دانشگاه اصفهان
دانشکده علوم و فن‌آوری‌های نوین
گروه زیست‌فناوری

پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست‌فناوری گرایش میکروبی

تولید و خالص سازی بتا لاکتوگلوبولین گاوی وحشی و نوترکیب C۱۲۱S در مخمر پیشیا پاستوریس

اساتید راهنما

دکتر مهرناز کیهان‌فر

دکتر عبدالخالق بردبار

استاد مشاور

دکتر اصغر طاهری کفرانی

پژوهشگر

مژگان مومنی

آبان ماه ۹۱

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتـایج مطالعـات، ابتکـارات و نـوآوری‌هـای ناشـی از تحقیـق موضوع این پایان نامـه متعلـق بـه دانشـگاه اصفهان است.

دانشگاه اصفهان
دانشکده علوم و فن‌آوری‌های نوین
گروه زیست‌فناوری

پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست‌فناوری گرایش میکروبی

خانم مژگان مومنی

تحت عنوان:

تولید و خالص سازی بتا لاکتوگلوبولین گاوی وحشی و نوترکیب C121S در مخمر پیشیا پاستوریس

در تاریخ ۱۳۹۰/۸/۳۰ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه ..... به تصویب نهایی رسید.

۱- اساتید راهنمای پایان نامه	دکتر مهرناز کیهان‌فر	با مرتبه‌ی علمی استادیار	امضا
	دکتر عبدالخالق بردبار	با مرتبه‌ی علمی استاد	امضا
۲- استاد مشاور پایان نامه	دکتر اصغر طاهری کفرانی	با مرتبه‌ی علمی استادیار	امضا
۳- استاد داور داخل گروه	دکتر حسن محبت‌کار	با مرتبه‌ی علمی دانشیار	امضا
۴- استاد داور خارج گروه	دکتر ابوالقاسم اسماعیلی	با مرتبه‌ی علمی استادیار	امضا

امضای مدیر گروه

تقدیم به

آن دو فرشته‌ای که خرج کردند از وجودشان برای وجودم

رنج کشیدند برای آسایش من

و پیر شدند برای جوانی من

پدر بزرگوار و مادر عزیز و مهربانم

و به تمام کسانی که نیک می اندیشند و جز رضای الهی و پیشرفت و سعادت جامعه، هدفی ندارند.

دانشمندان، بزرگان و جوانمردانی که جان و مال خود را در حفظ و اعتلای این مرز و بوم فدا نموده و

می نمایند.

سپاسگزاری:

سپاس خدای را که هر چه دارم از اوست و بزرگترین امید و یاور در لحظه لحظه زندگی‌ام است...

از راهنمایی‌های اساتید ارجمندم؛ سرکار خانم دکتر مهرناز کیهانفر، جناب آقای دکتر عبدالخالق بردبار و جناب آقای دکتر اصغر طاهری بی‌نهایت سپاس گزارم.

از دوستان و همکلاسی‌های عزیزم خانم‌ها عابدی، محمدی، سیدی‌پور، بنده‌علی، صداقت، غلامی، موسوی، جهاندار، پوریانژاد و طاهرزاده کمال تشکر را داشته، صمیمیت و لطف بی‌دریغ‌شان را ارج می‌نهم.

به امید آنکه توفیق یابیم جز خدمت به خلق نکوشیم.

چکیده

بتالاکتوگلوبولین (BLG) مهمترین پروتئین آب پنیر شیر گاو محسوب می‌گردد که غلظت متوسط آن حدوداً ۳-۲ گرم در لیتر است. این پروتئین متعلق به خانواده پروتئین‌های لیپوکالین و یکی از اصلی‌ترین حساسیت‌زاهای شیر گاو می‌باشد. BLG یک پروتئین کروی کوچک با ۱۶۲ اسیدآمینه (۱۸۴۰۰ دالتون) است که دارای دو پیوند دی‌سولفیدی (Cys۱۶۰–Cys۶۶ و Cys۱۱۹– Cys۱۰۶) و یک سیستئین آزاد در موقعیت ۱۲۱ می‌باشد. سیستئین آزاد نقش مهمی در متراکم شدن القا شده توسط گرما و احتمالاً پایداری ساختاری BLG ایفا می‌کند. در یک نوع نوترکیب این پروتئین Cys۱۲۱ توسط سرین جایگزین شده که در نتیجه از متراکم شدن پروتئین جلوگیری می‌کند. مطالعات گسترده‌ای بر روی این پروتئین انجام شده که نشان می‌دهد BLG گاوی به لیگاندهای کوچکی نظیر اسیدهای چرب و ویتامین‌ها متصل می-شود. اگرچه خواص فیزیکی و شیمیایی BLG گاوی به خوبی مشخص گردیده، اما عملکرد زیستی آن هنوز به طور کامل شناخته نشده است.

