تأثیر تیمار مایکروویو بر میزان گلیکوزیله شدن کانژوگه های حاصل از واکنش مایلارد لیزوزیم–مالتودکسترین

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

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: ۹۳/۱۱/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۱۳)

چکیده

کانژوگه های لیزوزیم- مالتودکسترین با استفاده از حرارت دهی بوسیله مایکروویو نمونه ها در زمان های مختلف آماده شد. تشکیل کانژوگه های پروتئین- پلی ساکارید با استفاده از الکتروفورز SDS-PAGE، تعیین محتوی گروه های آمینی آزاد، اندازه گیری شدت قهوه ای شدن و میزان جذب در ناحیه UV و اندازه گیری فعالیت آنزیمی تأیید شد. الگوی الکتروفورز نشان داد کانژوگه های لیزوزیم- مالتودکسترین بخوبی تشکیل شده اند. نتایج محتوی گروه های آمینی آزاد نشان داد که با افزایش زمان حرارت دهی مایکروویو، میزان (درجه) کانژوگه شدن افزایش میابد. محصولات قهوه ای و محصولات حد واسط مایلارد که با اندازه گیری جذب در ٤٢٠ نانومتر و ٢٩٤ نانومتر تعیین می شود، در مقایسه با نمونه شاهد افزایش قابل توجهی داشت. فعالیت آنزیمی لیزوزیم کانژوگه شده در مقایسه با لیزوزیم تیمار نشده کاهش یافت. تغییرات واضح صورت گرفته در میزان قهوه ای شدن، محتوی گروه های آمینی آزاد و الکتروفورز تأیید کرد که کانژوگه های لیزوزیم- مالتودکسترین به خوبی با استفاده از حرارت دهی مایکروویو تشکیل شده اند، بعلاوه افزایش شدت تیمار مایکروویو منجر به افزایش میزان کانژوگه شدن شد. نتایج نشان می دهد که تیمار با استفاده از مایکروویو می تواند یک راه موثر و سریع برای اتصال کوالانسی پلی ساکارید به پروتئین باشد.

کلید واژگان: تیمار مایکروویو، لیزوزیم، مالتودکسترین، گلیکوزیله شدن

* مسئول مکاتبات: Boostani.sareh@yahoo.com

۱- مقدمه

مایکروویو امواج الکترومغناطیسی با فرکانس ۰/۳ تا ۳۰۰ گیگا هرتز می باشد، در این روش حرارت دهی امواج جذب شده توسط نمونه موجب تولید گرما می گردد. گرما دهی با استفاده از انرژی مایکروویو بر دو اصل استوار است: هدایت یونی و چرخش دو قطبی، به طور معمول هدایت یونی و چرخش دو قطبی به طور همزمان اتفاق می افتد که به طور موثری انرژی مایکروویو را به نوع حرارتی تغییر می دهند. برخلاف سیستمهای گرمایشی متداول، به دلیل نفوذ امواج مایکروویو به داخل ماده غذایی، حرارت در سرتاسر محصول انتشار می یابد، به همین دلیل در روش مایکروویو سرعت انتقال گرما سریعتر از سایر روش های حرارتی است. سرعت زیاد انتقال حرارت و در نتیجه کاهش زمان فرایند، حفظ کیفیت محصول ضمن فرآیند به همراه انتخاب پذیری این فرایند در قطع و وصل کردن سریع منبع امواج از مزایای حرارت دهی مایکروویو نسبت به سایر روش های حرارت دهی می باشد [۱ و ۲].

حرارت دهی تحت شرایط کنترل شده واکنش مایلارد[1] از روش های جدید بهبود پایداری و خصوصیات عملکردی پروتئین هاست. 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 هیبریدهای سنگین و با وزن ملکولی متفاوت پروتئین –پلی ساکارید تشکیل می شود. تشکیل کانژوگه های پروتئین– پلی ساکارید با استفاده از روش مرسوم مایلارد[2] نیازمند صرف زمان طولانی بوده لذا محققان را به سمت استفاده از روش های سریعتر کانژوگه شدن هدایت کرده است [۳ و ٤].

