Downloaded from joasi.ir at 13:31 +0330 on Tuesday December 18th 2018

اثر امواج فراصدا بر پایداری شیمیایی و گرمایی پروتئین آلفا-لاکتالبومین

سید محمد حسینی[۱]، محمدرضا حسین‌دخت*[۱]، محمد ایزدیار[۱]، رضا ایزدی نجف‌آبادی[۲]

۱. گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

۲. گروه فیزیک، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

چکیده

فراصدا، صدایی است که بسامد آن بالاتر از محدوده شنوایی انسان است. بازه بسامدی (محدوده بسامدی) شنوایی انسان حدود ۲۰ هرتز تا ۲۰ کیلوهرتز است. در حالی‌که، امواج فراصدا بسامد بالای ۲۰ کیلوهرتز دارند. هدف از این پژوهش، بررسی اثر آوادهی امواج فراصدا (پروب ۲۰ کیلوهرتز) بر پایداری شیمیایی و گرمایی پروتئین آلفا- لاکتالبومین گاوی است. اندرکش سورفاکتانت‌های آنیونی (اِس‌دی‌اِس) و کاتیونی (دی‌تی‌اِی‌بی) با آلفا-لاکتالبومین در حضور و غیاب امواج فراصدا با استفاده از روش‌های طیف‌سنجی مرئی- فرابنفش و فلورسانس مورد بررسی قرار گرفت. آلفا-لاکتالبومین در یک سازوکار دو حالته غیرطبیعی می‌شود. در روش طیف‌سنجی مرئی- فرابنفش، پایداری آلفا-لاکتالبومین ($\Delta G^{\cdot}_{H_2O}$) نسبت به اِس‌دی‌اِس در غیاب امواج فراصدا کم‌ترین مقدار را داشتند (۷٫۴۸۳ کیلوژول بر مول) و این مقدار با افزایش ۲۰ دقیقه‌ای زمان آوادهی (امواج‌دهی) افزایش یافت (۸٫۶۹۱ کیلوژول بر مول). هم‌چنین، پایداری آلفا-لاکتالبومین ($\Delta G^{\cdot}_{H_2O}$) نسبت به دی‌تی‌اِی‌بی در غیاب امواج فراصدا کم‌ترین مقدار را داشته (۸٫۸۱۷ کیلوژول بر مول) و این مقدار با افزایش ۲۰ دقیقه‌ای زمان آوادهی افزایش یافت (۱۱٫۲۱۰ کیلوژول بر مول). مؤلفه‌های ترمودینامیکی ($\Delta G^{0}_{۲۹۸K}$، T_m، $\Delta C_{P,m}$ و ΔH_m) برای غیرطبیعی شدن گرمایی آلفا-لاکتالبومین گاوی در حضور و غیاب امواج فراصدا با استفاده از طیف‌سنجی فرابنفش مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان می‌دهند که امواج فراصدا پایداری گرمایی را افزایش داده و $\Delta C_{P,m}$ و ΔH_m را کاهش می‌دهند.

کلیدواژه‌ها: آلفا-لاکتالبومین، امواج فراصدا، سورفاکتانت، فلورسانس، پایداری گرمایی.

۱. مقدمه

در حقیقت امواج فراصدا به شکل گسترده‌ای در حوزه‌های پزشکی مانند تشخیص، فیزیوتراپی و درمان سرطان کاربرد دارند. تاثیرات شیمیایی و فیزیکی فراصدا در مواد آلی و معدنی تأیید شده است. با عبور امواج فراصدا از داخل مایع دو اثر کاواک‌زایی و گرما ایجاد می‌شود [۱-۴].

هنگامی که پدیده کاواک‌زایی در اثر عبور امواج فراصدا با شدت بالا از داخل آب اتفاق می‌افتد، تجزیه مولکول‌های بخار آب به اتم‌های هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل ($OH^{\cdot}$) مشاهده می‌گردد. اتم‌های هیدروژن و رادیکال‌های هیدروکسیل می‌توانند با هم ترکیب و مولکول‌های هیدروژن، هیدروژن‌پراکسید و رادیکال $HO_2^{\cdot}$ را به‌وجود آورند. رادیکال‌ها می‌توانند روی مولکول‌های زیستی هم‌چون آنزیم، دی‌اِن‌اِی[۲] و لیپیدها تأثیر بگذارند [۵-۹]. نتایج ضد و نقیضی در رابطه با اثر امواج فراصدا بر غیرفعال‌سازی آنزیم‌ها و ساختار پروتئین‌ها گزارش شده که بستگی به بسامد و شدت امواج فراصدا دارد [۱۰].

پروتئین آلفا-لاکتالبومین دارای ویژگی‌های خاصی از جمله موارد زیر است:

- نقش مهمی در ترشح آب به ویزیکول‌های یاخته‌های (سلول‌های) پستانی داشته و در ساخت لاکتوز اهمیت دارند [۱۱].
- حد واسط‌های متعددی در مسیر تاخوردگی دارد به همین خاطر مطالعات زیادی توسط دانشمندان علاقه‌مند به موضوع تاخوردگی پروتئین بر روی آن انجام شده است

* نویسنده پاسخگو: housain@um.ac.ir

[2] DNA

www.SID.ir

Downloaded from joasi.ir at 13:31 +0330 on Tuesday December 18th 2018

[۱۲-۱۳].

