نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۲، شماره ۴، مهر- آبان ۱۳۹۵، ص. ۴۶۲-۴۵۳

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 12, No. 4, Oct- Nov 2016, p. 453-462

خصوصیات فیزیکوشیمیایی و عملکردی کانژوگه‌های پروتئین‌های سویای رسوب‌یافته با اسید و مالتودکسترین

ساره بوستانی*[۱]، محمود امینلاری*[۲]، مرضیه موسوی نسب[۳]، مهرداد نیاکوثری[۳]، غلامرضا مصباحی[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۶/۰۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۱۸

چکیده

کانژوگه‌های پروتئین‌های سویای رسوب‌یافته با اسید و مالتودکسترین تحت شرایط کنترل شده واکنش مایلارد آماده شدند. (دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، pH:۸، رطوبت نسبی ۷۹٪ و زمان‌های ۱، ۳، ۵ و ۷ روز). تشکیل کانژوگه‌های پروتئین- پلی‌ساکارید با الکتروفورز SDS-PAGE تایید شد و کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون نشان داد واکنش مایلارد بین پروتئین‌های سویا و مالتودکسترین رخ داده است. مطابق نتایج آنالیز گرماسنجی افتراقی (DSC)، پایداری حرارتی پروتئین‌های سویا بطور چشمگیری توسط کانژوگه شدن با مالتودکسترین افزایش یافت و بیشترین دمای دناتوراسیون بعد از ۷ روز گرمخانه‌گذاری مشاهده شد. در مقایسه با نمونه شاهد، خصوصیات حلالیت، کف‌کنندگی و امولسیفایری بطور قابل توجه‌ای با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری بهبود یافت. نتایج نشان داد که خصوصیات فیزیکوشیمیایی و عملکردی پروتئین‌های سویا از طریق کانژوگه شدن با مالتودکسترین تغییر و بهبود می‌یابد.

واژه‌های کلیدی: پروتئین‌های سویا، پایداری حرارتی، خصوصیات عملکردی، کانژوگه

مقدمه

سویا به‌عنوان یکی از مهمترین منابع پروتئینی به علت دارا بودن ارزش غذایی بالا، خصوصیات عملکردی بی‌نظیر و قیمت مناسب شناخته شده است (Endres, 2001). پروتئین‌های سویا دامنه وسیع وزن ملکولی از ۸ تا ۶۰۰ کیلو دالتون دارند که بر اساس سرعت رسوب‌شان در اولتراسانتریفوژ نامگذاری شده‌اند (Kisenlla *et al.*, 1979). مهمترین اجزای پروتئینی سویا، گلوبولین 7S (بتاکان‌گلی سینین) و گلوبولین 11S (گلی‌سینین) می‌باشد که هر کدام از زیر واحدهای متفاوتی تشکیل شده و خصوصیات عملکردی پروتئین‌های سویا، عمدتاً به این دو گلوبولین نسبت داده شده است (Kilara and Sharkasi,. 1986). پروتئین‌های سویا در محصولات مختلفی چون نوشیدنی‌ها، محصولات گوشتی، آنالوگ‌های لبنی، انواع نان و کیک، دسر و سوپ مورد استفاده قرار می‌گیرند (Endres, 2001).

اغلب پروتئین‌ها از جمله پروتئین‌های سویا به فرم طبیعی و اصلاح نشده خواص عملکردی محدودی دارند و در مقابل حرارت و سایر عوامل آسیب‌رسان طی فرآیندهای غذایی بسیار حساس می‌باشند (Gan *et al*,. 2008) و محققین همواره در پی بهبود خصوصیات عملکردی و افزایش مقاومت این پروتئین‌ها بوده اند. برای افزایش پایداری و بهبود خصوصیات پروتئین‌ها، تیمارهای گوناگون شیمیایی، فیزیکی و آنزیمی صورت می‌پذیرد و به کمک چنین روش‌هایی توانسته‌اند خواص عملکردی پروتئین‌های سویا را به میزان زیادی بهبود بخشند (Damodaran, 1996). با توجه به مخاطرات روش‌های شیمیایی و گران بودن روش‌های فیزیکی و آنزیمی، اصلاح پروتئین‌ها با استفاده از روش‌های طبیعی از اهداف اصلی تکنولوژیست‌های غذایی می‌باشد. از روش‌های جدید اصلاح پروتئین‌ها که نیازی به واکنشگر شیمیایی ندارد، کم هزینه و کاملاً طبیعی است، اصلاح با استفاده از واکنش مایلارد می‌باشد (Kato *et al*, 1991). در این واکنش، اتصال کووالانسی میان گروه‌های آمین آزاد پروتئین وگروه کربونیلی پلی‌ساکارید تحت شرایط کنترل شده رطوبت، حرارت، pH، نسبت مناسب واکنشگرها و غیره صورت می‌پذیرد (Kato *et al*,. 1992) و هیبریدهای سنگین و با وزن ملکولی متفاوت پروتئین- پلی‌ساکارید تشکیل می‌شود (Oliver *et al*, 2006).

مطالعات مختلفی در زمینه امکان بهبود پایداری حرارتی و خصوصیات عملکردی پروتئین ها از طریق کانژوگه شدن انجام شده است. Aminlari و همکاران (۲۰۰۵)، نشان دادند کانژوگه شدن با دکستران باعث بهبود خصوصیات عملکردی و پایداری حرارتی پروتئین‌های لیزوزیم و کازئین می‌شود. Diftis و Kiosseoglou (۲۰۰۳)، خصوصیات امولسیفایری پروتئین های سویا را از طریق کانژوگه شدن با کربوکسی متیل سلولز بهبود دادند. Van de

۱، ۲، ۳ و۴- به ترتیب دانشجوی دکتری، استاد، دانشیار و استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز.
(* - نویسنده مسئول: Email: aminlari@shirazu.ac.ir)

