HNSJ Humanitarian & Natural Sciences Journal
ISSN: (e) 2709-0833
www.hnjournal.net
مجلة العلوم الإنسانية والطبيعية
مجلة علمية محكمة (التصنيف: NSP)
معامل التأثير العربي للعام 2020 = 0.44

عنوان البحث

استخلاص وتنقية انزيم Transglutaminase من بعض النباتات واستعماله في صناعة الصوصج

حلا عبد الواحد الحساني[1] زينة كاظم اليونس[1]

[1] قسم علوم الاغذية/ كلية الزراعة – جامعة البصرة

بريد الكتروني: zenaalyounis@yahoo.com

تاريخ النشر: 2021/08/01م تاريخ القبول: 2021/07/24م

المستخلص

هدفت الدراسة الحالية الى استخلاص انزيم Transglutaminase EC : 2.3.2.13 من اربع انواع من النباتات (اكليل الجبل ، السلق ، الفجل ، الجرجير) باستعمال تسع محاليل استخلاص تضمنت ماء مقطر ومحلول كلوريد الصوديوم NaCl بتركيز 3%، محلول كلوريد الصوديوم NaCl بتركيز 5، محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.1 مولاري ورقم هيدروجيني 6،5 ، محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.1 مولاري ورقم هيدروجيني 7،5 ، محلول Tris – Hcl بتركيز 0.2مولاري ورقم هيدروجيني 7 ، محلول Tris – Hcl بتركيز 0.2مولاري ورقم هيدروجيني 8 ، محلول Tris – Hcl بتركيز 0.1مولاري ورقم هيدروجيني 7 و محلول Tris – Hcl بتركيز 0.1 مولاري ورقم هيدروجيني 8 ، تم تحديد افضل مصدر وافضل محلول لاستخلاص الانزيم ووجد ان نبات السلق كان افضل مصدر للحصول على الانزيم مقارنةً بالمصادر الاخرى و محلول (pH 8،Tirs –HCl 0.1M) هو افضل محلول استخلاص اذ اعطى اعلى فعالية نوعية للانزيم والتي بلغت 8.104 وحدة/ملغم من ثم ركز المحتوى البروتيني للمستخلص الانزيمي باستعمال كبريتات الامونيوم بنسبة اشباع 20–60% ، ثم اجريت عملية الديلزة وبعدها تم تحضير ثلاث عينات من الصوصج المصنعة من لحم البقر واضيف لها الانزيم بنسب مختلفة ثم اجرى لها فحص التركيب الدقيق للعينات.

RESEARCH ARTICLE

EXTRACTION AND PURIFICATION OF TRANSGLUTAMINASE ENZYME FROM PLANTS AND USING IT IN SAUSAGE INDUSTRY

Hala Abdel Wahed Alhasani[1] ، Zena Kadhim Al-Younis[1]

[1] Department of Food Sciences / College of Agriculture - University of Basra
Email: zenaalyounis@yahoo.com

Published at 01/08/2021 **Accepted at 24/07/2021**

Abstract

The current study aimed to extract trans-glutaminase EC: 13.2.3.2 from four types of plants (rosemary، chard، radish، arugula) using nine extraction solutions that included Distilled water. Sodium chloride 3% solution ، Sodium chloride 5% solution، sodium phosphate solution 0.1 M and an pH 6.5، sodium phosphate 0.1 M and an pH of 7.5 ،Tris - Hcl solution 0.2 M and an pH 7، Tris - Hcl solution 0.2 M and an pH 8، Tris - Hcl solution 0.1 M and an pH 7 and Tris - Hcl solution 0.1 M and an pH 8. The best source and best solution for extracting the enzyme were determined، and it was found that chard was the best source for obtaining the enzyme compared to other sources، and (Tirs -HCl 0.1M، pH 8) solution was the best extraction solution as it gave the highest specific activity of the enzyme، which amounted to 8.104 units/mg Then the protein content of the enzymatic extract was concentrated using ammonium sulfate with a saturation rate of 20-60%، then dialysis was performed .Then، Three samples of sausage were prepared from beef and add enzyme with a different proportions and Scanning electrro Microscope was done.

المقــدمة:

الانزيمات هي محفزات بيولوجية تعمل على تسريع التفاعلات الكيميائية في الكائنات الحية ،اذ تستخلص من الخلايا وتستعمل لتحفيز مجموعة واسعة من العمليات ذات الاهمية التجارية (12) وتلعب الانزيمات دورا جوهريا في تحسين الخصائص الفيزيائية والكيمائية والحسية للمنتجات الغذائية لذلك يمكن استعمالها كبدائل عن المضافات الكيميائية التي قد تكون ضارة وخطرة خاصة اذا تم تطبيقها في مجال تصنيع الاغذية ومن هذه الانزيمات انزيم Transglutaminase الذي يستعمل في الغالب لتحسين الخواص الوظيفية للبروتينات في الغذاء (4) (14) .

