

Characterization of melanoidin formed from glucose with alanine by Fluorescence spectroscopy and redox chemistry in vitro cells

Ghassan Faisal Mohsin

General Directorate Vocational Education || Ministry of Education || Iraq

Abdulridha Ati Jaafar

Faculty of Agriculture || University of Misan || Iraq

Abstract: Possible identify and describe a polymer formed from Glc with Ala by Fluorescence spectroscopy. Melanoidins before dialysis was higher than those of melanoidin after dialysis. Time-resolved fluorescence has been applied in the characterization of melanoidin and was observed. Melanoidins show a decrease in the absorption after the addition of hydrogen peroxide when the concentrations of H₂O₂ from 100 - 200 µl are used. However, the data suggests that the melanoidin did not penetrate into the cells (CHO-K1) after 1 and 2 hours, but it can be observed after 24 hours.

Keywords: melanoidin, Fluorescence spectroscopy, hydrogen peroxide, Cells.

Abbreviation: TRES, time-resolved emission spectra ; Glc, Glucose ; Ala, Alanine ; YFP, Yellow fluorescence protein ; GFP, green fluorescence protein ; CHO, Chinese hamster ovary

تشخيص الميلانويدن المتشكل من الكلوكوز مع الأئين بمطياف الفلوره ودراسة تأثيره التأكسدي على خلايا CHO-K1 المختبرية

غسان فيصل محسن

المديرية العامة للتعليم المهني || وزارة التربية || العراق

عبد الرضا عاتي جعفر

كلية الزراعة || جامعة ميسان || العراق

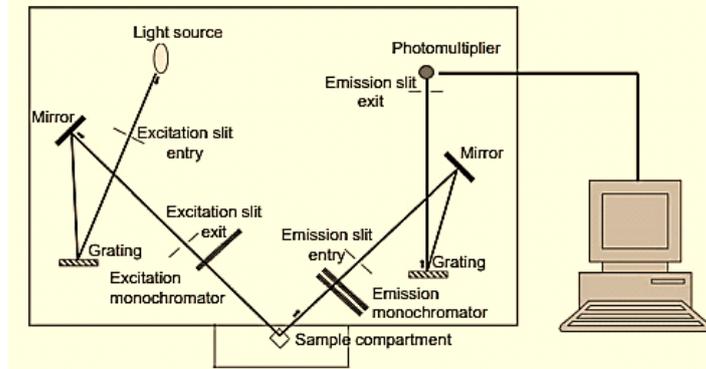
المخلص: تشخيص وتوصيف الميلانويدن المتشكل من السكر المخترل مع الحامض الأميني بواسطة مطيافية الفلوره كيميائيا وبيولوجيا. وأثبت الباحث أن الميلانويدن قبل الديلزة كان الاعلى امتصاص، ثم الميلانويدن بعد الديلزه، بعد ذلك الميلانويدن بعد الديلزه المعامل بايونات النحاس المعقدة على التوالي. وتم استخدام تقنية TRES في تشخيص الميلانويدن ولأول مرة، وذلك من أجل الحصول على نتائج أفضل. اختزال اللون البني وانخفاض امتصاصية الميلانويدن كان بسبب ارتفاع تركيز بيروكسيد الهيدروجين. حيث استخدمت التراكيز 100 و200 مايكرو لتر. أثبت الباحث أن الميلانويدن لا يستطيع اختراق خلايا CHO-K1 عند إضافة المركب إلى الخلايا خلال ساعة أو ساعتين، ولكن عند مرور 24 ساعة ظهرت نتائج مثيرة للاهتمام.

الكلمات المفتاحية: الميلانويدن - مطيافية الفلوره - بيروكسيد الهيدروجين - الخلايا.

المقدمة:

الميلانويدن مركب معقد من البولييمرات ذو لون بني أو بني غامق أو مائل إلى اللون الاسود المتشكل خلال نهاية التفاعلات غير الانزيمية المعروفة بتفاعلات ميلارد [3-1] Maillard reaction بين الأحماض الامينية ومجموعة الكاربونيل

في السكر المختزل. والميلانويدين يكون بوليمر ثقيل مع الاوزان الجزيئية المتجانسة المتشكلة من الأحماض الامينية والسكريات في درجات الحرارة العالية. [4] على الرغم من صعوبة تشخيص الميلانويدين، الا أن هناك بعض التراكيب الكيميائية المقترحة المشخصة لمركب الميلانويدين من قبل بعض الباحثين [5-8] بواسطة استخدام سكريات مختزلة احاديه كالفركتوز والكلوكوز، أو مختزلة ثنائية كالمالتوز واللاكتوز، أو وسطية كالديوكسي كلوكوزون مع الأحماض الامينية. عدة عوامل قد تلعب دورا كبير في تكثيف التفاعل البني وتشكيل المركب النهائي مثل الحرارة، والرطوبة، والاكسجين، ونوع الحامض الاميني، والسكر المختزل، والرقم الهيدروجيني pH وغيرها. [9] قد يحدث تفاعل بين سكر المالتوز والالنين في درجة حرارة 190°C فما فوق، ولكن التفاعل بين سكر الفركتوز والكلوكوز يكون كثيف وبني في درجة حراره 150°C فما فوق. [10] اشارت العديد من الدراسات إلى أن الميلانويدين مركب مضاد للأوكسدة وقادر على القضاء على الجذور الحرة الضارة في داخل الخلايا وخارجها. [11-12] تتشكل الميلانويدينات طبيعيا في الاغذية اثناء الخزن، والطبخ، والتحميص [13-14]، كما يحدث اثناء تحميص القهوة، أو المعجنات. تنشأ في هذه المركبات الكثير من الجذور الحرة عند التسخين لدرجات حرارية عالية ولمدة طويلة. [15] وهناك العديد من التقنيات المستخدمة لتشخيص المركبات الكيميائية منها: الأشعة فوق البنفسجية UV/Vis، والأشعة تحت الحمراء FTIR، والرنين المغناطيسي NMR، وأشعة اكس X-Ray، ومطياف الكتلة MALDI-TOF وغيرها. [16] ولم يتم تشخيص الميلانويدين بتقنية مطيافية الرامان Raman spectra، على الرغم من المحاولات العديدة لذلك. تعتبر الفلورة من التقنيات المهمة لتشخيص الميلانويدينات. التحليل الطيفي للفلور هو نوع من التحليل الطيفي الكهرومغناطيسي الذي يحلل الفلورسنت بواسطة الأشعة فوق البنفسجية. [17] وتكون مطيافية الفلورسنت طريقة سريعة وبسيطة وغير مكلفة. ويستخدم الفلورسنت أساسا لقياس المركبات في المحاليل. وتم تشخيص الكثير من الاغذية، وذلك بواسطة استخدام مطياف الفلورة كالخمور، وزيت الخضروات، وعصائر الفاكهة، والعسل، والحليب، وزيت الزيتون. [18]



الشكل (1) يوضح [18] fluorescence spectrophotometer

مشكلة البحث:

صعوبة تشخيص مركب الميلانويدين كيميائيا وعدم وجود دراسات عن امكانية تشخيص المركب بمطياف

الفلورة.

