بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی و عملکردی لیزوزیم اصلاح شده با تراگاکانتین

رویا کشنی[۱*]، محمود امین لاری[۲]، مهرداد نیاکوثری[۳]، عسگر فرحناکی[۳]، غلامرضا مصباحی[۴]

۱- بخش علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
۲- استاد بخش علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، و بخش بیوشیمی ، دانشکده دامپزشکی ، دانشگاه شیراز
۳- دانشیار بخش علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
٤- استادیار بخش علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

(تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۳/۸/۱۸)

چکیده

در سال های اخیر، پیشرفت هایی در بهینه کردن عملکردهای بیوکاتالیتیکی آنزیم ها صورت گرفته است. واکنش های بین آنزیم ها و ماکروملکول ها نقش مهمی در پایداری ساختار و عملکرد آنزیم ها دارد. لیزوزیم آنزیمی است که هیدرولیز باندهای (٤-۱) ß میان N-استیل مورامیک اسید و N-استیل گلوکز آمین موجود در ساختار دیواره سلولی باکتری ها را کاتالیز می کند. کتیرا به عنوان یکی از پلیمرهای آلی مترشحه از نوعی گیاه تیره گون از جمله ترکیبات مهم در داروسازی و تولید ریز مغذی های غذایی می باشد. این بیوپلیمر از دو جزء محلول و نامحلول به نام های تراگاکانتین و تراگاکانتیک اسید (باسورین) تشکیل شده است. هدف از این تحقیق اتصال تراگاکانتین (جزء محلول در آب هیدروکلوئید کتیرا) به آنزیم لیزوزیم از طریق واکنش میلارد است. اتصال کووالانسی این هیدروکلوئید به لیزوزیم با روش های الکتروفورز SDS-PAGE و کروماتوگرافی تبادل یون تایید گردید. آنالیزهای بررسی خواص عملکردی کانژوگه ی به دست آمده بهبود حلالیت، فعالیت امولسیون کنندگی و کف کنندگی را نشان داد. همچنین پایداری حرارتی لیزوزیم در این نمونه ها افزایش یافت. بنابر نتایج این تحقیق اتصال لیزوزیم با تراگاکانتین می تواند کاربرد این هیدروکلوئید را به یک ترکیب عملگر و لیزوزیم را به عنوان یک ترکیب ضدمیکروبی طبیعی در صنایع غذایی و دارویی افزایش دهد.

کلید واژگان: لیزوزیم، تراگاکانتین، واکنش میلارد، خواص عملکردی، پایداری حرارتی

* مسئول مکاتبات: Roya.Koshani@yahoo.com

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-18]

۱- مقدمه

آنزیم لیزوزیم یک N-استیل موراموئیل هیدرولاز[1] (EC 3.2.1.17)است که اغلب تحت عنوان مورامیداز نامیده می شود.این آنزیم یک ضد میکروب طبیعی است که سوبسترای طبیعی آن ترکیب اصلی دیواره سلولی باکتری ها یعنی پپتیدوگلیکان (که تحت عنوان مورین[2] نیز نامیده می شود) است [۱و۲]. نقش ضد میکروبی لیزوزیم بر دیواره سلولی باکتری ها موجب کاربرد گسترده این ترکیب در صنایع مختلف غذایی، داروسازی، پزشکی و آرایشی گردیده است [۳]. در صنایع داروسازی برای ساخت اسپری های[3] بکار رفته در درمان بیماری های ریوی[4]، پیشگیری از فساد دندان[5] و حفاظت از بافت بینی[6] بکار می رود. همچنین در تهیه محلول های نیمه جامد[7] و کرمهای پوستی جهت درمان زخم[8]، سوختگی[9] و ترمیم پوست[10] کاربرد دارد. در صنایع بسته بندی مواد غذایی از لیزوزیم برای تهیه فیلم های ضد میکروبی جهت توسعه ماندگاری غذاهایی که حداقل میزان فرآیند را دیده اند استفاده می شود. تثبیت لیزوزیم در فیلم های ساخته شده از کیتوزان، سیلیکاژل و پلی استایرین مثال هایی از این مورد می باشد. همچنین این آنزیم می تواند به عنوان یک نگهدارنده طبیعی برای توسعه ماندگاری مواد غذایی نظیر گوشت و محصولات گوشتی، پنیر، غذاهای دریایی، سبزیجات، میوه جات استفاده می شود [٤]. تشدید فعالیت ضدمیکروبی این ترکیب به همراه بهبود خواص عملکردی، لیزوزیم را به یک افزودنی بسیار ایده آل که کاربرد وسیعی در صنایع غذایی گوناگون تحت شرایط مختلف دارد مبدل ساخته است [۵و٦].

از طرفی هیدروکلوئید کتیرا از جمله مهمترین صمغ های گیاهی است که از گیاه گون Astragalus gummifer تراوش می شود و به عنوان یک هیدروکلوئید با کیفیت، در فهرست GRAS[11] قرار دارد [۷]. این بیوپلیمر از دو جزء محلول و نامحلول به نام های تراگاکانتین و تراگاکانتیک اسید (باسورین) تشکیل شده است. تراگاکانتین یک ترکیب پلی ساکاریدی خنثی است که به صورت آرابینوگالاکتان بسیار شاخه ای می باشد که در آن قند غالب ال- آرابینوز می باشد. ساختار تراگاکانتین از یک هسته متشکل از عوامل د- گالاکتوز می باشد که شاخه های بسیار منشعب ال-آرابینوز به آن متصل شده اند و شکل ملکولی کروی ایجاد میکند. این بخش محلول در آب است که بعلت ساختمان پلی ساکاریدی ویژه ای که دارد به شدت هیدروفیل می باشد و باعث ایجاد یک محلول کلوئید آبی می شود [۸].

یک روش مؤثر برای بهبود خواص عملکردی پروتئینها، که نیازی به کاتالیز شیمیایی هم ندارد و به برهمکنش پروتئین‌ها با پلی‌ساکاریدها تکیه دارد، واکنش میلارد است [۹]. در طی این واکنش کونژوگه شدن ترکیبات پروتئین- پلی‌ساکارید بین گروه آمینی در پروتئین و گروه کربونیل احیاکننده انتهایی در پلی-ساکارید، در شرایط کنترل شده دما و رطوبت نسبی و در محیط خشک انجام می‌شود.

هدف از این پژوهش تولید یک بیوپلیمر عملگرا، متشکل از آنزیم لیزوزیم با هیدروکلوئید تراگاکانتین از طریق واکنش میلارد می باشد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- آماده سازی کتیرا

کتیرای نواری مرغوب از گیاهان گون در حال رشد از نواحی جنوب غربی ایران جمع آوری شد. نمونه های جمع آوری شده با استفاده از آسیاب پودر شد و برای دستیابی به ذرات با اندازه یکسان از الک های با مش سایزهای مختلف، پودرهای بین ۲۰۰ تا ۵۰۰ میکرون به دست آمد.

