مقاله کامل علمی-پژوهشی

نشریه فرآوری و نگهداری مواد غذایی
جلد سیزدهم، شماره دوم، ۱۴۰۰
۶۱-۷۸
http://ejfpp.gau.ac.ir

DOI: 10.22069/EJFPP.2021.17683.1603

بررسی ارتباط بین ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و بافتی استیک گوساله مارینات شده بر اساس معادلات رگرسیونی

مونا مظاهری کلهرودی[۱]، هما بقایی[۱*]، بهاره عمادزاده[۲]، مرضیه بلندی[۱]

[۱]گروه صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، سمنان، ایران

[۲]گروه نانو فناوری مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، خراسان رضوی، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۱۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۵/۲۹

چکیده

سابقه و هدف: تردسازی از جمله فرآیندهای مهم در صنعت گوشت می‌باشد. این فرآیند معمولاً تحت تأثیر عوامل طبیعی و یا به‌صورت مصنوعی انجام می‌گیرد. در میان روش‌های تردسازی، استفاده از ترکیباتی با ماهیت طبیعی مثل میوه‌ها و سبزی‌جات که از میزان تولید بالایی نیز برخوردار هستند دارای اهمیت ویژه‌ای است. در بین منابع گیاهی مختلف، مارچوبه دارای فعالیت پروتئازی مناسبی می‌باشد که این امر نشان‌دهنده وجود پتانسیل کافی برای استفاده از آن در صنعت به عنوان ترد کننده است. هدف از این پژوهش، تعیین ارتباط بین ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و بافتی استیک گوساله مارینات شده با شیره مارچوبه (*Asparagus officinalis* L.) در بهبود تردی آن بر اساس معادلات ریاضی، به‌عنوان یک راه سریع، ایمن و مقرون به صرفه جهت تعیین کیفیت تکنولوژیک نمونه‌های گوشت مارینات شده با ترکیبات طبیعی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: بدین منظور پس از استخراج شیره مارچوبه به‌روش آبگیری، اثر تیمارهای مختلف حاوی شیره مارچوبه و سرکه بالزامیک شامل تیمارهای حاوی ۲۵ میلی‌لیتر شیره مارچوبه، ۲۵ میلی‌لیتر شیره مارچوبه+۷۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۲۵ میلی‌لیتر شیره مارچوبه+۱۰ میلی‌لیتر سرکه بالزامیک+۶۵ میلی‌لیتر آب مقطر بر نیروی برشی وارنر_براتزلر، شاخص تجزیه میوفیبریل، مقدار کلاژن، ظرفیت نگه‌داری آب و حلالیت کل پروتئین‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت ارزیابی شد. سپس روابط بین این متغیرها (نیروی برشی وارنر-براتزلر با شاخص تجزیه میوفیبریل و مقدار کلاژن، حلالیت کل با حلالیت پروتئین‌های میوفیبریلی و سارکوپلاسمی، همچنین شاخص تجزیه میوفیبریل با ظرفیت نگه‌داری آب)، در بهبود تردی استیک گوساله (beef M. *semitendinosus* steak) مورد بررسی قرار گرفته و معادله آنها تعیین گردید. همچنین، برای تعیین رابطه بین متغیرها، از معیار ضریب همبستگی (R^2) استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج حاکی از کاهش نیروی برشی وارنر-براتزلر و افزایش شاخص تجزیه میوفیبریل، مقدار کلاژن، ظرفیت نگه‌داری آب و حلالیت پروتئین‌ها در تیمارهای مارینادی در مقایسه با کنترل در طول دوره نگه‌داری بود ($P<0/05$). همچنین در پژوهش حاضر روابط بدست آمده بین متغیرهای مورد بررسی به‌صورت معادلات رگرسیونی خطی ساده بودند. طبق نتایج بدست آمده، رابطه بین شاخص تجزیه میوفیبریل و نیروی برشی وارنر-براتزلر و رابطه بین محتوای کلاژن و نیروی برشی وارنر-براتزلر خطی معکوس ($P<0/05$) بود؛ درحالی‌که رابطه بین حلالیت کل پروتئین‌ها و حلالیت پروتئین‌های سارکوپلاسمی و میوفیبریلی و همچنین رابطه بین ظرفیت نگه‌داری آب و شاخص تجزیه میوفیبریل به صورت رگرسیونی خطی مثبت بود ($P<0/05$). هرچه میزان تکه‌های میوفیبریلی سبک وزن حاصل از هیدرولیز پروتئین‌ها در سارکوپلاسم سلول عضلانی افزایش

[*]مسئول مکاتبه: h.baghaei@damghaniau.ac.ir

یابد قابلیت اتصال این پپتیدهای کوچک با مولکول‌های آب افزایش یافته و به دنبال آن حلالیت پروتئین‌های سارکوپلاسمی، میوفیبریلی و حلالیت کل بهبود می‌یابد که دلالت بر نرم‌تر شدن بافت گوشت دارند. از طرف دیگر افزایش حلالیت کلاژن طی پخت و تبدیل آن به ژلاتین محلول بخصوص در شرایط اسیدی ایجاد شده تحت تأثیر گلیکولیز یا سرکه بالزامیک می‌تواند منجر به کاهش نیروی لازم جهت برش بافت و به دنبال آن تردی بیشترگوشت شود.

نتیجه‌گیری: براساس یافته‌های این پژوهش، عملکرد شیره مارچوبه روی هر دو دسته پروتئین‌های میوفیبریلی و بافت پیوندی منجر به بهبود ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و بافتی استیک گوساله شد که نشان دهنده امکان استفاده از شیره مارچوبه در بهبود کیفیت گوشت و فرآورده‌های گوشتی می‌باشد. بنابراین اهداف تحقیق در خصوص بهبود تردی استیک گوساله تحقق یافت. شیره حاصل از این منبع می‌تواند در فرمولاسیون چاشنی‌ها، سس‌ها و ترد کننده‌ها استفاده شده و به عنوان منبعی جدید و طبیعی بخصوص در رژیم غذایی سالمندان و افرادی که مشکلات جویدن و بلع دارند، جهت استفاده بیشتر از ترکیبات پروتئینی، مورد مصرف واقع شود.

واژه‌های کلیدی: پروتئاز طبیعی، تردی، رابطه رگرسیون، گوشت، مارچوبه

مقدمه

کیفیت خوراکی گوشت به‌عنوان یکی از مهم‌ترین منابع پروتئینی با ارزش غذایی بالا و تأمین‌کننده انرژی روزانه مورد نیاز تأثیر بسزایی در میزان مصرف آن دارد. گوشت از پروتئین‌های ارزشمند حاوی اسیدهای‌آمینه ضروری برای بدن، مواد معدنی مانند آهن، روی و انواع ویتامین‌ها غنی می‌باشد و به‌همین دلیل در زمره بهترین و کامل‌ترین مواد غذایی قرار می‌گیرد. به‌کارگیری روش‌های مناسب به‌منظور تردکردن گوشت (بویژه قطعاتی از گوشت که محتوای بافت پیوندی بالایی داشته و کم ارزش تلقی می‌شوند) در بهبود کیفیت خوراکی آن و اصلاح ویژگی‌های بافت و کاهش زمان ترد کردن در سردخانه‌های بالای صفر می‌تواند بسیار مفید باشد (۱). افزودن پروتئازها به گوشت و ترد کردن آن از طریق افزایش حلالیت پروتئین‌ها، منجر به افزایش ظرفیت نگه‌داری آب و بهبود ویژگی‌های عملکردی[1] از جمله ظرفیت امولسیون‌کنندگی، افزایش ویسکوزیته امولسیون و پایداری آن می‌شود. بهبود کیفیت تکنولوژیکی گوشت و تولید محصولات گوشتی با بافتی یکنواخت و با کیفیت برش‌پذیری بهتر را بدنبال خواهد داشت (۲۶). امروزه پژوهش‌های مختلفی جهت شناسایی پروتئازهای جدید با منشأ گیاهی و دارای ویژگی هیدرولیزکنندگی کنترل شده در بافت در حال انجام است. پروتئازهای گیاهی موجود در برخی میوه‌ها با تجزیه اکتومیوزین و تا حدی تجزیه الاستین و کلاژن سبب افزایش تردی در بافت این قبیل گوشت‌ها می‌شوند (۱۷). ایرجی‌فر و همکاران (۱۳۹۷) گزارش کردند افزایش غلظت اسید استیک و نفوذ محلول اسیدی به داخل بافت گوشت شتر از طریق انتشار طی زمان، سبب افزایش حلالیت کلاژن و کاهش قابل توجه نیروی برشی و pH نمونه‌ها شد (۱۱). کیم و همکاران (۲۰۱۳) نیز تغییرات ساختاری ایجاد شده در بافت و کاهش محتوای پروتئین‌های پیوندی گوشت گوساله تیمار شده با سس سویا در طول دوره رسیدن را به افزایش حلالیت کلاژن مربوط دانستند (۱۴). افزایش حلالیت پروتئین‌های میوفیبریلی و سارکوپلاسمی در نمونه‌های تیمار شده با عصاره زنجبیل در مقایسه با نمونه شاهد نیز می‌تواند با دور شدن از نقطه ایزوالکتریک پروتئین‌ها و افزایش نیروی دافعه بین رشته‌های پروتئینی ارتباط داشته باشد. حلالیت

1. Functional properties

پروتئین‌ها جهت ارزیابی میزان دناتوراسیون پروتئین و اثر آن بر ظرفیت نگه‌داری آب اهمیت دارد (۹). آینسکو و همکاران (۲۰۰۸) نیز به وجود رابطه معکوس بین رطوبت خروجی (افت خونابه و افت پخت) و ظرفیت نگه‌داری آب در نمونه‌های گوشت گوساله تیمار شده با پاپائین و برومیلین پی بردند (۱۰).

