

مطالعه برهمکنش رنگ خوراکی قرمز آلورا با پپسین توسط طیف سنجی فلورسانس

فاطمه السادات محسنی شهری*



ایران، بندرعباس، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بندرعباس، گروه شیمی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۳/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۶/۴

چکیده

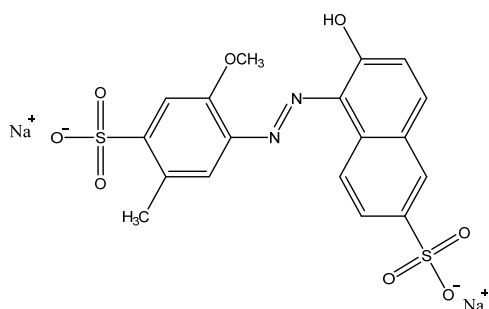
در این مقاله برهمکنش پپسین با رنگ خوراکی قرمز آلورا با استفاده از روش طیف سنجی فلورسانس در شرایط شبه فیزیولوژیک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد رنگ قرمز آلورا می‌تواند فلورسانس ذاتی پپسین را کاهش دهد، ثابت سرعت خاموشی (k_q) نشان می‌دهد که مکانیسم خاموشی از نوع پایا (استاتیک) است. ثابت اتصال ظاهری (K_a)، تعداد جایگاه اتصال (n) در دماهای مختلف مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان می‌دهند با افزایش دما ثابت اتصال رنگ قرمز آلورا به پپسین کاهش می‌یابد. آنتالپی (ΔH°) و آنتروپی (ΔS°) برهمکنش بین رنگ قرمز آلورا و پپسین به ترتیب $-45/584$ (kJ mol⁻¹) و $-49/052$ (J K⁻¹ mol⁻¹) محاسبه گردید که نشان دهنده نقش مهم پیوند های هیدروژنی و برهمکنشهای واندروالسی در این اتصال می‌باشد، علامت منفی مربوط به تغییرات انرژی آزاد (ΔG°) بیانگر تمایل اتصال رنگ به پروتئین است. طیف سنجی فلورسانس همزمان نشان داد که محیط اطراف باقی مانده های تریپتوفان و تیروزین در فرآیند اتصال تغییر قابل توجهی نداشته است. بر اساس داده های تجربی، اتصال بین رنگ قرمز آلورا و پروتئین می‌تواند فعالیت پپسین را مهار کند.

واژه های کلیدی: پپسین، رنگ قرمز آلورا، طیف فلورسانس، فعالیت آنزیم

* نویسنده مسئول، تلفن ۰۷۶۳۳۶۶۵۵۰۰، پست الکترونیکی: f.mohseni@iauba.ac.ir

مقدمه

رنگدانه غذایی مصنوعی است که دارای مقاومت بسیار بالایی است و در بسیاری از محصولات غذایی مانند پوشش آب نبات، بستنی، لواشک، نوشیدنیها و شیرینی استفاده می‌شود.



شکل ۱- ساختار مولکولی قرمز آلورا

تحقیقات پیشین نشان می‌دهد که رنگ قرمز آلورا در موش صحرائی توسط میکرو فلور روده تجزیه شده و

رنگهای غذایی به طور گسترده ای در صنایع غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند تا مواد غذایی را با هدف جذب مصرف کنندگان بهبود بخشند. در مقایسه با رنگهای طبیعی، رنگهای مصنوعی به دلیل پایداری بالای آنها در برابر نور، اکسیژن، pH، یکنواختی رنگ، آلودگی میکروبیولوژیکی کم و هزینه های نسبتا پایین تولید کاربرد بیشتری دارند (۹). با این حال، برخی از رنگهای مصنوعی برای بدن انسان مضر هستند، به ویژه اگر آنها بیش از حد مصرف شوند (۱۵). بنابراین، مانند بسیاری از مواد افزودنی خوراکی دیگر، کنترل ذرات رنگ در صنایع غذایی بسیار مهم است.

قرمز آلورا (Allura red) ساختار نشان داده شده در شکل ۱) رنگ محلول در آب، متعلق به خانواده منوآزو از

در این تحقیق، مکانیسم مولکولی برهمکنش رنگ قرمز آلورا با پپسین با استفاده از روش طیف سنجی فلورسانس مطالعه شده است. با استفاده از معادله اشترن-ولمر، سازوکار خاموشی فلورسانس پپسین با رنگ قرمز آلورا ارزیابی شده و همچنین پارامترهای ترمودینامیکی و فعالیت آنزیم پپسین در حضور رنگ خوراکی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روشها

پپسین خوکی با درجه خلوص بالای ۹۰ درصد و رنگ قرمز آلورا از شرکت معتبر سیگما-آلدردیج خریداری شدند. برای ثابت نگه داشتن pH محلول پپسین و هموگلوبین گاوی (شرایط فیزیولوژیک، pH=2) از محلول بافر سدیم سیترات-اسید سیتریک (۰/۲ مولار، حاوی NaCl ۰/۱ مولار) استفاده شد. کلیه محلولها با بافر سدیم سیترات-اسید سیتریک تا حجم مورد نظر رقیق شدند. کلیه مواد شیمیایی دارای خلوص تجزیه ای بودند و بدون خلص سازی استفاده شدند. تمام محلولهای تهیه شده تا زمان استفاده در یخچال (دمای ۴ درجه سانتی گراد) و تاریکی نگهداری شدند.