- بعضی از شکل‌های آلفا-لاکتالبومین باعث از بین‌رفتن یاخته‌های سرطانی می‌شوند و این نشان می‌دهد که آلفا-لاکتالبومین نقش زیستی بسیار مهمی دارد [۱۴- ۱۵].

مشخص شده است که آلفا-لاکتالبومین دارای خواص تغذیه‌ای مهم می‌باشد و اثرات مثبتی روی سلامت فرد مصرف‌کننده دارد. هم‌چنین به نظر می‌رسد که ساختار و ترکیبات آمینواسید آن برای کودکان بسیار خوب و قابلیت هضم بالایی دارد. آلفا-لاکتالبومین غنی از تریپتوفان است که مصرف آن تریپتوفان پلاسما را افزایش داده که اثرات مثبتی روی هوشیاری، حافظه و خلق‌وخوی مصرف‌کننده دارد [۱۶].

مطالعات زیادی در مورد اثر امواج فراصدا بر پروتئین‌ها انجام شده است که به برخی از آن‌ها اشاره می‌شود.

در سال ۲۰۰۸ جمبراک[1] و همکاران اثر فراصدا را بر روی پروتئین آب پنیر به منظور بهبود خواص کاربردی آن بررسی کردند. آن‌ها در این کار از فراصدا با شدت پایین (۵۰۰ کیلوهرتز) و شدت بالا (پروب ۲۰ کیلوهرتز و حمام ۴۰ کیلوهرتز) استفاده کردند. نتایج نشان داد که استفاده از امواج فراصدا با قدرت بالا (پروب ۲۰ کیلوهرتز) بیش‌ترین تأثیر را بر تغییرات خواص مورد مطالعه نظیر حلالیت و فومی شدن دارند و این کار به وسیله تغییر محیط اطراف پروتئین از جمله دما و رسانایی انجام می‌شود [۱۷].

در سال ۲۰۰۹ اثر امواج فراصدا بر شش پروتئین (سیتوکروم، لیزوزیم، میوگلوبین، سرم‌آلبومین گاوی، تریپسینوژن و آلفاتریپسینوژن A) با جرم مولکولی و ساختار دوم متفاوت با استفاده از روش‌های طیف‌سنجی مورد مطالعه قرار گرفت. منبع فراصدای به‌کار رفته، ۱ مگاهرتز و زمان در معرض قرار گرفتن ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ دقیقه بود. رفتار متفاوت پروتئین‌ها به نوع ساختار دوم غالب (مارپیچ α یا صفحات چین‌خورده β) و هم‌چنین به درجه نظم ساختار بستگی داشت. نتایج تایید می‌کند که رادیکال‌های آزاد به‌وجود آمده در طی سونولیز نقش مهمی در ایجاد تغییرات ساختاری دارند [۱۰].

در سال ۲۰۱۰ مارتینی[2] و همکاران اثر فراصدا را بر رفع کدورت پروتئین آب پنیر بررسی کردند. فراصدای به‌کار رفته ۲۰ کیلوهرتز با قدرت ۱۵ و ۳۰ وات بود. زمان در معرض قرار گرفتن ۵ و ۱۵ دقیقه در دماهای ۲۰ و ۶۰ درجه سلسیوس بود. بیش‌ترین تأثیر بر رفع کدورت زمانی مشاهده گردید که فراصدا با قدرت ۱۵ وات به مدت ۱۵ دقیقه و دمای ۶۰ درجه سلسیوس مهیا شده بود [۱۸].

در سال ۲۰۱۱ جیانی[3] و همکاران اثر امواج فراصدا را بر تغییرات ساختاری و خواص گرمایی پروتئین‌های آب پنیر بررسی نمودند. آن‌ها در این کار با روش‌های یووی-وی‌آی‌اِس[4]، دی‌اِس‌سی[5]، سی‌دی[6] و فلورسانس، تغییرات آب‌گریزی و تغییرات ساختاری را بررسی کردند. در این تحقیق نشان داده شد که اگر مدت زمان آوادهی فراصدا کم‌تر از ۵ دقیقه باشد، آنتالپی غیرطبیعی شدن گرمایی کاهش یافته ولی در دراز مدت به خاطر تجمع پروتئینی افزایش می‌یابد. فراصدا هم‌چنین تغییرات جزئی در ساختار دوم و خاصیت آب‌گریزی را باعث می‌شود [۱۹].

در سال ۲۰۱۲ جیانی و همکاران اثر امواج فراصدا (۲۰ کیلوهرتز و ۳۱ وات به مدت ۶۰ دقیقه) را بر تغییرات ساختاری و عملکردی آلفا-لاکتالبومین، بتا-لاکتاگلوبولین و مخلوط آن‌ها بررسی کردند. محتوی تیول واکنش‌پذیر و سطح آب‌گریزی پروتئین بتا-لاکتاگلوبولین افزایش و تغییرات جزئی در ساختار دوم و سوم مشاهده شد. هم‌چنین نتایج نشان داد که تأثیرپذیری آلفالا-کتالبومین از امواج فراصدا نسبت به بتا-لاکتاگلوبولین و مخلوط آن‌ها بیش‌تر است [۲۰].

