بررسی تاثیر آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی، نمک و زمان قوام یابی بر روی خواص رئولوژیکی ژل سوریمی

شیرین اشرفی شهمیرزادی[۱]، علی معتمدزادگان[۲]، علی جعفرپور[۳*]، بهرام شهره[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۲- دانشیار گروه صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۳- دانشیار گروه شیلات-فرآوری محصولات شیلاتی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
٤- استادیار گروه علوم دام، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

(تاریخ دریافت: ۹٤/۰۷/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹٦/۰۳/۳۰)

چکیده

به منظور تولید فراورده های مبتنی بر سوریمی یا خمیر ماهی با خواص مکانیکی و عملکردی مناسب میزان ۳-۲٪ نمک به آن اضافه می شود که این امر می تواند عامل محدودکننده مصرف آن توسط افراد دیابتی باشد. لذا در این تحقیق اثرات کاهش درصد نمک و به جای آن افزودن آنزیم ترانس گلوتامیناز و مدت زمان قوام یابی بر روی ویژگی های رئولوژیکی خمیر ماهی بررسی گردید. تیمارهای مورد آزمون شامل سطوح نمک (۱٪ و ۲٪)، سطوح آنزیم (۰٪ و ۵/۱٪) و دماهای قوام یابی (٤۰^{0}C و ٤ ^{0}C) می باشند. بر اساس نتایج، در دمای ٤۰ ^{0}C افزایش قابل توجهی در نمودا مدول ذخیره (G') تیمار حاوی ۱٪ نمک – ۱/۵٪ آنزیم و مدت قوام یابی ٤۰^{0}C به مدت ۱ساعت نسبت به سایر تیمارها، ایجاد شد. نمودارG' تیمار ۲٪ نمک- مدت قوام یابی٤ ^{0}C به مدت۱۲ساعت) بالاتر از نمودار تیمار حاوی ۲٪ نمک بدون دوره قوام یابی بود. در آزمون خزش و بازیابی تیماری ۱٪ نمک – ۱/۵٪ آنزیم – مدت قوام یابی^{0}C ٤۰-۱ ساعت بهترین میزان باز یابی را داشت و میزان تغییر شکل آن در حدود ۸/۰٪ بود که این میزان نسبت به تیمارهای فاقد آنزیم که در حدود ۳٪ بود، بسیار حائز اهمیت است.

کلید واژگان: سوریمی، آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی، نمک، دوره قوام یابی، خواص رئولوژیکی

* مسئول مکاتبات: a.jafarpour@sanru.ac.ir

۱- مقدمه

در دهه های اخیر، پژوهشگران صنایع غذایی جستجوی خود را برای روش ها و محصولاتی که می توانند خواص تکنولوژیکی و عملکردی ماکرو مولکول های مواد غذایی را تغییر دهند و قابلیت های کیفی و حسی و تغذیه ای محصولات را ارتقا دهند، متمرکز کرده اند. پروتئین ها یکی از اجزای اصلی ساختار مواد غذایی هستند از این رو اصلاح فیزیکی و شیمیایی و نیز آنزیمی، روش مناسبی برای بهبود این خواص و دستیابی به خواص عملکردی جدیدتر می باشد. برای تولید یک محصول با خواص مکانیکی و فراویژه مطلوب، افزودن نمک در مقادیر ۱-۲٪ ضروری می‌باشد. نمک از طریق ایجاد پل های نمکی بر روی مقدار پروتئین استخراج شده مؤثر است. پروتئین استخراج شده از طریق ایجاد باندهای عرضی به کمک انواع پیوندها از قبیل باندهای هیدروژنی، پیوندهای کوالانسی دوگانه و برهم کنش های هیدروفوبیک تشکیل ماتریس پروتئینی را داده که در نهایت بر روی کیفیت کلی محصول نهایی تأثیر می گذارد. از طرفی مشتریان متقاضی غذاهای سالم تر هستند، به خصوص افراد مبتلا به فشار خون بالا تمایل زیادی برای مصرف محصولات کم نمک دارند. نمک در مقادیر به کار رفته در غذاهای آماده برای این مشتریان مناسب نیست. برای برآورده کردن چنین نیازی صنعت غذا باید تهیه غذاهای کم‌نمک با کیفیت مطلوب را افزایش دهد. براساس مطالعات انجام شده، آنزیم ترانس گلوتامیناز (پروتئین -گلوتامین گاما-گلوتامیل ترانسفراز- EC.2.S.2.13) یک جایگزین مناسب وکارآمد می باشد، زیرا منجر به تسریع واکنش انتقال آسیل و دآمیناسیون و پلیمریزاسیون بین پروتئین ها توسط اتصالات عرضی داخلی و یا خارج زنجیره ای گلوتامین (اهدا کننده آسیل) و لیزین (آسیل پذیرنده) می گردد. ایجاد تغییرات زیاد در ماتریس پروتئینی مواد غذایی منجر به بهبود بافت و ثبات حرارتی، سینرژیس و خواص امولسیونی و ژل شدن و افزایش آب اتصال یافته ، بدون تغییر در pH، رنگ و عطر و طعم می شود و کیفیت تغذیه ای مواد غذایی را به دلیل اضافه کردن اسیدهای آمینه ضروری افزایش می دهد. آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی MTG[1] یک آنزیم خارج سلولی از نوع ترانسفرازها می باشد .این آنزیم در محدوده وسیعی از pH (pH ۵ تا ۸) و درجه حرارت فعالیت می کند و دمای بهینه ی آن در حدود۵۰ درجه سانتیگراد است ولی در بین ٤۰ تا ۷۰ درجه سانتی گراد نیز فعالیت می کند. مستقل از Ca2+ است و فعالیت آن نیاز به هیچ کوفاکتوری ندارد. از نظر انجمن غذا و دارو (FDA2) به عنوان یک غذای ایمن GRAS[3] شناخته شده است و هیچ محدودیتی در مصرف آن وجود ندارد [۱و۲]. کاهش مقدار نمک بدون کاهش کیفیت از طریق افزودن پروتئینهای لبنی و آنزیم ترانس گلوتامیناز امکان‌پذیر است [۳-٦]. تفاوت بین ژل های پروتئینی تیمار شده با MTG و تیمارهای فاقد آنزیم در تعداد باندهای گلوتامین و لیزین می باشد.

