تشکیل کانژوگه های لیزوزیم–دکستران با استفاده از حرارت دهی مایکروویو

محمد حسین مولایی فر[۱]، مهرداد نیاکوثری[۲*]، محمود امین لاری[۳]

۱- دانشجوی دکتری گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
۲- استاد گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی و استاد گروه بیوشیمی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز
۳- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

(تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۰۷ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰٦/۱٤)

چکیده

کاربرد لیزوزیم به عنوان ضد میکروب یا نگهدارنده طبیعی در صنایع غذایی و دارویی شناخته شده است. خواص ضد میکروبی لیزوزیم علیه باکتری ها با استفاده از واکنش های شیمیایی مثل کانژوگه شدن با کربوهیدرات با استفاده از واکنش مایلارد بهبود میابد اما این واکنش طبیعی بسیار زمان بر است، بنابراین در این پروژه روش جدید حرارت دهی با مایکروویو برای انجام واکنش مایلارد استفاده شد. لیزوزیم با دکستران مخلوط شد و تحت حرارت دهی مایکروویو قرار گرفت. در مقایسه با روش مرسوم، حرارت دهی مایکروویو سرعت کانژوگه شدن لیزوزیم و دکستران را افزایش می دهد. میزان کانژوگه شدن با استفاده از الکتروفورز SDS-PAGE، کروماتوگرافی تبادل کاتیونی و اندازه گیری محتوی قند نمونه ها تعیین گردید. نتایج الکتروفورز نشان داد با افزایش زمان حرارت دهی مایکروویو، افزایش وزن ملکولی کانژوگه ها مشاهده شده و بیشترین گلیکوزیله شدن بعد از ٤ دقیقه حرارت دهی بدست آمد و تحت این شرایط ۰/٦ مول دکستران به هر مول لیزوزیم متصل شد. پروفایل خروجی کروماتوگرافی کانژوگه های لیزوزیم –دکستران نشان داد که در مقایسه با لیزوزیم طبیعی، پیک کانژوگه ها به وزن های ملکولی بالاتر منتقل شده و با منحنی غیرکانژوگه ها همپوشانی دارد که اتصال کووالانسی لیزوزیم – دکستران را تأیید می کند. نتایج پیشنهاد می دهد که امکان افزایش سرعت کانژوگه شدن مایلارد با استفاده از حرارت دهی مایکروویو وجود دارد.

کلید واژگان: الکتروفورز، حرارت دهی مایکروویو، کروماتوگرافی، لیزوزیم، واکنش مایلارد

* مسئول مکاتبات: niakosar@shirazu.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

۱- مقدمه

لیزوزیم[1] پروتئینی با وزن مولکولی ۱٤٦۰۰ دالتون بوده و حاوی ۱۲۹ اسید آمینه است و در سال ۱۹۲۲ توسط الکساندر فلمینگ کشف شد. این آنزیم بدلیل حضور بالای اسیدهای آمینه هستیدین، لیزین و آرژنین نقطه ایزوالکتریک بالا و برابر ۱۱-۱۰/۵ دارد. چهار پیوند دی سولفیدی موجود در ساختار لیزوزیم موجب پایداری آن می گردد. این آنزیم بطور فراوان در طبیعت یافت می شود و در تخم پرندگان، بسیاری از گیاهان، قارچ ها، حشرات، بافت ها و مایعات پستانداران نظیر شیر، اشک، بزاق، خون، موکوس و کلسترول وجود دارد. لیزوزیم الیگوساکاریدهای N-استیل گلوکز آمین حاوی باند β-1-4 را می شکند و از این طریق نقش ضد میکروبی خود را ایفا می کند [۱-۲]. این آنزیم برای کاربردهای کلینیکی مختلف شامل درمان های ضد باکتریایی، ضد ویروسی و ضد التهابی در انسان و حیوان پیشنهاد شده است. همچنین این آنزیم برای کنترل رشد میکروبی در غذاهایی نظیر پنیر و شراب و غیره جهت افزایش طول عمر نگهداری استفاده می شود. به دلیل اینکه لیزوزیم یک جز درونی از سیستم ایمنی بدن انسان است انتظار می رود که سمیت کمی داشته باشد، این آنزیم بر روی پپتیدوگلیکان باکتری ها موثر است و بر روی بافت های انسانی اثری ندارد. لیروریم تجاری خالص شده از سفیده تخم مرغ امروزه بوسیله رزین های تعویض یونی کاتیونی تولید می شوند و کاربردهای متعددی در صنایع غذایی دارد از جمله در فراورده های لبنی و پنیر موجب به تأخیر انداختن رشد لیستریا مونوسیتوژنز می شود و در نوشیدنی های الکلی موجب به تأخیر افتادن فساد میکروبی می شود. ضمن اینکه مطالعات فراوانی برای افزایش پایداری و بهبود خصوصیات ضد میکروبی و عملکردی لیزوزیم صورت گرفته است [۳-۵].