در سال ۲۰۱۴ جمبراک و همکاران اثر فراصدا بر اندازه ذرات و وزن مولکولی پروتئین‌های آب پنیر را بررسی کردند. در این کار از فراصدا با شدت بالا (پروب ۲۰ کیلوهرتز و حمام ۴۰ کیلوهرتز) استفاده شد. نتایج نشان داد که بعد از در معرض قرار گرفتن با پروب ۲۰ کیلوهرتز و حمام ۴۰ کیلوهرتز، اندازه ذرات کاهش و سطح مخصوص آن‌ها افزایش داشت. پروب ۲۰ کیلوهرتز وزن

[1] Jambrak

[2] Martini
[3] Jayani
[4] UV-vis
[5] DSC
[6] CD

www.SID.ir

Downloaded from joasi.ir at 13:31 +0330 on Tuesday December 18th 2018

مولکول‌ها را کاهش و حمام ۴۰ کیلوهرتز تغییرات مخصوصی در ترکیب و وزن مولکولی پروتئین‌ها ایجاد کرد [۲۱].

در سال ۲۰۱۶ صیامی و همکاران تاثیر امواج فراصدا با شدت بالا (پروب ۲۰ کیلوهرتز) بر واکنش آوکافت نشاسته توسط آنزیم آلفا-آمیلاز را بررسی نمودند. افزایش درصد تبدیل نشاسته طی ۱۰ دقیقه آوادهی مشاهده شد. در حالی‌که زمان‌های ۲۰ و ۳۰ دقیقه امواج‌دهی کاهش تبدیل نشاسته را به دنبال داشت. نتایج براساس اثر دوگانه امواج، اثر تخریبی بر روی ساختار آنزیم و اثر سازنده بر افزایش بسامد برخورد سوبسترا و آنزیم، تحلیل شده است [۲۲]. حسین‌دخت و همکاران در سال ۲۰۰۵ نقش Cu^{2+} ودی‌تی‌اِی‌بی[1] را بر خواص گرمایی آلفا-لاکتالبومین با استفاده از کالریمتری اسکن تفاضلی (دی‌اِس‌سی)، طیف‌سنجی فلورسانس و ویسکومتری در غلظت‌های متفاوتی از این دو بررسی کرده و نشان دادند که یون مس اثرات مثبت و دی‌تی‌اِی‌بی اثرات منفی بر پایداری گرمایی پروتئین دارد [۲۳].

تمایل آلفا-لاکتالبومین به پذیرفتن کنفورماسیون‌های مختلف نشان‌دهنده پایداری کم این پروتئین در شرایط طبیعی است [۲۳].

با توجه به کاربرد گسترده امواج فراصدا در صنایع غذایی [۲۴-۲۵]، پزشکی و غیره تلاش شده تا اثر امواج فراصدا با بسامد ۲۰ کیلوهرتز و زمان‌های مختلف ۰، ۱۰ و ۲۰ دقیقه بر پایداری شیمیایی (پایداری در برابر سورفاکتانت اِس‌دی‌اِس[2] و دی‌تی‌اِی‌بی) و پایداری گرمایی آلفا-لاکتالبومین به عنوان پروتئین الگو، با روش‌های طیف‌سنجی (مرئی-فرابنفش و فلورسانس) بررسی شود.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱. مواد مورد استفاده

موادی که در این تحقیق استفاده شده‌اند به شرح زیر می‌باشند:

پودر آلفا-لاکتالبومین با وزن مولکولی ۱۴۱۷۸ دالتون (شرکت مرک[3])، سدیم دودسیل‌سولفات با وزن مولکولی ۲۸۸٫۳۸ (شرکت مرک)، دودسیل تری‌متیل‌آمونیم‌برماید با وزن مولکولی ۳۰۸٫۳۸ (شرکت مرک)، سدیم‌دی هیدروژن‌فسفات یک آبه با وزن مولکولی ۱۳۸ (شرکت مرک)، فسفریک اسید با وزن مولکولی ۹۸ (شرکت مرک)، سدیم هیدروکسید با وزن مولکولی ۴۰ (شرکت مرک).

۲-۲. دستگاه فراصدا

در این تحقیق از دستگاه فراصدای تپی (پالسی)[4] با بسامد ۲۰ کیلوهرتز استفاده شد. برای انجام آزمایش ۵ میلی‌لیتر از محلول داخل سل دستگاه قرار گرفت، درحالی‌که سل با استفاده از ترموستات سرد می‌شد. پرب دستگاه به اندازه ۱ سانتی‌متر در زیر محلول آزمایش قرار داشت. حداکثر دمای محلول در طول مدت آزمایش به ۳۰ درجه سلسیوس رسید. بعد از آوادهی، محلول امواج دیده جهت حفظ تغییرات به سرعت توسط یخ سرد شده و سپس جهت تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. همه آزمایش‌ها سه بار انجام و نتیجه میانگین در گزارش‌ها ارائه شد.

۲-۳. روش‌ها

۲-۳-۱. طیف‌سنجی فرابنفش

طیف‌سنجی مرئی فرابنفش یکی از روش‌های مورد استفاده در علوم تجربی برای دریافت اطلاعات علمی و عملی، با استفاده از برهم‌کنش نور و ماده می‌باشد.