تحقیقی روی اثر MTG (۰/۱-۰/۳٪w/w) و پکتین با متوکسیل پایین (۱٪ w/w) روی خواص مکانیکی ژل ماهی انجام شد و مشاهدات نشان داد که استفاده از MTG و پکتین، هر کدام به تنهایی اثر مثبتی روی کیفیت محصول دارند. اما به کاربردن همزمان این دو ترکیب باعث کاهش خواص کیفی ژلها می‌گردد [٤]. درتحقیقی دیگر Passos و Augusto (۲۰۱۰) آنزیم MTG را در مقادیر (۰/۵-۱-۱/۵٪) (w/w) در محصول بازسازی شده ماهی استفاده نموده ودر مقایسه با نمونه شاهد نتایج مطلوبتری در رابطه با خواص بافتی و حسی (بو و طعم و ظاهر) در مقادیر ۱/۵٪ آنزیم حاصل بدست آوردند [۷]. در مطالعه ای که بر روی ژل حاصل از ماهی، تحت تیمار غلظت ۰/۵٪ آنزیم MTG و غلظت های مختلف نمکی (۰/۲۵٪، ۰/۵، ۱، ۲/۵) انجام شد، دریافتند که نمک و MTG خواص سینرژیستی در بهبود خواص بافتی (آزمون آنالیز پروفیل بافت[4]، تست تا شدگی و قدرت ژل) دارند و با افزودن MTG می توان باعث کاهش نمک با کمترین تغییرات در خواص مکانیکی و ارگانولپتیکی شد. در تحقیقی که Lucia و همکاران (۲۰۱٤) بر روی استیک ماهی تیلاپیا انجام دادند مشخص شد که تیمار مرحله قوام یابی در دمای ٤°C برای ۲٤ ساعت در طی ۱۵، ۳۵، ٤۵ و ۹۰ روز نگهداری در ۱۸°C- تاثیر مشخصی بر روی pH و رشد میکروبی نداشت

1. Microbial trasglutaminase enzyme1(آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی)

2. Food and Drug Administration2(انجمن غذا و دارو)

3. Generally recognize as safe(به طور کلی ایمن تشخیص داده می شود)

4. Texture Profile Analysis (TPA)

و MTG باعث بهبود افت ناشی از پخت و پارامترهای مرتبط با تست TPA از قبیل سختی قابلیت جویدن ارزیابی حسی و حس دهانی آن شد [۸]. در مطالعه ای که رادمهر و معتمدزادگان (۱۳۹۳) بر روی ناگت مرغ به روش RSM در سطوح غلظت آنزیم (٪۱/۵ تا۰) و سطوح غلظت نمک (٪۱/۵ تا۰)و تیمار زمانی ۰ تا ٤٥ دقیقه تحت دمای ٤۰°C انجام دادند، گزارش کردند که نمک و آنزیم هر دو از عوامل کاهش آب تراوش یافته بودند و همچنین افزایش نمک و فعالیت آنزیم آثر خطی معنی داری بر روی خواص بافتی به ویژه خاصیت ارتجاعی و سختی تغییر شکل داشت [۹]. همچنین آنها در مقایسه خواص رئولوژیک سه نوع ماهی و مرغ در غلظت ٪۱/۵ آنزیم دریافتند که پروتئینهای گوشت ماهی در دمای پایینتری کمپلکس تشکیل داده و G´ در گوشت ماهی نسبت به مرغ در دمای پایینتری شروع به افزایش کرد.

با توجه به مطالعات صورت گرفته می توان دریافت که بررسی اثرات آنزیم MTG بر روی خواص رئولوژیک سوریمی از گستردگی بالایی برخوردار نمی باشد. لذا هدف از این مطالعه تعیین شرایط بهینه تهیه ژل سوریمی با استفاده از آنزیم ترانس گلوتامیناز در غلظت های مختلف نمک و آنزیم تحت مراحل مختلف قوام یابی و بهبود خواص رئولوژیکی ژل سوریمی با استفاده از آنزیم ترانس گلوتامیناز و تیمارهای دمایی و زمانی بود.

۲- مواد و روش ها

مواد اولیه

خمیر ماهی[5] تولید شده به روش صنعتی از شرکت نفیس کوثر دریا و نمک از شرکت فراورده های گوشتی بریان گوشت آمل تهیه شد. جهت ایجاد اتصالات عرضی از آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی (٪۹۹ مالتودکسترین +1٪ آنزیم) استفاده گردید. این آنزیم از نوع ACTIVA WM و تولید شرکت Ajinomoto Europe S.A.S فرانسه بوده و فعالیت آنزیم آن معادل 100گرم/آنسون می باشد. آنزیم تا زمان مصرف در فریزر با دمای C ۱۸- نگهداری شد.

آماده سازی خمیر ماهی

سوریمی تولید شده به روش صنعتی حاوی گوشت چرخ شده سه نوع ماهی حسون (*Saurida tumbil*)، پیکو (*Ilisha megaloptera*)، و سلطان ابراهیم (*Nemipterus japonieus*) که مدت سه ماه از زمان تولید آن گذشته بود به نسبت مساوی تهیه شده و در دمای ۱۸°C- تا زمان استفاده، نگهداری گردید. خمیر ماهی توسط غذاساز به مدت ۱۲۰ ثانیه همراه با نمک و یا آنزیم به صورت خمیر هموژن در آمد. دمای خمیر در تمامی مراحل زیر ۱۰°C نگه داشته شد. در طول مدت آسیاب کردن خمیر مقداری آب و یخ به ترکیب اضافه شد تا علاوه بر تنظیم دمای خمیر میزان رطوبت آن نیز در حد ۸۰ درصد ثابت نگه داشته شود. خمیر حاصله در تیمارهای دمایی مورد نظر قرار گرفت و بلافاصله آنالیزهای مورد نیاز روی آنها در دستگاه رئومتر انجام گرفت [۱۰].

آزمون های رئولوژی

آزمونهای روبش دما و آزمون خزش و بازیابی بر روی نمونه ی خمیر سوریمی جهت بررسی اثر آنزیم ترانس گلوتامیناز، نمک و تیمارهای دمایی صورت گرفت . این آزمون ها توسط دستگاه رئومتر (MCR 301, Anton paar, Austria)مجهز به ژئومتری صفحه موازی(pp25) ، فاصله برابر با ۱mmصورت گرفت [۱۰].

آنالیز آماری

از آنجا که هدف اصلی این پژوهش بررسی اثرات ساده و متقابل مقدار نمک در حضور مقدار آنزیم بر روی ویژگی های رئولوژیکی خمیر سوریمی بود از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی استفاده گردیده و تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۷ با روش آنالیز واریانس یک طرفه انجام شده و معنی دار بودن آزمون مشخص گردید. سپس اختلاف بین میانگین‌ها با کمک آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح معنی داری ٪۵ صورت پذیرفت. همچنین نرمال بودن داده های کیفی به روش U test Mann-Whitney مورد بررسی قرار گرفت.

