تأثیر دما، pH و زمان بر پیشرفت کانژوگه شدن پروتئین های سویا با دکستران از طریق واکنش مایلارد

ساره بوستانی[1*]، محمود امین لاری[2]، مرضیه موسوی نسب[3]، مهرداد نیاکوثری[4]، غلامرضا مصباحی[5]

[1*] دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

[2] استاد گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

[3] دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی و گروه پژوهشی آبزیان، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

[4] دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

[4] استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

تاریخ دریافت: 93/5/15 تاریخ پذیرش: 93/9/16

چکیده

در این تحقیق پروتئین های ایزوله سویا و دکستران تحت شرایط واکنش مایلارد در pH، دما و زمان های مختلف (دماهای 40، 60 و 80°C، pH= 7 و 8/5) و در حضور KBr اشباع (رطوبت نسبی 79٪) قرار گرفتند و تشکیل گلیکوکانژوگه ها با الکتروفورز SDS-PAGE، تعیین محتوی گروه های آمینی آزاد و اسپکتروسکوپی FT-IR بررسی و تأیید شد. الگوی الکتروفورز نشان داد بهینه شرایط برای گانژوگه شدن در دمای 60°C، pH= 8/5 و زمان 8 روز می باشد و کانژوگه های پروتئین های سویا-دکستران به خوبی شکل می گیرند. اندازه گیری درصد گلیکوزیله شدن با استفاده از روش OPA (Ortho-phthaldialdehyde) نتایج الکتروفورز را تأیید کرد و در نمونه بهینه بیشترین کانژوگه شدن مشاهده شد (44/23 درصد کاهش گروه های آمینی). آنالیز اسپکتروسکوپی FTIR نشان داد که گروه های آمید I، II و III پروتئین های سویا توسط واکنش مایلارد تغییر می کند، ارتعاش کششی C-N در ناحیه 1200-1450 cm^{-1} با کانژوگه شدن افزایش یافت و بعضی گروه های جدید مثل ترکیبات آمادوری و باز شیفت ظاهر گردید. کانژوگه شدن پروتئین های سویا با دکستران یک راه مناسب برای بهبود خصوصیات عملکردی این پروتئین ها جهت کاربردهای غذایی می باشد.

واژه های کلیدی: الکتروفورز، اسپکتروسکوپی FTIR، پروتئین های سویا، کانژوگه شدن، واکنش مایلارد

*مسئول مکاتبه: boostani.sareh@yahoo.com

1-مقدمه

افزایش مقاومت و بهبود خصوصیات عملکردی پروتئین ها همواره از اهداف چالش برانگیز مهندسی پروتئین می باشد. پروتئین های غذایی با وجود دارا بودن ارزش تغذیه ای بالا و خصوصیات عملکردی منحصر به فرد (16)، در مقابل حرارت، حلال های آلی و حملات آنزیمی بسیار حساس می باشند، لذا تحقیقات گسترده ای در زمینه ی طراحی پروتئین ها با خصوصیات عملکردی بهبود یافته، مقاومت بیشتر به حرارت و سایر عوامل آسیب رسان، خلق خصوصیات جدید و از بین بردن خصوصیات نامطلوب صورت گرفته است. استراتژی های مختلفی برای بهبود خصوصیات عملکردی پروتئین ها با استفاده از اصلاح های شیمیایی، فیزیکی و آنزیمی وجود دارد (13). تکنولوژیست های غذایی همیشه به دنبال بهترین گزینه برای اصلاح پروتئین های می باشند، بنابراین روش های اصلاح طبیعی در سال های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است و یکی از راه های طبیعی اصلاح پروتئین های غذایی واکنش مایلارد می باشد (16، 19).

واکنش مایلارد در نتیجه اتصال کوالانسی بین گروه های آمینی آزاد پروتئین و انتهای کربونیلی پلی ساکارید رخ می دهد و منجر به تغییرات مطلوبی در پروتئین های غذایی می شود (13، 19). هیبرید های تشکیل شده در نتیجه حرارت دهی مخلوط پروتئین-پلی ساکارید تأثیرات مثبتی بر پروتئین های غذایی دارد، به عنوان مثال باعث بهبود خصوصیات عملکردی پروتئین ها از جمله خصوصیات حلالیت، جذب آب، خصوصیات کف کنندگی و امولسیفایری می شود، خصوصیات بافتی بهبود می یابد و پایداری حرارتی نیز بیشتر می شود (2، 3، 6، 12). بعلاوه خصوصیاتی چون فعالیت آنتی اکسیدانی، فعالیت ضد سرطانی و ضد جهش زایی و خصوصیات ضد میکروبی نیز افزایش می یابد (2، 15، 19).

پیشرفت کانژوگه شدن از مهمترین عوامل در تعیین عملکرد واکنش مایلارد صورت گرفته به منظور اصلاح پروتئین می باشد و عوامل مختلفی بر میزان اتصال پروتئین به پلی ساکارید موثر است، از جمله: دما، pH، نسبت و نوع گروه های آمینی به قند، فعالیت آبی محیط، زمان، نوع پروتئین و پلی ساکارید شرکت کننده در واکنش و غیره می باشد. برای بدست آوردن نتایج مطلوب و بهبود خصوصیات عملکردی پروتئین ها بایستی بهترین شرایط را جهت واکنش مایلارد انتخاب نمود (19، 26). روش های مختلفی برای تعیین پیشرفت کانژوگه شدن وجود دارد از جمله این تکنیک ها می توان به الکتروفورز SDS-PAGE[1]، NMR[2]، SEC[3]، OPA[4] و اسپکتروسکوپی FT-IR[5] و غیره را نام برد (19).

مطالعات زیادی در رابطه با بهبود خصوصیات عملکردی پروتئین ها با استفاده از واکنش مایلارد صورت گرفته است. در حالی که در زمینه بررسی عوامل مختلف تأثیرگذار بر پیشرفت این واکنش و روشهای مختلف تعیین میزان کانژوگه شدن مستندات کمی موجود است. بنابراین هدف این تحقیق در گام اول کانژوگه کردن پروتئین های ایزوله سویا و دکستران در شرایط مختلف واکنش مایلارد (دما، زمان و pH های متفاوت) می باشد و در گام دوم پیشرفت کانژوگه شدن با استفاده از تکنیک های الکتروفورز، OPA و FT-IR مقایسه و بررسی خواهد شد.