انتخاب نوع پروتئین و پلی ساکارید شرکت کننده در واکنش مایلارد از عوامل مهم در تشکیل کانژوگه های دلخواه با خصوصیات عملکردی بهبود یافته و پرکاربرد می باشد. لیزوزیم[3] پروتئینی با وزن مولکولی ١٤٦٠٠ دالتون می باشد و به دلیل دارا بودن چهار پیوند دی سولفیدی پروتئینی پایدار می باشد. 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 [۵ و ٦]. 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 بافت های انسانی اثری ندارد. ضمن اینکه مطالعات فراوانی برای افزایش پایداری و بهبود خصوصیات ضد میکروبی و عملکردی لیزوزیم صورت گرفته است [۷ و ۸]. دکسترین محصول هیدرولیز جزئی نشاسته بوسیله حرارت، اسید و یا آنزیم می باشد. امروزه مشتقات اصلاح شده نشاسته، کاربردهای گسترده ای در صنعت مواد غذایی یافته اند. گستره وسیعی از فرآورده های حاصل از هیدرولیز نشاسته بر اساس اکی والان دکستروز[4] (DE) آنها توصیف و نام گذاری می گردند. از انواع دکسترین ها می توان مالتودکسترین، سیکلو دکسترین، پیرو دکسترین، اریترو دکسترین و آرکو دکسترین را نام برد. مالتودکسترین پلیمری از ساکاریدهای فاقد طعم شیرین بوده که اکی والان دکستروز آن کمتر از ۲۰ و شامل مخلوطی از ترکیبات با وزن مولکولی بین پلی ساکاریدها و الیگوساکاریدهاست که به صورت پودر سفید رنگ یا شربت غلیظ در دسترس می باشد. مالتودکسترین در آب محلول است در واقع حلالیت بیشتری در مقایسه با نشاسته در آب دارد و نسبت به اکثر هیدروکلوئید های خوراکی ارزان تر می باشد [۹ و ۱۰].

مطالعات متعددی در رابطه با بهبود پایداری و خواص ضد میکروبی لیزوزیم با استفاده از واکنش مایلارد صورت گرفته است. امینلاری و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کردند که طی گلیکوزیله کردن[5] لیزوزیم با دکستران فعالیت آنزیمی لیزوزیم، ۲۰٪ کاهش یافته اما حلالیت پروتئین در pH های مختلف بهبود می یابد. اسکامان و همکاران (۲۰۰٦) گزارش کردند که شرایط بهینه برای گلیکوزیله کردن لیزوزیم با دکستران، pH:

1. Maillard reaction
2. Classic method
3. Lysozyme
4. Dextrose equivalent
5. Glycosylation

۸/۵ و دمای ۶۰ درجه سانتی گراد با نسبت وزنی ۱ به ۵ است. بعلاوه لیزوزیم کانژوگه شده با دکستران، پایداری حرارتی و خواص امولسیفایری بهتری در مقایسه با لیزوزیم اصلاح نشده از خود نشان داد. اله داد و همکاران (۲۰۰۹) اقدام به کانژوگه کردن[1] 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 با گلوکزآمین کردند که طی آن بهبود حلالیت در pH و دماهای مختلف، افزایش پایداری حرارتی، بهبود فعالیت امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون و بهبود ظرفیت کف کنندگی مشاهده شد. سونگ و همکاران (۲۰۰۲)، کانژوگه کیتوزان –لیزوزیم را ازطریق واکنش مایلارد تهیه کردند و مشاهده کردند 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 اشریشیا کلی[2] در مقایسه با آنزیم اصلاح نشده دارد [۱۱–۱۶].

