نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۲، شماره ۴، مهر- آبان ۱۳۹۵، ص. ۵۳۲-۵۲۶

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 12, No. 4, Oct- Nov 2016, p. 526-532

کوتاه پژوهشی

بهینه‌سازی میزان کانژوگه شدن پروتئین‌های ایزوله سویا با دکستران در شرایط مختلف واکنش مایلارد

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

تاریخ دریافت:۱۳۹۳/۰۶/۰۴
تاریخ پذیرش:۱۳۹۴/۰۲/۲۱

چکیده

میزان کانژوگه شدن از عوامل مهم در بهبود عملکرد و پایداری حرارتی پروتئین‌های اصلاح شده از طریق واکنش طبیعی مایلارد می‌باشد. لذا در این مطالعه پروتئین‌های ایزوله سویا و دکستران تحت شرایط مختلف واکنش مایلارد در pHهای۷ و ۸/۵، دماهای ۴۰، ۶۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد، زمان‌های مختلف برای هر تیمار و رطوبت نسبی ۷۹٪ قرار گرفتند و تشکیل کانژوگه‌های پروتئین- پلی‌ساکارید با دو روش اسپکتوفتومتری OPA و میزان جذب UV با یکدیگر مقایسه و بررسی شدند. اندازه‌گیری میزان کانژوگه شدن با روش OPA (Ortho-phthaldialdehyde) نشان داد که افزایش دما، زمان و pH گرمخانه‌گذاری موجب افت بیشتری در میزان گروه‌های آمینی آزاد شده و در نتیجه میزان کانژوگه شدن افزایش می‌یابد. بالاترین میزان گانژوگه شدن در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، pH=۸/۵ و زمان ۸ روز مشاهده شد. اندازه‌گیری میزان جذب ترکیبات حدواسط حاصل از واکنش مایلارد در طول موج ۲۹۴ نانومتر نتایج حاصل از روش OPA را تأیید کرد. نتایج تحقیق نشان می‌دهد که روش OPA و میزان جذب UV دو روش ساده، مناسب و با کارایی تقریباً مشابه جهت بررسی میزان کانژوگه شدن طی واکنش مایلارد می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: گرمخانه‌گذاری، جذب UV، روش OPA، میزان کانژوگه شدن

مقدمه

پروتئین‌های غذایی با وجود دارا بودن ارزش تغذیه‌ای بالا و خصوصیات عملکردی منحصر به فرد در مقابل حرارت، حلال‌های آلی و حملات آنزیمی، شیمیایی و فیزیکی بسیار حساس می‌باشند، لذا تحقیقات گسترده‌ای در زمینه‌ی طراحی پروتئین‌ها با خصوصیات عملکردی بهبودیافته، مقاومت بیشتر به حرارت و سایر عوامل آسیب‌رسان، خلق خصوصیات جدید و از بین بردن خصوصیات نامطلوب صورت گرفته است (Liu *et al,* 2012). روش‌های متفاوتی برای بهبود خصوصیات عملکردی پروتئین‌ها با استفاده از اصلاح‌های شیمیایی، فیزیکی و آنزیمی وجود دارد. این در حالیست که محققین صنایع غذایی همیشه به دنبال بهترین گزینه برای اصلاح پروتئین‌ها می‌باشند، بنابراین روش‌های اصلاح طبیعی در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است و یکی از راه‌های طبیعی اصلاح پروتئین‌های غذایی، واکنش بین پروتئین‌ها با پلی‌ساکارید ها می‌باشد، از جمله این اتصالات واکنش مایلارد می‌باشد (Liu *et al*, 2012; Oliver *et al*, 2006; Kato, 2002).

