مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال دوازدهم، شماره 2، تابستان 1396، صفحات 54-45

ارزیابی اثر آنزیم ترانس‌گلوتامیناز میکروبی و سدیم‌کازئینات بر حلالیت پروتئین‌ها و برهم کنش پروتئین‌ها در سویا برگر

زهرا فرقانی[1]، محمود امین‌لاری[2]، محمد هادی اسکندری[3]، سید شهرام شکرفروش[4]

1- دانش‌آموخته‌ی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، بخش علوم و صنایع غذایی، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه شیراز، ایران
2- استاد بخش بیوشیمی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، ایران
3- نویسنده مسئول: دانشیار بخش علوم صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، ایران. پست الکترونیکی: Eskandar@shirazu.ac.ir
4- استاد بخش بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، ایران

تاریخ دریافت: 95/2/8 تاریخ پذیرش: 95/6/4

چکیده

سابقه و هدف: اثرات سلامت‌بخش جایگزینی پروتئین گوشت با پروتئین‌های گیاهی در تولید محصولاتی چون برگرها اثبات شده است. اما فقدان برهم‌کنش مناسب بین پروتئین‌های گیاهی خواص فیزیکی محصول را تضعیف می‌سازد. آنزیم ترانس‌گلوتامیناز میکروبی با ایجاد پیوندهای کووالانسی متقاطع سبب بهبود ویژگی‌های بافتی محصولات پروتئینی می‌شود و کازئین یکی از بهترین سوبستراها برای این آنزیم است. هدف از این مطالعه بررسی اثر غلظت‌های مختلف آنزیم و سدیم‌کازئینات بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی سویابرگر است.

مواد و روش‌ها: آنزیم ترانس‌گلوتامیناز میکروبی (در چهار سطح صفر، 0/25، 0/5 و 0/75درصد) و سدیم‌کازئینات (در سه سطح صفر، 1 و 2 درصد) به فرمولاسیون سویا برگر افزوده شد. حلالیت پروتئین‌ها و ظرفیت نگهداری آب اندازه‌گیری و برای بررسی برهم‌کنش پروتئین-پروتئین از آنالیز الکتروفورز یک‌بعدی استفاده شد.

یافته‌ها: آنزیم ترانس‌گلوتامیناز میکروبی و سدیم‌کازئینات در کنار هم باعث افزایش ظرفیت نگهداری آب و کاهش حلالیت پروتئین شدند ($P<0/05$). سدیم‌کازئینات در هر دو سطح و آنزیم در غلظت زیر 0/75 به تنهایی اثر معنی‌داری بر ظرفیت نگهداری رطوبت نداشتند. افزودن آنزیم به‌تنهایی یا همراه با سدیم‌کازئینات موجب کاهش معنی‌دار حلالیت پروتئین شد ($P<0/05$). نتایج آنالیز الکتروفورز نشان داد خمیر برگر نتوانسته باند مشخصی را روی صفحه الکتروفورز تشکیل دهد. درنتیجه برای بررسی دقیق‌تر اثر آنزیم، ترکیب سویا و آنزیم به ژل الکتروفورز افزوده شد. نتایج نشان داد، آنزیم ترانس‌گلوتامیناز میکروبی باعث تغییر دانسیته‌ی باندهای سویا و حذف پروتئین بازی زیر واحد B3 شد.

نتیجه گیری: آنزیم ترانس‌گلوتامیناز میکروبی در ترکیب با سدیم‌کازئینات باعث بهبود ظرفیت نگهداری آب، کاهش حلالیت پروتئین و برهم‌کنش پروتئین‌ها شد و در نتیجه خواص فیزیکی برگرهای گیاهی را بهبود داد.

واژگان کلیدی: برهم کنش پروتئین، آنزیم، ظرفیت نگهداری آب، حلالیت پروتئین، الگوی الکتروفورز

• مقدمه

افزایش روزافزون آگاهی مردم نسبت به ارزش تغذیه‌ای خوراکی‌ها، موجب افزایش فشار از سوی مصرف‌کننده برای تولید محصولات سالم‌تر شده است. هم‌چنین اهمیت غذاهای گیاهی در سلامت،گرایش افراد به سمت گیاه‌خواری را افزایش داده است (1). از سویی تغییر شیوه‌ی زندگی در کشورهای صنعتی و کمبود وقت و زمان‌بر بودن طبخ غذاهای سنتی، تقاضا برای مصرف خوراکی‌های آماده طبخ و غذاهای فوری (fast food) را بالا برده است.

برگرها، غذاهای آماده‌ی مصرف و محبوبی در بین مصرف-کنندگان هستند که معمولاً از گوشت قرمز تهیه می‌شوند. مطالعات نشان داده است گوشت قرمز خطر ابتلا به سرطان (3، 2)، دیابت (5، 4) و بیماری‌های قلبی- عروقی (2) را افزایش می‌دهد. به همین دلیل تولید برگر با منابع گیاهی می‌تواند غذاهای سالم‌تری را ارائه کند. برای مثال، پروتئین-های سویا شامل طیف وسیعی از اسیدآمینه‌های ضروری هستند که می‌توانند توازن مناسبی در ترکیب اسیدآمینه‌های فراهم نماید، هم چنین پروتئین سویا، از لحاظ فیزیولوژی

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

دارای ترکیبات سودمندی است که می‌تواند کلسترول را پایین آورده و خطر افزایش چربی خون و بیماری قلبی-عروقی را کاهش دهد (6). با این حال خواص فیزیکی و بافتی ضعیف برگرهای گیاهی، تمایل مصرف‌کننده به آن را کاهش داده است. حلالیت پروتئین یک عامل مهم در کیفیت غذاهای پروتئینی است (7).

