معرفی پروتئین‌های ضد یخ و کاربرد آنها در صنایع غذایی

ساناز قاسمی[1]، سید مهدی جعفری[2*]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۲- دانشیار گروه مهندسی مواد و طراحی صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۱/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۷/۰۴

پیام‌نگار: Smjafari@gau.ac.ir

چکیده

کاربرد پروتئین‌های ضد یخ به عنوان یکی از نگهدارنده‌های غذایی، کیفیت غذاهای منجمد شده را طی سردخانه گذاری، حمل‌ونقل و خروج از انجماد بهبود می‌بخشد. عمده نقش این پروتئین‌ها، کنترل بازتبلور یخ و جلوگیری از تشکیل بلورهای درشت یخ است که درنهایت از تخریب دیواره سلولی و خروج شیرابه از بافت در طی خروج از انجماد کاسته می‌شود. نکته درخور توجه دیگر از این قرار است که این پروتئین‌ها در مقادیر کم نیز از چنین قابلیتی برخوردارند. این پروتئین‌ها در بسیاری از دستگاه‌های زیستی مقاوم به سرما مثل ماهی‌ها، حشرات و گیاهان یافت شده‌اند که همه آن‌ها قابل کنترل بازتبلور یخ‌اندو در مواردی هیسترزیس گرمایی و فعالیت‌های هسته‌دار کردن یخ را نیز نشان می‌دهند. هدف از این مطالعه معرفی پروتئین‌های ضد یخ، سازوکار عمل آنها و برخی کاربردها و امکان بالقوهٔ مصرف آنها در صنایع غذایی است.

کلیدواژه‌ها: پروتئین‌های ضد یخ، تبلور مجدد، پروتئین‌های بلوری، هیسترزیس گرمایی.

۱. مقدمه

پروتئین‌های ضد یخ (AFP[1]) در اوایل دههٔ ۱۹۷۰ در خون ماهی‌های قطب جنوب یافت شدند. دمای آب اقیانوس‌های جنوب حدود ۱/۹ درجه سلسیوس است و بیشترین غلظت الکترولیت‌ها در این ماهی‌ها تنها قادر است که نقطه انجماد خون را ۰/۶ تا ۰/۷ کاهش دهد[۱]. بنابراین، علاوه بر نمک، حضور مواد ضد یخ دیگری موجب حفاظت ماهی در این دماها شده است. بنابر پژوهش‌ها، این مواد ضدیخ، پروتئین بوده‌اند که توانسته‌اند دمای انجماد را در ماهیان قطب کاهش دهند و ماهی را از صدمات ناشی از سرما حفظ کنند؛ بنابراین پروتئین‌های ضد یخ نامیده شدند که اغلب گونه‌های ماهی، حشرات، گیاهان و ریزاندامگان‌هایی که در محیط سرد زندگی می‌کنند، این پروتئین‌ها را تولید می‌کنند و بنابر تعریف جلوگیری کننده از رشد یخ معنا می‌دهند[۲]. پروتئین‌های ضد یخ از مسیرهای گوناگونی چون کاهش دمای انجماد، تعدیل یا ممانعت از رشد بلورهای یخ، جلوگیری از بازتبلور و محافظت غشایی سلول در برابر آسیب ناشی از سرما، موجودات زنده را در برابر سرما محافظت می‌کنند. سازوکار عمل این پروتئین‌ها از طریق تأثیر بر رشد بلورهای یخ بررسی شده و با بررسی‌های مختلف پی بردند که این

* گرگان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، دانشکده صنایع غذایی، گروه مهندسی مواد و طراحی صنایع غذایی

1. Anti Freeze Protein

پروتئین‌ها با اتصال به بلور یخ، نقطه انجماد یخ را کاهش و نقطه ذوب آن را افزایش می‌دهند[۳]. این اختلاف بین نقطه انجماد و نقطه ذوب را به اصطلاح هیسترزیس گرمایی[1] گویند که می‌تواند حدود ۰/۱ تا ۶ درجه سلسیوس باشد; همچنین، شیوه‌ای برای اندازه‌گیری تأثیر این پروتئین‌هاست که دامنه کاهش نقطه انجماد به نوع پروتئین ضد یخ بستگی دارد و از پروتئینی به پروتئین دیگر متفاوت است[۲،۱].

هدف از این مطالعه، معرفی پروتئین‌های ضدیخ[2]، سازوکارهای مختلف عملکرد آنها و برخی کاربردها و پتانسیل استفاده از آنها در صنعت غذایی است.

۲. دسته‌بندی پروتئین‌های ضد یخ

دو پژوهشگر به نام‌های هیو و یانگ (۱۹۹۲)، پروتئین‌های ضد یخ را در گروه‌های مختلفی (مطابق جدول (۱)) طبقه‌بندی کردند[۱].

جدول ۱. پروتئین‌های ضد یخ

انواع پروتئین‌های ضد یخ	وزن مولکولی (kDa)	ساختار
گلیکوپروتئین‌های ضدیخ (AFGPs)[3]	۲/۶-۳/۳	توالی‌های تکراری AAT با مولکول قند آلانین - آلانین- تیرونین
پروتئین ضدیخ نوع ۱	۳-۵	مارپیچی آلفا، غنی از آلانین
پروتئین ضدیخ نوع ۲	۱۴	کروی، پیوندهای دی سولفید
پروتئین ضدیخ نوع ۳	۶ - ۷	کروی، بتا ساندویچ
پروتئین ضدیخ نوع ۴	۱۲ - ۱۳	مجموعه مارپیچی چهارتایی غیر موازی، محتوای بالایی از گلوتامین

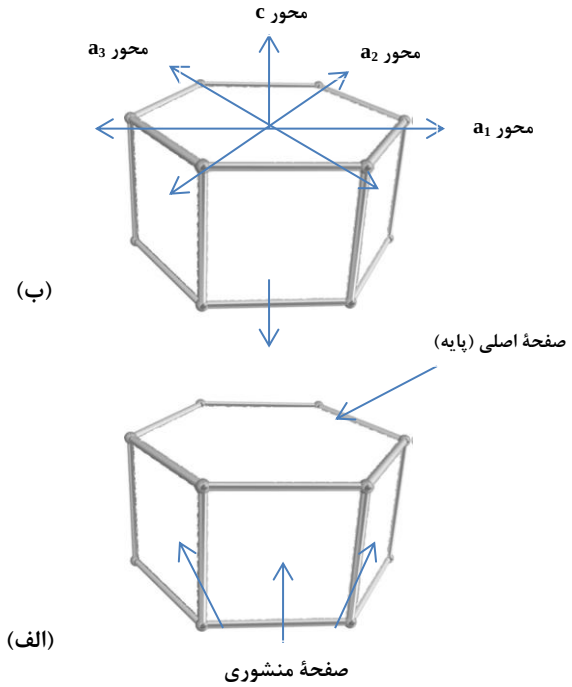
1. Thermal Hysteresis

۲. پروتئین‌های بلوری، پروتئین‌های ضد انجماد

3. Anti Freeze Glycoproteins

۳. تبلور یخ و بلوری شدن مجدد (بازتبلور) آن

تبلور یخ و بازتبلور آن به مرحله تبدیل آب از مایع به جامد مربوط است[۴]. تفاوت بسیار مهم از این قرار است که در تبلور یخ، بلورهای یخ در اطراف هسته همگن یا ناهمگن تشکیل می‌شوند، درحالی‌که در بازتبلور ، بلورهای یخ رشد می‌کنند و بزرگ‌تر می‌شوند و بلورهای کوچک‌تر یخ از بین می‌روند و مرحله هسته‌دار شدن را نمی‌گذراند[۵].