2- مواد و روش ها

2-1-مواد

ایزوله پروتئینی سویا[6] ساخت چین و دکستران[7] با وزن ملکولی 64000-76000 دالتون (از شرکت سیگما آمریکا) تهیه شد و سایر مواد شیمیایی مورد استفاده از برند های معتبر مواد آزمایشگاهی تهیه و مورد استفاده قرار گرفت.

2-2-تهیه کانژوگه های پروتئینهای سویا-دکستران

کانژوگه کردن پروتئین های ایزوله سویا در شرایط حرارت خشک[8] انجام گرفت، بدین صورت که ابتدا پروتئین های سویا و دکستران به نسبت 1 به 4 در محلول بافر با pH های 7 و 8/5، تهیه و کاملاً مخلوط شد، سپس لیوفیلیز گردید (ابتدا نمونه ها در فریزر 80- درجه سانتی گراد فریز شدند و سپس در فریز دارير[9] به پودر تبدیل شدند). پودر محصول در دسیکاتور با دما و زمان های مختلف در حضور برمید پتاسیم اشباع (رطوبت نسبی 79%) قرار

---

[1] Sodium-dodecyl-sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)
[2] Nuclear magnetic resonance
[3] Size exclusion chromatography
[4] O-phthaldialdehyde method
[5] Fourier transform infrared spectroscopy
[6] Soy protein isolate (SPI) (Pingdingshan tianjing plant albumen CO.,LTD)
[7] Dextran
[8] Dry heating
[9] Dena vaccum industry FD-5003-BT

گرفت تا واکنش مایلارد انجام شود. یک نمونه به عنوان شاهد که حاوی ترکیبات پروتئینی بدون پلی ساکارید است نیز در نظر گرفته شد، حالات مختلف بدین صورت است که گرمخانه گذاری (آون Galenkamp مدل IH-100 انگستان و آون ISUZU مدلKM235 ژاپن) در دماهای 40، 60 و 80 در جه سانتی گراد و به ترتیب در زمان های: 0، 4، 8 و 24 ساعت ، 2، 4، 6، 8 و 12 روز در دمای 40 درجه سانتی گراد، 0، 1، 2، 3، 4، 6 و 8 روز در دمای 60 درجه سانتی گراد و 0، 1، 2، 4، 8، 16، 24 و 48 ساعت در دمای 80 درجه سانتی گراد انجام شد، در مجموع 48 تیمار تهیه و برای تعیین پیشرفت کانژوگه شدن با هم مقایسه شدند (12).

2-3-الکتروفورز SDS-PAGE

برای تأیید تشکیل کانژوگه های پروتئین-پلی ساکارید، الکتروفورز SDS- PAGE مطابق روش لاملی (1970) و با کمی تغییرات صورت پذیرفت. ژل افقی الکتروفورز با 3٪ ژل متراکم کننده و 10٪ ژل جدا کننده تهیه شد و دستگاه الکتروفورز دو طرفه بیو راد ساخت سنگاپور مورد استفاده قرار گرفت. نمونه به غلظت 2 میلی گرم در 1 میلی لیتر، در بافر نمونه مخلوط و در دمای 100 درجه سانتی گراد به مدت 5 دقیقه حرارت داده شد و در هر چاهک 20 میکرولیتر نمونه تزریق شد. میزان جریان الکتریسیته روی 25 میلی آمپر تنظیم شد و در انتها رنگ آمیزی در محلول محتوی کوماسی بریلیانت بلو و متانول و رنگ زدایی در محلول محتوی استیک اسید و متانول صورت پذیرفت (14).

2-4-تعیین میزان گروه های آمینی آزاد

برای بررسی میزان گروه های آمینی آزاد پروتئین از روش ارزیابی اسپکترومتری O-فتال دی آلدهید (OPA) استفاده شد. محلول OPA به صورت روزانه از مخلوط کردن 25 میلی لیتر محلول 100 میلی مولار تتراهیدروبورات و 2/5 میلی لیتر محلول 20٪ وزنی/وزنی سدیم دودسیل سولفات و 40 میلی گرم OPA (که در 1 میلی لیتر اتانول حل شده است) و 100 میکرولیتر بتا مرکاپتواتانول بدست آمد که در نهایت با آب مقطر به حجم نهایی 50 میلی لیتر رسید. برای ارزیابی میزان گروه های آمینی آزاد، حدود 50-100 میکرولیتر از نمونه محلول به 1 میلی لیتر از واکنشگر OPA درون یک کووت کوارتز 1/5 میلی لیتری اضافه شد. محلول حاصله به آرامی تکان داده و به مدت 2 دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس جذب آن در طول موج 340 نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد و درصد جایگزینی (یا درصد کانژوگه شدن) مطابق فرمول زیر محاسبه شد (18).

$$\text{درصد کنژوگه شدن} = \frac{A_0 - A_T}{A_0} \times 100$$

A_0 و A_T، به ترتیب میزان جذب نمونه قبل از گرمخانه گذاری و بعد از گرمخانه گذاری در هر زمان تیمار می باشد.

2-5-اسپکترای امواج مادون قرمز[1] (FT-IR)

به منظور تأیید انجام واکنش مایلارد بین پروتئین های سویا و دکستران آنالیز با اسپکترومتر FTIR شیماتزو (ساخت ژاپن)[2]، برای نمونه پروتئین های سویا، دکستران و کانژوگه، از طول موج $400\text{-}4000cm^{-1}$ و با رزولوشن $4cm^{-1}$ صورت پذیرفت (24).

2-6-تجزیه وتحلیل داده‌ها

به منظور آنالیز آماری داده ها و بررسی اطلاعات به دست آمده از آزمون های مختلف از طرح کاملاً تصادفی استفاده گردید. آزمونها حداقل در سه تکرار انجام شده و سپس میانگین و انحراف معیار بدست آمد. به منظور تعیین وجود اختلاف بین میانگین اعداد (سه تکرار هر آزمایش)، از آنالیز واریانس و برای گروه بندی آنها از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح 0/05 استفاده شد. در تمام مراحل، تجزیه و تحلیل آماری داده ها با استفاده از نرم افزار SAS صورت پذیرفت.