يعد Transglutaminase (EC:2.3.2.13) احد انزيمات النقل القادر على تحفيز تفاعلات نقل مجموعة الاسيل من خلال تشكيل روابط تساهمية بين البروتينات و الببتيدات والامينات المختلفة ، اذ يحفز تكوين الروابط بين البروتينات بواسطة تفاعل نقل الأسيل من مجموعة كاربوكسي اميد(γ− carboxyamide group) للحامض الأميني الكلوتامين الطرفي(مانح مجموعه اسيل) الى مجموعة الامين العائدة للحامض الاميني اللايسين (مستقبل مجموعة اسيل)الموجود في الطرف الاخر (4) (12) ،ان الروابط التساهمية التي يكونها هذا الانزيم بين البروتينات تعمل على تحسين الخواص الوظيفية للمنتجات الغذائية مثل منتجات الالبان ومنتجات الحبوب ومنتجات اللحوم ،ومن هذه الخواص الوظيفية النسجه ،النكهة ، قابلية حمل الماء ، اللزوجة ، الثبات الحراري ، زيادة فترة الحفظ وتقليل حساسية الاشخاص لبعض الاغذية وتعد هذه من اهم خصائص جودة الغذاء (6) (10) .(2)

استعمل انزيم Transglutaminase في تصنيع منتجات اللحوم مثل الصوصج وكرات اللحم وشرائح اللحم (2) اذ يعمل الانزيم على تقوية شبكة بروتينات اللحوم مما يؤدي ال متانتها ومرونتها (9) كما يقوم بتقليل الصفات غير المرغوبة في اللحوم المصنعة مثل اللزوجة العالية واللصق المفرط للحوم (1).

بسبب قلة الدراسات عن استخلاص انزيم Transglutaminase من النباتات هدفت الدراسة الى:

استخلاص انزيم Transglutaminase من النباتات (اكليل الجبل ، السلق ، الفجل ، الجرجير) وتحديد افضل مصدر له وافضل محلول لاستخلاصه .

1- تنقية الانزيم باستعمال كبريتات الامونيوم .

2- ادخال الانزيم المنقى جزئياً في صناعة الصوصج.

طـرق العمل :

1- استخلاص الانزيم : استخلص انزيم الترانس كلوتامينيز من نبات السلق باستخدام تسع محاليل استخلاص وهي ماء مقطر ، محلول كلوريد الصوديوم NaCl بتركيز 3 %، محلول كلوريد الصوديوم NaCl بتركيز 5 % ، محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.2 مولاري ورقم هيدروجيني 6.5 ، محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.1 مولاري ورقم هيدروجيني 7 ، محلول Tris – acetic

acid بتركيز 0.2 مولاري ورقم هيدروجيني 7 ، محلول Tris – acetic acid بتركيز 0.2 مولاري ورقم هيدروجيني 8 ، محلولTris – acetic acid بتركيز 1.0مولاري ورقم هيدروجيني 7 ، محلولTris – acetic acid بتركيز 1.0 مولاري ورقم هيدروجيني 8 ، استخلص الانزيم حسب طريقة (11) وذلك بخلط النباتات التي تم ذكرها سابقاً مـــــع المحاليل الاستخلاص بنسبة 1:1 (وزن : حجم) حيث خـــلط 30 غم من النـــماذج (اكليل الجبل ، السلق ، الفجل ، الجرجير) الطازجة كلاً منها على حدا مع 30 مل من محاليل الاستخلاص وتم تركها منقوعه في المحاليل لمدة 24 ساعة في الثلاجة وبعدها تم خلطها بالخلاط الكهربائي (Blender) لمدة دقيقتين لحين الحصول على معلق متجانس ، ثم رشح المزيج بواسطة قطعة قماش من الململ (Cheese cloth) معدة بعدة طبقات تلاه الطرد المركزي بسرعة 10000 xg لمدة 20 دقيقة وبدرجة حرارة 4 مْ ، أهمل الراسب واخذ الراشح واستعمل في تقدير الفعالية الانزيمية حسب طريقة (3) وتركيز البروتين حسب طريقة (7).