شکل ۱. شکل فرضی بلور یخ: (الف) سه محور آلفای متقارن موجود در یک صفحه و یک محور C، در صفحه‌ای عمود بر صفحه محورهای آلفا.(ب) صفحه با محورهای آلفا که صفحه پایه واصلی نام دارد و صفحه با محور C که صفحه منشوری نام دارد.

۳-۱ ساختار یخ

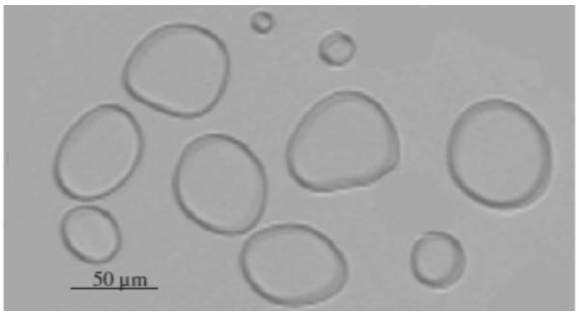
یخ نتیجه آرایش ویژهٔ مولکول‌های آب در یک شبکه پیوندهای هیدروژنی است که در آن هر مولکول آب چهار پیوند هیدروژنی با نزدیک‌ترین مولکول‌های آب (آرایش چهاروجهی) تشکیل می‌دهد. در این شکل بلوری، سه محور متقارن آلفا در یک صفحه قرار و یک محور C به‌تنهایی در یک صفحه قرار می‌گیرد که عمود بر صفحه محورهای آلفاست (شکل (۱)- الف). صفحه محورهای آلفا،

صفحه پایه یا اصلی و صفحه محور C، صفحه منشور نامیده می‌شود (شکل (۱)- ب)[۲]. بلورهای یخ با سرعت‌های مختلف در هر صفحه رشد می‌کنند؛ رشد در راستای صفحه منشوری C بسیار سریع‌تر از راستای صفحه اصلی آلفاست، این اختلاف در سرعت رشد، موجب آرایش مختلف مولکول‌های آب و تشکیل پیوندهای هیدروژنی در هر مکان و سرانجام ایجاد خصوصیات ظاهری متفاوت می‌شود[۲]. دما مهم‌ترین نقش را در سرعت رشد دارد. بلورهای یخ در دمای صفر درجه سلسیوس به‌صورت صفحات گرد ظاهر می‌شوند (شکل (۲)- الف) و در دماهای پایین‌تر از صفر درجه اغلب شکل غیرطبیعی و نامنظم دارند.

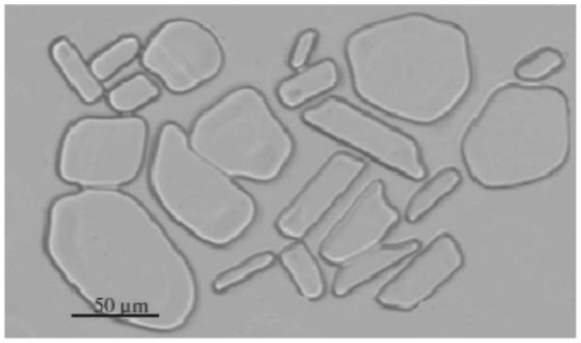
۳-۲ سازوکار تبلور یخ

هنگامی‌که آب یا هر محلول دیگری سرد می‌شود، حرکت مولکول‌ها کند می‌شود و محلول در فاز مایع باقی می‌ماند، حتی اگر دما پایین‌تر از نقطه انجماد تعادلی آن شود، که آن را نقطه فوق سرد یا اَبَرسرد گویند[۴]. نقطه ذوب محلول دمایی است که با حرارت دادن آهسته یک محلول منجمد آخرین بلور یخ ذوب شود[۶]. محلول‌ها در دماهای مختلفی اَبَرسرد می‌شوند تا به نقطه انجماد خودبه‌خود (نقطه هسته‌دار شدن)، یعنی هنگام شروع تبلور، برسند. تبلور طی دو مرحله اصلی صورت می‌گیرد: ۱. هسته‌دار شدن، یعنی تشکیل هسته پایدار بلورها؛ ۲. گسترش بلورهای یخ با رشد هسته‌ها[۴].

هسته‌دار شدن معمولاً پیرامون مولکول‌های خارجی رخ می‌دهد (هسته‌دار شدن ناهمگون) یا طی فرایندی، مولکول‌ها به‌خودی‌خود طی تغییرات درونی، هسته‌ها را تشکیل می‌دهند (هسته‌دار شدن همگون در مورد آب خالص)[۵]. هسته‌دار شدن ناهمگون در دماهای بالاتری نسبت به هسته‌دار شدن همگون، رخ می‌دهد[۶]. تشکیل هسته کوچک پایدار زمانی رخ می‌دهد که با کاهش دما حرکت مولکولی محلول، کاهش می‌یابد و مولکول‌ها در فاز مایع باقی می‌مانند و شروع به خوشه‌ای شدن می‌کنند (مرحله اول). افزایش سرعت انتقال گرما یا نقطه اَبَرسرد بالاتر، باعث ایجاد هسته‌های پایدارتر و کوچک‌تر می‌شود، بنابراین تعداد بلورهای یخ بیشتری تشکیل می‌شوند، زیرا هر هسته یک بلور یخ می‌سازد[۵و۴]. برخلاف مرحله هسته‌دار شدن، انتقال گرما آهسته یا نقطه اَبَرسرد پایین‌تر، سرعت رشد بلورهای یخ را افزایش می‌دهد که این نیز موجب تشکیل تعداد کمتر و درشت‌تر بلور یخ می‌شود[۴].



(الف) ۴°C-



(ب) ۱۰°C-

شکل ۲. تصاویری از محلول حاوی ۲۳٪ سوکروز در دماهای انجماد: (الف) بلورهای یخ به شکل صفحات گرد در دمای (۴-) درجه؛ (ب) بلورهای یخ به شکل نامنظم در انجماد سریع که هنوز به پایین‌ترین سطح انرژی خود نرسیده‌اند.

۳-۳ سازوکار بازتبلور

بازتبلور یخ زمانی رخ می‌دهد که دما در محدوده زیر صفر درجه در قالب سازوکارهای مختلف، نوسان دارد، که به از بین رفتن بلورهای کوچک یخ و رشد و بزرگ‌تر شدن بلورهای یخ می‌انجامد. این بلورهای درشت‌تر، به بافت و سلول‌ها آسیب بیشتری می‌رسانند[۷]. یک نوع جدید فرایند بازتبلور وجود دارد که در این پژوهش توضیح داده می‌شود[۴،۸،۹]. بازتبلور در انواع رایج هم جرمی جابه‌جا شونده و بهم پیوستگی وجود دارد که در شکل (۳) مشاهده می‌شوند. کاهش در سطح آزاد انرژی، یک نیروی محرک ترمودینامیکی در همه این سازوکارهاست[۱۰].