واکنش مایلارد در نتیجه اتصال کوالانسی بین گروه‌های آمینی آزاد پروتئین و انتهای کربونیلی پلی‌ساکارید رخ می‌دهد و منجر به تغییرات مطلوبی در پروتئین‌های غذایی می‌شود (Oliver *et al*, 2006; Kato, 2002). هیبریدهای بیوپلیمری در نتیجه حرارت‌دهی مخلوط پروتئین-پلی ساکارید تحت شرایط کنترل‌شده تشکیل می‌شوند و تأثیرات مثبتی بر پروتئین‌های غذایی دارد، به‌عنوان مثال باعث بهبود خصوصیات عملکردی پروتئین‌ها از جمله خصوصیات حلالیت، جذب آب، خصوصیات کف‌کنندگی و امولسیفایری می‌شود، خصوصیات بافتی بهبود می یابد و پایداری حرارتی نیز بیشتر می شود (Amiri *et al*, 2008; Alahdad *et al*, 2009; Kato *et al*, 1992). بعلاوه خصوصیاتی چون فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فعالیت ضدسرطانی و ضدجهش‌زایی و خصوصیات ضدمیکروبی نیز افزایش می‌یابد (Amiri*et al*, 2008; Lertittikul*et al*, 2007; Oliver *et al*, 2006؛ بوستانی و همکاران، ۱۳۹۵).

میزان کانژوگه شدن از مهمترین عوامل در تعیین عملکرد واکنش

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)

مایلارد صورت گرفته به منظور اصلاح پروتئین می‌باشد و عوامل مختلفی بر میزان اتصال پروتئین به پلی‌ساکارید موثر است، از جمله: دما، pH، نسبت و نوع گروه‌های آمینی به قند، فعالیت آبی محیط، زمان، نوع پروتئین و پلی‌ساکارید شرکت‌کننده در واکنش و غیره می‌باشد. برای بدست آوردن نتایج مطلوب و بهبود خصوصیات عملکردی پروتئین‌ها بایستی بهترین شرایط را جهت واکنش مایلارد انتخاب نمود (Oliver *et al*, 2006; Van Boekel, 2001). روش‌های مختلفی برای تعیین پیشرفت کانژوگه شدن وجود دارد از جمله این تکنیک‌ها می‌توان به الکتروفورز SDS-PAGE[1]، اسپکتروسکوپی FT-IR[2]، کروماتوگرافی[3]، انواع روش‌های رنگ سنجی با استفاده از اسپکتوفتومتر[4] و غیره را نام برد (Oliver *et al*, 2006).

تحقیقات متعددی در رابطه با بهبود پایداری حرارتی و خصوصیات عملکردی پروتئین‌ها با استفاده از واکنش مایلارد صورت گرفته است. در حالی که در زمینه بررسی عوامل مختلف تأثیرگذار بر پیشرفت این واکنش و روش‌های مختلف تعیین میزان کانژوگه شدن مستندات کمی موجود است. بنابراین هدف این تحقیق کانژوگه کردن پروتئین‌های ایزوله سویا و دکستران در شرایط مختلف واکنش مایلارد می‌باشد و در ادامه پیشرفت کانژوگه شدن با استفاده از روش‌های جذب‌سنجی اسپکتروسکوپی[5] مقایسه و بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مواد

ایزوله پروتئینی سویا[6] ساخت چین و دکستران[7] با وزن ملکولی ۶۴۰۰۰-۷۶۰۰۰ دالتون (از شرکت سیگما آمریکا) تهیه شد و سایر مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکت‌های معتبر تأمین‌کننده مواد آزمایشگاهی تهیه و مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه هیبریدهای پروتئین‌های سویا-دکستران

