مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال دوم، شماره دوم، پیاپی ششم، پاییز ۱۳۹۲ (۱۶-۷)

اثر سولفات کادمیوم بر پایداری حرارتی و سینتیک آنزیم پراکسیداز در دماهای مختلف

نیره بهامین[۱]، بهزاد شارقی[۲]*
۱. کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشگاه شهرکرد
۲. دانشیار، دانشگاه شهرکرد
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۶/۳۱، تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۰۹/۱۰)

چکیده
در این مطالعه، میانکنش غلظت‌های مختلف سولفات کادمیوم با آنزیم پراکسیداز (E.C 1.11.1.7) در دماهای مختلف (۲۵-۵۰ °C) مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور مطالعات پایداری حرارتی، اسپکتروفتومتری، فلوریمتری و سینتیک آنزیمی برای به دست آوردن پارامترهای ترمودینامیکی $\Delta G°$، $\Delta H°_m$، $\Delta S°_m$، T_m و نیز پارامترهای سینتیکی V_{max} و K_m انجام شد. نتایج نشان دادند که سولفات کادمیوم در غلظت‌های مختلف باعث مهار نارقابتی پراکسیداز می‌شود و افزایش دما این اثر مهاری را تشدید می‌کند. همچنین سولفات کادمیوم باعث کاهش پایداری حرارتی پراکسیداز شده و T_m آن را کاهش داد. در مطالعات اسپکتروفتومتری اثر سولفات کادمیوم بر ساختار آنزیم به گونه ای بود که جذب ۲۷۵nm افزایش و دما نیز آن را افزایش داد، همچنین جذب ۴۰۴nm (باند سورت) کاهش یافت و دما نیز آن را کاهش داد. در مجموع، سولفات کادمیوم در رفتاری وابسته به زمان و دز و تحت تأثیر دما در محیط اطراف گروه هم متصل شده و باعث کاهش پایداری حرارتی و مهار نارقابتی پراکسیداز می‌شود.

واژه‌های کلیدی: سولفات کادمیوم، پراکسیداز، کینتیک، پایداری حرارتی، اسپکتروفتومتری.

The Effect of Cadmium Sulfate on the Thermal Stability and Kinetics of Peroxidase at Different Temperatures

N. Bahamin[1], B. Shareghi[2]*
1. MSc of biochemistry, Shahrekord university
2. Associated Professor, Shahrekord university
(Received: Sep. 21, 2012; Accepted: Dec. 1, 2013)

ABSTRACT
In this study, the interaction of various concentrations of Cadmium Sulfate with Peroxidase (E.C 1.11.1.7) was investigated in different temperatures (25-35 °C). For this purpose thermostability, spectrophotometry, spectroflorimetry and kinetics studies were done to obtain thermodynamic parameters including $\Delta G°$, $\Delta H°_m$, $\Delta S°_m$, T_m and also kinetics parameters including V_{max} and K_m. The results showed that Cadmium Sulfate caused uncompetitive inhibition at different temperatures and increasing of temperature intensified this inhibition effect. Also Cadmium Sulfate was reduced the stability of peroxidase and reduced its T_m. In the spectrophotometric studies the effect of Cadmium Sulfate on the peroxidase in such a way that the absorption in 275nm increased and temperatures increased it too, also the absorption in 404nm (soret bond) decreased and temperature decreased it too. Totally, Cadmium Sulfate ions in a time- and dose- dependent manner and affected by temperature bind to the peroxidase in the heme environment and decrease the thermostability of it, and exert uncompetitive inhibition.

Keywords: Cadmium sulfate, Peroxidase, Kinetics, Thermostability, Spectrophotometery.