کلیه طیفهای فلورسانس پپسین در غیاب و حضور قرمز آلورا توسط یک دستگاه فلورومتر (Jasco) FP-6200 مجهز به سل کوآرتز ۱/۰ سانتیمتر ثبت شدند. طول موج تهییجی ۲۸۰ نانومتر انتخاب شد و طیف نشری در محدوده طول موج ۳۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر دردهماهای ۲۹۸، ۳۰۵ و ۳۱۰ کلوین ثبت شدند. غلظت اولیه پپسین ۴۰/۰ μM بود و غلظت قرمز آلورا بین ۰/۰ تا ۱۲/۰ میکرومولار با گرادیان رشد ۲/۰ میکرومولار تغییر کرد و پس از انکوبه شدن به مدت ۳ دقیقه در دمای مورد نظر طیف فلورسانس ذاتی پروتئین در طول موج تهییجی ثبت شد. طیفهای فلورسانس همزمان ($\Delta\lambda = 15$ ، $\Delta\lambda = 60$ نانومتر) با طول موج ۲۵۰ تا ۳۵۰ نانومتر در دمای اتاق ثبت شدند. غلظت پپسین و قرمز آلورا در آزمایشهای فلورسانس مشابه بود. برای حذف اثر

باعث تولید سم، عوامل سرطان زا و موتاژنیک می شود (۴ و ۲۰). یافته ها نشان می دهد که رنگ قرمز آلورا می تواند سبب آسیب DNA در روده بزرگ موش شود (۱۸). همچنین نشان داده شده است که رنگ قرمز آلورا می تواند موجب تغییرات فیزیولوژیک، آسیب به بافت و تغییرات ساختاری جدی کبد و کلیه در موش شود (۶ و ۷). با توجه به خطرات سلامتی بالقوه، رنگ قرمز آلورا برای مصرف کودکان در اروپا توصیه نمی شود.

پپسین آنزیم پروتئولیتیک اصلی در اسید معده است. پپسین به عنوان یکی از پروتئازهای گوارشی توسط سلولهای اصلی معده آزاد می شود. وزن مولکولی پپسین ۳۵۵۰۰ دالتون است و دارای یک زنجیره آنزیمی پلی پپتیدی حاوی ۳۲۷ باقی مانده آمینواسیدی است (۱۹،۲ و ۲۵). پپسین دارای ۵ باقی مانده تریپتوفان (Trp39، Trp141، Trp181، Trp190 و Trp300) و ۱۳ باقی مانده تیروزین (Tyr) و ۱۳ باقی مانده فنیل آلانین (Phe) است (۲۵ و ۲۶). پنج باقی مانده تریپتوفان می تواند به عنوان فلوروفورهای ذاتی برای فراهم کردن اطلاعاتی در زمینه برهمکنش لیگاند-پپسین و تغییرات کنفورماسیونی ناشی از اتصال به لیگاند استفاده شود (۱۳). اتصال مولکولهای کوچک با پپسین موجب تغییرات سازوکار و فعالیت آن می شود (۷). وانگ و همکارانش برهمکنش متقابل رنگ قرمز آلورا با سرم آلبومین انسانی را مورد مطالعه قرار دادند (۲۱). نتایج نشان داد که بین رنگ قرمز آلورا و سرم آلبومین برهمکنش وجود دارد. با این حال، رنگ قرمز آلورا قبل از این که وارد پلاسمای خون شود و با سرم آلبومین و پروتئینهای دیگر ارتباط برقرار کند، ابتدا وارد سیستم گوارش شده و به طور مستقیم به برخی از آنزیمهای گوارشی متصل می شود. در زمینه اتصال رنگ قرمز آلورا به پپسین اطلاعات کمی وجود دارد و نیاز است در این زمینه مطالعاتی انجام شود.

نانومتر است، تنها باقی مانده تریپتوفان برانگیخته می‌شود. خاموشی فلورسانس کاهش بهره کوانتومی فلورسانس فلوروفور ناشی از انواع مختلف برهمکنش‌های مولکولی مانند واکنش‌های حالت برانگیخته، تشکیل کمپلکس حالت پایه، انتقال انرژی و خاموشی در نتیجه برخورد است (۸، ۱۷، ۲۸ و ۲۹). نمودار شدت فلورسانس در مقابل طول موج نشری در طول موج تهیج ۲۸۰ نانومتر رسم شده است (شکل ۲a). همان‌طور که مشاهده می‌شود با افزایش غلظت قرمز آلورا شدت نشر پروتئین کاهش می‌یابد و خاموشی فلورسانس اتفاق می‌افتد. همچنین در اثر اتصال رنگ قرمز آلورا به پروتئین طول موج ماکزیمم به سمت طول موج‌های کمتر یعنی به سمت ناحیه آبی منتقل می‌شود. این انتقال زمانی رخ می‌دهد که باقیمانده‌های تیروزین و تریپتوفان از محیط آبدوست به محیط آبگریز انتقال یابند و این نشان دهنده کاهش قطبش پذیری محیط اطراف کروموفور است (۲۲).

