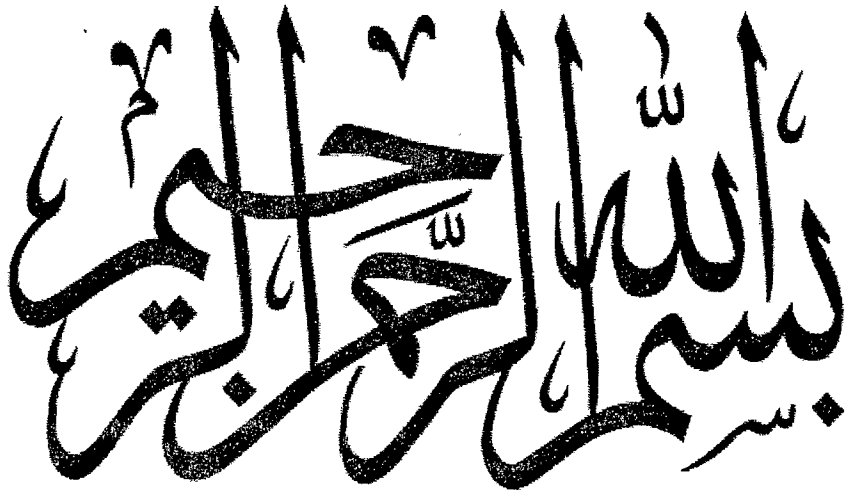

٤٦٣١٦

دانشگاه شیراز

دانشکده کشاورزی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد در رشته علوم و صنایع غذایی

بررسی تأثیر اتصال دکستران سولفات به لیزوزیم از طریق واکنش مایلارد بر خواص عملکردی آنها

توسط

زهرا اله داد

۱۳۸۷ /۷/ ۱۵

استاد راهنما:

دکتر محمود امین لاری

مهندس رقیه رمضانی

بهمن ماه ۱۳۸۶

۴۶۳۱۶

به نام خدا

بررسی تأثیر اتصال دکستران سولفات به لیزوزیم از طریق واکنش مایلارد بر خواص عملکردی آنها

به وسیله ی:

زهرا اله داد

پایان نامه
ارائه شده به تحصیلات تکمیلی دانشگاه به عنوان بخشی
از فعالیت های تحصیلی لازم برای اخذ درجه کارشناسی ارشد

در رشته ی:

علوم و صنایع غذایی

از دانشگاه شیراز

شیراز

جمهوری اسلامی ایران

ارزیابی شده توسط کمیته پایان نامه به درجه: عالی

دکتر محمود امین لاری، استاد بخش علوم و صنایع غذایی (رئیس کمیته).....

مهندس رقیه رمضانی، مربی بخش علوم و صنایع غذایی (رئیس کمیته).....

دکتر جلال جمالیان، استاد بخش علوم و صنایع غذایی.....

دکتر مهسا مجذوبی، استادیار بخش علوم و صنایع غذایی.....

بهمن ۸۶

تقدیم به پدر و مادر عزیزم

که صدای قلبم به نفسهایشان وابسته است و مهربانی نگاهشان در من طوفانی از عشق به پا میکند و تقدس کلامشان، امید به زندگی را در وجودم زنده می کند

و

تقدیم به همسرم

همسفر زندگیم که چون کوه به استقامتش و دریا به بزرگی اش و آسمان به وسعتش افتخار می کند، من هم به قلب پاک و وجود مهربان او افتخار می کنم

سپاسگزاری

سپاس خدای عزو وجل و خدای محمد (ص) و خدای باقرالعلوم و خدای همه کسانی که از آغاز تا آخر الزمان همواره در مسیر تعالی روح بشر تلاش می کنند، خداوندی که هر گاه ناامید گشتم با نور خود قلبم را پرنور گردانید و چراغ زندگی را به دستم داد تا مسیر زندگی را در یابم و در ساحل سعادت، حیات را ادامه دهم. پروردگارا، یاریم فرما، بتوانم تا پایان عمر بندگی و خدمتگزاری کسانی را نمایم که به من علم آموختند.

اینک بر خود لازم می دانم از زحمات طاقت فرسای اساتید راهنمای همیشه بزرگوار آقای دکتر محمود امین لاری و خانم مهندس رقیه رمضانی تشکر نمایم و از رهنمودهای اساتید مشاور گرانقدر جناب آقای دکتر جلال جمالیان و خانم دکتر مهسا مجذوبی نهایت سپاسگزاری را داشته باشم. همچنین از دیگر اساتید دانشمند بخش علوم و صنایع غذایی آقای دکتر عسگر فرحناکی، آقای مهندس غلامرضا مصباحی و خانم دکتر مرضیه موسوی نسب قدردانی نمایم.