مارچوبه (*Asparagus officinalis* L.) گیاهی تک لپه و از خانواده سوسنیان[1] است. در شیره مارچوبه آنزیم‌های مختلفی شامل پراکسیدازها، لیپوکسی‌ژنازها و سولفیدریل پروتئازها وجود دارد. پروتئاز مارچوبه یک اندوپپتیداز از نوع سولفیدریل پروتئاز بوده و بافت هدف آن به طور عمده، زنجیره سنگین میوزین می‌باشد (۸) که می‌تواند اثرات مطلوبی بر ساختار میوفیبریل‌ها و به موازات آن بافت پیوندی داشته باشد. وزن مولکولی پروتئین‌های مارچوبه ۷۵-۵ کیلودالتون و وزن مولکولی پروتئاز آن حدود ۲۸ کیلودالتون است. pH بهینه فعالیت آن در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، برابر ۷ است. از طریق تعیین توالی اسیدهای آمینه، شباهت پروتئاز مارچوبه با پاپائین مشخص شده است (۳۳). این پروتئاز در برابر اعمال حرارت تا دمای ۴۳ درجه سانتی‌گراد و pH ۶/۵ الی ۸/۵ مقاوم است (۳). هدف از پژوهش حاضر تعیین ارتباط بین ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و بافتی استیک گوساله مارینادشده با شیره مارچوبه و سرکه بالزامیک در بهبود تردی بر اساس معادلات ریاضی جهت تعیین کیفیت تکنولوژیکی نمونه‌های گوشت مارینادشده با ترکیبات طبیعی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد اولیه: مارچوبه تازه، استیک گوشت تازه گوساله و همچنین سرکه بالزامیک (۶درصد استو بالزامیکو دی مدونا، ایتالیا، pH=۴/۴) از بازار مصرف و مواد شیمیایی از شرکت مرک آلمان خریداری گردید.

استخراج شیره مارچوبه: مارچوبه‌های تازه پس از شستشو توسط همزن (اومنی[2] Du Pont Instruments (Corp., Wilmington, DE, USA) هموژنیزه شدند. سپس مواد مخلوط شده، در درون پارچه توری سه لایه‌ای، به‌صورت فشرده قرار گرفته و شیره آن استخراج شد. شیره حاصله، به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع فوقانی حاصل از سانتریفیوژ (سوپرناتانت، pH=۶، فعالیت پروتئازی: ۱۴/۱U/g و محتوای مواد جامد محلول: ۵/۰۲ درصد)، برای مارینادکردن استیک گوساله، درون شیشه تیره و درب‌دار در فریزر ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد (۸).

مارینادکردن استیک گوساله با شیره مارچوبه و سرکه بالزامیک: در این مرحله استیک گوشت تازه گوساله پس از تهیه، شسته، توزین شده و در قطعات مکعبی ($10cm^3$) با وزن تقریبی ۱۰۰ گرم و عاری از چربی به چهار قسمت تقسیم شد. سپس با انتخاب غلظت‌های مختلف شیره مارچوبه و سرکه بالزامیک، که براساس پیش تیمارهای انجام شده بدست آمدند، تیمارهای مارینادی نهایی در دو تکرار به شرح ذیل (جدول ۱)، از طریق سرنگ‌های ۲۰ میلی‌لیتری به قسمت‌های سطحی و عمقی قطعات گوشت تزریق شدند و سپس جهت توزیع یکنواخت محلول مارینادی در بافت، به آرامی ماساژ داده شدند.

1. *Liliaceae*

2. Omni Mixer

جدول۱- نمونه‌های تیمار شده با شیره مارچوبه و سرکه بالزامیک در پژوهش حاضر

Table 1. Treated samples with asparagus juice and balsamic vinegar in the present study

تیمار Treatment	نوع مارینـاد (حجمی-وزنی) Marinade type
S0	۱۰۰ گرم استیک گوساله بدون مارینـاد (کنترل) 100 g beef steak without marinade (Control)
S1	۲۵ میلی‌لیتر شیره مارچوبه که به ۱۰۰ گرم استیک گوساله تزریق شد. 25 mL asparagus juice was injected to 100 g beef steak.
S2	۲۵ میلی‌لیتر شیره مارچوبه که توسط ۷۵ میلی‌لیتر آب مقطر رقیق شد و سپس به ۱۰۰گرم استیک گوساله تزریق شد. 25 mL asparagus juice which is diluted with 75 mL water and injected to 100 g beef steak.
S3	۲۵ میلی‌لیتر شیره مارچوبه و ۱۰ میلی‌لیتر سرکه بالزامیک که توسط ۶۵ میلی‌لیتر آب مقطر رقیق شد و سپس به ۱۰۰گرم استیک گوساله تزریق شد. 25 mL asparagus juice and 10 mL balsamic vinegar which were diluted by 65 mL water and injected to 100 g beef steak.

نگه‌داری نمونه‌های مارینـاد شده در یخچال: هر یک از نمونه‌ها داخل کیسه زیپ‌کیپ پلی‌اتیلنی گذاشته شد و به‌منظور سپری کردن دوره ترد شدن به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. سپس در زمان‌های متوالی ۰، ۴، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از نگه‌داری، کلیه آزمون‌های فیزیکوشیمیایی و بافتی که در ادامه به آنها اشاره خواهد شد در سه تکرار جهت ارزیابی تأثیر نوع و زمان مارینـاد انجام شدند. ارزیابی پارامترهای ظرفیت نگه‌داری آب، شاخص تجزیه میوفیبریل و حلالیت پروتئین‌ها روی گوشت مارینـادی خام و ارزیابی نیروی برشی و محتوای کلاژن روی گوشت پخته صورت گرفت.

نیروی برشی وارنر-براتزلر (WBSF)[1]: اندازه‌گیری مقدار نیروی برشی و بررسی میزان تردی نمونه‌های مارینـادی که پس از سپری شدن دوره نگه‌داری مورد نظر پخته شده بودند بر اساس روش لورنس و همکاران (۲۰۰۳) با استفاده از دستگاه بافت‌سنج (TA-XT2i, Stable Micro Systems Ltd., UK) با ۵۰۰ نیوتن لود سل صورت گرفت (۱۶). به‌این منظور، نمونه‌ها داخل کیسه زیپ‌کیپ پلی‌اتیلنی گذاشته شدند و به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه در بن ماری با دمای ۴±۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند تا دمای مرکز نمونه‌ها به ۷۵ درجه سانتی‌گراد رسید. پس از اتمام پخت، نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند تا خنک شوند. سپس مقاومت برشی بافت هر قطعه گوشت که در ابعاد مشخص(۱×۲×۲) و به موازات تارهای عضلانی جدا شدند، توسط تیغه V شکل وارنر-براتزلر از جنس فولاد ضدزنگ با زاویه ۶۰ درجه و سرعت ۲۰۰ میلی‌متر بر دقیقه سنجیده شد. میانگین تکرارها به‌عنوان نیروی برش نهایی بر حسب نیوتن گزارش شد.

ظرفیت نگه‌داری آب (WHC)[2]: مقدار ۰/۳ گرم نمونه مارینـادی خام پس از سپری شدن دوره نگه‌داری مورد بررسی به روی کاغذ صافی واتمن شماره یک منتقل گردید و دو صفحه پلاستیکی در هر دو طرف آن قرار داده شد. بلافاصله وزنه‌ای ۲ کیلوگرمی دقیقاً در مرکز صفحه پلاستیکی بالایی و به مدت ۵ دقیقه روی نمونه گوشت قرار گرفت. بعد از گذشت ۵ دقیقه وزنه و صفحه پلاستیکی بالایی از روی کاغذ صافی برداشته شد و نمونه گوشت نهایی پس از جدا کردن آن از کاغذ صافی توزین گردید. در نهایت درصد ظرفیت نگه‌داری آب از رابطه ۱ محاسبه شد

1. Warner-Bratzler Shear Force

2. Water Holding Capacity

که در آن W_1 وزن اولیه گوشت (گرم)، W_2 وزن نهایی گوشت (گرم) و MC مقدار رطوبت هر گرم از گوشت است (۳۰).

رابطه ۱.

$$WHC\% = 1- [(W_1-W_2) \div (W_1 \times MC)] \times 100$$

شاخص تجزیه میوفیبریل (MFI)[1]: در زمان‌های متوالی ۰، ۴، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از نگهداری، ۴ گرم نمونه گوشت از هر یک از تیمارهای‌های مارینادی خام با ۴۰ میلی‌لیتر بافر MFI با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد (متشکل از کلرید پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار، فسفات پتاسیم (pH=۷) ۲۰ میلی‌مولار، EDTA ۱ میلی‌مولار، کلرید منیزیم ۱ میلی‌مولار و آزید سدیم ۱ میلی‌مولار) ترکیب شد و پس از هموژن کردن با دور ۸۰۰۰rpm به مدت ۳۰ ثانیه توسط اولتراتوراکس (IKA Ultra-Turrax T25، آلمان) با شتاب $1000\times g$ به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس ۴۰ میلی‌لیتر بافر MFI به رسوب باقیمانده از سانتریفوژ اضافه شد و پس از ورتکس، مجدد با شرایط قبلی سانتریفوژ گردید. رسوب حاصل از این مرحله با ۱۰ میلی‌لیتر بافر MFI مخلوط و پس از ورتکس از توری با مش ۱۸ عبور داده شد (۱۰ میلی‌لیتر دیگر بافر MFI برای شستشوی باقیمانده رسوب پشت صافی اضافه شد). پس از تعیین غلظت پروتئین محلول به روش بیورت، ۰/۲۵ میلی‌لیتر از محلول پروتئینی زیر صافی به همراه ۰/۷۵ میلی‌لیتر بافر MFI و ۴ میلی‌لیتر معرف بیورت مخلوط شدند و مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در محلی تاریک و در دمای اتاق قرار گرفت. پس از گذشت این زمان، جذب نمونه با اسپکتروفتومتر مرئی-فرابنفش (CECIL، انگلستان) در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت و در نهایت مقدار MFI با استفاده از رابطه ۲ بدست آمد (۶).