در این پژوهش در ابتدا BLG نوع وحشی (WT) و جهش‌یافته Cys۱۲۱Ser با استفاده از مخمر پیشیاپاستوریس تولید شد. سپس با توجه به اهمیت BLG به عنوان یکی از اصلی‌ترین پروتئین‌های شیر و عملکرد ویژه آن در حمل لیگاندهای آبگریز به خصوص رتینول، با استفاده از تکنیک فلورسانس، اتصال رتینول به هر یک از بتالاکتوگلوبولین‌های طبیعی، WT و جهش‌یافته C۱۲۱S مقایسه شد. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که اتصال رتینول به هر یک از BLGهای طبیعی و WT کاملاً با یکدیگر مشابه است ولی نوع جهش‌یافته C۱۲۱S افزایش ۵ برابری را در اتصال به رتینول نشان می‌دهد. به منظور بررسی محل اتصال رتینول از نرم‌افزار اتوداک استفاده شد که نتایج حاصل از آن نشان داد، محل اتصال رتینول در BLG طبیعی، حفره کالیکس و در BLG جهش‌یافته C۱۲۱S، حفره آبگریز بین کالیکس و مارپیچ آلفا است.

همچنین از آن‌جایی که BLG شیر گاو یکی از مهم‌ترین حساسیت‌های غذایی محسوب می‌شود که اپی‌توپ‌های خطی و غیرخطی موجود در ساختار آن مسؤل واکنش‌های ایمنی هستند، بنابراین شناسایی اپی‌توپ‌های این پروتئین با استفاده از پایگاه‌های کامپیوتری انجام شد و نتایج حاصل از آن با اپی‌توپ‌های شناسایی شده توسط روش‌های آزمایشگاهی مقایسه گردید. بررسی‌ها سه توالی LIVTQTMKGLDIQK، VEELKPTPEGDLEIL, IRLSFNPTQLEEQCHI را به عنوان اپی‌توپ‌های BLG شناسایی کردند.

واژه‌های کلیدی: بتالاکتوگلوبولین، مخمر پیشیاپاستوریس، فلورسانس، رتینول، پیش‌بینی اپی‌توپ

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و مروری بر منابع

۱-۱- شیر ۱
۱-۱-۱- خواص عمومی شیر ۱
۱-۱-۲- پروتئین‌های شیر گاو ۲
۱-۲-۱- ساختار مولکولی BLG گاوی ۵
۱-۲-۱-۱- نقش سیستئین۱۲۱ آزاد بر روی ساختار BLG ۹
۱-۲-۲- عملکرد زیستی BLG ۱۱
۱-۲-۳- پایداری BLG در دستگاه گوارش ۱۳
۱-۲-۴- اثر گرما بر روی BLG ۱۳
۱-۲-۵- اثر فشار بر روی BLG گاوی ۱۵
۱-۲-۶- بررسی نحوه اتصال لیگاند به BLG ۱۶
۱-۲-۶-۱- روش‌های بررسی اتصال لیگاند در شرایط آزمایشگاهی ۱۶
۱-۲-۶-۲- بررسی اتصال لیگاند به پروتئین با استفاده از نرم‌افزار داکینگ ۱۸
۱-۲-۶-۳- اتصال رتینول به BLG و مقایسه آن با پروتئین‌های متصل شونده به رتینول در پلاسما ۱۹
۱-۳- حساسیت چیست؟ ۲۲
۱-۳-۱- حساسیت غذایی ۲۳
۱-۳-۲- حساسیت به شیر گاو و BLG ۲۳
۱-۳-۳- تولید IgE ۲۴
۱-۳-۴- اثر فرآوری شیر بر روی حساسیت‌زایی شیر گاو ۲۴
۱-۴- پیش‌بینی اپی‌توپ و پپتیدهای سنتزی آنتی‌ژنی ۲۵
۱-۴-۱- روش‌های کامپیوتری پیش‌بینی اپی‌توپ ۲۷
۱-۴-۱-۱- پیش‌بینی اپی‌توپ‌های خطی ۲۷