*نویسنده مسئول: بهزاد شارقی E-mail: share.beh@sci.sku.ac.ir

مقدمه

فلزات سنگین از دگرگون‌کننده‌های آنزیم‌ها هستند. فلزات سنگین که سرب، آلومینیوم، جیوه، مس، کادمیوم، مس، نیکل و آرسنیک را شامل می‌گردد از سموم پرخطر پیرامون ما می‌باشند. این سموم در هوای تنفسی، آب آشامیدنی، مصالح ساختاری، لوازم آشپزخانه و حتی البسه موجوداند. برخی فلزات به مقدار ناچیز برای عملکرد طبیعی بدن ضروری می‌باشند اما ورود بیش از اندازه آنها به بدن مسمومیت ایجاد خواهد کرد. ایراد اصلی فلزات سنگین این است که در بدن متابولیزه نمی‌شوند. افزایش آلودگی محیط با فلزات سنگین باعث شده در جستجوی راه‌هایی برای پاک کردن محیط و نیز بررسی مکانیزم سمیت این فلزات باشیم (Moore and Ramamoorthy, 1984; Alloway, 1995; Volesky and Holan, 1995; Giller, Witter *et al.*, 1998). کادمیوم یک آلودگی فلزی بسیار توزیع شده در محیط است که می‌تواند از طریق بالاگیری مستقیم و نیز تجمع در زنجیره غذایی به داخل سیستم‌های زیستی جذب شود. در میان اثرات سمی گزارش شده برای کادمیوم به موارد زیر می‌پردازیم: کادمیوم کارسینوژن قوی انسان و حیوان است، باعث تخریب اسکلتی و کاهش قدرت استخوان‌ها، باعث شکست رشته DNA به صورت آزمایشگاهی و حیاتی (*in vivo* و *in vitro*) می‌شود، و مسئول کاهش تولید توده زیستی در گیاهان است. کادمیوم در آلیاژهای دندانی، باطری‌ها، روغن موتور، غذاهای دریایی، سرامیک‌ها، دود سیگار، چای و قهوه، کودها، آلیاژهای لحیم‌کاری، لوله‌های گالوانیزه، آب لوله‌کشی و یا چاه، الکترودهای جوشکاری، دود ناشی از سوختن لاستیک‌ها و پلاستیک‌ها، حبوبات و غلات فاقد سبوس وجود دارد(Keyhani, Keyhani *et al.*, 2003). پراکسیدازها (E.C 1.11.1.7) آنزیم‌های سم‌زدای مهمی هستند که برای خلاص شدن سلول‌ها از پراکسید هیدروژن اضافی تحت شرایط طبیعی و استرس، شامل آلودگی سطوح سمی فلزات سنگین، استفاده می‌شوند. به هر حال استرس شدید ممکن است فعالیت سم‌زدایی خود آنزیم را تحت تأثیر قرار دهد. اگرچه پراکسیدازها در حضور تعدادی از یون‌های فلزی فعال باقی می‌مانند، اما در گزارشاتی نیز مهار آنها توسط یون‌های فلزی روشن شده است (Keyhani *et al.*, 2003). پراکسیدازها در طبقه‌بندی آنزیم‌ها در گروه اکسیدوردوکتازها قرار می‌گیرند و توسط تعدادی از میکروارگانیزم‌ها و گیاهان تولید می‌شوند. این آنزیم‌ها پروتئین‌های دارای گروه هم (haem) بوده و گروه پروستتیک آنها آهن (III) پروتوپورفیرین IX (فری پروتوپورفیرین IX) است. آنها دارای وزن مولکولی از ۳۰۰۰۰ تا ۱۵۰۰۰۰ دالتون دارند. این آنزیم‌ها عمل احیای پراکسیدها مثل پراکسید هیدروژن، و اکسیداسیون مواد آلی و معدنی مختلف را کاتالیز می‌کنند. در واقع پراکسیدازها اکسیداسیون سوبستراهای مختلف را با استفاده از پراکسید هیدروژن یا دیگر پراکسیدها کاتالیز می‌کنند. پراکسیدازها به طور وسیع در بیوشیمی بالینی و ایمونواسی آنزیمی استفاده می‌شوند (Lin, Chen *et al.*, 1996). بعضی کاربردهای جدید که برای پراکسیدازها پیشنهاد شده است شامل تیمار پسماندهای حاوی ترکیبات فنولی، سنتز مواد شیمیایی آروماتیک مختلف و حذف پراکسید از موادی مانند مواد غذایی و پسماندهای صنعتی می‌باشد (Agostini, Hernandez-Ruiz *et al.*, 2002). به علاوه، گونه‌های فعال اکسیژن ازجمله پراکسید هیدروژن، نقش مهمی را در آپوپتوز سلول ایفا می‌کنند (Curtin, Donovan *et al.*, 2002). بنابراین پیگیری مقادیر پراکسید هیدروژن در تحقیقات زیستی و کاربردهای صنعتی مهم است (Towne, Will *et al.*, 2004). برجستگی‌های ریشه گیاه ترب کوهی به عنوان یکی از منابع تجاری تولید پراکسیداز استفاده می‌شود (Saitou, Kamada

(*et al.*, 1991). پراکسیداز ترب کوهی، ایزوآنزیم C، شامل یک پلی‌پپتید تنها است که ۳۰۸ رزیدوی اسید آمینه دارد. رزیدوی انتهای N به وسیله پیروگلوتامات بلوکه شده و انتهای C ناهمگن است، همراه با بعضی مولکول‌های فاقد رزیدوی آخر یعنی سرین ۳۰۸. چهار پیوند دی سولفید در آنزیم وجود دارد (Yang, Gray *et al.*, 1996, Takahashi, Lee *et al.*, 1998). محتوای کلی کربوهیدرات آنزیم مقادیری بین ۱۸ تا ۲۲ درصد دارد. دو مکان اتصال کلسیم در موقعیت‌های پروکسیمال و دیستال نسبت به صفحه هم قرار گرفته‌اند و به وسیله شبکه‌ای از باندهای هیدروژنی به ناحیه هم متصل هستند. ساختار آنزیم به طور زیادی دارای مارپیچ آلفا است گرچه یک ناحیه کوچک صفحه بتا نیز وجود دارد (Veitch, 2004). دانستن مکانیزم‌های غیر فعال شدن آنزیم و برگشت‌پذیر یا برگشت‌ناپذیر بودن این واکنش‌ها باعث کمک به خصوصیات پایداری آنزیم می‌شود که به موجب آن کنترل بهتر را در فرآیندهای بی‌اثر سازی، روش‌های پایدارسازی و ویژگی‌های کاتالیتیک مقدور می‌سازد (Iyer and Ananthanarayan, 2008).

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی

آنزیم پراکسیداز ترب کوهی به صورت پودر خشک، از شرکت مرک تهیه شد. استات سدیم و سولفات کادمیوم و پراکسید هیدروژن نیز از شرکت مرک خریداری شدند. ارتو- دی آنیزیدین از کمپانی سیگما خریداری شد.

