



بررسی اثر تغییرات دما بر روی پروتئین بتا-لاکتوگلوبولین شیر با استفاده از شبیه سازی دینامیک مولکولی

محمد خدادادی مقدم^۱، سحر مهاجری^۱، غلامرضا ابراهیم زاده رجائی^{*۱}

^۱ گروه شیمی، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران

تاریخ ثبت اولیه: ۱۴۰۳/۱۱/۱۹، تاریخ دریافت نسخه اصلاح شده: ۱۴۰۴/۰۱/۲۸، تاریخ پذیرش قطعی: ۱۴۰۴/۰۲/۰۷

چکیده

بتالاکتوگلوبولین به عنوان یکی از پروتئین های طبیعی شیر گاو جزو مهمترین آلرژن های آن به شمار می رود. در پژوهش حاضر با استفاده از روش شبیه سازی دینامیک مولکولی در دماهای ۳۰۰، ۳۱۰، ۳۲۰، ۳۳۰، ۳۴۰ و ۳۵۰ کلوین، تأثیر دما بر ویژگی های این مولکول در مقیاس اتمی مورد بررسی قرار گرفته است. یافته های شبیه سازی حاضر نشان می دهند که افزایش دما در ابتدا به صورت پیوسته باعث افزایش جذر میانگین مجذور جابه جایی اتمهای پروتئین می گردد که دلیل آن افزایش انرژی جنبشی ذرات می باشد. افزایش دما به ۳۴۰ کلوین به دلیل نزدیکی به محدوده شروع دناتوراسیون این پروتئین، باعث افزایشی شدید در جذر میانگین مجذور جابه جایی می شود. پارامتر مهم دیگر شعاع ژیراسیون می باشد که بر خلاف جذر میانگین مجذور جابه جایی، افزایش ملایمی را با افزایش دما نشان می دهد و بیان کننده تدریجی بودن دناتوراسیون بتالاکتوگلوبولین می باشد. در نهایت، مهمترین پارامتری که خاصیت آلرژن بتالاکتوگلوبولین را نشان می دهد، میزان سطح قابل دسترس برای حلال این مولکول می باشد. بالا بودن این سطح نشان دهنده امکان برهمکنش بیشتر بتالاکتوگلوبولین با مولکول های سیستم ایمنی بدن و در نتیجه بالاتر بودن خاصیت آلرژن می باشد. نتایج شبیه سازی حاضر نشان می دهد که میزان سطح در دسترس حلال بتالاکتوگلوبولین با افزایش دما کاهش می یابد و این مقدار در حدود دمای شروع دناتوراسیون پروتئین چشمگیرتر است. بنا بر نتایج حاصل، با افزایش دمای شیر تا دمای شروع دناتوراسیون بتالاکتوگلوبولین (حدوداً ۳۴۰ کلوین) می توان میزان آلرژن بودن این پروتئین را به مقدار قابل توجهی کاهش داد.

واژه های کلیدی: بتالاکتوگلوبولین، آلرژن های شیر، دینامیک مولکولی، اثر دما، شعاع ژیراسیون

۱. مقدمه

امروزه شبیه سازی های کامپیوتری و به ویژه شبیه سازی دینامیک مولکولی کاربردهای بسیاری در زمینه های مختلف علمی و فنی یافته است [۶-۱]. در سال های اخیر، استفاده از تکنیک های مختلف شبیه سازی کامپیوتری راه خود را به صنایع غذایی نیز باز

^{*}عهده دار مکاتبات: غلامرضا ابراهیم زاده رجائی

نشانی: گروه شیمی، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران

پست الکترونیک: gh_rajaei@iau.ac.ir

تلفن: ۰۹۱۴۳۵۳۰۳۱۲

نموده است. از این تکنیک ها به منظور افزایش ماندگاری و کیفیت تغذیه ای محصولات غذایی فرآوری شده استفاده می شود [۷]. توسعه مدل های ریاضی دقیق امکان شبیه سازی تغییرات مواد غذایی حین فرآوری را بدون استفاده از روش های آزمایشی مرسوم میسر می سازد و امکان طراحی بهینه آزمایشات تجربی به منظور کسب اطلاعات دقیق با کمترین زمان و هزینه را فراهم می نماید [۸] و [۹]. شیر و محصولات حاصل از آن از مهمترین منابع تغذیه ای انسان می باشند و به همین دلیل فعالیت های پژوهشی زیادی بر روی آن انجام می پذیرد [۱۰-۱۴]. پروتئین های شیر به صورت عمده به دو دسته پروتئین های آب پنیر و کازئین تقسیم بندی می شوند. پروتئین های آب پنیر ۲۰٪ پروتئین های شیر گاو را تشکیل می دهند و شامل بتا لاکتوگلوبولین، آلفا لاکتوگلوبولین، آلبومین سرم گاوی، ایمنوگلوبولین ها، لاکتوفرین و پروتئوس پتین ها می شود [۱۵-۱۸]. مهمترین مواد آلرژن در شیر گاو عبارتند از بتا لاکتوگلوبولین، آلفالاکتوگلوبولین و کازئین ها. مطالعات نشان می دهند که از میان پروتئین های ذکر شده، بتالاکتوگلوبولین یکی از مهمترین ها می باشد که می تواند در بیماران بسیار حساس، واکنش های آلرژیک شدیدی ایجاد نماید [۱۹-۲۱]. تغییر حالت کنفورماسیونی پروتئین، به عنوان مثال مساحت سطح آن، می تواند باعث کاهش دسترسی به اپیتوپهای آلرژیک شده و از شدت واکنش های حساسیتی بکاهد. بتالاکتوگلوبولین در فرم دی مری خود (که به عنوان زنجیره های A و B شناخته می شود) دارای وزن مولکولی کل ۳۶ کیلو دالتون و ۱۶۲ باقی مانده در هر زنجیره می باشد [۲۲].