۲-۲- جداسازی و اندازه گیری جزء محلول کتیرا و خشک کردن با استفاده از خشک کن پاششی

پودر کتیرا را به مقدار ۱ گرم با ۱ میلی لیتر اتانول مخلوط کرده تا پودر خیس شد، سپس ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر به آن اضافه کرده (محلول ۰/۵ درصد) و محلول حاصل به مدت یک شبانه روز در دمای ۳-۱ درجه سانتی گراد همراه با همزدن به منظور هیدراته شدن کامل نگهداری شد. برای جداسازی دو بخش کتیرا، از سانتریفیوژ با دور ٤٥۰۰rpm به مدت ۳ ساعت استفاده گردید (۱۰). جهت تولید مقرون به صرفه تراگاکانتین

1. N-acetylmuramoyl hydrolase
2. Murein
3. Aerosol
4. Bronchopulmonary
5. Dental care
6. Nasal tissue protection
7. Lotions
8. Inflamentation
9. Burning
10. Skin reparation
11. Generally Recognized As Safe

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-18]

به صورت پودر، محلول رویی کتیرای سانتریفیوژ شده با خشک کن پاششی آزمایشگاهی شرکت مهام صنعت ایران- نیشابور ، خشک گردید.

۲-۳- کانژوگه کردن لیزوزیم با تراگاکانتین در pH= ۸/۵ در حالت پودر لیوفیلیزه شده و در زمان های مختلف نگهداری در دمای ۶۰ °C

۴۰۰ میلی گرم ترگاکانتین در ۱۰ میلی لیتر بافر فسفات سدیم ۰/۰۵ مولار با pH= ۸/۵ به مدت ۱ ساعت دمای محیط حل شدند، سپس ۱۰۰ میلی گرم لیزوزیم که در ۲ میلی لیتر بافر فسفات حل شده به آن اضافه شد، محلول های آماده شده ی ترکیب لیزوزیم و هیدروکلوئید به شش قسمت مساوی تقسیم گردید و سپس لیوفیلیزه شد. نمونه پودرهای آماده شده به مدت ۱۰ روز در فواصل زمانی صفر، یک، دو، شش، هشت، ده روز در آون ۶۰ °C در حضور برماید پتاسیم[1] اشباع جهت تامین رطوبت نسبی ۷۹٪ قرار داده شدند [۱۱].

۲-۴- الکتروفورز نمونه ها

به منظور سنجش اتصال هیدروکلوئیدها به لیزوزیم، الکتروفورز SDS-PAGE در یک سیستم بافری ناپیوسته با استفاده از ژل پلی آکریل آمید بر طبق روش [۱۲] انجام گردید. نمونه ها با غلظت ۲ میلی گرم پروتئین در میلی لیتر آماده شدند. ژل زیرین یک ژل پلی آکریل آمید ۱۰٪ در ۱/۲M تریس بازی(pH=۸/۸) و ۰/۳٪ SDS بود. ژل روئی حاوی ۰/۳٪ آکریل آمید در ۰/۰۲۵M تریس بازی (pH=۸/۶) و ۰/۲٪ SDS بود. بافر الکترود حاوی ۰/۰۲۵M تریس بازی، ۰/۱۹۲M گلایسین، ۰/۱۵٪ SDS در pH=۸/۶ بود. الکتروفورز در جریان ۲۴ میلی آمپر انجام شد و ژل به وسیله کوماسی بریلیانت بلو آر-۲۵۰ در متانول ۵۰٪ رنگ آمیزی شد و سپس با اسید استیک ۱۰٪ در متانول ۷٪ رنگبری شد.

۲-۵- انجام کروماتوگرافی به روش تبادل کاتیونی در نمونه لیزوزیم

در این روش از رزین تبادل کاتیونی CM-25 برای بررسی میزان گلیکوزیله شدن و همچنین جداسازی لیزوزیم گلیکوزیله شده از لیزوزیم اصلاح نشده استفاده گردید. کروماتوگرافی بر اساس رفرانس ۶ با تغییرات جزئی انجام گردید [۶].

۲-۶- تعیین پایداری حرارتی با روش گرماسنجی پویشی تفاضلی (Differential Scanning Calirometry)

برای تعیین میزان پایداری حرارتی آنزیم لیزوزیم و کانژوگه ی لیزوزیم – تراگاکانتین از دستگاه DSC (مدل DSC1 Mettler Toledo، ساخت کشور سوئیس) استفاده شد. دستگاه DSC از نظر دما و آنتالپی با ایندیوم ($T_{m,onset}$=156.6ºC, ΔH=28.45J/g) کالیبره شد. نمونه ها با غلظت ۱۰ درصد وزنی- حجمی پروتئین در بافر فسفات با pH=۷ آماده سازی شدند. یک ظرف خالی به عنوان شاهد در دستگاه قرار داده شد. سپس با استفاده از ترموگرام های به دست آمده از DSC و نرم افزار STAR^e system پیک یا دمای دناتوراسیون (T_d) و تغییرات آنتالپی (ΔH) محاسبه شدند.

۲-۷- تعیین فعالیت امولسیون کنندگی و پایداری کانژوگه‌تولید شده

فعالیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون نمونه ها براساس روش انجام شده توسط Pearce و Kinsella (۱۳) صورت پذیرفت. یک میلی لیتر روغن ذرت به ۳ میلی لیتر نمونه به غلظت ۱۰۰ میلی گرم در ۱۰۰ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار pH=۷/۴ افزوده شد و کاملا مخلوط شده و سپس با هموژنایزر با دور ثابت به مدت ۱ دقیقه در دمای محیط هموژنیزه شد. ۰/۱ میلی لیتر از امولسیون تهیه شده در فواصل زمانی ۰ تا ۱۰ دقیقه در هر دقیقه برداشته شده و ۵ میلی لیتر سدیم دودسیل سولفات ۰/۱٪ به آن اضافه شد و بلافاصله جذب نوری آنها در طول موج ۵۰۰ نانومتر تعیین شد و منحنی مربوطه بر اساس میزان جذب و مدت زمان ۱۰ دقیقه رسم شد و میزان جذب در زمان صفر به عنوان فعالیت امولسیون کنندگی در نظر گرفته شد. پایداری امولسیون تشکیل شده نیز با تعیین مدت زمانی که طول می کشد تا میزان کدورت به نصف کاهش یابد محاسبه شد.