از راه های طبیعی بهبود خواص ضد میکروبی و عملکردی لیزوزیم اصلاح با استفاده از واکنش مایلارد[2] است. در این واکنش اتصال کووالانسی میان گروه های آمین آزاد پروتئین و گروه کربونیلی پلی ساکارید تحت شرایط کنترل شده رطوبت، حرارت، pH، نسبت مناسب واکنشگرها و غیره صورت می پذیرد و هیبرید های سنگین و با وزن ملکولی متفاوت پروتئین -پلی ساکارید تشکیل می شود [٦]. 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 [۷-۹]. بعلاوه خصوصیاتی چون فعالیت آنتی اکسیدانی، فعالیت ضد سرطانی و ضد جهش زایی و خصوصیات ضد میکروبی نیز افزایش می یابد [۱۰].

امینلاری و همکاران (۲۰۰۵)، گزارش کردند که گلیکوزیله کردن[3] لیزوزیم با دکستران با نسبت وزنی ۱ به ۵، در دمای ٦۰ درجه سانتی گراد، برای مدت زمان یک هفته و در رطوبت نسبی ۷۹٪، منجر به اتصال ۳ مول دکستران به یک مول لیزوزیم می گردد، این محققین اظهار داشتند که فعالیت آنزیمی لیزوزیم، طی گلیکوزیله شدن ۲۰٪ کاهش یافته اما حلالیت پروتئین در pH های مختلف بهبود می یابد. اسکامان و همکاران (۲۰۰٦) بهترین شرایط گلیکوزیله کردن لیزوزیم با پلی ساکارید های دکستران، گالاکتومنان و منان را مورد بررسی قرار دادند و متوجه شدند که شرایط بهینه برای گلیکوزیله کردن لیزوزیم با دکستران، pH: ۸/۵ و دمای ٦۰ درجه سانتی گراد با نسبت وزنی ۱ به ۵ است. نتایج یکسانی برای گالاکتومنان نیز بدست آمد اما مننان به لیزوزیم متصل نشد. لیزوزیم کانژوگه شده با دکستران، پایداری حرارتی و خواص امولسیفایری بهتری در مقایسه با لیزوزیم اصلاح نشده از خود نشان می دهد. اله داد و همکاران (۲۰۰۹) اقدام به کانژوگه کردن[4] لیزوزیم با دکستران سولفات کردند که طی آن افزایش حلالیت در pH قلیایی و دماهای متفاوت، افزایش پایداری حرارتی، بهبود فعالیت امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون مشاهده شد. رمضانی و همکاران (۲۰۰۸) اقدام به کانژوگه کردن لیزوزیم و کازئین با گلوکزآمین کردند که طی آن برای هر دو پروتئین بهبود حلالیت در pH و دماهای مختلف، افزایش پایداری حرارتی، بهبود فعالیت امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون و بهبود ظرفیت کف کنندگی مشاهده شد. تاکاهاشی و همکاران (۲۰۰۰) اقدام به کانژوگه کردن لیزوزیم و گلوکز استئاریک اسید مونو استر[5] کردند و طی آن بهبود فعالیت ضد باکتریایی، افزایش پایداری حرارتی و بهبود فعالیت