آنزیم ترانس‌گلوتامیناز میکروبی آنزیمی خارج سلولی از دسته‌ی ترانسفرازهاست، که به صورت تجاری از طریق تخمیر سنتی توسط میکروارگانیسم Streptoverticillium moboarense تولید می‌شود (8). این آنزیم با ایجاد باندهای کووالانسی بین اسیدآمینه‌های گلوتامین و لیزین حلالیت پروتئین‌های ماده‌ی غذایی را تحت تأثیر قرار می‌دهد و به محصول استحکام می‌بخشد (10، 9). برگرهای گیاهی عموماً متشکل از پروتئین‌های سویا، سدیم‌کازئینات و گلوتن به عنوان اجزای اصلی پروتئینی هستند و فقدان برهم‌کنش بین این پروتئین‌ها به عنوان عامل مهمی در کاهش پایداری فیزیکی این فرآورده‌ها شناخته می‌شود (11). استفاده از ترکیبات پیوند دهنده‌ی عرضی (Cross-linking) همچون آنزیم ترانس‌گلوتامیناز میکروبی با افزایش پلی‌مریزاسیون، پیوند بین پروتئین‌ها و متعاقباً خواص عمل‌گرایی محصولات پروتئینی را افزایش می‌دهد (12). برای مثال نتایج پژوهشی که اخیراً Seighalani و همکاران (2016) با هدف بررسی تأثیر آنزیم ترانس‌گلوتامیناز بر ویژگی‌های حرارتی و فیزیکوشیمیایی ژل سورمی ماهی تیلاپیا انجام دادند، نشان داد که این آنزیم به طور معنی‌داری بافت محصول و ظرفیت نگهداری آب ژل را به طور معنی‌داری بهبود می‌بخشد (13). در مطالعات پیشین اثر این آنزیم در بهبود ساختار محصولات گوشتی بازساخته، ثابت شده است (16-14، 11، 9). اما عملکرد این آنزیم در محصولات گیاهی کم‌تر مورد مطالعه بوده است. فرضیه اصلی در این مطالعه آن است که آنزیم ترانس‌گلوتامیناز میکروبی با تقویت پلی‌مریزاسیون پروتئین‌ها در فرمولاسیون، بهبود ویژگی‌های بافتی و فیزیکی برگر سویا را موجب می‌شود. لذا هدف از این مطالعه، ارزیابی اثر آنزیم ترانس‌گلوتامیناز میکروبی به عنوان کاتالیزور برهم‌کنش اجزای پروتئینی برگر گیاهی بر ظرفیت نگهداری رطوبت، حلالیت پروتئین‌ها و برهم‌کنش پروتئین-پروتئین می‌باشد.

• مواد و روش‌ها

مواد: ترکیبات مورد استفاده در فرمولاسیون برگر گیاهی شامل پروتئین سویای بافت‌دار (سونیک، هند)، ادویه مخصوص محصولات گوشتی (میت‌کرکز، آلمان)، صمغ کاراگینان و زانتان (شرکت بی ال جی، چین)، سدیم‌کازئینات (شرکت پگاه فارس، ایران)، گلوتن، روغن سویای هیدروژنه، سویای معمولی و دیگر افزودنی‌ها شامل پودر پیاز و زرد چوبه از بازار محلی تهیه شدند. همچنین ، آنزیم ترانس‌گلوتامیناز میکروبی از شرکت آنجینوموتو (Ajinomoto)، ژاپن تهیه شد که شامل 1% آنزیم ترانس‌گلوتامیناز و 99% مالتو-دکسترین، با فعالیت آنزیمی حدود 96 واحد در گرم بود. تریس، سوبسترای گلوتامین، لیزین، آکریل‌آمید، کلرواستیک اسید، معرف اسید تری‌کلرواستیک، هیدروکسیل-آمین و گلیسرول از شرکت مرک آلمان، 2-بتا مرکاپتواتانول و کوماسی‌بریلیانت آبی G250 از شرکت سیگما-آلدریچ آمریکا، تریتون x-100 از کمپانی دوو آمریکا و متانول از شرکت هاپ‌کین و ویلیامز انگلیس تهیه شد.

تهیه‌ی برگر گیاهی: به منظور تهیه‌ی برگر گیاهی، ابتدا 9 واحد سویای بافت‌دار و 5/5 واحد سویای معمولی به ترتیب در 12 و 9 واحد آب به مدت 10 دقیقه خیسانده شدند. روغن هیدروژنه (13%) با سویای خیس شده (40%) و پیاز (20%) ترکیب و توسط چرخ گوشت (مدل GMT-05 B2 شرکت پارس خزر، تهران، ایران) با پنجره 5 میلی‌متری چرخ شد. مواد پودری شامل آرد سوخاری، آرد گندم، گلوتن و نشاسته (14%)، نمک (1/5%)، بیکینگ پودر (1/35%)، ادویه (2%) صمغ زانتان و کاراگینان (هر کدام 0/7%) به سویای چرخ شده اضافه و برای 10 دقیقه ورز داده شد. در خاتمه برای حصول خمیر یکنواخت به ترکیب آب اضافه شد (با افزودن آب وزن خمیر به 100 واحد رسید).

خمیر نهایی به 12 قسمت مساوی تقسیم و برای تهیه‌ی 12 نوع فرمولاسیون‌های برگر به کار برده شد. محلول اولیه آنزیم مطابق دستورالعمل شرکت آنجینوموتو تهیه شد (آنزیم در 20 mM NaCl حل شد، و pH بافر 6 بود). محلول آنزیم ترانس‌گلوتامیناز (در چهار غلظت صفر، 0/25، 0/5 و 0/75 درصد) و سدیم‌کازئینات (در سه غلظت نهایی صفر، 1 و 2 درصد) مطابق طرح پیش‌بینی شده در جدول 1 به خمیر اضافه شده و برای 3 دقیقه با دست ورز داده شد. با استفاده از ماشین برگرساز از هر تیمار برگرهای 100 گرمی تهیه شد. به منظور انجام فعالیت آنزیم برگرها برای 1 ساعت در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس برگرها در کیسه‌های پلی اتیلن/ پلی‌آمید به ضخامت 75 میکرون بسته‌بندی و برای تکمیل فعالیت آنزیم، 24 ساعت در یخچال نگهداری شدند. کلیه‌ی آزمون‌ها در سه تکرار انجام شد.

ظرفیت نگهداری آب: ظرفیت نگهداری آب با استفاده از روش فشاری تعیین شد (17). صافی واتمن شماره 2 در محلول فوق اشباع کلرید-پتاسیم خیس خورد، سپس توسط خشک‌کن تحت خلأ خشک شد. مقدار 0/3 گرم نمونه‌ی خمیر بین دو کاغذ صافی قرار گرفت و کاغذها نیز بین دو صفحه

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

شیشه‌ای گذاشته شدند. سپس یک وزنه یک کیلوگرمی به مدت 20 دقیقه روی صفحه‌ی بالایی گذاشته شد. با استفاده از فرمول زیر ظرفیت نگه‌داری آب خمیر محاسبه شد:

$$WHC = [1- (B-A)/A] \times 100$$

B: مساحت آب تراوش‌یافته در اطراف نمونه (cm^2) و A: مساحت برگر پرس شده (cm^2).

