جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۸، دوره ۶۴، شماره ۱، ۶-۱

بررسی مقایسه‌ای تأثیر آنزیم فیسین بر حلالیت و الگوی الکتروفورتیک پروتئین‌های گوشت گاو و گوسفند

سید شهرام شکرفروش[1]* محمود امین لاری[2] نازنین صباغ[3]

۱) گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز -ایران.
۲) گروه علوم پایه دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز -ایران.
۳) دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز - ایران.

(دریافت مقاله: ۳ تیر ماه ۱۳۸۶، پذیرش نهایی: ۲۷ فروردین ماه ۱۳۸۷)

چکیده

برای بهبود کیفیت تکنولوژیک گوشت از روش‌های مختلفی استفاده می‌شود. یکی از این روش‌ها افزودن آنزیم‌های پروتئولیتیک به گوشت و ترد کردن آن و در نتیجه افزایش حلالیت پروتئین‌های آن می‌باشد. هدف از انجام این تحقیق بررسی تأثیر مقادیر مختلف آنزیم فیسین بر حلالیت پروتئین‌های گوشت گاو و گوسفند و تعیین بهترین شرایط برای حل کردن آنها بود. آنزیم فیسین از شیره انجیر با روش کروماتوگرافی تعویض کاتیونی به صورت نسبی خالص‌سازی شد. نمونه‌های گوشت گاو و گوسفند تحت تأثیر مقادیر مختلف شیره انجیر و آنزیم فیسین خالص‌سازی شده و شرایط مختلفی از نظر نوع بافر و مدت زمان اثر آنزیم قرار گرفتند و تاثیر آنزیم با اندازه‌گیری ضریب حلالیت پروتئین با روش ماکروکلدال و تهیه الگوی الکتروفورتیک پروتئین‌های محلول مشخص گردید. با افزایش آنزیم و زمان اثر آن، میزان شاخص حلالیت پروتئین‌های گوشت گاو و گوسفند افزایش یافت ($p<0/001$). الگوی الکتروفورتیک پروتئین‌های محلول نشان داد که با افزایش مقدار واحد آنزیم اکثر باندهای پروتئینی محو شده یا کاهش ضخامت پیدا کرده اند. این تحقیق نشان داد که شیره انجیر بدون خالص سازی آنزیم از آن قابل استفاده بوده و اثر تردکنندگی قابل توجهی بر گوشت گاو و گوسفند دارد. تأثیر آنزیم بر حلالیت پروتئین‌های گوشت گوسفند بیشتر از گوشت گاو بود. مقدار و مدت زمان اثر آنزیم تاثیر قابل توجهی در تجزیه پروتئینهای گوشت داشته و موجب افزایش حلالیت آنها می‌شود و این حلالیت در محیط حاوی کلرید سدیم افزایش می‌یابد. در صورتی که از مقدار یا مدت زمان اثر بیش از حد آنزیم استفاده شود پروتئین‌ها به پپتیدهای کوچک ترشکسته شده و بر اثرات تکنولوژیک آنها در محصولات گوشتی تاثیر سوء دارد.

واژه‌های کلیدی: فیسین، پروتئین‌های گوشت، الکتروفورز، شاخص حلالیت نیتروژن.

مقدمه

روش‌های مختلفی برای بهبود کیفیت گوشت و استفاده بهتر آن در تولید محصولات گوشتی وجود دارد. یکی از این روش‌ها افزایش حلالیت پروتئین‌های گوشت و در نتیجه ترد شدن آن و بالا رفتن خواص امولسیون کنندگی و سایر خواص عملکردی آن مثل افزایش ظرفیت نگهداری آب می‌باشد(۱). امروزه اثرات تردکنندگی آنزیم‌های موجود در گیاهان، باکتری‌ها و قارچ‌ها مورد بررسی قرار گرفته است. مهمترین آنزیم‌های تردکننده را اغلب آنزیم‌های گیاهی مثل پاپاین (Papain)، بروملین (Bromelain) و فیسین (Ficin) تشکیل می‌دهند(۲۰). پاپاین از برگ درخت انبه هندی، بروملین از آناناس و فیسین از شیره درخت انجیر بدست می‌آید. آنزیم‌های گیاهی فوق همگی پروتئولیتیک هستند و موجب تجزیه پروتئین‌های گوشت شده و در نتیجه تردی بسیاری را باعث می‌شوند(۱). این آنزیم‌ها را می‌توان به صورت خالص تهیه کرد و تأثیر آن‌ها را بر حلالیت پروتئین‌های عضله حیوانات مختلف و دیگر خواص عملکردی مثل امولسیون کنندگی و افزایش ظرفیت نگهداری آب بررسی نمود(۹).

یکی از اجزاء با ارزش انجیر آنزیم پروتئولیتیک موجود در میوه و به ویژه شیره آن است. این آنزیم به نام فیسین شناخته شده است. فیسین آنزیم مقاوم در برابر حرارت است و pHهای بین ۳/۵ تا ۹ را تحمل می‌کند(۱۸). در ایران غیر از مصرف سنتی چوب انجیر برای ترد کردن گوشت، گزارشی از کاربرد این آنزیم به صورت تجاری در سایر رشته‌های صنایع غذایی در دست نیست.

