بهبود فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین های سویای رسوب یافته با اسید از طریق کانژوگه شدن با مالتودکسترین با استفاده از واکنش مایلارد

ساره بوستانی[1*]، محمود امینلاری[2]، مرضیه موسوی نسب[3]

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 و گروه پژوهشی آبزیان، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

(تاریخ دریافت: ۹۳/۶/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۳/۸/۲۰)

چکیده

هدف این مطالعه بررسی تغییرات خصوصیات آنتی اکسیدانی در پروتئین های سویا می باشد. کانژوگه های پروتئین های سویا-مالتودکسترین با استفاده از واکنش مایلارد و در شرایط حرارت دهی خشک آماده شد (دمای ^0C ۶۰، رطوبت نسبی ۷۵٪ به مدت ۱، ۳، ۵ و ۷ روز). تشکیل گلیکوکانژوگه ها با استفاده از الکتروفورز SDS-PAGE و کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون تأیید شد. فاکتورهای شدت قهوه ای شدن، میزان جذب کردن رادیکال های DPPH و هیدروکسیل و قدرت احیا کنندگی به منظور سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی اندازه گیری شد. میزان قهوه ای شدن و تشکیل محصولات مایلارد که با جذب در ٤٢٠ نانومتر مشخص می شود، با کانژوگه شدن بطور چشمگیری افزایش یافت. درصد جذب کردن رادیکال DPPH و هیدروکسیل با افزایش زمان گرمخانه گذاری افزایش یافت، این بهبود در فعالیت جمع آوری رادیکال آزاد بواسطه خصوصیات آنتی اکسیدانی محصولات واکنش مایلارد می باشد. قدرت احیا کنندگی کانژوگه ها بطور قابل ملاحظه ای در مقایسه با نمونه شاهد افزایش یافت. نتایج نشان می دهد محصولات حاصل از واکنش مایلارد پروتئین های سویا-مالتودکسترین می تواند بطور موثری به عنوان آنتی اکسیدان طبیعی بکار رود.

کلید واژگان: آنتی اکسیدان، پروتئین های سویا، کانژوگه شدن، جذب کردن رادیکال

* مسئول مکاتبات: Boostani.sareh@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

۱- مقدمه

پروتئین‌ها به فرم طبیعی و اصلاح نشده خواص عملکردی محدودی دارند و در مقابل حرارت و سایر عوامل آسیب رسان طی فرآیندهای غذایی بسیار حساس می باشند و محققین همواره در پی بهبود خصوصیات عملکردی و افزایش مقاومت آنها بوده اند. برای افزایش پایداری و بهبود خصوصیات پروتئین ها، تیمارهای گوناگون شیمیایی، فیزیکی و آنزیمی صورت می پذیرد و به کمک چنین روش هایی توانسته‌اند خواص عملکردی پروتئین‌ها را به میزان زیادی بهبود بخشند [۱]. با توجه به مخاطرات روش های شیمیایی و هزینه بر بودن روش های فیزیکی و آنزیمی، اصلاح پروتئین ها با استفاده از روش های طبیعی از اهداف اصلی تکنولوژیست های غذایی می باشد. از روش های جدید اصلاح پروتئین ها که نیازی به واکنشگر شیمیایی ندارد، کم هزینه و کاملاً طبیعی است، اصلاح با استفاده از واکنش مایلارد می باشد [۲]. 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 واکنشگر ها و غیره صورت می پذیرد و هیبرید های سنگین و با وزن ملکولی متفاوت پروتئین-پلی ساکارید تشکیل می شود، کانژوگه های تشکیل شده باعث بهبود خصوصیات عملکردی پروتئین ها می شود. انتخاب صحیح و مناسب نوع گروه های آمین و کربونیل، نوع پروتئین و پلی ساکارید شرکت کننده در واکنش، زمان، pH، نسبت مناسب قند به پروتئین، فعالیت آبی و دما برای کنترل سرعت و نوع واکنش مایلارد و نیز هدایت آن به سمت تشکیل کانژوگه ها با خصوصیات دلخواه بسیار مؤثر است [۱، ۳].

