

مطالعه تغییرات بعضی آنزیمها و الگوی الکتروفورتیکی پروتئینها در فرآورده‌های گوشتی حرارت دیده

دکتر علی احسانی پهرآباد^{۱*} دکتر طالب واثقی^۲ دکتر محمود امین لاری^۲

دریافت مقاله: ۲۱ دی ماه ۱۳۸۲
پذیرش نهایی: ۱۹ خرداد ماه ۱۳۸۳

Study on Activities of Some Enzymes and Protein Electrophoretic Patterns in Heat Treated Meat Products

Ehsani Pehrabad, A.¹, Vaseghi, T.², Aminlari, M.²

¹Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Shiraz, Shiraz-Iran. ²Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, University of Shiraz, Shiraz-Iran.

Objective: Study on some enzymes and protein electrophoretic patterns in order to find an indicator for adequacy of heat treatment in meat products.

Design: Experimental study.

Procedure: The activities of some enzymes, including: lactate dehydrogenase (LDH), aspartate amino transferase (AST) and alanine amino transferase (ALT), were assayed in meat and heat treated meat products at different time-temperatures combinations. Extracts of samples were used for electrophoresis by SDS-PAGE method.

Statistical analysis: Analysis of variance and Duncan's test.

Results: LDH was active and demonstrated a good stability in samples which were heated up to 65°C for 55 minute. However, its activity started to decline thereafter so that at 70°C no significant activity was observed. ALT and AST were more heat stable than LDH and their activities were still present in heat treated products at 70°C for 30 minutes and vanished at 75°C. Many protein bands disappeared in SDS-PAGE pattern of meat products which heated at 65°C or above.

Conclusion: LDH can be considered as a suitable indicator for meat products that have been heated at 70°C or above.

J.Fac.Vet.Med. Univ. Tehran. 61,2:107-113,2006.

Keyword: lactate dehydrogenase, aspartate amino transferase, alanine aminotranferase, SDS-PAGE.

Corresponding author's email: ehsaniali@yahoo.com

هدف: بررسی تغییرات بعضی آنزیمها و الگوی الکتروفورتیکی پروتئینها در فرآورده‌های گوشتی تحت تاثیر حرارت در زمانهای مختلف به عنوان شاخصی برای تعیین میزان حرارت داده شده به فرآورده‌های گوشتی.

روش: در مطالعه حاضر فعالیت آنزیمهای لاکتات دهیدروژناز (LDH)، آسپاراتات آمینو ترانسفراز (AST) و آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) با روش اسپکتروسکوپی در گوشت گاو و فرآورده‌های گوشتی که در زمانهای متفاوت با دماهای مختلف حرارت دیده بودند، اندازه گیری شد. برای تعیین الگوی الکتروفورتیکی از روش SDS-PAGE استفاده گردید.

تجزیه و تحلیل آماری: آنالیز واریانس و مقایسه میانگینها با استفاده از روش آزمون تعقیبی دانکن.

نتایج: آنزیم LDH در نمونه‌های گوشت و محصول گوشتی که تا دمای ۶۵ درجه سانتیگراد حرارت دیده بود پایداری حرارتی خوبی داشت و از آن پس فعالیتش رو به کاهش گذاشت و در نمونه‌هایی که ۷۰ درجه سانتیگراد حرارت دیده بودند، به صفر نزدیک شد. بنابراین LDH برای فرآورده‌هایی که باید در حدود ۷۰ درجه سانتیگراد حرارت را متحمل شوند مناسب بوده و از آن به عنوان یک شاخص مناسب می‌توان استفاده کرد. فعالیت آنزیم AST نیز در نمونه‌هایی که تا ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه حرارت دیده بودند پایداری داشته و از آن پس فعالیت این آنزیم رو به کاهش گذاشت به نحوی که پس از ۳۰ دقیقه در ۷۵ درجه سانتیگراد فعالیتش به صفر رسید. آنزیم ALT نیز مشابه با آنزیم AST عمل می‌کند. فرآورده‌های گوشتی حرارت دیده در مقایسه با فرآورده‌های حرارت ندیده دارای تغییرات بارز در الگوی الکتروفورز پروتئین بودند.

نتیجه گیری: دقت عمل، سادگی و اقتصادی بودن از مزایای استفاده از روشهای آنزیمی برای تشخیص میزان حرارت داده شده به فرآورده‌های گوشتی می‌باشد. آنزیم LDH به دلیل غیرفعال شدن در حداقل دمای مورد نیاز برای فرآورده‌های گوشتی (۷۰ درجه سانتیگراد) شاخص خوبی به نظر می‌رسد. مطالعه تغییرات الگوی الکتروفورزی نیز چگونگی تغییرات پروتئینهای محلول در نمونه‌ها را مشخص می‌کند. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۱۳۸۵، دوره ۶۱، شماره ۲، ۱۱۳-۱۰۷.

واژه‌های کلیدی: فرآورده‌های گوشتی، لاکتات دهیدروژناز، آسپاراتات آمینو ترانسفراز، آلانین آمینو ترانسفراز، SDS-PAGE.