رابطه ۲. $MFI= A_{۵۴۰}\times ۲۰۰$

حلالیت پروتئین سارکوپلاسمی[2] **(SPS)**: ۲ گرم نمونه مارینادی خام پس از سپری شدن دوره نگه‌داری مورد بررسی با ۲۰ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۲۵ مولار (pH=۷) توسط هموژنایزر (IKA Ultra-Turrax T25, Germany) مخلوط شد. سپس، مخلوطه حاصله به‌مدت ۱۸-۱۶ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری و در نهایت به مدت ۱۵ دقیقه در $6000\times g$ سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت حاصله با کاغذ صافی واتمن شماره یک فیلتر شد. سپس غلظت پروتئین مایع شفاف عبوری از کاغذ صافی به روش بیورت تعیین شد (۹).

حلالیت پروتئین کل[3] **(TPS)**: ۲ گرم نمونه مارینادی خام پس از طی دوره رسیدن در یخچال، در ۲۰ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار (pH=۷) و یدید پتاسیم ۱/۱ مولار فوق العاده سرد، توسط هموژنایزر مخلوط شد. سپس مخلوط حاصله در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸-۱۶ ساعت نگه‌داری شد و تحت سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه در $6000\times g$ قرار گرفت. سوپرناتانت حاصله با کاغذ صافی واتمن شماره یک فیلتر شد. سپس غلظت پروتئین مایع شفاف عبوریافته از کاغذ صافی به روش بیورت تعیین شد. مکانیسم روش بیورت، تشکیل کمپلکس بنفش رنگ بین یون‌های مس و پیوندهای پپتیدی است. در طول موج ۵۴۰ نانومتر میزان جذب رنگ بنفش تولید شده، خوانده می‌شود. از آنجایی که جذب با غلظت ارتباط مستقیم دارد طبق قانون بیر-لامبرت با رسم منحنی استاندارد مقادیر پروتئین مجهول در نمونه قابل اندازه‌گیری است. معادله منحنی خط استاندارد حلالیت پروتئین کل در این پژوهش به صورت $y=۰/۰۱۱۹x-۰/۰۰۳$ و

1. Myofibrillar Fragmentation Index

2. Sarcoplasmic Protein Solubility
3. Total Protein Solubility

R^2=۰/۹۹ تعیین شد. حلالیت پروتئین میوفیبریلی[1] (MPS) طبق رابطه ۳ بدست آمد (۹).

رابطه ۳. MPS = TPS -SPS

محتوای کلاژن: جهت اندازه‌گیری مقدار کلاژن نمونه، ابتدا باید میزان هیدروکسی‌پرولین نمونه اندازه‌گیری شود. نمونه‌های گوشت مارینادشده پس از طی دوره رسیدن در یخچال به‌مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۴±۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند تا پخته شوند و جهت خنک شدن به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگه‌داری شدند. سپس ۲ گرم نمونه گوشت پخته شده با ۴۰ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک ۶ نرمال به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۱۰۸ درجه سانتی‌گراد هیدرولیز شد. در ادامه ترکیب حاصله فیلتر شد و با آب مقطر به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسید. سپس ۲۵ میلی‌لیتر از این ترکیب برداشته شد و pH با استفاده از هیدروکسید سدیم۴۰ درصد به ۷ رسید و مجدداً توسط آب مقطر به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسید. در مرحله بعدی ۱ میلی‌لیتر از محلول تهیه شده نهایی با ۱ میلی‌لیتر کلرآمین T (۱/۴ درصد) درون لوله آزمایش ریخته و پس از مخلوط کردن به مدت ۲۲-۱۸ دقیقه در دمای اتاق نگه‌داری شد. سپس یک میلی‌لیتر معرف رنگی ۴-دی متیل آمینو بنزآلدئید به آن اضافه شد و پس از اختلاط به مدت ۱۵ دقیقه در بن‌ماری ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت و جهت خنک شدن ۳ دقیقه زیر شیر آب قرار داده شد و در ادامه جهت تخمین میزان هیدروکسی پرولین آزاد شده در نمونه‌های مورد بررسی بکار برده شد. جذب نوری این محلول ارغوانی توسط اسپکتروفتومتر UV-VIS در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت شد و سپس محتوای هیدروکسی پرولین نمونه‌ها با کمک منحنی استاندارد تعیین شد. غلظت‌های انتخابی استاندارد در محدوده ۵۰-۲ میلی‌گرم بر گرم استاندارد هیدروکسی پرولین درنظر گرفته شدند. معادله منحنی خط استاندارد هیدروکسی پرولین در این پژوهش به صورت y=۰/۰۱۳ x +۰/۰۱۷۲ و R^2=۰/۹۷ تعیین شد. سپس مقدار کلاژن هم، برحسب میلی‌گرم بر گرم نمونه، طبق رابطه ۴ تعیین شد (۲۰).

رابطه ۴.

مقدار کلاژن = مقدار هیدروکسی پرولین × ۷/۱۴

تجزیه و تحلیل آماری: در پژوهش حاضر تجزیه و تحلیل داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی توسط نرم افزار SPSS (نسخه ۲۵) انجام شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده گردید و سطح اطمینان ۹۵ درصد لحاظ شد. سپس جهت تعیین نوع رابطه رگرسیونی بین متغیرهای مورد آزمایش، انواع مختلف روابط رگرسیونی و معادلات آنها ترسیم شد و رابطه‌ای با بالاترین ضریب همبستگی (R^2) به‌عنوان رابطه بین متغیرها اعلام شد. روابط بدست آمده به صورت معادلات رگرسیونی خطی ساده می‌باشند (y= ax+b) که y به‌عنوان متغیر وابسته، x به‌عنوان متغیر مستقل، a شیب خط و b مقدار ثابت در نظر گرفته می‌شود. جهت بررسی معنی‌دار بودن روابط بدست آمده از آزمون همبستگی پیرسون استفاده گردید.

نتایج و بحث

بررسی نتایج پارامترهای فیزیکوشیمیایی و بافتی نمونه‌های مارینادشده: نتایج نیروی برشی وارنر-براتزلر، شاخص تجزیه میوفیبریل، میزان کلاژن، ظرفیت نگه‌داری آب و حلالیت کل پروتئین در جدول ۲ نشان داده شده است. تأثیر نوع مارینادشده، زمان و اثر متقابل آنها بر هر یک از پارامترهای مورد بررسی معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). با افزایش طول دوره

1. Myofibrillar Protein Solubility

نگـه‌داری، میـزان نیـروی لازم جهـت بـرش اسـتیک گوساله در همه نمونه‌ها کـاهش یافـت؛ بـه‌طـوری‌کـه حداقل نیروی برشی وارنـر–براتزلـر در دو نمونـه S1 (حاوی ۲۵ میلی‌لیتر شیره مارچوبه) و S3 (حاوی ۲۵ میلـی‌لیتـر شـیره مارچوبـه+۱۰ میلـی‌لیتـر سـرکه بالزامیک+۶۵ میلـی‌لیتـر آب مقطـر) مشـاهده گردیـد (P<۰/۰۵). از طرف دیگـر افـزایش شـاخص تجزیـه میوفیبریل در همه نمونـه‌هـای تیمـار شـده بـویژه در نمونه S1 با شدت و سـرعت بـالاتری در مقایسـه بـا نمونه شاهد رخ داد و بـه‌طـور پیوسـته در طـول دوره نگه‌داری مشـاهده شـد (P<۰/۰۵). ایـن موضـوع بـه تشکیل باندهای پروتئینـی بـا وزن مولکـولی پـایین و پروتئولیز پروتئین‌های میوفیبریلی توسـط سـولفیدریل پروتئازهای مارچوبه مرتبط است. در اثر ایجاد شرایط بهینه برای فعالیت بیشتر پروتئازهـای گیـاهی افـزوده شـده / طبیعـی گوشـت بخصـوص کاتپسـین‌هـای لیزوزومی طی دوره رسیدن این پدیـده رخ مـی‌دهـد. مهم‌ترین اتفاقی که در گوشت طی دوره ترد شدن رخ می‌دهد شکسته شدن باند I و از بین رفـتن اتصـالات میوفیبریلی در اثر فعالیت آنزیم‌های پروتئازی است که با گذشت زمان تعداد این تکه‌های میوفیبریلی افزایش می‌یابد (۱۸). تعداد تکه‌هـای میـوفیبریلی موجـود در سارکوپلاسـم سـلول‌هـای عضـلانی توسـط شـاخص تجزیه میوفیبریل تعیـین مـی‌گـردد (۲۷). شدت تردی گوشت وابستگی زیادی به میزان تضعیف و شکسته شدن ساختارهای میوفیبریلی دارد و به‌همین دلیـل مـی‌تـوان از شـاخص تجزیـه میوفیبریـل بـرای پیش‌بینی شـدت تـردی گوشـت اسـتفاده کـرد (۳۱). شاخص تجزیه میوفیبریلی در مقایسه با نیروی برشـی وارنر–براتزلر، میزان رسـیدن گوشـت را بـه صـورت مستقیم‌تری می‌سنجد زیرا در گوشت خام اندازه‌گیری می‌شود و در نتیجـه، نمونـه از اثـرات جـانبی پخـتن گوشـت محفـوظ مـی‌مانـد (۲۵). در واقـع افـزایش حلالیت پروتئین‌ها (که در بخش رابطه بـین حلالیـت کل پروتئین‌ها با حلالیت پـروتئین‌هـای میـوفیبریلی و سارکوپلاسمی بررسی خواهند شد) و کـاهش نیـروی برشی وارنر–براتزلر تیمارهای حاوی شـیره مارچوبـه، در افزایش شاخص تجزیه میوفیبریلی ایـن نمونـه‌هـا بخوبی منعکس شده است. نتایـج حـاصـل از این پـژوهش بـا نتـایج کـیم و همکـاران (۲۰۱۳) و سلطانی‌زاده و همکـاران (۲۰۰۸) هـم‌خـوانی داشـت (۱۴، ۲۷).