تحقیقات زیادی نشان می دهد که محصولات واکنش مایلارد[1] (MRP) که بطور طبیعی در مواد غذایی ایجاد می شود، خاصیت آنتی اکسیدانی به محصول می دهد و یا آن را تشدید می کند، گرچه به علت تعدد و پیچیدگی ترکیبات تشکیل شده اطلاعات کمی در رابطه با خصوصیات فیزیکی و شیمیایی MRP ها موجود می باشد [٤]. فعالیت آنتی اکسیدانی MRPها در ابتدا توسط فرانکز و ایوانسکی (۱۹٥٤)، شناسایی و تشخیص داده شد. ظرفیت آنتی اکسیدانی MRPها تحت تأثیر عوامل مختلفی مثل نسبت و نوع ترکیبات آمینی و قند شرکت کننده، دما، pH و فعالیت آبی محیط واکنش قرار می گیرد. MRPهای تشکیل شده طی واکنش مایلارد روش های متفاوتی را جهت بروز خاصیت آنتی اکسیدانی ارائه می کنند، از جمله این روش ها: فعالیت شکستن زنجیره رادیکالی[2]،مقید کردن فلزات[3]، تغییر در هیدروژن پراکسید[4] و مهار کردن انواع مختلف اکسیژن فعال[5] می باشد [۵-۷]. برسودر و همکاران (۲۰۰۱)، مورالز و جیمنز پیرز (۲۰۰۱)، دیتریچ و همکاران (۲۰۰۳)، ونگر و همکاران (۲۰۰۲)، گزارش هایی را در رابطه با خصوصیات آنتی اکسیدانی محصولات واکنش مایلارد از طریق شلاته کردن مس، اسکونج کردن رادیکال اکسیژن، اسکونج کردن رادیکال DPPH و اسکونج کردن رادیکال پراکسیل ارائه کردند، بعلاوه آنتی اکسیدان های ایجاد شده طی واکنش مایلارد خاصیت سینرژیستی فوق العاده ای با آنتی اکسیدان های فنولی مورد استفاده و موجود در محصولات غذایی دارند [۸-۱۰].

سویا به عنوان یکی از مهمترین منابع پروتئینی به علت دارا بودن ارزش غذایی بالا، خصوصیات عملکردی بی‌نظیر و قیمت مناسب شناخته شده است و گزارشات متعددی در رابطه با بهبود پایداری و خصوصیات عملکردی پروتئین های سویا از طریق اتصال کوالانسی با منابع کربوهیدراتی مختلف با استفاده از مایلارد ارائه شده است [۱، ۱۱]. مالتودکسترین منبع کربوهیدراتی است که به وفور و با قیمت مناسب در دسترس می باشد، مالتودکسترین ها به عنوان پلیمرهای ساکاریدی غیرشیرین و غیرمغذی با واحد های D-گلوکز که با پیوند α-۱،٤ بهم متصل شده اند و دارای حداکثر معادل دکستروز (DE) کمتر از ۲۰ هستند، تعریف شده اند، قیمت مناسب و کاربرد گسترده از مزایای این منبع کربوهیدراتی است [۱۲]. با وجود محاسن گفته شده در اصلاح پروتئین ها با استفاده از واکنش طبیعی مایلارد، همچنین مزایای دو منبع پروتئینی و قندی ذکر شده و کمی مستندات در رابطه با خصوصیات آنتی اکسیدانی محصولات واکنش مایلارد، هدف این تحقیق گلیکوزیله کردن پروتئین های سویا و مالتودکسترین با استفاده از واکنش طبیعی مایلارد در زمان های مختلف گرمخانه گذاری و بررسی خصوصیات آنتی اکسیدانی کانژوگه های حاصل می باشد.

1. Maillard reaction products (MRP)

2. Radical chain-breaking activity
3. Metal chelation
4. Decomposition of hydrogen peroxide
5. Scavenging of reactive oxygen species

Archive of SID

www.SID.ir

۲- مواد و روش ها

۲-۱-مواد

لوبیای سویا (واریته ویلیامز) از بازار محلی تهیه و توسط هگزان روغن گیری و سپس آسیاب گردید. مالتو دکسترین نیز از بازار محلی تهیه شد. اکریل آمید، DPPH[1]، $FeCl_3$[2]، EDTA[3]، TCA[4] از شرکت مرک آلمان، سفادکس G100 و TBA[5] از شرکت سیگمای آمریکا تهیه و مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۲- تهیه پروتئین های سویای رسوب یافته با اسید[6]

خالص سازی پروتئین های سویا مطابق روش ییوبانچی و یاموچی (۱۹۸۷) و با کمی تغییرات در چندین مرحله صورت پذیرفت. ابتدا خالص سازی پروتئین های سویا با بافر تریس اسیدی در pH:۸ حاوی ۱۰ میلی مولار مرکاپتواتانول در دمای اتاق صورت گرفت و سپس سانتریفیوژ شد، محلول رویی با اسید کلریدریک ۲ مولار به pH:۴/۸ رسانیده شد و مجدداً سانتریفیوژ شد، رسوب بدست آمده با آب خنک، مخلوط و pH آن به ۸ رسانیده شد، در انتها محلول رویی جدا شد، دیالیز و فریزدرای گردید. پودر حاصله حاوی گلوبولین های خالص سویا می باشد [۱۳].

۲-۳-تهیه کانژوگه های پروتئین-پلی ساکارید

کانژوگه کردن پروتئین های خالص شده سویا با مالتودکسترین در شرایط حرارت خشک[7] انجام گرفت، بدین صورت که ابتدا پروتئین های خالص شده سویا و مالتودکسترین به نسبت ۱ به ۳ در بافر فسفات ۰/۰۱ مولار با pH: ۸ کاملاً مخلوط و سپس لیوفیلیز گردید، پودر حاصل در دسیکاتور و در حضور برمید پتاسیم اشباع (رطوبت نسبی ۷۹٪) و در زمان های ۱، ۳، ۵ و ۷ روز قرار گرفت تا واکنش مایلارد انجام شود. یک نمونه به عنوان شاهد که حاوی ترکیبات پروتئینی بدون پلی ساکارید است نیز در نظر گرفته شد [۲].