کانژوگه کردن پروتئین‌های ایزوله سویا در شرایط حرارت خشک انجام گرفت، بدین صورت که ابتدا پروتئین‌های سویا و دکستران به نسبت ۱ به ۴ در محلول بافر با pHهای ۷ و ۸/۵، تهیه و کاملاً مخلوط شدند، سپس نمونه‌ها در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منجمد شدند و توسط خشکن انجمادی[8] به پودر تبدیل شدند. پودرهای حاصله در دسیکاتور[9] با دما و زمان‌های مختلف در حضور برمید پتاسیم اشباع (رطوبت نسبی ۷۹٪) قرار گرفت تا واکنش مایلارد انجام شود. یک نمونه به‌عنوان شاهد که حاوی ترکیبات پروتئینی بدون پلی‌ساکارید است نیز در نظر گرفته شد، حالات مختلف بدین صورت بود که گرمخانه‌گذاری (آون Galenkamp مدل IH-100 انگستان و آون ISUZU مدلKM235 ژاپن) در دماهای ۴۰، ۶۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد و به ترتیب در زمان‌های: ۰، ۴، ۸ و ۲۴ ساعت، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۲ روز در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد، ۰، ۱، ۲، ۳، ۴، ۶ و ۸ روز در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و ۰، ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد، پیشرفت کانژوگه شدن نمونه‌ها با دو روش متفاوت جذبی اندازه‌گیری و مقایسه شدند.

تعیین میزان کانژوگه شدن با روش OPA[10]

برای بررسی میزان گروه‌های آمینی آزاد پروتئین از روش ارزیابی اسپکترومتری O-فتال دی آلدهید (OPA) استفاده شد. محلول OPA به‌صورت روزانه از مخلوط کردن ۲۵ میلی‌لیتر محلول ۱۰۰ میلی‌مولار تتراهیدروبورات و ۲/۵ میلی‌لیتر محلول ۲۰٪ وزنی/وزنی سدیم دودسیل سولفات و ۴۰ میلی‌گرم OPA (که در ۱ میلی‌لیتر اتانول حل شده است) و ۱۰۰ میکرولیتر بتا مرکاپتواتانول بدست آمد که در نهایت با آب مقطر به حجم نهایی ۵۰ میلی‌لیتر رسید. برای ارزیابی میزان گروه‌های آمینی آزاد، حدود ۵۰-۱۰۰ میکرولیتر از نمونه محلول به ۱ میلی‌لیتر از واکنشگر OPA درون یک کووت کوارتز[11] ۱/۵ میلی‌لیتری اضافه شد. محلول حاصله به آرامی تکان داده و به مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس جذب آن در طول موج ۳۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد و درصد جایگزینی (یا درصد کانژوگه شدن) مطابق فرمول زیر محاسبه شد (Nielsen *etal*, 2001). A_T ,A_0، به ترتیب میزان جذب نمونه قبل و بعد از گرمخانه‌گذاری در هر زمان تیمار می‌باشد.

$$\text{Conjugation degree (\%)} = (A_0\text{-}A_T/A_0)\times 100 \quad (1)$$

تعیین میزان کانژوگه شدن با اندازه‌گیری جذب UV

اندازه‌گیری میزان جذب در ناحیه UV مطابق روش Lertittikul و همکاران (۲۰۰۷) و با کمی تغییرات انجام شد. ابتدا نمونه‌ها به غلظت ۰/۲ درصد پروتئین در SDS ۱ درصد تهیه شدند و سپس میزان جذب در طول موج ۲۹۴ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر

1 Sodium-dodecyl-sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)
2 Fourier transform infrared spectroscopy
3 Chromatography
4 Spectrophotometer
5 Absorption spectroscopy methods
6 Soy protein isolate (SPI) (Pingdingshantianjing plant albumen CO.,LTD)
7 Dextran

8 Lyophilized
9 Desiccator
10 O-Phthaldialdehyde Assay
11 Quartz cuvette

مجهز به لامپ فرابنفش[1] خوانده شد. عدد ثبت شده به‌عنوان معیاری از میزان کانژوگه‌شدن محسوب شد و افزایش میزان جذب نشان از تشکیل بیشتر کانژوگه‌ها می‌باشد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

به‌منظور آنالیز آماری داده‌ها و بررسی اطلاعات به‌دست 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. به‌منظور تعیین وجود اختلاف بین میانگین اعداد (سه تکرار هر آزمایش)، از آنالیز واریانس و برای گروه‌بندی آنها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۰/۰۵ استفاده شد. در تمام مراحل، تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS صورت پذیرفت.