3- نتایج و بحث

3-1- الگوی الکتروفورز کانژوگه های پروتئین-پلی ساکارید

میزان یا درصد گلیکوزیله شدن از مهمترین خصوصیات فیزیکوشیمیایی است که بطور مستقیم بر خصوصیات عملکردی پروتئین ها تأثیر می گذارد، میزان گلیکوزیله شدن تحت تأثیر فاکتورهای مختلفی از جمله دمای واکنش، زمان و pH قرار می گیرد و الکتروفورز از راه های اصلی تشخیص پیشرفت کانژوگه شدن می باشد. اغلب اوقات تغییرات بدین صورت است که با

[1] Fourier transform infrared spectroscopy
[2] 8300 Shimadzu IR spectrometer (Japan made)

افزایش وزن ملکولی پروتئین های کانژوگه شده در مقایسه با غیر کانژوگه ها همراه است و در نتیجه توزیع باندها در ابتدای ژل افزایش می یابد (12). تأثیر شرایط مختلف واکنش مایلارد بر میزان گلیکوزیله شدن دکستران با پروتئین های ایزوله سویا در الگوی الکتروفورز (شکل 1 الی 3) نشان داده شده است.

همانطور که در تصاویر مشاهده می شود در ستون شماره 1 در همه ژل ها، باندهای پروتئینی مربوط به پروتئین های ایزوله سویا و بخصوص باندهای پروتئینی 7S و 11S بخوبی مشاهده می شود در الگوی 1 و 3 (4ساعت تا 12 روز در 40 °C و 1 تا 48 ساعت در 80°C در هر دو pH= 7 و 8/5) با گذشت زمان، گستردگی اندک باندهای پروتئینی در بالای ژل جداکننده مشاهده می شود و باندهای پروتئینی سویا همچنان حضور دارند که نشان می دهد همه پروتئین ها با پلی ساکارید در چنین شرایطی واکنش ندادند. در الگوی 2 (از 1 تا 8 روز در 60°C) با افزایش زمان تیمار باعث ظاهر شدن تدریجی یک باند کشیده، وسیع و متراکم در بالای ژل متراکم کننده و حد فاصل بین دو ژل استکینگ[1] (ژل متراکم کننده) و سپریتینگ[2] (ژل جداکننده) شده که مربوط به اجزاء با وزن مولکولی بالای تشکیل شده در طی واکنش مایلارد می باشد (2، 3، 5، 11، 21، 22، 28).

در هر دو pH ، 7 و 8/5 گلیکوزیله شدن بیشتر و شیفت بهتری در وزن ملکولی نمونه های تیمار شده در دمای 60°C در مقایسه با 40 و 80 °C مشاهده می شود.

آنالیز تصاویر نشان می دهد که در نمونه های انکوبه شده در 60 °C باند های پروتئینی پس از 1 روز از زمان گرمخانه گذاری بطور کامل ناپدید نشده که نشان می دهد همه پروتئین ها با دکستران در این شرایط واکنش ندادند، با افزایش زمان گرمخانه گذاری کاهش شدت باندهای پروتئینی سویا مشاهده می شود (2، 3، 4، 6 و 8 روز) از تصاویر ژل مشخص است که 8 روز گرمخانه گذاری در pH=8/5 ، برای ناپدید شدن همه باند های پروتئینی کافی است و کانژوگه شدن تقریبا به طور کامل رخ می دهد (نمونه بهینه[3]).نتایج حاصل از تصاویر الکتروفورز تحت تأثیر زمان با گزارشات بدست آمده از سایر محققین مطابقت دارد، اله داد و همکاران (2009) گزارش کردند، با افزایش زمان واکنش مایلارد به منظور اصلاح لیزوزیم با دکستران از زمان صفر تا یک هفته شدت باندها کاهش یافته و گستردگی باندها با افزایش زمان گرمخانه گذاری افزایش می یابد.

جیمز کاستانو و همکاران (2005) در پی کانژوگه کردن بتا لاکتو گلوبولین و دکستران در زمان های مختلف، یاداو و همکاران (2010) طی کانژوگه کردن پروتئین های شیر و فیبر ذرت از 2 تا 7 روز، زو و همکاران (2010) با تولید کانژوگه های پروتئین های آب پنیر و دکستران، مشاهده کردند که با افزایش زمان گرمخانه گذاری ناپدید شدن تدریجی باندهای پروتئینی اصلی مشاهده می شود و همزمان باندهای جدید، تیره و وسیع با وزن ملکولی بالا از کانژوگه ها در بالای ژل جداکننده ایجاد می شود (3، 11، 28، 29).

در تحلیل تاثیر دما بر واکنش مایلارد، مطابق نتایج مشاهده شده بهینه دمایی برای حصول حداکثر میزان گلیکوزیله شدن وجود دارد، اسکامان و همکاران (2006) در پی کانژوگه شدن لیزوزیم و دکستران گزارش کردند که تلفیقی از دما و pH بالا برای کانژوگه شدن مناسب نیست و بهترین کانژوگه شدن در دمای 60 در مقایسه با 80 °C در pH=8/5 رخ می دهد (22). فوجیوارا و همکاران (1998) طی کانژوگه کردن پروتئین میوفیبریل ماهی با دکستران مشاهده کردند میزان اتصال دکستران به میوفیبریل با افزایش دما بیشتر می شود و سرعت بالای واکنش در دمای بالاتر از 40 °C مشاهده شد(7) .

جیمز کاستانو و همکاران (2005)، در پی کانژوگه شدن بتا لاکتوگلوبولین و دکستران در شرایط مختلف واکنش مایلارد مشاهده کردند تشکیل ترکیبات آمادوری با افزایش دما از 50 به 60 °C افزایش میابد و با افزایش a_w کاهش میابد، بطور کلی واکنش مایلارد در a_w متوسط سریع تر رخ میدهد، ضمن اینکه a_w مناسب برای بیشترین سرعت مایلارد به دمای سیستم بستگی دارد و تشکیل ترکیبات آمادوری در شرایط دمای بالاتر و a_w کمتر بهتر رخ می دهد (1، 11).

