

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

سید محمد حسینی<sup>۱</sup>، محمد رضا حسین دخت<sup>\*</sup>، محمد ایزدیار<sup>۱</sup>، رضا ایزدی نجف آبادی<sup>۲</sup>

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 (پرور ۲۰ کیلوهرتز) بر پایداری شیمیایی و گرمایی پروتئین آلفا-لاکتالبومین گاوی است. اندرکش سورفاکتانت‌های آبیونی (اس‌دی‌اس) و کاتیونی (دی‌تی‌ای‌بی) با آلفا-لاکتالبومین در حضور و غیاب امواج فراصدا با استفاده از روش‌های طیف‌سنجدی مرئی-فرابنفش و فلورسانس مورد بررسی قرار گرفت. آلفا-لاکتالبومین در یک سازوکار دو حالته غیرطبیعی می‌شود. در روش طیف‌سنجدی مرئی-فرابنفش، پایداری آلفا-لاکتالبومین ( $\Delta G_{H_2O}$ ) 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 ( $\Delta G_{H_2O}$ ) 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 بافت (۱۱/۲۱۰ کیلوژول بر مول). مؤلفه‌های ترمودینامیکی ( $T_m$ ,  $\Delta C_{P,m}$  و  $\Delta H_m^0$ ) برای غیرطبیعی شدن گرمایی آلفا-لاکتالبومین گاوی در حضور و غیاب امواج فراصدا با استفاده از طیف‌سنجدی فرابنفش مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان می‌دهند که امواج فراصدا پایداری گرمایی را افزایش داده و  $\Delta C_{P,m}$  و  $\Delta H_m^0$  را کاهش می‌دهند.

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

آورند. رادیکال‌ها می‌توانند روی مولکول‌های زیستی هم‌چون آنزیم، دی‌إن‌ای<sup>۲</sup> و لیپیدها تأثیر بگذارند [۹-۵]. 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 واسطه‌های متعددی در مسیر تاخورده‌گی دارد به همین خاطر مطالعات زیادی توسط دانشمندان علاقه‌مند به موضوع تاخورده‌گی پروتئین بر روی آن انجام شده است

## 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 کواکزایی و گرمایی ایجاد می‌شود [۴-۱].

هنگامی که پدیده کواکزایی در اثر عبور امواج فراصدا با شدت بالا از داخل آب اتفاق می‌افتد، تجزیه مولکول‌های بخار آب به اتم‌های هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل (OH<sup>-</sup>) مشاهده می‌گردد. اتم‌های هیدروژن و رادیکال های هیدروکسیل می‌توانند با هم ترکیب و مولکول‌های هیدروژن، هیدروژن‌پراکسید و رادیکال HO<sub>2</sub><sup>-</sup> را به وجود

<sup>2</sup> DNA

\* نویسنده پاسخگو: housain@um.ac.ir

در سال ۲۰۱۰ مارتینی<sup>۲</sup> و همکاران اثر فرا صدا را بر رفع کدورت پروتئین آب پنیر بررسی کردند. فرا صدای به کار 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 فرا صدا با قدرت ۱۵ وات به مدت ۱۵ دقیقه و دمای ۶۰ درجه سلسیوس مهیا شده بود [۱۸].

در سال ۲۰۱۱ جیانی<sup>۳</sup> و همکاران اثر امواج فرا صدا را بر تغییرات ساختاری و خواص گرمایی پروتئین‌های آب پنیر بررسی نمودند. آن‌ها در این کار با روش‌های یووی-وی‌آی‌اس<sup>۴</sup>، دی‌اس‌سی<sup>۵</sup>، سی‌دی<sup>۶</sup> و فلورسانس، تغییرات آب‌گریزی و تغییرات ساختاری را بررسی کردند. در این تحقیق نشان داده شد که اگر مدت زمان آواده‌ی فرا صدا کمتر از ۵ دقیقه باشد، آنتالپی غیرطبیعی شدن گرمایی کاهش یافته ولی در دراز مدت به خاطر تجمع پروتئینی افزایش می‌یابد. فرا صدا همچنین تغییرات جزئی در ساختار دوم و خاصیت آب‌گریزی را باعث می‌شود [۱۹].

در سال ۲۰۱۲ جیانی و همکاران اثر امواج فرا صدا (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 فرا صدا نسبت به بتا-لاکتاگلوبولین و مخلوط آن‌ها بیشتر است [۲۰].