نرم افزار گرونینگن برای شبیه سازی شیمیایی^۱ (GROMACS) یکی از بهترین، سریع ترین، کاربر پسندترین و راحت ترین نرم افزارهای مورد استفاده برای شبیه سازی های دینامیک مولکولی می باشد. این نرم افزار رایگان، دارای کارایی بسیار بالایی در شبیه سازی درشت ملکول ها و ساختارهای زیستی است. همچنین، این نرم افزار به کاربر امکان توسعه مدل مجازی ساختار های مولکولی با میلیون ها اتم را می دهد. در نتیجه امکان شبیه سازی ساختارهای بزرگ زیستی با این نرم افزار وجود دارد. در مطالعه حاضر، از این نرم افزار برای شبیه سازی اثر دما بر روی پروتئین بتا لاکتوگلوبولین شیر استفاده شده است.

۲. روش های محاسباتی

در شبیه سازی دینامیک مولکولی استفاده شده در پژوهش حاضر از میدان نیروی CHARM برای مولکول پروتئین و TIP3P برای آب استفاده شده است. ساختار مولکولی مونومر بتالاکتوگلوبولین نوع B (1b8e.pdb) از بانک داده پروتئین (<https://www.rcsb.org/structure/1b8e>) برداشت شده است. پس از افزودن آمینو اسیدهای شماره ۱۵۲ تا ۱۵۹ و تشکیل دimer، مولکول در جعبه شبیه سازی مکعبی با ابعاد ۱ نانومتر (با شرایط مرزی متناوب) قرار داده شد. جعبه شبیه سازی با مولکول آب (۱۰۸۳۲ مولکول) پر شده است. در ابتدا سیستم برای بازه زمانی ۱ نانوثانیه در دمای منتخب از نظر انرژی بهینه گردیده است. در نهایت، شبیه سازی اصلی با استفاده از مجموعه NPT در فشار ۱ بار و دمای مورد نظر برای مدت زمان ۲۰ نانوثانیه انجام پذیرفت و داده های نهایی استخراج گردید.

¹ Groningen Machine for Chemical Simulations (GROMACS)

۳. نتایج و بحث

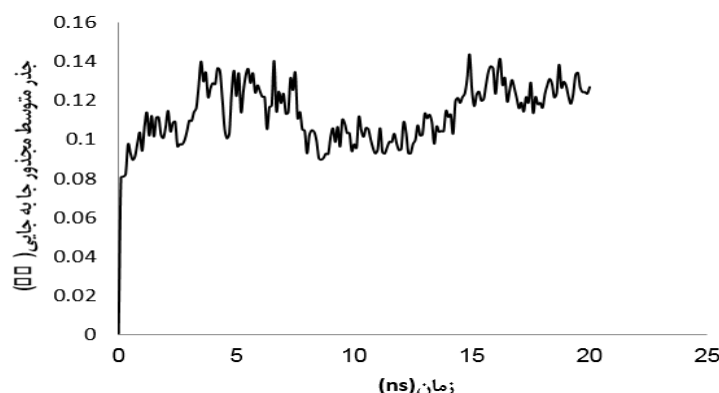
هدف اصلی در پژوهش حاضر بررسی تأثیرات تیمار دمایی (دماهای ۳۰۰، ۳۱۰، ۳۲۰، ۳۳۰، ۳۴۰ و ۳۵۰ کلوین) بر ساختار مولکول بتالاکتوگلوبولین می باشد. به همین منظور پارامترهای جذر متوسط مجذور جابجایی، شعاع ژیراسیون و سطح قابل دسترس توسط حلال محاسبه گردیده و مورد بررسی قرار گرفته اند.

۳-۱. بررسی جذر متوسط مجذور جابه جایی اتم های بتالاکتوگلوبولین نسبت به زمان در دماهای مختلف

جذر متوسط مجذور جابه جایی^۱ RMSD میزان تغییرات ساختار مولکول را در مقیاس اتمی به هنگام قرار گرفتن در معرض تنش های بیرونی نشان می دهد. این پارامتر با بررسی تغییرات ساختار مولکول پروتئین در مقایسه با مولکول مشابهی که تحت هیچگونه تنش خارجی نمی باشد، محاسبه می شود. معادله (۱) برای محاسبه RMSD مولکول پروتئین مورد استفاده قرار می گیرد [۲۲]:

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |r_{final}(i) - r_{initial}(i)|^2} \quad (1)$$

