

Investigating the Interaction between Cyanidin-3-Glucoside and Grass Pea (*Lathyrus sativus* L.) Protein Isolate in Acidic Conditions via Fluorescence Quenching Approach

S.H. Razavizadegan Jahromi^{1*}, R. Farhoosh²

1- Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
(* - Corresponding Author Email: sh.razavizadegan@iut.ac.ir)

2- Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Received: 31.08.2025
Revised: 14.10.2025
Accepted: 21.10.2025
Available Online: 16.11.2025

How to cite this article:

Razavizadegan Jahromi, S.H., & Farhoosh, R. (2025). Investigating the interaction between Cyanidin-3-Glucoside and Grass pea (*Lathyrus sativus* L.) protein isolate in acidic conditions via fluorescence quenching approach. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 21(5), 529-547. (In Persian with English abstract).
<https://doi.org/10.22067/ifstrj.2025.95191.1472>

Introduction

Investigating anthocyanin-protein complexes is important for the food industry from several perspectives. 1) Utilizing the anthocyanin-protein complex formation method to stabilize anthocyanin pigments in food products against external factors. This is achieved through various physical interactions with different bond strengths established between their binding sites. Studies have shown that the higher the binding constant of this interaction and the stoichiometric ratio between them, the lower the concentration of free anthocyanin remains in the environment, and most anthocyanins are found bound to the protein. In this state, the stability of anthocyanin against external factors increases due to the physical bonds formed with the protein, and its structure is not degraded. 2) Changes in the physicochemical and physiological properties of anthocyanin. For example, it has been proven that the antioxidant properties of anthocyanins decrease in the presence of proteins. 3) The effect of this complex on protein digestibility, which plays a significant role in the nutritional value of the system under study. 4) Production of modified biopolymer for use in food formulation. As a result of these interactions, which are as covalent or non-covalent, the functional properties of proteins are altered. Consequently, suitable raw materials can be designed for various food products.

Materials and Methods

Fluorescence emission spectra were measured using a fluorimeter (Varian Cary Eclipse, Agilent, USA) equipped with a 10 mm cell and a temperature controller at temperatures of 298, 308, and 318 K. All samples were excited at a wavelength of 280 nm, and their emission spectra were recorded in the wavelength range of 280 to 500 nm. The slit width for both excitation and emission was set at 5 nm. To record the protein fluorescence quenching spectra, a 1 mg/mL solution of grass pea protein was first prepared and titrated against different concentrations of CYG pigment (0 to 4.5×10^{-6} M). The corresponding fluorescence emission spectrum for quenching was recorded at each step. For synchronous fluorescence spectra, simultaneous scanning was performed at the absorption and emission wavelengths of the tyrosine and tryptophan amino acid chromophores of grass pea protein, where their wavelength differences ($\Delta\lambda$) were set at 15 nm and 60 nm, respectively. Three-dimensional fluorescence spectra were recorded sequentially within the excitation wavelength range of 220 to 540 nm and the emission wavelength range of 220 to 600 nm, with a consecutive 10 nm increment in the excitation wavelength. To collect Resonance Light Scattering (RLS) data, the emission intensity of the protein monochromators was recorded simultaneously in the wavelength range of 220 to 700 nm at a zero wavelength difference ($\Delta\lambda=0$) between excitation and emission. In all experiments, the concentration of CYG pigment used was in the range of 0 to 4.5×10^{-6} M.



Authors retain the copyright. This is an open access article distributed under [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

<https://doi.org/10.22067/ifstrj.2025.95191.1472>

Results and Discussion

The results indicated a key role of hydrogen bonds in the formation of the grass pea protein-CYG complex through a combined static and dynamic quenching mechanism, with a binding constant of $1.73 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ and a binding site number of 0.78 at ambient temperature. Furthermore, the synchronous and three-dimensional fluorescence spectra of the protein revealed that the CYG pigment bound near tyrosine amino acid residues in the protein structure. This binding induced a local folding change in the protein's conformation. Changes in the RLS spectra of the protein indicated that the particle size of the complex decreased at low CYG concentrations. However, when the molar ratio of CYG to protein approached 2:1, the particle size of the complex increased. The results of the protein binding site saturation also demonstrated that grass pea protein is capable of binding CYG pigment at concentrations more than two times. Therefore, the use of this complex is recommended in systems that require natural and small quantities of protein to effectively trap the CYG pigment.

Keywords: Anthocyanin, Binding and thermodynamic constants, Interaction, Fluorescence, Protein

مقاله پژوهشی

جلد ۲۱، شماره ۵، آذر- دی ۱۴۰۴، ص. ۵۲۹-۵۴۷

مطالعه برهم کنش بین رنگدانه سیانیدین-۳-گلیکوزید و ایزوله پروتئین نخود خلر (*Lathyrus sativus* L.) در شرایط اسیدی با استفاده از روش فرونشانی فلئورسانس

سید حسین رضوی زادگان جهرمی^{۱*} - رضا فرهوش^۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۶/۰۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۷/۲۹

چکیده

بررسی برهم کنش آنتوسیانین با بیوپلیمرها، اطلاعات ارزشمندی در خصوص امکان‌سنجی طراحی سامانه‌های مناسب جهت پایداری رنگدانه آنتوسیانین، تغییر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و فیزیولوژیکی آنتوسیانین و بیوپلیمر و همچنین اصلاح ساختار بیوپلیمرها جهت کاربردهای گوناگون فراهم می‌کند. در این پژوهش، برهم کنش بین پروتئین نخود خلر و رنگدانه سیانیدین-۳-گلیکوزید (CYG) در شرایط اسیدی (pH=3) توسط دستگاه فلوریمتری انجام شد و طیف‌های حاصل از فرونشانی نشر ذاتی و همزمان فلئورسانس پروتئین، طیف‌های نشر سه بعدی پروتئین، مشتق دوم طیف‌های فلئورسانس ذاتی پروتئین و پراکندگی نور رزونانس پروتئین در حضور و عدم حضور CYG بررسی شد. نتایج حاکی از نقش کلیدی پیوندهای هیدروژنی در شکل‌گیری کمپلکس پروتئین نخود خلر CYG از طریق مکانیسم همزمان استاتیک و دینامیک با ثابت اتصال $10^3 \times 1/73$ بر مولار و تعداد سایت‌های اتصال ۰/۷۸ در دمای محیط بود. همچنین، نتایج طیف‌های همزمان و سه بعدی فلئورسانس پروتئین نشان داد که رنگدانه CYG در نزدیکی‌های اسید آمینه تیروزین در ساختار پروتئین متصل شد که در اثر این اتصال، تاخوردگی موضعی در ساختار پروتئین مشاهده گردید. تغییرات طیف‌های پراکندگی نور رزونانس پروتئین نشان داد که اندازه ذرات کمپلکس در غلظت‌های پائین CYG کاهش یافته و زمانی که نسبت غلظت CYG به پروتئین نزدیک به ۲ برابر گردد، اندازه ذرات کمپلکس افزایش یافت. نتایج اشباعیت سایت‌های اتصال پروتئین نیز نشان داد که پروتئین نخود خلر قادر به اتصال رنگدانه CYG در غلظت‌های بیشتر از ۲ برابر غلظت خود می‌باشد، لذا استفاده از کمپلکس مذکور در سیستم‌هایی که نیاز به بکارگیری مقادیر کمی از پروتئین به صورت طبیعی جهت بدام انداختن رنگدانه CYG می‌باشد، پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: آنتوسیانین، برهم کنش، پروتئین، ثابت‌های اتصال و ترمودینامیکی، فلئورسانس

مقدمه

تشکیل کمپلکس‌های دو یا چند جزئی بین اجزاء یک سیستم مورد مطالعه از منظر مولکولی ارائه می‌کند (Tabasi, Maghami, Amiri, Tehranizadeh, Saberi, & Chamani, 2023) که بر اساس آن می‌توان رفتار سیستم مورد مطالعه را تفسیر کرد. از دیدگاه صنایع غذایی، دانش مولکولی برهم کنش بین ترکیبات موجود در یک ساختار غذایی می‌تواند در مواردی نظیر پایداری ترکیبات حساس بواسطه تشکیل کمپلکس‌های غذایی (Yang et al., 2023)، ریزپوشانی کردن، رهایش و زیست دسترسی ترکیبات (Joye, Davidov-Pardo, Ludescher, & McClements, 2015)، پایداری امولسیون‌های

از منظر مولکولی، زمانی که دو ترکیب در یک سیستم در کنار یکدیگر قرار می‌گیرند، در برخی از موارد، رفتارها و یا ویژگی‌های مختلفی از خود نشان می‌دهند که با ویژگی‌های هر یک از آنها بصورت منفرد متفاوت است. این تفاوت اغلب ناشی از برهم کنش ایجاد شده بین ترکیبات می‌باشد. بررسی برهم کنش‌های بین اجزاء موجود در یک سیستم، اطلاعات بسیار ارزشمندی در خصوص میل ترکیبی اجزاء بهم، نحوه شکل‌گیری کمپلکس، نوع پیوندهای درگیر در برهم کنش (Ma, Cheng, Jiao, & Jing, 2022)، ترتیب، تقدم و تأخر و رقابت بین

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران
(* نویسنده مسئول: Email: sh.razavizadegan@iut.ac.ir)

۲- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

در برابر عوامل خارجی (Cai et al., 2022; Cortez, Luna-Vital, 2017; Margulis, & Gonzalez de Mejia, 2017) برای این منظور، بدلیل حضور گروه‌های عاملی متنوع موجود در ساختار پروتئین‌ها نسبت به دیگر درشت مولکول‌ها، تمایل و میل اتصال بسیار بالای آنتوسیانین به آنها بواسطه برهم‌کنش‌های فیزیکی مختلف و متنوع با قدرت پیوندی گوناگون ایجاد شده بین سایت‌های اتصال آنها مشاهده شده است (Chung, Rojanasasithara, Mutilangi, & McClements, 2015). بررسی‌ها نشان داده است که هر چقدر ثابت اتصال این برهم‌کنش و نسبت استوکیومتری بین آنها بیشتر باشد، غلظت کمتری از آنتوسیانین بصورت آزاد در محیط باقیمانده و اغلب آنتوسیانین‌ها به صورت ترکیب با پروتئین دیده می‌شود. در این حالت، پایداری آنتوسیانین در برابر عوامل خارجی بدلیل پیوندهای فیزیکی شکل گرفته با پروتئین افزایش می‌یابد و ساختار آن تخریب نمی‌گردد (Jahromi, Farhoosh, Hemmateenejad, & Varidi, 2020). ۲- تغییر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و فیزیولوژیکی آنتوسیانین. برای مثال ثابت شده است که خواص آنتی‌اکسیدانی آنتوسیانین در حضور پروتئین‌ها کاهش می‌یابد (Zheng, Zheng, Zhao, Yi, & Cai, 2021). لذا داشتن اطلاعات در خصوص نوع برهم‌کنش و تأثیر آن بر خواص آنتوسیانینی ضرورت دارد. ۳- تأثیر این کمپلکس بر هضم‌پذیری پروتئین که نقش بسزایی در ارزش غذایی سیستم مورد بررسی دارد (Zheng et al., 2021). ۴- تولید بیوپلیمرهای اصلاح شده برای کاربرد در فرمولاسیون‌های غذایی (Li et al., 2024). در اثر این برهم‌کنش‌ها که بصورت کووالانس و غیر کووالانس برقرار می‌گردد، ویژگی‌های عملکردی پروتئین‌ها تغییر کرده، لذا می‌توان برای محصولات غذایی مختلف، مواد اولیه مناسب آن را طراحی کرد. برخی از برهم‌کنش‌های بین آنتوسیانین و پروتئین مطالعه شده تاکنون عبارتند از برهم‌کنش بین آنتوسیانین و پروتئین سرمی شیر^۳ (Chung et al., 2015)، آنتوسیانین و سرم آلبومین گاوی^۳ (Jahromi et al., 2020)، آنتوسیانین و پروتئین نخود (Li et al., 2024) و آنتوسیانین و پروتئین سویا (Ma et al., 2022; Zheng et al., 2021). در تمامی این مطالعات، برهم‌کنش بین پروتئین و آنتوسیانین با قدرت‌های اتصال گوناگون تشکیل شده است. این امر نشان می‌دهد که تمایل اتصال آنتوسیانین به پروتئین از پروتئینی به پروتئینی دیگر متفاوت می‌باشد، لذا برای هر پروتئین بصورت مجزا باید بررسی گردد. همچنین نشان داده شده است که ویژگی‌های گوناگون هر یک از اجزاء شرکت کننده در برهم‌کنش، با حالت‌های منفرد آنها کاملاً متفاوت می‌باشد. نکته قابل تأمل در اینگونه مطالعات، تأثیر عوامل مختلفی نظیر نوع پروتئین و

غذایی (Zhang, Liang, & Li, 2022)، پیش‌بینی و تفسیر تغییرات فیزیکوشیمیایی مواد غذایی و بیوپلیمرها (Cao et al., 2021; Li et al., 2024)، رقابت بین اجزاء یک ماده غذایی در حالت مدل و واقعی (Cheng, Ma, Li, Yan, & Cui, 2015; Ni, Zhu, & Kokot, 2003; Rampon et al., 2011)، هضم‌پذیری مواد غذایی (Abioye, Obeme-Nmom, & Udenigwe, 2024) و مواردی دیگر کاربرد بسزائی داشته باشد. لذا ضرورت پرداختن به مکانیسم‌های برهم‌کنش بین اجزاء یک سیستم غذایی، برای توسعه محصولات غذایی جدید با ویژگی‌های منحصر به فرد، در صنعت غذا بیش از پیش احساس می‌گردد.