در سال ۲۰۱۴ جمبراک و همکاران اثر فرا صدا بر اندازه ذرات و وزن مولکولی پروتئین‌های آب پنیر را بررسی کردند. در این کار از فرا صدا 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

[۱۲-۱۳]

- بعضی از شکل‌های آلفا-لاکتالبومین باعث از بین‌رفتن یاخته‌های سلطانی 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 تریپتوфан است که مصرف آن تریپتوфан پلاسمای افزایش داده که اثرات مثبتی روی هوشیاری، حافظه و خلق‌خوی مصرف‌کننده دارد [۱۶].

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

در سال ۲۰۰۸ جمبراک<sup>۱</sup> و همکاران اثر فرا صدا را بر روی پروتئین آب پنیر به منظور بهبود خواص کاربردی آن بررسی کردند. آن‌ها در این کار از فرا صدا با شدت پایین (۵۰۰ کیلوهرتز) و شدت بالا (پروب ۲۰ کیلوهرتز و حمام ۴۰ کیلوهرتز) استفاده کردند. نتایج نشان داد که استفاده از امواج فرا صدا 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 فرا صدا بر شش پروتئین (سیتوکروم، لیزوژیم، میوگلوبین، سرم‌آلبومن گاوی، تریپسینوژن و آلفا‌تریپسینوژن A) با جرم مولکولی و ساختار دوم متفاوت با استفاده از روش‌های طیف‌سنجی مورد مطالعه قرار گرفت. منبع فرا صدای به کار 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  $\alpha$  یا صفحات چین خورده  $\beta$ ) و همچنین به درجه نظم ساختار بستگی داشت. نتایج تایید می‌کند که رادیکال‌های آزاد به وجود آمده در طی سونولیز نقش مهمی در ایجاد تغییرات ساختاری دارند [۱۰].

<sup>1</sup> Jambrak<sup>2</sup> Martini<sup>3</sup> Jayani<sup>4</sup> UV-vis<sup>5</sup> DSC<sup>6</sup> CD

پودر آلفا-لاکتالبومین با وزن مولکولی ۱۴۱۷۸ دالتون (شرکت مرک<sup>۳</sup>، سدیم دودسیل سولفات با وزن مولکولی ۲۸۸,۳۸ (شرکت مرک)، دودسیل تری متیل آمونیم برماید با وزن مولکولی ۳۰,۸۳۸ (شرکت مرک)، سدیم دی هیدروژن فسفات 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)<sup>۴</sup> با بسامد ۲۰ کیلوهertz استفاده شد. برای انجام آزمایش ۵ میلی لیتر از محلول داخل سل دستگاه قرار گرفت، در حالی که سل با استفاده از ترمومترات سرد می شد. پرب دستگاه به اندازه ۱ سانتی متر 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 آزمایش ها سه بار انجام و نتیجه میانگین در گزارش ها ارائه شد.

## ۲-۳. روش ها

### ۲-۳-۱. طیف‌سنجدی فرابینفس

طیف‌سنجدی مرئی فرابینفس یکی از روش های مورد استفاده در علوم تجربی برای دریافت اطلاعات علمی و عملی، با استفاده از برهم کنش نور و ماده می باشد.

### ۲-۳-۲. اثر سورفاکtant 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 میلی مولار سورفاکtant (اس دی اس یا دی تی ای بی) به صورت جداگانه در بافر فسفات ۲۰ میلی مولار با pH=۷ ساخته شد. سپس محلول پروتئین وارد سل شد و هر بار به محلول، مقادیر مشخصی سورفاکtant اضافه و طیف آن ثبت گردید. از رسم بیشینه

مولکول ها را کاهش و حمام ۴۰ کیلوهertz تغییرات مخصوصی در ترکیب و وزن مولکولی پروتئین ها ایجاد کرد [۲۱].

در سال ۲۰۱۶ صیامی و همکاران تاثیر امواج فراصدا با شدت بالا (پرب ۲۰ کیلوهertz) بر واکنش آوکافت نشاسته توسط آنزیم آلفا-آمیلаз را بررسی نمودند. افزایش درصد تبدیل نشاسته طی ۱۰ دقیقه آوادهی مشاهده شد. در حالی که زمان های ۲۰ و ۳۰ دقیقه امواج دهی 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 C<sup>۱۴</sup> [۲۲]. حسین دخت و همکاران در سال ۲۰۰۵ نقش ودی تی ای بی<sup>۱</sup> را بر خواص گرمایی آلفا-لاکتالبومین با استفاده از کالریمتری اسکن تفاضلی (دی اس سی)، طیف‌سنجدی فلورسانس و ویسکومتری در غلظت های متفاوتی از این دو بررسی کرده و نشان دادند که یون مس اثرات مثبت و دی تی ای بی اثرات منفی بر پایداری گرمایی پروتئین دارد [۲۳].