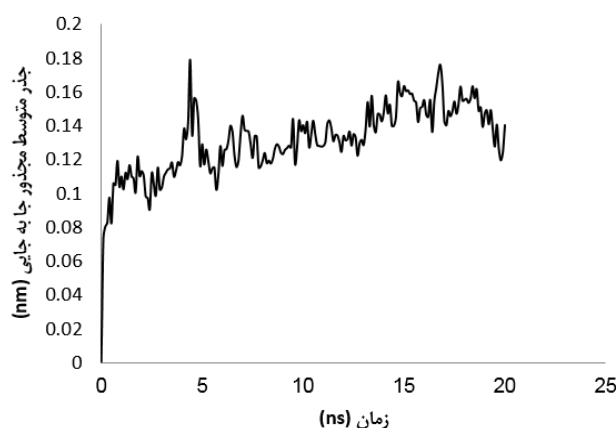
در این معادله $r_{final}(i)$ مختصات نهایی اتم مورد نظر و $r_{initial}(i)$ مختصات اولیه همان اتم و N تعداد کل اتمها در مولکول پروتئین می باشد. تصاویر نشان داده شده در اشکال ۱ تا ۶ تغییرات RMSD را نسبت به زمان شبیه سازی در دماهای مختلف برای مولکول بتالاکتوگلوبولین نشان می دهد. در شکل ۷ میانگین RMSD برای هر دما در طول شبیه سازی نشان داده شده است. بررسی شکل ۱ نشان می دهد که با شروع شبیه سازی در ابتدا تغییرات شدیدی در RMSD دیده می شود که دلیل آن شروع به حرکت و تغییر موقعیت اتمها از حالت ساکن می باشد. در ادامه در بازه های زمانی ۵ تا ۱۰ نانوثانیه و ۱۵ تا ۲۰ نانوثانیه افت و خیزهایی در RMSD قابل مشاهده می باشد که دلیل این افت و خیزها تغییرات ساختاری رخ داده در مولکول حین شبیه سازی می باشد [۲۲]. تغییرات ساختاری با حرکات قابل توجه اتمها انجام می گیرد و همین امر افت و خیزهایی را در روند RMSD ایجاد می نماید.



شکل ۱. تغییرات RMSD مولکول بتالاکتوگلوبولین در طول شبیه سازی در دمای ۳۰۰ کلوین

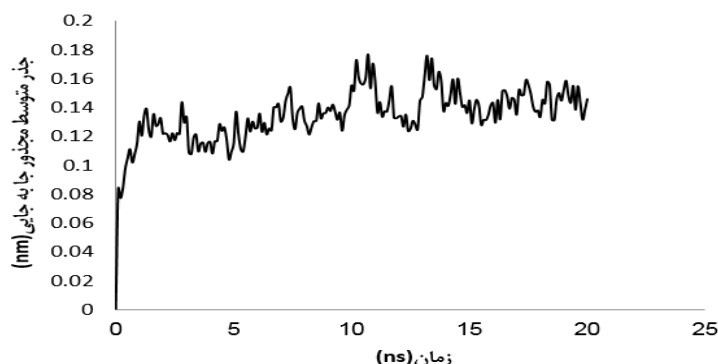
¹ Root Mean Square Displacement (RMSD)

شکل ۲ RMSD مولکول بتالاکتوگلوبولین را در دمای ۳۱۰ کلوین نشان می دهد. تغییر ۱۰ درجه ای در دمای شبیه سازی تغییرات قابل توجهی را در نمودار RMSD ایجاد می نماید. یکی از مهمترین این تغییرات، افزایش مقادیر عددی نمودار در حالت کلی می باشد. افزایش دمای محیط باعث افزایش میانگین انرژی جنبشی ذرات شده و در نتیجه سطح نمودار اندکی بالاتر می آید. در عین حال، افت و خیزهای تغییرات ساختاری اشاره شده در شکل ۱، با افزایش دما تیز تر شده و در بازه زمانی کمتری اتفاق می افتد. افزایش دما با افزایش انرژی جنبشی ذرات باعث می گردد که اتمها راحتتر بتوانند بر سد انرژی ممانعت کننده به هنگام رخ دادن تغییرات ساختاری غلبه کنند و همین امر باعث مشاهده پیک تیزتری در نمودار در مقایسه با شکل ۱ می گردد.