فرضية البحث:

يتم البحث عن امكانية تشخيص مركب الميلانويدين كمقترح باستخدام مطاييف مختلفة للتشخيص كمطياف

الفلورة والتي تكون مكملية لمطياف الأشعة تحت الحمراء والرنين المغناطيسي التي سبق وان استخدمت من قبلنا في

تشخيص الميلانويدين ونشرت هذه الأبحاث في مجلة كيمياء الاغذية، حيث تمت الإشارة لها في قائمة المصادر.

أهمية البحث:

إمكانية دراسة تشخيص الميلانويدن ودراسة تأثيره المضاد للأكسدة على خلايا الجرذان

منهجية البحث:

تم اتباع دراسة المنهج التحليلي الاحصائي باستخدام برنامج OriginPro9 من اجل تحليل ورسم الاشكال على شكل صور TIF ومعدل الدقة فيها 600 Res. وتم اخذ الكثير من القياسات للعينة الواحدة، ومن ثم اخذ المتوسط الحسابي باستخدام نفس البرنامج للحصول على رسم بياني دقيق وشامل.

المواد وطرق العمل:

المواد الكيميائية:

الكلوكوز من شركة Carl Roth ، الألبين وبيروكسيد الهيدروجين والنحاس من شركة Fluka ، انابيب الديليزة من شركة Carl Roth ، خلايا CHO-K1 من المركز الألماني للخلايا.

جهاز مطيافية الفلوره Fluorescence spectroscopy :

وتم قياس الإثارة وأطياف الانبعاثات باستخدام مطياف فلوري FLS980 مجهز بمصباح Xe 450 W وإثارة مزدوجة وأحادية اللون. وقد استخدمت Gratings blazed عند 405 نانومتر في اذرع الإثارة والانبعاثات. وتم استخدام كاشف أنبوب المضاعف الضوئي (Hamamatsu) ، (R928P مع 0.2 s dwell. وتم تصفية أوامر التعرج المرتفع من قبل مرشحات تمرير الموجة الطويلة المتكاملة في FLS980 .

تحضير الميلانويدن:

تم تحضير الميلانويدن وذلك بخلط 0.1M سكر مع 0.1M حامض اميني وسخن الخليط في طبق مصنوع من الالمنيوم في فرن خاص بالتسخين على درجة حرارة 160°C ولمدة 10 دقائق. وتم ديلزة الخليط للحصول على مركب ذو وزن جزئي عالي، وذلك بإذابة 2.5g من العينة في 150 mL ماء مقطر. ومن ثم وضع المحلول في انابيب ديلزة مصنوعة من السيليلوز. بعد ذلك، وضعت الانابيب في حمام مائي لمدة 72 ساعة مع تبديل الماء المقطر كل 10 ساعات. بعد انتهاء الديليزة، تم وضع المحلول في اطباق من الزجاج لغرض تجميد العينة. واخيرا، تم وضعها في جهاز التجفيد freeze drying لغرض تجفيف العينة واستعمالها للقياس مباشرة. [15]

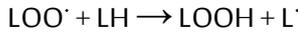
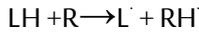
تحضير مزرعة خلايا (CHO-K1 (Chinese hamster ovary) :

خلايا بويضة الهامستر الصيني : عبارة عن خلايا مستخرجة من نسيج بويضة الهامستر الصيني. تم شراء الخلايا من المركز الألماني لأبحاث الخلايا. تم حضن الاطباق المحتوية على الخلايا النامية في حاضنة اهتزاز Climo-shaking في 110 دورة في الدقيقة إلى خليط من ثنائي اوكسيد الكربون والهواء الرطب بنسبة 5% عند درجة حرارة 37 درجة مئوية.

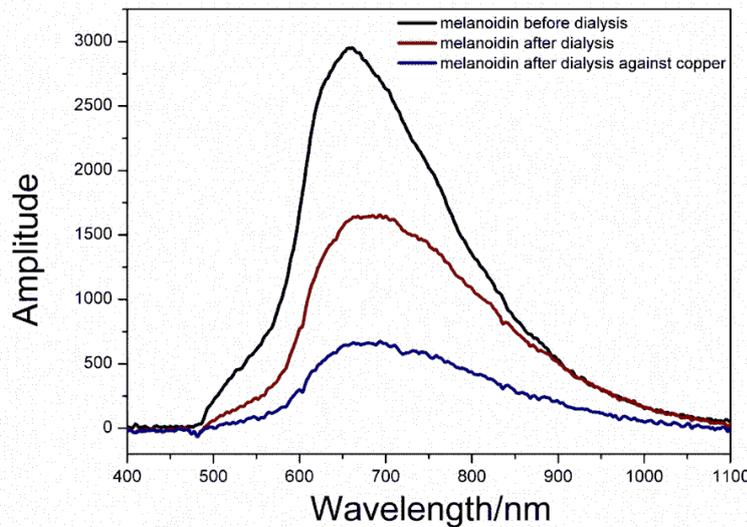
النتائج والمناقشة:

تشخيص العينة بمطيافية الفلوره:

يبين الشكل (2) تشخيص الميلانويدينات بالفلوره يتم بواسطة إثارة العينة على طول موجي 405 nm ونلاحظ من الشكل (2)، بداية قمم امتصاص العينة المثارة تقريبا على طول موجي 470 nm ، حيث كان الميلانويدين قبل الديليزة الاكثر امتصاص، ثم الميلانويدين بعد الديليزة، بعد ذلك الميلانويدين بعد الديليزة المعامل بايونات النحاس المعقدة Cu+2. تكون العينة قبل الديليزة ذات لون بني غامق جدا، اذ تحتوي على الكثير من المركبات ذات الوزن الجزيئي العالي والمنخفض. وتتداخل معها الكثير من المركبات ذات الوزن الجزيئي المنخفض مثل الفورال والبايرونول، والمثيل كلايوكسال، والكلايوكسال وغيرها والتي تتميز بانخفاض مركبات chromophores فيها. وبعد عملية الديليزة باغشية سلسلوزية خاصة، يتم التخلص من المركبات ذات الوزن الجزيئي المنخفض والحصول على بوليمير ثقيل ذو وزن جزيئي عالي بني اللون ومحتوى عالي من حاملات اللون. chromophores إضافة النحاس إلى الميلانويدين يؤدي إلى اختزال اللون البني، وبالتالي يتحول إلى محلول ذو لون باهت أو عديم اللون. الكثير من الأبحاث اشارت إلى أن الميلانويدينات تعمل كمضادات للأكسدة في التخلص من الجذور الحرة. Free Radicals كما أن الميكانيكية الرئيسية لمضادات الأكسدة Antioxidants تكون على مراحل: كالعامل على تثبيط، أو تأخير المرحلة الاولى للأكسدة بواسطة التفاعل مع الجذور أو الشقائق الحرة. وكذلك في المرحلة النهائية بواسطة التفاعل مع جذر (Peroxy radical) LOO· كما في المعادلات ادناه [19]، عن طريق منح الكترولونات للجذور أو الشقائق الحرة الطليقة وتحويلها إلى ذرات أو ايونات غير مضره بالجسم، بالإضافة إلى حماية الاغذية من حدوث التزنخ والروائح غير المرغوبة.



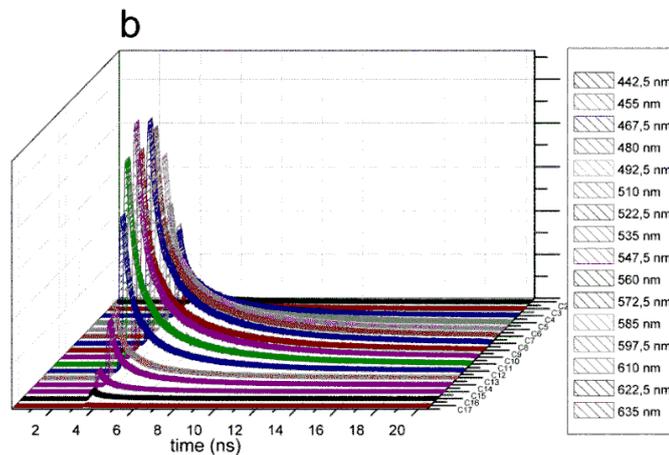
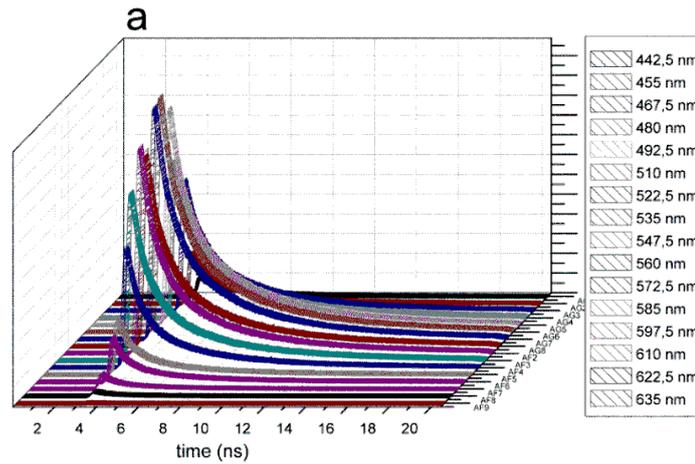
ان الغرض من إضافة ايونات النحاس إلى الميلانويدين، كان لأجل دراسة تأثيره المعقد على البوليمرات الناتجة من التفاعل الاخير لتفاعلات ميلارد البنية. ويمكن القول بان النحاس يضعف وجود حاملات اللون chromophores في هيكل الميلانويدين.

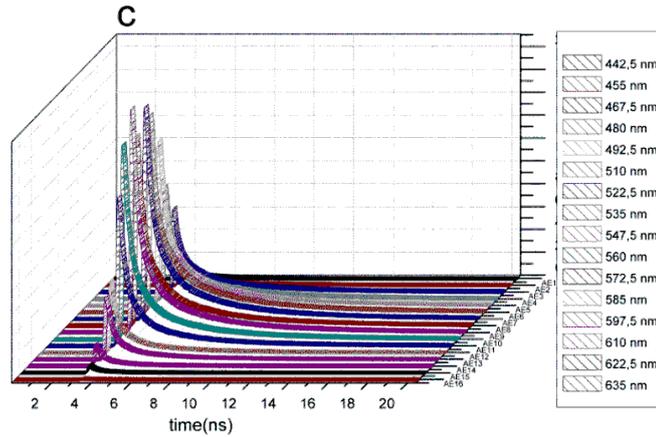


الشكل (2) يبين امتصاصية الميلانويدينات بالفلوره

التشخيص باستخدام (TRES) Time-Resolved Emission Spectra :