در این پژوهش تأثیر شیره درخت انجیر و آنزیم فیسین که با روش کروماتوگرافی کاتیونی از شیره انجیر به شکل نیمه خالص تهیه شده به صورت مقایسه‌ای بر حلالیت پروتئین‌های عضله گاو و گوسفند بررسی شد و با بررسی الگوی الکتروفورتیک آنها بهترین غلظت آنزیم از نظر واحد فعالیت به طور تقریبی مشخص گردید. همچنین با استفاده از چهار محلول مختلف که عبارت بودند از آب مقطر، بافر فسفات pH=۷، آب نمک ۳ درصد و بافر فسفات حاوی ۳ درصد نمک، بهترین محلول جهت حل شدن پروتئین‌ها گوشت گاو و گوسفند ترد شده با آنزیم فیسین مشخص شد.

مواد و روش کار

۱- **تهیه شیره انجیر:** شیره انجیر در یک روز فصل تابستان از درختان انجیر (Ficus azmirna) دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز تهیه گردید. برای این کار پس از قطع برگ و شاخه‌های نازک گیاه اقدام به جمع آوری قطرات شیره سفید رنگ خارج شده می‌شد.

۲- **جداسازی نسبی فیسین از شیره انجیر:** برای این کار از روش

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۰۷۱۱-۲۲۸۶۹۵۰ نمابر: ۰۷۱۱-۲۲۸۶۹۴۰ Email: shekar@shirazu.ac.ir

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

کروماتوگرافی تبادل کاتیونی توصیف شده توسط Englund و همکاران درسال ۱۹۶۸ استفاده شد. کروماتوگرافی تبادل کاتیونی منجر به جدا کردن پروتئینهای شیره انجیر به چهار فراکسیون شد، سه بخش شسته شده با بافر فسفات و یک بخش شسته شده با کلرید سدیم (نمودار ۱).

۳- اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فیسین: فعالیت آنزیم فیسین جدا شده در مرحله قبل بر اساس روش Englund و همکاران در سال ۱۹۶۸ اندازه گیری و بر اساس واحد آنزیم گزارش شد(۹).

۴- تهیه تیمارهای تحقیق: بدین منظور ۳ نمونه حدود ۳۰۰ گرمی از عضله Longissimus dorsi در حد فاصل مهره‌های ۱۰ تا ۱۳ سینه‌ای گوساله‌های نر هلشتاین ۱/۵ ساله و ۳ نمونه با همان مشخصات از بره‌های نر ۱/۵ ساله بومی بلافاصله پس از کشتار تهیه شد. نمونه‌ها به مدت ۴۸ تا ۷۲ساعت در یخچال ۴درجه سانتیگراد نگهداری شدند. سپس نمونه‌ها به طور مجزا با چرخ گوشت خانگی چرخ و کاملاً مخلوط شدند و pH آنها با افزودن سود ۰/۱ نرمال روی ۷ تنظیم شد. سپس نمونه‌هایی به وزن ۱۰ گرم تهیه و به آنها مقدار ۵ میلی لیتر آب مقطر pH =۷ و مقادیر صفر (شاهد)، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرولیتر شیره خام انجیر (با واحد آنزیمی برابر صفر، ۰/۸، ۱/۶ و ۲/۴) و یا ۱۰۰ میکرولیتر آنزیم خالص شده فیسین از شیره انجیر حاوی ۲/۶ واحد آنزیم اضافه شد. سپس یکسری از نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه و یکسری به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۲۵درجه سانتیگراد نگهداری شدند. سپس به هر تیمار مقدار ۵۰ میلی لیتر آب مقطر، بافر فسفات ۰/۰۰۵ مولار pH = ۷، آب نمک ۳ درصد یا بافر فسفات حاوی ۳ درصد نمک اضافه شد و با هموژنایزر به مدت ۱۰ دقیقه هموژن شدند و به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۶۰۰۰g سانتریفیوژ شدند. سپس محلول رویی جمع آوری و نیتروژن محلول در آن به روش ماکروکلدال اندازه گیری شد(۵). میزان نیتروژن گوشت نیز با روش مشابه اندازه گیری شد.

در مجموع ۴۰ تیمار (۵ مقدار مختلف آنزیم × ۲ مدت زمان × ۴ محلول جهت حل کردن پروتئین) در سه تکرار برای گوشت گاو و ۴۰ تیمار در سه تکرار برای گوشت گوسفند مورد آزمایش قرار گرفت.