Lagemaat و همکاران (۲۰۰۷) مشاهده کردند واکنش‌های حساسیت‌زای پروتئین‌های سویا با کانژوگه شدن کاهش می‌یابد. بوستانی و همکاران (۱۳۹۵)، افزایش خصوصیات آنتی‌اکسیدانی کانژوگه‌های حاصل از پروتئین‌های سویای رسوب یافته با اسید و مالتودکسترین را گزارش کردند. Liu و همکاران (۲۰۱۲) افزایش چشمگیری در خصوصیات عملکردی پروتئین‌های بادام‌زمینی کانژوگه شده با دکستران مشاهده نمودند. انتخاب صحیح و مناسب نوع گروه‌های آمین و کربونیل، نوع پروتئین و پلی‌ساکارید شرکت کننده در واکنش، زمان، pH، نسبت مناسب کربوهیدرات به پروتئین، فعالیت آبی و دما در جهت کنترل سرعت و نوع واکنش مایلارد و نیز هدایت آن به سمت تشکیل کانژوگه‌های دلخواه بسیار مؤثر است Van (Boekel *et al*, 2001).

مالتودکسترین منبع کربوهیدراتی است که به وفور و با قیمت مناسب در دسترس می‌باشد. بر اساس قوانین سازمان غذا و داروی ایالات متحده آمریکا در سال ۱۹۸۳، مالتودکسترین‌ها به‌عنوان پلیمرهای ساکاریدی غیرشیرین و غیرمغذی با واحدهای D- گلوکز که با پیوند α-۴،۱ بهم متصل شده‌اند و دارای حداکثر معادل دکستروز[1] (DE) کمتر از ۲۰ هستند، تعریف شده‌اند. این پلی‌ساکارید کاربردهای متنوعی داشته از جمله به‌عنوان جایگزین چربی، در تهیه انواع پودرهای نوشیدنی، به‌عنوان پرکننده در محصولات غذایی مختلف و غیره بکار می‌رود (مولایی فر و همکاران، ۱۳۹۵).

با توجه به سهولت دسترسی و قیمت مناسب هر دو منبع پروتئینی و کربوهیدراتی ذکر شده، هدف این مطالعه بهبود مقاومت و خصوصیات عملکردی پروتئین های سویا از طریق گلیکوزیله شدن[2] با مالتودکسترین و بررسی تغییرات خصوصیات فیزیکوشیمیایی و عملکردی کانژوگه‌های تشکیل شده طی واکنش مایلارد با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد

لوبیای سویا (واریته ویلیامز) از بازار محلی تهیه و توسط هگزان روغن‌گیری شد (نسبت حلال به سویا، ۱/۷۵ به ۱ و روغن‌گیری به صورت غیرمداوم و با استفاده از روش غوطه‌وری مشابه روغن‌گیری به روش سوکسله، در دمای ۶۵/۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد)، سپس سویای روغن‌گیری شده آسیاب گردید. مالتودکسترین و روغن ذرت نیز از بازار محلی تهیه شد. سفادکس G-100 از شرکت سیگمای آمریکا و سایر مواد شیمیایی مورد استفاده، از شرکت‌های تولیدکننده معتبر مواد شیمیایی آزمایشگاهی تهیه و مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه پروتئین های سویای رسوب یافته با اسید[3]

خالص سازی پروتئین‌های سویا مطابق روش Iwabuchi and Yamauchi (1987) و با کمی تغییرات در چندین مرحله صورت پذیرفت. ابتدا خالص سازی پروتئین های سویا (۱۰۰ گرم) با ۲ لیتر بافر تریس اسیدی در pH: ۸ حاوی ۱۰ میلی مولار مرکاپتواتانول در دمای اتاق صورت گرفت و سپس سانتریفیژ شد، محلول رویی با اسیدکلریدریک ۲ مولار به pH: ۴/۸ رسانیده شد و مجدداً سانتریفوژ شد، رسوب بدست آمده با آب خنک، مخلوط و pH آن به ۸ رسانیده شد، در انتها محلول رویی جدا و دیالیز شد و با استفاده از خشک‌کن انجمادی به پودر تبدیل گردید. پودر حاصله حاوی گلوبولین‌های خالص سویا می‌باشد.

تهیه کانژوگه‌های پروتئین-پلی‌ساکارید

کانژوگه کردن پروتئین‌های خالص شده سویا با مالتودکسترین در شرایط حرارت خشک[4] انجام شد. ابتدا پروتئین‌های خالص شده سویا و مالتودکسترین به نسبت ۱ به ۳ در بافر فسفات ۰/۰۱ مولار با pH: ۸ کاملاً مخلوط و سپس با استفاده از خشک‌کن انجمادی به پودر تبدیل گردید، پودر حاصل در دسیکاتور و در حضور برمید پتاسیم اشباع (رطوبت نسبی ۷۹٪) و در زمان‌های ۱، ۳، ۵ و ۷ روز در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا واکنش مایلارد انجام شود. یک نمونه به‌عنوان شاهد که حاوی ترکیبات پروتئینی بدون پلی‌ساکارید بود نیز در نظر گرفته شد (Kato *et al*, 1991).

الکتروفورز

برای تأیید تشکیل کانژوگه‌های پروتئین- پلی‌ساکارید، الکتروفورز SDS- PAGE مطابق روش Laemmli (1970) و با کمی تغییرات صورت پذیرفت. ژل افقی الکتروفورز با ۳٪ ژل متراکم کننده و ۱۰درصد ژل جدا کننده تهیه شد و دستگاه الکتروفورز دو طرفه بیو راد ساخت سنگاپور مورد استفاده قرار گرفت. نمونه به غلظت ۲ میلی‌گرم در ۱ میلی‌لیتر در بافر نمونه مخلوط و در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه حرارت داده و در هر چاهک ۲۰ میکرولیتر نمونه تزریق شد. میزان جریان الکتریسیته روی ۲۵ میلی‌آمپر تنظیم شد و در انتها رنگ آمیزی در محلول محتوی کوماسی بریلیانت بلو و متانول و رنگ‌زدایی در محلول محتوی استیک اسید و متانول صورت پذیرفت.