۲-۳-۱-۱. اثر سورفاکتانت بر پایداری پروتئین آلفا-لاکتالبومین در غیاب و حضور امواج فراصدا

در این تحقیق محلول ۰٫۰۲۵ درصد وزنی حجمی پروتئین آلفا-لاکتالبومین و محلول ۴۰ میلی‌مولار سورفاکتانت (اِس‌دی‌اِس یا دی‌تی‌اِی‌بی) به صورت جداگانه در بافر فسفات ۲۰ میلی‌مولار با pH=۷ ساخته شد. سپس محلول پروتئین وارد سل شد و هر بار به محلول، مقادیر مشخصی سورفاکتانت اضافه و طیف آن ثبت گردید. از رسم بیشینه

[1] DTAB
[2] SDS
[3] Merk
[4] Scientz-IID

www.SID.ir

Downloaded from joasi.ir at 13:31 +0330 on Tuesday December 18th 2018

جذب پروتئین آلفا-لاکتالبومین در غلظت‌های مختلف سورفاکتانت، نسبت به غلظت سورفاکتانت، نمودارهای دو حالته غیرطبیعی شدن پروتئین به‌دست آمد. با استفاده از معادله‌های ۱ تا ۴ $\Delta G^{\cdot}$ در چند غلظت از سورفاکتانت (غلظت‌هایی که در آن‌ها مقدار K بین ۰/۱ تا ۱۰ باشد) به‌دست می‌آید،

$$F_D + F_N = ۱ \quad (۱)$$

$$K_D = \frac{F_D}{F_N} \quad (۲)$$

$$\Delta G_D^{\cdot} = -RT \ln K \quad (۳)$$

در این رابطه‌ها F_N و F_D به ترتیب کسری از پروتئین هستند که ساختار طبیعی و ساختار غیرطبیعی شده دارند. از رسم مقادیر $\Delta G^{\cdot}$ در برابر غلظت سورفاکتانت خط راستی با معادله ۴ بدست می‌آید،

$$\Delta G_D^{\cdot} = \Delta G_{H_2O}^{\cdot} - m[denaturant] \quad (۴)$$

که در این رابطه $\Delta G_{H_2O}^{\cdot}$ به عنوان پایداری شیمیایی معرفی می‌شود.

۲-۳-۱-۲. اثر دما بر پایداری آلفا-لاکتالبومین در غیاب و حضور امواج فراصدا

در این تحقیق محلول ۰/۰۲۵ درصد وزنی حجمی آلفا لاکتالبومین در بافر فسفات ۲۰ میلی‌مولار با pH=۷ تهیه و سپس طیف آن در دماهای مختلف ۳۰ تا ۹۵ درجه سلسیوس در محدوده ۲۰۰ تا ۳۰۰ نانومتر گرفته شد. از رسم بیشینه جذب در برابر دما نمودارهای دو حالته دناتوره شدن پروتئین به‌دست آمد. از معادله‌های ۱ تا ۲ مقدار $\Delta G^{\cdot}$ در چند دما تعیین و با معادله ۵ برازش شدند. مقادیر پایداری گرمایی $\Delta G^{\cdot}(۲۹۸k)$، $\Delta H^{\cdot}_m$، ΔC_p و T_m به‌دست می‌آید.

$$\Delta G^{\cdot}(T) = \Delta H^{\cdot}_m(۱-T/T_m) - \Delta C_p [T_m - T + T\ln(T/T_m)] \quad (۵)$$

در این رابطه $\Delta H^{\cdot}_m$ تغییرات آنتالپی، T_m دمای نیمه راه و ΔC_p تغییرات ظرفیت گرمایی در غیرطبیعی شدن پروتئین می‌باشد.

۲-۳-۲. طیف سنجی فلورسانس

با تجزیه و تحلیل طیف نشری می‌توان اطلاعاتی در زمینه ساختار، تاخوردگی و برهم‌کنش پروتئین‌ها به‌دست آورد.

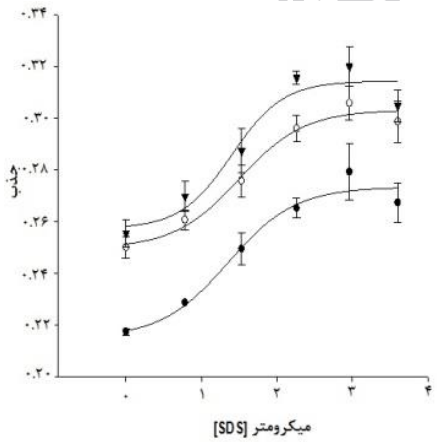
۲-۳-۲-۱. اثر سورفاکتانت بر پایداری پروتئین آلفا-لاکتالبومین در غیاب و حضور امواج فراصدا

برای بررسی برهم‌کنش سورفاکتانت (اِس‌دی‌اِس یا دی‌تی‌اِی‌بی) با پروتئین آلفا-لاکتالبومین در غیاب امواج فراصدا آزمایش به این صورت انجام شد که ابتدا محلول ۰/۰۲۵ درصد وزنی-حجمی پروتئین آلفا-لاکتالبومین و محلول ۴۰ میلی‌مولار سورفاکتانت (اِس‌دی‌اِس یا دی‌تی‌اِی‌بی) به صورت جداگانه در بافر فسفات ۲۰ میلی مولار با pH=۷ ساخته و سپس طیف نشری فلورسانس آن در محدوده طول موج ۲۰۰ تا ۳۰۰ نانومتر، با طول موج تهییجی ۲۹۵ نانومتر گرفته شد. بقیه مراحل محاسبات همانند قسمت فرابنفش انجام شد. آزمایش‌ها برای پروتئین آلفا-لاکتالبومین آوادهی‌شده به مدت ۱۰ و ۲۰ دقیقه مشابه حالت موج می‌باشد.

