DOI: http://dx.doi.org/10.22104/jift.2013.24

بررسی برخی خصوصیات ساختاری و فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیلم پروتئینی دانه گاودانه و تأثیر آن بر شاخص‌های اکسیداسیون روغن آفتابگردان

اکرم عربستانی [1*]، مهدی کدیور[2]، محمد شاهدی[2]، سید امیر حسین گلی[3]

1. دانشجوی دکترای علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان
2. استاد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان
3. استادیار علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

(تاریخ دریافت: 92/10/25، تاریخ پذیرش: 92/11/19)

چکیده

هدف این تحقیق، بررسی برخی خصوصیات ساختاری و فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیلم زیست‌تخریب‌پذیر تهیه‌شده از پروتئین دانه گاودانه و تأثیر آن بر شاخص‌های اکسیداسیون روغن آفتابگردان بود. در ابتدا فیلم از کنسانتره پروتئینی دانه گاودانه و گلیسرول تهیه و ساختار آن با تبدیل فوریه مادون قرمز، میکروسکوپ نیروی اتمی و میکروسکوپ الکترونی مورد بررسی قرارگرفت. در مرحله بعد میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیلم تهیه‌شده اندازه‌گیری شد. سپس فیلم حاصل، با ابعاد مشخصی به نمونه‌های روغن آفتابگردان اضافه و تأثیر آن بر شاخص‌های اکسیداسیون روغن (عدد اسیدی، عدد پراکسید و تیوباربیتوریک اسید) در مقایسه با نمونه کنترل (بدون فیلم) در یک دوره انبارداری 45 روزه و در دمای 40 درجه‌سانتی‌گراد، مورد ارزیابی قرار گرفت. در طیف تبدیل فوریه مادون قرمز، پیک‌های مشخصی مربوط به گروه‌های درگیر در برهم‌کنش‌های ساختاری فیلم حاصل مشخص شد. تصاویر میکروسکوپ نیروی اتمی و میکروسکوپ الکترونی نیز سطح به نسبت صاف (زبری سطح 10/63 نانومتر) و ساختار به نسبت متراکم و به‌هم پیوسته‌ای از فیلم مورد نظر آشکار کردند. فیلم تهیه‌شده در این تحقیق (با فعالیت آنتی‌اکسیدانی 22/56٪) فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل مقایسه و حتی بهتری را نسبت به فیلم‌های زیست‌تخریب‌پذیر دیگر نشان داد. در حضور فیلم پروتئینی، اکسیداسیون روغن آفتابگردان در مقایسه با نمونه کنترل (بدون فیلم) به‌طور معنی‌داری ($p<0/001$) کاهش یافت که با توجه به نتایج به‌دست آمده، فیلم پروتئینی گاودانه به‌دلیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی به نسبت مناسب، تأثیر مثبتی بر کاهش روند اکسیداسیون روغن آفتابگردان داشته و در صورت بهبود برخی نقاط ضعف آن به‌ویژه میزان نفوذپذیری به رطوبت می‌تواند گزینه مناسبی جهت استفاده در بسته‌بندی موادغذایی باشد.

واژه‌های کلیدی: گاودانه، فیلم زیست‌تخریب‌پذیر، فعالیت آنتی‌اکسیدان.

* مسئول مکاتبات: arabestaniakram@yahoo.com

1- مقدمه

بدون شک آلودگی‌های زیست‌محیطی یکی از مهم‌ترین دغدغه‌های جوامع امروزی در سراسر جهان است. تجمع انواع مواد سنتزی غیرقابل‌تجزیه به‌خصوص انواع مختلف مواد بسته‌بندی و ترکیبات مضر ناشی از تجزیه طولانی‌مدت برخی از آن‌ها در طبیعت سبب افزایش نگرانی‌ها در رابطه با آلودگی‌های زیست‌محیطی شده‌است. از طرف دیگر، نگرانی مصرف‌کنندگان در رابطه با بحث سلامتی مواد بسته‌بندی به‌خصوص برای موادغذایی سبب شده تا طبیعی‌بودن مواد بسته‌بندی غذاها، به‌طور ذاتی زیست‌تخریب‌پذیر و قابل بازیافت‌شدن به‌طور جدی مطرح شود. از این رو در سال‌های اخیر تحقیقات زیادی در رابطه با توسعه مواد بسته‌بندی جدید و زیست‌تخریب‌پذیر متمرکز شده و پلیمرهای زیستی مختلفی مانند پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها و چربی‌ها به‌عنوان فیلم‌های بسته‌بندی استفاده و برخی از خصوصیات آن‌ها بررسی شده‌اند [۱،۲،۳]. نتایج تحقیقات مختلف نشان داده‌است که به‌طور کلی فیلم‌های بر پایه پروتئین خصوصیات ممانعتی بهتری در مقابل چربی، اکسیژن و عطر و طعم در رطوبت نسبی پایین دارند از این‌رو به‌طور گسترده‌تری برای تهیه فیلم‌های خوراکی استفاده می‌شوند [4]. پروتئین‌ها پلیمرهایی با توالی اسیدآمینه و ساختار مولکولی خاص هستند و بسته به‌ترتیب توالی اسیدهای آمینه، ساختار دوم، سوم و چهارم پیدا می‌کنند. تشکیل فیلم از پروتئین شامل سه مرحله است: ابتدا باید پیوندهای بین مولکولی که پروتئین را در حالت طبیعی پایدار نگه‌می‌دارد، شکسته شوند. در مرحله بعد زنجیرهای پلیمر آرایش و جهت‌گیری پیداکرده و در نهایت با برهم‌کنش‌ها و پیوندهای جدید، شبکه سه بعدی پایداری را تشکیل دهند.

