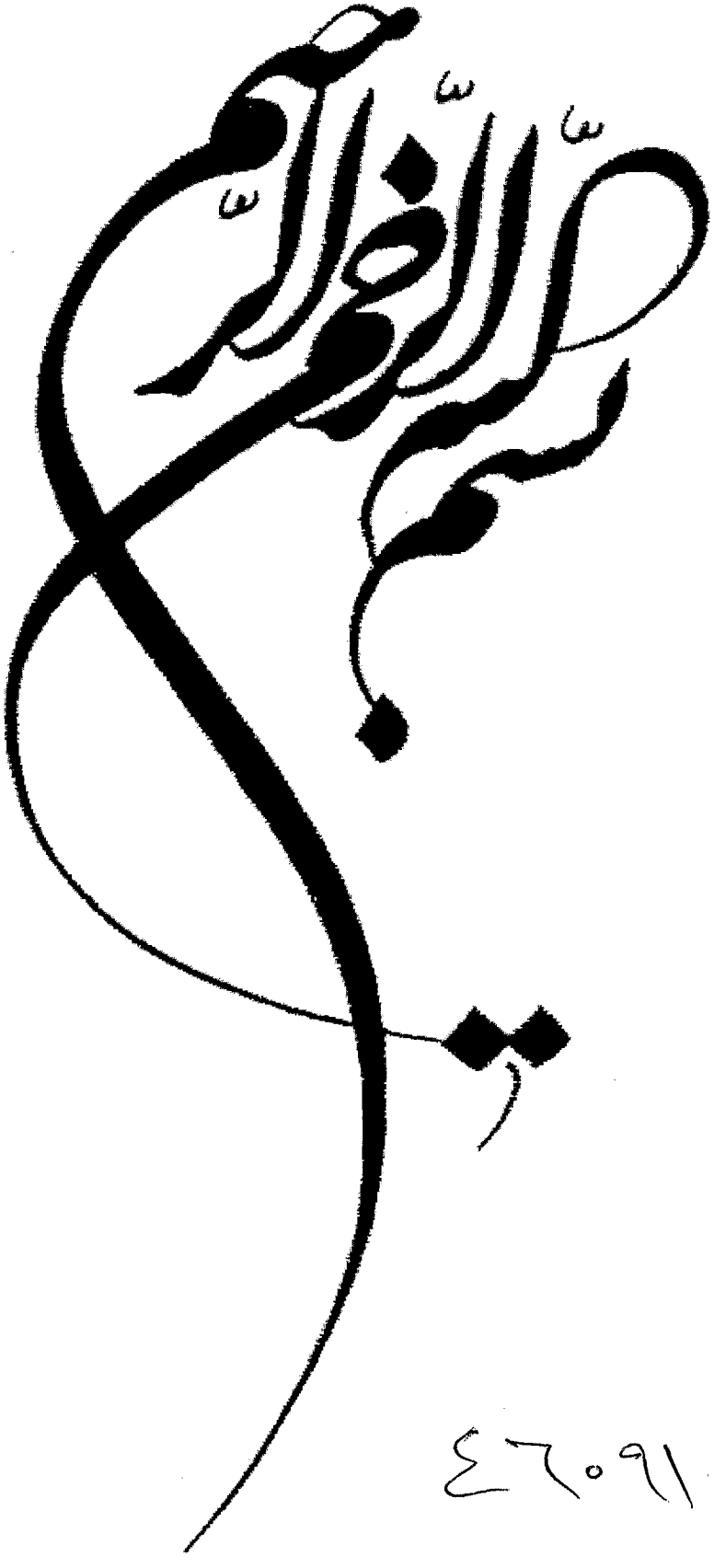
بسم الله الرحمن الرحيم
٤٦٠٩١

دانشگاه شیراز

دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد در رشته علوم و صنایع غذایی

بررسی تاثیر اتصال پروتئین به بتاگلوکان از راه واکنش میلارد بر خواص عملکردی آنها

توسط:

سارا انصاری

استاد راهنما:

دکتر محمود امین لاری

مهندس رقیه رمضانی

۱۳۸۷/۳/۰۷

اسفند ۱۳۸۶

٤٦٠٩١

به نام خدا

بررسی تأثیر اتصال پروتئین به بتاگلوکان از راه واکنش میلارد بر خواص عملکردی آنها

به وسیله ی:

سارا انصاری

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

در رشته:

مهندسی کشاورزی - علوم و صنایع غذایی

از دانشگاه شیراز

شیراز

جمهوری اسلامی ایران

ارزیابی شده توسط کمیته پایان نامه با درجه : .....

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

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

دکتر عسکر فرحناکی، استادیار بخش علوم و صنایع غذایی .....

دکتر مهرداد نیاکوثری، استادیار بخش علوم و صنایع غذایی .....

اسفندماه ۱۳۸۶

تقدیم به :

ستاره های پرفروز آسمان زندگی ام،

پدر و مادر عزیز و فداکارم،

به سپاس زحمات بی دریغ و فراوانی که در سرتاسر زندگی ام کشیده اند،

باشد که پاسخگوی قطره ای از دریای بیکران محبتشان باشد.

سپاسگزاری

حمد و سپاس بیکران یگانه معبود عارفان، آفریننده جهان و جهانیان که آثار عظمت و قدرتش در جای جای هر مکان و در هر زمان در نهایت جمال و شگفتی آشکار است و تمامی مخلوقات به عجز خویش در برابر جاه و جلال کبریائیش معترفند و امید به لطف و عنایتش دارند. اکنون که به یاری خداوند متعال تحقیق و نگارش این رساله را به پایان رسانیده ام، وظیفه خود می دانم سپاس متواضعانه خویش را حضور اساتید ارجمند و گرانقدرم جناب آقای دکتر محمود امین لاری و سرکار خانم مهندس رقیه رمضانی که زحمت راهنمایی و هدایت این پروژه را تقبل فرمودند، تقدیم نمایم. از رهنمودهای ارزنده شان در مسیر انجام این پایان نامه، حمایت و پشتیبانی هایشان در انجام کارهای عملی این رساله و دلگرمی دوستانه شان جهت ادامه راه صمیمانه سپاسگزارم.

