تاثیر آنزیم ترانس گلوتامیناز بر پایداری امولسیون پروتئین استخراج شده از عضله ماهی فیتوفاگ(*Hypophthalmichthys molitrix*)

ربابه سقایی[a]، علی معتمدزادگان [b*]، مسعود رضایی[c]

[a] *دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، ورامین، ایران*
[b] *استادیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، دانشکده مهندسی زراعی، گروه علوم و صنایع غذایی، مازندران، ایران*
[c] *دانشیار دانشگاه تربیت مدرس، واحد نور، دانشکده علوم دریایی و منابع طبیعی، گروه شیلات، مازندران، ایران*

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۳/۱۸ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۰/۹/۴

چکیده

مقدمه: هدف از این تحقیق بررسی تاثیر آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی بر بهبود خواص امولسیون کنندگی پروتئین ماهی فیتوفاگ می باشد.

مواد و روش ها: بعد از استخراج پروتئین از گوشت ماهی فیتوفاگ، جهت بررسی روند پایداری امولسیون به مدت ۴ و ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد، پروتئین با آنزیم ترانس گلوتامیناز با فعالیت آنزیمی ۱۰۰ واحد بر میلی گرم پروتئین در غلظت های مختلف (۰، ۰/۲۵، ۰/۶۳، ۱/۰۱، ۱/۲۵یونیت بر میلی گرم پروتئین) و دماهای (۵، ۱۳، ۲۵، ۳۶، ۴۵ درجه سانتی گراد) به مدت (۳۰، ۱۰۹، ۲۲۵، ۳۴۱، ۴۴۰ دقیقه) با استفاده از طرح آزمایشی RSM در قالب طرح مرکب مرکزی (CCD) تیمار داده شد.

یافته ها: براساس نتایج بدست آمده پایداری امولسیون از ۴ ساعت به ۲۴ ساعت بعد از تولید امولسیون افزایش چشمگیری داشت. یافته ها نشان می دهند افزایش و کاهش زمان و دمای فعالیت آنزیم ترانس گلوتامیناز تاثیر معناداری ($P < ۰/۰۵$) بر بهبود پایداری امولسیون دارد.

نتیجه گیری: فعالیت آنزیم سبب افزایش اتصالات عرضی در ساختمان پروتئین و بهبود ویژگی ویسکو الاستیک پروتئین در سطح مشترک می شود که در نتیجه این تغییرات، خواص امولسیون کنندگی بهبود می یابد.

واژه‌های کلیدی: *آنزیم ترانس گلوتامیناز، پایداری امولسیون، پروتئین عضله ماهی فیتوفاگ*

[*] نویسنده مسئول مکاتبات email: amotgan@sanru.ac.ir

jftn.srbiau.ac.ir

مقدمه

ساختار امولسیونی طیف وسیعی از محصولات غذایی را در بر دارد که عموما توسط پروتئین یا امولسیفایرهای دیگر پایدار می‌شود (Wild *et al*., 2004). فاکتورهای مختلفی از جمله، ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی (تشکیل باندهای کووالانسی) و بیولوژیکی (تخمیر) در پایداری سیستم امولسیونی موثرند. پروتئین‌ها با داشتن سرهای قطبی و غیر قطبی در مولکول خود و خصوصیت ویسکوالاستیک لایه مشترک نقش بسیار مهمی در پایداری امولسیون دارند (Sharma *et al*., 2009). نتایج بررسی‌های مختلف نشان داده ساختمان پروتئین در ایجاد سطح الاستیک و خواص کاری پروتئین اهمیت بسزایی دارد (Wild *et al*., 2004). خواص کاری پروتئین نظیر ژل کنندگی، ظرفیت نگهداری آب، ویسکوزیته، پایداری حرارتی، امولسیون کنندگی و کف‌کنندگی منعکس کننده ارتباط بین ساختمان و اجزای پروتئین است (Ionesca *et al*., 2008). در این راستا پیوندهای عرضی پروتئین-پروتئین می تواند نقش بسیار مهمی در بهبود ویژگی های کاری پروتئین مواد غذایی ایفا کند (Gerrard, 2002) که در این خصوص روش های شیمیایی، فیزیکوشیمیایی و آنزیمی بسیار استفاده شده است (Ionesca *et al*., 2008). اما روش آنزیمی به منظور کنترل بهتر خصوصیات تکنولوژیکی در حد مطلوب و یکنواخت (Stangierski *et al*., 2008) و رسیدن به بالاترین سطح ویژگی‌های عملکردی پروتئین‌ها در زمان معین بیشتر مورد توجه است (Ahhmed *et al*., 2009). در سالهای اخیر توانایی آنزیم ترانس گلوتامیناز در بهبود ویژگی‌های پروتئین در موارد گوناگون اثبات شده است (Anuradha & Prakash, 2009). این آنزیم مرکب از ۳۳۱ اسید آمینه (Ahhmed *et al*., 2009) که واکنش‌های انتقال آسیل را میان باندهای پپتیدی گلوتامین به عنوان دهنده آسیل و گروه ε-amin از باندهای پپتیدی لیزین، آمین های اولیه و پپتیدها به عنوان گیرنده آسیل کاتالیز می‌کند (Sharma *et al*., 2002) که نتیجه آن تشکیل پیوندهای *ε-(γ- Glutaminyl)lysine* درونی و اتصالات عرضی بین مولکولی در ساختار پروتئین است. این باندها در مقابل پروتئولیز بسیار مقاومند (Norziah *et al*., 2009) و موجب افزایش خصوصیت ویسکوالاستیک پروتئین در سطح آب و روغن و بهبود پایداری امولسیون می‌شود (Sharma *et al*., 2002). در مطالعه انجام شده توسط Ionescu و همکاران در سال (۲۰۰۸) خصوصیات عملکردی پروتئین میوفیبریلار گوشت گاو عمل آوری شده با آنزیم ترانس گلوتامیناز نشان داد، میزان جذب آب و خواص امولسیون کنندگی به طور چشمگیری بهبود می یابد. با توجه به برتری امولسیون کننده‌های پروتئینی در صنایع غذایی، طبیعی و غیر سمی بودن پروتئین‌ها و در بسیاری موارد قابل دسترس بودنشان (Leal_calderon *et al*., 2007) هدف از این تحقیق تعیین تاثیر آنزیم ترانس گلوتامیناز بر بهبود خواص کاری پروتئین ماهی فیتوفاگ است.

