مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال سوم، شماره اول، پیاپی نهم، تابستان ۱۳۹۳ (۱۸-۹)

اثر حلاّل‌های آلی بر پایداری ساختار و فعالیت کاتالیتیکی پپسین

بهزاد شارقی[۱]*، کلثوم شهدادنژاد[۲]
۱. دانشیار، دانشگاه شهرکرد
۲. دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوشیمی
(تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/۲۳، تاریخ تصویب: ۹۳/۵/۶)

چکیده
آنزیم پپسین در مخاط معده مهره‌داران سنتز می‌شود. پپسین از ۳۲۷ رزیدو تشکیل شده است. وزن مولکولی آن ۳٤KD می‌باشد. ساختار پپسین غالباً β-Sheet و رندوم کویل با α- هلیکس محدود است و دو دمین آن با یک صفحه بتا شش‌رشته‌ای به هم متصل می‌شوند. در این مطالعه از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل فارماسیا ٤۰۰۰ با سیستم کنترل دما استفاده و پایداری دمایی پپسین خوک در حضور غلظت‌های مختلف (۰ تا ۵۰٪ حجمی- حجمی) حلاّل‌های آلی بوتانول، اتانول، ٤،۱- بوتان‌دیول و گلیسرول در pH=۲ بررسی شد. Tm پپسین به ترتیب در حضور حلاّل‌های بوتانول، اتانول و ۱/٤-بوتان‌دیول کاهش یافت و در حضور گلیسرول افزایش یافت. همچنین اثر این حلاّل‌های آلی بر روی فعالیت پپسین خوک بررسی شد. فعالیت پپسین به ترتیب در حضور محلول‌های آبی بوتانول، اتانول و ۱/٤- بوتان‌دیول با افزایش غلظت حلاّل‌های آلی کاهش یافت و در حضور گلیسرول با افزایش غلظت حلاّل آلی زیاد شد. تغییرات ایجاد شده در فعالیت کاتالیتیکی به وسیله حلاّل‌های آلی محلول در آب بوتانول، اتانول و ۱/٤- بوتان‌دیول ممکن است مربوط به تغییرات ساختاری که به وسیله تغییرات پایداری دمایی نیز نشان داده شد و همچنین تغییر در جایگاه فعال پپسین باشد و گلیسرول نیز ساختار پپسین را پایدار کرد.

واژه‌های کلیدی: پپسین، پایداری دمایی، حلاّل‌های آلی، فعالیت، تغییرات ساختاری.

The Effect of Organic Solvents on the Structural Stability and Catalytic Activity of Pepsin

B. Shareghi[1]*, K. Shahdad-Nejad[2]
1. Associate Professor, Shahr-e-Kord University
2. Graduate M. Sc. Student, Biochemistry
(Received: Feb. 12. 2014; Accepted: Jul. 28, 2014)

Abstract
Pepsin enzyme is synthesized in the gastric mucosa of vertebrates. Pepsin is composed of 327 amino acid residues, with a molecular mass of 34KD. The structure is predominantly β-strand and random coil with limited α-helix. The two domains are connected via a six-stranded β-sheet plate. In this study used UV-Vis spectrophotometer pharmacia-4000 with electronic temperature controller system. Thermal stability of porcine pepsin has been investigated in the presence of organic solvents include butanol, ethanol, 1,4-Butanediol and glycerol in different concentrations (0-50% V/V) at pH=2. Tm of pepsin was decreased the presence of butanol, ethanol, 1,4-Butanediol respectively. and Tm of pepsin increased in the presence of glycerol. Also the effects of these organic solvents on the activity of porcine pepsin were studied Activity of pepsin decreased in aqueous butanol, ethanol and 1,4-Butanediol with increasing organic solvent concentration respectively and activity of pepsin increased in presence of glycerol with increasing organic solvent concentration. The changes caused in the catalytic activity by the water-miscible organic solvents include butanol, ethanol and 1,4-Butanediol may be related to structural changes, which were followed by means of thermal stability changes and also change in active site of pepsin. Glycerol also stabilized the structure of pepsin.

Keywords: Pepsin, Thermal Stability, Organic Solvents, Activity, Structural Changes.