از استاد گرانقدرم جناب آقای دکتر عسگر فرحناکی به جهت همفکری ها و مساعدت های ارزنده شان در طول انجام این تحقیق و ارائه نظرات مفیدشان در تصحیح پایان نامه کمال تشکر را دارم.

همچنین از استاد گرامی جناب آقای دکتر مهرداد نیاکوثری به سبب راهنمایی ها و توصیه هایشان در تنظیم و نگارش پایان نامه سپاسگزارم.

در پایان شایسته است از کارشناسان محترم بخش صنایع غذایی سرکار خانم محسنی، سرکار خانم کشتکاران، سرکار خانم شفیعی، جناب آقای اسفندیاری و سایر دوستانی که در طول انجام این تحقیق مرا یاری کردند تشکر و سپاسگزاری نمایم.

چکیده

بررسی تأثیر اتصال پروتئین به بتاگلوکان از راه واکنش میلارد بر خواص عملکردی آنها

به وسیله ی:

سارا انصاری

در سال های اخیر با افزایش تقاضای مصرف کنندگان مبنی بر غذاهای سالم تر، تولید محصولات غذایی عملگر اهمیت قابل ملاحظه ای یافته است. یکی از مهمترین ترکیباتی که در این رابطه بطور وسیعی مورد مطالعه قرار گرفته، پلی ساکارید غیر شاخه ای (۳→۱)(۴→۱)- β - D- گلوکان است که بطور طبیعی در دیواره سلولی جو و جودوسر یافت می شود. این ترکیب اثرات مفیدی را بر پاسخ های گلایسمیک، انسولین و کلسترول خون دارد. هدف از این تحقیق اتصال بتاگلوکان به لیزوزیم و بررسی تاثیر آن بر خواص عملکردی و ضدمیکروبی هر دو ترکیب می باشد. گلیکوزیله کردن لیزوزیم تحت شرایط واکنش میلارد (دمای ۶۰°C و رطوبت نسبی ۷۹٪ به مدت یک هفته) و با نسبت وزنی ۱ به ۱ صورت گرفت. اتصال کووالانسی بتاگلوکان به لیزوزیم با روش های الکتروفورز SDS-PAGE و کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون G-100 و G-200 تایید گردید و نشان داده شد که بطور تقریبی ۳/۶ میلی مول بتاگلوکان به هر مول لیزوزیم اتصال یافته است. نتایج بدست آمده حاکی از آن است که نمونه های گلیکوزیله حلالیت بیشتری را در مقادیرpH ۷، ۵ و ۹ و دماهای مختلف(۲۵، ۴۰ و ۶۰°C) نسبت به نمونه های کنترل داشتند. مقاومت حرارتی، فعالیت امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون لیزوزیم نیز طی اتصال به بتاگلوکان بطور قابل ملاحظه ای بهبود یافت. این در حالی است که فعالیت آنزیمی لیزوزیم در اثر گلیکوزیله کردن به میزان ۵۶ درصد در مقایسه با لیزوزیم معمولی کاهش یافت. نتایج حاصل از بررسی اثر ضدمیکروبی نمونه ها نیز نشان داد که کنژوگه کردن بتاگلوکان به لیزوزیم موجب بهبود اثر ضدمیکروبی آن در مقابل باکتری گرم منفی اشریشیاکلی می شود، در عین حال اثر ضدمیکروبی آن بر روی باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس محفوظ می ماند. ارزیابی رفتار رئولوژیکی بتاگلوکان و بتاگلوکان کنژوگه در سرعت های برشی ۰ تا ۱۵/۲ s^{-1}، دماهای ۵ تا ۶۰°C و غلظت های ۰/۵ تا ۲ درصد حاکی از آن است که اتصال کووالانسی لیزوزیم به بتاگلوکان موجب افزایش شاخص رفتاری جریان، کاهش تنش تسلیم، کاهش ویسکوزیته ظاهری و به عبارتی سودوپلاستیک تر شدن محلول بتاگلوکان می شود. بعلاوه ویسکوزیته ذاتی کاهش(احتمالاً بدلیل تاثیر بر حجم هیدرودینامیکی)، حلالیت و ظرفیت نگهداری آب بتاگلوکان بهبود می یابد. بنابرنتایج این تحقیق کنژوگه کردن لیزوزیم با بتاگلوکان می تواند کاربرد بتاگلوکان را به عنوان یک ترکیب عملگر و لیزوزیم را به عنوان یک ترکیب ضدمیکروبی طبیعی در فرمولاسیون های غذایی و دارویی افزایش دهد.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه ۱