رنگ یکی از مهمترین ویژگی‌های حسی مواد غذایی است که تأثیر زیادی در پذیرش کلی و بازاریابی محصول نهایی و همچنین ادراک طعم ماده غذایی دارد (Wu, Oliveira, & Lila, 2023). آنتوسیانین‌ها دسته‌ای از انواع رنگدانه‌های طبیعی محلول در آب هستند که به وفور در منابع گیاهی و گل‌های رنگی در طبیعت یافت می‌شوند (Mazza & Miniati, 2018). اسکلت شیمیایی عمومی این رنگدانه‌ها، از دو حلقه فنلی (A و B) و یک حلقه هتروسیکلیک (C) که بصورت کووالانس بهم متصل شده‌اند تشکیل شده است که اصطلاحاً به آن آنتوسیانیدین می‌گویند. فرم‌های گلیکوزیدی آنتوسیانیدین‌ها را آنتوسیانین می‌نامند. بر حسب قرارگیری نوع و تعداد گروه‌های هیدروکسی و متوکسی بر روی مکان‌های ویژه‌ای از حلقه فنلی B، و همچنین نوع قند و اسیدهای آلی متصل به کربن شماره سوم از حلقه C، آنتوسیانین‌ها به انواع مختلفی تقسیم می‌شوند (Castañeda-Ovando, de Lourdes Pacheco-Hernández, Páez-Hernández, Rodríguez, & Galán-Vidal, 2009). سیانیدین-۳-گلیکوزید^۱ (CYG) یکی از اجزاء مشهور آنتوسیانینی بوده که به وفور و به میزان بالا در عصاره‌های آنتوسیانینی اغلب میوه‌جات و گیاهان یافت می‌شود. ترکیبات آنتوسیانینی، علاوه بر خواص رنگی (طیف رنگی قرمز تا آبی) که از خود بروز می‌دهند، دارای نقش‌های بیولوژیکی مختلفی نظیر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، ضد قند خون بالا، ضد چاقی (Tsuda, Horio, Uchida, Aoki, & Osawa, 2003)، ضد سرطان، ضد دیابت و فعالیت‌های محافظتی قلبی-عروقی و عصبی (Konczak & Zhang, 2004; Nichenametla, Taruscio, Barney, & Exon, 2006) می‌باشند.

بررسی کمپلکس‌های آنتوسیانین-پروتئین از چند جنبه در صنعت غذا حائز اهمیت است. ۱- استفاده از روش تشکیل کمپلکس آنتوسیانین-پروتئین برای پایدارسازی رنگدانه آنتوسیانین در مواد غذایی

3- Bovine serum albumin (BSA)

1- Cyanidin-3-glycoside (CYG)

2- Whey protein

مواد و روش‌ها

مواد

رنگدانه سیانیدین-۳-گلیکوزید (CYG) از شرکت پلی فنل (St.) (Hanaveien, Sandnes, Norway) تهیه شد. نخود خلر از بازار تهیه شد. مابقی ترکیبات از درجه آزمایشگاهی بوده و از شرکت‌های معتبر خریداری شده است.

روش‌ها

استخراج پروتئین نخود خلر

استخراج پروتئین از نخود خلر مطابق با روش فیضی و همکاران (Feyzi, Milani and Golimovahhed, 2018) انجام شد.

اندازه‌گیری طیف نشر ذاتی^۵ فلئورسانس پروتئین

نخود خلر در حضور و عدم حضور سیانیدین-۳-گلیکوزید طیف‌های نشر فلئورسانس با استفاده از دستگاه فلوریمتر متری و ابزار کنترل دما^۶ در دماهای ۲۹۸، ۳۰۸ و ۳۱۸ درجه کلون اندازه‌گیری شد. کلیه نمونه‌ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر تهییج شده و طیف نشری آنها در محدوده طول موجی ۲۸۰ الی ۵۰۰ نانومتر ثبت شد. پهنای شکاف عبور نور در هر دو حالت تهییج و نشر بر روی عدد ۵ نانومتر تنظیم شد. برای ثبت طیف‌های حاصل از فرونشانی فلئورسانس پروتئین، ابتدا محلول ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پروتئین نخود خلر تهیه شد و در مقابل غلظت‌های مختلف رنگدانه CYG (۰ الی $10^{-6} \times 4/5$ مولار) تیتر شد و در هر مرحله، طیف نشر فلئورسانس مربوط به فرونشانی فلئورسانس آن ثبت گردید. بدلیل حضور فیلتر داخلی (منظور از فیلتر داخلی، حضور کروموفورها یا ترکیباتی است که در محدوده طیف نشری پروتئین جذب داشته باشند) (Shi, Wang, 2014) (Zhu, & Chen, 2014)، کلیه داده‌های نشری به روش زیر اصلاح شدند (Jahromi et al., 2020).

$$F_{cor} = F_{obs} * 10^{\frac{A_{exc} + A_{em}}{2}} \quad (1)$$

پارامترهای F_{cor} و F_{obs} به ترتیب اعداد شدت نشر اصلاح شده و اندازه‌گیری شده می‌باشد. A_{em} و A_{exc} نیز به ترتیب اعداد جذب در طول موج‌های جذبی و نشری می‌باشد. برای رسم نحوه اشغال جایگاه‌های اتصال پروتئین در کمپلکس پروتئین-CYG، مطابق روش جهرمی و همکاران (Jahromi et al., 2020) از ایزوترم اتصال لانگمیر استفاده

همچنین پارامترهای فیزیکوشیمیایی گوناگونی نظیر pH، حرارت، قدرت یونی و غیره بر روی اتصال آنتوسیانین با پروتئین می‌باشد (Cortez et al., 2017) که می‌توانند اتصال آنتوسیانین به پروتئین و متعاقباً اصلاح ویژگی‌های هر یک از اجزاء را تحت تأثیر قرار دهند. نخود خلر^۱ (*Lathyrus sativus* L.)، یک منبع پروتئینی جدید از خانواده حبوبات می‌باشد که حاوی ۲۵ درصد پروتئین است (Tamburino et al., 2012). ایزوله پروتئین نخود خلر دارای ارزش غذایی (بدلیل حضور اسیدهای آمینه ضروری زیاد) و خواص عملکردی مطلوبی می‌باشد. این ویژگی‌ها، آن را به گزینه‌ای مناسب جهت استفاده در فرمولاسیون غذایی تبدیل کرده است. این پروتئین از زیرواحدهای اصلی لگومین^۲ (11S) و ویسیلین^۳ (7S) تشکیل شده است. تعادل بین اسیدهای آمینه قطبی، غیر قطبی، باردار و آب دوست و آبگریز در ساختار پروتئین نخود خلر، این پروتئین را گزینه مناسب برای ساخت نانوذرات جهت محافظت از ترکیبات دیگر کرده است (Mehr & Koocheki, 2021). در بین تمامی برهم‌کنش‌ها، برهم‌کنش‌های هیدروژنی و آبگریز، اصلی‌ترین نوع برهم‌کنش بین پروتئین و آنتوسیانین می‌باشد که از طریق گروه‌های هیدروکسی و حلقه‌های فنلی از ساختار آنتوسیانین با اسیدهای آمینه آب دوست و آبگریز در ساختار پروتئین برقرار می‌گردد (Li et al., 2024). با توجه به ویژگی‌های ایزوله پروتئین نخود خلر، انتظار می‌رود که برهم‌کنش قوی و مناسبی با آنتوسیانین ایجاد شود.

روش طیف‌سنجی فلئورسانس^۴ یکی از روش‌های بسیار حساس، دقیق، سریع با کاربری آسان می‌باشد که به وفور در مطالعه برهم‌کنش بین پروتئین با دیگر ترکیبات، بصورت مکرر استفاده شده است. پایش تغییرات موضعی محیط اطراف فلئورفور^۵ جهت تعیین تغییرات ساختار پروتئین، تعیین نوع مکانیسم اتصال پروتئین با دیگر ترکیبات در کمپلکس‌های پروتئینی، بررسی ماهیت پدیده اتصال، نوع پیوندهای درگیر در برهم‌کنش، جایگاه‌های اتصال و پارامترهای ترمودینامیکی برهم‌کنش از کاربردهای رایج این تکنیک در مطالعات پروتئین با دیگر ترکیبات می‌باشد (Jahromi et al., 2020).

هدف از این مطالعه، ۱- بررسی و مشخص کردن برهم‌کنش بین رنگدانه سیانیدین-۳-گلیکوزید با ایزوله پروتئین نخود خلر جهت امکان سنجی استفاده از این بیوپلیمر در فرمولاسیون‌های حاوی این رنگدانه در محیط‌های اسیدی (نظیر نوشیدنی‌های خوراکی) با اهداف گوناگون می‌باشد. ۲- مشخص کردن تغییرات ساختاری پروتئین طی برهم‌کنش می‌باشد.

5- Fluorophores

6- Intrinsic fluorescence spectrum

7- Peltier

1- Grass pea (*Lathyrus sativus* L.)

2- Legumin

3- Vicilin

4- Fluorescence spectroscopy

مشتق دوم طیف‌های فلورئورسانس ذاتی پروتئین نخود

خلر در حضور و عدم حضور سیانیدین-۳-گلیکوزید

برای این منظور، طیف‌های نشر فلورئورسانس پروتئین نخود خلر ثبت شده در حضور CYG در بازه غلظتی ۰ الی $10^{-6} \times 4/5$ مولار، را با استفاده از نرم‌افزار متلب ورژن b ۲۰۲۲ مشتق دوم گرفته و پارامتر H که نمادی از هیدروفوبیسیته محیط اطراف اسید آمینه تریپتوفان است، بر اساس روش (Mozo-Villarias, 2002) محاسبه شد. طیف‌های نشر فلورئورسانس با استفاده از دستگاه فلوریمتر (Varian Cary Eclipse, Agilent, USA) مجهز به سل ۱۰ میلی‌متری ثبت شد.

آنالیز آماری

کلیه داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی و آزمون فاکتوریل تک فاکتوره با دو تکرار توسط نرم‌افزار SPSS 27 آنالیز شدند. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام شد. کلیه نمودارها با نرم‌افزارهای Graphpad prism 10 و متلب ورژن b ۲۰۲۲ رسم شد.