چکیده

بررسی تأثیر اتصال دکستران سولفات به لیزوزیم از طریق واکنش مایلارد بر خواص عملکردی آنها

توسط

زهرا اله داد

هدف از این تحقیق تهیه کانژوگه لیزوزیم-دکستران سولفات با نسبت های وزنی ۱، ۲، ۳ و ۵ میلی گرم دکستران سولفات به ازای هر میلی گرم لیزوزیم تحت شرایط واکنش مایلارد و همچنین بررسی ویژگیهای عملکردی و فعالیت ضد میکروبی کانژوگه حاصله در مقایسه با لیزوزیم و دکستران سولفات می باشد. نتایج حاصل از کروماتوگرافی تبادل کاتیونی و الکتروفورز بر روی ژل پلی اکریل آمید، اتصال کووالانت دکستران سولفات به لیزوزیم را تأیید نمود. اندازه گیری میزان قند کل نمونه های اصلاح شده نشان داد که نسبت وزنی ۱ به ۵ (پروتئین به پلی ساکارید) دارای بالاترین درجه گلیکوزیلاسیون می باشد بنابراین از این نسبت جهت سایر بررسی های آنالیتیکی استفاده گردید. نتایج بدست آمده حاکی از آن است که کانژوگه نمودن باعث تغییر رفتار رئولوژیکی دکستران سولفات از حالت غلیظ شونده با افزایش تنش برشی به حالت رقیق شونده با افزایش تنش برشی می گردد. همچنین بهبود قابل توجهی در پایداری حرارتی و ویژگیهای امولسیون کنندگی لیزوزیم اصلاح شده در مقایسه با نوع اصلاح نشده آن مشاهده گردید و لیزوزیم اصلاح شده ۴۰ درصد فعالیت لیتیک خود را حفظ نمود. علاوه بر این ارزیابی فعالیت ضد میکروبی کانژوگه حاصله علیه باکتریهای اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس در محیط کشت حاکی از آن است که درحالیکه رشد باکتری اشریشیاکلی با افزایش غلظت کانژوگه به شدت ممانعت می شود، تأثیر آن علیه استافیلوکوکوس اورئوس در مقایسه با فعالیت لیزوزیم و دکستران سولفات کاهش می یابد بنابراین، تغییرات بوجود آمده در ویژگیهای لیزوزیم و دکستران سولفات می تواند کاربرد این دو پلیمر را در صنایع غذایی و داروسازی گسترش دهد.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه

۱-۱-اهمیت و کلیات..... ۱
۱-۲- کاربردهای صنعتی کمپلکس های پروتئین-پلی ساکارید..... ۳
۱-۳-انواع برهم کنش ها در کمپلکس های پروتئین-پلی ساکارید..... ۳
۱-۳-۱- برهم کنش های الکترواستاتیک..... ۴
۱-۳-۲-برهم کنش های غیر الکترواستاتیک..... ۵
۱-۳-۲-۱-پیوندهای هیدروژنی..... ۵
۱-۳-۲-۲-پیوندهای آبگریز..... ۵
۱-۳-۲-۳-پیوندهای کوالانسی..... ۶
۱-۴-لیزوزیم..... ۷
۱-۴-۱-مکانیسم عمل لیزوزیم..... ۸
۱-۴-۲-ساختار و خصوصیات لیزوزیم..... ۹
۱-۵-دکستران سولفات..... ۱۱
۱-۶-اصلاحات پروتئین ها..... ۱۳
۱-۶-۱-اصلاح فیزیکی..... ۱۳
۱-۶-۲-اصلاح آنزیمی..... ۱۴
۱-۶-۳-اصلاح شیمیایی..... ۱۷
۱-۶-۳-۱-آسیلاسیون..... ۱۸
۱-۶-۳-۲-آمیداسیون و استریفیکاسیون..... ۱۸
۱-۶-۳-۳-فسفریلاسیون..... ۱۹
۱-۶-۳-۴-تیولاسیون..... ۲۰

عنوان | صفحه

۱-۶-۳-۵-آلکیلاسیون احیایی..... ۲۱
۱-۶-۳-۶-اتصال کوالانسی اسیدهای آمینه..... ۲۱
۱-۶-۳-۷-اصلاح شیمیایی پروتئین ها از طریق واکنش مایلارد..... ۲۲
۱-۷-هدف پژوهش..... ۲۴