عنوان **صفحه**

۱-۴-۱-۲- پیش‌بینی اپی‌توپ‌های غیرخطی ۲۸
۱-۵- اهداف پژوهش ۳۱

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱- وسایل و دستگاه‌های مورد استفاده ۳۲
۲-۱-۱- خطای ابزاری ۳۳
۲-۲- سویه میکروبی مورد استفاده ۳۳
۲-۳- مواد مورد استفاده ۳۴
۲-۴- محیط‌های کشت و روش تهیه آن‌ها ۳۵
۲-۴-۱- محیط پپتون دکستروز مخمری (YPD) ۳۵
۲-۴-۲- محیط عصاره مخمر پپتونی (YEP) ۳۵
۲-۴-۳- محیط مخمری بر پایه نیتروژن (YNB) ۳۶
۲-۵- تهیه بافر فسفات ۱ مولار با pH ۷/۴ ..... ۳۶
۲-۶- تهیه محلول ذخیره گلوکز ۳۰٪ ۳۶
۲-۷- کشت مخمر پیشیاپاستوریس بر روی محیط YPD-آگار ۳۷
۲-۸- تهیه محلول‌های مورد نیاز برای SDS-PAGE کاهشی ۳۸
۲-۸-۱- تهیه محلول آکریل‌آمید و بیس‌آکریل‌آمید ۴۰٪ ۳۸
۲-۸-۲- تهیه محلول آمونیوم پرسولفات ۱۰٪ ۳۹
۲-۸-۳- تهیه محلول رنگ‌آمیزی کوماسی‌بلو ۴۰
۲-۸-۴- تهیه محلول رنگ‌بر ۴۰
۲-۸-۵-تهیه بافر مهاجرت ۴۰
۲-۹- تکنیک SDS-PAGE کاهشی ۴۰
۲-۱۰- آماده کردن نمونه‌ها به منظور تزریق بر روی ژل ۴۲
۲-۱۱- روش رنگ‌آمیزی کوماسی‌بلو ۴۳
۲-۱۲- استفاده از سانتریکون به منظور تغلیظ و خالص‌سازی BLG ۴۳
۲-۱۳- روش برادفورد ۴۴
۲-۱۳-۱- تهیه محلول برادفورد ۴۵

۲-۱۳-۲- استاندارد پروتئینی ۴۵
۲-۱۴- تهیه محلول‌های مورد نیاز برای انجام فلورسانس ۴۶
۲-۱۴-۱- تهیه محلول ۰/۵ میلی‌مولار رتینول ۴۶
۲-۱۴-۲- تهیه محلول ۵ میکرومولار BLG ۴۶
۲-۱۴-۳- تیتراسیون فلوریمتری BLG توسط رتینول ۴۷
۲-۱۵- فرایند داکینگ با استفاده از نرم‌افزار اتوداک ۴۹
۲-۱۵-۱- آماده‌سازی پروتئین و لیگاند ۴۹
۲-۱۵-۲- تنظیم کردن جعبه اتصال ۴۹
۲-۱۵-۳- انجام محاسبه و تحلیل نتایج داکینگ ۴۹
۲-۱۶- استفاده از پایگاه‌ها برای پیش‌بینی اپی‌توپ ۵۰
۲-۱۶-۱- پایگاه‌های پیش‌بینی کننده اپی‌توپ‌های خطی ۵۰
۲-۱۶-۲- پایگاه‌های پیش‌بینی‌کننده اپی‌توپ‌های غیرخطی ۵۱
۲-۱۷- تعیین ساختار دوم BLG ۵۱
۲-۱۸- بررسی ویژگی‌های فیزیکی- شیمیایی پپتیدها ۵۱

فصل سوم: نتایج

۳-۱- نتایج تولید و خالص‌سازی BLGهای نوترکیب وحشی و جهش‌یافته C۱۲۱S ۵۲
۳-۱-۱- تولید پروتئین‌های نوترکیب ۵۲
۳-۱-۲- خالص‌سازی پروتئین‌های نوترکیب ۵۴
۳-۲- نتایج تست برادفورد ۵۵
۳-۳- نتایج تیتراسیون فلوریمتری BLG با رتینول ۵۵
۳-۴- نتایج حاصل از داکینگ BLG طبیعی و جهش‌یافته C۱۲۱S با رتینول ۶۲
۳-۵- نتایج حاصل از پیش‌بینی اپی‌توپ‌های خطی و غیرخطی سلول B ۶۶
۳-۵-۱- پیش‌بینی اپی‌توپ‌های خطی سلول B ۶۶
۳-۵-۲- پیش‌بینی اپی‌توپ‌های غیرخطی مربوط به سلول‌های B ۶۷
۳-۶- نتایج تعیین ساختار دوم در BLG ۶۸

فصل چهارم: بحث

۴-۱- تولید و خالص‌سازی BLG نوترکیب وحشی و جهش‌یافته C۱۲۱S در مخمر پیشیاپاستوریس ۷۰

۴-۲- بررسی اتصال رتینول به BLGهای نوترکیب وحشی و جهش‌یافته C۱۲۱S ۷۱
۴-۳- بررسی اپی‌توپ‌های سلول B در BLG..... ۷۳
۴-۴- پیشنهادات ۷۶
منابع و مآخذ ۷۷

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱، دنباله‌های اسیدآمینه‌ای بتالاکتوگلوبولین گاوی نوع A (www.pdb.org, code 1BEB) ۶

شکل۱-۲، ساختار مونومر و دیمر BLG. الف) ساختار BLG گاوی مونومر که در آن ۸ رشته بتای غیرموازی (A-H) یک حفره آبگریز تشکیل می‌دهند، که اطراف آن حلقه‌های انعطاف‌پذیر AB، CD، EF و GH قرار دارند. ب) ساختار BLG گاوی دیمر که در آن دو پروتئین مونومر با تشکیل پیوند هیدروژنی از طریق اسیدآمینه‌های ۱۵۰-۱۴۶ دیمر BLG را تشکیل می‌دهد (Vetri and Militello 2005) ۸