بیماریهای با منشأ غذایی در فرآورده‌های گوشتی اغلب در اثر مصرف فرآورده‌هایی اتفاق می‌افتد که حرارت کافی که موجب از بین رفتن عوامل بیماریزا در این فرآورده‌ها بشود را ندیده‌اند. در این فرآورده‌ها حرارت کافی

جهت اطمینان از بین رفتن عوامل بیماریزا (اعم از انگل، باکتری و ویروس) الزامی است (۱۲، ۳۰). علاوه بر اهمیت در بهداشت عمومی، در واردات و صادرات فرآورده‌های دامی، حصول اطمینان از یک فرآیند حرارتی با درجه حرارت معین در بسیاری از کشورها الزامی است. به عنوان مثال درجه حرارت ۶۹ درجه سانتیگراد برای اطمینان از عدم انتقال بیماری تب برفکی در فرآورده‌های دامی وارداتی اجباری است (۳۳). بسیاری از عوامل بیماریزا مثل لیستریا مونوسیتوزن، اشریشیا کلی O157:H7 و سالمونلا در فرآورده‌هایی که حرارت کافی ندیده‌اند باقی مانده و در فرصت مناسب تولید تا مصرف،

۱) گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز - ایران.

۲) بخش بیوشیمی گروه علوم پایه دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز - ایران.

* نویسنده مسؤل: ehsaniali@yahoo.com



جدول ۱- درصد ترکیبات تشکیل دهنده فرآورده های گوشتی.

ترکیب	گوشت	روغن مایع	سویا	گلوتن	آرد	نمک	پلی فسفات	اسید اسکوربیک	نیتریت	سیرو ادویه	آب ویخ
محصول شماره ۱	۴۲	۱۴	۴	۲	۵	۱/۵۸	۰/۳	۰/۰۵	۱۲۰ppm	۳/۲	۲۷/۸
محصول شماره ۲	۴۲	۱۵	۴	۴	۸	۱/۶	۰/۵	۰/۰۵	۱۲۰ppm	۳/۲	۲۱/۶

* - مواد تشکیل دهنده براساس استاندارد شماره ۲۳۰۳ برای محصول سوسیس و کالباس است (۱).

هدف از این مطالعه بررسی مقدار فعالیت بعضی از آنزیمها و یافتن همبستگی بین دما و میزان پایداری این آنزیمها در گوشت و فرآورده های گوشتی می باشد.

مواد و روش کار

نمونه ها: نمونه های گوشت از عضله سه سر بازویی لاشه گاوهای سالم، بدون توجه به سن و نژاد و جنس برداشته و بلافاصله در کیسه های حاوی یخ به آزمایشگاه انتقال داده شد. در رابطه با فرآورده های گوشتی هم طبق فرمول جدول ۱ با رعایت شرایط استاندارد ایران تهیه گردید.

فرآورده های گوشتی طبق فرمول مندرج در جدول ۱ و براساس استاندارد شماره ۲۳۰۳ ایران به شرح زیر ساخته شد. ابتدا گوشت قرمز چرخ شده به همراه نمک طعام، پلی فسفات، نیتریت سدیم، سیرو ادویه ها و مقداری آب ویخ مخلوط شده و در مرحله بعد بقیه ترکیبات به همراه روغن مایع اضافه شد. باقی مانده مخلوط یخ و آب نیز در این مرحله اضافه گردید. مخلوط کردن ترکیبات فوق به مدت سه دقیقه ادامه یافت. پس از آماده شدن خمیر اولیه در داخل پوششهای مخصوص پر شد. نمونه ها مطابق روش زیر حرارت داده شدند.

فرآیندهای حرارتی: بعد از آماده کردن نمونه های گوشت و فرآورده گوشتی در هر مورد حدود ۵۰ گرم از نمونه با قطر حدود ۲ سانتیمتر در پوشش های دو لایه پلی اتیلنی مخصوص فرآورده های گوشتی قرار داده و در داخل یک پوشش دیگر پلاستیکی غیر قابل نفوذ به آب آماده گردید. نمونه ها در داخل حمام آبی که قبلاً به درجه حرارت مورد نظر رسیده بود، قرار داده شد. در مرکز نمونه ها دماسنج حساس با انتهای فلزی برای ثبت دقیق درجه حرارت قرار داده شد. از زمانی که مرکز نمونه به درجه حرارت مورد نظر می رسید اندازه گیری زمان شروع می گردید.

به این ترتیب نمونه ها در حرارت های ۴۵، ۵۵، ۶۰، ۶۵، ۷۰ و ۷۵ درجه سانتیگراد با زمانهای ۳۰، ۴۵، ۵۵ و ۶۰ دقیقه حرارت داده شدند. بعد از این مرحله نمونه ها به سرعت در یخچال تا زمان اندازه گیری آنزیمها نگهداری گردید.

عصاره گیری: ۰/۵ گرم از نمونه های آماده شده را در داخل هاون چینی در مجاورت ازت مایع کاملاً خرد کرده، ۴/۵ میلی لیتر بافر فسفات با pH=7/4 و مولاریته ۰/۲۵ به آن اضافه شده مخلوط حاصل به مدت پنج دقیقه با دور ۳۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ شد. از محلول رویی جهت اندازه گیری آنزیمها،

تکثیر پیدا کرده و می توانند موجب بیماریهای خطرناک در مصرف کنندگان این فرآورده ها شوند (۱۷، ۳۸). حرارت علاوه بر از بین بردن این عوامل، موجب بهبود رنگ، طعم و مزه و تردی گوشت می شود. حرارت بر روی فعالیت آنزیمها، پروتئینها و ویتامینها اثر می کند. به عنوان مثال موجب تغییر ماهیت در پروتئینها شده و برخی از ویتامینها نیز در اثر حرارت از بین می روند (۲، ۶). به دلایل ذکر شده استفاده از یک حرارت حداقل در فرآورده های گوشتی از استانداردهای اجباری در بسیاری از کشورها از جمله در ایران است و مرکز فرآورده های گوشتی باید حداقل ۷۰ درجه سانتیگراد حرارت بدون در نظر گرفتن مدت زمان، رادیده باشد (۱).