میزان یا درصد گلیکوزیله شدن از مهمترین خصوصیات فیزیکوشیمیایی است که بطور مستقیم بر خصوصیات عملکردی پروتئین ها تأثیر می گذارد و روش های مختلفی برای تعیین میزان کانژوگه شدن وجود دارد. هدف این تحقیق بررسی میزان کانژوگه شدن لیزوزیم و دکستران تحت گرمادهی مایکروویو به عنوان راهی موثر برای کاهش زمان گلیکوزیله شدن مایلارد می باشد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد

لیزوزیم تهیه شده از شرکت آنوا تک کانادا[3] با وزن مولکولی ۱٤٦۰۰ دالتون و مالتودکسترین با DE: ۱۵–۲۰ ساخت چین[4] مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۲- کانژوگه کردن لیزوزیم با دکستران

برای تهیه کانژوگه های لیزوزیم –دکستران با استفاده از مایکروویو مطابق روش گوان و همکاران (۲۰۰٦) و با کمی تغییرات عمل شد. بدین صورت که لیزوزیم و مالتودکسترین با نسبت وزنی ۱به ۳ در بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH: ۷/۵ حل شد، یک نمونه شامل لیزوزیم بدون مالتودکسترین نیز به عنوان شاهد تهیه شد، پس از حل شدن کامل نمونه ها در دمای ۲۰°C، نمونه های تهیه شده، در دستگاه مایکروویو خانگی[5] با توان ۱۸۰ وات به مدت ۱/۵، ۳ و ٤/۵ دقیقه قرار گرفت، جهت جلوگیری از افزایش دما هر یک و نیم دقیقه نمونه ها خارج شد و به مدت ۲/۵ دقیقه در آب سرد چهار درجه سانتیگراد قرار گرفت [۱۷].

۲-۳- الکتروفورز SDS-PAGE

برای تأیید تشکیل کانژوگه های پروتئین–پلی ساکارید، الکتروفورز SDS- PAGE[6] 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 [۱۸].

۲-٤- 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 ۲۵ میلی لیتر محلول ۱۰۰ میلی مولار تتراهیدروبورات و ۲/۵ میلی لیتر محلول ۲۰٪ وزنی/وزنی سدیم دودسیل سولفات و ٤۰ میلی گرم OPA (که در ۱ میلی لیتر اتانول حل شده است) و ۱۰۰ میکرولیتر بتا مرکاپتواتانول بدست آمد که در نهایت با آب مقطر به حجم نهایی ۵۰ میلی لیتر رسید. برای ارزیابی میزان

1. Conjugation
2. *Escherichia coli*
3. Canadian Inovatech Inc
4. Henan boom gelatin Co., Ltd.
5. LG MC-789Y (Made in Korea)
6. Sodium-dodecyl-sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

گروه های آمینی آزاد، حدود ۵۰-۱۰۰ میکرولیتر از نمونه محلول به ۱ میلی لیتر از واکنشگر OPA درون یک کووت کوارتز ۱/۵ میلی لیتری اضافه شد. محلول حاصله به آرامی تکان داده و به مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس جذب آن در طول موج ۳٤۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد و درصد جایگزینی (یا درصد کانژوگه شدن) مطابق فرمول زیر محاسبه شد [۱۹].

$$\text{درصد کانژوگه شدن} = \frac{A0 - AT}{A0} \times 100$$

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

۲-۵- اندازه گیری میزان قهوه ای شدن

به منظور تعیین پیشرفت کانژوگه شدن ارزیابی تغییرات رنگی با استفاده از اندازه گیری میزان قهوه ای شدن صورت گرفت. نمونه ها به غلظت ۰/۲ درصد پروتئین در SDS[1] ٪۱ تهیه شدند و میزان قهوه ای شدن با اندازه گیری میزان جذب در ٤۲۰ نانومتر تعیین شد [۱۹].

۲-٦- اندازه گیری جذب UV

اندازه گیری میزان جذب در ناحیه UV مطابق روش لرتیتیکول و همکاران (۲۰۰۷) و با کمی تغییرات انجام شد. ابتدا نمونه ها به غلظت ۰/۲ درصد پروتئین در SDS ٪۱ تهیه شدند میزان جذب در طول موج ۲۹٤ نانومتر خوانده شد، عدد خوانده شده به عنوان معیاری از میزان کانژوگه شدن محسوب شد و افزایش میزان جذب نشان از تشکیل بیشتر کانژوگه ها می باشد [۲۰].

