Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Food Processing and Preservation

Print ISSN: 2322 - 2069
Online ISSN: 2322 - 2794

Iranian Association of Food Scientists and Technologists

Marinating beefsteak with soy sauce and broccoli (*Brassica oleracea var. italica*) juice and its effects on physicochemical properties and quality of meat during aging

Fatemeh Mirhaj[1] | Homa Baghaei[2*] | Bahareh Emadzadeh[3] | Ashkan Jebelli javan[4]

[1] Phd Student, Department of Food Industry, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran
[2] Department of Food Industry, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran, Email: baghaei.homa@yahoo.com
[3] Department of Food Nanotechnology, Food Science and Technology Research Institute, Mashhad, Iran.
[4] Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran.

Article Info

Article type:
Research Full Paper

Article history:
Received: 28.12.2019
Revised: 31.01.2020
Accepted: 06.05.2020

Keywords:
Beefsteak
Broccoli
Tenderization
Soy sauce
Marinade

ABSTRACT

Background and objectives: Protease activity of various fruits and vegetables has been previously studied. Broccoli is one of the most abundant and affordable vegetables interested by consumers and researchers due to its pleasant flavor and nutritional attributes, such as anticancer and antioxidant compounds (e.g. sulforaphane, indole-3-carbinol ,and selenium). This study was conducted to investigate the effect of broccoli juice and soy sauce on physicochemical and textural characteristics of beefsteak with the aim of tenderizing and reducing aging time.

Mateials and methods: Meat samples were separated from the beef *(Round Steak)* muscle. The steak samples were cut into cubic pieces (10 cm^3) with a weight of approximately 1 kg and free of fat. The marinade composition consisted of 2.6% (W/V) broccoli juice (protease activity: 12.3 u/g) and 25% (W/V) soy sauce were prepared in three treatments compared to control and were injected into the superficial and deep segments. The samples were analyzed at 1, 3, 24 , and 48 hours storage in the refrigerator (4 $^{\circ}C$).

Results: According to the results of the analysis of variance, the tenderization parameters of all treatments were significantly higher than control ($P < 0.05$). The value of tender parameters composed of myofibrillar fragmentation index, myofibrillar protein solubility, insoluble collagen , and shear force was better for broccoli + soy sauce treatment than the others. Also, scanning electron microscopy results of the treatment containing broccoli juice + soy sauce confirmed this finding. The highest and lowest mean value of drip loss were observed in soy sauce (1.97%) and broccoli juice (1.72%), respectively. The rate of cooking loss was decreased over 48 h storage period for all treatments. During the tenderization period, the shear force means values of all treatments showed a significant decrease due to enzymatic activity and the progress of the meat aging process. The minimum shear force mean value were recorded in broccoli + soy sauce (128.5N), broccoli juice (151.1N), soy sauce (166.8N) , and control (187.5N), respectively during cold storage. Based on our findings, the combination of broccoli juice and soy sauce can be used as an effective marinade, improving beefsteak tenderness.

Conclusion: The result of this study showed that broccoli juice may have

proteolytic components that are effective in myofibrillar proteins degradation. The proteolytic activity of these enzymes was higher at low pH. Therefore, the higher myofibrillar proteins degradation, as well as their solubility, were obtained in treatment containing broccoli + soy sauce.

Cite this article: Mirhaj, F., Baghaei, H., Emadzadeh, B., Jebelli javan, A. 2022. Marinating beefsteak with soy sauce and broccoli (*Brassica oleracea var. italica*) juice and its effects on physicochemical properties and quality of meat during aging. *Journal of Food Processing and Preservation*, 13 (3), 37-54.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/EJFPP.2022.17501.1593
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

فرآوری و نگهداری مواد غذایی
شاپا چاپی: ۳۵۴۴-۲۴۲۳
شاپا الکترونیکی: ۳۸۰۳-۲۴۲۳

ماریناد‌کردن استیک گوساله با سس سویا و شیره بروکلی (*Brassica oleracea var. italica*) و ارزیابی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و کیفی آن طی زمان رسیدن

فاطمه میرحاج[۱] | هما بقایی[۲*] | بهاره عمادزاده[۳] | اشکان جبلی‌جوان[۴]

۱. دانشجوی دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان، ایران.
۲. گروه صنایع غذایی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران، رایانامه: baghaei.homa@yahoo.com
۳. گروه نانو فناوری مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران.
۴. گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۰۷
تاریخ ویرایش: ۱۳۹۸/۱۱/۱۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۱۷

واژه‌های کلیدی:
استیک گوساله
بروکلی
ترد شدن
سس سویا
ماریناد

چکیده

سابقه و هدف: فعالیت پروتئازی میوه‌ها و سبزیجات در پژوهش‌های مختلف بررسی شده است. کلم بروکلی یکی از سبزیجات فراوان و مقرون به صرفه می‌باشد که به‌علت طعم مطلوب و ویژگی‌های تغذیه‌ای؛ ترکیبات ضدسرطانی و آنتی‌اکسیدان مانند سولفورفان و ایندول-۳-کاربینول و سلنیوم مورد توجه مصرف‌کنندگان و محققان قرار دارد. این پژوهش به‌منظور بررسی تأثیر شیره استخراجی بروکلی و سس سویا بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و بافتی استیک گوساله با هدف تردسازی و کاهش زمان رسیدن انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: نمونه‌های گوشتی از عضله، استیک روند گوساله جدا شد. نمونه‌های استیک در قطعات مکعبی به ابعاد (۱۰ سانتی‌مترمکعب) با وزن تقریبی یک کیلوگرم و عاری از چربی برش داده شدند. ترکیب ماریناد شامل ۲/۶ درصد (حجمی/ وزنی) شیره بروکلی (فعالیت پروتئازی بروکلی: ۱۲/۳ u/g) و ۲۵ درصد سس سویا (حجمی/ وزنی) در سه تیمار نسبت به نمونه کنترل از طریق سرنگ به قسمت‌های سطحی و عمقی تزریق گردید و نمونه‌ها در زمان‌های ۱، ۳، ۲۴ و ۴۸ ساعت در یخچال با میانگین دمای ۴ درجه سانتی‌گراد جهت انجام آزمون‌ها و ارزیابی نگهداری شدند.

یافته‌ها: نتایج تجزیه واریانس نشان داد با گذشت زمان، میزان تردی در همه تیمارها نسبت به نمونه شاهد به‌طور معنی‌داری بیشتر بود ($P<۰/۰۵$). مقادیر شاخص‌های اصلی تردی شامل شاخص تخریب میوفیبریل، حلالیت پروتئین‌های میوفیبریلی، کلاژن نامحلول و نیروی برشی وارنر براتزلر در تیمار حاوی شیره بروکلی+ سس سویا بهتر بود. همچنین نتایج ریزنگاشت میکروسکوپ الکترونی روبشی میکروساختار عضله نیز این یافته را در تیمار حاوی شیره بروکلی و سس‌سویا تأیید کرد. بطور میانگین بیشترین میزان افت‌خونابه در نمونه سس سویا (۱/۹۷درصد) و کمترین مقدار آن در نمونه شیره بروکلی (۱/۷۲درصد) مشاهده شد. در پژوهش حاضر از ساعت اول تا ۴۸ ترد شدن، میزان افت پخت در تمامی تیمارها روند کاهشی نشان داد. به‌دلیل فعالیت آنزیم‌ها و پیشرفت فرایند رسیدن گوشت مقدار نیروی برشی طی زمان ترد شدن در تمامی تیمارها کاهش معنی‌دار نشان داد ($P<۰/۰۵$). میانگین مقدار نیروی

برشی در تمامی روزهای مورد بررسی، در نمونه شیره بروکلی + سس سویا کمترین مقدار (۱۲۸/۵نیوتن) گزارش شد. پس از آن به‌ترتیب نمونه شیره بروکلی (۱۵۱/۱نیوتن)، نمونه سس سویا (۱۶۶/۸نیوتن) و نمونه شاهد (۱۸۷/۵نیوتن) قرار داشتند. بر اساس یافته‌های پژوهش حاضر، ترکیب شیره بروکلی به همراه سس سویا می‌تواند به عنوان یک مارینادموثر در بهبود تردی استیک گوساله به کار رود.

نتیجه‌گیری: نتیجه این پژوهش نشان داد شیره استخراج شده از بروکلی می‌تواند دارای ترکیبات آنزیمی موثر در تجزیه پروتئین‌های میوفیبریلی باشد. فعالیت پروتئولیتیک این آنزیم‌ها در pH های پایین بیشتر بود. بنابراین، تخریب بیشتر پروتئین‌های میوفیبریلی و حلالیت بیشتر آن در نمونه حاوی شیره بروکلی و سس سویا حاصل شد.

استناد: میرحاج، ف.، بقایی، ه.، عمادزاده، ب.، جبلی‌جوان، الف. (۱۴۰۰). مارینادکردن استیک گوساله با سس سویا و شیره بروکلی (*Brassica oleracea var. italica*) و ارزیابی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و کیفی آن طی زمان رسیدن *فرآوری و نگهداری مواد غذایی*، ۱۳ (۳)، ۳۶-۵۴.