از سال ۱۹۵۰ میلادی آزمایشات مختلفی جهت حصول اطمینان از میزان حرارت داده شده به فرآورده های گوشتی ابداع گردیده و روز به روز بر دقت و حساسیت این روشها افزوده می گردد (۳۵). تعدادی از آزمایشات بر پایه پروتئین های محلول سارکوپلاسمی شامل آنزیمها و مولکولهای ناقل سلولی است. آزمایشهایی مانند تست انعقاد بر پایه کاهش حلالیت پروتئین در فرآورده های گوشتی که باید بالاتر از ۶۵ درجه سانتیگراد حرارت بینند بنا شده است (۳۳). اندازه گیری فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی در فرآورده های گوشتی کنسروی و آزمایش کاتالاز در فرآورده های گوشتی سرخ شده از دیگر روشهای اندازه گیری میزان حرارت داده شده است (۴، ۹، ۳۱).

همچنین از آنزیمهای دیگر، و تکنیک های الکترو فورز، کروماتوگرافی و روشهای فیزیکی (مانند اسپکتروسکوپی و سونوگرافی) نیز در این رابطه استفاده شده است (۳، ۲۸، ۳۱، ۳۲).

روشهای آنزیمی بدلیل ویژگیهای حساسیت بالا، سرعت عمل مناسب و آسانی عمل مورد توجه بوده اند. در رابطه با فرآورده های گوشتی، آنزیمهای آن استیل بتادی گلوکز آمینداز (۳۰)، اسید فسفاتاز (۹)، کاتالاز (۴)، تریوز فسفات ایزومراز (۱۶)، ترانس آمینازها (۲۲) و لاکتات دهیدروژناز (۳، ۲۴، ۳۶، ۳۸) مورد بررسی قرار گرفته اند. وجود فعالیت بالایی از آنزیمها در گوشت، همبستگی بین غیر فعال شدن آنزیم ویژه ای با میزان حرارت مورد نیاز برای رعایت قوانین استاندارد، سادگی و سرعت عمل اندازه گیری و میزان فعالیت آنزیم از عوامل اساسی و مهم در انتخاب آنزیم مناسب است. البته عوامل دیگری مانند نوع عضلات، pH، مدت زمان نگهداری در قبل از فرآیند، وجود افزودنیهای غذایی، روشهای عصاره گیری و سرعت گرم کردن در باقی ماندن فعالیت آنزیم نقش دارد (۲۵، ۳۴).

جداسازی پروتئینها بر روی ژلهای پلی آکریل آمید و در حضور سدیم دودسیل سولفات (SDS) برای شناسایی وزن مولکولی آنها به صورت گسترده مورد استفاده قرار گرفته است (۸). الگوی الکترو فورتیکی پروتئین های گوشت و فرآورده های آن به هنگام حرارت دیدن تغییر پیدا می کند. این تغییرات مربوط به تغییر ماهیت پروتئینها به هنگام حرارت دیدن و کاهش حلالیت پروتئین های سارکوپلاسمی و میوفیبریلی می باشد (۲۷). از بررسی این تغییرات می توان به عنوان شاخصی برای میزان حرارت داده شده به فرآورده های گوشتی استفاده کرد (۲۰، ۳۷).



الکتروود بافر شامل ۰/۲۵ مول در لیتر تریس - اسیدکلریدریک، ۰/۱۹۲ مول در لیتر گلیسین و ۰/۱ درصد SDS با pH=۸/۱ بود. الکتروفورز در شدت ۲۵ میلی آمپر انجام شده و ژلها با رنگ کوماسی بریلیانت بلو ۰/۲۵ درصد مخلوط در اسید استیک ۵۰ درصد و متانول ۰/۲۵ درصد رنگ آمیزی شده و با اسید استیک ۱۰ درصد و متانول ۷ درصد رنگ زدایی گردیدند.

نمونه‌ها در سه تکرار انجام گردیده و نتایج با استفاده از آزمونهای آنالیز واریانس یکطرفه و آزمون تعقیبی دانکن (Duncan's multiple range) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. مقدار (p<۰/۰۵) به عنوان سطح معنی دار تفاوت آماری انتخاب شد. نرم افزار مورد استفاده برای روشهای آماری SPSS, Version 11.5 بود.

نتایج

در نمونه‌های گوشت حرارت ندیده میزان فعالیت لاکتات دهیدروژناز حدود 682 ± 28 واحد در گرم بود که در اثر گرما دادن در ۴۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ تا ۶۰ دقیقه به صورت معنی داری (p<۰/۰۵) افزایش نشان داد (جدول ۲).