۲-۷-روش انداره گیری فعالیت آنزیم

فعالیت آنزیمی لیزوزیم از سرعت تجزیه دیواره سلولی سوبسترای لیزوزیم (میکروکوکوس لیزودکتیکوس) توسط لیزوزیم تعیین شد و بنا به تعریف یک واحد فعالیت آنزیمی برابر با کاهش جذب ۰/۰۰۱ در دقیقه در طول موج ٤۵۰ نانومتر، در ۷ =pH و در دمای ۲۵ °C است. ۹ میلی گرم از دیواره سلول های خشک شده میکروکوکوس لیزودکتیکوس در ۲۵ میلی لیتر بافر پتاسیم فسفات ۰/۱ مولار با ۷ =pH حل شده و حجم نهایی به ۳۰ میلی لیتر رسانده شد. آنزیم لیزوزیم طبیعی و کانژوگه شده به غلظت ۱ میلی گرم در میلی لیتر که در یخچال نگهداری شده بود ابتدا در آب مقطر سرد حل شد و در تمام طول آزمایش این محلول ها سرد نگهداشته شدند. قبل از ارزیابی سریعاً غلظت آنها ۲۰۰ برابر رقیق شده و در هنگام سنجش، دما به ۲۵ °C رسانده شد. ۲/۹ میلی لیتر از سوسپانسیون محلول های سوبسترا داخل یک کووت ریخته ۵-٤ دقیقه فرصت داده شد تا دمای آنها به تعادل برسد. ۰/۱ میلی لیتر از آنزیم رقیق شده به کووت اضافه شد. تغییرات جذب نور در طول موج ٤۵۰ نانومتر (در قسمت خطی ابتدای منحنی) ثبت شده و از فرمول زیر برای تعیین واحد فعالیت آنزیمی استفاده شد [۲۱].

$$\text{فعالیت آنزیمی} = \frac{\text{تغییرات جذب در ٤۵۰ نانومتر در دقیقه}}{\text{میلی گرم آنزیم موجود در نمونه}} \times ۱۰۰$$

۲-٦-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- الکتروفورز SDS-PAGE

شکل ۱ الگوی الکتروفورز مربوط به نمونه های لیزوزیم شاهد و کانژوگه ها در زمان های ۱/۵، ۳/۵ و ٤/۵ دقیقه را نشان می دهد. 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 مابقی ستون ها با افزایش زمان حرارت دهی مایکروویو باعث ظاهر شدن تدریجی یک باند کشیده، وسیع و متراکم در ابتدای ژل که مربوط به اجزاء با وزن مولکولی بالای تشکیل شده در طی واکنش مایلارد می باشد، می شود. در این ستون ها پروتئین هایی با حرکت الکتروفورتیکی کمتر از لیزوزیم شاهد مشاهده می شود که بصورت باندهای گسترده و وسیع دیده می شوند و

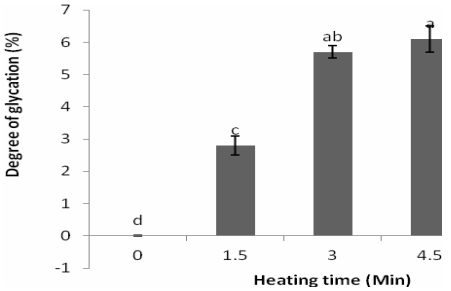
1. Sodium-dodecyl-sulphate

با افزایش زمان تیمار مایکروویو، این باندها گسترده تر می شوند و همزمان باند مربوط به لیزوزیم کمرنگ تر می شود. بدلیل اتصال تعداد مول های متفاوت مالتودکسترین 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 باندهای پروتئینی شکل گرفته در مسیر حرکت پروتئین می گردد [۱۳-۱۶-۱۱-۱۲-۱۴]. امین لاری و همکاران (۲۰۰۵) با تهیه کانژوگه های لیزوزیم –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 (۲۰۰۶) 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. 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.