DOI: 10.22069/EJFPP.2022.17501.1593

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

مقدمه

کیفیت، تردی، آبدار بودن، عطر و طعم گوشت از جمله عواملی است که مورد توجه مصرف‌کننده بوده و عدم رضایت از آن می‌تواند زمینه‌ساز بسیاری از شکایات و حتی مرجوع شدن کالا توسط مصرف‌کنندگان باشد (۲۵). ماریناد کردن یکی از رایج‌ترین روش‌های بهبود تردی گوشت و تقویت عطر و طعم می‌باشد و به روش‌های مختلف شامل غوطه‌وری، تزریق و غلتاندن تحت خلاء صورت می‌گیرد (۳۴). در بین روش‌های مذکور تزریق از نظر شدت نفوذ ترکیبات ترد کننده در بافت و صرفه‌جویی زمان ترد کردن، از جمله رایج‌ترین و پرمصرف‌ترین روش‌های ماریناد گوشت محسوب می‌گردد (۴۰). آب، نمک و اجزای اسیدی مانند سرکه و عصاره میوه‌ها از جمله ترکیباتی هستند که از قدیم جهت ماریناد گوشت به‌کار گرفته می‌شود (۲۵).

به‌طورکلی ماریناد کردن از طریق دو مسیر عمده سبب تردی گوشت می‌شود. مسیر اول به کاهش pH برمی‌گردد که طی آن پروتئین‌های عضله و بافت همبند تورم می‌یابد (۳). مسیر دوم بهبود فرایند تردی با تغییر در فرایند پروتئولیتیک است که با افزایش فعالیت پروتئازهای داخل سلولی و یا اضافه شدن آنزیم‌های پروتئولیتیک استخراج شده از میوه‌ها و سبزیجات روی می‌دهد. اضافه کردن نمک‌ها از قبیل کلرید سدیم، کلرید کلسیم و نمک‌های فسفات نیز به‌دلیل بهبود ظرفیت نگهداری آب سبب تردی گوشت می‌گردد (۷، ۲۴). در سال‌های اخیر پروتئازهای گیاهی به‌دلیل داشتن ویژگی‌های مناسب و قابلیت فعالیت در طیف وسیع دمایی و pH مورد توجه خاص قرار گرفته‌اند (۵، ۱۳، ۱۵). یکی از کاربردهای مهم پروتئازهای گیاهی ترد کردن گوشت است. این پروتئازها نظیر پاپائین، بروملین و فیسین می‌توانند پروتئین‌های میوفیبریلی و پیوندی عضله را هیدرولیز نموده و با تغییر در ساختار اکتین و میوزین سبب ترد شدن گوشت شوند. این روزها تقاضای چشمگیر مصرف‌کنندگان برای تهیه محصولات غذایی سالم، در دسترس و عاری از مواد افزودنی شیمیایی رو به فزونی است (۲۷). بنابراین، توجه به ترکیب‌های گیاهی و استفاده مفید آنها در صنعت غذایی جایگاه ویژه‌ای دارد. کلم بروکلی از سبزیجات پراهمیت، فراوان و مقرون به‌صرفه می‌باشد که از لحاظ طعم و حضور ترکیب‌های ضدسرطانی و آنتی‌اکسیدانی مانند سولفورفان وایندول-۳-کاربینول و سلنیوم مورد توجه مصرف کنندگان و محققان قرار گرفته است. پژوهش‌های اخیر در کلم بروکلی با استفاده از آنالیز RNA-blot و CDNA-blot قادر به شناسایی چهار ژن سیستئین پروتئاز و یک ژن آسپارتیک پروتئاز بوده است (۳۲، ۳۹).

سس سویا[1] نوعی چاشنی تخمیری سویا است که در شرق آسیا شامل چین، ژاپن، کره و تایلند به‌طور گسترده برای ماریناد کردن انواع غذاها بر پایه گوشت استفاده می‌شود. در سال‌های اخیر در ایالات متحده آمریکا و کشورهای اروپایی مصرف سس سویا به‌دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی ثابت شده رو به افزایش گذاشته‌است (۲۳). سس سویا از مقادیر زیادی نمک، آمینواسید آزاد، پپتیدها، کربوهیدرات‌ها، اسیدهای آلی و مواد معدنی تشکیل شده‌است. pH پایین آن (pH حدود ۵-۴) ناشی ازتشکیل اسیدهای آلی مختلف از جمله اسید استیک، اسید لاکتیک، اسید سوکسینیک و اسید پیروگلوتامیک است که از ویژگی‌های مهم سس سویا می‌باشد (۲۴). کیم و همکاران (c ۲۰۱۳) با اضافه کردن آب سبزیجات گیاهی از جمله بروکلی به‌عنوان پوشش خوراکی بر روی گوشت تازه نشان دادند که پوشش‌های خوراکی تهیه شده از سبزیجات

1. Soy sauce

دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بوده و سبب بهبود ویژگی‌های ارگانولپتیکی، اکسایش چربی و کیفیت گوشت گردیدند (۲۶). در پژوهش حاضر اثر مارینـاد کردن استیک گوساله با شیره بروکلی و سس سویا بر ویژگی‌های کیفی گوشت طی دوره ترد شدن ۴۸ ساعته مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی: بروکلی تازه خوراکی (*Brassica oleracea var. italica*) مورد استفاده در این پژوهش، از بازار محلی در مشهد تهیه گردید. تمام مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکت‌های مرک و سیگما آلدریچ خریداری شدند.

استخراج شیره[1] بروکلی: بروکلی تازه پس از شستشو، توسط همزن اولتراتوراکس (IKA Ultra-Turrax T25، آلمان) به مدت دو دقیقه همگن گردید. سپس با قرارگیری مواد همگن شده در پارچه توری[2] سه لایه عصاره یا اصطلاحاً " شیره " استخراج گردید. عصاره‌ی حاصل، سانتریفیوژ (۱۶۰۰۰g به مدت ۵ دقیقه) شده و مایع فوقانی حاصل از سانتریفیوژ (روماند) برای مارینادکردن استیک گوساله، درون شیشه تیره و درب‌دار در فریزر ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۶، ۱۷). بازده استخراج شیره بروکلی ۱۰/۴۷ درصد تعیین شد.

آماده‌سازی نمونه‌ها: نظر بر این‌که بالاترین سطح آنزیمی بدون تغییرات نامطلوب ارگانولپتیکی در گوشت u/g ۳/۱ می‌باشد (۱۲)، و با توجه به فعالیت پروتئازی بروکلی تازه به میزان u/g ۱۲/۳ (۳۷) وتخمین میزان فعالیت پروتئازهای شیره بروکلی استخراج شده با بازده ۱۰/۵ درصد (۱۱۷u/g) از ۲/۶ گرم عصاره در هر ۱۰۰ گرم گوشت (۲/۶ درصد) استفاده گردید. نمونه‌ها به‌صورت جدول ۱ تیماربندی شدند و همچنین درصد افزودن سس سویا بر اساس انجام پیش تیمار به مقدار ۲۵ درصد مشخص گردید (۲۴). گوشت گوساله استیک از عضله روند[3] (گوشت نزدیک به بخش پای عقب گاو) ۲۴ ساعت پس از کشتار از درب کشتارگاه تحویل گرفته شد و در شرایط سرد به آزمایشگاه منتقل گردید. نمونه‌های استیک جهت انجام تجزیه‌ی تقریبی در قطعات مکعبی به ابعاد ۱۰ سانتی‌متر مکعب با وزن تقریبی یک کیلوگرم و عاری از چربی برش داده شدند. ترکیب‌های آماده شده مارینـاد مطابق جدول شماره ۱ از طریق سرنگ‌های ۲۰ میلی‌لیتری به نمونه‌ی گوشت تزریق گردیدند. شیره بروکلی ۲/۶ درصد (حجمی/ وزنی) و سس سویا ۲۵ درصد (حجمی / وزنی) بر مبنای وزن گوشت در ۴ تیمار آماده سازی و مارینـاد گردید. بعد از تزریق و ورز دادن ملایم نمونه‌ها با دست، گوشت‌ها در کیسه‌های زیپ‌دار پلی اتیلنی در دمای ۱± ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری و آزمون‌ها در زمان‌های ۱، ۳، ۲۴ و ۴۸ ساعت انجام شدند (۳۸).

ترکیب شیمیایی: محتوای رطوبت، پروتئین، چربی و خاکستر استیک گوساله با سه تکرار طبق روش AOAC (2000) اندازه‌گیری شدند (۴).

تعیین pH: ۵ گرم نمونه گوشت با ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر به مدت ۶۰ ثانیه در هموژنایزر (IKA Ultra-Turrax T25) مخلوط شد. pH گوشت با استفاده از دستگاه pH متر (Model Inolab WTW, L2, Germany) ارزیابی گردید (۲۴).

حلالیت پروتئین‌های میوفیبریلی[4]: ابتدا جهت اندازه‌گیری حلالیت پروتئین‌های سارکوپلاسمیک، ۲ گرم نمونه گوشت با ۲۰ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۲۵ مولار (pH=۷) توسط هموژنایزر (IKA Ultra-

1. Juice
2. Cheesecloth
3. Round steak
4. Myofibrillar protein solubility

Turrax T25) همگن شد. مخلوط همگن حاصل پس از ۲۴ ساعت نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه در ۶۰۰۰g سانتریفیوژ شد. روماند حاصله با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ فیلتر گردید. غلظت پروتئین مایع شفاف زیر صافی به روش بیورت تعیین شد. در مرحله بعد، جهت تعیین حلالیت پروتئین کل، ۲ گرم نمونه گوشت با ۲۰ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار (pH=۷) و یدید پتاسیم ۱/۱ مولار توسط هموژنایزر مخلوط شد. مخلوط حاصل طی ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۶۰۰۰g سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت حاصله با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ فیلتر گردید. غلظت پروتئین مایع شفاف زیرصافی به روش بیورت تعیین شد. در انتها، میزان حلالیت پروتئین‌های میوفیبریلی طبق رابطه ۱ بدست آمد (۱۸).

