

تأثیر دما بر روی تشکیل کمپلکس آلفا-لاکتالبومین-اولئوروپئین با به کارگیری روش‌های طیف‌سنجی و داکینگ مولکولی

ایمان کاتوزیان^۱، سید مهدی جعفری^{۲*}، یحیی مقصدلو^۳، لایلا کرمی^۴، محمد حسن
ایکانی^۵

۱- دانشجوی دکتری، گروه مهندسی مواد و طراحی صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۲- استاد، گروه مهندسی مواد و طراحی صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۳- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۴- استادیار، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، تهران، ایران

۵- استاد، گروه صنایع غذایی پژوهشکده فناوری‌های شیمیایی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۸/۰۸/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۰/۰۷)

چکیده

استفاده از حامل‌ها روش مناسبی برای بهبود انتقال و افزایش زیست‌دسترسی‌پذیری ترکیبات زیست‌فعال می‌باشد. آلفا-لاکتالبومین دومین پروتئین فراوان در آب‌پنیر است که به لحاظ تغذیه‌ای غنی از اسیدهای آمینه ضروری تریئوفان، لیزین و سیستئین بوده و می‌تواند به عنوان حامل مولکول‌های غذا و دارو مورد استفاده قرار گیرد. اولئوروپئین ترکیبی زیست‌فعال با خواص دارویی و ضد اکسایشی می‌باشد که به میزان قابل توجهی در برگ زیتون و به مقدار کمتر در روغن زیتون وجود دارد. هدف از این مطالعه بررسی برهم‌کنش هم‌زمان ترکیب اولئوروپئین با پروتئین آلفا-لاکتالبومین در دماهای مختلف (۲۵، ۵۰ و ۷۲ درجه سانتی‌گراد) و pH ۷ با استفاده از روش‌های طیف‌سنجی فلوروسانس، فرابنفش و دورنگ‌نمایی دورانی به همراه شبیه‌سازی داکینگ مولکولی بود. مطالعات ناشی از طیف‌سنجی فرابنفش و فلوروسانس افزایش جایگاه و ثابت اتصال را در اثر افزایش دما به سبب تغییر کنفورماسیون و بازآرایی ساختار پروتئین نشان داد. به علاوه، طیف‌سنجی دورنگ‌نمایی دورانی افزایش در ساختار صفحه‌ای بتا و کاهش در ساختار مارپیچ آلفا را در اثر افزایش دما تا ۷۲ درجه سانتی‌گراد نشان داد. در نهایت، شبیه‌سازی داکینگ مولکولی نشان داد که بهترین انرژی پیوندی پیش‌بینی شده جهت تشکیل کمپلکس kcal/mol ۶/۳- بود و ناحیه اتصال نیز بین شیار مارپیچ آلفا و صفحه بتا قرار داشت. نتایج حاصل سبب درک بهتر و عمیق برهم‌کنش و اتصال پروتئین آلفا-لاکتالبومین و مولکول اولئوروپئین می‌شود که در نهایت در تولید محصولات غذایی فراسودمند مورد استفاده قرار می‌گیرد.

کلید واژگان: آلفا-لاکتالبومین؛ اولئوروپئین، طیف‌سنجی، داکینگ مولکولی، محصولات فراسودمند

*مسئول مکاتبات: Jafarism@hotmail.com

۱- مقدمه

و سیستمین می‌باشد. به لحاظ ساختاری، این پروتئین شامل ۱۲۳ اسید آمینه است که با یکدیگر ساختار کروی تشکیل داده و این ساختار با ۴ پیوند دی‌سولفیدی پایدار شده است. این پروتئین به دلیل داشتن جایگاه اتصال قوی برای Ca^{2+} یک متالوپروتئین محسوب شده، به طوری که هر مول از آن به یک مول از کلسیم متصل شده و این اتصال موجب افزایش پایداری حرارتی آن می‌شود [۵]. نقطه‌ی ایزوالکتریک این پروتئین ۴/۶ است و از لحاظ ژنتیکی به لیزوزیم شباهت دارد. به لحاظ فیزیولوژیک، این پروتئین به دلیل قابلیت اتصال به کاتیون‌های دو ظرفیتی مانند Zn^{2+} و Ca^{2+} ، موجب تسهیل جذب مواد معدنی می‌گردد. نوع انسانی این پروتئین عملکردهای فیزیولوژیکی زیادی در دوران نوزادی دارد. هم‌چنین در غده‌های پستانی به عنوان یک کوآنزیم در بیوسنتز لاکتوز شرکت کرده و تولید و ترشح شیر را تسهیل می‌کند. تحقیقات نشان داده است که آلفا-لاکتالبومین دارای عملکردهای فیزیولوژیکی متعددی مانند کاهش استرس، فعالیت‌های ضد میکروبی و تنظیم رشد سلول‌ها است و سبب مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلول‌های توموری می‌شود [۶]. علاوه بر موارد اشاره شده می‌توان به خاصیت ضد باکتریایی این پروتئین نیز اشاره نمود که به تولید پپتیدهای با خواص ضد باکتریایی طی فرایند هضم آن نسبت داده می‌شود.

در ارتباط با استفاده از آلفا-لاکتالبومین به عنوان حامل ترکیبات زیست فعال مطالعات متعددی انجام شده است که در ادامه به برخی از آن‌ها اشاره می‌شود. آلهانیس و همکاران (۲۰۱۶) برهمکنش متقابل اپی گالوکاتچین ۳-گالات با پروتئین آلفا-لاکتالبومین را با استفاده از روش طیف‌سنجی و محاسباتی بررسی کردند. بر اساس نتایج به دست آمده از طیف‌سنجی رنگ تابی دورانی و طیف‌سنجی مادون‌قرمز تبدیل فوریه، پس از اتصال و تشکیل کمپلکس، ساختارهای صفحه‌ای β و مارپیچ α به ترتیب افزایش و کاهش پیدا کردند. نتایج کالریتری تیتراسیون ایزوترمال^۵ نیز نشان داد که واکنش از نظر آنتالپی مطلوب

غنی‌سازی مواد غذایی و تولید محصولات عملگرا امروزه مورد توجه پژوهشگران و بخش صنعت قرار گرفته است. در میان ترکیبات زیست‌فعال، پلی‌فنول‌ها از جایگاه ویژه‌ای برخوردار می‌باشند. این ترکیبات قادر به کاهش آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد از طریق به دام انداختن و کاهش فعالیت آن‌ها بوده و بدین صورت در محافظت از بدن و جلوگیری از بروز بسیاری از بیماری‌ها نقش مهمی را ایفا می‌نمایند. یکی از منابع غنی از ترکیبات فنولیک، درخت زیتون می‌باشد. بخش‌های مختلف این گیاه حاوی ترکیبات فنولی، ترپنی، ترکیبات محلول در چربی، کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها، مواد معدنی و غیره می‌باشد. برگ‌های درخت زیتون که در کشورهای مدیترانه‌ای مصرف دارویی دارند، بالاترین فعالیت ضد اکسایشی و قدرت گیرندگی رادیکال‌های آزاد را در بین بخش‌های مختلف درخت زیتون دارند. ترکیبات موجود در برگ‌های زیتون شامل ترکیبات سکوریدوید (مانند اولئوروپئین، لیگستروزید، دی متیل اولئوروپئین و الئوزید)، هم‌چنین ترکیبات فلاونوئیدی مانند آپیجنین، کامپفرول، لوتئین و ترکیبات فنولی شامل اسید کافئیک، تیروزول و هیدروکسی تیروزول می‌باشد. اولئوروپئین به میزان قابل توجهی در برگ زیتون و به مقدار کمتری در روغن زیتون وجود دارد [۱]. استفاده از حامل‌ها روش مناسبی برای بهبود انتقال و افزایش زیست‌دسترسی‌پذیری این ترکیبات زیست‌فعال^۱ می‌باشد [۲]. پروتئین‌های شیر می‌توانند به‌عنوان حامل مولکول‌های غذا و دارو مورد استفاده قرار گیرند تا مواد مغذی به‌راحتی در دسترس سیستم گوارش قرار گرفته و زیست‌دسترسی‌پذیری^۲ آن‌ها افزایش یابد [۳]. آلفا-لاکتالبومین دومین پروتئین فراوان در آب‌پنیر^۳ بوده و حدود ۲۰-۱۵٪ از کل پروتئین شیر گاو را تشکیل می‌دهد [۴]. وزن مولکولی این پروتئین ۱۴/۲ کیلو دالتون و ساختار آن غنی از اسیدهای آمینه تریپتوفان، لیزین