5. Surimi(خمیر ماهی)

Table 1 Experimental treatments for rheological tests

Treatments	Setting condition	Salt (%)	Enzyme (%)
1	12 h/4°C	2	0
2	12 h/4°C	2	0
3	Without setting	2	0
4	12 h/4°C	1	1.5
5	1h/40°C	1	1.5
6	1h/40°C	1	1.5
7	Without setting	1	1.5
8	Without setting	1	1.5 (inactivated enzyme)

۳- نتایج

آزمون روبش تنشی

در آزمون تنش ، محدوده ی تنش (۰/۰۱ تا۱۰۰۰ Pa) و فرکانس ۱ Hz در دمای ۱۰ ^{0}C انجام گرفت (شکل ۱). این آزمون با استفاده از خمیر سوریمی حاوی ۲٪ نمک و بدون آنزیم صورت گرفت تا محدوده خطی تنش لازم جهت اعمال در آزمون روبش دمایی مشخص گردد. با توجه به نمودار تنش بدست آمده (شکل ۱) مشاهده می گردد که مدول ذخیره (G′) در فاصله بالاتری از مدول افت (G″) قرار گرفته این امر بیانگر ماهیت ویسکوالاستیک بودن خمیر سوریمی می باشد. در ضمن بازه عددی تنش بین ۱۰ تا حدود ۱۲۰ پاسکال در محدوده خطی ویسکوالاستیک قرار دارد که از این بین با توجه به منابع و پژوهش های قبلی [۱۰] تنش ۱۰۰ پاسکال به عنوان تنش مورد نظر در آزمون روبش دمایی در نظر گرفته شد. با اعمال بیشتر تنش و با گذشتن آن از مرز ۵۰۰ پاسکال گراف مدول های ذخیره و افت به ترتیب به سمت پایین و بالا منحرف شده که نشان دهنده از هم گسیختگی باندهای پروتئینی شبکه ژل خمیر سوریمی می باشند.

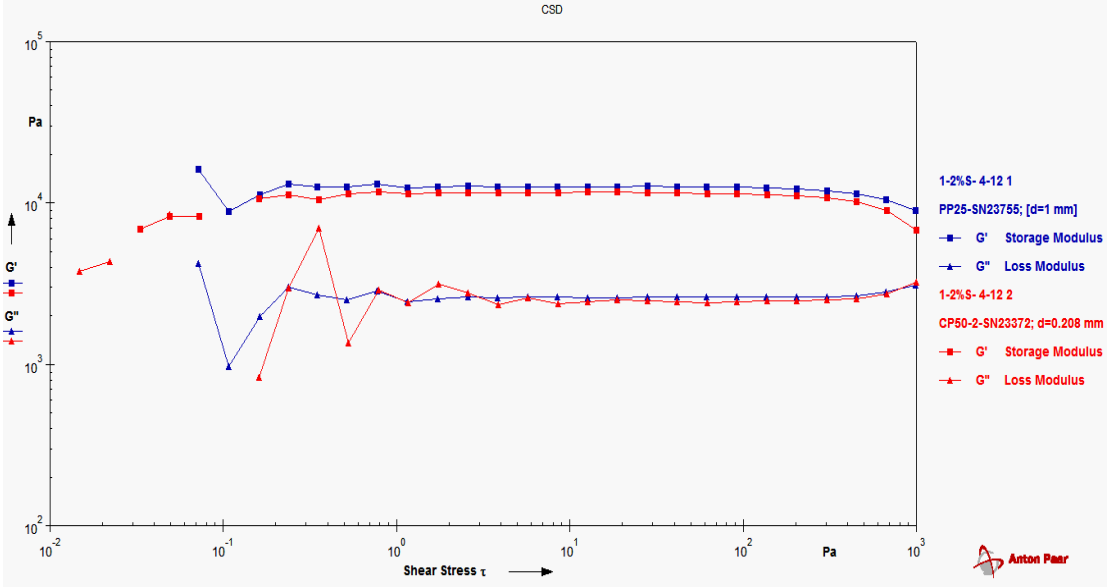

Fig 1 Linear Viscoelastic Rang of Shear stress test (0.01-1000 Pa), in frequency of 1 Hz

آزمون روبش فرکانسی

با توجه به نیاز به دو مولفه تنش و فرکانس به منظور اعمال آزمون روبش دمایی توسط دستگاه رئومتر، آزمون فرکانس در محدوده ۰/۱تا ۱۰ Hz و تنش ۱۰۰Pa در دمای ۱۰ ^{0}C انجام شد تا محدوده خطی ویسکوالاستیک آن نیز تعیین گردد (شکل ۲).

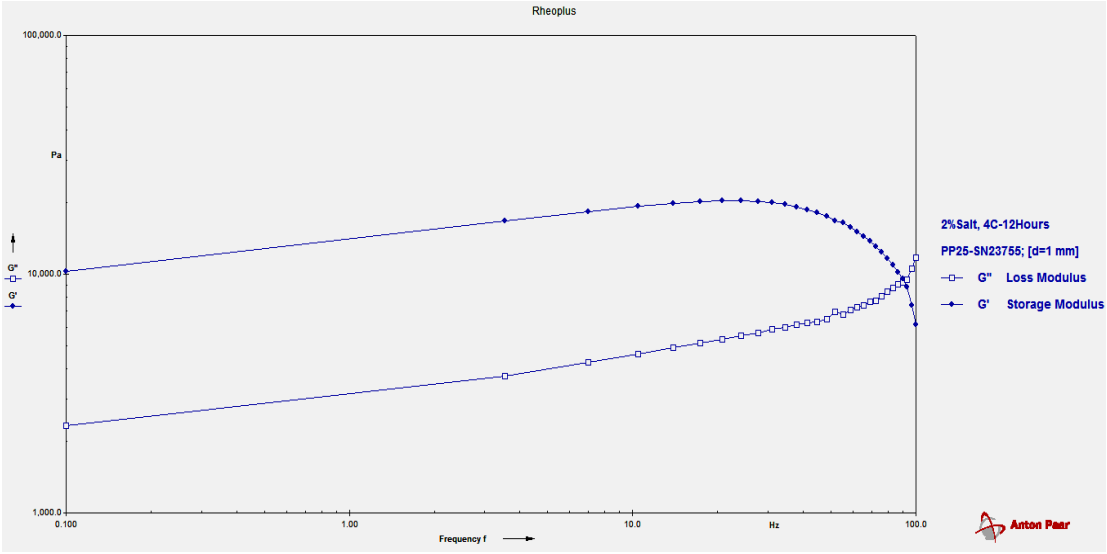

Fig 2 Linear Viscoelastic Rang of Frequency test (0.1-100 Hz), in stress of 100 Pa

همانطور که در شکل ۲ نیز مشاهده می شود شاخص مدول ذخیره مجددا در بالای گراف مدول افت قرار گرفته که تاکیدی بر ماهیت ویسکوالاستیک بودن خمیر سوریمی مورد آزمون می باشد بیان شده است که ژل‌های قوی دارای G' بیشتر از G'' و بدون وابستگی مدول‌های دینامیکی به فرکانس هستند [۱۱]. با شروع آزمون هردو شاخص مدول ذخیره و افت به سمت بالا متمایل شده و بازه خطی را نشان می دهند و به عبارتی مدول‌های دینامیکی (G' و G'') مقداری وابستگی به فرکانس داشتند و با افزایش فرکانس، این مدول‌ها نیز افزایش یافتند که میزان عددی آن بین ۱/۰ تا ۳۰ هرتز می باشد که مجددا با توجه به مرور منابع و پژهش های قبلی صورت گرفته در خصوص ژل سوریمی مقدار عددی فرکانس ۱/۰ هرتز به عنوان فرکانس قابل استفاده جهت انجام آزمون روبش دمایی انتخاب گردید.