۵- تعیین شاخص حلالیت نیتروژن (NSI, solubility index nitrogen): برای تعیین شاخص حلالیت نیتروژن از فرمول زیر استفاده شد (۵).

$$NSI = \frac{\text{درصد نیتروژن مایع رویی}}{\text{درصد نیتروژن گوشت}} \times ۱۰۰$$

۶- انجام الکتروفورز SDS-PAGE روی نمونه‌ها: برای تهیه ژل گرادینت از محلولهای ۵ درصد و ۲۰ درصد پلی اکریل آمید استفاده شد. پس از تعیین غلظت پروتئین نمونه‌های مجهول به روش ماکروکلدال، در صورت نیاز با افزودن بافر فسفات pH=۷ غلظت همه آنها در حد دو میکروگرم در میکرو لیتر تنظیم شد. سپس برای دناتوره شدن پروتئین نمونه‌ها، به آنها حجم مساوی از بافر نمونه حاوی ۳ میلی لیتر گلیسرول، ۰/۲ میلی لیتر

جدول۱- میزان فعالیت آنزیم فیسین خالص سازی شده با ستون کروماتوگرافی CM-52 پس از دو مرحله دیالیز *جذب نور لوله‌ها در نمودار شماره ۱ آورده شده است.

فراکسیون کروماتوگرافی	محلول مورد استفاده در ستون	شماره لوله*	فعالیت آنزیم (Unit/ml)
شیره انجیر (شاهد)	-	-	۸/۰
۱	بافر فسفات	۲۰ تا ۳۵	۲/۰
۲	بافر فسفات	۷۰ تا ۹۲	۷/۵
۳	بافر فسفات	۱۱۰ تا ۱۲۵	۱۵/۰
۴	کلرید سدیم ۳٪	۱۷۰ تا ۱۸۰	۲۶/۲

جدول۲- اثر آنزیم فیسین بر شاخص حلالیت نیتروژن (mean ±S.E.) در گوشت گاو و گوسفند در هر ستون حروف غیر مشابه نشانگر اختلاف معنی دار می‌باشد (p<۰/۰۱).

مقدار آنزیم (واحد)	گوشت گاو (n =۱۲) مدت زمان اثر آنزیم (دقیقه)		گوشت گوسفند (n =۱۲) مدت زمان اثر آنزیم (دقیقه)	
	۳۰	۶۰	۳۰	۶۰
۰ (شاهد)	۳۵/۲۸±۰/۸۳ ^{a}	۳۵/۲۸±۰/۸۳ ^{a}	۳۳/۵۹±۱/۸۷ ^{a}	۳۳/۵۹±۱/۸۷ ^{a}
۰/۸	۴۲/۳۱±۰/۴۹ ^{b}	۴۵/۵۸±۰/۶۵ ^{b}	۴۲/۳۷±۲/۲۲ ^{b}	۴۸/۴۶±۱/۶۴ ^{b}
۱/۶	۴۶/۱۸±۰/۹۵ ^{c}	۴۹/۳۶±۱/۱۰ ^{c}	۵۰/۸۴±۱/۴۹ ^{c}	۵۳/۸۵±۱/۵۵ ^{c}
۲/۴	۵۱/۶۰±۱/۲۵ ^{d}	۵۵/۳۶±۱/۴۲ ^{d}	۵۵/۹۱±۱/۵۲ ^{d}	۵۸/۱۹±۱/۱۰ ^{d}
۲/۶	۵۶/۸۲±۱/۸۰ ^{e}	۶۰/۱۹±۱/۶۹ ^{e}	۶۰/۰۳±۱/۸۰ ^{e}	۶۲/۳۵±۱/۹۱ ^{e}

بتامرکاپتواتانول و ۱۰ میلی گرم برموفنول در ده میلی لیتر آب مقطر افزوده و به مدت ۱ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد حرارت داده شدند (در نهایت غلظت پروتئین نمونه‌ها به یک میکروگرم در میکرو لیتر شد). سپس با شدت ۳۰ میلی آمپر الکتروفورز شدند. ژل‌ها با مخلوطی از ۰/۱ گرم کوماسی بلو، ۰/۱ گرم استات مس، ۲۵ میلی لیتر ایزوپروپانول و ۱۰ میلی لیتر اسید استیک در صد میلی لیتر آب مقطر تثبیت و رنگ آمیزی شدند. برای رنگبری از حجم مساوی مخلوط متانول ۳۰ درصد و اسید استیک ۷ درصد استفاده شد.