1. Bioactive
2. Bioavailability
3. Whey protein

4. Apoptosis
5. Isothermal titration calorimetry

با پروتئین دارد؛ اما ایزومریزاسیون به فرم ترانس سبب کاهش جذب پلی فنول به پروتئین شد. اگرچه فعالیت ضد اکسایشی ترانس رسوراترول در اثر اتصال به پروتئین آلفا-لاکتالبومین حفظ شد [۱۰]. با بررسی مطالعات صورت گرفته مشخص می‌شود که نحوه اتصال و تأثیر دماهای مختلف بر روی کمپلکس‌های تشکیل شده تأثیر به‌سزایی در تغییرات خواص عملکردی و ضد اکسایشی آن‌ها دارد. در مطالعه حاضر واکنش مولکول زیست فعال اولئوروپتین با پروتئین آلفا-لاکتالبومین گاوی با چندین روش طیف‌سنجی شامل فلئورسانس، فرابنفش و رنگ‌تابی دورانی در دماهای مختلف انجام شد. تاکنون مطالعه‌ای بر برهمکنش آلفا لاکتالبومین با مولکول اولئوروپتین انجام نشده و تأثیر دماهای مختلف (۲۵، ۵۰ و ۷۲ درجه سانتی‌گراد) بر روی ایجاد کمپلکس نهایی و پایداری آن نیز بررسی نشده است. بررسی این ساختار در دماهای مختلف می‌تواند اطلاعات مفیدی را در خصوص واکنش این دو ماده زیست فعال و پایداری آن‌ها در دماهای مختلف، به‌منظور به‌کارگیری تحت شرایط فرایند حرارتی در کارخانه‌های صنایع غذایی و تولید محصولات غذایی عملگرا فراهم سازد.

۲- مواد و روش‌ها

آلفا-لاکتالبومین از شرکت آگروپور (ایالات متحده)، تریس هیدروکسی متیل آمینومتان، اسید کلریدریک و اتیلن دی‌آمین ترا استیک اسید از شرکت مرک (آلمان)، اولئوروپتین با درجه خلوص ۹۰ درصد از شرکت اکسترانتاز (فرانسه) و آب مقطر از شرکت میلیپور (فرانسه) تهیه شد.

۲-۱- طیف‌سنجی فلئورسانس

اندازه‌گیری سیگنال‌های طیف‌سنجی فلئورسانس اطلاعات مهمی در خصوص محیط بیوشیمیایی و ترکیبات دارای نشر فلئورسانس و اتصال مولکول‌های دیگر به این ترکیبات در اختیار ما قرار می‌دهد. طیف فلئورسانس بر روی طیف‌سنج فلئورسانس (Cytation 5) با طول موج تهییج ۲۸۰ نانومتر و طول موج نشر

می‌باشد. جایگاه اتصال مطلوب نیز در محاسبات داکینگ مولکولی بین شیار صفحات β و ماریچ α تعیین شد که شامل اسیدهای آمینه آروماتیک دسته II^۱ بود [۷]. محمدی و همکاران (۲۰۱۶) با مطالعات فرانشان فلئورسانس و داکینگ مولکولی نشان دادند که پروتئین آلفا-لاکتالبومین یک حامل طبیعی و ایمن برای مولکول‌های زیست فعال کامپفرول و جنیستین می‌باشد. تمامی پارامترهای ضروری اتصال نظیر ضرایب اتصال و پارامترهای ترمودینامیکی از طریق طیف‌سنجی فلئورسانس به‌دست آمد. بر اساس نتایج به‌دست آمده پیوندهای هیدروژنی مهم‌ترین عامل در پایداری ساختار نهایی کمپلکس پروتئین-لیگاند بود. به‌علاوه، اطلاعات داکینگ مولکولی نشان داد که مولکول‌های کامپفرول و جنیستین در مجاورت اسید آمینه تریپتوفان-۶۰ قرار گرفته و به ترتیب توسط ۳ و ۵ پیوند هیدروژنی به آن متصل می‌شوند. نتایج این مطالعه نشان داد که پروتئین آلفا-لاکتالبومین تمایل اتصال به ترکیبات پلی فنولی را دارد [۸]. در مطالعه‌ای دیگر بی و همکاران (۲۰۱۶) برهمکنش اتصال تتراسایکلین هیدروکلراید را با پروتئین‌های آلفا-لاکتالبومین و بتا-کازئین توسط روش‌های طیف‌سنجی و روش‌های مدل‌سازی مولکولی بررسی کردند. مطالعات طیف‌سنجی فلئورسانس نشان دادند که واکنش فرونشانی پروتئین‌ها از نوع استاتیک می‌باشد. همچنین، پارامترهای ترمودینامیکی نشان دادند که نیروهای الکترواستاتیک جزء نیروهای اصلی در برهمکنش تتراسایکلین هیدروکلراید با پروتئین بتا-کازئین می‌باشند؛ درحالی‌که پیوندهای هیدروژنی و نیروهای واندروالسی عوامل اصلی در برهمکنش با پروتئین آلفا-لاکتالبومین بودند [۹]. مطالعات طیف‌سنجی رنگ‌تابی دورانی روی ساختار ثانویه پروتئین‌های گاوی نشان داد که برهمکنش با تتراسایکلین هیدروکلراید سبب کاهش ساختار ثانویه ماریچ‌های α شد [۹]. چنگ و همکاران (۲۰۱۸) برهمکنش سیس و ترانس رسوراترول را با پروتئین آلفا-لاکتالبومین بررسی کردند. نتایج بررسی آن‌ها نشان داد که سیس رسوراترول تمایل جذب بیشتری

جایگاه‌های اتصال نیز با استفاده از معادله زیر محاسبه شد که در آن n تعداد جایگاه‌های اتصال و K_b ثابت اتصال می‌باشد (معادله-۳).

معادله (۳)

$$\log \frac{(F_0 - F)}{F} = \log K_b + n \log [OLE]$$

۲-۲- طیف‌سنجی فرابنفش

مطالعه طیف‌سنجی فرابنفش توسط دستگاه طیف‌سنج (Jasco V-550) دو پرتویی انجام شد. غلظت پروتئین آلفا-لاکتالبومین در حد ۱۰ میکرومولار ثابت نگه داشته شد و نسبت پروتئین به اولئوروپتین تا ۱:۱۰ تغییر داده شد. بعد از اصلاح پایه، مقادیر جذب کمپلکس و پروتئین در طول موج ۲۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد [۱۳].

ثابت اتصال لیگاند از طریق معادله بنسی-هیلبرانت^{۱۰} محاسبه شد (معادله-۴).

معادله (۴)

$$\frac{A_0}{A - A_0} = \frac{\epsilon_G}{\epsilon_{H-G} - \epsilon_G} + \frac{\epsilon_G}{\epsilon_{H-G} - \epsilon_G} \frac{1}{K[Ole]}$$

در معادله بالا A_0 و A مقدار جذب آلفا-لاکتالبومین آزاد و کمپلکس آلفا-لاکتالبومین-اولئوروپتین می‌باشد. ϵ_{H-G} و ϵ_G به ترتیب ضرایب مولی خاموشی لیگاند و پروتئین-لیگاند می‌باشند.

با رسم کردن $\frac{A_0}{A - A_0}$ در برابر $\frac{1}{[Ole]}$ ، ضریب اتصال

لیگاند^{۱۱} (K) از نسبت عرض از مبدأ^{۱۲} به شیب خط^{۱۳} حاصل به دست می‌آید [۱۴]. ضرایب میرایی مولی^{۱۴} آلفا-لاکتالبومین و محلول اولئوروپتین به ترتیب برابر $2081 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ و $26620 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ می‌باشد [۱۳، ۱۵].

۳۴۵ نانومتر تنظیم شد. تأثیر درونی فیلتر در طیف‌سنجی فلئورسانس با استفاده از معادله زیر اصلاح شد (معادله-۱).