تشکیل فیلم پروتئینی بستگی به توانایی پروتئین در تشکیل پیوندهای بین مولکولی دارد که آن هم به نوبه خود به شکل پروتئین و شرایط تولید بستگی دارد. پروتئین‌های رشته‌ای (که بیش‌تر در منابع حیوانی یافت می‌شوند) به‌علت داشتن نسبت طول به قطر بالا، توانایی خوبی در تشکیل فیلم دارند ولی پروتئین‌های کروی (که بیش‌تر در بافت‌های گیاهی یافت می‌شوند) برای تشکیل فیلم باید توسط حرارت، اسید، باز و یا حلال‌های دیگر واسرشت شده تا ساختارشان باز شود؛ سپس توسط پیوندهای هیدروژنی، یونی، آب‌گریز و کووالانسی زنجیرها به‌هم متصل و فیلم پیوسته‌ای را تشکیل دهند [5]. در واقع زیست‌تخریب‌پذیری و خصوصیات ممانعتی خوب نسبت به گازها، از ویژگی عمده فیلم‌های پروتئینی به‌شمار می‌رود [6]، ضمن آن‌که امکان افزودن انواع ترکیبات آنتی‌اکسیدان، ترکیبات ضدمیکروب، ویتامین‌ها، فلیورها و رنگ‌ها نیز به فرمول تهیه فیلم به‌منظور بهبود خصوصیات و افزایش عمر ماندگاری محصولات بسته‌بندی شده در آن‌ها وجود دارد [7]. در این تحقیق نیز یک منبع پروتئینی گیاهی به‌نام گاودانه برای تهیه فیلم بسته‌بندی مورد توجه قرارگرفت. گاودانه گیاهی از بقولات و ماشک‌ها متعلق به جنس *Vicia* است. *Vicia* شامل 160 گونه یک و چند ساله است که در سراسر مناطق معتدل اروپا، غرب و مرکز آسیا، شمال آفریقا و آمریکا پراکنده می‌باشد [8]. گاودانه با نام علمی *Vicia ervilia* از گونه‌های یک ساله جنس*Vicia*، علفی، دارای یک ریشه اصلی و تعدادی ریشه‌های فیبری جانبی است. ریشه‌ها دارای گره‌های باکتری تثبیت‌کننده نیتروژن هستند. بذور آن اغلب چند وجهی می‌باشد و از آن بیش‌تر به‌عنوان علوفه و پوشش گیاهی خاک‌های شور استفاده‌می‌شود [9]. گاودانه از نظر کشت و برداشت محصولی فوق‌العاده به‌شمار می‌آید، چرا که در خاک‌های خیلی سطحی و قلیایی می‌تواند رشد کند. بازده تولید دانه 2000-500 کیلوگرم در هکتار در محیطی با بارش 400-350 میلی‌متر است [8]. از آن‌جایی که این دانه در اکثر نقاط کشور به فراوانی و با قیمت مناسب‌تر نسبت به سایر حبوبات (مانند نخود، انواع لوبیا و عدس که از آن‌ها فیلم تهیه‌شده‌است) یافت می‌شود و با درنظرگرفتن این نکته که فیلم تهیه‌شده از پروتئین این دانه خصوصیات فیزیکی ـ شیمیایی قابل مقایسه و در بعضی موارد فیلم بهتری را نسبت به سایر منابع پروتئینی نشان داده است [10]، هدف این تحقیق، شناسایی بیش‌تر خصوصیات فیلم مورد نظر به‌منظور استفاده کاربردی از آن می‌باشد به‌همین دلیل بررسی برخی خصوصیات ساختاری و فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیلم پروتئینی تهیه‌شده از دانه گاودانه و تأثیر آن بر شاخص‌های اکسیداسیون روغن آفتابگردان از جمله اهداف تحقیق حاضر بود.

2- مواد و روش‌ها

2-1- مواد

دانه گاودانه از مغازه‌ای محلی در اصفهان تهیه شد. مواد شیمیایی و حلال‌های مورد استفاده در این تحقیق شامل هیدروکسید سدیم، اسیدکلریدریک (37٪) و گلیسرول (تقریبا 87٪)، الکل اتیلیک 95٪، شناساگر فنل فتالئین، پتاسیم هیدروژن فتالات، اسید استیک، کلروفرم، یدید پتاسیم، نشاسته، تیوسولفات سدیم، یدات پتاسیم، 1- بوتانول خالص و تیوباربیتوریک اسید از شرکت مرک آلمان خریداری شدند. روغن آفتابگردان تصفیه‌شده بدون آنتی‌اکسیدان توسط کارخانه نهان گل بروجن تامین گردید. این تحقیق به‌طور کلی در دو مرحله انجام شد:

مرحله اول: در این مرحله، ابتدا پروتئین از دانه گاودانه استخراج و سپس فیلم آن تهیه شد. استخراج پروتئین: ابتدا دانه‌های گاودانه آسیاب شده و سپس در آب مقطر قلیایی (pH=11) با نسبت 1 به 10 وزنـی - حجمی خیسانده شد. مخلوط به‌مدت 1 ساعت به‌هم زده‌شد (IKA® RH basic 2, Germany) تا پروتئین به‌طور کامل محلول شود و از ترکیبات غیرپروتئینی جدا شود، سپس مخلوط در 3200 g به‌مدت 10 دقیقه سانتریفوژ (Sigma 2-16, Germany) شد. بعد از آن سوپرناتانت جمع‌آوری شده و pH آن با HCl 0/1 نرمال به 5/4 رسانده شد، دوباره سانتریفوژ انجام گرفته و رسوبات حاصل در شرایط خلأ در دمای 40 درجه‌سانتی‌گراد خشک شد [11]. از روش کلدال برای تعیین و اندازه‌گیری مقدار پروتئین استفاده و عدد به‌دست آمده در 6/25 ضرب شد [12].

برای تهیه فیلم، کنسانتره یا ایزوله پروتئینی به‌دست آمده از مرحله قبل به نسبت 5 گرم در 100 میلی‌لیتر آب مقطر با هم‌زدن ثابت حل و بعد گلیسیرین به نسبت 50 درصد (وزنی - وزنی پروتئین) اضافه شد. pH محلول با استفاده از NaOH 1 نرمال روی 11 تنظیم و در حمام آب 85 درجه‌سانتی‌گراد به‌مدت 20 دقیقه حرارت داده‌شد. پس از عبور آن از یک پارچه نازک به‌منظور حذف حباب‌های هوا در نهایت به‌صورت یک لایه نازک و یکنواخت روی شیشه‌ای با پوشش تفلون (30×30 سانتی‌متر) قرار داده‌شد. از آون با دمای 50 درجه‌سانتی‌گراد برای خشک‌کردن فیلم استفاده شد. بعد از خشک‌شدن، فیلم را برداشته و آزمایش‌های لازم روی آن انجام گرفت [4].

مرحله دوم: در این مرحله آزمایش‌های لازم روی فیلم تهیه‌شده در مرحله اول انجام گرفت. قبل از انجام آزمایش‌ها ابتدا باید فیلم‌های تهیه‌شده مشروط شوند. مشروط‌کردن فیلم‌ها در رطوبت نسبی 50 درصد و در دمای 25 درجه‌سانتی‌گراد با قرار دادن فیلم در دسیکاتور حاوی محلول اشباع نیترات منیزیوم با 6 مولکول آب، به‌مدت 48 ساعت انجام گرفت.

2-2- ضخامت

ضخامت فیلم‌های تهیه‌شده با استفاده از میکرومتر (Electronic digital micrometer, DC - 516 و sensitivity 0.001 mm) اندازه‌گیری شد. حداقل 10 نقطه متفاوت فیلم مورد اندازه‌گیری قرار گرفته و میانگین اعداد به‌دست آمده گزارش شد.

2-3- اندازه‌گیری میزان مقاومت سطحی

میزان مقاومت سطحی نمونه‌های فیلم تهیه‌شده، با استفاده از دستگاه مقاومت‌سنج (Static voltmeter R-4021, Switzerland) و بر اساس زمان تخلیه الکتریکی تعیین شد. نمونه‌ها در ابعاد مناسب (حدود 10 سانتی‌متر طول و 1 سانتی‌متر عرض) آماده و بین دو گیره فنری قرار داده‌شدند. ولتاژ 50 و 15 ولت بین دو سر نمونه‌ها اعمال و هنگام انجام تست، در قسمت دیگر دستگاه ولتاژ روی 150 ولت تنظیم شد. زمان تخلیه الکتریکی تا افت تنش به نیمی از مقدار اولیه آن، با یک کرونومتر ثبت شد. بر اساس زمان به‌دست آمده مطابق فرمول زیر میزان مقاومت محاسبه شد (هنگام انجام آزمون دمای محیط 28 درجه‌سانتی‌گراد و رطوبت نسبی 42 درصد بود):

میزان مقاومت سطحی (بر اساس اهم)= 10^{11}× زمان برحسب ثانیه

2-4- آنالیز ساختار فیلم با روش تبدیل فوریه مادون قرمز

2پروتئین دانه گاودانه تبدیل فوریه مادون قرمز انجام شد. طیف تبدیل فوریه مادون قرمز از 4000 تا 650 cm^{-1} با قدرت تفکیک 1 cm^{-1} با استفاده از اسپکترومتر Tensor 27 ساخت شرکت Bruker مجهز به سیستم ATR ثبت شد [13].