حلالیت پروتئین: شاخص حلالیت پروتئین بر پایه‌ی روش AACC- 46-24 با اندکی تغییر و مطابق آنچه Aminlari و Majzoobi (2002) بیان کردند سنجش شد (18). در این روش 10 گرم نمونه با 50 میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد. مخلوط حاصل در 1000 rpm در 4 °C برای 10 دقیقه سانتریفوژ (مدل Friolabo- SW14R، فرانسه) شد. سپس، غلظت پروتئین در محلول رویی با استفاده از روش برادفورد (BioRad, Hercules, CA) و توسط اسپکتروفوتومتر مدل MSE انگلستان در طول موج 595 نانومتر اندازه‌گیری شد.

آزمون الکتروفورز : این آزمون به وسیله SDS-PAGE یک بعدی و بر اساس روش Lomeli، با اندکی تغییر مطابق اصلاح Aminlariو Majzoobi انجام شد (18). آزمون الکتروفورز برای خمیر برگر و پروتئین سویای تیمار شده با آنزیم ترانس‌گلوتامیناز میکروبی انجام گرفت. ژل‌های الکتروفورز با استفاده از نرم‌افزار ImageJ (نسخه 1/46 r، آمریکا) مورد بررسی قرار گرفتند.

آنالیز آماری: تحلیل داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و توسط نرم‌افزار SAS 9.2 (شرکت SAS، آمریکا) انجام شد. مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون دانکن و در سطح اطمینان 95% صورت پذیرفت.

•یافته‌ها

ظرفیت نگهداری آب: نتایج اثر تیمارهای مختلف بر ظرفیت نگهداری آب در جدول 1 آمده است. ظرفیت نگهداری آب در برگرها بین 10 تا 19% متغیر بود. کم‌ترین مقدار در نمونه‌ی بدون آنزیم و کازئین (نمونه‌ی کنترل) و بیش‌ترین آن در نمونه‌ی حاوی 2% کازئین و 0/75 % آنزیم ثبت شد. زمانی که از سدیم‌کازئینات در فرمول استفاده نشد تنها غلظت 0/75% آنزیم توانست باعث افزایش معنی‌دار میزان نگهداری رطوبت شود. با این حال لازم به ذکر است که این افزایش ظرفیت نگهداری چندان بالا نبود. سدیم‌کازئینات به تنهایی نتوانست اثر معنی‌داری بر افزایش نگهداری رطوبت داشته باشد. با این حال آنزیم و کازئین در کنار هم اثر هم‌افزایی داشتند، به طوری که کاربرد 1% سدیم‌کازئینات در کنار غلظت‌های 0/5 و 0/75 % آنزیم باعث افزایش معنی‌دار ظرفیت نگهداری محصول شد.

حلالیت پروتئین: نتایج اثر تیمارهای کازئین و آنزیم ترانس گلوتامیناز بر حلالیت پروتئین در جدول 1 گردآوری شده است. افزودن آنزیم به تنهایی یا در ترکیب با سدیم‌کازئینات موجب کاهش معنی‌دار حلالیت پروتئین شد ($P<0/05$). به طور کلی، با افزایش آنزیم، صرف‌نظر از حضور سدیم‌کازئینات، حلالیت پروتئین کاهش یافت. کم‌ترین میزان حلالیت پروتئین در نمونه‌ی حاوی 0/75% آنزیم و 2 % سدیم‌کازئینات دیده شد. زمانی که از غلظت‌های 1 و 2 % سدیم کازئینات به تنهایی استفاده شد، حلالیت پروتئین به‌طور معنی‌داری بیش از سایر نمونه‌ها بود. ترکیب کازئین و آنزیم به ویژه در غلظت 2% کازئین به‌طور معنی‌داری حلالیت پروتئین را کاهش می‌دهد.

جدول 1. اثر غلظت‌های مختلف آنزیم ترانس‌گلوتامیناز و سدیم کازئینات بر ظرفیت نگهداری آب و حلالیت پروتئین

تیمارها		ظرفیت نگهداری آب (%)	حلالیت پروتئین (*mg/ml*)
سدیم کازئینات (%)	آنزیم ترانس‌گلوتامیناز (%)		
0/00	0/00	$10 \pm 0/96^{a}$	$0/62 \pm 0/01^{a}$
0/00	0/25	$11 \pm 0/98^{a}$	$0/58 \pm 0/01^{b}$
0/00	0/50	$12 \pm 0/95^{a}$	$0/53 \pm 0/02^{c}$
0/00	0/75	$14 \pm 0/94^{b}$	$0/51 \pm 0/02^{c}$
1/00	0/00	$12 \pm 0/98^{a}$	$0/68 \pm 0/01^{d}$
1/00	0/25	$12 \pm 0/97^{a}$	$0/47 \pm 0/01^{e}$
1/00	0/50	$15 \pm 0/94^{b}$	$0/45 \pm 0/01^{e}$
1/00	0/75	$16 \pm 0/93^{b}$	$0/41 \pm 0/01^{f}$
2/00	0/00	$12 \pm 0/97^{a}$	$0/72 \pm 0/01^{g}$
2/00	0/25	$12 \pm 0/98^{b}$	$0/39 \pm 0/01^{fh}$
2/00	0/50	$17 \pm 0/99^{c}$	$0/37 \pm 0/01^{h}$
2/00	0/75	$19 \pm 1/00^{c}$	$0/32 \pm 0/01^{i}$

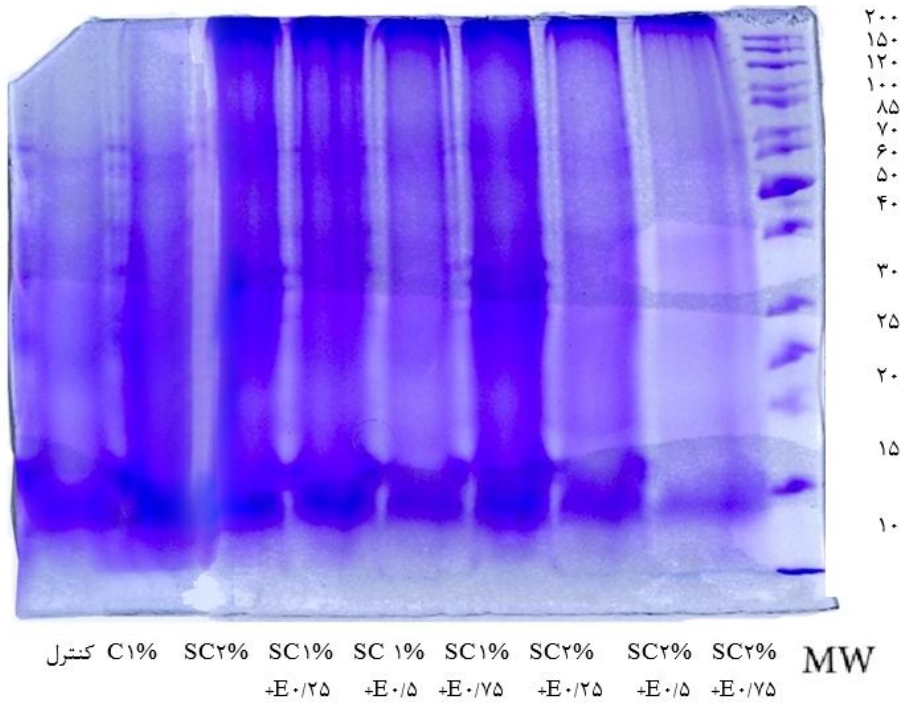
* هر عدد میانگین سه تکرار ± انحراف از استاندارد (SD) است.

* حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف آماری معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد ($p\leq 0/05$).

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

الکتروفورز خمیر برگ گیاهی: شکل 1، ژل الکتروفورز فرمولاسیون‌های مختلف خمیر برگ گیاهی را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشخص است، باندهای پروتئینی تفکیک‌شده‌ای روی ژل تشکیل نشده‌اند. پروتئین‌ها در خمیر برگ گیاهی در بستر الکتروفورز اسمیر تشکیل داده‌اند.

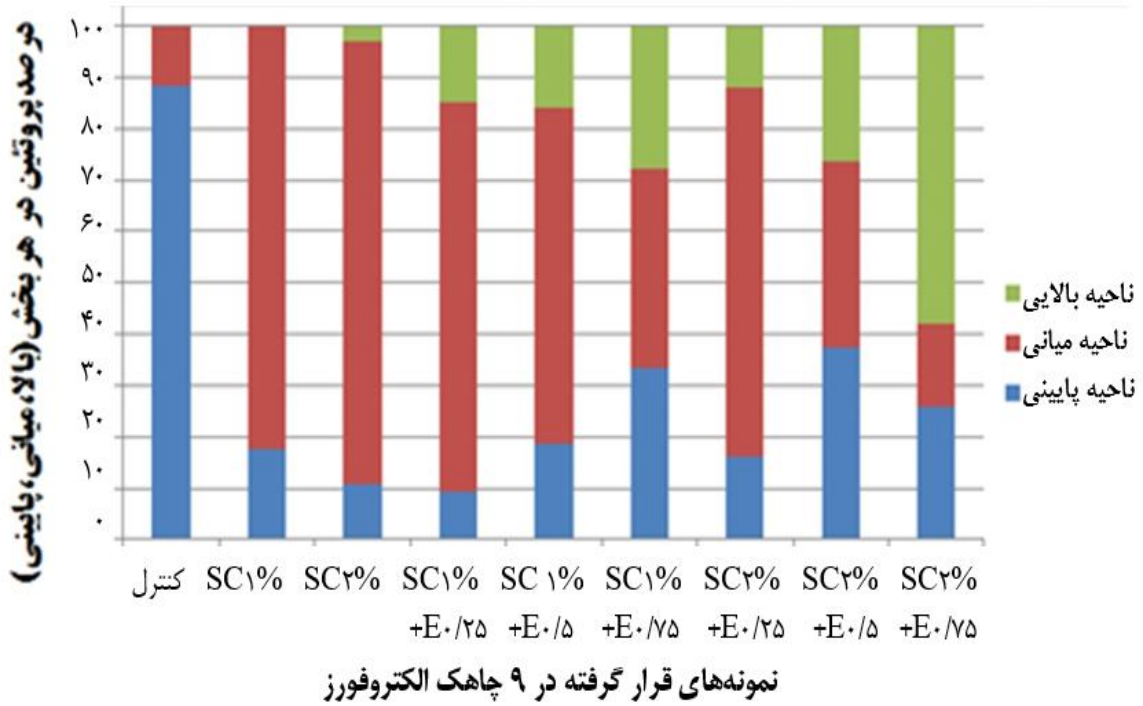
علی‌رغم تشکیل اسمیر در الکتروفورز خمیر برگر، با توجه به اطلاعات موجود در ژل می‌توان به نتایج خوبی رسید. به این منظور، ستون‌های الکتروفورزی به سه قسمت تقسیم شدند و نمودار پشته‌ای (Stack Chart) آن مطابق شکل 2 رسم شد. این سه ناحیه شامل؛ ناحیه ابتدایی ژل (قسمت سبز نمودار پشته‌ای) که حاوی توده پلیمری در خمیرهای تیمار شده با آنزیم است، ناحیه انتهایی (سوم) ژل که حاوی پروتئین‌های خرد شده است (رنگ آبی در نمودار پشته‌ای) و قسمت میانی ژل (رنگ قرمز در نمودار پشته‌ای) که نشانگر اسمیر است. همان‌طور که مشخص است نمونه‌های فاقد آنزیم در ناحیه‌ی ابتدایی ژل، پروتئینی ایجاد نکرده‌اند و نمودار پشته‌ای این تیمارها فاقد قسمت سبز رنگ است، اما در نمونه‌های تیمار شده با آنزیم با افزایش غلظت آنزیم درصد قسمت سبز رنگ در نمودار پشته‌ای افزایش می‌یابد. مقایسه ناحیه‌ی میانی در نمودار پشته‌ای نیز حاکی از این است که نمونه‌های تیمار شده با آنزیم و کازئین اسمیر کم‌تری تشکیل داده‌اند. به‌طوری که در مقدار 0/75 درصد آنزیم و 2 % کازئین از حجم ناحیه وسطی ژل کاسته و درصد آن شبیه ناحیه میانی (بخش قرمز) در ستون نمونه‌ی کنترل شده است. با افزایش میزان آنزیم کاهش رنگ بیش‌تری در ناحیه وسطی ژل مشاهده و در نتیجه از میزان درصد قسمت قرمز رنگ در نمودار پشته‌ای کاسته و همزمان به درصد رنگ سبز نمودار افزوده می‌شود. مقایسه ستون‌های حاوی 1% سدیم‌کازئینات و ستون‌های حاوی 2 % سدیم‌کازئینات نشان داد، نمونه‌ی حاوی 0/75 درصد آنزیم و 2% سدیم‌کازئینات میزان پروتئین‌های خرد شده (بخش آبی نمودار پشته‌ای) کاهش و حجم پلیمر (رنگ سبز نمودار پشته ای) افزایش یافته است.



