

تأثیر 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 پذیرش مقاله: ۱۳۹۰/۹/۴

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۳/۱۸

چکیده

مقدمه: هدف از این تحقیق بررسی تأثیر 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، ۱/۲۵ یونیت بر میلی گرم پروتئین) و دماهای (۵، ۱۳، ۲۵، ۳۶، ۴۵ درجه سانتی گراد) به مدت (۳۰، ۱۰۹، ۲۲۵، ۳۴۱، ۴۲۰ 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 تأثیر معناداری ($P < 0.05$) 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.

واژه های کلیدی: آنزیم ترانس گلوتامیناز، پایداری امولسیون، پروتئین عضله ماهی فیتوفاگ

مقدمه

ساختار امولسیون طیف وسیعی از محصولات غذایی را در بر دارد که عموماً 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 ژل‌کنندگی، ظرفیت نگهداری آب، ویسکوزیته، پایداری حرارتی، امولسیون‌کنندگی و کف‌کنندگی منعکس‌کننده ارتباط بین ساختمان و اجزای پروتئین است (Ionesca et al., 2008). در این راستا پیوندهای عرضی پروتئین-پروتئین می‌تواند نقش بسیار مهمی در بهبود ویژگی‌های کاری پروتئین مواد غذایی ایفا کند (Gerrard, 2002) که در این خصوص روش‌های 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، آمین‌های اولیه و پپتیدها به عنوان گیرنده آسیل کاتالیز می‌کند (Sharma et al., 2002) که نتیجه آن تشکیل پیوندهای $(\gamma\text{-Glutaminy})\text{lysine}$ 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

تاثیر آنزیم ترانس گلوتامیناز بر پایداری امولسیون پروتئین عضله ماهی

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 عمل‌آوری شده با آنزیم ترانس گلوتامیناز نشان داد، میزان جذب آب و خواص امولسیون‌کنندگی به طور چشمگیری بهبود می‌یابد. با توجه به برتری امولسیون‌کننده‌های 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 روش‌ها

- 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 هم‌اندازه و سالم صورت پذیرفت. سریعاً 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 بسته‌های پودری ۱۰۰ گرمی، حاوی ۹۹ درصد مالتودکسترین و ۱ درصد آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی با فعالیت آنزیمی حدود ۱۰۰ یونیت بر گرم پروتئین است. شرایط مطلوب فعالیت آنزیم (۶۰-۲ درجه سانتی‌گراد) 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 پروتئین‌های میوفیبریلار، فیله خرد و همگن شده با محلول ۰/۵ مولار کلرید سدیم به نسبت ۱

UNICO,) با دستگاه اسپکتوفوتومتر (UV4802H) قرائت و از رابطه زیر محاسبه گردید.

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

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

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

X: زمان های ۴ و ۲۴ ساعت

طرح آزمایش

در این پژوهش آزمایشات بر اساس روش کاملاً 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.

جدول ۱- میزان پایه های کد بندی و بکار برده شده در آزمایش

متغیر های مستقل	پایه
	$+\alpha$ ۱ ۰ -۱ $-\alpha$
فعالیت آنزیم (یونیت بر میلی گرم پروتئین)	۱/۲۵ ۰/۶۳ ۰/۲۵ ۰
دما (°C)	۳۶ ۲۵ ۱۳ ۵
زمان (دقیقه)	۳۴۱ ۲۲۵ ۱۰۹ ۳۰
$\alpha = 1/682$	

به ۵ (w/v) اختلاط و با هموژنایزر (Wiggenhauser, N1565) با سرعت ۱۰۰۰ دور 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 ۲۰ دقیقه مخلوط در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع فوقانی عملیات سانتریفوژ به عنوان پروتئین های 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، ۰/۱۰۱، ۱/۲۵ میلی گرم)، دماهای (۵، ۱۳، ۲۵، ۳۶ و ۴۵ درجه سانتی گراد) و زمان های (۳۰، ۱۰۹، ۲۲۵، ۳۴۱ و ۴۲۰ دقیقه) بررسی شد.