همچنین می‌توان نتیجه گرفت با اتصال رنگ قرمز آلورا به پپسین فلوروفورهای این پروتئین به سمت داخل پروتئین رفته و محیط شان آبگریز تر شده است. برای تعیین سازوکار اتصال بین پپسین و قرمز آلورا، داده‌های شدت فلورسانس با استفاده از معادله اشتراک-ولمر تحلیل شدند (۱ و ۱۱):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad (1)$$

در این معادله F_0 و F به ترتیب شدت فلورسانس پروتئین در غیاب و حضور خاموش کننده K_q ثابت سرعت خاموشی پروتئین، K_{sv} ثابت اشتراک-ولمر، τ_0 طول عمر فلورسانس پروتئین در غیاب خاموش کننده ($\tau_0 = 10^{-8}$ s) (۲۷) و $[Q]$ غلظت خاموش کننده است. بدیهی است که:

$$K_{sv} = K_q \tau_0 \quad (2)$$

فیلتر داخلی، نیاز است مقدار شدت فلورسانس نمونه‌ها برای جذب آنها در طول موج‌های تهیجی و نشری با استفاده از معادله زیر تصحیح شوند:

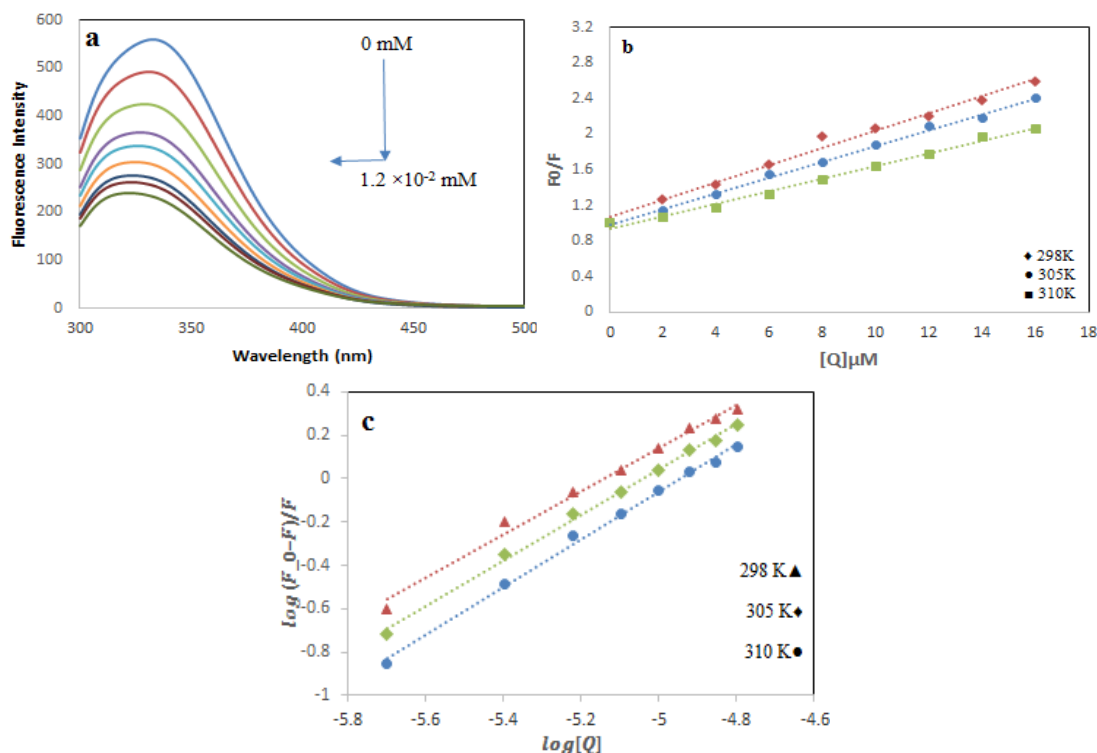
$$F_c = F * \text{antilog} \left(\frac{A_{ex} + A_{em}}{2} \right)$$

در این معادله F_c و F به ترتیب شدت نشر فلورسانس اندازه‌گیری شده و تصحیح شده می‌باشند. A_{em} و A_{ex} جذب لیگاند (خاموش گر) در طول موج تهیجی و نشری می‌باشند (۱۰).

فعالیت آنزیم با استفاده از روش دقیق آنسون با برخی اصلاحات بررسی شد. پپسین (۲۰/۰ میکرومولار) با غلظت‌های مختلفی از رنگ قرمز آلورا (۰/۷ و ۰/۶، ۰/۵، ۰/۴، ۰/۳، ۰/۲، ۰/۱، ۰/۰۵، ۰/۰ میلی مولار) در بافر سترات سدیم (pH=۷/۰) و در دمای ۳۱۰K به مدت ۲۰ دقیقه مخلوط شد و سپس ۲/۰ میلی لیتر از محلول هموگلوبین گاوی ۵ درصد اضافه شد. پس از گذشت ۲۰ دقیقه برای خاتمه واکنش ۲ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید (۱۰ درصد وزنی) اضافه شد. مخلوط به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه نگهداری شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. در نهایت به ۱ میلی لیتر از محلول صاف شده، ۱ میلی لیتر NaOH (۴/۰ مولار) و ۱ میلی لیتر رقیق کننده فنول اضافه شد و سپس این مخلوط در دمای ۳۱۰ K به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد (۳).