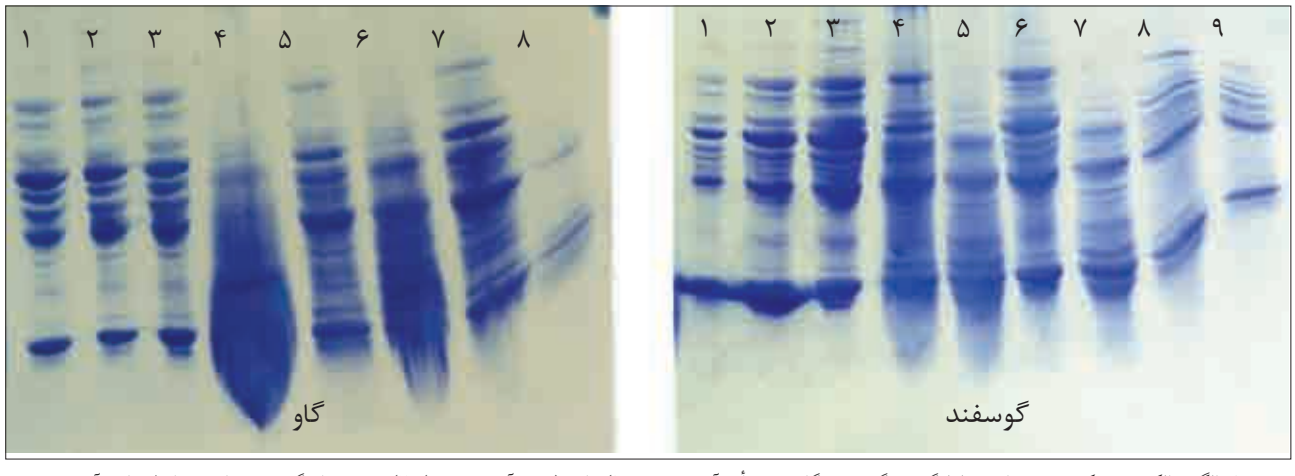
۷- تجزیه و تحلیل آماری: برای بررسی تأثیر عوامل مختلف شامل گونه دام، غلظت آنزیم، مدت زمان اثر آنزیم و نوع محلول استفاده شده برای حل کردن پروتئین از آزمون آماری آنالیز واریانس دو طرفه (Two way ANOVA) و تست تعقیبی دانکن (Duncan's multiple range test) استفاده شد.

نتایج

میزان فعالیت آنزیم فیسین خالص سازی شده با روش کروماتوگرافی به تفکیک چهار فراکسیون که بیشترین جذب نور در ۲۸۰ نانومتر را داشتند در جدول ۱ آورده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود بیشترین فعالیت آنزیم با ۲/۶ واحد در ۱۰۰ میکرولیتر در فراکسیون چهارم وجود دارد و این نشان دهنده جداسازی بهتر آنزیم در حضور کلرید سدیم می‌باشد.

در این تحقیق تأثیر حل کنندگی مقادیر مختلف آنزیم فیسین (۰/۸، ۱/۶، ۲/۴ و ۲/۶ واحد) در مدت زمان ۳۰ و ۶۰ دقیقه بر پروتئین‌های گوشت گاو و گوسفند مقایسه شد. همچنین اثر چهار نوع محلول مختلف (آب مقطر،

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد



تصویر ۱- الگوی الکتروفورتیک پروتئین‌های محلول گوشت گوسفند و گاو تحت تأثیر آنزیم فیسین. ۱) شاهد (بدون آنزیم فیسین). ۲) پروتئین‌های گوشت تیمار شده با ۰/۸ واحد آنزیم به مدت نیم ساعت. ۳) پروتئین‌های گوشت تیمار شده با ۰/۸ واحد آنزیم به مدت یک ساعت. ۴) پروتئین‌های گوشت تیمار شده با ۱/۶ واحد آنزیم به مدت نیم ساعت. ۵) پروتئین‌های گوشت تیمار شده با ۱/۶ واحد آنزیم به مدت یک ساعت. ۶) پروتئین‌های گوشت تیمار شده با ۲/۴ واحد آنزیم به مدت نیم ساعت. ۷) پروتئین‌های گوشت تیمار شده با ۲/۴ واحد آنزیم به مدت یک ساعت. ۸) پروتئین‌های گوشت تیمار شده با ۲/۶ واحد آنزیم به مدت نیم ساعت. ۹) پروتئین‌های گوشت تیمار شده با ۲/۶ واحد آنزیم به مدت یک ساعت.

بافر فسفات pH=۷، کلرید سدیم ۳ درصد و بافر فسفات حاوی ۳ درصد کلرید سدیم) بر میزان حلالیت پروتئین‌های گوشت بررسی گردید. نتایج نشان داد مقدار آنزیم فیسین تأثیر معنی داری بر NSI گوشت گاو و گوسفند داشت و با افزایش آنزیم میزان NSI افزایش می‌یافت ($p<0/01$، جدول ۲). مدت زمان اثر آنزیم بر NSI گوشت گاو و گوسفند در بعضی مقادیر آنزیم تأثیر معنی داری داشت، به طوری که با افزایش زمان اثر از ۳۰ دقیقه به ۶۰ دقیقه در مقادیر ۰/۸ و ۱/۶ واحد آنزیم در ده گرم گوشت گاو و مقدار ۰/۸ واحد آنزیم در ده گرم گوشت گوسفند میزان NSI افزایش می‌یافت ($p<0/05$). نوع گوشت بر میزان تأثیر حل کنندگی آنزیم و افزایش NSI تأثیر معنی داری داشت. اثر آنزیم فیسین در مقادیر ۱/۶ و ۲/۴ واحد آنزیم بر گوشت گوسفند به طور معنی داری بیشتر از گوشت گاو بود ($p<0/05$).