نتایج و بحث

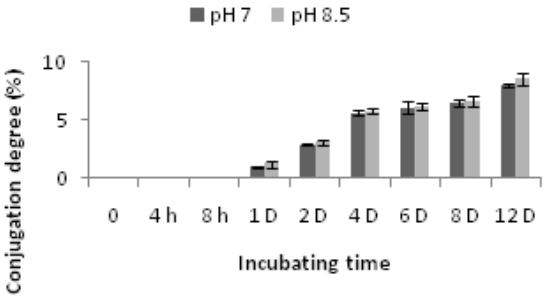
میزان یا درصد گلیکوزیله شدن از مهمترین خصوصیات فیزیکوشیمیایی پروتئین‌های کانژوگه شده است به این علت که بطور مستقیم بر خصوصیات عملکردی پروتئین‌ها تأثیر می‌گذارد. تحت هر شرایط واکنش مایلارد، میزان گلیکوزیله شدن تحت تأثیر فاکتورهای مختلفی از جمله دمای واکنش، زمان و pH قرار می‌گیرد. اغلب اوقات تغییرات بدین صورت است که با افزایش وزن ملکولی پروتئین‌های کانژوگه شده در مقایسه با غیرکانژوگه‌ها همراه است. روش‌های مختلفی برای تشخیص میزان تغییرات وجود دارد. در این بخش اندازه‌گیری میزان کانژوگه شدن با دو روش OPA و جذب UV مقایسه و بررسی خواهد شد.

میزان کانژوگه شدن با روش OPA

گروه‌های فعال موجود در پروتئین‌ها مثل گروه‌های آمینی[2]، کربوکسیل[3]، سولفیدریل[4]، فنولیک[5]، تیواتر[6] و گوانیل[7] قادر به انجام واکنش با عوامل شیمیایی مختلف می‌باشند. بعضی از این واکنش‌ها قادر به تشخیص آبدوست یا آبگریز ملکول و همچنین خصوصیات عملکردی پروتئین یا پپتید می‌باشند و برخی دیگر قادر به تخمین میزان آمینواسید و یا گروه خاصی در آمینواسید می‌باشند. واکنش با OPA از جمله واکنش‌هایی است که به‌منظور اندازه‌گیری کمی آمینواسید بکار می‌رود. در این واکنش آمینو اسید با O-فتال دی آلدهید در حضور ۲-مرکاپتواتانول[8] واکنش داده و یک مشتق فلورسان[9] تولید می‌کند. جذب ترکیبات رنگی ایجاد شده در طول موج ۳۴۰ نانومتر خوانده می‌شود و با استفاده از روابطی به میزان گروه‌های آمینی آزاد تبدیل می‌گردد. روش OPA یکی از روش‌های متداول اندازه‌گیری میزان کانژوگه شدن با استفاده از واکنش مایلارد می‌باشد (Damodaran, 1996).

میزان کانژوگه شدن پروتئین های ایزوله سویا با دکستران در شرایط مختلف واکنش مایلارد در اشکال ۱-۳ نشان داده شده است.

همانگونه که مشاهده می‌شود نمونه‌های گرمخانه‌گذاری شده در۴۰°C(شکل ۱) و ۸۰°C (شکل ۳) در هر دو pH ۷ و ۸/۵، تعداد گروه‌های آمینی در طول گرمخانه‌گذاری کاهش قابل توجه‌ای نداشته و بنابراین میزان کانژوگه شدن در این نمونه‌ها کم می‌باشد. ناپدید شدن گروه‌های آمینی در ۶۰°C بیشتر از ۴۰ و ۸۰ °C می‌باشد (شکل ۲). درصد کانژوگه شدن در نمونه‌های گرمخانه‌گذاری شده در ۶۰°C و در pHهای ۷ و ۸/۵ ، در مقایسه با نمونه شاهد نشان می‌دهد که مقادیر گروه‌های آمینی آزاد در همه نمونه‌های کانژوگه شده کاهش یافته است و با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری محتوی گروه‌های آمینی آزاد کمتر می‌شود و بنابراین میزان کانژوگه شدن افزایش می‌یابد (Chevalier *et al*, 2001;Diftis and Kiosseoglou, 2006; Van de Lagemaat *et al*, 2007).