مواد و روش ها

- **مواد مورد استفاده در آزمایش**

ماهیان فیتوفاگ با وزن تقریبی ۱۰۰۰-۸۰۰ گرم به صورت زنده جهت مصرف روزانه از بازار ماهی واقع در شهرستان نور تهیه و در کوتاهترین زمان با رعایت شرایط صحیح انتقال به آزمایشگاه شیلات دانشکده علوم دریایی و منابع طبیعی تربیت مدرس واحد نور منتقل گردید. انتخاب ماهی به صورت تصادفی از بین ماهیان صید شده هم اندازه و سالم صورت پذیرفت. سریعا پوست کنی و تخلیه حفره شکمی به روش دستی در دمای آزمایشگاه انجام و جهت ادامه آزمایشات، فیله به روش دستی جداسازی و در هاون چینی خرد و همگن شد.

- **آنزیم ترانس گلوتامیناز**

آنزیم ترانس گلوتامیناز توسط شرکت آژینوموتو از کشور فرانسه تهیه گردید. آنزیم به صورت بسته های پودری ۱۰۰ گرمی، حاوی ۹۹ درصد مالتودکسترین و ۱درصد آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی با فعالیت آنزیمی حدود ۱۰۰ یونیت بر گرم پروتئین است. شرایط مطلوب فعالیت آنزیم (۶۰-۲ درجه سانتی گراد) و در دمای ۱۰۰-۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه غیر فعال می‌شود. آنزیم خریداری شده تا زمان مصرف در دمای یخچال (کمتر از ۵ درجه سانتی‌گراد) یا فریزر نگهداری شد.

- **استخراج پروتئین**

به منظور استخراج پروتئین های میوفیبریلار، فیله خرد و همگن شده با محلول ۰/۵ مولار کلرید سدیم به نسبت ۱

ifn.srbiau.ac.ir

به ۵ (w/v) اختلاط و با هموژنایزر (Wiggenhauser, N1565) با سرعت ۱۰۰۰دور در دقیقه به مدت کمتر از ۱ دقیقه در دمای آزمایشگاه هموژن گردید. جهت جداسازی کامل دو فاز بافت و محلول مخلوط هموژن شده با سانتریفوژ (HERMLE, Z36HK) در دور ۱۳۰۰۰rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه مخلوط سانتریفوژ شد. مایع فوقانی عملیات سانتریفوژ به عنوان پروتئین‌های محلول مورد استفاده قرار گرفت. میزان پروتئین استخراج شده به روش بیورت (Gornall *et al*., 1949) با دستگاه اسپکتوفوتومتر (UNICO, UV4802H) در جذب ۵۴۰ نانومتر تعیین گردید، سپس غلظت پروتئین در سطح ۵ میلی گرم بر میلی لیتر با استفاده از آب مقطر استاندارد، و تاثیر آنزیم ترانس گلوتامیناز در سطوح مختلف فعالیت آنزیم (۰، ۰/۲۵، ۰/۶۳، ۱/۰۱، ۱/۲۵میلی‌گرم)، دماهای (۵، ۱۳، ۲۵، ۳۶و ۴۵ درجه سانتی‌گراد) و زمان های (۳۰، ۱۰۹، ۲۲۵، ۳۴۱ و ۴۲۰دقیقه) بررسی شد.

