت ترانس گلوتامیناز و کازئینات سدیم در تیمارها، خمیر قویتر و مستحکم‌تر می‌شود. به طوری که خمیر حاصل از ٤ درصد

کازئینات سدیم و ۰/۷ درصد آنزیم ترانس گلوتامیناز بدلیل اتصالات بیشتر و قویتر، و در نتیجه شبکه پروتئینی گسترده‌تر نسبت به سایر تیمارها دارای خمیر قویتری بود.

۵- منابع

[1] Clafferty, B. (2000). Ensuring Food Security in Egypt: Food Subsidy, Income Generation and Market Reform. Food Policy, 25:219–224

[2] Bonet A., Caballero A., Gómez M. & Rossel C.M. 2005. Microbial transglutaminase as a tool to restore the functionality of gluten from insect damaged wheat. Cereal Chemistry, 82 (4), 425-430.

[3] Caballero, P.A, Rosell, C.M, Bonet, A, Gomez, M. 2005. Effect of microbial transglutaminase on the rheological and thermal properties of insect damaged wheat flour. Journal of Cereal Science, 42: 93-100

[4] Karababa, E., Ozan, A.N., 1998. Effect of wheat bug (Eurygaster integriceps) damage on quality of a wheat variety grown in Turkey. Journal of the Science of Food and Agriculture 77, 399–403.

[5] Allameh, A., Kadivar, M., and Shahedi, M., 2007, Effect of bug proteases on wheat gluten subunits and consequent improvement. 17th National Congres of Food Science and Technology, Urmia, Iran, 17: 3-4

[6] Askarian Zadeh A. Rajab Zadeh N.,. Abdollahi.A, 2008. An Investigation on damage relation by Sunn pest to the properties and methods for improving the quality of wheat demaged. Journal - Iranian of agronomy sciences, 1: 46.

[7] Lorenz, K., Meredith, P., 1988. Insect-damaged wheat: history of the problem, effects on baking quality, remedies. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie 21, 183–187.

[8] Penston K. 1996. Zooming on enzymes. Food Rev, 23:36-41.

[9] Gerrard, J.A., 2002. Protein–protein crosslinking in food: methods, consequences, applications. Trends Food Science and Technology 13, 389–397.

[10] Motoki, M., Seguro, K., 1998. Transglutaminase and its use for food processing. Trends in Food Science and Technology 9, 204–210.

[11] Gerrard, J.A., Fayle, S.E., Brown, P.A., Sutton,K.H., Simmons, L., Rasiah, I., 2001.Effects of microbial transglutaminase on the wheat proteins of bread and croissant dough. Journal of Food Science 66, 782–786.

[12] Kenny, S., Wehrle, K., Auty, M., and Arendt, E.K. (2001). Influence of sodium caseinate and whey protein on baking properties and rheology of frozen dough. Cereal Chem. 78(4), 458-463.

[13] Ghiasi B, Salehifar, M. 2011. Test Methods for Wheat, Flour and Products. Publisher*:* Islamic Azad University, Science & Research Branch.

[14] Gerrard, J.A., Fayle, S.E., Wilson, A.J., Newberry, M.P., Ross, M., Kavale, S., 1998. Dough properties and crumb strength of white pan bread as affected by microbial transglutaminase. Journal of Food Science 63, 472–475.

[15] Mohtarami, F., Esmaiili, M. 2012. Microbial transglutaminase enzymes in the baking industry. Journal – Iranian Second National Seminar on Food Security. Savadkuh.

[16] Constandache M, 2005. Influences of sodium caseinate and whey protein to the rheology and baking properties of dough. Agroalimentary Processes and Technologies, Volume XI, No. 1, 85-90

[17] Shokri, F. 2013. Survey on the Possibility of Using Microbial Transglutaminase Enzyme and Hydroxy Propyl Methyl Cellulose Gum on Production of Gluten-Free pasta. Shahre Qods Branch University.

[18] Kinsella, J. E. 1982. Relationships between structure and functional properties of food proteins. In: Food Proteins. P. F. Fox and J. J. Condon, ed. Appl. Sci. Publishers: London.

[19] Pouresmaeil1, N. Azizi, MH. Abbasi, S and Mohamadi, M. 2011. Formulation of Gluten Free Bread Using Guar and Microbial Transglutaminase Enzyme. Journal – Iranian Food Science and Technologhy, Tarbiat Modarres University.

[20] Bauer, N., Koehler, P., Wieser, H., Schieberle, P., 2003. Studies of the effects of microbial transglutaminase on gluten proteins of wheat II: rheological properties. Cereal Chemistry 80, 787–790.

Effect of Microbial Transglutaminase and Sodium Caseinate on Restoring Damaged Gluten Network from Insect Damaged Wheat Flour

Babaee-aminlouee, H.[1] , Salehifar, M.[2*]

1. MSC of Food Science and Technology, Shahr-e- Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Food Science and Technology, Shahr-e- Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

(Received: 2015/01/27 Accepted: 2015/08/22)

Different factors have undesirable effects on viscoelasticity of gluten. One of the most important factors, is bug insect. Bug insect which feeds on wheat injects the proteolytic enzymes into a wheat kernel with its own salivary. The proteolytic activity of the enzymes in damaged wheat is made clear in physical properties of dough and its bread. The activity of the protease enzyme leads to the weakening and breaking of the gluten network. This research investigates the effects of the microbial transglutaminase and sodium caseinate on improving the chemical and rheological properties of the damaged wheat flour. For this purpose, Transglutaminase and Sodium Caseinate were added to the formulation at three levels of 0.3, 0.5, and 0.7% and two levels of 2 and 4%, respectively. Experimental results demonstrated that addition of Transglutaminase and Sodium Caseinate can improve rheological properties of dough. Also, functionality of Transglutaminase was improved in presence of Sodium Caseinate.

Keywords: Gluten network, Insect damaged wheat, Microbial transglutaminase, Sodium caseinate.

* Corresponding Author E-Mail Address: salehifarmania@yahoo.com