معادله (۱)

$$F_{corrected} = F_{observed} \times 10^{((A_{excitation} + A_{emission})/2)}$$

در این معادله $F_{corrected}$ و $F_{observed}$ به ترتیب مربوط به مقادیر اصلاح شده و اولیه فلئورسانس می‌باشد. همین‌طور $A_{excitation}$ و $A_{emission}$ مربوط به جذب اولئوروپتین در طول موج‌های تهییج و نشر می‌باشد. آزمون در سه نوبت تکرار و بر اساس روش دلاوری و همکاران (۲۰۱۵) انجام شد. شکاف نشر و تهییج بر روی ۵ نانومتر تنظیم شد. به طور کلی، مقدار ۱۰ میکرومولار از آلفا-لاکتالبومین در بافر ۲۰ میلی‌مولار حاوی ۳۰۵ میلی‌مولار EDTA جهت حذف کردن کلسیم و حصول ساختار آ‌پو آلفا-لاکتالبومین حل شد [۱۱]. در ادامه نسبت‌های مختلف (۱:۱، ۱:۲، ۱:۳، ۱:۴، ۱:۵، ۱:۶، ۱:۸، ۱:۱۰) از محلول اولئوروپتین با پروتئین آلفا-لاکتالبومین تیترا^۷ و به مدت ۱۰ ثانیه جهت به دست آمدن کمپلکس مربوطه و بررسی نشر فلئورسانس همزده شد [۱۰] و طیف فلئورسانس در سه دمای (۲۵، ۵۰ و ۷۲ درجه سانتی‌گراد) بررسی شد.

آزمایش‌ها در خصوص فرونشاندن^۸ شدت فلئورسانس داخلی آلفا-لاکتالبومین در حضور مولکول اولئوروپتین جهت پی بردن به تغییرات در ساختار تریپتوفان و تغییرات در کنفورماسیون پروتئین انجام شد. در این مرحله ثابت فرونشاندن از نمودار اشترن-ولمر^۹ طبق معادله زیر محاسبه شد (معادله-۲).

$$F_0 / F = 1 + K_{SV}[Q] \quad \text{معادله (۲)}$$

در این معادله F_0 شدت فلئورسانس پروتئین در غیاب اولئوروپتین و F شدت فلئورسانس در حضور اولئوروپتین می‌باشد. هم‌چنین، K_{SV} ثابت فرونشاندن اشترن-ولمر و $[Q]$ غلظت اولئوروپتین می‌باشد [۱۲]. ثابت اتصال و تعداد

10. Benesi-Hildebrand
11. Association constant
12. Intercept
13. Slope
14. Molar extinction coefficient

7. Titration
8. Quenching
9. Stern-Volmer

۲-۳- رنگ تابی دورانی

طیف رنگ تابی دورانی آلفا-لاکتالبومین بر روی دستگاه طیف-سنج (Jasco J-810) ثبت شد. تغییرات در ساختار ثانویه پروتئین آلفا-لاکتالبومین و کمپلکس آن با لیگاند اولئوروپتین در ناحیه فرابنفش دور (۱۹۰-۲۶۰ نانومتر) با استفاده از کووت با طول مسیر یک میلی متر ثبت شد و توسط نرم افزار CDNN بررسی شد. غلظت پروتئین ۱۰ میکرومولار و اندازه گیری در دماهای ۲۵، ۵۰ و ۷۲ درجه سانتی گراد در ۳ نسبت مولی پروتئین: اولئوروپتین (۱→۱، ۱→۵ و ۱→۱۰) انجام شد. نتایج بر حسب مقادیر بیضوی واری مولی $[\theta]$ با واحد $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ بر اساس میانگین وزنی اسیدهای آمینه ۱۱۵/۳ گزارش شد. مقادیر بیضوی واری مولی توسط معادله (۵) محاسبه شد.

$$[\theta] = 100 \times 115.3 \times \theta / cl \quad (5)$$

که در این معادله C غلظت نمونه بر حسب mg/ml طول مسیر کووت بر حسب سانتی متر و θ پارامتر بیضوی واری می باشد.

۲-۴- داکینگ مولکولی

نرم افزار اتوداک ۱،۵،۶ جهت عملیات داکینگ استفاده شد. ساختار PDB^{16} اولئوروپتین و آلفا-لاکتالبومین (1F6S) در این نرم افزار استفاده شد و pubchem ID اولئوروپتین با استفاده از نرم افزار OpenBabel 2.4.1 به فرمت PDB تبدیل شد. ژنتیک الگوریتم لامارکین^{۱۷} با ۱۰۰ ران جهت تعیین بهترین و پایدارترین جایگاه اتصال استفاده شد.

در نهایت، نرم افزارهای Python molecule viewer و Ligplot+ v1.0 به ترتیب برای تهیه شکل های سه بعدی و دو بعدی مورد استفاده قرار گرفت [۱۶].

۳- تجزیه و تحلیل آماری

جهت تجزیه و تحلیل آماری داده های حاصل از آنالیز واریانس دو طرفه (ANOVA) برای بررسی تفاوت میانگین ها و جهت

15. Molar ellipticity
16. Protein databank
17. Lamarckian genetic algorithm

انجام آنالیزهای آماری از نرم افزار SPSS 24 استفاده شد. طرح آماری به کار رفته در این پژوهش، طرح آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک های کاملاً تصادفی با ۳ تکرار بود و جهت رسم نمودارها از نرم افزار OriginPro 2018 استفاده شد [۱۷].

۴- نتایج و بحث

۴-۱- طیف سنجی فلوروسانس

آلفا-لاکتالبومین به دلیل وجود ۴ آمینو اسید تریپتوفان (Trp 118، Trp 104، Trp 60 و Trp 26) در ساختار خود پروتئینی فلوروسنت است که در نهایت منجر به حداکثر شدت نشر در طول موج ۳۳۰ نانومتر می شود [۸]. شکل (۱) حداکثر شدت فلوروسنت را در طول موج ۳۷۵ نانومتر نشان می دهد.

فرو نشانندن فعالیت فلوروسنت گروه ایندول تریپتوفان می تواند توسط پپتید و یا گروه های آمین مجاور آن صورت گیرد. به علاوه، جهت گیری خاص نیتروژن حلقه ایندول و ابر الکترونی π از حلقه فیل که در آن پیوند هیدروژنی از نوع $\text{NH} \dots \pi$ وجود دارد، نیز می تواند سبب فرو نشانندن فعالیت فلوروسنت تریپتوفان شود [۱۸، ۱۹]. این اطلاعات واکنش مستقیم گروه NH -آمینو اسید تریپتوفان در آلفا-لاکتالبومین با ابر الکترونی مولکول اولئوروپتین را نشان می دهد. شکل (۱) نمودار فلوروسنت کمپلکس در دماهای ۲۵، ۵۰ و ۷۲ درجه سانتی گراد به همراه نمودار اشتراک-ولمر و اشتراک ولمر اصلاح شده را نشان می دهد. با توجه به شکل ۱a، مقدار K_{sv} برابر 0.092 L.mol^{-1} و در نتیجه مقدار k_q برابر با $53 \times 10^3 \text{ L.s}^{-1} \text{mol}^{-1}$ می باشد که نشان می دهد واکنش از نوع دینامیک است ($k_q < 10^{11} \times 2$) به علاوه، تعداد جایگاه های اتصال (n) و ثابت اتصال (k_b) به ترتیب برابر 0.3165 و $1.0 \times 10^6 \text{ L.mol}^{-1}$ است. به همین ترتیب در دماهای بالاتر (۵۰ و ۷۲ درجه سانتی گراد) به ترتیب طبق شکل های 1b و 1c مقادیر k_q برابر با $1.0 \times 10^6 \text{ L.mol}^{-1}$ و $1.735 \times 10^7 \text{ L.mol}^{-1}$ است. در ضمن، مقادیر جایگاه های اتصال و ثابت اتصال در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد برابر با 0.35295 ± 0.0295 و $1.0 \times 10^6 \text{ L.mol}^{-1}$ است؛ همچنین در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد برابر با 0.5586 ± 0.050471 و $1.0 \times 10^6 \text{ L.mol}^{-1}$ است.