۲-۸- تعیین ظرفیت کف کنندگی و پایداری کف

مقداری از نمونه ها که حاوی ۳ گرم پروتئین بود در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد. مخلوط حاصل در مخلوط کن با سرعت بالا برای ۳ دقیقه مخلوط شد. مخلوط حاصل در یک

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-18]

استوانه ۲۵۰ میلی لیتری ریخته شد و حجم کل اندازه گیری شد. بعد از ۳۰ ثانیه دوباره حجم خوانده شد و اختلاف بین دو حجم برابر با ظرفیت کف کنندگی است. پایداری کف برابر با افت حجم در مدت ۳۰ دقیقه است [۱٤].

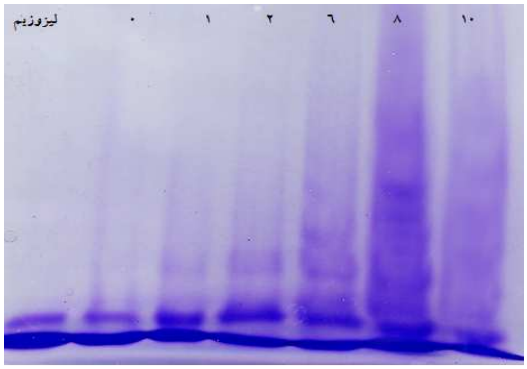
۲-۹- تجزیه و تحلیل آماری داده ها

برای انجام آنالیز داده ها و بررسی اطلاعات به دست آمده از آزمون های مختلف از طرح کاملا تصادفی استفاده شد. به منظور تعیین اختلاف بین میانگین اعداد (سه تکرار برای هر آزمایش)، پس از آنالیز واریانس[12] از آزمون چند دامنه ای دانکن[13] در سطح ($P<۰/۰۵$) استفاده گردید. در تمام مراحل، تجزیه و تحلیل آماری داده ها با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 صورت گرفت.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- تاثیر شرایط گلیکوزیله کردن آنزیم با هیدروکلوییدهای تراگاکانتین بر الگوی الکتروفورتیکی آنها

شکل ۱ الگوی الکتروفورز بر روی ژل پلی آکریل آمید ۱۰٪ نمونه های لیزوزیم کانژوگه شده با تراگاکانتین در حالت پودر لیوفیلیزه شده در زمان های مختلف شامل ۰، ۱، ۲، ٦، ۸، ۱۰ روز نگهداری در دمای ٦۰°C و pH =۸/۵ در مقایسه با ترکیب لیزوزیم حرارت ندیده نشان می دهد.



شکل ۱ الگوی الکتروفورز لیزوزیم کانژوگه شده با هیدروکلوئید تراگاکانتین (با نسبت وزنی ۱:٤) در pH=۸/۵ و زمان های مختلف بر روی ژل پلی آکریل آمید ۱۰ درصد

از آنجا که قهوه ای شدن غیر آنزیمی میلارد به میزان زیادی به فاکتورهای زمان، pH، فعالیت آبی وغلظت اجزای شرکت کننده در واکنش بستگی دارد، بنابراین در این تحقیق تاثیر زمان های مختلف انکوباسیون بر میزان کانژوگه شدن لیزوزیم با تراگاکانتین از طریق واکنش میلارد مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد که با افزایش زمان واکنش میلارد از صفر تا ده روز، گستردگی باند های پروتئینی افزایش می یابد. همانطور که در شکل ۱ مشاهده می گردد که با افزایش زمان گرمخانه گذاری باند پروتئینی گسترده تر شده است و در واقع دامنه گستردگی وزن ملکولی بیشتر شده است، در حالیکه در ستون شماره ۱و۲ باند باریکتر و کم رنگ تری دیده می شود.

نتایج حاصل از تصاویر الکتروفورز تحت تاثیر زمان با گزارشات بدست آمده از سایر محققین مطابقت دارد. امین لاری و همکاران (۲۰۰۵) [۵] گزارش کردند که با افزایش زمان واکنش میلارد به منظور اصلاح لیزوزیم با دکستران از زمان صفر تا یک هفته شدت باند ها کاهش یافته و گستردگی باند ها با افزایش زمان گرمخانه گذاری افزایش می یابد. Yadav و همکاران (۲۰۱۲) [۱۵] کانژوگه های پروتئین شیر و صمغ فیبر ذرت در شرایط میلارد تهیه کردند. با توجه به الگوی الکتروفورز، یک روند کاهش تدریجی در باندهای پروتئینی با افزایش زمان گرمخانه گذاری (۲، ۳ و ۷ روز) در دمای ٦۰ درجه سانتی گراد مشاهده کردند. آنها دریافتند که ۷ روز گرمخانه گذاری تحت این شرایط برای تشکیل کانژوگه ها کافی است. Miralles و همکاران (۲۰۰۷) [۱٦] گزارش کردند که با افزایش زمان حرارت دهی از ۰/۵ تا ۷ روز بمنظور اصلاح بتا-لاکتوگلوبین با کیتوزان شدت باندها افزایش می یابد که بدلیل تشکیل ترکیبات با وزن مولکولی بالاتری می باشد و باند مربوط به بتا-لاکتوگلوبولین با گذشت زمان کمرنگ تر و محو می شود. آنالیز تصویر الکتروفورز (شکل ۱) نشان می دهد که بیشترین تغییرات در طی ۸ روز گرمخانه گذاری در دمای ٦۰ درجه سانتی گراد و pH=۸/۵ رخ می دهد و بیشترین تعداد باند های پروتئینی لیزوزیم در واکنش شرکت می کنند (نمونه اپتیمم).

لازم به ذکر است که دلیل واضح دیده نشدن دایمرهای لیزوزیم و سایر باندهای مربوط به کانژوگه شدن، تا حدودی مربوط به ماهیت هیدروکلوئید تراگاکانتین و به خصوص ویسکوزیته

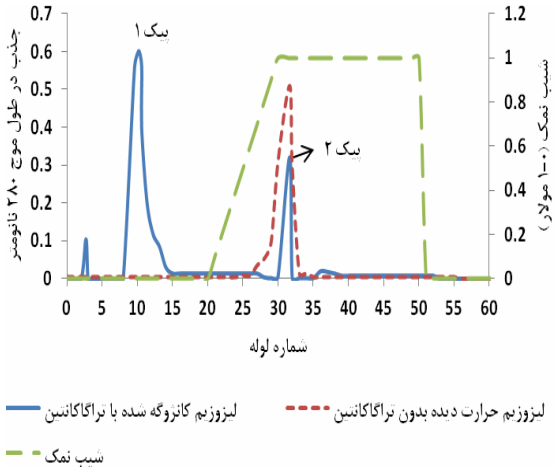
12. Analysis of variance
13. Test Multiple Range Duncans

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-18]

بالای این هیدروکلوئید است، که مانع حرکت الکتروفورتیکی معمول و ایده آل گانژوکه ها شده است.