نتایج و بحث

خاموشی فلورسانس پپسین: به منظور بررسی نوع برهمکنش رنگ قرمز آلورا با پپسین اندازه‌گیری‌های فلورسانس انجام شد. فلورسانس ذاتی پپسین معمولاً مربوط به حضور باقی مانده‌های تریپتوفان (Trp) و تیروزین (Tyr) است. هنگامی که طول موج تهیجی ۲۸۰



شکل ۲- (a) اثر افزایش غلظت رنگ قرمز آلورا بر طیف نشری پپسین در طول موج تهییجی ۲۸۰ نانومتر و دمای ۲۹۸ کلین، جهت پیکان عمودی افزایش غلظت و جهت پیکان افقی انتقال آبی را نشان می‌دهد (b) نمودار اشتراک-ولمر کمپلکس پپسین-قرمز آلورا در دماهای مختلف (c) نمودار $\log\left(\frac{F_0-F}{F}\right)$ در مقابل $\log[Q]$ برای برهمکنش رنگ قرمز آلورا با پپسین در دماهای مختلف.

خاموش کننده‌های مختلف همراه بیومولکول $L \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 2×10^{11} است (۲۴). نمودار اشتراک-ولمر فلورسانس پپسین که توسط قرمز آلورا خاموش شده در شکل ۱b نشان داده شده و نتایج در جدول ۱ گزارش شده است.

ثابت سرعت خاموشی، K_q ($L \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) را می‌توان بر اساس معادله (۲) به دست آورد. عموماً خاموشی دینامیک و استاتیک را می‌توان توسط ثابت خاموشی K_q از یکدیگر تشخیص داد، به طوری که حداکثر ثابت خاموشی دینامیک

جدول ۱- ثابت های اشتراک-ولمر برای برهمکنش پپسین با رنگ قرمز آلورا در دماهای مختلف

T (K)	K_{sv} ($L \text{ mol}^{-1}$)	K_q ($L \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	R^*
۲۹۸	$9/07 \times 10^4$	$9/07 \times 10^{12}$	۰/۹۸۷
۳۰۵	$۸/۸۴ \times 10^4$	$۸/۸۴ \times 10^{12}$	۰/۹۹۷
۳۱۰	$۷/۱۰ \times 10^4$	$۷/۱۰ \times 10^{12}$	۰/۹۹۱

*: ضریب همبستگی

آلورا به پپسین و تعداد جایگاههای اتصال از معادله ۳ استفاده شد.

$$\log\left(\frac{F_0-F}{F}\right) = \log K_a + n \log[Q] \quad (3)$$

در این معادله F_0 و F به ترتیب شدتهای فلورسانس پروتئین در غیاب و حضور خاموش کننده، K_a ثابت

با افزایش دما، K_{sv} کاهش می‌یابد، مقدار K_q بیشتر از $L \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 2×10^{11} است، بنابراین خاموشی فلورسانس پپسین در حضور رنگ قرمز آلورا به واسطه تشکیل کمپلکس پپسین-قرمز آلورا می‌باشد. برای محاسبه ثابت اتصال قرمز

تعداد جایگاه‌های اتصال و عرض از مبدأ لگاریتم ثابت اتصال را می‌دهد (۸). نتایج در جدول ۲ گزارش شده است.

اتصال، n تعداد جایگاه‌های اتصال و [Q] غلظت خاموش کننده می‌باشد. شیب نمودار $\log \frac{F_0 - F}{F_0}$ در مقابل $\log [Q]$

جدول ۲- ثابت اتصال (K_a) و پارامترهای ترمودینامیکی برای برهمکنش پپسین و قرمز آلورا

T (K)	K_a ($L mol^{-1}$)	n	R^*	ΔH° ($kJ mol^{-1}$)	ΔG° ($kJ mol^{-1}$)	ΔS° ($J mol^{-1} K^{-1}$)
۲۹۸	$2/62 \times 10^5$	۱/۰۹۵	۰/۹۹۵	-۴۵/۵۸۴	-۳۰/۹۱۰	-۴۹/۰۵۲
۳۰۵	$1/۸۵۸ \times 10^5$	۱/۰۴۵	۰/۹۹۶		-۳۰/۷۶۵	
۳۱۰	$1/۲۷۲ \times 10^5$	۰/۹۹۲	۰/۹۸۹		-۳۰/۲۹۲	

*: ضریب همبستگی

برای ΔG° در محدوده دمایی مورد بررسی بدین معنی است که فرآیند اتصال پپسین به قرمز آلورا به صورت خود به خودی است. بر طبق قوانین خلاصه شده توسط راس و سوبرامانیان (۱۹۸۱)، هنگامی که ΔH° و ΔS° مثبت هستند، برهمکنش‌های هیدروفوبی نقش اصلی را در واکنش اتصال ایفاء می‌کند و مقدار منفی ΔH° و ΔS° نشان دهنده حضور نیروهای واندروالس و پیوند هیدروژنی در تشکیل کمپلکس هستند. علاوه بر این، برهمکنش الکترواستاتیک با ΔS° مثبت و ΔH° منفی مشخص می‌شود که ΔH° معمولاً بسیار کوچک و تقریباً برابر با صفر است. نتایج نشان می‌دهند که پیوند هیدروژنی و نیروهای واندروالسی نقش مهمی را در تشکیل کمپلکس رنگ قرمز آلورا با پپسین ایفاء می‌کنند (۱۶).