نتایج حاصل از تأثیر pH بر میزان کانژوگه شدن با نتایج محققان دیگری مشابهت دارد، لرتیتیکول و همکاران (2007)، مشاهده کردند که واکنش مایلارد بطور مؤثری در pH بالا رخ می دهد، در pH های 8 و 9 پروتئین های گسترده با وزن ملکولی بالا شکل می گیرد که بصورت باندهای تیره در بالای ژل جداکننده قابل

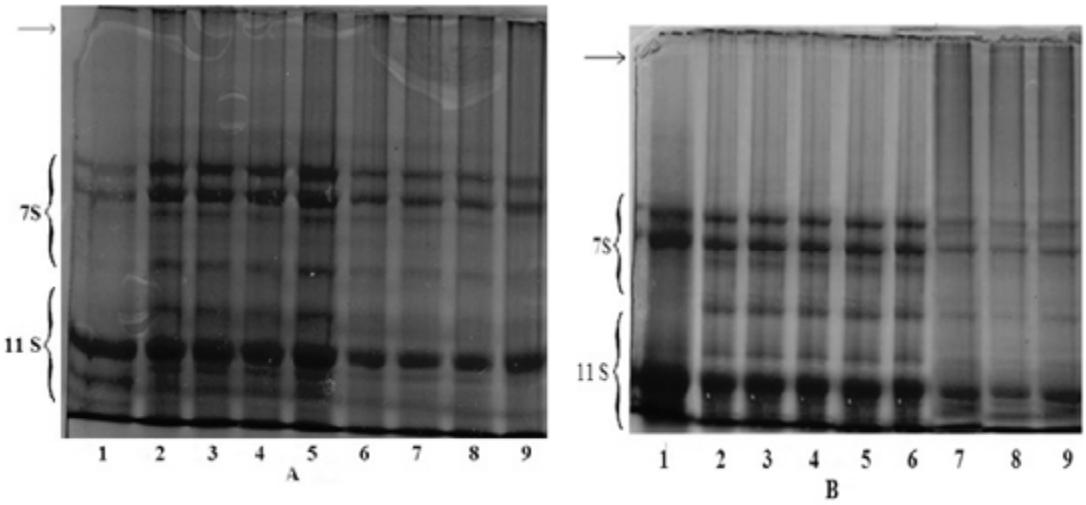
[1] Stacking gel
[2] Separating gel
[3] Optimum

مشاهده است بعلاوه در دمای بالای واکنش مایلارد و pHهای قلیایی امکان تجزیه کانژوگه های تشکیل شده وجود دارد (15). نتیجه گیری کلی از الگوی الکتروفورز این تحقیق و نتایج سایر محققان بدین صورت است که، واکنش مایلارد در pH بالا بهتر صورت گرفته (pH= 8/5 در مقایسه با 7)، pHهای پایین که خود به عنوان عامل ضد قهوه ای شدن عمل می کند و در pHهای خیلی قلیایی امکان تجزیه ترکیبات به اجزاء با وزن ملکولی کمتر وجود دارد و مناسبترین pH واکنش مایلارد 7-9 است که در دامنه بالایی بهتر رخ خواهد داد، در pH 8/5 در مقایسه با 7 گروه های نیتروژنی شرکت کننده در واکنش مایلارد بیشتر به صورت NH_2 می باشد در حالی که درpH = 7 بیشتر به صورت NH^+_3 می باشد، از آنجایی که گروه NH_2 عامل اصلی شرکت کننده در واکنش مایلارد است بنابراین در pH: 8/5 در مقایسه با 7 کانژوگه شدن بیشتر رخ می دهد (12، 15).

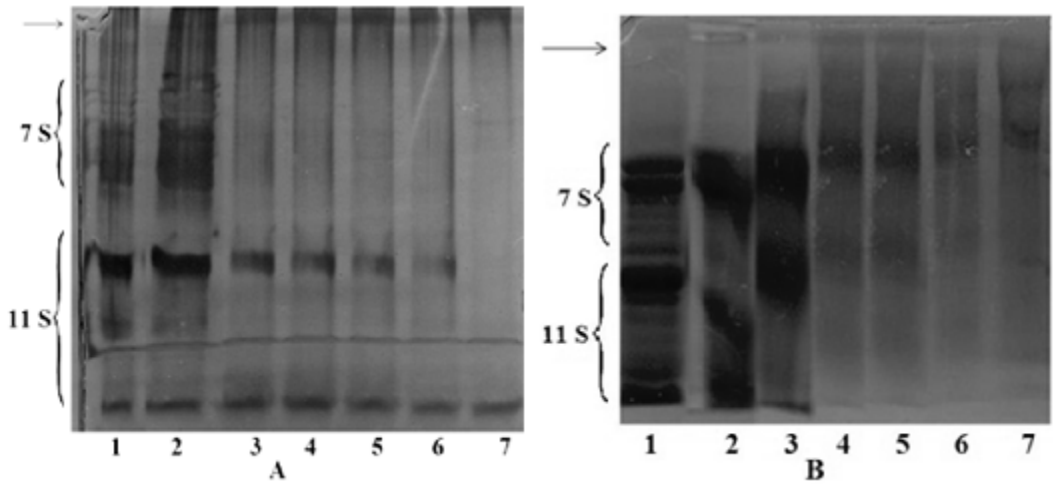
بسته به دمای واکنش، a_w مناسب، متفاوت است، در دمای بالاتر، a_w پایین تر، برای رخ دادن بهتر واکنش مایلارد توصیه می شود (با افزایش دما از 40 به 80 °C، a_w مورد نیاز کاهش میابد، در دمای 60°C رطوبت مناسب 79٪ است در حالی که در دمای 40 °C، a_w بیشتر و در دمای 80 °C، a_w کمتری را نیاز دارد) (1، 15). نقش مؤثر بهینه دمایی برای بیشترین میزان گلیکوزیله شدن را نبایستی نادیده گرفت (در بین هر 3 دمای تیمار مناسب ترین 60 °C می باشد).