اندازه گیری پایداری امولسیون (ES)

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

تجزیه و تحلیل آماری

برای تحلیل داده‌ها و بیان روابط بین متغیرها از تحلیل رگرسیونی از نرم‌افزار آماری (SAS، نسخه ۹/۰) 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.

یافته‌ها

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_1, X_2, X_3)، درجه دوم (X_{11}, X_{22}, X_{33}) و اثرات متقابل آنها (X_{21}, X_{31}, X_{32}) به منظور بررسی معنی دار بودن با آزمون t محاسبه و به منظور تعیین معادلات مدل سطح پاسخ برازش شده، تمام ضرایب فاقد معنی ($P > 0.05$) حذف شدند. ضرایب معنی دار براساس معادله چند جمله‌ای (معادله ۱) برای هر یک از ویژگی‌ها به صورت مدل‌های برازش شده در جدول ۲ نشان داده شده است.

معادله ۱:

$$Y = B_0 + \sum_{i=1}^3 B_i X_i + \sum_{i=1}^3 B_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 B_{ij} X_i X_j$$

معنی داری و اعتبار مدل توسط عدم برازش یا R^2 بررسی شد تا صحت و اثر بخشی مدل تعیین شود. همانطور که در جدول ۲ نشان داده شده است، با توجه به سطح معنی داری و R^2 تمامی مدل‌ها به قدر کافی معنی دار 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 معنی داری 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. احتمالاً افزایش دما خارج از محدوده مرکزی موجب بیشینه فعالیت آنزیم و اشباع سوبسترای پروتئینی می‌شود که به دلیل افزایش وزن مولکولی پلیمرها انعطاف پذیری پروتئین در قرار گرفتن در سطح مشترک آب و روغن کاهش خواهد یافت.

جدول ۲- 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	$y = 10.2/138127 - (0.64537 \cdot X_2^2) - (0.1898 X_3^2)$
Y_2	۰/۰۱۴۶	۰/۸۵	$y = 10.2/303391 - (0.569272 X_1) - (672166 X_2^2) - (0.916639 X_3^2)$

معنی دار $P < 0.05$ Y_1 : پایداری امولسیون (۴ ساعت)، Y_2 : پایداری امولسیون (۳۴ ساعت)

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	۰/۰۰۰۷۶	۰/۰۰۲۵۳۳		
	total error	8	۰/۳۰۸۴۲	۰/۰۰۴۸۰۲		

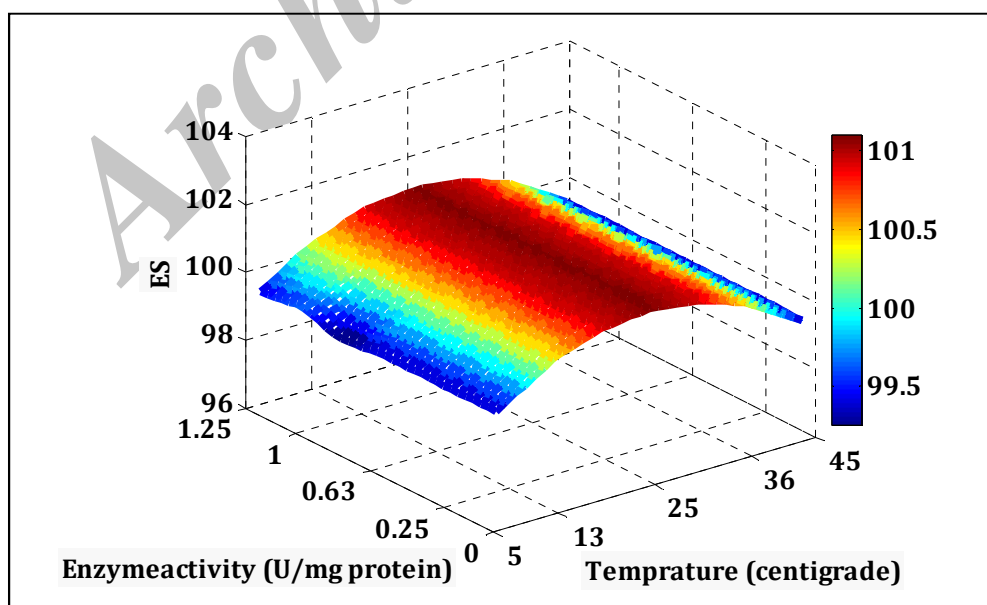
معنی دار $P < 0.05$ Y_1 : پایداری امولسیون (۴ ساعت)، Y_2 : پایداری امولسیون (۳۴ ساعت)