در اثر افزایش درجه حرارت به ۵۵ درجه سانتیگراد یا بیشتر کاهش معنی داری در فعالیت آنزیم LDH دیده شد، به طوری که در نمونه‌های گوشت پس از ۳۰ دقیقه در ۵۵ درجه سانتیگراد فعالیت آنزیم از 682 ± 28 واحد به 606 ± 5 واحد رسیده و در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد پس از ۳۰ دقیقه هنوز ۶۰ درصد فعالیت آنزیم باقی مانده و کاهش جزئی فعالیت در زمانهای طولانیتر مشاهده شد، به طوری که پس از ۵۵ دقیقه فعالیت به حدود ۳۰ درصد بالاترین فعالیت خود رسید. دماهای پایین تر از ۶۵ درجه سانتیگراد، کاهش جزئی در فعالیت آنزیم را نشان داد. همین روند در مورد فعالیت آنزیم LDH در نمونه‌های محصول گوشتی نیز دیده شد (جدول ۳). در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ دقیقه میزان فعالیت آنزیم بصورت معنی داری کاهش (p<۰/۰۵) و به ۲۰ واحد رسید. این کاهش تا ۷۵ درجه سانتیگراد ادامه پیدا کرد. به طوری که در ۷۵ درجه سانتیگراد در مدت ۴۵ دقیقه پایداری آنزیم به صفر رسید. در مقایسه نمونه‌های گوشت و محصول گوشتی از لحاظ پایداری فعالیت آنزیم در درجه حرارتهای مختلف و زمانهای متفاوت اختلاف معنی داری مشاهده نشد (p<۰/۰۵).

در نمونه‌های گوشت حرارت ندیده میزان فعالیت آنزیم AST ۶۵ واحد بین‌المللی در گرم گوشت بود. این فعالیت در درجه حرارتهای ۴۵ درجه سانتیگراد به فعالیت خود افزود و درجه حرارتهای بالاتر حتی به ۸۵ واحد رسید، اما از درجه حرارت ۷۰ درجه سانتیگراد شروع به کاهش کرد و در ۷۵ درجه سانتیگراد به صفر رسید.

روند تغییرات آنزیم ALT در گوشت و محصول گوشتی نیز تقریباً مشابه با الگوی تغییرات آنزیم AST بود با این تفاوت که میزان آنزیم ALT در نمونه‌های یک دهم آنزیم AST بود (جدول ۳، ۲).

در نمونه‌های گوشت و محصول گوشتی در مورد فعالیت آنزیمهای AST و ALT اختلاف معنی داری مشاهده نشد (p<۰/۰۵).

پروتئین‌ها و الکتروفورز استفاده گردید. این عمل در نمونه‌های خام به عنوان شاهد در آزمایشها تکرار گردید.

اندازه گیری آنزیم‌ها: لاکتات دهیدروژناز تبدیل پیرووات به ال لاکتات در حضور NADH را کاتالیز می‌کند.

اثر این واکنش NADH به NAD⁺ تبدیل می‌گردد. این تغییرات موجب کاهش میزان جذب نور در طول موج ۳۴۰ نانومتر می‌شود که با اندازه گیری این تغییر جذب می‌توان به میزان فعالیت آنزیم پی برد. یک واحد فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز برابر مقدار آنزیمی است که در یک دقیقه یک میکرومول NADH را به NAD⁺ در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و pH=۷/۵ تبدیل کند (۵).

آنزیم‌های ALT و AST بر اساس روش ذکر شده در رفرنس شماره ۵ اندازه‌گیری شد. در این روش آلانین تحت اثر آنزیم ALT به اسید پیرویک تبدیل می‌گردد. متعاقب آن اسید پیرویک حاصل با ترکیب DNPH (2,4 dinitrophenylhydrazine) در محیط اسیدی موجب تولید هیدرازون می‌شود و این ماده در محیط قلیایی (سود ۰/۴ نرمال) ایجاد رنگ می‌کند. حداکثر جذب نوری این ترکیب در طول موج ۵۰۵ نانومتر می‌باشد (۵).

آنزیم AST موجب تبدیل اسید آسپارتیک به اسید اکسالو استیک می‌گردد که این محصول با محلول DNPH در محیط اسیدی ایجاد هیدرازون می‌کند و این ماده در محیط قلیایی ایجاد رنگ می‌کند که شدت رنگ متناسب با شدت فعالیت آنزیم می‌باشد (۵).

واحد اندازه گیری آنزیمهای فوق بر اساس مقدار آنزیمی است که یک میکرومول سوپسترا را در مدت یک دقیقه در ۲۵ درجه سانتیگراد و pH=۷/۵ تبدیل به محصول کند (در رابطه با آنزیم AST سوپسترا ال - آسپارتیک اسید و در مورد آنزیم ALT، ال آلانین می‌باشد).

اندازه‌گیری پروتئین‌ها بر اساس روش لوری انجام گرفت و از آلبومین سرم گاو به عنوان استاندارد استفاده شد (۲۱).

الکتروفورز: الکتروفورز با روش SDS-PAGE روی نمونه‌های گوشت و فرآورده‌های گوشتی انجام گردید. فرآورده‌های گوشتی که توسط الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفتند شامل دو نوع بافر مول جدول بود و هر دو در پوشش با قطر یکسان حرارت دیدند. الکتروفورز بر اساس سیستم Laemmli (۱۹۷۰) که توسط Lee و همکاران در سال ۱۹۷۴ کامل شده بود روی ژل آکریل آمید با شیب ژل ۲۰-۱۰ درصد (W/V) انجام شد. نمونه‌ها با ۱۰ میلی لیتر بافر نمونه SDS-PAGE رقیق گردید تا به غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی لیتر پروتئین، ۰/۰۱ مول در لیتر تریس - اسیدکلریدریک با pH=۶/۸ و غلظت SDS ۰/۴ درصد، گلیسرول ۱۰ درصد و برموفنول بلو ۰/۰۰۴ درصد برسد. ژل رویی (stacking gel) شامل آکریل آمید ۳ درصد در ۰/۲۵ مول در لیتر تریس - اسیدکلریدریک با pH=۶/۸ و SDS ۰/۲ درصد بود. نمونه‌ها قبل از افزودن به ژل الکتروفورز به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار داده شدند.