1. 1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl
2. Ferric chloride
3. Ethylene diamine tetraacetic acid
4. Trichloroacetic
5. Thiobarbituric acid
6. Acid-precipitated soy protein
7. Dry heating

۲-۴-الکتروفورز SDS-PAGE

برای تأیید تشکیل کانژوگه های پروتئین-پلی ساکارید، الکتروفورز SDS- PAGE[8] 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 [۱۴].

۲-۵-انجام کروماتوگرافی به روش ژل فیلتراسیون

برای خالص سازی بیشتر کانژوگه های پروتئین های سویا-دکستران، کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون با رزین سفادکس G-100 مطابق روش جانسون (۱۹۹۸) استفاده شد. ستون به ابعاد ۱/۵×۷۰ سانتی متر تهیه و فاز متحرک بافر کربنات آمونیوم ۰/۰۱ میلی مولار با pH: ۷/۵ استفاده شد و در هر لوله ۳ میلی لیتر جمع آوری شد. جذب نوری فراکسیون ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر تعیین و کروماتوگرام مربوطه رسم گردید و میزان کانژوگه شدن از طریق تغییرات میزان جذب نمونه ها در ۲۸۰ نانومتر بدست آمد. تمام اجزای[9] جمع آوری شده در تیوپ ها در حضور آب مقطر دیالیز شد و سپس لیوفیلیز گردید، کانژوگه های حاصل در ٤ درجه سانتی گراد نگهداری و برای آزمون های بعدی مورد استفاده قرار گرفت [۱۵].

۲-٦-اندازه گیری شدت قهوه ای شدن[10]

برای اندازه گیری شدت قهوه ای شدن مطابق روش کیم و لی (۲۰۰۲)، عمل شد. بدین صورت که نمونه ها به میزان ٤ برابر در بافر فسفات با pH:۷/٤ رقیق شدند، جذب محلول های رقیق شده نمونه ها در ٤۲۰ نانومتر خوانده و ثبت شد، این آزمون معیاری از پیشرفت کانژوگه شدن می باشد که می تواند

8. Sodium-dodecyl-sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)
9. Fractions
10. Browning intensity

Archive of SID
www.SID.ir

با خصوصیات آنتی اکسیدانی رابطه داشته باشد. میزان شدت قهوه ای شدن نمونه ها از طریق افزایش جذب در ٤٢٠ نانومتر مشخص و مقایسه می گردد [١٦].

٢-٧-اندازه گیری فعالیت اسکونج کردن رادیکال DPPH[1] محصولات واکنش مایلارد

اندازه گیری فعالیت اسکونج کردن رادیکال DPPH (DPPH-RS)، مطابق روش لرتیتیکول و همکاران (٢٠٠٧)، صورت پذیرفت. روش کار بدین صورت است که ٠/٤ میلی لیتر از محلول آبی نمونه ها به ٢ میلی لیتر محلول ٠/١٢ میلی مولار DPPH در اتانول اضافه شد و در دمای اتاق به مدت ٣٠ دقیقه در تاریکی نگهداری شد، جذب نمونه ها در طول موج ٥١٧ نانومتر خوانده شد، برای شاهد بجای نمونه از آب مقطر استفاده گردید [١٧]. درصد فعالیت جذب کردن رادیکال آزاد مطابق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\%\ DPPH-RS = \left[\frac{Acontrol - Asample}{Acontrol}\right] \times 100$$

A_{sample}: جذب نمونه در ٥١٧ nm

$A_{control}$: جذب شاهد در ٥١٧ nm

٢-٨-اندازه گیری فعالیت اسکونج کردن رادیکال هیدروکسیل[2] محصولات واکنش مایلارد

به منظور اندازه گیری فعالیت اسکونج کردن رادیکال هیدروکسیل (HRS) مطابق روش چولا و همکاران (٢٠٠٩) عمل شد. ١ سی سی از محلول رقیق شده نمونه ها (٥ مرتبه رقیق شده) به بافر فسفات ٠/١ مولار با pH: ٧/٤ (حاوی: فریک کلراید ٠/١ میلی مولار، EDTA ١ میلی مولار، اسکوربیک اسید ١ میلی مولار، داکسی ریبوز ٣٠ میلی مولار و هیدروژن پراکسید ٢٠ میلی مولار) اضافه شد. محلول نهایی در ^0C ٣٧ به مدت ٩٠ دقیقه نگهداری شد و در ادامه ٢ سی سی تری کلرو استیک اسید ٢٪ و ٢ سی سی تیوباربیتوریک ١٪ نیز به مخلوط فوق اضافه شد و در حمام آب گرم ^0C ١٠٠ به مدت ١٥ دقیقه حرارت داده شد و میزان جذب رنگ صورتی حاصل در ٥٣٢ نانومتر خوانده شد، برای تهیه نمونه شاهد بجای نمونه از آب مقطر استفاده گردید [٦]. درصد فعالیت جذب کردن HRS مطابق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\%HRS = \left[1 - \frac{Asampl}{Acontrol}\right] \times 100$$