جدول ۱- نمونه ماریناد شده با شیره بروکلی و سس سویا

Table 1- The samples treated with broccoli juice and soy sauce

نمونه Sample	تیمارها Treatments
شاهد Control	استیک گوساله Beefsteak
A	استیک گوساله + ۲/۶ درصد (حجمی / وزنی) عصاره بروکلی Beefsteak + 2.6 % (v/w) Broccoli juice
B	استیک گوساله + ۲/۶ درصد(حجمی / وزنی) عصاره بروکلی + ۲۵ درصد (حجمی / وزنی) سس سویا Beefsteak + 2.6 % (v/w) Broccoli juice + 25% (v/w) soy sauce
C	استیک گوساله + ۲۵ درصد (حجمی / وزنی) سس سویا Beefsteak + 25% (v/w) soy sauce

رابطه ۱.

حلالیت پروتئین‌های سارکوپلاسمیک - حلالیت پروتئین کل = حلالیت پروتئین‌های میوفیبریلی

افت خونابه (چکه)[1]: برای محاسبه مقدار افت چکه در زمان‌های ۱، ۳، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از کشتار، ابتدا قطعه ۵۰ گرمی گوشت با ضخامت ۲ تا ۲/۵ سانتی‌متر از عضله جدا، داخل توری گذاشته و سپس درون ظرف شیشه‌ای آویزان شد. شیشه حاوی نمونه به مدت ۲۴ ساعت در یخچال (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شد. درصد اختلاف وزن اولیه و ثانویه نمونه به‌عنوان افت خونابه مطابق رابطه ۲ محاسبه گردید (۱۹).

رابطه ۲.

100× [وزن اولیه نمونه ÷ (وزن ثانویه نمونه - وزن اولیه نمونه)] = درصد افت خونابه

افت پخت[2]: ۵۰ گرم نمونه گوشت جدا شده، داخل کیسه پلی‌اتیلنی گذاشته شده و درون بن ماری با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن دمای مرکز گوشت به ۷۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. درصد افت پخت در واقع کاهش وزنی است که نمونه طی پخت پیدا می‌کند (۳۳).

رابطه ۳.

100× [وزن نمونه خام ÷ (وزن نمونه پخته - وزن نمونه خام)] = درصد افت پخت

ظرفیت نگهداری آب[3] **(WHC)**: جهت تعیین ظرفیت نگهداری آب، مقدار ۰/۳ گرم نمونه به روی کاغذ صافی واتمن شماره یک منتقل و دو صفحه پلاستیکی در هر دو طرف آن قرار داده شد. وزنه ۲

1. Drip loss

2. Cooking loss

3. Water Holding Capacity

کیلوگرمی به مدت ۵ دقیقه در مرکز صفحه پلاستیکی بالایی قرار گرفت. در نهایت درصد WHC از رابطه ۴ محاسبه شد که در آن W_1 وزن اولیه گوشت (گرم)، W_2 وزن نهایی گوشت (گرم) و MC مقدار رطوبت هر گرم از گوشت است (۳۶).

رابطه ۴.

$$\text{درصد ظرفیت نگهداری آب} = 1 - [(W_1 - W_2) \div (W_1 \times MC)] \times 100$$

کلاژن نامحلول: کلاژن نامحلول به‌روش سالیوان و همکاران (۲۰۱۰) با کمی تغییر اندازه‌گیری شد. نمونه در مخلوط‌کن یکنواخت گردید و در فریزر ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس کلاژن محلول و نامحلول به‌ترتیب با استفاده از حمام آبی به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و ۸۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد جداسازی گردید. نمونه‌ها فیلتر و هیدروکسی پرولین اندازه گیری شد. از ضریب ۷/۲۵ جهت تعیین مقدار کلاژن نامحلول استفاده شد. هر نمونه به‌صورت سه تکرار تهیه و جذب هر کدام به‌صورت جداگانه با طیف‌سنج نوری (CECIL UV-ViS Spectophotometer, Uk) در طول موج ۵۵۸ نانومتر قرائت شد.

شاخص تخریب میوفیبریل[1] (MFI): ۴ گرم نمونه با ۴۰ میلی‌لیتر محلول بافر MFI (حاوی کلرید پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار، فسفات پتاسیم (pH=۷) ۲۰ میلی‌مولار، EDTA ۱میلی‌مولار، کلرید منیزیم ۱ میلی‌مولار و سدیم آزید ۱ میلی‌مولار) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ترکیب و پس از هموژن کردن توسط اولتراتوراکس (دور ۸۰۰۰ rpm به مدت ۳۰ ثانیه) سانتریفیوژ (۱۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه) شد. ۴۰ میلی‌لیتر بافر MFI به رسوب باقیمانده از سانتریفیوژ اضافه و پس از ورتکس، مجدد با شرایط قبلی سانتریفیوژ 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 زیر صافی از طریق روش بیورت، ۰/۲۵ میلی‌لیتر از محلول پروتئینی زیر صافی به‌همراه ۰/۷۵ میلی‌لیتر بافر MFI و ۴ میلی‌لیتر معرف بیورت مخلوط و مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در محلی تاریک در دمای اتاق قرار گرفت (۱۶). پس از گذشت این زمان، جذب نمونه‌ها با اسپکتروفتومتر مرئی-فرابنفش (CECIL، انگلستان) در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت و در نهایت مقدار MFI با استفاده از رابطه ۵ به‌دست آمد (۱۸، ۲۴). برای تهیه معرف بیورت ۱/۵ گرم سولفات مس پنج آبه و ۶ گرم تارتارات مضاعف سدیم پتاسیم در حدود ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل گردید، سپس ۳۰۰ میلی‌لیتر سود ۱۰ درصد اضافه و به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسانیده شد.

رابطه ۵.

$$MFI = A_{540} \times 200$$

نیروی برشی: اندازه‌گیری مقدار نیروی برشی نمونه‌ها با استفاده از دستگاه بافت سنج (TA.XT Plus Japan) صورت گرفت. برای این منظور، قطعات گوشت ۵۰ گرمی در بن‌ماری با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن دمای مرکز گوشت به ۷۵ درجه سانتی‌گراد پخته شد. با استفاده از قالب مناسب، قطعات گوشت به‌طور یک دست (موازی با جهت فیبریل‌های عضله) به ابعاد ۲×۲ سانتی‌متر برش خوردند. نمونه‌های آماده‌سازی شده در دستگاه بافت سنج قرار گرفته و مقاومت بافتی آن‌ها از طریق نیروی برشی وارنر-براتزلر (WBSF)[2] و توسط تیغ v شکل با سرعت ۲۰۰ میلی‌متر بر دقیقه سنجیده شد (۲۰).

ریزساختار فیبرها (SEM)[3]: نمونه‌های گوشت با ضخامت ۲ تا ۳ میلی متر برش خورده و در محلول

1. Myofibrillar Fragmentation Index

2. Warner Bratzler Shear Force
3. Scan Electron Microscopy

۲/۵ درصد گلوتار- آلدهید و بافر فسفات ۰/۱ مولار (pH=۷) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت جهت تثبیت نگهداری شدند. نمونه‌های تثبیت شده، در همان محلول بافر فسفات حاوی ۲ درصد تتروکسید اسمیوم[1] به مدت ۲ ساعت، مجدد تثبیت گردیدند. نمونه‌های تثبیت شده توسط غلظت‌های مختلف محلول اتانول (۵۰، ۷۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد) به مدت ۳۰ دقیقه آبگیری شده، سپس نمونه‌های خشک شده بر روی نگهدارنده‌های آلومینیومی قرارگرفته و طلا پوشی (SC7620, UK) شدند. در نهایت، نمونه‌های آماده سازی شده توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM, LEO 1450VP, Germany) مورد عکس‌برداری با بزرگنمایی ۱۰۰۰× و ولتاژ ۲۰ کیلوولت قرار گرفتند (۲۴، ۳۰).

تجزیه و تحلیل آماری: بررسی داده‌های حاصل از پژوهش حاضر با استفاده از مدل خطی اندازه‌گیری‌های مکرر[2] در سه تکرار انجام شد. شاخص‌های مورد مطالعه به کمک نرم افزار Ver.21 SPSS تجزیه و تحلیل شدند. میانگین داده‌ها در قالب آزمون چنددامنه‌ای دانکن و در سطح معنی‌داری ۹۵ درصد مورد مقایسه قرار گرفت (P<0.05). برای ترسیم نمودارها از نرم‌افزار اکسل نسخه ۲۰۱۶ استفاده گردید.