مقدار خود قرار دارد. این نمودار نشان می‌دهد احتمالاً 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 نسبتاً 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. احتمالاً 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، احتمالاً به دلیل تشکیل میزان بیشینه پیوندهای عرضی درون و بین مولکولی در ساختار پروتئین، پایداری امولسیون کاهش یافت.

در حالی که پایداری امولسیون طی ۲۴ ساعت در دماهای مختلف با افزایش فعالیت آنزیم با شیب نسبتاً 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 ۰/۱۲۵-۰/۲۵ یونیت بر میلی‌گرم پروتئین و دامنه دمایی ۱۳/۳۰-۱۹/۴ درجه سانتی‌گراد می‌باشد که این محدوده‌ای بهینه جهت فعالیت آنزیم است (نمودار ۲).

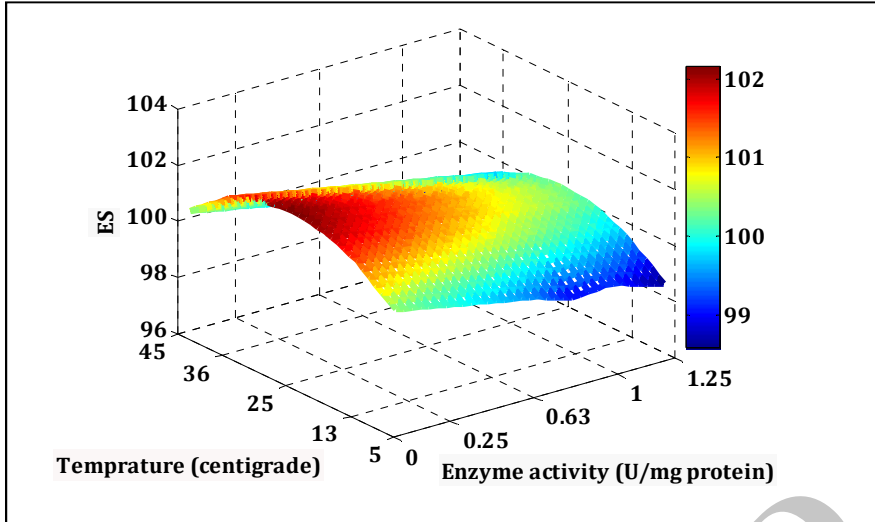
اثر متغیرهای مستقل زمان و فعالیت آنزیم بر پایداری امولسیون