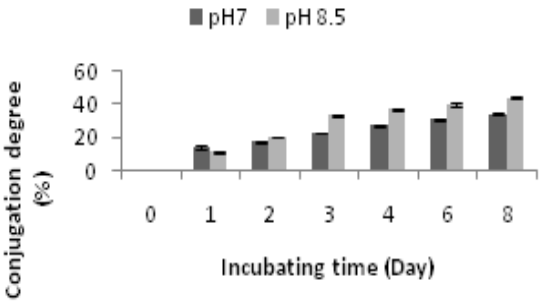
شکل۱- میزان کانژوگه شدن نمونه‌های گرمخانه‌گذاری شده در دمای ۴۰°C، pH=۷ و ۸/۵ و زمان‌های مختلف (هر ستون نمایانگر میانگین ±انحراف معیار برای سه تکرار می‌باشد)

نتایج گروه‌های آمینی آزاد تشکیل بهتر محصولات واکنش مایلارد[10] را در نمونه‌های گرمخانه‌گذاری شده در ۶۰°C و به ویژه در pH=۸/۵ را نشان می‌دهد (شکل ۲)، وقتی که پروتئین‌های سویا برای مدت ۸ روز در ۶۰°C و در pH=۸/۵ گرمخانه‌گذاری می‌شود، کاهش قابل توجهی در مقادیر گروه‌های آمینی آزاد پروتئین رخ

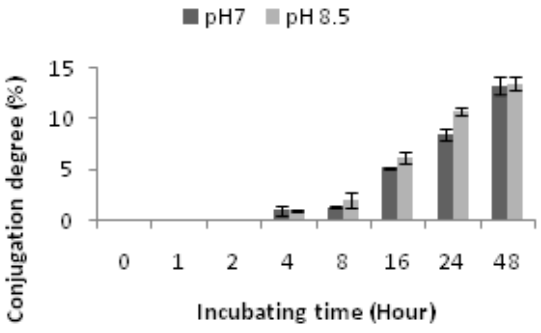
1Uv-visible spectrophotometer
2 Amino groups
3 Carboxyl
4 Sulfhydryl
5 Phenolic
6Thioether
7Guanyl

8 2-Mercaptoethanol
9 Fluorescent compound
10Maillard reaction products (MRP)

می‌دهد. درصد گلیکوزیله شدن در نمونه شاهد صفر و در این نمونه ۴۴/۲۳ درصد می‌باشد، بدین معنی که در این شرایط قسمت اعظم گروه‌های آمینی آزاد قابل اندازه‌گیری با این روش، با دکستران واکنش داده و گلیکوکانژوگه‌های سنگین را تولید می‌کند.



شکل ۲- میزان کانژوگه شدن نمونه‌های گرمخانه‌گذاری شده در دمای۶۰°C، pH=۷ و ۸/۵ و زمان های مختلف (هر ستون نمایانگر میانگین ±انحراف معیار برای سه تکرار می باشد)



شکل ۳ –میزان کانژوگه شدن نمونه‌های گرمخانه‌گذاری شده در دمای ۸۰ °C، pH=۷ و ۸/۵ و زمان های مختلف (هر ستون نمایانگر میانگین ±انحراف معیار برای سه تکرار می‌باشد)