1. Lysozyme
2. Maillard reaction
3. Glycosilation
4. Conjugation
5. Glucose stearic acid monoester

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

امولسیون‌کنندگی مشاهده شد. شو و هکاران (۱۹۹٦) زایلو گلوکان و گالاکتومنان را با لیزوزیم کانژوگه نمودند و به این نتیجه رسیدند که با افزایش طول زنجیر پلی ساکارید اتصال یافته به لیزوزیم خواص امولسیفایری و پایداری حرارتی افزایش می یابد و همچنین با افزایش تعداد پلی ساکاریدهای اتصال یافته بهبود خواص بیشتر مشاهده می گردد. سونگ و همکاران (۲۰۰۲)، کانژوگه کیتوزان –لیزوزیم را ازطریق واکنش مایلارد تهیه کردند و مشاهده کردند که خاصیت امولسیفایری کانژوگه های سنگین وزن بهتر از سبک وزن است و این کانژوگه ها خصوصیات ضد باکتریابی خوبی نسبت به گرم منفی ها دارد. امیری و همکاران (۲۰۰۷) با تولید کانژوگه دکستران –لیزوزیم گزارش کردند که کانژوگه حاصله اثر ضد میکروبی خوبی بر اشریشیاکلی[1] در مقایسه با آنزیم اصلاح نشده دارد، در حالیکه بر استافیلوکوکوس اورئوس[2] نسبت به آنزیم اصلاح نشده تفاوت معنی داری ندارد، بعلاوه فعالیت آنزیمی نیز با کانژوگه شدن کاهش یافت [۱۱–۱٦].

تاکنون مطالعات متعددی در رابطه با بهبود خواص ضد میکروبی و عملکردی لیزوزیم با استفاده از واکنش طبیعی مایلارد صورت گرفته است در حالی که این واکنش طبیعی زمان بر بوده و برای حصول میزان کانژوگه شدن دلخواه نیازمند صرف زمان زیادی است، لذا در این تحقیق امکان استفاده از مایکروویو برای تسریع واکنش مایلارد بین لیزوزیم و دکستران بررسی گردید.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد

لیزوزیم تهیه شده از شرکت آنوا تک کانادا[3] با وزن مولکولی ۱٤٦۰۰ دالتون و دکستران با وزن مولکولی ۱۰۵۰۰ دالتون از شرکت سیگمای آمریکا[4]، مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۲- کانژوگه کردن لیزوزیم با دکستران

برای تهیه کانژوگه های لیزوزیم –دکستران با استفاده از مایکرویو مطابق روش گوان و همکاران (۲۰۰٦) و با کمی تغییرات عمل شد. بدین صورت که لیزوزیم و دکستران با نسبت وزنی ۱به ۵ (٤۸۰ میلی گرم لیزوزیم به ازای۲٤۰۰ میلی گرم دکستران) در ۲ میلی لیتر آب مقطر با pH: ۷ حل شد، یک نمونه شامل لیزوزیم بدون دکستران (۲٤۰میلی گرم در ۱ میلی لیتر آب مقطر) نیز به عنوان شاهد تهیه شد، پس از حل شدن کامل نمونه ها در دمای C^o ۲۰، نمونه های تهیه شده حاوی لیزوزیم و دکستران و همچنین نمونه حاوی لیزوزیم شاهد، در دستگاه مایکروویو با توان ۱۸۰ وات به مدت ٤ دقیقه قرار گرفت، جهت جلوگیری از افزایش دما هر یک دقیقه نمونه ها خارج شد و به مدت ۲/۵ دقیقه در آب سرد ٤ درجه سانتیگراد قرار گرفت [۱۷].

۲-۳- الکتروفورز SDS-PAGE

برای تأیید تشکیل کانژوگه های پروتئین-پلی ساکارید، الکتروفورز SDS- PAGE[5] مطابق روش لاملی (۱۹۷۰) و با کمی تغییرات صورت پذیرفت. ژل افقی الکتروفورز با ۳٪ ژل متراکم کننده و ۱۰٪ ژل جدا کننده تهیه شد و دستگاه الکتروفورز دو طرفه بیو راد ساخت سنگاپور مورد استفاده قرار گرفت. نمونه به غلظت ۲ میلی گرم در ۱ میلی لیتر در بافر نمونه مخلوط و در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه حرارت داده شد و در هر چاهک ۲۰ میکرولیتر نمونه تزریق شد. میزان جریان الکتریسیته روی ۲۵ 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 [۱۹].

۲-٤- انجام کروماتوگرافی به روش تبادل کاتیونی[6]

برای خالص سازی و تأیید تشکیل کانژوگه های لیزوزیم-دکستران، از کروماتوگرافی تبادل کاتیونی حاوی رزین تبادل کاتیونی CM-۲۵ مطابق روش جانسون (۱۹۹۸) استفاده شد. ستون به ابعاد ۲۰×۵ سانتی متر تهیه شد و نمونه ها به میزان ۱۰۰۰ میلی گرم توزین و در ۱ میلی لیتر بافر کربنات آمونیوم ۱۰ میلی مولار با pH: ۷/۷ حل شدند و سپس با دور g×۲۵۰۰ به مدت ده دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. مایع رویی جدا و برای نمونه گذاری روی ستون مورد استفاده قرار گرفت و در هر لوله ۳ میلی لیتر جمع آوری شد. جذب نوری فراکسیون ها در

1. *Escherichia coli*
2. *Staphylococcus aureus*
3. Canadian Inovatech Inc
4. Sigma Co.