انجام کروماتوگرافی به روش ژل فیلتراسیون

برای جداسازی پروتئین‌های سویای کانژوگه شده از غیر

1Dextrose equivalent
2 Glycosylation

3Acid-precipitated soy protein (SAPP)
4Dry heating

کانژوگه، از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون حاوی رزین سفادکس G-100 مطابق روش Janson (1998) استفاده شد. ستون به ابعاد ۷۰×۱/۵ سانتی‌متر تهیه شد و نمونه‌ها به میزان ۵۰۰ میلی‌گرم توزین و در ۲ میلی‌لیتر بافر کربنات آمونیوم ۰/۰۱ میلی مولار با pH: ۷/۵ حل شدند و سپس با دور ۲۵۰۰×g به مدت ده دقیقه سانتریفوژ گردیدند. مایع رویی جدا و برای نمونه‌گذاری روی ستون مورد استفاده قرار گرفت و در هر لوله ۳ میلی‌لیتر جمع‌آوری شد. جذب نوری فراکسیون ها[1] در طول موج ۲۸۰ نانومتر تعیین و کروماتوگرام مربوطه رسم گردید. کانژوگه‌های خالص شده برای آزمون‌های بعدی مورد استفاده قرارگرفتند.

بررسی پایداری حرارتی با استفاده از تکنیک گرماسنجی افتراقی[2] (DSC)

اندازه‌گیری اختلاف در دمای واسرشت شدن نمونه‌های کانژوگه شده و شاهد مطابق روش Tang و همکاران (۲۰۰۷) و با ایجاد کمی تغییرات صورت پذیرفت. دستگاه ترمال آنالایزر متلر[3] ساخت سوئیس مورد استفاده قرار گرفت و در انتها، داده‌ها با نرم افزار STAR SW.9.3 آنالیز شد. بدین ترتیب که ابتدا، محلول آبی نمونه‌ها (غلظت ۲۰٪ حجمی/ وزنی و به میزان ۱۰ میکرولیتر) تهیه و در پن‌های آلومینیومی جاسازی شد و آنالیز از دمای ۲۵ تا ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۱۰درجه سانتی‌گراد بر هر دقیقه صورت گرفت و در انتها، دمای واسرشت شدن[4] (T_d)، دمای اولیه[5] (T_0) و آنتالپی[6] (ΔH) از نمودارها استخراج و آنالیز گردید.

تعیین حلالیت پروتئین

اندازه‌گیری حلالیت نمونه‌ها در pHهای ۳، ۵، ۷ و ۹ مطابق روش امینلاری و همکاران (۲۰۰۵) و با کمی تغییرات صورت پذیرفت. ابتدا میزان پروتئین کل به روش کلدال اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری پروتئین‌های موجود در مایع فوقانی بدین ترتیب عمل شد که ۳۰ میلی‌گرم از نمونه‌های پروتئینی با ۱ سی‌سی بافر با pHهای مورد نظر در ۲۵ درجه سانتی‌گراد کاملاً مخلوط شد و در ۱۲۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد و میزان نیتروژن موجود در محلول رویی مطابق روش لوری و با تعیین میزان جذب در ۶۰۰ نانومتر محاسبه گردید. فرمول زیر برای تعیین درصد حلالیت نمونه ها مورد استفاده قرار گرفت.

1 Fractions
2Differential Scanning Calorimetry
3METTLER thermal analyser
4Denaturation temperature
5Onset temperature
6Denaturation enthalpies

درصد حلالیت = (محتوی پروتئین کل/ محتوی پروتئین در مایع فوقانی)×۱۰۰ (۱)

تعیین ظرفیت کف کنندگی[7] و پایداری کف[8]

برای اندازه‌گیری ظرفیت کف‌کنندگی بدین صورت عمل شد که مقداری از نمونه‌ها که حاوی ۳ گرم پروتئین بود در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر با استفاده از مخلوط کن با سرعت بالا برای ۳ دقیقه کاملاً مخلوط شد و سپس در یک استوانه مدرج ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته و حجم کف (ارتفاع کف بر حسب میلی‌لیتر) بعد از ۳۰ ثانیه ثبت و به‌عنوان ظرفیت کف‌کنندگی گزارش شد. پایداری کف بر اساس حجم کف (ارتفاع کف بر حسب میلی‌لیتر) در دقیقه سی ام اندازه‌گیری و محاسبه گردید (Chiu *et al*, 2009, Alhakkak *et al*, 2010, Appiah *et al*, 2011)

تعیین فعالیت امولسیون کنندگی[9] و پایداری امولسیون[10]

فعالیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون مطابق روش Pearce and Kinsella (1978) اندازه‌گیری شد. بدین صورت که ابتدا یک میلی‌لیتر روغن ذرت به ۳ میلی‌لیتر نمونه به غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۰۱ مولار با pH: ۷/۴ افزوده و کاملاً مخلوط شد، سپس با هموژنایزر با دور ثابت به مدت ۱ دقیقه در دمای محیط هموژنیزه شد. ۰/۱ میلی‌لیتر از امولسیون تهیه شده در فواصل زمانی ۰ تا ۱۰ دقیقه برداشته و ۵ میلی‌لیتر سدیم دودسیل سولفات ۰/۱درصد به آن اضافه 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. فعالیت امولسیون‌کنندگی از طریق اندازه گیری میزان جذب بلافاصله پس از تشکیل امولسیون محاسبه شد (میزان جذب در زمان ۰). پایداری امولسیون تشکیل شده نیز با تعیین مدت زمانی که طول می کشد تا میزان کدورت اولیه امولسیون به نصف کاهش یابد، از روی منحنی جذب در طول موج ۵۰۰ نانومتر و در مدت ۱۰ دقیقه محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

به‌منظور آنالیز آماری داده ها و بررسی اطلاعات بدست آمده از آزمون‌های 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 گروه‌بندی آنها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح

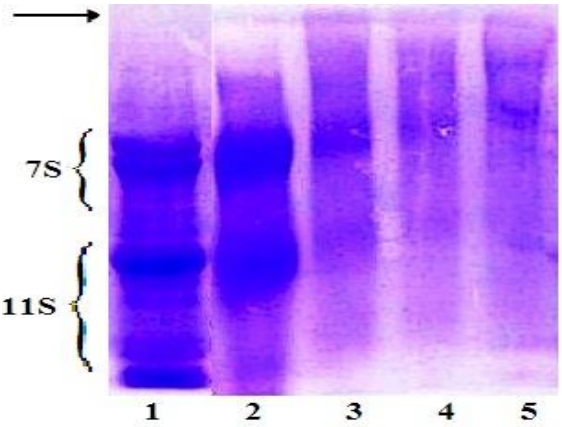
7Foaming capacity
8Foaming stability
9Emulsion activity
10Emulsion stability

۰/۰۵ استفاده شد. در تمام مراحل، تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 صورت پذیرفت.

نتایج و بحث

نتایج الکتروفورز

الگوی الکتروفورز نمونه‌ها در شکل ۱ نشان داده شده است. میزان یا درصد گلیکوزیله شدن[1] از مهمترین خصوصیات فیزیکوشیمیایی است که بطور مستقیم بر خصوصیات عملکردی پروتئین‌ها تأثیر می‌گذارد و الکتروفورز یکی از راه‌های تعیین میزان پیشرفت کانژوگه شدن می‌باشد. در ستون شماره ۱ باندهای پروتئینی مربوط به گلوبولین‌های 7S و 11S به خوبی مشخص است. همان گونه که قابل انتظار است حرارت‌دهی خشک مخلوط پروتئین-کربوهیدرات در شرایط فعالیت آبی و دمای مناسب منجر به تشکیل هیبریدهای پروتئین-کربوهیدرات حاصل از واکنش مایلارد می‌شود (Kato *et al*, 1991).

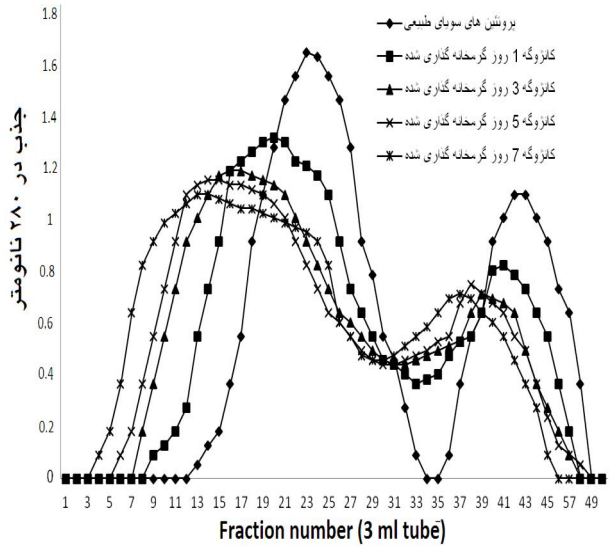


شکل ۱- الگوی الکتروفورز: پروتئین‌های سویای طبیعی (۱)، کانژوگه ۱ روز گرمخانه‌گذاری شده (۲)، کانژوگه ۳ روز گرمخانه‌گذاری شده (۳)، کانژوگه ۵ روز گرمخانه‌گذاری شده (٤)، کانژوگه ۷ روز گرمخانه‌گذاری شده (۵)

با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری از ۱ روز به سمت ۷ روز، کانژوگه شدن رخ داده و پروتئین به کربوهیدرات متصل می‌شود در نتیجه وزن مولکولی افزایش و توزیع باندها در ابتدای ژل افزایش می‌یابد و باعث ظاهر شدن تدریجی یک باند کشیده، وسیع و متراکم در ابتدای ژل متراکم‌کننده که مربوط به اجزاء با وزن مولکولی بالای تشکیل شده در طی واکنش مایلارد می‌باشد، می‌شود. نتایج حاصل از الگوی الکتروفورز با گزارشات بدست آمده از سایر محققین مطابقت دارد، Aminlari و همکاران (۲۰۰۵) با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری مخلوط لیزوزیم با دکستران از زمان صفر تا یک هفته، Yadav و همکاران (۲۰۱۰) با کانژوگه کردن پروتئین‌های شیر و فیبر ذرت در زمان‌های ۲ تا ۷ روز و O'Regan و Mulvihill (۲۰۱۰) طی کانژوگه کردن پروتئین‌های کازئین با مالتودکسترین، مشاهده کردند که با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری ناپدید شدن تدریجی باندهای پروتئینی اصلی مشاهده می‌شود و همزمان باندهای جدید، تیره و وسیع با وزن ملکولی بالای کانژوگه‌ها در بالای ژل جداکننده ایجاد می شود .

نتایج کروماتوگرافی

کروماتوگرام[2] پروتئین‌های خالص سویا و کانژوگه‌ها در زمان‌های مختلف گرمخانه‌گذاری در شکل ۲ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود، پروتئین‌های سویای طبیعی دو پیک عمده را نشان می‌دهد که مربوط به اجزای پروتئینی 7S و 11S می‌باشد در صورتیکه که کانژوگه‌ها یک پیک پهن را نشان می‌دهد که این حاکی از تشکیل کمپلکس‌های با وزن ملکولی بالا و متنوع پروتئین-مالتودکسترین می‌باشد. کروماتوگرام بدست آمده نتایج حاصل از الکتروفورز را تأیید می‌کند.