شکل 1. الکتروفورز SDS-PAGE خمیر برگر گیاهی تیمار شده با غلظت‌های مختلف آنزیم ترانس گلوتامیناز.

SC: سدیم کازئینات (عدد درج شده در کنار SC بیانگر غلظت این ترکیب است)، E: آنزیم ترانس‌گلوتامیناز میکروبی (عدد درج شده کنار E بیانگر غلظت این ترکیب به درصد است). ستون آخر، ستون مربوط به استاندارد پروتئین است و وزن ملکولی مشخص شده به کیلودالتون است.

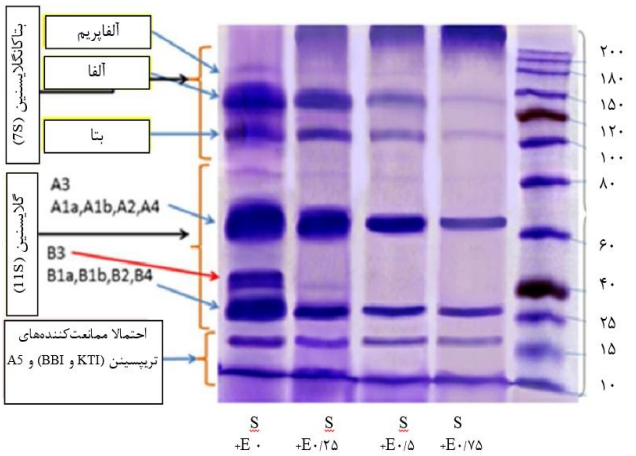
[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]



شکل 2 . نمودار پشته‌ای بیان درصد انواع پروتئین‌های پلیمر شده (ناحیه‌ی بالایی)، اسمیرها (ناحیه‌ی میانی) و پروتئین‌های خرد شده (ناحیه‌ی پایینی) خمیر برگر گیاهی تیمار شده با غلظت‌های مختلف آنزیم ترانس گلوتامیناز.

SC: سدیم کازئینات (عدد درج شده در کنار SC بیانگر غلظت این ترکیب است). E: آنزیم ترانس‌گلوتامیناز میکروبی (عدد درج شده کنار E بیانگر غلظت این ترکیب به درصد است).

الکتروفورز سویا: تصویر ژل الکتروفورز حاصل از سویای تیمار شده با آنزیم ترانس‌گلوتامیناز در شکل 3 ارائه شده است. همان‌طور که مشخص است دانسیته‌ی پروتئین‌های تفکیک شده در سویای تیمار شده با آنزیم، کم‌تر از نمونه‌های فاقد آنزیم است. پروتئین‌ها در الکتروفورز *SDS-PAGE* بر اساس وزن مولکولی تفکیک می‌شوند که در این صورت زیر واحدهای *S11* (گلایسنین) به دلیل وزن پایین‌تر عمدتاً در پایین ژل و زیر واحدهای *S7* (کانگلایسنین) در بالای ژل مشاهده می‌شوند (19). پروتئین‌های تشکیل‌دهنده بخش *S11* روی ژل الکتروفورز نمونه‌ی سویا سه باند مشخص تشکیل داده‌اند که در محدوده‌ی وزنی 15 تا 65 کیلودالتون هستند. باند پررنگ بالایی ترکیبی از زیرواحدهای A2، A1b، A1a، A4 و احتمالاً A3 است که در این الکتروفورز زیرواحد A3 به خوبی تفکیک نشده است. باند پروتئینی پایین‌تر از آن، پروتئین بازی زیرواحد B3 است که در نمونه‌ی کنترل قابل رؤیت است. اما در هر سه محلول سویای تیمار شده با آنزیم ناپدید شده است. پایین‌تر از B3 زیرواحدهای B4، B2، B1b و B1a به صورت یک باند واحد مشاهده می‌شوند که در الکتروفورز یک بعدی غالباً از هم تفکیک نمی‌شوند. در انتهای پایینی ژل، یک باند مشاهده می‌شود که احتمالاً محل قرارگیری مهارکننده‌های تریپسین یا دیگر زیرواحد گلیسینین *A* یعنی *A5* است. همچنین ممکن است، آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی نیز در ژل الکتروفورز حضور داشته باشد.



شکل 3. ژل الکتروفورز SDS-PAGE سویای تیمار شده با آنزیم ترانس گلوتامیناز.

S: محلول سویا، E: آنزیم ترانس‌گلوتامیناز میکروبی (اعداد درج شده کنار E بیانگر غلظت آنزیم در محلول سویا به درصد است. ستون آخر، ستون مربوط به استاندارد پروتئین است و وزن ملکولی مشخص شده به کیلودالتون است.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

• بحث

ظرفیت نگهداری آب: به لحاظ تئوری می‌توان گفت آنزیم ترانس‌گلوتامیناز با ایجاد پیوندهای کووالانسی بین آمین‌های نوع اول همچون لیزین و گلوتامین سویا و سدیم‌کازئینات شبکه پروتئینی مناسبی را ایجاد و آب بیش‌تری را در خود حفظ می‌کند (20-22). غلظت‌های 0/25 و 0/5 درصد آنزیم به تنهایی و حتی غلظت 0/25درصد آنزیم در حضور 1% کازئین اثری بر ظرفیت نگهداری آب محصول نداشت. Pietrasik و همکاران (2003) گزارش کردند که افزودن آنزیم ترانس‌گلوتامیناز (غلظت 0/4 %) هیچ اثر معنی‌داری بر میزان ظرفیت نگهداری رطوبت ژل گوشت خوک ندارد و تنها در حضور غلظت‌های بالاتر سدیم کازئینات اثر آن مشخص می‌شود (10). Heraze و همکاران (2013) نیز این آنزیم را فاقد اثر معنی‌دار بر توانایی نگهداری رطوبت در سوریمی دانستند (23). این نتایج متنوع حاکی از آن است که اثر مثبت آنزیم بر میزان نگهداری رطوبت محصولات پروتئینی وابسته به نوع سوبسترای پروتئینی است (24).