فصل دوم: مروری بر پژوهش های پیشین

۲-۱-اصلاح فیزیکی..... ۲۵
۲-۲-اصلاح آنزیمی..... ۲۶
۲-۳-اصلاح شیمیایی..... ۲۶

فصل سوم: مواد و روشها

۳-۱ مواد مورد نیاز..... ۳۵
۳-۲-وسایل و دستگاههای مورد نیاز..... ۳۶
۳-۳-روشها..... ۳۷
۳-۳-۱-گلیکوزیله کردن لیزوزیم با دکستران سولفات..... ۳۷
۳-۳-۲-انجام کروماتوگرافی به روش تبادل کاتیونی..... ۳۷
۳-۳-۲-۱-آماده سازی ژل..... ۳۷
۳-۳-۲-۲-پر کردن ستون..... ۳۸
۳-۳-۲-۳-آماده سازی نمونه..... ۳۸
۳-۳-۲-۴-نمونه گذاری در ستون..... ۳۸
۳-۳-۲-۵-آماده سازی نمونه های خروجی از ستون..... ۳۹
۳-۳-۳-الکتروفورز..... ۳۹
۳-۳-۳-۱-تهیه محلولهای الکتروفورز..... ۳۹
۳-۳-۳-۱-۱-تهیه محلول A ۳۹
۳-۳-۳-۱-۲-تهیه محلول B ۴۰
۳-۳-۳-۱-۳-تهیه محلول D ۴۰
۳-۳-۳-۱-۴-تهیه بافر الکترود..... ۴۰
۳-۳-۳-۱-۵-تهیه بافر نمونه..... ۴۰

عنوان | صفحه

۳-۳-۳-۱-۶-تهیه محلول پرسولفات آمونیوم..... ۴۰
۳-۳-۳-۱-۷-تهیه محلول رنگ آمیزی..... ۴۰
۲-۳-۳-۱-۸-تهیه محلول رنگ بر..... ۴۰
۳-۳-۳-۱-۹-تهیه نمونه..... ۴۱
۳-۳-۳-۲-تهیه ژل جداکننده..... ۴۱
۳-۳-۳-۳-تهیه ژل متراکم کننده..... ۴۱
۳-۳-۳-۴-نمونه گذاری و انجام الکتروفورز..... ۴۲
۳-۳-۳-۵-رنگ آمیزی و رنگ زدایی ژل..... ۴۳
۳-۳-۴-ارزیابی تغییرات رنگی..... ۴۳
۳-۳-۵-تعیین میزان قند نمونه های لیزوزیم به روش فنل-سولفوریک اسید..... ۴۴
۳-۳-۵-۱-تهیه محلولهای استاندارد..... ۴۵
۳-۳-۵-۲-روش اندازه گیری..... ۴۵
۳-۳-۵-۳-اندازه گیری قند نمونه ها..... ۴۵
۳-۳-۶-بررسی فعالیت آنزیمی..... ۴۶
۳-۳-۶-۱-آماده سازی سوبسترا..... ۴۶
۳-۳-۶-۲-آماده سازی آنزیم..... ۴۷
۳-۳-۶-۳-روش اندازه گیری فعالیت آنزیم..... ۴۷
۳-۳-۷-بررسی حلالیت پروتئین اصلاح شده در pH ۴۷
۳-۳-۷-۱-اندازه گیری پروتئین کل به روش میکروکلدال..... ۴۸
۳-۳-۷-۲-اندازه گیری پروتئین محلول در مایع فوقانی..... ۴۸
۳-۳-۷-۲-۱-آماده سازی محلولها..... ۴۹
۳-۳-۷-۲-۱-۱-محلول A ۴۹
۳-۳-۷-۲-۱-۲-محلول B ۴۹
۳-۳-۷-۲-۱-۳-محلول C ۴۹
۳-۳-۷-۲-۱-۴-محلول E ۴۹
۳-۳-۷-۳-آماده سازی محلول استاندارد و تعیین میزان پروتئین محلول در نمونه ها..... ۴۹
۳-۳-۸-تعیین حلالیت پروتئین ها در دماهای مختلف..... ۵۱
۳-۳-۹-تعیین فعالیت امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون..... ۵۲
۳-۳-۱۰-تعیین پایدار ی حرارتی..... ۵۲

عنوان | صفحه

۳-۳-۱۱-بررسی فعالیت ضد میکروبی..... ۵۳
۳-۳-۱۱-۱-تهیه محلولهای لازم برای انجام آزمایشهای میکروبی..... ۵۳
۳-۳-۱۱-۱-۱-تهیه محلول آب نمک..... ۵۳
۳-۳-۱۱-۱-۲-تهیه محیط کشت Plate count agar..... ۵۳
۳-۳-۱۱-۱-۳-تهیه محیط کشت Nutrient broth ۵۳
۳-۳-۱۱-۲-آزمایشهای میکروبی..... ۵۳
۳-۳-۱۲-اندازه گیری میزان جذب آب..... ۵۴
۳-۳-۱۳-اندازه گیریهای رئولوژیکی..... ۵۵
۳-۳-۱۴-تعیین ویسکوزیته ذاتی..... ۵۶
۳-۳-۱۵-تجزیه آماری داده ها..... ۵۷