2- تنقية الانزيم : ركز الانزيم باستخدام كبريتات الامونيوم بنسبة اشباع (20-60%) بعد ذلك اجريت عملية النبذ المركزي بسرعة 1000×g لمدة نصف ساعة وبعدها اجريت عملية الديلزة للانزيم مقابل الماء ولمدة 24 ساعة مع تبديل الماء المقطر كل 6 ساعات ، ثم جمع المستخلص المديلز والذي يسمى بالأنزيم المنقى جزئيا.

3- صناعة الصوصج : صنع الصوصج حسب طريقة (14) وذلك حسب المكونات التالية :

أ- المواد :

- لحم بقر شرح 100% .
- بطاطا مسلوقة 15% .
- ماء بارد 20% مل .
- ملح 2%
- كزبرة ، سكر ، فلفل اسود 0.5% .
- ثوم باودر، حليب مجفف 0.3% .
- قرفه 1% .
- ببريكا 1.3% .

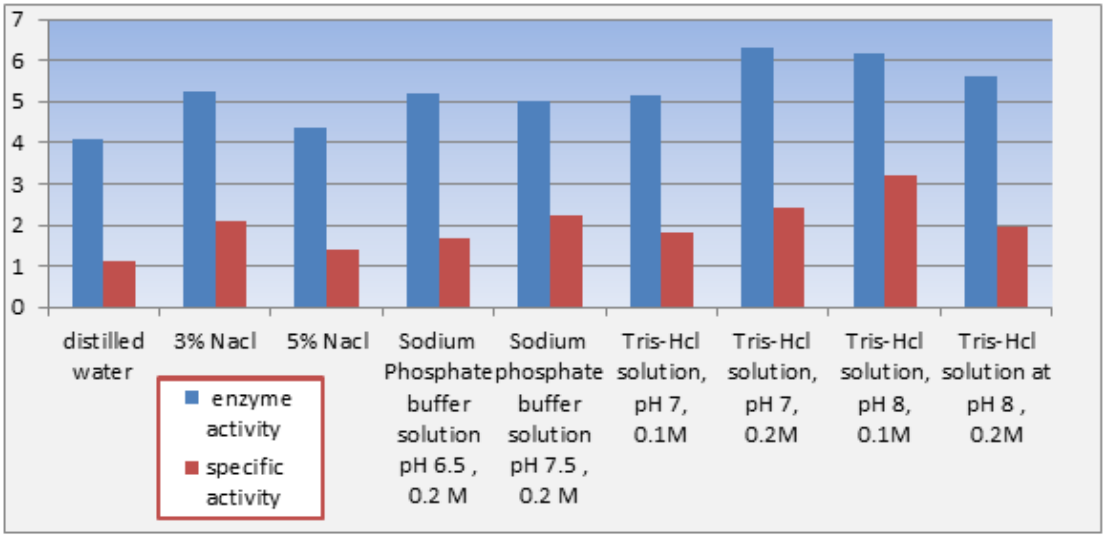
ب –طريقة العمل : فرم اللحم في ماكنة الفرم (Meat grinder)) وبعدها اضيف بقية المكونات الاخرى الى خليط اللحم ، من ثم قسم الخليط الى 3 عينات وبأوزان متساوية واضيف الانزيم المنقى جزئيا الى العينة الاولى بنسبة 2.5% ، و الثانية بنسبة 5 % اما العينة الثالثة تركت دون اضافة انزيم كعينة قياسية ، من ثم وضعت في الاكياس الخاصة بصناعة الصوصج ورصت وبعدها تم غلقها بشكل محكم ووضعت في الثلاجة لحين اجراء الاختبار التالي.