جدول ۲- تغییرات فعالیت آنزیم‌ها (واحد در گرم گوشت)، (میانگین \pm انحراف معیار) در درجه حرارت‌های مختلف در نمونه‌های گوشت.*

۶۰ درجه سانتیگراد				۵۵ درجه سانتیگراد				۴۵ درجه سانتیگراد				فعالیت آنزیم (u/g meat)	حرارت ندیده
زمان (دقیقه)				زمان (دقیقه)				زمان (دقیقه)					
۶۰	۵۵	۴۵	۳۰	۶۰	۵۵	۴۵	۳۰	۶۰	۵۵	۴۵	۳۰		
* ۴۵۰±۵	* ۴۶۹±۴	* ۴۷۲±۱۰	* ۴۷۵±۱۸	* ۵۰۳±۱۰	* ۵۴۵±۵	* ۵۷۵±۲۵	* ۶۰۶±۵	* ۶۴۴±۱۲	* ۶۸۶±۱۰	* ۷۱۰±۱۳	* ۷۰۰±۲۰	۶۸۲±۲۸	LDH
۶۵±۳	۶۸±۷	۷۰±۰	* ۷۵±۰	* ۷۷±۳	* ۸۰±۵	* ۸۰±۵	* ۸۵±۳	* ۸۵±۵	* ۸۰±۸	* ۷۵±۱	* ۷۰±۵	۶۵±۲	AST
۶/۵±۰/۸۵	۶/۵±۰/۸۵	۶/۸±۰/۵	* ۷/۲۵±۰/۲۵	* ۷/۶±۰/۶	* ۷/۸±۰/۲۵	* ۸±۰/۵۰	* ۸/۵±۰/۵	* ۸/۶±۰/۵	* ۹±۰/۵۰	* ۸±۰/۵۰	* ۷/۵±۰/۵	۶/۵±۰/۲۵	ALT
* ۴±۰/۲۵	* ۵/۵±۰/۲۰	* ۵±۰/۲۰	* ۶±۰/۳۵	* ۸±۰/۵	* ۹±۰	* ۱۰±۰/۵	* ۱۲±۰/۵	* ۱۵±۰/۵	* ۱۶/۵±۰/۵	* ۱۸±۰/۵	* ۲۰±۲	۲۵±۲	(mg/ml) Protein

۷۵ درجه سانتیگراد				۷۰ درجه سانتیگراد				۶۵ درجه سانتیگراد				فعالیت آنزیم (u/g meat)
زمان (دقیقه)				زمان (دقیقه)				زمان (دقیقه)				
۶۰	۵۵	۴۵	۳۰	۶۰	۵۵	۴۵	۳۰	۶۰	۵۵	۴۵	۳۰	
* صفر	* صفر	* صفر	* ۶±۱	* ۸±۱	* ۱۲±۱	* ۱۵±۲	* ۱۸±۲	* ۲۰±۲	* ۲۵±۱۰	* ۹±۴۲۰	* ۲۲۴±۱۲	LDH
* صفر	* صفر	* ۵±۱	* ۱۰±۱	* ۱۰±۲	* ۱۵±۳	* ۱۵±۵	* ۵۰±۴	* ۵۵±۵	* ۵۵±۳	* ۵۸±۵	* ۶۰±۵	AST
* صفر	* صفر	* صفر	* ۱±۰	* ۱±۰	* ۲±۰/۲	* ۲±۰	* ۵±۰	* ۵/۵±۰	* ۵/۵±۰/۵	* ۶±۰/۵	* ۶±۰/۵	ALT
* ۲۰/±۰	* ۰/۲±۰	* ۰/۳±۰	* ۰/۴±۰/۰۲	* ۰/۶±۰/۰۲	* ۰/۸±۰/۱	* ۱±۰/۱	* ۲±۰/۲۵	* ۲±۰/۴	* ۲/۵±۰/۲	* ۳±۰/۱	* ۳۲±۰/۲۵	Protein (mg/ml)

*- در هر ردیف علامت * نشانگر تفاوت معنی دار با شاهد (نمونه خام) می باشد (p<۰/۰۵).

بحث

حرارت یکی از روشهای مطمئن در جلوگیری از انتقال بیماریهای قابل انتقال توسط غذا به انسان به شمار می رود. به همین دلیل برای تحقق این امر در مواد غذایی روشهای مختلفی برای کنترل درجه حرارت‌های مناسب به کار می روند (۳).

روشهای آنزیمی بدلیل ویژگی و حساسیت بالا از اهمیت خاصی در این زمینه برخوردار هستند. آنزیمهای متعددی برای بررسی میزان حرارت داده شده به فرآورده‌های گوشتی مورد توجه قرار گرفته اند. آنزیم LDH به دلیل خصوصیات مانند فراوانی در عضلات، ویژگی و حساسیت بالا به تغییرات حرارتی می تواند بعنوان یک شاخص برای بررسی میزان حرارت داده شده به کار رود (۳). مقدار فعالیت آنزیم LDH در گوشت گاو و خوک به ترتیب ۱۰۰۰ و ۶۵۰ واحد در گرم عضلات گزارش شده است (۲۶). در تحقیق حاضر میزان فعالیت LDH در گوشت حرارت ندیده ۶۸۰ واحد در هر گرم نمونه بوده است،

در رابطه با تغییرات میزان پروتئین‌های محلول در عصاره نمونه‌ها، با افزایش دما کاهش معنی داری در مقایسه با نمونه شاهد داشتند (p<۰/۰۵)، (جدول شماره ۲، ۳). در نمونه‌های گوشت حرارت ندیده این میزان ۲۵ میلی‌گرم در میلی لیتر عصاره نمونه بود که با بالا رفتن دما و افزایش مدت زمان از مقدار آن کاسته گردید.