شکل ۲- کروماتوگرام پروتئین‌های سویا و کانژوگه‌ها

در یک مخلوط پروتئینی ملکول‌های کوچک وارد منافذ رزین شده و به آرامی خارج می‌شود در حالی که ملکول‌های بزرگتر قادر به نفوذ به منافذ رزین نبوده و با سرعت بیشتری از ستون خارج می‌شود (Aminlari *et al* 2005, Qi *et al*, 2009). از آنجا که کانژوگه‌ها بزرگتر می‌باشند در ابتدای کار از ستون خارج می‌شوند، بنابراین منحنی خروج آنها به سمت چپ نمودار منتقل می‌شود، از طرفی به دلیل نزدیک بودن وزن ملکولی گلیکوکانژوگه‌های سنگین تشکیل

1 Glycation degree

2 Chromatogram

شده در طی واکنش مایلارد، منحنی خروج آنها با پروتئین‌های گلیکوزیله نشده همپوشانی نشان داده و تقریباً به صورت یک پیک پهن گسترده مشاهده می‌شود. نتایج مشابهی نیز توسط Aminlari و همکاران (۲۰۰۵)، Qi و همکاران (۲۰۰۹)، Nakamura و همکاران (۱۹۹۲) بدست آمده است.

تعیین پایداری حرارتی با استفاده از DSC

پارامترهای استخراج شده از DSC نمونه پروتئین‌های سویای شاهد و گلیکوکانژوگه‌ها به شرح جدول ۱ می‌باشد. DSC بطورگسترده‌ای برای بررسی ویژگی‌های حرارتی پروتئین‌ها، از جمله دمای واسرشت شدن حرارتی و دمای انتقال شیشه‌ای بکار می‌رود (Tang *et al*, 2007).

جدول ۱- ویژگی‌های DSC پروتئین‌های سویای شاهد و کانژوگه‌ها

نمونه ها	پیک اول بتا کان گلی سینین (7S)		پیک دوم گلی سینین (11S)	
	T_d(°C)	ΔH(J/g)	T_d(°C)	ΔH(J/g)
پروتئین های سویای خالص	۷۳/۱ ± ۱/۰۵^{d}	۳ ± ۰/۰۸^{a}	۸۸/۹ ± ۱/۱۵^{d}	۴/۲ ± ۰/۰۴^{a}
کانژوگه ۱ روز گرمخانه‌گذاری شده	۷۵/۵ ± ۱/۳۵^{c}	۲/۶ ± ۰/۰۴^{b}	۹۱/۷ ± ۰/۹۸^{c}	۳/۷ ± ۰/۰۶^{b}
کانژوگه ۳ روز گرمخانه‌گذاری شده	۷۷/۳ ± ۱/۱۵^{b}	۲/۶ ± ۰/۰۷^{b}	۹۳/۱۵ ± ۱/۳۲^{b}	۳/۳ ± ۰/۰۸^{c}
کانژوگه ۵ روز گرمخانه‌گذاری شده	۷۷/۸ ± ۱/۱۱^{b}	۲/۵ ± ۰/۰۵^{b}	۹۵/۱ ± ۱/۰۱^{a}	۲/۷ ± ۰/۰۴^{d}
کانژوگه ۷ روز گرمخانه‌گذاری شده	۷۹/۶ ± ۱/۴۷^{a}	۲/۳ ± ۰/۰۶^{c}	۹۵/۶ ± ۱/۲۳^{a}	۲/۶ ± ۰/۰۵^{d}

*اعداد موجود در جدول میانگین سه تکرار± انحراف معیار و حروف نامشابه در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف آماری معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.

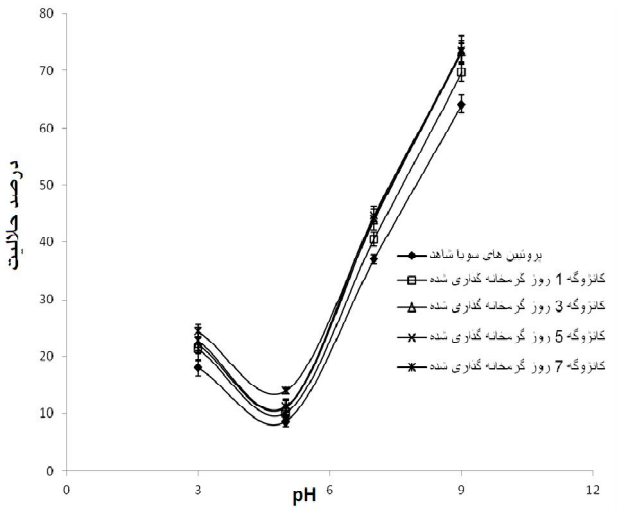
ترموگرام[1] DSC برای پروتئین‌های سویای خالص شده دو پیک اندوترمیک کاملاً واضح را نشان می دهد که نشان دهنده پروتئین‌های مختلف با دمای واسرشت شدن متفاوت می‌باشد که متعلق به واسرشت شدن بتاکان گلی‌سینین در دمای کمتر (۷۳/۱°C) و گلی سینین در دمای بالاتر (۸۸/۹ °C) می باشد، نتایج بدست آمده با گزارش Tang و همکاران (۲۰۰۷) مشابهت دارد. همانطور که مشاهده می‌شود، با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری دمای دناتوراسیون اجزای پروتئینی سویا افزایش می‌یابد، Liu و همکاران (۲۰۱۲) با کانژوگه کردن پروتئین‌های بادام زمینی و دکستران مشاهده کردند با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری، دمای دناتوراسیون نیز افزایش می‌یابد. دمای واسرشت شدن بالاتر، گویای افزایش پایداری حرارتی پروتئین‌ها یا پایداری ساختار سوم در حالت گلیکوزیله شده در مقایسه با شاهد می‌باشد، با اتصال کووالانسی پلی‌ساکارید هیدروفیل و باردار به پروتئین، اتصالات هیدروژنی و الکتروستاتیک در ساختار سوم و چهارم پروتئین بیشتر شده و ساختار سوم پایدارتر می‌شود و در نتیجه دمای واسرشت شدن افزایش می‌یابد (Liu *et al*, 2012, Tang *et al*, 2007).