4- فحص التركيب الدقيق

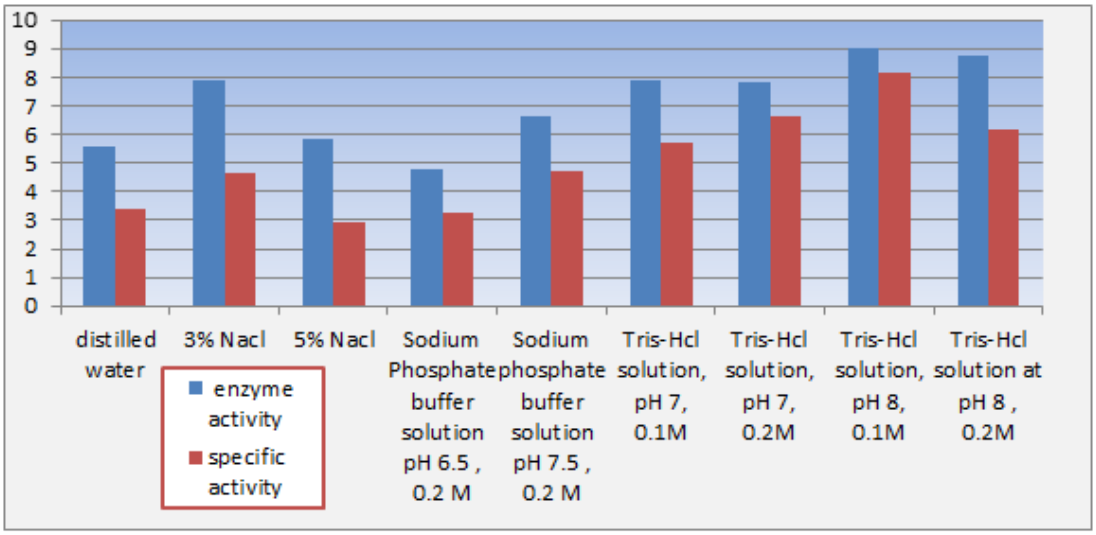
يطلق على هذا الفحص Scanning electro Microscope (SEM)، اذ درست الصفات المورفولوجيا حسب الطريقة التي أشار اليها (5) باستعمال المجهر الإلكتروني الماسح لعينات الصوصج الثلاثة .

النتائج والمناقشة :

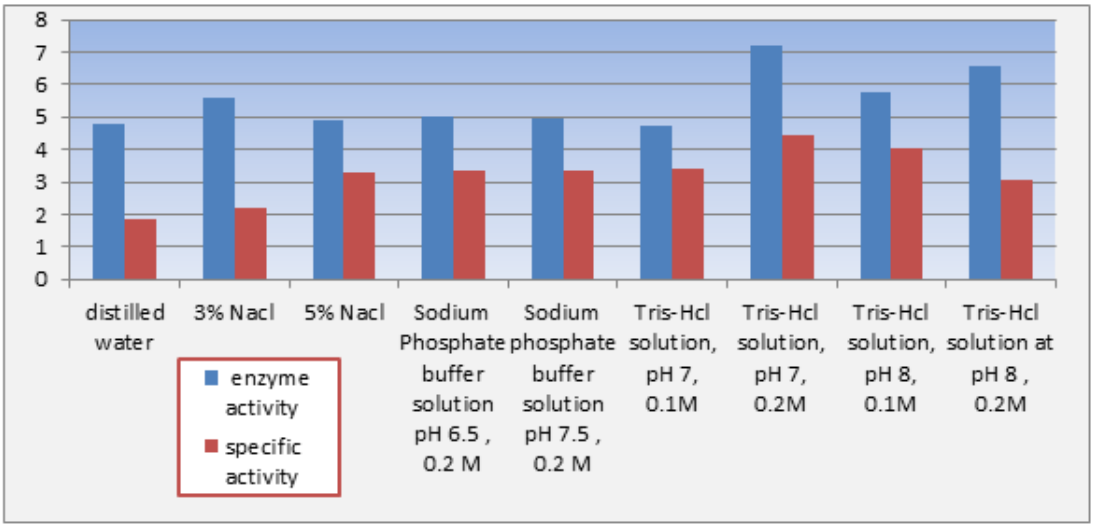
1- استخلاص الانزيم تبين النتائج الموضحة في الاشكال (1، 2، 3، 4) الفعالية الانزيمية والنوعية لأنزيم TG المستخلص من النباتات، حيث يوضح الشكل(1) ان افضل محلول لاستخلاص الانزيم من نبات اكليل الجبل هو محلول Tris–Hcl ذو رقم هيدروجيني 8 و 0.2 مولاري) و بلغت الفعالية الانزيمية (6.32 وحدة/مل والفعالية النوعية 3.059 وحدة /ملغم)، بينما يبين الشكل (2) ان افضل محلول لاستخلاص الانزيم من نبات السلق هو محلول الاستخلاص Tris– Hcl بتركيز 0،1 مولاري وبرقم هيدروجيني 8 وبلغت الفعالية الانزيمية والنوعية (9.02 وحدة/مل – 8.104 وحدة /ملغم) على التوالي ، يوضح شكل (3) افضل محلول استخلاص للانزيم من نبات الفجل هو محلول Tris– Hcl بتركيز 0،2 مولاري وبرقم هيدروجيني 8 وبلغت الفعالية الانزيمية والنوعية (7.18 وحدة/مل – 2.972 وحدة /ملغم) على التوالي ، بينما يوضح الشكل (4) افضل محلول استخلاص الانزيم من نبات الجرجير هو محلول فوسفات الصوديوم الدارئ 0.1 مولاري و برقم هيدروجيني 8 و بلغت الفعالية الانزيمية والنوعية (5.08 وحدة/مل – 3.618 وحدة /ملغم) على التوالي، وبعد مقارنة النتائج الموضحة في الاشكال السابقة تبين ان افضل نبات لاستخلاص انزيم الترانس كلوتاميناز من النباتات هو نبات السلق وافضل محلول استخلاص هو Tris– Hcl بتركيز 0،1 مولاري وبرقم هيدروجيني 8 ، اذ انه اعطى اعلى فعالية نوعية مقارنة بمحاليل الاستخلاص الاخرى .