A_{sample}: جذب نمونه در ٥٣٢ nm

$A_{control}$: جذب شاهد در ٥٣٢ nm

٢-٩-اندازه گیری قدرت احیاکنندگی[3] محصولات واکنش مایلارد

اندازه گیری قدرت احیا کنندگی محصولات واکنش مایلارد مطابق روش لرتیتیکول همکاران (٢٠٠٧)، صورت پذیرفت. روش کار بدین صورت است که ١ میلی لیتر نمونه (٥ مرتبه رقیق شده)، با ٢/٥ میلی لیتر بافرفسفات ٠/٢ مولار (٦/٦:pH) و ٢/٥ میلی لیتر فروسیانید پتاسیم ١٪ کاملاً مخلوط شد، مخلوط حاصل در بن ماری با دمای ^0C ٥٠ برای ٣٠ دقیقه نگهداری شد و در ادامه ٢/٥ سی سی تری کلرواستیک اسید ١٠٪ به آن اضافه و مخلوط شد، مخلوط حاصل در ١٦٥٠×g به مدت ١٠ دقیقه و در دمای ^0C ٢٣ سانتریفیوژ شد. ٢/٥ سی سی از محلول آبی به ١ سی سی آب مقطر و ٠/٥ سی سی فریک کلرید ٠/١ درصد اضافه شد. نمونه شاهد نیز به همین ترتیب تهیه و بجای نمونه های کانژوگه آب مقطر جایگزین گردید، بعد از ١٠ دقیقه جذب نمونه ها در ٧٠٠ نانومتر در اسپکتروفتومتر خوانده شد. میزان قدرت احیا کنندگی نمونه ها از طریق افزایش جذب در ٧٠٠ نانومتر مشخص و مقایسه می گردد [١٧].

٢-١٠-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 ٠/٠٥ استفاده شد. در تمام مراحل، تجزیه و تحلیل آماری داده ها با استفاده از نرم افزار SAS صورت پذیرفت.

1. DPPH radical scavenging activity
2. Hydroxyl radical scavenging activity (HRS)
3. Reducing power

Archive of SID
www.SID.ir

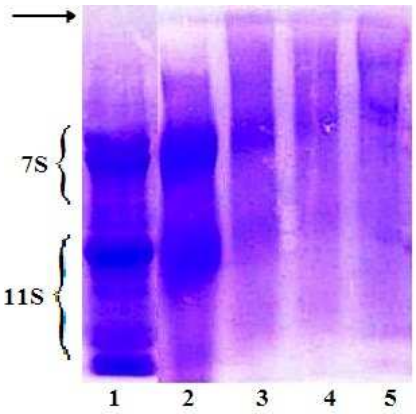
۳- نتایج و بحث

۳-۱- الکتروفورز SDS-PAGE

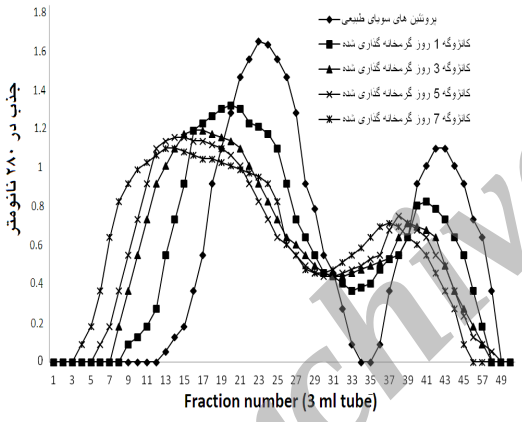
الگوی الکتروفورز نمونه ها در شکل ۱ نشان داده شده است. میزان یا درصد گلیکوزیله شدن از مهمترین خصوصیات فیزیکوشیمیایی است که بطور مستقیم بر خصوصیات عملکردی پروتئین ها تأثیر می گذارد و الکتروفورز یکی از راه های تعیین میزان پیشرفت کانژوگه شدن می باشد. در ستون شماره ۱ باند های پروتئینی مربوط به گلوبولین های 7S و 11S به خوبی مشخص است. همان گونه که قابل انتظار است حرارت دهی خشک مخلوط پروتئین-کربوهیدرات در شرایط فعالیت آبی و دمای مناسب منجر به تشکیل هیبرید های پروتئین-کربوهیدرات حاصل از واکنش مایلارد می شود [۲]. با افزایش زمان گرمخانه گذاری از ۱ روز به سمت ۷ روز، کانژوگه شدن رخ داده، پروتئین به کربوهیدرات متصل شده، وزن مولکولی افزایش و توزیع باندها در ابتدای ژل افزایش می یابد و 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. نتایج حاصل از الگوی الکتروفورز با گزارشات بدست آمده از سایر محققین مطابقت دارد، امینلاری و همکاران (۲۰۰۵) با افزایش زمان گرمخانه گذاری مخلوط لیزوزیم با دکستران از زمان صفر تا یک هفته، و ارگان و مولویهیل (۲۰۱۰) طی کانژوگه شدن پروتئین های کازئین با مالتو دکسترین، 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 بالای کانژوگه ها در بالای ژل جداکننده ایجاد می شود [۱۸، ۱۹].

