

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

سید محمد حسینی^۱، محمدرضا حسین دخت^{۱*}، محمد ایزدیار^۱، رضا ایزدی نجف آبادی^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 حالی که، 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 (اس‌دی‌اس) و کاتیونی (دی‌تی‌ای‌بی) 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 حالت غیرطبیعی می‌شود. در روش طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش، پایداری آلفا-لاکتالبومین (ΔG_{H_2O}) نسبت به اس‌دی‌اس 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 (ΔG_{H_2O}) نسبت به دی‌تی‌ای‌بی 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 (ΔG_{298K}^0 ، $\Delta C_{P,m}$ ، ΔH_m و ΔS_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، هیدروژن پراکسید و رادیکال $HO_2^\cdot$ را به وجود

آورند. رادیکال‌ها می‌توانند روی مولکول‌های زیستی هم‌چون آنزیم، دی‌ان‌ای^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

² DNA

* نویسنده پاسخگو: housain@um.ac.ir

[۱۳-۱۲].

- بعضی از شکل‌های آلفا-لاکتالبومین باعث از بین رفتن 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 پلازما 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^۱ 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 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 [۱۸].

در سال ۲۰۱۰ مارتینی^۲ 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^۳ و همکاران اثر امواج فراصدا را بر تغییرات ساختاری و خواص گرمایی پروتئین‌های آب پنیر بررسی نمودند. آن‌ها در این کار با روش‌های یووی-وی‌آی‌اس^۴، دی‌اس‌سی^۵، سی‌دی^۶ 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 آلفا-لاکتالبومین 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

² Martini³ Jayani⁴ UV-vis⁵ DSC⁶ CD¹ Jambrak

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 حالی که 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+} و دی‌تی‌ای بی^۱ را بر خواص گرمایی آلفا-لاکتالبومین با استفاده از کالریمتری اسکن تفاضلی (دی‌اس‌سی)، طیف‌سنجی فلورسانس و ویسکومتری در غلظت‌های متفاوتی از این دو بررسی کرده و نشان دادند که یون مس اثرات مثبت و دی‌تی‌ای بی 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 سورفاکتانت‌های دی‌اس‌سی^۲ و دی‌تی‌ای بی) 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^۳)، سدیم دودسیل سولفات با وزن مولکولی ۲۸۸/۳۸ (شرکت مرک)، دودسیل تری‌متیل‌آمونیم‌برماید با وزن مولکولی ۳۰۸/۳۸ (شرکت مرک)، سدیم‌دی‌هیدروژن فسفات یک آب‌ه با وزن مولکولی ۱۳۸ (شرکت مرک)، فسفریک اسید با وزن مولکولی ۹۸ (شرکت مرک)، سدیم‌هیدروکسید با وزن مولکولی ۴۰ (شرکت مرک).

۲-۲. دستگاه فراصدا

در این تحقیق از دستگاه فراصدای تپی (پالسی)^۴ 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 (اس‌دی‌اس یا دی‌تی‌ای بی) 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

³ Merk

⁴ Scientz-III

¹ DTAB

² SDS

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-

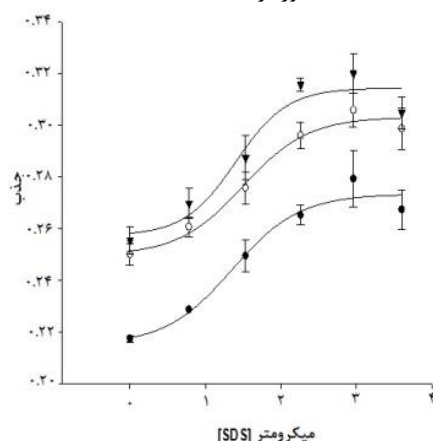
لاکتالبومین در غیاب و حضور امواج فراصدا

برای بررسی برهم‌کنش سورفاکتانت (اس‌دی‌اس یا دی‌تی‌ای‌بی) 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 (اس‌دی‌اس یا دی‌تی‌ای‌بی) به صورت جداگانه در بافر فسفات ۲۰ میلی‌مولار 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 آواهی‌شده به مدت ۱۰ و ۲۰ دقیقه مشابه حالت موج می‌باشد.