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

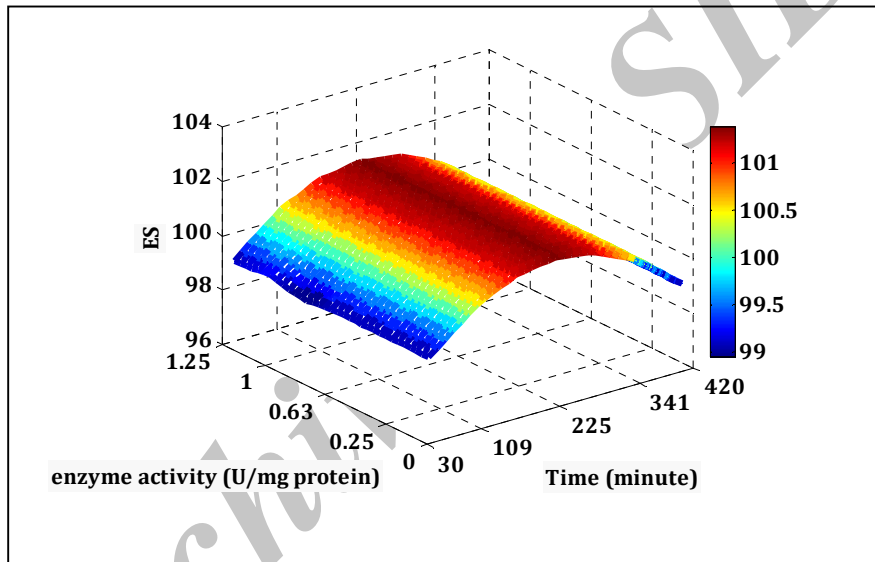


نمودار ۱- سطح پاسخ سه بعدی، اثر دما و فعالیت آنزیم بر پایداری امولسیون (۴ ساعت)

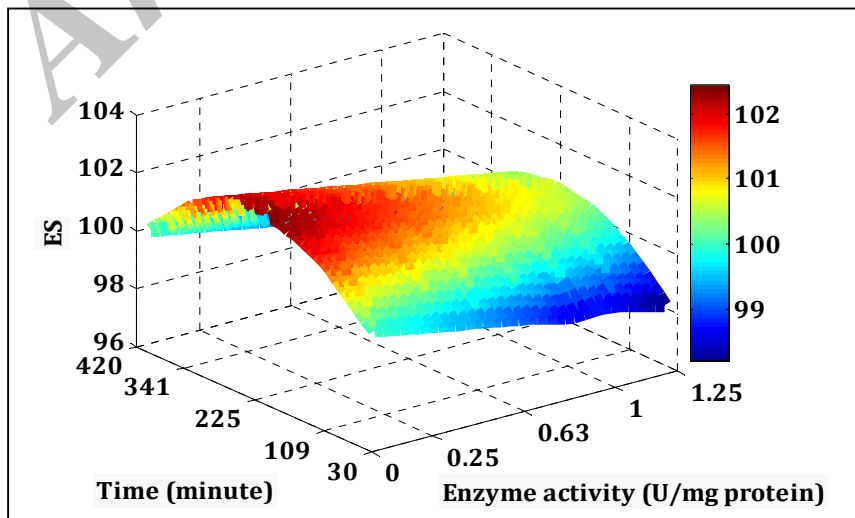
تأثير أنزيم ترانس گلوتامیناز بر پایداری امولسیون پروتئین عضله ماهی



نمودار ۲- سطح پاسخ سه بعدی، تاثیر دما و فعالیت آنزیم بر پایداری امولسیون (۲۴ ساعت)



نمودار ۳- سطح پاسخ سه بعدی، اثر زمان و فعالیت آنزیم بر پایداری امولسیون (۴ ساعت)



نمودار ۴- سطح پاسخ سه بعدی، تاثیر زمان و فعالیت آنزیم بر پایداری امولسیون (۲۴ ساعت)

بحث

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 ویسلین (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 ویسلین باشد که فعالیت آنزیم سبب کاهش عملکرد آن شود.

نتیجه گیری

تیمار آنزیمی پروتئین عضله ماهی فیتوفاگ با آنزیم ترانس گلوتامیناز در این پژوهش سبب بهبود پایداری امولسیون شده است که می تواند امر مهمی در کاربرد و بهبود ویژگی های 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 می توان 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.

بر اساس نتایج پژوهش حاضر، دما و زمان بهینه فعالیت آنزیم اهمیت بسزایی در بهبود پایداری امولسیون دارد. به طوری که 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 می یابد. 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 احتمالاً 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 کنده 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 احتمالاً به دلیل افزایش بهینه پیوند های عرضی در ساختار پروتئین، توانایی آن جهت کاهش کشش سطحی بین اجزای امولسیون و لذا افزایش پایداری امولسیون می باشد. نتایج تحقیقات پایداری امولسیون، پیرامون پیوندهای عرضی تشکیل شده بعد از امولسیون سازی 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

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 α -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.