۳. نتایج و بحث

برهم‌کنش اِس‌دی‌اِس با آلفا-لاکتالبومین توسط طیف‌سنجی مرئی- فرابنفش مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱).

● بدون حضور فراصدا، ○ در حضور فراصدا (۱۰ دقیقه)، ▼ در حضور فراصدا (۲۰ دقیقه)



شکل ۱ نمودار جذب پروتئین آلفا-لاکتالبومین در طول موج ۲۷۴ نانومتر نسبت به غلظت اِس‌دی‌اِس در حضور و غیاب فراصدا.

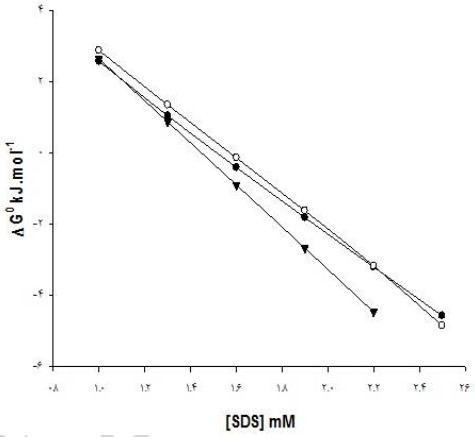
www.SID.ir

Downloaded from joasi.ir at 13:31 +0330 on Tuesday December 18th 2018

رفتار S شکل در غیاب و حضور امواج ملاحظه می‌شود.

براساس روابط ۲ تا ۴ مقادیر $\Delta G^{\cdot}_{D}$ ارزیابی و نمودار آن نسبت به غلظت اِس‌دی‌اِس رسم شد (شکل ۲).

● بدون حضور فراصدا، ○ در حضور فراصدا (۱۰ دقیقه)، ▼ در حضور فراصدا (۲۰ دقیقه)



شکل ۲ نمودار خطی $\Delta G^{\cdot}_{D}$ پروتئین آلفا-لاکتالبومین نسبت به غلظت اِس‌دی‌اِس در حضور و غیاب فراصدا.

با برازش نمودارها براساس رابطه ۴ مقادیر m و $\Delta G^{\cdot}(H_2O)$ بدست آمد (جدول ۱).

جدول ۱ نتایج برهم‌کنش اِس‌دی‌اِس بر پایداری آلفا-لاکتالبومین در حضور و غیاب امواج فراصدا.

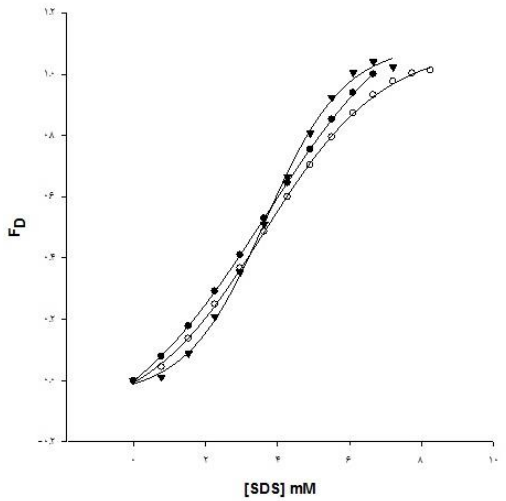
زمان آوادهی (دقیقه)	$\Delta G^{\cdot}(H_2O)$ $kJ.mol^{-1}$	m $kJ.mol^{-1}.M^{-1}$
۰	*۷٫۴۸۳	*۵٫۰۰۵
	**۶٫۶۴۷	**۱٫۸۶۸
۱۰	*۸٫۰۹۲	*۵٫۱۸۳
	**۷٫۰۷۶	**۱٫۹۰۵
۲۰	*۸٫۶۹۱	*۶٫۰۵۷
	**۸٫۹۶۵	**۲٫۵۲۳

* فرابنفش ** فلورسانس

بزرگی $\Delta G^{\cdot}_{H2O}$ معرف پایداری و m معرف حساسیت است. نتایج نشان می‌دهد که پایداری و حساسیت آلفا-لاکتالبومین آوادهی‌شده نسبت به اِس‌دی‌اِس افزایش می‌یابد و میزان افزایش به زمان آوادهی بستگی دارد.

با تهییج نمونه در ۲۹۵ نانومتر، طیف نشری محلول را در حضور غلظت‌های مختلف اِس‌دی‌اِس سنجش نموده و براساس روابط ۲ تا ۴ مقدار F_D تعیین شد. نتایج در شکل نشان داده شده است.