۳-۲- تاثیرکانژوگه شدن شدن لیزوزیم با هیدروکلوئید تراگاکانتین بر رفتار کروماتوگرافی تبادل یونی

شکل ۲ کروماتوگرام حاصل از کروماتوگرافی به روش تبادل یونی در ستون CM-25 برای نمونه های لیزوزیم بدون تراگاکانتین و لیزوزیم کانژوگه شده با تراگاکانتین به نسبت وزنی ۱ به ٤ و نگهداری شده در دمای ٦٠°C به مدت ۸ روز را نشان می دهد. در این روش لیزوزیم که بار مثبت دارد به ذرات ستون CM-25 که گروه کربوکسیل منفی دارد متصل می شود.



شکل ۲ کروماتوگرام حاصل از کروماتوگرافی به روش تبادل یون در نمونه های لیزوزیم کانژوگه نشده و لیزوزیم کانژوگه شده با هیدروکلوئید تراگاکانتین بر روی رزین CM-25 (نسبت وزنی ٤:۱، دمای ٦٠°C به مدت ۸ روز در رطوبت نسبی ۷۹٪)

اندازه ستون: (۵×۱۰ سانتیمتر)، بافر مورد استفاده: استات آمونیوم ۰/۰۵ مولار با pH=٦، سرعت جریان بافر: ۰/۵ میلی لیتر در دقیقه، مقدار نمونه:۵۰ میلی گرم کانژوگه لیزوزیم- تراگاکانتین در ۳ میلی لیتر بافر فسفات سدیم ۰/۰۵ مولار pH=۸/۵ ، ۱۰ میلی گرم لیزوزیم کانژوگه نشده در ۱ میلی لیتر بافر فسفات سدیم ۰/۰۵ مولار pH=۸/۵

همانطور که در منحنی مربوط به لیزوزیم تنها مشاهده می شود تا لوله ۲٦ هیچ جذبی در طول موج ۲۸۰ نانومتر دیده نمی شود و از لوله ۲٦ به بعد، با افزودن کلرور سدیم ۱ مولار به صورت گرادیانت، میزان جذب با سرعت کمی افزایش یافته به طوریکه قله منحنی در لوله های شماره ۳۱ و ۳۲ حاصل شده است. در حالیکه در منحنی مربوط به لیزوزیم کانژوگه شده با تراگاکانتین با اعمال شرایط یکسان از نظر نوع بافر مورد استفاده، غلظت و pH آن، ارتفاع و قطر ستون و افزودن کلرور سدیم ۱ مولار به صورت گرادیانت در همان نقطه ، جدا شدن لیزوزیم از لوله شماره ۳۰ شروع شد و قله منحنی در لوله شماره ۳۱ حاصل شد که گستردگی کمتری نسبت به قله منحنی لیزوزیم تنها دارد. اتصال هیدروکلوئید تراگاکانتین به لیزوزیم و خنثی شدن بار ترکیب (لیزوزیم بار مثبت و تراگاکانتین بار منفی) باعث شده است که کانژوگه لیزوزیم- تراگاکانتین از ستون تبادل یون CM-25 بدون جذب شدن به ذرات رزین های با بار منفی، در حجم های اولیه خارج شود (پیک ۱) و لیزوزیم دست نخورده که وارد واکنش نشده، دارای بار مثبت است، در هنگام تزریق کانژوگه روی ستون جذب ذرات رزین شده با بار منفی شده و در جریان عبور بافر دیرتر خارج می شود (پیک ۲).

۳-۳- تعیین پایداری حرارتی با روش گرماسنجی پویشی افتراقی برای نمونه های لیزوزیم کانژوگه شده با تراگاکانتین در pH=۸/۵ و دمای ٦٠°C به مدت ۸ روز در حالت پودر لیوفیلیزه

گرماسنجی پویشی افتراقی[14] می تواند مستقیما تغییرات حرارتی که طی افزایش یا کاهش کنترل شده ی دما در گلیکوکانژوگه ها رخ می دهد را اندازه گیری کند. برای مثال آنتالپی مربوط به بازشدگی[15] در اثر حرارت را اندازه می گیرد زیرا کلیگوکانژوگه ها در محلول در حال تعادل بین ساختار طبیعی (پیچ خورده) و حالت دناتوره شده (باز شده) آن هستند. بالا بودن نقطه میانی انتقال حرارتی ($T_{midpoint}$) نشان دهنده ی مقاوم بودن ساختار (عمدتا ساختار چهارم) است. عموما گلیکوزیله باعث افزایش دمای دناتوره (T_d) و کاهش آنتالپی (ΔH) می شود که این نشان از بازشدگی و تجمع[16] پروتئین هاست. بنابراین در نتیجه گلیکوزیله شدن افزایشی در پایداری حرارتی یا پایداری ساختار چهارم خواهیم داشت. اخیرا جهت بررسی ویژگی های حرارتی کمپلکس های پروتئین- کربوهیدرات به طور گسترده ای از گرماسنجی پویشی افتراقی استفاده می شود[۱۷]. به طور کلی ویژگی های ساختاری و عملکردی پروتئین ها در اثر تیمارهای حرارتی می تواند تحت تاثیر قرار گیرد، که اغلب از

14. Differential Scanning Calorimetry
15. Unfolding
16. Aggregate

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-18]

طریق تخریب بعضی پیوندها یا نیروهای پایدارکننده ساختار پروتئین از جمله پیوندهای هیدروژنی، دی سولفیدی، نیروهای هیدروفوبیک و الکترواستاتیکی، باعث دناتوراسیون ساختارهای طبیعی می شود.

جدول ۱ تغییرات پارامترهای مربوط به گرماسنجی افتراقی را در نمونه های کانژوگه لیزوزیم- تراگاکانتین که تحت دمای ۶۰ درجه به مدت ۸ روز کانژوگه شده اند، به همراه نمونه لیزوزیم طبیعی نشان می دهد. دمای دناتوره شده در نمونه های کانژوگه شده در مقایسه با لیزوزیم طبیعی با اختلاف معنی داری (α<۰/۰۵) افزایش یافته است.