شکل ۱-۳، شمایی از دیمر بتالاکتوگلوبین نوع A. محل پیوندهای دی‌سولفیدی، گروه تیول آزاد و دو اسیدآمینه تریپتوفان نشان داده شده است (Sakai *et al.* 2000) ۱۱

شکل ۱-۴، شمایی از پروتئین متصل شونده به رتینول (Kontopidis *et al.* 2002) ۱۹

شکل۱-۵، ساختار مولکولی رتینول (Cho *et al.* 1994) ۲۰

شکل ۲-۱، نمایی از یک سانتریکون ۴۴

شکل ۲-۲، نمایی از نرم‌افزار اتوداک و جعبه اتصال که پروتئین و لیگاند در آن قرار گرفته است ۵۰

شکل ۳-۱، کلونی‌های مخمر پیشیاپاستوریس بر روی محیط YPD-آگار ۵۳

شکل ۳-۲، نتایج SDS-PAGE کاهشی ۱۲٪. شماره ۱ معرف BLG طبیعی، شماره‌های ۲،۳،۴ معرف BLG وحشی و شماره‌های ۵،۶،۷،۸ معرف BLG جهش‌یافته C121S می‌باشند. ۵۳

شکل ۳-۳، نتایج SDS-PAGE کاهشی ۱۲٪ خالص‌سازی با سانتریکون. شماره ۱ BLG طبیعی، شماره ۲ BLG جهش‌یافته C۱۲۱S و شماره ۳ BLG نوترکیب وحشی را نشان می‌دهد ۵۴

شکل ۳-۴، منحنی استاندارد تست برادفورد ۵۵

شکل ۳-۵، طیف نشری BLG طبیعی با غلظت ۵ میکرومولار در حضور مقادیر مختلف از رتینول ۰/۵ میلی-مولار در pH ۶/۷ در دمای ۲۵ °C. طول موج برانگیختگی برابر ۲۸۰ نانومتر بوده و از طول موج ۳۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر پیمایش گردیده است ۵۷

شکل ۳-۶، تغییرات نشر در طول موج ۳۳۰ نانومتر محلول BLG طبیعی ۵ میکرومولار در pH ۶/۷ در دمای ۲۵ °C در مقابل نسبت مولی [Retinol]/[BLG] ۵۸

شکل ۳-۷، نمودار $\mathbf{P_0\,\alpha}$ نسبت به $\frac{R_0\alpha}{1-\alpha}$ به دست آمده توسط روش کوگان حاصل از نتایج فلورسانس BLG طبیعی در حضور غلظت‌های متفاوت رتینول در بافر فسفات۵۰ میلی‌مولار pH ۶/۷ و دمای $20^{\circ}C$ ۵۸
شکل ۳-۸، طیف نشری BLG نوترکیب وحشی با غلظت ۵ میکرومولار در حضور مقادیر مختلف از رتینول ۰/۵ میلی‌مولار در pH ۶/۷ در دمای $25^{\circ}C$ ۵۹
شکل ۳-۹، تغییرات نشر در طول موج ۳۳۰ نانومتر محلول BLG نوترکیب وحشی ۵ میکرومولار در pH ۶/۷ در دمای $25^{\circ}C$ در مقابل نسبت مولی [Retinol]/[BLG] ۵۹
شکل ۳-۱۰، نمودار $\mathbf{P_0\,\alpha}$ نسبت به $\frac{R_0\alpha}{1-\alpha}$ به دست آمده توسط روش کوگان حاصل از نتایج فلورسانس BLG نوترکیب وحشی در حضور غلظت‌های متفاوت رتینول در بافر فسفات۵۰ میلی‌مولار pH ۶/۷ و دمای $20^{\circ}C$ ۶۰
شکل ۳-۱۱، طیف نشری BLG جهش‌یافته C۱۲۱S با غلظت ۵ میکرومولار در حضور مقادیر مختلف از رتینول ۰/۵ میلی‌مولار در pH ۶/۷ در دمای $25^{\circ}C$ ۶۰
شکل ۳-۱۲، تغییرات نشر در طول موج ۳۳۰ نانومتر محلول BLG جهش‌یافته C۱۲۱S ۵ میکرومولار در pH ۶/۷ در دمای $25^{\circ}C$ در مقابل نسبت مولی [Retinol]/[BLG]. ۶۱
شکل ۳-۱۳، نمودار $\mathbf{P_0\,\alpha}$ نسبت به $\frac{R_0\alpha}{1-\alpha}$ به دست آمده توسط روش کوگان حاصل از نتایج فلورسانس BLG جهش‌یافته C۱۲۱S در حضور غلظت‌های متفاوت رتینول در بافر فسفات۵۰ میلی‌مولار pH ۶/۷ و دمای $20^{\circ}C$ ۶۱
شکل ۳-۱۴، شناسایی محل اتصال رتینول به BLG طبیعی با استفاده از نرم‌افزار اتوداک. نتایج حاصل از داکینگ این پروتئین با رتینول نشان می‌دهد که لیگاند به کالیکس مرکزی متصل می‌شود. در این شکل پروتئین به صورت ریبون و با رنگ آبی و رتینول به صورت گوی و میله و با رنگ قرمز نشان داده شده است..... ۶۳
شکل ۳-۱۵، شناسایی محل اتصال رتینول به BLG جهش‌یافته C۱۲۱S با استفاده از نرم‌افزار اتوداک. ۶۴
شکل ۳-۱۶، شناسایی اسیدآمینه‌های BLG طبیعی تعامل کننده با رتینول با استفاده از نرم‌افزار اتوداک ۶۵
شکل ۳-۱۷، شناسایی اسیدآمینه‌های BLG جهش‌یافته C۱۲۱S تعامل کننده با رتینول با استفاده از نرم‌افزار اتوداک ۶۵
شکل ۳-۱۸، تعیین ساختار دوم BLG با استفاده از نرم‌افزار Molegro. صفحات بتا و مارپیچ آلفا با خط مستقیم به ترتیب با رنگ آبی و قرمز بر روی توالی مشخص شده است ۶۹