نتایج و بحث

مکانیسم فرونشانی فلورئورسانس^۳

بطور کلی ترکیباتی که دارای ساختار آروماتیک و یا آلیفاتیک با تعداد زیاد پیوندهای دوگانه باشند، خاصیت نشر فلورئورسانس دارند. پروتئین‌ها بدلیل دارا بودن اسیدهای آمینه حلقوی نظیر تیروزین، تریپتوفان و فنیل آلانین، دارای خاصیت نشر فلورئورسانسی می‌باشند که از این خاصیت برای مطالعه برهم‌کنش‌های پروتئین با دیگر ترکیبات به وفور استفاده می‌شود (Joye et al., 2015). همانطور که در شکل ۱ دیده می‌شود، در اثر افزودن غلظت‌های مختلفی (۰ الی $10^{-6} \times 4/5$ مولار) از CYG به پروتئین نخود خلر، شدت نشر فلورئورسانس پروتئین به میزان ۱۱/۲۲ درصد کاهش یافت که می‌تواند نشانگر قدرت اتصال کم بین پروتئین و CYG باشد. این کاهش فرونشانی اندک با نتایج شی و همکاران (Shi et al., 2014) که برهم‌کنش بین پروتئین سرم آلبومین گاوی و سیانیدین-۳-گلیکوزید پرداخته‌اند و مطالعات دی کاروالو و همکاران (de Carvalho Bertoso et al., 2020) که به برهم‌کنش بین آلبومین و اکتیل گالات پرداخته‌اند مشابهت دارد. درصد فرونشانی نشر فلورئورسانس با افزایش دما به میزان ۲۱/۹ درصد افزایش یافت.

شد. برای این منظور، عدد یک بر ثابت اتصال بدست آمده از معادلات ۴ تقسیم شد تا ثابت تفکیک بدست آید ($K_d=1/K_a$). سپس از طریق فرمول زیر، میزان اشغال شدن جایگاه‌های اتصال در غلظت‌های مختلف CYG محاسبه شد.

$$B = \frac{1}{1 + \frac{K_d}{[CYG]}} \quad (2)$$

اندازه‌گیری طیف نشری همزمان^۱ پروتئین نخود خلر در

حضور و عدم حضور سیانیدین-۳-گلیکوزید

برای این منظور، بصورت همزمان طول موج‌های جذبی و نشری کروموفورهای اسیدهای آمینه تیروزین و تریپتوفان پروتئین نخود خلر، جایی که اختلاف طول موج ($\Delta\lambda$) جذبی و نشری آنها به ترتیب ۱۵ و ۶۰ نانومتر است، اسکن طیفی انجام شد (Jahromi et al., 2020). این آزمون در غلظت‌های مختلف CYG (۰ الی $10^{-6} \times 4/5$ مولار) انجام شد. طیف‌های نشر فلورئورسانس با استفاده از دستگاه فلوریمتر (Varian Cary Eclipse, Agilent, USA) مجهز به سل ۱۰ میلی‌متری ثبت شد.

اندازه‌گیری طیف پراکندگی نور رزونانسی^۲ پروتئین

نخود خلر در حضور و عدم حضور سیانیدین-۳-گلیکوزید

جهت ثبت داده‌های پراکندگی نور رزونانسی (RLS)، شدت نشر مونوکروماتورهای پروتئینی در اختلاف طول موج جذبی و نشری صفر ($\Delta\lambda=0$) بصورت همزمان در بازه طول موجی ۲۲۰ الی ۷۰۰ نانومتر ثبت شد (Jahromi et al., 2020). اختلاف پراکندگی نور رزونانسی پروتئین در حضور و عدم حضور غلظت‌های مختلف CYG (۰ الی $10^{-6} \times 4/5$ مولار) در طول موج نشر حداکثر در مقابل غلظت‌های گوناگون سیانیدین-۳-گلیکوزید گزارش شد. طیف‌های نشر فلورئورسانس با استفاده از دستگاه فلوریمتر (Varian Cary Eclipse, Agilent, USA) مجهز به سل ۱۰ میلی‌متری ثبت شد.

اندازه‌گیری طیف فلورئورسانس سه بعدی^۳ پروتئین

نخود خلر در حضور و عدم حضور سیانیدین-۳-گلیکوزید

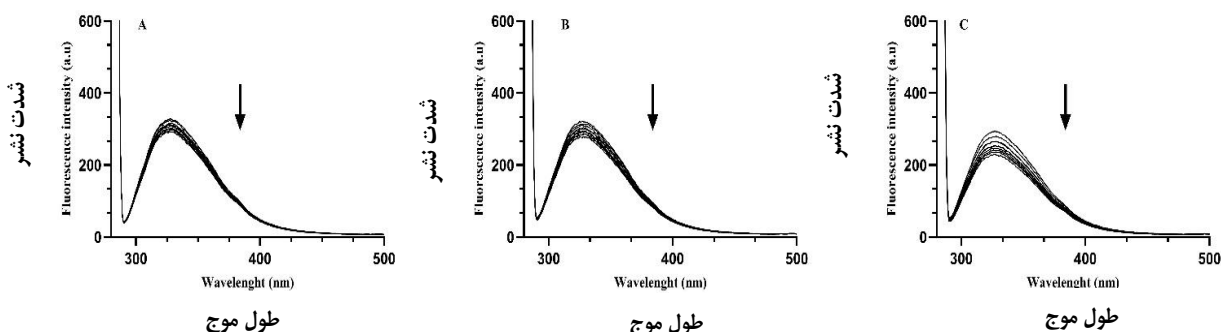
طیف‌های سه بعدی فلورئورسانس (3D) پروتئین نخود خلر بصورت متوالی در بازه طول موج جذبی ۲۲۰ الی ۵۴۰ نانومتر و نشری ۲۲۰ الی ۶۰۰ نانومتر با افزایش متوالی ۱۰ نانومتری طول موج جذبی انجام شد. این آزمون در غلظت برابر پروتئین نخود و CYG (نسبت ۱:۱) انجام شد (Jahromi et al., 2020). طیف‌های نشر فلورئورسانس با استفاده از دستگاه فلوریمتر (Varian Cary Eclipse, Agilent, USA) مجهز به سل ۱۰ میلی‌متری ثبت شد.

3- Three-dimensional fluorescence spectra (3D)

4- Fluorescence quenching

1- Synchronous fluorescence spectra

2- Resonance light scattering (RLS)



شکل ۱- طیف های فرونشانی فلئورسانسی پروتئین نخود خلر در حضور غلظت های مختلف CYG (۰ الی 4.5×10^{-6} مولار) در دماهای 25°C (A)، 35°C (B) و 45°C (C)

غلظت پروتئین نخود خلر ۱ میلی گرم بر میلی لیتر می باشد.

Fig. 1. Fluorescence quenching spectra of grass pea protein in the presence of varying concentrations of CYG (0 to 4.5×10^{-6} M) at temperatures of 25°C (A), 35°C (B), and 45°C (C). The grass pea protein concentration was 1 mg/mL.

بین پروتئین و لیگاند) و استاتیک می باشد (Van de Weert & Stella, 2011). همانطور که در جدول ۱ مشاهده می شود، ثابت K_q برای کمپلکس پروتئین-CYG در دمای محیط برابر است با $1.0^{12} \times 10^{12}$ بر مولار ثانیه که از عدد 2×10^{10} بر مولار ثانیه بیشتر است، لذا می توان انتظار داشت که مکانیسم فرونشانی از نوع استاتیک باشد. با توجه به روند تغییرات ثابت K_q با افزایش دما، مشاهده می شود که با افزایش دما مقادیر ثابت K_q افزایش می یابد که خلاف فرونشانی استاتیک است. این نتایج با نتایج جهرمی و همکاران (Jahromi et al., 2020) که به برهم کنش بین پروتئین سرم آلبومین گاوی و CYG پرداخته اند و نتایج جنگ و همکاران (Geng et al., 2020) که برهم کنش بین ترکیبات فلاونوئیدی و پروتئین بتالاکتوگلوبولین مطالعه کرده اند مشابهت دارد و بیانگر این مطلب است که مکانیسم فرونشانی، از نوع ترکیب مکانیسم های استاتیک و دینامیک می باشد.

پارامترهای اتصال در کمپلکس پروتئین نخود خلر-

سیانیدین-۳-گلیکوزید

برای دستیابی به پارامترهای اتصال کمپلکس پروتئین نخود خلر-CYG، داده های فرونشانی فلئورسانس ثبت شده را بر معادله دو لگاریتمی (معادله ۴) که در زیر نشان داده شده است برازش می دهیم.

این فرونشانی نشر فلئورسانس می تواند به عوامل مختلفی از جمله تشکیل کمپلکس در حالت پایه، فرونشانی ناشی از برخورد ذرات، تبادل انرژی در حالت برانگیخته^۱ و غیره ارتباط داشته باشد که اغلب مکانیسم این واکنش ها را به دو دسته استاتیک و دینامیک تقسیم بندی می کنند (Van de Weert & Stella, 2011).

برای اثبات مکانیسم فرونشانی فلئورسانس پروتئین نخود خلر ناشی از تماس با CYG، داده های اصلاح شده نشر فلئورسانس را بر معادله زیر که معروف به معادله استر-ولمر است برازش داده و پارامترهای حاصل از فرونشانی را بررسی می کنیم.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + K_q\tau_0[Q] \quad (3)$$

که در این معادله، F_0 ، F ، K_{SV} ، $[Q]$ ، K_q و τ_0 به ترتیب بیانگر شدت نشر فلئورسانس در طول موج نشری حداکثر برای پروتئین نخود خلر در عدم حضور و حضور CYG، ثابت استر-ولمر، غلظت خاموش کننده^۲ (CYG)، ثابت سرعت فرونشانی زیست مولکولی^۳ و عمر زنده مانی^۴ ترکیبات زیست مولکولی بدون هرگونه خاموش کننده (برابر است با 10^{-8} ثانیه) می باشند. K_q شاخصی بسیار مناسبی برای تعیین مکانیسم فرونشانی پروتئین و لیگاند می باشد که در صورتی که عدد آن از $10^{10} \times 2$ بر مولار ثانیه بیشتر باشد، مکانیسم فرونشانی از نوع استاتیک بوده و در غیر این صورت از نوع دینامیک می باشد. همچنین اگر عدد ثابت مذکور با افزایش دما، افزایش و یا کاهش یابد، به ترتیب مکانیسم فرونشانی فلئورسانس از نوع دینامیک (بدلیل تسریع برخورد

3- Biomolecular quenching

4- Lifetime

1- Excited-state reaction

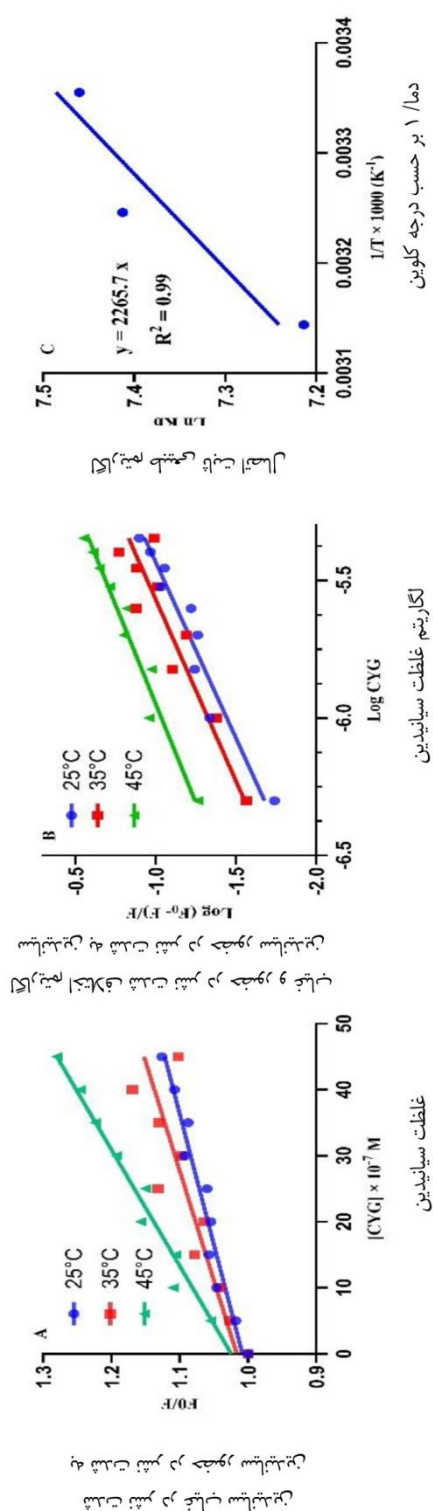
2- Quencher

جدول ۱- ثابت‌های اتصال، استر-ولمر، فرونشانی و پارامترهای ترمودینامیکی برای کمپلکس پروتئین نخود خمر - سیانیدین-۳- گلیکوزید در دماهای مختلف و ۳ pH

Table 1- The quenching constant, Stern-Volmer constant, binding constant and thermodynamic parameters for the pea-CYG association at different temperatures (pH 3)

Different superscript letters denote statistically significant differences at the 95% confidence level ($p < 0.05$).