در دماهای پایین (40°C) واکنش مایلارد با سرعت بسیار کمی رخ می دهد، دمای بالا به همراه pH بالای واکنش برای رخ دادن مایلارد مناسب نیست (دمای 80 °C و pHهای 7 و 8/5)، هر چند این نکته را باید در نظر گرفت که در دمای 40 °C برای رخ دادن بهتر واکنش بایستی a_wبالاتر و در دمای 80 °C بایستی a_w پایین تری در مقایسه با نمونه های 60 °C مورد استفاده قرار می گرفت و در انتها با افزایش زمان تیمار، گلیکوزیله شدن بیشتری رخ خواهد داد.

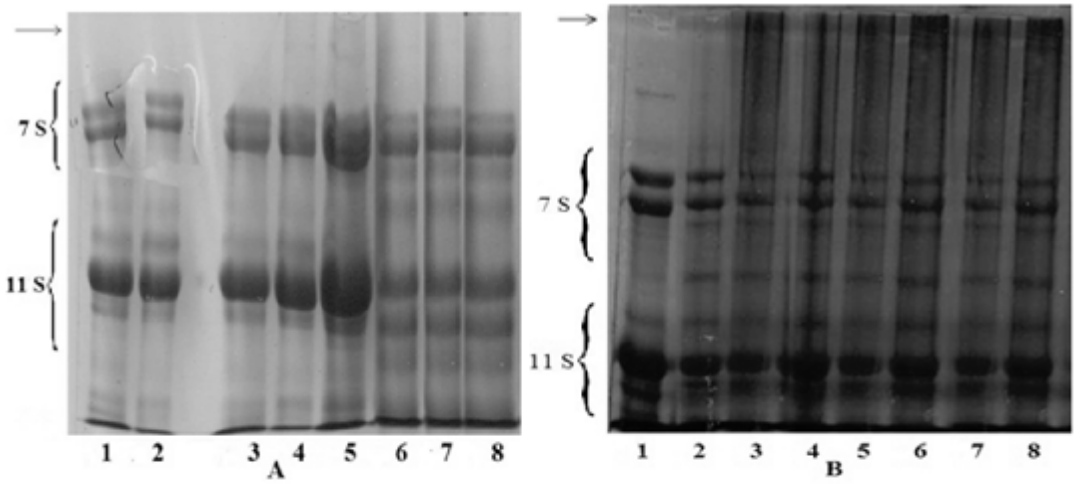
مجموع عوامل گفته شده موجب اتصال حداکثر دکستران به پروتئین های سویا در دمای 60 °C، pH=8/5 و زمان 8 روز می شود (3، 11، 22).



شکل 1- الگوی الکتروفورز پروتئین های سویای کانژوگه شده با دکستران در دمای 40 °C و زمان های مختلف بر روی ژل اکریل آمید، A. pH= 7 و B. pH= 8/5 (شماره ستون ها به ترتیب :ستون شماره 1= نمونه کنترل (پروتئین های سویا) ، 2= نمونه کانژوگه شده به مدت 4 ساعت، 3= نمونه کانژوگه شده به مدت 8 ساعت، 4= نمونه کانژوگه شده به مدت 1 روز، 5= نمونه کانژوگه شده به مدت 2 روز، 6= نمونه کانژوگه شده به مدت 4 روز، 7= نمونه کانژوگه شده به مدت 6 روز، 8= نمونه کانژوگه شده به مدت 8 روز، 9= نمونه کانژوگه شده به مدت 12 روز)



شکل 2- الگوی الکتروفورز پروتئین های سویای کانژوگه شده با دکستران در دمای 60°C و زمان های مختلف بر روی ژل اکریل آمید، A. 7 =pH و B. 8/5 =pH (شماره ستون ها به ترتیب: 1= نمونه کنترل (پروتئین های سویا)، 2= نمونه کانژوگه شده به مدت 1 روز، 3= نمونه کانژوگه شده به مدت 2 روز، 4= نمونه کانژوگه شده به مدت 3 روز، 5= نمونه کانژوگه شده به مدت 4 روز، 6= نمونه کانژوگه شده به مدت 6 روز، 7= نمونه کانژوگه شده به مدت 8 روز)

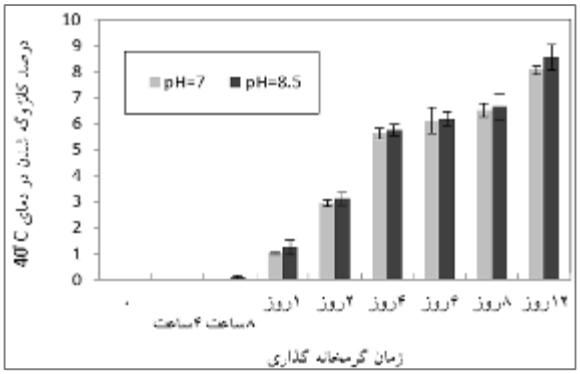


شکل 3- الگوی الکتروفورز پروتئین های سویای کانژوگه شده با دکستران در دمای 80°C و زمان های مختلف بر روی ژل اکریل آمید، A. 7 =pH و B. 8/5 =pH (شماره ستون ها به ترتیب، 1 = نمونه کنترل (پروتئین های سویا)، 2 = نمونه کانژوگه شده به مدت 1 ساعت، 3= نمونه کانژوگه شده به مدت 2 ساعت، 4 = نمونه کانژوگه شده به مدت 4 ساعت، 5 = نمونه کانژوگه شده به مدت 8 ساعت ، 6 = نمونه کانژوگه شده به مدت 16 ساعت، 7 = نمونه کانژوگه شده به مدت 24 ساعت، 8= نمونه کانژوگه شده به مدت 48 ساعت).