دمای دناتوراسیون لیزوزیم طبیعی ۶۷/۰۹ درجه سانتی گراد است. از آنجا که دمای دناتوراسیون در یک پروتئین کروی با پایداری حرارتی در ارتباط است. بنابراین پایداری حرارتی لیزوزیم به طور قابل ملاحضه ای طی کانژوگه شدن با هیدروکلوئید تراگاکانتین افزایش یافت (α< ۰/۰۵). که این افزایش پایداری در تطابق با کارهای Wang و همکاران (۲۰۰۶) (۱۸) کانژوگه گلوتن گندم هیدولیز شده- کاراگینان، Medrano و همکاران (۲۰۰۹) [۱۹] کانژوگه بتالاکتوگلوبولین- گلوکز و لاکتوز، Rodriguez Furlán و همکاران (۲۰۱۲) [۲۰] در مخلوط پروتئین پلاسمای گاوی با اینولین، گلوکز و لاکتوز، است.

این افزایش دما در کانژوگه لیزوزیم- تراگاکانتین نسبت به لیزوزیم طبیعی به ترتیب ۶/۳۵ درجه سانتی گراد می باشد.

جدول ۱ دمای دناتوره شدن و آنتالپی دناتوره شدن کانژوگه لیزوزیم- تراگاکانتین (۴:۱) در pH =۸/۵ طی نگهداری در ۸ روز در دمای ۶۰°C در حالت پودر لیوفیلیزه

نمونه	دمای دناتوره شدن (°C)			آنتالپی (گرم/ژول)
	دمای ابتدایی	دمای پیک	دمای پایانی	
لیزوزیم	۶۰/۰۸*^{b}(±۰/۱۲)	۶۷/۰۹^{b}(±۰/۰۴)	۷۵/۷۸^{b}(±۰/۲۴)	۹/۷۶^{a}(±۲/۶۲)
کانژوگه لیزوزیم- تراگاکانتین	۶۳/۹۲^{a}(±۰/۰۹)	۷۳/۴۴^{a}(±۰/۳۱)	۸۱/۹۲^{a}(±۰/۰۹)	۵/۰۹^{b}(±۰/۹۸)

*اعداد نشان داده شده میانگین سه تکرار می باشند (±SD).

** حروف کوچک متفاوت در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار (α<۰/۰۵) است.

دمای دناتوره شدن بالاتر، گویای افزایش پایداری حرارتی پروتئین ها یا پایداری ساختار سوم در حالت گلیکولیزه شده در مقایسه با شاهد می باشد، گلیکولیزه شدن یا اتصال آمینی گلایکان[17] به پروتئین (تشکیل گلیکو پروتئین) باعث افزایش هیدروفوبیسیتی سطحی و بار خالص پروتئین شده بنابراین ساختار سوم پایدارتری را بوجود می آورد [۱۷،۱۸،۱۹،۲۱،۲۲،۲۳،۲۴]. با اتصال کووالانسی پلی ساکارید هیدروفیل و باردار به پروتئین، اتصالات هیدروژنی و نیز الکتروستاتیک در ساختار سوم پروتئین بیشتر شده و در نتیجه دمای دناتوراسیون افزایش می یابد. ملکول های هیدروکلوئیدها با قرار گرفتن بین ملکول های پروتئین و افزایش اتصالات[18] با توجه به موقعیت پیوندها، چرخش اسیدهای آمینه لیزوزیم در اطراف پیوند C-N را با یک ممانعت یا فشار فضایی روبه رو می کند و آنها فقط در محدوده خاصی می توانند این چرخش را انجام دهند، بنابراین ساختار پروتئین تحت تاثیر حرارت یا عوامل دناتوره کننده نمی تواند به راحتی از نظر شکل یا ساختار تغییر کند و از طرفی با اشغال جایگاه های اتصالات هیدروفوبیک[19] روی سطح لیزوزیم از تجمع این پروتئین محافظت می کند [۱۷]. پارامتر دیگری که در بررسی پایداری حرارتی مورد توجه قرار می گیرد، تغییرات آنتالپی (ΔH) است که در کانژوگه ها پایین تر از لیزوزیم است. آنتالپی لیزوزیم ۹/۷۶ گرم بر ژول گزارش شده است. آنتالپی لیزوزیم کانژوگه شده با هیدروکلوئیدهای تراگاکانتین نسبت به لیزوزیم طبیعی ۴۷/۸۵ درصد کاهش یافته است. تجمع و تخریب نیروهای هیدروفوبیک در اثر حرارت از نوع واکنش های اگزوترمیک است و می تواند دلیل کاهش آنتالپی کانژوگه نسبت به لیزوزیم طبیعی باشد [۲۵]. همچنین ایجاد اتصالات عرضی[20] بین لیزوزیم و هیدروکلوئیدها از نوع اگزوترمیک (حرارت زا) است که این موضوع هم می تواند دلیل دیگری برای کاهش آنتالپی باشد. کاهش آنتالپی در نمونه گلیکولیزه شده در مقایسه با شاهد نشان از دناتوره شدن جزئی ساختار سوم/چهارم در طول گلیکولیزه شدن می باشد. آنتالپی دناتوره شدن در نمونه های تیمار شده با گلوکز، به خصوص نسبت مولی بالای پروتئین: گلوکز (۱:۱۰۰)، به طور قابل ملاحضه ای کاهش یافت چیزی

17. N- linked glycans
18. Spacers
19. blocking the hydrophobic binding sites
20. Cross-linking

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-18]

که می تواند به بازشدگی و توده ای شدن ساختار بتالاکتوگلوبولین ارتباط داشته باشد [۱۹]. Hattori و همکاران (۱۹۹٤) [۲٦] مشاهده کردند که آنتالپی برای کانژوگه بتالاکتوگلوبولین- کربوکسی متیل دکستران در مقایسه با بتالاکتوگلوبولین طبیعی ٤۰ درصد کاهش یافته است، آنها توضیح دادند علت این میزان کاهش آنتالپی مربوط به کاهش محتوای ساختار از جمله آلفا هلیکس است. بعلاوه Chevalier و همکاران در سال (۲۰۰۲) [۲۷] زمانیکه هیچ پیکی در دمانگاشت های مربوط به کانژوگه ها مشاهده نکردند، دریافتند که بتالاکتوگلوبولین طی کلیگوزیله شدن با ریبوز یا آرابینوز شدیدا دناتوره شده است. آنها افزایشی تقریبا ۱۰ درجه ای در دمای دناتورسیون بتالاکتوگلوبولین بعد از کلیگوزیله شدن با لاکتوز، رامنوز، گلوکز، گالاکتوز گزارش کردند که این نشان دهنده اثر حفاظتی گلیکوزیله شدن بر ساختار پروتئین ها است.