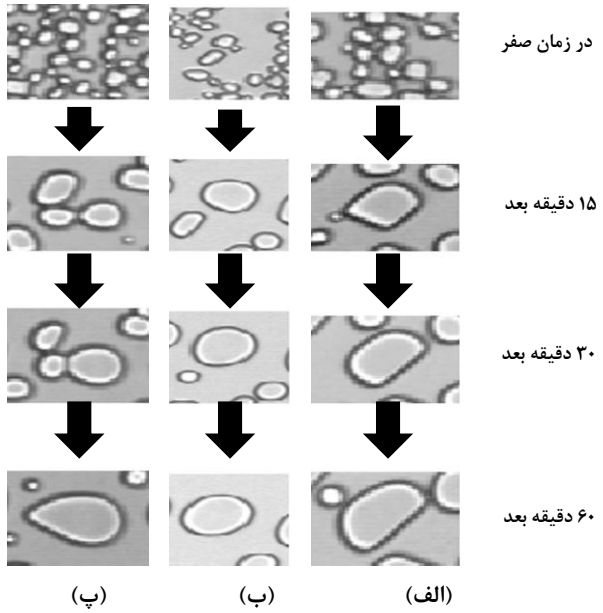
۳-۳-۱ بازتبلور هم جرمی

این فرایند را گرد کردن نیز می‌گویند و شامل تبدیل بلورهای یخ با سطح نامنظم به بلورهای یخ با سطح صاف‌تر است (شکل (۳)- الف). بلورهای با سطح تیزتر پایداری کمتری دارند که علت آن

بیشتر بودن شعاع خمیدگی انرژی ویژهٔ آن است؛ بنابراین در مدت طولانی‌تری سطح آنها صاف می‌شود[۳]. این فرایند سطح انرژی بلورهای یخ با شکل نامنظم و نسبت سطح به حجم را نیز کاهش می‌دهد[۸]. چسبندگی سطحی مولکول‌های آب این تغییرات را در ساختار بلورهای یخ آغاز می‌کند[۹].

۳-۳-۲ بازتبلور جابه‌جا شونده

در این روش، بلورهای بزرگ‌تر یخ رشد می‌کنند و بلورهای کوچک‌تر از بین می‌روند. بلورهای کوچک‌تر یخ بسیار سریع‌تر از بلورهای بزرگ‌تر یخ ذوب و ناپدید می‌شوند، زیرا در این بلورها شعاع خمیدگی کمتر و نسبت سطح به حجم بیشتر است که موجب می‌شود انرژی سطح آزاد آن‌ها بالاتر باشد و سریع‌تر ذوب شوند[۹]. در دما و فشارثابت، بازتبلور جابه‌جا شونده، رسیدن استوالد[1] نامیده می‌شود[۸]. وقتی دما تغییر می‌کند، این نوع را بازتبلور ذوب- انجماد می‌نامند و به دودسته تقسیم می‌شوند: ۱. ذوب- انتشار- رشد؛ ۲. ذوب- کوچک شدن- رشد مجدد.



شکل ۳. تصاویری از محلول سوکروز ۲۳٪ در دمای ۴- درجه سلسیوس؛ فرایند تبلور مجدد: (الف) هم جرمی؛ (ب) جابه‌جا بازشونده؛ (پ) بهم پیوستگی

در نوع ذوب- انتشار- رشد، بعد از افزایش دما کوچک‌ترین بلورهای یخ به‌طور کامل ذوب می‌شوند و فاز مایع محلول بیشتر می‌شود. پس از کوتاه زمانی دماپایین می‌آید و آب از لایه‌های فاز مایع روی سطح بلورهای بزرگ‌تر قرار می‌گیرند؛ بنابراین تعداد بلورها کاهش می‌یابد[۸]. در نوع ذوب- کوچک شدن- رشد مجدد، تعداد بلورهای یخ ثابت می‌ماند، زیرا هنگام حرارت دادن، بلورهای یخ تا حد کمی ذوب می‌شوند و هنگام سرد شدن مجدد رشد می‌کنند. از رفتارهای نوع ذوب- انتشار- رشد در دماهای بالاتر انجماد هنگام نوسان دمایی استفاده می‌شود، زیرا بلورهای کوچک‌تر یخ به علت مقاومت کمتر نسبت به ذوب شدن، سریع‌تر ذوب می‌شوند[۱۱]. کوچک‌ترین بلورها در برابر ذوب شدن و کوچک شدن پایدار و محکم‌اند؛ بعد از آن بزرگ‌ترین بلورهای یخ رشد می‌کنند تا مساحت سطح و انرژی آزاد به حداقل برسد. نتیجه نهایی این فرایند، کاهش تعداد کلی بلورهای یخ و افزایش ابعاد بلورهاست.