۳-۲- کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون

کروماتوگرام پروتئین های خالص سویا و کانژوگه ها در زمان های مختلف گرمخانه گذاری در نمودار ۲ نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می شود، پروتئین های سویای طبیعی دو پیک عمده را نشان می دهد که مربوط به اجزای پروتئینی 7S و 11S می باشد در صورتیکه که کانژوگه ها یک پیک پهن را نشان می دهد که این حاکی از تشکیل کمپلکس های با وزن ملکولی بالا و متنوع پروتئین-مالتودکسترین می باشد.



شکل ۱ الگوی الکتروفورز پروتئین های سویای طبیعی (۱)، کانژوگه ۱ روز گرمخانه گذاری شده (۲)، کانژوگه ۳ روز گرمخانه گذاری شده (۳)، کانژوگه ۵ روز گرمخانه گذاری شده (٤)، کانژوگه ۷ روز گرمخانه گذاری شده (۵)



شکل ۲ کروماتوگرام پروتئین های سویا و کانژوگه ها

کروماتوگرام بدست آمده نتایج حاصل از الکتروفورز را تأیید می کند. در یک مخلوط پروتئینی ملکول های کوچک وارد منافذ رزین شده و به آرامی خارج می شود در حالی که ملکول های بزرگتر قادر به نفوذ به منافذ رزین نبوده و با سرعت بیشتری از ستون خارج می شود [۱۸، ۲۰]، از آنجا که کانژوگه ها بزرگتر می باشند در ابتدای کار از ستون خارج می شوند، بنابراین منحنی خروج آنها به سمت چپ نمودار منتقل می شود، از طرفی به دلیل نزدیک بودن وزن ملکولی گلیکوکانژوگه های سنگین تشکیل شده در طی واکنش مایلارد، منحنی خروج آنها با پروتئین های گلیکوزیله نشده همپوشانی نشان داده و تقریباً به صورت یک پیک پهن گسترده

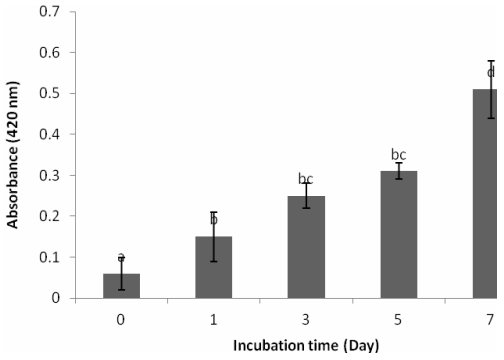
Archive of SID

www.SID.ir

مشاهده می شود. نتایج مشابهی نیز توسط امینلاری و همکاران (۲۰۰۵)، کی و همکاران (۲۰۰۹)، بدست آمده است [۱۸، ۲۰].

۳-۳- شدت قهوه ای شدن

شدت قهوه ای شدن یک معیار غیر اختصاصی از تشکیل محصولات واکنش مایلارد (MRP) و میزان کانژوگه شدن می باشد. در مراحل ابتدایی واکنش مایلارد گروه های کربونیلی با گروه های آمین واکنش داده و محصولات بی رنگ تولید می کند، در حالی که با گذشت زمان و در مراحل انتهایی ترکیبات سنگین وزن از جمله ملانوئیدین تولید می شود که بالاترین جذب را در ٤٢٠ نانومتر نشان می دهد [۷، ۲۱]. در این تحقیق اندازه گیری شدت قهوه ای شدن به عنوان معیاری از تشکیل MRPها و میزان فعالیت آنتی اکسیدانی انجام شد. در نمودار ۳ تغییرات شدت قهوه ای شدن با گذشت زمان گرمخانه گذاری نشان داده شده است، همانطور که مشاهده می شود با گذشت زمان میزان قهوه ای شدن نیز افزایش می یابد، ونگنی و ونویک (۲۰۱۳) و بنجاکول و همکاران (۲۰۰۵) نیز اعلام کردند با افزایش زمان گرمخانه گذاری شدت قهوه ای شدن افزایش می یابد. با افزایش شدت قهوه ای شدن در مراحل پایانی واکنش مایلارد، امکان تشکیل حداکثر MRP و بروز بیشترین خصوصیات آنتی اکسیدانی توسط کانژوگه ها وجود دارد [۲۱، ۲۲].