روش های مطالعاتی

اندازه‌گیری T_m پراکسیداز در حضور غلظت‌های مختلف سولفات کادمیوم

برای مطالعه پایداری حرارتی پراکسیداز ترب کوهی در دامنه حرارتی ۳۰-۹۰°C از دستگاه اسپکتروفتومتری UV/VIS شیمادزو مدل pharmacia 4000 استفاده شد. غلظت نمونه آنزیمی مورد استفاده ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در تامپون استات ۰/۱ مولار با pH=۴ بوده است. علت انتخاب pH=۴ این است که طبق مطالعات گذشته تناسب بالاتری برای یون آهن ۶ کوردینات در pH=۴ نسبت به pH=۷ وجود دارد که طیف جذبی را آشفته نمی‌کند (Smulevich, Paoli *et al.*, 1997, Laurenti, Suriano *et al.*, 2000). محلول غلیظ سولفات کادمیوم با غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار در آب مقطر دو بار تقطیر تهیه شد و غلظت‌های ۱۰۰-۵ میلی‌مولار آن مورد استفاده قرار گرفت و اثر آنها بر پایداری حرارتی آنزیم بررسی شد.

مطالعات اسپکتروفتومتری پراکسیداز در حضور غلظت‌های مختلف سولفات کادمیوم در دماهای مختلف

به این منظور از دستگاه اسپکتروفتومتری UV/VIS شیمادزو مدل pharmacia 4000 استفاده شد. غلظت نمونه آنزیمی ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و تامپون استات با pH=۴ مورد استفاده قرار گرفت. محلول غلیظ سولفات کادمیوم با غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار در آب مقطر دو بار تقطیر تهیه شد و غلظت‌های ۱۰۰-۵ میلی‌مولار آن مورد استفاده قرار گرفت. در این مطالعات تغییرات باند سورت و باند ۲۸۰ نانومتر آنزیم در دماهای مختلف ۳۰، ۴۰ و ۵۰°C بررسی شد.

تعیین پارامترهای سینتیکی پراکسیداز در حضور غلظت‌های مختلف سولفات کادمیوم در دماهای مختلف

برای این مطالعات از دستگاه اسپکتروفتومتری UV/VIS شیمادزو مدل pharmacia 4000 استفاده شد. غلظت نمونه آنزیم مورد مطالعه ۰/۰۷۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. تامپون استات سدیم ۰/۱

مولار با pH=۴ مورد استفاده قرار گرفت. سوبسترای مورد استفاده ارتو- دی آنیزیدین بود که محلول غلیظ آن با غلظت ۲۰ میلی‌مولار در آب مقطر دو بار تقطیر تهیه شد. محلول غلیظ پراکسید هیدروژن نیز با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار در آب مقطر دو بار تقطیر تهیه شد. در این آزمایشات ارتو دی-آنیزیدین به عنوان سوبسترای ثابت با غلظت ۵ میلی‌مولار در هر نمونه و پراکسید هیدروژن با غلظت‌های ۵-۱ میلی‌مولار به عنوان سوبسترای متغیر در نظر گرفته شدند. طول موج منتخب ۴۶۰ نانومتر مخصوص پیگیری محصول تولید شده از اکسیداسیون ارتو-دی آنیزیدین است. محلول غلیظ سولفات کادمیوم با غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار در آب مقطر دو بار تقطیر تهیه و اثر غلظت‌های ۵۰-۰ میلی‌مولار آن، پس از ۵ دقیقه انکوباسیون با آنزیم، در دماهای ۲۵، ۳۵ و ۴۵°C بر سینتیک آنزیم مورد بررسی قرار گرفت. بعد از جمع‌آوری اطلاعات نمودارهای میکائیلیس- منتن و لینویور- برک رسم شده و با بدست آوردن طول از مبدأ (K_m) و عرض از مبدأ (V_{MAX}) نمودار لینویور- برک، پارامتر های سینتیکی محاسبه شد.