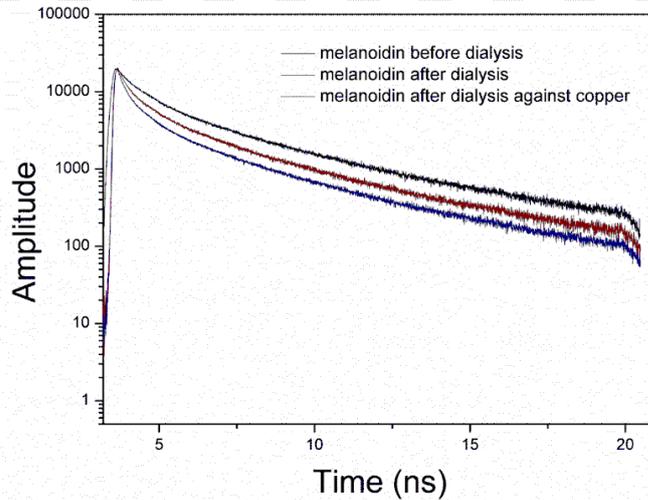
الى اليوم لا توجد مصادر استخدمت تقنية TRES في دراسة الميلا نويدين وتشخيصه، وبالتالي فقد نحلل ونفسر النتيجة تفسيراً علمياً بالاعتماد على المعطيات المتوفرة لدينا وليس على المصادر. الشكل (3) يبين تحليل العينة قبل الديليزة بأطوال موجية مختلفة كما مبين في الشكل (a). نلاحظ من الاشكال ادناه مجموعة من القمم المنبعثة بأطوال موجية مختلفة بعد الاثارة. نلاحظ اعلى قمم في الميلا نويدين قبل الديليزة كانت بطول موجي 510 nm و 522 nm، في حين نلاحظ اعلى القمم في الميلا نويدين بعد الديليزة (b) والتي كانت بطول موجي 522 nm و 548 nm. اما بالنسبة للميلا نويدين المعامل بايونات النحاس المعقدة (c) فكانت اعلى القمم الممتصة ايضاً بطول موجي 522 nm و 548 nm ومن هنا نستنتج بان تعدد الاوزان الجزيئية في الميلا نويدين قبل الديليزة، قد يؤدي إلى تداخل الكثير من المركبات معروفة أو مجهولة التركيب الكيميائي ذات وزن جزيئي واطيء مع الميلا نويدين. وكذلك توجد ادله تشير إلى قوة مركبات chromophores كالكاربونيل و hybridized SP2 في الميلا نويدين، والتي تم الكشف عنها بالأشعة فوق البنفسجية من قبل الكثير من الباحثين في المناطق $1/cm1730$ و $1/cm1670$ [16]، وكذلك بمطيافية الرنين المغناطيسي. يمكن الكشف عنها ايضاً بمطيافية TRES، والتي توضح وجود الأنواع المختلفة التي تنبعث منها، وكذلك على نوع الطول الموجي الذي من خلالها يتم انبعاث العينة. ونلاحظ في الشكل (3) الاضمحلال الذي يحدث بعد اثارة العينة في الزمن 4 ns، والحصول على القمم وهذا ما سيتم توضيحه في الشكل (4).





الشكل (3) تحليل العينات على أطوال موجية مختلفة بواسطة TRES a: قبل الديليزة b: بعد الديليزة c: بعد الديليزة المعامل بايونات النحاس المعقدة.

تم قياس العينات بطول موجي 550 nm وذلك لمعرفة محتوى مكونات الاضمحلال أو التناقص السريع الذي يحدث للعينات بعد الاثارة كما مبين في الشكل (4). نلاحظ التناقص السريع في الميلانويدين قبل الديليزة في الشكل (4)، وهذا يتناسب مع افتراض أن متوسط حجم الجسيمات أصغر، وذلك لاحتوائه على الكثير من المركبات ذات الاوزان الجزيئية الواطئة كما وضحنا ذلك في الشكل (1). بعد ذلك الميلانويدين بعد الديليزة ذو الوزن الجزيئي العالي (High molecular fraction: > 3.5 kdalton)، ومن ثم الميلانويدين المعامل بالنحاس على التوالي.



الشكل (4) يبين تحليل العينات على طول موجي 550 nm بواسطة TRES

تأثير بيروكسيد الهيدروجين على الميلانويدين:

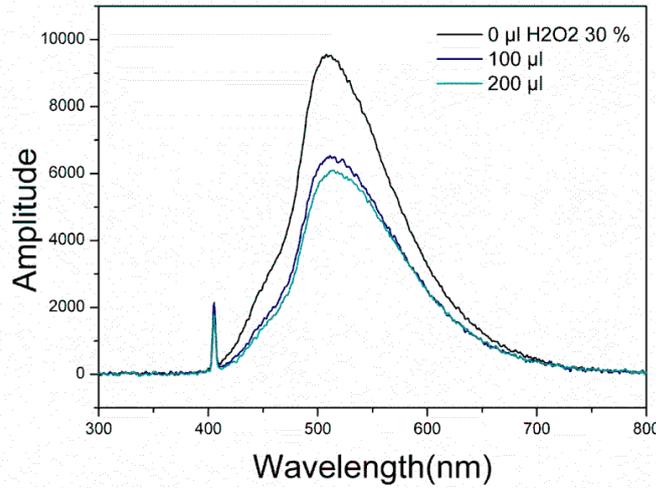
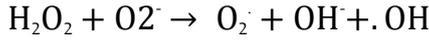
يبين الشكل (5) تأثير بيروكسيد الهيدروجين على الميلانويدين بعد الديليزة. حيث نلاحظ اختزال اللون البني وانخفاض امتصاصية الميلانويدين مع ارتفاع تركيز البيروكسيد. هناك دراسات بينت تأثير بيروكسيد الهيدروجين على الميلانويدين، حيث استنتج أن معاملة الميلانويدين المتشكل من الكلوكوز مع الكلابسين أدى أن انخفاض الوزن الجزيئي من 5.300 إلى [20] 3.500 كما بين أن الاستمرار بإضافة بيروكسيد الهيدروجين يؤدي إلى ازاله اللون من الميلانويدين وتحلله. وبالرغم من أن الميلانويدينات تصنف كمضادات اكسده ضد الجذور الحرة، لكن لون الميلانويدين يمتلك الاثر

تشخيص الميلانويدين المتشكل من الكلوكوز مع الأئين بمطياف

الفلوره ودراسة تأثيره التاكسدي على خلايا CHO-K1

الأكبر في القضاء على تلك الجذور، وبالتالي استقرار الإلكترونات. أن العلاقة بين اللون والتضاد التأكسدي يكون طردياً، أي كلما كان اللون بني غامق، كلما كان مضاداً تأكسدياً قوياً والعكس صحيح [20].
يعد بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 مصدراً لإنتاج الشقائق أو الجذور الحرة، والذي يستطيع أن يتحول خلال catalysis إلى جذر OH (hydroxyl radical) وهو من جذور الأوكسجين الفعالة، والذي يبدأ بالتناقص مع إضافة الميلانويدين وذلك بسبب فعاليتها المضادة للتأكسد. ويكون بيروكسيد الهيدروجين جذر الهيدروكسيل وفوق الأوكسيد (O_2^-) من خلال دورة تفاعل