شکل ۱ الگوی الکتروفورز لیزوزیم گلیکوزیله شده با دکستران، ستون شماره ۱: لیزوزیم شاهد، ستون شماره ۲: لیزوزیم کانژوگه شده با دکستران با ۱/۵ دقیقه حرارت دهی مایکروویو، ستون شماره ۳: لیزوزیم کانژوگه شده با دکستران با ۳ دقیقه حرارت دهی مایکروویو، ستون شماره ٤: لیزوزیم کانژوگه شده با دکستران با ٤/٥ دقیقه حرارت دهی مایکروویو

۳-۲- تعیین درصد کانژوگه شدن

میزان یا پیشرفت گلیکوزیله شدن لیزوزیم با مالتودکسترین در زمان های مختلف حرارت دهی مایکروویو با اندازه گیری مقادیر گروه های آمینی آزاد پروتئین تعیین می شود. همان طور که در شکل ۲ مشاهده می شود، با افزایش حرارت دهی مایکروویو درصد کانژوگه شدن افزایش یافته، بدین معنی که در این شرایط گروه های آمینی آزاد قابل اندازه گیری با این روش، با مالتودکسترین واکنش داده و گلیکوکانژوگه ها را تولید می کند. اندازه گیری مقادیر گروه های آزاد آمینی به روش OPA شاهد و تأییدی بر نتایج حاصل از الگوی الکتروفورز ذکر شده در بخش قبل می باشد [۱۹ و ۲۲]. گوان و همکاران (۲۰۰۶) با تشکیل کانژوگه های پروتئین های سویا و قند های مختلف با استفاده از حرارت دهی مایکروویو نتایج مشابهی مبنی بر کاهش مقادیر گروه های آمینی آزاد گزارش کردند.

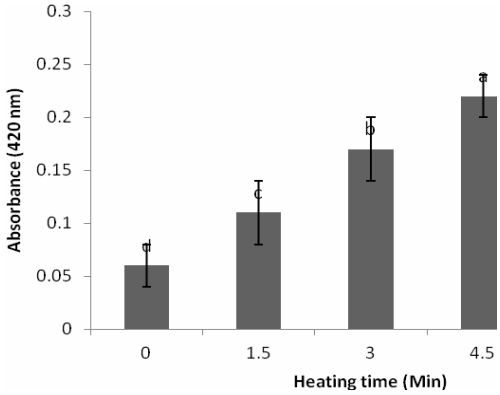


شکل ۲ درصد کانژوگه شدن لیزوزیم در زمان های مختلف حرارت دهی مایکروویو(هر ستون نمایانگر میانگین ±انحراف معیار برای سه تکرار می باشد)

۳-۳- شدت قهوه ای شدن

نتایج حاصل از اندازه گیری شدت قهوه ای شدن در شکل ۳ نشان داده شده است. از همان ابتدای قرارگیری نمونه ها در مایکروویو رنگ قهوه ای شروع به پدیدار شدن می کند که نشان می دهد واکنش مایلارد در همان زمان های کوتاه اولیه صورت می پذیرد که بدلیل واکنش بین گروه های آمینی آزاد پروتئین ها و انتهای احیا کننده کربوهیدرات می باشد. با افزایش زمان حرارت دهی مایکروویو شدت قهوه ای شدن افزایش می یابد. لی و همکاران (۲۰۱۳ و ۲۰۰۹) نتایج مشابهی مبنی بر رابطه بین افزایش میزان قهوه ای شدن و تشکیل کانژوگه ها ارائه کردند. موپالا و همکاران (۲۰۱۲) با کانژوگه

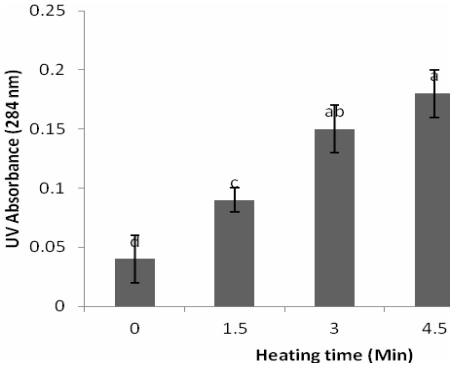
کردن نیسین و کربوهیدرات های مختلف با استفاده از پرتودهی گاما گزارش کردند با افزایش میزان کانژوگه شدن، شدت قهوه ای شدن نیز افزایش میابد [۱۹، ۲۲ و ۲۳].