۳-۳-۳ بازتبلور بهم پیوستگی

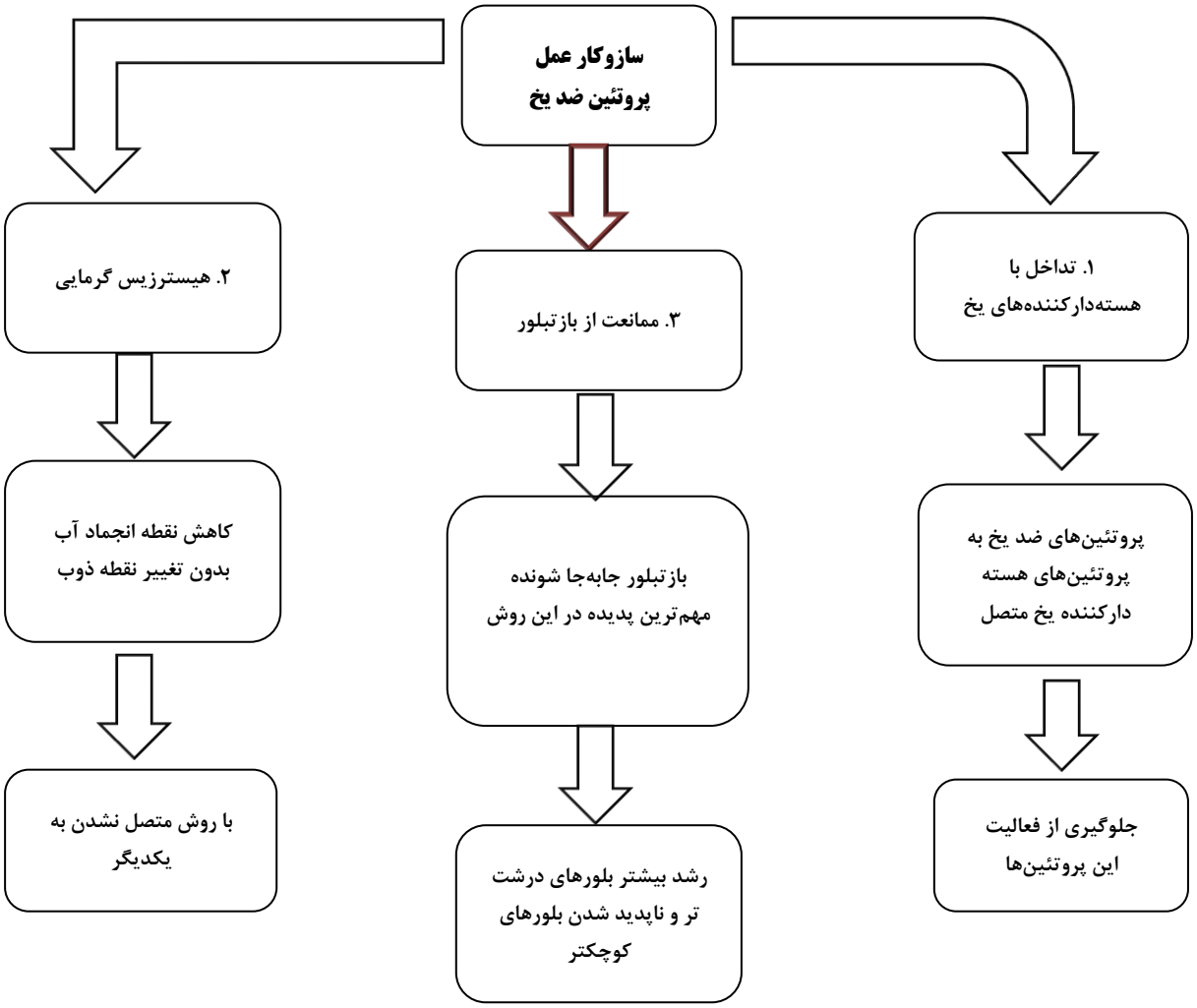
این نوع تبلور، عبارت است از چسبیدن دو یا چند بلور یخ به یکدیگر که موجب کمتر شدن تعداد بلورها و بزرگ‌تر شدن ابعاد آنها می‌شود (شکل (۳)- پ). سازوکار عمل این نوع تبلور، انتشار سطحی بدون حرکت بلورها فرض شده است[۹]. این نوع تبلور زمانی رخ می‌دهد که حجم فاز یخ محلول بیشتر باشد، زیرا حرکت بلورهای یخ به سمت یکدیگر بعید فرض شده است. در نقطه برخورد بلورهای یخ، افزایش غلظت شیبداری اتفاق می‌افتد که موجب انتقال مواد در آن ناحیه می‌شود[۳] که در بعضی مواقع، تجمع بلورهای یخ، این نوع بازتبلور را موجب می‌شوند[۱۰]. به هم پیوستن بلورهای یخ معمولاً بعداز گرد کردن آن رخ می‌دهد تا شکل کروی‌تری در بلورهای یخ ایجاد شود و انرژی سطح آزاد آن‌ها کاهش یابد، زیرا سطح خمیدگی کاهش می‌یابد. هنگام بازتبلور یخ سازوکارهای یاد شده در بالا همزمان رخ می‌دهند، بنابراین با توجه به مفهوم بازتبلور ، می‌توان این نام را با نام رشد بلورهای بزرگ‌تر یخ و بازسازی دیگر بلورها، عوض کرد.

1. Ostwald Ripening

۴. برهمکنش بین بلورهای یخ و پروتئین‌های ضد یخ

بنابر نتایج مطالعات، روشی که این پروتئین‌های ضد یخ طی آنها روی فرایند یخ زدن تأثیر می‌گذارند، به هیچ ماده دیگری شبیه نیست و برهمکنش این پروتئین‌ها و بلورهای یخ نیز به هیچ ماده دیگری شبیه نیست[۲]؛ اما موضوع مهم از این قرار است که پروتئین‌های ضدیخ ممکن است با تشکیل یخ و بازتبلور یخ تداخل ایجاد کنند. این پروتئین‌ها هنگام برخورد با بلورهای یخ سه رفتار بروز می‌دهند که شامل برهمکنش با خصوصیت هسته‌دار کردن یخ، هیسترزیس گرمایی، و ممانعت از بازتبلور یخ است.

فعالیت ممانعت از بازتبلور یخ ممکن است خصوصیت مشترک بین همه پروتئین‌های ضد یخ باشد، اما هیسترزیس گرمایی یا فعالیت اتصال هسته‌دار کننده‌های یخ چنین نیست؛ پس، این ویژگی ملاکی برای اندازه‌گیری فعالیت ضدیخی به‌شمار می‌آید.



شکل ۴. برهمکنش پروتئین‌های ضد یخ و بلورهای یخ

۵. آزمون‌های اندازه‌گیری فعالیت ضدیخی پروتئین‌ها

دو آزمون اصلی برای اندازه‌گیری فعالیت ضدیخی پروتئین‌های ضد یخ در آزمایشگاه انجام می‌گیرد:

۱. هیسترزیس گرمایی ۲. اندازه‌گیری فعالیت ممانعت کردن از بازتبلور یخ (IRI)[1].

۵-۱ آزمون هیسترزیس گرمایی

در این آزمون، اختلاف دمای نقطه انجماد و نقطه ذوب محلول حاوی پروتئین‌های ضد یخ اندازه‌گیری می‌شود[۶]. هیسترزیس گرمایی در آزمایشگاه با بهره‌گیری از اسمزسنج نانولیتر اندازه‌گیری می‌شود. در این آزمون مقدار بسیار کمی (حجم میکرولیتر) از محلول پروتئین‌های ضد یخ درون سوراخ استوانه‌ای شکل موجود در یک صفحه فلزی تزریق می‌شود، که قبلاً با یک قطره روغن در سرما، پر شده است (تا از کشش سطحی جلوگیری کند). دمای حفره با بهره‌گیری از دستگاه پلتیر[2] کنترل و به نمونه زیر میکروسکوپ نگاه می‌شود. رشد و یا کوچک شدن بلورهای یخ را در خلال اندازه‌گیری، می‌توان روی فیلم یا عکس ضبط و بعداً آن را مطالعه کرد [۱۷]. در اندازه‌گیری هیسترزیس گرمایی از طریق مشاهده مستقیم میکروسکوپی رشد بلورها در نمونه، خطا و اشتباه پیش می‌آید. در این روش، مسیر دقیقی برای ثبت نقطه انجماد و نقطه شروع ثانویه دمای تبلور در یک محلول با وجود یک هسته یخ، وجود ندارد، زیرا آن‌ها با ارزیابی بصری سنجیده می‌شوند[۱۸]. نمونه‌ها بعد از اندازه‌گیری نمی‌توانند برای کاربرد دیگری به‌کار گرفته شوند. واردکردن نمونه‌ها به یک صفحه فلزی و یافتن یک بلور مناسب برای آزمون می‌تواند کسل‌کننده و موجب اتلاف وقت باشد. دو تن از پژوهشگران به نام هاسن و بوست (۱۹۸۸)، روشی را پیشنهاد کردند که با استفاده از گرماسنج طیفی متفاوتی (DSC)[3] انجام می‌شود و فعالیت هیسترزیس گرمایی پروتئین‌های ضدیخی ماهی را اندازه‌گیری می‌کند. در این روش، پروتئین‌های ضدیخی ماهی نمونه‌هایی را شامل می‌شود که درون روغن در این دستگاه گرماسنج معلق می‌شوند. این روش دقت اندازه‌گیری هیسترزیس گرمایی را بالا می‌برد، زیرا این دستگاه گرماسنج قادر است دمای ذوب شدن و یخ زدن نمونه را با دقت زیاد ضبط کند. یکی از محدودیت‌های این روش، بهره‌گیری از روغن در محیط این دستگاه است که نه تنها با شرایط عادی خیلی متفاوت است، بلکه با پروتئین‌های ضدیخ ماهی تداخل ایجاد می‌کند و روی نتیجه تأثیر می‌گذارد[۱۹].