۳. نتایج و بحث

برهم‌کنش اس‌دی‌اس 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 اس‌دی‌اس در حضور و غیاب فراصدا.

جذب پروتئین آلفا-لاکتالبومین در غلظت‌های مختلف سورفاکتانت، نسبت به غلظت سورفاکتانت، نمودارهای دو حالت غیرطبیعی شدن پروتئین به‌دست آمد. با استفاده از معادله‌های ۱ تا ۴ ΔG° در چند غلظت از سورفاکتانت (غلظت‌هایی که در آن‌ها مقدار K بین ۰/۱ تا ۱۰ باشد) به‌دست می‌آید،

$$F_D + F_N = 1 \quad (1)$$

$$K_D = \frac{F_D}{F_N} \quad (2)$$

$$\Delta G_D^\circ = -RT \ln K \quad (3)$$

در این رابطه‌ها F_D و F_N به ترتیب کسری از پروتئین هستند که ساختار طبیعی و ساختار غیرطبیعی شده دارند. از رسم مقادیر ΔG° در برابر غلظت سورفاکتانت خط راستی با معادله ۴ بدست می‌آید،

$$\Delta G_D^\circ = \Delta G_{H_2O}^\circ - m[\text{denaturant}] \quad (4)$$

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

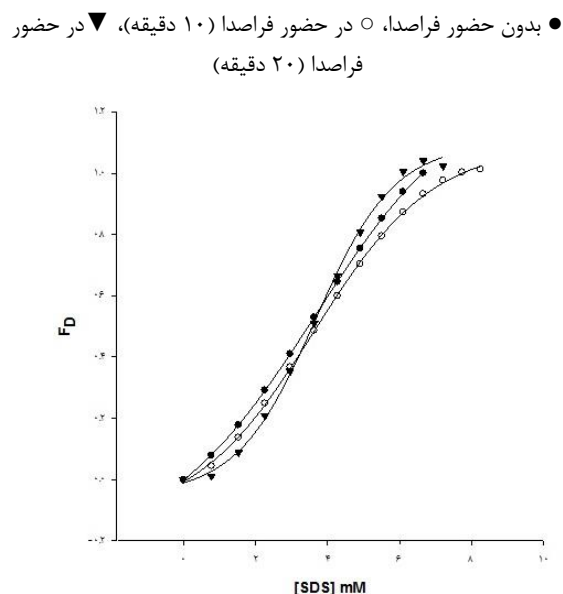
۲-۳-۲-۱. اثر دما بر پایداری آلفا-لاکتالبومین در غیاب و حضور امواج فراصدا

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 حالت دنا توره شدن پروتئین به‌دست آمد. از معادله‌های ۱ تا ۲ مقدار ΔG° در چند دما تعیین و با معادله ۵ برازش شدند. مقادیر پایداری گرمایی ΔG° (۲۹۸k)، ΔH_m° و ΔC_p و T_m به‌دست می‌آید.

$$\Delta G^\circ(T) = \Delta H_m^\circ(1 - T/T_m) - \Delta C_p [T_m - T + T \ln(T/T_m)] \quad (5)$$

در این رابطه ΔH_m° تغییرات آنتالپی، T_m دمای نیمه راه و ΔC_p تغییرات ظرفیت گرمایی در غیرطبیعی شدن پروتئین می‌باشد.

لاکتالبومین آوادهی شده نسبت به ΔG_D افزایش می‌یابد و میزان افزایش به زمان آوادهی بستگی دارد. با تهیه نمونه در ۲۹۵ نانومتر، طیف نشری محلول را در حضور غلظت‌های مختلف ΔG_D تعیین شد. نتایج در شکل براساس روابط ۲ تا ۴ مقدار F_D تعیین شد. نتایج در شکل نشان داده شده است.