نتایج و بحث

میانگین مقادیر ترکیبات شیمیایی نمونه گوشت در جدول ۲ آورده شده‌است. استیک گوساله مورد بررسی دارای رنگ قرمز تیره، بافتی مناسب، فیبرهای عضلانی زبر، سطحی برجسته، فاقد بافت همبند و چربی قابل رویت بود. آنالیز تقریبی گوشت در پژوهش حاضر مشابه نتایج سایر تحقیقات بود (۱۰، ۳۱).

pH: میانگین مقادیر pH در تیمارهای مختلف استیک گوساله طی زمان ترد شدن در جدول ۳ ارائه شده‌است. نتایج تحلیل واریانس نشان داد اثر نوع ماریناد، مدت زمان ترد شدن و اثر متقابل ماریناد و زمان بر میانگین مقادیر pH معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). با توجه به تیمارگذاری نمونه‌های گوشت ۲۴ ساعت پس از کشتار، مقدار pH در اولین ساعت مورد بررسی برای تمامی تیمارها کمتر از ۶ بدست آمد که با توجه به اثر نوع تیمار، بیشترین مقدار برای نمونه‌ی شاهد (۵/۷۶) و نمونه‌ی دارای شیره بروکلی (۵/۷۴)، و کمترین pH (۵/۱۸) در نمونه‌های سس سویا با ماهیت اسیدی گزارش شد (جدول ۳). کی و همکاران (۲۰۰۹) گزارش نمودند با افزودن اسید لاکتیک به گوشت ضمن کاهش pH تا نزدیک نقطه ایزوالکتریک، جذب محلول ماریناد توسط گوشت افزایش پیدا کرد و در نتیجه تیمارهای ماریناد شده با محلول اسیدی دارای pH کمتری بودند. بر اساس نتایج تجزیه واریانس از ساعت اول تا ۴۸ زمان مورد بررسی، میانگین مقدار pH روند افزایشی معنی دار نشان داد که نمونه A با بیشترین سرعت و مقدار افزایش ($pH_{۴۸}$=۶/۳۲) و نمونه شاهد با کمترین سرعت و مقدار افزایش ($pH_{۴۸}$=۵/۸۸) مشاهده شد. دلیل این موضوع می‌تواند حضور آنزیم‌های پروتئولیتیک در بروکلی باشد و با تغییر یا تجزیه ساختار پروتئین‌های عضلانی سبب افزایش pH شده‌است. در تطابق با یافته‌های پژوهش حاضر، تاسائی و همکاران (۲۰۱۲) بیان نمودند که آنزیم‌های گیاهی با تأثیر بر پروتئین‌های میوفیبریلی و بافت پیوندی و بطور خاص تجزیه اکتین، میوزین، کلاژن و الاستین ضمن ترد کردن گوشت، سبب افزایش pH شدند.

1. Osmium tetroxide
2. Repeated measurments

جدول ۲- مقادیر ترکیب شیمیایی نمونه گوشت استیک گوساله خام

Table 2- Proximate chemical composition of crude beefsteak

نمونه Sample	پروتئین(درصد) Protein (%)	خاکستر(درصد) Ash (%)	چربی(درصد) Fat (%)	ماده خشک (درصد) Dry substance (%)	رطوبت (درصد) Moisture (%)
استیک گوساله Beefsteak	19.32±0.10*	0.095±0.001*	5.31±0.05*	30.71±0.74*	69.29±0.80*

*مقادیر متوسط ± انحراف استاندارد

* Mean values ±standard deviations

جدول ۳- تأثیر مارینادکردن شیره بروکلی + سس سویا بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و بافتی استیک گوساله طی دوره ترد شدن در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد

Table 3- Effect of marinating with broccoli juice and soy sauce on physicochemical and textural properties of beefsteak chunks during storage at 4 °C.

نمونه Sample	تیمارها Treatments	زمان ترد شدن (ساعت) Tenderization time (h)			
		1	3	24	48
pH	شاهد Control	$5.76 \pm 0.07^{AB,a}$	$5.67\pm0.07^{BC,a}$	$5.59\pm0.03^{C,a}$	$5.88\pm0.08^{A,b}$
	A	$5.74\pm0.04^{B,a}$	$5.70\pm0.02^{B,a}$	$5.58\pm0.07^{B,a}$	$6.32\pm0.07^{A,a}$
	B	$5.23\pm0.02^{C,b}$	$5.38\pm0.05^{B,b}$	$5.40\pm0.06^{B,b}$	$5.54\pm0.05^{A,c}$
	C	$5.13\pm0.02^{C,c}$	$5.17\pm0.02^{B,c}$	$5.24\pm0.15^{AB,b}$	$5.34\pm0.08^{A,d}$
حلالیت پروتئین (میلی‌گرم بر گرم) Protein solubility (mg/g)	شاهد Control	$83.50\pm3.39^{D,b}$	$89.31\pm3.10^{C,b}$	$105.89\pm2.63^{B,d}$	$112.53\pm2.94^{A,c}$
	A	$84.28\pm4.27^{D,a}$	$90.57\pm2.21^{C,b}$	$117.33\pm3.34^{B,b}$	$123.58\pm4.24^{A,b}$
	B	$87.69\pm4.32^{D,a}$	$103.81\pm5.29^{C,a}$	$129.79\pm5.01^{B,a}$	$135.70\pm3.07^{A,a}$
	C	$83.83\pm5.16^{CD,b}$	$89.94\pm3.26^{C,b}$	$112.50\pm4.55^{B,bc}$	$119.60\pm2.10^{A,b}$
افت خونابه (درصد) Drip loss (%)	شاهد Control	$2.12\pm0.39^{A,a}$	$2.09\pm0.05^{A,b}$	$1.54\pm0.04^{B,b}$	$1.28\pm0.26^{C,c}$
	A	$2.11\pm0.47^{A,a}$	$2.09\pm0.49^{A,b}$	$1.52\pm0.13^{B,bc}$	$1.18\pm0.12^{C,d}$
	B	$2.11\pm0.24^{A,a}$	$2.11\pm0.28^{A,a}$	$1.54\pm0.21^{B,b}$	$1.46\pm0.04^{C,b}$
	C	$2.14\pm0.14^{A,a}$	$2.13\pm0.33^{A,a}$	$1.85\pm0.25^{B,a}$	$1.77\pm0.36^{C,a}$
افت پخت (درصد) (%) Cooking loss	شاهد Control	$31.13\pm0.55^{A,b}$	$31.16\pm1.15^{A,a}$	$28.37\pm1.04^{B,b}$	$27.50\pm2.10^{B,ab}$
	A	$30.95\pm0.47^{A,b}$	$30.43\pm0.23^{B,b}$	$27.90\pm1.38^{C,c}$	$20.23\pm0.98^{D,c}$
	B	$31.37\pm1.37^{A,ab}$	$31.12\pm1.08^{A,a}$	$29.36\pm0.91^{B,a}$	$28.43\pm1.34^{B,a}$
	C	$31.96\pm0.32^{A,a}$	$31.68\pm2.09^{A,a}$	$29.71\pm0.48^{B,a}$	$28.92\pm0.49^{C,a}$
ظرفیت نگهداری آب (درصد) WHC (%)	شاهد Control	$34.41\pm0.32^{C,a}$	$34.87\pm0.14^{C,a}$	$36.50\pm0.33^{B,b}$	$38.48\pm0.25^{A,b}$
	A	$33.22\pm0.23^{C,b}$	$33.13\pm0.13^{C,c}$	$37.14\pm0.35^{B,a}$	$41.59\pm0.28^{A,a}$
	B	$34.11\pm0.24^{C,a}$	$33.96\pm0.18^{C,b}$	$36.27\pm0.19^{B,b}$	$37.40\pm0.26^{A,c}$
	C	$34.03\pm0.16^{C,a}$	$34.23\pm0.25^{C,b}$	$36.08\pm0.1^{B,c}$	$37.10\pm0.1^{A,d}$
نیروی برشی (نیوتن) Shear force (N)	شاهد Control	$215.22\pm7.80^{A,a}$	$203.51\pm6.34^{A,a}$	$168.23\pm6.72^{B,a}$	$164.62\pm5.96^{B,a}$
	A	$211.18\pm9.89^{A,a}$	$185.27\pm5.03^{B,c}$	$127.46\pm7.60^{C,c}$	$81.37\pm7.04^{D,c}$
	B	$184.89\pm3.20^{A,b}$	$165.30\pm4.44^{B,d}$	$101.73\pm1.61^{C,d}$	$64.58\pm2.80^{D,d}$
	C	$212.63\pm5.30^{A,a}$	$191.40\pm6.60^{B,b}$	$145.05\pm7.12^{C,b}$	$119\pm6.20^{D,b}$
کلاژن نامحلول (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) Insoluble collagen (mg/ml)	شاهد Control	$9.78\pm0.10^{A,a}$	$9.47\pm0.25^{AB,a}$	$9.14\pm0.46^{B,a}$	$8.75\pm0.17^{C,a}$
	A	$9.67\pm0.19^{A,a}$	$9.29\pm0.10^{B,ab}$	$8.28\pm0.25^{C,c}$	$7.83\pm0.35^{D,c}$
	B	$9.51\pm0.27^{A,a}$	$9.01\pm0.34^{B,b}$	$7.88\pm0.58^{C,c}$	$7.13\pm0.27^{D,d}$
	C	$9.72\pm0.12^{A,a}$	$9.41\pm0.26^{B,a}$	$8.74\pm0.05^{C,b}$	$8.35\pm0.23^{D,b}$

مقادیر میانگین ± انحراف معیار سه تکرار هستند. حروف متفاوت A-D اختلاف معنی‌دار اثر تیمارهای مارینادشده و حروف متفاوت a-d وجود تفاوت معنی‌دار مدت زمان تردشدن را در سطح اطمینان ۹۵ درصد نشان می‌دهد. تیمار کنترل (شاهد): استیک گوساله خام، تیمار A: استیک گوساله + ۲/۶ درصد (حجمی/ وزنی) عصاره بروکلی تیمار، B: استیک گوساله + ۲/۶ درصد (حجمی/ وزنی) عصاره بروکلی + ۲۵درصد (حجمی/ وزنی) سس سویا، تیمار C: استیک گوساله + ۲۵درصد (حجمی/ وزنی) سس سویا

Values are mean ± standard deviation in triplicate.A-D significant letters indicate statistical differences within marinade treatments and a-d show significant different letters within the tenderization time at P<0.05).Treatments include: control: crude beefsteak, A: beefsteak + 2.6 % (v/w) Broccoli juice, B: beefsteak + 2.6 % (v/w) Broccoli juice + 25% (v/w)soy sauce, C: beefsteak + 25% (v/w) soy sauce.