۵-۲ اندازه‌گیری‌فعالیت ممانعت‌کردن‌از بازتبلور یخ (IRI)

این آزمون تغییرات تدریجی در اندازه بلورهای یخ را در محلول‌ها در دمای ثابت و متغیر اندازه‌گیری می‌کند. روش‌های زیادی برای اجرای این آزمون وجود دارد که به چند مورد آنها اشاره می‌کنیم.

۵-۲-۱ روش اول

وقتی یک محلول آبی از پروتئین‌های ضد یخ از ارتفاع ۳ متر به روی یک صفحه فلزی دارای محلول نیتروژن سرد ریخته می‌شود، لایه نازکی از یخ به‌سرعت تشکیل می‌شود که آن را آزمون صفحه گویند[۱۲].

۵-۲-۲ روش دوم

روش بالا را اسمال وود و همکاران (۱۹۹۹) اصلاح کردند. آنان نمونه را در مدت زمان کوتاهی بین دو پوشش کاغذی درون یک ظرف یخ خشک منجمد کردند. یکی از نواقص این روش از این قرار است که نمونه بعد از آنالیز غیر قابل استفاده می‌شود و نمی‌توان برای کاربردهای دیگر آن را به‌کار گرفت و یا همزمان آنالیز کرد. نمونه‌های یخ‌زده در این روش و روش قبل با میکروسکوپ آنالیز می‌شوند[۱۳].

۵-۲-۳ روش سوم

این روش را ریگاند و گوف (۲۰۰۵) معرفی کرده‌اند[۱۴]. یک نمونه حاوی پروتئین‌های ضد یخ و سوکروز تهیه می‌شود، به طوری که مانند محلولی عمل کند که نقطه انجماد را کاهش می‌دهد و یک فاز غیر منجمد در تعادل با یخ برقرار کند، به این ترتیب، نمونه روی یک صفحه قرار داده می‌شود و سپس در دمای بسیار کم در یک فضای کنترل‌شده با یک دستگاه دارای صفحات سرد، به‌سرعت سرد (تا دمای ۵۰-) و هسته یخ سریعاً تشکیل شود. درنتیجه، دمای آن محفظه افزایش می‌یابد (اما در محدوده انجماد) و بین ۱۰- و ۴- درجه سلسیوس گردش می‌کند و برای مدت‌زمانی در هریک از

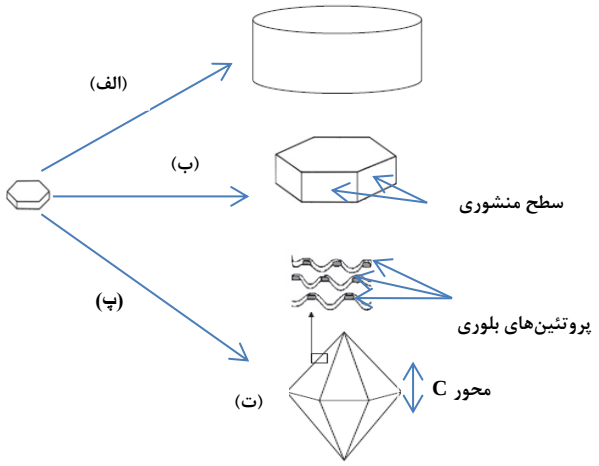
1. The ice Recrystallization Inhibition
2. Peltier Thermostat
3 .Differential Scanning Calorimeter

این دماها باقی می‌ماند تا به بلورهای یخ اجازه رشد دهد، بلورهای بزرگتر یخ رشد می‌کنند و بلورهای کوچک‌تر در طول فرایند ناپدید می‌شوند. بعد از اجرای نوسان‌های دمایی، در محلول حاوی پروتئین‌های ضدیخ، در مقایسه با محلول کنترل‌شده بدون پروتئین‌های ضدیخ، بلورهای یخ کوچک‌تری تشکیل می‌شود. این فرایند با استفاده از میکروسکوپ مشاهده و بررسی می‌شود و می‌توان با دوربین از آن عکس گرفت و ضبط کرد؛ بنابراین عکس‌های حاصل از آن را می‌توان با برنامه‌های کامپیوتری آنالیز کرد و نتیجه کیفی را به دست آورد.

اخیراً رودساری و گوف روش کیفی سریعی را پیشنهاد کردند که با استفاده از روش گرماسنجی (که قبلاً توضیح داده شده)، براساس آزمون ممانعت کنندگی از بازتبلور انجام می‌شود[۲۰]. این روش میزان فعالیت ممانعت‌کنندگی از بازتبلور را در شرایط هم‌دما به مدت ۶۰ دقیقه اندازه می‌گیرد. در این روش، نمونه‌های حاوی پروتئین‌های ضدیخ در غلظت و دامنه گرمایی معینی، به صورت گرمازا در دمانگار نشان داده می‌شوند، در صورتی که نمونه‌های شاهد در دمانگار گرمازا نیستند. این روش می‌تواند برای هر نمونه حاوی پروتئین‌های ضد یخ در محلول آبی خودشان جواب دهد (در محلول‌های بافر و عصاره‌های آبی). این روش خیلی دقیق و سریع است و به‌کار آزمایشگاهی و مشاهده نیز، نیازی ندارد. مقدار عصاره می‌تواند به مقدار کم و حدود ۱ ML باشد. این روش می‌تواند با روش هیسترزیس گرمایی (با استفاده از گرماسنج) درهم آمیزد. محدودیت این روش از این قرار است که نمونه‌ها نمی‌توانند بازیافت و دوباره به‌کار گرفته شوند و دامنه غلظت باید تعیین شود و معین باشد. در این آزمون اطلاعاتی در مورد اندازه بلورها به‌دست نمی‌آید[۱۵].

۶. سازوکار عمل پروتئین‌های ضدیخ

این پروتئین‌ها به سطح یک بلور یخ متصل می‌شوند و با انتشار متعارف در سطح بلور یخ تداخل برقرار و در آن محل از رشد بلورها جلوگیری می‌کنند[۲۱،۲۲،۲۳]. ممانعت از رشد در بعضی مناطق، درحالی که سایر مناطق در حال رشدند، باعث خمیدگی سطحی در بلور یخ می‌شود و در نتیجه به افزایش نسبت سطح به حجم می‌شود که از نظر ترمودینامیکی برای رشد خود به خودی یخ مساعد است و بنابراین رشد بلور یخ به پایان می‌رسد. این سازوکار، به نام آثار کلوین[۲۴]، در محلول‌های بدون پروتئین‌های ضد یخ رشد بلورها در طول محور آلفا باعث گسترش پایه بلوری یخی می‌شود (شکل (۵)- الف). در محلول‌های حاوی پروتئین های ضد یخ رشد یخ در راستای محور C معمول است که موجب می‌شود از یک سطح پایه‌یک نمای منشوری عمودی پدید آید یا در مسیری در جهت نمای پایه نیست[۲۱،۲۵،۲۶،۲۷] (شکل (۵)- ب و پ).



