

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

سید شهرام شکر فروش^{۱*}، محمود امین لاری^۲، نازنین صباغ^۳

(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 تکنولوژی یک 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 مقدار 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 تأثیر آنزیم با اندازه‌گیری ضریب حلالیت پروتئین با روش ماکروکلدال و تهیه الگوی الکتروفوریتیک پروتئین‌های محلول مشخص گردید. با افزایش آنزیم و زمان آن، میزان شاخص حلالیت پروتئین‌های گوشت گاو و گوسفند افزایش یافت ($P < 0.001$). الگوی الکتروفوریتیک پروتئین‌های محلول نشان داد که با افزایش مقدار واحد آنزیم اکثر باندهای پروتئینی محوشده یا کاهش ضخامت پیدا کرده‌اند. این تحقیق نشان داد که شیره انجیر بدون خالص‌سازی 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 تأثیر 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 تر شکسته شده و بر اثرات تکنولوژی یک آنها در محصولات گوشتی تأثیر سوء دارد.

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

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 الکتروفوریتیک 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=7، 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 azmirma*) 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

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 امولسیون‌کنندگی 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 امولسیون‌کنندگی 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



جدول ۱- 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.

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

جدول ۲- اثر آنزیم فیسین بر شاخص حلالیت نیتروژن (mean \pm S.E.) در گوشت گاو و گوسفند در هر ستون حروف غیر مشابه نشانگر اختلاف معنی دار می باشد ($p < 0.01$).

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

بنامرکاپتواتانول 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 میکرولیتر شد). سپس با شدت ۳۰ میلی آمپر الکتروفورز شدند. ژل‌ها با مخلوطی از ۰/۱ گرم کوماسی بلو، ۱/۰ گرم استات مس، ۲۵ میلی لیتر ایزوپروپانول و ۱۰ میلی لیتر اسید استیک درصد 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 فاکسیون که بیشترین جذب نور در ۲۸۰ نانومتر را داشتند در جدول ۱ آورده شده است. همانطور که مشاهده می شود بیشترین فعالیت آنزیم با ۲/۶ واحد در ۱۰ میکرولیتر در فاکسیون چهارم وجود دارد و این نشان دهنده جداسازی بهتر آنزیم در حضور کلرید سدیم می باشد.

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 پروتئین های گوشت گاو و گوسفند مقایسه شد. همچنین اثر چهار نوع محلول مختلف (آب مقطر،

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

۳- اندازه گیری 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 مهره های ۱۰ تا ۱۳ سینه ای گوساله های نر هشتتاین ۱/۵ ساله و ۳ نمونه با همان مشخصات از پره های نر ۱/۵ ساله بومی بلافاصله پس از کشتار تهیه شد. نمونه‌ها به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در یخچال ۴ درجه 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 ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. سپس به هر تیمار مقدار ۵۰ میلی لیتر آب مقطر، بافر فسفات ۰/۰۵ مولار pH=۷، آب نمک ۳ درصد یا بافر فسفات حاوی ۳ درصد نمک اضافه شد و با هموژنایز به مدت ۱۰ دقیقه هموژن شدند و به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۶۰۰۰g سانتر فیوژ 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.

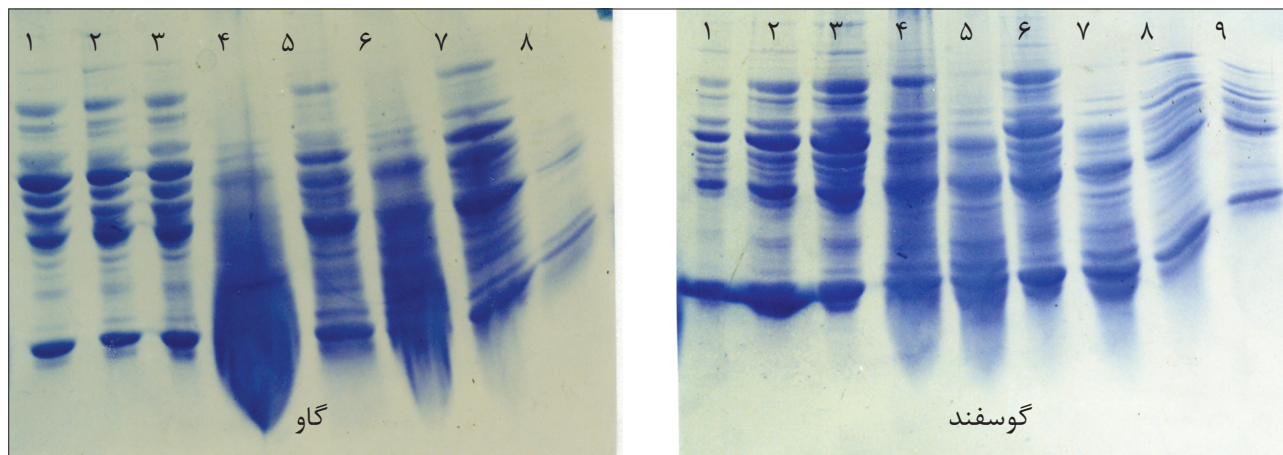
در مجموع ۴۰ تیمار (۵ مقدار مختلف آنزیم * ۲ مدت زمان * ۴ محلول جهت حل کردن پروتئین) در سه تکرار برای گوشت گاو و ۴۰ تیمار در سه تکرار برای گوشت گوسفند مورد آزمایش قرار گرفت.