حلالیت پروتئین‌های میوفیبریلی: میانگین مقادیر حلالیت پروتئین‌های میوفیبریلی تیمارهای مختلف گوشت طی زمان ترد شدن در جدول ۳ آورده شده‌است. بر اساس نتایج تجزیه واریانس، میزان حلالیت پروتئین‌های میوفیبریلی از ساعت ۱ تا ۴۸ در تمامی تیمارها افزایش معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵). دلیل این افزایش تجزیه و شکسته شدن پروتئین‌ها در اثر فعالیت آنزیم‌ها طی دوره ترد شدن می‌باشد که با توجه به کوچک‌تر شدن اندازه پروتئین، حلالیت آن افزایش یافته و لذا میانگین مقدار این شاخص بیشتر شد. همانطورکه در جدول۳ ملاحظه می‌گردد بیشترین مقدار حلالیت پروتئین‌های میوفیبریلی(۱۳۵/۷۰ میلی‌گرم درگرم، ساعت ۴۸) در نمونه C (نمونه حاوی شیره بروکلی و سس سویا) مشاهده شد. پس از آن نمونه‌های حاوی شیره بروکلی (۱۲۳/۵۸ میلی‌گرم در گرم) و نمونه دارای سس سویا (۱۱۹/۶۰ میلی‌گرم در گرم) و نمونه شاهد (۱۱۲/۵۳ میلی‌گرم در گرم) قرار داشتند. این نتیجه نشان می‌دهد شیره بروکلی دارای ترکیبات آنزیمی موثر در تجزیه پروتئین‌های میوفیبریلی است و از آنجا که فعالیت پروتئولیتیک آنزیم‌های بروکلی در pH های پایین بیشتر است (۳۷)، لذا تخریب بیشتر پروتئین‌های میوفیبریلی و حلالیت بیشتر آن در نمونه حاوی شیره بروکلی و سس سویا حاصل شد. هی و همکاران (۲۰۱۵) با بررسی تأثیر عصاره زنجبیل و اسید سیتریک بر گوشت اردک نشان دادند نمونه‌های تیمار شده با عصاره زنجبیل و اسید سیتریک، حلالیت پروتئین بالاتری داشتند (۱۸). همچنین در مطالعه‌ی آنها ثابت شده‌است که افزایش حلالیت پروتئین با کاهش نیروی برشی ارتباط دارد که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت داشت.

افت خونابه: نتایج میانگین داده‌های افت خونابه تیمارهای مختلف استیک گوساله طی زمان تردشدن در جدول ۳ آورده شده‌است. نتایج تحلیل واریانس نشان داد اثر زمان و نوع ماریناد بر افت خونابه معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). همان‌طور که ملاحظه می‌گردد، میزان افت خونابه از ساعت اول تا ساعت ۴۸ ترد شدن در همه تیمارها روند کاهشی داشت. به نظر می‌رسد فعالیت آنزیمی قوی‌تر باعث شکسته شدن بیشتر فیبرهای عضلانی شده و pH را افزایش می‌دهد. در نتیجه توانایی اتصال پروتئین و آب افزایش یافته و افت خونابه تمامی تیمارها طی زمان ترد شدن کاهش می‌یابد (۱، ۸). در پژوهش حاضر، بیشترین میزان افت خونابه در نمونه C (۱/۹۷درصد) و کمترین مقدار آن در نمونه A (۱/۷۲ درصد) مشاهده شد. میانگین افت خونابه در نمونه شاهد (۱/۷۵ درصد) و نمونه حاوی شیره بروکلی اختلاف معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵). در تیمارهای ماریناد با اسیدیته بالاتر با کاهش pH و در اثر فعالیت آنزیم‌های پروتئولیتیک با دناتوره شدن بیشتر پروتئین‌های عضله قدرت اتصال پروتئین‌ها با آب کم می‌شود. این کاهش اتصال آب و پروتئین تا جایی ادامه دارد که پروتئین‌های میوفیبریلی اکتین و میوزین به نقطه ایزوالکتریک خود می‌رسند و بیشترین میزان آب پیوندی را در این زمان از دست می‌دهند. هانیکل (۱۹۹۸) نشان داد طی ماریناد‌کردن گوشت، تیمار با کمترین افت خونابه طی زمان ترد شدن قابل قبول‌تر می‌باشد (۱۹).

افت پخت: نتایج میانگین مقادیر افت پخت تیمارهای مختلف استیک گوساله طی زمان ترد شدن در جدول ۳ آورده شده‌است. بر اساس نتایج تحلیل واریانس، اثر زمان ترد شدن و نوع ماریناد بر مقادیر افت پخت تیمارهای گوشت معنی‌دار (P<۰/۰۵) بود. در پژوهش

حاضر، از ساعت اول تا ۴۸ ترد شدن، میزان افت پخت در تمامی تیمارها روندکاهشی داشت. بیشترین میزان افت پخت درنمونه C (۳۰/۵۶ درصد) و کمترین میزان آن در نمونه A (۲۷/۳۷ درصد) مشاهده شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که میانگین افت پخت نمونه‌های C و B (۳۰/۰۷ درصد) و شاهد (۲۹/۵۴ درصد) اختلاف معنی داری با هم نداشتند. این نتایج با نتایج داده‌های افت خونابه هم‌خوانی دارد. pH گوشت نقش مهمی در میزان افت پخت دارد زیرا مستقیماً بر مقدار بارهای منفی مولکول‌های پروتئینی که با مولکول‌های آب پیوند برقرار می‌کنند، تأثیر می‌گذارد. در pH نزدیک نقطه ایزوالکتریک به‌دلیل مساوی بودن بارهای مثبت و منفی پروتئین‌ها، آب کمتری می‌تواند به آنها متصل شود. علت این امر، عدم وجود دافعه الکترواستاتیکی در فیبرهای عضله است که باعث می‌شود فضای بین آن‌ها کاهش یافته و مقدار آب به دام افتاده در فضای بین آنها به حداقل برسد. بنابراین، در pH بالاتر از pH ایزوالکتریک عضله (حدود ۵/۳) توانایی اتصال پروتئین‌ها و آب افزایش می‌یابد و درنتیجه آن افت پخت کمتر می‌شود (۱، ۸). ناوینا و مندیراتا (۲۰۰۴) گزارش کردند مقدار افت پخت در نمونه‌های تیمارشده با آنزیم‌های گیاهی زنجبیل و پاپایا به‌علت اثرات پروتئولیتیکی و افزایش pH، کاهش پیدا کرد (۲۸) که موافق با نتایج تحقیق حاضر در مورد تیمار استیک با شیره بروکلی است.

یافته‌های پژوهشگران نشان داد ماریناد کردن اسیدی گوشت با افزایش افت پخت همراه است. در پژوهش کیم و همکاران (۲۰۱۳b) گزارش شد با افزایش غلظت سس سویا از صفر تا ۵۰ درصد، میزان افت پخت عضله دو سر ران[1] (بایسپس فموریس) گاو افزایش یافت که دلیل آن به دو موضوع نسبت داده شد: مورد اول- احتمالاً با افزایش غلظت اسیدهای آلی و کاهش شدیدتر pH، غشای سلول‌های عضلانی شروع به پاره شدن کرده و کلاژن که در شرایط اسیدی حلالیت بیشتری پیدا می‌کند، به آرامی از عضله خارج شده و مقدار بافت پیوندی عضله کاهش می‌یابد. مورد دوم- با رهایش آنزیم‌های لیزوزومی در شرایط اسیدی و تخریب پروتئین‌های میوفیبریلی افت پخت بیشتری در نمونه‌ها مشاهده می‌شود. در اغلب موارد بین افت پخت و ظرفیت نگهداری آب همبستگی منفی وجود دارد (۱).

