



دانشگاه ارومیه

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد در گرایش فیزیولوژی گیاهی

عنوان:

اثرات تیمارهای ساکارز و pH روی پایداری کمپلکس آنتوسیانین-کوپیگمانت

در پیاز قرمز آذرشهر (*Allium cepa L.*)

نگارش:

نوشین صدقیه

استاد راهنما:

دکتر رشید جامعی

خرداد ۱۳۹۲

" حق طبع و نشر هرگونه مطلب این پایان نامه در انحصار دانشگاه ارومیه می باشد "

الله أكبر

تقدیم به پدر و مادر عزیزم

چشمه های جوشان محبت

جلوه های مهر و عطف الهی

که بودنشان تاج افتخاری است بر سرم و نامشان دلیلی است بر بودنم.

تقدیم به همسر عزیزم،

تکیه گاه امن و آسایش و برترین آموزگار خوش بینی و امیدم در زندگی.

تقدیر و تشکر:

بانشکر از استاد راهنمای گرامی ام جناب آقای دکتر رشید جامعی، استاد بزرگواری که اندیشیدن را به من آموختن و سخاوتمندانه سرمایه علم و معرفتشان را در اختیارم قرار دادند و با صبوری مثال زدنی مراد تمام مراحل پایان نامه یاری کردند. از اساتید ارجمند خانم دکتر رحمانی و آقای دکتر حسینی به خاطر قبول زحمت داوری این پایان نامه کمال تشکر را دارم.

و نیز خود را موظف می دانم که از سرکار خانم فرناز به پاس تمام محبت هایش تشکر نمایم. و در پایان از همه سروران عزیزم که مراد جهت پیشبرد اهدافم و رسیدن به مرتبه علمی بالاییاری کردند کمال تشکر و قدردانی دارم و برای این عزیزان آرزوی سلامتی و تندرستی دارم.

فهرست مطالب

۱	چکیده:
۲	مقدمه:
۲	آنتوسیانین ها:
۲	۱.۱) معرفی کلی آنتوسیانین ها:
۴	۱.۲) اهمیت آنتوسیانین ها:
۵	۱.۳) ساختار آنتوسیانین ها:
۸	۱.۴) مسیر بیوسنتزی آنتوسیانین ها:
۱۱	۱.۵) پایداری آنتوسیانین ها:
۱۱	۱.۵.۱) اثرات ساختار:
۱۲	۱.۵.۲) اثر غلظت:
۱۲	۱.۵.۳) اثر pH:
۱۳	۱.۵.۴) دما:
۱۴	۱.۵.۵) قندها:
۱۴	۱.۵.۶) آنزیم ها:
۱۴	۱.۵.۷) اکسیژن:
۱۵	۱.۶) کوپیگمانتاسیون:
۱۶	۱.۶.۱) کوپیگمانتاسیون بین ملکولی:
۱۶	۱.۶.۲) کوپیگمانتاسیون درون ملکولی:
۱۷	۱.۷) کوپیگمانت ها:
۱۷	۱.۸) عوامل موثر بر کوپیگمانتاسیون:
۱۷	۱.۸.۱) اثر pH:
۱۸	۱.۸.۲) اثر غلظت آنتوسیانین و غلظت کوپیگمان ها:
۱۸	۱.۹) روشهای مختلف برای استخراج آنتوسیانین ها:
۱۸	۱.۱۰) گیاه مورد آزمایش:
۲۰	۱.۱۱) هدف تحقیق:
۲۱	۲.۱) تهیه و نگهداری نمونه ها:
۲۱	۲.۲) مراحل استخراج آنتوسیانین:
۲۱	۲.۲.۱) تهیه حلال استخراجی:
۲۱	۲.۲.۲) استخراج رنگیزه های آنتوسیانین:
۲۱	۲.۳) تهیه بافر ها:
۲۱	۲.۳.۱) بافر کلرید پتاسیم:
۲۲	۲.۳.۲) بافر استات سدیم:
۲۲	۲.۳.۳) بافر کوپیگمانت:
۲۲	۲.۳.۴) بافر سترات:
۲۲	۲.۴) مطالعات اسپکترومتری:

۲۲ آماده سازی و طرز کار با دستگاه: (۲.۴.۱)
۲۳ روش های اندازه گیری آنتوسیانین کل: (۲.۵)
۲۳ روش اختلاف pH: (۲.۵.۱)
۲۳ روش اندازه گیری آنتوسیانین مونومری کل: (۲.۵.۲)
۲۴ واکنش های کوپیگمانتاسیون: (۲.۶)
۲۴ واکنش کوپیگمانتاسیون با کوپیگمانت های متفاوت: (۲.۶.۱)
۲۴ واکنش کوپیگمانتاسیون تحت شرایط متفاوت غلظت کوپیگمانت ها: (۲.۶.۲)
۲۴ واکنش کوپیگمانتاسیون تحت pH: (۲.۶.۳)
۲۵ واکنش کوپیگمانتاسیون تحت ساکارز: (۲.۶.۴)
۲۵ آنالیز آماری: (۲.۷)
۲۶ اثر کوپیگمانتاسیون: (۳)
۲۶ اثر غلظت کوپیگمانتاسیون: (۳.۱)
۲۹ اثر نوع کوپیگمانت: (۳.۲)
۳۲ اثر pH روی فرایند کوپیگمانتاسیون: (۳.۳)
۳۶ اثر ساکارز روی فرایند کوپیگمانتاسیون: (۳.۴)
۴۲ نتیجه گیری: (۴)
۴۳ پیشنهادات: (۴)
۴۴ ضمائم: (۴)
۴۸ منابع: (۴)
۵۶ Abstract: (۵)

چکیده:

آنتوسیانین ها پیگمان های طبیعی هستند که به طور گسترده ای در طبیعت توزیع شده اند. ملکول های رنگی آنتوسیانین زیرکلاسی از فلاونوئیدها می باشند که مسئول رنگ قرمز، ارغوانی و آبی در بسیاری از گل ها، میوه ها و سبزیجات می باشند. کوپیگمانت ها مواد بی رنگی هستند که قادر هستند مجموعه رنگی را با فرم های بی رنگ آنتوسیانین تشکیل دهند. کوپیگمانتاسیون اصلی ترین مکانیسم پایداری رنگ آنتوسیانین است. در این مطالعه کوپیگمانتاسیون پیاز قرمز با چهار کوپیگمانت (تانیک اسید، کوماریک اسید، کافنیک اسید و بنزوئیک اسید) مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق، وابستگی فرایند کوپیگمانتاسیون به pH، غلظت قند، غلظت و نوع کوپیگمانت به اثبات رسید. کوپیگمانتاسیون آنتوسیانین باعث افزایش هم اثرات Hyperchromic و هم تغییرات Bathochromic شد. تانیک اسید بیشترین اثر Hyperchromic و بنزوئیک اسید کمترین اثر Hyperchromic را داشت. پنج غلظت کوپیگمانت (۰، ۱۲۰، ۲۴۰، ۴۸۰ و ۹۶۰ میلی گرم بر لیتر) مورد آزمایش قرار گرفت. اثرات کوپیگمانتاسیون با افزایش محتوای کوپیگمانت افزایش یافت. همچنین اثرات شش pH (۱، ۲، ۳، ۴، ۳/۵، ۴ و ۴/۵) و سه غلظت متفاوت ساکارز (۱۰٪، ۳۰٪ و ۵۰٪) نیز روی کمپلکس آنتوسیانین-کوپیگمانت مورد ارزیابی قرار گرفت. بررسی ها نشان داد تغییرات حاصل از اثر قند به غلظت ساکارز بستگی دارد و غلظت پایین ساکارز (۱۰٪) پایداری کمپلکس آنتوسیانین-کوپیگمانت را افزایش داد. نتایج حاصل نشان داد که در pH اسیدی پایداری آنتوسیانین بیشتر بود. pH مناسب برای پایداری کمپلکس آنتوسیانین-کوپیگمانت pH=۳ بود. در این مطالعه تانیک اسید در بین سایر کوپیگمانت ها، کوپیگمانت موثر و غالب بود.

فصل اول

مقدمه

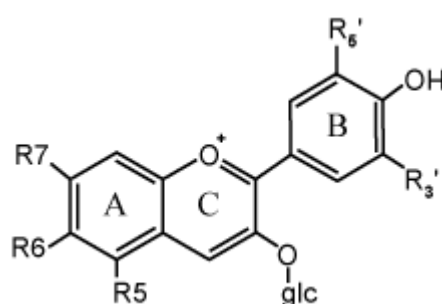
مقدمه:

رنگ موجود در گیاهان ناشی از رنگیزه های آن است که شامل: (۱) کلروفیل ها که به طور بسیار بارزی رنگ سبز برگ درختان، گل ها و نیز ساقه های جوان را ایجاد می کنند. (۲) کاروتنوئید که کاروتن موجود در هویج از مشتقات آن است. (۳) فلاونوئیدها که آنتوسیانین ها زیر گروهی از آن ها هستند. در واقع آنتوسیانین ها را اینگونه می توانیم تعریف کنیم که پیگمان های فلاونوئیدی قرمز تا آبی و بنفش موجود در گلبرگ ها و اپیدرم گیاهان مختلف هستند. آنتوسیانین ها در اعضای دیگر گیاهان عالی و به طور کلی در دنیای گیاهان (به جز کپک ها) وجود دارند (۵۴).

آنتوسیانین ها:

۱.۱ معرفی کلی آنتوسیانین ها:

کلمه آنتوسیانین (Anthocyanin) از دو کلمه یونانی به معنی گیاه (Antho) و آبی (Cyanin) مشتق شده است و آنتوسیانین ها ترکیباتی با فعالیت پاد اکسایشی^۱ بسیار بالا هستند و عمدتاً در میوه جات و سبزیجات قرمز یافت می شوند و باعث قرمز شدن نهال ها و تغییر رنگ برگ ها در فصل پاییز می گردند. مولکول های آنتوسیانین متعلق به گروه فلاونوئیدها می باشند که مسئول رنگ های قرمز، ارغوانی و آبی بسیاری از گل ها، میوه ها و سبزیجات بوده و نقش های مهمی در جذب حشرات جهت گرده افشانی و محافظت در برابر تنش های گیاهی را بر عهده دارند (۵۴).

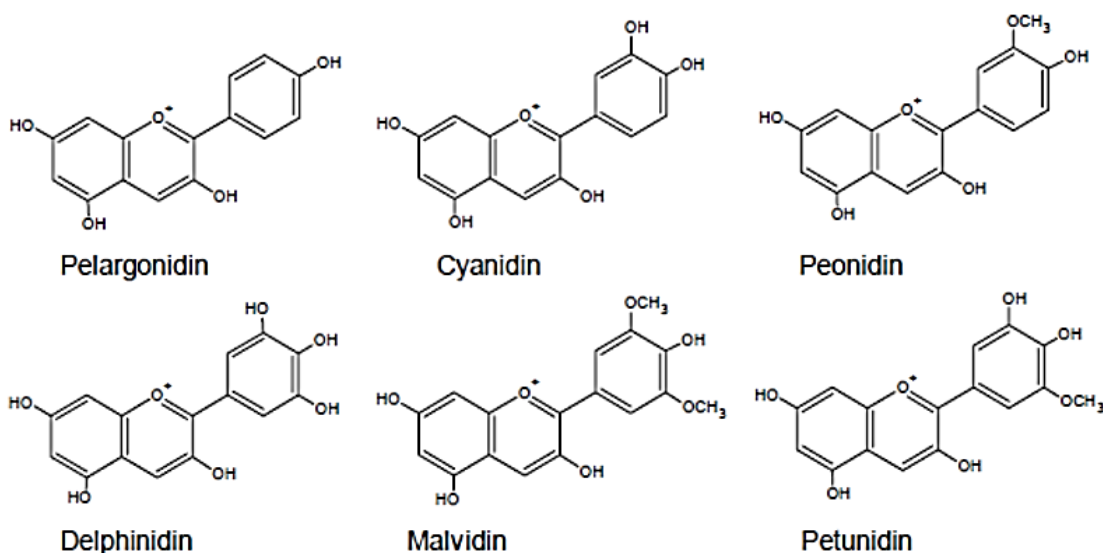


شکل ۱: ساختار شیمیایی آنتوسیانین ها

فعالیت پاد اکسایشی و فعالیت علیه فساد مواد غذایی و مبارزه با مواد جهش زا در سلول از کاربردهای آنتوسیانین ها محسوب می شود (۱،۲). آنتوسیانین های استخراج شده از سبزیجات و میوه های حاوی آنتوسیانین بالا به عنوان