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱، غلظت پروتئین‌های اصلی شیر ۴
جدول ۲-۱، فهرست دستگاه‌ها و وسایل مورد استفاده به همراه شرکت تولیدکننده ۳۲
جدول ۲-۲، فهرست مواد شیمیایی مورد استفاده به همراه شرکت تولیدکننده ۳۴
جدول ۲-۳، ترکیب ژل الکتروفورز SDS-PAGE کاهشی ۱۲٪ ۴۲
جدول ۲-۴، حجم مورد استفاده از هر یک از محلول‌ها جهت رسم منحنی استاندارد ۴۵
جدول ۲-۵، حجم مورد استفاده برای نمونه مجهول ۴۶
جدول ۲-۶، پایگاه‌های پیش‌بینی اپی‌توپ‌های خطی به همراه آدرس اینترنتی آن‌ها ۵۱
جدول ۲-۷، پایگاه‌های پیش‌بینی اپی‌توپ‌های غیرخطی به همراه آدرس اینترنتی آن‌ها ۵۱
جدول ۳-۱، نتایج مربوط به ثابت تفکیک ظاهری BLGهای طبیعی، وحشی و جهش‌یافته C۱۲۱S ۵۶
جدول ۳-۲، انرژی آزاد حاصل از اتصال رتینول به BLGهای طبیعی و جهش‌یافته C۱۲۱S ۶۲
جدول ۳-۳، ثابت‌های تفکیک ظاهری به دست آمده از نتایج داکینگ برای BLGهای طبیعی و جهش‌یافته C۱۲۱S ۶۲
جدول ۳-۴، بررسی ویژگی‌های اسیدآمینه‌های موجود در توالی BLG بر اساس الگوریتم‌های مختلف ذکر شده ۶۶
جدول ۳-۵، اپی‌توپ‌های غیرخطی پیش‌بینی شده توسط پایگاه‌های اینترنتی ۶۷
جدول ۳-۶، بهترین اپی‌توپ‌های سلول B پیش‌بینی شده در BLG گاوی توسط پایگاه‌های اینترنتی ۶۸
جدول ۳-۷، موقعیت صفحات بتا و مارپیچ آلفا در BLG ۶۹

فهرست اختصارات

معادل (برگردان فارسی)	مخفف	واژه انگلیسی
بتالاکتوگلوبولین	BLG	Beta-lactoglobolin
آلبومین سرم گاوی	BSA	Bovine serum albumin
محیط کمپلکس گلیسرول بافر شده	BMGY	Buffered glycerol complex medium
دو رنگ نمایی چرخشی	CD	Circular dichorism
پروتئین متصل شونده به رتینول	RBP	Retinol binding protein
سدیم دودسیل سولفات	SDS	Sodium dodesil sulphate
تمد	TEMED	Tetramethylethyldiamine
نوع وحشی	WT	Wild type
عصاره مخمر پپتونی	YEP	Yeast extract peptone
محیط مخمری بر پایه نیتروژن	YNB	Yeast nitrogen base
پپتون دکستروز مخمری	YPD	Yeast peptone dextrose