آزمون روبش دمایی

آزمون روبش دما در محدوده ی دمایی ۱۰ تا ۹۰ درجه سانتی گراد و تنش ۱۰۰Pa و فرکانس ۰/۱ Hz انجام شد (شکل ۳). لازم به ذکر است در این آزمون به منظور راستی آزمایی داده های بدست آمده دو تیمار اضافی نیز به عنوان شاهد مورد آزمایش قرار گرفتند که عبارت بودند از الف) تیمار خمیر ماهی تازه و ب) تیمار حاوی آنزیم غیر فعال شده.

با توجه به نمودارهای آزمون روبش دما، در شروع آزمون، تیمار حاوی ۱/۵٪ آنزیم غیر فعال و تیمار حاوی ۱٪ نمک – ۵/۱٪ آنزیم با دوره قوام یابی ٤ ^{0}C به مدت ۱۲ساعت در دماهای زیر ٤۰ ^{0}C بیشترین G' را (در حدود ۲۰۰۰۰ Pa) در مقایسه با سایر تیمارها ثبت کردند. اما در خصوص تیمار حاوی ۱٪ نمک –۱/۵٪ آنزیم با دوره قوام یابی ٤۰ $^\circ C$ به مدت ۱ ساعت چه در خمیر تازه و چه خمیر ۳ماهه در دمای ٤۰ ^{0}C یک افزایش قابل توجه در گراف G' به وجود آمد که نشان دهنده فعالیت بیشتر آنزیم در دمای ٤۰ ^{0}C می باشد.

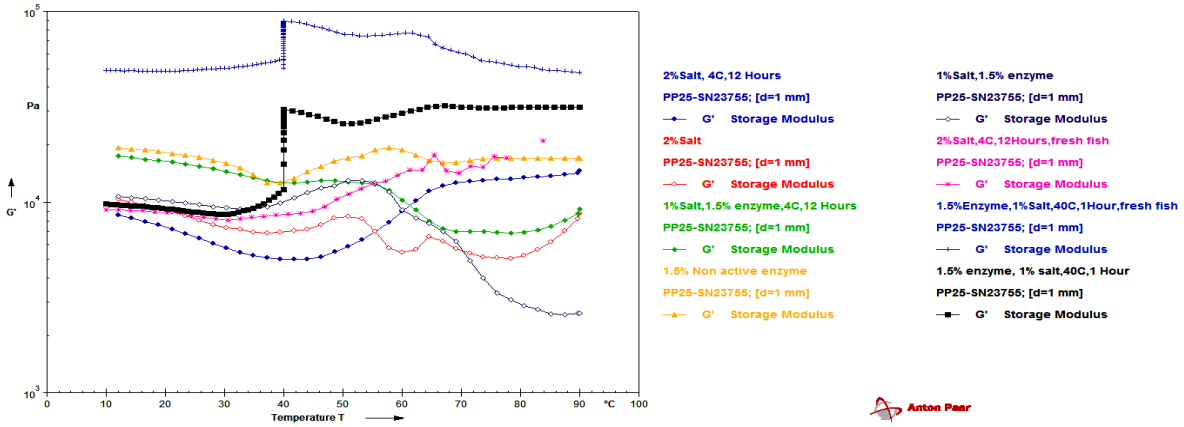

Fig 3 Temperature sweep test of surimi with and without MTG under different setting condition from 10C-90C with 100Pa stress and 0.1 Hz frequency

حضور آنزیم MTG باعث افزایش سریع 'G بعد از ٤٠ درجه سانتی گراد و باعث پایداری ژل در دماهای بالا در حدود ٥٢ ^{0}C تا ٧٠^{0}C گردید. همچنین دمای تشکیل ژل در حضور MTG کاهش یافت و حضور نمک باعث ایجاد ژل قویتر شد. حضور آنزیم MTG باعث افزایش سریع 'G بعد از ٤٠ درجه سانتی گراد و باعث پایداری ژل در دماهای بالا در حدود ٥٢ ^{0}C تا ٧٠^{0}C گردید. همچنین دمای تشکیل ژل در حضور MTG کاهش یافت و حضور نمک باعث ایجاد ژل قویتر شد. در حالی که این افزایش، در مورد تیمار حاوی ٢٪ نمک با دوره قوام یابی ٤^{0}C به مدت ١٢ ساعت در دمای ٤٦ ^{0}C ثبت گردید. همچنین کاهشی در دمای بین ٤٠ تا ٥٠ درجه سانتی گراد در روند گراف 'G مشاهده شد.

در بررسی حاضر، در مورد تیمار حاوی ٢٪ نمک بدون دوره قوام یابی، افزایش'G، در دمای ٤٦ ^{0}C بوده ولی این افزایش بسیار کمتر ازتیمار حاوی ١٪ نمک- ٥/١٪ آنزیم و مدت قوام یابی ٤٠^{0}C به مدت ١ ساعت بود و به سرعت در محدوده ی دمایی ٥٠ تا ٦٠ درجه سانتی گراد کاهش داشته است. این روند می تواند اهمیت زمان قوام یابی را در مورد تیمار حاوی نمک نشان دهد، زیرا نمودار'G تیمار حاوی ٢٪ نمک با دوره قوام یابی ٤ ^{0}C به مدت ١٢ ساعت بالاتر از نموادر 'G تیمار حاوی ٢٪ نمک بدون دوره قوام یابی بود. در نمونه های حاوی آنزیم غیر فعال نیز افزایش 'G از دمای ٤٠^{0}C شروع گردید ولی نسبت به تیمار بهینه حاوی ١٪ نمک – ٥/١٪ آنزیم با دوره قوام یابی ٤٠^{0}C به مدت ١ساعت بسیار کمتر است که این تفاوت نشان دهنده ی فعالیت و نقش مرحله قوام یابی در افزایش الاستیسیته و ایجاد باند در رشته های پروتئینی می باشد. همچنین تیمار حاوی ١٪ نمک – ٥/١٪ آنزیم با دوره قوام یابی ٤٠^{0}C به مدت ١ ساعت در مورد خمیر تازه نسبت به همین تیمار بر روی خمیر ٣ ماهه 'G بالاتری دارد که نشان دهنده تاثیر فرایندهای دمایی و آنزیمی بر روی خمیر ماهی تازه می باشد. بعلاوه تیمار حاوی ١٪ نمک – ٥/١٪ آنزیم با دوره قوام یابی ٤٠^{0}C به مدت ١ ساعت در مورد خمیر ٣ ماهه 'G بالاتری نسبت به تیمار خمیر ماهی تازه با تیمار حاوی ٢٪ نمک نشان داد که این می تواند تاثیر آنزیم را در جهت بهبود بافت نشان دهد. در مورد تیمار حاوی ١٪ نمک – ٥/١٪ آنزیم با دوره قوام یابی ٤^{0}C به مدت ١٢ ساعت بعد از دمای ٤٠^{0}C افت در نمودار 'G مشاهده شد که این میتواند به دلیل تخریب باندهای ایجاد شده ی ضعیف ترو نیز فعالیت بسیار کمتر آنزیم در دماهای پایین نسبت به دمای ٤٠ ^{0}C که دمای بهینه فعالیت آن است، باشد. همچنین در تیمار حاوی ١٪ نمک – ٥/١٪ آنزیم بدون دوره قوام یابی نیز می توان روند صعودی نمودار'G را بعد از ٤٠ ^{0}C مشاهده کرد که البته این نرخ افزایشی بسیار کمتر است و در دماهای بالای ٥٦ ^{0}C به دلیل فعالیت آنزیمهای پروتئاز قلیایی افت را در نمودار 'G مشاهده می کنیم.