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

$$NSI = \frac{\text{درصد نیتروژن مایع رویی}}{\text{درصد نیتروژن گوشت}} \times 100$$

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





تصویر ۱- الگوی الکتروفور تیک 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.

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 محوشده 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 کیلودالتون 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

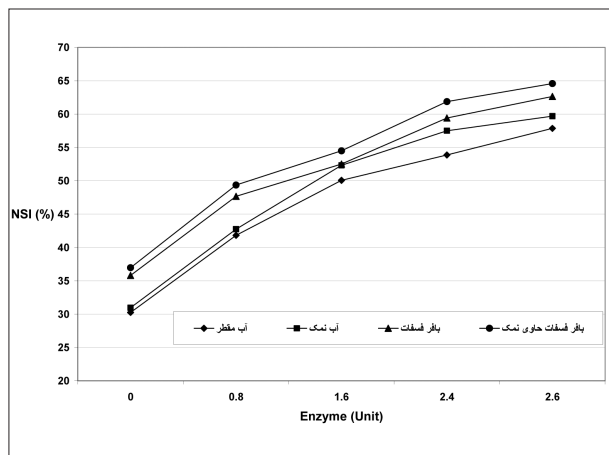
آنزیم فیسین یک آنزیم پروتئولیتیک نسبتاً قوی می‌باشد و در زمینه خالص سازی نسبی آن تحقیقاتی انجام شده است (۹). در تحقیق حاضر بیشترین فعالیت آنزیم در فراکسیونی مشاهده شد که پس از افزودن محلول ۳ درصد نمک طعام به ستون کروماتوگرافی تعویض کاتیونی، از ستون خارج گردید. به طوری کلی بر اساس خاصیت تبادل یونی و رقابت 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 مخصوصاً در دمای ۵ درجه سانتیگراد، به شکل کریستالی رسوب می‌کنند (۲۳).

بر اساس 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

بافر فسفات ۷ pH، 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 درده گرم گوشت گاو و مقدار ۰/۸ واحد آنزیم درده گرم گوشت گوسفند میزان NSI افزایش می‌یافت ($p < 0/05$). نوع گوشت بر میزان تأثیر حل‌کنندگی 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 ۳ و ۲). اختلاف معنی داری بین میزان حلالیت پروتئین‌های گوشت گوسفند و گاو ترد شده با آنزیم فیسین در محلول‌های مورد مطالعه مشاهده نشد ($p \geq 0/2$). تصویر ۱ نشان دهنده الگوی الکتروفور تیک پروتئین‌های محلول عضله گوسفند و گاو است. همانگونه که مشاهده می‌شود با افزایش مقدار آنزیم و مدت زمان اثر آن پروتئین‌های گوشت به پپتیدهای کوچک 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 تقریباً محو شده است. همچنین باند پروتئینی با وزن مولکولی تقریبی ۶۹ کیلودالتون کاهش ضخامت پیدا کرده است و در مقابل باند پروتئینی با وزن مولکولی ۱۴/۷ کیلودالتون دو باند پروتئینی مجزا ایجاد شده





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

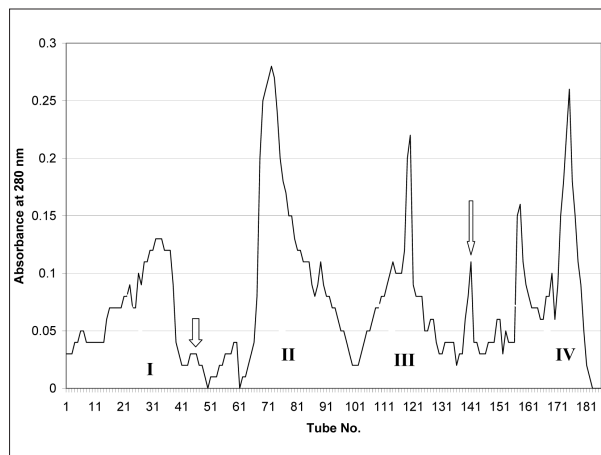
تجزیه شده نمک و گروه های قطبی پروتئین ها نیز بالا خواهد رفت. از طرفی با افزودن نمک طعام به محیط میزان ظرفیت نگهداری آب نیز افزایش می یابد (۱۰،۱۷).