ظرفیت نگهداری آب (WHC): نتایج میانگین مقادیر WHC تیمارهای مختلف استیک گوساله طی زمان ترد شدن در جدول ۳ آورده شده‌است. بر اساس نتایج تحلیل واریانس، اثر زمان ترد شدن و نوع ماریناد بر مقادیر WHC تیمارهای گوشت معنی‌دار بود. همان‌طور که در جدول ۳ ملاحظه می‌گردد، مقدار WHC در تمامی تیمارها از ساعت اول تا سوم اختلاف معنی‌داری نداشت ($P>0/05$) اما بعد از ۲۴ تا ۴۸ ساعت ترد شدن در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، WHC به‌طور آهسته افزایش یافت و به ترتیب، کمترین و بیشترین مقدار WHC در تیمار C (۳۷/۱۰ درصد) و تیمار A (۴۱/۵۹ درصد) مشاهده شد. دلیل این موضوع به وجود آنزیم‌های پروتئولیتیک گیاهی در بروکلی برمی‌گردد که با افزایش pH سبب حلالیت بیشتر پروتئین های میوفیبریلی و افزایش WHC شد (۲، ۲۴). دوین و دیکمان (۲۰۱۴) در پژوهش خود گزارش نمودند ماریناد کردن گوشت شتر با اسید استیک طی ۷۲ ساعت در دمای۴ درجه سانتی‌گراد سبب افزایش رطوبت خروجی و کاهش WHC گردید که می‌تواند ناشی ازنزدیک شدن pH گوشت به نقطه ایزوالکتریک پروتئین‌های واسرشت شده باشد. در pH های اسیدی، بیشترین رسوب پروتئین‌های سارکوپلاسمی روی پروتئین‌های میوفیبریلی اتفاق می‌افتد و این موضوع مقدار WHC را کاهش می‌دهد

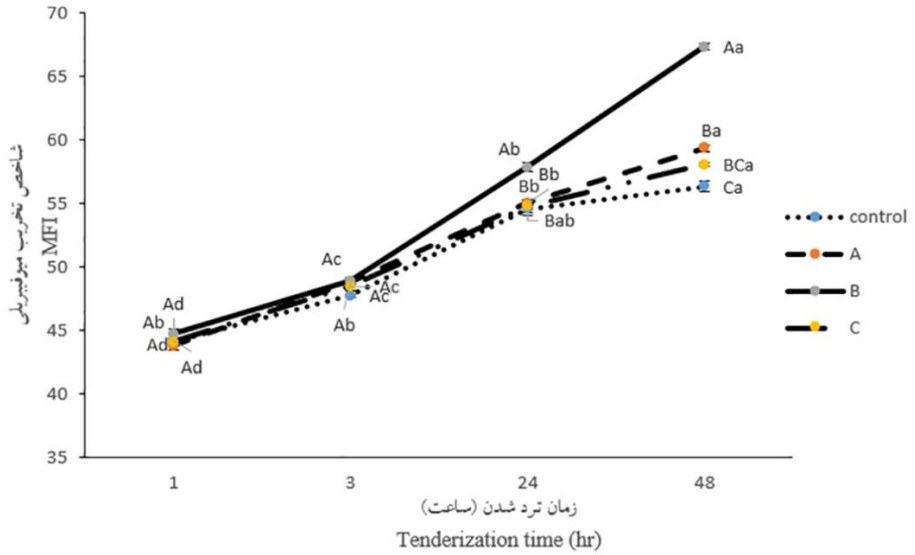
1 . Biceps Femoris

که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت داشت. در پژوهش کیم و همکاران (b ۲۰۱۳) با افزایش غلظت سس سویا، کاهش جزئی WHC درعضله‌های بایسپس فموریس گاو مشاهده گردید.

کلاژن نامحلول: میانگین مقادیر کلاژن نامحلول تیمارهای مختلف استیک گوساله طی زمان ترد شدن در جدول ۳ آورده شده‌است. بر اساس نتایج تحلیل واریانس، اثر زمان ترد شدن و نوع ماریناد بر مقادیر کلاژن نامحلول تیمارهای گوشت معنی‌دار بود. همان‌طور که در جدول ۳ ملاحظه می‌گردد، با افزایش زمان تردشدن تا ساعت ۴۸، میانگین مقدار کلاژن نامحلول تمامی تیمارها کاهش یافت. بیشترین مقدار کلاژن نامحلول پس از ۴۸ ساعت زمان ترد شدن به‌ترتیب در تیمار شاهد (۸/۷۵ میلی‌گرم درگرم)، تیمار C (۸/۳۵ میلی‌گرم درگرم) و تیمار A (۷/۸۳ میلی‌گرم درگرم) و کمترین مقدار در تیمار B (۷/۱۳ میلی‌گرم درگرم) مشاهده شد. این موضوع نشان‌دهنده‌ی قابلیت آنزیم‌های تردکننده طبیعی موجود در کلم بروکلی است که توانسته کلاژن نامحلول را تجزیه نماید و شدت این توانایی در pH های اسیدی بهتر بود (۳۷) زیرا شیره بروکلی در کنار افزودن سس سویا کمترین مقدار کلاژن نامحلول را حاصل نمود (جدول ۳). مطالعات زیادی ثابت نمودند فعالیت پروتئولیتیک پروتئازهای گیاهی بر کلاژن نامحلول قابل توجه می‌باشد (۲، ۲۹). به‌طور مشابه در پژوهشی توسط برگ و همکاران (۲۰۰۱) اثر تزریق اسید لاکتیک بر تردی گوشت گوساله مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد بعد از ۱۴ روز ترد شدن، تزریق غلظت‌های مختلف اسید لاکتیک سبب کاهش مقدار کلاژن نامحلول گردید (۹). کیم و همکاران (b۲۰۱۳) گزارش نمودند علت حلالیت بالاتر کلاژن در تیمارهای ماریناد شده با سس سویا نسبت به نمونه کنترل به تورم تحت شرایط اسیدی و سهولت تبدیل به ژلاتین در دماهای پخت برمی‌گردد و در نتیجه از این طریق بهبود و تردی گوشت حاصل می‌شود (۲۴).

شاخص تخریب میوفیبریل: شاخص تخریب میوفیبریل (MFI) نشان دهنده تعداد قطعات میوفیبریل موجود در سارکوپلاسم سلول‌های عضلانی و یکی از بهترین روش‌های پایش شدت پروتئولیز طی دوره ترد شدن می‌باشد (۲۴). میانگین مقادیر شاخص تخریب میوفیبریل تیمارهای مختلف استیک گوساله طی زمان ترد شدن در شکل ۱ آورده شده‌است. بر اساس نتایج تحلیل واریانس، اثر متقابل زمان ترد شدن و نوع ماریناد بر مقادیر کلاژن نامحلول تیمارهای گوشت معنی‌دار بود. همان‌طور که در شکل ۱ ملاحظه می‌گردد، مقدار میانگین شاخص تخریب میوفیبریل تمامی تیمارها طی زمان ترد شدن از ساعت اول تا ۲۴ روند افزایشی ثابتی داشت و پس از آن تا ساعت ۴۸ این روند افزایشی بویژه در نمونه B سرعت معنی‌داری گرفت. بر اساس نتایج تجزیه واریانس بیشترین مقدار شاخص تخریب میوفیبریل در ساعت ۴۸ مربوط به نمونه B (۶۷/۳۶) وکمترین مقدار در نمونه شاهد (۵۶/۳۷) گزارش گردید. از آنجا که فعالیت پروتئازهای کلم بروکلی درpH های اسیدی بیشتر است (۳۷) و درpH های پائین علاوه بر کالپائین‌ها، آنزیم‌های لیزوزومی نیز فعال می‌شوند در نتیجه، اثر هم‌افزایی آنها سبب تخریب بیشتر پروتئین‌های میوفیبریلی (۱) در تیمار حاوی سس سویا به همراه بروکلی (تیمار B) شد و شاخص تخریب میوفیبریل افزایش معنی‌دار نشان داد. اگر چه مقادیر بالای شاخص تخریب میوفیبریل نشان دهنده‌ی گوشت تردتر می‌باشد اما، اطلاعات کمی از تأثیر خواباندن گوشت در محلول‌های اسیدی بر مقدار شاخص تخریب میوفیبریل در دسترس است (۲۴). طبق پژوهش تاسائی و همکاران (۲۰۱۲)، قراردادن

گوشت مرغابی در محلول اسیدی (۰/۱ و ۰/۲ مولار اسید لاکتیک) منجر به افزایش مقدار شاخص تخریب میوفیبریل گردید. علت این امر، افزایش میزان فعالیت پروتئولیزکنندگی آنزیم μ-کالپائین عضله (پروتئاز طبیعی وابسته به غلظت کلسیم) در شرایط اسیدی بیان شد. کیم و همکاران (۲۰۱۳ b) در پژوهشی دیگر نشان دادند که ماریناد گوشت گوساله با غلظت‌های مختلف سس سویا سبب افزایش شاخص تجزیه میوفیبریلی در تیمارهای غلیظ‌تر سس سویا گردید (۲۴).