- **اندازه گیری پایداری امولسیون (ES)**

آماده سازی امولسیون به‌روش (Lorena, Crapkin, & Paredi, 2008) با اندکی تغییرات انجام گردیده است. ۵ میلی‌لیتر نمونه پروتئین تیمار داده شده با آنزیم با ۵ میلی‌لیتر روغن آفتابگردان خوراکی مخلوط سپس با هموژنایزر (Wiggenhauser, N1565) در دور ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱ دقیقه هموژن شد. جهت اندازه‌گیری پایداری امولسیون ابتدا شاخص امولسیون کنندگی بعد از ساخت امولسیون با استناد به روش Pacheco-Agiuilar و همکاران در سال (۲۰۰۸) تعیین گردید. از انتهای بشر حاوی امولسیون از فاز آبی ۵۰ ماکرولیتر با سمپلر برداشته با ۱۰ میلی لیتر محلول سولفات دودسیل سدیم (SDS) ۰/۱٪ رقیق سازی و جذب در ۵۰۰nm با دستگاه اسپکتوفوتومتر (UNICO, UV4802H) قرائت و از رابطه زیر محاسبه گردید.

$$EAI\left(\frac{m^2}{g}\right) = \frac{2.303 \times 2 \times dil \times A}{C \times \emptyset \times 10000}$$

EAI: شاخص امولسیون کنندگی; A: جذب در ۵۰۰ نانومتر; Dil: فاکتور رقیق سازی ۲۰۰; C: غلظت پروتئین (g/ml) Ø:کسر حجمی فاز دیزپرسیون.

شاخص پایداری امولسیون در زمان های ۴ و ۲۴ ساعت بعد از ساخت امولسیون طبق فرمول زیر محاسبه شد. در این بازه زمانی بشر حاوی امولسیون در یخچال دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. بعد از ۴ و ۲۴ ساعت از فاز آبی امولسیون با سمپلر ۵۰ ماکرولیتر برداشته با ۱۰ میلی لیتر محلول SDS ۰/۱ درصد رقیق سازی و جذب با دستگاه اسپکتوفوتومتر (UNICO, UV4802H) در ۵۰۰nm قرائت و در فرمول زیر قرار داده شد (Pacheco-Aguilar *et al*., 2008).

$$\%ESI = 100 - [EAI_{t=0} - \frac{EAI_{t=x}}{EAI_{t=0}}] \times 100$$

X: زمان های ۴ و ۲۴ ساعت

- **طرح آزمایش**

در این پژوهش آزمایشات بر اساس روش کاملا تصادفی در قالب طرح مرکب مرکزی (CCD) شامل ۴ تکرار در نقطه مرکزی و جمعا ۱۸ تیمار انجام شد. مقدار آلفا (فاصله نقطه محوری از مرکز طرح) برابر با ۱/۶۸۲ می باشد. محدوده و مقادیر نقطه مرکزی برای سه متغیر مستقل فعالیت آنزیم، دما و زمان در جدول ۱ نشان داده شده است. پایداری امولسیون در زمان های ۴ و ۲۴ ساعت به عنوان متغیر وابسته بررسی شد.

جدول۱- میزان پایه های کد بندی و بکار برده شده در آزمایش

متغیر های مستقل		پایه				
		-α	-۱	۰	۱	+α
فعالیت آنزیم (یونیت بر میلی گرم پروتئین)	X_1	۰	۰/۲۵	۰/۶۳	۱/۰۱	۱/۲۵
دما (°C)	X_2	۵	۱۳	۲۵	۳۶	۴۵
زمان (دقیقه)	X_3	۳۰	۱۰۹	۲۲۵	۳۴۱	۴۲۰
α= ۱/۶۸۲						

jfn.srbiau.ac.ir

- **تجزیه و تحلیل آماری**

برای تحلیل داده‌ها و بیان روابط بین متغیرها از تحلیل رگرسیونی از نرم‌افزار آماری (SAS، نسخه۹/۰) استفاده گردید (Hu, 1999) و نمودارهای سطح پاسخ و کانتور، با استفاده از نرم افزار MATLAB، نسخه ۷/۷ رسم که در آن تابع بودن دو متغیر مستقل در حالی نشان داده شد که متغیر مستقل دیگر در مقدار بهینه ثابت نگه داشته شده است.