5-2- مطالعه ریز ساختار فیلم با استفاده از میکروسکوپ نیروی اتمی

مرفولوژی سطح فیلم با استفاده از میکروسکوپ نیروی اتمی (Bruker, Model Nanos) مطالعه شد. یک پایه Si_3N_4 با ثابت فنر 0/2 نیوتن‌برمتر و یک نوک وی شکل 450 میکرومتر طول روی نمونه قرار داده‌شد و تصاویر 20×15 میکرومتری تحت شرایط محیطی به‌دست آمد.

6-2- مطالعه ریز ساختار فیلم با استفاده از میکروسکوپ الکترونی

سطح مقطع فیلم با استفاده از میکروسکوپ الکترونی (Philips XL 30, Netherlands) مطالعه شد. به این صورت که ابتدا نمونه فیلم در نیتروژن مایع شکسته شد، سپس فیلم شکسته‌شده با استفاده از چسب دو طرفه مناسب روی لبه‌های یک قطعه آلومینیومی مستطیل شکل ثابت‌شد. سپس به‌مدت 300 ثانیه در 20 میلی‌آمپر طلاپوشی شده و بعد از آن با بزرگنمایی × 1000 و × 5000 زیر میکروسکوپ مشاهده شد. طی میکروگرافی ولتاژ 12 کیلوولت مورد استفاده قرار گرفت.

7-2- تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی

مطابق با روش Norajit و همکاران [14] ابتدا فیلم‌ها داخل هاون چینی تحت نیتروژن مایع قرارگرفته و به سرعت توسط دسته‌هاون خرد شدند. فیلم‌های خردشده (0/2 گرم) با 5 میلی‌لیتر متانول مخلوط و توسط انکوباتور شیکردار (IKA® KS 4000 I control, Germany) به‌مدت 3 ساعت به شدت هم‌زده شدند. سپس در 3000 g به‌مدت 20 دقیقه سانتریفوژ انجام و سوپرناتانت حاصل برای بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روش دی‌پی‌پی‌اچ [1]مورد استفاده قرار گرفت. برای انجام این تست، 500 میکرولیتر از عصاره فیلم به سرعت به 5 میلی‌لیتر از محلول متانولی 0/1 میلی مولار دی‌پی‌پی‌اچ اضافه و به شدت مخلوط شد. مخلوط حاصل به‌مدت 30 دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت و سپس جذب آن در 517 نانومتر قرائت شد. جذب خود محلول متانولی دی‌پی‌پی‌اچ نیز در 517 نانومتر قرائت و از فرمول زیر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی محاسبه شد:

درصد مهار رادیکال دی‌پی‌پی‌اچ=

(جذب دی‌پی‌پی‌اچ /جذب عصاره فیلم -جذب دی‌پی‌پی‌اچ) ×100

8-2- بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیلم‌های پروتئینی در نمونه روغن آفتابگردان

به‌منظور کنترل فعال بودن فیلم‌های پروتئینی تهیه‌شده از نظر آنتی‌اکسیدانی، فیلم‌های تهیه‌شده به روغن آفتابگردان تصفیه‌شده بدون آنتی‌اکسیدان اضافه تا تأثیر آن‌ها در روند اکسیداسیون روغن آفتابگردان در مقایسه با نمونه روغن شاهد (بدون فیلم) مشخص شود. نحوه انجام بررسی به‌صورت زیر بود:

ابتدا عـدد پراکسید (مطابق روش AOCS شماره (Cd8-53)، عدد اسیدی (مطابق روش AOCS شماره (Cd3d) و تیوبابیتوریک اسید (مطابق روش AOCS شماره (Cd19-90) [15] روغن آفتابگردان بدون آنتی‌کسیدان در زمان صفر اندازه‌گیری و ثبت‌شد. سپس شیشه‌های درب‌داری به ابعاد مشخص انتخاب و میزان 80 گرم روغن آفتابگردان داخل آن‌ها ریخته‌شد. نمونه‌های فیلم به‌صورت دایره‌ای به‌نحوی بریده‌شد که قطر آن‌ها از قطر دهانه شیشه‌ها کم‌تر و به راحتی داخل شیشه و درون روغن قرار گرفت. یک شیشه هم حاوی فقط روغن آفتابگردان و بدون فیلم پروتئینی به‌عنوان شاهد در نظر گرفته‌شد. از هر نمونه 3 تکرار برای نمونه‌برداری در زمان‌های 15 روزه تامین و شیشه‌ها داخل آون 40 درجه‌سانتی‌گراد قرار داده‌شد. مدت انبارداری 45 روز در نظر گرفته شد و در این مدت هر 15 روز یک‌بار اندیس‌های مربوط به اکسیداسیون روغن در نمونه‌های ذکر شده اندازه‌گیری و ثبت‌شد.

9-2- تجزیه و تحلیل داده‌ها

آزمایش‌ها با سه تکرار انجام و در بخش تأثیر فیلم پروتئینی بر شاخص‌های اکسیداسیون روغن آزمایش اسپیلیت پلات در زمان در قالب طرح به‌طورکامل تصادفی با استفاده از نرم افزارهای (9.1) SAS و MSTAT انجام گرفت.

3- نتایج و بحث

میزان پروتئین آرد دانه گاودانه 27/62 درصد بر اساس وزن

1. 2,2-diphenyl-1-pycrilhydrazyl (DPPH)

خشک به‌دست‌آمد که قابل مقایسه با نتیجه سایر محققان است که میزان پروتئین دانه گاودانه را در محدوده 20/1 تا 32 درصد گزارش کرده‌اند [16]. فرایند استخراج پروتئین نیز منجر به تهیه کنسانتره پروتئینی با خلوص 86/45 درصد براساس وزن خشک شد که این کنسانتره برای تهیه فیلم مورد استفاده قرارگرفت. با توجه به عوامل محدودکننده تغذیه ای مانند ال ـ کاناوانین ، هماگلوتنین، بازدارنده‌های پروتئازی وتانن‌ها که در دانه گاودانه وجوددارد [17] مقدار پروتئین به نسبت بالای آن، فراوانی و قیمت مناسب آن در ایران در مقایسه با سایر حبوبات، این دانه پتانسیل بسیار خوبی برای تهیه فیلم‌های پروتئینی دارد. ضمن آن‌که خصوصیات فیزیکی ـ شیمیایی فیلم تهیه‌شده از آن نیز نسبت به منابع پروتئینی دیگر قابل مقایسه و در برخی موارد بهتر بود [10].