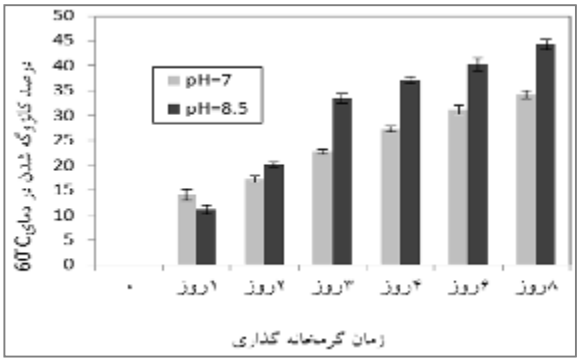
3-2-میزان گروه های آمینی آزاد

میزان یا پیشرفت گلیکوزیله شدن پروتئین های ایزوله سویا با دکستران در شرایط مختلف واکنش مایلارد با اندازه گیری مقادیر گروه های آمینی آزاد پروتئین تعیین می شود. اندازه گیری مقادیر گروه های آزاد آمینی به روش OPA شاهد و تأییدی بر ژل الکتروفورز تیمار ها می باشد (شکل 4-6) .درصد کانژوگه شدن در نمونه های گرمخانه گذاری شده در 60 °C و در pHهای 7 و 8/5 ، در مقایسه با نمونه شاهد نشان می دهد که مقادیر گروه های آمینی آزاد در همه نمونه های کانژوگه شده کاهش یافته است و با افزایش زمان گرمخانه گذاری مقادیر گروه های آمینی آزاد کمتر می شود (4، 5، 27).

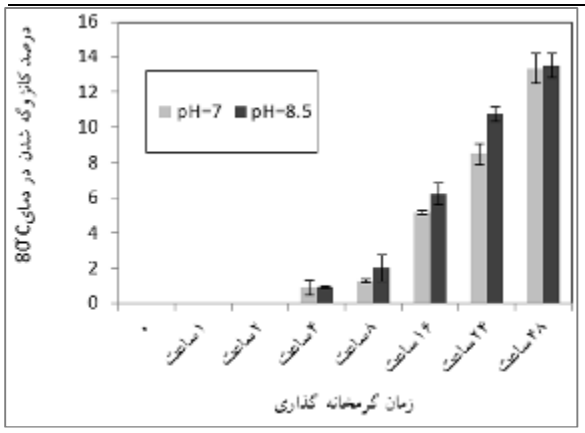
همان طور که در شکل ها مشاهده می شود، وقتی که پروتئین های سویا برای مدت 8 روز در 60 °C و در pH=8/5 گرمخانه گذاری می شود، کاهش قابل توجهی در مقادیر گروه های آمینی آزاد پروتئین رخ می دهد. درصد گلیکوزیله شدن در نمونه شاهد 0 و در این نمونه 44/23 درصد می باشد، بدین معنی که در این شرایط قسمت اعظم گروه های آمینی آزاد قابل اندازه گیری با این روش، با دکستران واکنش داده و گلیکوکانژوگه های سنگین را تولید می کند. نمودارهای 4 و 6 نمونه های گرمخانه گذاری شده در 40 و 80 °C در هر دو pH واکنش را نشان می دهد، در این تیمار ها، تعداد گروه های آمینی در طول حرارت دهی با دکستران کاهش قابل توجهی نداشته است. ناپدید شدن گروه های آمینی در 60°C بیشتر از 40 و 80 °C می باشد.



شکل4- درصد جایگزینی گروه های آمینی در نمونه های تیمار شده در دمای 40 °C، pH=7 و 8/5 و زمان های مختلف
(هر ستون نمایانگر میانگین ±انحراف معیار برای سه تکرار می باشد)



شکل 5- درصد جایگزینی گروه های آمینی در نمونه های تیمار شده در دمای60 °C، pH=7 و 8/5 و زمان های مختلف
(هر ستون نمایانگر میانگین ±انحراف معیار برای سه تکرار می باشد)



شکل 6 - درصد جایگزینی گروه های آمینی در نمونه های تیمار شده در دمای 80 °C، pH=7 و 8/5 و زمان های مختلف
(هر ستون نمایانگر میانگین ±انحراف معیار برای سه تکرار می باشد)

نتایج گروه های آمینی آزاد تشکیل بهتر محصولات واکنش مایلارد[1] را در نمونه های گرمخانه گذاری شده در 60 °C و به ویژه در pH=8/5 را نشان می دهد که تأییدی بر نتایج حاصل از الگوی الکتروفورز ذکر شده در بخش قبل نیز می باشد.

3-3-نتایج اسپکتروسکوپی FT-IR

در طی گلیکوزیله شدن گروه آمینی پروتئین تخریب شده و باند کوالانسی با انتهای احیاکننده کربونیلی کربوهیدرات ایجاد می کند، بنابراین در طی گلیکوزیله شدن ساختار اولیه پروتئین و اتصالات (C-N, N-H) پروتئین های غذایی تغییر می کند. تشکیل باند کووالانسی بین انتهای آمینی پروتئین و انتهای احیاکننده کربوهیدرات در اسپکترای FT-IR[2] خود را به نمایش می گذارد (شکل 7) (16). آنالیز اسپکترای FT-IR برای شناسایی گروه های عاملی نمونه های پروتئین های سویا، دکستران و کانژوگه در شرایط بهینه انتخاب شده، بکار رفت. نمودار 7 (C) اسپکترای FT-IR دکستران خالص را نشان می دهد، (B) نمونه ایزوله پروتئینی سویا و (A) نمونه کانژوگه 8 روز گرمخانه گذاری شده در pH=8/5 و دمای 60 °C (نمونه بهینه) می باشد.