میزان کانژوگه شدن با روش جذب UV

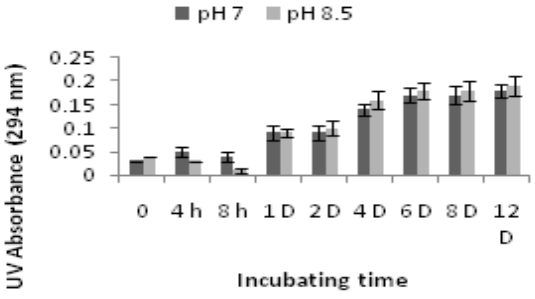
از دیگر روش‌های تشخیص و تخمین کمی میزان کانژوگه شدن تعیین میزان جذب ترکیبات در طول موج ناحیه UV می‌باشد. کینتیک جذب UV و زمان گرمخانه‌گذاری نمونه‌ها در اشکال ۴-۶ ارائه شده است. همانگونه که مشاهده می‌شود با افزایش pH میزان جذب در تمامی نمونه‌ها افزایش می‌یابد (pH ۸/۵ در مقایسه با pH ۷)، بعلاوه افزایش دما موجب افزایش میزان جذب می‌شود (دمای ۶۰°C در مقایسه با ۴۰ °C). نتایج حاصله در این بخش با نتایج گزارش شده توسط Ajandouz و همکاران (۲۰۰۸) مبنی بر افزایش میزان جذب UV با افزایش دما و pH در تشابه است، ایشان کانژوگه شدن گلوکز با پروتئین‌های سرم آلبومین گاوی و کازئین را مورد مطالعه و بررسی قرار دادند. افزایش زمان گرمخانه‌گذاری نیز موجب افزایش میزان جذب UV می‌شود.

Lertittikul و همکاران (۲۰۰۷) با کانژوگه کردن پروتئین پورسین پلاسما[1] و گلوکز، همچنین مولایی فر و همکاران (۱۳۹۵) با کانژوگه کردن لیزوزیم و مالتودکسترین با استفاده از تیمار مایکروویو[2] نتایج مشابهی مبنی بر افزایش میزان جذبUV با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری مشاهده کردند.

ترکیبات حد واسط[3] تولید شده طی واکنش مایلارد از جمله دی و پلی کربونیل[4] جذب بالایی در این ناحیهUV دارند. تشکیل بیشتر ترکیبات حاصل از واکنش مایلارد (MRP) در pHهای بالاتر تأیید می‌کند که تولید ترکیبات حد واسط در pHهای قلیایی مطلوبتر است. مطابق نتایج با افزایش زمان حرارت‌دهی میزان جذب درناحیه UVافزایش یافته و بالاترین میزان جذب در نمونه گرمخانه‌گذاری شده به مدت ۸ روز در ۶۰°C و در pH=۸/۵ مشاهده شد (شکل ۵).نتایج بدست آمده در این بخش تأییدی بر تعیین میزان کانژوگه شدن با روش OPA می‌باشد.

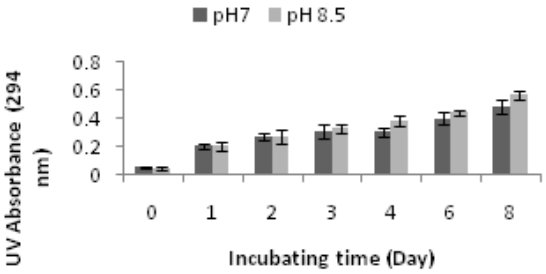
نتیجه‌گیری

در این تحقیق پروتئین‌های سویا با دکستران در شرایط مختلف واکنش مایلارد کانژوگه شد و میزان کانژوگه شدن با دو روش مقایسه و بررسی گردید. نتایج روش OPA نشان داد بیشترین کانژوگه شدن در دمای۶۰°C، pH=۸/۵ و زمان ۸ روز و به میزان اتصال ۴۴/۲۳ درصد رخ داده است. بررسی میزان جذب در ناحیه UV نتایج حاصل از روش OPA را تأیید کرد. گرمخانه‌گذاری پروتئین‌های سویا با دکستران به نسبت ۱ به ۴ در دمای ۶۰ °C، pH=۸/۵ زمان ۸ روز و رطوبت نسبی ۷۹٪ جهت انجام واکنش مایلارد یکی از راه های مناسب اصلاح این پروتئین ها جهت کاربرد های گسترده تر در صنایع غذایی می باشد.