3-1- ضخامت

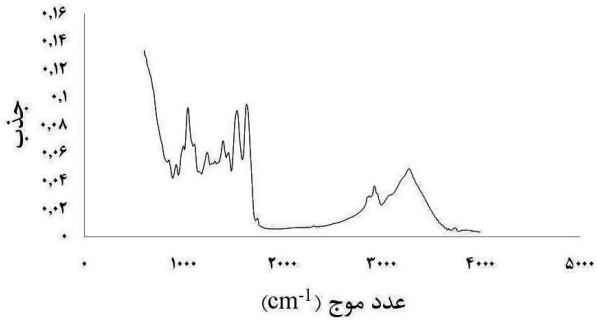
فیلم‌های تهیه‌شده پس از خشک‌شدن به آسانی از ظرف جداشده و ضخامت آن‌ها پس از مشروط‌شدن در نقاط مختلف ارزیابی شد. میانگین اعداد به‌دست‌آمده در محدوده 0/02± 0/1 میلی‌متر بود.

3-2- میزان مقاومت سطحی

همان‌طور که پیش از این اشاره شد، میزان مقاومت سطحی نمونه‌های فیلم با توجه به زمان تخلیه بار الکتریکی، ارزیابی شد. زمانی که ولتاژ 150 ولت بین دو سر نمونه اعمال شد، ثبت زمان امکان پذیر نبود به‌همین دلیل از ولتاژهای کم‌تر یعنی 50 و 15 ولت استفاده‌شد. با توجه به زمان‌های ثبت‌شده و طبق فرمول در ولتاژ 50 ولت، مقاومت سطحی فیلم‌ها 3×10^{11} اهم و در ولتاژ 15 ولت، $5/5\times 10^{11}$ اهم به‌دست آمد. با توجه به مقاومت بالای به‌دست‌آمده، فیلم تهیه‌شده در دسته اجسام نارسانا قرار می‌گیرد البته در مقایسه با پلیمرهای سنتزی مانند پلی اتیلن سبک (که در همین تحقیق میزان مقاومت سطحی آن مورد بررسی قرار گرفت و با اعمال ولتاژ 200 ولت بین دو سر نمونه بعد از گذشت 20 دقیقه هم تخلیه بار الکتریکی به‌طور کامل انجام‌نشد) نارسانایی آن کم‌تر است. مقاومت سطحی نیز به‌عنوان یکی از خصوصیات ویژه هر ماده می‌تواند در کاربرد موثر از آن مد نظر قرار گیرد.

3-3- آنالیز ساختار فیلم با روش تبدیل فوریه مادون قرمز

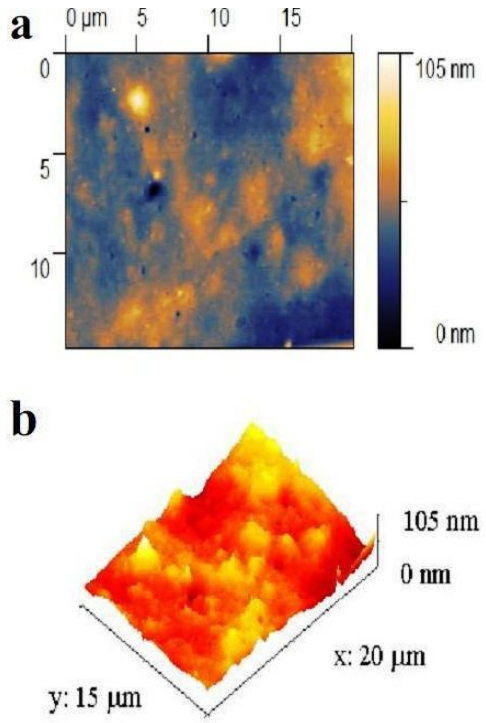
به‌طور معمول از روش تبدیل فوریه مادون قرمز به‌عنوان وسیله‌ای مناسب، جهت بررسی برهم‌کنش‌های ساختاری استفاده‌می‌شود. در این تحقیق نیز از روش تبدیل فوریه مادون قرمز به همین منظور استفاده‌شد (شکل 1). با توجه به فرمولاسیون فیلم و شرایط قلیایی استفاده شده، برهم‌کنش بین مجموعه‌ای از اسیدهای آمینه درگیر در شبکه پروتئینی و گلیسرول به‌عنوان نرم‌کننده قابل انتظار است. مطابق با طیف به‌دست آمده، پیک‌های مشخصی در $3284\ cm^{-1}$ مربوط به OH و NH (کششی)، $3100\ cm^{-1}$ مربوط به C-H آروماتیک (کششی)، 2937 و $2908\ cm^{-1}$مربوط به C-H آلیفاتیک (کششی)، $1753\ cm^{-1}$ مربوط به گروه کربونیل، 1643 و $1546\ cm^{-1}$ مربوط به N-H آمیدی (خمشی)، $1458\ cm^{-1}$ مربوط به CH2 (خمشی)، $1404\ cm^{-1}$ مربوط به گروه کربوکسیلات (O=C-O-) و $1045\ cm^{-1}$ مربوط به C-O (کششی) قابل مشاهده است. طیف به‌دست آمده متعلق به فیلم تهیه‌شده از کنسانتره پروتئینی دانه گاودانه (5 درصد در 100 میلی‌لیتر آب مقطر قلیایی با pH 11) و گلیسرول (50 درصد وزنی/ وزنی کنسانتره پروتئینی) به‌عنوان نرم‌کننده است و با اضافه کردن یا کم کردن هر ترکیبی در فرمولاسیون فیلم، پیک‌ها از نظر شدت و موقعیت تغییر کرده و در مقایسه با پیک نمونه کنترل می‌توان نتایج حاصله را تفسیر کرد.



شکل (1) طیف تبدیل فوریه مادون قرمز فیلم تهیه شده از پروتئین دانه گاودانه

3-4- مطالعه ریز ساختار فیلم با استفاده از میکروسکوپ نیروی اتمی

در شکل 2 تصاویر دو بعدی (سطح) و سه بعدی فیلم حاصل از پروتئین دانه گاودانه قابل مشاهده است. با توجه به تصاویر، فیلم مورد نظر سطحی به‌نسبت نرم و ماتریکس پیوسته‌ای دارد و زبری سطح 10/63 نانومتر را نشان می‌دهد. در تحقیقات دیگر زبری سطح 19/7 نانومتر برای فیلم تهیه‌شده از زئین ذرت با نرم‌کننده گلیسرول و 79/1 میکرومتر برای فیلم حاصل از پروتئین آب پنیر و نرم‌کننده گلیسرول (ابعاد اسکن 10×10میکرومتر) به‌دست آمده‌است [6]. در واقع این تصاویر مربوط به فیلم پروتئینی گاودانه با فرمولی که پیش از این اشاره شده، می‌باشد. بدیهی است هر تغییری در فرمولاسیون، بر ساختار دو بعدی و سه بعدی و زبری سطح فیلم مورد نظر تأثیرگذار است و با مقایسه با تصاویر نمونه کنترل می‌توان تفاوت‌ها را تشخیص داد.