تمایل آلفا-لاکتالبومین به پذیرفتن کنفورماسیون های مختلف نشان دهنده پایداری کم این پروتئین در شرایط طبیعی است [۲۴].

با توجه به کاربرد گسترده امواج فراصدا در صنایع غذایی [۲۵-۲۶]، پزشکی و غیره تلاش شده تا اثر امواج فراصدا با بسامد ۲۰ کیلوهertz و زمان های مختلف ۰، ۱۰ و ۲۰ دقیقه بر پایداری شیمیایی (پایداری در برابر سورفاکtant اس دی اس<sup>۲</sup> و دی تی ای بی) و پایداری گرمایی آلفا-لاکتالبومین به عنوان پروتئین الگو، با روش های طیف‌سنجدی (مرئی- فرابینفس و فلورسانس) بررسی شود.

## ۲. مواد و روش ها

### ۲-۱. مواد مورد استفاده

موادی که در این تحقیق استفاده شده اند به شرح زیر می باشند:

<sup>3</sup> Merk  
<sup>4</sup> Scientz-IID

<sup>1</sup> DTAB  
<sup>2</sup> SDS

### ۲-۳-۲. طیف سنجی فلورسانس

با تجزیه و تحلیل طیف نشری می‌توان اطلاعاتی در زمینه ساختار، تاخوردگی و برهمنش پروتئین‌ها به دست آورد.

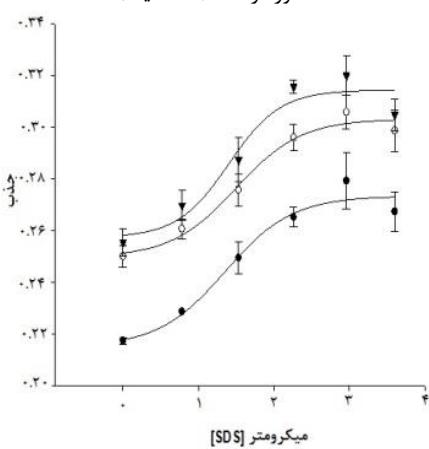
### ۲-۳-۱. اثر سورفاکтанت بر پایداری پروتئین آلفا-لاکتالبومین در غیاب و حضور امواج فراصدا

برای بررسی برهمنش سورفاکتانت (اس‌دی‌اس یا دی‌تی‌ای‌بی) با پروتئین آلفا-لاکتالبومین در غیاب امواج فراصدا آزمایش به این صورت انجام شد که ابتدا محلول ۰۰۲۵ 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 فرابینفس انجام شد. آزمایش‌ها برای پروتئین آلفا-لاکتالبومین آواهی‌شده به مدت ۱۰ و ۲۰ دقیقه مشابه حالت موج می‌باشد.

### ۳. نتایج و بحث

برهمنش اس‌دی‌اس با آلفا-لاکتالبومین توسط طیف‌سنجی مرئی-فرابینفس مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱).

- بدون حضور فراصدا، ۰ 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 به دست آمد. با استفاده از معادله‌های ۱ تا ۴  $\Delta G^\circ$  در چند غلظت از سورفاکتانت (غلظت‌هایی که در آن‌ها مقدار K بین ۱/۰ تا ۱۰ باشد) به دست 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  $\Delta G^\circ$  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 معروفی می‌شود.

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

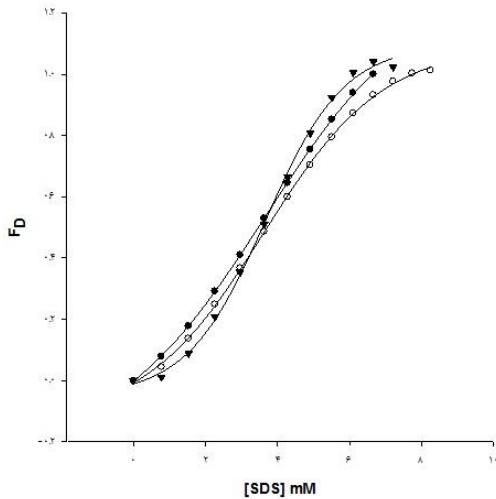
در این تحقیق محلول ۰۰۲۵ درصد وزنی حجمی آلفا لاکتالبومین در بافر فسفات ۲۰ میلی‌مولار با pH=۷ تهییه و سپس طیف آن در دماهای مختلف ۳۰ تا ۹۵ درجه سلسیوس در محدوده ۲۰۰ تا ۳۰۰ نانومتر گرفته شد. از رسم بیشینه جذب در برابر دما نمودارهای دو حالت دنaturه شدن پروتئین به دست آمد. از معادله‌های ۱ تا ۲ مقدار  $\Delta G^\circ$  در چند دما تعیین و با معادله ۵ برازش شدند. مقادیر پایداری گرمایی  $(\Delta H_m^\circ, \Delta C_p^\circ, \Delta G^\circ)$  به دست می‌آید.