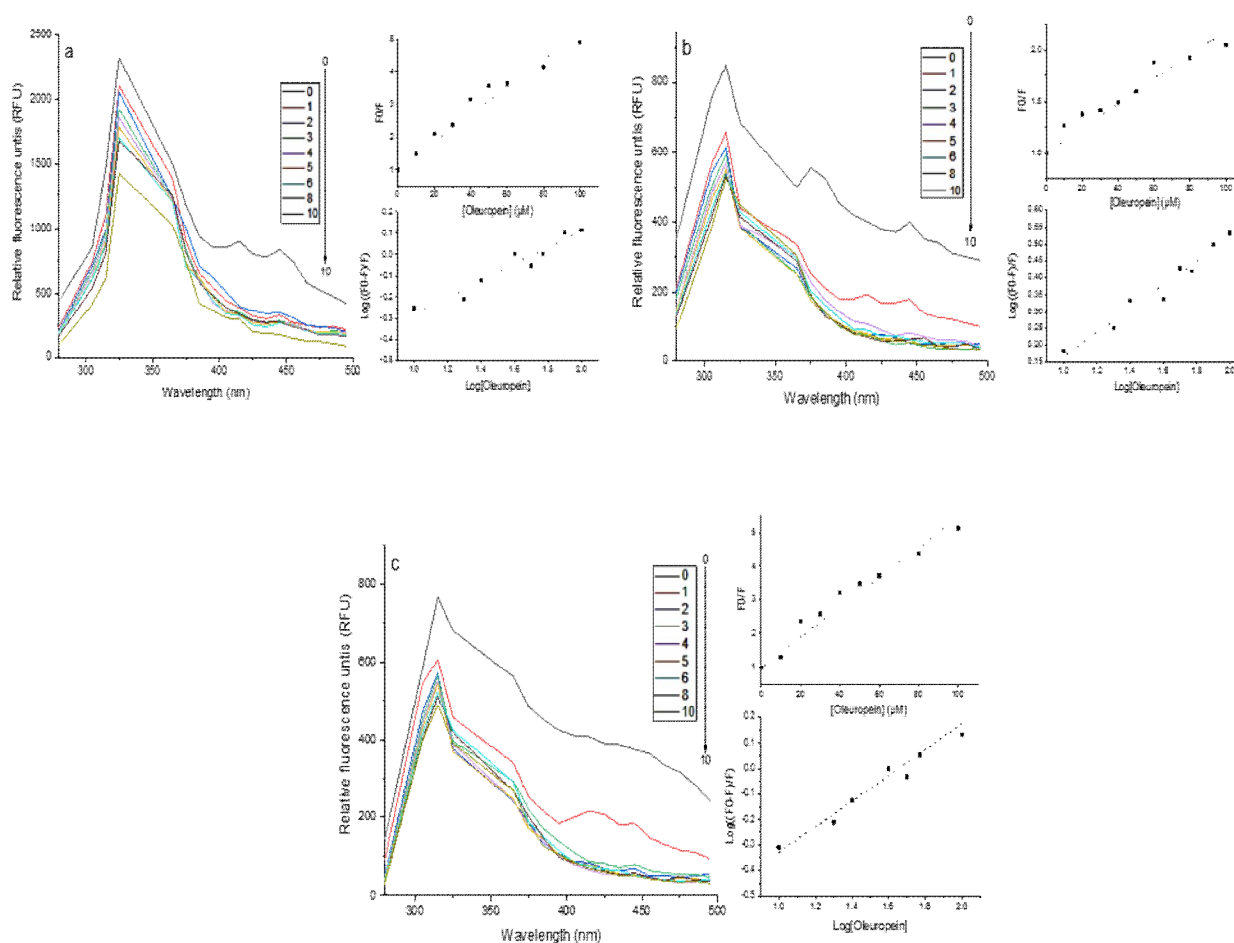


Fig 1 Intrinsic fluorescence intensity of α -La in the presence of oleuropein in Trisbuffer, pH 7 at 25 °C (a), 50 °C (b) and 72 °C (c). Oleuropein concentration was 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 and 100 μ M, respectively. The excitation wavelength was 280 nm. The Stern–Volmer plot and Modified Stern-Volmer plot for quenching fluorescence intensity of α -lactalbumin-oleuropein complex at 25 °C (a), 50 °C (b) and 72 °C (c). The excitation and emission wavelengths were 280 nm and 338 nm, respectively.

۴-۲-طیف‌سنجی فرابنفش

شود. بدین ترتیب، شکل (۲) طیف جذبی فرابنفش دو پیک را در خصوص پروتئین آلفا-لاکتالبومین نشان می‌دهد.

تشکیل کمپلکس پروتئین-لیگاند و تغییر در کنفورماسیون پروتئین می‌تواند از طریق تغییرات در طیف جذب فرابنفش نیز بررسی

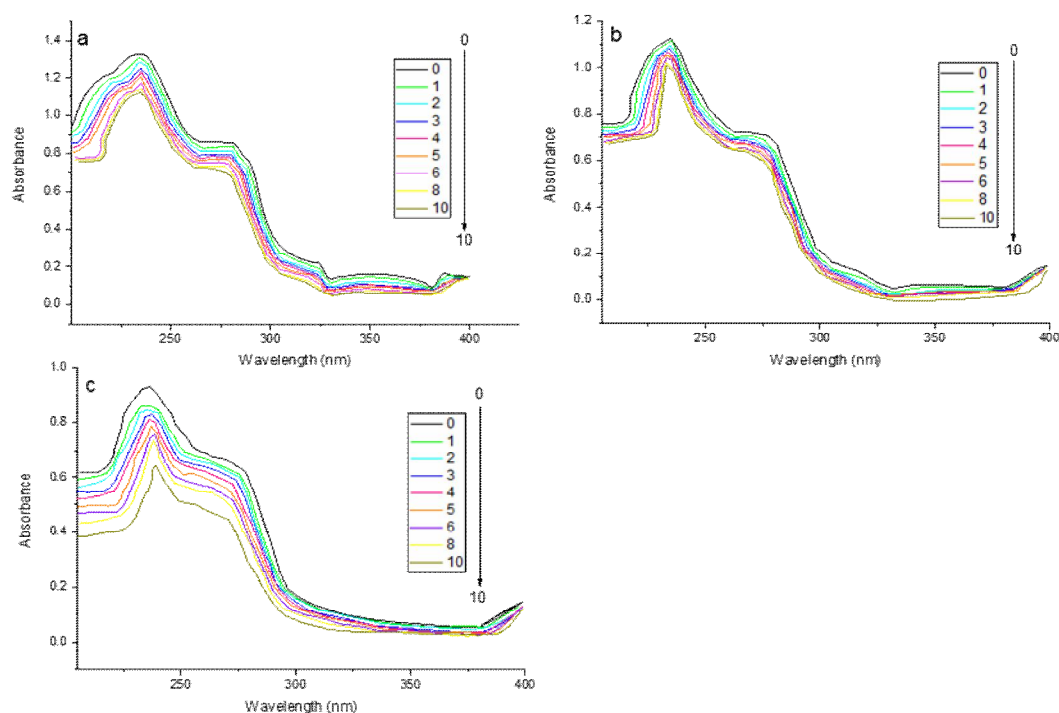


Fig 2 Absorption spectra of α -lactalbumin-oleuropein complex at different concentrations of oleuropein at 25 °C (a), 50 °C (b) and 72 °C (c).