در این پژوهش میزان حلالیت پروتئین های گوشت گوسفند در مقایسه با گوشت گاو بیشتر بوده است ($p < 0/01$). به نظر می رسد عوامل مختلفی چون گذراندن سریع تر دوره جمود نعشی در گوشت گوسفند و تأثیر آن در تردی گوشت (۱۳،۱۴)، به علاوه فعال شدن آنزیم های پروتئاز وابسته به کلسیم در دوره جمود نعشی در عضله گوسفند می توانند در بالا رفتن میزان حلالیت پروتئین های گوشت گوسفند زمانی که تحت تأثیر آنزیم های پروتئولیتیک دیگری چون فیسین قرار می گیرند، مؤثر باشند (۱۳).

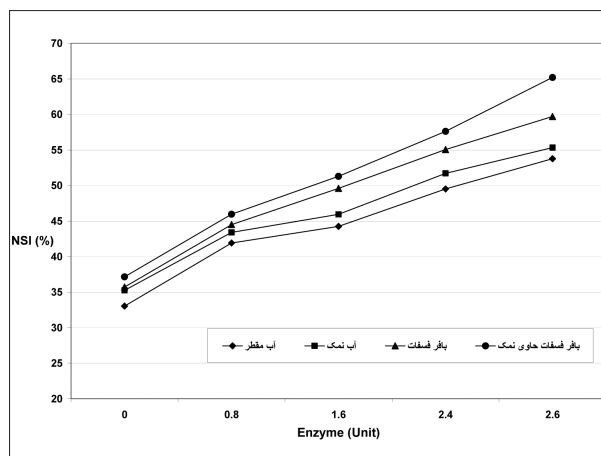
در الگوی الکتروفوریتیک پروتئین های عضلات مختلف گونه های متفاوت حیوانی نوار پروتئینی مشاهده می شود که اکتینین نامیده می شود. این پلی پپتید دارای وزن مولکولی معادل ۱۰۵-۱۰۰ کیلو دالتون می باشد (۸،۱۲،۲۱). در این پژوهش این پروتئین در الگوی الکتروفوریتیک عضله گاو و گوسفند مشاهده گردید. تفاوتی که در ماهیت این نوار پروتئینی در تيمارهای مختلف در مقایسه با نمونه شاهد دیده شد، محو شدن آن در تیمار ۵ و ۷ می باشد. این الگومی 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 الکتروفوریتیک عضلات حیوانات مختلف مشاهده می شود اکتین است (۸،۱۲،۱۶،۱۹،۲۱،۲۲). این یک پروتئین میوفیبریلی با وزن مولکولی حدود ۴۲ کیلو دالتون می باشد (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 می شود و با توجه به وزن مولکولی ۴۰-۱۸ کیلو دالتونی



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



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

انجام شده نشان می دهد که با افزایش مدت زمان تأثیر آنزیم و غلظت آنزیم پروتئین های نامحلول گوشت مانند کلاژن و الاستین کاملاً هضم شده و ماهیت آنها تغییر می کند (۱۰).

طبق نتایج بدست آمده از این تحقیق، با استفاده از محلول سه درصد نمک میزان NSI افزایش می یابد. افزودن نمک تا حداکثر به میزان ۴ درصد ($\mu < 1$)، با بالا بردن قدرت یونی محیط سبب انحلال و ایجاد فاصله بین رشته های پروتئینی شده و در نتیجه باعث بالا رفتن حلالیت پروتئین ها می گردد (۱۰،۱۷). بخشی از پروتئین های سارکوپلاسمی که محلول در نمک هستند، در محیط حاوی نمک بهتر از هم باز می شوند. از طرفی پروتئین های 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 پروتئین های میوفیبریلی به علت تبادل ایجاد شده بین یونهای



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 American Oil Chemists' Society. 3thed., Champaign, IL., Meryland, USA. pp. 11-65.
6. Boyer, F. R. (1993) Modern Experimental biochemistry. 2nded., The Benjamin Cummings Publishing Co. London,UK. pp. 117-126.
7. Braith, W., Smith, F.J. (1985) Chromatographic Method. 4thed., Chapman and Hall, Boca Raton,USA. pp.370-372.
8. Caeyns, 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) Acceleration of postmortem tenderization in ovine carcasses through activation of Ca²⁺ dependent proteases J. Food Sci. 53: 1638-1641.
14. Koohmaraie, M., Seideman, S.C. (1988) Factors

ترپرونین‌ها، 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 ترپرومیوسین 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. رضانی و همکاران در سال 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 درمی‌آیند و در سانتریفوژ همراه رسوب خارج می‌شوند. اگر چه شاخص حلالیت نیترژن 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 نمی‌باشند و احتمالاً همراه جبهه رنگ در قسمت انتهایی 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.



- 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., Taylor, 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.



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

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

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

³Graduated 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 with different activities of ficin and the effect of enzyme 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 from 0.8 to 2.6 units, most protein bands were disappeared or decreased in intensity. These results indicated that the very 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