فصل چهارم: نتایج

۴-۱-نتایج حاصل از الکتروفورز SDS-PAGE ۵۸
۴-۲-نتایج حاصل از کروماتوگرافی تبادل کاتیونی..... ۶۰
۴-۳-ارزیابی تغییرات رنگی..... ۶۲
۴-۴-تعیین میزان قند متصل شده در لیزوزیم گلیکوزیله شده به
نسبت های مختلف..... ۶۳
۴-۵-تأثیر گلیکوزیله نمودن بر فعالیت آنزیمی لیزوزیم..... ۶۴
۴-۶-تأثیر pH بر حلالیت لیزوزیم گلیکوزیله شده یا دکستران سولفات..... ۶۵
۴-۷-تأثیر دما بر حلالیت لیزوزیم گلیکوزیله شده با دکستران سولفات..... ۶۶
۴-۸-تأثیر گلیکوزیله نمودن بر پایداری حرارتی..... ۶۸
۴-۹-تأثیر گلیکوزیله نمودن بر ویژگیهای امولسیون کنندگی..... ۶۹
۴-۱۰-تأثیر گلیکوزیله نمودن بر ویژگیهای ضد میکروبی لیزوزیم..... ۷۰
۴-۱۱-میزان جذب آب کانژوگه لیزوزیم-دکستران سولفات..... ۷۲
۴-۱۲-تعیین ویسکوزیتی ذاتی و متوسط وزن مولکولی..... ۷۲
۴-۱۳-ارزیابی ویژگیهای رئولوژیکی..... ۷۳
۴-۱۳-۱-بررسی اثر غلظت های مختلف بر پارامترهای رئولوژیکی..... ۷۴
۴-۱۳-۲-بررسی اثر دماهای مختلف بر پارامترهای رئولوژیکی..... ۷۶
۴-۱۳-۳-بررسی pH های مختلف بر پارامترهای رئولوژیکی..... ۷۸

عنوان صفحه

فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری

۵-۱-بررسی اثر شرایط گلیکوزیله کردن بر میزان اتصال دکستران سولفات به لیزوزیم..... ۸۱
۵-۲-تأثیر گلیکوزیله نمودن بر فعالیت آنزیمی لیزوزیم..... ۸۳
۵-۳-تأثیر گلیکوزیله نمودن بر ویژگیهای عملکردی لیزوزیم..... ۸۴
۵-۳-۱-تأثیر pH بر حلالیت لیزوزیم گلیکوزیله شده با دکستران سولفات..... ۸۴
۵-۳-۲-تأثیر دما بر حلالیت لیزوزیم گلیکوزیله شده با دکستران سولفات..... ۸۵
۵-۳-۳-تأثیر گلیکوزیله نمودن بر ویژگیهای امولسیون کنندگی لیزوزیم..... ۸۵
۵-۳-۴- تأثیر گلیکوزیله نمودن بر پایداری حرارتی لیزوزیم..... ۸۶
۵-۳-۵-تأثیر گلیکوزیله نمودن بر ویژگیهای ضد میکروبی لیزوزیم..... ۸۷
۵-۴-ارزیابی های رئولوژیکی..... ۸۸

فصل ششم: نتیجه گیری کلی و پیشنهادات

۶-۱-نتیجه گیری کلی..... ۹۰
۶-۲-پیشنهادات..... ۹۱
پیوست ها..... ۹۲
منابع..... ۹۸
چکیده و عنوان به زبان انگلیسی..... ۱۰۷

فهرست جداول

عنوان و شماره **صفحه**

جدول ۳-۱-مقادیر مورد نیاز جهت تهیه ژل آکریل آمید با درصد های محتلف..... ۴۱
جدول ۳-۲-مقادیر مورد نیاز جهت تهیه ژل رویی..... ۴۲
جدول ۳-۳-آماده سازی محلول استاندارد..... ۴۵
جدول ۴-۱-روند تغییرات پارامترهای رنگ سنجی L، a و b در لیزوزیم گلیکوزیله شده..... ۶۳
جدول ۴-۲-میانگین میزان دکستران سولفات اتصال یافته به لیزوزیم ۶۴
جدول ۴-۳-فعالیت آنزیمی لیزوزیم گلیکوزیله شده با دکستران سولفات..... ۶۵
جدول ۴-۴-تأثیر pH بر حلالیت نمونه های لیزوزیم گلیکوزیله شده با دکستران سولفات..... ۶۶
جدول ۴-۵-الف-تأثیر دما بر حلالیت نمونه های گلیکوزیله شده در pH ۷ ..... ۶۷
جدول ۴-۵-ب-تأثیر دما بر حلالیت نمونه های گلیکوزیله شده در pH ۹..... ۶۷
جدول ۴-۶-فعالیت امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون لیزوزیم گلیکوزیله شده با دکسترانسولفات..... ۶۹
جدول ۴-۷-اثر ضد میکروبی لیزوزیم اصلاح نشده،دکستران سولفات و لیزوزیم گلیکوزیله شده با دکستران سولفات بر باکتری گرم منفی *E. coli* بعد از ۵ ساعت در دمای ۳۷°C..... ۷۱
جدول ۴-۸--اثر ضد میکروبی لیزوزیم اصلاح نشده،دکستران سولفات و لیزوزیم گلیکوزیله شده با دکستران سولفات بر باکتری گرم مثبت *S. aureus* بعد از۵ ساعت در دمای ۳۷°C..... ۷۱
جدول ۴-۹- تأثیر غلظت های مختلف دکستران سولفات بر پارامترهای رئولوژیکی در دمای ۲۵ °C ۷۴
جدول ۴-۱۰-تأثیر غلظت های مختلف کانژوگه لیزوزیم-دکستران سولفات بر پارامترهای رئولوژیکی در دمای ۲۵ °C ۷۵
جدول ۴-۱۱-تأثیر دماهای مختلف بر پارامترهای رئولوژیکی محلول ۵ درصد دکستران سولفات ۷۷