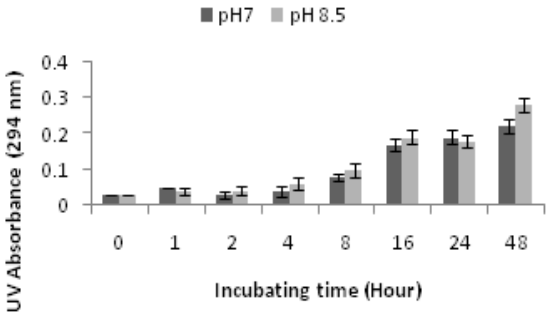


شکل٤- میزان جذب UV نمونه‌های گرمخانه‌گذاری شده در دمای ۴۰ °C، pH=۷ و ۸/۵ و زمان‌های مختلف (هر ستون نمایانگر میانگین ±انحراف معیار برای سه تکرار می‌باشد)

1 Porcine plasma protein
2 Microwave
3 Intermediate products
4 di- and poly-carbonylcompounds



شکل ۵- میزان جذب UV نمونه‌های گرمخانه‌گذاری شده در دمای۶۰°C، pH=۷ و ۸/۵ و زمان‌های مختلف (هر ستون نمایانگر میانگین ±انحراف معیار برای سه تکرار می‌باشد)



شکل ٦ - میزان جذب UV نمونه‌های گرمخانه‌گذاری شده در دمای pH،۸۰°C=۷ و ۸/۵ و زمان‌های مختلف (هر ستون نمایانگر میانگین ±انحراف معیار برای سه تکرار می‌باشد)

منابع

بوستانی، س.، امینلاری، م.، موسوی نسب، م.، ۱۳۹۵، بهبود فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین های سویای رسوب‌یافته با اسید از طریق کانژوگه شدن با مالتودکسترین با استفاده از واکنش مایلارد، فصل نامه 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، فصل نامه علوم و صنایع غذایی، ۱۳، ۱۰۵-۱۱۳.

Amiri, S. Ramezani, R. andAminlari, M., 2008. Antibacterial activity of dextran conjugated lysozyme against Escherichia coli and Staphylococcus aureus in cheese curd. *Journal of Food Protection*., 71, 411-415.

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

Alahdad, Z. Ramezani, R. Aminlari, M. and Majzoobi.M., 2009.Preparation and properties of dextran Sulfate-Lysozyme Conjugate.*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 6449–6454.

Chevalier, F. Chobert, J. M. Popineau, Y. Nicolas, M. G. and Haertlé, T., 2001. Improvement of functional properties of β-lactoglobulinglycated through the Maillard reaction is related to the nature of the sugar. *International Dairy Journal*, 11, 145–152.

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.

Damodaran, S., 1996, Amino acids, peptides, and proteins. In: Food Chemistry. pp.321-429. Fennema, O. R., Ed., *Marcel Dekker*, New York

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

Kato, A., 2002. Industrial applications of Maillard-type protein-polysaccharide conjugates. *Food ScienceandTechnology Research*, 8, 193-199.

Lertittikul, W. Benjakul, S. and Tanaka, M., 2007. Characteristics and antioxidative activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein–glucose model system as influenced by pH. *Food Chemistry*, 100, 669–677.

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.

Nielsen, P. M. Petersen, D. and Dambmann, C., 2001. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of Food Science*, 66, 642–646.

Oliver, C. M. Melton, L. D. and Stanley, R. A., 2006.Creating proteins with novel functionality via the Maillard reaction: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46, 337–350.