آزمون خزش و بازیابی

آزمون خزش و بازیابی نیز درمدت ٣٠٠ ثانیه تنش و ٣٠٠ ثانیه بازیابی در دمای ١٠ درجه سانتی گراد انجام شد. در آزمون خزش و بازیابی نمونه بهینه حاوی ١٪ نمک – ٥/١٪ آنزیم با دوره قوام یابی ٤٠^{0}C به مدت ١ ساعت در مورد خمیر تازه و خمیر ٣ ماهه بهترین میزان بازیابی را نشان داد و نسبت به نمونه های حاوی ٢٪ نمک تغییر شکل کمتری را نسبت به نیروی ١٠٠Pa وارد شده داشت و میزان تغییر شکل آن در حدود ٨/٠٪ بود که این میزان نسبت به تیمار حاوی ٢٪ نمک که تغییر شکل آن در حدود ٣٪ بود، بسیار چشمگیر است و این می تواند به دلیل فعالیت آنزیم MTG و ایجاد اتصالات عرضی کووالانسی بین زنجیره های پروتئینی باشد که باعث افزایش میزان الاستیسیته و مقاومت به تغییر شکل می گردند. در بررسی حاضر، در مورد تیمارهای حاوی ٢٪ نمک با دوره قوام یابی ٤ $^\circ C$ به مدت ١٢ ساعت و ٢٪ نمک بدون دوره قوام یابی تفاوت چندانی مشاهده نشد که این می تواند به دلیل فعالیت آنزیم های پروتئازی موجود در بافت گوشت باشد که با شکستن پیوندها اجازه ایجاد تفاوت در اثر دوره قوام یابی سرد را نمی دهند. در مورد نمودار مربوط به تیمار حاوی حاوی ١٪ نمک – ٥/١٪ آنزیم با دوره قوام یابی ٤ $^\circ C$ به مدت ١٢ ساعت بیشترین میزان تغییر شکل در حدود ٨/٣٪ مشاهده شدکه این نیز می تواند به دلیل میزان فعالیت کمتر آنزیم MTG در دماهای پایین و نیز فعالیت آنزیم های پروتئازی در دمای های بالاتر در حین فرایند تشکیل ساختار سه بعدی ژل پروتئینی باشد.

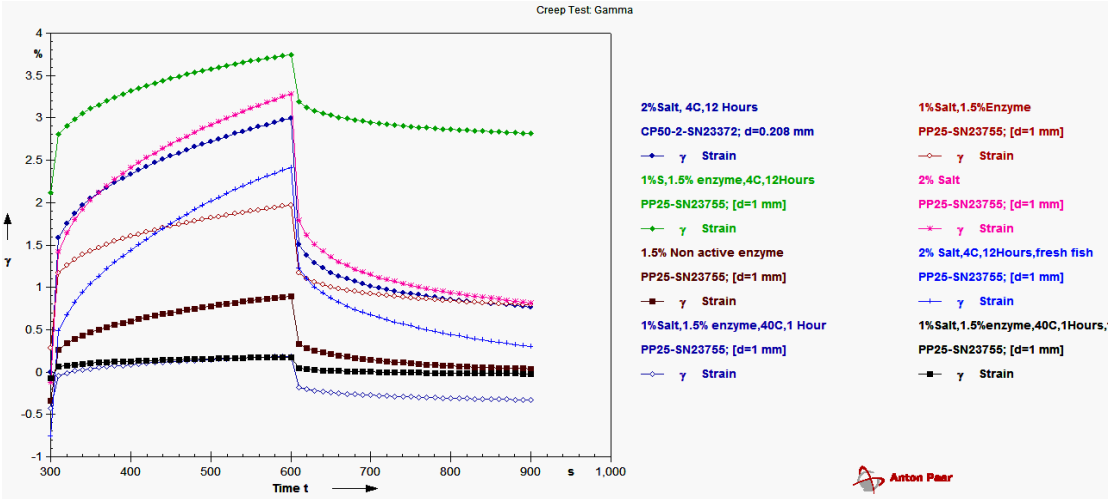

Fig 4 Stress and Relaxation test of surimi with and without MTG under different setting condition under 100Pa stress for 300 sec. and relaxation for 300 sec.

٤- بحث

داده های بدست آمده از مطالعه حاضر تاکیدی در خصوص تاثیر مثبت افزودن آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی و دوره قوامی یابی بر روی روند تشکیل ساختار سه بعدی ژل سوریمی و بهبود کیفیت بافت آن بوده و هم راستا با مطالعات انجام شده قبلی می باشد. به عنوان مثال در تیمار حاوی ۱٪ نمک –۱/۵٪ آنزیم با دوره قوام یابی ٤۰ $^{\circ}C$ به مدت ۱ ساعت چه در خمیر تازه و چه خمیر ۳ماهه در دمای ٤۰ $^{\circ}C$ یک افزایش قابل توجه در گراف 'G به وجود آمد که نشان دهنده فعالیت بیشتر آنزیم در دمای ٤۰ $^{\circ}C$ و ایجاد باندهای کووالانسی و اتصالات عرضی زیاد بین رشته های پروتئینی و زنجیره های سنگین میوزین می باشد. در مطالعه Piyadhammaviboon و Yongsawatdigul (2005) بر روی تاثیر آنزیم MTG بر روی سوریمی گزارش گردید که افزودن آنزیم باعث افزایش و بهبود مدول ذخیره 'G شد [۱۲]. تشکیل ژل در سوریمی حاوی MTG در طول دوره قوام یابی به ویژه در ٤۰ ^{0}C صورت گرفت در حالی که در نمونه شاهد در ٤۸/۱ ^{0}C شبکه ژل تشکیل شد. در مطالعه Benjakul و همکاران (۲۰۰۸) گزارش گردید که وجود آنزیم MTG باعث افزایش سریع 'G بعد از٤۰ درجه سانتی گراد و باعث پایداری ژل در دماهای بالا در حدود ۵۲ درجه تا ۷۰ درجه گردید [۱]. همچنین دمای تشکیل ژل در حضور MTG کاهش یافت و حضور نمک باعث ایجاد ژل قویتر شد. در حالی که این افزایش، در دمای ٤٦ ^{0}C در مورد تیمار حاوی ۲٪ نمک با دوره قوام یابی ٤ ^{0}C به مدت۱۲ساعت رخ داد. همچنین کاهشی در دمای بین ٤۰ تا ۵۰ درجه سانتی گراد مشاهده شد که احتمالا به دلیل فعال شدن آنزیم های پروتئاز قلیایی می باشد. بر اساس مطالعه Piyadhammaviboon و Yongsawatdigul (2005) در سوریمی آنزیم های پروتئاز درون زا وجود دارد که دمای ٦۵ ^{0}C بهترین دما جهت هیدرولیز پروتئینی برای آنها می باشد که باعث دناتوراسیون پروتئین ها و در نتیجه افزایش میزان محتوای الیگو پپتیدهای محلول می گردد. اشکال کوتاه پروتئینی حاصل از پروتئولیز ممکن است بستر مناسبی برای فعالیت MTG نباشد. همچنین در ٦۵ درجه سانتی گراد آنزیم MTG تا حدودی غیر فعال می گردد. در بررسی آنها میزان 'G در ۳۲ درجه سانتی گراد بدون حضور MTG افزایش یافت و در ۷۵ درجه سانتی گراد بیشترین 'G را نشان داد [۱۲].