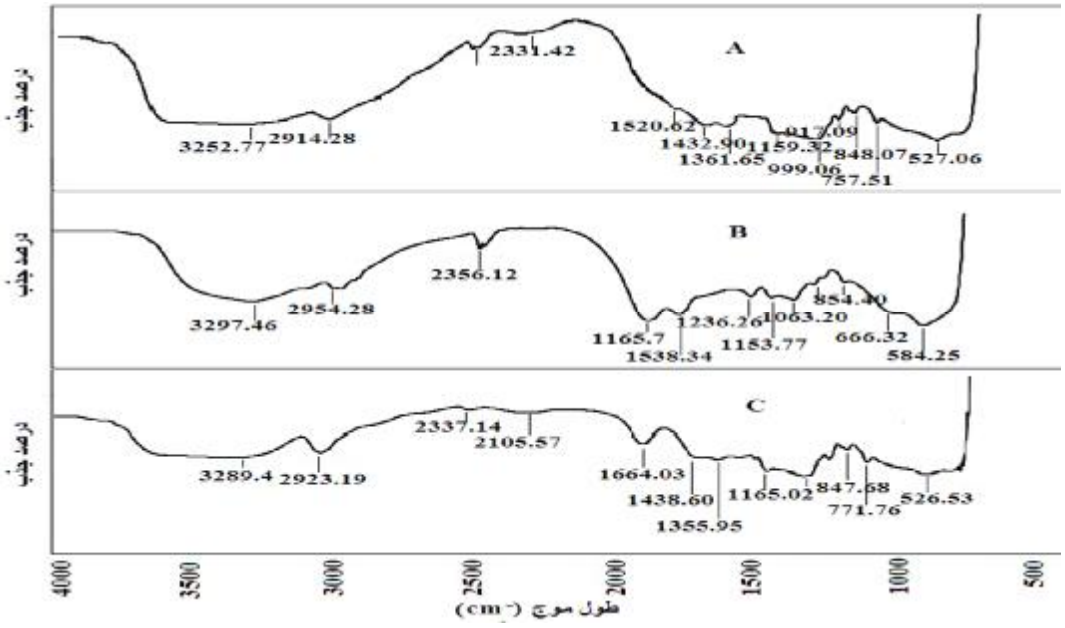
در شکل7 (C) باند های مشخصه دکستران نشان داده شده است. پیک جذب در $914\ cm^{-1}$، نشان دهنده حضور باند α-گلیکوزیدیک می باشد. باند موجود در $1010\ cm^{-1}$ نیز نشان از

[1] Maillard reaction products
[2] Fourier transform infrared spectra

انعطاف فوق العاده شاخه دکستران در ناحیه α 1→6 باند گلیکوزیدی می باشد، باند در ناحیه 1156 cm^{-1} مربوط به ارتعاش والانت اتصالات C-O-C و پل های گلیکوزیدیک می باشد (20).

شکل7 (B) اسپکترای FT-IR پروتئین های سویا را نشان می دهد. ارتعاش باند ها در 1600-1700 (1665)cm^{-1}، مربوط به آمید I و خمیدگی N-H در ناحیه (1538) 1450-1550 cm^{-1} (آمید II) به پایانه آمینواسیدی ساختار پروتئین بر می گردد (24، 23). جذب باندها در 1200-1450 cm^{-1} مربوط به ارتعاش های کششی C-N و خمیدگی N-H (آمید III) می باشد (24).

نمودار 7 (A) اسپکترای FT-IR نمونه کانژوگه در شرایط بهینه واکنش مایلارد را نشان می دهد. قابل انتظار است که تغییرات شیمیایی که در پروتئین های سویا طی واکنش مایلارد رخ می دهد باعث می شود برخی از گروه های عاملی از جمله NH_2 مربوط به لیزین از دست رود در حالی که برخی گروه های جدید از جمله ترکیبات آمادوری (C=O)، باز شیفت (C=N) و پیرازین (C-N) می باشد که ممکن است در طی واکنش مایلارد ایجاد و جذب آنها افزایش یابد (8). جذب باند ها در ناحیه 1600-1650و 1500-1600,cm^{-1} کاهش می یابد که مربوط به آمید I و آمید II می باشد (24). ارتعاش اسپکترا در ناحیه cm^{-1} 1200-1300 که مربوط می شود به خمیدگی N-H (آمید III) نیز در نمونه کانژوگه در مقایسه با شاهد بسیار کم می شود (10، 24). جذب در ناحیه 1200-1450 که مربوط می شود به ارتعاش کششی C-N نیز در مقایسه با نمونه پروتئین های سویا افزایش می یابد و در نمونه کانژوگه پیک جدیدی در 1361 ظاهر می شود (24) به علاوه یک جذب جدید در ناحیه 1600-1700 cm^{-1} مشاهده می شود که پیک روئیت شده در 1651 cm^{-1} مربوط به ارتعاش کششی C=N ایجاد شده در طی پی باز شیفت واکنش مایلارد و نیز C=O حاصل از ترکیبات آمادوری واکنش می باشد (10). همچنین جذب در نواحی 999، 917 و 1159 cm^{-1} که مربوط به اتصالات گلیکوزیدی ناشی از حضور دکستران می باشد در نمونه کانژوگه افزایش می یابد (9). نتایج بدست آمده در این بخش با گزارشات سو و همکاران (2010)، گوان و همکاران (2006) مطابقت دارد و بطور کلی تغییرات جذب نشان می دهد که دکستران بطور کووالانسی به پروتئین های سویا در نمونه کانژوگه متصل شده است.



شکل7- اسپکترای FT-IR (A) نمونه کانژوگه بهینه، (B) نمونه پروتئین های سویا، (C) دکستران

4- نتیجه گیری

در این مطالعه پروتئین های سویا با دکستران در شرایط مختلف واکنش مایلارد کانژوگه شد. نتایج الکتروفورز نشان داد بیشترین کانژوگه شدن در دمای60 °C، pH=8/5 و زمان 8 روز رخ داده است، نتایج OPA میزان اتصال 44/23 درصدی پروتئین به پلی ساکارید را در نمونه کانژوگه بهینه تأیید کرد و نتایج اسپکتروسکوپی FTIR تشکیل اتصالات کوالانسی C-N را در نمونه بهینه تأیید کرد. گرمخانه گذاری پروتئین های سویا با دکستران به نسبت 1 به 4 در دمای 60 °C، pH=8/5، زمان 8 روز و رطوبت نسبی 79٪ جهت انجام واکنش مایلارد یکی از راه های مناسب اصلاح این پروتئین ها جهت کاربرد های گسترده تر در صنایع غذایی می باشد.

5- منابع

1- Ames, J. M. 1992. The Maillard reaction. In: Biochemistry of Food Proteins. pp. 99-153. Hudson, B. J. F., Ed., Elsevier Science Publishers, London.