عنوان و شماره **صفحه**

جدول ۴-۱۲-تأثیر دماهای مختلف بر پارامترهای رئولوژیکی محلول ۵ درصد کانژوگه لیزوزیم-دکستران سولفات..... ۷۷
جدول ۴-۱۳-تأثیر pH های مختلف بر پارامترهای رئولوژیکی محلول ۵ درصد دکستران سولفات در دمای $25\ ^{\circ}C$ ۷۹
جدول ۴-۱۴- تأثیر pH های مختلف بر پارامترهای رئولوژیکی محلول ۵ درصد کانژوگه لیزوزیم-دکستران سولفات در دمای $25^{\circ}C$ ۷۹

فهرست تصاویر

عنوان و شماره **صفحه**

شکل ۱-۱-جایگاه فعال آنزیم لیزوزیم..... ۱۰
شکل ۱-۲-ساختار شیمیایی دکستران سولفات..... ۱۱
شکل ۱-۳-سولفاته نمودن دکستران با کلروسولفونیک اسید و پیریدین..... ۱۲
شکل ۳-۱-محورهای مقادیر رنگ بر حسب L، a و b در سیستم هانتر..... ۴۴
شکل ۳-۲-منحنی استاندارد دکستران سولفات برای تعیین میزان قند اتصال یافته به نمونه های پروتئینی..... ۴۶
شکل ۳-۳-منحنی استاندارد برای تعیین میزان پروتئین مجهول با استفاده از روش لوری..... ۵۱
شکل ۴-۱-الگوی الکتروفورز لیزوزیم گلیکوزیله شده با دکستران سولفات بر روی ژل پلی آکریل آمید ۱۰ درصد..... ۵۹
شکل ۴-۲-کروماتوگرام های حاصل از کروماتوگرافی تبادل کاتیونی CM-25 نمونه های گلیکوزیله شده به نسبت های وزنی مختلف..... ۶۲
شکل ۴-۳-تغییرات رنگ لیزوزیم و دکستران سولفات بعد از گرمخانه گذاری در $60^{\circ}C$ و اتصال کوالانسی به یکدیگر..... ۶۲
شکل ۴-۴-تأثیر گلیکوزیله نمودن بر پایداری حرارتی لیزوزیم..... ۶۸
شکل ۴-۵-تغییرات ویسکوزیته کاهیده به صورت تابعی از غلظت در محلولهای دکستران سولفات و کانژوگه لیزوزیم-دکستران سولفات..... ۷۳
شکل ۴-۶-ویسکوزیته محلولهای دکستران سولفات با غلظت های مختلف در دامنه وسیعی از سرعت برشی در دمای $25^{\circ}C$..... ۷۵
شکل ۴-۷- ویسکوزیته محلولهای کانژوگه لیزوزیم-دکستران سولفات با غلظت های مختلف در دامنه وسیعی از سرعت برشی در دمای $25^{\circ}C$..... ۷۶
شکل ۴-۸- تغییرات ویسکوزیته-سرعت برشی محلول دکستران سولفات با غلظت ۵ درصد در آب مقطر و در دماهای مختلف..... ۷۷