[1] DSC thermograms

بررسی تأثیر گلیکوزیله شدن بر حلالیت پروتئین‌ها

یکی از پارامترهای مؤثر در حلالیت پروتئین‌ها، pH محیط است که با تغییر آن، حلالیت پروتئین‌ها می‌تواند به میزان زیادی تغییر کند (Abtahi and Aminlari, 1997). نمودار معمول تغییر حلالیت پروتئین‌های سویا در مقابل تغییرات pH محیط به صورت یک منحنی U شکل است و پایین‌ترین نقطه این منحنی بین مقادیر pH ۴ و ۵ می باشد که نشان‌دهنده نقطه ایزوالکتریک پروتئین‌های سویا در این محدوده می‌باشد (Babiker *et al*, 1998). با گلیکوزیله کردن پروتئین‌های سویا مطابق شکل ۳، مشاهده می‌شود که حلالیت در تمامی pHها نسبت به نمونه کنترل بطور معناداری افزایش می‌یابد.

Chiu و همکاران (۲۰۰۹) و Liu و همکاران (۲۰۱۲)، نیز نتایج مشابهی مبنی بر بهبود حلالیت پروتئین‌ها با کانژوگه شدن مشاهده کردند. کانژوگه شدن با پلی‌ساکارید هیدروفیل و آبدوست، ارتباط[2] بین پروتئین و ملکول آب را بهبود می‌بخشد و در نتیجه باعث افزایش حلالیت پروتئین می‌شود (Babiker *et al*, 1998, Chiu *et al*, 2009, Liu *et al*, 2012)



شکل ۳- درصد حلالیت پروتئین‌های سویای شاهد و کانژوگه‌ها در pHهای مختلف

بررسی تأثیر گلیکوزیله شدن بر خصوصیات امولسیفایری

نتایج حاصل از فعالیت امولسیفایری و پایداری امولسیون در جدول ۲ گزارش شده است، همانطور که مشاهده می‌شود، کانژوگه شدن باعث بهبود خصوصیات امولسیفایری می‌شود و با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری و پیشرفت کانژوگه شدن، روند بهبود این خصوصیات بیشتر می‌شود. نتایج مشابهی توسط Liu و همکاران (۲۰۱۲)، با کانژوگه کردن پروتئین‌های بادام زمینی و دکستران و Diftis و Kiosseoglou (۲۰۰۳)، با کانژوگه کردن پروتئین‌های سویا و

2 Affinity

کربوکسی متیل سلولز گزارش شد. بالاتر بودن خصوصیات امولسیفایری گلیکوکانژوگه‌ها می‌تواند به دلیل تأثیر همزمان خصوصیات خوب امولسیفایری پروتئین و پایدارکنندگی پلی‌ساکارید در یک ملکول باشد که از جدا شدن چربی جلوگیری کرده و در نتیجه فعالیت امولسیفایری بهبود می‌یابد (Chiu *et el*, 2009, Diftis and Kiosseoglou, 2003). پروتئین‌ها در لایه بین سطحی آب و روغن[1] جذب شده تا یک لایه پیوسته ویسکوالاستیک را تشکیل دهد، در حالی که پلی‌ساکاریدها پایداری کلوئید را بواسطه خصوصیات قوام‌دهندگی[2] و ژله‌کنندگی[3] در فاز آبی، افزایش می‌دهند، بنابراین کانژوگه‌های پروتئین- پلی ساکارید خصوصیات خوب امولسیفایری را از خود نشان می‌دهد (Kato, 2002).

بررسی تأثیر گلیکوزیله شدن بر خصوصیات کف‌کنندگی

مطابق نتایج ارائه شده در جدول ۲ اختلاف آماری معنی‌داری بین پروتئین‌های شاهد و کانژوگه در ظرفیت کف‌کنندگی و پایداری کف وجود دارد که با گزارش‌های Liu و همکاران (۲۰۱۲)، Al-hakkak (۲۰۱۰)، Achouri و همکاران (۲۰۰۵)، مشابهت دارد. ظرفیت کف‌کنندگی بالابه توانایی حلالیت[4] (پخش‌پذیری) پروتئین بستگی دارد (Liu *et al*, 2012). همانطور که در نمودار ۳ مشاهده شد، پروتئین‌های گلیکوزیله شده در مقایسه با شاهد حلالیت بیشتری دارد پس با سرعت بیشتری به لایه بین سطحی مهاجرت کرده، بنابراین ظرفیت کف‌کنندگی بالاتری مشاهد می‌شود. بعلاوه مالتودکسترین، یک کربوهیدرات هیدروفیل است که می‌تواند پایداری کف پروتئینی را از طریق عمل کردن به‌عنوان یک عامل قوام‌دهنده، افزایش دهد و با افزایش ویسکوزیته بخش مایع باعث افزایش پایداری کف شود (Achouri *et al*, 2005, Liu *et al*, 2012).

نتیجه گیری

در این مطالعه پروتئین های سویا از طریق واکنش مایلارد اصلاح گردید و مطابق نتایج بدست آمده، واکنش طبیعی مایلارد موجب بهبود مقاومت حرارتی و خصوصیات عملکردی پروتئین‌های سویا شد. نوع کربوهیدرات و شرایط واکنش بر میزان و پیشرفت کانژوگه شدن و در پی آن بهبود خصوصیات عملکردی موثر است و کانژوگه کردن با مالتودکسترین به عنوان منبع کربوهیدراتی ارزان قیمت، در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و pH: ۸ و زمان ۷ روز می‌تواند باعث بهبود ویژگی‌های عملکردی و مقاومت این پروتئین‌ها گردد.