۱-۱- پیشگفتار ۱
۱-۲- خواص عملکردی بیوپلیمرهای غذایی ۲
۱-۳- برهمکنش های میان بیوپلیمرها ۲
۱-۴- ایجاد عملکرد جدید بر پایه برهمکنش میان بیوپلیمرها در محلول ..۴
۱-۵- کاربردهای صنعتی کمپلکس های پروتئین- پلی ساکاریدی ۶
۱-۶- بتاگلوکان ۷
۱-۶-۱- β-D-(۱→۳)-گلوکان خطی ۸
۱-۶-۲- β-D-(۱→۳)(۱→۶)-گلوکان ها ۹
۱-۶-۳- β-D-(۱→۳)(۱→۴)-گلوکان ها ۱۱
۱-۶-۴- خواص عملکردی بتاگلوکان ۱۴
۱-۶-۵- خواص تغذیه‌ای و فیزیولوژیکی بتاگلوکان ۱۷
۱-۶-۶- کاربرد بالقوه بتاگلوکان در محصولات غذایی ۲۱
۱-۷- لیزوزیم ۲۲
۱-۷-۱- تاریخچه لیزوزیم ۲۲
۱-۷-۲- منابع آنزیم لیزوزیم ۲۳
۱-۷-۳- خصوصیات ساختاری لیزوزیم ۲۴
۱-۷-۴- عملکرد لیزوزیم ۲۶
۱-۷-۵- کاربرد لیزوزیم ۲۸
۱-۸- اصلاح پروتئین ها ۳۱
۱-۸-۱- اصلاح فیزیکی ۳۲
۱-۸-۲- اصلاح آنزیمی ۳۳
۱-۸-۳- اصلاح شیمیایی ۳۵

عنوان صفحه

۱-۸-۳-۱- اصلاح شیمیایی پروتئین ها به روش میلارد ۳۶
فصل دوم: مروری بر تحقیقات و پژوهشهای انجام شده..... ۴۲

۲-۱- اصلاحات انجام شده بر روی لیزوزیم ۴۲
۲-۲- اصلاحات انجام شده بر روی بتاگلوکان ۴۶
۲-۳- اهداف تحقیق..... ۴۸
فصل سوم : مواد و روش ها..... ۴۹

۳-۱- مواد مورد نیاز..... ۴۹
۳-۲- وسایل و دستگاه های مورد نیاز..... ۵۰
۳-۳- روش کار ۵۱
۳-۳-۱- اتصال لیزوزیم به بتاگلوکان..... ۵۱
۳-۳-۲- انجام کروماتوگرافی به روش ژل فیلتراسیون(صافی مولکولی) .۵۱
۳-۳-۲-۱- ژل فیلتراسیون بر روی سفادکس G-100 ..... ۵۱
۳-۳-۲-۱-۱- آماده سازی ستون ۵۱
۳-۳-۲-۱-۲- آماده سازی نمونه ۵۲
۳-۳-۲-۱-۳- نمونه گذاری در ستون ۵۲
۳-۳-۲-۲- ژل فیلتراسیون بر روی سفادکس G-200 ..... ۵۲
۳-۳-۳- الکتروفورز ۵۳
۳-۳-۳-۱- تهیه محلول های الکتروفورز ۵۳
۳-۳-۳-۲- تهیه ژل جداکننده با غلظت های مختلف آکریل آمید ...۵۴
۳-۳-۳-۳- تهیه ژل متراکم کننده(ژل رویی) ۵۵
۳-۳-۳-۴- نمونه گذاری و انجام الکتروفورز ۵۶
۳-۳-۳-۵- رنگ آمیزی و رنگ زدایی ژل ۵۷
۳-۳-۴- تعیین میزان قند نمونه ۵۷
۳-۳-۴-۱- آماده سازی اولیه نمونه ۵۷
۳-۳-۴-۲- تهیه محلول های استاندارد ۵۸
۳-۳-۴-۳- روش اندازه گیری ۵۸
۳-۳-۴-۴- اندازه گیری قند نمونه ها ۵۸
۳-۳-۵- بررسی فعالیت آنزیمی لیزوزیم ۵۹

عنوان | صفحه

۳-۳-۵-۱- آماده سازی سوبسترا ۵۹
۳-۳-۵-۲- آماده سازی آنزیم ۶۰
۳-۳-۵-۳- روش اندازه گیری فعالیت آنزیم ۶۰
۳-۳-۶- بررسی خواص عملکردی پروتئین ۶۰
۳-۳-۶-۱- حلالیت پروتئین در مقادیر pH مختلف ۶۰
۳-۳-۶-۱-۱- اندازه گیری پروتئین به روش میکروکلدال ۶۱
۳-۳-۶-۱-۲-اندازه گیری پروتئین محلول در مایع فوقانی به روش لوری ۶۱
۳-۳-۶-۱-۲-۱- آماده سازی محلول ها ۶۱
۳ -۳-۶-۱-۲-۲- روش کار ۶۲
۳-۳-۶-۲- حلالیت پروتئین در دماهای مختلف ۶۳
۳-۳-۶-۳- خواص امولسیفایری ۶۴
۳-۳-۶-۴- پایداری حرارتی ۶۴
۳-۳-۶-۵- بررسی فعالیت ضدمیکروبی لیزوزیم ۶۵
۳-۳-۶-۵-۱- تهیه محلول های لازم برای انجام آزمایشات میکروبی ۶۵
۳-۳-۶-۵-۲- انجام آزمایشات میکروبی ۶۵
۳-۳-۶-۶- بررسی خواص عملکردی بتاگلوکان ۶۶
۳-۳-۶-۶-۱- بررسی میزان تورم(یا ظرفیت نگهداری آب) و حلالیت ۶۶
۳-۳-۶-۶-۲- تعیین ویسکوزیته ذاتی ۶۷
۳-۳-۶-۶-۳- بررسی رفتار رئولوژیکی ۶۸
۳-۳-۷- تجزیه آماری داده ها ۶۹
فصل چهارم : نتایج ۷۰
۴-۱- تاثیر گلیکوزیله کردن بر رفتار الکتروفورتیکی SDS-PAGE لیزوزیم ۷۰
۴-۲- تاثیر گلیکوزیله کردن بر رفتارکروماتوگرافی لیزوزیم ۷۳