نمودار ۳ شدت قهوه ای شدن کانژوگه ها در زمان های مختلف گرمخانه گذاری (هر ستون نمایانگر میانگین ±انحراف معیار برای سه تکرار و حروف نامشابه نشان دهنده وجود اختلاف آماری معنی دار می باشد)

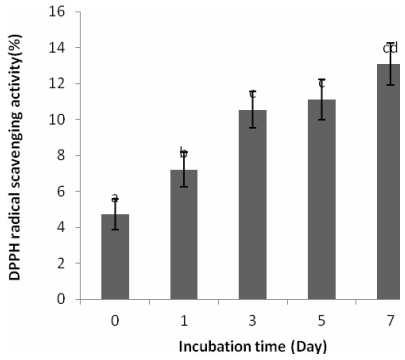
۳-٤- فعالیت جذب کردن رادیکال DPPH

رادیکال DPPH در یک سیستم با آنتی اکسیدان اسکونج[1] می شود، آنتی اکسیدان از طریق دادن یک هیدروژن به رادیکال آزاد، فرم پایدار DPPH-H را تشکیل می دهد و این روش به طور گسترده ای برای اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی اولیه[2] بکار می رود. روش جذب رادیکال DPPH برای اندازه گیری فعالیت مهار کنندگی کلیه آنتی اکسیدان ها چه آنهایی که در فرم خالص وجود داشته و آنهایی که در محصولات غذایی، طی فرایند ایجاد می شوند، بکار می رود [۲۳]. مطابق این آزمون نمونه ها با رادیکال پایدار DPPH واکنش می دهد و میزان تغییر رنگ محلول نمایانگر پتانسیل آنتی اکسیدانی MRP می باشد. تغییر رنگ از بنفش به زرد با پذیرش یک اتم هیدروژن از آنتی اکسیدان (MPR) و تشکیل یک مکول دو قطبی پایدار (DPPH-H) صورت می پذیرد [۷، ۲٤].

نتایج فعالیت مهارکردن رادیکال DPPH نمونه های کانژوگه در زمان های مختلف و نمونه شاهد در نمودار ٤ نشان داده شده است. مقدار اندک فعالیت اسکونج کردن رادیکال DPPH که در نمونه شاهد مشاهده می شود به علت ترکیبات بالقوه موجود در سویا ست که دارای فعالیت آنتی اکسیدانی می باشد [۲۵]. با افزایش زمان گرمخانه گذاری از ۱ روز به ۷ روز افزایش قابل توجه فعالیت مهار رادیکال DPPH مشاهده می شود. بنجاکول و همکاران (۲۰۰۵) و لرتیتیکول و همکاران (۲۰۰۷) با افزایش زمان گرمخانه گذاری کانژوگه ها، نتایج مشابهی را گزارش کردند. موپالا و همکاران (۲۰۱۲) با تشکیل کانژوگه های نایسین-قند، چنگ و همکاران (۲۰۱۱)، با تشکیل کانژوگه های کیتوزان-گلولز گزارش هایی را مبنی بر افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی با کانژوگه شدن مایلارد ارائه دادند [۱۷، ۲۲، ۲٤، ۲٦]. ونگنی و ونویک (۲۰۱۳) و لرتیتیکول و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند دما و pH از عوامل اصلی تأثیرگذار در فعالیت آنتی اکسیدانی MRP می باشد و کاهش pH و دما موجب کاهش شدید فعالیت آنتی اکسیدانی می شود و در این تحقیق هر دو عامل دما و pH جهت تشکیل کانژوگه های با فعالیت آنتی اکسیدانی مساعد می باشد [۱۷، ۲۱].

1. Scavenged
2. Primary antioxidant activity

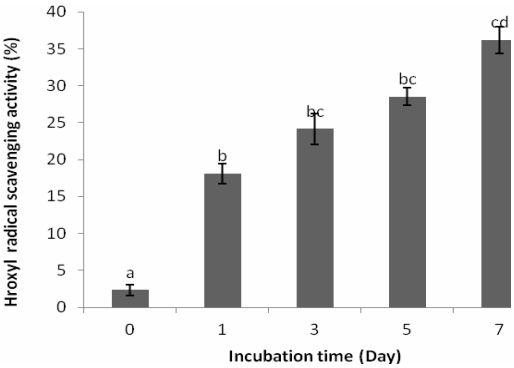
Archive of SID
www.SID.ir



نمودار ٤ درصد جذب کردن رادیکال DPPH کانژوگه ها در زمان های مختلف گرمخانه گذاری (هر ستون نمایانگر میانگین ±انحراف معیار برای سه تکرار و حروف نامشابه نشان دهنده وجود اختلاف آماری معنی دار می باشد)

۳-۵- فعالیت جذب کردن رادیکال هیدروکسیل

رادیکال هیدروکسیل یکی از گونه های مهم اکسیژن فعال است، در سیستم های بیولوژیکی این ترکیب با استفاده از واکنش فنتون[1] و در حضور هیدروژن پراکسید تشکیل می شود، در سیستم های آزمایشگاهی این واکنش شبیه سازی شده و رادیکال های هیدروکسیل تشکیل شده منجر به تولید مالون دی آلدهید می شود، ترکیب حاصل با تیوباربیتوریک واکنش داده و رنگ صورتی ایجاد می کند که در ۵۳۲ نانومتر ماکزیمم جذب را نشان می دهد. در صورت وجود ترکیبات آنتی اکسیدانی در محیط با اسکونج کردن رادیکال هیدروکسیل مانع تشکیل مالون دی آلدهید و تغییرات رنگی می شود [۲۱]. نتایج فعالیت اسکونج کردن رادیکال هیدروکسیل در نمودار ۵ ارائه شده است. پروتئین های و پپتید های سویا بطور طبیعی دارای فعالیت اسکونج کردن رادیکال هیدروکسیل می باشد [۲۷]، کانژوگه شدن باعث افزایش قابل توجه فعالیت اسکونج کردن کلیه تمیارها در مقایسه با نمونه شاهد می شود، ویجویکرم و همکاران (۱۹۹۹)، ونگنی و ونویک (۲۰۱۳)، نیز نتایج مشابهی مبنی بر بهبود فعالیت اسکونج کردن رادیکال هیدروکسیل با کانژوگه شدن گزارش کردند [۲۱، ۲۸].