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

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.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 12, No. 4, Oct- Nov 2016, p. 526-532

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۲، شماره ۴، مهر - آبان ۱۳۹۵، ص. ۵۳۲-۵۲۶

Brief report

Optimizing the glycation extent of SPI-dextran conjugates produced by different Maillard reaction conditions

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

Received: 2014.10.30
Accepted: 2015.10.13

Introduction: Engineering of food proteins with improved functional properties and higher resistance to heat is the main goal of food scientists. Food technologists are always seeking for innovative, simple and effective methods to manipulate proteins, hence natural modification has had the most attention in last decades. One of the natural ways used for protein modifications isMaillard grafting reaction. Maillard reaction as a consequence of covalentbindingbetween the available amino groups of the proteins and carbonyl containing moiety of the polysaccharides, causes a loss in free amino group content of the mixture that can be measured through different methods. Protein-polysaccharide hybrids, as a result of dry heating of two biopolymers mixture under controlled reaction conditions, cause the emergence of conjugates with novel functionalities.Selecting appropriate reaction conditions has a significant impact on the properties of the final conjugates. Among the factors affecting the degree of conjugation, temperature, pH and incubation time have considerable roles in determining the degree of conjugation. There are various methods by which conjugation degree can be assessed and factors such as accuracy, cost, accessibility and *etc*. must be considered when selecting a measuring method. Therefoe, in this study the effect of different Maillard reaction conditions on the conjugation degree of soy proteins-dextran heated mixtures have been investigated. In addition, the glycation degree was compared and reported by both OPA assay and UV absorbance methods.

Materials and methods: Soy proteins–dextran conjugates were prepared as described later. First, soy proteins and dextran were mixed with phosphate buffer (0.1 M, pH: 8.5 and 7) and 1 to 4 ratio of protein to polysaccharide. After mixing and incubating at ambient temperature for some hours, solutions were frozen at –80 ℃ and freeze dried. Then, the lyophilized powder was incubated at 40 ℃ for 0, 4, 8, 24 hours and 2, 4, 6, 8, 12 days, at 60 ℃ for 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8 days and at 80 ℃ for 0, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 48 hours, under the 79 percent relative humidity in presence of saturated KBr. For each treatment a non conjugated sample was prepared in the exact same condition. Conjugation of proteins to polysaccharides was monitored by two methods (OPA assay and UV absorbance). Determining degree of glycation by OPA method was done as follows, in this procedure the level of available amino groups was estimated using the ortho- phthaldialdehyde (OPA) reagent, the absorbance was measured at 340 nm and degree of glycation was measured using a formula. To investigate the UV absorption of conjugated proteins, the samples were diluted using distilled water and the absorption was read using a UV-visible spectrophotometer.

Results & Discussion: Covalent linkage between amino group of proteins and carbonyl group of polysaccharides causes depletion in the amount of available amino groups. The extent of soy proteins-dextran conjugation under various Maillard reaction conditions was evaluated by the reduction of available amino groups of proteins, the more reduction in amount of amino groups, the more conjugation between protein and polysaccharide. OPA results showed that, in the samples heated at 40 °C and 80 °C (at both pH 7 and 8.5), the

1.Ph.D candidate, 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.
2&3Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture and Department of Biochemistry, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran.
4. Associate professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.
5. Assistant professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.
(*Corresponding author: E-mail: mosavi@shirazu.ac.ir)

amount of free amino groups slightly reduced compared to 60 °C heated samples. The disappearance of available amino groups at 60°C was faster than other temperatures and formation of conjugates in this temperature was more successful. A stepwise reduction in free amino group content observed with increasing incubation time. When soy proteins were incubated at pH 8.5 for 8 days at 60 °C, a considerable decrease in available amino group contents occurred. UV absorption results showed similar trend of changes in OPA method. Increasing UV absorption is due to the intermediate Maillard reaction products (MRP). Increasing incubation time, temperature and pH cause a significant increase in UV absorbance. Increasing UV absorption with increasing heating time indicates the fact that Maillard reaction products (MRP) formation is more favorable at alkaline pH. Data of UV absorption are a proper evidence for OPA assay results.

Conclusion: As a conclusion, both OPA assay and UV absorption methods are cost effective, accurate and simple methods which can represent valuable information concerning the Maillard conjugation.

Key words: Conjugation degree, Incubation, OPA method, UV Absorbance