عنوان | صفحه

۴-۲-۱-کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون بر روی سفادکس G-100 و G-200 ..... ۷۳
۴-۳- بررسی میزان قند متصل شده به لیزوزیم با روش فنول سولفوریک اسید ۷۶
۴-۴- بررسی فعالیت آنزیمی لیزوزیم کنژوگه شده با بتاگلوکان ۷۶
۴-۵- تاثیر pH بر حلالیت لیزوزیم گلیکوزیله شده با بتاگلوکان ۷۷
۴-۶- تاثیر دما بر حلالیت لیزوزیم گلیکوزیله شده با بتاگلوکان ۷۸
۴-۷- پایداری حرارتی لیزوزیم گلیکوزیله شده با بتاگلوکان ۷۸
۴-۸- خواص امولسیفایری لیزوزیم گلیکوزیله شده با بتاگلوکان ۷۹
۴-۹- بررسی فعالیت ضدمیکروبی لیزوزیم گلیکوزیله شده با بتاگلوکان ۸۰
۴-۱۰- نتایج حاصل از بررسی خواص عملکردی بتاگلوکان ۸۳
۴-۱۰- ۱- بررسی میزان تورم(یا ظرفیت نگهداری آب) و حلالیت ۸۳
۴-۱۰- ۲- تعیین ویسکوزیته ذاتی ۸۴
۴-۱۰- ۳- نتایج حاصل از بررسی رفتارهای رئولوژیکی ۸۵
۴-۱۰-۳-۱- تاثیر غلظت بر فاکتورهای رئولوژیکی در دمای ثابت ۸۶
۴-۱۰-۳-۲- تاثیر دما بر فاکتورهای رئولوژیکی نمونه با غلظت ثابت ۹۰
۴-۱۰-۳-۳- رسم منحنی آرنیوس ۹۵
فصل پنجم : بحث و نتیجه گیری ۹۸

۵-۱- بررسی اثر گلیکوزیله کردن بر میزان اتصال بتاگلوکان به لیزوزیم ۹۸
۵-۲- اثر گلیکوزیله کردن بر فعالیت آنزیمی لیزوزیم ۱۰۰
۵-۳- اثر گلیکوزیله کردن بر ویژگی های عملکردی لیزوزیم ۱۰۰
۵-۳-۱- اثر pH بر حلالیت لیزوزیم ۱۰۱
۵-۳-۲- اثر دما بر حلالیت لیزوزیم ۱۰۲
۵-۳-۳- اثر گلیکوزیله کردن بر پایداری حرارتی لیزوزیم ۱۰۳
۵-۳-۴- اثر گلیکوزیله کردن بر خواص امولسیفایری لیزوزیم ۱۰۴
۵-۴- اثر گلیکوزیله کردن بر خواص ضدمیکروبی لیزوزیم ۱۰۵
۵-۵- تاثیر کنژوگه کردن بر خواص عملکردی بتاگلوکان ۱۰۸
۵-۵-۱- ظرفیت نگهداری(یا جذب)آب و حلالیت ۱۰۸
۵-۵-۲- ویسکوزیته ذاتی ۱۰۹

عنوان **صفحه**

۵-۵-۳- رفتار رئولوژیکی ۱۱۰
۵-۵-۳-۱- تاثیر غلظت بر پارامترهای رئولوژیکی..... ۱۱۰
۵-۵-۳-۲- تاثیر دما بر پارامترهای رئولوژیکی..... ۱۱۱
۵-۵-۳-۳- بررسی منحنی آرنیوس..... ۱۱۲
۵-۶- نتیجه گیری کلی..... ۱۱۳
پیشنهادات ۱۱۴
پیوست..... ۱۱۵
فهرست منابع ۱۲۲

فهرست جداول

عنوان و شماره **صفحه**

جدول ۳-۱- مقادیر مورد نیاز برای تهیه ژل آکریل آمید با درصدهای مختلف..... ۵۵
جدول ۳-۲- مقادیر مورد نیاز برای تهیه ژل رویی..... ۵۶
جدول ۳-۳- آماده سازی محلول استاندارد بتاگلوکان..... ۵۸
جدول ۴-۱- میزان بتاگلوکان اتصال یافته به نمونه های پروتئینی..... ۷۶
جدول ۴-۲- فعالیت آنزیمی لیزوزیم و لیزوزیم اصلاح شده..... ۷۷
جدول ۴-۳- تاثیر pH بر حلالیت نمونه های لیزوزیم و لیزوزیم اصلاح شده ۷۷
جدول ۴-۴- تاثیر دما بر حلالیت نمونه های لیزوزیم و لیزوزیم گلیکوزیله شده در pH برابر۵..... ۷۸
جدول۴-۵- فعالیت امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون تشکیل شده در نمونه های پروتئینی..... ۷۹
جدول ۴-۶- ظرفیت نگهداری آب و حلالیت بتاگلوکان و بتاگلوکان کنژوگه ۸۳
جدول ۴-۷- ویسکوزیته ذاتی بتاگلوکان کنژوگه در مقایسه با بتاگلوکان..... ۸۵
جدول ۴-۸- ویسکوزیته ذاتی و وزن مولکولی محاسبه شده برای بتاگلوکان..... ۸۵
جدول ۴-۹- پارامترهای رئولوژیکی محلول های بتاگلوکان و بتاگلوکان کنژوگه در غلظت های مختلف ۹۰
جدول ۴-۱۰- پارامترهای رئولوژیکی محلول های ۱ درصد بتاگلوکان و بتاگلوکان کنژوگه در دماهای مختلف..... ۹۵
جدول۴-۱۱- انرژی فعال سازی و فاکتور A محلول ۱٪ بتاگلوکان و بتاگلوکان کنژوگه در محدوده دمایی $^{\circ}C$ ۶۰-۵ حاصل از منحنی آرنیوس..... ۹۷
جدول۱-پیوست- اثرضد میکروبی لیزوزیم حرارت دیده، لیزوزیم اصلاح شده با بتاگلوکان و بتاگلوکان بر باکتری گرم منفی اشریشیاکلی..... ۱۱۸
جدول۲-پیوست- اثرضد میکروبی لیزوزیم حرارت دیده، لیزوزیم اصلاح شده با بتاگلوکان و بتاگلوکان بر باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس ۱۱۸