T (K)	K_{sv} ($\times 10^4 M^{-1}$) ثابت استر-ولمر	K_q ($\times 10^{12} M^{-1}$) ثابت فرونشانی	R^2	Log K_b لگاریتم ثابت اتصال	K_b ($\times 10^8 M^{-1}$) ثابت اتصال	K_d ($\times 10^{-4} M$) ثابت تفکیک	n تعداد سایت های اتصال	R^2	ΔH° (KJ mol ⁻¹) انتالپی	ΔS° J (K mol ⁻¹) انترپوی	ΔG° (KJ mol ⁻¹) انرژی آزاد گیبس
298	2.53±0.32B	2.53±0.34B	0.95	3.24±0.14A	1.73±0.35A	5.75	0.78±0.04A	0.93	-18.42	0	-18.07±0.31B
308	3.01±0.12B	3.01±0.14B	0.80	3.21±0.11A	1.65±0.28A	6.03	0.75±0.01A	0.85			-18.56±0.23A
318	5.67±0.45A	5.67±0.47A	0.96	3.13±0.05B	1.35±0.06B	7.36	0.69±0.02B	0.96			-18.65±0.11A



شکل ۲- نمودارهای استر-ولمر (A)، دو لگاریتمی (B) و ونت هوف (C) در کمپلکس پروتئین نخود خلر - CYG
Fig. 2. The Stern-Volmer (A), Log (F₀-F)/F versus Log [Q] (B) and Van't Hoff plots (C) in the gras pea protein-CYG association, respective

در جدول ۱ نشان داده شده است، همانطور که مشاهده می‌شود، تعداد ثابت‌های اتصال و تعداد سایت‌های اتصال CYG با پروتئین نخود خلر $\log [Q]$ و $\text{Log } \left[\frac{F_0 - F}{F} \right]$ برقرار شده است (R^2 برابر است با ۰/۹۳).

که در این معادله، K_b و n به ترتیب عبارتند از ثابت اتصال و تعداد سایت‌های اتصال. یک ارتباط خطی بسیار خوبی بین مقادیر

$$\text{Log } \left[\frac{F_0 - F}{F} \right] = \text{log } K_b + n \text{log } [Q] \quad (4)$$

اساس معادلات ۳ و ۴ دو پارامتر مهم و کلیدی بنام‌های ثابت‌های فرونشانی (K_q) و اتصال (K_b) بدست می‌آید که بر اساس مکانیسم فرونشانی می‌توانند با افزایش دما، افزایش و کاهش یابند. در صورتی که مکانیسم فرونشانی از نوع استاتیک باشد، با افزایش دما ثابت فرونشانی کاهش می‌یابد اما ثابت اتصال در صورتی که نوع برهم‌کنش بین لیگاند و پروتئین گرماده (مانند پیوندهای هیدروژنی) باشد کاهش (Li et al., 2018; Tang et al., 2016) و در صورتی که گرماگیر (مانند برهم‌کنش‌های آبگریز) باشد، افزایش می‌یابد (Guo et al., 2025; Li et al., 2018; Meng et al., 2021). در صورتی که مکانیسم فرونشانی از نوع ترکیب استاتیک و دینامیک باشد، با افزایش دما، ثابت فرونشانی افزایش اما ثابت اتصال در صورتی که برهم‌کنش از نوع گرماده (مانند پیوندهای هیدروژنی) باشد کاهش (Fenner, Reynolds, & Basu, 2020; Geng et al., 2020; Jahromi et al., 2020) و در صورتی که گرماگیر (مانند برهم‌کنش‌های آبگریز) باشد افزایش می‌یابد (Fenner et al., 2020; Peng, Wang, Qi, 2012; Su, & He, 2016; Tian et al., 2012). لذا درست است که با افزایش دما شدت فرونشانی نشر بیشتر شده است اما بر حسب نوع مکانیسم فرونشانی و نوع پیوند بین لیگاند و پروتئین، ثابت‌های فرونشانی و اتصال تغییر می‌یابند و افزایش شدت فرونشانی همیشه منجر به افزایش ثابت اتصال با دما نخواهد شد که این امری واضح و رایج می‌باشد.

پارامترهای ترمودینامیکی و نوع برهم‌کنش در کمپلکس پروتئین نخود خلر-سیانیدین-۳-گلیکوزید

نوع نیروهای پیوندی در گیر در کمپلکس پروتئین نخود خلر- CYG را بر اساس معادله معروف به معادله ونت هوف (معادله ۵) محاسبه شد.

$$\ln K_b = - \left(\frac{\Delta H}{RT} \right) + \left(\frac{\Delta S}{R} \right) \quad (5)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K_b \quad (6)$$

در این معادله، ΔH ، ΔS ، ΔG ، و R و T به ترتیب عبارتست از آنتالپی، آنتروپی، انرژی آزاد گیبس، ثابت جهانی گازها (۸/۳۱۴ ژول بر مول کلوین) و دما بر حسب درجه کلوین می‌باشد. یک رگرسیون خطی با برازش خیلی خوب بین $\ln K_b$ و عکس دما بر حسب درجه کلوین برقرار شده است ($R^2 = 0.99$). بطور کلی، بر اساس علامت‌ها و مقادیر آنتالپی و آنتروپی می‌توان نوع برهم‌کنش بین ذرات را تعیین کرد. در صورتی که مقادیر آنتالپی مثبت و آنتروپی نیز مثبت باشد، برهم‌کنش غالب از نوع آبگریز یا هیدروفوبی می‌باشد. در صورتی که مقادیر آنتالپی و آنتروپی هر دو منفی باشند، برهم‌کنش غالب واندروالس و یا هیدروژنی

سایت‌های اتصال کمپلکس پروتئین- CYG نزدیک به عدد ۱ است که بیانگر این واقعیت است که در پروتئین نخود خلر تنها یک جایگاه برای اتصال CYG وجود دارد و احتمالاً می‌توان انتظار داشت که نوع برهم‌کنش از نوع تعاونی باشد. عبارت دیگر اتصال یک مولکول از CYG، اتصال مولکول دیگر از آن را تحت تأثیر قرار دهد (اتصالات لیگاندها وابسته به هم هستند) (Van de Weert & Stella, 2011). این نتایج با نتایج الله داد و همکاران (Allahdad, Varidi, Zadmard, Saboury, 2018; Allahdad, Varidi, Zadmard, Saboury & Haertlé, 2019) که به برهم‌کنش‌های بین بتاکاروتن با و پروتئین های کازئین و سرمی شیر پرداخته‌اند مطابقت دارد. ثابت اتصال CYG به پروتئین نخود خلر در دمای 25°C در جدول ۱ آورده شده است که عبارتست از 1.73×10^3 بر مولار. این عدد که بیانگر ثابت اتصال ضعیف CYG به پروتئین نخود خلر است، که با درصد اندک فرونشانی نشر فلئورسانس نشان داده شده در شکل ۱ همخوانی دارد. همانطور که مشاهده می‌شود، با افزایش دما از 25°C به 45°C ، K_b از 1.73 به 1.35×10^3 بر مولار کاهش یافته است. این روند نشان‌دهنده تضعیف اتصال CYG به پروتئین نخود خلر با افزایش دما می‌باشد و دلالت بر ماهیت آنتالپی محور بودن برهم‌کنش بین CYG و پروتئین نخود خلر دارد که تضعیف شونده با دما هستند. با توجه به نوع برهم‌کنش بین CYG و پروتئین نخود خلر که از نوع هیدروژنی است (بر اساس تغییر علامت پارامترهای ترمودینامیکی در بخش بعد اثبات شده است) و از آنجایی که ثابت شده است که پیوندهای هیدروژنی از نوع گرماده^۱ بوده و مانند دیگر برهم‌کنش‌های گرماده با افزایش دما تضعیف و تخریب می‌شوند (Fennema, Damodaran, & Parkin, 2017b)، کاهش ثابت‌های اتصال با افزایش دما توجیه می‌گردد و نشان‌دهنده تشخیص صحیح و درست نوع برهم‌کنش هیدروژنی بین CYG و پروتئین نخود خلر که در بخش بعد بر اساس علامت پارامترهای ترمودینامیکی تعیین شده است می‌باشد. این روند، عکس اتفاقیست که در برهم‌کنش‌های پیش رونده با آنتروپی^۲ نظیر برهم‌کنش‌های گرماگیر هیدروفوبی رخ می‌دهد (Fennema et al., 2017b; Jahromi et al., 2020). این کاهش ثابت اتصال با افزایش دما با نتایج لی و همکاران (Li et al., 2018) و تانگ و همکاران (Tang, Li, Bi, & Gao, 2016) که به برهم‌کنش‌های بین پروتئین با ترکیبات فلاونوئیدی و CYG پرداخته‌اند مطابقت دارد. این کاهش ثابت‌های اتصال بدست آمده از معادله دو لگاریتمی (معادله ۴)، با میزان فرونشانی فلئورسانس در دماهای مختلف (شکل ۱) قدری متفاوت است. علت این امر، نوع مکانیسم فرونشانی فلئورسانس در برهم‌کنش بین CYG و پروتئین نخود خلر می‌باشد. از داده‌های حاصل از فرونشانی فلئورسانس در شکل ۱، بر

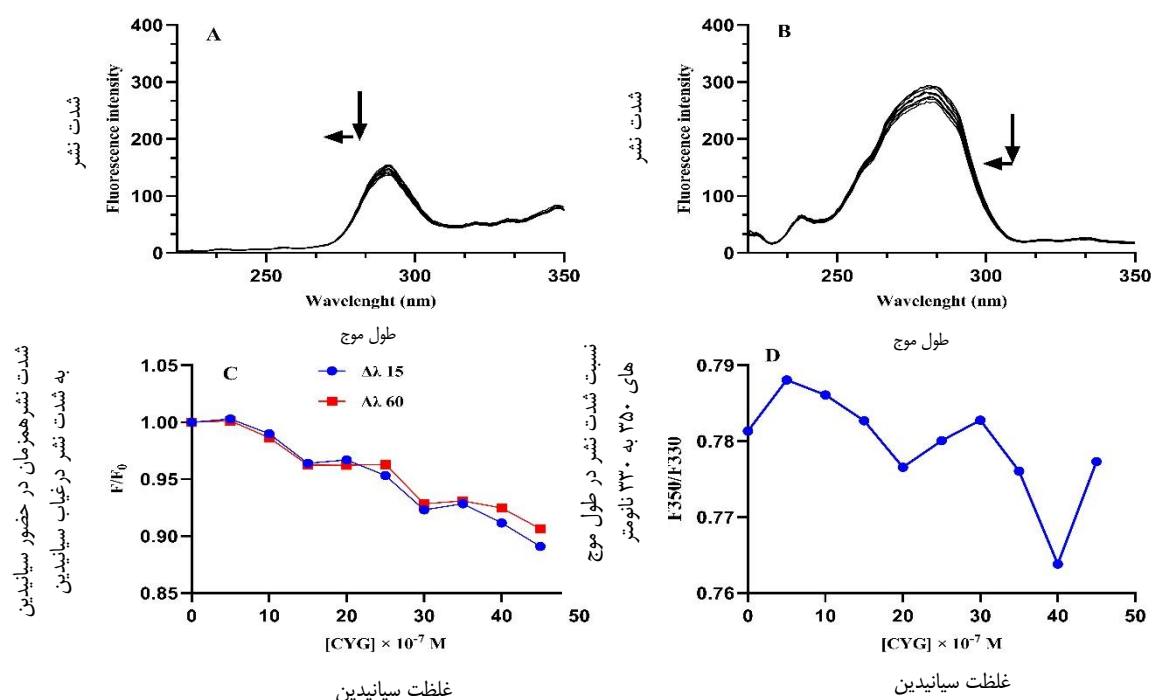
می‌باشد. در صورتی که آنتالپی منفی و آنتروپی مقادیر مثبت باشد، برهم کنش از نوع الکتروستاتیک است (Ross & Subramanian, 1981; Shi et al., 2014). مقادیر پارامترهای ترمودینامیکی در جدول ۱ آورده شده است. مقادیر منفی آنتالپی ($-18/42$) و مقادیر صفر آنتروپی در برهم کنش پروتئین نخود خلر با CYG دیده می‌شود. با توجه به منفی بودن مقادیر آنتالپی، می‌توان نتیجه گرفت که برهم کنش از نوع گرماده بوده لذا از نوع برهم کنش آبگریز یا هیدروفوبی نمی‌باشد. با توجه به این نکته که برهم کنش‌های هیدروژنی و الکتروستاتیکی می‌توانند مقادیر آنتالپی آنها منفی باشد ممکن است برهم کنش یکی از این دو مورد باشد. با توجه به این نکته که برهم کنش‌های الکتروستاتیک اغلب مقادیر آنتالپی آنها بین ۰ الی ۲۰ کیلوژول بر مول می‌باشد و در انواع قوی آن همراه با مقادیر بالا و مثبت آنتروپی بوده، با توجه به مقادیر منفی آنتالپی $-18/42$ بالا در این نوع برهم کنش انتظار می‌رود مقادیر بسیار بالا از آنتروپی دیده شود، لذا با توجه به مقادیر صفر آنتروپی، احتمال برقراری پیوند الکتروستاتیک بین پروتئین نخود خلر و CYG بسیار اندک می‌باشد (هر دو ترکیب در pH ۳ تقریباً دارای بار مثبت بوده و دافعه الکتروستاتیکی بین آنها برقرار است). از طرفی دیگر، آنتالپی پیوندهای هیدروژنی اغلب بین صفر الی ۳۰ کیلوژول بر مول بوده، لذا مقدار آنتالپی برهم کنش پروتئین نخود خلر-CYG جزء مقادیر بالای آنتالپی در این نوع برهم کنش‌ها نمی‌باشد. همچنین در برهم کنش‌های هیدروژنی، اغلب آزادی عمل حرکت مولکول‌ها کاهش یافته و در برخی از موارد، مولکول آب از سطح کمپلکس پروتئین-لیگاند آزاد می‌شود (لیگاند جایگزین آب در سطح پروتئین می‌شود) که در چنین شرایطی ممکن است اثرات ناچیز آنتروپی خنثی شود و مقادیر آن به صفر نزدیک شود. این استدلال با تغییرات بسیار اندک ساختار سوم پروتئین نخود خلر (شکل ۳ و ۴) (معمولاً برهم کنش‌های هیدروژنی ساختار پروتئین را پایدار کرده (Fennema et al., 2017b) و آزادی عمل جهت تحرک آن را کمتر می‌کنند) که قابل صرف نظر کردن است و نمادی از تغییرات آنتروپی بوده و همچنین با پایداری بیشتر ساختار پروتئین در اثر ایجاد برهم کنش‌های هیدروژنی هم‌خوانی دارد. لذا احتمالاً، برهم کنش بین پروتئین نخود خلر-CYG از نوع برهم کنش هیدروژنی می‌باشد. این نتایج با موارد مشابه نظیر جهرمی و همکاران (Jahromi et al., 2020) و شی و همکاران (Shi et al., 2014) که کمپلکس‌های پروتئین-آنتوسیانین را بررسی کرده‌اند و نوع برهم کنش را از نوع هیدروژنی گزارش کرده‌اند مطابقت دارد.