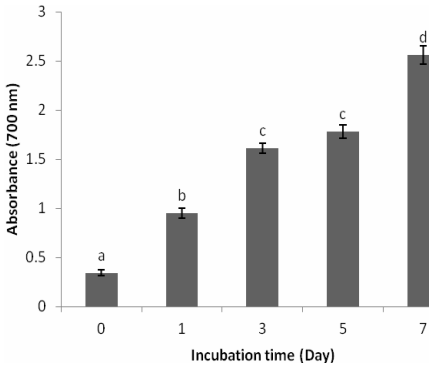
نمودار ۵ درصد جذب کردن رادیکال هیدروکسیل کانژوگه ها در زمان های مختلف گرمخانه گذاری (هر ستون نمایانگر میانگین ±انحراف معیار برای سه تکرار و حروف نامشابه نشان دهنده وجود اختلاف آماری معنی دار می باشد)

۳-٦- ظرفیت احیا کنندگی محصولات واکنش مایلارد

توانایی MRPها به عنوان احیا کننده از طریق اهدا الکترون برای تشکیل ترکیبات پایدار با تعیین قدرت احیاکنندگی ارزیابی می شود، در این روش توانایی احیا یون فریک به فروس اندازه گیری و تغییر رنگ محیط به آبی گویای فعالیت احیاکنندگی است و با افزایش میزان جذب، قدرت احیاکنندگی نیز بیشتر می شود [۷]. مطابق نمودار ٦ با افزایش زمان گرمخانه گذاری، میزان جذب افزایش یافته و ظرفیت احیا کنندگی نیز بیشتر می شود. بنجکول و همکاران (۲۰۰۵) و لرتیتیکول و همکاران (۲۰۰۷) با تهیه کانژوگه های پروتئین پروسین پلاسما و قند های مختلف در زمان های مختلف نتایج مشابهی را بدست آوردند [۱۷، ۲۲]. شوبیتا و همکاران (۲۰۱۲)، مرالس و جیمینزپیرس (۲۰۰۱)، نیز گزارشاتی مبنی بر افزایش قدرت احیا کنندگی با کانژوگه شدن ارائه کردند، در واقع MRPها فعالیت اهدا کنندگی هیدروژن دارد و گروه های هیدروکسیل MRPها نقش مهمی در بروز فعالیت احیاکنندگی به عهده دارد بعلاوه ترکیبات ردکتون حد واسط حاصل از واکنش مایلارد زنجیره رادیکالی را از طریق احیا اتم هیدروژن می شکند [۲۹]. نتایج بدست آمده در این بخش تأییدی بر نتایج حاصل از فعالیت مهار رادیکال DPPH و هیدروکسل و بیانگر پتانسیل بالای آنتی اکسیدانی کانژوگه های پروتئین های ایزوله سویا-دکستران می باشد.

1. Fenton reaction

Archive of SID
www.SID.ir



نمودار ٦ قدرت احیا کنندگی کانژوگه ها در زمان های مختلف گرمخانه گذاری (هر ستون نمایانگر میانگین ±انحراف معیار برای سه تکرار و حروف نامشابه نشان دهنده وجود اختلاف آماری معنی دار می باشد)

٤- نتیجه گیری

در این تحقیق پروتئین های سویا با مالتودکسترین در زمان های مختلف گرمخانه گذاری شد. الکتروفورزSDS-PAGE و کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون پیشرفت کانژوگه شدن با افزایش زمان گرمخانه گذاری را نشان داد. نتایج حاصل از شدت میزان قهوه ای شدن، درصد جذب رادیکال DPPH و رادیکال هیدروکسیل و میزان فعالیت احیا کنندگی بیان گر بهبود چشمگیر فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین های سویای کانژوگه شده با مالتوکسترین از طریق واکنش مایلارد می باشد.

٥- منابع

[1] Kato, A., 2002. Industrial applications of maillard-type protein- polysaccharide conjugates, Food Science and Technology Research, 8: 193-199.

[2] Kato, A. Shimokawa, K. 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.

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

[4] Yilmaz, Y., Toledo, R., 2005. Antioxidant activity of water soluble Maillard reaction products. Food Chemistry, 93: 273–278.

[5] Franzke, C., Iwainsky, H. 1954. Zur antioxydativen Wirksamveit der Melanoidine. Deutche Lebensmittle-Rundschau, 50: 251-254.