شکل ۳ شدت قهوه ای شدن لیزوزیم در زمان های مختلف حرارت دهی مایکروویو(هر ستون نمایانگر میانگین ±انحراف معیار برای سه تکرار می باشد)

۳-٤- تغییرات میزان جذب UV

یکی دیگر از راه های تشخیص کانژوگه شدن تعیین میزان جذب در طول موج ناحیه UV می باشد و ترکیبات حد واسط حاصل از واکنش مایلارد از جمله دی و پلی کربونیل جذب بالایی در این ناحیه دارند [۲۰، ۲۳ و ۲٤]. مطابق نتایج شکل ٤ با افزایش زمان حرارت دهی مایکروویو میزان جذب در این ناحیه افزایش یافته که تأییدی بر تشکیل کانژوگه های حاصل از واکنش مایلارد می باشد. آجاندوز و همکاران (۲۰۰۸) با کانژوگه کردن گلوکز و پروتئین های سرم آلبومین گاوی و کازئین، لرتیتیکول و همکاران (۲۰۰۷) با کانژوگه کردن پروتئین پورسین پلاسما با گلوکز و موپالا و همکاران (۲۰۱۲) با کانژوگه کردن نیسین و منابع قندی مختلف با استفاده از پرتودهی گاما نتایج مشابهی مبنی بر افزایش میزان جذب در ناحیه UV گزارش کردند.

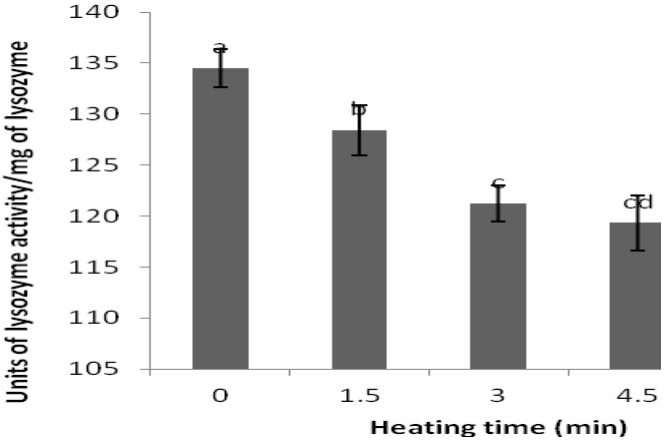


شکل ٤ مقادیر جذب لیزوزیم و کانژوگه ها در زمان های مختاف حرارت دهی مایکروویو(هر ستون نمایانگر میانگین ±انحراف معیار برای سه تکرار می باشد)

۳-۵- تعیین فعالیت آنزیمی لیزوزیم

نتایج حاصل از اندازه گیری فعالیت آنزیمی (شکل ۵) نشان می دهد کانژوگه شدن موجب کاهش فعالیت آنزیمی می گردد. امینلاری و همکاران (۲۰۰۵)، گزارش کردند که گلیکوزیله کردن[1] 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. امیری و همکاران (۲۰۰۷) با تولید کانژوگه دکستران -لیزوزیم گزارش کردند فعالیت آنزیمی نیز با کانژوگه شدن کاهش یافت بعلاوه کانژوگه های حاصل اثر ضد میکروبی خوبی بر اشریشیاکلی[2] در مقایسه با آنزیم اصلاح نشده دارد، در حالیکه بر استافیلوکوکوس اورئوس[3] نسبت به آنزیم اصلاح نشده تفاوت معنی داری ندارد. نتایج مشاهده شده در این بخش نیز تأییدی بر کانژوگه شدن لیزوزیم و مالتودکسترین با استفاده از حرارت دهی مایکروویو می باشد.