طیف سنجی فلورسانس همزمان: طیف سنجی فلورسانس همزمان اطلاعاتی در زمینه باقی مانده های تیروزین و تریپتوفان پپسین فراهم می‌کند. زمانی که فاصله بین طول موج تهییج و طول موج نشری $\Delta\lambda = 15$ نانومتر است طیف اطلاعاتی را در زمینه باقی مانده های Tyr ارائه می‌دهد و زمانی که $\Delta\lambda = 60$ نانومتر است طیف اطلاعات مربوط به باقی مانده Trp را نشان می‌دهد، تغییر در موقعیت حداکثر طول موج نشری، تغییر در قطبیت محیط اطراف باقی مانده های Tyr یا Trp را نشان می‌دهد (۱۱). شکل ۳، تغییرات طیف فلورسانس همزمان برای پپسین را نشان می‌دهد.

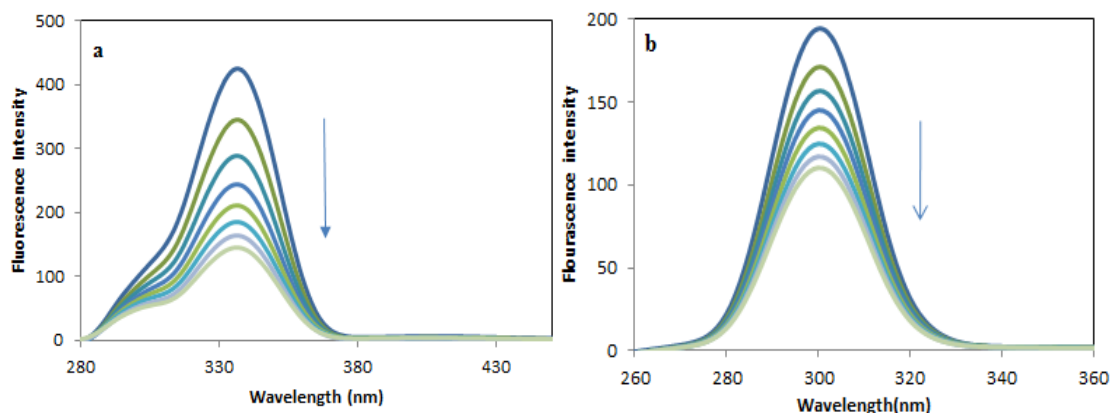
از نتایج جدول ۲ می‌توان دریافت که K_a برای اتصال قرمز آلورا به پپسین با افزایش دما کاهش می‌یابد، که نشان می‌دهد کمپلکس تشکیل شده ناپایدار است و در دماهای بالاتر تجزیه می‌شود (۲۳). علاوه بر این مقادیر n نشان می‌دهد یک دسته جایگاه اتصال مستقل در پپسین برای رنگ وجود دارد. اساساً چهار نوع برهمکنش غیر کووالانسی در اتصال لیگاند به بیومولکول وجود دارد: پیوند هیدروژنی، نیروهای واندروالسی، نیروهای الکترواستاتیک و برهمکنش‌های هیدروفوب (۲۳). علامت و مقدار پارامترهای ترمودینامیکی مانند تغییر انرژی آزاد (ΔG°)، تغییر آنتالپی (ΔH°) و تغییر آنتروپی (ΔS°) واکنش برای تعیین نوع برهمکنش اهمیت دارند. اگر ΔH° با تغییر دما خیلی تغییر نکند، مقدار ΔH° و ΔS° را می‌توان با استفاده از معادله وانت هوف به صورت زیر محاسبه کرد:

$$\ln K_a = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} \quad (4)$$

که T دمای آزمایش بر حسب کلوین است، K_a ثابت اتصال است که از معادله (۳) به دست می‌آید و R ثابت گاز است. از شیب و عرض از مبدأ منحنی $\ln K_a$ در مقابل $1/T$ ، به ترتیب تغییر آنتالپی (ΔH°) و تغییر آنتروپی (ΔS°) به دست آمد. انرژی آزاد گیبس، ΔG° ، نیز با استفاده از معادله ترمودینامیکی زیر محاسبه شد (۱۲):

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (5)$$

مقادیر پارامترهای ترمودینامیکی در جدول ۲ ارائه شده است. از جدول ۲ می‌توان نتیجه گرفت که علامت منفی

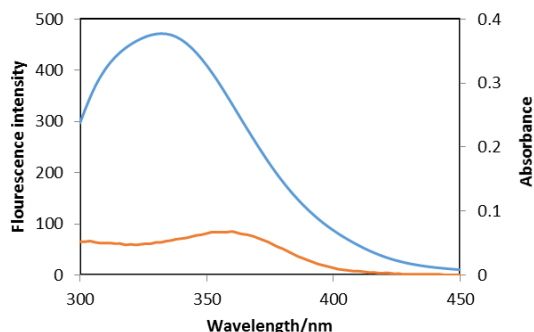


شکل ۳- (a) طیف فلورسانس همزمان برهمکنش بین پیسین و رنگ قرمز آلورا در $\Delta\lambda = 60$ نانومتر و (b) $\Delta\lambda = 15$ نانومتر در دمای اتاق (برای $\Delta\lambda = 60$ نانومتر طول موج تهییج ۲۲۰ نانومتر و برای $\Delta\lambda = 15$ نانومتر طول موج تهییج ۲۲۵ نانومتر تنظیم گردید).