مولکولی توجیه می‌شود. اتصال مولکول اولئوروپتین منجر به تغییرات کنفورماسیونی در ساختار پپتید می‌شود و سبب بسط کنفورماسیون در خصوص تبدیل ساختارهای مارپیچ-کوئل می‌شود [۲۱, ۲۲] که این پدیده می‌تواند به کاهش و انتقال قرمز باند جذب Trp B_b نسبت داده شود [۲۳]. ناحیه جذب مربوط به Trp B_b به علت تبدیل پیوند $\pi \rightarrow \pi^*$ بسیار قوی‌تر است. علاوه بر این، پدیده انتقال قرمز نیز کاهش مقدار قطبیت در سامانه حاوی اسیدهای آمینه تریپتوفان را نشان می‌دهد که به علت مترکم شدن ساختار و ایجاد دافعه توسط مولکول‌های آب مجاور ساختار می‌باشد [۲۴]. در نتیجه با توجه به ساختار اولئوروپتین، گروه‌های هیدروکسیل و حلقه آریل، پیوندهای هیدروژنی و واکنش‌های الکترواستاتیکی π - π برهمکنش‌های اصلی در ایجاد کمپلکس آلفا-لاکتالبومین-اولئوروپتین می‌باشند. نتایج به‌دست آمده تأییدی بر واکنش مستقیم مولکول اولئوروپتین با آلفا-لاکتالبومین می‌باشد. با این حال این امکان وجود دارد که

همان‌طور که در شکل (۲) مشاهده می‌شود، طیف اول شدت بالاتری دارد (ناحیه فرابنفش دور ۲۳۵ نانومتر) و طیف دوم شدت کمتری را نشان می‌دهد (ناحیه فرابنفش نزدیک ۲۸۰ نانومتر). با افزایش غلظت مولی اولئوروپتین نسبت به آلفا-لاکتالبومین کاهش در میزان شدت پیک در ناحیه فرابنفش دور همراه با پدیده انتقال قرمز^{۱۸} در ناحیه فرابنفش نزدیک مشاهده می‌شود. طیف‌های مربوط به جذب در ناحیه فرابنفش دور مربوط به گروه‌های پپتیدی است که سهم اسیدهای آمینه آروماتیک در آن قابل‌توجه نمی‌باشد؛ درحالی‌که جذب در ناحیه فرابنفش نزدیک مربوط به اسیدهای آمینه آروماتیک و پیوندهای دی‌سولفیدی موجود در اسیدهای آمینه جفت شده سیستمین می‌باشد [۲۰]. تغییرات طیفی مشاهده شده در ناحیه فرابنفش دور در اثر اتصال اولئوروپتین به آلفا-لاکتالبومین توسط دو مکانیسم

18. Red shift

است. تغییر کنفورماسیون پروتئین و افزایش سطح هیدروفوب در سطح پروتئین سبب ایجاد جایگاه‌های اتصال بیشتر می‌شود. به-علاوه، پیوندهای هیدروژنی به علت وجود گروه‌های هیدروکسیل در مولکول اولئوروپئین افزایش می‌یابند که عامل افزایش در مقادیر ثابت اتصال می‌باشد [۲۷، ۲۸]. نسبت مولی که در آن اشباع پروتئین توسط مولکول‌های اولئوروپئین مشاهده شد، در حد ۱:۵ (آلفا-لاکتالبومین به اولئوروپئین) بود. در مطالعه‌ای مشابه تشکیل کمپلکس کورکومین با پروتئین β -کوگلیسینین سویا بررسی شد. افزایش مقدار کورکومین سبب افزایش ثابت اتصال شد به طوری که نسبت مولی ۱:۱۵ (کورکومین به پروتئین) به‌عنوان نقطه اشباع در نظر گرفته شد. هم‌چنین، در حضور پروتئین سویا اندازه کمپلکس تا حد ۲۴ نانومتر کاهش یافت، در صورتی‌که بدون حضور پروتئین، کورکومین متراکم می‌شود و اندازه آن به حد میکرون افزایش می‌یابد که نامطلوب است [۲۹].

اولئوروپئین با ناحیه دیگری از اسید آمینه تریپتوفان اتصال برقرار کند و سبب برهمکنش زنجیره جانبی تریپتوفان با سایر بخش‌های پروتئین شود. ژانگ و ژونگ برهمکنش بین بیکسین-کاروتنوئید و پروتئین آب‌پنیر را بررسی کردند و دریافتند که اضافه شدن بیکسین سبب ایجاد انتقال آبی ۷ نانومتری در طیف جذبی آلفا-لاکتالبومین شد [۲۵]. علت این امر جای‌گیری تعدادی از اسیدهای آمینه تریپتوفان در ساختار کروی پروتئین گزارش شد. باربارا و همکاران نیز گزارش کردند که در دماهای بالاتر از ۸۰ درجه سانتی‌گراد پدیده انتقال آبی و به همراه آن کاهش در دسترس‌پذیری لیگاند (عامل فروشاننده) صورت گرفت [۲۶]. طبق معادله بنسی-هیلدبرانت و ثابت‌های اتصال محاسبه شده (جدول ۱) با افزایش دما تا ۷۲ درجه سانتی‌گراد مقادیر ثابت اتصال افزایش می‌یابد که مطابق با نتایج طیف‌سنجی فلوروسنت

Table 1 Native α -lactalbumin and α -lactalbumin-oleuropein complex binding constants as obtained from UV-Vis spectroscopy at different temperatures.

Compound	T= 25°C	T= 50°C	T= 72°C
[ALA]/[OLE] \rightarrow 1:1	$14.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$	$3.35 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$	$3.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$
[ALA]/[OLE] \rightarrow 1:2	$1.30 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$	$2.14 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$	$3.34 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$
[ALA]/[OLE] \rightarrow 1:3	$1.31 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$	$1.91 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$	$3.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$
[ALA]/[OLE] \rightarrow 1:4	$1.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$	$1.07 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$	$2.31 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$
[ALA]/[OLE] \rightarrow 1:5	$1.52 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$	$2.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$	$3.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$
[ALA]/[OLE] \rightarrow 1:6	$1.35 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$	$1.15 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$	$2.9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$
[ALA]/[OLE] \rightarrow 1:8	$1.31 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$	$1.12 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$	$2.83 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$
[ALA]/[OLE] \rightarrow 1:10	$1.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$	$1.35 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$	$2.96 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$

درجه سانتی‌گراد دنا تورا سیون پروتئین در اثر تخریب پیوندهای هیدروژنی و کاهش ساختار ثانویه پروتئین رخ می‌دهد و این دنا تورا سیون برگشت‌ناپذیر است [۳۰]. به‌علاوه، این بازآرایی ساختاری پروتئین در پژوهش‌های قبلی در مورد پروتئین سویا [۳۱]، برنج [۳۲] و آلفا-لاکتالبومین [۳۳] گزارش شده است. تغییرات ساختاری آلفا-لاکتالبومین وابسته به شرایط دمایی و حلال می‌باشد. در ساختار آپوآلفا-لاکتالبومین که اتم کلسیم موجود نمی‌باشد، در اثر تغییرات دما ساختار پروتئین بیشتر دستخوش تغییر می‌شود که باز هم به نوع حلال بستگی دارد.

۴-۳- طیف‌سنجی رنگ‌تابی دورانی

رنگ‌تابی دورانی جهت بررسی ساختار ثانویه آلفا-لاکتالبومین در اثر تغییرات دما و غلظت‌های مختلف اولئوروپئین مورد بررسی قرار گرفت. با افزایش دما مقدار بیضوی‌واری مولی کاهش پیدا کرد و ساختار کمپلکس منظم‌تر شد (شکل‌های 3a,b,c). به نظر می‌رسد که در دماهای ۵۰ و ۷۲ درجه سانتی‌گراد پروتئین دچار افزایش آنتروپی ساختاری می‌شود که به زنجیره‌های پلی‌پپتید امکان بازآرایی ساختاری را می‌دهد. نتایج حاصل مشابه با پژوهش لام و نیکرسون (۲۰۱۵) می‌باشد. در دماهای بالاتر از ۹۵

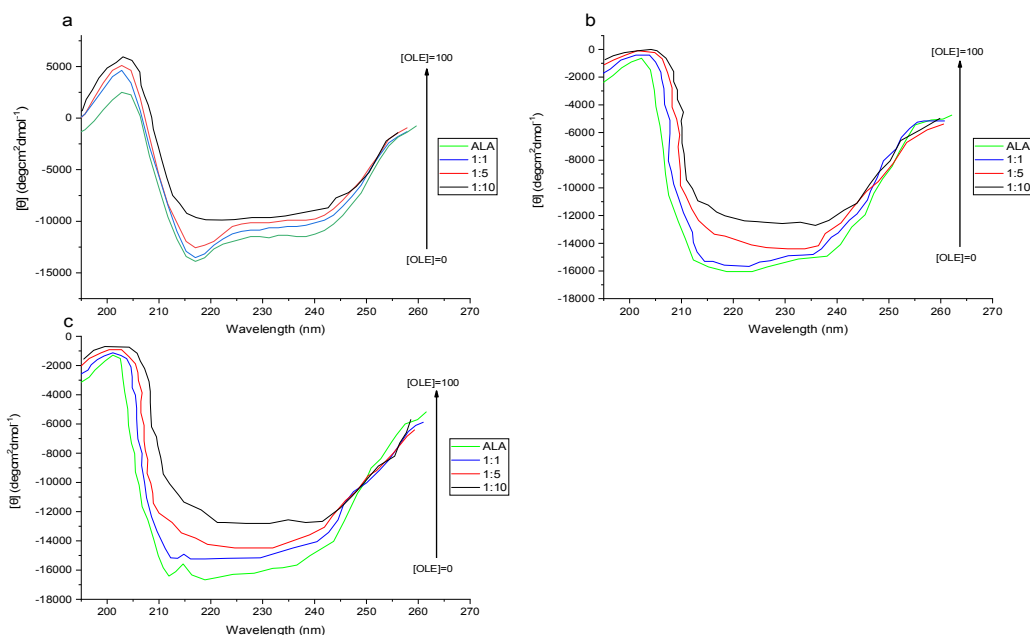


Fig 3 Far-UVCD spectra of α -La-oleuropein complex with the molar ratios of 0, 1, 5 and 10 at pH 7 and 25 °C (a), 50 °C (b) and 72 °C (c).