فهرست شکل‌ها

عنوان و شماره **صفحه**

شکل۱-۱- نحوه آرایش ساختاری مولکول ها هنگام اختلاط پروتئین ها و پلی ساکاریدها ۵

شکل۱-۲- ساختار شیمیایی کردلان ۹

شکل۱-۳- ساختار شیمیایی β- D-(۳→۱)(۶→۱) گلوکان ۱۰

شکل۱-۴- ساختار شیمیایی β- D-(۳→۱)(۴→۱) گلوکان ۱۲

شکل۱-۵- نحوه عمل آنزیم لیکناز بر بتاگلوکان ۱۳

شکل۳-۱- منحنی استاندارد بتاگلوکان برای تعیین مقدار قند اتصال یافته به نمونه های پروتئینی ۵۹

شکل۳-۲- منحنی استاندارد بدست آمده با آلبومین سرم گاوی برای تعیین میزان پروتئین مجهول با استفاده از روش لوری ۶۳

شکل۴-۱- الگوی الکتروفورز لیزوزیم گلیکوزیله شده با بتاگلوکان بر روی ژل پلی اکریل آمید با غلظت ۱۰٪ ۷۱

شکل۴-۲- الگوی الکتروفورز لیزوزیم گلیکوزیله شده با بتاگلوکان بر روی ژل پلی اکریل آمید با شیب غلظت ۵ تا ۲۰٪ ۷۲

شکل۴-۳-کروماتوگرام حاصل از ژل فیلتراسیون G-100 نمونه های لیزوزیم گلیکوزیله نشده و گلیکوزیله شده با بتاگلوکان ۷۴

شکل۴-۴-کروماتوگرام حاصل از ژل فیلتراسیون G-200 نمونه های لیزوزیم گلیکوزیله نشده و گلیکوزیله شده با بتاگلوکان ۷۵

شکل۴-۵-پایداری حرارتی لیزوزیم و لیزوزیم گلیکوزیله شده با بتاگلوکان در دماهای مختلف ۷۹

شکل۴-۶- اثر ضد میکروبی لیزوزیم گلیکوزیله شده با بتاگلوکان، بتاگلوکان و لیزوزیم حرارت دیده بدون بتاگلوکان بر باکتری گرم منفی اشریشیاکلی ۸۱

شکل ۴-۷- اثر ضد میکروبی لیزوزیم گلیکوزیله شده با بتاگلوکان، بتاگلوکان

عنوان و شماره | صفحه

و لیزوزیم حرارت دیده بدون بتاگلوکان بر باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس..... ۸۲
شکل۴-۷- ویسکوزیته کاهش یافته بتاگلوکان و بتاگلوکان کنژوگه در محدوده غلظت ۰/۵-۰/۰۱ درصد..... ۸۴
شکل۴-۸- تغییرات ویسکوزیته-سرعت برشی محلول بتاگلوکان در غلظتهای مختلف(۲-۰/۵ درصد) در دمای ثابت ۲۵ درجه سانتی گراد..... ۸۶
شکل۴-۹- تغییرات ویسکوزیته-سرعت برشی محلول بتاگلوکان کنژوگه شده در غلظت های مختلف(۲-۰/۵ درصد) در دمای ثابت ۲۵ درجه سانتی گراد..... ۸۷
شکل۴-۱۰- تغییرات ویسکوزیته-سرعت برشی محلول بتاگلوکان و بتاگلوکان کنژوگه شده در غلظت ۰/۵ درصد..... ۸۷
شکل۴-۱۱- تغییرات ویسکوزیته-سرعت برشی محلول بتاگلوکان و بتاگلوکان کنژوگه شده در غلظت ۱ درصد..... ۸۸
شکل۴-۱۲- تغییرات ویسکوزیته-سرعت برشی محلول بتاگلوکان و بتاگلوکان کنژوگه شده در غلظت ۱/۵ درصد..... ۸۸
شکل۴-۱۳- تغییرات ویسکوزیته-سرعت برشی محلول بتاگلوکان و بتاگلوکان کنژوگه شده در غلظت ۲ درصد..... ۸۹
شکل۴-۱۴- تغییرات ویسکوزیته-سرعت برشی محلول یک درصد بتاگلوکان در دماهای مختلف ۵ تا ۶۰ درجه سانتی گراد..... ۹۱
شکل۴-۱۵- تغییرات ویسکوزیته-سرعت برشی محلول یک درصد بتاگلوکان کنژوگه در دماهای مختلف ۵ تا ۶۰ درجه سانتی گراد..... ۹۱
شکل۴-۱۶- تغییرات ویسکوزیته-سرعت برشی محلول یک درصد بتاگلوکان و بتاگلوکان کنژوگه شده در دمای ۵ درجه سانتی گراد..... ۹۲
شکل۴-۱۷- تغییرات ویسکوزیته-سرعت برشی محلول یک درصد بتاگلوکان و بتاگلوکان کنژوگه شده در دمای ۱۵ درجه سانتی گراد..... ۹۲
شکل۴-۱۸- تغییرات ویسکوزیته-سرعت برشی محلول یک درصد بتاگلوکان و بتاگلوکان کنژوگه شده در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد..... ۹۳