جدول ۲- خصوصیات امولسیفایری و کف‌کنندگی پروتئین‌های سویای شاهد و کانژوگه‌ها

نمونه ها	خصوصیات امولسیفایری			خصوصیات کف کنندگی	
	فعالیت امولسیفایری (A_{500})	پایداری امولسیون(min)	ظرفیت کف کنندگی (ml)	پایداری کف(ml)
پروتئین های سویای خالص	۰/۴۷±۰/۰۳^{d}	۶/۴۴±۰/۲۷^{c}	۱۲/۳۸±۱/۳۳^{d}	۷/۶۶ ±۰/۷۱^{d}
کانژوگه ۱ روز گرمخانه‌گذاری شده	۰/۶۰±۰/۰۴^{c}	۷/۵۱±۰/۱۳^{b}	۱۳/۸۶±۱/۵۶^{c}	۱۱/۱۷±۱/۱۳^{c}
کانژوگه ۳ روز گرمخانه‌گذاری شده	۰/۶۱±۰/۰۵^{c}	۸/۰۲±۰/۴۱^{a}	۱۳/۲۵±۱/۷۱^{c}	۱۳/۰۲±۰/۸۴^{b}
کانژوگه ۵ روز گرمخانه‌گذاری شده	۰/۸۸±۰/۰۵^{b}	۸/۲۳±۰/۲۵^{a}	۱۵/۱۷±۱/۳۹^{b}	۱۳/۱۵±۱/۰۱^{b}
کانژوگه ۷ روز گرمخانه‌گذاری شده	۱/۰۴±۰/۰۷^{a}	۸/۴۶±۰/۱۷^{a}	۱۶/۶۳± ۱/۴۵^{a}	۱۴/۳۵ ±۰/۸۸^{a}

اعداد موجود در جدول میانگین سه تکرار± انحراف معیار و حروف نامشابه در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف آماری معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می باشد.

1 Oil-water interface
2 Thickening
3 Gelation
4 Dispersing ability

منابع

بوستانی، س.، امینلاری، م.، موسوی نسب، م.، ۱۳۹۵، بهبود فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های سویای رسوب یافته با اسید از طریق کانژوگه شدن با مالتودکسترین با استفاده از واکنش مایلارد، فصلنامه علوم و صنایع غذایی، ۱۳، ۹۳-۱۰۲.

مولایی فر، م.ح.، امینلاری، م.، نیاکوثری، ن.، بوستانی، س.، ۱۳۹۵، تأثیر تیمار مایکروویو بر میزان گلیکوزیله شدن کانژوگه‌های حاصل از واکنش مایلارد لیزوزیم- مالتودکسترین، فصلنامه علوم و صنایع غذایی، ۱۳، ۱۰۵-۱۱۳.

Abtahi, S. and Aminlari, M. 1997. Effect of sodium sulfite, sodium bisulfite, cysteine, and pH on protein solubility and Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of soybean milk base. Journal of Agricultural and *Food Chemistry*,45: 4768-4772.

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.

Achouri, A. Boye, J. I. Yaylayan, V. A and Yeboah, F. K. 2005. Functional properties of glycated soy 11S glycinin. *Journal of Food Science*, 70: 269-274.

Al-hakkak, J. and Al-hakkak, F. 2010. Functional egg white–pectin conjugates prepared by controlled Maillard reaction. *Journal of Food Engineering*, 100: 152–159.

Appiah F., Asibuo J.Y and Kumah P. 2011. Physical and functional properties of bean flours of three cowpea (Vigna unguiculata L. walp) varieties in Ghana. *African J. of Food Science*. 5(2): 100-104.

Babiker, E. Hiroyuki, A. Matsudomi, N. Iwata, H. Ogawa, T. Bando, N. and Kato, A. 1998. Effect of polysaccharide conjugation or transglutaminase treatment on the allergenicity and functional properties of soy protein. Journal of *Agricultural and Food Chemistry*, 46: 866-871.

Chiu T. Chen, M. and Chang, H. 2009. Comparisons of emulsifying properties of maillard reaction products conjugated by green, red seaweeds and various commercial proteins. *Food Hydrocolloids*, 23: 2270–2277.

Damodaran, S. 1996. Amino Acids, Peptides and Proteins. In: Food Chemistry, 3rd ed.; Fennema, O. R., Ed.; Dekker: *New York*. 321-330.

Diftis, N. and Kiosseoglou, V. 2003. Improvement of emulsifying properties of soybean protein isolate by conjugation with carboxymethyl cellulose. Food Chemistry, 81: 1–6.

Endres, J. G. 2001. Soy protein products characteristics, nutritional aspects, and utilization. AOAC Press, *Champaign* IL. 16-30.

Gan, C.Y. Cheng, L.H. and Easa, A.M. 2008. Assessment of Maillard reaction and cross-linking in transglutaminase-cross-linked powdered soy protein isolate gel. *Food Research International*. Communicating.

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

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

Kinsella, J. E. 1976. Functional properties of food proteins: a rview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 7:219-280.

Kilara, A. and Sharkasi, T.Y. 1986. Effect of temperature on food protein. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 23: 323-395.

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

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.

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

Lowry, O. H., Rosembroug, H. J., Lewis, A., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 19, 265–275.

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

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

Nakamura, S., Kato, A., and Kobayashi, K. 1992. Bifunctional lysozymegalactomannan conjugate having excellent emulsifying properties and bactericidal effect. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40:735–739.

Oliver, C. M. Stanley, R. A. and Melton, L. D. 2006. Creating proteins with novel functionality through the maillard reaction. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46: 337-350.