افزایش میزان کلاژن محلول نیز در همه نمونه‌های مارینادشده در مقایسه با نمونه کنترل (P<۰/۰۵) طـی ۴۸ ساعت نگه‌داری، که به عنوان شـاخص پروتئـولیز بافت پیوندی بکار برده شده است، ناشـی از افـزایش نفوذپـذیری و حلالیـت فیبرهـای کـلاژن و بهبـود پروتئـولیز بافـت‌هـای پیونـدی ماننـد پـری‌میزیـوم و اندومیزیوم و تخریب اتصالات عرضی بـین فیبرهـای کلاژن در طول زمان بـود (۱۹). به‌نظر می‌رسـد کـه پروتئازها بر پروتئوگلیکان‌ها (به‌عنـوان پل‌های بین تارهای عضلانی که تارهای کـلاژن نـوع دوم را بهـم متصل می‌کنند) و همچنین کلاژن‌ها موثر باشند (۲۴). افزایش میزان کلاژن پس از تیمار آنزیمی را مـی‌تـوان بـه هیدروکسـی‌پـرولین آزاد اولیـه گوشـت و هیدروکسی‌پـرولین آزاد شـده در اثـر عملکـرد آنـزیم کلاژناز و فرآیند حرارتی اعمال شده در طـول پخـت نسبت داد. در واقع در اثر عملکرد پروتئـازهـای ذکـر شده، حلالیت کلاژن افـزایش یافتـه و تبـدیل بـه ژل فشرده شد (۲۹، ۱۸). بـا توجـه بـه مقایسـه میـانگین ظرفیت نگه‌داری آب تیمارهای مارینادی که در جدول ۲ آورده شده است، روند افزایشی ظرفیـت نگـه‌داری آب طی ۴۸ ساعت فقـط در تیمـار S1 ملاحظـه شـد (P<۰/۰۵) که می‌تواند به نقش شیره مارچوبـه در دور کردن pH ایـن نمونـه از نقطـه ایزوالکتریـک مربـوط باشـد. در حـالی کـه کـاهش ظرفیـت نگـه‌داری آب

تیمارهای S3 و S2 در مقایسه با نمونه کنترل (P<۰/۰۵) می‌تواند ناشی از کاهش pH طی گلیکولیز و یا در اثر وجود سرکه بالزامیک و به دنبال آن دناتوراسیون و رسوب پروتئین‌ها باشد. در نتیجه گروه‌های واکنش پذیر جهت اتصال با مولکول‌های آب کاهش می‌یابد.

ظرفیت نگه‌داری آب، توانایی گوشت برای نگه‌داری آب طبیعی یا آب افزوده شده به آن در شبکه فضایی خود است. عوامل فیزیولوژیکی (میزان گلیکوژن، سرعت و میزان کاهش pH پس از کشتار، گونه، نژاد، سن، جنس، نوع عضله، ترکیب و موقعیت تشریحی آن)، شرایط پرورش (الگوهای تغذیه‌ای، استفاده از محرک‌های رشد، فعالیت‌های قبل از کشتار) و عوامل حین کشتار و فرآوری (جمود نعشی، شوک الکتریکی، راندمان سرد، استخوان‌گیری گرم، مواد و روش انتقال، بسته‌بندی، دمای نگه‌داری پس از کشتار، شرایط انجماد و خروج از انجماد و رساندن) از جمله عوامل مؤثر بر ظرفیت نگه‌داری آب است (۵). ظرفیت نگه‌داری آب به عنوان یک ویژگی کیفی مهم، انعکاسی از توانایی عضلات برای به دام انداختن و نگه‌داشتن آب درون ساختارهای خود می‌باشد که با رطوبت خروجی رابطه معکوس دارد. رطوبت خروجی توانایی گوشت برای حفظ آب موجود بین فیلامنت‌های ضخیم و نازک را طی اعمال فشار خارجی منعکس می‌کند و همچنین حفظ ویتامین‌ها، پروتئین‌های محلول در آب، پیش‌سازهای مواد عطر و طعم و همچنین حجم آب آزاد شده را تحت تأثیر قرار می‌دهد. عضلاتی که به راحتی آب را از دست می‌دهند خشک شونده بوده و در مدت زمان سردسازی، نگه‌داری، حمل و نقل و فروش مقدار زیادی آب از دست می‌دهند (۱۳). رطوبت خروجی به‌دلیل تأثیر بر ارزش تغذیه‌ای، ظاهر و دلپذیری گوشت یک ویژگی کیفی مهم گوشت تلقی می‌شود. تغییرات ظرفیت نگه‌داری آب شاخص خوبی از تغییرات به‌وجود آمده در بارالکتریکی و ساختار عضله است. پروتئین‌های میوفیبریلی عامل اصلی جذب آب در عضلات هستند (۲۷). تغییر ظرفیت نگه‌داری آب در نتیجه مارینادکردن گوشت توسط محلول‌های با pH بالاتر/ پایین‌تر از نقطه ایزوالکتریک در مطالعات سایر محققان نیز به چشم می‌خورد؛ به‌طوری‌که ایرجی‌فر و همکاران (۱۳۹۷) گزارش کردند با افزایش غلظت اسیداستیک میزان جذب محلول مارینادکردن، وزن نمونه‌های تیمار شده و ظرفیت نگه‌داری آب به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. این در حالی است که درصد رطوبت خروجی نمونه‌ها نیز به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (۱۱).

حلالیت کل پروتئین‌ها به‌عنوان اولین شاخص اندازه‌گیری ویژگی‌های عملکردی پروتئین‌ها مطرح می‌باشد (۱۸). افزایش حلالیت پروتئین‌ها در pH اسیدی یا قلیایی به‌دلیل افزایش بار مثبت یا منفی پروتئین‌ها است. در نتیجه با افزایش نیروی دافعه بین رشته‌های پروتئینی، حلالیت نیز افزایش می‌یابد. در نقطه ایزوالکتریک به‌دلیل فقدان نیروی دافعه، پروتئین‌ها حداقل حلالیت را دارند که منجر به رسوب و ته نشینی پروتئین‌ها می‌شود (۲۲). در این پژوهش حلالیت کل پروتئین‌ها تحت تأثیر نوع مارینادکردن، زمان و اثر متقابل آنها قرار گرفت؛ به‌طوری‌که روند صعودی در تیمار S1 در طول دوره رسیدن مشاهده شد (P<۰/۰۵). در تیمار S3 علی‌رغم افزایش جزئی که تا ۲۴ ساعت پس از مارینادکردن رخ داد حلالیت معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). همچنین در فاصله زمانی ۴۸-۲۴ ساعت کاهش اندکی در میزان حلالیت کل مشاهده شد (P<۰/۰۵). در نمونه کنترل، تغییرات رخ داده برعکس نمونه S3 بود؛ به‌طوری‌که در فاصله زمانی ۲۴ الی۴۸ ساعت، حلالیت کل پروتئین‌های نمونه کنترل به‌صورت ناگهانی افزایش یافت

(P<۰/۰۵). این موضوع دلالت بر افزایش نفوذپذیری و حلالیت پروتئین‌های میوفیبریلی و سارکوپلاسمی در اثر عملکرد پروتئازهای مارچوبه همراه با کاتپسین‌ها و کالپائین‌ها در سیستم پیچیده‌ای نظیر گوشت دارد که منجر به تفکیک فیلامنت‌ها و نفوذ بهتر پروتئازها/ بافر استخراج در این نمونه می‌شود (۲۱). تغییرات در تیمار S2 نیز تا انتهای دوره نگه‌داری یکنواخت ارزیابی شد؛ به‌طوری‌که در بازه زمانی ۴ تا ۲۴ ساعت و ۲۴ تا ۴۸ ساعت نگه‌داری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد اختلاف آماری معنی‌داری در افزایش حلالیت پروتئین‌ها مشاهده نشد (P>۰/۰۵) ولی در بازه زمانی ۴ تا ۴۸ ساعت نگه‌داری نمونه‌های مارینادی، اختلاف آماری معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج آیونسکو و همکاران (۲۰۰۸) و سولیوان و کالکینز (۲۰۱۰) مطابقت داشت (۱۱، ۲۹).