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

در این رابطه  $\Delta H_m^\circ$  تغییرات آنتالپی،  $T_m$  دمای نیمه راه و  $\Delta C_p^\circ$  تغییرات ظرفیت گرمایی در غیرطبیعی شدن پروتئین می‌باشد.

لکتالبومین آواده‌ی شده نسبت به اس‌دی‌اس افزایش می‌یابد و میزان افزایش به زمان آواده‌ی بستگی دارد. با تهییج نمونه در ۲۹۵ نانومتر، طیف نشری محلول را در حضور غلظت‌های مختلف اس‌دی‌اس 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)



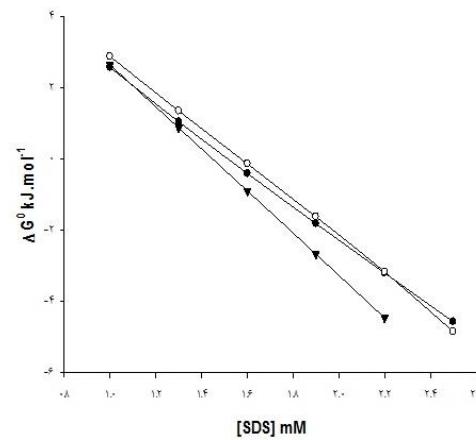
شکل ۳ نمودار  $F_D$  آلفا-لکتالبومین در طول موج ۲۷۴ نانومتر نسبت به غلظت اس‌دی‌اس در حضور و غیاب فراصدا ( $F_D$ ) کسری از پروتئین است که ساختار غیرطبیعی دارد.

براساس شکل ۳ و رابطه ۴ مقادیر  $m$  و  $\Delta G^\circ(H_2O)$  برآورد شد (جدول). نتایج هم‌خوانی مناسبی با نتایج طیف‌سنجی یووی دارد که تأییدی بر دو حالت بودن غیرطبیعی شدن شیمیایی توسط اس‌دی‌اس است. برهم‌کنش دی‌تی‌ای‌بی با آلفا-لکتالبومین به طور مشابه به روش‌های یووی و فلورسانس بررسی و نتایج در جدول ۲ گزارش شده‌اند.

ملحوظه‌ی می‌گردد که پایداری شیمیایی پروتئین آواده‌ی شده در برابر غیرطبیعی کننده دی‌تی‌ای‌بی افزایش یافته و این افزایش پایداری متناسب با زمان آواده‌ی می‌باشد (نظیر حالت اس‌دی‌اس).

رفتار S شکل در غیاب و حضور امواج ملاحظه می‌شود. براساس روابط ۲ تا ۴ مقادیر  $\Delta G^\circ$  ارزیابی و نمودار آن نسبت به غلظت اس‌دی‌اس رسم شد (شکل ۲).

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



شکل ۲ نمودار خطی  $\Delta G^\circ$  پروتئین آلفا-لکتالبومین نسبت به غلظت اس‌دی‌اس در حضور و غیاب فراصدا.

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

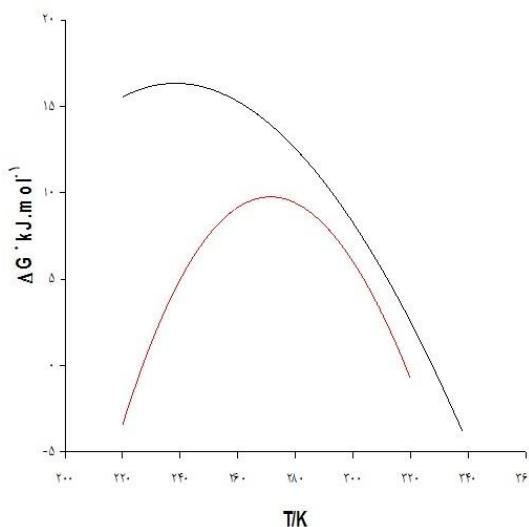
جدول ۱ نتایج برهم‌کنش اس‌دی‌اس بر پایداری آلفا-لکتالبومین در حضور و غیاب امواج فراصدا.