عنوان و شماره **صفحه**

شکل ۴-۹- تغییرات ویسکوزیته-سرعت برشی محلول کانژوگه لیزوزیم-دکستران سولفات با غلظت ۵ درصد در آب مقطر و در دماهای مختلف.....۷۸
شکل ۴-۱۰- تغییرات ویسکوزیته-سرعت برشی محلول دکستران سولفات با غلظت ۵ درصد در pH های مختلف.....۸۰
شکل۴-۱۱- تغییرات ویسکوزیته-سرعت برشی محلول کانژوگه لیزوزیم-دکستران سولفات با غلظت ۵ درصد در pH های مختلف.....۸۰
شکل ۱-پیوست-فعالیت آنزیمی لیزوزیم گلیکوزیله شده با دکستران سولفات.....۹۳
شکل ۲-پیوست-تأثیر pH بر حلالیت لیزوزیم گلیکوزیله شده با دکستران سولفات.....۹۳
شکل ۳- پیوست- تأثیر دما بر حلالیت لیزوزیم گلیکوزیله شده با دکستران سولفات در pH ۷.....۹۴
شکل ۴-پیوست-تأثیر دما بر حلالیت لیزوزیم گلیکوزیله شده با دکستران سولفات در pH ۹.....۹۴
شکل ۵-پیوست-پایداری امولسیون تشکیل شده در لیزوزیم گلیکوزیله شده با دکستران سولفات در pH ۷ و دمای ۲۵ °C.....۹۵
شکل ۶-پیوست-تأثیر ضد میکروبی لیزوزیم اصلاح نشده، لیزوزیم گلیکوزیله شده با دکستران سولفات و دکستران سولفات بر باکتری گرم مثبت *E. coli* بعد از ۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد.....۹۶
شکل ۷-پیوست-تأثیر ضد میکروبی لیزوزیم اصلاح نشده، لیزوزیم گلیکوزیله شده با دکستران سولفات و دکستران سولفات بر باکتری گرم مثبت *S. aureus* بعد از ۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد.....۹۷

فصل اول-مقدمه

۱-۱-اهمیت و کلیات

پروتئین ها و پلی ساکاریدها از جمله پلیمرهای زیستی[1] هستند که به طور گسترده ای در ارگانیسم های زنده موجود می باشند. محصولات غذایی نیز به طور گسترده ای شامل اجزاء غذایی مختلفی از قبیل پروتئین ها، لیپیدها، پلی ساکاریدها، قندها، امولسیفایرها و آب می باشند که از بین این اجزاء، پروتئین ها و پلی ساکاریدها تأثیر به سزایی در ساختار، بافت و پایداری سیستم های غذایی بواسطه اعمال ویژگیهای عملکردی[2] مانند تولید ژل، ایجاد غلظت[3] و پایداری سطحی[4] ایفا می نمایند (Schmitt *et al.*, 1998). با وجودیکه پروتئین ها و پلی ساکاریدها به طور گسترده ای به عنوان پلیمرهای غذایی مورد استفاده قرار می گیرند اما در سالهای اخیر به دلیل افزایش تقاضا، گرایش به سمت غذاهایی با ویژگیهای عملکردی جدید به شدت افزایش یافته و توجه بیشتری به ایجاد پروتئین هایی با عملکرد جدید صورت گرفته است، از طرف دیگر امکان استفاده از برخی منابع متنوع پروتئینی (از قبیل منابع گیاهی و میکروبی) اغلب به دلیل ارزش بیولوژیکی پایین، ویژگیهای ارگانولپتیک نامطلوب، وجود اجزاء سمی و ویژگیهای عملکردی ضعیف محدود می باشد بنابراین با به کارگیری انواع اصلاحات مختلف بر روی پروتئین ها و پلی ساکاریدها با استفاده از عوامل فیزیکی و شیمیایی گوناگون به منظور تغییر در خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آنها، می توان بر این مشکلات فائق آمد (Franzen and Kinsella, 1976 و Matheis *et al.*,1983). با وجودیکه شناخت زیادی در رابطه با اصلاح پروتئین ها با پلیمرها موجود نمی باشد اما به نظر می آید که اتصال پروتئین ها به یک پلیمر، ویژگیهای پروتئین را به طور مؤثرتری نسبت به اتصال با اجزایی با وزن مولکولی پایین بهبود می بخشد که این مسئله در رابطه با پلیمرهای باردار به دلیل اختلاف در وزن مولکولی یا بار پلیمر اتصال یافته به پروتئین، به طور واضح تری قابل مشاهده می باشد (Hattori *et al.*, 1994). بررسی هایی که اخیراً بر روی سیستم های پروتئین-

---

[1] Biopolymer
[2] Functional properties
[3] Thickening
[4] Surface stability

پلی ساکارید صورت گرفته است نشان دهنده این موضوع است که پیوندهای آنتاگونیست[1] یا سینرژیستیک[2] بین این دو بیوپلیمر باعث تغییرات شدیدی در ویژگیهای عملکردی آنها می شود. کنترل این پیوند های ماکرومولکولی یک عامل کلیدی در توسعه فراوری مواد غذایی و محصولات جدید و نیز در فرمولاسیون محصولات ساخته شده می باشد (Schmitt *et al.*, 1998).