جدول ۲- اثرات متقابل نوع مارینادو زمان مارینادبر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و بافتی استیک گوساله

Table 2- Interaction effects of marinade type and marination time on physicochemical and textural properties of beefsteak

متغیرها Variables	نوع مارینادMarinade type	مدت زمان مارینادMarination time (h)			
		0	4	24	48
WBSF(N) نیروی برشی وارنر- براتزلر	**S0**	56.10 ± 5.70^{Aa}	49.95 ± 6.35^{Ab}	50.43 ± 6.88^{Aab}	38.96 ± 5.80^{Bc}
	S1	56.03 ± 5.43^{Aa}	35.51 ± 3.93^{Cc}	38.66 ± 3.17^{Db}	33.69 ± 3.17^{Dc}
	S2	56.01 ± 5.74^{Aa}	51.41 ± 6.33^{Aab}	44.11 ± 4.52^{Bc}	43.23 ± 3.90^{Ac}
	S3	56.02 ± 5.54^{Aa}	38.07 ± 5.98^{Bbc}	40.27 ± 2.13^{Cb}	36.38 ± 4.63^{Cc}
MFI شاخص تجزیه میوفیبریل	**S0**	20.4 ± 2.08^{Ad}	23.4 ± 2.05^{Dc}	34.5 ± 2.20^{Db}	40.45 ± 4.00^{Da}
	S1	20.5 ± 2.01^{Ad}	34.57 ± 2.9^{Ac}	44.81 ± 4.00^{Ab}	51.45 ± 5.24^{Aa}
	S2	20.6 ± 2.03^{Ad}	26.9 ± 2.48^{Cc}	38.45 ± 2.90^{Cb}	42.28 ± 3.64^{Ca}
	S3	20.2 ± 2.00^{Ad}	32.56 ± 3.01^{Bc}	41.33 ± 3.88^{Bb}	$44.36\pm4,57^{Ba}$
Collagen (mg/g) میزان کلاژن	**S0**	3.49 ± 3.17^{Ad}	3.99 ± 3.80^{Dc}	6.06 ± 5.93^{Db}	7.63 ± 7.50^{Da}
	S1	3.49 ± 3.14^{Ad}	6.56 ± 5.81^{Ac}	9.13 ± 6.17^{Ab}	9.99 ± 8.71^{Aa}
	S2	3.49 ± 3.15^{Ad}	5.06 ± 4.64^{Cc}	7.06 ± 6.88^{Cb}	8.63 ± 7.44^{Ca}
	S3	3.49 ± 3.14^{Ad}	6.06 ± 5.65^{Bc}	8.63 ± 7.33^{Bb}	9.63 ± 8.57^{Ba}
WHC(%) ظرفیت نگهداری آب	**S0**	46.17 ± 3.36^{Ac}	52.62 ± 3.86^{Bb}	57.24 ± 3.19^{Ba}	57.40 ± 3.77^{Ba}
	S1	46.19 ± 3.08^{Ac}	57.43 ± 5.54^{Aab}	59.22 ± 5.85^{Aa}	60.48 ± 5.36^{Aa}
	S2	46.15 ± 3.26^{Ac}	50.98 ± 3.93^{Bb}	53.02 ± 4.04^{Ca}	55.55 ± 4.00^{Ca}
	S3	46.16 ± 3.17^{Ac}	46.72 ± 3.27^{Cc}	53.35 ± 4.93^{Cab}	54.56 ± 3.40^{Ca}
TPS (mg/g) حلالیت کل پروتئین	**S0**	48.2 ± 4.00^{Ad}	49.91 ± 5.01^{Cbc}	50.73 ± 4.85^{Cb}	74.62 ± 6.93^{Ba}
	S1	48.2 ± 4.01^{Ad}	59.47 ± 5.84^{Ac}	74.02 ± 6.70^{Ab}	92.7 ± 8.79^{Aa}
	S2	48.2 ± 4.00^{Ad}	51.45 ± 5.31^{Cbc}	51.55 ± 5.33^{Cab}	52.54 ± 5.15^{Da}
	S3	48.2 ± 3.99^{Ad}	56.97 ± 5.20^{Bab}	57.53 ± 5.48^{Ba}	56.57 ± 4.93^{Cbc}

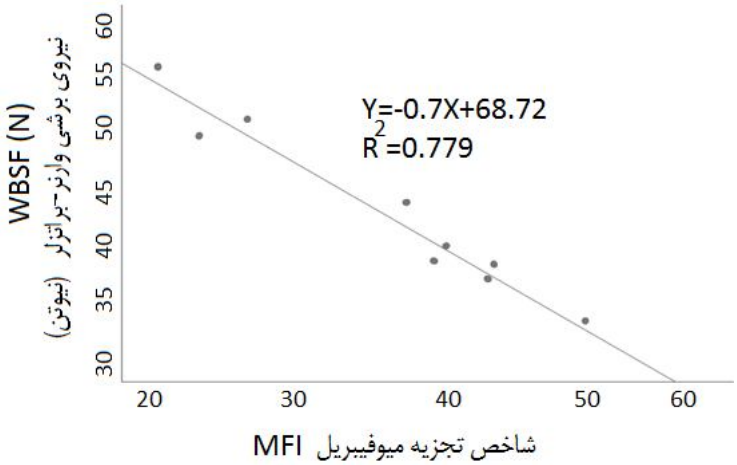
حروف A-D در ستونها و a-d در سطرها به ترتیب نشان دهنده تفاوت بین نوع مارینادو مدت زمان مارینادمی‌باشد. حروف غیرمشابه نشان دهنده تفاوت معنی‌دار تیمارها در سطح ۵ درصد است.

Letters A-D in columns and a-d in rows show marinade type and marination time, respectively. Non-similar letters indicate significant difference between treatments at P<0.05.

آیونسکو و همکاران (۲۰۰۸) بیان کردند اثر توأم آنزیم همراه با مدت زمان بیشتر تماس آنزیم با سوبسترا، منجر به هیدرولیز بیشتر پروتئین و به دنبال آن افزایش قابل توجه حلالیت پروتئین‌های میوفیبریلی نمونه‌ها شد (۱۰). در واقع پروتئولیز با اصلاح ویژگی‌های پروتئین‌های گوشت، منجر به‌افزایش حلالیت آنها می‌شود. تجزیه زنجیره‌های پلی‌پپتیدی و کاهش طول آنها، تضعیف شبکه کلاژن و دناتوراسیون حرارتی

پروتئین‌های گوشت از جمله عوامل اصلی مورد اشاره هستند (۱۵).

رابطه بین شاخص تجزیه میوفیبریل و نیروی برشی وارنر- براتزلر: نتایج حاصل از بررسی رابطه بین شاخص تجزیه میوفیبریل و نیروی برشی وارنر-براتزلر استیک گوساله مارینا‌د شده با شیره مارچوبه در شکل ۱ نشان داده شده است. طبق این نتایج، بین شاخص تجزیه میوفیبریل و نیروی برشی وارنر-براتزلر رابطه رگرسیونی خطی معکوس برقرار است. بدین معنی که با افزایش شاخص تجزیه میوفیبریلی نمونه‌های مارینا‌د شده، میزان نیروی لازم جهت برش استیک گوساله کاهش می‌یابد. آماره پیرسون نشان‌دهنده رابطه معنی‌دار (p=-۰/۸۸) بود. افزایش معنی‌دار شاخص تجزیه میوفیبریلی استیک گوساله همراه با کاهش نیروی برشی وارنر-براتزلر تیمارهای مارینادی در مقایسه با نمونه کنترل، که بخوبی در ضریب همبستگی (R^2=۰/۷۸) منعکس شده است، حاکی از ارتباط بین این دو پارامتر می‌باشد. در واقع با توجه به R^2 تعیین‌شده، رابطه بین شاخص تجزیه میوفیبریلی استیک گوساله و نیروی لازم جهت برش نمونه‌های مارینا‌د شده با شیره مارچوبه نشان از هیدرولیز بیشتر پروتئین‌های میوفیبریلی به قطعه‌های کوچکتر در صفحات Z و یا اطراف آن توسط کالپائین‌ها و کاهش تعداد واحدهای سارکومری در بافت و به دنبال آن افزایش شاخص تجزیه میوفیبریل طی دوره رسیدن می‌باشد (۳۱).



شکل۱- ارتباط شاخص تجزیه میوفیبریل ونیروی برشی وارنر-براتزلر در نمونه‌های تیمار شده با شیره مارچوبه

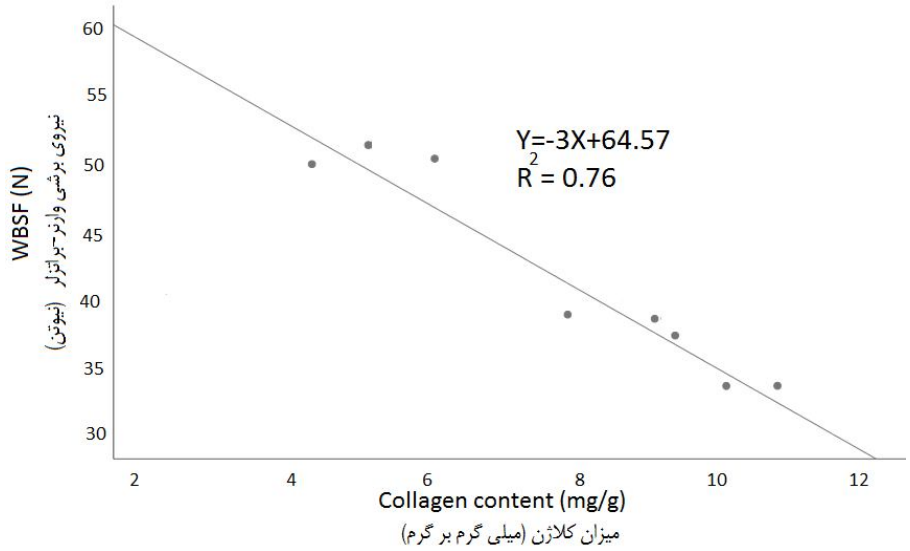
Figure 1. Correlation of Myofibrillar Fragmentation Index (MFI) versus Warner-Bratzler Shear Force (WBSF) of asparagus juice treated samples

رابطه بین محتوای کلاژن و نیروی برشی وارنر- براتزلر: بررسی رابطه بین محتوای کلاژن و نیروی برشی وارنر-براتزلر حاکی از وجود رابطه رگرسیونی خطی معکوس بین این دو متغیر و معنی‌داری آماره پیرسون (p=-۰/۸۷) می‌باشد (شکل ۲)؛ به‌طوری‌که با افزایش میزان کلاژن در نمونه‌های استیک گوساله مارینا‌د شده با شیره مارچوبه، نیروی برشی وارنر-براتزلر کاهش یافت. افزایش معنی‌دار محتوای کلاژن همراه با کاهش نیروی برشی وارنر-براتزلر نمونه‌های استیک گوساله مارینا‌د شده با شیره مارچوبه در مقایسه با نمونه شاهد، که بخوبی در ضریب همبستگی (R^2=۰/۷۶) منعکس شده است، حاکی از ارتباط بین این دو پارامتر بود. در واقع با توجه به R^2 بدست آمده رابطه بین محتوای کلاژن محلول استیک گوساله و نیروی لازم جهت برش نمونه‌های مارینا‌د شده با شیره مارچوبه نشان از بهبود

پروتئولیـــز پروتئین‌های عضله بویژه تخریب میـوزین توسط سولفیدریل پروتئازهای مارچوبه دارد.