شکل ۵. رشد بلور یخ: (الف) محلول فاقد پروتئین ضدیخ؛ (ب) محلول رقیق حاوی پروتئین ضدیخ که به سمت منشوری آن جذب می‌شود و بلورها به شکل هگزاگونال تشکیل می‌شوند؛ (پ) محلول غلیظ پروتئین‌های ضدیخ که تشکیل بلور به شکل هگزاگونال دوهرمی است؛ (ت) ممانعت از رشد بلور توسط پروتئین‌های ضدیخ.

۷. کاربرد پروتئین‌های ضد یخ در مواد غذایی

بعضی از این پروتئین‌ها به‌طور طبیعی در بسیاری غذاها یافت می‌شوند که به‌عنوان قسمتی از رژیم غذایی انسان مصرف می‌شوند[۷،۲۸،۲۹،۳۰]. ماهی‌های آب‌های سرد یکی از منابع اصلی پروتئین‌های ضد یخ در رژیم غذایی انسان است. فرایندهای صنایع غذایی نیز می‌توانند به خاطر وجود این پروتئین‌ها با سازوکار ممانعت از رشد بلورهای یخ در طول سردخانه گذاری، حمل‌ونقل و یخ‌زدایی بسیار مفید باشد؛ بنابراین از کاهش کیفیت، مانند خراب شدن بافت غذا، به روش کاهش آسیب سلولی و حفظ ارزش غذایی و کاهش شیرابه خارج‌شده جلوگیری می‌کند[۲،۷،۳۱]. در ادامه، کاربرد این پروتئین‌ها درمواد غذایی و اثرات و ویژگی‌های آن‌ها ذکر می‌شود.

۷-۱ تولید میوه و سبزی تراریخته

مواد غذاهای مختلفی یافت می‌شوند که بر اثر انجماد تغییرات منفی در آنها ایجاد می‌شود، به ویژه غذاهایی که کیفیت آنها با بافت خارجی‌شان تعیین می‌شود و نمی‌توانند کیفیت خود را حفظ کنند. بلورهای یخ به خاطر صدمه‌ای که در اثر از دست دادن آب ایجاد می‌کنند، در بافت‌های داخل سلولی و خارج سلولی تغییرات نامطلوبی را در کیفیت غذا و میوه‌ها می‌گذارند. این امر می‌تواند به وارد آمدن خسارت به پلاسما انجامید که هر دو با تشکیل بلورهای مجدد یخ ایجاد می‌شوند[۳۲]. اگر انجماد با سرعت پایین انجام شود، بلورهای یخ بزرگی در بافت میوه‌ها ایجاد می‌شود و خسارت زیادی وارد می‌آورد و اگر میوه‌ها و سبزیجات با سرعت زیاد منجمد شوند، بلورهای یخ کوچک‌تر در بافت‌های داخلی و خارج سلولی تشکیل خواهند شد و سبب خرابی کمتر بافت می‌شود، ولی با توجه به این‌که انجماد سریع هزینه‌بر است، از پروتئین‌های ضد یخ در میوه‌ها و سبزیجات استفاده می‌شود. پروتئین‌ها را می‌توان از راه مخلوط کردن با مواد غذایی، تزریق کردن به بافت گیاهی، خیساندن، اسپری کردن، تصفیه تحت خلاء و یا انتقال ژن به طور کالبدی ایجاد کرد. مزیت روش اضافه کردن پروتئین ضد یخ به میوه و سبزی نسبت به روش انجماد سریع- با هزینهٔ بسیار زیاد- هزینه کمتر است، و از این راه می‌توان گیاهان مقاوم به سرما و انجماد تولید کرد[۲۲]. این روش برای گیاهانی مانند گوجه فرنگی و سبزیجات در شکل (۶)، که بافت خارجی آن‌ها تعیین کیفیت می‌شود بسیار اهمیت دارد.

شکل ۶. تصویری از گوجه فرنگی و دیگر سبزیجات دارای بافت و کیفیت مطلوب.

۷-۲ گوشت منجمد

به همین ترتیب، با سبزی‌های خوراکی، کیفیت گوشت نیز پس از انجماد کاهش می‌یابد. در پژوهشی[۳۳] برای بهبود کیفیت گوشت منجمد، ۲۴ ساعت قبل از ذبح گوسفند، گلیکوپروتئین‌های ضد یخ به حیوان تزریق شدند، بعد از ذبح نمونه‌های گوشت در دمای ۲۰- درجه سلسیوس، به مدت ۱۶ هفته نگهداری شدند. مشاهده شد که ابعاد بلورهای یخ با حضور پروتئین‌های ضد یخ کاهش و کیفیت گوشت پس از انجماد بهبود یافت[۳۴]. همچنین، حضور این پروتئین‌ها در گوشت منجمد به کاهش تراوش شیرابه و حفظ ارزش غذایی گوشت به هنگام انجمادزدایی انجامید. یک تکه گوشت منجمد حاوی پروتئین ضد یخ، دارای بافت و کیفیت مطلوبی مطابق شکل (۷) است.

شکل ۷. تصویری از برش گوشت منجمد شده با بافت و کیفیت مطلوب.

۷-۳ بستنی‌سازی

امروزه تقاضا برای بالا بردن کیفیت و کمیت در تولید بستنی پیوسته در حال رشد است. استفاده از پروتئین‌های ضد یخ در بستنی‌سازی، با جلوگیری از رشد بلورهای یخ موجب بهبود بافت و طعم بهتر بستنی می‌شود که در شکل (۸) نیز بافتی مطلوب از بستنی را مشاهده می‌کنید. یکی از مشکلات در مورد تولید بستنی، بلوری شدن مجدد با تغییرات دما در طول ذخیره‌سازی است که بلورهای کوچک یخ ذوب شده به بلورهای بزرگ‌تر با انجماد مجدد تبدیل می‌شود؛ بلورهای بزرگ یخ مزه و بافت بستنی را تخریب می‌کنند که حضور پروتئین ضد انجماد از این عمل جلوگیری می‌کند[۳۵].

شکل ۸. بستنی با بافت مطلوب.