در بررسی حاضر، در مورد تیمار حاوی ۲٪ نمک بدون دوره قوام یابی افزایش'G، در ٤٦ ^{0}C بود ولی این افزایش بسیار کمتر ازتیمار حاوی ۱٪ نمک–۱/۵٪ آنزیم با مرحله قوام یابی در دمای ٤۰ ^{0}C به مدت ۱ساعت بود و به سرعت در محدوده ی دمایی۵۰ تا٦۰ درجه سانتی گراد کاهش داشته است که می تواند به دلیل فعال شدن آنزیم های پروتئاز قلیایی در این محدوده ی دمایی و در نتیجه تخریب بافت گوشت ماهی باشد. این میتواند اهمیت زمان قوام یابی را در مورد تیمار حاوی ۲٪ نمک نشان دهد، زیرا که نمودار'G تیمار ۲٪ نمک با

دوره قوام یابی در دمای ^{0}C ٤، به مدت ۱۲ساعت بالاتر از نمودار 'G تیمار حاوی ۲٪ نمک بدون مرحله قوام یابی بود. این موضوع می تواند نشان دهد که در دوره قوام یابی و همچنین آماده سازی نمونه فرایند تجمع پروتئینی در حال رخ دادن بوده است که باعث تبدیل یک خمیر ویسکوز به خمیر الاستیک بوده است. در مطالعات مشابه انجام شده گزارش کردیده است که در طی مرحله قوام یابی تغییرات ساختاری قابل توجهی در پروتئین رخ می دهد [۱و۱۳] به طوریکه میوزین بسیار حساس به حرارت است و در درجه حرارت های پایین نیز آسیب پذیر است و دناتوره میگردد. در نتیجه تغییرات ساختاری منجر به در معرض قرار گرفتن گروه های پروتئینی عملکردی آن میگردد. از سویی دیگر افزودن آنزیم ترانس گلوتامیناز و افزایش زمان قوام یابی منجر به کاهش در محتوای گروه SH می گردد. اتصال پروتئین ها در دمای پایین می تواند در نتیجه ی واکنش بین سر های آزاد میوزین و اکتین باشد. بنا به اظهارات این پژوهشگران، میوزین در دمای ٦٣°C به طور کامل دناتوره می شود در نتیجه آن را قادر می سازد تا به طور کامل در شکل گیری شبکه ژل پروتئینی سه بعدی در آن محدوده دمایی شرکت کند. در دمای بالاتر از٧٠°C تغییر بارزی در مونومرG-اکتین رخ نمی دهد. افزایش الاستیسیته در ژل میوزین در این محدوده دمایی٥٠ تا٨٠ درجه سا نتی گراد نتیجه شرکت سرهای میوزین است که به نوبه خود در دمای ٦٠°C تا ٦٥ ساختار شبکه پلیمری در اثر تشکیل مقدار زیادی کمپلکس اکتومیوزین تقویت می شود که احتمالا این اثر توسط اتصالات حاصل از MTG به وجود می آید. فرآیند تشکیل ژل نه تنها مرتبط با اکسیداسیون گروه های SH که منجر به تشکیل باندهای کووالانسی S-S می گردد، بلکه در پیوندهای داخل مولکول پروتئینی به -S-S-SH- تبدیل میگردد [۱و۱۳]. در مطالعه رادمهر و معتمدزادگان (۱۳۹۳)، در آزمون روبش دما نیز ابتدا افزایشی در مقدار ´G رخ داده، سپس کاهش یافت همچنین پروتئینهای گوشت ماهی در دمای پایینتری کمپلکس تشکیل داده و ´G در گوشت ماهی نسبت به مرغ در دمای پایینتری شروع به افزایش کرد [۹]. افزودن آنزیم ترانس گلوتامیناز فعال در مورد نمونه گوشت ماهی فیتوفاک و کپور باعث افزایش میزان الاستیسیته در پایان ٣٠ °C گردید، در مورد گوشت ماهی قزل آلا نیز در محدوده دمایی ٢٠ تا ٢٥ درجه سانتیگراد میزان ´G بالاتر از نمونه حاوی آنزیم غیر فعال بود. دلیل این امر را تشکیل اتصالات عرضی داخل و خارج مولکولی توسط MTG دانسته است که این مولکولهای پروتئینی اتصال عرضی یافته نیاز به دمای پایینتری برای ایجاد یک ساختار الاستیک دارند. البته لازم به ذکر است که تمامی این تغییرات تابعی از نوع گونه ماهی مورد استفاده و ماهیت متفاوت پروتئین های میوفیبریلی آن می باشد [١٤].

نکته جالب دیگر در مطالعه حاضر اینکه در نمونه های حاوی آنزیم غیر فعال نیز افزایش'G از دمای C° ٤٠ شروع می گردد ولی نسبت به نمونه بهینه (۱٪ نمک –۱/۵٪ آنزیم با دوره قوام یابی ^{0}C ٤٠-١ ساعت) بسیار کمتر است که این تفاوت نشان دهنده ی فعالیت و نقش آن در افزایش الاستیسیته و ایجاد باند در رشته های پروتئینی می باشد. در بررسی رادمهر و معتمدزادگان (۱۳۹۳) مشاهده گردیدکه افزودن آنزیم ترانس گلوتامیناز هم به صورت فعال و هم غیر فعال میزان 'G گوشت را افزایش داد و دلیل این مسئله را، وجود ۹۹٪ مالتودکسترین در نمونه آنزیم تجاری مورد استفاده دانستند [۹]، در نتیجه این ماده روی میزان خاصیت الاستیکی نمونه ها تأثیر گذاشته است. در مطالعه حاضر همچنین تیمار حاوی ۱٪ نمک – ۱/۵٪ آنزیم با دوره قوام یابی C° ٤٠-١ ساعت–خمیر تازه) نسبت به همین تیمار بر روی خمیر ۳ماهه 'G بالاتری دارد که نشان دهنده تاثیر فرایندهای دمایی و آنزیمی بر روی خمیر ماهی تازه می باشد و همچنین تیمار حاوی ۱٪ نمک – ۱/۵٪ آنزیم با دوره قوام یابی C° ٤٠-١ ساعت–خمیر ۳ ماهه) 'G بالاتری نسبت به تیمار خمیر ماهی تازه با تیمار حاوی تنها ۲٪ نمک نشان داد که این می تواند تاثیر آنزیم را در جهت بهبود بافت نشان دهد که می تواند بافت تخریب شده در اثر گذشت زمان را تا حد زیادی بهبود دهد. در مورد تیمار حاوی ۱٪ نمک –۱/۵٪ آنزیم با دوره قوام یابی ^{0}C٤-١٢ ساعت، بعد از دمای ٤٠°C افت در نمودار 'G مشاهده شد که این میتواند به دلیل تخریب باندهای ایجاد شده ی ضعیف تر و نیز فعالیت بسیار کمتر آنزیم در دماهای پایین نسبت به دمای ٤٠°C که دمای بهینه فعالیت آن است، باشد. همچنین در تیمار حاوی ۱٪ نمک –۱/۵٪ آنزیم بدون دوره قوام یابی نیز می توان افزایش نمودار'G را بعد از ٤٠°C مشاهده کرد که البته این نرخ رشد بسیار کمتر است و در دماهای بالای C° ٥٦ به دلیل فعالیت