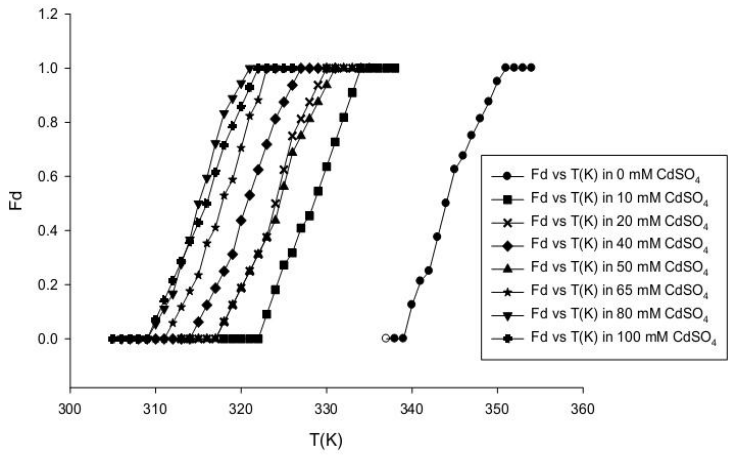
نتایج

اثر سولفات کادمیوم بر پایداری حرارتی پراکسیداز

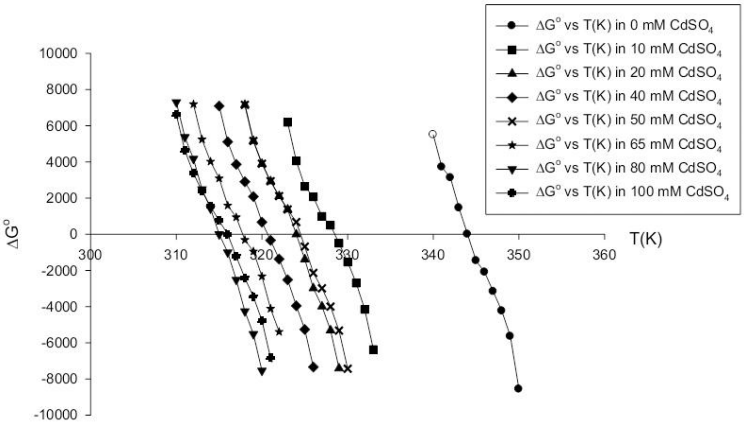
پایداری حرارتی آنزیم پراکسیداز ترب کوهی با محاسبه تغییرات انرژی آزاد گیبس و T_m آنزیم محاسبه می‌شود. با محاسبه کسر دناتوراسیون (Fd) و قرار دادن آن در رابطه زیر، تغییرات انرژی آزاد گیبس به دست می آید:

$$\Delta G^{\circ} = -RTlnK_{eq} = -RTln[F_d/(1-F_d)] = -RTln\left[\left(\frac{A_N - A_{obs}}{A_{obs} - A_D}\right)\Big/\left(1 - \frac{A_N - A_{obs}}{A_{obs} - A_D}\right)\right]$$

در این رابطه A_N و A_D مقادیر جذب در حالت طبیعی و دگرگون شده هستند و A_{obs} جذب مشاهده شده می‌باشد. T_m یا دمای ذوب پروتئین جایی است که ΔG° برابر با صفر است. ما همچنین با استفاده از شیب خط منحنی ΔG° توانستیم ΔS_m° را به دست آورده و با قرار دادن آن در رابطه $\Delta H_m^{\circ} = T_m \Delta S_m^{\circ}$ مقدار ΔH_m° را نیز به دست آوریم. با توجه به مطالب فوق مطالعات پایداری حرارتی در حضور سولفات کادمیوم انجام شد. بر این اساس مقادیر T_m°، ΔS_m° و ΔH_m° در جدول ۱ محاسبه شده‌اند و چنانچه مشاهده می‌شود با در نظر گرفتن T_m آنزیم که ۳۴۴ کلوین است، افزایش غلظت یون کادمیوم تا ۱۰۰ میلی‌مولار، باعث کاهش T_m در حدود ۲۸ درجه می‌شود و مقادیر ΔS_m° و ΔH_m° نیز سیر کاهشی دارند. شکل‌های ۱ و ۲ نیز نشانگر تغییرات کسر دناتوراسیون و ΔG° در برابر دما می‌باشند.



شکل ۱. تغییرات کسر دناتوراسیون پراکسیداز ترب کوهی در مقابل دما در غلظت‌های مختلف سولفات کادمیوم



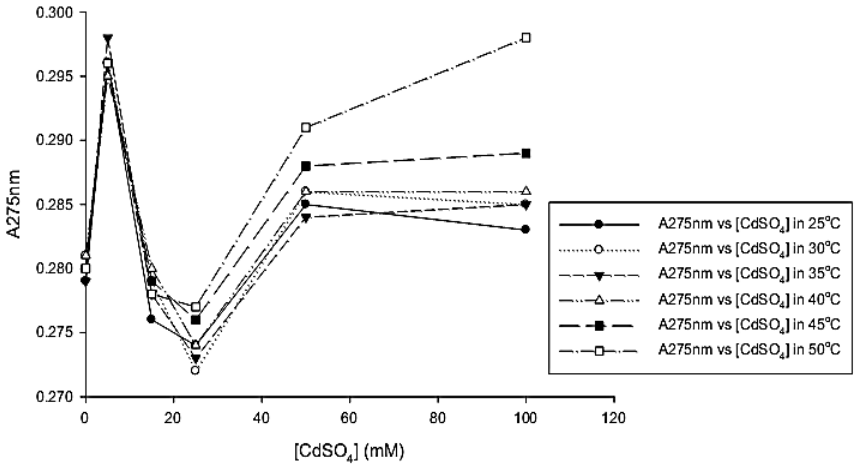
شکل ۲. تغییرات انرژی آزاد گیبس پراکسیداز ترب کوهی در مقابل دما در غلظت‌های مختلف سولفات کادمیوم

جدول ۱. تغییرات پارامتر های T_m°، ΔS_m° و ΔH_m° در غلظت‌های مختلف سولفات کادمیوم در pH=۴