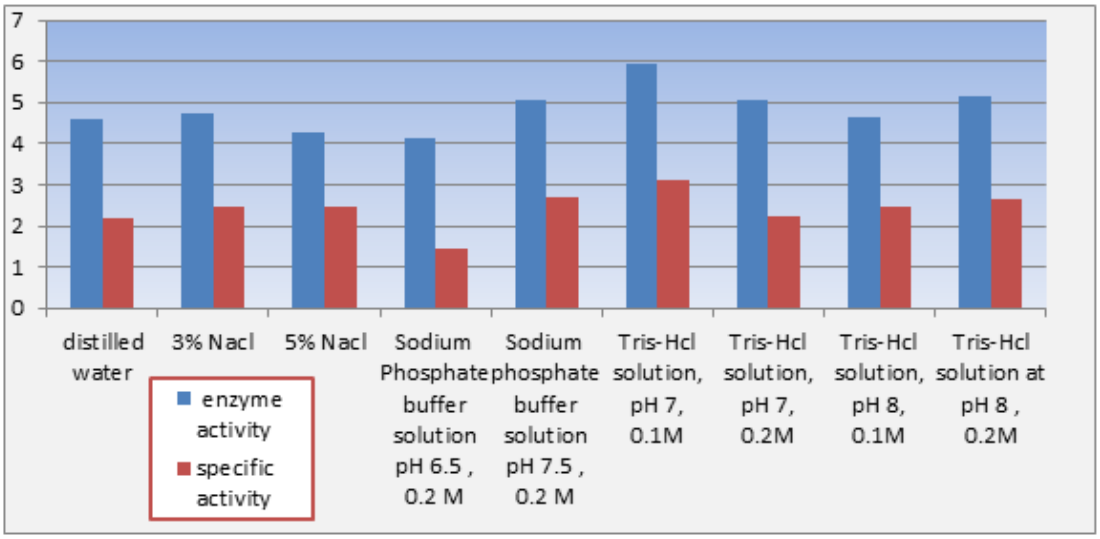
شكل (1) الفعالية الانزيمية والنوعية لأنزيم TG المستخلص من نبات اكليل الجبل باستعمال محاليل مختلفة



شكل (2) الفعالية الانزيمية والنوعية لأنزيم TG المستخلص من نبات السلق باستعمال محاليل مختلفة



شكل (3) الفعالية الانزيمية والنوعية لإنزيم TG المستخلص من نبات الفجل باستعمال محاليل مختلفة



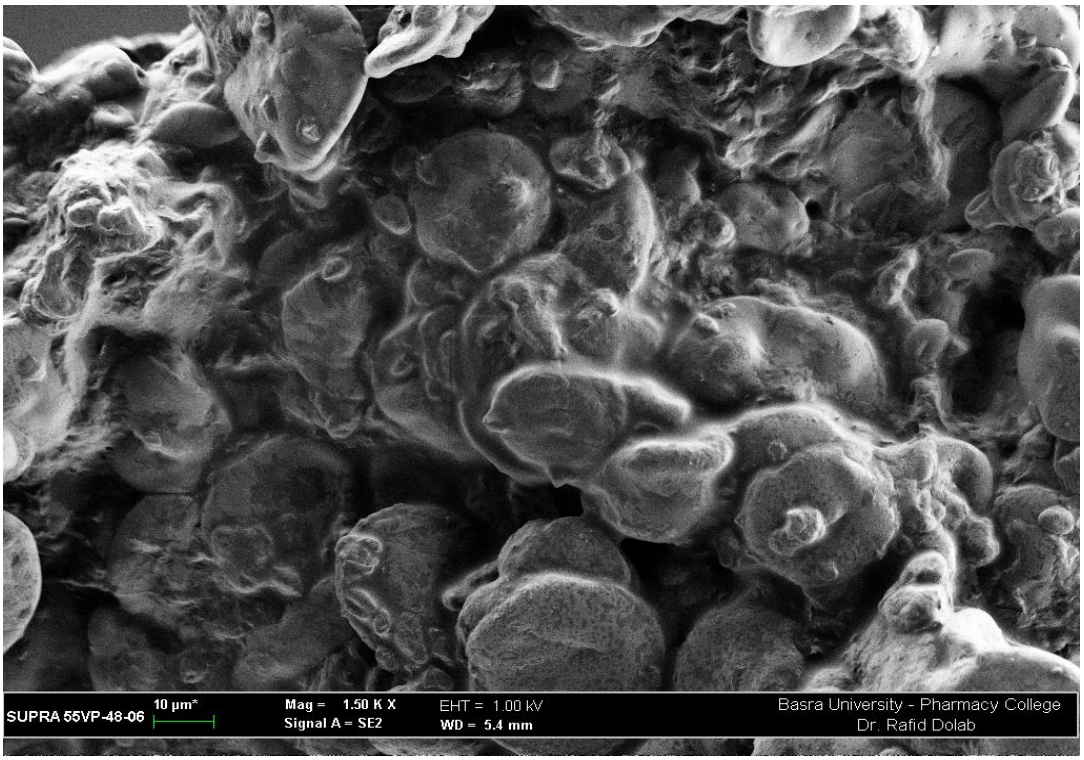
شكل (4) الفعالية الانزيمية والنوعية لانزيم TG المستخلص من نبات الجرير باستعمال محاليل مختلفة