فصل اول

مقدمه و مروری بر منابع

۱-۱- شیر

۱-۱-۱- خواص عمومی شیر

شیر مایعی است که توسط جنس ماده در تمام پستانداران (۴۵۰۰ گونه) به منظور رفع نیازهای نوزادانشان تولید می‌شود. اصلی‌ترین نیازها شامل، تأمین انرژی (که توسط چربی‌ها، قندها و پروتئین‌های مازاد تأمین می‌شود)، بیوسنتز زیستی اسیدآمینه‌های غیرضروری از اسیدآمینه‌های ضروری (که توسط پروتئین‌ها تأمین می‌شود)، اسیدهای چرب ضروری، ویتامین‌ها، عناصر معدنی و آب می‌باشد. به دلیل اینکه نیازهای غذایی نوزاد به میزان بلوغ آن در هنگام تولد، سرعت رشد نوزاد و میزان نیازش به انرژی وابسته است، از این‌رو ترکیب اصلی شیر در گونه‌های مختلف متفاوت است (Fox and McSweeney 1998). هم‌چنین شیر شامل مقادیر متفاوتی از چربی‌ها، قندها، پروتئین‌ها، مواد معدنی، همه ویتامین‌های ضروری، لوکوسیت‌ها، فاکتورهای رشد، آنزیم‌ها، مهارکننده‌های آنزیمی، ایمونوگلوبولین‌ها، پپتیدها و پروتئین‌های ضد باکتری می‌باشد. اگرچه شیر اصولاً برای تغذیه نوزاد تولید می‌شود، ترکیبات شیر عملکردهای فیزیولوژیکی مهمی مثل تنظیم سیستم ایمنی، پاسخ‌های رشد و هورمونی و فعالیت‌های ضدباکتریایی انجام می‌دهند، بنابراین می‌تواند بر روی سلامتی نوزاد و مادر تأثیر به‌سزایی داشته باشند (Farrell and Thompson 1990, Meisel 1997). غلظت ترکیبات اصلی شیر بین گونه‌های مختلف بسیار متفاوت است، به نحوی که چربی‌ها بین ۵۵-۲ درصد، پروتئین‌ها بین ۲۰-۱ درصد و قندها بین ۱۰-۰ درصد متغیر

می‌باشند. برای مثال میزان پروتئین شیر انسان ۰/۹ گرم در هر ۱۰۰ میلی‌لیتر است (افزایش دو برابری وزن در طی ۱۸۰-۱۲۰ روز نسبت به هنگام تولد)، در حالی‌که در شیر موش این مقدار ۸/۱ گرم در هر ۱۰۰ میلی‌لیتر می‌باشد (افزایش دو برابری وزن در طی ۲ روز نسبت به هنگام تولد) (Hambraeus and Lonnerdal 2003).

۱-۱-۲- پروتئین‌های شیر گاو[1]

خواص شیر و اکثر محصولات لبنی بیشتر تحت تاثیر مقدار پروتئین موجود در آن است. پروتئین‌های شیر به دلیل خواص منحصر به فرد و اهمیت فرآوری‌شان تحت مطالعات بسیاری قرار گرفته‌اند. تحقیق بر روی پروتئین‌های شیر از اوایل قرن ۱۹ میلادی آغاز شد. نخستین کارها توسط برزلیوس[2] در ۱۸۱۴ میلادی و شوبلر[3] در ۱۸۱۸ میلادی بر روی خواص شیمیایی و فیزیکی پروتئین‌های شیر انجام شد. برای اولین بار کلمه کازئین[4] توسط بارکونوت[5] در ۱۸۳۰ میلادی به‌کار رفت و عبارت کازئین برای پروتئین‌های شیر که در pH ۴/۶ نامحلول هستند، عمومیت پیدا کرد. یک روش برای جدا کردن پروتئین از شیر به شیوه رسوب‌دهی اسیدی در ۱۹۳۸ توسط مولدر[6] به چاپ رسید که در آن از عبارت پروتئین استفاده شد (Fox 1992). مایع آب پنیر[7] که بعد از رسوب‌دهی ایزوالکتریک کازئین از خامه شیر یا کل شیر باقی می‌ماند، یک محلول رقیق شامل مخلوطی از پروتئین‌ها (۰/۷ درصد)، لاکتوز، نمک-های معدنی و آلی، ویتامین‌ها و مقادیر ناچیزی از ترکیبات دیگر است. تفکیک پروتئین‌های آب‌پنیر توسط سبلین[8] با استفاده از نمک‌زدایی با سولفات منیزیم در سال ۱۸۸۵ به اجزای محلول (آلبومین[9]) و نامحلول (گلوبولین[10]) صورت گرفت.

در سال ۱۸۸۹ ویچمن[11] یک پروتئین از اجزاء آلبومین آب پنیر را بوسیله سولفات‌آمونیوم و اسیدی کردن متبلور کرد، که قبلاً از این روش برای متبلور کردن آلبومین و اوالبومین[12] سرم خون استفاده می‌شده است. با استفاده از روش‌های موجود در ۱۰۰ سال پیش، مشخص شد که پروتئین‌های موجود در آب پنیر بسیار شبیه به اجزاء موجود در پروتئین‌های خون هستند. بررسی‌ها نشان دادند که این پروتئین‌ها به‌طور مستقیم از خون به شیر منتقل می‌شوند.