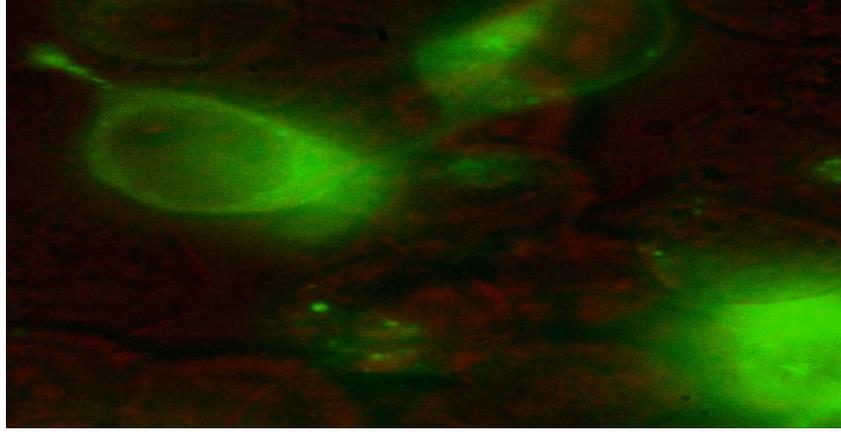
[21] Haber-Weiss reaction كما في التفاعل:



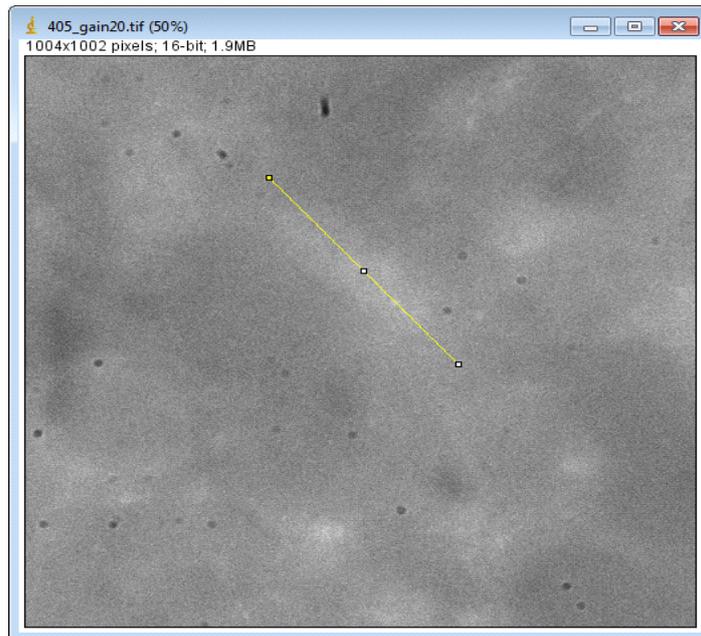
الشكل (5) يبين تأثير بيروكسيد الهيدروجين على الميلانويدين بعد الدليزة.

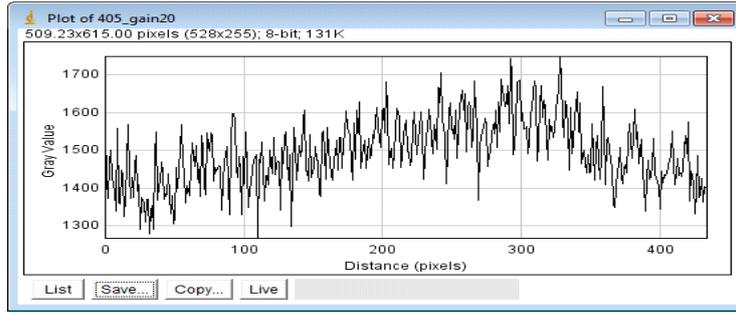
دراسة تأثير الميلانويدين خلايا CHO-K1 (Chinese hamster ovary):

وصف صورة خلية مبايض الجرذان الحية بعد تصويرها بواسطة الفلورسنس مايكروسكوبي عالي الدقة تكون موضحة في الشكل (6). الصورة تكون متراكبة لصورة الضوء الأبيض في مزرعة الخلية، والتي لوحظت بواسطة مرشح 560nm الطويل لقطع الفلورية YFP الصفراء. كذلك انبعاثات YFP المثارة مع 470nm الخلايا الموصوفة كعلامة حمراء داكنة اللون إلى اللون البني تعبر عن YFP متغير GFP شديد الفلورية. (أما YFP فيكون حساس قليلاً لمركب ROS. ولكن للمزيد من القياسات، فإننا نفضل استخدام HyPer أو YFP وذلك لأن YFP يثار مع 470nm وقد يتعين علينا أيضاً تحويل طول الموجة المثارة للبروتينات المميزة.