حلالیت پروتئین: آنزیم ترانس‌گلوتامیناز با تشکیل باندهای کووالانسی غیرسولفیدی حلالیت پروتئین را کاهش می‌دهد (25) و از آن‌جایی که کازئین سوبسترای خوب این آنزیم است، به سادگی در دسترس آنزیم قرار می‌گیرد و باندهای بیش‌تر و متعاقباً پلیمرهای پپتیدی بزرگ‌تری تشکیل و از حلالیت پروتئین کاسته می‌شود. به این ترتیب آنزیم و کازئین در کاهش حلالیت پروتئین اثر هم‌افزایی دارند (27، 26، 14). از سوی دیگر حضور همزمان کازئین و آنزیم در فرمولاسیون آبگریزی سطحی را افزایش و از حلالیت پروتئین می‌کاهد (28). هم چنین، حضور پروتئین‌های سویا در محیط می‌تواند با افزایش اتصالات عرضی ایجاد شده توسط آنزیم موجب کاهش حلالیت پروتئین‌ها شود (29). با این وجود همان‌طور که در جدول 1 می‌توان دید، سدیم‌کازئینات به تنهایی باعث افزایش معنی‌دار حلالیت پروتئین شد. Jiang و Zhao (2011) دلیل این امر را افزایش میزان پروتئین در نمونه دانستند. به عبارتی به دلیل عدم حضور آنزیم در فرمولاسیون، کازئین در پیوند کووالانسی غیرسولفیدی شرکت نکرده و به صورت آزاد و محلول در محیط وجود دارد (27).

الکتروفورز خمیر برگر: در الکتروفورز نمونه‌های خمیر برگر، نمونه‌ی شاهد فاقد باند پروتئینی است. همچنین نمونه‌های حاوی 1 و 2 درصد سدیم‌کازئینات هیچ باند مشخصی تشکیل نداده‌اند در حالی که انتظار می‌رفت خود کازئین حداقل دو یا سه باند قوی ایجاد کند، اما اتفاقی که در عمل افتاده است، تشکیل اسمیری از پروتئین بوده است. غلظت اسمیر تشکیل شده در نمونه حاوی 2 درصد سدیم‌کازئینات بیش‌تر است و نشان دهنده آن است که افزایش کازئین باعث تشدید رنگ شده است. هنگامی که به انتهای ستون نمونه‌ی کنترل نگاه می‌شود، به نظر می‌رسد که پپتیدهای کوچک انتهای ستون از مسیر خارج شده و به طرف کناره‌های ستون کشیده شده‌اند. این پدیده می‌تواند نشانگر غلظت یونی بالا در نمونه‌های تهیه شده باشد. علت این موضوع، آن است که نمونه‌ی خمیر برگر گیاهی حاوی مقداری نمک است. به علاوه، موادی مانند سویا، گلوتن، آرد سفید و آرد سوخاری نیز که همه در تولید خمیر برگر گیاهی به کار رفته‌اند، حاوی پتاسیم و غلظت یونی بالایی می‌باشند (31، 30).

همچنین نمونه خمیر برگر گیاهی، علاوه بر مخلوطی از پروتئین‌ها دارای مواد کربوهیدراتی هم‌چون کاراگینان، زانتان و نشاسته است که در پیوند با پروتئین‌ها، مولکول‌های درشتی را ایجاد می‌کنند. آزمون الکتروفورز یک‌بعدی توانایی جدا کردن چنین ملکول‌های درشتی را ندارد. Hu و همکاران (2015) نیز به دنبال افزودن صمغ کردلان و آنزیم ترانس‌گلوتامیناز به پروتئین ماهی به نتایج مشابهی رسیدند (25). Janssen و همکاران (1978) در پژوهشی برای تعیین باندهای مخلوط پروتئین گلوتن، آب پنیر، کازئین، آلبومین تخم مرغ و سویا در ترکیب با مواد کربوهیدراتی چون نشاسته و صمغ در محصولات گوشتی پخته شده در ژل الکتروفورز به اسمیر رسیدند (32).

همان‌طور که گفته شد نمودار پشته‌ای (شکل 2) اطلاعات خوبی را از وضعیت پلیمریزاسیون نشان می‌دهد. حضور آنزیم درصد پروتئین‌های پلیمر (ستون سبز) را افزایش می‌دهد و از میزان پروتئین‌های اسمیر (ستون قرمز) و پروتئین‌های خرد شده (ستون آبی) می‌کاهد. به عبارتی مشخص است که پروتئین‌های کوچک در تشکیل پلیمر شرکت می‌کنند. که تشکیل پلیمرهای درشت پروتئینی در اثر آنزیم، نشان‌دهنده تأثیر آنزیم ترانس‌گلوتامیناز میکروبی در تشکیل باندهای کووالانسی غیر سولفیدی بین پروتئین‌هاست (25).

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

الکتروفورز سویا: تحت شرایط غیراحیاء پروتئین‌های سویا به دو بخش *S11* به نام گلایسین و *S7* به نام کانگلایسنین تفکیک می‌شوند که در الکتروفورز غیراحیاء بخش *S11* در بالا و بخش *S7* در پایین قرار می‌گیرند. اما اگر شرایط احیاء برقرار شود، این دو پروتئین درشت به پلی‌پپتیدهای کوچک شکسته می‌شوند و چون در این تحقیق شرایط احیاء در طی تهیه و الکتروفورز نمونه حاکم بوده، لذا زیر واحدهای بتاکانگلایسینین در قسمت بالای ژل جمع شده‌اند. اولین باند پروتئینی از بالا زیر واحد آلفاپریم از کانگلایسینین و پایین‌تر از آن به ترتیب زیر واحد آلفا و سپس بتا کانگلایسینین هستند (33، 19).

همان‌طور که گفته شد پروتئین‌های تشکیل دهنده بخش S11 سویا در نمونه کنترل، در ژل الکتروفورز سه باند مشخص در محدوده وزنی بین 15 تا 65 کیلودالتون تشکیل می‌دهند. محققین دیگر گزارش کرده‌اند که طی تیمار پروتئین با آنزیم، خود آنزیم نیز در تشکیل شبکه پلیمری شرکت می‌کند و با گذشت زمان انکوباسیون، مقدار آنزیم نیز کاهش پیدا می‌کند (34، 19). بدین معنی که بخشی از کاهش مشاهده شده در شدت رنگ باندهای این ناحیه در نمونه‌های تیمارشده با آنزیم ممکن است به دلیل کاهش مقدار خود آنزیم در طی ساخته شدن پلیمرها باشد.