شکل (2) تصاویر دو بعدی (a) و سه بعدی (b) فیلم تهیه شده از پروتئین دانه گاودانه

3-5- مطالعه ریز ساختار فیلم با استفاده از میکروسکوپ الکترونی

تصویر سطح مقطع فیلم تهیه‌شده از پروتئین دانه گاودانه درشکل 3 آورده شده‌است. فیلم مورد نظر یک ساختار شبکه‌ای و به نسبت متراکم را نشان می‌دهد البته سوراخ‌های بسیار ریزی نیز در بعضی نقاط آن دیده می‌شود. در واقع بسیاری از خصوصیات فیلم تهیه‌شده با توجه به ساختار آن قابل‌توجیه است. از جمله این که هرچند میزان نفوذپذیری آن به رطوبت در مقایسه با برخی فیلم‌های پروتئینی دیگر کم‌تر است [10]. اما در مقایسه با فیلم‌های سنتزی مانند پلی اتیلن سبک بسیار بیش‌تر است که با توجه به ساختار آن قابل توجیه است. باوجود این‌که فیلم موردنظر انعطاف‌پذیری بسیار خوبی در مقایسه با سایر فیلم‌های پروتئینی دارد [10]. وجود سوراخ‌های ریز مشاهده‌شده در ساختار آن سبب می‌شوند که فیلم تا حدی نیروی کششی اعمال‌شده را تحمل کند و بعد از مدتی به‌دلیل وجود همین سوراخ‌ها دچار پارگی‌شده و قابلیت کشش خووجود همین سوراخ‌ها دچار پارگی‌شده و قابلیت کشش خود را از دست بدهد. Tang و همکاران (۲۰۰۵) [۱۸] نیز ساختار کشباف مانند و به‌طور نسبی متخلل را برای فیلم تهیه‌شده از پروتئین سویا (و نرم‌کننده گلیسرول به میزان ۰/۶ گرم به ازای هر گرم پروتئین سویا) گزارش کردند. صارم نژاد و همکاران (۲۰۱۱) [۱۹] نیز با مشاهده سطح مقطع فیلم تهیه‌شده از باقلا (نرم‌کننده گلیسرول ۴۰ درصد و pH ۱۲) ساختار به‌طور نسبی متخلل را برای آن گزارش کردند.

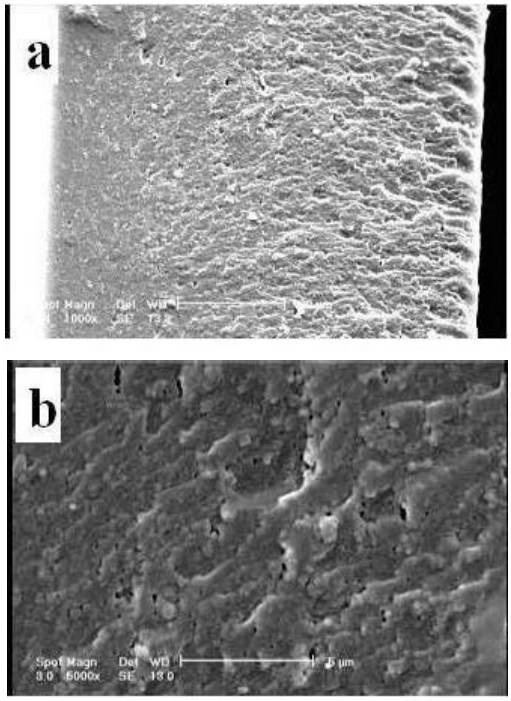
3-6- تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی

فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیلم مورد نظر با روش مهار رادیکال دی‌پی‌پی‌اچ 22/56٪ به‌دست آمد (شکل 4) که در مقایسه با فیلم‌های پلی‌ساکاریدی مانند کیتوزان یا آلجینات که فعالیت آنتی‌اکسیدانی حدود 5٪ ، با همین روش برای آن‌ها گزارش شده بسیار بیش‌تر می‌باشد [14، 13]. فعالیت آن حتی در مقایسه با فیلم‌های پروتئینی نیز مانند فیلم تهیه‌شده از کنجاله آفتابگردان پس از روغن کشی که فعالیت آنتی‌اکسیدانی حدود 10٪ را نشان داد، بالاتر است [7].

در این تحقیق برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی از

روش دی‌پی‌پی‌اچ استفاده شد. در این آزمون هنگامی که محلول دی‌پی‌پی‌اچ (یک رادیکال آزاد پایدار) با نمونه مخلوط شود، نمونه به‌عنوان دهنده اتم هیدروژن عمل‌کرده و یک فرم غیررادیکالی پایدار دی‌پی‌پی‌اچ با تغییر هم‌زمان رنگ بنفش به زرد به‌دست می‌آید. در این تست، آنتی‌اکسیدان‌های موجود در نمونه، دی‌پی‌پی‌اچ را به ترکیبی به‌نام دی‌فنیل‌پیکریل‌هیدرازین تبدیل می‌کنند که زرد رنگ است و تغییر رنگ محلول‌های واکنش دهنده نیز به‌همین دلیل اتفاق می‌افتد. طول واکنش به توانایی هیدروژن دهندگی آنتی‌اکسیدان‌های موجود در نمونه بستگی دارد [13].

فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌ها مربوط به اسیدهای آمینه سازنده آن‌ها است. فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسیدهای آمینه آروماتیک مانند تیروزین، فنیل آلانین و تریپتوفان و اسیدهای آمینه حاوی سولفور مانند سیستئین به توانایی آن‌ها در دادن پروتون به رادیکال‌های آزاد برمی‌گردد [20]. اسیدهای آمینه اسیدی (آسپارتات و گلوتامات) و بازی (لیزین و آرژنین) نیز به‌دلیل کلات‌کردن یون‌های فلزی فعالیت آنتی‌اکسیدانی از



شکل (3) تصاویر تهیه‌شده از مقطع فیلم پروتئینی گاودانه در دو بزرگنمایی 1000 (a) و 5000 (b)

خود نشان می‌دهند [21]. البته موقعیت مناسب اسیدهای آمینه در یک زنجیره پروتئینی نیز فاکتور بسیار مهم و موثری برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها محسوب می‌شود [22]. در جدول 1 آنالیز اسیدهای آمینه پروتئین دانه گاودانه توسط سایر محققان آورده شده‌است. تفاوت فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیلم مورد نظر با سایر فیلم‌های زیست‌تخریب‌پذیر با توجه به منبع تهیه فیلم و روش اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجیه است به این ترتیب که منبع تهیه فیلم مورد نظر پروتئین دانه گاودانه است و همان‌طور که پیش از این اشاره شد، خودِ اسیدهای آمینه سازنده پروتئین‌ها که ساختار اصلی فیلم را تشکیل می‌دهند دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی هستند. بنابراین طبیعی است که در مقایسه با فیلم‌هایی که منشا پلی‌ساکاریدی دارند فعالیت آنتی‌اکسیدانی متفاوتی را نشان‌دهند. در مقایسه با فیلم تهیه‌شده از پروتئین کنجاله آفتابگردان نیز از روش‌های متفاوتی برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی استفاده شده‌است. به این ترتیب که در این تحقیق از روش دی‌پی‌پی‌اچ برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی استفاده شد درحالی‌که فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیلم تهیه‌شده از پروتئین کنجاله آفتابگردان با روش ای‌بی‌اس‌تی[1] ارزیابی گردیده‌است. علاوه‌بر منبع تهیه فیلم، تفاوت در روش اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز می‌تواند یک از علل تفاوت در نتایج به‌دست آمده‌باشد.