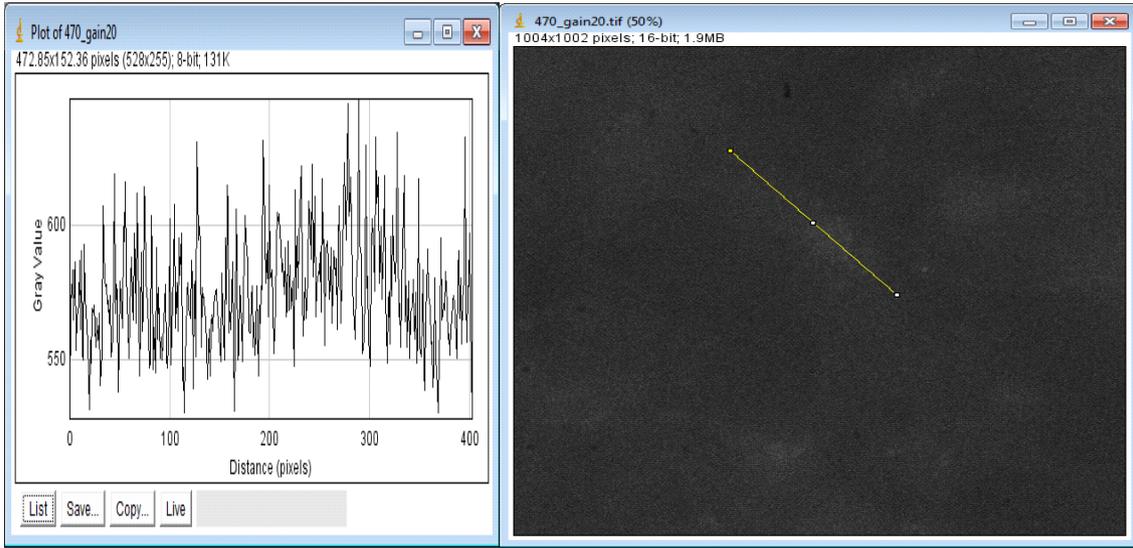


الشكل (6) صورته خلية مبيض الجرذان الحية بعد تصويرها بالفلورسنس مايكروسكوبي عالي الدقة. من خلال الدراسة تم إضافة الميلانويدين المتشكل من الكلوكوز والألنين بعد الديلز به خلايا CHO-k1 مع ذلك تشير البيانات إلى أن الميلانويدينات لم تخترق الخلايا، على الرغم من أن هناك دراسة أخرى بينت اختراق الميلانويدين للخلايا وتأثيرها الجيد على الجذور الحرة. [9] كما اود أن اشير إلى أن الباحث استخدم الميلانويدين المعزول من الفواكه، وبالخصوص الميلانويدين المعزول من البرقوق في تجاربه. كما هو المعروف، بأن الميلانويدين المعزول من الاغذية عادة ما يكون غير نقي ويحتوي على مركبات معقدة تتداخل معه. ولعل اختراق الميلانويدين للخلايا تم من خلال المركبات المتداخلة مع الميلانويدين، وليس فقط من خلال الميلانويدين النقي. وقد تم اجراء المزيد من التجارب والقياسات، وذلك من اجل معرفة تأثير الميلانويدين الذي يعمل كمضاد للأكسدة للتخلص من الجذور الحرة. تم حضن الخلايا في محلول من الميلانويدين تركيز نهائي حوالي 10 ميكرو لتر لمدة 20 دقيقة، 1 ساعة، 2 ساعة، 24 ساعة. (وبعد ذلك تم غسلها في المحلول المنظم PBS مرتين. تم حضن الخلايا مع الميلانويدين لفترة اطول من 24 ساعة، الا ذلك ادى إلى إذابة الخلايا في المحلول. من اجل معرفة تأثير الميلانويدين على الجذور الحرة في الخلايا ومن ضمنها نموذج الميلانويدين المحضر بالمختبر) ليس المعزول من الغذاء (في تأثيره على بيروكسيد الهيدروجين، قد يحتاج إلى المزيد من التجارب. الميلانويدينات تظهر كثيف الفلورية بعد الإثارة مع 405 نانومتر و 470 نانومتر، ولذلك تم استخدام كلا الطولين الموجيين للدراسة.



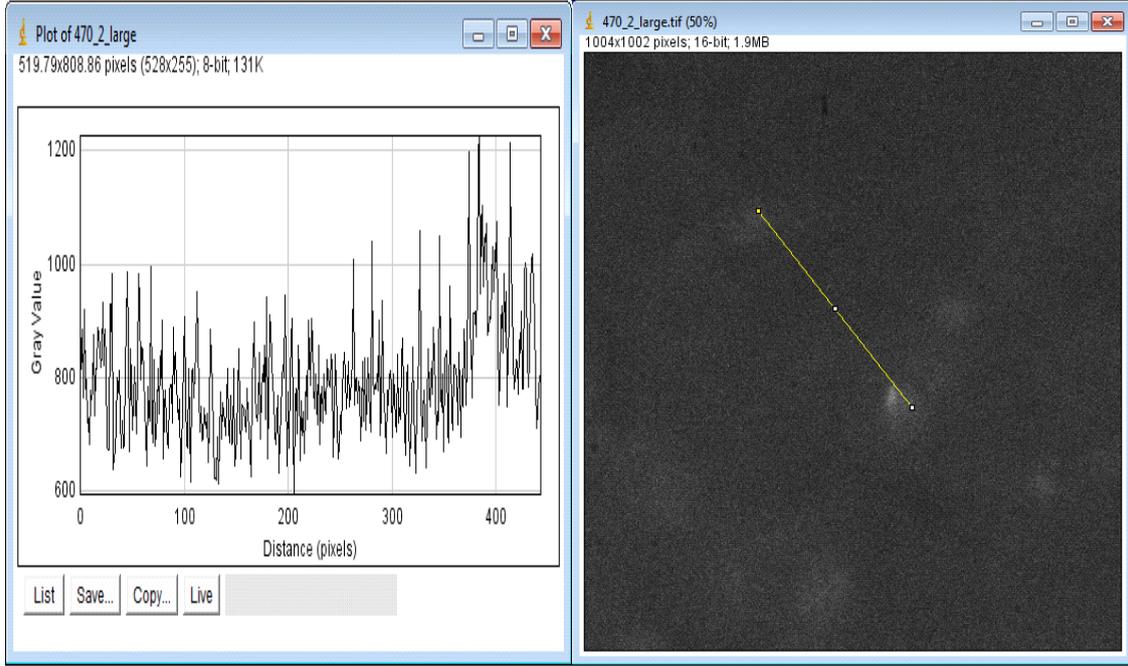


الشكل (7) تأثير الميلانويدين على خلايا مبيض الجرذان الحية بعد معاملة بيروكسيد الهيدروجين. وعلى طول موجي 405 nm بعد 20 دقيقة من الإضافة.



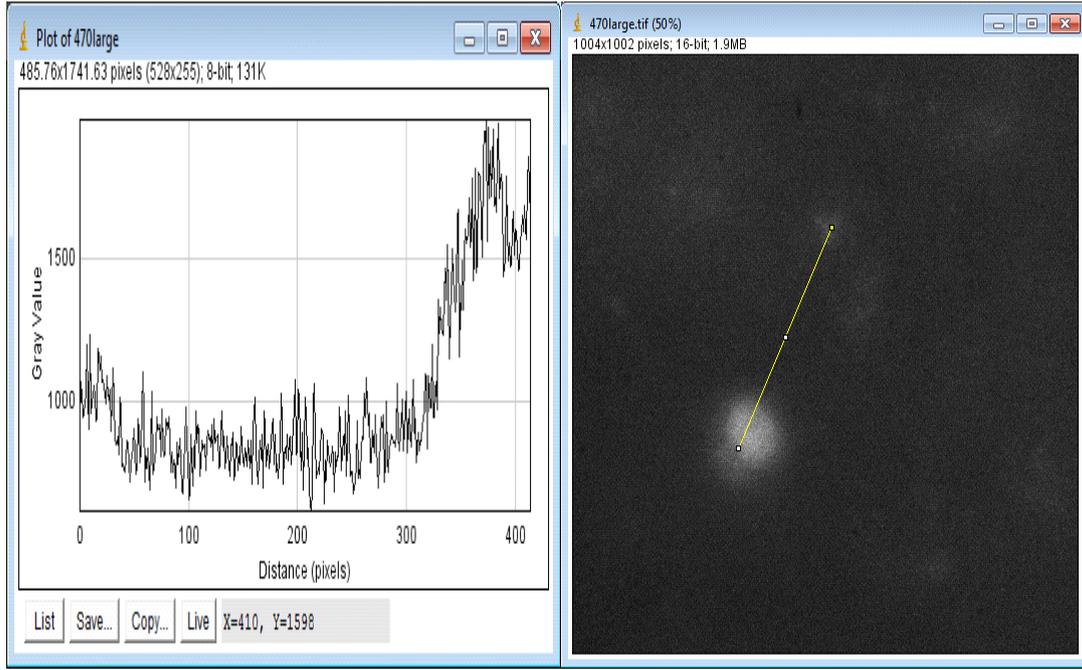
الشكل (8) يبين تأثير الميلانويدين على خلايا مبيض الجرذان الحية بعد معاملة بيروكسيد الهيدروجين، وعلى طول موجي 470 nm بعد 20 دقيقة من الإضافة.