زمان آواده‌ی (دقیقه)	$\Delta G^\circ(H_2O)$ kJ.mol <sup>-1</sup>	$m$ kJ.mol <sup>-1</sup> .M <sup>-1</sup>
-	* 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

\* فرایندهش \*\* فلورسانس

بزرگی  $\Delta G^\circ_{H_2O}$  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  $\Delta G_D^\circ$  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  $\Delta G_D^\circ$  و  $T_m$  دناتوره 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
$\Delta H_m$ (kJ.mol⁻¹)	۱۱۳,۸۶۰	۱۲۹,۰۱۰

ملحوظه می‌گردد آوادهی سبب افزایش پایداری حرارتی پروتئین می‌شود.

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

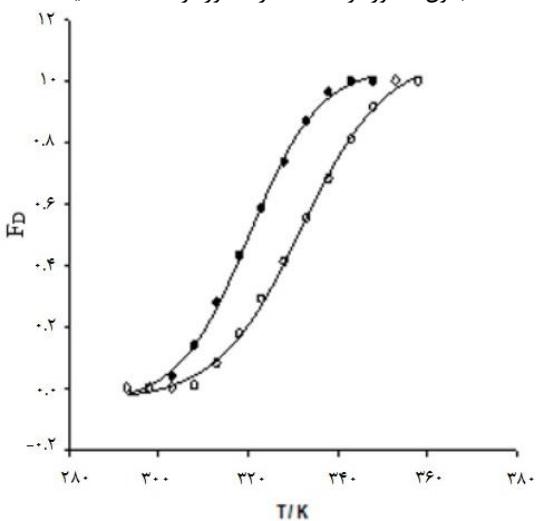
جدول ۲ نتایج برهم‌کنش دی‌تی‌ای‌بی بر پایداری آلفا-لاکتالبومین در حضور و غیاب امواج فراصدا.

زمان آوادهی (دقیقه)	$\Delta G^\circ(H_2O)$ kJ.mol⁻¹	m kJ.mol⁻¹.M⁻¹
*	*۸,۸۱۷	*۲,۱۴۶
*	**۱۷,۳۰	**۱,۵۵۰
۱۰	*۱۰,۶۳	*۲,۷۰۶
	**۲۸,۴۱۲	**۲,۳۷۰
۲۰	*۱۱,۲۱۰	*۲,۹۵۰
	**۳۰,۲۷۸	**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 ۲۷۴ نانومتر نسبت به دما در حضور و غیاب امواج فراصدا  $F_D$  کسری از پروتئین است که ساختار غیرطبیعی دارد.

مقادیر  $\Delta G^\circ$  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  $\alpha$ -lactalbumin: Structural rearrangement and association constant evaluation by means of intrinsic protein fluorescence changes,"

غیرطبیعی کننده 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 برهمنکنش‌های جدیدی شده که در نهایت منجر به افزایش پایداری ساختار می‌گردد. علت تفاوت پایداری سنجش شده 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 سنجش شده در روش‌های مختلف الزاماً برابر نمی‌باشد.

## ۴. نتیجه‌گیری

نتایج برآورد شده در شرایط مختلف (سورفاکتانت‌ها و زمان‌های آواده‌ی مختلف) برای غیرطبیعی شدن پروتئین آلفا-لکتالبومین نشان می‌دهد که آواده‌ی سبب افزایش پایداری شیمیایی و هم‌زمان افزایش حساسیت پروتئین آلفا-لکتالبومین به سورفاکتانت می‌شود. همچنین مشخص شده که مقاومت ساختار نسبت به دی‌تی‌ای‌بی، در مقایسه با اس‌دی‌اس بیشتر است (به خاطر بالا بودن چگالی بار بر روی اس‌دی‌اس نسبت به دی‌تی‌ای‌بی؛ ولی اثر پرتو مشابه است؛ یعنی مقاومت ساختار را افزایش می‌دهد. همچنین نتایج غیرطبیعی شدن گرمایی برآورد شده برای پروتئین آلفا-لکتالبومین در غیاب و حضور فراصدا نشان می‌دهد که امواج فراصدا پایداری گرمایی  $T_m$  و  $\Delta G_{D(298\text{K})}$  و  $\Delta H_m$  و  $\Delta C_p$  را افزایش و 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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -Lactalbumin,  $\beta$ -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 alpha-amylase enzyme," *Journal of Acoustical Engineering Society of Iran*, vol. 3, no. 2, pp. 37-43, 2016.