رنگیزه‌هایی که برای سلامتی انسان بسیار موثرند، نشان از این دارد که آنتوسیانین‌ها دارای فعالیت‌های بیولوژیکی و فارماکولوژیکی می‌باشند و از این نظر در پزشکی و داروسازی کاربرد بسیاری دارند. آنتوسیانین‌ها بسیار ناپایدار بوده و به راحتی تخریب می‌شوند. پایداری آنتوسیانین‌ها تحت تاثیر pH، دمای نگهداری، حضور آنزیم‌ها، نور، اکسیژن، آسکوربیک اسید، قندها، دی‌اکسید گوگرد، یون‌های فلزی و کوپیگمان‌ها قرار می‌گیرد. آنتوسیانین‌ها در میوه‌ها بیشتر در پوست وجود دارند مثل سیب، آلو و گلابی، اما گاهی اوقات، آنتوسیانین‌ها در قسمت گوشتی میوه نیز بافت می‌شوند مانند گیلاس، آلبالو و پرتقال تو سرخ (۵۶،۶۴).

آنتوسیانین‌ها زمانی که به شکل گلیکوزیدی باشند با عنوان آنتوسیانین معرفی می‌شوند این فلاونوئیدها از لحاظ شیمیایی فلاویلیوم گلیکوزیده، و یا نمک ۲- فنیل بنزوپیریلیوم هستند (۷۲). مهمترین آنتوسیانین‌ها عبارتند از: سیانیدین، دلفینیدین، پئونیدین، پلارگونیدین، پتونیدین و مالویدین که سیانیدین عمومی‌ترین آنهاست. قرار گرفتن گروه گلیکوزیدی در موقعیت ۳ برای پایداری آنتوسیانیدین‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. آنتوسیانین‌ها در میوه‌ها بیشتر با مقادیر فراوان مونوگلیکوزید مشخص می‌شوند تا دی‌گلیکوزید. معمولی‌ترین قند‌های آنتوسیانین‌ها مونوساکاریدهایی مانند گلوکز، رامنوز، گالاکتوز، آرابینوز و گزیلوز هستند. دی و تری ساکارید‌های پیدا شده در آنتوسیانین‌ها شامل: روتینوز، سوفوروز، سامبویوز و گلوکوروتینوز هستند. آنتوسیانین‌ها همچنین می‌توانند آسیله نیز شوند (۵۶،۶۴).



شکل ۲: مهمترین آنتوسیانیدین‌های طبیعی

۱.۲) اهمیت آنتوسیانین ها:

آنتوسیانین ها نه به دلیل اینکه مسئول رنگ در گیاهان و محصولات گیاهی هستند، بلکه به دلیل خصوصیات فارماکولوژیکی، از قرن ها پیش با رژیم غذایی انسان عجین شده اند.

بین مقدار کلی فنولیک های بافت های گیاهی از جمله آنتوسیانین ها و شدت تابش اشعه نور خورشید که گیاهان در معرض آن هستند یک رابطه بنیادی وجود دارد. این مقاومت در برابر اشعه UV با سیستم های ترمیم DNA و همچنین پاد اکساینده ها و پلی آمین ها تکمیل می شود تا آسیب غشایی کم شود. البته جهش زا ها در این ساز و کارهای حفاظتی حساسیت بیشتری به آسیب UV از خود نشان می دهند، که آنتوسیانین ها به بروز حداقل آسیب ناشی از تابش فراوان UV خورشیدی که سلولهای فتوسنتزی در معرض آن هستند کمک می کند. آنها همچنین در جایی قرار گرفته اند که در دفاع علیه گیاهخواران احتمالا به عنوان یک مهارکننده شیمیایی در روشی مشابه با تانن ها، که باعث رسوب پروتئین ها و مهار خاصیت گوارش کنندگی آنها می شود نقش دارند.

آنتوسیانین ها برای درمان فشارخون بالا، اختلالات کبدی، اسهال و مشکلات ادراری مانند سنگ کلیه، عفونت های مجاری ادراری و همچنین سرماخوردگی استفاده شده است.

آنتوسیانین ها فعالیت ضد التهابی و آنتی باکتریایی بسیار قوی دارند و مهارکننده جهش هایی هستند که توسط مواد جهش زا در غذاهای پخته ایجاد می شوند، همچنین تضعیف کننده تکثیر سلول های سرطانی در انسان می باشند. آنتوسیانین ها به علت داشتن خاصیت پاد اکسایشی قوی، اثرات رادیکال های آزاد تولید شده در بدن انسان را که منجر به جهش شده و به مولکول DNA آسیب جدی وارد می کند، خنثی می کنند. مصرف آنتوسیانین ها ممکن است در جلوگیری از بیماریهایی نظیر دیابت و اختلالات روحی و روانی نیز موثر باشند. بسیاری از فلاونوئید های موجود در میوه جات، سبزیجات، خشکبارها و غلات خواص بیولوژیکی بسیار گسترده ای دارند و خطر بسیاری از بیماریها را به میزان قابل توجهی کاهش می دهند (۲۵،۵۵).