همچنین با توجه به وجود همبسـتگی مثبـت بـین حلالیت کلاژن و محتوای آن در نمونه‌های تیمار شده با پروتئازهای گیاهی (۱۸)، افزایش حلالیت کلاژن در اثر حرارت در کاهش نیروی لازم جهت برش نمونه‌ها مؤثر است. عامل اصلی تعیین کننده کیفیت خـوراکی گوشت از نظر مصرف‌کنندگان بافت آن است و عوامل مؤثر بر بافت گوشت الف) عوامل پیش از کشتار مانند گونه، جنس، سن و ب) عوامل پـس از کشـتار ماننـد روش رساندن و نحوه پخت می‌باشند. همچنین برخی از ویژگی‌های عضله از قبیل ترکیب شـیمیایی، مقـدار بافـت پیونـدی، pH، انـدازه عضـله و نیـز سـاختار و عملکرد آن بـر مقـدار تـردی تأثیرگـذار اسـت (۱۲). افزایش تردی گوشت طی دو مرحله رخ می‌دهد؛ فـاز سریع و فاز کند. فاز سـریع تـردی بـه‌دلیـل تضـعیف ساختمان عضـله و سـاختمان میـوفیبریلی (از طریـق شکست اتصال اکتومیوزین) و فاز کند تردی از طریق تضعیف بافت پیوندی (پری‌میزیوم و انـدومیزیوم) رخ می‌دهـد (۴). بـرای ارزیـابی تـردی اسـتیک گوشـت گوساله، هر چه میانگین حداکثر نیـروی برشـی ثبـت شده توسط دستگاه بافـت سـنج کمتـر باشـد، بافـت گوشـت نـرم‌تـر و تردتـر بـوده و از کیفیـت بـالاتری برخوردار خواهد بـود (۲). کـاهش نیـروی برشـی را می‌توان به دو دلیل نسبت داد؛ اولی شامل تـأثیر اسید بر بافت پیوندی عضله است کـــه منجر به افزایـــش حلالیت بافت پیوندی و به دنبـال آن کـاهش نیـروی برشی می‌شود. ترکیبات اسیدی مانند سـرکه و آبلیمـو باعث تخریب پیوندهای هیدروژنی در فیبرهای کلاژن و در نتیجه متورم شدن بافت پیوندی می‌گـردند. علت دیگر، تأثیر بر ظرفیت نگه‌داری آب در عضـله اسـت. مارینـاد کردن گوشت توسط محلول‌های با pH بـالاتر/ پایین‌تر از نقطـه ایزوالکتریـک و دور شـدن از نقطـه ایزوالکتریک پروتئین‌های اصلی عضله، سبب تورم در پروتئین‌هـای میـوفیبریلی و بافـت پیونـدی، افـزایش ظرفیت نگـه‌داری آب، رطوبـت و در نهایـت کـاهش نیروی برشی وارنر-براتزلر می‌گردد (۷) که به خـوبی در نتایج ظرفیت نگه‌داری آب و حلالیت پروتئین‌های نمونه‌های مارینـاد شده در مقایسه با نمونـه کنتـرل در این پژوهش منعکس شده است.

رابطـه بـین حلالیـت کـل پروتئیـن‌هـــا بـــا حلالیـت پروتئین‌های سارکوپلاسمی و میوفیبریلی: نتایج بررسـی روابـط موجـود بـین حلالیـت کـل بـا حلالیت پروتئین‌های سارکوپلاسمی و میـوفیبریلی بـه ترتیب در شکل ۳ (الف و ب) نشان داده شده اسـت. رابطـــه بـــین حلالیـــت کـــــل و حلالیـــت پـــروتـــئـــین‌هـــای سارکوپلاســمی بـــه صـــورت رگرسیونی خطی مثبت تعیـین گردیـد؛ بـه‌نحـوی‌کـه افزایش حلالیت پروتئین‌های سارکوپلاسمی نمونه‌های استیک گوساله مارینـاد شده با شیره مارچوبه نشـان از افزایش حلالیت کل نمونه‌ها داشت (شـکل ۳ الـف). آماره پیرسون نیز نشان‌دهنده رابطه معنی‌دار بـین ایـن متغیرهـا بـود (p۰=/۹۴). افـزایش معنـی‌دار حلالیـت پـروتئین‌هـای سارکوپلاســمی و نیـز حلالیـت کـل (پروتئین‌های محلول در آب+پروتئین‌های محلـول در نمک) تیمارهای مارینادی در مقایسه با نمونه کنتـرل بخـوبی در ضـریب همبسـتگی مثبـت (R^2=۰/۸۹) منعکس شده است. همچنین بین دو متغیر حلالیت کل و حلالیـت پـروتئین‌هـای میـوفیبریلی نیـز رابطـه رگرسیونی خطی مثبت برقرار می‌باشد (شـکل ۳ ب)؛ به‌نحوی‌که افزایش حلالیت کل نشان دهنـده افـزایش حلالیـت پـروتئین‌هـای میـوفیبریلی اسـتیک گوسـاله مارینـاد شده بود.

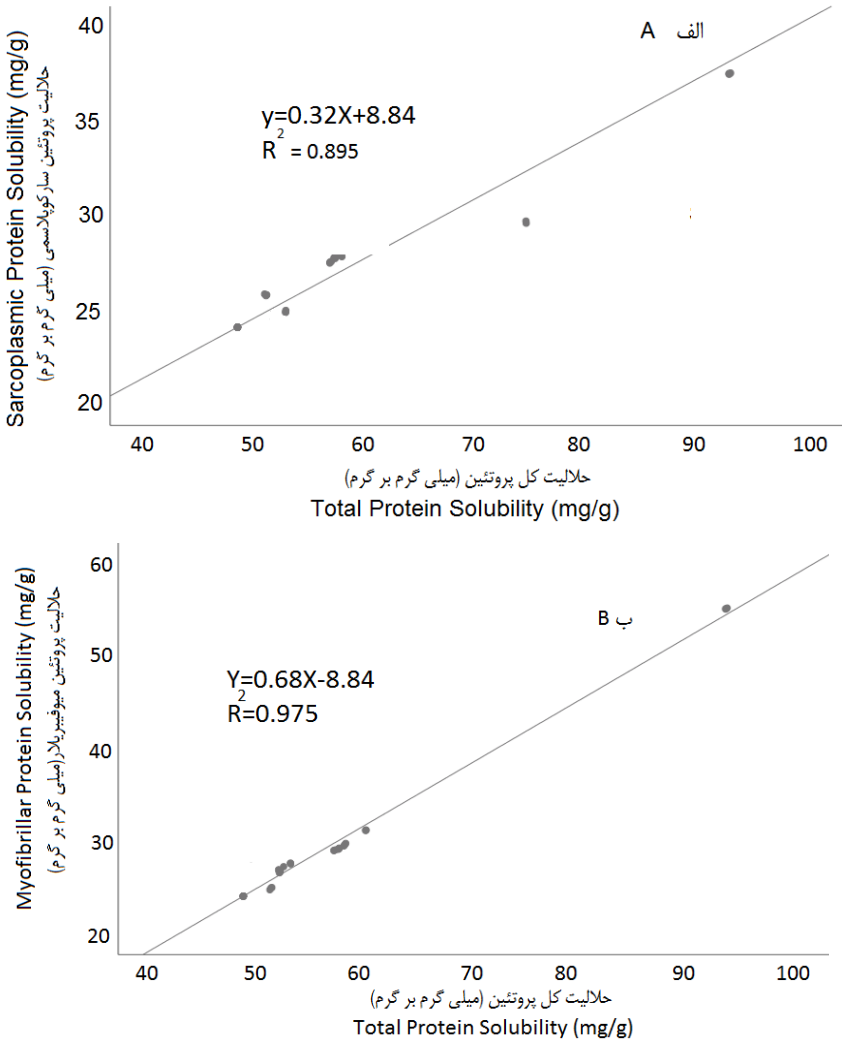


شکل ۲- ارتباط نیروی برشی وارنر-براتزلر و محتوای کلاژن در نمونه‌های تیمار شده با شیره مارچوبه

Figure 2. Correlation of Warner-Bratzler Shear Force (WBSF) versus collagen content of asparagus juice treated samples