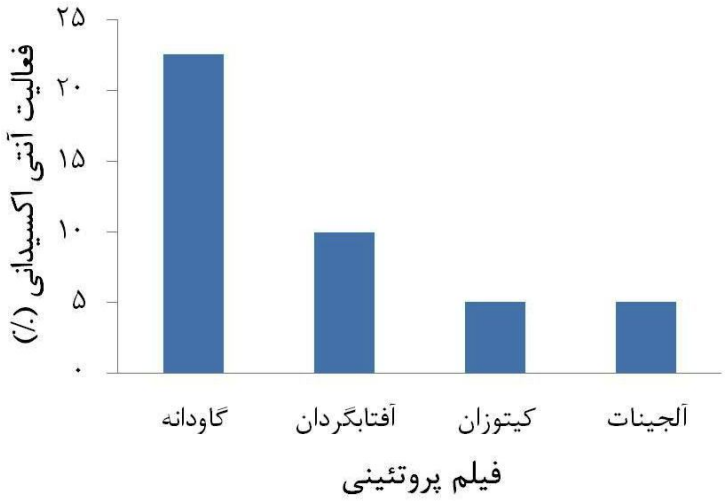
3-7- تأثیر فیلم پروتئینی بر شاخص‌های اکسیداسیون روغن آفتابگردان

مطابق با نتایج به‌دست آمده حضور فیلم پروتئینی اثر معنی‌داری بر کاهش روند اکسیداسیون روغن آفتابگردان داشت. به‌نحوی که عدد پراکسید، عدد اسیدی و عدد تیوباربیتوریک اسید در نمونه‌های روغن حاوی فیلم پروتئینی در مقایسه با نمونه کنترل (بدون فیلم) به‌طور معنی‌داری ($p<0/001$) کم‌تر بود. همان‌طور که پیش از این بحث شد با توجه به این‌که پروتئین‌ها ساختار اصلی فیلم مورد نظر در این تحقیق را تشکیل می‌دهند و پروتئین‌های مختلف نیز دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی هستند بنابراین در حضور فیلم روند اکسیداسیون کاهش یافته‌است.

1. 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)

جدول (1) میزان پروتئین (بر اساس وزن خشک) و اسیدهای آمینه در 100 گرم پروتئین دانه گاودانه

CP	پروتئین خام	26/56	21/1
Arg	آرژنین	7/42	8/2
His	هیستیدین	2/76	2/7
Ile	ایزولوسین	3/88	3/7
Leu	لوسین	6/63	8/2
Lys	لیزین	7/42	8/0
Met	متیونین	1/11	0/6
Cys	سیستئین	0/49	0/8
Phe	فنیل آلانین	4/47	5/3
Tyr	تیروزین	2/21	2/4
Thr	تریپتوفان	3/88	4/3
Val	والین	3/97	4/6
Asp	اسید آپارتیک	13/83	12/6
Glu	اسید گلوتامیک	19/63	19/6
Gly	گلایسین	4/10	4/7
Ser	سرین	4/52	6/3
Ala	آلانین	4/63	5/0
Pro	پرولین	-	2/3
منبع	-	Sadeghi و همکاران [17]	Pastor-Cavada و همکاران [16]



شکل (4) فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیلم پروتئینی گاودانه در مقایسه با سایر فیلم‌های زیست‌تخریب‌پذیر

فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌ها مربوط به اسیدهای آمینه سازنده آن‌ها است که بسته به نوع و ساختارشان فعالیت آنتی‌اکسیدانی خاصی را نشان می‌دهند و بنابراین می‌توانند اثر مثبتی بر کاهش اکسیداسیون روغن داشته باشند.

3-7-1- عدد پراکسید

در ابتدا عدد پراکسید روغن آفتابگردان 0/998 میلی اکی‌والان اکسیژن در کیلوگرم روغن بود که در هر دو نوع نمونه تا روز 45 روندی صعودی داشته‌است (شکل 5) با این تفاوت که میزان افزایش آن در نمونه روغن بدون فیلم به مراتب بیش‌تر از نمونه روغن حاوی فیلم بوده‌است. هیدروپراکسیدها محصول واکنش اکسیژن و اسیدهای چرب غیراشباع هستند که در مرحله اول اکسیداسیون تشکیل می‌شوند و بنابراین با گذشت زمان میزان این ترکیبات افزایش می‌یابد تا این‌که مقدار آن‌ها به حد معینی برسد، سپس اکسیداسیون وارد مرحله ثانویه شده و این ترکیبات به سرعت تجزیه‌شده و مواد فرار آلدهیدی و کتونی را تشکیل می‌دهند و بنابراین عدد پراکسید کاهش می‌یابد. بنابر این اگر مدت زمان آزمایش طولانی‌تر بود به احتمال زیاد عدد پراکسید کاهش می‌یافت.

3-7-2- عدد اسیدی

در ابتدا عدد اسیدی روغن آفتابگردان 0/127 میلی‌گرم هیدروکسید پتاسیم در گرم روغن بود. شکل 6 نشان می‌دهد که عدد اسیدی نمونه‌ها با افزایش زمان انبارداری به‌طور تقریبی روند افزایشی داشته است، البته این افزایش در نمونه روغن کنترل نسبت به نمونه روغن حاوی فیلم بیش‌تر است. در نتیجه فساد هیدرولیتیکی و اکسیداسیون روغن، مولکول تری‌آسیل گلیسرول به گلیسرول و اسیدهای چرب آزاد تجزیه می‌شود در نتیجه عدد اسیدی روغن افزایش می‌یابد.