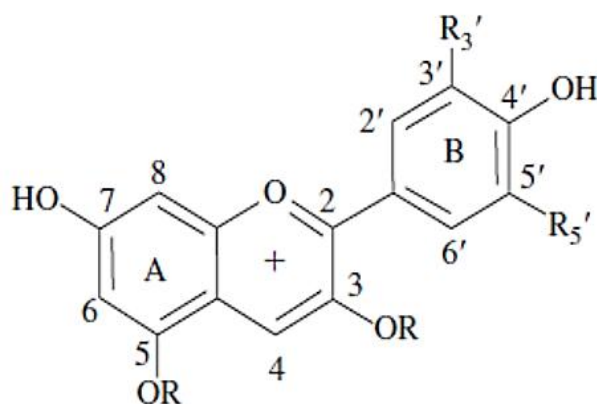
آنتوسیانین ها نفوذپذیری مویرگ ها را کاهش داده و خاصیت التیام دارند و باعث افزایش نیروی انقباضی قلب می شوند همچنین از کلسترول موجود در LDL در مقابل اکسید شدن محافظت می کنند و جلوی تشکیل لخته خون را گرفته، خاصیت ضد التهابی دارند (۳۵،۳۶). مطالعات در اروپا نشان داده است که افرادی که به مقدار قابل توجهی آنتوسیانین

مصرف می کنند در مقایسه با کسانی که از این ترکیبات کمتر استفاده می کنند حدود ۶۰٪ کمتر دچار مرگ ناشی از سکته‌ی قلبی می شوند و ۷۰٪ خطر حملات قلبی کاهش می یابد.

۱.۳ ساختار آنتوسیانین‌ها:

آنتوسیانین‌ها متعلق به گروه فلاونونوئیدها از پلی فنل‌ها هستند. اسکلت آنها به صورت زیر می باشد: $C_6C_3C_6$ آنتوسیانین‌ها گلیکوزیده مشتقات پلی هیدروکسی و پلی متوکسی ۲- فنیل بنزو پیریلیوم می باشند. آنتوسیانیدین ساختار پایه آنتوسیانین‌ها می باشد. آنتوسیانیدین (آگلیکون) شامل یک حلقه آروماتیک (A) می باشد که به حلقه ی هیدروکسیل (C) وصل شده که این حلقه واجد اکسیژن بوده و در موقعیت ۲ از طریق پیوند کربن - کربن به حلقه ی آروماتیک (B) با گروه های استخلافی متصل شده و کاتیون فلاویلیوم نامیده می شود (۵۳). قسمت اصلی آنتوسیانین‌ها قسمت آگلیکون آن بنام کاتیون فلاویلیوم است که شامل باندهای دوگانه بوده و مسئول جذب نور حدود ۵۰۰ نانومتر است که باعث می شود رنگیزه در چشم قرمز به نظر برسد (۱۸).

محیط اسیدی با pH ۳-۵ غنی از یون های معدنی و پلی فنول های دیگر برای تحول در این رنگدانه ها که قادر به شکل گیری کمپلکس های ملکولی و پس از آن تثبیت و تغییر رنگ هستند ضروری می باشد. اسیدهای آلی آلفاتیک یا آروماتیک ممکن است قند هیدروکسیل را استریفیه کنند. علاوه بر این گروه های OH و OCH_3 که نام های مشخص از ۶ ساختار اصلی آنتوسیانین را ایجاد می کنند وجود حداقل یک گروه OH باعث تغییرات ساختاری و در نهایت تنوع رنگی می شود.



شکل ۳: کروموفر فلاویوم، R معمولاً قند یا قند اسیده شده می باشد

امروزه ۲۲ نوع آنتوسیانیدین مختلف شناسایی شده که شش نوع از آنها ویژه اند و در بیشتر مواد غذایی دیده می شوند که شامل: پلارگونیدین، سیانیدین، پتونیدین، دلفینیدین و مالویدین است (۶۰). این آنتوسیانیدین ها در تعداد گروه های متوکسیل و هیدروکسیل در حلقه B از کاتیون فلاویلیوم با هم متفاوتند (۴۶). سیانیدین عمومی ترین نوع آنتوسیانیدین ها می باشد و کمتر میوه ای دیده می شود که سیانیدین نداشته باشد و در تعدادی از میوه ها نظیر هلو سیانیدین یک آگلیکون غالب است (۵۳).

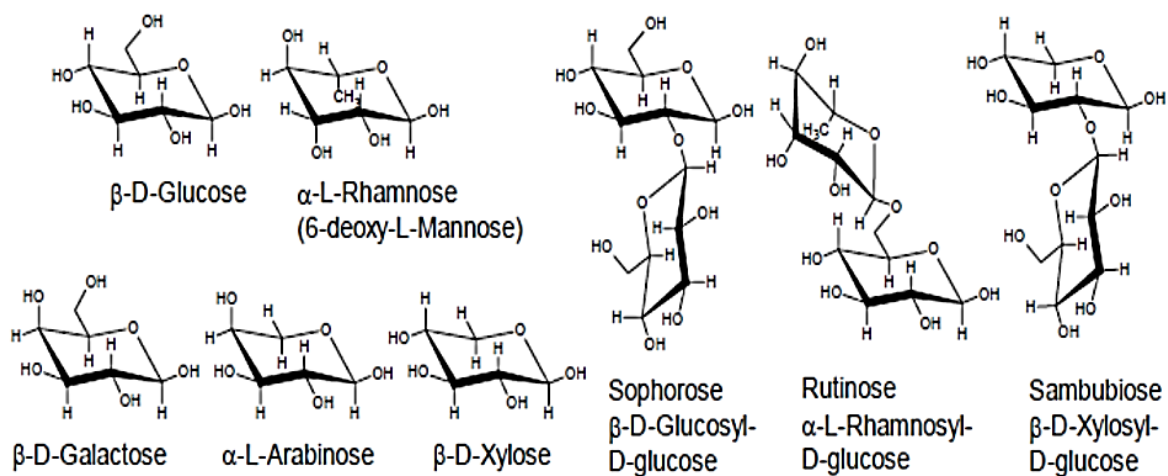
جدول ۱-۱: آنتوسیانین ها پلی فنول های گلیکوزیده ۱۵ کربنه با ساختار هیدروکسیله در موقعیت ۳' و ۴' هستند که می توانند در ۶ ساختار اصلی بر طبق الگوی جایگزین در موقعیت ۳' و ۵' تقسیم شوند.