به طور کلی اهدافی که از اصلاح شیمیایی پروتئین ها دنبال می شود شامل موارد زیر می باشد (Kester and Richardson, 1983 ،Richardson, 1977 و Khmelnitsky, 2004):

- بهبود در ویژگیهای دارویی پروتئین ها بواسطه اتصال بهتر با گیرنده های بیولوژیکی به دلیل جذب غیر مستقیم توسط گیرنده های کربوهیدراتی خاص، بهبود ویژگیهای حساسیت زایی[3] و ایمنی شناسی به دلیل ایجاد جایگاههای آنتی ژنی بر روی چارچوب پپتید، بهبود ویژگیهای دارویی به دلیل اصلاح ماندگاری پروتئین ها در چرخه، پایداری بهتر به دلیل جلوگیری از انعقاد حرارتی، مقاومت به حمله پروتئاز ها و بهبود پایداری ساختار پروتئین ها و بهبود حلالیت در محلولهای آبی و سیالهای بیولوژیکی
- افزایش ظرفیت کف کنندگی[4] در مواد کف کننده
- تاخیر در انجام واکنش هایی مانند مایلارد
- بهبود بافت در پروتئین های گیاهی بافت یافته
- افزایش حلالیت در نوشابه ها و آشامیدنیها
- افزیش ظرفیت امولسیون کنندگی[5]
- برطرف نمودن طعم بد در تهیه تافو[6] از سویا
- اتصال ترکیباتی مانند رنگ ها و طعم ها
- اتصال اسیدهای آمینه به اجزاء غذایی به منظور بهبود ارزش تغذیه ای غذاها

---

[1] Antagonist
[2] Synergistic
[3] Allergenic
[4] Foaming capacity
[5] Emulsifying capacity
[6] Tofu

۱-۲-کاربردهای صنعتی کمپلکس های پروتئین-پلی ساکارید

ایجاد کمپلکس بین پروتئین ها و پلی ساکاریدها ابزاری مفید به منظور بهبود ویژگیهای عملکردی هر بیوپلیمر می باشد. این ویژگیها را می توان با کنترل شرایط تشکیل کمپلکس ها شامل pH، قدرت یونی، غلظت پلی ساکارید، نسبت بیوپلیمرها، تیمار حرارتی و مکانیکی تعدیل نمود. کمپلکس های پروتئین-پلی ساکارید در صنایع مختلفی مورد استفاده قرار می گیرند اما به طور کلی کمپلکس های پروتئین-بیوپلیمرها در صنعت غذا، بیوتکنولوژی، داروسازی، پزشکی و آرایشی مورد استفاده قرار می گیرند (Schmitt *et al.*, 1998).
چهار کاربرد مهم کمپلکس ها که ظاهراً از دیگر کاربرد های آنها مهم تر می باشد شامل موارد زیر می باشد (Schmitt *et al.*, 1998، Kester and Fennema, 1991 و McArdel, 1997):

- خالص سازی ماکرومولکولها از طریق تکنیک های فیلتراسیون غشایی یا کروماتوگرافی
- استفاده از ویژگی بین سطحی[1] کمپلکس ها در ریز کپسوله نمودن[2] مولکولهای فعال
- کاربرد به عنوان اجزاء غذایی یا مواد زیستی[3] در تشکیل پوشش های خوراکی و مواد بسته بندی محصولات غذایی
- کاربرد کمپلکس های پروتئین-بیوپلیمرها به عنوان جایگزین های چربی در مواد غذایی

۱-۳-انواع برهم کنش ها در کمپلکس های پروتئین-پلی ساکارید

این برهم کنش ها به صورت ضعیف یا قوی، جذبی یا دفعی و ویژه یا غیر ویژه تقسیم بندی می شوند. برهم کنش های دفعی به صورت زودگذر می باشند و از برهم کنش های الکترواستاتیک نشأت می گیرند و معمولاً از دسته برهم کنش های ضعیف می باشند. برهم کنش های دفعی می توانند در مخلوط پروتئین ها با پلی ساکارید های غیر یونی یا با پلی ساکارید های آنیونی و پروتئین های مخلوط شده در pH های بالاتر از نقطه ایزو الکتریک پروتئین یافت شوند. برهم کنش های جذبی بیوپلیمرها ممکن است ضعیف یا قوی باشند. برای مثال اتصال کووالان بین پروتئین ها و پلی ساکاریدها یک بر هم کنش جذبی، قوی و دائمی می باشد. بر هم کنش های جذبی و غیر ویژه در کمپلکس های پروتئین-پلی ساکارید ناشی از اتصالات ضعیف بین گروههای موجود در سطح بیوپلیمرها می باشد و اتصالات یونی،

---

[1] Interfacial properties
[2] Micro capsulation
[3] Biomaterial

واندروالس، هیدروفوبی و هیدروژنی را در بر می گیرد. برهم کنش های جذبی و قوی بین پروتئین های با بار مثبت (pH<pI) و پلی ساکارید های کاتیونی در قدرت های یونی پایین اتفاق می افتد. برهم کنش های جذبی و ضعیف تر ناشی از بر هم کنش بین پروتئین های با بار منفی (pH>pI) و یا بدون بار و پلی ساکاریدهای آنیونی می باشد. اگرچه در بعضی موارد تشکیل کمپلکس به دلیل وجود مناطقی باردار در سطح پروتئین ها[1] امکانپذیر می باشد (Schmitt *et al.*, 1998).