آماره پیرسون نشان داد که این رابطه کاملاً معنی‌دار می‌باشد (p۰=/۹۸). علاوه بر این افزایش معنی‌دار حلالیت پروتئین‌های میوفیبریلی و حلالیت کل در مقایسه با نمونه شاهد بخوبی در ضریب همبستگی مثبت (R^2=۰/۹۷۵) منعکس شده است که حاکی از ارتباط بین این دو پارامتر می‌باشد. در واقع با توجه به رابطه بین حلالیت کل با حلالیت پروتئین‌های سارکوپلاسمی و میوفیبریلی نمونه‌های مارینا‌د شده با شیره مارچوبه، پروتئولیز پروتئین‌های میوفیبریلی و سارکوپلاسمی بهبود یافت. این پدیده در اثر فعالیت سولفیدریل پروتئازهای مارچوبه و همچنین هم‌افزایی شیره مارچوبه و کاهش pH اعمال شده طی گلیکولیز/ حضور سرکه بالزامیک در طول دوره رسیدن رخ داد. مهم‌ترین تغییرات حاصله در اثر افزایش یا کاهش pH در گوشت، شامل تضعیف ساختار پروتئینی و بهبود پروتئولیز پروتئین‌های میوفیبریلی به‌خصوص تخریب میوزین توسط سولفیدریل پروتئازهای مارچوبه و همچنین رها شدن آنزیم‌های لیزوزومی به‌دلیل نزدیک شدن pH محیط به محدوده فعالیت این آنزیم‌ها بیان شده است (۳۲). در واقع افزایش حلالیت پروتئین‌ها پس از تیمار آنزیمی، به افزایش نفوذپذیری میوفیبریل‌ها مرتبط بوده که در نهایت منجر به تجزیه آسان پروتئین‌ها می‌شود (۲۱، ۲۳). بر اساس نتایج این پژوهش، افزایش حلالیت و قابلیت استخراج پروتئین‌ها با افزایش نسبت شیره مارچوبه در محلول مارینادی ارتباط مستقیم داشت. از طرف دیگر افزایش قابلیت استخراج پروتئین‌ها با کاهش نیروی برشی مرتبط می‌باشدکه حاکی از ارتباط قابل توجهی بین میزان نیروی لازم جهت برش نمونه‌های پخته شده با میزان حلالیت پروتئین‌های سارکوپلاسمی، میوفیبریلی و حلالیت کل بود (۲۸). بررسی انجام شده توسط ها و همکاران (۲۰۱۳) نشان داد که افزایش طول دوره گرمخانه‌گذاری تا مدت ۲۴ ساعت باعث هیدرولیز کامل کلاژن و نیز تخریب همه پروتئین‌های میوفیبریلی بجز تروپونین C می‌گردد (۸). میودال و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند حلالیت بیشتر پروتئین‌های میوفیبریلی نسبت به پروتئین‌های سارکوپلاسمی نشان دهنده مقاومت پروتئین‌های سارکوپلاسمی در برابر هیدرولیز آنزیمی است (۱۹). با این وجود حلالیت پروتئین‌های سارکوپلاسمی

به‌صورت غیرمستقیم بر تردی مؤثر است (۱۸). مقصود و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند که وجود همبستگی مثبت بین حلالیت کل با حلالیت پروتئین‌های سارکوپلاسمی در نمونه‌های تیمار شده با پروتئازهای گیاهی نقش مهمی در تردی گوشت شتر دارد که با نتایج این پژوهش هم‌خوانی دارد (۱۸).

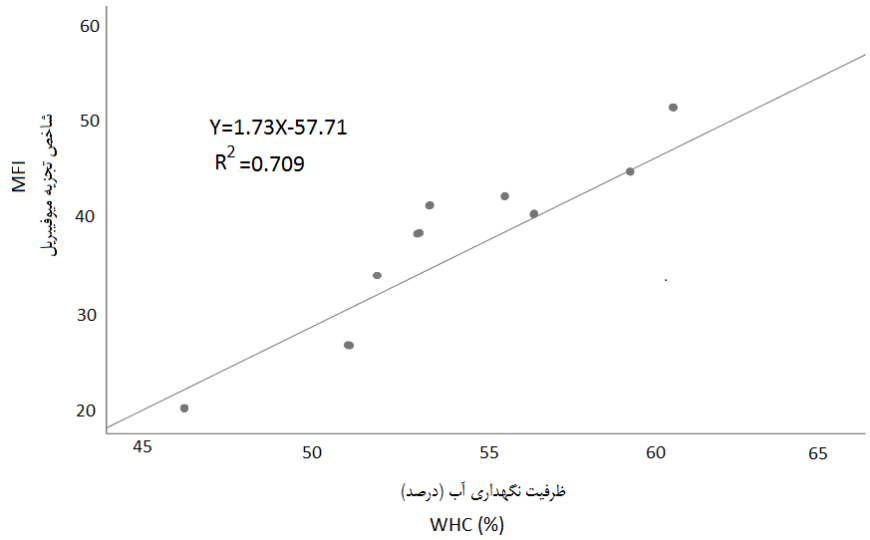


شکل۳- ارتباط حلالیت کل پروتئین با حلالیت پروتئین سارکوپلاسمی (الف) و حلالیت پروتئین میوفیبریلار (ب) در نمونه‌های تیمار شده با شیره مارچوبه

Figure 3. Correlation of Total Protein Solubility (TPS) versus Sarcoplasmic Protein Solubility (SPS): (A) and Myofibrillar Protein Solubility (MPS): (B) of asparagus juice treated samples

رابطه بین ظرفیت نگه‌داری آب و شاخص تجزیه میوفیبریل: بررسی رابطه بین ظرفیت نگه‌داری آب و شاخص تجزیه میوفیبریل نشان داد بین این دو متغیر رابطه رگرسیونی خطی مثبت برقرار بود؛ به‌طوری‌که افزایش ظرفیت نگه‌داری آب در استیک گوساله حاکی از افزایش شاخص تجزیه میوفیبریل در نمونه‌های مارینا شده بود (شکل ۴). بر اساس آماره پیرسون این رابطه معنی‌دار بود (p=۰/۸۴). افزایش معنی‌دار ظرفیت نگه‌داری آب و شاخص تجزیه میوفیبریل در استیک گوساله در مقایسه با نمونه شاهد، که بخوبی در ضریب همبستگی مثبت (R^2=۰/۷۰۹) منعکس شده است، حاکی از ارتباط بین این دو پارامتر می‌باشد. در

واقع با توجه به R^2 بدست آمده رابطه بین ظرفیت نگه‌داری آب و شاخص تجزیه میوفیبریل نمونه‌های مارینادشده با شیره مارچوبه حاکی از بهبود پروتئولیز پروتئین‌های میوفیبریلی توسط سولفیدریل پروتئازهای مارچوبه و پروتئازهای طبیعی گوشت (کاتپسین‌ها، کالپائین‌ها و کمپلکس پروتئازی چند کاتالیزوری) و همچنین ناشی از اثر هم‌زمان حضور شیره مارچوبه و کاهش pH اعمال شده طی پروسه گلیکولیز و همچنین حضور سرکه بالزامیک طی دوره رسیدن بود.



شکل٤- ارتباط ظرفیت نگهداری آب و شاخص تجزیه میوفیبریل در نمونه‌های تیمار شده با شیره مارچوبه

Figure 4. Correlation of Water Holding Capacity (WHC) versus Myofibrillar Fragmentation Index (MFI) of asparagus juice treated samples

نتیجه‌گیری کلی

اثرات ترد سازی شیره مارچوبه در محلول مارینادی به مکانیسم‌های متنوعی شامل پروتئولیز پروتئین‌های میوفیبریلی و افزایش حلالیت کلاژن توسط سولفیدریل پروتئازهای مارچوبه نسبت داده می‌شود. به علت مقادیر قابل توجه پروتئین‌های میوفیبریلی اصلی (اکتین و میوزین)، تعیین اثر قابل توجه مارینادبا شیره مارچوبه بر پروتئولیز و تردی استیک گوساله دشوار است. با این وجود، نتایج پژوهش حاضر نشان داد که دلیل اصلی تخریب پروتئولیتیک پروتئین‌های میوفیبریلی و بافت پیوندی علاوه بر حضور سولفیدریل پروتئازهای مارچوبه، شرایط محیطی بهینه برای فعالیت بیشتر پروتئازهای طبیعی گوشت طی دوره رسیدن از طریق تغییرات pH توسط شیره مارچوبه و سرکه بالزامیک می‌باشد.

منابع

1.Alvarado, C. and McKee, S. 2007. Marination to improve functional properties and safety of poultry meat. Journal of Applied Poultry Research, 16: 113–120.

2.Aziz Mohamadi, M., Bolandi, M. 2017. The effect of transglutaminase enzyme on the physicochemical, sensory and textural properties of veal steaks. Iranian J.of Food Science and Technology, 72:14. 37-45 (In Persian).

3.Bhat, Z.F., Morton, J.M., Susan L. Mason, L.M., and Bekhit, A.E.D. 2018. Applied and emerging methods for meat tenderization: A Comparative Perspective. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 17: 481-485.

4.Calkins, C.R., and Sullivan, G. A. 2007. Adding enzymes to improve beef tenderness. Beef facts, product enhancement. National Cattlemen's Beef Association, University of Nebraska. Available online: http://www.beefresearch.org.

5.Cheng, Q., and Sun, D.W. 2008. Factors affecting the water holding capacity of red meat products: A review of recent research advances. Critical Review in Food Science Nutrition, 48:2. 137-159.

6.Culler, R.D., Parrish Jr, F.C., Smith, G.C., and Cross, H.R. 1978. Relationship of myofibril fragmentation index to certain chemical, physical and sensory characteristics of bovine longissimus muscle. J.of Food Science, 43: 4. 1177-1180.

7. Desmond, E.M. and Troy, D.J. 2001. Effect of lactic and citric acid on low-value beef used for emulsion-type meat products. Lebensm.-Wiss. u. - Technology, 34: 374–379.