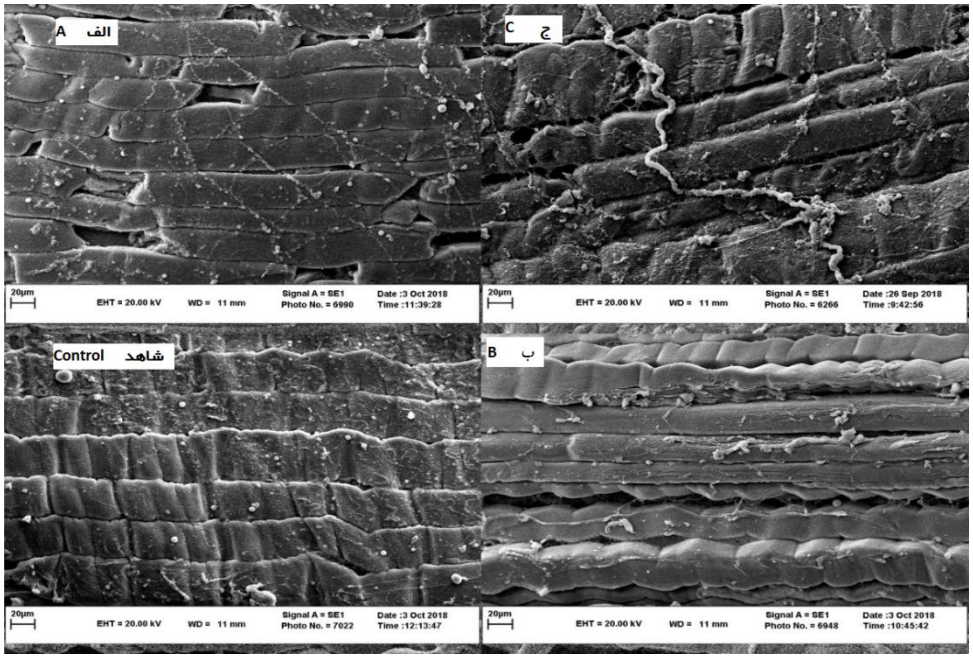


شکل ۱- تغییرات شاخص تخریب میوفیبریلی (MFI) استیک گوساله تیمار شده با ماریناده‌های مختلف طی ۴۸ ساعت تردشدن، حروف متفاوت A-D تیمارهای ماریناد شده و حروف متفاوت a-d مدت زمان تردشدن را نشان می‌دهد که از نظر آماری اختلاف معنی‌دار دارند (P<0.05). تیمار کنترل (شاهد): استیک گوساله خام، تیمار A: استیک گوساله + ۲/۶ درصد (حجمی/ وزنی) عصاره بروکلی تیمار، B: استیک گوساله + ۲/۶ درصد (حجمی/ وزنی) عصاره بروکلی + ۲۵درصد (حجمی/ وزنی) سس سویا، تیمار C: استیک گوساله + ۲۵درصد (حجمی/ وزنی) سس سویا.

Figure 1- The Myofibril Fragmentation Index (MFI) of beefsteak chunks with broccoli juice and soy sauce during storage at 4 °C. A-D different letters within marinade treatments and a-d different letters within the tenderization time indicate statistically significant differences at P<0.05.Treatments: control: crude beefsteak, A: beefsteak + 2.6 % (v/w)Broccoli juice, B: beefsteak + 2.6 % (v/w) Broccoli juice + 25% (v/w) soy sauce, C: beefsteak + 25% (v/w)soy sauce.

نیروی برشی: میانگین داده‌های نیروی برشی تیمارهای مختلف گوشت طی زمان ترد شدن در جدول ۳ آورده شده‌است. بر اساس نتایج تحلیل واریانس، اثر زمان ترد شدن و نوع ماریناد بر مقدار نیروی برشی معنی‌دار بود. همان‌طور که در جدول ۳ ملاحظه می‌گردد، میانگین مقدار نیروی برشی طی زمان ترد شدن در تمامی تیمارها کاهش معنی‌دار نشان داد که به‌دلیل فعالیت آنزیم‌ها و پیشرفت فرایند رسیدن گوشت می‌باشد. میانگین مقدار نیروی برشی در تمامی روزهای مورد بررسی در نمونه B در کمترین مقدار (۱۲۸/۵نیوتن) گزارش شد. پس از آن به ترتیب، نمونه A (۱۵۱/۱نیوتن)، نمونه C (۱۶۶/۸نیوتن) و نمونه شاهد (۱۸۷/۵نیوتن) قرار داشتند. همان‌طور که در جدول ۳ ملاحظه می‌گردد، در نمونه $B_{۴۸}$ کمترین مقدار نیروی برشی (۶۴/۵۸ نیوتن) در بین تمامی تیمارها مشاهده شد. علت این موضوع را می‌توان فعالیت آنزیم‌های پروتئولیتیک بروکلی که از نوع سیستئین پروتئازها می‌باشند دانست. از آنجا که این پروتئازها بر پروتئین‌های میوفیبریلی و بافت پیوندی تأثیر بیشتری دارند (۲،

۲۹، ۳۵)، لذا شدت تردشدن نمونه‌های گوشت حاوی بروکلی بیشتر بود و نیروی برشی کمتری مشاهده شد. نکته دیگر به‌دست آمده از نتایج داده‌های نیروی برشی آن است که آنزیم‌های تردکننده بروکلی در شرایط اسیدی (نمونه دارای شیره بروکلی و سس سویا) بهتر عمل می‌نماید و نمونه حاوی بروکلی و فاقد سس سویا (نمونه A) جایگاه دوم تردی را به‌دست آورد. ماریناد اسیدی می‌تواند سبب تخریب پیوندهای هیدروژنی فیبرهای کلاژن و در نتیجه متورم شدن بافت پیوندی شود که در نهایت با افزایش حلالیت بافت پیوندی عضله و کاهش نیروی برشی همراه است (۱۱). این نتایج کاملاً با مقادیر شاخص MFI هم‌خوانی دارد. ناوینا و همکاران (۲۰۰۴) گزارش کردند نیروی برشی وارنربراتزلر در نمونه های گوشت تیمار شده با پروتئازهای گیاهی کوکومیس زردچوبه و پودر زنجبیل طی دوره ترد شدن کاهش یافت (۲۹). آکتاس و همکاران (۲۰۰۳) و بورکه و مونهان (۲۰۰۳) بطور مشابهی گزارش کردند با افزایش غلظت اسید سیتریک در نمونه‌ها، مقدار نیروی لازم جهت رسیدن به نقطه تسلیم کاهش یافت (۱۱).



شکل ۲- ریزنگاشت میکروسکوپ الکترونی روبشی استیک گوساله تیمار شده با مارینادهای مختلف بعد از ۴۸ ساعت زمان تردشدن؛ تیمار کنترل (شاهد): استیک گوساله خام، تیمار الف: استیک گوساله + ۲/۶ درصد (حجمی/ وزنی) شیره بروکلی تیمار، ب: استیک گوساله + ۲/۶ درصد (حجمی/ وزنی) شیره بروکلی + ۲۵درصد (حجمی/ وزنی) سس سویا تیمار، ج: استیک گوساله + ۲۵درصد (حجمی/ وزنی) سس سویا. تیمارهای شاهد، A، B و C با بزرگنمایی ۱۰۰۰× و ولتاژ kv ۲۰.

Figure 2- Scanning Electron Microscopy (SEM) of beefsteak chunks with broccoli juice and soy sauce during storage after 48 hours at 4 °C. Treatments: sample C: beefsteak + 25% (v/w)soy sauce, sample A: beefsteak + 2.6 % (v/w)Broccoli juice, sample B: beefsteak + 2.6 % (v/w)Broccoli juice + 25% (v/w)soy sauce, sample Control: croud beefsteak. Magnification of ×1000 A, B, C and Control samples. at acceleration voltage of 20 kv.

ریزساختار عضله: ریزنگاشت میکروسکوپ الکترونی روبشی عضله تیمار شده با سس سویا (شکل ۲- ج)، شیره بروکلی(شکل ۲-الف)، بروکلی + سس سویا (شکل ۲-ب) و نمونه تیمار نشده کنترل (شاهد) مربوط به ساعت ۴۸ دوره ترد شدن در شکل۲ نمایش شده‌است. همان‌طور که در شکل ۲ ملاحظه می‌گردد، نمونه شاهد دارای ساختار فیبرهای عضلانی فشرده و نزدیک به یکدیگر بود؛ در حالی که در نمونه‌های

تیمارشده، افزایش فضای بین میوفیبریل‌ها همراه با مقدار زیادی مواد مترشحه و همچنین شکاف‌های بزرگ بین فیبرهای عضلانی دیده می‌شود که می‌تواند ناشی از تخریب کلاژن اندومزیوم و بخش‌های سارکولمایی فیبرهای عضلانی باشد (۲۲، ۲۹). نتایج پژوهش‌های پیشین نشان داد در شرایط اسیدی به‌دلایل افزایش حلالیت کلاژن، تورم و تخریب بافت‌های همبند مانند پری مزیوم و اندومزیوم گسترش بیشتری دارند (۲۴). ونگ و همکاران (۲۰۰۴) گزارش دادند در شرایط اسیدی آنزیم‌های EP1 (متالوپروتئاز)، EP2 (متالوپروتئاز و سیستئین پروتئاز)، EP3 (سرین پروتئاز و آسپارتیک پروتئاز)، EP4، EP5 و EP7 (سیستئین پروتئاز) و EP6 (سرین پروتئاز) موجود در شیره بروکلی فعالیت پروتئولیتیک بیشتری را بر پروتئین‌های میوفیبریلی و بافت همبندی نشان دادند (۳۹). ریزنگاشت میکروسکوپ الکترونی روبشی عضله تیمار شده با مارینـاد بروکلی و سس سویا (شکل ۲-ب) این موضوع را تأیید می‌نماید.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد شیره کلم بروکلی دارای ترکیبات تردکننده گوشت و به‌عبارتی آنزیم‌های پروتئازی است که البته این آنزیم‌ها در شرایط اسیدی فعالیت بهتری دارند. ترکیب شیره‌ی بروکلی به‌همراه سس سویا می‌تواند به عنوان یک مارینـاد موثر برای بهبود تردی در استیک گوساله به کار رود. افزایش مقادیر MFI، WHC و حلالیت پروتئین‌های میوفیبریلی و نیز کاهش WBSF از اثرات مثبت نگهداری گوشت در مارینـاد فوق است. بنابراین، فرمولاسیون بهینه‌ی این افزودنی می‌تواند جایگاه مناسبی در بین ترد کننده‌های طبیعی گوشت برای کاربرد صنعتی پیدا کند.