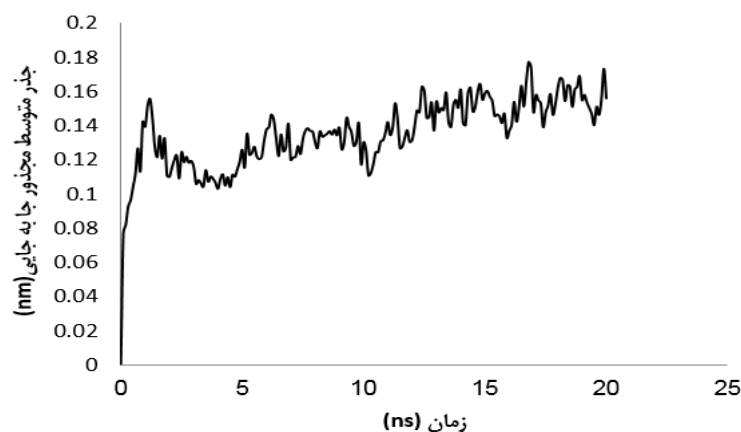


شکل ۲. تغییرات RMSD مولکول بتالاکتوگلوبولین در طول شبیه سازی در دمای ۳۱۰ کلوین

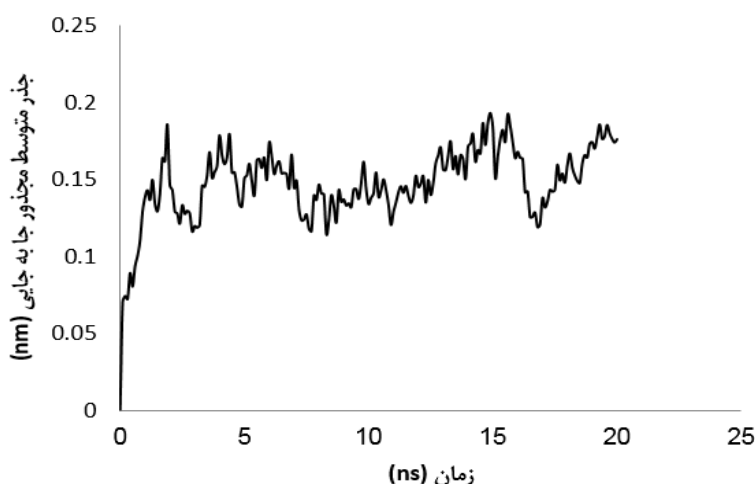
با افزایش دما، سطح عمومی نمودار بالاتر می آید که نشان دهنده پیروی از روند قبلی می باشد. همانگونه که اشاره شد دلیل این افزایش با افزایش دمای شبیه سازی، افزایش انرژی جنبشی ذرات می باشد که میزان جابه جایی آنها را تحت تأثیر قرار می دهد. شکل های ۳ تا ۵ که به ترتیب RMSD بتالاکتوگلوبولین را در دماهای ۳۲۰، ۳۳۰ و ۳۴۰ کلوین نشان می دهند، روند ذکر شده را به خوبی نشان می دهند.



شکل ۳. تغییرات RMSD مولکول بتالاکتوگلوبولین در طول شبیه سازی در دمای ۳۲۰ کلوین

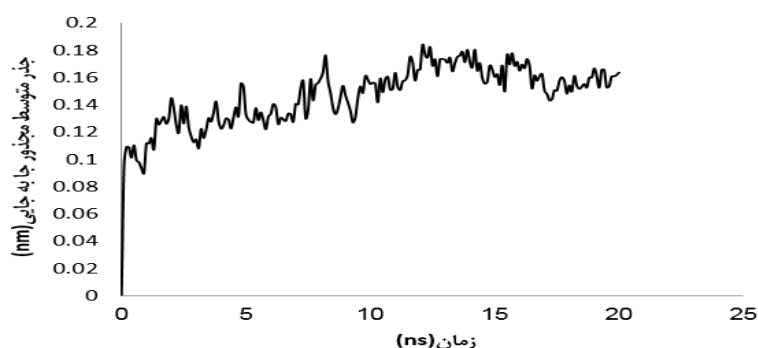


شکل ۴. تغییرات RMSD مولکول بتالاکتوگلوبولین در طول شبیه سازی در دمای ۳۳۰ کلوین



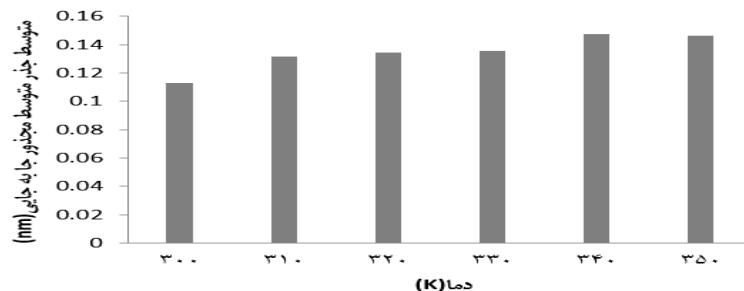
شکل ۵. تغییرات RMSD مولکول بتالاکتوگلوبولین در طول شبیه سازی در دمای ۳۴۰ کلوین

روند تغییرات افزایش سطح عمومی نمودار RMSD به هنگام افزایش دما از ۳۴۰ به ۳۵۰ کلوین معکوس می گردد و مقادیر RMSD در دمای ۳۵۰ کلوین کمتر از ۳۴۰ کلوین می باشند. این موضوع از شکل ۶ قابل مشاهده می باشد. دلیل این تغییرات به ظاهر نا هماهنگ به تغییرات شدید ساختار مولکول در دمای ۳۴۰ کلوین در مقایسه با سایر دماها بر می گردد. محدوده دمایی حدود ۳۴۰ کلوین، محدوده دمایی دناتوراسیون بتالاکتوگلوبولین می باشد [۲۳] و دلیل بالا بودن سطح عمومی نمودار RMSD در دمای ۳۴۰ کلوین و افت و خیزهای شدید نمودار نیز (در دمای ۳۴۰ کلوین در مقایسه با دماهای کمتر و بیشتر) به همین موضوع بر می گردد. با افزایش دما به ۳۵۰ کلوین (شکل ۶) علاوه بر کاهش در سطح کمی نمودار RMSD، افت و خیزهای کمتری را نیز نشان می دهد. این نمودارها در مجموع نشان می دهند شدیدترین تحرکات اتمی در مولکول بتالاکتوگلوبولین در محدوده دمایی شروع دناتوراسیون رخ می دهد.