بررسی تغییرات ساختاری پروتئین نخود خلر در حضور سیانیدین-۳-گلیکوزید توسط طیف‌های همزمان فلورئورسانس

استفاده از طیف‌های فرونشانی فلورئورسانس همزمان برای مطالعه محیط اطراف مولکولی نزدیک به اسیدهای آمینه تیروزین و تریپتوفان بسیار رایج می‌باشد. برای این منظور، از فواصل اختلاف طول موج جذبی و نشری ۱۵ و ۶۰ نانومتر به ترتیب برای پایش محیط اطراف مولکولی نزدیک به اسید آمینه تیروزین و تریپتوفان استفاده می‌گردد (Shahsavani et al., 2016). فرونشانی تدریجی نشر فلورئورسانس پروتئین نخود خلر در حضور غلظت‌های مختلف CYG در شکل ۳ آورده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود، شدت نشر فلورئورسانس در $\Delta\lambda$ معادل ۶۰ نانومتر که نمادی از پایش محیط اطراف اسید آمینه تریپتوفان در ساختار پروتئین است به مراتب از اسید آمینه تیروزین ($\Delta\lambda$ برابر با ۱۵ نانومتر) بیشتر است. این امر بیانگر مشارکت بیشتر اسید آمینه تریپتوفان در ایجاد نشر ذاتی فلورئورسانس پروتئین می‌باشد. همانطور که در شکل ۳ (A و B) دیده می‌شود، شدت نشر فلورئورسانس در حضور غلظت‌های مختلف CYG کاهش یافته و طول موج حداکثر نشری، اندکی به طول موج‌های کوتاه‌تر (جابجایی آبی) جابجا شده است. این اتفاق زمانی رخ می‌دهد که قطبیت محیط اطراف اسیدهای آمینه تریپتوفان و تیروزین کاهش یابد و بدرون ساختار پروتئین مهاجرت یابد. این امر نشان‌دهنده تاخوردگی موضعی پروتئین در اثر اتصال CYG می‌باشد (Amani, Reza Saberi, & Khan Chamani, 2011). این نتایج جابجایی آبی طول موج حداکثر نشری با نتایج وی و همکاران (Wei, Xu, Zhang, Yang, & Wang, 2018) و برکت و پاترا (Barakat & Patra, 2013) مطابقت دارد. لذا ساختار پروتئین اندکی باز شده و در مرحله بعد دچار تاخوردگی موضعی اطراف این اسیدهای آمینه شده است. به همین دلیل، کاهش شدت نشر و جابجایی آبی در طول موج حداکثر نشر فلورئورسانس دیده می‌شود. در صورتی که در اثر اتصال لیگاند تاخوردگی کامل رخ دهد، بدلیل افزایش ضریب نشر کوآتومی پروتئین در این حالت، شدت نشر آن افزایش یافته و این افزایش با جابجایی آبی در طول موج حداکثری نشر فلورئورسانس دیده می‌شود (Royer, 2006). این کاهش شدت نشر فلورئورسانس تأکیدی بر ایجاد تاخوردگی موضعی نسبت به تاخوردگی کامل در ساختار پروتئین می‌باشد. سرعت فرونشانی نشر فلورئورسانس همزمان در شکل ۳ (C) آورده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود، شیب نمودار فرونشانی نشر فلورئورسانس همزمان در $\Delta\lambda$ ۱۵ بیشتر از ۶۰ می‌باشد که بیانگر اتصال CYG به مکان‌های نزدیک به حضور تیروزین نسبت به تریپتوفان (منظور اتصال به اسیدهای آمینه نزدیک به مکان حضور اسیدهای آمینه تیروزین در ساختار پروتئین است) در ساختار پروتئین می‌باشد (Jahromi et al., 2020; Shi et al., 2014). در طیف‌های ذاتی نشر فلورئورسانس پروتئین، شدت نشر در طول موج نشری ۳۳۰ و ۳۵۰ نانومتر به ترتیب نمادی از نشر پروتئین در محیط‌های قطبی و غیر

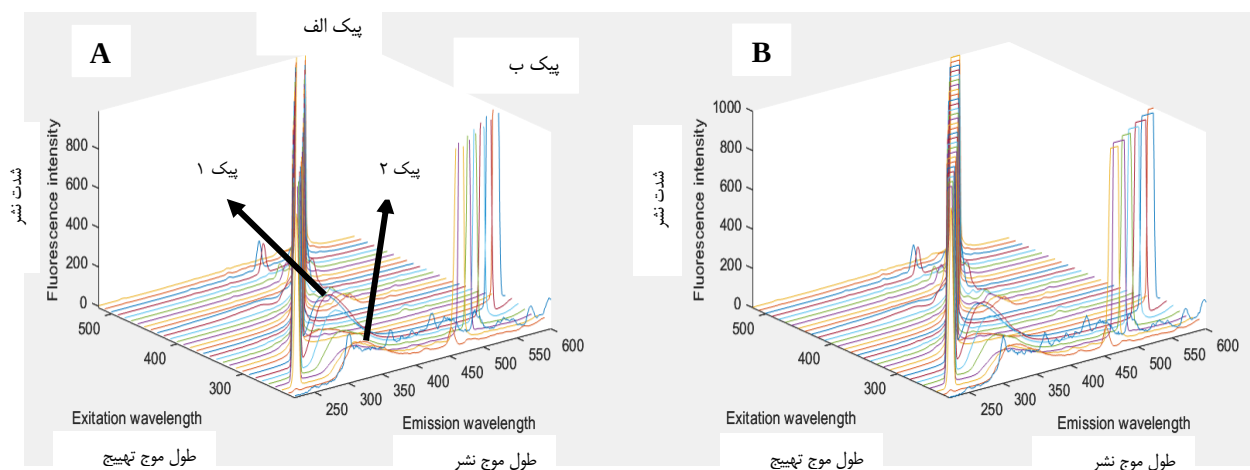
هیدروژنی که در بخش قبل اثبات شد) دچار تاخوردگی موضعی در ساختار پروتئین شده است بطوری که شدت نشر ۳۵۰ به ۳۳۰ نانومتر که نمادی از دناتوره شدن و باز شدن ساختار پروتئین است، از پروتئین طبیعی به تنهایی کمتر است. البته اختلاف این نسبت، در بالاترین غلظت CYG افزوده شده به پروتئین نخود خلر و پروتئین نخود خلر به تنهایی زیاد نبوده و نشان از تغییرات بسیار اندک ساختاری در پروتئین دارد. این نتایج با جابجایی‌های آبی اندک طول موج حداکثر نشری در طیف‌های همزمان نشری فلئورسانس و طیف‌های سه بعدی فلئورسانس مطابقت دارد. همچنین تغییرات ساختاری اندک آن با مفاهیم مطرح شده در نوع برهم‌کنش هیدروژنی و ثبات ساختار پروتئینی در اثر آن، نیز همخوانی دارد.

قطبی می‌باشد (Allahdad et al., 2020). عبارت دیگر طول موج‌های نشری ۳۳۰ و ۳۵۰ نانومتر، به ترتیب نمادی از ساختار طبیعی و غیرطبیعی شده (دناتوره شده) پروتئین می‌باشند. لذا، از نسبت شدت نشر فلئورسانس پروتئین در این طول موج‌ها، برای بررسی تغییرات ساختاری در پروتئین استفاده می‌گردد. همانطور که در شکل ۳ (D) مشاهده می‌شود، شدت نشر ۳۵۰ به ۳۳۰ نانومتر با افزایش غلظت CYG، ابتدا افزایش و سپس روند کاهشی دارد بطوری که در آخرین غلظت CYG، مقدار این نسبت اندکی کمتر از نسبت پروتئین نخود خلر می‌باشد. این مطلب نشان می‌دهد که در غلظت‌های اولیه افزودن CYG به پروتئین نخود خلر، ابتدا ساختار پروتئین نخود خلر دناتوره شده (افزایش نسبت شدت نشر ۳۵۰ به ۳۳۰ نانومتر) و سپس با افزایش غلظت CYG در ادامه، در اثر برهم‌کنش‌های ایجاد شده (از نوع



شکل ۳- طیف‌های فرونشانی فلئورسانس همزمان پروتئین نخود خلر (۱ میلی گرم بر میلی لیتر) در حضور غلظت‌های مختلف CYG (0 الی 4.5×10^{-6} M) در $\Delta\lambda$ های ۱۵ (A) و ۶۰ (B). مقایسه کاهش شدت فرونشانی نشر فلئورسانس همزمان در $\Delta\lambda$ های ۱۵ و ۶۰ (C). تغییرات نسبت شدت فلئورسانس ذاتی پروتئین در طول موج‌های ۳۵۰ به ۳۳۰ نانومتر در حضور غلظت‌های مختلف CYG (0 الی 4.5×10^{-6} M) (D) در دمای محیط

Fig. 3. Synchronous fluorescence quenching spectra of grass pea protein (1 mg/mL) in the presence of different concentrations of CYG (0 to 4.5×10^{-6} M) at $\Delta\lambda$ values of 15 (A) and 60 (B). Comparison of the decrease in synchronous fluorescence emission quenching intensity at $\Delta\lambda$ values of 15 and 60 (C). Changes in the intrinsic fluorescence intensity ratio (350 nm/330 nm) of the protein in the presence of varying concentrations of CYG (0 to 4.5×10^{-6} M) (D).