طیف جذبی پذیرنده است. مقدار J می‌توان با استفاده از معادله زیر به دست آورد:

$$J = \frac{\sum F(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 \Delta\lambda}{\sum F(\lambda) \Delta\lambda} \quad (8)$$

که $F(\lambda)$ شدت فلورسانس دهنده در طول موج λ است و $\varepsilon(\lambda)$ ضریب جذب مولی پذیرنده در طول موج λ است. مقدار انتگرال همپوشانی با استفاده از رابطه (۸) و نرم افزار اکسل ۲۰۱۶ محاسبه شد و مقدار آن $10^{-15} \text{ cm}^3 \text{ L mol}^{-1}$ به دست آمد. همپوشانی طیف جذبی مرئی-فرابنفش رنگ قرمز آلورا با طیف نشری فلورسانس پیسین در شکل ۴ نشان داده شده است. تحت شرایط آزمایش برای پیسین $n = 1/36$, $K^2 = 2/3$ و $\Phi = 0.15$ می‌باشد (۲۷).



شکل ۴- همپوشانی طیف فلورسانس پیسین با طیف جذبی رنگ قرمز

$$\text{آلورا. } C = 2/0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1} = C \text{ (رنگ قرمز آلورا) (پیسین)}$$

(قرمز: طیف جذبی پذیرنده انرژی، آبی: طیف نشری دهنده انرژی)

نتایج نشان می‌دهند شدت فلورسانس برای هر دو باقی مانده تریپتوفان و تیروزین به تدریج همراه با افزایش رنگ قرمز آلورا کاهش می‌یابد که نشان دهنده تشکیل کمپلکس و برهمکنش رنگ قرمز آلورا با باقی مانده تیروزین و تریپتوفان در پیسین است، همچنین با افزایش غلظت رنگ تغییری در موقعیت λ_{max} مشاهده نگردید، که حاکی از نبود تغییر قابل توجه در محیط اطراف فلوروفور است.

انتقال انرژی بین پیسین و رنگ قرمز آلورا: با توجه به نظریه انتقال انرژی غیر تابشی فورسترکاریبی انتقال انرژی بین دهنده و پذیرنده، E می‌تواند توسط معادله زیر تعیین شود (۵):

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (9)$$

که r فاصله لیگاند تا باقیمانده تریپتوفان پروتئین است. R_0 فاصله بحرانی است هنگامی که بازده انتقال آنها ۵۰ درصد می‌باشد و می‌تواند از معادله زیر تعیین شود:

$$R_0^6 = 8.79 \times 10^{-25} K^2 N^{-4} \Phi \quad (7)$$

K^2 فاکتور جهت گیری فضایی مربوط به هندسه دهنده و پذیرنده دو قطبی برای جهت گیری تصادفی در یک محلول است. n ضریب شکست محیط است، Φ بهره کوانتومی فلورسانس دهنده در غیاب پذیرنده است و J انتگرال همپوشانی بین طیف نشری فلورسانس دهنده و

میزان مهارکنندگی رنگ قرمز آلورا در غلظت ۰/۵۰ میلی مولار برابر ۳۴/۴ درصد می باشد. این نتایج نشان می دهد هنگامی که رنگ قرمز آلورا وارد معده می شود می تواند فعالیت پپسین را مهار کند.

به طور کلی نتایج نشان می دهد که رنگ قرمز آلورا می تواند به طور خود به خود به پپسین متصل شود و فلورسانس ذاتی پروتئین را از طریق مکانیسم استاتیک خاموش کند. پارامترهای ترمودینامیکی نشان می دهد که پیوندهای هیدروژنی و نیروهای وان در والس نقش مهمی در برهمکنش رنگ قرمز آلورا با پپسین ایفاء می کنند. طیف سنجی فلورسانس همزمان نشان داد که محیط اطراف باقی مانده های تریپتوفان و تیروزین در فرآیند اتصال تغییر قابل توجهی نمی کند. علاوه بر این، رنگ قرمز آلورا باعث مهار فعالیت پپسین شد. نتایج حاصل از این تحقیق می تواند اطلاعات ارزشمندی در مورد برهمکنش رنگ قرمز آلورا با پروتئینهای گوارشی فراهم کند که در ارزیابی اثرات سمی رنگهای آزو مفید است.

در پژوهشهای آتی می توان با انجام محاسبات دینامیک مولکولی نتایج حاصل از این تحقیق را تفسیر و همچنین تغییرات ساختاری پپسین ناشی از اتصال رنگ قرمز آلورا را بررسی نمود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بندر عباس انجام شده است. بنابراین نویسنده مراتب سپاس خود را از آن دانشگاه محترم اعلام می دارد.