● بدون حضور فراصدا، ○ در حضور فراصدا (۱۰ دقیقه)، ▼در حضور فراصدا (۲۰ دقیقه)



شکل ۳ نمودار F_D آلفا-لاکتالبومین در طول موج ۲۷۴ نانومتر نسبت به غلظت اِس‌دی‌اِس در حضور و غیاب فراصدا (F_D کسری از پروتئین است که ساختار غیرطبیعی دارد).

براساس شکل ۳ و رابطه ۴ مقادیر m و $\Delta G^{\cdot}(H_2O)$ برآورد شد (جدول). نتایج هم‌خوانی مناسبی با نتایج طیف‌سنجی یووی دارد که تأییدی بر دو حالته بودن غیرطبیعی شدن شیمیایی توسط اِس‌دی‌اِس است.

برهم‌کنش دی‌تی‌اِی‌بی با آلفا-لاکتالبومین به طور مشابه به روش‌های یووی و فلورسانس بررسی و نتایج در جدول ۲ گزارش شده‌اند.

ملاحظه می‌گردد که پایداری شیمیایی پروتئین آوادهی‌شده در برابر غیرطبیعی‌کننده دی‌تی‌اِی‌بی افزایش یافته و این افزایش پایداری متناسب با زمان آوادهی می‌باشد (نظیر حالت اِس‌دی‌اِس).

www.SID.ir

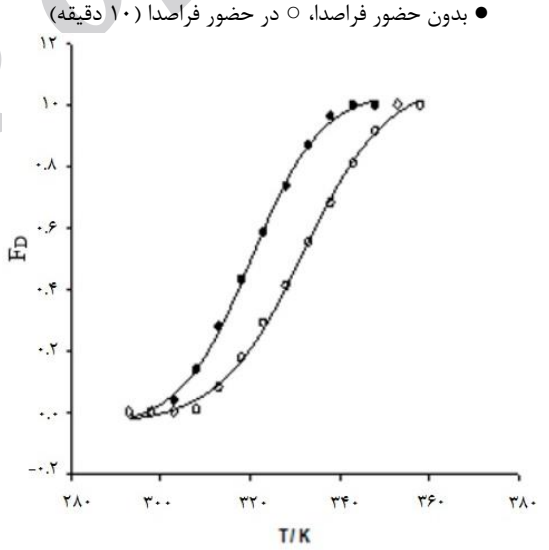
Downloaded from joasi.ir at 13:31 +0330 on Tuesday December 18th 2018

جدول ۲ نتایج برهم‌کنش دی‌تی‌ای‌بی بر پایداری آلفا-لاکتالبومین در حضور و غیاب امواج فراصدا.

زمان آوادهی (دقیقه)	$\Delta G^{\cdot}(H_2O)$ kJ.mol^{-1}	m kJ.mol^{-1}.M^{-1}
۰	*۸٫۸۱۷ **۱۷٫۳۰	*۲٫۱۴۶ **۱٫۵۵۰
۱۰	*۱۰٫۶۳ **۲۸٫۴۱۲	*۲٫۷۰۶ **۲٫۳۷۰
۲۰	*۱۱٫۲۱۰ **۳۰٫۲۷۸	*۲٫۹۵۰ **۲٫۵۰۰

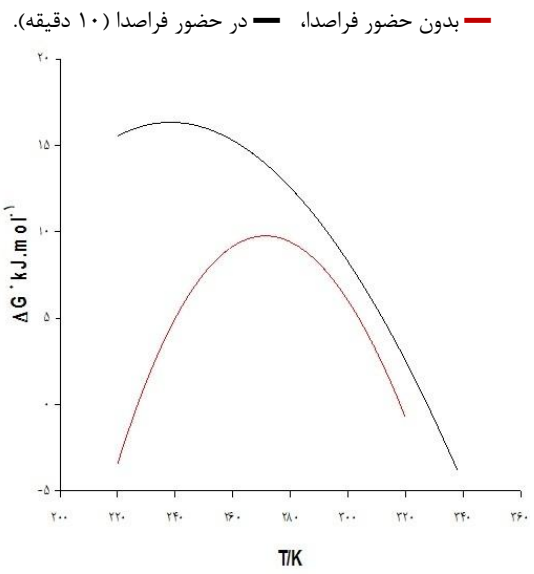
* فرابنفش ** فلورسانس

در ادامه پایداری حرارتی آلفا-لاکتالبومین مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور میزان جذب محلول در ۲۷۴ نانومتر در دماهای مختلف ارزیابی و براساس آن نمودار F_D نسبت به دما رسم شد (شکل ۴).



شکل ۴ نمودار F_D آلفا-لاکتالبومین در طول موج ۲۷۲ نانومتر نسبت به دما در حضور و غیاب امواج فراصدا (F_D کسری از پروتئین است که ساختار غیرطبیعی دارد).

مقادیر $\Delta G^{\cdot}$ غیرطبیعی‌شدن حرارتی براساس روابط ۲ تا ۴ در دماهای مختلف ارزیابی و نمودار آن رسم شد (شکل ۳).



شکل ۳ نمودار سهمی شکل $\Delta G_D^{\cdot}$ پروتئین آلفا-لاکتالبومین نسبت به دما که در حضور و غیاب امواج فراصدا بدست آمده است.

نمودار براساس معادله ۵ برازش و مؤلفه‌های مربوطه مورد ارزیابی قرار گرفتند (جدول).