شکل ۴- طیف‌های فلوئورسانس سه بعدی پروتئین نخود خلر (۱ میلی گرم بر میلی لیتر) در حضور (B) و عدم حضور (A) CYG (۴/۵ × ۱۰^{-۶} مولار) در دمای محیط (pH=۳)

Fig. 4. Three-dimensional fluorescence spectral of grass pea protein (1 mg/mL) in the presence (B) and absence (A) of CYG (4.5 μM) at room temperature (pH 3)

جدول ۲- تغییرات طیف فلوئورسانس سه بعدی پروتئین نخود خلر (۱ میلی گرم بر میلی لیتر) در حضور و عدم حضور CYG (۴/۵ × ۱۰^{-۶} مولار) در دمای محیط (pH=۳)

Table 2. Three-dimensional fluorescence spectral changes of grass pea protein (1 mg/mL) in the presence and absence of CYG (4.5 μM) at room temperature (pH 3).

Systems سیستم	Peak 1 ($\lambda_{ex}-\lambda_{em}$) پیک ۱	$\Delta\lambda$ اختلاف موج جذبی-نشری	Emission intensity شدت نشر	Peak 2 ($\lambda_{ex}-\lambda_{em}$) پیک ۲	$\Delta\lambda$ اختلاف موج جذبی-نشری	Emission intensity شدت نشر
Pea	280-328 nm	48 nm	323.48	230-327.07 nm	97.07 nm	164
Pea-CYG	280-316 nm	36 nm	296.59	230-316 nm	86 nm	159.63

دارد (Jahromi et al., 2020). همانطوری که در شکل ۴ و شکل ۱ مشاهده می‌شود، کاهش شدت نشر فلوئورسانس و جابجایی آبی (جابجایی به طول موج‌های کوتاه‌تر) در طول موج حداکثر نشری در هر دو پیک ۱ و ۲، بیانگر حذف گروه‌های عاملی نظیر کربونیل، هیدروکسیل و آمین که دارای الکترون‌های پای^۳ هستند و کاهش حلقه‌های آروماتیک و پیوندهای کنژوگه^۴ در ساختار می‌باشد. این تغییرات بدلیل جابجایی اسید آمینه تریپتوفان به محیط‌هایی با قطبیت کمتر که نشان‌دهنده تاخوردگی موضعی پروتئین می‌باشد (Sattar et al., 2012) که با نتایج طیف‌های همزمان نشری کاملاً مطابقت دارد. همچنین فرونشانی بسیار اندک شدت نشر فلوئورسانس (جدول ۲) در هر دو پیک، بیانگر تغییرات اندک ساختار دوم در پروتئین نخود خلر در تماس با CYG می‌باشد که شباهت زیادی با نتایج جهرمی و همکاران دارد. (Jahromi et al., 2020)

بررسی تغییرات ساختاری پروتئین نخود خلر در حضور سیانیدین-۳-گلیکوزید توسط طیف‌های سه بعدی فلوئورسانس

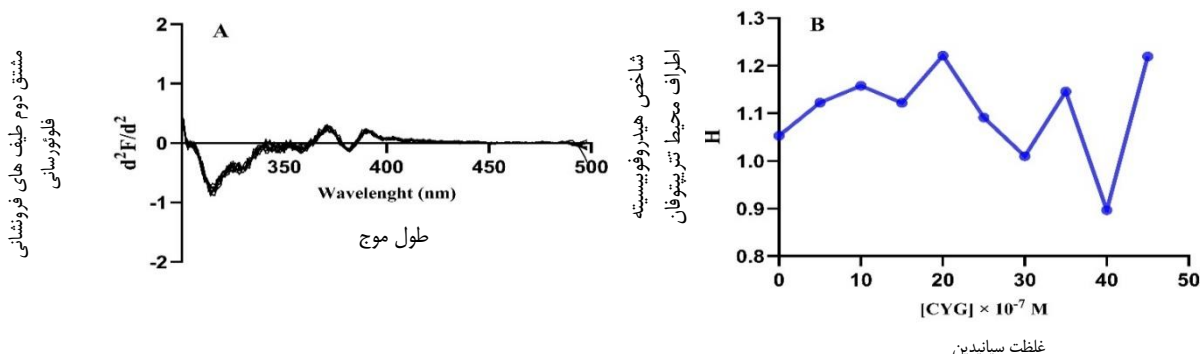
یکی از روش‌های دقیق برای بررسی تغییرات ساختار سوم پروتئین، طیف‌های سه بعدی نشر فلوئورسانس می‌باشد. جابجایی در طول موج حداکثر جذبی و نشری و فرونشانی شدت نشر فلوئورسانس آنها، نمادی از تغییرات ساختاری پروتئین می‌باشد. پیک‌های متعددی در طیف‌های سه بعدی دیده می‌شود که هر یک حاوی اطلاعات ویژه‌ای هستند. این پیک‌ها عبارتند از پیک پراکندگی رایلی^۱ (پیک الف) ($\lambda_{em} = \lambda_{ex}$)، پیک پراکندگی مرتبه دوم^۲ ($\lambda_{em} = 2\lambda_{ex}$) (پیک ب)، پیک فلوئورسانس^۱ که مرتبط به تغییرات محیط اطراف اسیدهای آمینه تیروزین و تریپتوفان است ($\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$)

و پیک فلوئورسانس^۲ ($\lambda_{ex} = 230 \text{ nm}$) که مربوط به تغییرات اسکلت پلی‌پپتیدی پروتئین (پیوندهای آمیدی) می‌باشد. همچنین، شدت نشر فلوئورسانس همبستگی خوبی با تغییر ساختار دوم پروتئین

3- π -electron systems
4- Conjugated bonds

1- Rayleigh scattering peak
2- The second-order scattering peak

تریپتوفان در مواردی که طول موج تهییج پروتئین ۲۸۰ نانومتر است می‌باشد. با این روش می‌توان حضور اسیدهای آمینه حلقوی به‌ویژه اسید آمینه تریپتوفان را در محیط‌هایی با درجه آبگریزی مختلف تعیین کرد (Mozo-Villarias, 2002). عبارت دیگر، میزان تاخوردگی و باز شدن ساختار پروتئین با این روش قابل تشخیص است.



شکل ۵- مشتق دوم طیف‌های فرونشانی فلوئورسانس پروتئین نخود خلر (۱ میلی گرم در میلی لیتر) (A) و تغییرات پارامتر H (B) در حضور غلظت های مختلف CYG (۰ الی 4.5×10^{-6} مولار) در دماهای $25^\circ C$

Fig. 5. Second derivative of fluorescence quenching spectra of grass pea protein (1 mg/mL) (A) and H parameter changes (B) in the presence of different concentrations of CYG (0 to 4.5×10^{-6} M) at $25^\circ C$

بررسی طیف پراکندگی نور رزونانس پروتئین نخود خلر در حضور سیانیدین-۳-گلیکوزید

پراکندگی نور رزونانس یا RLS، روشی است که اغلب برای تشخیص تجمعات مولکولی ریز و بزرگ کروموفورهایی که بدلیل خود تجمعی یا تجمع با دیگر مولکول‌ها، تشکیل ساختارهای بزرگ دارای سیگنال RLS قوی می‌دهند (در برخی موارد تجمعات کروموفوری رخ می‌دهد اما اندازه آن به نحوی نیست که سیگنال قوی RLS داشته باشد)، استفاده می‌گردد. لذا مفهوم RLS، با اندازه ذرات و حجم هر ذره از ترکیبات موجود در یک سیستم مورد مطالعه، ارتباط خطی مستقیم دارد (Sattar et al., 2012). نتایج RLS کمپلکس پروتئین نخود خلر-CYG در شکل ۶ آورده شده است. همانطور که مشاهده می‌گردد (شکل ۶ A)، طیف‌های RLS دارای دو پیک ماکزیمم در طول موج‌های ۴۰۵ و ۴۷۲ نانومتر می‌باشند. که به ترتیب بیانگر تجمعات ریزتر و درشت‌تر در کمپلکس پروتئین نخود خلر-CYG می‌باشند (Pasternack & Collings, 1995). با افزایش غلظت CYG تا ۰/۵ میکرومولار (شکل ۶ B)، ابتدا بدلیل تشکیل کمپلکس پروتئین نخود خلر-CYG از طریق پیوند هیدروژنی (ثابت شده از بخش قبل)، اندازه ذرات پروتئین اندکی افزایش یافته، لذا شدت نشر بیشتری از RLS در هر دو طول موج بویژه در طول موج ۴۷۲ نانومتر دیده می‌شود که حاکی

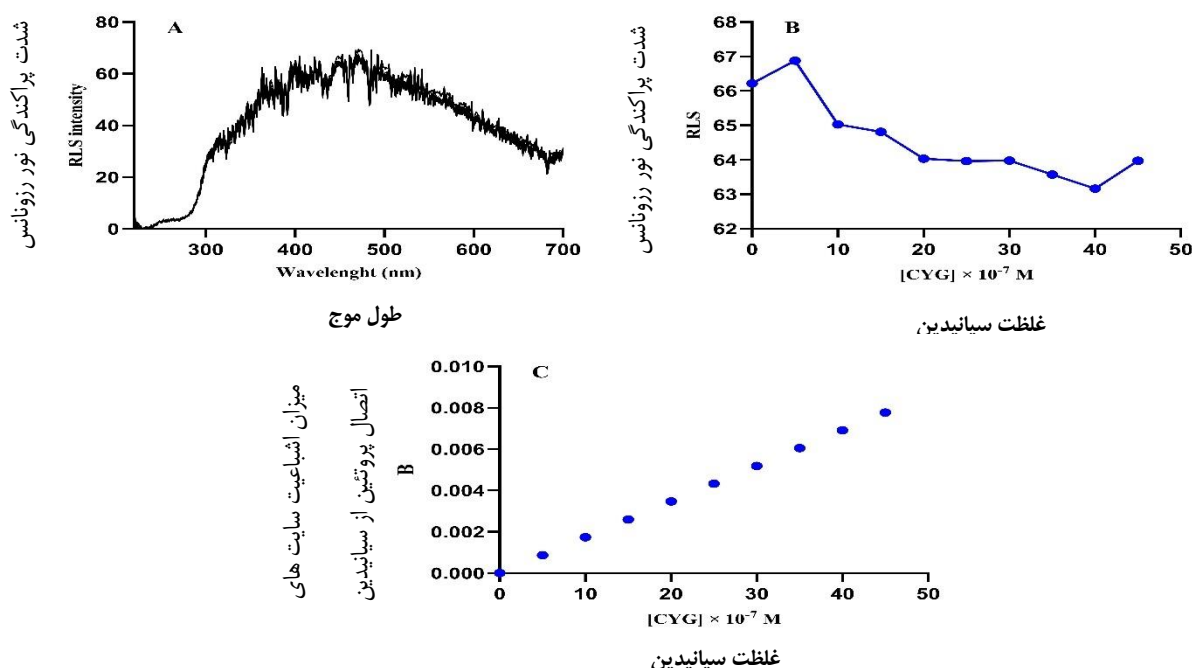
بررسی تغییرات ساختاری پروتئین نخود خلر در حضور سیانیدین-۳-گلیکوزید توسط مشتق دوم طیف‌های فلوئورسانس

استفاده از مشتق دوم طیف‌های نشر فلوئورسانس، تکنیکی مؤثر برای پایش تغییرات اندک در محیط پیرامون اسیدهای آمینه تیروزین و

برای این منظور، پارامتری بنام H تعریف شده است که عبارتست از اختلاف بین حداقل شدت نشر فلوئورسانس در نواحی طول موجی ۳۲۰-۳۵۰ نانومتر و شدت نشر در پیک ۳۷۰ نانومتر نسبت به اختلاف بین حداقل شدت نشر فلوئورسانس حداقلی در نواحی طول موجی ۳۲۰-۳۵۰ نانومتر و شدت نشر در پیک ۴۰۰ نانومتر. پارامتر H نشان دهنده تغییرات آبگریزی محیط پیرامون اسیدهای آمینه حلقوی بخصوص اسید آمینه تریپتوفان می‌باشد. مشتق دوم طیف‌های فرونشانی نشر فلوئورسانس پروتئین نخود خلر در مقابل غلظت‌های گوناگون CYG در شکل ۵ آورده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود، برآیند روند تغییرات پارامتر H با افزایش غلظت CYG، صعودی می‌باشد. این نتایج حاکی از افزایش آبگریزی محیط پیرامون اسید آمینه تریپتوفان ناشی از تاخوردگی موضعی پروتئین نخود خلر در حضور رنگدانه CYG می‌باشد. این نتیجه با نتایج تغییرات ساختاری پروتئین (طیف‌های فرونشانی فلوئورسانس همزمان (شکل ۳ A و B)، طیف‌های سه بعدی فلوئورسانس (شکل ۴) و تغییرات نسبت شدت فلوئورسانس ذاتی پروتئین در طول موج‌های ۳۵۰ به ۳۳۰ نانومتر (شکل ۳ D) در حضور ترکیب CYG کاملاً هم‌خوانی دارد و تأیید کننده آن نتایج می‌باشد. این نتایج با نتایج عبدالله پور و همکاران (Abdollahpour, Soheili, Saberi, & Chamani, 2016) مطابقت دارد.