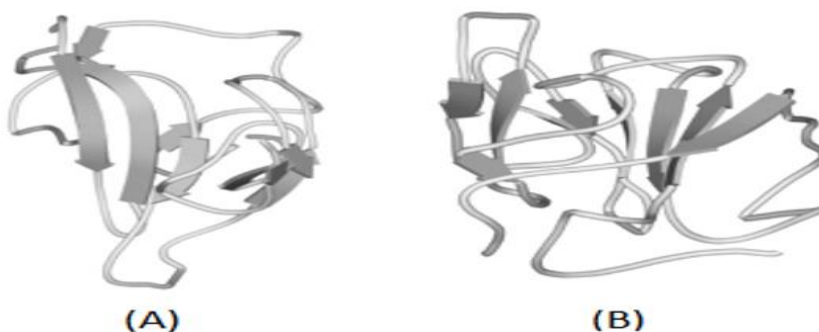


شکل ۶. تغییرات RMSD مولکول بتالاکتوگلوبولین در طول شبیه سازی در دمای ۳۵۰ کلوین

شکل ۷ میانگین RMSD برای ۲۰ نانو ثانیه شبیه سازی را در دماهای مختلف نشان می دهد. دقت در این شکل افزایشی مداوم و آهسته در میانگین جا به جایی اتمهای مولکول بتالاکتوگلوبولین با افزایش دما را در دماهای کمتر از دمای دناتوراسیون نشان می دهد. این افزایش ملایم حاصل تغییرات در انرژی جنبشی اتم ها با افزایش دما می باشد. وقتی دمای شبیه سازی به محدوده دمایی شروع دناتوراسیون پروتئین می رسد (۳۴۰ کلوین)، حرکات اتمهای سازنده مولکول ها افزایشی محسوس نشان می دهد که بعداً دچار افتی اندک (در ۳۵۰ کلوین) می گردد. این تغییرات نشان می دهند که آشفته گی و افت و خیزهای شدیدی به هنگام شروع دناتوراسیون در ساختار بتالاکتوگلوبولین رخ می دهد که در دماهای بالاتر شدتی کمتر به خود می گیرد.



شکل ۷. میانگین RMSD مولکول بتالاکتوگلوبولین طی شبیه سازی در دماهای مختلف



شکل ۸. مقایسه شکل صورتبندی مولکول بتالاکتوگلوبولین طی شبیه سازی در طول زمان ۲۰ نانو ثانیه در دو دمای مختلف ۳۵۰ و ۳۰۰ کلوین

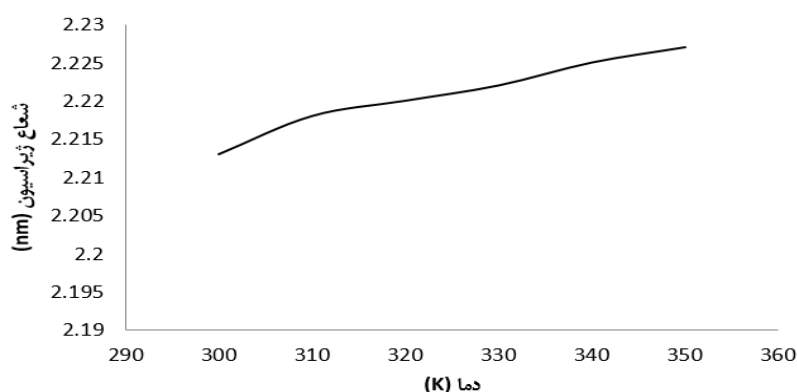
در شکل ۸ مقایسه صورتبندی مولکول بتالاکتوگلوبولین طی شبیه سازی در طول زمان ۲۰ نانوثانیه در دو دمای مختلف ۳۰۰ (شکل ۸A) و ۳۵۰ کلوین (شکل ۸B) نمایش داده شده است. همانطوری که از شکل مشخص است، با افزایش دما از ۳۰۰ به ۳۵۰ کلوین، شکل مولکول بتالاکتوگلوبولین به حالت تقارن کروی متمایل می شود و یک تغییر محسوس در ساختار مارپیچی مولکول پس از ۲۰ نانوثانیه شبیه سازی دینامیک مولکولی حاصل می شود که این موضوع هم راستا با نتایج میانگین RMSD بوده و در ارتباط با افزایش مداوم و آهسته در میانگین جا به جایی اتم های مولکول بتالاکتوگلوبولین با افزایش دما است. احتمال می رود روند باز شدن مولکول پس از دمای ۳۴۰ کلوین، درست بالاتر از دمای دناتوراسیون پروتئین شیر، برای مدت طولانی تری از ۲۰ نانوثانیه رخ دهد. شاید بتوان گفت که شبیه سازی دینامیک مولکولی کمتر از ۲۰ نانوثانیه در هر تکرار هنوز برای دستیابی به نتایج قابل توجه کافی نباشد و ترمیم این نقص به صرف بالا بردن هزینه محاسباتی یعنی استفاده از پردازشگرهای محاسباتی قوی تر مقدور باشد.

۲-۳. شعاع ژیراسیون

شعاع ژیراسیون پروتئین R_g عبارت است از توزیع اتم ها در مولکول پروتئین با توجه به مرکز جرم آن [۲۴]. محاسبه شعاع ژیراسیون روشی برای تعیین میزان فشردگی ساختار مولکول پروتئین می باشد. شعاع ژیراسیون کمتر بدین معنی است که تعدادی بیشتری از اتمهای پروتئین نزدیک مرکز جرم مولکول گرد آمده اند. برای محاسبه شعاع ژیراسیون از معادله زیر استفاده می شود:

$$R_g = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |r(i) - r_{center}|^2} \quad (1)$$

در معادله ۲ $R(i)$ مختصات اتم i ام و R_{center} مختصات مرکز جرم پروتئین و N تعداد اتم های تشکیل دهنده پروتئین می باشد. شکل ۸ میانگین محاسبه شده برای شعاع ژیراسیون بتالاکتوگلوبولین طی ۲۰ نانوثانیه شبیه سازی را در دماهای مختلف نشان می دهد.