عنوان و شماره | صفحه

شکل۴-۱۹- تغییرات ویسکوزیته-سرعت برشی محلول یک درصد بتاگلوکان و بتاگلوکان کنژوگه شده در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد.....۹۳
شکل۴-۲۰- تغییرات ویسکوزیته-سرعت برشی محلول یک درصد بتاگلوکان و بتاگلوکان کنژوگه شده در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد ۹۴
شکل۴-۲۱- منحنی Ln ویسکوزیته در مقابل معکوس دما محلول ۱ درصد بتاگلوکان در محدوده دمایی $^{\circ}C$ ۶۰-۵ و چهار سرعت برشی.....۹۶
شکل ۴-۲۲- منحنی Ln ویسکوزیته در مقابل معکوس دما محلول ۱ درصد بتاگلوکان کنژوگه در محدوده دمایی $^{\circ}C$ ۶۰-۵ و چهار سرعت برشی....۹۶
شکل۱- پیوست- فعالیت آنزیمی لیزوزیم و لیزوزیم گلیکوزیله شده با بتاگلوکان.....۱۱۵
شکل۲- پیوست- تاثیر pH بر حلالیت نمونه های لیزوزیم و لیزوزیم گلیکوزیله شده با بتاگلوکان.....۱۱۵
شکل۳- پیوست- تاثیر دما بر حلالیت نمونه های لیزوزیم و لیزوزیم گلیکوزیله شده با بتاگلوکان.....۱۱۶
شکل۴-پیوست- فعالیت امولسیون کنندگی لیزوزیم حرارت دیده و لیزوزیم گلیکوزیله شده در مقایسه با لیزوزیم طبیعی.....۱۱۶
شکل۵- پیوست- پایداری امولسیون تشکیل شده در لیزوزیم حرارت دیده و لیزوزیم گلیکوزیله شده در مقایسه با لیزوزیم طبیعی.....۱۱۷
شکل۶- پیوست- منحنی پایداری امولسیون تشکیل شده در لیزوزیم گلیکوزیله شده با بتاگلوکان در مقایسه با لیزوزیم و لیزوزیم حرارت دیده.....۱۱۷
شکل۷-پیوست- منحنی فشار برشی-سرعت برشی محلول بتاگلوکان در غلظت های مختلف ۰/۵ تا ۲ درصد.....۱۱۹
شکل۸-پیوست- منحنی فشار برشی-سرعت برشی محلول بتاگلوکان کنژوگه شده در غلظت های مختلف ۰/۵ تا ۲ درصد.....۱۱۹
شکل۹-پیوست- منحنی فشار برشی-سرعت برشی محلول ۱ درصد بتاگلوکان در محدوده دمایی ۵ تا ۶۰ درجه سانتی گراد.....۱۲۰
شکل۱۰-پیوست- منحنی فشار برشی-سرعت برشی محلول ۱ درصد بتاگلوکان کنژوگه شده در محدوده دمایی ۵ تا ۶۰ درجه سانتی گراد.....۱۲۱

عنوان و شماره | صفحه

و بتاگلوکان کنژوگه شده در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد.....۹۴
شکل۴-۲۱- منحنی Ln ویسکوزیته در مقابل معکوس دما محلول ۱ درصد
بتاگلوکان در محدوده دمایی $^{\circ}C$ ۶۰-۵ و چهار سرعت برشی.....۹۶
شکل ۴-۲۲- منحنی Ln ویسکوزیته در مقابل معکوس دما محلول ۱ درصد
بتاگلوکان کنژوگه در محدوده دمایی $^{\circ}C$ ۶۰-۵ و چهار سرعت برشی.....۹۶
شکل۱- پیوست- فعالیت آنزیمی لیزوزیم و لیزوزیم گلیکوزیله شده با بتاگلوکان.....۱۱۵
شکل۲- پیوست- تاثیر pH بر حلالیت نمونه های لیزوزیم و لیزوزیم گلیکوزیله
شده با بتاگلوکان.....۱۱۵
شکل۳- پیوست- تاثیر دما بر حلالیت نمونه های لیزوزیم و لیزوزیم گلیکوزیله
شده با بتاگلوکان.....۱۱۶
شکل۴-پیوست- فعالیت امولسیون کنندگی لیزوزیم حرارت دیده و لیزوزیم
گلیکوزیله شده در مقایسه با لیزوزیم طبیعی.....۱۱۶
شکل۵- پیوست- پایداری امولسیون تشکیل شده در لیزوزیم حرارت دیده
و لیزوزیم گلیکوزیله شده در مقایسه با لیزوزیم طبیعی.....۱۱۷
شکل۶- پیوست- منحنی پایداری امولسیون تشکیل شده در لیزوزیم گلیکوزیله
شده با بتاگلوکان در مقایسه با لیزوزیم و لیزوزیم حرارت دیده.....۱۱۷
شکل۷-پیوست- منحنی فشار برشی-سرعت برشی محلول بتاگلوکان در غلظت
های مختلف ۰/۵ تا ۲ درصد.....۱۱۹
شکل۸-پیوست- منحنی فشار برشی-سرعت برشی محلول بتاگلوکان کنژوگه
شده در غلظت های مختلف ۰/۵ تا ۲ درصد ۱۱۹
شکل۹-پیوست- منحنی فشار برشی-سرعت برشی محلول ۱ درصد بتاگلوکان
در محدوده دمایی ۵ تا ۶۰ درجه سانتی گراد.....۱۲۰
شکل۱۰-پیوست- منحنی فشار برشی-سرعت برشی محلول ۱ درصد بتاگلوکان
کنژوگه شده در محدوده دمایی ۵ تا ۶۰ درجه سانتی گراد.....۱۲۱

۱- مقدمه

۱-۱- پیشگفتار:

امروزه همزمان با تلاش برای دستیابی به راههای درمان بیماری های تهدید کننده زندگی نظیر سرطان، تحقیقات در جهت پیشگیری از این بیماری ها از طریق تغذیه رو به افزایش است. بسیاری از کشورهای صنعتی ضمن اینکه امکان زندگی طولانی و بهتر را با ارائه محصولات غذایی ایمن، مفید و در عین حال لذیذ برای جوامع خود فراهم ساخته اند، هزینه های درمان بیماری ها را نیز کاهش داده اند. پیشرفتهای اخیر در علوم و تکنولوژی غذا توانسته است مهارتهای لازم برای کنترل و بهبود ساختار فیزیکی و ترکیبات شیمیایی محصولات غذایی را فراهم نماید (Wood and Beer, 1998).