5. Sodium-dodecyl-sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)
6Cation-exchange chromatography

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

طول موج ۲۸۰ نانومتر تعیین و کروماتوگرام مربوطه رسم گردید. کانژوگه های خالص شده برای آزمون های بعدی مورد استفاده قرارگرفتند [۲۰].

۲-۵- اندازه گیری قند در نمونه های کانژوگه شده

اندازه گیری قند کل پروتئین ها با استفاده از روش فنول سولفوریک اسید[1] و با استفاده از گلوکز به عنوان استاندارد تعیین شد. در این روش قندهای احیاکننده در واکنش با اسید سولفوریک غلیظ هیدروکسی متیل فورفورال تولید می کنند که این ترکیب با فنول رنگ زرد نارنجی تولید می کند که در غلظت های ثابت فنول، مقدار رنگ تولید شده با مقدار قند موجود در نمونه متناسب است و شرایط واکنش با اسید سولفوریک به نحوی است که تمام پلی ساکاریدها به مونوساکاریدها تجزیه می شوند و میزان رنگ ایجاد شده متناسب با تعداد مونوساکارید موجود در پلی ساکارید است، بنابراین با توجه به وزن مولکولی ۱۶۲ برای باقیمانده های مونوساکارید و۱۰۵۰۰ دالتون برای دکستران می توان تعداد مول های دکستران متصل شده به لیزوزیم را محاسبه کرد. ۲۵ میلی گرم نمونه لیزوزیم شاهد و کانژوگه شده با ۰/۵ میلی لیتر تری کلرو استیک اسید ۵٪ مخلوط شد و سپس با دور ۲۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل با آب مقطر شسته شد و در دمای ۶۰°C به مدت ۳ ساعت در آون خشک شد. به هرکدام از لوله‌های آزمایش فوق، ۰/۱ میلی لیتر آب، ۰/۱ میلی لیتر فنل ۵ درصد و ۰/۵ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ اضافه شد. سپس نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط باقی ماندند. پس از آن نمونه ها کاملاً مخلوط شده و در حمام آب گرم ۳۰°C-۲۵ به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شدند. سپس جذب نوری آنها در طول موج ۴۹۰ نانومتر تعیین شد و از طریق منحنی استاندارد غلظت قند آنها محاسبه شد [۲۱].

۲-۶- تجزیه و تحلیل آماری

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، از آنالیز واریانس و برای گروه بندی آنها از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح ۰/۰۵ استفاده شد. در تمام مراحل، تجزیه و تحلیل آماری داده ها با استفاده از نرم افزار SAS صورت پذیرفت.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- نتایج الکتروفورز SDS-PAGE