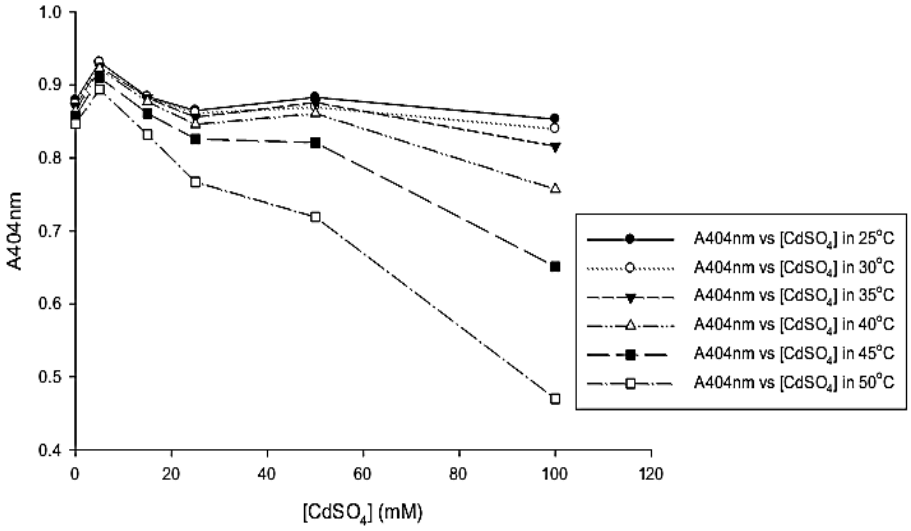
$CdSO_4$ (mM)	T_m (K)	S_m° Δ(J/mol)	H_m° Δ(J/mol)
۰	۳۴۴	۱۳۰۰	۴۴۷۲۰۰
۲۰	۳۲۴	۱۲۲۷/۴	۳۹۸۹۰۵
۴۰	۳۲۱	۱۲۰۷/۳	۳۸۷۵۴۳/۳
۶۵	۳۱۸	۱۱۷۶/۱	۳۷۳۹۹۹/۸
۱۰۰	۳۱۶	۱۰۹۵/۸	۳۴۶۲۷۲/۸

مطالعه اسپکتروفتومتری پراکسیداز در حضور سولفات کادمیوم در دماهای مختلف

در این مطالعات اثر سولفات کادمیوم بعد از ۵ دقیقه انکوباسیون با پراکسیداز ترب کوهی بر باند جذبی ۲۷۵ نانومتر و باند سورت این آنزیم در ۴۰۴ نانومتر بررسی شد. جذب در ۲۷۵ نانومتر به‌خاطر زنجیره‌های جانبی آروماتیک اسید آمینه‌ها می‌باشد و می‌تواند نشانگر تغییرات کونفورماسیونی باشد. یک تریپتوفان و پنج تیروزین در توالی آمینو اسیدی پراکسیداز ترب کوهی وجود دارند که بعضی از آنها در ناحیه‌ای قرار گرفته‌اند که در واکنش کاتالیتیک مهم است و بعضی در نزدیکی گروه هم قرار دارند (Veitch, 2004). نتایج حاصل از این مطالعات به صورت نمودارهای تغییرات جذب ۲۷۵ نانومتر و باند سورت آنزیم در ۴۰۴ نانومتر در مقابل غلظت‌های مختلف سولفات کادمیوم در شکل‌های ۳ و ۴ ارایه گردیده است.



شکل ۳. تغییرات جذب ۲۷۵ نانومتر در مقابل غلظت‌های مختلف سولفات کادمیوم در دماهای مختلف



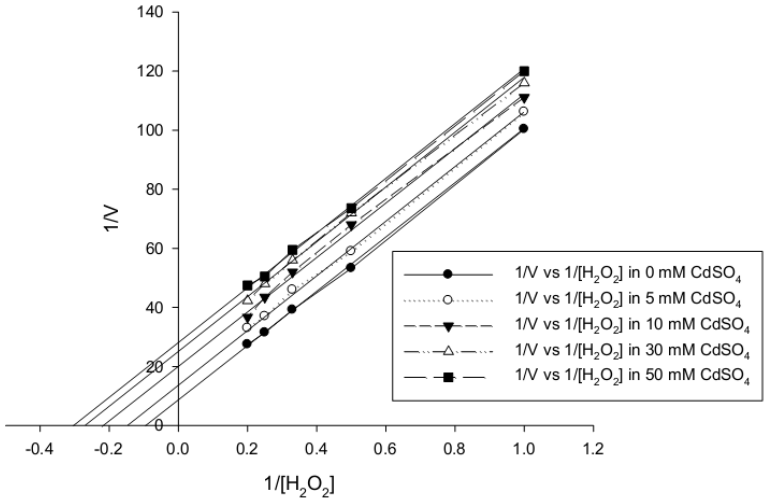
شکل ۴. تغییرات جذب باند سورت در ۴۰۴ نانومتر در مقابل غلظت‌های مختلف سولفات کادمیوم در دماهای مختلف