8.Ha, M., Bekhit A.E.D, Carne A., Hopkins D.L. 2013 Characterization of kiwifruit and asparagus enzyme extracts and their activities toward meat proteins. Food Chemistry, 136: 989–998.

9.He, F., Kim, H.W., Hwang, K.E., Song D.H., Kim Y.J., Ham, Y.K., Kim, S.Y., Yeo, I.J., Jung, T.J., and Kim, C.J. 2015. Effect of ginger extract and citric acid on the tenderness of duck breast muscles, Korean J.Food Science Annual, 35: 6. 721-730.

10.Ionescu, A., Aprodu, I., Pascaru, G. 2008. Effect of papain and bromelin on muscle and collagen proteins in beef meat. The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati Food Technology, New Series. p: 9-16.

11.Irajifar, M., Varidi, M.J., Varidi, M. and Zahedi, Y. Effects of sodium chloride / acetic acid marinade on some quality properties of Iranian one-humped camel meat. 2018. J.of food research, 28: 1. 145-160 (In Persian).

12. Juarez, M., Aldai, N., López-Campos, Ó., Dugan, M.E.R., Uttaro, B., and Aalhus, J.L. 2012. Beef texture and juiciness. Handbook of meat and meat processing. CRC Press, Boca Raton, FL, 177-206.

13.Kadim, I.T., Al-Karousi, A., Mahgoub, O., Al-Marzooqi, W., Khalaf, S.K., Al-Maqbali, R.S., Al-Sinani, S.S.H., and Raiymbek, G. 2013. Chemical composition, quality and histochemical characteristics of individual dromedary camel (*Camelus dromedarius*) muscles. Meat Science, 93: 564-571.

14.Kim, H., Choi, Y., Choi, J.i., Kim. Hack., Lee. Mi., Hwang. Ko., Song Dong., Lim. Yun., Kim, Cheon. 2013. Tenderization effect of soy sauce on beef M. *biceps femoris*. Food Chemistry, 139: 1. 597–603.

15.Kristinsson, H.G., and Rasco, B.A. 2000. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 40: 43-81.

16.Lawrence, T.E., Dikeman, M.E., Hunt, M.C., Kastner, C.L. and Johnson, D.E. 2003. Staged injection marination with Calcium Lactate, Phosphate and salt may improve beef water-binding ability and palatability traits. Meat Science, 65. 967-972.

17.Lawrie, R.A. and Ledward, D. 2006. Meat science. 7 th ed., CRC Press, USA, 442 p.

18.Maqsood, S., Manheem, K., Gani, A., and Abushelaibi, A. 2018. Degradation of myofibrillar, sarcoplasmic and connective tissue proteins by plant proteolytic enzymes and their impact on camel meat tenderness. J.of Food Science Technology, 55: 9. 3427-3438.

19. Mudalal, S., Babini, E., Cavani, C., and Petracci, M. 2014. Quantity and functionality of protein fractions in chicken breast fillets affected by white striping. J.of Poultry Science, 93: 2108-2116.

20.Naveena, B.M., Kiran, M., Reddy, K.S., Ramakrishna, C., Vaithiyanathan, S., and Devatkal, S.K. 2011. Effect of ammonium hydroxide on ultrastructure and tenderness of buffalo meat. Meat Science. 88: 727–732.

21.Naveena, B.M., Mendiratta, S.K., and Anjaneyulu, A.S.R. 2004. Tenderization of buffalo meat using plant proteases

from *Cucumis trigonus Roxb* (Kachri) and *Zingiber officinale roscoe* (Ginger rhizome). Meat Science. 68: 3. 363-369.
22. Palafox, H., Co´rdova-Murueta, J.H., Navarrete del Toro, M.A. and Garcı´a-Carren˜o, F.L. 2009. Protein isolates from jumbo squid (*Dosidicus gigas*) by pH-shift processing. Process Biochemistry. 44: 584-587.
23. Pawar, V.D., Mule, B.D., and MacHewad, G.M. 2007. Effect of marination with ginger rhizome extract on properties of raw and cooked chevon. of Muscle Foods, 18: 4. 349-369.
24. Phillips, A.L., Means, W.J., Kalchayanand, N., McCormick, R.J. and Miller, K.W. 2000. Bovine placental protease specificity towards muscle connective tissue proteins. J.of Animal Science. 78: 1861–1866.
25. Prado, C.S., and De Felicio, P.E. 2010. Effects of chilling rate and spray-chilling on weight loss and tenderness in beef strip loin steaks. Meat Science, 86: 430-435.
26. Ramezani, R., Aminlari, M., and Fallahi, H. 2003. Effect of chemically modified soy proteins and ficin-tenderized meat on the quality attributes of sausage. Journal of Food Science, 68: 1. 85-88.
27. Soltanizadeh, N., Kadivar, M., Keramat, J., and Fazilati, M. 2008. Comparison of fresh beef and camel meat proteolysis during cold storage. Meat Science. 80: 892-895.
28. Soltanizadeh, N., Kadivar, M. 2010. Chemistry and technology of meat and meat Products, Isfahan University of Technology Publishing Center, Isfahan 472p. (In Persian).
29. Sullivan, G.A., and Calkins, C.R. 2010. Application of exogenous enzymes to beef muscle of high and low-connective tissue. Meat Science. 85: 4. 730-734.
30. Sultana, A., Nakanishi, A., Roy, B., Mizunoya, W., Tatsumi, R., Ito, T., and Ikeuchi, Y. 2008. Quality improvement of frozen and chilled beef formis with the application of salt-bicarbonate solution. Asian Australasian Journal of Animal Science. 21: 6. 903-911.
31. Taylor, R.G., Geesink, G.H., Thompson, V.F., Koohmaraie, M. and Goll, D.E. 1995. Is Z disk degradation responsible for postmortem tenderization? Journal of Animal Science, 73: 1351-1367.
32. Warriss, P.D. 2000. Meat science – an introductory text. CABI Publishing, UK, 310 p.
33. Yonezawa, H., Kneda, M., Uchikoba, T. 1997. A cysteine protease from young stems of Asparagus: Isolation, Properties, and Specificity. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 62: 1. 28-33.

EJFPP, Vol. 13 (2): 61-78
http://ejfpp.gau.ac.ir

Evaluation of correlation between physicochemical and textural attributes of marinated beefsteak based on regression equations

Mona Mazaheri Kalahrodi[1], Homa Baghaei[1*], Bahare Emadzadeh[2], Marzieh Bolandi[1]
[1]Department of Food Science, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan, Semnan, Iran.
[2]Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), Mashhad, Khorasan-Razavi, Iran.
Received: 2020/02/06 ; Accepted: 2020/08/19

Abstract

Background and objectives: Tenderization is one of the most important processes in the meat industry. This process is usually influenced by natural or artificial factors. Among the tenderizing methods, the application of natural compounds such as fruits and vegetables that have a high production rate, is of particular importance. Asparagus has a good proteolytic activity among various plant sources, which indicates there is a sufficient potential for its utilization in the meat industry. The purpose of this study was to evaluate the relationship between physicochemical and textural attributes of beefsteak marinated with asparagus (*Asparagus officinalis* L.) juice in improving meat tenderness based on mathematical equations as a fast, safe and cost-effective way to determine the quality of meat marinated with natural ingredients.

Materials and methods: After extraction of asparagus juice, the effect of different asparagus juice and balsamic vinegar treated samples including 25 ml asparagus juice, 25 ml asparagus juice+75 ml distilled water and 25 ml asparagus juice+10 ml balsamic vinegar+ 65 ml distilled water treatments on Warner-Bratzler shear force (WBSF), myofibrillar fragmentation index (MFI), collagen content, water holding capacity (WHC) and total protein solubility (TPS) were evaluated at 4 °C for 48 h. Then, the relationships between these variables (WBSF versus MFI and collagen content, TPS versus SPS and MPS, also MFI versus WHC) in improving beef M. *semitendinosus* steak tenderness were investigated and their equation was assigned. Also, correlation coefficient (R^2) was used to determine the relationship between variables.

Results: Results indicated decreased WBSF and increased MFI, collagen content, WHC as well as TPS in treated samples in comparison to the control during storage ($P<0.05$). In the present study, the obtained relationships (between WBSF versus MFI and collagen content, TPS versus SPS and MPS, also MFI versus WHC) are simple linear regression equations. According to the results, the correlation between MFI and WBSF and the relationship between collagen content and WBSF was the reverse linear ($P<0.05$). While, the positive correlation was observed between total proteins solubility and solubility of sarcoplasmic and myofibrils proteins as well as the relationship between WHC and MFI ($P<0.05$). As the amount of low weight myofibrillar fragments produced from protein hydrolysis increases in sarcoplasm of muscle cell, the ability of these small peptides to bind water molecules increases, followed by improved solubility of sarcoplasmic, myofibrils and total proteins implies softer meat texture. On the other hand, increasing the solubility of collagen during cooking and converting it to soluble gelatin, especially in acidic condition provided by glycolysis / balsamic vinegar, can lead to reduced required force for cutting tissue, followed by more tender meat.

*Corresponding author: H.baghaei@damghaniau.ac.ir

Conclusion: Based on the findings, asparagus juice influenced both myofibrillar proteins and connective tissues thereby, resulted in improving physicochemical and textural characteristics of beefsteak, indicating the possibility of using asparagus juice to enhance the quality of meat and meat products. Therefore, improving beefsteaks tenderness as the main research objective was achieved. The asparagus juice may be used as a new natural source in the formulation of seasoning, sauces and tenderizing agents, especially in the diet of the elderly people who have problems in swallowing and mastication to use more protein resources.

Keywords: Asparagus, Meat, Natural protease, Regression correlation, Tenderness