میزان حلالیت پروتئین‌های گوشت گوسفند و گاو ترد شده با آنزیم فیسین در محلولهای مورد مطالعه تفاوت معنی داری داشت ($p<0/01$) به طوری که به ترتیب بیشترین حلالیت در بافر فسفات حاوی نمک، بافر فسفات، آب نمک و آب مقطر بود. تفاوت معنی داری در میزان NSI بین بافر فسفات حاوی نمک و آب نمک مشاهده نشد ($p>0/05$، نمودار ۲و۳). اختلاف معنی داری بین میزان حلالیت پروتئین‌های گوشت گوسفند و گاو ترد شده با آنزیم فیسین در محلول‌های مورد مطالعه مشاهده نشد ($p\geq0/2$).

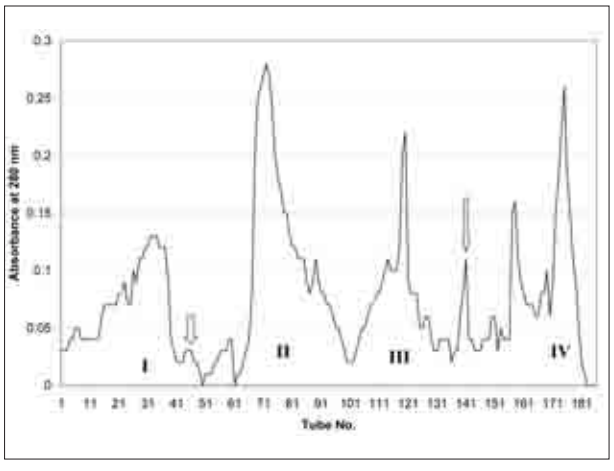
تصویر ۱ نشان دهنده الگوی الکتروفورتیک پروتئین‌های محلول عضله گوسفند و گاو است. همانگونه که مشاهده می‌شود با افزایش مقدار آنزیم و مدت زمان اثر آن پروتئین‌های گوشت به پپتیدهای کوچک‌تر تبدیل شده‌اند. مقایسه تیمارهای ۵ و ۷ (۱/۶ و ۲/۴ واحد آنزیم به مدت یک ساعت روی گوشت گوسفند) با شاهد نشان می‌دهد که باند پروتئینی با وزن مولکولی ۱۰۵ کیلو دالتون تقریبا" محو شده است. همچنین باند پروتئینی با وزن مولکولی تقریبی ۶۹ کیلو دالتون کاهش ضخامت پیدا کرده است و در مقابل باند پروتئینی با وزن مولکولی ۱۴/۷ کیلودالتون دو باند پروتئینی مجزا ایجاد شده است. در تیمار ۸ و ۹ (۲/۶ واحد آنزیم خالص، نیم ساعت و یک ساعت) کاهش ضخامت در باندهای پروتئینی ۱۴/۷، ۳۵ و ۴۵ کیلودالتونی مشاهده می‌شود. در مقابل باند پروتئینی ۶۹ کیلودالتونی دو باند پروتئینی مجزا دیده می‌شود. به علاوه در تیمار ۹ باند پروتئینی ۱۰۵ کیلودالتونی محو شده است.

مقایسه تیمارهای ۵ و ۶ گوشت گاو با شاهد نشان می‌دهد که باند پروتئینی با وزن مولکولی ۱۴/۷ و ۶۹ کیلودالتون در تیمار ۵ کاهش ضخامت یافته و در تیمار ۶ نوار ۶۹ کیلو دالتون به صورت دو نوار مجزا دیده می‌شود. همچنین نوار پروتئینی با وزن مولکولی ۱۰۵ کیلودالتون در هر دو تیمار محو شده است. در تیمار ۸ اکثر نوارهای پروتئینی یا محو شده‌اند و یا کاهش ضخامت پیدا کرده‌اند.

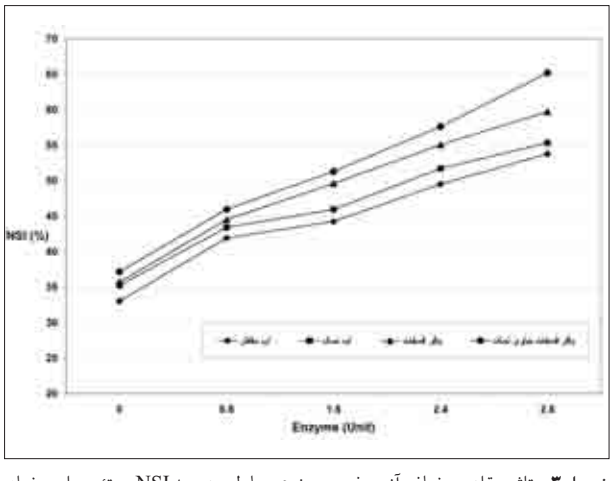
بحث و نتیجه‌گیری

آنزیم فیسین یک آنزیم پروتئولیتیک نسبتا" قوی می‌باشد و در زمینه خالص سازی نسبی آن تحقیقاتی انجام شده است(۹). در تحقیق حاضر بیشترین فعالیت آنزیم در فراکسیونی مشاهده شد که پس از افزودن محلول ۳ درصد نمک طعام به ستون کروماتوگرافی تعویض کاتیونی، از ستون خارج گردید. به طوری کلی براساس خاصیت تبادل یونی و رقابت مولکولهای موجود در بافر و یونهای نمک برای تصاحب محل‌های اتصال باندها در کروماتوگرافی تعویض یونی، با اضافه نمودن محلول نمک در مرحله آخر، آنزیم از ستون جدا شده و خارج می‌گردد(۲،۳،۴،۶،۷،۱۵). از طرفی مولکولهای آنزیم در حضور برخی نمک‌ها مانند کلرید پتاسیم و کلرید سدیم مخصوصا" در دمای ۵ درجه سانتیگراد، به شکل کریستالی رسوب می‌کنند (۲۳).