---

[1] Cow's milk proteins
[2] Berzelius
[3] Schubler
[4] Casein
[5] Barconnot
[6] Mulder
[7] Whey
[8] Sbelein
[9] Albumin
[10] Globulin
[11] Wichmann
[12] Ovalbumin

ترکیب شیر علاوه بر کازئین و پروتئین‌های آب پنیر شامل دو گروه دیگر از مواد شبه پروتئینی، پروتئوزپپتون‌ها[1] و نیتروژن‌های غیر پروتئینی[2]، نیز هستند که در سال ۱۹۳۸ توسط راولند[3] کشف شدند. او مشاهده کرد که بعد از حرارت دادن چربی شیر در دمای $95\ ^{\circ}C$ به مدت ۱۰ دقیقه، بر اثر اسیدی نمودن تا pH ۴/۶، پروتئین‌های آب پنیر با کازئین‌ها رسوب می‌کنند. زمانی‌که به اجزای محلول شیر حرارت داده شده در pH ۴/۶، اسیدتری‌کلرواستیک[4] ۱۲ درصد اضافه شد، تعدادی ترکیبات نیتروژن‌دار رسوب کردند که پروتئوزپپتون نامیده شدند، همچنین ترکیبات نیتروژنی که به صورت محلول باقی می‌مانند، نیتروژن‌های غیر پروتئینی نام گرفتند (Fox and MacSweeney 2003).

شیر گاو منبع مهمی از پروتئین‌ها با ارزش غذایی بالا است. شیر گاو در حدود ۲۵ نوع پروتئین دارد که در هر لیتر آن ۳۵-۳۰ گرم پروتئین موجود است. با فعالیت کیموزین[5] (رنین[6]) یا اسیدی شدن[7] شیر در pH ۴/۶ دو قسمت شامل آب پنیر در حدود ۲۰ درصد از پروتئین‌های شیر گاو، و شیر بسته شده[8] در حدود ۸۰ درصد از پروتئین‌های شیر گاو ایجاد می‌شوند. کازئین، اصلی‌ترین پروتئین شیر بسته شده، شامل ۴ پروتئین (α_{s1}، α_{s2}، β و κ) کد شده به‌وسیله ژن‌های متفاوت است که بر روی یک کروموزوم قرار گرفته‌اند (Wal 2001).

۱-۱-۳- پروتئین‌های آب پنیر

آب پنیر از شیر بسته شده در طی تولید پنیر جدا می‌شود و شامل لاکتوز، پروتئین‌ها و لیپید است. پروتئین‌های آب پنیر شامل دو گروه هستند: لاکتالبومین‌ها که در محلول اشباع ۵۰ درصد از سولفات آمونیوم یا سولفات منیزیم محلول‌اند و لاکتوگلوبولین‌ها که در این شرایط به صورت نمک نامحلول وجود دارند. اجزای لاکتوگلوبولین‌ها عموماً شامل ایمونوگلوبولین[9]ها هستند. لاکتالبومین‌ها از دو نوع پروتئین اصلی بتالاکتوگلوبولین[10] و آلفالاکتولبومین[11] و چندین پروتئین جزئی دیگر شامل آلبومین سرم[12] خون و لاکتوفرین[13]، تشکیل شده است

[1] Proteinaceous material proteos peptones
[2] Non-protein nitrogen
[3] Rawland
[4] Trichloroacetic acid
[5] Chymosin
[6] Renin
[7] Acidification
[8] Coagulum
[9] Immunoglobulin
[10] Beta-lactoglobulin(BLG)
[11] α-lactalbumin(ALA)
[12] Serum albumin
[13] Lactoferrin

(Imafidon *et al*. 1997, Fox 2003). بتالاکتوگلوبولین و آلفالاکتالبومین در غده شیری سنتز می‌شوند در حالی‌که بقیه پروتئین‌ها مثل آلبومین سرم گاوی از خون نشأت می‌گیرند (Korhonen 2009).

پروتئین‌های آب پنیر دارای ساختار پایداری هستند ولی ۴ نوع کازئین ساختار دوم[1] پایداری ندارند که به دلیل داشتن مقدار بیشتری از اسیدآمینه ساختارشکن پرولین[2] است، به خصوص بتاکازئین که دارای ۳۵ پرولین از ۲۰۹ دنباله اسیدآمینه‌ای خود می‌باشد. انعطاف‌پذیری ساختار کازئین باعث مستعد شدن آن برای پروتئولیز می‌شود که عملکرد طبیعی آن را به عنوان منبع اسیدهای آمینه تسهیل می‌کند (Holt and Sawyer 1993). در مقابل، پروتئین‌های طبیعی آب پنیر کاملاً در برابر هضم پایدار هستند و مقداری از آن‌ها از طریق مدفوع نوزادان دفع می‌شود. با توجه به مقاوم بودن اکثر پروتئین‌های آب پنیر در برابر هضم، عملکرد غیرتغذیه‌ای آن‌ها در روده از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Sawyer and Kontopidis 2000). امروزه علاقه فراوانی به تولید تجاری پروتئین‌های اصلی و جزئی آب پنیر برای مصارف تغذیه‌ای و کاربردهای وابسته وجود دارد و روش‌های متعددی برای تولید تعداد زیادی از پروتئین‌های آب‌پنیر در مقیاس صنعتی توسعه یافته است (Mulvihill and Ennis 2003).