با افزایش دما ساختارهای مارپیچ تصادفی^{۲۱} نیز افزایش می‌یابند که در نتیجه آن سطح هیدروفوب پروتئین افزایش یافته و در دسترس مولکول لیگاند قرار می‌گیرد. نتایج حاصل مشابه با مطالعه کامیجیما و همکاران (۲۰۰۸) است. این پژوهشگران واکنش اسید اولئیک و آلفا-لاکتالبومین را در دمای اتاق، ۵۰ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد بررسی کردند. آن‌ها گزارش کردند که اسید اولئیک در دمای اتاق به سختی به ساختار هولو-آلفا-لاکتالبومین^{۲۲} متصل می‌شود که علت آن وجود اتم کلسیم و پایداری ساختاری پروتئین است. نمونه‌های حرارت دیده تغییرات ساختاری را در خود نشان دادند و پروتئین آلفا-لاکتالبومین نیز حالت گذار^{۲۳} را نشان داد که در نتیجه آن اسید اولئیک با وجود اتم کلسیم در ساختار پروتئین به آن متصل می‌شود. تیمار حرارتی سبب بازآرایی ساختاری و در دسترس قرار گرفتن اسیدهای آمینه آب‌گریز در معرض اسید اولئیک می‌شود که علی‌رغم وجود اتم‌های کلسیم سبب برهمکنش پروتئین-لیگاند می‌گردد [۳۵].

در اثر افزایش دما یک ساختار مسنجم به علت افزایش قابل توجه پیوندهای هیدروژنی به وجود می‌آید که افزایش خاصیت آب‌گریزی سطحی^{۱۹} را نیز از خود نشان می‌دهد. هنگامی که کاهش دما در حد دمای اتاق صورت پذیرد، آلفا-لاکتالبومین با تاخوردگی مجدد به ساختاری تبدیل می‌شود که گاهی با ساختار اولیه^{۲۰} خود متفاوت می‌باشد [۳۴]. طبق شکل‌های 3a و 3b در دماهای بالاتر از ۲۵ درجه سانتی‌گراد ساختار ثانویه پروتئین آلفا-لاکتالبومین و کمپلکس آن تغییر می‌کند. در طول موج ۲۱۵ نانومتر یک پیک مشاهده می‌شود که نشان‌دهنده ساختار ثانویه مارپیچ پروتئین می‌باشد. همان‌طور که مشاهده می‌شود افزایش درجه حرارت سبب کاهش مقدار بیضوی‌واری مولی می‌گردد که نشان‌دهنده کاهش ساختار ثانویه مارپیچ α می‌باشد. از سوی دیگر واکنش اولئوروپین با آلفا-لاکتالبومین سبب افزایش مقدار بیضوی‌واری مولی می‌شود که نشان‌دهنده تغییر ساختار ثانویه است. طبق جدول (۲) ساختار مارپیچ α در اثر برهم‌کنش لیگاند و پروتئین کاهش و ساختار صفحات β افزایش می‌یابد، هم‌چنین

21. Random coil
22. Holo- alpha-lactalbumin
23. Transition state

19. Surface hydrophobicity
20. Native

Table 2 The secondary structure composition of α -lactalbumin before and after interaction with different ratios of oleuropein at different temperatures and pH of 7.0. Ala represents α -lactalbumin and OLE indicates oleuropein.

complex	α -helix	β -sheet Antiparallel	β -sheet Parallel	β -turn	Random coil
ALA (25°C)	42.6%	10.2%	12.1%	14.3%	20.8%
[ALA]/[OLE]→1:1 (25°C)	38.2%	14.6%	10.2%	15.5%	21.5%
[ALA]/[OLE]→1:5 (25°C)	34.6%	16.2%	11.3%	16%	21.9%
[ALA]/[OLE]→1:10 (25°C)	29.4%	18.8%	9.3%	18.2%	24.3%
ALA (50°C)	41.5%	10.8%	8.8%	14.1%	24.8%
[ALA]/[OLE]→1:1 (50°C)	37.5%	14.8%	10.5%	15.1%	22.1%
[ALA]/[OLE]→1:5 (50°C)	33.7%	16.9%	11.8%	15.2%	22.4%
[ALA]/[OLE]→1:10 (50°C)	28.6%	19.1%	9.7%	17.8%	24.8%
ALA (72°C)	41.1%	11%	9.1%	13.8%	25%
[ALA]/[OLE]→1:1 (72°C)	36.1%	15.1%	10.7%	13.2%	24.9%
[ALA]/[OLE]→1:5 (72°C)	33.2%	15%	10.8%	14.9%	26.1%
[ALA]/[OLE]→1:10 (72°C)	27.4%	20.2%	10.1%	17.1%	25.2%

هیدروژنی بین گروه‌های هیدروکسیل اولئوروپئین نقش دارند. همچنین احتمال تشکیل پیوند O-H... π بین گروه‌های هیدروکسیل اولئوروپئین و حلقه‌های آروماتیک Tyr103 و Thr33 در آلفا-لاکتالبومین وجود دارد. کاهش در شدت فعالیت فلئورسنت پروتئین آلفا-لاکتالبومین توسط شکل‌گیری پیوندهای هیدروفوبیک با اسیدهای آمینه Tyr103, Trp104 و Phe53 توجیه می‌شود (شکل ۱). آلفا-لاکتالبومین دارای دو محفظه هیدروفوب است. ناحیه اول شامل اسیدهای آمینه Phe31, His32, Gln117, Trp118 از مارپیچ ۲ و ۳۱ می‌باشد که به ترتیب تحت عنوان‌های گروه آروماتیک اول و گروه آروماتیک دوم (جعبه هیدروفوب) شامل ۳ آمینو اسید تربیتوفان است [۲۸]. مولکول اولئوروپئین در گروه آروماتیک II قرار می‌گیرد و نوع واکنش هیدروژنی و برهمکنش الکترواستاتیک واندرالس می‌باشد. نتایج حاصل با روند پژوهش آل هانیش و همکاران (۲۰۱۶) در شبیه‌سازی داکینگ مولکولی اپی گالو کاتچین گالات^{۲۶} با آلفا-لاکتالبومین مطابقت دارد [۷].