براساس نتایج بدست آمده در این تحقیق آنزیم فیسین در بهترین شرایط توانسته است NSI را تا حدود دو برابر افزایش دهد. همچنین مشاهده می‌شود که با بالا رفتن میزان آنزیم، NSI افزایش می‌یابد. تحقیقات



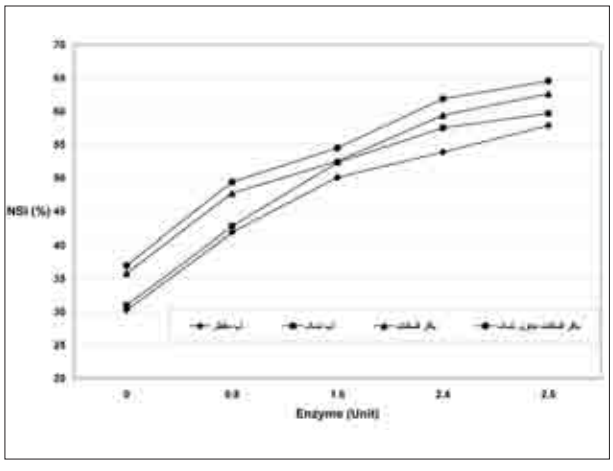
نمودار۱- کروماتوگراف بدست آمده از ستون CM-52. مرحله I شامل افزودن بافر فسفات ۰/۰۰۵ مولار ۷/۱ =pH می‌باشد، پیکان کوتاه نشان دهنده افزودن بافر فسفات۷/۱ =pH با شیب خطی ۰/۰۰۵ تا ۰/۱۸۵ مولار و پیکان بلند نشان دهنده افزودن کلریدسدیم ۳ درصد می‌باشد، سرعت جریان بافر ۳-۲/۵ میلی لیتر در دقیقه و حجم محلول در هر لوله ۵ میلی لیتر می‌باشد).



نمودار ۳- تاثیر مقادیر مختلف آنزیم فیسین و نوع محلول بر درصد NSI پروتئین‌های عضله گاو.

انجام شده نشان می‌دهد که با افزایش مدت زمان تأثیر آنزیم و غلظت آنزیم پروتئین‌های نامحلول گوشت مانند کلاژن و الاستین کاملاً هضم شده و ماهیت آنها تغییر می‌کند(۱۰).

طبق نتایج بدست آمده از این تحقیق، با استفاده از محلول سه درصد نمک میزان NSI افزایش می‌یابد. افزودن نمک تا حداکثر به میزان ۴ درصد (μ<۱)، با بالا بردن قدرت یونی محیط سبب انحلال و ایجاد فاصله بین رشته‌های پروتئینی شده و در نتیجه باعث بالا رفتن حلالیت پروتئین‌ها می‌گردد (۱،۱۷). بخشی از پروتئین‌های سارکوپلاسمی که محلول در نمک هستند، در محیط حاوی نمک بهتر از هم باز می‌شوند. از طرفی پروتئین‌های میوفیبریلی به طور کامل محلول در نمک هستند و با افزودن نمک به دلیل افزایش قدرت یونی از حداقل آن در گوشت یعنی ۰/۱۵ به ۰/۳ بهتر از هم باز شده و به صورت محلول درمی آیند. همراه با بالا رفتن قدرت یونی، میزان انحلال پروتئین‌های میوفیبریلی به علت تبادل ایجاد شده بین یونهای



نمودار ۲- تاثیر مقادیر مختلف آنزیم فیسین و نوع محلول بر درصد NSI پروتئین‌های عضله گوسفند.

تجزیه شده نمک و گروههای قطبی پروتئین‌ها نیز بالا خواهد رفت. از طرفی با افزودن نمک طعام به محیط میزان ظرفیت نگهداری آب نیز افزایش می‌یابد(۱،۱۷).

در این پژوهش میزان حلالیت پروتئین‌های گوشت گوسفند در مقایسه با گوشت گاو بیشتر بوده است (p<۰/۰۱). به نظر می‌رسد عوامل مختلفی چون گذراندن سریع تر دوره جمود نعشی در گوشت گوسفند و تأثیر آن در تردی گوشت(۱۳،۱۴)، به علاوه فعال شدن آنزیم‌های پروتئاز وابسته به کلسیم در دوره جمود نعشی در عضله گوسفند می توانند در بالا رفتن میزان حلالیت پروتئین‌های گوشت گوسفند زمانی که تحت تأثیر آنزیم‌های پروتئولیتیک دیگری چون فیسین قرار می‌گیرند، مؤثر باشند (۱۳).