۱-۳-۱-بر هم کنش های الکترواستاتیک

اتصال الکترواستاتیک بین ماکرومولکولهای باردار منجر به کاهش انرژی آزاد الکترواستاتیک سیستم می شود. افت انتروپی پلیمرهای سخت در طی تشکیل کمپلکس می تواند بوسیله تأثیر آنتالپی ناشی از بر هم کنش پلی یونها و آزاد سازی یونهای مخالف و مولکولهای آب جبران شود. اولین بار وجود پیوندهای الکترواستاتیک در تشکیل کمپلکس های پروتئین-پلی ساکارید توسط Tiebackx در سال ۱۹۱۱ پیشنهاد شد که وی با توجه به سازگاری ژلاتین و صمغ آکاسیا دریافت که این دو بیوپلیمر با یکدیگر کمپلکس نامحلولی را تشکیل می دهند. علاوه بر این پایداری این کمپلکس ها وابسته به مقدار اسید افزوده شده جهت تشکیل کواسرویشن (توده)[2] می باشد بنابراین Tiebackx دریافت که یک طبیعت الکترواستاتیک در برهم کنش بین دو بیوپلیمر دخیل می باشد (Schmitt *et al.*, 1998).

به طور کلی دو نوع کمپلکس از طریق پیوندهای الکترواستاتیک تولید می شود (Schmitt *et al.*, 1998):

- هنگامی که تعداد بارهای مخالفی که بوسیله دو ماکرویون حمل می شوند، برابر نباشند کمپلکس حاصل محلول می باشد. بنابراین بار خالص کمپلکس باعث حلالیت آن بواسطه بر هم کنش با مولکولهای حلال می شود.
- هنگامی که تعداد بارهای مخالف حمل شده بوسیله هر دو بیوپلیمر مساوی باشد بار خالص کمپلکس صفر می باشد و کمپلکس نامحلول می باشد. در بعضی سیستم ها برای مثال دکستران سولفات[3]/ آلبومین سرم گاوی[4]، کمپلکس نامحلول بدست آمده در قدرت یونی پایین و pH نزدیک نقطه ایزوالکتریک با استفاده از تیتراسیون اسیدی

[1] Patches
[2] Coacervation
[3] Dextran sulfate
[4] Bovine serum albumin

محلول می شود، کمپلکس حاصله تی-کمپلکس[1] نام دارد. این پدیده به دلیل افـزایش پیوندهای الکترواسـتاتیک بـین ماکرومولکولهـا در کمـپلکس هـا در طـی تیتراسـیون اسیدی می باشد. بعضی کمپلکس ها به تغییرات pH و قدرت یونی حساسیت کمتـری دارند که نشان دهنـده وجـود پیونـدهای غیـر الکترواسـتاتیک در تـشکیل و پایـداری کمپلکس های پروتئین-پلی ساکارید مانند پیوندهای آبگریز، واانـدروالس و هیـدروژنی می باشد (Schmitt *et al.*, ۱۹۹۸).

۱-۳-۲-برهم کنش های غیرالکترواستاتیک

هنگامی که دو بیوپلیمر به یکدیگر نزدیـک مـی شـوند، نیروهـای بـرهم کنـشی بـه غیـر از الکترواستاتیک می تواند باعث ایجاد اتصال بین دو پلیمر شود که این نیروها وابسته به ترکیب و ساختار ماکرومولکول شامل توالی واحدهای گلوکوسیدیک[2] و اسیدهای آمینه، ساختار رشته ای بی شکل یا فشرده[3] می باشد (Schmitt *et al.*, 1998).

۱-۳-۲-۱-پیوندهای هیدروژنی

اتصالات شامل برهم کنش یک اتم هیدروژن متـصل بـه یـک اتـم الکترونگـاتیو (نیتـروژن، اکسیژن، سولفور) با اتم های الکترونگاتیو دیگـر (اکـسیژن، کربونیـل وکربوکـسیل) مـی باشـد. چنین بر هم کنشی در تشکیل کمپلکس بین پکتین و ژلاتـین موجـود مـی باشـد و کمـپلکس محلول بین این دو بیوپلیمر در محدوده گسترده ای از pH حاصل مـی آیـد. اگرچـه سـازگاری بین دو ماکرومولکول با افزایش درجه استریفیکاسـیون پکتـین افـزایش مـی یابـد، توزیـع ایـن گروهها بر روی زنجیره پکتین نیر در این مورد می تواند مؤثر باشد (Schmitt *et al.*, 1998)

۱-۳-۲-۲- پیوندهای آبگریز

دسته دیگر از نیروهای مؤثر در تشکیل کمپلکس ها، پیوندهای آبگریـز مـی باشـد کـه ایـن دسته از برهم کنشها با افزایش بی نظمی ناشی از افزایش دما توسعه می یابنـد، همچنـین ایـن

---

[1] T-Complex
[2] Glucosidic monomers
[3] Compact or random coil structure