2-تنقية الانزيم :

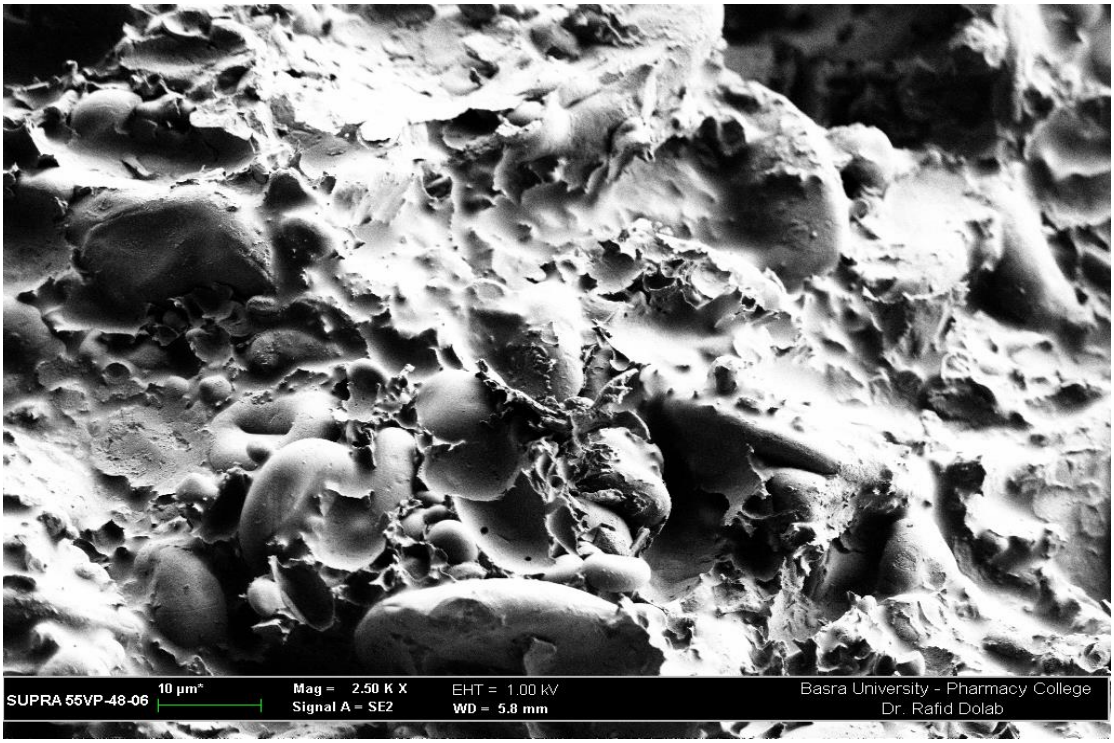
2-1-تركيز الانزيم : رُكز انزيم الترانس كلوتامينيز المستخلص من نبات السلق باستخدام املاح كبريتات الامونيوم بنسب اشباع تراوحت بين 20-60 % ، حيث جمع الراسب الناتج من الطرد المركزي واذيب في قليل من الماء المقطر وتمت ديلزته بالماء المقطر للتخلص من كبريتات الامونيوم ثم قيست فعالية الانزيم وتركيز البروتين فيه واعطت هذه الخطوة فعالية انزيمية ونوعية مقدارها و 38.36 وحدة /مل 0.91 وحدة /ملغم على التوالي ، وحققت هذه الخطوة تنقية جزئية للانزيم بلغت 5.3 مرة وحصيلة انزيمية 59.59 % مقدارها ، واعطت هذه النتائج فعالية انزيمية اعلى مما توصل اليها الباحث (8) التي بلغت10.51 وحدة /مل ، بينما بلغت الفعالية النوعية لدى الباحث 79.62 وحدة /ملغم و حقق الباحث في هذه الخطوة تنقية جزئية قدرها 1.68 والحصيلة 32.34% وبتالي النتائج التي قيد الدراسة اعطت فعالية انزيمية وحصيلة اعلى مما توصل اليها البحث (8) اثناء دراسته على استخلاص انزيم الترانس الكلوتامينيز المستخلص من نبات اكليل الجبل، و يعتبر الانزيم الناتج من هذه الخطوة منقى تنقية جزئية (Partially Purified) ويرجع السبب نتيجة التداخل في ذائبية مديات واسعة مختلفة من الاوزان الجزيئية للبروتينات.