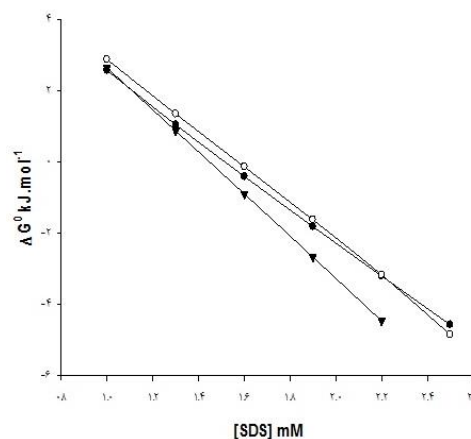
شکل ۳ نمودار F_D آلفا-لاکتالبومین در طول موج ۲۷۴ نانومتر نسبت به غلظت ΔG_D در حضور و غیاب فراصدا (F_D کسری از پروتئین است که ساختار غیرطبیعی دارد).

براساس شکل ۳ و رابطه ۴ مقادیر m و $\Delta G_D(H_2O)$ برآورد شد (جدول). نتایج هم‌خوانی مناسبی با نتایج طیف‌سنجی یووی دارد که تأییدی بر دو حالت بودن غیرطبیعی شدن شیمیایی توسط ΔG_D است. برهم‌کنش دی‌تی‌ای بی 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 آوادهی شده در برابر غیرطبیعی کننده دی‌تی‌ای بی افزایش یافته و این افزایش پایداری متناسب با زمان آوادهی می‌باشد (نظیر حالت ΔG_D).

رفتار S شکل در غیاب و حضور امواج ملاحظه می‌شود. براساس روابط ۲ تا ۴ مقادیر ΔG_D ارزیابی و نمودار آن نسبت به غلظت ΔG_D رسم شد (شکل ۲).

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



شکل ۲ نمودار خطی ΔG_D پروتئین آلفا-لاکتالبومین نسبت به غلظت ΔG_D در حضور و غیاب فراصدا.

با برآزش نمودارها براساس رابطه ۴ مقادیر m و $\Delta G_D(H_2O)$ بدست آمد (جدول ۱).

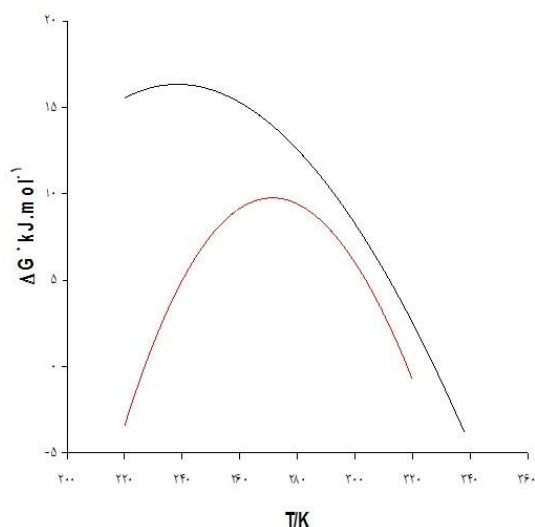
جدول ۱ نتایج برهم‌کنش ΔG_D بر پایداری آلفا-لاکتالبومین در حضور و غیاب امواج فراصدا.

زمان آوادهی (دقیقه)	$\Delta G_D(H_2O)$ kJ.mol^{-1}	m $\text{kJ.mol}^{-1}.\text{M}^{-1}$
۰	*۷۴۸۳ **۶۶۴۷	*۵۰۰۵ **۱۸۶۸
۱۰	*۸۰۹۲ **۷۰۷۶	*۵۱۸۳ **۱۹۰۵
۲۰	*۸۶۹۱ **۸۹۶۵	*۶۰۵۷ **۲۵۲۳

* فرابنفش ** فلورسانس

بزرگی $\Delta G_D(H_2O)$ معرف پایداری و m معرف حساسیت است. نتایج نشان می‌دهد که پایداری و حساسیت آلفا-

— بدون حضور فراصدا، — در حضور فراصدا (۱۰ دقیقه).