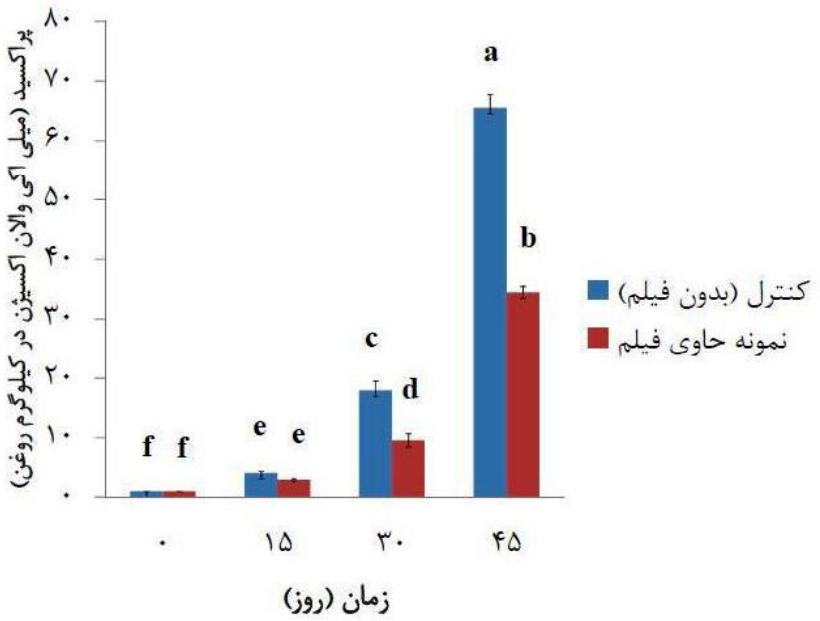
3-7-3- عدد تیوباربیتوریک اسید

گاهی به‌دلیل گسترش فساد روغن، محصولات اولیه اکسیداسیون مانند هیدروپراکسیدها به آلدهیدها و کتون‌ها تجزیه‌شده و عدد پراکسید کاهش می‌یابد، بنابراین جهت تشخیص و اندازه‌گیری محصولات ثانویه حاصل از اکسیداسیون مانند آلدهیدها و کتون‌ها آزمایش تیوباربیتوریک اسید انجام می‌شود. مالون آلدهید، آلدهیدی است که به‌طور عمده در اثر تجزیه اسیدهای چرب چند غیراشباعی تشکیل می‌شود. در اندازه‌گیری اندیس تیوباربیتوریک اسید، مالون آلدهید با تیوباربیتوریک اسید واکنش می‌دهد. بنابراین میزان تیوباربیتوریک طی اکسیداسیون افزایش می‌یابد. طی اکسیداسیون ممکن است آلدهیدها خود اکسیدشده و به اسیدهای کربوکسیلیک تبدیل شوند که در این صورت میزان تیوباربیتوریک اسید کاهش خواهد یافت [23] مانند آنچه در نمونه کنترل در روز 45 انبارداری مشاهده‌شد (شکل 7).

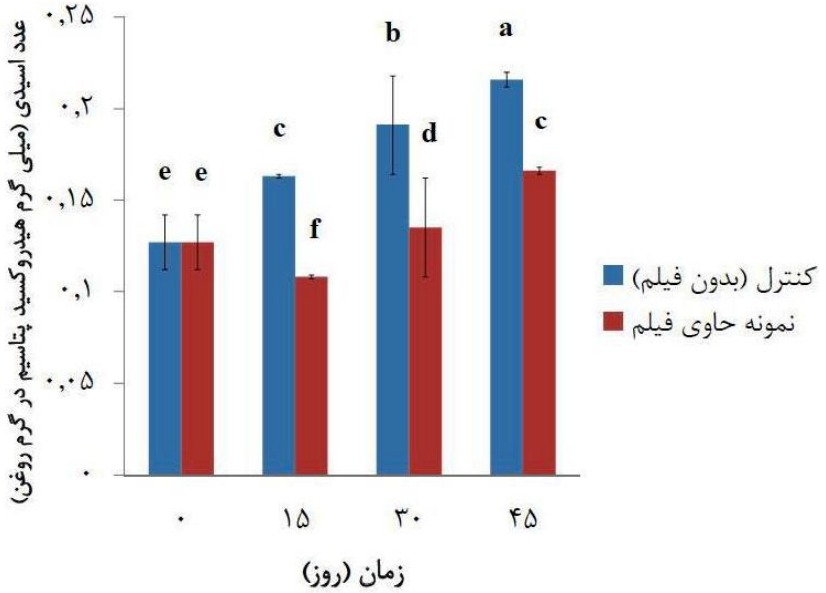
در تحقیقی توسط Atares و همکاران (2010) [24] نیز ظرفیت آنتی‌اکسیدانی فیلم‌های پروتئینی تهیه‌شده از کازئینات سدیم تنها و حاوی دارچین و زنجبیل (نسبت دارچین و زنجبیل به پروتئین 0/075 به 1) بر عدد پراکسید روغن آفتابگردان در یک دوره انبارداری 50 روزه و در دمای 40 درجه‌سانتی‌گراد مورد بررسی قرارگرفت. نتایج نشان داد عدد پراکسید در نمونه‌هایی که از فیلم پروتئینی به‌عنوان پوشش برای درب ظرف حاوی روغن آفتابگردان استفاده شده بود به‌طور معنی‌داری کم‌تر از نمونه بدون فیلم بود. در این تحقیق فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیلم‌های پروتئینی بیش‌تر از طریق میزان نفوذپذیری آن‌ها به اکسیژن و تأثیر آن بر اکسیداسیون روغن مد نظر قرار گرفته بود.

Cho و همکاران (2010) [25] نیز پایداری روغن زیتون را از طریق اندازه‌گیری عدد پراکسید در کیسه‌های[1] تهیه‌شده از نایلون و کیسه‌های دو لایه تهیه‌شده از زئین ذرت و ایزوله پروتئینی سویا در سه دمای 30، 40، و 50 درجه‌سانتی‌گراد و به‌مدت 4 ماه بررسی کردند. مطابق نتایج به‌دست‌آمده پایداری روغن زیتون در کیسه‌های دو لایه فیلم‌های پروتئینی نسبت به کیسه‌های نایلونی بیش‌تر بود ضمن آن‌که مطابق انتظار عدد پراکسید هردو نوع نمونه در دماهای بالاتر نسبت به دماهای پایین‌تر افزایش بیش‌تری داشت. در این تحقیق نیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیلم‌ها هم از طریق میزان نفوذپذیری آن‌ها به اکسیژن و هم تأثیر ترکیبات ساختار تشکیل دهنده آن‌ها و تأثیرشان بر اکسیداسیون روغن مورد بررسی قرار گرفته بود.

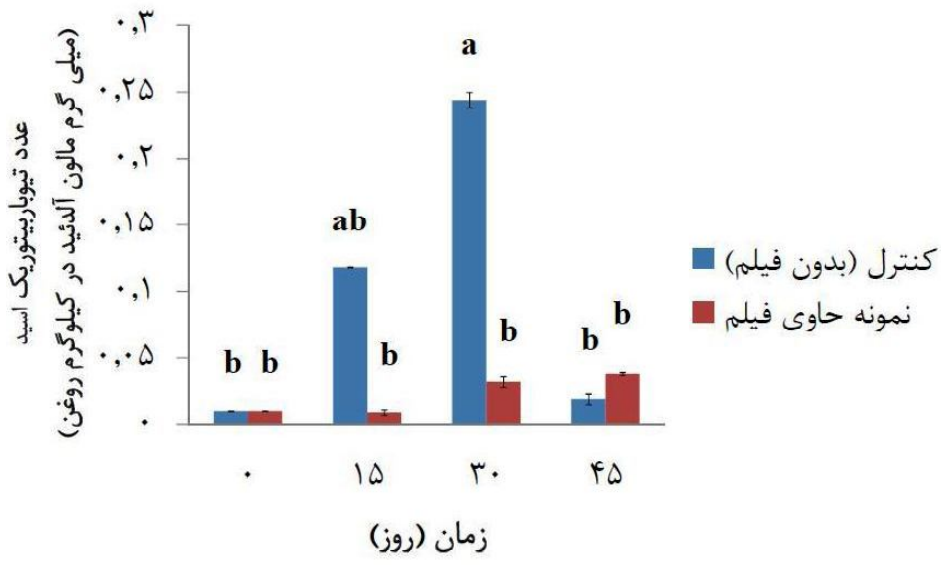
1. Pouch



شکل (5) مقایسه میانگین اثر متقابل نوع نمونه روغن و زمان بر عدد پراکسید روغن آفتابگردان در حضور و عدم حضور فیلم پروتئینی
در هر ستون، تفاوت میانگین‌های دارای حروف غیر مشترک با آزمون LSD در سطح 5 درصد معنی‌دار است.