شکل ۱ الگوی الکتروفورز مربوط به نمونه های لیزوزیم طبیعی (بدون حرارت دهی و بدون دکستران)، لیزوزیم شاهد (حرارت دیده بدون دکستران) و لیزوزیم کانژوگه شده با دکستران (با نسبت وزنی ۵ میلی گرم دکستران به ازای هر میلی گرم لیزوزیم) در زمان های ۱، ۲، ۳، ٤ دقیقه را نشان می دهد. میزان یا درصد گلیکوزیله شدن از مهمترین خصوصیات فیزیکوشیمیایی است که بطور مستقیم بر خصوصیات عملکردی پروتئین ها تأثیر می گذارد و الکتروفورز یکی از راه های تعیین میزان پیشرفت کانژوگه شدن می باشد. مطابق الگو در ستون شماره ۱ (لیزوزیم شاهد) تنها یک باند پروتئینی دیده می شود در حالیکه در ستون های ۲ تا ۵ با افزایش زمان حرارت دهی مایکروویو باعث ظاهر شدن تدریجی یک باند کشیده، وسیع و متراکم در ابتدای ژل متراکم کننده که مربوط به اجزاء با وزن مولکولی بالای تشکیل شده در طی واکنش مایلارد می باشد، می شود و به نظر می رسد بیشترین کانژوگه شدن در ستون شماره ۵ (نمونه با ٤ دقیقه حرارت دهی مایکروویو) رخ داده است (نمونه بهینه). در ستون های ۲ تا ۵ پروتئین هایی با حرکت الکتروفورتیکی کمتر از لیزوزیم طبیعی مشاهده می شود که بصورت باندهای گسترده و وسیع مشاهده می شوند و با افزایش زمان تیمار مایکروویو، این باندها گسترده تر می شوند و همزمان باند مربوط به لیزوزیم ضعیف تر و کمرنگ تر می شود. دکستران تحت واکنش کنترل شده مایلارد، با پیوند کووالانسی به لیزوزیم متصل شده است که بدلیل اتصال تعداد مول های متفاوت دکستران به لیزوزیم، مشتقاتی با وزن مولکولی متفاوت تولید می شوند. این توزیع وسیع وزن مولکولی برای ترکیبات مختلف پروتئینی لیزوزیم، منجر به گسترده شدن باندهای پروتئینی در الکتروفورز شده که حرکت الکتروفوریتیکی آنها بسته به وزن مولکولی این ترکیبات دارد، این امر منجر به ظاهر شدن یک طیف وسیع در

1. Phenol sulfuric acid method

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

باندهای پروتئینی شکل گرفته در مسیر حرکت پروتئین می گردد [۸-۹ و ۱۱-۱۳]. اله داد و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند، با افزایش زمان گرمخانه گذاری واکنش مایلارد به منظور کانژوگه کردن لیزوزیم با دکستران از زمان صفر تا یک هفته شدت باندهای اصلی پروتئینی کاهش یافته و همزمان گستردگی باندهای کانژوگه ها افزایش می یابد. ناکامورا و همکاران (۱۹۹۲) با کانژوگه کردن لیزوزیم و دکستران مشاهده کردند با افزایش زمان گرمخانه گذاری لیزوزیم ناپدید شده و همزمان باندهای با وزن ملکولی متفاوت و سنگین کانژوگه ها ظاهر شدند. امین لاری و همکاران (۲۰۰۵) با تهیه کانژوگه های لیزوزیم -دکستران و کازئین -دکستران گزارش کردند افزایش زمان گرمخانه گذاری منجر به تشکیل کانژوگه های با وزن ملکولی متفاوت در ابتدای ژل جدا کننده می شود. گوان و همکاران (۲۰۰٦) با تهیه کانژوگه های پروتئین ایزوله شده سویا -دکستران، پروتئین ایزوله شده سویا -گلوکز، پروتئین ایزوله شده سویا -مالتوز و پروتئین ایزوله شده سویا -لاکتوز بوسیله مایکروویو در مقایسه با روش گرمخانه گذاری معمول واکنش مایلارد، گزارش کردند حرارت دهی مایکروویو موجب تسریع واکنش مایلارد شده و کانژوگه های بیشتری در مقایسه با روش مرسوم حرارت دهی تشکیل می شود [۹، ۱۱، ۱۷، ۲۲].

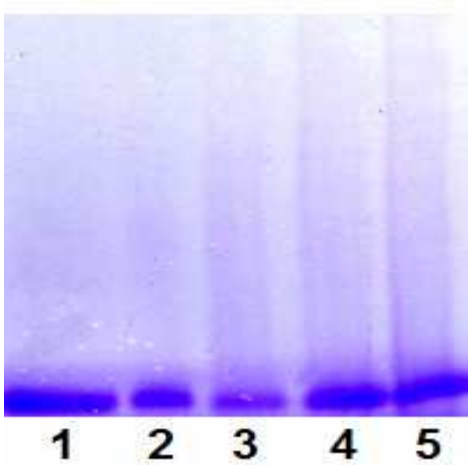

Fig 1SDS–PAGE patterns of lysozyme -dextran conjugates (1) Control lysozyme, (2) Sample treated with microwave for 1 min (3) Sample treated with microwave for 2 min (4) Sample treated with microwave for 3 min (5) Sample treated with microwave for 4 min

۳-۲- نتایج حاصل از کروماتوگرافی تبادل کاتیونی

شکل ۲ نتایج کروماتوگرافی تبادل کاتیونی نمونه های لیزوزیم طبیعی (بدون حرارت دهی مایکروویو و بدون دکستران) (A) و کانژوگه لیزوزیم-دکستران بهینه (٤ دقیقه حرارت دهی مایکروویو) (B) را نشان می دهد. در این نوع کروماتوگرافی، بارهای مثبت موجود در ساختار لیزوزیم باعث اتصال آن به ذرات ستون CM-25 (حامل بارهای منفی ناشی از گروهای کربوکسیل) می شود و تنها با جاگزینی بارهای مثبت با یک کاتیون قوی تر (مثل کاتیون Na^+ در نمک)، پیوند بین لیزوزیم و ذرات رزین گسسته می شود.