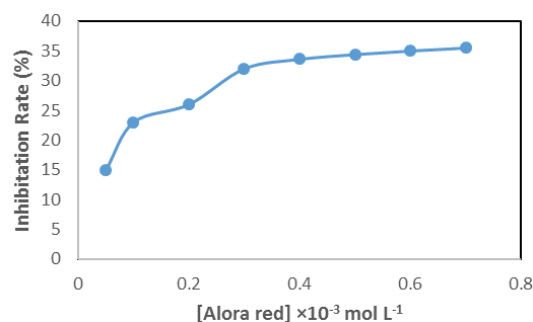
بر اساس معادلات ۸-۶ فاصله بین باقیمانده تریپتوفان پپسین (دهنده) و رنگ قرمز آلورا (پذیرنده) ۳/۴۷ نانومتر محاسبه شد که چون در محدوده ۸-۲ نانومتر و $0.5R_0 < r < 1.5R_0$ می باشد، نشان می دهد انتقال انرژی از پپسین به رنگ قرمز آلورا رخ داده است (۱۴).

فعالیت پپسین در حضور رنگ قرمز آلورا: به منظور نشان دادن اینکه آیا رنگ قرمز آلورا پس از ورود به بدن انسان از طریق غذا یا دارو می تواند فعالیت پپسین را تحت تأثیر قرار دهد، اثر رنگ آلورا بر فعالیت پپسین در محیط آزمایشگاهی طبق روش ذکر شده بررسی شد.

با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر، جذب در ۶۶۰ نانومتر (OD₆₆₀) اندازه گیری شد و فعالیت پپسین با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (۳):

$$\text{بازدارندگی آنزیم (\%)} = \frac{\text{OD}_{660} \text{ blank} - \text{OD}_{660} \text{ sample}}{\text{OD}_{660} \text{ blank}} \times 100 \quad (9)$$

همان طور که در شکل ۵ نشان داده شده است، فعالیت آنزیم در حضور رنگ قرمز آلورا با غلظتهای مختلف تغییر می کند. با افزایش غلظت رنگ، میزان بازدارندگی افزایش می یابد و فعالیت پپسین کاهش می یابد.



شکل ۵- اثر رنگ قرمز آلورا بر فعالیت پپسین در دمای ۳۱۰ کلونین و

$$C_{\text{پپسین}} = 20/0 \mu\text{M}$$

منابع

فلورسانس. مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران). (۳)، ۲۸، ۵۵۷-۵۴۵.

۱- ریاحی مدوار، ع.، قاسمی نسب، ع. ر. ۱۳۹۶. مطالعه میانکنش نانوذره اکسید مس با آلبومین سرم انسانی با استفاده از تکنیک

- اکسیدآهن. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران). (۴) ۳۰، ۳۴۴-۳۵۱.
- 3- Anson, M. L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *The Journal of general physiology*, 22(1): 79.
 - 4- Chung, K. T. 2000. Mutagenicity and carcinogenicity of aromatic amines metabolically produced from azo dyes. *Journal of Environmental Science & Health Part C*, 18(1): 51-74.
 - 5- Förster, T. and Sinanoglu O. 1996. Modern quantum chemistry, *Academic* 3: 93-338.
 - 6- Gičević, A. Hindija, L. and Karačić, A. 2019. Toxicity of Azo Dyes in Pharmaceutical Industry. In *International Conference on Medical and Biological Engineering*: 581-587.
 - 7- Helal, E. G. 2001. Progressive effects of the interaction of sodium nitrite and sunset yellow on different physiological parameters in albino rats. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*, 2: 23-46.
 - 8- Iranfar, H. Rajabi, O. Salari, R. and Chamani, J. 2012. Probing the interaction of human serum albumin with ciprofloxacin in the presence of silver nanoparticles of three sizes: multispectroscopic and ζ potential investigation. *The Journal of Physical Chemistry B*, 116(6): 1951-1964.
 - 9- Kashanian, S. Zeidali, S. H. Omidfar, K. and Shahabadi, N. 2012. Multi-spectroscopic DNA interaction studies of sunset yellow food additive. *Molecular biology reports*, 39(12): 10045-10051.
 - 10- Lakowicz, J. *Quenching of Fluorescence in Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2006. Springer-Verlag, Berlin.
 - 11- Mohseni-Shahri, F. S. Housaindokht, M. R. Bozorgmehr, M. R. and Moosavi-Movahedi, A. A. 2014. The influence of the flavonoid quercetin on the interaction of propranolol with human serum albumin: Experimental and theoretical approaches. *Journal of Luminescence*, 154: 229-240.
 - 12- Mohseni-Shahri, F. S. Housaindokht, M. R. Bozorgmehr, M. R. and Moosavi-Movahedi, A. A. 2016. Influence of taxifolin on the human serum albumin-propranolol interaction: multiple spectroscopic and chemometrics investigations and molecular dynamics simulation. *Journal of Solution Chemistry*, 45(2): 265-285.
 - 13- Mohseni-Shahri, F. S. Moeinpour, F. Malaekheh-Nikouei, B. and Nassirli, H. 2017. Combined multispectroscopic and molecular dynamics simulation investigation on the interaction between cyclosporine A and β -lactoglobulin. *International journal of biological macromolecules*, 95: 1-7.
 - 14- Naik, P. Chimatadar S. and Nandibewoor, S. 2010. Interaction between a potent corticosteroid drug-dexamethasone with bovine serum albumin and human serum albumin: a fluorescence quenching and fourier transformation infrared spectroscopy study. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 100(3): 147-159.
 - 15- Pourreza, N. Rastegarzadeh S. and Larki, A. 2011. Determination of Allura red in food samples after cloud point extraction using mixed micelles. *Food Chemistry*, 126(3): 1465-1469.
 - 16- Ross, P. D. and Subramanian, S. 1981. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Biochemistry*, 20(11): 3096-3102.
 - 17- Samari, F. Hemmateenejad, B. Shamsipur, M. Rashidi, M. and Samouei, H. 2012. Affinity of two novel five-coordinated anticancer Pt (II) complexes to human and bovine serum albumins: a spectroscopic approach. *Inorganic chemistry*, 51(6): 3454-3464.
 - 18- Shimada, C. Kano, K. Sasaki, Y. F. Sato, I. and Tsuda, S. 2010. Differential colon DNA damage induced by azo food additives between rats and mice. *The journal of toxicological sciences*, 35(4): 547-554.
 - 19- Spelzini, D. Peleteiro, J. Picó, G. and Farruggia, B. 2008. Polyethyleneglycol-pepsin interaction and its relationship with protein partitioning in aqueous two-phase systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 67(2): 151-156.
 - 20- Tsuda, S. Murakami, M. Matsusaka, N. Kano, K. Taniguchi, K. and Sasaki, Y. F. 2001. DNA damage induced by red food dyes orally administered to pregnant and male mice. *Toxicological Sciences*, 61(1): 92-99.
 - 21- Wang, L. Zhang, G. and Wang, Y. 2014. Binding properties of food colorant allura red with human serum albumin in vitro. *Molecular biology reports*, 41(5): 3381-3391.
- Wang, T. Zhao, Z. Wei, B. Zhang L. and Ji, L. 2010. Spectroscopic investigations on the binding of dibazol to bovine serum albumin. *Journal of Molecular Structure*, 970(1-3): 128-133.