شکل (6) مقایسه میانگین اثر متقابل نوع نمونه روغن و زمان بر عدد اسیدی روغن آفتابگردان در حضور و عدم حضور فیلم پروتئینی
در هر ستون، تفاوت میانگین‌های دارای حروف غیر مشترک با آزمون LSD در سطح 5 درصد معنی‌دار است.



شکل (7) مقایسه میانگین اثر متقابل نوع نمونه روغن و زمان بر عددتیوباربیتوریک اسید روغن آفتابگردان در حضور و عدم حضور فیلم پروتئینی در هر ستون، تفاوت میانگین‌های دارای حروف غیر مشترک با آزمون LSD در سطح 5 درصد معنی‌دار است.

4- نتیجه گیری

از آن‌جا که ارتباط مستقیمی بین خصوصیات فیزیکی ـ شیمیایی و ساختاری فیلم‌ها وجود دارد، در این تحقیق خصوصیات ساختاری فیلم حاصل از پروتئین دانه گاودانه، با تبدیل فوریه مادون قرمز، میکروسکوپ نیروی اتمی و میکروسکوپ الکترونی مورد بررسی قرار گرفت. مطابق با نتایج به‌دست‌آمده فیلم مورد نظر، به‌طور نسبی سطحی صاف و ساختاری متراکم و به‌هم پیوسته‌ای دارد که خصوصیات فیزیکی ـ شیمیایی آن را تاحد زیادی توجیه می‌کند. هم‌چنین فیلم پروتئینی گاودانه به‌دلیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌نسبت مناسب، تأثیر مثبتی بر روند کاهش اکسیداسیون روغن آفتابگردان داشت و در صورت بهبود برخی نقاط ضعف آن به‌ویژه میزان نفوذپذیری به رطوبت می‌تواند گزینه مناسبی جهت استفاده در بسته‌بندی موادغذایی باشد.

منابع

[1] Cutter, C.N. (2006). Opportunities for bio-based packaging technologies to improve the quality and safety of fresh and further processed muscle foods. *Meat Sci.*, 74, 131-142.

[2] Lee, J.W., Son, S.M., Hong, S.I. (2008). Characterization of protein-coated polypropylene films as a novel composite structure for active food packaging application. *J. Food Eng.*, 86, 484–493.

[3] Popovic, S., Pericin, D., Vastag, Z., Popovic, L., Lazic, V. (2011). Evaluation of edible film-forming ability of pumpkin oil cake; effect of pH and temperature. *Food Hydrocolloid.*, 25, 470-476.

[4] Bamdad, F., Goli, A.H., Kadivar, M. (2006). Preparation and characterization of proteinous film from lentil (Lens culinaris) Edible film from lentil (Lens culinaris). *Food Res. Int.*, 39, 106–111.

[5] قنبرزاده، ب.؛ الماسی، ه. زاهدی، ی. (1388) بیوپلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر و خوراکی در بسته‌بندی موادغذایی و دارویی. چاپ اول، انتشارات امیر کبیر، ص 86-81.

[6] Ghanbarzadeh, B., Oromiehi, A.R. (2008).

Biodegradable biocomposite films based on whey protein and zein: Barrier, mechanical properties and AFM analysis. *Int. J. Biol. Macromo*., 43, 209–215.

[7] Salgado, P.R., Molina Ortiz, S.E., Petruccelli, S., Mauri, A.N. (2010). Biodegradable sunflower protein films naturally activated with antioxidant compounds. *Food Hydrocolloid*., 24, 525–533.

[8] Larbi, A., El.Moneim, M.A., Nakkoul, H., Jammal, B., Hassan, S. (2011). Intra-species variations in yield and quality determinants in Vicia species:1. Bitter vetch (*Vicia ervili*a L.). *Anim. Feed Sci. Tech*., 165, 278–287.

[9] Piergiovanni, A.R., Taranto, G. (2005). Specific differentiation in Vicia genus by means of capillary electrophoresis. *J. Chromatogr*. A., 1069, 253–260.

[10] Arabestani, A., Kadivar, M., Shahedi, M., Goli, S.A.H., Porta, R. (2013). Properties of a new protein film from bitter vetch (*Vicia ervilia*) and effect of CaCl2 on its hydrophobicity. *Int. J. Biol. Macromol*., 57, 118-123.

[11] Monsoor, M.A., Yusuf, H.K.M. (2002). In vitro protein digestibility of lathyrus pea (*Lathyrus satirus*), lentil (*Lens culinaris*), and chickpea (*Cicer arietinum*). Int. *J. Food Sci. Tech*., 37, 97–99.

[12] American Association of Cereal Chemists. (2003). *Approved methods of AACC*., The Association: St. Paul, MN.

[13] Siripatrawan, U., Harte, B. (2010). Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloid*., 24, 770-775.

[14] Norajit, K., Kim, k.M., Ryu, G.H. (2010). Comparative studies on the characterization and antioxidant properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract, *J. Food Eng*., 98, 377-384.

[15] Horwitz, W. (2004). *Official methods of analysis of AOAC* International, 17th ed., Gaithersburg, Maryland.

[16] Pastor.Cavada, E., Juan, R., Pastor, J.E., Alaiz, M., Vioque, J. (2011). Nutritional characteristics of seed proteins in 28 Vicia species (Fabacease) from southern spain. *J. Food Sci*., 76, 1118-1123.

[17] Sadeghi, GH., Pourreza, J., Samei, A., Rahmani, H. (2009). Chemical composition and some anti-nutrient content of raw and processed bitter vetch (*Vicia ervilia*) seed for use as feeding stuff in poultry diet. *Trop. Anim. Health Prod*., 41, 85–93.

[18] 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. *J. Biotech*., 120, 296–307.

[19] Saremnezhad, S., Azizi, M.H., Barzegar, M., Abbasi, S., Ahmadi, E. (2011). Properties of a new edible film made of faba bean protein isolate. *J. Agric. Sci. Tech*., 13, 181-192.

[20] Hu, M., McClements, D.J., Decker, E.A. (2003). Lipid oxidation in corn oil-in-water emulsions stabilized by casein, whey protein isolate and soy protein isolate. *J. Agic. Food Chem*., 51, 1696-1700.

[21] Rajapakse, N., Mendis, E., Jung, W., Je, J., Kim, S. (2005). Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. *Food Res. Int*., 38, 175-182.

[22] Acran, I., Yemencioglu, A. (2007). Antioxidant activity of protein extracts from heat-treated or thermally processed chickpeas and white beans. *Food Chem*., 103, 301-312.

[23] فاطمی، ح. (1381) شیمی مواد غذایی، چاپ سوم، شرکت سهامی انتشار، ص 176-179.

[24] Atarés, L., De Jesṡ, C., Talens, P., Chiralt, A. (2010). Characterization of SPI-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. *J. Food Eng*., 99, 384–391.

[25]Cho S., Lee, S.Y., Rhee, C. (2010). Edible oxygen barrier bilayer film pouches from corn zein and soy protein isolate for olive oil packaging. *LWT-Food sci. Tech*., 43(8),1234-1239.