Refrences

1. Aaslyng, M.D., Bejerholm, C., Ertbjerg, P., Bertram, H.C., and Andersen, H.J. 2003. Cooking loss and juiciness of pork in relation to raw meat quality and cooking procedure. Food Quality and Preference. 14:4.277-288.
2. Abdeldaiem, M., Hoda, H., and Ali, G. 2013. Tenderization of camel meat by using fresh ginger (Zingiber officinale) extract. Food Science and Quality Managment. 21:12-25.
3. Aktaş, N., Aksu, M., and Kaya, M. 2003. The effect of organic acid marination on tenderness, cooking loss and bound water content of beef. Journal of Muscle Foods. 14:3.181-194.
4. AOAC Method, 2000. Association of Official Analytical Chemists, 17th ed. Washington, DC.
5. Bah, C.S., Carne, A., McConnell, M.A., Mros, S., and Bekhit Ael, D. 2016. Production of bioactive peptide hydrolysates from deer, sheep, pig and cattle red blood cell fractions using plant and fungal protease preparations. Food Chemistry. 202:458-466.
6. Baker, E.N., Boland, M.J., Calder, P.C., and Hardman, M.J. 1980. The specificity of actinidin and its relationship to the structure of the enzyme. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology. 61:61.30-34.
7. Baublits, R.T., Pohlman, F.W., Brown, A.H., Jr., and Johnson, Z.B. 2005. Effects of sodium chloride, phosphate type and concentration, and pump rate on beef biceps femoris quality and sensory characteristics. Meat Science. 70: 2.205-214.
8. Bejerholm, C., and Aaslyng, M.D. 2004. The influence of cooking technique and core temperature on results of a sensory analysis of pork depending on the raw meat quality. Food Quality and Preference. 15:1.19-30.
9. Berge, P., Ertbjerg, P., Larsen, L.M., Astruc, T., Vignon, X., and Møller, A.J. 2001. Tenderization of beef by lactic acid injected at different times post mortem. Meat science. 57:4.347-357.

10. Buford, M.L., Calkins, C.R., Johnson, D.D. and Gwartney, B.L. 2004. Cow muscle profiling: A comparison of chemical and physical properties of 21 muscles from beef and dairy cow carcasses. Nebraska Beef Cattle Reports .185.
11. Burke, R., and Monahan, F. 2003. The tenderisation of shin beef using a citrus juice marinade. Meat science. 63: 2.161-168.
12. Calkins, C.R., and Sullivan, G. 2007. Adding enzymes to improve beef tenderness. Beef Facts Product Enhancement, National Cattleman's Beef Association. Centennial Colorado: Cattlemen's Beef Board.
13. Chávez-Garay, D.R., Gutiérrez-Méndez, N., Valenzuela-Soto, M.E., and García-Triana, A. 2015. Partial characterization of a plant coagulant obtained from the berries ofSolanum elaeagnifolium. CyTA - Journal of Food. 14:2.200-205.
14. Devine C, Dikeman M, 2014. Encyclopedia of meat sciences. Elsevier Ltd. unless otherwise stated, 465p.
15. Feijoo-Siota, L., and Villa, T.G. 2010. Native and Biotechnologically Engineered Plant Proteases with Industrial Applications. Food and Bioprocess Technology. 4:6.1066-1088.
16. Gornall, A.G., Bardawill, C.J., and David, M.M. 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. Journal of Biological Chemistry. 177:2.751-766.
17. Ha, M., Bekhit Ael, D., Carne, A., and Hopkins, D.L. 2013. Characterisation of kiwifruit and asparagus enzyme extracts, and their activities toward meat proteins. Food Chemistry. 136:2.989-998.
18. He, F.Y., Kim, H.W., Hwang, K.E., Song, D.H., Kim, Y.J., Ham, Y.K., and Kim, C.J. 2015. Effect of Ginger Extract and Citric Acid on the Tenderness of Duck Breast Muscles. Korean J Food Science of Animal Resources. 35:6.721-730.
19. Honikel, K.O. 1998. Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. Meat science. 49:4.447-457.
20. Lawrence, T., Dikeman, M., Hunt, M., Kastner, C. and Johnson, D. 2003. Staged injection marination with calcium lactate, phosphate and salt may improve beef water-binding ability and palatability traits. Meat Science. 65: 3.967-972.
21. Ke, S., Huang, Y., Decker, E.A., and Hultin, H.O. 2009. Impact of citric acid on the tenderness, microstructure and oxidative stability of beef muscle. Meat Science. 82:1.113-118.
22. Ketnawa, S., and Rawdkuen, S. 2011. Application of Bromelain Extract for Muscle Foods Tenderization. Food and Nutrition Sciences. 02:05.393-401.
23. Kim, H.-W., Choi, Y.-S., Choi, J.-H., Kim, H.-Y., Hwang, K.-E., Song, D.-H., and Kim, C.-J. 2013a. Antioxidant effects of soy sauce on color stability and lipid oxidation of raw beef patties during cold storage. Meat science. 95:3.641-646.
24. Kim, H.W., Choi, Y.S., Choi, J.H., Kim, H.Y., Lee, M.A., Hwang, K.E., and Kim, C.J. 2013b. Tenderization effect of soy sauce on beef M. biceps femoris. Food Chemistry. 139:1-4.597-603.
25. Kim, H.W., Hwang, K.E., Song, D.H., Kim, Y.J., Lim, Y.B., Choi, J.H., and Kim, C.J. 2014. Effects of soy sauce on physicochemical and textural properties of tumbled chicken breast. Poultry Science. 93:3.680-686.
26. Kim, S.J., Min, S.C., Shin, H.J., Lee, Y.J., Cho, A.R., Kim, S.Y., and Han, J. 2013c. Evaluation of the antioxidant activities and nutritional properties of ten edible plant extracts and their application to fresh ground beef. Meat Science. 93:3.715-722.
27. Lopez-Chillon, M.T., Carazo-Diaz, C., Prieto-Merino, D., Zafrilla, P., Moreno, D.A., and Villano, D. 2019. Effects of long-term consumption of broccoli sprouts on inflammatory markers in overweight subjects. Clinical Nutrition. 38:2.745-752.
28. Naveena, B., and Mendiratta, S. 2004. The tenderization of buffalo meat using ginger extract. Journal of Muscle Foods. 15:4.235-244.
29. Naveena, B., Mendiratta, S., and Anjaneyulu, A. 2004. Tenderization of buffalo meat using plant proteases from *Cucumis trigonus Rox*b (Kachri) and

Zingiber officinale roscoe (Ginger rhizome). Meat Science. 68:3.363-369.

30. 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. 88:4.727-732.
31. Reza Gheisari, H., Aminlari, M. and Shahram Shekarforoush, S. 2009. A comparative study of the biochemical and functional properties of camel and cattle meat during frozen storage. Veterinarski arhiv 79: 1.51-68.
32. Page, T., Griffiths, G., and Buchanan-Wollaston, V. 2001. Molecular and biochemical characterization of postharvest senescence in broccoli. Plant Physiology. 125:2.718-727.
33. Sheard, P.R., and Tali, A. 2004. Injection of salt, tripolyphosphate and bicarbonate marinade solutions to improve the yield and tenderness of cooked pork loin. Meat Science. 68:2.305-311.
34. Smith, D.P., and Young, L.L. 2007. Marination pressure and phosphate effects on broiler breast fillet yield, tenderness, and color. Poultry Science. 86: 12. 2666-2670.
35. 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.
36. Sultana, A., Nakanishi, A., Roy, B., Mizunoya, W., Tatsumi, R., Ito, T., and Ikeuchi, Y. 2008. Quality improvement of frozen and chilled beef biceps femoris with the application of salt-bicarbonate solution. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. 21: 6.903-911.
37. Sun, Q., Zhang, B., Yan, Q.J., and Jiang, Z.Q. 2016. Comparative analysis on the distribution of protease activities among fruits and vegetable resources. Food Chemistry. 213, 708-713.
38. Tsai, L.-L., Yen, N.-J., and Chou, R.-G.R. 2012. Changes in Muscovy duck breast muscle marinated with ginger extract. Food Chemistry. 130:2.316-320.
39. Wang, Y.T., Yang, C.Y., Chen, Y.T., Lin, Y., and Shaw, J.F. 2004. Characterization of senescence-associated proteases in postharvest broccoli florets. Plant Physiology Biochemistry. 42:7-8.663-670.
40. Xargayó, M., Lagares, J., Fernández, E., Ruiz, D., and Borrell, D. 2001. Marination of fresh meats by means of spray effect: influence of spray injection on the quality of marinated products. Fleischwirstschaft. 81: 2.93-98.