شکل ۳ نمودار سهمی شکل ΔG_D° 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 آواهی فراصدا به مدت ۱۰ دقیقه بر پایداری حرارتی ($\Delta G_{D(298K)}^\circ$ ، ΔH_m ، $\Delta C_{p,m}$ و T_m دنا توره شدن گرمایی).

T_m (K)	۳۲۷٫۶	۳۱۸٫۲
$\Delta G_{D(298K)}^\circ$ (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 آواهی سبب افزایش پایداری حرارتی پروتئین می‌شود.

توجه به طیف نثری پروتئین در حضور غلظت‌های مختلف سورفاکتانت (اس‌دی‌اس 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 نثری شیفت آبی را نشان می‌دهد که می‌تواند ناشی از استحکام‌یافتگی ساختار توسط امواج باشد (ساختار تاخورده مقاومت بیش‌تری نسبت به

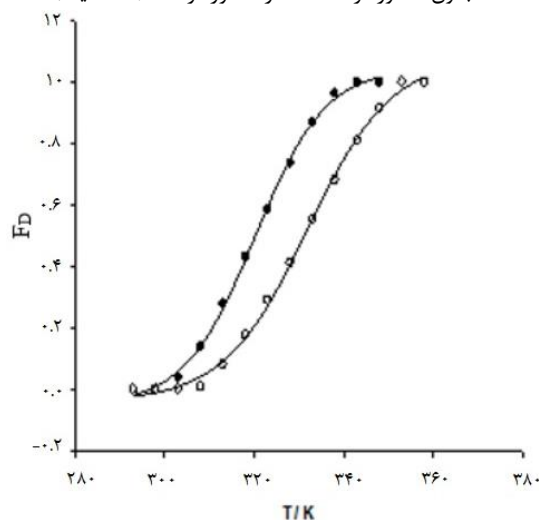
جدول ۲ نتایج برهم‌کنش دی‌تی‌ای‌بی بر پایداری آلفا-لاکتالبومین در حضور و غیاب امواج فراصدا.

زمان آواهی (دقیقه)	$\Delta G^\circ(H_2O)$ 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).

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



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 ΔG° غیرطبیعی شدن حرارتی براساس روابط ۲ تا ۴ در دماهای مختلف ارزیابی و نمودار آن رسم شد (شکل ۳).

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 proteins," 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,"

غیرطبیعی کننده دارد). علت افزایش پایداری ساختار تاخوردۀ این است که در حالت تاخوردۀ 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 غیرطبیعی شدن گرمایی استحکام بنا در برابر حرارت و در غیرطبیعی شدن 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 آواهی مختلف) برای غیرطبیعی شدن پروتئین آلفا-لاکتالبومین نشان می‌دهد که آواهی سبب افزایش پایداری شیمیایی و هم‌زمان افزایش حساسیت پروتئین آلفا-لاکتالبومین به سورفاکتانت می‌شود. هم‌چنین مشخص شده که مقاومت ساختار نسبت به دی‌تی‌ای‌بی، در مقایسه با ΔT_m (به خاطر بالا بودن چگالی بار بر روی ΔT_m نسبت به دی‌تی‌ای‌بی)؛ ولی اثر پرتو مشابه است؛ یعنی مقاومت ساختار را افزایش می‌دهد. هم‌چنین نتایج غیرطبیعی شدن گرمایی برآورد شده برای پروتئین آلفا-لاکتالبومین در غیاب و حضور فراصدا نشان می‌دهد که امواج فراصدا پایداری گرمایی $(\Delta G_{D(298^\circ K)}^\circ)$ 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.

- [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 Engineering*, 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 α -amylase enzyme," *Journal of Acoustical Engineering Society of Iran*, vol. 3, no. 2, pp. 37-43, 2016.