یافته ها

- **بررسی تشخیص مدل‌های برازش شده (Response Surface Methodology)**

در واقع ساخت مدل، یافتن مناسب ترین ضرایب هر جمله در معادله است. در دستورالعمل RSREG (Response surface regression) در نرم‌افزار SAS به منظور برازش معادله چند جمله‌ای و تمام ضرایب ساده (x_3 , x_2 , x_1)، درجه دوم (x_{33}, x_{22} ,x_{11}) و اثرات متقابل آنها (x_{32} , x_{31}, x_{21}) به منظور بررسی معنی‌دار بودن با آزمون t محاسبه و به منظور تعیین معادلات مدل سطح پاسخ برازش‌شده، تمام ضرایب فاقد معنی ($P>۰/۰۵$) حذف شدند. ضرایب معنی‌دار براساس معادله چند جمله‌ای (معادله ۱) برای هر یک از ویژگی‌ها به صورت مدل‌های برازش شده درجدول ۲ نشان داده شده است.

معادله ۱:

$$Y = B_{\circ} + \sum_{i=1}^{3} B_i X_i + \sum_{i=1}^{3} B_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{2} \sum_{j=i+1}^{3} B_{ij} X_i X_j$$

معنی‌داری و اعتبار مدل توسط عدم برازش یا R^2 بررسی شد تا صحت و اثر بخشی مدل تعین شود. همانطور که درجدول ۲ نشان داده شده است، با توجه به سطح معنی‌داری وR^2 تمامی مدل‌ها به قدر کافی معنی‌دار شدند و در نتیجه می‌توان از آن‌ها به منظور آنالیز اثر هر ترکیبی از فاکتورهای مورد ارزیابی به کار گرفت (جدول ۳).

- **اثر متغیرهای مستقل دما و فعالیت آنزیم بر پایداری امولسیون**

تاثیر متقابل دما و فعالیت آنزیم بر پایداری امولسیون طی ۴ ساعت در نمودار ۱ نشان داده شده است. با توجه به شکل در دماهای یکسان، افزایش فعالیت آنزیم تاثیر معنی‌داری بر پایداری امولسیون ندارد. بنابراین در هر غلظتی از آنزیم با افزایش دمای انکوباسیون از ابتدای محور دما تا محدوده مرکزی، منحنی پایداری امولسیون با شیب ملایمی روند صعودی دارد و در ادامه با افزایش بیشتر دما منحنی روند نزولی نشان می‌دهد. احتمالا افزایش دما خارج از محدوده مرکزی موجب بیشینه فعالیت آنزیم و اشباع سوبسترای پروتئینی می‌شود که به دلیل افزایش وزن مولکولی پلیمرها انعطاف‌پذیری پروتئین در قرار گرفتن در سطح مشترک آب و روغن کاهش خواهد یافت.

جدول۲- مدل سطح پاسخ، تاثیر آنزیم ترانس گلوتامیناز بر پایداری امولسیون پروتئین ماهی فیتوفاگ

پاسخ	معنی داری	R^2	مدل چند جمله ای
Y_1	۰/۰۱۰۳	۰/۸۶	$y=۱۰۲/۱۳۸۱۲۷-(۰/۶۴۵۳۷۰\boldsymbol{x_2^2})-(۰/۸۸۹۸\ \mathbf{x_3^2})$
Y_2	۰/۰۱۴۶	۰/۸۵	$y=۱۰۲/۳۰۳۳۹۱-(۰/۵۶۹۲۷۲\ x_1)-(۶۷۲۱۶۶\ \boldsymbol{x_2^2})\ -(۰/۹۱۶۶۳۹\mathbf{x_3^2})$

Y_1: پایداری امولسیون (۴ ساعت)، Y_2: پایداری امولسیون (۲۴ساعت) معنی دار $P<$ ۰/۰۵

جدول ۳- آنالیز باقیمانده های مدل رگرسیون، تاثیر آنزیم ترانس گلوتامیناز بر پایداری امولسیون

	source of variation	Degrees of Freedom	sum of squares	Mean of squares	F-Value	P-value
Y_1	lack of fit	5	۰/۰۰۴۶۷۳	۰/۰۰۰۹۳۵	۳/۶۸	۰/۱۵۶۵
	pure error	3	۰/۰۰۰۷۶۳	۰/۰۰۰۲۵۴		
	total error	8	۰/۰۰۵۴۳۶	۰/۰۰۰۶۷۹		
Y_2	lack of fit	5	۰/۳۰۸۲	۰/۰۰۶۱۶۴	۲/۴۳	۰/۲۴۷۵
	pure error	3	۰/۰۰۷۶	۰/۰۰۲۵۳۳		
	total error	8	۰/۰۳۸۴۲	۰/۰۰۴۸۰۲		