Anthocyanidin common name	3' and 5' substituents
Pelargonidin	H/H
Cyanidin	OH/H
Peonidin	OCH ₃ /H
Delphinidin	OH/OH
Petunidin	OH/OCH ₃
Malvidin	OCH ₃ /OCH ₃

آنتوسیانیدین ها به ندرت در طبیعت یافت می شوند و در طبیعت به فرم گلیکوزیده (آنتوسیانین) وجود دارند. آنتوسیانیدین ها اغلب در گل ها و میوه ها در فرم گلیکوزیده خود یعنی آنتوسیانین ها وجود دارند (۵۳). آنتوسیانین ها نسبت به آنتوسیانیدین ها در آب بسیار محلول و پایدارند که این به علت گلیکوزیلاسیون آن ها می باشد. واحد های گلیکوزیل، گروه های آسیل متصل شده به آگلیکون ها و جایگاه اتصال شان تاثیر زیادی روی پایداری و واکنش پذیری ملکول های آنتوسیانین دارد. هم چنین الگوی جانشینی آنتوسیانیدین، تعداد و جایگاه گروه های هیدروکسیل و متوکسیل در آگلیکون روی رفتار شیمیایی رنگیزه ها موثر است. افزایش هیدروکسیلاسیون آگلیکون، آنتوسیانیدین ها را پایدارتر می کند: دلفینیدین نسبت به سیانیدین گروه هیدروکسیل بیشتری دارد به همین دلیل در متانل اسیدی نسبت به سیانیدین پایدارتر است (۳۸). به هر حال این اختلافات مربوط به تاثیر هیدروکسیلاسیون آگلیکون روی پایداری ملکول می باشد، در pH ۳ سیانیدین ۳- گلوکوزید پایدارتر از پلارگونیدین ۳- گلوکوزید است اما پایداری دلفینیدین ۳- گلوکوزید کمتر از سیانیدین ۳- گلوکوزید است. هم چنین پایداری پتونیدین ۳- گلوکوزید با دو گروه هیدروکسیل در حلقه ی B از

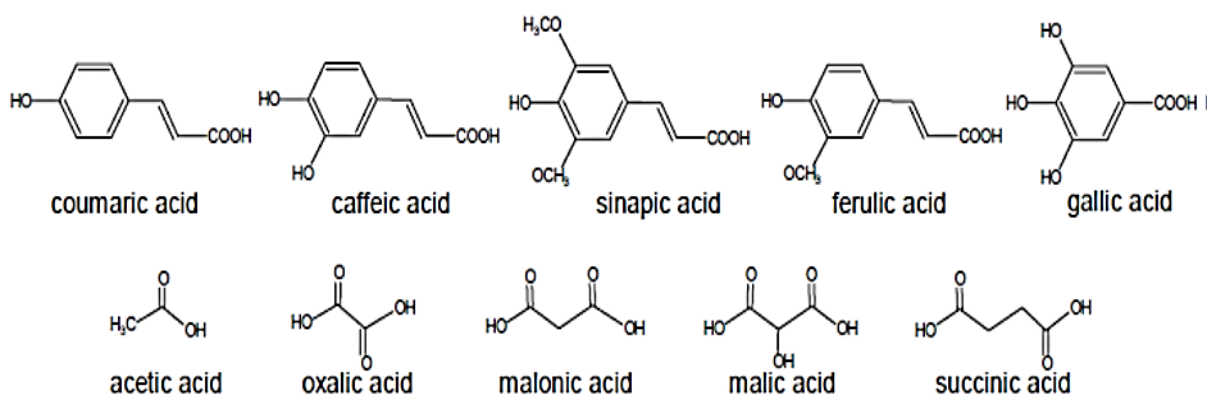
پتونیدین ۳- گلوکوزید که دارای یک گروه هیدروکسیل در این حلقه است کمتر است (۱۷،۲۶). افزایش متیلاسیون گروه هیدروکسیل پایداری آنتوسیانین ها را تضعیف می کند. گروه های متوکسیل در C^۴ و C^۷ پایداری رنگیزه هایی با گروه هیدروکسیل را در این موقعیت کاهش می دهد (۶۳). آنتوسیانین ها هم به صورت گلیکوزیدی و هم به صورت نمک می باشند، لذا بیشتر از تمام فلاونوئیدها در آب محلول می باشند. با گرم کردن یا نگه داشتن آنتوسیانین ها در محلول های خنثی و آبی، مواد بی رنگی به نام باز کاذب تولید می شود (۳۸،۴۸). آنتوسیانین ها توسط تعدادی از واحدهای گلیکوزیل موجود در خود طبقه بندی شده اند: مونوگلیکوزیدها دارای یک بخش ساکاریدی هستند که ابتدا به گروه ۳-هیدروکسیل متصل شده است (۱۸). آنتوسیانین ها با گلیکوزیل شدن در موقعیت ۳ و ۴' بدون گلیکوزیل شدن در C^۳ در گل های آبی و پیاز قرمز شناسایی شدند (۴۴). در دی گلیکوزیدها دو مونوساکارید به گروه ۳-هیدروکسیل و ۵-هیدروکسیل از آنتوسیانیدین متصل می شوند و ممکن است به ندرت به گروه ۳-هیدروکسیل و ۷-هیدروکسیل متصل شوند اما ممکن است که دو مونوساکارید هر دو به C^۳ متصل شوند. در تری گلیکوزیدها، مونوساکاریدها به آگلیکون متصل می شوند که دو تا از آن ها در C^۳ و یکی در C^۵ یا C^۷ است. آنتوسیانین تری ساکاریدی می تواند اتصال خطی یا شاخه ای به ۳ مونوساکارید در C^۳ داشته باشد.

از مونوساکاریدهای رایج در آنتوسیانین ها: گلوکوز، رامنوز، گالاکتوز، آرابینوز و گزیلوز می باشند. دی ساکاریدها و تری ساکاریدها در آنتوسیانین ها اغلب روتینوز، سوفورز، سامبی بیوز و گلوکوروتینوز هستند. شکل ۴ ساکاریدهای رایج در آنتوسیانین ها را نشان می دهد (۳۳،۵۷).