شکل ۹. میانگین شعاع ژیراسیون مولکول بتالاکتوگلوبولین طی ۲۰ نانوثانیه شبیه سازی در دماهای مختلف

شکل ۹ نشان می دهد که با افزایش دمای شبیه سازی، شعاع ژیراسیون بتالاکتوگلوبولین به آرامی و بدون افت و خیز مشخصی افزایش می یابد. دلیل افزایش شعاع ژیراسیون با افزایش دما به دلیل دور شدن تدریجی اتمها از مرکز جرم مولکول با افزایش انرژی جنبشی آنها می باشد. همین پدیده در نهایت به باز شدن ساختار مولکول پروتئین و دناتوراسیون آن می انجامد. با توجه به نبود

تغییرات ناگهانی در شعاع ژیراسیون در حوالی دمای دناتوراسیون، می توان نتیجه گرفت که باز شدن ساختار مولکول پدیده ای تدریجی و پیوسته می باشد و این اتفاق به صورت ناگهانی رخ نمی دهد [۲۲].

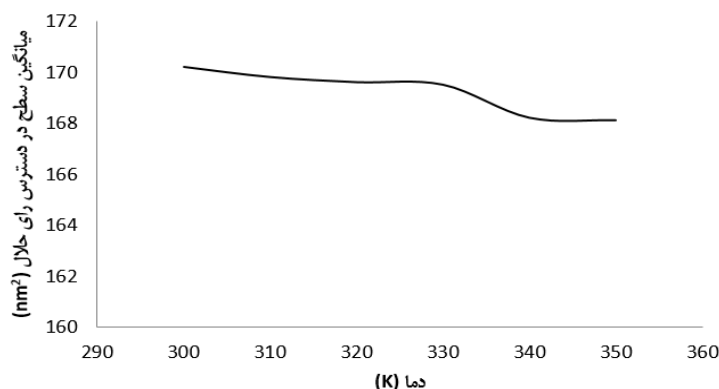
۳-۳. سطح قابل دسترس پروتئین برای حلال

سطح قابل دسترس توسط حلال پارامتر مهمی برای بررسی برهمکنش پروتئین با محیط خود (شامل حلال و سایر مولکول ها) می باشد. این ویژگی به ساختار پروتئین ها وابسته است و تغییرات اندک در ساختار پروتئین آن را تغییر می دهد و در نتیجه به تغییر برهمکنش مولکول با محیط اطراف خود می انجامد. کاهش این پارامتر برای مولکول پروتئین می تواند به کاهش توانایی آلرژی زایی آن پروتئین منجر گردد [۲۵]. سطح قابل دسترس پروتئین برای حلال به صورت سطحی تعریف می شود که مرکز مولکول حلال می تواند بدون برهم زدن نظم سایر مولکول های همسایه پروتئین در آن قرار گیرد [۲۶]. این سطح با استفاده از معادله ۳ قابل محاسبه می باشد:

$$SASA = A = \sum \left(\frac{R}{\sqrt{R^2 - Z_j^2}} \right) \times D \times L_j \quad (3)$$

در معادله ۳، A نشان دهنده میزان سطح، R شعاع اتم، L فاصله بین اتم حلال در موقعیت فعلی با موقعیت نهایی و Z نشان دهنده فاصله عمودی سطح مولکول پروتئین با مرکز کره پیرامون آن می باشد. این رابطه ساختار مولکول پروتئین را در لحظه محاسبه ثابت و بدون تغییر شکل فرض می نماید.

نتیجه محاسبه سطح در دسترس برای مولکول بتالاکتوگلوبولین در دماهای مختلف نشان می دهد که با افزایش دما این کمیت کاهش می یابد. شکل ۱۰ تغییرات سطح قابل دسترس بتالاکتوگلوبولین (میانگین گیری شده طی ۲۰ نانو ثانیه شبیه سازی) را با افزایش دما نشان می دهد. با بررسی این شکل سه مرحله در تغییرات سطح قابل دسترس توسط حلال قابل مشاهده می باشد. اولین مرحله تغییر آرام از ۳۰۰ تا ۳۳۰ کلوین می باشد. در این محدوده دمایی با توجه به عدم رخداد تغییرات کنفورماسیون ناگهانی در مولکول پروتئین، سطح قابل دسترس آن برای حلال به آرامی کاهش می یابد. در ادامه بین دماهای ۳۳۰ و ۳۴۰ کلوین، افتی نسبتاً شدید و ناگهانی در سطح قابل دسترس پروتئین دیده می شود که نشان دهنده شروع دناتوراسیون و تغییرات ساختاری شدید پروتئین می باشد. افزایش بیشتر دما هر چند باعث افت بیشتر میزان سطح در دسترس می گردد اما این افت مجدداً حالتی ملایم به خود می گیرد. زیرا با افزایش بیشتر دما میزان پیشرفت دناتوراسیون افزایش می یابد و همین امر سطح در دسترس را کاهش می دهد اما چون این تغییرات ساختاری ناگهانی نمی باشند، کاهشی مشابه کاهش سطح در دسترس در محدوده دمایی ۳۳۰ تا ۳۴۰ مجدداً مشاهده نمی گردد.



شکل ۱۰. تغییرات میانگین سطح قابل دسترس مولکول بتالاکتوگلوبولین برای حلال در دماهای مختلف در طی ۲۰ نانوثانیه شبیه سازی

۴. نتیجه گیری

بتالاکتوگلوبولین از مهمترین مواد آلرژن در شیر می باشد. داده های تجربی نشان می دهد که افزایش دما می تواند خواص آلرژی زایی این ماده را کاهش دهد اما بررسی اتفاقاتی که در سطح اتمی در این مولکول در دماهای مختلف رخ می دهد جز با شبیه سازی دینامیک مولکولی میسر نمی باشد. بررسی یافته های شبیه سازی دینامیک مولکولی بتالاکتوگلوبولین در مدت زمان ۲۰ نانوثانیه نشان می دهد که با افزایش دما میانگین جا به جایی اتمهای سازنده پروتئین افزایش می یابد. این افزایش در ابتدا تدریجی و به دلیل افزایش انرژی جنبشی ذرات می باشد. اما در محدوده دمایی ۳۴۰ کلوین، افزایش میانگین جا به جایی اتم ها به طور چشمگیری بیشتر می شود و پیک مشخصی را نشان می دهد. با توجه به اینکه در حول و حوش دمای ۳۴۰ کلوین، دناتوراسیون این پروتئین شروع می شود، پیک موجود در این دما را می توان به تغییرات بزرگ رخ داده در موقعیت اتم های سازنده پروتئین به دلیل شروع دناتوراسیون دناتوراسیون آن منتصب دانست.