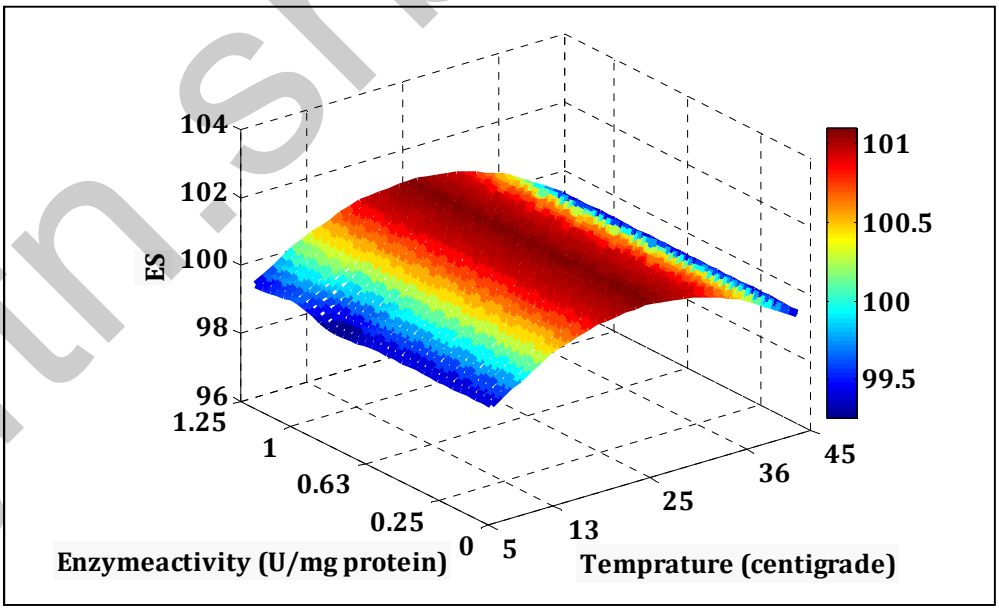
Y_1: پایداری امولسیون (۴ ساعت)، Y_2: پایداری امولسیون (۲۴ ساعت) معنی دار $P<$ ۰/۰۵

jftn.srbiau.ac.ir

در حالی که پایداری امولسیون طی ۲۴ ساعت در دماهای مختلف با افزایش فعالیت آنزیم با شیب نسبتا تند روند کاهشی نشان می‌دهد. اما در فعالیت‌های آنزیمی مختلف با افزایش دمای واکنش تا محدوده نقطه مرکزی (۲۵ درجه سانتی‌گراد)، پایداری امولسیون افزایش یافت در حالیکه در دماهای بالاتر روند معکوس مشاهده می‌شود. بالاترین مقدار پایداری امولسیون در رنج آنزیمی ۰/۱۲۵- ۰/۰۲۵یونیت بر میلی‌گرم پروتئین و دامنه دمایی ۳۰/۱۳- ۱۹/۴ درجه سانتی گراد می‌باشد که این محدوده‌ای بهینه جهت فعالیت آنزیم است (نمودار۲).

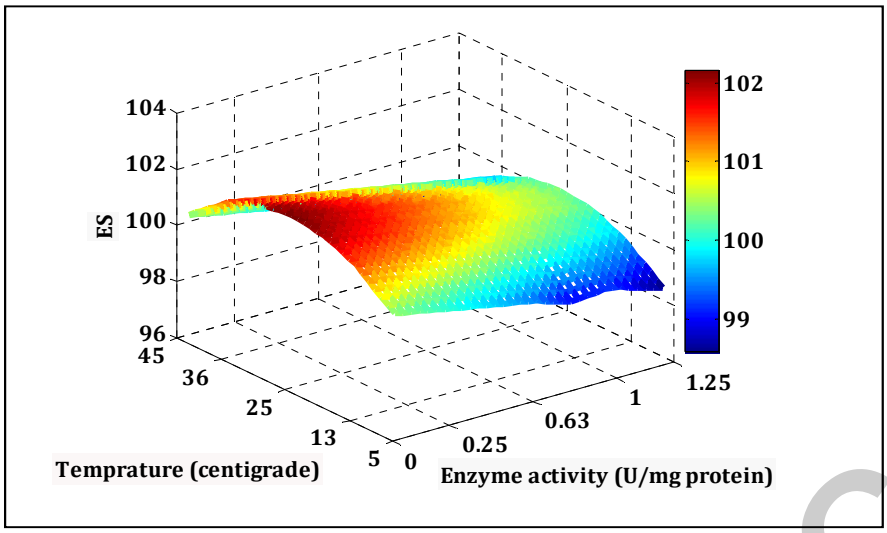
- اثر متغیرهای مستقل زمان و فعالیت آنزیم بر پایداری امولسیون