شکل ۴: ساکاریدهای رایج در آنتوسیانین ها

آنتوسیانین ها همچنین می توانند استیله شوند. اسیدهای آلی که از طریق باند استر به واحد گلیکوزیل آنتوسیانین متصل می شوند معمولا اسیدهای فنولی آروماتیک یا اسید دی کربوکسیل آلیفاتیک یا مخلوطی از این دو هستند. این اسیدها اغلب به موقعیت ۶ مونوساکارید متصل می شوند اما آنتوسیانین ها با جایگزینی آسیل در موقعیت ۲، ۳ و ۴ مونوساکارید دیده شده اند (۲۳). اسیدهای فنولی رایج در آنتوسیانین ها از هیدروکسینامیک اسیدها یعنی پاراکوماریک، فرولیک، کافئیک و سیناپیک اسید و هیدروکسی بنزویک اسیدها مثل گالیک اسیدها مشتق شده اند. اسیدهای آلیفاتیک رایج موجود در ملکول های آنتوسیانین مالونیک، استیک، مالیک، سوکسینیک و اگزالیک اسیدها هستند (۲۳، ۴۶). رایج ترین اسیدهای فنولی آروماتیک و اسیدهای دی کربوکسیل آلیفاتیک بخشی از ملکول های آنتوسیانین هستند که در شکل ۵ نشان داده شده است.



شکل ۵: واحدهای آسیل رایج آنتوسیانین ها

۱.۴ مسیر بیوسنتزی آنتوسیانین ها:

آنتوسیانین ها رنگیزه های مشتق از فلاونوئیدها از طریق مسیر شیکیمیک اسید هستند که ممکن است از نظر تکوینی به طور گذرا تنها در بافت های جوان یا در حال پیر شدن ظاهر شوند یا ممکن است دائمی باشند. آن ها از نظر زیست - محیطی به طور گذرا همراه با تغییرات دوره نوری، دما و سایر علائم نمایان و ناپدید می شوند. بیوسنتز آنتوسیانین ها به طور گسترده ای در گل صد تومانی (پیونیا)، گل میمونی و ذرت مطالعه و مشخص شده است. رنگیزه های گوناگون آنتوسیانینی از فنیل آلانین ساخته می شوند. بیوسنتز آنتوسیانین تنها زمانیکه میوه می رسد آغاز می گردد و به طور عادی در طول مرحله رسیدن ادامه پیدا می کند. عواملی مانند وارپته، محل رویش و شرایط رشد می توانند مقدار آنتوسیانین ها

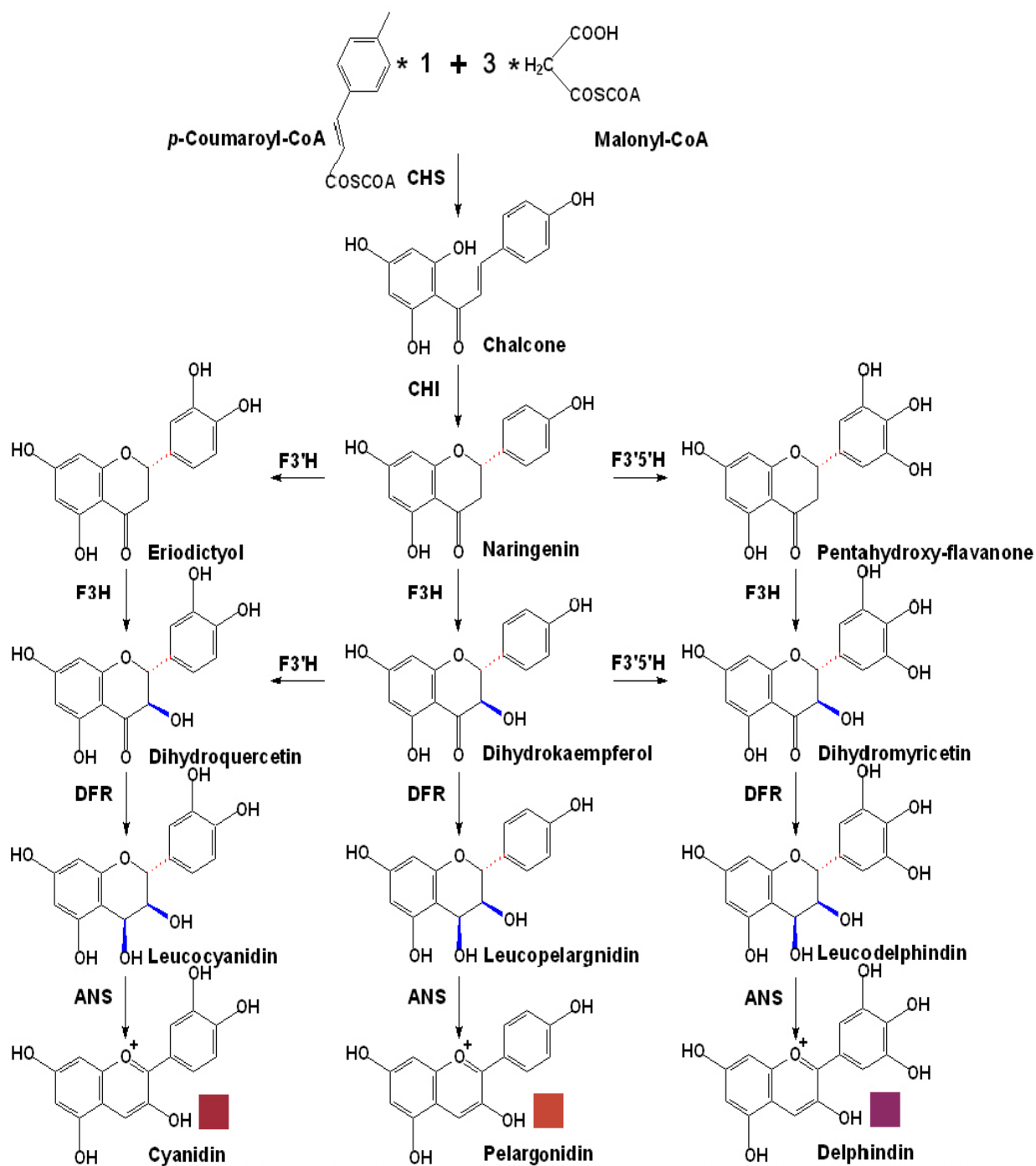
و پروفایل رنگیزه های مختلف را تحت تاثیر قرار دهند. مسیر بیوستتزی آنتوسیانین ها به این صورت انجام می گیرد که ابتدا از طریق مسیر اسید شیکمیک، اسید آمینه L- فنیل آلانین به وجود می آید سپس این اسید آمینه توسط آنزیم کلیدی فنیل آلانین آمونیلایز به اسید سینامیک تبدیل می شود. ساخت آنتوسیانین ها با دخالت آنزیم چالکون سنتتاز (CHS) که تراکم سه واحد مالونیل را با p- کوماریل CoA- کاتالیز می کند و حاصل آن تتراهیدروکسی چالکون است، آغاز می گردد. سپس چالکون ایزومراز (CHI)، ایزومراسیون تتراهیدروکسی چالکون زرد رنگ را به فلاوانون بی رنگ کاتالیز می کند. نارینژین توسط فلاوانون ۳- هیدروکسیلاز (F³H) به دی هیدروکسی کامپفرول (DHK) تبدیل می شود. دی هیدروکسی کامپفرول (DHK) توسط آنزیم فلاوانول ۳-هیدروکسیلاز (F³H)، هیدروکسیله شده دی هیدرو کوئرستین (DHQ) را به وجود می آورد و یا دی هیدروکسی کامپفرول (DHK) توسط آنزیم های فلاونوئید ۳و۵ دی هیدروکسیلاز به دی هیدرومیرستین (DHM) تبدیل می گردد. هم چنین فلاوانون ۳و۵ دی هیدروکسیلاز می تواند DHQ را به DHM تبدیل کند. در آخر برای تبدیل دی هیدرو فلاونول های بی رنگ مثل، DHK، DHM و DHQ به آنتوسیانین ها، سه آنزیم مورد نیاز است. اولین تبدیل آنزیمی احیای دی هیدرو فلاونول ها به فلاون ۳و۴ دیول ها است که Leucoanthocyanins گفته می شود. این واکنش توسط آنزیم دی هیدرو فلاونول ۴ ردوکتاز (DFR) صورت می گیرد. علاوه بر اکسیداسیون، دی هیدراسیون و گلیکوزیلاسیون Leucoanthocyanins های مختلف، رنگیزه های پلارگونیدین آجری رنگ تیره، سیانیدین قرمز و دلفینیدین آبی را تولید می کند. آنتوسیانیدین ۳ گلوکوزیدها ممکن است در بسیاری از گونه ها توسط واکنش های گلیکوزیلاسیون، متیلاسیون و آسیلاسیون تغییر حاصل می کنند و به مواد دیگری تبدیل گردند (۴۱). مرحله نهایی در مسیر آنتوسیانین تشکیل ۳ گلوکوزید به وسیله ی UDP-گلوکز-فلاونوئید ۳-O گلوکوزیل ترانسفراز است (UFOT).