بررسی نتایج مطالعه سینتیک پراکسیداز در حضور سولفات کادمیوم در دماهای مختلف

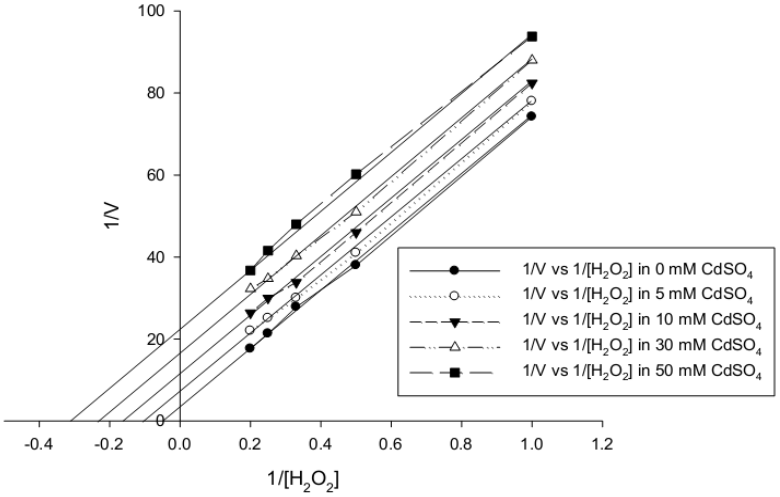
سینتیک آنزیم پراکسیداز ترب کوهی با پیگیری اکسیداسیون وابسته به پراکسید هیدروژن ماده ارتودی آنیزیدین در ۴۶۰ نانومتر به دست می‌آید به این منظور واکنش با افزودن پراکسید هیدروژن آغاز و فعالیت آن اندازه‌گیری می‌شود (Keyhani, Keyhani *et al.*, 2003, Keyhani, Keyhani *et al.*, 2005). در این مطالعات ارتو- دی آنیزیدین به عنوان سوبسترای ثابت، و پراکسید هیدروژن به عنوان سوبسترای متغیر در نظر گرفته شد. محلول غلیظ ارتو- دی آنیزیدین با غلظت ۲۰ میلی‌مولار روزانه در آب مقطر دو بار تقطیر تهیه و غلظت ۵ میلی‌مولار آن در هر نمونه استفاده شد. محلول غلیظ پراکسید هیدروژن نیز با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار در آب مقطر تهیه و غلظت ۵-۱ میلی‌مولار آن در آزمایشات استفاده شد. غلظت نمونه آنزیمی مورد استفاده ۰/۰۷۵ گرم در میلی‌لیتر در بافر استات با pH=۴ بوده است. چنانچه مشاهده می‌شود طبق نمودار میکائیلیس- منتن، در غلظت ۵ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن، آنزیم به بیشینه سرعت خود یا V_{MAX} می‌رسد. همان طور که پیداست در دمای ۳۵ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد آنزیم بدون حضور مهارکننده، دارای بیشینه سرعت بیشتری نسبت به دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد است. در این مطالعه اثر غلظت‌های مختلف سولفات کادمیوم، در دماهای $45C^{\circ}$ و ۳۵، ۲۵ درجه سانتی‌گراد، بر سینتیک پراکسیداز ترب کوهی بررسی شد. نتایج در نمودارهای زیر آورده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود در هر سه دمای مورد نظر نوع مهار نا رقابتی می‌باشد و در دما های C° ۴۵ و ۳۵ شدت کاهش V_{MAX} و کاهش K_m خیلی بیشتر است. جدول ۲، اثر سولفات کادمیوم بر مقادیر K_m و V_{MAX} آنزیم در دماهای مختلف را نشان داده و به مقایسه آنها می‌پردازد.

جدول ۲. تغییرات K_m و V_{MAX} آنزیم پراکسیداز ترب کوهی در حضور غلظت‌های مختلف سولفات کادمیوم در دماهای مختلف

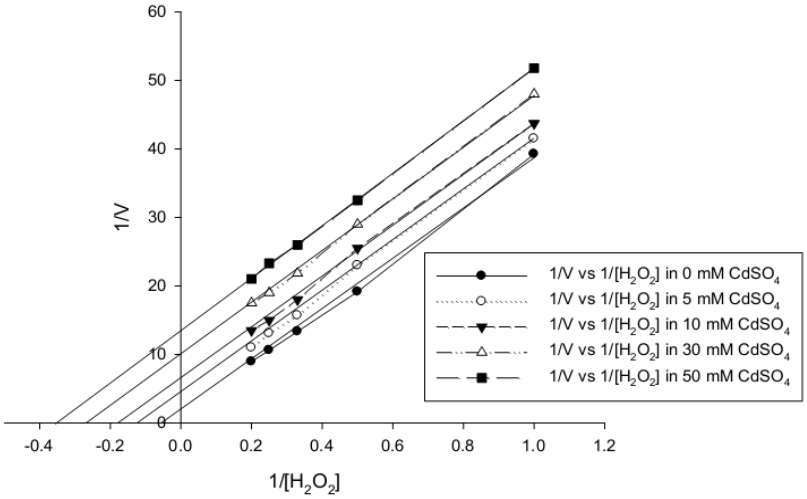
۴۵°C		۳۵°C		۲۵°C		
K_m	V_{MAX}	K_m	V_{MAX}	K_m	V_{MAX}	$CdSO_4$ (mM)
۴۱	۱	۱۸	۰/۲۶	۱۰	۰/۱۱	۰
۱۱	۰/۲۸	۹	۰/۱۴	۶	۰/۰۶	۵
۶	۰/۱۷	۶	۰/۰۸	۴	۰/۰۴	۱۰
۴	۰/۱۰	۴	۰/۰۵	۳/۶	۰/۰۳۹	۳۰
۲	۰/۰۷	۲	۰/۰۴	۳/۱	۰/۰۳۴	۵۰



شکل ۵. نمودار لینویور- برک برای آنزیم پراکسیداز ترب کوهی در حضور غلظت‌های مختلف $CdSO_4$ در دمای ۲۵ °C



شکل ۶. نمودار لینویور- برک برای آنزیم پراکسیداز ترب کوهی در حضور غلظت‌های مختلف $CdSO_4$ در دمای ۳۵°C



شکل ۷. نمودار لینویور-برک برای آنزیم پراکسیداز ترب کوهی در حضور غلظتهای مختلف $CdSO_4$ در دمای ۴۵°C