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

Pearce, K. M. and Kinsella, J. E. 1978. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimeric technique.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 26: 716-723.
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.
Tang, C. Choi, S. and Ma, C. 2007. Study of thermal properties and heat-induced denaturation and aggregation of soy proteins by modulated differential scanning calorimetry, *International Journal of Biological Macromolecules*, 40: 96–104.
Van de Lagemaat, J. Manuel Silván, J. Javier Moreno, F. Olano, A. and Dolores del Castillo, M. 2007. In vitro glycation and antigenicity of soy proteins. *Food Research International*, 40: 153–160.
Van Boekel, M. A. J. S. 2001. Kinetic aspects of the Maillard reaction: *A critical review*. Nahrung, 45: 150-159.
Wang, Q. and Ismail, B. 2012. Effect of Maillard-induced glycosylation on the nutritional quality, solubility, thermal stability and molecular configuration of whey protein. *International Dairy Journal*, 25: 112-122.
Xu, C.H. Yang, X.Q. Yu, S.J. Qi, J.R. Guo, R. Sun, W.W. Yao, Y.J. and Zhao, M.M. 2010. The effect of glycosylation with dextran chains of differing lengths on the thermal aggregation of β-conglycinin and glycinin, *Food Research International* 43: 2270–2276.
Yadav, M.P. Parris, N. Johnston D.B. Onwulata, C.I and Hicks, K.B. 2010. Corn fiber gum and milk protein conjugates with improved emulsion stability, *Carbohydrate Polymers*, 81: 476–483.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 12, No. 4, Oct- Nov 2016, p. 453-462

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۲، شماره ۴، مهر - آبان ۱۳۹۵، ص. ۴۶۲-۴۵۳

Physicochemical and functional properties of acid precipitated soy proteins-maltodextrin conjugates

S. Boostani [1], M. Moosavi-nasab [2]*, M. Aminlari [2&3], M. Niakosari[4], GH. R. Mesbahi[5]

Received: 2014.06.11
Accepted: 2014.11.05

Introduction: Soybean is an excellent plant protein source with diverse applications in food systems. Despite numerous commercial applications and rich nutritional properties of soybeans, soy proteins are sensitive to heat and other damaging agents during food processing which can limit their applications in food industries. Maillard reaction includes a series of chemical reactions between the free carbonyl groups of carbohydrates and the un-protonated amino groups of proteins under mild experimental conditions. This is one of the most desirable approaches for applying in food systems, because of the safety of the procedure and the independency of adding extra chemicals. Natural occurring Maillard reaction can be a relatively safe and inexpensive method in order to improve functionalities of food proteins. The production of conjugates haspositive influences on food proteins functionality such as solubility, water holding capacity, emulsion activity and stability, foaming properties, thermal stability, whipping ability, textural and gelation properties and also reduce allergenicity of proteins. Due to the positive characteristics and reasonable price of both soy proteins and maltodextrin in food industries, the aim of current study was to enhance the heat stability and functional properties of soy proteins through glycosylation with maltodextrin. In addition, assessment of changes in protein properties as a function of incubation time were evaluated

Materials and methods: Preparation of purified soy proteins (Acid precipitated soy proteins) was done by a multistage process of washing, centrifugation, dialysis and freeze drying. The resulting powder contained pure soy globulins. Conjugation of acid precipitated soy proteins with maltodextrin was performed according to the method described as follows: protein-polysaccharide at a weight ratio of 1: 3 were dissolved in 0.01 M phosphate buffer, at pH values of 8, and were incubated at ambient temperature for 1 hr. Solutions were frozen at –80°C and then freeze dried. Lyophilized powders were incubated at 60 °C for 1, 3, 5 and 7 days, under 79% of relative humidity provided by saturated KBr. For each treatment an un-conjugated (control) sample was prepared under the same conditions. The formation of protein-polysaccharide conjugates was confirmed by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and gel filtration chromatography (Sephadex G-100 chromatographic system was used to separate the conjugated proteins from the un conjugated samples). Determination of protein denaturation temperature changes were carried out using METTLER TA Q100-DSC thermal analyser.The emulsifying properties of the samples including emulsifying activity and emulsion stability were assessed according to the procedure established by Pearce and Kinsella. Protein solubility was measured by calculating the amount of nitrogen in the supernatant and total nitrogen content of the samples and reported as percentage of protein solubility at pH 3, 5, 7 and 9. Foaming properties of the samples including foaming capacity and foaming stability were determined using calibrated measuring cylinder

Discussion & Results: When the heating duration is increased, wider and heavier molecular weight bands emerge near the top of the running gel of SDS-PAGE, and yet these were not observed in the control. As a result of conjugation, the protein-carbohydrate covalent binding occurs, producing heavier molecular weight species, and thus leading to its accumulation on top of the separating gel. Compared with un-modified soy proteins, the conjugated soy proteins eluted in the void volume of G-100 gel permeation chromatography column, suggesting increase in the size and molecular weight of soy proteins due to the covalent attachment of maltodextrin. According to differential scanning calorimetry (DSC) analysis, thermal stability of soy proteins was remarkably increased by conjugation with maltodextrin and maximum denaturation temperature was observed for the mixture incubated for 7 days. The improved thermal stability is manifested in increase in denaturation temperature of globular proteins, hence conjugation leads to significant improvement of soy proteins stability.

1,4 and 5. Ph.D candidate, Associate professor and Assistant professor Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.
2. Professor, Department of Food Science and Technology and Sea Food Processing Research Group, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.
2&3. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture and Department of Biochemistry, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran.
(*-Corresponding Author Email: aminlari@shirazu.ac.ir)

Increase in thermal stability is the result of inclusion of the hydrophilic carbohydrate moiety to the surface of the proteins. Compared to control sample, the solubility, foaming characteristics and emulsifying properties were significantly improved by increasing incubation time. The protein solubility of conjugate remarkably increased at all pH's compared with the un-conjugated proteins. Covalent links between hydrophilic maltodextrin and soy proteins could enhance the reaction tendency between proteins and water molecules under unfavorable conditions. Improvements in the emulsifying properties of the conjugated samples can be explained by the fact that there is a combination among the emulsifying activity of proteins and the stabilizing impacts of polysaccharides per molecule. Foaming capacity of proteins can be affected by the solubility of proteins. Furthermore, maltodextrin is a hydrophilic carbohydrate which can improve the stability of soy proteins foams by acting as a thickener, thus increasing the strength of bubbles. It should also be considered that functionality of proteins are frequently influenced by protein solubility, and this could also serve the understanding of why improvements occur in functional properties of conjugated proteins, compared to un-conjugated ones. The results indicate that physiochemical and functional properties of soy proteins were modified and improved by conjugation with maltodextrin.

Keywords: Conjugate, Functional properties, Heat stability, Soy proteins