3- فحص التركيب الدقيق Scanning electron microscope (SEM)

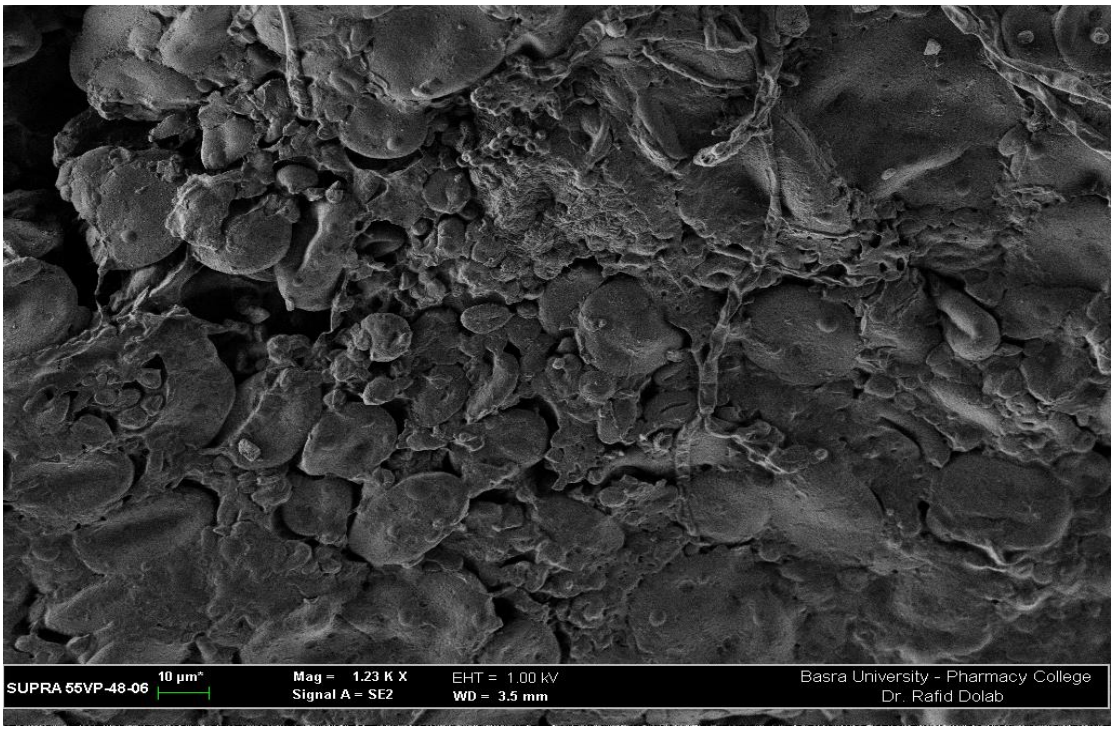
تبين الاشكال**(5)** و **(6)** و **(7)** نتائج فحص التركيب الدقيق (SEM) لعينات الصوصج الثلاثة



شكل (5) فحص التركيب الدقيق لعينة للصوصج (.CO)



شكل (6) فحص التركيب الدقيق لعينة للصوصج (2.5% TGase)



شكل (7) فحص التركيب الدقيق لعينة للصوصج (5% TGase)