نمودار ۳ اثر متقابل زمان و فعالیت آنزیم را بر پایداری امولسیون طی ۴ ساعت نشان می‌دهد. با توجه به شکل در زمان‌های یکسان، افزایش فعالیت آنزیم تاثیر معناداری بر پایداری امولسیون ندارد. بدین ترتیب در هر فعالیت آنزیمی با افزایش زمان انکوباسیون تا محدوده نقطه مرکزی (۲۲۵ دقیقه) منحنی پایداری امولسیون با شیب ملایمی رو به افزایش است. در ادامه با افزایش بیشتر زمان سبب کاهش پایداری امولسیون خواهد شد. در محور زمان در محدوده نقطه مرکزی پایداری امولسیون با شیب ثابت در حداکثر مقدار خود قرار دارد. این نمودار نشان می‌دهد احتمالا کاهش سطوح هیدروفوب در نتیجه فعالیت آنزیم با افزایش زمان تا نقطه بهینه روند افزایشی دارد که در محدوده مرکزی بالاترین پایداری مشاهده شد. اما با افزایش زمان به دلیل کاهش تعادل سطوح هیدروفیل و هیدروفوب به دلیل افزایش ساختار پلیمری پروتئین، پایداری کاهش یافت. اما اثر متقابل زمان و فعالیت آنزیم در طی ۲۴ ساعت نشان می‌دهد که در زمان‌های مختلف با افزایش فعالیت آنزیم، میزان پایداری امولسیون با شیب نسبتا ملایمی روند کاهشی دارد اما در فعالیت‌های آنزیمی مختلف با افزایش زمان واکنش تا محدوده نقطه مرکزی (۲۲۵ دقیقه)، پایداری امولسیون افزایش خواهد یافت و در زمان‌های بالاتر روند معکوس داشته است (نمودار ۴). افزایش فعالیت آنزیمی تا نقطه مرکزی و افزایش همزمان زمان واکنش، محدوده مناسب جهت رسیدن به پایداری بهینه طی ۲۴ ساعت است. احتمالا پیوندهای عرضی که بعد از امولسیون سازی در نتیجه فعالیت آنزیم در ساختار پروتئین تشکیل می‌شود سبب افزایش پایداری امولسیون با افزایش بهینه زمان می‌شود. اما با افزایش مقدار آنزیم همراه با افزایش زمان واکنش، احتمالا به دلیل تشکیل میزان بیشینه پیوندهای عرضی درون و بین مولکولی در ساختار پروتئین، پایداری امولسیون کاهش یافت.

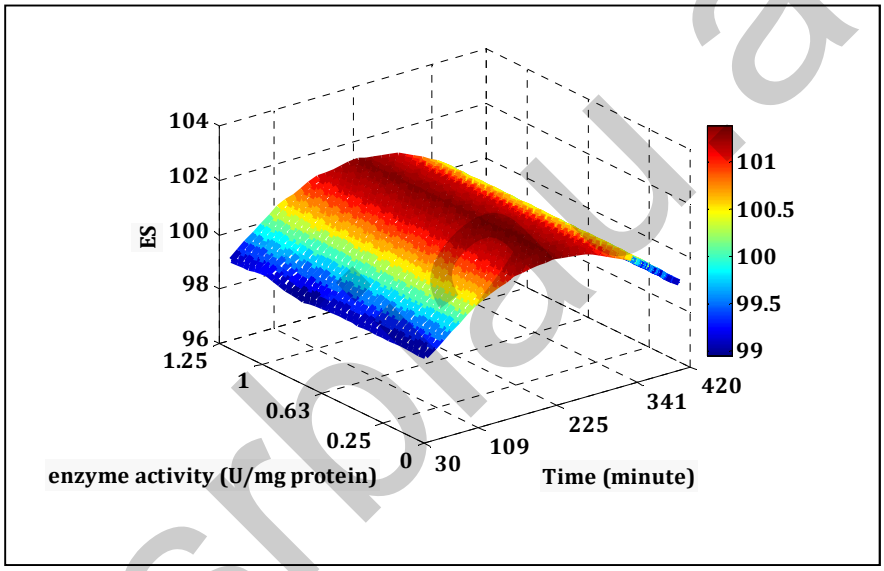


نمودار ۱- سطح پاسخ سه بعدی، اثر دما و فعالیت آنزیم بر پایداری امولسیون (٤ ساعت)

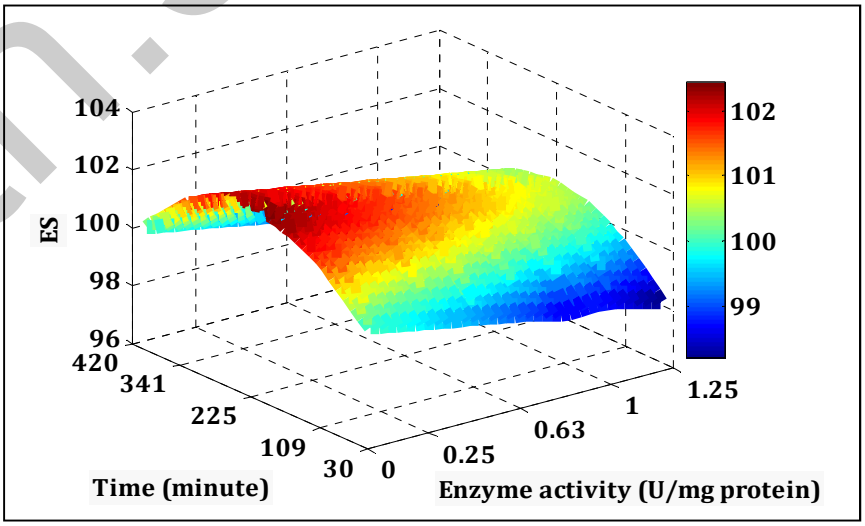
jftn.srbiau.ac.ir



نمودار ۲- سطح پاسخ سه بعدی، تاثیر دما و فعالیت آنزیم بر پایداری امولسیون (۲٤ ساعت)