آنزیم های پروتئاز قلیایی افت را در نمودار 'G مشاهده می کنیم. دلیل آن، احتمالا فرصت کم فعالیت آنزیم جهت ایجاد باند کووالانسی برای ایجاد بافتی مستحکمتر را می باشد و باند های ایجاد شده نسبت به باندهای شکسته شده توسط آنزیم های پروتئازی کمتر بوده است در نتیجه در نمودار'G بعد از دمای ٥٦°C افت مشاهده شد. در این نتیجه همچنین حضور پر رنگ آنزیم های پروتئاز قلیایی را در بافت سوریمی که مدت۳ ماه از تولید آن گذشته است را می توان مشاهده کرد. در پژوهشی که Chin و همکاران (۲۰۰۹) بر روی پروتئین های میوفیبریل خوک انجام دادند بیان کردند که حضور MTG باعث افزایش زیادی در سفتی ژل و الاستیسیته و 'G در غلظت ۰/٦M نمک شد [١٤]، زیرا که افزودن MTG به میزان ۱۰g/kg باعث پلیمریزاسیون زنجیره سنگین میوزین شد. نتایج نشان داد که سوسپانسیون پروتئین میوفیبریلی در غلظت های پایین نمک نتوانست شبکه الاستیک ژلی تشکیل دهد زیرا که میزان پروتئین های محلول بسیار کم بوده است در نتیجه در غلظت های پایین نمک به دلیل عدم حضور نمک میزان پروتئین های محلول نسبت به زمانی که غلظت نمک بالاتر است، کمتر است در نتیجه MTG فعالیت کمتری نشان میدهد زیرا نمیتواند به تنهایی باعث بهبود بافت گردد. با افزایش غلظت پروتئین های محلول که حاصل افزایش میزان نمک می باشند تاثیر MTG نیز افزایش می یابد و مدول'G افزایش چشمگیری نسبت به مدول"G داشته و تفاوت چشمگیری نسبت به غلظت های پایین تر نمک دارد. همچنین MTG باعث افزایش سریع'G بعد از ٥٥ درجه سانتی گراد و باعث پایداری ژل در دماهای بالا درحدود ٦٥ درجه سانتی گراد تا ۷۲ درجه سانتی گراد گردید و همچنین دمای تشکیل ژل در حضور MTG کاهش یافت و افزایش غلظت نمک باعث ایجاد ژل قویتر شد.

در آزمون خزش و بازیابی نمونه بهینه (۱٪ نمک –۱/۵٪ آنزیم با دوره قوام یابی۴۰°C-۱ ساعت تازه و ۳ماهه) بهترین میزان باز یابی را داشت و نسبت به نمونه های حاوی ۲٪ نمک تغییر شکل کمتری را نسبت به نیروی ۱۰۰Pa وارد شده داشت و میزان تغییر شکل آن در حدود ۰/۸٪ بوده است که این میزان نسبت به تیمار حاوی ۲٪ نمک که در حدود۳٪ می باشد، بسیار چشمگیر است و این می تواند به دلیل فعالیت آنزیم MTG و ایجاد اتصالات عرضی کووالانسی بین زنجیره های پروتئینی باشد که باعث افزایش میزان الاستیسیته و مقاومت به تغییر شکل می گردند. در بررسی انجام شده در پژوهش Herranze و همکاران (۲۰۱۳) نمونه حاوی ۰/۰۸٪ آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی بالاترین شاخص J(t) در طول خزش و بازیابی نشان داد [۱۵]. این نشان می دهد که در طول بارگذاری، نسبت به سایر تیمارها از هم گسیختگی متوالی در باندهای بیشتری صورت گرفته است، بنابراین مولکولهای کوتاه اولیه، اتصالات عرضی ضعیف تری داشته اند و در نتیجه دچار پارگی شده اند. در بارگذاری با زمان های بالاتر، پارگی ممکن است به کمپلکس های مولکولی بزرگتر و قوی تر مانند پیوندهای کووالانسی سرایت کند که تا حدی غیر قابل بازگشت هستند. علاوه بر این در طول دوره بازیابی در مورد نمونه حاوی ۰/۰۸٪ آنزیم J(t) بیشترین بوده است. این نشان می دهد که پیوندهای غیر قابل بازگشت بیشتری شکسته است در نتیجه این نمونه بالاترین"G را دارا می باشد.

در بررسی حاضر، در مورد نموادر تیمار حاوی ۲٪ نمک با دوره قوام یابی ١٢°C–٤ ساعت) و تیمار حاوی ۲٪ نمک بدون دوره قوام یابی تفاوت چندانی مشاهده نشد که این می تواند به دلیل فعالیت آنزیم های پروتئازی موجود در بافت گوشت باشد که با شکستن پیوندها اجازه ایجاد تفاوت در اثر دوره قوام یابی سرد را نمی دهند. در مورد نمودار مربوط به تیمار حاوی ۱٪ نمک –۱/۵٪ آنزیم با دوره قوام یابی٤°C-١٢ ساعت بیشترین میزان تغییر شکل در حدود ۳/۸٪ مشاهده شدکه این نیز می تواند به دلیل میزان فعالیت کمتر آنزیم MTG در دماهای پایین و نیز فعالیت آنزیم های پروتئازی باشد. ایجاد اتصالات عرضی کمتر توسط MTG و تخریب برخی دیگر از پیوند ها باعث ایجاد یک شبکه ژل مناسب و خاصیت الاستیک زیاد در این نمونه شده است، همچنین در مورد قسمت دوم نمودار که نشان دهنده قدرت بازیابی این خمیر می باشد میتوان مشاهده کرد که به دلیل فعالیت آنزیم MTG، ساختار و شبکه ژل از قدرت بازیابی خوبی برخوردار است در حالی که در مورد تیمار حاوی فقط ۲٪ نمک با وجود تغییر شکل کمتر در قسمت اول نمودار اما میزان بازیابی این تیمار بسیار کمتر از تیمار های آنزیمی بوده است و در اثر نیروی اعمالی پیوند های بیشتری تخریب شده است.