لوحظ من خلال الاشكال السابقة للعينات ان عينة الكونترول شكل (5) التي لا تحتوي على الانزيم يكون شكلها مختلف تماماً عن بقية الاشكال التي تحتوي على الانزيم ، حيث يوضح ان عينة الصوصج غير حاوية على الانزيم نسجتها والشبكة الهلامية فضفاضة وغير منتظمة الشكل وليست ملساء ولا يوجد اي ترابط بين نسجه اللحم المكون للصوصج ويظهر انها على شكل كتل متفرقه فيما بينها ، بينما الشكل(6) التي تحتوي على انزيم بنسبة (2.5% من TGase) كانت ذات شكل شبه منتظم حيث قل فيها التكتلات واختلفت فيها نسجه الصوصج عن

العينة السابقة الكونترول وحدث ترابط ما بين تلك التكتلات من خلال تواجد TGase المستخلص من نبات السلق مما يدل على قيام الانزيم بعمله وهو احداث الترابط ما بين تكتلات اللحم ، ونلاحظ في الشكل (7) العينة الحاوية على 5%من TGase اختفاء تام للتكتلات المتكونة في عينة الكونترول وتكون شبكة هلامية اكثر صرامة وانتظاماً في هذه العينة بالتحديد نتيجة زيادة تركيز الانزيم فيها وقدرته على عمل شبكة ما بين جزيئات اللحم وبالتالي تبدو بشكل قطعة واحده من اللحم ، حيث لا يظهر هناك اي تكتلات او ظهور فجوات متفرقه بين كتلة اللحم وبذلك اعطت هذه العينة المرونة المناسبة للصـــوصج اتفقـــت هذه النتائج مع ما وجده (5) عند اضافته TGase لبيركر الدجاج.

❁ المصادر

1. **Ahmed، A. M.، Nasu، T.، Huy، D. Q.، Tomisaka، Y.، Kawahara، S.، & Muguruma، M. (2009)**. Effect of microbial transglutaminase on the natural actomyosin cross-linking in chicken and beef. *Meat Science*، 82(2)، 170-178.
2. **Chandrasekaran، M. (Ed.). (2015)**. *Enzymes in food and beverage processing*. CRC Press.
3. **Folk J. K. (1970).** Transglutaminase in: Methods in Enzymology، (ed.)، H. Tabor and C.W. Tabor، 17 : 889-894.
4. **Giosafatto، C. V. L.، Al-Asmar، A.، & Mariniello، L. (2018).** Transglutaminase protein substrates of food interest. In *Enzymes in food technology* (pp. 293-317). Springer، Singapore.
5. **Harun U. and İsmail Y.(2018).** A research on determination of quality characteristics of chicken burgers produced with transglutaminase supplementation .Food Sci. Technol، Campinas، 38(1): 19-25.
6. **Herranz، B.، C. A. Tovar، A. J. Borderias and H. M. Moreno. 2013.** Effect of high-pressure and/or microbial transglutaminase on physicochemical، rheological and microstructural properties of flying fish surimi. Innov. Food Sci. Emerg. Technol.، 20: 24-33.
7. **Lowry O. H.; N. J Rose brough A. L.; Farr، and R. J. Randoll. (1951).** Protein measurement with folin phenol reagent. J . Biol Chem.، 1(1):265 -270.
8. **M. El-Hofi ، A. Ismail1، M. Nour and O. Ibrahim .(2014) .** Acta Sci. Pol.، Technol. Aliment. 13(3) 2014، 267-278 .
9. **Marapana، R. A. U. and B. Jiang. 2004.** Protein cross-linking in food by microbial transglutaminase (MTGase) and its application and usefulness in food industry. Trop. Agric. Res. Ext.، 7: 49-61.
10. **Mirzaei، M. (2011).** Microbial transglutaminase application in food industry. Int. Conferen. Food Eng. Biotechn. 9،267-271.
11. **P.Falcone ، D.Serafini-Fracassina and S. Del duca . (1993)** Dipartimento Acta Sci. Pol.، Technol. Aliment. 13(3) 2014، 267-278 .di biologia ، Seda di Botanica ،Via Irnerio ، 42.
12. **Ray، R. C.، & Rosell، C. M. (Eds.). (2017).** *Microbial enzyme technology in food applications*. CRC Press.

13. **Robinson، P. K. (2015).** Enzymes: principles and biotechnological applications. Essays in biochemistry، 59، 1-41.
14. **Siham Abdelwhab Alamin.(2015).** Chemical Composition of different types of Sausage. American International Journal of Research in Humanities، Artsand Social Sciences .
15. **Uran، H.، & Yilmaz، I. (2018).** A research on determination of quality characteristics of chicken burgers produced with transglutaminase supplementation. *Food Science and Technology*، *38*(1)، 19-25.