واضح ترین یافته الکتروفورزی در این تحقیق ناپدید شدن باند الکتروفورزی *B3* از گلایسینین پس از تیمار با آنزیم است (شکل 3). اغلب محققین پس از تیمار محلول سویا با آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی، کاهش یکنواخت در اکثر باندهای پروتئینی را گزارش نموده‌اند (6). تنها نتایج مطالعه Tang و همکاران (2006) نشان داد که پس از افزودن آنزیم ترانس‌گلوتامیناز به محلول سویا، زیر واحد بازی گلایسینین، پلیمر تشکیل داده و رسوب می‌کند. تجمع زیرواحد *B3* در بخش ترسیب شده با افزایش زمان شدت می‌یابد. همچنین وی تشکیل پلیمر توسط آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی را در محلول پروتئینی سویا، در دو مرحله مقدماتی و تکمیلی بیان کرده است. به باور وی آنزیم ابتدا زیرواحدهای اسیدی گلایسینین و سپس زیرواحدهای بتاکانگلایسینین (که در بخش بیرونی مولکول قرار دارند) را برای ساخت پلیمر به کار می‌گیرد که منجر به پیدایش ژل اولیه و غیرمقاوم می‌گردد. اما متعاقباً واکنش زیرواحد *B* با واحدهای اسیدی شرکت کننده در ساخت پلیمر منجر به بلوغ پلیمر و افزایش ثبات و پایداری آن می‌شود. هنگامی که در بافر نمونه، این پلیمرها وجود داشته باشند در ناحیه بالایی ژل الکتروفورز نفوذ می‌کنند و نمی‌توانند وارد ژل گردند (35).

مقاومت پروتئین بازی گلایسینین در مقابل اثر آنزیم ترانس‌گلوتامیناز میکروبی توسط Suárez -Ramırez و Xiong (2003) گزارش شده است. دلیل این مقاومت، درونی‌تر بودن زیرواحد بازی نسبت به زیر واحدهای اسیدی در ساختار گلایسینین و عدم دسترسی آنزیم به آن ذکرشده است (12). در مطالعه حاضر نیز، تشکیل پلیمرها با ناپدیدشدن پروتئین‌های اسیدی سویا همراه شده و فقط زیرواحد بازی در الکتروفورز مشاهده گردید که نشان می‌دهد بافر لاملی قادر به تجزیه پلیمر تشکیل شده نیست. همچنین زیرواحد بازی پروتئین نیز تحت تأثیر آنزیم ترانس‌گلوتامیناز میکروبی قرار نمی‌گیرد.

نتیجه‌گیری

افزودن آنزیم ترانس‌گلوتامیناز به تنهایی و یا در ترکیب با سدیم‌کازئینات ویژگی‌های تشکیل ژل و شبکه‌ی پروتئینی در برگر سویا را بهبود داد و نتیجه‌ی آن افزایش میزان حفظ رطوبت محصول بود. همچنین تشکیل پیوندهای کووالانسی بین پروتئین‌ها در حضور آنزیم و کازئین باعث تشکیل پلی پپتیدهای سنگین و کاهش حلالیت پروتئین شد که این دو عامل به نوبه خود می‌تواند باعث بهبود بافت محصول گردد که لازم است در پژوهشی جداگانه به آن پرداخته شود. بهترین نتیجه زمانی حاصل شد که غلظت 0/75 درصد آنزیم در کنار 2 % سدیم‌کازئینات استفاده شد. ایجاد پیوند عرضی توسط آنزیم باعث تشکیل شبکه پروتئینی مناسبی می‌شود که می تواند ویژگی‌های بافتی مطلوب‌تری را به برگر گیاهی بدهد.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

References

1. Zhu H, Yang X, Zhang C, Zhu C, Tao G, Zhao L, et al. Red and processed meat intake is associated with higher gastric cancer risk: a meta-analysis of epidemiological observational studies. PLoS One. 2013;8(8):e70955.
2. Pan A, Sun Q, Bernstein AM, Schulze MB, Manson JE, Stampfer MJ, et al. Red meat consumption and mortality: results from 2 prospective cohort studies. Arch intern Med. 2012;172(7):555-63.
3. Farvid MS, Cho E, Chen WY, Eliassen AH, Willett WC. Adolescent meat intake and breast cancer risk .Int J Cancer. 2015;136(8):1909-20.
4. Herrero AM, Cambero M, Ordonez J, De la Hoz L, Carmona P. Raman spectroscopy study of the structural effect of microbial transglutaminase on meat systems and its relationship with textural characteristics. Food Chem, 2008; 109 (1): 25-32.
5. Pan A, Sun Q, Bernstein AM, Schulze MB, Manson JE, Willett WC, et al. Red meat consumption and risk of type 2 diabetes: 3 cohorts of US adults and an updated meta-analysis. Am J Clin Nutr 2011;94(4):1088-96.
6. Nishinari K, Fang Y ,Guo S, Phillips G. Soy proteins: a review on composition, aggregation and emulsification. Food Hydrocolloids. 2014;39:301-18.
7. Ramirez-Suarez J, Xiong Y. Transglutaminase Cross-linking of Whey/Myofibrillar Proteins and the Effect on Protein Gelation. J Food Sci. 2002;67(8):2885-91.
8. Gaspar ALC, de Góes-Favoni SP. Action of microbial transglutaminase (MTGase) in the modification of food proteins: A review. Food Chem. 2015;171:315-22.
9. Ahhmed AM, RumikoKawahara, SatoshiOhta, KazuyoshiNakade, KojiAoki, TakayoshiMuguruma, Michio. Dependence of microbial transglutaminase on meat type in myofibrillar proteins cross-linking. Food Chem. 2009;112(2):354-61.
10. Pietrasik Z. Binding and textural properties of beef gels processed with κ-carrageenan, egg albumin and microbial transglutaminase. Meat Sci. 2003;63(3):317-24.
11. Pietrasik Z, Li-Chan E. Binding and textural properties of beef gels as affected by protein, κ-carrageenan and microbial transglutaminase addition. Food Res Int. 2002; 35(1): 91-98.
12. Ramırez-Suárez J, Xiong YL. Effect of transglutaminase-induced cross-linking on gelation of myofibrillar/soy protein mixtures. Meat Sci. 2003;65(2):899-907.
13. Seighalani FZB, Bakar J, Saari N, Khoddami A. Thermal and physicochemical properties of red tilapia (Oreochromis niloticus) surimi gel as affected by microbial transglutaminase. Animal Prod Sci. 2016.
14. Kilic B. Effect of microbial transglutaminase and sodium caseinate on quality of chicken döner kebab. Meat Sci. 2003;63(3):417-21.
15. Martelo-Vidal MJ, Fernández-No IC, Guerra-Rodríguez E, Vázquez M. Obtaining reduced-salt restructured white tuna (Thunnus alalunga) mediated by microbial transglutaminase. LWT-Food Sci Technol. 2016;65:341-8.
16. Wu M, He Q, Hong Y, Wang S. Preheating of kidney bean proteins enhances cross-linking and functional properties with chicken myofibrillar proteins induced by transglutaminase. LWT-Food Sci Techol. 2016;65:816-22.
17. Wang C, Zayas J. Comparative study of corn germ and soy proteins utilization in comminuted meat products. J Food Quality. 1992;15(2):153-67.
18. Aminlari M, Majzoobi M. Effect of chemical modification, pH change, and freezing on the rheological, solubility, and electrophoretic pattern of wheat flour proteins. J Food Sci. 2002;67(7):2502-6.
19. Basman A, Köksel H, Ng P. Effects of Transglutaminase on SDS-PAGE Patterns of Wheat, Soy, and Barley Proteins and their Blends. J Food Sci. 2002;67(7):2654-8.
20. Dzudie T, Scher J, Hardy J. Common bean flour as an extender in beef sausages. J Food Eng. 2002;52(2):143-7.
21. Martínez MA, Robledo V, Velazquez G, Ramírez JA, Vázquez M, Uresti RM. Effect of precooking temperature and microbial transglutaminase on the gelling properties of blue crab (Callinectes sapidus) proteins. Food Hydrocolloid. 2014;35:264-9.
22. Canto AC, Lima BRC, Suman SP, Lazaro CA, Monteiro MLG, Conte-Junior CA, et al. Physico-chemical and sensory attributes of low-sodium restructured caiman steaks containing microbial transglutaminase and salt replacers. Meat Sci. 2014;96(1):623-32.
23. Herranz B, Tovar CA, Borderias AJ, Moreno HM. Effect of high-pressure and/or microbial transglutaminase on physicochemical, rheological and microstructural properties of flying fish surimi. IFSET. 2013;20:24-33.
24. Krintiras GA, Göbel J, Van der Goot AJ, Stefanidis GD. Production of structured soy-based meat analogues using simple shear and heat in a Couette Cell. J Food Eng. 2015;160:34-41.
25. Hu Y, Liu W, Yuan C, Morioka K, Chen S, Liu D ,et al. Enhancement of the gelation properties of hairtail (Trichiurus haumela) muscle protein with curdlan and transglutaminase. Food chem. 2015;176:115-22.
26. Pietrasik Z, A. Effect of sodium caseinate and κ-carrageenan on binding and textural properties of pork muscle gels enhanced by microbial transglutaminase addition. Food Res Int. 2003;36(3):285-94.
27. Jiang S-J, Zhao X-H. Transglutaminase-induced cross-linking and glucosamine conjugation of casein and some functional properties of the modified product. Int Dairy J. 2011;21(4):198-205.
28. Hiller B, Lorenzen PC. Functional properties of milk proteins as affected by enzymatic oligomerisation. Food Res Int. 2009;42(8):899-908.
29. Weng W, Zheng H. Effect of transglutaminase on properties of tilapia scale gelatin films incorporated with soy protein isolate. Food Chem. 2015;169:255-60.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