جدول۱-۱، غلظت پروتئین‌های اصلی شیر

	پروتئین	غلظت در شیر گاو(g/L)	درصد تقریبی در بین کل پروتئین‌های شیر گاو
کازئین	آلفا کازئین	۱۵-۱۹	۴۲
	بتا کازئین	۹-۱۱	۲۵
	کاپا کازئین	۳-۴	۹
	گاما کازئین	۱-۲	۴
آب پنیر	بتالاکتوگلوبولین	۲-۴	۹
	آلفالاکتالبومین	۱-۱/۵	۴
	پروتئوز پپتون	۰/۶-۱/۸	۴
	آلبومین سرم گاوی	۰/۱-۰/۴	۱
	ایمونوگلوبولین	۰/۶-۱	۲

[1] Second structure
[2] Proline

۱-۲- بتالاکتوگلوبولین شیر گاو

بتالاکتوگلوبولین (BLG) در حدود ۵۰ درصد از پروتئین‌های آب پنیر و ۱۲ درصد از کل پروتئین‌های شیر گاو را تشکیل می‌دهد. BLG پروتئین اصلی آب پنیر در شیر گاو، بوفالو[1]، گوسفند و بز است (اگرچه اندکی تفاوت‌های درون گونه‌ای نیز وجود دارد). در ابتدا مشخص شد که BLG فقط در شیر نشخوارکنندگان وجود دارد ولی هم-اکنون می‌دانیم که در شیر بسیاری از گونه‌های دیگر شامل: گوزن، خوک، کانگورو، اسب، میش، دلفین، گربه، نهنگ و سگ نیز وجود دارد (Pervaiz and Brew 1986). با این حال در شیر انسان، موش، خوکچه هندی و شتر دیده نشده است. آلفالاکتالبومین عمده‌ترین پروتئین آب پنیر در این گونه‌ها می‌باشد (Sawyer and Kontopidis 2000).

BLG پروتئین اصلی آب پنیر شیر گاو با غلظت متوسط حدوداً ۳-۲ گرم در لیتر است (Kontopidis *et al.* 2004). این پروتئین متعلق به خانواده پروتئینی لیپوکالین است (Sawyer and Kontopidis 2000). لیپوکالین‌ها عموماً پروتئین‌های کوچکی با ۱۸۰-۱۶۰ اسیدآمینه هستند که همگی آنها در یکسری خواص با هم مشترک می-باشند. آنها می‌توانند با مولکول‌های آبگریز[2] کوچک پیوند برقرار کنند، کمپلکس‌هایی با ماکرومولکول‌های محلول دیگر ایجاد نمایند و به گیرنده‌های خاصی روی سطح سلول متصل شوند. همچنین نشان داده شده است که BLG گاوی به لیگاندهای کوچکی مانند اسیدهای چرب و ویتامین‌ها متصل می‌شود (Kontopidis *et al.* 2002). اگرچه ویژگی‌های فیزیکی-شیمیایی BLG گاوی به خوبی مشخص شده ولی عملکردهای زیستی آن کاملاً شناسایی و تأیید نشده است. این پروتئین به طور گسترده از زمانی که برای اولین بار در ۱۹۳۴ توسط پالمر[3] از شیر گاو خالص‌سازی[4] شد، مورد مطالعه قرار گرفته است (Palmer 1934).

۱-۲-۱- ساختار مولکولی BLG گاوی

BLG در سلول‌های اپیتلیال[5] ترشحی غده پستانی، تحت کنترل هورمون پرولاکتین[6] تولید می‌شود (Larson 1972). RNAای که مسئول کدکردن این پروتئین در غده پستانی است به پیش پروتئینی با ۱۸۰ اسیدآمینه ترجمه می‌شود و سپس پپتید پیام‌رسان، ۱۸ اسیدآمینه‌ای بسیار محافظت شده، حذف می‌گردد (Yoshikawa *et al.* 1978). ساختار BLG از ۱۶۲ اسیدآمینه با وزن مولکولی حدود ۱۸/۴ کیلودالتون تشکیل شده است

[1] Buffalo
[2] Hydrophobic
[3] Palmer
[4] Purification
[5] Epithelial
[6] Prolactin