نتایج الکترو فورز پروتئین‌های گوشت و فرآورده‌های گوشتی در تصاویر ۱، ۲ نشان داده شده است. در دماهای پایین باندهای مختلف که مشخص کننده پروتئین‌های سارکوپلاسمی و میوفیبریلی هستند دیده می شود. در دماهای بالاتر میزان حرارت و مدت زمان بر الگوی پروتئینی اثر گذاشته و منجر به محو شدن تعداد زیادی از باندهای پروتئینی گردید. این تغییرات به ویژه در فرآورده‌های گوشتی در دماهای بالای ۴۵ درجه سانتیگراد مشهود است. در درجه حرارت‌های ۵۵ یا بیشتر هیچ گونه باندهای مشاهده نگردید.



در تحقیق دیگری که توسط Samuel و همکاران در سال ۱۹۹۶ بر روی فعالیت آنزیم AST صورت گرفته است، این آنزیم تا ۷۹/۴ درجه سانتیگراد فعالیت خود را از دست نمی دهد. به طور کلی در مقایسه دو آنزیم AST و ALT در عضلات به دلیل وجود میزان بالای آنزیم AST نسبت به آنزیم ALT، قابلیت استفاده بیشتری را در تعیین مقدار حرارت دیده شده دارد. این امر به خصوص در فرآورده های گوشتی که دارای میزان مشخصی از گوشت می باشد (در فرآورده های، میزان گوشت تا ۴۰ درصد کاهش می یابد)، از اهمیت بیشتری برخوردار می گردد.

برای بررسی تغییرات پروتئین های سارکوپلاسمی و میوفیبریلی در سطح مولکولی، استفاده از روش الکترو فورز مناسب می باشد (۷). در درجه حرارت ۴۵ درجه سانتیگراد حداقل ۶ باند مشخص دیده می شود و با بالا رفتن دما از تعداد و شدت (intensity) آنها کاسته می شود به طوری که در ۵۵ درجه سانتیگراد ۴ باند و در ۶۵ درجه سانتیگراد ۲ باند مشخص دیده می شود. این نتایج با یافته هایی که توسط Lee و همکاران در سال ۱۹۷۴ به دست آمده است همخوانی دارد. در تحقیقی که توسط Hsieh و همکاران در سال ۲۰۰۲ بر روی تغییرات الگوی الکترو فورتیکی گوشت گاو و خوک به هنگام حرارت دادن آنها انجام گرفته است، پروتئین های با وزن مولکولی کم (در حدود ۱۲ کیلو دالتون) از باندهای دیگر مقاوم ترند. در تحقیق حاضر نیز پروتئین های با وزن مولکولی کمتر مقاومت بیشتری از خود نشان دادند. البته بیشتر تغییرات در دماهای بالاتر قابل مشاهده است. این تغییرات را Leveux و همکاران در سال ۱۹۹۵ در حرارت های بین ۶۰ تا ۷۰ درجه سانتیگراد مشاهده کردند.

در مجموع، مقایسه سه آنزیم بررسی شده نشان می دهد که LDH و AST به دلیل اینکه از میزان فعالیت بالایی برخوردار بوده و همخوانی بیشتری با حداقل میزان فرآیند حرارتی در دماهای غیر فعال شدن دارند، از قابلیت بیشتری برای انتخاب یک شاخص مناسب برخوردار هستند.

برای استفاده بهتر و دقیق تر از این آنزیمها، بررسی فاکتورهای داخلی مثل pH، قدرت یونی و عوامل خارجی مثل اثر افزودنیهای مختلف به فرآورده های گوشتی و شرایط نگهداری محصول بعد از تولید بر فعالیت آنزیمها، پیشنهاد می شود. بررسی این عوامل جهت استفاده عمومی از این آنزیمها در آزمایشگاه های کنترل کیفیت مواد غذایی می تواند راهگشا باشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق بخشی از طرح پژوهشی به شماره ۱۳۶۲-۷۹EV-۱۱۸ C مصوب شورای پژوهشی دانشگاه شیراز می باشد.

References

۱. استاندارد ملی ایران (۱۳۷۹): سوسیس و کالباس-ویژگیها و روشهای آزمون. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، شماره ۲۳۰۳.
۲. رکنی، نوردهر. (۱۳۷۷): علوم و صنایع گوشت، چاپ دوم، انتشارات دانشگاه تهران.