30. Rizvi S, Josephson R, Blaisdell J, Harper W. Separation of soy-spun fiber, egg albumen, and wheat gluten blend by sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis. J Food Sci. 1980;45(4):958-61.

31. Babiker EE. Effect of transglutaminase treatment on the functional properties of native and chymotrypsin-digested soy protein. Food Chem. 2000;70(2):139.۴۵-

32. Janssen FW, Voortman G, De Baaij JA. Detection of wheat gluten, whey protein, casein, ovalbumin, and soy protein in heated meat products by electrophoresis, blotting, and immunoperoxidase staining. J Agric Food Chem. 1987; 35(4): 563-567.

33. Martí MC, Olmos E, Calvete JJ, Díaz I, Barranco-Medina S, Whelan J, et al. Mitochondrial and nuclear localization of a novel pea thioredoxin: identification of its mitochondrial target proteins. Plant Physiology. 2009;150(2):646-57.

34. Motoki M, Nio N. Crosslinking between different food proteins by transglutaminase. J Food Sci. 1983;48(2):561-6.

35. Tang CH, Wu H, Yu HP, Li L, Chen Z, Yang XQ. Coagulation and gelation of soy protein isolates induced by microbial transglutaminase. J Food Biochem. 2006;30(1):35-55.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

The Effect of Microbial Transglutaminase Enzyme and Sodium Caseinate on Proteins Solubility and Interaction between the Proteins in Soy Burger

*Forghani Z[1], Aminlari M [2], Eskandari MH[*3], Shekarforoush Sh[4]*

1- MSc Graduate, Department of Food Science and Technology, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

2- Prof, Department of Biochemistry, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

*3- *Corresponding author: Associate Professor. Department of Food Science and Technology, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran . Email: skandar@shirazu.ac.ir*

4- Prof, Department of Food Hygiene, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

Received 27 Apr, 2016 **Accepted 25 Aug, 2016**

Background and Objectives: the healthier effects of protein sources, especially plant sources instead of red meat for the production of protein-based products such as burgers have been proven. However, the lack of proper interaction between proteins of plant source causes poor physical properties of product. Microbial transglutaminase enzyme, results in improvement of the textural properties of protein products by formation of covalent bonds and casein is one of the best substrates for this enzyme. The aim of this study is to evaluate the effect of different concentrations of enzyme and sodium-caseinate on the physicochemical characteristics of veggie burger.

Materials and Methods: Microbial transglutaminase (MTGase, 0-0.75%) and sodium-caseinate (SC, 0-2%) were added to veggie burger formulation. The solubility of proteins and water-holding capacity were measured and in order to investigate the protein-protein interaction, the SDS-PAGE electrophoresis was applied.

Results: Addition of SC and MTGase significantly increased the water holding capacity and decreased solubility of the protein ($P<0.05$). Sodium-caseinate in both levels and the enzyme at less than 0.75% alone had no significant effect on the water holding capacity ($P>0.05$). The addition of MTGase alone or in combination with SC significantly decreased the solubility of the protein. SDS–PAGE analysis showed that burger dough did not form specific bands on SDS-PAGE. Therefore, in order to investigate the precise effect of enzyme, mixture of soy and enzyme was added to electrophoresis gel. Results revealed significant reduction in density of soy bands after adding MTGase and elimination of basic protein subunit B3.

Conclusions: MTGase combined with sodium-caseinate resulted in improvement of the water holding capacity, interaction of proteins and the solubility reduction of protein and thus enhanced the physical properties of veggie burgers.

Keywords: Interaction between proteins, Enzyme, Water-holding capacity, Solubility of Protein, Electrophoretic Pattern

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]