۳-٤- خواص امولسیفایری لیزوزیم کانژوگه شده با هیدروکلوئید تراگاکانتین (فعالیت امولسی فایری و پایداری امولسیون تشکیل شده)

جدول ۲ فعالیت امولسی فایری و پایداری امولسیون تشکیل شده را در نمونه کانژوگه لیزوزیم- تراگاکانتین به همراه نمونه لیزوزیم طبیعی نشان می دهد. فعالیت امولسی فایری و پایداری امولسیون کانژوگه در مقایسه با لیزوزیم طبیعی با اختلاف معنی داری ($\alpha<$۰/۰۵) افزایش یافته است.

جدول ۲ فعالیت امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون تشکیل شده در نمونه های لیزوزیم و کانژوگه لیزوزیم-تراگاکانتین

نمونه	فعالیت امولسی فایری (جذب در ۵۰۰ نانومتر)	پایداری امولسیون (دقیقه)
لیزوزیم	۰/۱۱۷ ^{b}(±۰/۰۱۱)	۰/۲۷ ^{b}(±۰/۰۳)
کانژوگه لیزوزیم- تراگاکانتین	۰/۷۸۲^{a}(±۰/۰۱۷)	۷/۹^{a}(±۰/۱۵)

*اعداد نشان داده شده میانگین سه تکرار می باشند (±SD).

** حروف کوچک متفاوت در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار ($\alpha<$۰/۰۵) است.

هر دو ماکرومولکول پروتئین و پلی ساکارید در پایداری امولسیون های روغن در آب نقش دارند. پروتئین ها در طول تشکیل امولسیون برای ایجاد لایه ویسکوالاستیک منسجم در سطح روغن آب جذب می شوند، در حالیکه پلی ساکاریدها از طریق تغلیظ کردن و رفتار ژل دهندگی در فاز مایع پایداری کلوئیدی ایجاد می کنند [۲۸]. تحقیقات نشان داده است که علاوه بر افزایش آبدوستی سطحی فاکتورهای دیگری نظیر قابلیت انعطاف پذیری ساختار پروتئین، بار سطحی، پایداری ساختاری، حلالیت، اندازه ملکولی نیز در پایداری امولسیون می تواند موثر باشد[۲۹،۳۰،۳۱]. همانطور که انتظار می رفت نتایج بدست آمده از فعالیت امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون حاصل از لیزوزیم طبیعی و کانژوگه لیزوزیم- هیدروکلوئید تراگاکانتین حاکی از آنست که اتصال کووالانسی هیدروکلوئیدهای نامبرده به لیزوزیم بطور قابل توجهی در بهبود فعالیت امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون لیزوزیم موثر می باشد. در واقع در کانژوگه کردن لیزوزیم با هیدروکلوئید، نیمه پروتئینی کانژوگه مولکول را در فصل مشترک آب- روغن ایجاد می کند که از تجمع یافتن آنها جلوگیری می کند. بعلاوه خود تراگاکانتین نیز دارای خاصیت امولسی فایری است که می تواند بر لیزوزیم اثر تشدید کننده[۲۱] داشته باشد. مکانیزم اصلی پایداری امولسیون توسط این ترکیب افزایش ویسکوزیته و تشکیل احتمالی یک شبکه نسبتا ضعیف در اطراف ذرات می باشد. تحقیقات Kasran و همکاران (۲۰۱۳) [۳۲] ایزوله پروتئین سویا و صمغ شنبلیله[۲۲]، Liu و همکاران (۲۰۱۲) [۱۷] ایزوله پروتئین نخود و دکستران، Yadav و همکاران (۲۰۱۰) [۱۵] در ترکیب پروتئین شیر- صمغ فیبر ذرت، Jafar Al-Hakkak و Fadia Al-Hakkak (۲۰۱۰) [۳٤] سفیده تخم مرغ و پکتین، Aminlari و همکاران (۲۰۰۵) [۵] در ترکیب لیزوزیم- دکستران نیز حاکی از آن بودند که خواص امولسی فایری پروتئین ها طی کانژوگه کردن با پلی ساکاریدها بهبود می یابد. Kim و همکاران (۲۰۰۳) [۳٦] دراصلاح کردن آلبومین سرم خون با گالاکتومانان نشان دادند که کانژوگه های آلبومین – گالاکتومانان پایداری امولسیفایری بهتری نسبت به آلبومین تنها دارند که به دلیل خواص ملکولی کانژوگه های دارای پیوند کووالان است. در واقع باند شدن کووالان پروتئین و گالاکتومانان باعث تقویت جذب به فصل مشترک روغن –

21. Synergistic
22. fenugreek

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-18]

آب و پایداری ذرات روغن از طریق لایه ویسکوالاستیک پلی ساکارید در فاز آبی می شود.

۳-۵- خواص کف کنندگی لیزویم کانژوگه شده با هیدروکلوئید تراگاکانتین (قدرت ایجاد کف و پایداری کف تشکیل شده)

کف کردن ظرفیت پروتئین ها برای تشکیل لایه های پایدار اطراف ذرات گاز در یک فاز مایع (یا نیمه جامد)، پخش و نفوذ در سطح مشترک هوا/آب می باشد. به این ترتیب، حباب ها توسط دیواره های مایع یا نیمه جامد که در یک کف پایدار حالت الاستیک دارند از یکدیگر جدا می شوند. قطر حباب کف از ۱ میکرون تا چند سانتی متر متغیر است. با توجه به اندازه حباب و ضخامت دیواره، یک کف می تواند تقریبا به فشردگی یک فاز مایع پیوسته یا تقریبا به سبکی یک فاز گازی باشد. تشکیل کف بستگی به وجود عامل ایجاد کننده کف در فاز پیوسته قبل از پراکنده شدن گاز در آن دارد. ظرفیت کف کنندگی[23] نمونه ها بر اساس اختلاف کاهش حجم مخلوط بعد از ۳۰ ثانیه و پایداری کف[24] بر اساس اختلاف حجم نمونه ها بعد از ۳۰ دقیقه بیان شد.

جدول ۳ قدرت ایجاد کف و پایداری کف تشکیل شده را در نمونه های کانژوگه لیزوزیم- تراگاکانتین به همراه لیزوزیم طبیعی نشان می دهد. ظرفیت تولید کف و پایداری کف تولید شده توسط کانژوگه لیزوزیم- تراگاکانتین در مقایسه با لیزوزیم طبیعی به طور چشمگیری افزایش یافته است که از لحاظ آماری نیز اختلاف معنی داری ($\alpha<۰/۰۵$) دیده می شود. به عنوان مثال ظرفیت تولید کف و پایداری کف ایجاد شده در لیزوزیم از ۱۲/۲۳٪ به ۷۰/۵۱٪ در کانژوگه لیزوزیم-تراگاکانتین افزایش یافته است.