- 22- Wang, Y. Q. Zhang, H. M. Zhang, G. C. Zhou, Q. H. Fei, Z. H. Liu, Z. T. and Li, Z. X. 2008. Fluorescence spectroscopic investigation of the interaction between benzidine and bovine hemoglobin. *Journal of Molecular Structure*, 886(1-3): 77-84.
- 23- Ware, W. R. 1962. Oxygen quenching of fluorescence in solution: an experimental study of the diffusion process. *The Journal of Physical Chemistry*, 66(3): 455-458.
- 24- Ying, M., Huang, F. Ye, H. Xu, H. Shen, L. Huan, T. Huang, S. Xie, J. Tian, S. and Hu, Z. 2015. Study on interaction between curcumin and pepsin by spectroscopic and docking methods. *International journal of biological macromolecules*, 79: 201-208.
- 25- Yue, Y. Zhao, S. Liu, J. Yan, X. and Sun, Y. 2017. Probing the binding properties of dicyandiamide with pepsin by spectroscopy and docking methods. *Chemosphere*, 185: 1056-1062.
- 26- Zeng, H. j. Qi, T. Yang, R. You, J. and Qu, L. b. 2014. Spectroscopy and molecular docking study on the interaction behavior between nobiletin and pepsin. *Journal of fluorescence*, 24(4): 1031-1040.
- 27- Zeng, H.J. Liang, H.L. You, J. and Qu, L.B. 2014. Study on the binding of chlorogenic acid to pepsin by spectral and molecular docking. *Luminescence*, 29(7): 715-721.
- 28- Zhang, J. Zhuang, S. Tong, C. and Liu, W. 2013. Probing the molecular interaction of triazole fungicides with human serum albumin by multispectroscopic techniques and molecular modeling. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(30): 7203-7211.
- 29- Zohoorian-Abootorabi, T. Sane, H. Iranfar, H. Saberi, M.R. and Chamani, J. 2012. Separate and simultaneous binding effects through a non-cooperative behavior between cyclophosphamide hydrochloride and fluoxymesterone upon interaction with human serum albumin: Multi-spectroscopic and molecular modeling approaches. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 88: 177-191.

Study on the interaction of allura red food additive with pepsin using fluorescence technique

Mohseni-Shahri F.S.

Dept. of Chemistry, Bandar Abbas Branch, Islamic Azad University, Bandar Abbas, I.R. of Iran.

Abstract

In this study, the interaction of pepsin with allura red food additive was investigated using a fluorescence spectroscopy method under quasi-physiological conditions. The experimental results indicated that allura red can quench the fluorescence of pepsin, the quenching rate constant (K_q), indicates that the quenching mechanism is static. The apparent binding constant (K_a) and binding site number (n) were evaluated at different temperatures. The results show that that the K_a for the association of SY with pepsin decreases with the rising temperature. Enthalpy (ΔH°) and entropy (ΔS°) were calculated as -45.584 (kJ mol^{-1}) and -49.052 ($\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$) respectively, which shows the importance of hydrogen bond formation and van der Waal's interaction in binding of allura red to pepsin, the negative sign of free energy changes (ΔG°) indicates the affinity of color to protein. The results of synchronous fluorescence spectra showed that the microenvironment around Tyr and Trp residues is not significant changed binding between pepsin and allura red. According to experimental data, red allura can reducing the pepsin activity.

Key words: Pepsin, Allura red color, Fluorescence spectroscopy, Enzyme activity.