بحث

با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعات، در طی آزمایشات پایداری حرارتی پراکسیداز ترب کوهی در دامنه حرارتی ۱۰۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد، با به دست آوردن تغییرات جذب در این دامنه حرارتی، محاسبه کسر آنزیم دگرگون شده و تغییرات انرژی آزاد گیبس، T_m آنزیم در pH=۴ در نقطه ۳۴۴ درجه کلوین یا ۷۱ درجه سانتی گراد به دست آمد. T_m در حضور سولفات کادمیوم کاهش یافت. در حضور غلظت ۱۰ میلی‌مولار سولفات کادمیوم، T_m در حدود ۱۶ درجه کاهش داشته و ۳۲۸ درجه کلوین می‌باشد. این مقدار در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار کادمیوم به ترتیب ۱۹ و ۲۸ درجه کاهش یافته و به ۳۲۵ و ۳۱۶ درجه کلوین می‌رسد. در حضور غلظت‌های افزایش یابنده کادمیوم و کاهش T_m، کاهش مقادیر ΔS_m° و ΔH_m° مشاهده می‌شود، که بیانگر بازتر شدن ساختار آنزیم و افزایش کسر دگرگون شده آن می‌باشد.

در مطالعات اسپکتروفتومتری پراکسیداز ترب کوهی در حضور سولفات کادمیوم، مشاهده می‌شود افزایش دما باعث افزایش جذب باند ۲۷۵ نانومتر می‌شود و این افزایش در غلظت‌های بالاتر سولفات کادمیوم بیشتر می‌شود. در حالی که با افزایش دما جذب باند سورت، در ۴۰۴ نانومتر، کاهش می‌یابد و این کاهش در غلظت‌های بالاتر سولفات کادمیوم شدت می‌یابد. این آنزیم دارای گروه پروستتیک هم است که به خاطر خصوصیات طیفی آن ویژگی‌های منحصر بفردی را برای تکنیک‌های بیوفیزیکی مثل اسپکتروسکوپی فلورسانس مهیا می‌کند. باند سورت نیز یک پیک شدید در منطقه طول موج آبی طیف مرئی است و در اسپکتروسکوپی جذبی و برای توضیح جذب بخش‌های حاوی هم استفاده می‌شود. این پیک در پراکسیداز ترب کوهی در ۴۰۴ نانومتر مشاهده می‌شود. در نمودار جذب ۲۷۵ نانومتر در مقابل غلظت سولفات کادمیوم در طی روند افزایشی مشاهده شده، غلظت ۵ میلی‌مولار سهم زیادی در این افزایش جذب داشته است و پس از یک افت در مقدار جذب در نمودار مجدداً مسیر افزایشی ادامه می‌یابد. در غلظت‌های بالاتر، دما در افزایش جذب ۲۷۵ نانومتر تأثیر گذار تر بوده است. همچنین در نمودار جذب سورت در مقابل غلظت سولفات کادمیوم به جز یک افزایش جزئی در اثر غلظت ۵ میلی‌مولار سولفات کادمیوم، روند کاهشی جذب باند سورت آنزیم مشهود است و افزایش دما باعث تشدید این روند می‌شود. گروه هم در پراکسیداز ترب کوهی به وسیله شبکه ای از برهمکنش‌های آبگریز و الکترواستاتیک در ماتریکس پروتئین باقی می‌ماند و به وسیله یک اتصال کووالانسی بین یون آهن خود و هیستیدین ۱۷۰ (در سمت پروکسیمال) قرار می‌گیرد. کوردیناسیون فلز دارای یک اثر پایدارکننده روی ساختار پروتئین- پورفیرین است. نشر تنها تریپتوفان این آنزیم نیز توسط گروه هم فرو نشانده می‌شود بنابراین تغییر در کونفورماسیون پروتئین که روی محیط تریپتوفان اثر بگذارد و فاصله آن را از گروه هم تغییر دهد فرونشانی را تغییر خواهد داد (Tayefi-Nasrabadi, 2006; Keyhani *et al.*, 2006). طبق مطالعات پیشین، که همگی در دمای اتاق انجام شده بود، تغییرات در جذب و نشر با افزایش غلظت کادمیوم و نیز زمان انکوباسیون افزایش می‌یابند. چنان که مشاهده می‌شود این تغییرات با افزایش دما نیز افزایش می‌یابند و با افزایش غلظت یون فلزی هرچه دما افزایش می‌یابد این تغییرات تشدید می‌شوند. بر اساس گزارشات پیشین سه یون کادمیوم می‌توانند به صورت تعاونی به آنزیم متصل شوند. این تعاونی در زمان‌های انکوباسیون پایین حدود ۱۵ دقیقه مثبت است و اگر آنزیم بیش از ۳۰ دقیقه در معرض کادمیوم قرار بگیرد تعاونی منفی خواهد بود، که اشباع شدن جایگاه‌های