مواد غذایی فرموله شده اساساً شامل مجموعه پیچیده ای از اجزای غذایی متعدد نظیر پروتئین ها، پلی ساکاریدها، لیپیدها، قندها، امولسیفایرها، موادمعدنی و آب هستند که در میان این ترکیبات پروتئین ها و پلی ساکاریدها بواسطه اعمال ویژگی های عملکردی[1] نظیر تشکیل ژل[2] ، قوام دهندگی[3] و پایداری سطحی[4] نقش کلیدی در ساختار و تثبیت سیستم های غذایی ایفا می کنند. پروتئین ها پلیمرهای پیچیده از اسیدهای آمینه هستند که بدلیل ساختار و ترکیب شیمیایی خاص خود در ایجاد خصوصیات فیزیکی و بافتی مناسب و لازم در مواد غذایی نقش مهمی دارند. این ترکیبات همچنین از نظر ایجاد عطر و طعم در غذا حائز اهمیت هستند. طبق تعریف پروتئین های غذایی به آن دسته از پروتئین های ضرورتاً قابل هضم، غیر سمی و به اندازه کافی مغذی گفته می شود که از نظر عملکردی در محصولات غذایی قابل استفاده بوده و بطور فراوان هم در دسترس باشند. از نقطه نظر بیولوژیک پروتئین های غذایی فراهم

---

[1] Functional properties
[2] Gel formation
[3] Thickening
[4] Surface stability

آورنده اجزا لازم جهت ساخت پروتئین های مختلف چون پروتئین های ساختمانی، آنزیم ها و بسیاری هورمون ها بوده که اساس حیات را در موجودات زنده تشکیل می دهند. پلی ساکاریدها نیز فراوان ترین ترکیبات آلی موجود در طبیعت هستند و شامل انواع قندهای ساده، پلیمرهای نشاسته، سلولز، دکسترین، صمغ ها و دیگر ترکیبات مربوطه می باشند. این گروه از ترکیبات هم از نظر عناصر ساختاری و هم حفظ فعالیت های عملکردی نقش مهمی را در حیات گیاهان و حیوانات ایفا می کنند. با توجه به فراوانی و همچنین ارزانی، کربوهیدرات ها تامین کننده بخش اعظم انرژی انسان می باشند و در تغذیه دام و طیور- که خود مورد استفاده انسان قرار می گیرند- نقش بسیار مهمی دارند (Damodaran, 1996).

۱-۲- خواص عملکردی بیوپلیمرهای غذایی:

نوع، تعداد، توالی و نحوه اتصال منومرها در یک بیوپلیمر غذایی تعیین کننده خواص مولکولی آن در محلول (نظیر طول زنجیره، انشعاب، بار، انعطاف پذیری و هیدروفوبیسیتی) است. این خواص مولکولی به مقدار زیادی بر ویژگی های عملکردی بیوپلیمرها در ماده غذایی (شامل قابلیت آنها برای غلیظ کردن محلول ها، تشکیل ژل، حفظ و نگهداری آب همچنین تشکیل و پایداری امولسیون و کف) اثر می گذارد. هر کدام از این بیوپلیمرها به تنهایی می توانند جهت فراهم کردن بسیاری از این صفات حسی بکار روند، با این حال عملکردهای بهبود یافته یا جدید در یک سیستم اغلب با کاربرد مخلوط بیوپلیمرها ایجاد می شود (McClements 2006).

۱-۳- برهمکنش های[1] میان بیوپلیمرها:

علاوه بر خواص عملکردی هر یک از پروتئین ها و پلی ساکاریدها، ماهیت و ساختار برهمکنش های میان این ترکیبات نیز تعیین کننده "بافت، ساختار نهایی و پایداری ماده غذایی" می باشد. از آنجا که بافت و پایداری نیز از مهمترین خواص تعیین کننده کیفیت ظاهری محصول غذایی می باشند، دانشمندان و صنعتگران از ابتدا تعیین چنین برهمکنش هایی را جهت تأمین کیفیت بهینه غذا و طراحی ساختارهای غذایی جدید مورد توجه قرار داده اند. دانستن برهمکنش های میان بیوپلیمرهای موجود در سیستم های محلول، نظیر پروتئین ها و

[1] Interactions

پلی ساکاریدها، در سیستم های بیولوژیکی نیز اهمیت اساسی دارد که از جمله این موارد می توان به DNA و آنزیم های همانند سازی، ایمنوگلوبولین ها و پروتئین های خارج سلولی و یا پلی ساکارید ها، ویروسها و غشاهای باکتریایی اشاره کرد (Schmitt et al., 1998).

بطور کلی برهمکنش های ماکرومولکولی مؤثر در تشکیل کمپلکس ها را می توان در سه دسته برهمکنش های میان ماکرومولکول های باردار، برهمکنش های میان گروه های جانبی با بار مخالف (اسیدی و بازی)، برهمکنش میان دیگر گروه های جانبی پلی یون ها طبقه بندی کرد. این برهمکنش ها بطور دقیق تر بصورت ضعیف/قوی[1]، ویژه/غیرویژه[2]، جاذبه/دافعه[3] تقسیم بندی می شوند (Tolstoguzov, 1991).