البياض الذي نشاهده في الشكل (8) يكون الميلانويدين على سطح الخلايا، والذي يبين عدم قدرة الميلانويدين في التأثير على بيروكسيد الهيدروجين، وكذلك عدم قدرته على اختراق الخلايا. قد يكون هناك مستوى منخفض للغاية من الإشارة، ومع ذلك هذا هو ضمن مستوى noise و background من الفلور التلقائي المتوقع. من الصعب جدا تفسير وتحليل نتيجة هذه الإشارة الصادره من تأثير الميلانويدين على الخلايا. وقد تم إعادة القياس مرات عديدة، للحصول على نتائج أفضل، ولكن للأسف لم يتمكن من الحصول على نتائج أفضل.

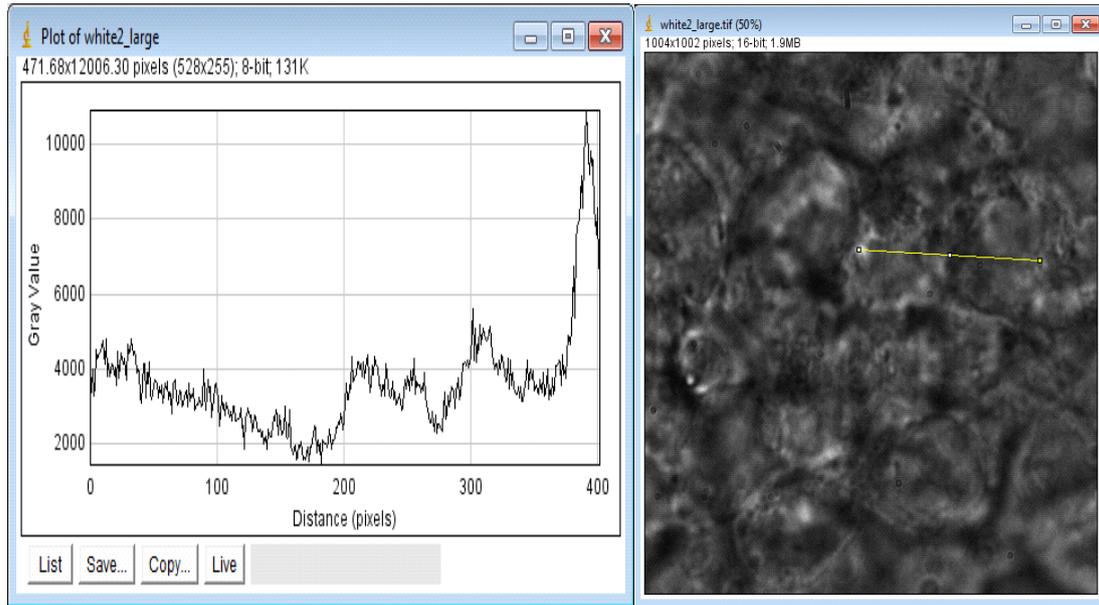


الشكل (9) تأثير الميلانويدين على خلايا مبايض الجرذان الحية بعد معاملةها بيروكسيد الهيدروجين، وعلى طول موجي 470 nm بعد ساعة من الإضافة.

حيث إننا لم نلاحظ اختلاف كبير في تأثير الميلانويدين على الجذور الحرة بعد مرور ساعة من الحضانة، كما هو الحال في الحضانة لمدة 20 دقيقة الموضح في الشكل (9) وقد تم حضانة الخلايا بمحلول الميلانويدين لمدة يوم كامل، وذلك لمعرفة تأثيره على بيروكسيد الهيدروجين في الخلايا في طول الموجي 470 nm كما موضح في الشكل (10) و (11) تبين من خلال الإشارة أن النتيجة تكون أفضل، على الرغم من عدم ملاحظة العشوائية في قراءة البيانات مثل التي نلاحظها في الأشكال السابقة اعلاه. قد يفسر ذلك على أن الحضانة لفترة طويلة يعطي نتائج أفضل، وان كان من الصعب تفسير هذه الإشارة. وكذلك صعوبة مقارنتها بدراسات سابقة لكوننا اول من يبحث في هذا المجال. أن دراسة تأثير الميلانويدين وبيروكسيد الهيدروجين على الخلايا في طول موجي 470 nm يكون أفضل، على الرغم من استخدام أطوال موجية أخرى في الدراسة، إلا أنها في الحقيقة لا تعطي نفس الدقة والوضوح في بيان العلاقة بين الخلايا ومركبات الميلانويدين والجذور الحرة. أن الميلانويدين المستخدم في تجارب الخلايا هو المركب المنقى بانابيب الديلزة، وذلك من أجل الحصول على بوليمير نقي وذو وزن جزيئي عالي.



الشكل (10) تأثير الميلانويدين على خلايا مبيض الجرذان الحية بعد معالمتها بيروكسيد الهيدروجين، وعلى الطول الموجي 470nm بعد 24 ساعة من الإضافة.



الشكل (11) يبين تأثير الميلانويدين على خلايا مبيض الجرذان الحية بعد معالمتها بيروكسيد الهيدروجين، وعلى الطول الموجي 470nm بعد 24 ساعة من الإضافة.