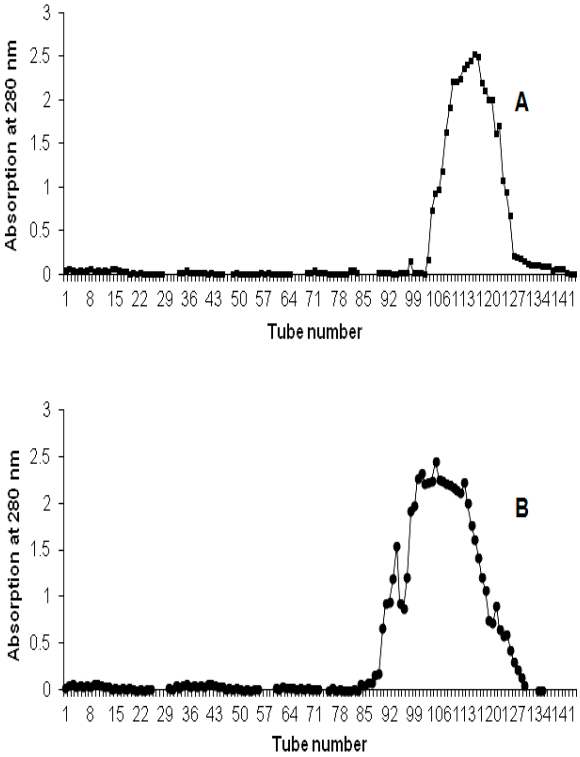

Fig 2 Chromatograms of unconjugated (A) and dextran-conjugted (B) lysozyme

کاهش بار مثبت در لیزوزیم کانژوگه شده منجر به کاهش اتصال لیزوزیم با گروه های کربوکسیل ذرات ستون می شود و در غلظت های پایین تر نمک و در ابتدا از ستون خارج می شود [۱۱ و ۱۲]. همانطور که در شکل ۲ مشاهده می شود، لیزوزیم طبیعی و شاهد در غلظت های بالاتر نمک کلرور سدیم خارج می شود و با مشاهده جذب نمونه ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر قله منحنی در لوله های ۱۱٤-۱۱۲ برای

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

لیزوزیم شاهد مشاهده شد، در حالیکه با اعمال شرایط یکسان (از لحاظ نوع، غلظت، pH بافر مورد استفاده، ارتفاع و قطر ستون)، نمونه کانژوگه شده در غلظت های پایین تر نمک همراه با بافر کربنات آمونیوم ۱۰ میلی مولار شسته و خارج می شود، بنابراین پیک بلند وگسترده تری مشاهده می شود که از لوله شماره ۸۵ شروع و تا لوله شماره ۱۳۲ ادامه پیدا کرده است و قله منحنی در لوله های ۱۰۴-۱۰۰ قرار دارد.