پارامتر مهم دیگر در شبیه سازی دینامیک مولکولی پروتئین ها شعاع ژیراسیون آن ها می باشد. نتایج شبیه سازی حاضر افزایش پیوسته شعاع ژیراسیون پروتئین را بر اثر افزایش دما نشان می دهد که به دلیل افزایش جا به جایی های اتمی بر اثر افزایش انرژی جنبشی آنها می باشد. نبود تغییرات شدید شعاع ژیراسیون در نزدیکی دمای دناتوراسیون بتالاکتوگلوبولین نشان دهنده تدریجی بودن این پدیده می باشد.

مهمترین پارامتری که در خاصیت آلرژی زایی بتالاکتوگلوبولین تأثیر دارد، سطح در دسترس حلال این مولکول می باشد. بالا بودن سطح در دسترس حلال توانایی برهمکنش پروتئین را با مولکول های اطراف افزایش داده و همین امر می تواند به افزایش خاصیت آلرژی زایی بیانجامد. نتایج شبیه سازی حاضر نشان می دهد که با افزایش دما میزان سطح در دسترس بتالاکتوگلوبولین کاهش می یابد و این کاهش در دمای ۳۴۰ کلوین که محدوده دمایی شروع دناتوراسیون می باشد، بسیار بیشتر از سایر دماهاست. بدین صورت می توان نتیجه گرفت که با افزایش دمای شیر تا محدوده دمایی شروع دناتوراسیون بتالاکتوگلوبولین می توان خواص آلرژی زایی این پروتئین را به میزان قابل قبولی کاهش داد.

سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل بابت دسترسی و استفاده از امکانات آزمایشگاه تحقیقاتی و محاسباتی گروه شیمی و کلیه حمایت‌های انجام گرفته در طول پروژه کمال تشکر را دارند.

۵. مراجع

- [۱] مجیدی، رویا؛ منصوری، خدیجه، شبیه سازی دینامیک مولکولی جذب مخلوط اکسیژن و نیتروژن روی نانومخروط و نانولوله کربنی، نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران، (۳۶:۳) ۱۱۳ تا ۱۴۱ (۱۳۹۶).
- [۲] کوثری، محمد حسین؛ گنج خانلو، اعظم، ساختار و ویژگی‌های ترمودینامیکی مایع‌های یونی بر پایه ایمیدازولیوم با آنیون دی سیانامید: مطالعه دینامیک مولکولی، (۳۷:۲) ۹۵ تا ۱۰۲ (۱۳۹۷).
- [۳] کوثری، محمد حسین؛ ترابی، سید محمد، شبیه سازی دینامیک مولکولی مایع یونی ۱-بوتیل-۳-متیل ایمیدازولیوم نیترات و رفتار دینامیکی مخلوط‌های دوتایی مایع یونی-آب، (۳۷:۲) ۱۰۳ تا ۱۱۲ (۱۳۹۷).
- [۴] ایزدی، محمد ابراهیم؛ سبزیان، حسن، میدان نیروی واکنشی ReaxFF در شبیه سازی دینامیک مولکولی سامانه‌های واکنشی، (۳۸:۴) ۱ تا ۲۱ (۱۳۹۸).
- [۵] مظفری، فرخنده، شبیه سازی دینامیک مولکولی نفوذ گاز هیدروژن و اکسیژن در پلی استایرن، (۳:۴۰) ۱۶۵ تا ۱۷۳ (۱۴۰۰).
- [۶] ولی زاده، زهرا؛ عباسپور، محسن؛ اکبرزاده، حامد، بررسی انرژی سطحی، پایداری و ویژگی‌های ساختاری نانوخوشه‌های Au-Ag تشکیل شده در فرآیند تراکم بخار با استفاده از شبیه سازی دینامیک مولکولی، (۱:۴۱) ۱ تا ۱۴ (۱۴۰۱).
- [7] Smith, A., Dong, X., Raghavan, V., An Overview of Molecular Dynamics Simulation for Food Products and Processes, Processes, 119(10): 1-14 (2022).
- [8] Ekins, S., Computer Applications in Pharmaceutical Research and Development, Wiley-Interscience: Hoboken, NJ, USA, (2006).
- [9] Eom, K., Computer Simulation of Protein Materials at Multiple Length Scales: From Single Proteins to Protein Assemblies, Multiscale Scie. Eng. 1: 1-25 (2019).
- [10] Sargolzaei, J., Saghatoleslami, N., Mosavi, S. M., Khoshnoodi, M., Comparative Study of Artificial Neural Networks (ANN) and Statistical Methods for Predicting the Performance of Ultrafiltration Process in the Milk Industry, Iran J. Chem. Chem. Eng., 25(2): 67-76 (2006).
- [11] Razavi, S. M. A., The Study of Dynamic Milk Ultrafiltration Performance Influenced by Membrane Molecular Weight Cut off, Iran J. Chem. Chem. Eng., 26(1): 61-69 (2007).
- [12] Saghatoleslami, N., Mousavi, M., Sargolzaei, J., Khoshnoodi, M., A Neuro-Fuzzy Model for a Dynamic Prediction of Milk Ultrafiltration Flux and Resistance, Iran J. Chem. Chem. Eng., 26(2): 53-61 (2007).
- [13] Alali, F., Amayreh, M., Massadeh, A., El-Alali, A., Determination of Fat-Soluble Vitamins A, D3, and E in Infant Formula and Milk Powder Using High-Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array Detection: Jordan Market as a Case Study, Iran J. Chem. Chem. Eng., 39(4): 173-181 (2020).