طوری متصل شده باشند که گروه‌های آبگریز موجود در سطح پروتئین پوشانده شده است. با توجه به اینکه برهم‌کنش بین CYG و پروتئین نخود خلر از نوع هیدروژنی بوده و مکان‌های اتصال پیوندهای هیدروژنی اغلب در سطح پروتئین می باشد، می‌توان چنین پدیده‌ای را انتظاری داشت.

از تجمعات کنترل شده می‌باشد. در ادامه با افزایش غلظت‌های CYG در بازه غلظتی ۱ الی ۴ میکرو مولار، کاهش شدت RLS دیده می‌شود که بیانگر کاهش اندازه ذرات و تجمعات کمپلکس پروتئین نخود خلر- CYG می‌باشد. این امر احتمالاً بدلیل نحوه اتصال CYG به پروتئین نخود ارتباط دارد که ممکن است مولکول‌های CYG به سطح پروتئین



شکل ۶. طیف‌ها (A) و روند تغییرات (B) RLS پروتئین نخود خلر (۱ میلی گرم بر میلی لیتر) در حضور غلظت‌های مختلف CYG (0 الی 4.5×10^{-6} مولار) در طول موج نشری ۴۷۲ نانومتر در دمای محیط. ایزوترم اتصال لانگمیر در دمای محیط (C).

Figure 6. (A) Spectra and (B) variation trends of RLS (resonance light scattering) of grass pea protein (1 mg/mL) in the presence of different concentrations of CYG (0 to 4.5×10^{-6} M) at emission wavelength of 472 nm at room temperature. Langmuir binding isotherm at room temperature (C)

از دیگر دلایل کاهش میزان RLS می‌توان به دافعه الکترواستاتیکی ناشی از بار مثبت ترکیبات سیانیدین-۳-گلیکوزید (در pH ۳ سهم ترکیب کاتیون فلاویوم از ترکیب همی‌کتال در آنتوسیانین بیشتر بوده و چون بار مثبت دارد لذا بار CYG مثبت است (Brouillard, 1982)) و پروتئین نخود خلر در pH ۳ نیز اشاره کرد که تمایل اتصال قوی به هم ندارند و تمایل به تجمعات را کاهش می‌دهد. این نتایج با نتایج محسنی شهری و همکاران (Mohseni-Shahri, Housaindokht, Bozorgmehr, & Moosavi-Movahedi, 2014) مطابقت دارد. این محققان بیان کردند که کاهش بار منفی در سطح پروتئین (و متعاقباً افزایش بار مثبت سطح پروتئین) منجر به کاهش میزان تجمعات پروتئین می‌شود. اثبات شده است که یکی از عوامل مؤثر در ایجاد تجمعات پروتئینی، برهم‌کنش‌های پروتئین-پروتئین از سمت گروه‌های آبگریز سطحی در پروتئین می‌باشد

میزان سطوح آبگریز سطحی پروتئین بواسطه برهم‌کنش با CYG کاهش یابد، متعاقباً تجمعات آنها از سمت آبگریز سطحی کاهش و لذا شدت RLS نیز کاهش می‌یابد. نکته دیگری که در این محدوده غلظتی از CYG مشاهده می‌شود، اندکی جابجایی قرمز طول موج حداکثر نشری در RLS به طول موج‌های بلندتر می‌باشد که به تجمعات پروتئینی اشاره دارد (Sattar et al., 2012)، این جابجایی طول موجی در این محدوده غلظتی همراه با افزایش شدت RLS نمی‌باشد که علت آن این است که RLS تنها تجمعاتی که اندازه آنها در حدی باشد که نور فلئورسانس را پراکنده کنند می‌تواند نشان دهد (Sattar et al., 2012). در غلظت ۴/۵ میکرومولار، با افزودن CYG به پروتئین، به یکباره شدت RLS افزایش می‌یابد. این اتفاق ممکن است بدلیل افزایش قرار گیری CYG بر روی سطح پروتئین و رسیدن به حد آستانه

شدت RLS ممکن است بدلیل شکل‌گیری تجمعات بزرگتر پروتئینی باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داده که پروتئین نخود خلر قادر به تشکیل کمپلکس با رنگدانه CYG از طریق پیوندهای هیدروژنی با ثابت اتصال $10^3 \times 1/73$ بر مولار با مکانیسم ترکیب استاتیک و دینامیک و تعداد جایگاه اتصال $0/78$ می‌باشد. نتایج طیف‌های همزمان، سه بعدی و مشتق دوم فلئورسانس نشان داد که در اثر اتصال CYG به پروتئین نخود خلر، تاخوردگی موضعی در ساختار پروتئین ایجاد می‌شود که منجر به حفظ بخش زیادی از ساختار طبیعی پروتئین می‌شود. تضعیف ثابت اتصال پروتئین نخود خلر با افزایش دما نشان داد که استفاده از پروتئین نخود خلر گزینه‌ای مناسب برای اتصال به ترکیب CYG در سیستم‌های غذایی و غیره که در دمای محیط و شرایط اسیدی نیاز به مقادیر اندک سامانه‌های پروتئین بوده می‌باشد بطوری که در اثر اتصال به رنگدانه CYG، ساختار طبیعی پروتئین دستخوش تغییرات جدی نشود و ویژگی‌های عملکردی پروتئین تغییر نکند. همچنین اندازه کمپلکس مذکور در غلظت‌های بیشتر از ۲ برابر غلظت CYG نسبت به پروتئین افزایش می‌یابد که بیانگر رفتار مختلف این کمپلکس در غلظت‌های بالاتر نسبت به غلظت‌های پائین تر CYG می‌باشد.

منابع تأمین مالی

این پژوهش با حمایت مالی وزارت علوم تحقیقات و فناوری انجام شده است.

میزان مشارکت نویسندگان

رضوی زادگان جهرمی: مفهوم‌سازی، مدیریت داده‌ها، تحلیل رسمی، تأمین مالی، تحقیق و بررسی، روش‌شناسی، مدیریت پروژه، منابع، نرم‌افزار، نظارت، اعتبارسنجی، تجسم، نوشتن-پیش‌نویس و نوشتن-بررسی و ویرایش. **فروهش:** تأمین مالی، بررسی و ویرایش.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچگونه تعارض منافی ندارند.

غلظتی از CYG برای نزدیک کردن مولکول‌های پروتئینی بهم و تشکیل تجمعات پروتئینی از طریق برهم‌کنش‌های پروتئین با CYG باشد. عبارت دیگر، مولکول‌های CYG در غلظت بالا توانسته‌اند مانند پلی بین پروتئین‌ها عمل کنند و این مولکول‌ها را بهم متصل کنند و سبب ایجاد تجمعات بزرگ در ساختار پروتئین گردند که با افزایش شدت RLS دیده می‌شوند. این افزایش تجمعات پروتئینی در اثر پیوندهای هیدروژنی با نتایج جهرمی و همکاران (Jahromi et al., 2020) که به برهم‌کنش پروتئین سرم آلبومین گاوی و رنگدانه سیانیدین-۳-گلیکوزید پرداخته است شباهت دارد. در این مطالعه نشان داده شده است که در غلظت‌های بالاتر رنگدانه CYG به پروتئین سرم آلبومین گاوی (نسبت ۱۳ به ۱)، رنگدانه مانند پلی، پروتئین‌های سرم آلبومین گاوی را بهم متصل کرده و سبب ایجاد ساختارهای تجمعی پروتئین شده و اندازه ذرات کمپلکس افزایش یافته است. همچنین نتایج سرزهی و چمنی (Sarzehi & Chamani, 2010) نیز افزایش تجمعات پروتئینی ناشی از برهم‌کنش با لیگاند را تأیید می‌کند. در مطالعه‌ای دیگر رهنما و همکاران (Rahnema, Mahmoodian-Moghaddam, Khorsand-Ahmadi, Saberi & Chamani, 2015) محققان نشان داده‌اند که در غلظت‌های پائین لیگاند، علی‌رغم ایجاد برهم‌کنش بین پروتئین و لیگاند، تغییرات اندکی در شدت RLS رخ داده است. با ادامه تیتراسیون و افزایش غلظت لیگاند، به یکباره شدت نشر RLS با شیب بیشتری افزایش می‌یابد. این محققان بیان کردند که تجمعات بین پروتئینی در غلظت‌های بیشتر لیگاند شدت بیشتری می‌گیرد و لیگاند می‌تواند سبب افزایش اندازه ذرات کمپلکس گردد. در غلظت ۴/۵ میکرومولار، میزان مولکول‌های CYG نسبت به پروتئین نخود خلر در محیط ۲ برابر می‌باشد. این افزایش دو برابری CYG نسبت به پروتئین در سطح از یک طرف و عدم اشباعیت مکان‌های اتصال پروتئین از CYG (شکل ۶ C) (بدلیل روند خطی با شیب زیاد از اشغال شدن مکان‌های اتصال پروتئین (B) از CYG و عدم مشاهده تغییرات اندک در پر شدن این جایگاه‌ها در غلظت‌های بالای CYG) از طرفی دیگر سبب شده تا بتوان چنین استدلال کرد که در غلظت‌های بالاتر از ۴/۵ میکرومولار تا رسیدن به حد اشباعیت جایگاه‌های اتصال پروتئین، میل ترکیبی بین CYG و پروتئین موجب شکل‌گیری کمپلکس‌های بزرگتر بدلیل افزایش برهم‌کنش‌های بیشتر می‌باشد. لذا این افزایش ثانویه در

References

1. Abdollahpour, N., Soheili, V., Saberi, M.R., & Chamani, J. (2016). Investigation of the interaction between human serum albumin and two drugs as binary and ternary systems. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 41(6), 705–721. <https://doi.org/10.1007/s13318-015-0297-y>