برهمکنش های دافعه همیشه بصورت غیر ویژه و موقتی می باشند. آنها حاصل اثرات حجمی(دور شدن فضایی[4]) و یا برهمکنش های الکتروستاتیکی[5] هستند که بجز در محدوده قدرت یونی بسیار پایین و یا بسیار نزدیک بهم ذرات، تمایل به ضعیف شدن دارند. این نوع برهمکنش ها در مخلوط پروتئین-پلی ساکارید غیر یونی و یا در مخلوط پلی ساکاریدهای آنیونی و پروتئین در pH بالاتر از نقطه ایزوالکتریک یافت می شوند. برهمکنش های جاذبه میان بیوپلیمرها ممکن است به فرم ضعیف/قوی، ویژه/غیرویژه باشد. برای مثال اتصال کووالانسی میان پروتئین ها و پلی ساکاریدها یک برهمکنش جاذبه ویژه، قوی و دائمی است. برهمکنش های جاذبه غیر ویژه میان کمپلکس های پروتئین-پلی ساکارید حاصل اتصالات ضعیف متعدد میان گروه های موجود در سطح بیوپلیمرهاست که در این میان می توان به اتصالات یونی[6]، وان دروالسی[7]، هیدروفوبیک[8] و هیدروژنی[9] اشاره کرد. برهمکنش های جاذبه قوی میان پروتئین های با بار مثبت (pH پایین تر از نقطه ایزوالکتریک) و پلی ساکاریدهای کاتیونی در قدرت یونی پایین و برهمکنش های جاذبه ضعیف میان پروتئین های با بار منفی (pH بالاتر از نقطه ایزوالکتریک) و یا بدون بار و پلی ساکاریدهای آنیونی رخ می دهد. با این حال در بعضی موارد نیز ممکن است تشکیل کمپلکس بدلیل وجود مناطق کوچک باردار روی سطح پروتئین صورت پذیرد (Schmitt et al., 1998).

بطور کلی هنگامی که دو بیوپلیمر در مجاورت یکدیگر قرار می گیرند، نیروهای برهمکنشی متعددی علاوه بر اتصالات الکتروستاتیکی می توانند موجب افزایش تشکیل مناطق اتصال میان بیوپلیمرها شوند. این نیروها بسته به ترکیب و ساختار ماکرومولکول های موجود-

---

[1] Weak or strong
[2] Specific or not
[3] Attractive or repulsive
[4] Steric exclusion
[5] Electrostatic interactions
[6] Ionic
[7] Van der waals
[8] Hydrophobic interactions
[9] Hydrogen bonding

که همان توالی منومرهای گلوکزی[1] و آمینو اسیدی، ساختار حلقوی بی شکل یا فشرده[2] می باشد- متفاوت است و از مهمترین آنها می توان به اتصالات هیدروژنی، برهمکنش های هیدروفوبیک و اتصالات کووالانسی[3] اشاره کرد (Schmitt et al., 1998). اهمیت نسبی این برهمکنش ها در یک سیستم خاص بستگی به نوع بیوپلیمر شرکت کننده (نظیر وزن مولکولی، دانسیته بار در مقابل تغییرات pH ، انعطاف پذیری و هیدروفوبیسیتی) ، ترکیب محلول (مثل قدرت یونی و pH) و شرایط محیطی(مانند دما، سرعت برشی، زمان برشی و فشار) دارد. با تنظیم این پارامترها، امکان کنترل برهمکنش میان بیوپلیمرها و بنابراین ایجاد خواص عملکردی مختلف در سیستم غذایی حاصل می شود (McClements, 2006).

یک برهمکنش غیر الکتروستاتیکی بسیار ویژه در جریان تشکیل کمپلکس های پروتئین-پلی ساکاریدی، اتصال کووالانسی است. این نوع برهمکنش اغلب با ایجاد واکنش شیمیایی میان گروه های آمینی پروتئین و کربوکسیل پلی ساکاریدها و در نتیجه یک اتصال آمیدی کووالانسی[4] تشکیل می شود (Stainsby, 1980). دهیدراسیون کمپلکس[5] (از طریق حرارت دهی یا خشک کردن انجمادی[6]) و یا افزودن عوامل اتصال دهنده عرضی[7] (نظیر کربودی آماید[8]) نیز معمولا موجب القای تشکیل این نوع برهمکنش می گردد. در حقیقت اتصال کووالان یا کنژوگه کردن یک ابزار کاربردی مهم جهت برگشت ناپذیر شدن[9] و پایدار شدن کمپلکس به تغییرات pH و قدرت یونی می باشد که در سال های اخیر بدلیل ایجاد خواص عملکردی جدید بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Babikar et al., 1998).

۱-۴- ایجاد عملکرد جدید بر پایه برهمکنش میان بیوپلیمرها در محلول:

هنگامی که دو بیوپلیمر با هم مخلوط می شوند، بسته به ماهیت بیوپلیمر بکار رفته، ترکیب محلول و شرایط محیطی ممکن است تشکیل سیستم های تک یا دو فازی[10] دهند(شکل ۱-۱). در سیستم تک فازی دو بیوپلیمر بصورت مولکول های انفرادی و یا کمپلکس های محلول که بطور یکنواخت در سیستم توزیع شده اند موجود می باشند، حال آنکه در سیستم های دو فازی

[1] Glucosidic monomers
[2] Compact or random coil
[3] Covalent bond
[4] Amide covalent bond
[5] Complex dehydration
[6] Freeze drying
[7] Crosslinking agents
[8] Carbodiimide
[9] Irreversible
[10] One-phase or two-phase systems