آنزیم لیزوزیم دارای ۷ گروه آمینی آزاد می باشد که می توانند به گروه کربونیل آزاد موجود در دکستران متصل شوند و با شرکت گروه های آمینی آزاد لیزوزیم در واکنش مایلارد میزان بار مثبت پروتئین کاهش می یابد و هر چه میزان اتصال بیشتر باشد لیزوزیم های کانژوگه شده سریعتر خارج می شوند. میزان اتصال لیزوزیم به گروه های کربوکسیل رزین بسته به میزان بار مثبت لیزوزیم دارد و هر چه بار مثبت بیشتر باشد، این اتصال قوی تر است و با غلظت های بالاتر یون سدیم جایگزین می شود، از این رو لیزوزیم هایی که در غلظت های پایین تر یون سدیم و در ابتدا از ستون خارج شده اند لیزوزیم های متصل شده با دکستران های بیشتر هستند و همانگونه که در الگوی کروماتوگرام مشاهده می شود پیک وسیعی در مورد لیزوزیم کانژوگه شده مشاهده می شود که نشان دهنده خروج لیزوزیم کانژوگه شده در ابتدای کار و سپس مخلوط لیزوزیم کانژوگه شده و کانژوگه نشده و در پایان لیزوزیم های کانژوگه می باشد [۱۱-۱۳]. شو و همکاران (۱۹۹۶) گزارش کردند که اتصال کووالانسی دکستران به لیزوزیم، بار مثبت لیزوزیم را کاهش داده و جایگزینی آنها با یون های سدیم راحت تر صورت می پذیرد و احتمالاً گستردگی بیشتر منحنی بدلیل همپوشانی منحنی های لیزوزیم کانژوگه شده و کانژوگه نشده می باشد. نتایج مشابهی توسط ناکامورا و همکاران (۱۹۹۲) در ترکیب لیزوزیم-گالاکتومانان، امین لاری و همکاران (۲۰۰۵) در ترکیب لیزوزیم-دکستران و کازئین-دکستران، اسکامن و همکاران (۲۰۰۶) در ترکیب لیزوزیم-دکستران و لیزوزیم -گالاکتومانان و امیری و همکاران (۲۰۰۷) در ترکیب لیزوزیم-دکستران گزارش شد.

۳-۳- نتایج میزان قند متصل شده به لیزوزیم

جدول ۱ نشان دهنده میزان دکستران موجود در نمونه لیزوزیم کانژوگه شده در حالت محلول می باشد. همانطور که مشاهده می شود به طور متوسط به هر مول لیزوزیم ۰/۶ مول دکستران (یا ۲۸۱ میکرو گرم دکستران به هر میلی گرم لیزوزیم) متصل می شود که با نمونه های لیزوزیم طبیعی و شاهد دارای اختلاف آماری معنی داری است. انجام واکنش مایلارد بین لیزوزیم و دکستران بوسیله مایکروویو با اندازه گیری میزان قند کل موجود در لیزوزیم های کانژوگه خالص شده، نتایج الکتروفورز و کروماتوگرافی را تأیید کرد. ناکامورا و همکاران (۱۹۹۲) با کانژوگه کردن لیزوزیم-گالاکتومانان، سونگ و همکاران (۲۰۰۲) در طی کانژوگه شدن لیزوزیم-کیتوزان، امین لاری و همکاران (۲۰۰۵) با تهیه کانژوگه های لیزوزیم-دکستران و کازئین-دکستران، اله داد و همکاران (۲۰۰۹) با تهیه کانژوگه های لیزوزیم -دکستران و لیزوزیم -دکستران سولفات و امیری و همکاران (۲۰۰۸) با تهیه کانژوگه های لیزوزیم و دکستران نتایج مشابهی را مبنی بر اتصال قند به لیزوزیم با استفاده از واکنش مایلارد گزارش کردند

Table 1 Average amount of dextran conjugated to lysozyme

Mol dextran/mol protein	Mg dextran/mg protein	
0^b	0.0^b	Unconjugated lysozyme
0.6 ± 0.021^a	0.281 ± 0.016^a	Dextran-conjugted lysozyme

*Data represent means ± standard deviations from triplicate analysis. The different small letters indicate significant difference ($p < 0.05$)

٤- نتیجه گیری

در این پروژه لیزوزیم با دکستران با استفاده از حرارت دهی مایکروویو در شرایط واکنش مایلارد قرار گرفت، نتایج الکتروفورز نشان داد با افزایش زمان حرارت دهی مایکروویو دکستران بیشتری به لیزوزیم متصل می شود. کروماتوگرام حاصل از کروماتوگرافی تبادل یونی نتایج الکتروفورز را تأیید کرد. اندازه گیری میزان قند متصل شده به پروتئین نشان داد ۰/۶ مول دکستران به ازای هر مول لیزوزیم در شرایط حرارت دهی به مدت ٤ دقیقه به لیزوزیم متصل می شود. استفاده از

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

مایکروویو سرعت کانژوگه شدن را در مقایسه با روش طبیعی و مرسوم کانژوگه شدن مایلارد به میزان قابل توجهی افزایش می دهد.

۵- منابع

[1] Bester, B.H. and Lombard, S.H. 1990. Influence of lysozyme on selected bacteria associated with Gouda cheese. Journal of Food Protection. 53: 306-311.

[2] Chun, W. and Hancock, R. E. W. 2000. Action of lysozyme and nisin mixtures against lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology. 60: 25–32.