الاستنتاجات:

يمكن أن نستنتج من خلال هذه الدراسة إلى امكانية تشخيص الميلانويدين المتشكل من السكر المختزل Glc مع الحامض الاميني Ala في درجة حرارة 160°C بواسطة مطياف الفلورة. الميلانويدين قبل الديلزة كان الاعلى امتصاص، ثم الميلانويدين بعد الديلزة، بعد ذلك الميلانويدين بعد الديلزة المعامل بايونات النحاس المعقدة. استخدام تقنية TRES

تشخيص الميلانويدين يكون ملاحظ، ولكن يحتاج أيضا إلى المزيد من الدراسة والتحليل. اختزال اللون البني وانخفاض امتصاصية الميلانويدين كان بسبب ارتفاع تركيز بيروكسيد الهيدروجين. الباحث اثبت أن الميلانويدين لا يستطيع اختراق الخلايا الحية لمبيض الجردان. تأثير الميلانويدين على ROS يكون مثير للاهتمام بعد مرور 24 ساعة.

التوصيات:

- 1- التركيز الدقيق على دراسة التأثير المضاد للأكسدة لمركب الميلانويدين على الجذور الحرة في الخلايا.
- 2- استخدام مطيافية الفلورة بشكل موسع في تشخيص مركب الميلانويدين.
- 3- امكانية مواصلة الدراسة على ما توصلنا اليه من استنتاجات مهمة في بحثنا هذا للخروج بنتائج مهمة.

قائمة المراجع:

- [1] Martins, S. I.F.S., Jongen, W. M.F., & van Boekel, M. A.J.S. (2000). A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modeling. *Trends in Food Science & Technology*, 11, 364–373.
- [2] Gniechwitz, D., Reichardt, N., Ralph, J., Blaut, M., Steinhart, H., & Bunzel, M.(2008). Isolation and characterisation of a coffee melanoidin fraction. *J Sci Food Agric.*, 88, 2153–2160.
- [3] Cämmerer, B.; Jalyschko, W.; Kroh, L. W. (2002). Intact carbohydrate structures as part of the melanoidin skeleton. *J. Agric. Food Chem.*, 50, (7), 2083-2087.
- [4] Mohsin, G.F., Schmitt, F.J., Kanzler, C., Hoehl, A., & Hornemann, A. (2019). PCA-based identification and differentiation of FTIR data from model melanoidins with specific molecular compositions. *Food chemistry*, 281, 106–113.
- [5] Tressl, R., Wondrak, G. T., Garbe, L.-A., Krüger, R.-P., & Rewicki, D. (1998). Pentoses and Hexoses as Sources of New Melanoidin-like Maillard Polymers *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1765–1776.
- [6] Cämmerer, B., & Kroh, L. W. (1995). Investigation of the influence of reaction conditions on the elementary composition of melanoidins. *Food Chemistry*, 53, 55-59.
- [7] Hofmann, T. (1998). Studies on the Influence of the Solvent on the Contribution of Single Maillard Reaction Products to the Total Color of Brownd Pentose/Alanine Solutions A Quantitative Correlation Using the Color Activity Concept *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3912–3917.
- [8] Yaylayan, V. A., & Kaminsky, E. (1998). Isolation and structural analysis of Maillard polymers: caramel and melanoidin formation in glycine/glucose model system. *Food Chem.*, 63, 25-31.
- [9] Gasparetti, D. G. (2012). Melanoidins from dry fruit prevent oxidative endothelial cell death by counteracting mitochondrial oxidation and membrane depolarization. Tesi di Dottorato in Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche – Università degli Studi di Sassari, Italy.
- [10] Mohsin, G.F. (2019). Study investigate of melanoidins formed from maltose with alanine by FTIR. Paper In preparation

- [11] Goya, L., Delgado-Andrade, C., Rufiñán-Henares, J. A., Bravo, L., & Morales, F. J. (2007). Effect of coffee Melanoidin on human hepatoma HepG2 cells. Protection against oxidative stress induced by tert-butylhydroperoxide. *Mol. Nutr. Food Res.* 51, 536–545.
- [12] Cossu, A., Posadino, A.M., Giordo, R., Emanuelli, C., Sanguinetti, A.M., Piscopo, A., Poiana, M., Capobianco, G., Piga, A., & Pintus, G. (2012). Apricot melanoidins prevent oxidative endothelial cell death by counteracting mitochondrial oxidation and membrane depolarization. *PLoS One*, 7(11).
- [13] Echavarría, A. P., Pagán, J., & Ibarz, A. (2013). Antioxidant activity of the melanoidin fractions formed from D-Glucose and D-Fructose with L-Asparagine in the Maillard reaction. *Scientia Agropecuaria*, 4, 45-54.
- [14] Kim J-S & Lee Y-S (2009). Antioxidant Activity of Melanoidins from Different Sugar/Amino Acid Model Systems: Influence of the Enantiomer Type. *Food Sci Tech Int.* 15(3), 0291-297.
- [15] Mohsin, G.F., Schmitt, F.-J., Kanzler, C., Epping, J.D., Flemig, S., & Hornemann, A. (2018). Structural characterization of melanoidin formed from D-glucose and L-alanine at different temperatures applying FTIR, NMR, EPR, and MALDI-ToF-MS. *Food Chemistry*, 245, 761–767.
- [16] Mohsin, G.F., Schmitt, F.-J., Kanzler, C., Epping, J.D., Buhrke, D., & Hornemann, A. (2020). Melanoidin formed from fructosylalanine contains more alanine than melanoidin directly formed from D-glucose with L-alanine. *Food Chemistry*, 305, 125459.
- [17] So, T. P. & Dong, Y. C. (2002). Fluorescence Spectrophotometry. *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES /&2002 Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group / www.els.net.*
- [18] Wold, J.P & Engelsen, S.P. (2008). Autofluorescence spectroscopy in food analysis. In Ötles S, editor, *Handbook of food analysis instruments*. Boca Raton: CRC Press, p. 347-363.
- [19] Nimse, S.B., & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv.*, 5, 27986-28006.
- [20] Hayase, F., Kim, S. B., & Kato, H. (1984). Decolorization and Degradation Products of the Melanoidins by Hydrogen Peroxide, *Agricultural and Biological Chemistry*, 48(11), 2711-2717.
- [21] Koppenol, W. H. (1978). "The Haber-Weiss cycle – 70 years later". *photochemistry and photobiology*, 28, 655-660.