این تفاوت ها را می توان به تأثیر عواملی مثل نوع عضله، جنس و سن حیوان نسبت داد (۳۶). وجود مقادیر متفاوت آنزیم در عضلات مختلف در اثر عوامل فوق می تواند به عنوان یکی از معایب اندازه گیری آنزیم لاکتات دهیدروژناز به عنوان روشی مطمئن در اندازه گیری میزان حرارت داده شده به فرآورده های گوشتی بیان شود، ولی به دلیل کاهش فعالیت این آنزیم که به شدت در یک محدوده خاص دمایی رخ می دهد اندازه گیری این آنزیم را در محدوده دمایی مورد نظر (۷۰ درجه سانتیگراد) با اشکال مواجه نمی سازد. به عنوان مثال فعالیت آنزیم در گوشت خام گاو از ۶۸۲ واحد در هر گرم نمونه در اثر حرارت دادن در ۶۵ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ دقیقه به ۲۰ واحد و در ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ دقیقه به ۸ واحد رسیده یعنی به ترتیب به حدود ۳ و ۲۵/۰ درصد فعالیت اولیه خود رسیده است (جدول ۲). این مقادیرها در نمونه محصول گوشتی از ۴۷۰ واحد به ۴۰ و به ۱۱ واحد در درجه حرارت و زمانهای فوق رسید که به ترتیب به ۸/۵ و ۲/۳ درصد فعالیت اولیه خود رسیده است (جدول ۳). کمتر بودن فعالیت آنزیم در نمونه فرآورده گوشتی بدلیل وجود کمتر گوشت در این محصول است. در هر دو مورد (گوشت و فرآورده گوشتی) کاهش سریع فعالیت در کمتر از نیم ساعت در محدوده حرارتی ۷۰ درجه سانتیگراد دیده می شود.

علت کاهش شدید فعالیت این آنزیم در حرارت های حدود ۷۰ درجه سانتیگراد تغییر ماهیت ساختمان آنزیم و از بین رفتن ساختمانهای دوم، سوم و چهارم آن است، از طرف دیگر با بالا رفتن دما و زمان از میزان پروتئین در عصاره های استخراج شده کاسته گردید و از ۲۵ میلیگرم در هر میلی لیتر در نمونه حرارت ندیده به ۲ میلیگرم در میلی لیتر در ۶۵ درجه سانتیگراد و زمان ۶۰ دقیقه رسید که ۴ درصد مقدار اولیه است (جدول ۳، ۲).

مطالعات مختلف انجام شده در گوشت بوقلمون (۳۵)، خوک (۱۰)، مرغ (۳) و گاو (۳۳) نشان داده است که از آنزیم LDH می توان برای تشخیص میزان گرمای داده به گوشت و فرآورده های آن استفاده کرد.

در عضلات فعالیت ALT نسبت به AST کمتر است و بطور نسبی این مقدار یک به ده است (۲۹). در نتایج بدست آمده در این تحقیق مقدار AST در گوشت گاو ۶۵ و ALT ۶/۵ واحد در گرم گوشت بود. مقدار AST در نمونه گوشت حرارت دیده در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه به ۸۵ واحد رسید که به صورت معنی داری افزایش پیدا کرد ($p < 0.05$). با افزایش بیشتر دما فعالیت آنزیم کاهش یافت (جدول ۲). آنزیمهای ALT و AST در مقابل حرارت بیشترین مقاومت را نسبت به دیگر آنزیم های مورد مطالعه داشته اند. در بررسی که Townsend و Davis در سال ۱۹۹۲ انجام دادند نشان دادند که انجماد و نگهداری محصول در بعد از تولید تا مصرف، تأثیر زیادی روی فعالیت آنزیم AST ندارد (۲۹)، و طبق تحقیقی که Searcy و همکاران در سال ۱۹۹۵ انجام دادند، بعد از انجماد و رفع انجماد بر مقدار فعالیت آنزیم AST افزوده گردید. این محققین ادعا کرده اند که یکی از دلایل این امر می تواند رها شدن ایزو آنزیم های میتوکندری در اثر آسیب این اندامکها در داخل بافت عضله در اثر انجماد و رفع انجماد باشد (۲۳).