۵- نتیجه گیری

در بررسی حاضر جایگزینی نسبی نمک با تعیین نقطه بهینه به روش سطح پاسخ در غلظت ۵/۱٪ آنزیم، غلظت ۱٪ نمک وتیمار دمایی ٤٠ درجه سانتی گراد به مدت ۱ ساعت باعث بهبود خواص بافتی و رئولوژیکی سوریمی ماهی توسط آنزیم و تیمار دمایی به ویژه در نقطه بهینه شد. همچنین در آزمون های رئولوژیکی این نتایج به دست آمد که تیماردمایی ٤٠ درجه سانتی گراد نقطه بهینه فعالیت آنزیم ترانس گلوتامیناز بوده که این امر موجب افزایش قابل توجه در نمودار G′ تیمار های حاوی آنزیم و تیمار دمایی٤٠درجه سانتی گراد شده است و همچنین دمای تشکیل ژل را در این تیمار ها نسبت به تیمار حاوی تنها ۲٪ نمک که در حدود ٤٦ درجه سانتی گراد بوده است به٤٠درجه سانتی گراد کاهش داد. از سویی دیگر اعمال این تیمار بر روی خمیر سوریمی قادر به تشکیل شبکه سه بعدی ژل پروتئینی می باشد که دارای قابلیت بازیافت بعد از تنش آن نیز در مقایسه با سایر تیمارها قابل توجه می باشد.

٦- منابع

[1] Benjakul, S., Phatcharat, S., Tammatinna, A., Visessanguan, W., & Kishimura, H. 2008. Improvement of gelling properties of lizardfish mince as influenced by microbial transglutaminase and fish freshness. Journal of Food Science, 73(6), S239-S246

[2] Damodaran, S., & Agyare, K. K. (2013). Effect of microbial transglutaminase treatment on thermal stability and pH-solubility of heat-shocked whey protein isolate. Food Hydrocolloids, 30(1), 12–18.

[3] Ramırez J.A., Del A ´ ngel .A,. Uresti R.M, Velazquez G., Va´zquez M. 2007. Low-salt restructured products from striped mullet (*Mugil cephalus*) using microbial transglutaminase or whey protein concentrate as additives. Food Chemistry 102 , 243–249.

[4] Uresti, R. M., Tellez-Luis, S. J., Ramırez, J. A., Vazquez M. 2004. Use of dairy proteins and microbial transglutaminase to obtain low salt fish products from filleting waste from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). Food Chemistry, 86, 257–262.

[5] Ramirez.J, Uresti. R,Tellez. S,Vazquez.M, 2002. Using Salt and Microbial Transglutaminase as Binding Agents in Restructured Fish Products Resembling Hams, Journal of Food Science Vol. 67, Nr.5.

[6] Cardoso C, Mendes R, Vaz-Pires P, Nunes ML. 2010. Effect of salt and MTGase on the production of high quality gels from farmed sea bass. Journal of Food Engineering. 101(1):98-10

[7] Augusto Gonçalves, A., and Passos M. 2010. Restructured fish product from White Croacker minced using microbial transglutaminase. Brazilian Archives of Biology and Technology.53, 987-995.

[8] Lúcia M, Monteiro G, Teixeira Mársico E , Lázaro C, 2015. Effect of transglutaminase on quality characteristics of a value-added product tilapia wastes, J Food Science and Technology. 52(5), 2598-2609.

[9] Radmehr, A. and Motamedzadegan, A. 2014. Effect of salt and MTGase on the physiochemical characteristics of chicken nugget. Iranian Journal of Food Researches. 19(9), 98-105

[10] Jafarpour, A., & Gorczyca, E. M. 2009. Rheological Characteristics and Microstructure of Common Carp (*Cyprinus carpio*) Surimi and Kamaboko Gel. Journal of Food Science, 4(3), 172-179.

[11] Ferris , J., Sandoval, A., Barreiro , J., Sánchez , J., & Müller, A. 2009. Gelation kinetics of an imitation-mortadella emulsion during heat treatment determined by oscillatory rheometry. Journal of Food Engineering, 95, 677–683.

[12] Yongsawatdigul, J., and Piyadhammaviboon, P. 2005. Effect of microbial transglutaminase on autolysis and gelation of lizardfish surimi, Science of Food and Agriculture 85:1453–1460.

[13] Stangierski, J., Rezler, R., Lesnierowski, G., 2014. Analysis of the effect of heating on rheological attributes of washed mechanically recovered chicken meat modified with transglutaminase, Journal of Food Engineering 141, 13–19.

[14] Chin, KB., Mi Y., Youling, G., Xiong, L. 2009 Konjac flour improved textural and water retention properties of transglutaminase-mediated, heat-induced porcine myofibrillar protein gel: Effect of salt level and transglutaminase incubation, Meat Science 81 ,565–572.

[15] Herranz, B. Tovar, CA, Borderias, A. J, Moreno, H. M. 2013. Effect of high-pressure and/or microbial transglutaminase on physicochemical, rheological and microstructural properties of flying fish surimi, Innovative Food Science and Emerging Technologies 20, 24–33.

Effects of microbial transglutaminase enzyme, salt and Setting on rheological characteristics of surimi gel

Shahmirzadi, Sh. [1], Motamedzadegan, A. [2], Jafarpour, A. [3*], Shohreh, B. [4]

1. M.Sc. student, Department of Food Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
2. Associate Prof. Department of Food Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
3. Associate Prof. Department of Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
4. Assistant Prof. Department of Animal Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

(Received: 2015/10/10 Accepted:2017/06/20)

In order to prepare a functional surimi based products, the amount of 2-3% salt is adding to the surimi paste, conventionally. Therefore, this can be considered as a limitation factor for its consumption by the diabetic consumers. Thereafter, in this study the effects of reduction of salt, addition of microbial trasglutaminase and setting temperature was evaluated on the rheological characteristics of surimi gel. Based on the temperature sweep test results, a more significant increase in the storage modulus (G') graph of treatment containing 1% salt, 1.5% enzyme and setting at 40 $^{\circ}C$ for 1 hour was recorded compared to other treatments. Furthermore, the G' Graph of treatment with 2% salt with no enzyme and setting at 4 $^{\circ}C$ for 12 hours was significantly above the G' Graph of treatment with 2% salt without setting), thus indicating the importance of setting stage for surimi paste containing salt. In the Creep and recovery test, treatments including 1% salt 1.5% enzymes with setting at 1hour-40 $^{\circ}C$ had the best recovery rates compared to the treatments without enzyme. Accordingly the deformation rate was recorded at about 0.8%, compared to the 3% in treatments without enzyme which can be considered as an important property.

Keywords: Surimi, Microbial transglutaminase enzyme, Salt, Setting, Rheological characteristics

* Corresponding Author E-Mail Address: a.jafarpour@sanru.ac.ir