آنتوسیانین ها پس از ساخته شدن در سیتوزول از طریق پروتئین های حامل که در تونوپلاست قرار دارند به درون واکوئل می روند و در آنجا انباشته می شوند. اگر آنتوسیانین ها بیوستتز نشوند درون واکوئل های سلول های اپیدرمی بالغ ذخیره می شوند. مایع واکوئلی همیشه به صورت خفیف اسیدی است به این دلیل و دلایل مشابه در صنایع غذایی به پایداری رنگ آنتوسیانین ها و دگرگونی آنها بیشتر توجه می شود (۷۹).

محیط فیزیوشیمیایی طبیعی آنتوسیانین ها مناسب است چون یک محلول نسبتا اسیدی است که در دمای اتاق تحت فشاری نزدیک به فشار اتمسفر حفظ می شود، با این حال گفته می شود که بیشتر آنتوسیانین ها ی به وجود آمده به طور

طبیعی به هنگام نگهداری در محلول های به طور خفیف اسیدی به طور سریع و در برخی موارد تقریباً به طور کامل

بیرنگ می شوند (۵).



شکل ۶: مسیر سنتز آنتوسیانین (۴۱)

به نظر می رسد که ساخته شدن آنتوسیانین ها در گیاهان معمولا با تجمع قند ها در بافت های گیاهی همراه است. هر عامل محیطی از قبیل شدت زیاد نور، حرارت پایین، خشکی یا کمبود ازت که مناسب افزایش محتویات قند در یک بافت گیاهی است، اغلب ساخته شدن آنتوسیانین در آن بافت را زیاد می کند. از طرف دیگر عوامل محیطی که مانع از تشکیل یا تجمع قند ها شوند اغلب همان اثر بازدارندگی را روی ساخته شدن آنتوسیانین دارد. نور در برخی از بافت های گیاهی روی سنتز آنتوسیانین تاثیر می گذارد، مثلا رنگ قرمز پاییزی به طور شدید فقط در برگ هایی که در معرض نور قرار دارند ایجاد می گردد. در برخی گونه ها آنتوسیانین در غیاب نور ساخته می شود. ایجاد رنگ توسط آنتوسیانین ها در گل ها پدیده پیچیده ای است. عوامل موثر بر رنگ بافت های گیاهان که به سبب آنتوسیانین ایجاد می شود شامل: غلظت رنگیزه، نسبت رنگیزه های مختلف موجود در گیاه، حالت فیزیکی آنتوسیانین و pH شیره سلول است (۳،۴،۷۳).

۱.۵) پایداری آنتوسیانین ها:

مطالعات جدید نشان می دهد که آنتوسیانین ها می توانند به عنوان رنگ طبیعی غذاها مورد استفاده قرار گیرند، اما چون آنتوسیانین ها مولکول هایی بسیار ناپایدار در ماتریکس غذایی هستند این عمل را دچار محدودیت کرده است. پایداری رنگ آنتوسیانین ها به طور موثری تحت تاثیر pH، حلال ها، دما، غلظت، ساختار آنتوسیانین ها، اکسیژن، نور، آنزیم ها و مواد دیگر متصل شده به آن ها قرار می گیرد (۵).