۴-۷ مخمر نانوایی

تقاضا برای فرآورده‌های خمیری منجمد به سرعت روبه افزایش است، هرچند انجماد در طول ذخیره‌سازی در بیشتر مواقع برای سلول‌های مخمر کشنده است و آثار منفی زیادی مانند تغییر ماهیت درشت مولکولها، گسیختگی غشاها، و چروکیدگی سلول‌ها را با از دست دادن آب سبب می‌شود که روی کیفیت نان اثر منفی می‌گذارد. یکی از راه‌حل‌ها برای این مشکل، انتقال ژن پروتئین ضد یخ به مخمر نانوایی ساکارومایسس سرویسیا است که میزان گاززدگی و تولید کل گاز را در خمیرهای منجمد افزایش می‌دهد. دانشمندان تلاش می‌کنند روشی را برای استفاده از پروتئین ضد یخ در تولیدات خمیری منجمد، با بهره‌گیری از یک مسیر بیان، حاوی توالی رمزگذاری پروتئین ضد یخ، تدوین و اجرا کنند. پروتئین ضد یخ که در آزمایش‌ها به‌کار گرفته‌اند یک پروتئین ضد یخ نوع یک است که GS-5 نامیده می‌شود و از ماهی *Grubby sculpin* جداسازی شده است[۳۶]. نتایج آزمایش نشان داد که ژن نوترکیب پروتئین ضدیخ نوع یک، قدرت تحمل انجماد در مخمر را افزایش می‌دهد.

۸. کاربردهای غیر غذایی پروتئین‌های ضدیخ

پروتئین‌های ضدیخ، علاوه بر کاربردهای غذایی، کاربردهای دیگری نیز دارند که در جدول (۲) به اختصار درج شده‌اند[۳۸،۳۷،۳۹].

۹. بررسی سمّی و حساسیت زا بودن پروتئین‌های ضدیخ

بنابر بررسی‌های کرول و همکاران (۲۰۰۲)، برپایهٔ تاریخچه مصرف، پروتئین‌های ضد یخ ماهی و گیاهان سمی نیستند[۲۹]. حساسیت به مواد غذایی دریایی (حساسیت به پروتئین‌های ماهی) نیز بررسی شد[۴۰]. تا امروز گزارشی از نقش پروتئین‌های ضد یخ ماهی به عنوان منبع حساسیت‌زایی مواد غذایی یافت نشده است.

۱۰. نتیجه‌گیری کلی

اغلب گونه‌های ماهی، حشرات، گیاهان و ریزاندامگان‌هایی که در محیط سرد زندگی می‌کنند، پروتئین‌های ضد یخ تولید می‌کنند. این پروتئین‌ها با وجود ساختارهای متفاوت نشان وظیفه و کار مشابهی را انجام می‌دهند. اتصال به یخ و جلوگیری از رشد یخ و تبدیل بلورهای بزرگ به کوچک مشخصه پروتئین‌های ضد یخ است که می‌توان از این امکان بالقوه برای محافظت سرمایی یا محدود کردن آسیب‌های ناشی از یخ در ایجاد گیاهان مقاوم به سرما، نگهداری اعضای پیوندی، سلول‌های خاص، سبزیجات و گیاهان خوراکی، گوشت، مخمر نان و انجماد سازی اسپرم‌های جاندران برای ایجاد تنوع ژنتیک در نسل‌های مختلف بهره گرفت. کاربرد پروتئین‌های ضدیخ به عنوان نگهدارنده مواد غذایی، کیفیت مواد غذایی منجمد شده و پیش‌غذاها را در طول مدت سردخانه‌گذاری،

جدول ۲. کاربردهای غیر غذایی پروتئین‌های ضد یخ.

کاربردها	ویژگی‌ها و چگونگی اثر پروتئین ضد یخ
۱. نگهداری اعضای پیوندی	• برای نگهداری عضو پیوندی مانند قلب؛ • در این روش عضو پیوندی در مقایسه با نگهداری در اتانول و اتیلن گلیگول می‌تواند در دماهای پایین‌تر و به مدت بیشتری سالم بماند[۳۷].
۲. نگهداری اسپرم برای استفاده در تلقیح مصنوعی	• نگهداری سرمایی اسپرماتوزوئیدها؛ • افزایش باروری اسپرماتوزوئیدها؛ • با نگهداری اسپرم می‌توان به ذخایر ژنتیک جانداران (ماهی و گاو) کمک کرد[۳۸].
۳. تولید ماهیان ترانسفوم شده و کمک به عملیات آبزی‌پروری	• با تزریق مستقیم پروتئین ضدیخ به ماهی فاقد پروتئین ضد یخ، ماهیان می‌توانند انجماد را تحمل کنند؛ • این روش، پرورش ماهیان تجاری را- که تحمل دمای پایین آب را در طول زمستان ندارند- در طول زمستان امکان‌پذیر خواهد کرد. • بنابراین این روش دامنه آبزی پروری را در نواحی اطلس شمالی گسترش خواهد داد[۳۹].

حمل و نقل و یخ‌زدایی، افزایش می‌دهند. تا امروز این پروتئین‌ها کاربرد وسیعی در مواد غذایی نداشته‌اند، اما با پی بردن به سازوکار دقیق و شناسایی پروتئین‌های ضد یخ دیگر، امید می‌رود که در آینده بتوان کاربردهای بیشتری از این پروتئین‌ها را کشف کرد و به‌کار گرفت. یکی از مزایای پروتئین‌های ضدیخ در صنایع غذایی از این قرار است که آن‌ها در مقدار کم نسبتاً فعال‌اند و این امر می‌تواند بر بهای موادغذایی جدید تأثیر بگذارد؛ اما، منبع تجاری این پروتئین‌ها، کاربرد آن‌ها را محدود می‌کند. اگرچه اطلاعات پژوهشگران در مورد پروتئین‌های ضدیخ کافی نیست تا سازوکار دقیق عملکرد آنها را شرح دهند، اما، تا حدودی به ساختار بنیادیشان دست یافته‌اند و قادرند پروتئین‌های ضدیخ جدید یا پپتیدهای ضدیخ بسازند. مثلاً، ژلاتین هیدرولیز شده (پپتیدهای کوچک ۵۰۰۰kDa - ۲۰۰۰) که از طریق عمل پاپایین تولید می‌شود، فعالیت بازدارندگی از رشد بلورهای یخ در مخلوط بستنی دارد[۴۱]. سرانجام، باید گفت که مطالعات بسیاری لازم است تا امکان انجام فرایندهای ویژه (مانند واکنش آنزیمی) در مواد غذایی چون شیر و گوشت، به عنوان منابع جدیدی از پروتئین‌های ضدیخ، و اثر آنها بر ایمنی و ارزش تغذیه‌ای بررسی شود.

مراجع

[1] Hew, C. L., Yang, D. S. C., "Protein interaction with ice", European Journal of Biochemistry, 203, 33–42, (1992).

[2] Wathen, B., Jia, Z., "Controlling the freezing process with antifreeze proteins", In D. Sun (Ed.), Emerging technologies for food processing (pp. 653–674), London: Elsevier, (2005).

[3] Siemer, A. B., Huang, K-Y., McDermott, A. E., "Protein-ice interaction of an antifreeze protein observed with solid-state NMR", Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 107: 17580-17585, (2010).

[4] Goff, H. D., "Food at subzero temperatures", In J. R. Dutcher, A. G. Marangoni (Eds.), Soft materials structure and dynamics (pp. 229–320), New York: Marcel Dekker Inc, (2005).

[5] Sahagian, M. E., Goff, H. D., "Fundamental aspects of the freezing process", In L. E. Jeremiah (Ed.), Freezing effects on food quality (pp. 1–50), New York: Marcel Dekker Inc, (1996).

[6] Zachariassen, K. E., Kristiansen, E., "Ice nucleation and antinucleation in nature", Cryobiology, 41(4), 257–279, (2000).