جدول ۳ خصوصیات کف کنندگی در نمونه های لیزوزیم و کانژوگه لیزوزیم-تراگاکانتین

نمونه*	ظرفیت تولید کف (٪)	پایداری کف (٪)
لیزوزیم	۱۲/۲۳**^{b}(±۲/۳۳)	۳۱/۵۸^{b}(±۳/۰۳)
کانژوگه لیزوزیم- تراگاکانتین	۷۰/۵۱^{a}(±۵/۹۱)	۵۳/۹۵^{a}(±٤/۲۷)

*اعداد نشان داده شده میانگین سه تکرار می باشند (±SD).

** حروف کوچک متفاوت در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار ($\alpha<۰/۰۵$) است.

23. Foaming capacity
24. Foaming stability

Al- Hakkak, J. و Al- Hakkak, F. (۲۰۱۰) [۳٤] مشاهده کردند که کانژوگه کردن پروتئین سفیده تخم مرغ با پکتین بعلت افزایش ویسکوزیته و بهبود کشش سطحی موجب تولید حجم بیشتری از کف و افزایش پایداری کف ایجاد شده می شود، در واقع یک لایه فیلم الاستیک قوی در اثر واکنش بین پروتئین و پلی ساکارید در سطح مشترک هوا/آب تشکیل می شود. همچنین Schimitt و همکاران (۲۰۰۵) [۳۷] نیز نشان دادند که کانژوگه کردن بتالاکتوگلوبولین با صمغ عربی موجب بهبود چشمگیر خواص کف کنندگی بتالاکتوگلوبولین می شود.

نتایج بدست آمده در این تحقیق نیز نشان می دهد که پیوند کووالان ایجاد شده بین هیدروکلوئید تراگاکانتین با لیزوزیم بطور چشمگیری باعث بهبود ظرفیت کف کنندگی و پایداری کف می شود. در واقع پیوند کووالان بین لیزوزیم و هیدروکلوئید نامبرده، کانژوگه ی پروتئین – پلی ساکاریدی تولید می کند که موجب تشکیل یک لایه چسبنده اطراف حباب های گاز و ایجاد ویسکوزیته و قدرت مکانیکی کافی جهت تولید و پایداری کف می شود.

٤- نتیجه گیری کلی

به طور خلاصه می توان گفت کانژوگه کردن لیزوزیم با هیدروکلوئید تراگاکانتین (با نسبت های وزنی ۱:٤) از طریق واکنش میلارد، در دمای ٦۰ درجه سانتی گراد، در زمان های مختلف (۰، ۱، ۲، ٦، ۸ و ۱۰ روز) و در رطوبت نسبی ۷۹ درصد و pH=۸/۵ قابل انجام می باشد. نتایج آنالیزهای SDS-PAGE و کروماتوگرافی تبادل یون به خوبی اتصال میان گروه آمینی لیزوزیم و عامل کربونیل هیدروکلوئید تراگاکانتین را تایید کردند. گرماسنجی پویشی افتراقی افزایش پایداری حرارتی در کانژوگه لیزوزیم- تراگاکانتین نسبت به لیزوزیم طبیعی (٦/۳۵ درجه سانتی گراد) را نشان داد. فعالیت امولسیون کنندگی و کف کنندگی ایجاد شده توسط لیزوزیم کانژوگه شده با تراگاکانتین نسبت به لیزوزیم طبیعی افزایش یافت. در مجموع با توجه به نتایج این تحقیق پیشنهاد می شود که می توان با کانژوگه کردن لیزوزیم ها با هیدروکلوئیدها، ترکیب های آنزیمی- بیوپلیمری، با خواص فیزیکوشیمیایی و عملکردی جدید و بهبود یافته تولید کرد و بدین ترتیب کاربرد آن ها را در صنایع مختلف دارویی و غذایی افزایش داد.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-18]

۵- منابع

[1] Johnson, E.A., Larson, A.E, 2005, Lysozyme, In: Davidson, P.M., Sofos, J.N., Branen, A.L. (Eds.), Antimicrobials in Food, 3rd ed, Taylor & Francis Group, New York.

[2] Fleming, A, 1974, Personal recollections of lysozyme. In: Osserman, E.F.; Canfield, R.T.and Beychok, S (Eds.), Lysozyme. P: 3, New York, Academic Press.

[3] Datta S., Xue Q.G., Janes M.E., Losso J.N. and La Peyre J.F, 2005, Potential use of lysozyme from shell liquor of eastern oysters against bacteria causing food poisoning and food spoilage, Journal of Shellfish Research, 24, 650-653.

[4] Nakimbugwe, D., Masschalck, B., Atanassova, M., Zewdie-Bosüner, A. and Michiels, C. W, 2006, Comparison of bactericidal activity of six lysozymes at atmospheric pressure and under high hydrostatic pressure, International Journal of Food Microbiology, 108 (3), 355-363.

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

[6] Scaman, C., S. Nakai, M. 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.

[7] Anderson, D.M.W., 1989, Evidence for the safety of gum tragacanth (Asiatic Astragalus spp.) and modern criteria for evaluation of food additives, Food Additives and Contaminants, 6, 1–12.

[8] Aspinall, G. O. and Baillies, J, 1963, Gum tragacanth, Part I. The arabinogalactan, Journal of Chemical Society, 1714-1721.

[9] Jime´nez-Castan˜ o, L., Villamiel, M., Lo´ pez-Fandin˜ o., R., 2007, Glycosylation of individual whey proteins by Maillard reaction using dextran of different molecular mass, Food Hydrocolloids, 21, 433–443.

[10] Mohammadifar, M. A., Musavi, S. M., Kumarsi, A., Williams, P., 2006, Solution properties of targacanthin (water-soluble part of gum tragacanth exudate from Astragalus gossypinus), International Journal of Biological Macromolecules, 38, 31–39.

[11] Einhorn-Stoll, U., Ulbrich, M., Sever, S., Kunzek, H, 2005, Formation of milk protein-pectin conjugates with improved emulsifying properties by controlled dry heating, Food Hydrocolloids, 19, 329-340.

[12] Laemmli, U. K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature (London), 227, 680–685.

[13] Pearce, K. M., and Kinsella, J. E., 1978, Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimeric technique, Agricultural and Food Chemistry, 26, 716–723.

[14] Fernandez, Q. A.,and Macarulla, M. T., 1997, Composition and functional properties of protein isolates obtained from commercial legumes grown in northern Spain. Plant Foods for Human Nutr, 51, 331–342.

[15] Yadav, M. P., Strahan, G. D., Mukhopadhyay, S., Hotchkiss, A.T., Hicks, K. B., 2012, Formation of corn fiber gum-milk proteins conjugates and their molecular characterization, Food Hydrocolloids, 26, 326-333.