1. Glycosylation
2. *Escherichia coli*
3. *Staphylococcus aureus*



شکل ۵ فعالیت آنزیمی لیزوزیم و کانژوگه ها در زمان های مختلف حرارت دهی مایکروویو(هر ستون نمایانگر میانگین ±انحراف معیار برای سه تکرار می باشد)

٤- نتیجه گیری

در این مطالعه کانژوگه های لیزوزیم و مالتودکسترین با استفاده از حرارت دهی مایکروویو تهیه شد. نتایج الکتروفورز تشکیل کانژوگه ها را نشان داد. با اندازه گیری میزان گروه های آمینی درصد کانژوگه شدن در نمونه های مختلف در مقایسه با لیزوزیم شاهد مشخص گردید. اندازه گیری میزان تغییرات رنگی، افزایش شدت قهوه ای شدن را نشان داد. با افزایش کانژوگه شدن میزان جذب در ناحیه UV افزایش یافت. فعالیت آنزیمی نیز با کانژوگه شدن کاهش یافت. نتایج امکان تشکیل کانژوگه های لیزوزیم- مالتودکسترین در زمان کوتاه با استفاده از حرارت دهی مایکروویو را تأیید می کند.

٥- منابع

[1] Wang, L. and Weller, C.L., 2006, Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. Trends in Food Science and Technology, 17: 300-312.

[2] Zhang, H. F., Yang, X. H. and Wang, Y. 2011, Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: Current status and future directions. Trends in Food Science and amp; Technology, 22: 672-688.

[3] Kato, A. Shimokawa, K. and Kobayashi, K. 1991. Improvement of the functional properties of insoluble gluten by pronase digestion followed by dextran conjugation. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 39: 1053-1058.

[4] 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.

[5] 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.

[6] 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.

[7] 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.

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

[9] Chronakis, L. 1998. On the Molecular Characteristics, Compositional Properties, and Structural-Functional Mechanisms of Maltodextrins. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 38: 599-673.

[10] Carvalho, J, Gonc alves, C, Gil, A. M, Gama, F. M, 2007, Production and characterization of a new dextrin based hydrogel, European Polymer Journal, 43: 3050–3059.

[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] 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.

[14] 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.

[15] 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.

[16] 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.

[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] Li, Y., Lu, F, Luo, C, Chen, Z, Mao, J, Shoemaker, C, Zhong, F, 2009, Functional properties of the Maillard reaction products of rice protein with sugar, Food Chemistry, 117, 69–74

[20] 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

[21] Imoto, T., and Yagishita, K. 1971, A simple activity measurement of lysozyme. Agricultural and Biological Chemistry, 35: 1154- 1156.

[22] Li, Y, Zhong, F, Ji, W, Yokoyama, W, Shoemaker, C. F, Zhu, S, Xia, W, 2013, Functional properties of Maillard reaction products of rice protein hydrolysates with mono, oligo and polysaccharides, Food Hydrocolloids, 30: 53-60.

[23] Muppalla, S. R, Sonavale, R, Chawla, S. P, Sharma, A, 2012, Radiation Physics and Chemistry, 81: 1917-1922.

[24] Ajandouz, E, Desseaux, V, Tazi, S. and Puigserver, A, 2008, Effects of temperature and pH on the kinetics of caramelisation,protein cross-linking and Maillard reactions in aqueous model systems, Food Chemistry, 107: 1244–1252

Effect of microwave treatment on glycation extent of lysozyme-maltodextrin maillard conjugates

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

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: 93/11/18 Accepted: 94/2/13)

Lysozyme- maltodextrin conjugates were prepared by microwave heating of the mixtures at different times. The formation of the protein- polysaccharide conjugates was confirmed by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis, free amino group content, browning intensity and UV absorbance measurement and determination enzyme activity. SDS-PAGE profile showed that lysozyme–maltodextrin conjugates were formed. The results of free amino group content indicated that increasing microwave heating time caused an increased in glycation degree. Browning and intermediate maillard products, as monitored by absorbance at 420 nm and absorbance at 294 nm, sharply increased compared to control sample. Enzymatic activity of glycosylated lysozymes were reduced compared with unmodified lysozyme. Significant changes in browning intensity, free amino group content and SDS-PAGE profile indicated that lysozyme–maltodextrin conjugates were successfully formed using microwave heating treatment. Moreover, higher microwave heating intensity enhanced the extent of glycosylation. All data showed that microwave heating treatment could be an effective and promising method for linking polysaccharides to proteins.

Key words: Glycation, Lysozyme, Microwave treatment, Maltodextrin

* Corresponding Author E-Mail Address: Boostani.sareh@yahoo.com