۱.۵.۱) اثرات ساختار:

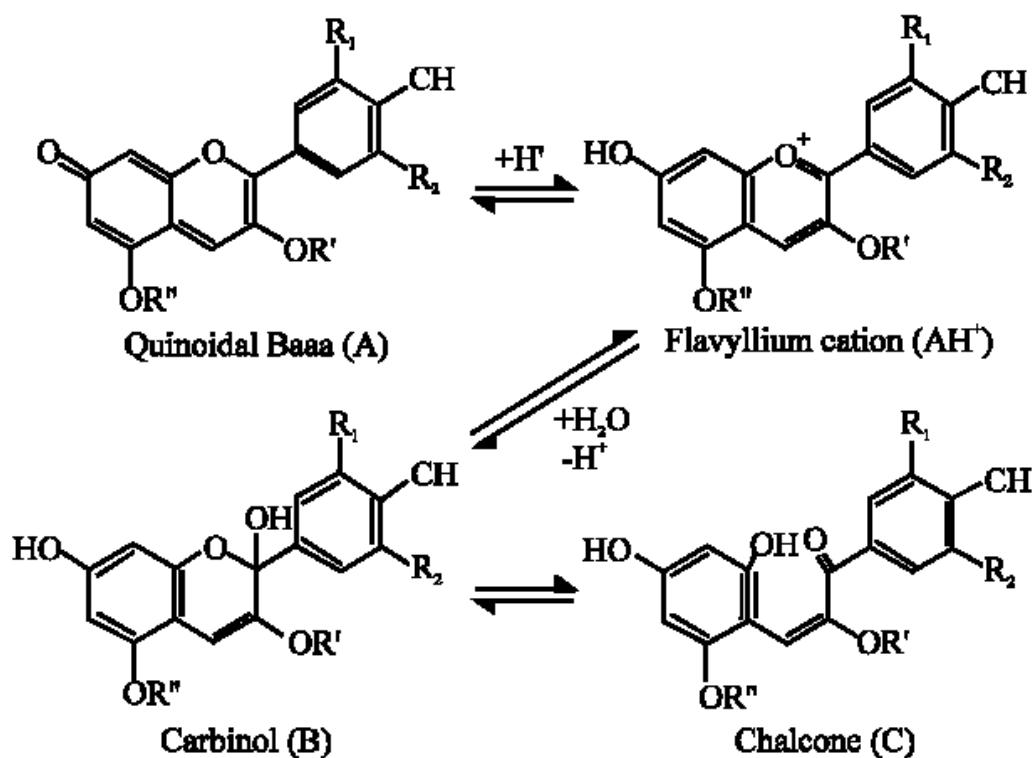
محل اتصال واحدهای گلیکوزیل و آسیل به آگلیکون نقش مهمی را روی پایداری و فعالیت ملکول آنتوسیانین دارند. همچنین تعداد و محل گروه های هیدروکسیل و متوکسیل در آگلیکون رفتار شیمیایی ملکول آنتوسیانیدین را تحت تاثیر قرار می دهند. افزایش هیدروکسیلاسیون آگلیکون پایداری آنتوسیانین را بیشتر می کند، در حالیکه افزایش متیلاسیون گروه های هیدروکسیل باعث ضعیف شدن پایداری آنتوسیانین می شود. گروه های هیدروکسیل و متوکسیل فقط در پایداری آنتوسیانین ها نقش ندارند بلکه در ظاهر شدن رنگ هم موثرند. آنتوسیانین ها نسبت به آنتوسیانیدین ها در محلول های آبی پایدارترند (۷). آنتوسیانیدین ها به ندرت در طبیعت یافت می شوند اما به فرم گلیکوزیل شده در طبیعت وجود دارند. مشخص شده است که گلیکوزیل های جانشین شده باعث پایداری ملکول آنتوسیانین می شوند (۸۰).

۱.۵.۲) اثر غلظت:

افزایش غلظت آنتوسیانین موجب پایداری بیشتر رنگ می شود. افزایش غلظت آنتوسیانین همچنین باعث افزایش شدت رنگ (چند برابر) می شود (۹).

۱.۵.۳) اثر pH:

آنتوسیانین ها بیشترین پایداری را در محلول های اسیدی با pH پایین دارند. آنتوسیانین ها تنوع زیادی از رنگ را در طیف متفاوت pH از ۱-۱۴ از خود نشان می دهند. در محلول های اسیدی آنتوسیانین ها به چهار شکل اصلی و متعادل وجود دارند که شامل: باز کوئینیدال A، کاتیون فلاویلیوم AH⁺، کرینیول یا سودوباز B و چالکون (C). در محیط با pH ۰/۵ کاتیون فلاویلیوم قرمز رنگ وجود دارد که با بالا رفتن pH کاتیون هیدراته شده و به فرم بدون رنگ کرینیول تبدیل می شود. این فرم به وجود آمده به علت از دست دادن باند دوگانه نور مرئی را نمی تواند جذب کند. همچنین با کاهش یک پروتون از کاتیون فلاویلیوم در pH های بالا فرم رنگی کوئینوئیدال به وجود می آید. با بالا رفتن pH و باز شدن حلقه B چالکون بی رنگ به وجود می آید (۱۸). از دست رفتن رنگ آنتوسیانین به pH بستگی دارد که AH⁺ و کاتیون فلاویلیوم پایدارترین و بیشترین گونه های رنگی می باشند. در pH پایین نسبت به pH های بالا شدت رنگ آنتوسیانین چند برابر است که اگر فرم فلاویلیوم از بین برود رنگ از بین خواهد رفت. در واکنش های گیاه که pH نزدیک به ۷ است رنگ آبی - قرمز مشاهده می شود که این به کمپلکس آنتوسیانین به فنولیک ها و یون های فلزی Al³⁺ و Mg²⁺ نسبت داده می شود.



شکل ۷: چهار فرم متداول آنتوسیانین ها در محیط های آبی (۷۰)

۱.۵.۴) دما:

در دماهای بالا سرعت تخریب آنتوسیانین ها زیاد می شود. دمای بالای ۳۰ درجه سانتی گراد باعث دگرگونی ساختار مولکول آنتوسیانین به ویژه در مجاورت هوا (اکسیژن) می شود. متلاشی شدن سریع آنتوسیانین ها در دماهای بالا ممکن است به علت هیدرولیز حلقه پیریلیوم باشد که ممکن است چالکون هایی را برای تولید ذرات قهوه ای پلیمریزه ایجاد کند که در محصولات حاوی آنتوسیانین انباشته می شوند. نهایتاً تخریب دمایی آنتوسیانین ها منجر به تولید محصولات قهوه ای رنگ به ویژه در حضور اکسیژن می شود (۴۲).