[16] Miralles, B., Martinez-Rodrigues, A., Santiago, A., Lagemaat, J., Heras, A., 2007, The occurrence of a Maillard-type protein-polysaccharide reaction between ß-lactoglobulin and chitosan, Food Chemistry, 1000, 1071-1075.

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

[18] Wang, J. S, Zhao, M. M., Yang , X. Q., Jiang,Y. M., 2006, Improvement of Emulsifying Properties of Wheat Gluten Hydrolysate/Lambda-Carrageenan Conjugates, Food Technology and Biotechnology, 44(1), 25–32.

[19] Medrano, A., Abirached, C., Panizzolo, L., Moyna, P., Añón, M.C., 2009, The effect of glycation on foam and structural properties of b-lactoglobulin, Food Chemistry, 113, 127–133.

[20] Rodriguez Furlán, L. T., Lecot. J., Padilla. A. P., Campderrósa, M. E., Zaritzky, N., 2012, Stabilizing effect of saccharides on bovine plasma protein: A calorimetric study. Meat Science, 91, 478–485.

[21] Chobert, J.M., Gaudin, J.C., Dalgalarrondo, M., Haertlé, T., 2006, Impact of Maillard type glycation on properties of beta-lactoglobulin, Biotechnology Advances, 24, 629–632.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-18]

[22] Xu, D. X., Wang, X. Y., Jiang, J. P., Yuan, F., & Gao, Y. X., 2012, Impact of whey protein– Beet pectin conjugation on the physicochemical stability of β-carotene emulsions, Food Hydrocolloids, 28, 258–266.
[23] Garcia, R. N., Adachi, M., Tecson-Mendoza, E. M., Bernardo, A. E. N., & Utsumi, S., 2006, PHysicochemical properties of native and recombinant mungbean (Vigna radiate L. Wilczek) 8S globulins and the effects of the N-linked glycans, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 6005–6010.
[24] Tang, C.H., Sun, X., Foegeding, E.A., 2011, Modulation of PHysicochemical and Conformational Properties of Kidney Bean Vicilin (PHaseolin) by Glycation with Glucose: Implications for Structure-Function Relationships of Legume Vicilin, Agricultural and Food Chemistry, 59, 10114–10123.
[25] Boye, J. I., Alli, I., & Ismail, A. A., 1996, Interactions involved in the gelation of bovine serum albumin, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44, 996–1004.
[26] Hattori, M., Imamura, S., Nagasawa, K. and Takahashi, K., 1994, Functional changes of lysozyme by conjugating with carboxymethyl dextran, Biosci. Biothecnol. Biochem, 58, 174-177.
[27] Chevalier, F., Chobert, J. M., Dalgalarrondo, M., Choiset, Y., & Haertle, T., 2002, Maillard glycation of b-lactoglobulin induces conformation changes, Nahrung, 46(1), 58–63.
[28] Kato, A., 2002, Industrial Applications of Maillard-Type Protein-Polysaccharide Conjugates, Food Science and Technology Journal, 8 (3), 193–199.
[29] Ibrahim, H. R., Kato, A., Kobayashi, K., 1991, Antimicrobial effects of lysozyme against gram-negative bacteria due to covalent binding of palmitic acid, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 39, 2077-2082.
[30] Diftis, N., Kiosseoglou, V., 2003, Improvement of emulsifying properties of soybean protein isolate by conjugation with carboxymethyl cellulose, Food Chemistry, 81, 1–6.
[31] Nakamura, S., Kato, A., & Kobayashi, K., 1992, Bifunctional lysozyme galactomannan conjugate having excellent emulsifying properties and bactericidal effect, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40, 735–739.
[32] Kasran, M., Cui, S. W., Goff, H. D., 2013, Covalent attachment of fenugreek gum to soy whey protein isolate through natural Maillard reaction for improved emulsion stability, Food Hydrocolloids, 30, 552-558.
[33] Yadav, M. P., Strahan, G. D., Mukhopadhyay, S., Hotchkiss, A.T., Hicks, K. B., 2012, Formation of corn fiber gum-milk proteins conjugates and their molecular characterization, Food Hydrocolloids, 26, 326-333.
[34] Al-Hakkak, Jafar., & Al-Hakkak, Fadia., 2010, Functional egg white–pectin conjugates prepared by controlled Maillard reaction, Journal of Food Engineering, 100, 152–159.
[35] Aminlari, M., Ramezani, R., Jadidi, F., 2005, Effect of Maillard-based conjugation with dextran on the functional properties of lysozyme and casein, Journal of Food Science and Agriculture, 85, 2617–24.
[36] Kim, H., Choi, S., Shin, W.-S., and Moon, T., 2003, Emulsifying properties of bovine serum albumin-galactomannan conjugates, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 1049–1056.
[37] Schmitt, C., Bovay, C., Frossard, P., 2005, Kinetics of formation and functional properties of conjugates prepared by dry-State Iincubation of â-Lactoglobulin/acacia gum glectrostatic complexes.,Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 9089-9099.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-18]

Studies on the physiochemical and functional properties of lysozyme modified with tragacanthin gum

Koshani, R. [1*], Aminlari, M. [1,2], Niakosari, M. 1, Farahnaky, A. 1, Mesbahi, Gh. R. [1]

1. Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran
2. Department of Biochemistry, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

(Received: 93/8/19 Accepted: 93/10/18)

In recent years, many advances have been made in improving the biocatalytic activities of enzymes. Interaction of enzymes and macromolecules have important role in stabilization of enzyme's structure and function. Lysozyme lyses the bacterial cell wall by splitting ß (1–4) linkages between N-acetylmuramic acid and N-acetylglucosamine of the peptidoglycan in bacterial cell walls. Tragacanth is a polysaccharide obtained from exudates of the species of Astragalus. It is a very complex heterogeneous anionic polysaccharide of high molecular weight. Tragacanth consists of two main fractions: a water-insoluble component called bassorin, and a water-soluble component called tragacanthin. The aim of this investigation was to attach tragacanthin (water-soluble component of tragacanth) to lysozyme by Maillard reaction. The covalent attachment of this hydrocolloid with lysozyme was confirmed by SDS-PAGE and ion exchange chromatography. The conjugates exhibited improved solubility, foaming and emulsion properties. In addition, thermal stability of lysozyme in this conjugate was increased significantly. According to these results, attachment of lysozyme to tragacanthin can increase the application of this hydrocolloid as a functional component and lysozyme as a natural antimicrobial component in food and pharmaceutical industry.

Keywords: Lysozyme, Tragacanthin, Maillard reaction, Functional properties, Thermal stability

[*] Corresponding Author E-Mail Address: Roya.Koshani@yahoo.com

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-12-18]