نمودار ۳- سطح پاسخ سه بعدی، اثر زمان و فعالیت آنزیم بر پایداری امولسیون (٤ ساعت)



نمودار ٤- سطح پاسخ سه بعدی، تاثیر زمان و فعالیت آنزیم بر پایداری امولسیون (۲٤ ساعت)

jftn.srbiau.ac.ir

بحث

بر اساس نتایج پژوهش حاضر، دما و زمان بهینه فعالیت آنزیم اهمیت بسزایی در بهبود پایداری امولسیون دارد. به‌طوری‌که خارج از محدوده بهینه، با افزایش دما و زمان فعالیت آنزیم پایداری امولسیون کاهش خواهد یافت. در مطالعه Ionescu و همکاران در سال (۲۰۰۸) بیان شد که با افزایش دما و زمان واکنش آنزیم ترانس گلوتامیناز بر پروتئین میوفیبریلار گوشت گاو، خواص امولسیون کنندگی کاهش می‌یابد. آنها دلیل این نتایج را دگرگونی در تعادل سطح های هیدروفیل و هیدروفوب پروتئین در اثر افزایش بسیار زیاد تعداد اتصالات عرضی می دانند که با افزایش درجه پلیمریزاسیون سطح های هیدروفیل کاهش یافته و سبب کاهش خواص امولسیون کنندگی پروتئین می شود. طبق نتایج این تحقیق پایداری امولسیون در زمان های نگهداری از ۴ ساعت به ۲۴ ساعت افزایش یافت. این نتیجه احتمالا به دلیل ادامه فعالیت آنزیم در دمای یخچال و تشکیل پیوند های عرضی ε-(γ-glutamyl)lysine درون و بین مولکولی قوی تر در ساختار پروتئین است که موجب افزایش سرعت جذب سطحی پروتئین و بهبود خصوصیت ویسکوالاستیک آن در سطح مشترک می شود و به موجب آن پایداری امولسیون افزایش می یابد (Xiong, & Chen, 2008). اما با توجه به تاثیر دما بر فعالیت آنزیم، در دمای ۴ درجه سانتی گراد (دمای یخچال) آنزیم فعالیت کندی خواهد داشت، بنابراین زمان طولانی تری جهت تشکیل بهینه باند های عرضی نیاز است. به طوریکه بالاترین میزان پایداری امولسیون طی ۲۴ ساعت مشاهده شده که احتمالا به دلیل افزایش بهینه پیوند های عرضی در ساختار پروتئین، توانایی آن جهت کاهش کشش سطحی بین اجزای امولسیون و لذا افزایش پایداری امولسیون می‌باشد. نتایج تحقیقات پایداری امولسیون، پیرامون پیوندهای عرضی تشکیل شده بعد از امولسیون‌سازی توسط Dicknson و همکاران در سال (۱۹۹۶) و Sharma و همکاران در سال (۲۰۰۲) موید نتایج این پژوهش بوده است. Gauche و همکاران در سال (۲۰۰۸) در مطالعه تاثیر آنزیم ترانس گلوتامیناز بر پروتئین شیر، بیشینه خواص عملکردی، در دمای یخچال (۶ درجه سانتی گراد) به مدت ۲۴ ساعت گزارش نمودند که نشان دهنده تاثیر دما و زمان بر فعالیت آنزیم است. Ahhmed و همکاران (۲۰۰۹) در اندازه گیری های فلورسنس بر پروتئین گوشت جوجه و خوک عمل آوری شده با میزان بهینه آنزیم ترانس گلوتامیناز، کاهش چشمگیر سطح هیدروفوب را در میوزین نشان دادند و به اعتقاد آنها این کاهش سبب تغییرات بیشتر در خصوصیات عملکردی پروتئین می شود. نتایج حاصل از اثر آنزیم ترانس گلوتامیناز بر خواص کاری پروتئین ویسیلین (پروتئین غنی دانه لوبیای قرمز) حاکی از کاهش تدریجی شاخص امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون نسبت به نمونه غیر عمل آوری می باشد (Tang *et al*., 2008). آنها دلیل آن را، کاهش حلالیت پروتئین در نتیجه تشکیل بیوپلیمرهایی با وزن مولکولی بالا گزارش نمودند. عدم تطابق نتایج این محققین با نتایج پژوهش حاضر ممکن است بدلیل تفاوت در سوبسترای آنزیم و خواص کاری بیشینه پروتئین ویسیلین باشد که فعالیت آنزیم سبب کاهش عملکرد آن شود.