۴-۴- داکینگ مولکولی کمپلکس آلفا-

لاکتالبومین-اولئوروپئین

داکینگ مولکولی یکی از روش‌های متداول جهت بررسی نحوه واکنش بین پروتئین و لیگاند می‌باشد؛ بنابراین، از این روش جهت بررسی نحوه اتصال مولکول اولئوروپئین به پروتئین آلفا-لاکتالبومین استفاده شد. با توجه به نتایج حاصل از محاسبات داکینگ، واکنش غالب در نوع اتصال، هیدروفوب^{۲۴} بود و همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، علاوه بر پیوندهای هیدروژنی، شیار بین مارپیچ α و صفحه β با مولکول اولئوروپئین واکنش می‌دهد. این واکنش عبارت است از Ser47, Glu49, Gln54, Ile55, Phe53, Tyr103, Trp104, Thr33, Leu105, His32 and Ala106 که با توجه به کنفورماسیون^{۲۵} و بهترین انرژی پیوندی پیش‌بینی شده (-6.3 kcal/mol) می‌باشد و ناحیه آن نیز بین شیار مارپیچ α و صفحه β است که با نتایج طیف‌سنجی فلئورسنت مطابقت دارد. گروه‌های امید Asn44 و Asn56 در تشکیل پیوندهای

26. Epigallocatechin gallate

24. Hydrophobic
25. Conformation

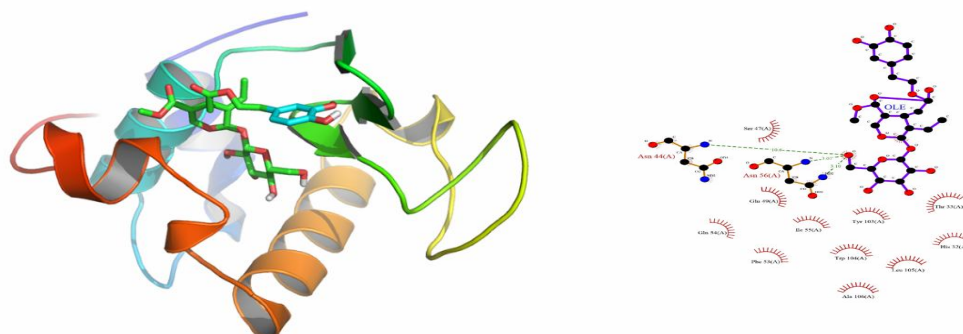


Fig 4 a) The molecular docking analysis represents close-up view of the high-affinity site for the binding of OLE molecule to ALA (PDB ID 1f6s, chain A): Here, β -sheet structures are illustrated in blue, helix in orange and light blue and loops in yellow and dark blue. **b)** LigPlot+ diagram of the interaction between ALA and OLE. Hydrophobic interactions are dominant in the binding process. The hydrogen bonds are indicated by dashed green line between Asp44, Asp56 (polar residues) and OLE.

۵- نتیجه گیری

در حال حاضر تولید محصولات غذایی عملگرا یکی از اهداف مهم در صنایع غذایی می‌باشد. آلفا-لاکتالبومین دومین پروتئین فراوان در آب‌پنیر است و از لحاظ تغذیه ای بعلت وجود آمینواسیدهای ضروری قابل توجه می‌باشد. اولئوروپین فراوان-ترین نوع از ترکیبات فنولی برگ زیتون است و اثرات درمانی آن به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی به خوبی شناخته شده است. بررسی برهم‌کنش مواد زیست فعال با بیوپلیمرهای مختلف اطلاعات مفیدی را در اختیار ما در خصوص واکنش‌ها و پیوندهای شکل گرفته بین آن‌ها در اختیار ما قرار می‌دهد. در پژوهش حاضر روش‌های طیف سنجی در دماهای مختلف (۲۵، ۵۰ و ۷۲ درجه سانتی‌گراد) و pH ۷ داکینگ مولکولی جهت بررسی برهم‌کنش بین پروتئین آلفا-لاکتالبومین و اولئوروپین بکار گرفته شدند. بطور کلی؛ افزایش دما سبب تغییر کنفورماسیون و بازآرایی ساختار پروتئین شد و ساختار صفحه‌ای بتا و ماریچ آلفا را در اثر افزایش دما تا ۷۲ درجه سانتی‌گراد نشان داد. در نهایت، شبیه‌سازی داکینگ مولکولی نشان داد ناحیه اتصال بهینه بین شیار ماریچ آلفا و صفحه بتا قرار دارد که می‌تواند بعنوان جایگاه بهینه در شبیه‌سازی دینامیک مولکولی مورد استفاده قرار گیرد. اطلاعات حاضر در صنایع شیر و داروسازی جهت تولید محصولات کاربرد خواهد داشت.

مطالعات دیگر نیز با بررسی اتصال سایر پلی فنول‌ها مانند کورکومین^{۲۷}، رسوراترول^{۲۸}، کامپفرول^{۲۹} و جنیستین^{۳۰} به آلفا-لاکتالبومین نشان دادند که جایگاه اتصال مشخصی در خصوص اتصال پلی فنول‌های مختلف در آلفا-لاکتالبومین وجود ندارد [۸، ۳۶]. با توجه به نتایج گزارش شده، رسوراترول پایدارترین کمپلکس را با اتصال به اسیدهای آمینه Trp60 و Trp104 تشکیل می‌دهد. هم‌چنین، کورکومین به اسید آمینه Trp118 در آلفا-لاکتالبومین متصل می‌شود. در خصوص مولکول‌های جنیستین و کامپفرول، به ترتیب ۳ پیوند هیدروژنی (دو مورد با Thr48 و یک مورد با Asn66) و ۵ پیوند هیدروژنی (دو مورد با Thr48 و ۱ عدد با Asn66 و Ser69) منجر به تشکیل کمپلکس‌های پایدار می‌شوند. در انتها، حجم ترکیب مورد نظر نیز در فرایند اتصال بسیار حائز اهمیت است. اولئوروپین یک مولکول نسبتاً حجیم بوده و در مقایسه با مولکول‌های کوچک دیگر نمی‌تواند به‌طور کامل درون شیار پروتئین آلفا-لاکتالبومین قرار گیرد [۷].

- 27. Curcumin
- 28. Resveratrol
- 29. Kaempferol
- 30. Genistein

۶- منابع

- resveratrol with bovine serum albumin, β -lactoglobulin or α -lactalbumin, *Food hydrocolloids*, 81 (2018) 242-252.
- [11] B. Delavari, A.A. Saboury, M.S. Atri, A. Ghasemi, B. Bigdeli, A. Khammari, P. Maghami, A.A. Moosavi-Movahedi, T. Haertlé, B. Goliaei, Alpha-lactalbumin: A new carrier for vitamin D3 food enrichment, *Food Hydrocolloids*, 45 (2015) 124-131.
- [12] J.R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, Springer Science & Business Media 2013.
- [13] M. Dasgupta, N. Kishore, Characterization and analysis of binding of Thioflavin T with partially folded and native states of α -lactalbumin protein by calorimetric and spectroscopic techniques, *International journal of biological macromolecules*, 95 (2017) 376-384.
- [14] A. Shah, E. Nosheen, S. Munir, A. Badshah, R. Qureshi, N. Muhammad, H. Hussain, Characterization and DNA binding studies of unexplored imidazolidines by electronic absorption spectroscopy and cyclic voltammetry, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 120 (2013) 90-97.
- [15] M. Mohamadi, D. Afzali, S. Esmaeili-Mahani, A. Mostafavi, M. Torkzadeh-Mahani, Spectroscopic and electrochemical studies of the interaction between oleuropein, the major bio-phenol in olives, and salmon sperm DNA, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 148 (2015) 260-265.
- [16] J.A. Pradeepkiran, K.K. Kumar, Y.N. Kumar, M. Bhaskar, Modeling, molecular dynamics, and docking assessment of transcription factor rho: a potential drug target in *Brucella melitensis* 16M, *Drug design, development and therapy*, 9 (2015) 1897.
- [17] S.M. Jafari, K. Mahdavee Khazaei, E. Assadpour, Production of a natural color through microwave-assisted extraction of saffron tepal's anthocyanins, *Food science & nutrition*, 7 (2019) 1438-1445.
- [18] P.D. Adams, Y. Chen, K. Ma, M.G. Zagorski, F.D. Sönnichsen, M.L. McLaughlin, M.D. Barkley, Intramolecular quenching of tryptophan fluorescence by the peptide bond in cyclic hexapeptides, *Journal of the American Chemical Society*, 124 (2002) 9278-9286.
- [19] M. Jahanshahtalab, M. Kamshad, S. Rezaei, S. Beigoli, A.S. Rad, J. Mehrzad, S.K.
- [1] R. Japón-Luján, M.L. de Castro, Superheated liquid extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves, *Journal of Chromatography A*, 1136 (2006) 185-191.
- [2] I. Katouzian, S.M. Jafari, Protein nanotubes as state-of-the-art nanocarriers: Synthesis methods, simulation and applications, *Journal of Controlled Release*, (2019).
- [3] I. Katouzian, S.M. Jafari, Nano-encapsulation as a promising approach for targeted delivery and controlled release of vitamins, *Trends in Food Science & Technology*, 53 (2016) 34-48.
- [4] L.G. Mendoza-Sánchez, M. Jiménez-Fernández, G. Melgar-Lalanne, G.F. Gutiérrez-López, A.s. Hernández-Arana, F. Reyes-Espinosa, H. Hernández-Sánchez, Chemical Lipophilization of Bovine α -Lactalbumin with Saturated Fatty Acyl Residues: Effect on Structure and Functional Properties, *Journal of agricultural and food chemistry*, 67 (2019) 3256-3265.
- [5] D.K. Layman, B. Lönnerdal, J.D. Fernstrom, Applications for α -lactalbumin in human nutrition, *Nutrition reviews*, 76 (2018) 444-460.
- [6] Y. Delgado, M. Morales-Cruz, C.M. Figueroa, J. Hernández-Román, G. Hernández, K. Griebenow, The cytotoxicity of BAMLET complexes is due to oleic acid and independent of the α -lactalbumin component, *FEBS open bio*, 5 (2015) 397-404.
- [7] A. Al-Hanish, D. Stanic-Vucinic, J. Mihailovic, I. Prodic, S. Minic, M. Stojadinovic, M. Radibratovic, M. Milcic, T.C. Velickovic, Noncovalent interactions of bovine α -lactalbumin with green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, *Food Hydrocolloids*, 61 (2016) 241-250.
- [8] F. Mohammadi, M. Moeeni, Analysis of binding interaction of genistein and kaempferol with bovine α -lactalbumin, *Journal of functional foods*, 12 (2015) 458-467.
- [9] H. Bi, L. Tang, X. Gao, J. Jia, H. Lv, Spectroscopic analysis on the binding interaction between tetracycline hydrochloride and bovine proteins β -casein, α -lactalbumin, *Journal of Luminescence*, 178 (2016) 72-83.
- [10] H. Cheng, Z. Fang, A.M. Bakry, Y. Chen, L. Liang, Complexation of trans-and cis-