[6] Chawla, S. P., Chander, R., Sharma, A. 2009. Antioxidant formation by cirradiation of glucose-amino acid model systems. Food Chemistry, 116: 122–128.

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

[8] Bersuder, P., Hole, M., Smith, G., 2001. Antioxidants from a heated histidine–glucose model system. Investigation of the copper [II] binding ability. Journal of the American Oil Chemists' Society, 78: 1079–1082.

[9] Morales, J. F., Jimenez-Perez, S. 2001. Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. Food Chemistry, 72: 119–125.

[10] Dittrich, R., El-Massry, F., Rinaldi, F., Peich, C. C., Beckmann, M. W., Pischetsrieder, M. 2003. Maillard reaction products inhibit oxidation of human low-density lipoproteins in vitro. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51: 3900–3904.

[11] 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.

[12] Chrystel Loret, W. J. F. 2008. Influence of preparation conditions of maltodextrin gel on food texture. 3rd International Symposium on Food Rheology and Structure.

[13] Iwabuchi, S. Yamauchi, F. 1987. Determination of glycinin and β-conglycinin in soy protein by immunological methods. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 35: 200–205.

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

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

[16] Kim, J. S., and Lee, Y. S. 2008. Effect of reaction pH on enolisation and racemisation reactions of glucose and fructose on heating with amino acid enantiomers and formation

Archive of SID

www.SID.ir

of melanoidins as a result of the Maillard reaction. Food Chemistry, 108: 582–592.

[17] Lertittikul, W., Benjakul, S., 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.

[18] Aminlari, M. Ramezani, R. adidi, 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

[19] O′Regan, J., Mulvihill, D. M. 2009. Preparation, characterisation and selected functional properties of sodium caseinate–maltodextrin conjugates. Food Chemistry, 115: 1257–1267.

[20] Qi, J. R. Yang, X. Q. and Liao, J. S. 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.

[21] Vhangani, L. N., and Van Wyk, J., 2013, Antioxidant activity of Maillard reaction products [MRPs] derived from fructose–lysine and ribose–lysine model systems, Food Chemistry, 137: 92–98

[22] Benjakul, S., Lertittikul, W., and Bauer, F., 2005, Antioxidant activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein–sugar model system, Food Chemistry, 93: 189–196

[23] Sharma, O. P., and Bhat, T. K. 2009. DPPH antioxidant assay revisited. Food Chemistry, 113: 1202–1205.

[24] Muppalla, S.R., Sonavale, R., Chawla, S.P., and Sharma, A., 2012, Functional properties of Nisin-Carbohydrate Conjugates Formed by Radiation Induced Maillard Reaction, Radiation Physics and Chemistry., Accepted Manuscript.

[25] Lee, C.H., Yang, L., Xu, J.Z., Ying, S., Yeung, V., Huang, Y., Chen, Z.Y., 2005, Relative antioxidant activity of soybean isoflavones and their glycosides, Food Chemistry, 90: 735–741

[26] Chang, H.L., Chen, Y.C., Tan, F.J., 2011, Antioxidative properties of a chitosan–glucose Maillard reaction product and its effect on pork qualities during refrigerated storage, Food Chemistry, 124: 589–595

[27] Moure, A., Domı´nguez, H., Carlos Parajo, J. 2006. Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates Process Biochemistry 41: 447–456

[28] Wijewickreme, A. N., Krejpcio, Z., Kitts, D. D. 1999. Hydroxyl scavenging activity of glucose, fructose, and ribose–lysine model Maillard products. Journal of Food Science, 64: 457–461.

[29] Yoshimura, Y., Iijima, T., Watanabe, T., Nakasawa, H. 1997. Antioxidant effect of Maillard reaction products using glucose–glycine model system. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45: 4106–4109

Archive of SID

www.SID.ir

Improvement of antioxidant activity of acid-precipitated soy proteins by conjugating to maltodextrin through maillard reaction

Boostani, S. [1*], Aminlari, M. [2], Moosavi-nasab, 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 and Sea Food Processing Research Group, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

(Received: 93/6/15 Accepted: 93/8/20)

The aim of the present study was to identify changes in the antioxidant properties of soy proteins. Soy proteins- maltodextrin conjugates were prepared by Maillard type reaction in a controlled dry state condition (60 ^{0}C, 75% relative humidity, pH:8 for 1, 3, 5 and 7 days). The formation of glycoconjugates was confirmed by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and gel filtration chromatography. Browning intensity, 1,1 Diphenyl 2 picryl hydrazyl (DPPH) and hydroxyl radical scavenging activity and reducing power measured their antioxidant properties. Browning and intermediate products, as monitored by absorbance at 420 nm, sharply increased with conjugation. DPPH and hydroxyl radical scavenging activity increased with increasing incubation time, this improved free radical scavenging activity mediated by antioxidant maillard reaction products. Reducing power of conjugates was remarkably increased compared with the control sample. The results demonstrated that the Maillard type soy protein-maltodextrin products can be used as an effective natural antioxidant.

Key words. Antioxidant, Conjugation, Radical scavenging, Soy proteins

Archive of SID

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

www.SID.ir