3. Abouzied, M.M., Wang, C.H., Smith, D.M. (1993) Lactate dehydrogenase as safe end point cooking indicator in poultry breast rolls: development of monoclonal antibody and application to sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J Food Protec.* 56: 120-124
4. Ang, C.Y. W., Liu, F., Townsend, W. E., Fung, D.Y.C. (1994) Sensitive catalase test for end-point temperature of heated chicken meat. *J Food Sci.* 59: 994-997
5. Bergmeyer .H.U. (1971) *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, Inc. New York .PP.574-582 , 735-739
6. Bogin, E., Israeli, B.A. Klinger, I. (1992) Evaluation of heat treatment of turkey breast by biochemical methods. *J Food Protec.* 55:787-791
7. Cheng, C.S., Parrish, F.C. (1979) Heat induced changes in myofibrillar proteins of bovine longissimus muscle. *J Food Sci.* 44: 22-24
8. Claeys, L.U., Buts, B., Demeyer, D. (1995) Quantification of beef myofibrillar proteins by SDS-PAGE. *Meat Sci.* 39: 177-193
9. Choen, E. H. (1969) Determination of acid phosphatase activity in canned hams as an indicator of temperatures attained during cooking. *Food Technol.* 23: 101-104
10. Collins, S.S., Keeton, J.K., Smith, S.B. (1991) Lactate dehydrogenase enzyme activity in raw, cured and heated porcine muscle. *J Agri Food Chem.* 39: 1294-1297
11. Davis, C.E., Anderson, J.B. (1983) Effect of heat on biuret-positive water soluble porcine muscle proteins. *J Food Protec.* 46:947-949
12. Edwards, D.S., Johnston, A.M., Mead, G.C. (1997) Meat inspection: an overview of present practices and future trends. *Vet Rec.* 154: 135-147
13. Favetto, G.J., Chirefe, J., Scorza, O., Hermida, C. (1988) Color changing indicator to monitor the time temperature history during cooking of meats. *J Food Protec.* 51: 542-546
14. Fritz, J.D., Greaser, M. (1991) Changes in titin and nebulin in postmortem bovine muscle revealed by gel electrophoresis, western blotting and immunofluorescence microscopy. *J Food Sci.* 56: 607-610, 615
15. Hsieh, Y.H.P., Zahng, S., Sheu, S.C. (2002) Monoclonal antibody-based ELISA for assessment of endpoint heating temperature of ground pork and beef. *J Food Sci.* 67:1149-1154
16. Hsu, Y.C., Sair, A.I., Booren, A.M., Smith, D.M. (2000) Triose phosphate isomerase as an indigenous time-temperature integrator to verify adequacy of roast beef processing. *J Food Sci.* 65:236-240
17. Incze, K., Kormendy, L., Kormendy, I., Zsarnoczay, G. (1999) Consideration of critical microorganisms and indicator enzymes in connection with the pasteurization of meat products. *Meat Sci.* 51:115-121
18. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 15:680-685
19. LeVieux, D., LeVieux, A., Venien, A. (1995) Immunochemical quantification of heat denaturation of bovine meat soluble proteins. *J Food Sci.* 60:678-684
20. Lee, Y.B., Rickansrud, E.C., Hagber, E.C., Briskey, E.J. (1974) Application of SDS-acrylamide gel electrophoresis for determination of the maximum temperature to which bovine muscles have been cooked. *J Food Sci.* 39: 428-429
21. Lowry, O.H., Rosebrogh, N.J., Farr, A.L., Randall, J.R. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193: 256-275
22. Samuel, D.S., Searcy, G.K., Young, L.L. (1996) Glutamic-oxaloacetic transaminase activity in commercially processed chicken: An indicator of product end-point temperature. *J Food Protec.* 59: 1230-1232
23. Searcy, G.K., Senter, S.D., Wilson, R.L. (1995) Glutamic-oxaloacetic transaminase activity: A potential endpoint- temperature indicator for imported cooked beef. *J Food Protec.* 58: 686-688
24. Sharen, S.C., Keeton, J., Smith, S.B. (1991) Lactate dehydrogenase activity in bovine muscle as a potential heating endpoint indicator. *J Agri Food Chem.* 39: 1291-1293
25. Smith, D.M. (1993) Immunoassays in process control and speciation of meats. *Food Technol.* 5: 116-119



26. Stalder, J.W., Smith, G.L., Keeton, J. T. ,Smith, S.B. (1991) Lactate dehydrogenase activity in bovine muscle as a means of determining heating endpoint. *J Food Sci.* 56: 895-899
27. Tajima, T.I., Arakawa, F.C., Parrish, J.R. (2001) Heat induced changes of myosin and sarcoplasmic proteins in beef during simmering. *J Food Sci.* 66: 233-237
28. Thyholt, K., Enersen, G. (1998) Determination of endpoint temperatures in previously heat treated beef using reflectance spectroscopy. *Meat Sci.* 48: 49-63
29. Townsend, W.E., Davis, C.E. (1992) Transaminase (AST/GOT and ALT/GPT) activity in ground beef as determining end-point temperatures. *J Food Sci.* 57: 555-557
30. Townsend, W.E., Searcy, G.K., Davis, C.E., Wilson, J. (1993) Endpoint temperature (EPT) affects N-Acetyl-Beta-D-Glucosaminidase activity in beef, pork and turkey. *J Food Sci.* 58: 710-712
31. Townsend, W.E., Blankenship, L.C. (1989) Methods for detecting processing temperatures of previously cooked meat and poultry products-A review. *J Food Protec.* 52:128-135
32. Townsend, W.E., Davis, C.E., Wilson, R.L. (1990) Evaluation of a sound velocity analyzer for estimating maximum internal temperature to which meat products have been heat processed., *J Food Protec.* 53:680-684
33. Townsend, W.E., Thomson, J.E., Hutchins, J. (1984) Coagulation test for cooked meat temperature: Effect of variations in filtration., *J Food Sci.* 49: 853-858
34. Trout, G., Schemid, G.R., Schmidt, G.R. (1987) :The effect of cooking temperature on the functional properties of beef proteins: the role of ionic strength, pH and pyrophosphate. *Meat Sci.* 20: 129-147
35. Wang, C.H., Booren, A.M., Abouzied, M.M. (1993) ELISA determination of turkey roll endpoint temperature: Effects of formulation, storage and processing., *J Food Sci.* 58: 1258-1261
36. Wang, C.H., Abouzied, M.M., Pestka, J. J., Smith, D.M. (1995) Lactate dehydrogenase polyclonal antibody sandwich ELISA for determination of endpoint heating temperatures of ground beef. *J Food Protec.* 59: 51-55
37. Wang, S. F., Abouzied, M.M., Smith, D.D. (1996) Proteins as potential endpoint temperature indicator for ground beef patties. *J Food Sci.* 61: 5-7
38. Wang, C.H., Pestaka, J. J., Booren, A.M., Smith, D.M. (1994) Lactate dehydrogenase, serum protein, and immunoglobulin G content of uncured turkey thigh rolls as influenced by endpoint cooking temperature. *J Agri Food Chem.* 42: 1829-1833.