اتصال کادمیوم را نشان می‌دهد. همان طور که در نتایج مشاهده شد، از آن جایی که کادمیوم باند جذبی سورت را به شدت تغییر می‌دهد پیشنهاد شده است که این یون فلزی در نزدیک گروه هم متصل می‌شود یا اتصال یون‌های کادمیوم ساختار آنزیم را به نحوی تغییر می‌دهد که روی طیف جذبی محیط گروه هم اثر می‌گذارد. پراکسیداز ترب کوهی دارای دو کلسیم در ساختار خود می‌باشد. اگر کلسیم از ساختار آنزیم حذف شود دیگر یون‌های دو ظرفیتی مثل‌کادمیوم می‌توانندجایگزین آن شوند (Keyhani, Keyhani *et al.*, 2003). اما در این کار و کارهایی که کلسیم در ساختار آنزیم وجود دارد مشخص است که جایگاه‌های اتصال کادمیوم از کلسیم مجزا است. در راستای کارهای گذشته به این نتیجه رسیدیم که اتصال یون کادمیوم به پراکسیداز ترب کوهی علاوه بر این که وابسته به غلظت یون فلزی و زمان انکوباسیون است، به دما نیز وابسته است. احتمالاً دما با اثر بر روی ساختار آنزیم به ویژه محیط اطراف گروه هم باعث باز شدن ساختار و اتصال بهتر کادمیوم می‌شود. در مطالعات سینتیک پراکسیداز ترب کوهی در حضور سولفات کادمیوم در دماهای ۲۵، ۳۵ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد مهار نارقابتی دیده می‌شود. کادمیوم یک مهارکننده نارقابتی پراکسید هیدروژن است و یک برهمکنش اختصاصی جایگاه را نشان می‌دهد که روی جایگاه اتصال پراکسید هیدروژن اثری ندارد بلکه تمایل بیشتری به جایگاه اتصال ارتو- دی آنیزیدین دارد (Keyhani, Keyhani *et al.*, 2003). با توجه به این که در دماهای بالاتر شدت کاهش K_m خیلی بیشتر است و کادمیوم در محیط نزدیک گروه هم به آنزیم متصل می‌شود تعاونی مثبت باعث اتصال بیشتر کادمیوم‌ها و پر شدن جایگاه‌های اتصال آنها و نیز تأثیر بیشتر روی جایگاه ارتو- دی آنیزیدین می‌شود پس تمایل آنزیم به پراکسید هیدروژن بیشتر می‌شود و K_m کاهش می‌یابد. با توجه به آلودگی محیط پیرامون ما با فلزات سنگین و اثرات مهرکنندگی آنها بر آنزیم‌ها، پیشنهاد می‌شود میانکنش سایر فلزات سنگین نیز با آنزیم‌های شناخته شده، پرکاربرد و مهم همچون پراکسیداز ترب کوهی مورد مطالعه قرار گرفته و تغییرات ساختمانی حاصل از اثرات آنها بر آنزیم مشخص شود.

سپاسگزاری

این مطالعه در دانشگاه شهرکرد، دانشکده علوم پایه، آزمایشگاه‌های بیوشیمی و تحقیقاتی انجام شده و حمایت مالی آن نیز توسط دانشگاه شهرکرد صورت گرفته است.

REFERENCES

Agostini E, *et al.*, (2002) "A peroxidase isoenzyme secreted by turnip (Brassica napus) hairy root cultures: inactivation by hydrogen peroxide and application in diagnostic kits." Biotechnology and applied biochemistry 35(1): 1-7.

Alloway BJ (1995) Heavy metals in soils, Springer.

Curtin JF, *et al.*, (2002) "Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis." Journal of immunological methods 265(1-2): 49-72.

Giller KE, *et al.*, (1998) "Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review." Soil Biology and Biochemistry 30(10-11): 1389-1414.

Iyer PV, Ananthanarayan L (2008) "Enzyme stability and stabilization--Aqueous and non-aqueous environment." Process Biochemistry 43(10): 1019-1032.

Keyhani J, *et al.*, (2003) "Heterogeneous inhibition of horseradish peroxidase activity by cadmium." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1621(2): 140-148.

Keyhani J, *et al.,* (2005) "Stepwise binding of nickel to horseradish peroxidase and inhibition of the enzymatic activity." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1722(3): 312-323.

Laurenti E, *et al.,* (2000) "Ionic strength and pH effect on the Fe (III)-imidazolate bond in the heme pocket of horseradish peroxidase: An EPR and UV-visible combined approach." Journal of Inorganic Biochemistry, 81(4): 259-266.

Lin Z, *et al.,* (1996) "Peroxidase from Ipomoea cairica. Isolation, purification and some properties." Process Biochemistry 31(5): 443-448.

Moore JW, Ramamoorthy S (1984) "Heavy metals in natural waters: Applied monitoring and impact assessment".

Saitou T, *et al.,* (1991) "Isoperoxidase in hairy roots and regenerated plants of horseradish (Armoracia lapathifolia)." Plant Science, 75(2): 195-201.

Smulevich G, *et al.,* (1997) "Spectroscopic evidence for a conformational transition in horseradish peroxidase at very low pH." Biochemistry, 36(3): 640-649.

Takahashi N, *et al.,* (1998) "NewN-Glycans in Horseradish Peroxidase." Analytical biochemistry, 255(2): 183-187.

Tayefi-Nasrabadi H, *et al.,* (2006) "Conformational changes and activity alterations induced by nickel ion in horseradish peroxidase." Biochimie 88(9): 1183-1197.

Towne V, *et al.,* (2004) "Complexities in horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of dihydroxyphenoxazine derivatives: appropriate ranges for pH values and hydrogen peroxide concentrations in quantitative analysis." Analytical biochemistry, 334(2): 290-296.

Veitch NC (2004) "Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme." Phytochemistry, 65(3): 249-259.

Volesky B, Holan ZR (1995) "Biosorption of heavy metals." Biotechnology Progress, 11(3): 235-250.

Yang BY, *et al.,* (1996) "The glycans of horseradish peroxidase." Carbohydrate research, 287(2): 203-212.