- [28] L. Dumitrașcu, F.M. Ursache, N. Stănciuc, I. Aprodu, Studies on binding mechanism between carotenoids from sea buckthorn and thermally treated α -lactalbumin, *Journal of Molecular Structure*, 1125 (2016) 721-729.
- [29] S. David, Y. Zagury, Y.D. Livney, Soy β -conglycinin– curcumin nanocomplexes for enrichment of clear beverages, *Food Biophysics*, 10 (2015) 195-206.
- [30] R.S. Lam, M.T. Nickerson, The effect of pH and temperature pre-treatments on the structure, surface characteristics and emulsifying properties of alpha-lactalbumin, *Food chemistry*, 173 (2015) 163-170.
- [31] M. Miriani, M. Corredig, S. Iametti, F. Bonomi, Denaturation of soy proteins in solution and at the oil–water interface: A fluorescence study, *Food Hydrocolloids*, 25 (2011) 620-626.
- [32] S. Ellepola, C.-Y. Ma, Thermal properties of globulin from rice (*Oryza sativa*) seeds, *Food research international*, 39 (2006) 257-264.
- [33] Y.V. Griko, Denaturation versus unfolding: energetic aspects of residual structure in denatured α -lactalbumin, *Journal of protein chemistry*, 18 (1999) 361-369.
- [34] E.A. Permyakov, L.J. Berliner, α -Lactalbumin: structure and function, *FEBS letters*, 473 (2000) 269-274.
- [35] T. Kamijima, A. Ohmura, T. Sato, K. Akimoto, M. Itabashi, M. Mizuguchi, M. Kamiya, T. Kikukawa, T. Aizawa, M. Takahashi, Heat-treatment method for producing fatty acid-bound alpha-lactalbumin that induces tumor cell death, *Biochemical and biophysical research communications*, 376 (2008) 211-214.
- [36] F. Mohammadi, M. Moeeni, Study on the interactions of trans-resveratrol and curcumin with bovine α -lactalbumin by spectroscopic analysis and molecular docking, *Materials Science and Engineering: C*, 50 (2015) 358-366.
- Moghadam, P. Mokaberi, S. Gharebaghi, M.R. Saberi, New insights into alpha-lactalbumin behavior upon interaction with resveratrol and curcumin by spectroscopic and molecular modeling techniques: binary and ternary system comparison, *Journal of the Iranian Chemical Society*, (2019) 1-16.
- [20] S.M. Kelly, N.C. Price, The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function, *Current protein and peptide science*, 1 (2000) 349-384.
- [21] G. Asghari, M.S. Atri, A.A. Saboury, M. Mohadjerani, Study of the Interaction of Cinnamaldehyde with Alpha-lactalbumin: Spectroscopic and Molecular Docking Investigation, *Biomacromolecular Journal*, 3 (2017) 123-132.
- [22] M.S. Atri, A.A. Saboury, A.A. Moosavi-Movahedi, K. Kavousi, S. Ariaeenejad, Effects of zinc binding on the structure and thermal stability of camel alpha-lactalbumin, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 120 (2015) 481-488.
- [23] H. Hiramatsu, K. Takeuchi, H. Takeuchi, Involvement of histidine residues in the pH-dependent β -galactoside binding activity of human galectin-1, *Biochemistry*, 52 (2013) 2371-2380.
- [24] A. Okada, T. Miura, H. Takeuchi, Protonation of histidine and histidine–tryptophan interaction in the activation of the M2 ion channel from influenza A virus, *Biochemistry*, 40 (2001) 6053-6060.
- [25] Y. Zhang, Q. Zhong, Binding between bixin and whey protein at pH 7.4 studied by spectroscopy and isothermal titration calorimetry, *Journal of agricultural and food chemistry*, 60 (2012) 1880-1886.
- [26] C. Barbana, M. Perez, C. Pocovi, L. Sanchez, Z. Wehbi, Interaction of human α -lactalbumin with fatty acids: Determination of binding parameters, *Biochemistry (Moscow)*, 73 (2008) 711-716.
- [27] B. Delavari, F. Mamashli, B. Bigdeli, A. Poursoleiman, L. Karami, Z. Zolmajd-Haghighi, A. Ghasemi, S. Samaei-Daryan, M. Hosseini, T. Haertlé, A biophysical study on the mechanism of interactions of DOX or PTX with α -lactalbumin as a delivery carrier, *Scientific reports*, 8 (2018) 17345.

Exploration of the impact of temperature on the formation of α -lactalbumin-oleuropein complex by the application of spectroscopy methods and molecular docking

Katouzian, I. ¹, Jafari, S.M. ^{2*}, Maghsoodlou, Y. ³, Eikani, M.H. ⁴, Karami, L. ⁵

1. Phd Student of food chemistry., Department of Food design materials engineering, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran.
2. Professor at Department of ., Department of Food design materials engineering, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural ResourcesGorgan, I.R. Iran.
3. Professor at Department of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural ResourcesGorgan, I.R. Iran.
4. Professor of the Department of Chemical Technologies, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran.
5. Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

(Received: 2019/11/10 Accepted:2019/12/28)

The application of carriers is a proper means of improving the transfer and increasing the bioavailability of bioactive compounds. α -lactalbumin is the second major component of whey protein nutritionally consisted of Trp, Lys and Cys residues which can be employed as nutraceutical carriers. Oleuropein is a bioactive compound with pharmaceutical and antioxidant properties which is found abundantly in olive leaves and at lower levels in olive oil. The current study was undertaken to explore the interaction of α -lactalbumin-oleuropein complex at 25, 50 and 72 °C at pH 7 by using fluorescent, UV and circular dichroism spectroscopy techniques together with molecular docking. The results from UV and fluorescent studies demonstrate that site and binding constant are increased as the temperature increased due to the change in conformation and rearrangement of protein structure. Moreover, circular dichroism results depicted that α -helix and β -sheet structures are decreased and increased respectively as a result of temperature increase up to 72 °C. Ultimately, the molecular docking findings revealed that the best binding energy for complex formation was about -6.3 kCal/mol and the best binding site was between the α -helix and β -sheet cleft. The findings give us useful information regarding the interaction of oleuropein and α -lactalbumin which can be further used to produce functional foods.

Key words: α -lactalbumin, Oleuropein, Spectroscopy, Molecular docking, Functional products

* Corresponding Author E-Mail Address: Jafarism@hotmail.com