2- Amiri, S. Ramezani, R. and Aminlari, M. 2008. Antibacterial activity of dextran conjugated lysozyme against Escherichia coli and Staphylococcus aureus in cheese curd. Journal of Food Protection., 71: 411-415.

3- Alahdad, Z. Ramezani, R. Aminlari, M. and Majzoobi. M. 2009). Preparation and properties of dextran Sulfate-Lysozyme Conjugate. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57: 6449–6454.

4- Chevalier, F. Chobert, J. M. Popineau, Y. Nicolas, M. G. and Haertlé, T. 2001. Improvement of functional properties of β-lactoglobulin glycated through the Maillard reaction is related to the nature of the sugar. International Dairy Journal, 11: 145–152

5- Diftis, N. and Kiosseoglou, V. 2006. Stability against heat-induced aggregation of emulsions prepared with a dry-heated soy protein isolate–dextran mixture. Food Hydrocolloids, 20: 787–792.

6- Easa, A.M. Hill, S.E. Mitchell, J.R. and Taylor, A.J. 1996. Bovine serum albumin gelation as a result of the Maillard reaction. Food Hydrocolloids. 10: 199–202.

7- Fujiwara, K. Oosawa, T. and Saeki, H. 1998. Improved thermal stability and emulsifying properties of carp myofibrillar proteins by conjugation with dextran. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46: 1257-1261.

8- Farhat, I. A. Orset, S. Moreau, P. and Blanshard, J. M. V. 1998. FTIR study of hydration phenomena in protein–sugar systems. Journal of Colloid and Interface Science., 207: 200–208.

9- Guan, J. Qiu, A. Liu, X. Hua, Y. and Ma, Y. 2006. Microwave improvement of soy protein isolate–saccharide graft reactions, Food Chemistry. 97: 577-585.

10- Gu, F. L. Kim, J. M. Abbas, S., Zhang, X. M., Xia, S. Q. and Chen, Z. X. 2010. Structure and antioxidant activity of high molecular weight Maillard reaction products from casein-glucose. Food Chemistry. 120: 505–511.

11- Jime´nez-Castan˜o, L. Villamiel, M. Martı´n-A´ lvarez, P. Olano, A. and Lo´pez-Fandin˜o, R. 2005. Effect of the dry-heating conditions on the glycosylation of b-lactoglobulin with dextran through the Maillard reaction. Food Hydrocolloids, 19: 831–837

12- Kato, A. Mifuru, R. Matsudomi, N. and Kobayashi, K. 1992. Functional casein-polysaccharide conjugates prepared by controlled dry heating. Bioscience, Biotechnology, *and* Biochemistry, *56:567–571*

13- Kato, A. 2002. Industrial applications of Maillard-type protein- polysaccharide conjugates. *Food* Science and Technology Research, *8: 193-*199.

14- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.

15- Lertittikul, W. Benjakul, S. and Tanaka, M. 2007. Characteristics and antioxidative activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein–glucose model system as influenced by pH. Food Chemistry, 100: 669–677.

16- Liu, Y., Zhao, G., Zhao, M., Ren, J. and Yang, B. 2012. Improvement of functional properties of peanut protein isolate by conjugation with dextran through Maillard reaction. Food Chemistry, 131: 901-906.

17- Li, Y. Zhong, F. Ji, W. Yokoyama,W.H. Shoemaker, C. Zhu, S. and Xia, W.2012. Functional properties of Maillard reaction products of rice protein hydrolysates with mono, oligo and polysaccharides. Food Hydrocolloids, 30: 53-60

18- Nielsen, P. M. Petersen, D. and Dambmann, C. 2001. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. Journal of Food Science, 66: 642–646.

19- Oliver, C. M. Melton, L. D. and Stanley, R. A. 2006. Creating proteins with novel functionality via the Maillard reaction: a review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 46: 337–350.

20- Purama, R.K., Goswami, P., Khan, A.T. and Goyal, A. 2009. Structural analysis and properties

of dextran produced by Leuconostoc mesenteroides NRRL B-640. Carbohydrate Polymers. 76: 30–3.

21- Qi, J., Yang, X. and Liao, J. 2009. Improvement of functional properties of acid-precipitated soy protein by the attachment of dextran through Maillard reaction, International Journal of Food Science and Technology. 44: 2296–2302

22- Scaman, C. Nakai, S. and Aminlari. 2006. Effect of pH, temperature and sodium bisulfite or cysteine on the level of Maillard-based conjugation of lysozyme with dextran, galactomannan and mannan. Food Chemistry. 99: 368–380.

23- Schmitt, V. and Soldi, V. 2006. Influence of polycaprolactone-triol addition on thermal stability of soy protein isolate based films. Polymer Degradation and Stability., 9: 3124–3130

24- Su, J. Huang, Z. Yuan, X. Wang, X. and Li, M. 2010. Structure and properties of carboxymethyl cellulose/soy protein isolate blend edible films crosslinked by Maillard reactions, Carbohydrate Polymers., 79: 145–153.

25- Tian, H. Xu, G. Yang, B., Guo, G. 2011. Microstructure and mechanical properties of soy protein/agar blend films: Effect of composition and processing methods, Journal of Food Engineering, 107: 21–26

26- Van Boekel, M. A. J. S. 2001. Kinetic aspects of the Maillard reaction: A critical review. Nahrung, 45: 150-159.

27- Van de Lagemaat, J. Manuel Silván, J. Javier Moreno, F. Olano, A. and Dolores del Castillo, M. 2007. In vitro glycation and antigenicity of soy proteins, Food Research International, 40: 153–160

28- Yadav, M.P. Parris, N. Johnston, D.B. Onwulata, C.I. and Hicks, K.B. 2010. Corn fiber gum and milk protein conjugates with improved emulsion stability, Carbohydrate Polymers. 81: 476–483.

29- Zhu, D. Damodaran, S. and Lucey, J. A. 2010. Physicochemical and emulsifying properties of whey protein isolate (WPI)-dextran conjugates produced in aqueous solution. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58: 2988–2994.