در الگوی الکتروفورتیک پروتئین‌های عضلات مختلف گونه های متفاوت حیوانی نوار پروتئینی مشاهده می‌شود که اکتینین نامیده می‌شود. این پلی پپتید دارای وزن مولکولی معادل ۱۰۵-۱۰۰ کیلو دالتون می‌باشد(۸،۱۲،۲۱). در این پژوهش این پروتئین در الگوی الکتروفورتیک عضله گاو و گوسفند مشاهده گردید. تفاوتی که در ماهیت این نوار پروتئینی در تیمارهای مختلف در مقایسه با نمونه شاهد دیده شد، محو شدن آن در تیمار ۵ و ۷ می‌باشد. این الگو می تواند نشانگر شکسته شدن این پروتئین به پپتیدهای کوچک تری باشد که امکان مشاهده آنها در ژل وجود ندارد.

باند پروتئینی دیگری که در اکثر الگوهای الکتروفورتیک عضلات حیوانات مختلف مشاهده می‌شود اکتین است(۸،۱۲،۱۶،۱۹،۲۱،۲۲). این یک پروتئین میوفیبریلی با وزن مولکولی حدود ۴۲ کیلودالتون می‌باشد (۱۹،۲۱). در این پژوهش نوار پروتئینی اکتین در تیمار ۸ و ۹ در عضله گوسفند کاهش ضخامت یافته بود. این نوار در تیمار ۸ عضله گاو نیز کاهش ضخامت پیدا کرده بود. این نتایج نشان داد که اکتین در حضور مقادیر بالای آنزیم (۲/۶ واحد آنزیم) شکسته شده و ایجاد پپتیدهای کوچک نموده است.

در تحقیق حاضر در زیر نوار پروتئینی اکتین یک نوار پروتئینی نسبتاً باریک مشاهده می‌شود و با توجه به وزن مولکولی ۴۰-۱۸ کیلو دالتونی

تروپونین‌ها، احتمالاً متعلق به این پروتئین می‌باشد. در تیمارهای آنزیمی مخصوصاً تیمار ۸ و ۹ در عضله گوسفند این نوار پروتئینی باریک تر شده است که نشان می‌دهد تروپومیوسین نیز در حضور مقادیر بالای آنزیم به پپتیدهای کوچک تر شکسته شده است (۸،۱۹،۲۱). در تیمار ۸ عضله گاو نیز این نوار تقریباً محو شده است. رمضانی و همکاران درسال ۲۰۰۲، کاربرد گوشت ترد شده را بر کیفیت فرآورده‌های گوشتی مورد بررسی قرار داده، نشان دادند که با افزایش یافتن مقدار آنزیم، میزان حلالیت پروتئین‌های گوشت افزایش می‌یابد و استفاده از آن در فرآورده گوشتی باعث یکنواختی بافت، بهبود کیفیت تا خوردن و برش پذیری محصول خواهد شد (۱۱).

این مطالعه نشان داد که آنزیم فیسین برخی از پروتئین‌های گوشت را تجزیه کرده به گونه‌ای که به صورت واحدهایی با وزن مولکولی کوچک تر درمی آیند و در سانتریفوژ همراه رسوب خارج می‌شوند. اگر چه شاخص حلالیت نیتروژن که نشان دهنده میزان حلالیت پروتئین‌های گوشت می‌باشد در نمونه‌های تیمار شده با آنزیم افزایش یافته است، اما پپتیدهای کوچک تر در ژل الکتروفورز قابل مشاهده نمی باشند و احتمالاً همراه جبهه رنگ در قسمت انتهای ژل قرار گرفته و از آن خارج شده‌اند. از طرفی افزایش مقدار واحد آنزیم تا ۲/۶ واحد تأثیر شدیدی بر پروتئین‌های گوشت داشته، به طوریکه اکثر باندهای پروتئینی محو شده یا کاهش ضخامت پیدا کرده‌اند. این مسأله نشان دهنده محدودیت استفاده از واحدهای بالاتر در فرآورده‌های گوشتی می‌باشد و برای حفظ کیفیت نهایی فرآورده باید مد نظر قرار گیرد.