- [14] Sadeghi, N., Jamshidi, A., Seyyedin, M., Detection of *Mycobacterium avium* Sub sp. Paratuberculosis in Pasteurized Milk Samples in Northeast of Iran by Culture, Direct Nested PCR and PCR Methods, Iran J. Chem. Chem. Eng., 39(6): 251-258 (2020).
- [15] Chandan, R., Dairy-based ingredients. Minnesota: Eagan Press Handbook series, Eagan Press Handbook, USA (1997).
- [16] El-Agamy, E., The challenge of cow milk protein allergy, Small Ruminant Res. 68(1): 64-72 (2007).
- [17] Farrell, H. M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G. T., Brown, E. M., Butler, J. E., Creamer, L. K., Swaisgood, H. E., Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk, J. Dairy Sci. 87(6): 1641-1674 (2004).
- [18] Odriozola-Serrano, I., Bendicho-Porta, S., Martín-Belloso, O., Comparative Study on Shelf Life of Whole Milk Processed by High-Intensity Pulsed Electric Field or Heat Treatment, J. Dairy Sci. 89: 905-911 (2006).
- [19] Busse, P. J., Järvinen, K. M., Vila, L., Beyer, K., Sampson, H. A., Identification of sequential IgE-binding epitopes on bovine alpha(s2)-casein in cow's milk allergic patients, Int. Arch. Allergy Immunology 129(1): 93-96 (2002).
- [20] Beyer, K., Ellman-Grunther, L., Järvinen, K. M., Wood, R. A., Hourihane, J., Sampson H. A., Measurement of peptide-specific IgE as an additional tool in identifying patients with clinical reactivity to peanuts, J Allergy Clin Immunol, 112(2): 202-207 (2003).
- [21] Wang, J., Sampson, H. A., Food allergy: recent advances in pathophysiology and treatment, Allergy Asthma Immunol Res., 1(1): 19-29 (2009).
- [22] Saxena R., Kranthi S., Raghavan V., Effect of thermal and microwave processing on secondary structure of bovine β -lactoglobulin: A molecular modeling study, J. Food Biochem. 43(7): 12898-12911 (2019).
- [23] de Wit J. N., Swinkels G. A., A differential scanning calorimetric study of the thermal denaturation of bovine beta-lactoglobulin. Thermal behaviour at temperatures up to 100 degrees C., Biochim Biophys Acta., 624(1):40-50 (1980).
- [24] Budi A., Legge F. S., Treutlein H., Yarovsky I., Comparative study of insulin chain-B in isolated and monomeric environments under external stress, J. Phys. Chem. B, 112(26):7916-7924 (2008).
- [25] Miller S., Lest A. M., Janin J., Chotia C., The accessible surface area and stability of oligomeric proteins, Nature, 328 (27): 834-836 (1987).
- [26] Lee B., Richards F. M., The interpretation of protein structures: Estimation of static accessibility, J. Mol. Biol., 55: 379-400 (1971).

Investigating the effect of temperature changes on milk β -lactoglobulin protein using molecular dynamics simulation

Mohammad Khodadadi-Moghaddam, Sahar Mohajeri, Gholamreza Ebrahimzadeh-Rajaei*

Department of Chemistry, Ard.C., Islamic Azad University, Ardabil, Iran

Submitted: 07 February 2025, Revised: 17 April 2025, Accepted: 27 April 2025

Abstract

β -lactoglobulin, as one of the natural proteins of cow's milk, is considered one of its most important allergens. In the present study, the effect of temperature on the properties of this molecule at the atomic scale was investigated using molecular dynamics simulation at temperatures of 300, 310, 320, 330, 340 and 350 K. The findings of the present simulation show that increasing the temperature initially continuously increases the root mean square displacement of protein atoms, which is due to the increase in the kinetic energy of the particles. Increasing the temperature to 340 K, due to its proximity to the starting range of denaturation of this protein, causes a sharp increase in the root mean square displacement. Another important parameter is the radius of gyration, which, unlike the root mean square displacement, shows a gentle increase with increasing temperature and expresses the gradual denaturation of β -lactoglobulin. Finally, the most important parameter that indicates the allergen properties of β -lactoglobulin is the amount of solvent-accessible surface area of this molecule. A high level of this level indicates the possibility of greater interaction of β -lactoglobulin with molecules of the immune system and, as a result, a higher allergen property. The results of the present simulation show that the amount of solvent-accessible surface area of β -lactoglobulin decreases with increasing temperature, and this amount is more significant around the temperature of onset of protein denaturation. According to the results, by increasing the temperature of milk to the temperature of onset of β -lactoglobulin denaturation (approximately 340 K), the allergenicity of this protein can be significantly reduced.

Keywords: *β -lactoglobulin, Milk's allergens, Molecular dynamics, Effect of temperature, Radius of gyration.*