جدول ۳ نتایج اثر آوادهی فراصدا به مدت ۱۰ دقیقه بر پایداری حرارتی ($\Delta G^{\cdot}_{D(۲۹۸K)}$)، ΔH_m، $\Delta C_{p,m}$ و T_m دناتوره شدن گرمایی.

T_m (K)	۳۲۷٫۶	۳۱۸٫۲
$\Delta G^{\cdot}_{D(۲۹۸K)}$ (kJ.mol^{-1})	۸٫۸۷۰	۶٫۵۲۴
$\Delta C_{p,m}$ (kJ.mol^{-1})	۱٫۰۹۳	۲٫۵۴۳
ΔH_m (kJ.mol^{-1})	۱۱۳٫۸۶۰	۱۲۹٫۰۱۰

ملاحظه می‌گردد آوادهی سبب افزایش پایداری حرارتی پروتئین می‌شود.

توجه به طیف نشری پروتئین در حضور غلظت‌های مختلف سورفاکتانت (اِس‌دی‌اِس و دی‌تی‌ای‌بی) نشان‌دهنده تغییرات کم به صورت شیفت آبی بوده که می‌تواند دلیلی بر تاخوردگی ساختار در حضور سورفاکتانت باشد. هنگامی که آلفا-لاکتالبومین تحت امواج فراصدا قرار می‌گیرد طیف نشری شیفت آبی را نشان می‌دهد که می‌تواند ناشی از استحکام‌یافتگی ساختار توسط امواج باشد (ساختار تاخورده مقاومت بیش‌تری نسبت به

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from joasi.ir at 13:31 +0330 on Tuesday December 18th 2018

غیرطبیعی‌کننده دارد). علت افزایش پایداری ساختار تاخورده این است که در حالت تاخورده فرصت نزدیکی برای قسمت‌هایی از مولکول فراهم می‌شود که در حالت عادی میسر نبوده است. این نزدیکی می‌تواند باعث برهم‌کنش‌های جدیدی شده که در نهایت منجر به افزایش پایداری ساختار می‌گردند. علت تفاوت پایداری سنجش‌شده در روش‌های مختلف این است که در هر روش پایداری اشاره به تفاوت ساختار در برابر یک عامل محیطی سنجیده می‌شود. در غیرطبیعی‌شدن گرمایی استحکام بنا در برابر حرارت و در غیرطبیعی‌شدن در مقابل سورفاکتانت استحکام بنا در برابر سورفاکتانت به عنوان پایداری مطرح می‌شود. چون تفاوت ساختار در برابر عوامل مختلف متفاوت است و پایداری سنجش‌شده در روش‌های مختلف الزاما برابر نمی‌باشد.

۴. نتیجه‌گیری

نتایج برآورد شده در شرایط مختلف (سورفاکتانت‌ها و زمان‌های آوادهی مختلف) برای غیرطبیعی‌شدن پروتئین آلفا-لاکتالبومین نشان می‌دهد که آوادهی سبب افزایش پایداری شیمیایی و هم‌زمان افزایش حساسیت پروتئین آلفا-لاکتالبومین به سورفاکتانت می‌شود. هم‌چنین مشخص‌شده که مقاومت ساختار نسبت به دی‌تی‌اِی‌بی، در مقایسه با اِس‌دی‌اِس بیش‌تر است (به خاطر بالا بودن چگالی بار بر روی اِس‌دی‌اِس نسبت به دی‌تی‌اِی‌بی)؛ ولی اثر پرتو مشابه است؛ یعنی مقاومت ساختار را افزایش می‌دهد. هم‌چنین نتایج غیرطبیعی‌شدن گرمایی برآورد شده برای پروتئین آلفا-لاکتالبومین در غیاب و حضور فراصدا نشان می‌دهد که امواج فراصدا پایداری گرمایی ($\Delta G^{\circ}_{D(۲۹۸^{\circ}K)}$) و T_m پروتئین را افزایش و ΔH_m و ΔC_p را کاهش می‌دهند.

۵. تقدیر و تشکر

این تحقیق مربوط به طرح پژوهشی شماره ۲۸۹۴۴ مربوط به معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی بوده که بدین وسیله از آن حوزه تقدیر می‌گردد.

۶. فهرست منابع

[1] J. David, N. Cheeke, "Fundamentals and applications of ultrasonic waves," Physics Department Concordia University Montreal, Quebec, Canada, pp. 1-13, 2002.V.F. Humphrey, "Ultrasound and matter-Physical interactions," Progress in Biophysics and Molecular Biology, vol. 93, no. 1-3, pp. 195-211, 2007.

[2] K.S. Suslick, W.L. Nyborg, "Ultrasound: Its chemical, physical, and biological effects," VCH Publishers, pp. 919-920 1990.

[3] R.E. Apfel, C.K. Holland, "Gauging the likelihood of cavitation from short-pulse, low-duty cycle diagnostic ultrasound," Ultrasound in Medicine & Biology, vol. 17, no. 2, pp. 179-185, 1991.

[4] WFUMB Safety Committee, "Free-radical production: Its biological consequences," Ultrasound in Medicine & Biology, vol. 24, no. 1, pp. S29-S34, 1998.