2. Abioye, R.O., Obeme-Nmom, J.I., & Udenigwe, C.C. (2024). Pea protein–curcumin interactions and their effects on in vitro protein digestibility. *ACS Food Science & Technology*, 4(3), 711–718. <https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.3c00614>
3. Allahdad, Z., Khammari, A., Karami, L., Ghasemi, A., Sirotkin, V.A., Haertlé, T., & Saboury, A.A. (2020). Binding studies of crocin to β -Lactoglobulin and its impacts on both components. *Food Hydrocolloids*, 108, 106003. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106003>
4. Allahdad, Z., Varidi, M., Zadmand, R., & Saboury, A.A. (2018). Spectroscopic and docking studies on the interaction between caseins and β -carotene. *Food Chemistry*, 255, 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.143>
5. Allahdad, Z., Varidi, M., Zadmand, R., Saboury, A.A., & Haertlé, T. (2019). Binding of β -carotene to whey proteins: Multi-spectroscopic techniques and docking studies. *Food Chemistry*, 277, 96–106. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.057>
6. Amani, N., Reza Saberi, M., & Khan Chamani, J. (2011). Investigation by fluorescence spectroscopy, resonance rayleigh scattering and zeta potential approaches of the separate and simultaneous binding effect of paclitaxel and estradiol with human serum albumin. *Protein and Peptide Letters*, 18(9), 935–951. <https://doi.org/10.2174/092986611796011473>
7. Barakat, C., & Patra, D. (2013). Combining time-resolved fluorescence with synchronous fluorescence spectroscopy to study bovine serum albumin-curcumin complex during unfolding and refolding processes. *Luminescence*, 28(2), 149–155. <https://doi.org/10.1002/bio.2354>
8. Brouillard, R. (1982). Chemical structure of anthocyanins. *Anthocyanins as Food Colors*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-472550-8.50005-6>
9. Cai, D., Li, X., Chen, J., Jiang, X., Ma, X., Sun, J., Tian, L., Vidyarthi, S.K., Xu, J., & Pan, Z. (2022). A comprehensive review on innovative and advanced stabilization approaches of anthocyanin by modifying structure and controlling environmental factors. *Food Chemistry*, 366, 130611. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130611>
10. Cao, J., Li, F., Li, Y., Chen, H., Liao, X., & Zhang, Y. (2021). Hydrophobic interaction driving the binding of soybean protein isolate and chlorophyll: Improvements to the thermal stability of chlorophyll. *Food Hydrocolloids*, 113, 106465. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106465>
11. Castañeda-Ovando, A., de Lourdes Pacheco-Hernández, M., Páez-Hernández, M.E., Rodríguez, J.A., & Galán-Vidal, C.A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113(4), 859–871. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.001>
12. Cheng, J., Ma, Y., Li, X., Yan, T., & Cui, J. (2015). Effects of milk protein-polysaccharide interactions on the stability of ice cream mix model systems. *Food Hydrocolloids*, 45, 327–336. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.11.027>
13. Chung, C., Rojanasasithara, T., Mutilangi, W., & McClements, D.J. (2015). Enhanced stability of anthocyanin-based color in model beverage systems through whey protein isolate complexation. *Food Research International*, 76, 761–768. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.003>
14. Cortez, R., Luna-Vital, D.A., Margulis, D., & Gonzalez de Mejia, E. (2017). Natural pigments: stabilization methods of anthocyanins for food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(1), 180–198. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12244>
15. de Carvalho Bertozo, L., Fernandes, A.J., Yogui, M.I., Bolean, M., Ciancaglini, P., & Ximenes, V.F. (2020). Entropy-driven binding of octyl gallate in albumin: failure in the application of temperature effect to distinguish dynamic and static fluorescence quenching. *Journal of Molecular Recognition*, 33(7), e2840. <https://doi.org/10.1002/jmr.2840>
16. Fennema, O.R., Damodaran, S., & Parkin, K.L. (2017a). Introduction to food chemistry. In *Fennema's food chemistry* (fifth ed., pp. 290–291). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420020526>
17. Fennema, O.R., Damodaran, S., & Parkin, K.L. (2017b). Introduction to food chemistry. In *Fennema's food chemistry* (pp. 272). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420020526>
18. Fenner, K., Reynolds, G., & Basu, S. (2020). Fluorescence quenching of various indoles by nickel complexes. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 239, 118473. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118473>
19. Feyzi, S., Milani, E., & Golimovahhed, Q.A. (2018). Grass pea (*Lathyrus sativus* L.) protein isolate: The effect of extraction optimization and drying methods on the structure and functional properties. *Food Hydrocolloids*, 74, 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.07.031>
20. Geng, S., Jiang, Z., Ma, H., Wang, Y., Liu, B., & Liang, G. (2020). Interaction mechanism of flavonoids and bovine β -lactoglobulin: Experimental and molecular modelling studies. *Food Chemistry*, 312, 126066. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126066>

21. Guo, X., Yao, J., Zhang, J., Wu, Q., Liu, L., & Liu, L. (2025). The binding mechanisms of oat flavonoids and sodium caseinate and their anti-glycation effect: spectroscopy, chromatography, and molecular docking study. *Food Bioscience*, 107058. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2025.107058>
22. Jahromi, S.H.R., Farhoosh, R., Hemmateenejad, B., & Varidi, M. (2020). Characterization of the binding of cyanidin-3-glucoside to bovine serum albumin and its stability in a beverage model system: A multispectroscopic and chemometrics study. *Food Chemistry*, 311, 126015. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126015>
23. Joye, I.J., Davidov-Pardo, G., Ludescher, R.D., & McClements, D.J. (2015). Fluorescence quenching study of resveratrol binding to zein and gliadin: Towards a more rational approach to resveratrol encapsulation using water-insoluble proteins. *Food Chemistry*, 185, 261-267. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.128>
24. Konczak, I., & Zhang, W. (2004). Anthocyanins—more than nature's colours. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2004(5), 239. <https://doi.org/10.1155/S110724304407013>
25. Li, K., Yuan, X., Zhao, J., Ren, J., Ma, L., Liao, X., Hu, X., Chen, F., & Ji, J. (2024). Covalent conjugate of pea protein induced by cyanidin-3-O-glucoside quinone: The structural formation and functional properties. *Food Hydrocolloids*, 153, 110047. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2024.110047>
26. Li, T., Hu, P., Dai, T., Li, P., Ye, X., Chen, J., & Liu, C. (2018). Comparing the binding interaction between β -lactoglobulin and flavonoids with different structure by multi-spectroscopy analysis and molecular docking. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 201, 197-206. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.05.011>
27. Ma, Z., Cheng, J., Jiao, S., & Jing, P. (2022). Interaction of mulberry anthocyanins with soybean protein isolate: Effect on the stability of anthocyanins and protein in vitro digestion characteristics. *International Journal of Food Science & Technology*, 57(4), 2267-2276. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15576>
28. Mazza, G., & Miniati, E. (2018). *Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains*. CRC press. <https://doi.org/10.1201/9781351069700-1>
29. Mehr, H.M., & Koocheki, A. (2021). Physicochemical properties of Grass pea (*Lathyrus sativus* L.) protein nanoparticles fabricated by cold atmospheric-pressure plasma. *Food Hydrocolloids*, 112, 106328. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106328>
30. Meng, Y., Hao, L., Tan, Y., Yang, Y., Liu, L., Li, C., & Du, P. (2021). Noncovalent interaction of cyanidin-3-O-glucoside with whey protein isolate and β -lactoglobulin: Focus on fluorescence quenching and antioxidant properties. *LWT*, 137, 110386. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110386>
31. Mohseni-Shahri, F.S., Housaindokht, M.R., Bozorgmehr, M.R., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2014.04.033>
32. Mozo-Villarias, A. (2002). Second derivative fluorescence spectroscopy of tryptophan in proteins. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 50(2-3), 163-178. [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(01\)00181-6](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(01)00181-6)
33. Ni, Y., Zhu, R., & Kokot, S. (2011). Competitive binding of small molecules with biopolymers: a fluorescence spectroscopy and chemometrics study of the interaction of aspirin and ibuprofen with BSA. *Analyst*, 136(22), 4794-4801. <https://doi.org/10.1039/C1AN15550D>
34. Nichenametla, S.N., Taruscio, T.G., Barney, D.L., & Exon, J.H. (2006). A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(2), 161-183. <https://doi.org/10.1080/10408390591000541>
35. Pasternack, R.F., & Collings, P.J. (1995). Resonance light scattering: a new technique for studying chromophore aggregation. *Science*, 269(5226), 935-939. <https://doi.org/10.1126/science.7638615>
36. Peng, X., Wang, X., Qi, W., Su, R., & He, Z. (2016). Affinity of rosmarinic acid to human serum albumin and its effect on protein conformation stability. *Food Chemistry*, 192, 178-187. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.109>
37. Rahnama, E., Mahmoodian-Moghaddam, M., Khorsand-Ahmadi, S., Saberi, M.R., & Chamani, J. (2015). Binding site identification of metformin to human serum albumin and glycosylated human serum albumin by spectroscopic and molecular modeling techniques: a comparison study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 33(3), 513-533. <https://doi.org/10.1080/07391102.2014.893540>
38. Rampon, V., Genot, C., Riaublanc, A., Anton, M., Axelos, M., & McClements, D. (2003). Front-face fluorescence spectroscopy study of globular proteins in emulsions: displacement of BSA by a nonionic surfactant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(9), 2482-2489. <https://doi.org/10.1021/jf026168g>
39. Ross, P.D., & Subramanian, S. (1981). Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Biochemistry*, 20(11), 3096-3102. <https://doi.org/10.1021/bi00514a017>
40. Royer, C.A. (2006). Probing protein folding and conformational transitions with fluorescence. *Chemical Reviews*, 106(5), 1769-1784. <https://doi.org/10.1021/cr0404390>

41. Sarzehi, S., & Chamani, J. (2010). Investigation on the interaction between tamoxifen and human holo-transferrin: determination of the binding mechanism by fluorescence quenching, resonance light scattering and circular dichroism methods. *International Journal of Biological Macromolecules*, 47(4), 558–569. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.08.002>
42. Sattar, Z., Iranfar, H., Asoodeh, A., Saberi, M.R., Mazhari, M., & Chamani, J. (2012). Interaction between holo transferrin and HSA–PPIX complex in the presence of lomefloxacin: An evaluation of PPIX aggregation in protein–protein interactions. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 97, 1089–1100. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.07.034>
43. Shahsavani, M.B., Ahmadi, S., Aseman, M.D., Nabavizadeh, S.M., Alavianmehr, M.M., & Yousefi, R. (2016). Comparative study on the interaction of two binuclear Pt (II) complexes with human serum albumin: Spectroscopic and docking simulation assessments. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 164, 323–334. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.09.035>
44. Shi, J.H., Wang, J., Zhu, Y.Y., & Chen, J. (2014). Characterization of intermolecular interaction between cyanidin-3-glucoside and bovine serum albumin: Spectroscopic and molecular docking methods. *Luminescence*, 29(5), 522–530. <https://doi.org/10.1002/bio.2579>
45. Tabasi, M., Maghami, P., Amiri-Tehranizadeh, Z., Saberi, M.R., & Chamani, J. (2023). New perspective of the ternary complex of nano-curcumin with β -lactoglobulin in the presence of α -lactalbumin: Spectroscopic and molecular dynamic investigations. *Journal of Molecular Liquids*, 392, 123472. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.123472>
46. Tamburino, R., Guida, V., Pacifico, S., Rocco, M., Zarelli, A., Parente, A., & Di Maro, A. (2012). Nutritional values and radical scavenging capacities of grass pea (*Lathyrus sativus* L.) seeds in Valle Agricola district, Italy. *Australian Journal of Crop Science*, 6(1), 149–156. <https://search.informit.org/doi/abs/10.3316/informit.053932061026241>
47. Tang, L., Li, S., Bi, H., & Gao, X. (2016). Interaction of cyanidin-3-O-glucoside with three proteins. *Food Chemistry*, 196, 550–559. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.089>
48. Tian, F.-F., Li, J.-H., Jiang, F.-L., Han, X.-L., Xiang, C., Ge, Y.-S., Li, L.-L., & Liu, Y. (2012). The adsorption of an anticancer hydrazone by protein: an unusual static quenching mechanism. *RSC Advances*, 2(2), 501–513. <https://doi.org/10.1039/C1RA00521A>
49. Tsuda, T., Horio, F., Uchida, K., Aoki, H., & Osawa, T. (2003). Dietary cyanidin 3-O- β -D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. *The Journal of Nutrition*, 133(7), 2125–2130. <https://doi.org/10.1093/jn/133.7.2125>
50. Van de Weert, M., & Stella, L. (2011). Fluorescence quenching and ligand binding: A critical discussion of a popular methodology. *Journal of Molecular Structure*, 998(1-3), 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2011.05.023>
51. Wei, J., Xu, D., Zhang, X., Yang, J., & Wang, Q. (2018). Evaluation of anthocyanins in *Aronia melanocarpa*/BSA binding by spectroscopic studies. *Amb Express*, 8(1), 72. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0604-5>
52. Wu, H., Oliveira, G., & Lila, M.A. (2023). Protein-binding approaches for improving bioaccessibility and bioavailability of anthocyanins. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 22(1), 333–354. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13070>
53. Yang, P., Wang, W., Xu, Z., Rao, L., Zhao, L., Wang, Y., & Liao, X. (2023). New insights into the pH dependence of anthocyanin-protein interactions by a case study of cyanidin-3-O-glucoside and bovine serum albumin. *Food Hydrocolloids*, 140, 108649. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.108649>
54. Zhang, L., Liang, R., & Li, L. (2022). The interaction between anionic polysaccharides and legume protein and their influence mechanism on emulsion stability. *Food Hydrocolloids*, 131, 107814. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107814>
55. Zheng, J., Zheng, X., Zhao, L., Yi, J., & Cai, S. (2021). Effects and interaction mechanism of soybean 7S and 11S globulins on anthocyanin stability and antioxidant activity during in vitro simulated digestion. *Current Research in Food Science*, 4, 543–550. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.08.003>