[3] Johnson, E.A., and Larson A.E. 2005. lysozyme. In: Antimicrobial in foods. Davidson, P.M., Sofos, N.J., Branen, A.L. Ed:, New York, 361-387.

[4] Losso, J.N. Nakai, S. and Charter, E.A. 2000. lysozyme. In: Natural Food Antimicrobial Systems. Naidu, A.S. Ed:, New York, 1-27.

[5] Nattress, F. M. Yost, C. K. and Baker, L. P. 2001. Evaluation of the ability of lysozyme and nisin to control meat spoilage bacteria. International Journal of Food Microbiology. 70: 111–119.

[6] de Oliveira, F. C. Coimbra, J. S. d. R. de Oliveira, E. B. Zuñiga, A. D. G. and Rojas, E. E. G. 2016. Food protein-polysaccharide conjugates obtained via the maillard reaction: A review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 56: 1108-1125.

[7] Liu, J. Ru, and Q. Ding, Y. 2012. Glycation a promising method for food protein modification: physicochemical properties and structure, a review, Food Research International. 49: 170-183.

[8] 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.

[9] 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.

[10] 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.

[11] Aminlari, M. Ramezani, R. and Jadidi, F. 2005. Effect of Maillard-based conjugation with dextran on the functional properties of lysozyme and casein. Journal of the Science of Food and Agriculture, 85: 2617–2624.

[12] 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.

[13] Ramezani, R., Esmailpour, M., and Aminlari, M., 2008. Effect of conjugation with glucosamine on the functional properties of lysozyme and casein. Journal of the Science of Food and Agriculture, 88: 2730–2737.

[14] Takahashi, K., Lou, X. F., Ishii, Y. and Hattori, M. 2000. Lysozyme-glucose-stearicmonoester conjugate formed through maillard reaction as an antimicrobial emulsifier. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48: 2044-2049.

[15] Shu, Y. W., S., Nakamura, S. and Kato, A. 1996. Effects of the length of polysaccharide chains on the functional properties of the maillard-type lysozymepolysaccharide. Journal of Agricultural and Food Chemistry., 44: 2544-2548.

[16] Song, Y., Babiker, E. E., Usui, M., Saito, A. and Kato, A. 2002. Emulsifying properties and bactericidal action of chitosan-lysozyme conjugates. Food Research International., 35: 459-466.

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

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

[19] Janson, J.C. 1998. Protein purification, principle of high resolution methods and application, New York, WILEY-LISS. Inc.

[20] Dubois, M, Gilles, KA, Hamilton K, Rebers AP and Smith F, 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anaytical Chemistry. 28:350–356.

[21] Nakamura, S., Kato, A. and Kobayashi, K. 1992. Bifunctional lysozyme-galactomanan conjugate having excellent emulsifying properties and bactericidal effect. Journal of Agricultural and Food Chemistry., 40: 735- 739.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

Formation of Lysozyme- dextran conjugates through microwave heating

Mowlaeifar, M. H. [1], Niakosari, M. [2*], Aminlari, M. [3]

1. Ph.D Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran
2. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture and Department of Biochemistry, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
3. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Shiraz University Shiraz, Iran

(Received: 2015/01/27 Accepted: 2016/09/04)

Application of lysozyme as a natural antimicrobial or preservative agent in food and pharmaceutical industry is well known. The antimicrobial effects of lysozyme can be expanded by conjugation with carbohydrates via Maillard reaction, however this natural reaction is a time consuming process. So in this study a new method microwave heating, was applied to Accelerate the Maillard reaction. Lysozyme was mixed with dextran and heated by microwave irradiation. The glycation extent was determined by SDS-PAGE electrophoresis, cation-exchange chromatography and sugar analysis. SDS-page pattern show that with increasing heating time a high molecular weight conjugates were appeared and maximum glycosylation was occurred after 4 minutes heating. The elution profiles (chromatograms) of the lysozyme–dextran conjugates compared the natural lysozyme showed that the conjugated peak shifted towards the higher molecular weight fraction and overlapped with the non conjugated proteins, indicated that lysozyme was covalently bound to dextran. These results suggest that Maillard reaction rate can be increase using microwave heating.

Key words. Chromatography, Electrophoresis, Lysozyme, Maillard reaction, Microwave heating

* Corresponding Author E-Mail Address: niakosar@shirazu.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]