[7] Griffith, M., Ewart, K. V., "Antifreeze proteins and their potential uses in frozen foods", Biotechnology Advances, 13, 375–402, (1995).

[8] Fennema, O. R., "Nature of the freezing process", In O. R. Fennema, W. D. Powrie,, E. H. Marth (Eds.), Low temperature preservation of foods and living matters (pp. 151–227), New York: Marcel Dekker Inc..., (1973).

[9] Zaritzky, N., "Physical–chemical principles in freezing", In D. Sun (Ed.), Handbook of frozen food packaging and processing (pp. 23–25), Florida: Taylor and Francis Group, (2006).

[10] Sutton, R. L., Wilcox, J., "Recrystallization in model ice cream solutions as affected by stabilizer concentration", Journal of Food Science, 63, 9–11, (1998).

[11] Franks, F., "Biophysics and biochemistry at low temperatures", Cambridge: Cambridge University Press, (1985).

[12] Knight, C. A., Hallett, J., DeVries, A. L., "Solute effects on ice recrystallization", An assessment technique, Cryobiology, 25, 55–60, (1988).

[13] Smallwood, M., Worrall, D., Byass, L., Elias, L., Ashford, D., Doucet, C. J., Holt, C., Telford, J., Lillford, P., Bowles, D. J., "Isolation and characterization of a novel antifreeze protein from carrot (Daucus carota)", Biochemical Journal, 340(2), 385–391, (1999).

[14] Regand, A., Goff, H. D., "Freezing and ice recrystallization properties of sucrose solutions containing ice structuring proteins from cold acclimated winter wheat grass extract", Journal of Food Science, 70, E552–E556, (2005).

[15] Hassas-Roudsari, M., "Extraction, purification and study of the mechanism of action of apoplastic ice structuring proteins from cold acclimated winter wheat leaves", Ph.D. dissertation, University of Guelph, https://dspace.lib.uoguelph.ca/ xmlui/bitstream/handle/ 10214/2987/Final%20Thesis.pdf?sequence=1 accessed on 10/15/2011.

[16] Tomczak, M. M., Marshall, C. B., Gilbert, J. A., Davies, P. L., "A facile method for determining ice recrystallization inhibition by antifreeze proteins", Biochemical and Biophysical Research Communications, 311, 1041–1046, (2003).

[17] Fletcher, G. L., Hew, C. L., Davis, P. L., "Antifreeze proteins of teleost fishes", Annual Review of Physiology, 63, 359–390, (2001).

[18] Lu, M., Wang, B., Li, Zh. Fei, Y., Wie, L., Gao, Sh., "Differential scanning calorimetric and circular dichroistic studies on plant antifreeze proteins", Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 67, 689–698, (2002).

[19] Hansen, T. N., Baust, J. G., "Differential scanning calorimetric analysis of antifreeze protein activity in the common mealworm, Tenebrio molitor", Biochimica and Biophysica Acta, 957, 217–221, (1988).

[20] Hassas-Roudsari, M., Goff, H. D., "(in press) A new quantitative method to measure activity of ice structuring proteins using differential scanning calorimetry", Cryoletters.
[21] Raymond, J. A., DeVries, A. L., "Adsorption inhibition as a mechanism of freezing resistance in polar fishes", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74, 2589–2593, (1977).
[22] Venketesh, S., Dayananda, C., "Properties, potentials, and prospects of antifreeze proteins", Critical Reviews in Biotechnology, 28(1), 57–82, (2008).
[23] Wen, D., Laursen, R. A., "A D-antifreeze polypeptide displays the same activity as its natural L-enantiomer", FEBS Letters, 317, 31–34, (1993).
[24] Yeh, Y., Feeney, R. E., "Antifreeze proteins: Structures and mechanisms of function", Chemical Reviews, 96, 601–617, (1996).
[25] Grandum, S., Yabe, A., Nakagomi, K., Tanaka, M., Takemura, F., Kobayashi, Y., Frivik, P., "Analysis of ice crystal growth for a crystal surface containing adsorbed antifreeze proteins", Journal of Crystal Growth, 205, 382–390, (1999).
[26] Knight, C. A., Cheng, C. C., DeVries, A. L., "Adsorption of alpha–helical antifreeze peptides on specific ice crystal-surface planes", Biophysical Journal, 59, 409–418, (1991).
[27] Knight, C. A., Driggers, E., DeVries, A. L., "Adsorption to ice of fish antifreeze Glycopeptides -7 and Glycopeptides-8", Biophysical Journal, 64, 252–259, (1993).
[28] Atící, Ö., Nalbantoğlu, B., "Antifreeze proteins in higher plants", Phytochemistry, 64, 1187–1196, (2003).
[29] Crevel, R. W. R., Fedyk, J. K., Spurgeon, M. J., "Antifreeze proteins: characteristics, occurrence and human exposure", Food and Chemical Toxicology, 40, 899–903, (2002).
[30] Griffith, M., Yaish, M. W. F., "Antifreeze proteins in overwintering plants: A tale of two activities", Trends in Plant Science, 9(8), 399–405, (2004).
[31] Feeney, R. E., Yeh, Y., "Antifreeze proteins: Current status and possible food Uses", Trends in Food Science and Technology, 9, 102–106, (1998).
[32] Hightower, R., Baden, C., Penzes, E., Lund, P., Dunsmuir, P., "Expression of antifreeze proteins in transgenic plants", Plant Molecular biology, 17: 1013-1021, (1991).
[33] Nelson, D. L., Cox M. M., "Lehninger Principles of Biochemistry", Fourth edition, W. H. Freeman and Company, Chapter 9, 306-308, ISBN 978-0-7167-4339-2, (2005).
[34] Hew, C. L., Ewart, K. V., "Fish antifreeze proteins", World Scientific publishing, 213-221, ISBN 981-02-4899-7, (2002).
[35] Regand, A., Goff, H. D., "Ice Recrystallization Inhibition in Ice Cream as Affected by Ice Structuring Proteins from Winter Wheat Grass", American Dairy Science Association. J. Dairy Sci. 89:49–57, (2006).
[36] Panadero, J., Randez-Gil, F., Prieto, J. A., "Heterologous Expression of Type I Antifreeze Peptide GS-5 in Baker's Yeast Increases Freeze Tolerance and Provides Enhanced Gas Production in Frozen Dough J", Agric. Food Chem., 2005, 53 (26), 9966-9970, (2005).
[37] Queen's University, New Antifreeze Protein Found In Fleas May Allow Longer Storage Of Transplant Organs. (2005).
[38] Watson, P. F., "The cause of reduced fertility with cryopreserved semen", Anim Reprod Sci 2000 Jul 2;60 -61 :481 -92.
[39] Ewart, K. V., Hew, C. L., "Fish antifreeze proteins", World Scientific: London ISBN: 9789810248994, (2002).
[40] Lopata, A. L., Lehrer, S. B., "New insights into seafood allergy", Current Opinion in Allergy, Clinical Immunology, 9, 270–277, (2009).
[41] Damodaran, S., "Inhibition of ice crystal growth in ice cream by gelatin hydrolysate", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, 10918–10923, (2007).