[5] C. Giulivi, E. Cadenas, "Heme protein radicals: formation, fate, and biological consequences," Free Radical Biology and Medicine, vol. 24, no.2, pp. 269-279, 1998.

[6] C.L. Hawkins, M.J. Davies, "Generation and propagation of radical reactions on proteins," Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, vol. 1504, no 2-3, pp. 196-219, 2001.

[7] E. Stadtman, R. Levine, "Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteinsm," Amino Acids, vol. 25, no. 2-3, pp. 207-218, 2003.

[8] P.R. Strom-Jensen, F. Dunn, "Ultrasonic absorption by solvent-solute interactions and proton transfer in aqueous solutions of peptides and small proteins," The Journal of The Acoustical Society of America, vol. 75, no. 3, pp. 960-966, 1984.

[9] C. Marchioni, E. Riccardi, S. Spinelli, F. Dell'Unto, P. Grimaldi, A. Bedini, C. Giliberti, L. Giuliani, R. Palomba, A.C. Castellano, "Structural changes induced in proteins by therapeutic ultrasounds," Ultrasonics, vol. 49, no. 6-7, pp. 569-576, 2009.

[10] R.L. Hill, K. Brew, "Lactose synthetase," Advances in Enzymol and Related Areas of Molecular Biology, vol. 43, pp. 411-490, 1975.

[11] E.A. Permyakov, V.V. Yarmolenko, L.P. Kalinichenko, L.A. Morozova, E.A. Burstein, "Calcium binding to α-lactalbumin: Structural rearrangement and association constant evaluation by means of intrinsic protein fluorescence changes,"

www.SID.ir

Downloaded from joasi.ir at 13:31 +0330 on Tuesday December 18th 2018

[22] M.R. Housaindokht, J. Chamani, A. Moosavi-Movahedi, "A differential scanning calorimetric study of the influence of copper and dodecyl trimethyl ammonium bromide on the stability of bovine α-lactalbumin," International Journal of Biological Macromolecules, vol. 36, no. 3, pp. 169-175, 2005.

[23] L.H. Green, J.A. Grobler, V.A. Malinovskii, K.R. Acharya, K. Brew, "Stability, Activity and flexibility in α-Lactalbumin," Protein Enggineering, vol. 12, no. 7, pp. 581-587, 1999.

[24] A.C. Soria, M. Villamiel, "Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: A review," Trends in Food Science & Technology, vol. 21, no.7, pp. 323-331, 2010.

[25] H. Hu, J. Wu, E.C. Li-Chan, L. Zhu, F. Zhang, X. Xu, G. Fan, L. Wang, X. Huang, S. Pan, "Effects of ultrasound on structural and physical properties of Soy Protein Isolate (SPI) dispersions," Food Hydrocolloids, vol. 30, no. 2, pp. 647-655, 2013.

Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 100, no. 1, pp. 191-197, 1981.

[12] K. Kuwajima, "The molten globule state of alpha-lactalbumin," The FASEB Journal, vol. 10, no. 1, pp. 102-109, 1996.

[13] G. Klarenbeek, "Effects of various heat treatments on structure and solubility of whey proteins," Journal of Dairy Science, vol. 67, no. 11, pp. 2701-2710, 1984.

[14] A.Tziboula, W. Steele, I. West, D. Muir, "Microfiltration of milk with ceramic membranes: Influence on casein composition and heat stability," Milchwissenschaft, vol. 53, no. 1, pp. 8-11, 1998.

[15] J. Graveland-Bikker, C. De Kruif, "Unique milk protein based nanotubes: Food and nanotechnology meet," Trends in Food Science & Technology, vol. 17, no. 5, pp. 196-203, 2006.

[16] A.R. Jambrak, T.J. Mason, V. Lelas, Z. Herceg, I.L. Herceg, "Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming properties of whey protein suspensions," Journal of Food Engineering, vol. 86, no. 2, pp. 281-287, 2008.

[17] S. Martini, R. Potter, M. Walsh, "Optimizing the use of power ultrasound to decrease turbidity in whey protein suspensions," Food Research International, vol. 43, no. 10, pp. 2444-2451, 2010.

[18] J. Chandrapala, B .Zisu, M. Palmer, S. Kentish, M. Ashokkumar, "Effects of ultrasound on the thermal and structural characteristics of proteins in reconstituted whey protein concentrate," Ultrasonics Sonochemistry, vol. 18, no. 5, pp. 951-957, 2011.

[19] J. Chandrapala, B. Zisu, S. Kentish, M. Ashokkumar, "The effects of high-intensity ultrasound on the structural and functional properties of α-Lactalbumin, β-Lactoglobulin and their mixtures," Food Research International, vol. 48, no. 2, pp. 940-943, 2012.

[20] A.R. Jambrak, T.J. Mason, V. Lelas, L. Paniwnyk, Z. Herceg, "Effect of ultrasound treatment on particle size and molecular weight of whey proteins," Journal of Food Engineering, vol. 121, pp. 15-23, 2014.

[21] H. Siami, M. R. Housaindokht, A. Nakhaeipour, "The effect of ultrasound on the enzymatic hydrolysis of starch with alph-amylase enzyme," Journal of Acoustical Engineering Society of Iran, vol. 3, no. 2, pp. 37-43, 2016.

Archive of SID

www.SID.ir