نتیجه‌گیری

تیمار آنزیمی پروتئین عضله ماهی فیتوفاگ با آنزیم ترانس گلوتامیناز در این پژوهش سبب بهبود پایداری امولسیون شده است که می‌تواند امر مهمی در کاربرد و بهبود ویژگی‌های بافتی محصولات گوشتی باشد. بر اساس نتایج بدست آمده دما و زمان فعالیت آنزیم تاثیر بسزایی در افزایش پایداری امولسیون دارد. این در حالی است که می‌توان با افزایش زمان نگهداری امولسیون در دمای یخچال از ۴ ساعت به ۲۴ ساعت، پایداری را بهبود بخشید.

منابع

Ahhmed, M. A., Kuroda, R., Kawahara, S., Ohta, K., Nakada, K., Aoki, T. & Muguruma, M. (2009). Dependence of microbial transglutaminase on meat type in myofibrillar proteins cross-linking. Food Chemistry, 112: 354–361.

Ahhmed, A. M., Nasa, T., Huy, D. Q., Tomisaka, Y., Kawahara, S. & Muguruma, M. (2009). Effect of microbial transglutaminase on the natural actomyosin cross-linking in chicken and beef. Meat Science, 82: 170–178.

Anuradha, S. N. & Prakash, V. (2009). Altering functional attributes of proteins through cross linking by transglutaminase – A case study with whey and seed proteins. Food Research International, 42: 1259–1265.

jfn.srbiau.ac.ir

Dickinson, E., Ritzoulis, C., Yamamoto, Y. & Logan, H. (1999). Ostwald ripening of protein-stabilized emulsions: effect of transglutaminase crosslinking. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 12, 139–146.

Gauche, C., Joana, T. C., Vieira, P., Ogliari, J. & Marilde T. B. (2008). Crosslinking of milk whey proteins by transglutaminase. Process Biochemistry 43, 788–794

Gerrard, J. A. (2002). Protein–protein crosslinking in food: methods, consequences, applications. Trends in Food Science & Technology, 13: 391–399.

Gornall, A. G., Bardawill, C. J. & David, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. Journal of Biological Chemistry.

Hu, R. (1999). Food product design, technomic publishing company Inc., USA.

Ionesca, A., Aprodu, I., Daraha, A. & Porneala, L. (2008). The effects of transglutaminase on the functional properties of the myofibrillar protein concentrate obtained from beef heart. Meat Science, 79: 278–284.

Leal-calderon, F., Thivilliers, F. & Schmitt, V. (2007). Structured emulsions. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 12: 206–212.

Lorena, M. A., Crupkin, M. & Paredi, M. P. (2008). Surface hydrophobicity and functional properties of myofibrillar proteins of mantle from frozen-stored squid (Illex argentinus) caught either jigging machine or trawling. LWT, 41; 678–685.

Norziah, M. H., Al-Hassan, A., Khairalnizam, A. B., Mordi, M. N. & Norita, M. (2009). Characterization of fish gelatin from surimi processing wastes: Thermal analysis and effect of transglutaminase on gel properties. Food Hydrocolloids, 23: 1610–1616.

Pacheco-Agiuilar, R., Mazorra-Manzano, M. & Ramirez-Suarez, J. C. (2008). Functional properties of fish protein hydrolysates from Pacific whiting (Merluccius productus) muscle produced by a commercial protease. Food Chemistry, 109: 782–789.

Sharma, R., Zakora, M. & Qvist, K. B. (2002). Characteristics of oil–water emulsions stabilised by an industrial a-lactalbumin concentrate, cross-linked before and after emulsification, by a microbial transglutaminase. Food Chemistry, 79: 493–500.

Stangierski, J., Baranowska, H. M., Rezler, R. & Kijowski, J. (2008). Enzymatic modification of protein preparation obtained from water-washed mechanically recovered poultry meat. Food Hydrocolloids, 22: 1629–1636.

Tang, C., Xin, S., Shou-Wei, Y. & Ching-Yung, M. (2008). Chuan-He. Food Research International 41, 941–947.

Wild, P., Mackie, A., Husband, F., Gunning, P. & Morris, V. (2004). Proteins and emulsifiers at liquid interfaces. Advances in Colloid and Interface Science, 108 –109: 63–71.

Xiong, L. Y. & Chen, J. (2008). Application of microbial transglutaminase to improve muscle protein functionality. *Journal of Biotechnology, 136S: S711–S716*.

jftn.srbiau.ac.ir