References

1. Rokni, N. (1995) Meat Science and Technology. University of Tehran press. Tehran, Iran. pp. 14-17, 42-47, 73-141.
2. Shojollah Sdati, S.A.(1992) High Performance Liquid Chromatography. Tarbiat Modares University Press. Tehran, Iran. pp. 40-61.
3. Shafiei, A. (1994) Chromatography and Spectrometry. University of Tehran Press. Tehran, Iran. pp. 49-53.
4. Anonymous (1970) A Guide to Ion Exchange Chromatography, Pharmacia fine chemicals Inc. Montreal, Canada. pp. 5-8.
5. AOCS (1973) Official and Tentative Methods of the Amercian Oil Chemists' Society. 3th ed., Champaign, IL., Meryland, USA. pp. 11-65.
6. Boyer, F. R. (1993) Modern Experimental biochemistry. 2nd ed., The Benjamin Cummings Publishing Co. London,UK. pp. 117-126.
7. Braith, W., Smith, F.J. (1985) Chromatographic Method. 4th ed., Chapman and Hall, Boca Raton,USA. pp.370-372.
8. Caeys, E., Uytterhaegen, L. (1995) Quantification of beef myofibrillar proteins by SDS-PAGE. Meat Sci.35: 177-193.
9. Englund, P.T., King, T.P., Craig, L.C. (1968) Studies on ficin. I. Its isolation and characterization. Biochemistry. 7: 163-175.
10. Kang, C. K., Warner, W.D. (1974) Tenderization of meat with papaya latex proteases. J. Food Sci. 36: 130-132.
11. Ramezain, R., Aminlari, M., Fallahi, H. (2002) Effect of chemically modified soy-proteins and ficin-tenderized meat on the quality, attributes of sausage. J. Food Sci. 67: 1-4.
12. Hay, J.D., Currie, R.W. (1973) Polyacrylamide disc gel electrophoresis of fresh and aged chicken muscle proteins in sodium dodecylsulfate. J. Food Sci. 38: 987-99.
13. Koohmaraie, M., Babiker, A.S. (1988) Accelaration of postmortem tendarization in ovine carcasses through activation of Ca2+ dependent proteases J. Food Sci. 53: 1638-1641.
14. Koohmaraie, M., Seideman, S.C. (1988) Factors

associated with the tenderness of three bovine muscle. J. Food Sci. 53: 407-410.

15. Peterson, E.A., Sober, H.A. (1995) Chromatography of proteins. J. Am. Chem. Soc. 73: 751-755.
16. Robert, N., Taylar, R. (1999) The effect of protease on myofibrillar structures in bovine skeletal muscle. Meat Sci. 51: 149-153.
17. Swift, C.E., Sulzbacher, W.L. (1963) Comminuted meat emulsions: factors affecting meat proteins as emulsion stabilizer. Food Tech. 17: 224-226.
18. Uhlig, H. (1989) Proteases in: Industrial Enzymes, 2nd ed., John Wiley and Sons Inc. New york,USA. pp. 146-179.
19. Van Jaarsveld, F.P. (1994) The effects of Ca++ Ions, EDTA and storage time on myofibrillar protein degradation. Meat Sci. 45: 517-529.
20. Whitaker, J.R. (1974) Food Related Enzymes. American Chemical Society, Washington,USA.pp. 202-219.
21. Whitaker, J.R., Tannenbaum, S.R. (1977) Food Proteins. The avipublishing Inc. Westport, USA. pp. 129-137.
22. Yamamoto, K., Samejima, K. (1977) A comparative study of the changes in hen pectoral muscle during storage at 4 °C and -20 °C. J. Food Sci. 42: 1642-1645.
23. Yatco-Manzo, E., Whitaker, J.R. (1962) Ficin-catalyzed hydrolysis of elastin. Biochem. Biophys. 97: 122-127.

J.Vet.Res. 64,1:1-6,2009

COMPARATIVE STUDIES ON THE EFFECT OF THE ENZYME FICIN ON THE SOLUBILITY AND ELECTROPHORETIC PATTERN OF OVINE AND BOVINE MEAT PROTEINS

Shekarforoush, S.S.[1]*, Aminlari, M.[2], Sabbagh, N.[3]

[1]*Department of Food Hygiene, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz- Iran.*

[2]*Department of Basic Sciences, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz- Iran.*

[3]*Graduated from the School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz- Iran.*

(Received 24 June 2007 , Accepted 15 April 2008)

Abstract:

Different techniques have been employed to improve the technological properties of meat. One of the most important techniques is adding proteolytic enzymes which could simultaneously increase the tenderization and solubility of meat proteins. The purpose of this investigation was to study the effect of different levels of the enzyme ficin on ovine and bovine meat and to determine the best condition for solubilization of meat proteins. Ficin was partially purified from figs tree latex by cationic exchange chromatography. Meat samples were treated wilh different activities of ficin and the effect ofenzyme was followed by measuring nitrogen solubility index (NSI) and electrophoresis. NSI was determined by homogenization of ficin-treated meat in the presence of buffers, centrifugation and nitrogen determination of the supernatant by kjeldal. The solubility of meat proteins increases with increase in the activity of added ficin and with increase in the incubation time ($p<0.001$). Presence of salt significantly increased the solubility of meat proteins up to 65% ($p<0.01$). The SDS-PAGE pattern of soluble proteins showed the molecular weight of proteins was in the range of 15-105 KDa and was similar in ovine and bovine meat. Also by increasing the unit activity of enzyme form 0.8 to 2.6 units. most protein bands were disappeared or decreased in intensity. These results indicated that the velry high activity of ficin results in disruption of the structure of myofibrillar proteins and excessive break down of these proteins to smaller peptides which either precipitate or can not be detected by electrophoresis.

Key words: Ficin, meat proteins, electrophoresis, nitrogen solubility index.

***Corresponding author's email: shekar@shirazu.ac.ir, Tel: 0711-2286950, Fax: 0711-2286940**