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

مقدمه

آنزیم پپسین A[1] (EC ۱.۲۳.۴.۳) که متعلق به خانواده آسپارتیک‌پروتئازها است (Okoniewska *et al*., 1999). در مخاط معده مهره‌داران سنتز می‌شود (Dunn, 2002). پپسین در pH خنثی به صورت زیموژن غیرفعال پپسینوژن تا می‌خورد (Dunn, 2002). پپسین یک پروتئاز معدی و یکی از سه آنزیم‌های اصلی هضم پروتئین در سیستم هضمی است. در واقع پپسین به اغلب پروتئین‌ها به جز کراتین، ناخن و دیگر پروتئین‌های غنی از کربوهیدرات حمله می‌کند (Chakraborty *et al*., 2007). پپسین پیوندهای پپتیدی بین آمینواسیدهای هیدروفوبیک و ترجیحاً آروماتیک از قبیل تریپتوفان، فنیل‌آلانین وتیروزین را هیدرولیز می‌کند (Dunn, 2001; Chakraborty *et al*., 2007). پپسین از ۳۲۷ رزیدو تشکیل شده است که یک وزن مولکولی ۳۴KD دارد (Cooper *et al*., 1990). ساختار پپسین غالباً β-Sheet و رندوم کویل با α- هلیکس محدود می‌باشد و دو دمین آن با یک صفحه بتا شش رشته‌ای به هم متصل می‌شوند (Sielecki *et al*., 1990). پپسین خوک در ساختار خود دارای ۴۳ رزیدو باردار منفی (۱۳ گلوتامیک اسید، ۳۰ آسپارتیک اسید) و ۴ رزیدو باردار مثبت (۱ هیستدین، ۱ لیزین، ۲ آرژنین) و ۵ تریپتوفان و ۱۴ تیروزین و ۶ سیستئین است (Tang *et al*., 1973). پپسین کاربردهای زیادی از جمله در تهیه پنیر، صنعت چرم، در تهیه چاشنی‌های غذایی و نوشابه دارد (www.org.wikipedia). استفاده از آنزیم‌ها در حلاّل‌های آلی و میزان کاربرد تجربی آن‌ها گسترش یافته است. اگرچه توانایی آنزیم‌ها به این‌که به عنوان کاتالیست‌های انتخابی عمل می‌کنند برای یک طیف گسترده‌ای از واکنش‌های آلی در چند سال اخیر شناخته شده است، کاربرد آن‌ها به دلیل پایداری نامناسب بیوکاتالیست‌ها کمیاب است. حلاّل‌ها بر روی خصوصیات کاتالیتیکی و پایداری آنزیم‌ها به طور قابل توجهی اثر می‌گذارند (Simon *et al*., 2007). مزیت‌های زیادی جهت استفاده از آنزیم‌ها در حلاّل‌های آلی وجود دارد، از قبیل: ۱. جلوگیری از اتولیز (در مورد پروتئازها)؛ ۲. افزایش پایداری دمایی به دلیل کاهش تحرک ساختاری (Fitzpatrick *et al*., 1994; Griebenow & Klibanov, 1995). در حقیقت، نشان داده شده است که آنزیم‌ها می‌توانند در حلاّل‌های آلی در دماهای بالاتر از دمایی که آنزیم‌ها در محیط‌های آبی دگرگون می‌شوند کاتالیز انجام دهند. با این وجود، غیرفعال شدن آنزیم‌ها در حلاّل‌های آلی گزارش شده‌است (Castillo *et al*., 2005)؛ ۳. کاربرد محیط‌های آلی اجازه استفاده از آنزیم‌ها برای فرایندهای سنتزی به کاتالیز استریفیکاسیون، ترانس استریفیکاسیون، ترانس پپتیداسیون و ... را می‌دهد؛ ۴. بعضی ترانسفورماسیون‌های زیستی آنزیمی نیاز دارند که حلاّل‌های آلی برای حل شدن سوبسترا (قندها و مشتقات آن‌ها) به دلیل قطبیت بالای آن‌ها استفاده شوند (Simon *et al*., 1998)؛ ۵. جابه‌جایی واکنش‌های تعادلی در جهت مطلوب همانند استفاده از هیدرولازها برای واکنش‌های سنتزی؛ ۶. کاهش خطر رشد میکروبی؛ ۷. بازده انرژی فرایندهای با سرعت پایین وقتی که حلاّل‌های فرار استفاده می‌شوند؛ ۸. بازیابی و استفاده مجدد آنزیم حتی بدون ایموبیلیزه شدن؛ ۹. استفاده سوبستراهای حساس به رطوبت راحت باشد/ عوامل شبیه انیدریک اسید؛ ۱۰. امکان کنترل اختصاصیت سوبسترا، اختصاصیت ناحیه (Gupta, 1993). در مطالعه‌ای که Simon *et al*. (2007) بر روی فعالیت پپسین داشتند نشان دادند که حلاّل‌های آلی اتانول و استونیتریل تا غلظت ۶۰٪ حجمی-حجمی بر فعالیت پپسین اثر نداشته‌اند، اما از غلظت ۶۰٪ تا ۹۰ ٪ فعالیت پپسین کم شده است و ۱/۴ دی اکسان نیز تا غلظت ۳۰ ٪ بر فعالیت پپسین اثر نداشته است، اما فعالیت آن را از غلظت ۳۰ تا ۹۰٪ کاهش داده است. در

1. Porcine

این مطالعه اثر حلاّل‌های آلی بوتانول، اتانول، ۱/۴-بوتان‌دیول و گلیسرول بر روی فعالیت آنزیم پپسین بررسی شده است.

سپس اثر غلظت‌های مختلف بوتانول، اتانول، ۱/۴- بوتان‌دیول و گلیسرول (۰ تا ۶٪ حجمی-حجمی) را بر فعالیت پپسین بررسی کردیم.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از آنزیم پپسین خوک و هموگلوبین گاوی (محصولات شرکت سیگما)، بافر گلایسین-اسید کلریدریک (محصول شرکت مرک) با pH=۲ در غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار و از دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Vis مدل فارماسیا-۴۰۰۰، برای اندازه‌گیری استفاده شده است.

بررسی پایداری حرارتی آنزیم پپسین در حضور غلظت‌های مختلف حلاّل‌های آلی در دامنه حرارتی ۳۰۳ تا ۳۶۳ درجه کلوین: از بافر گلایسین- اسید کلریدریک با pH=۲ در غلظت ۱۰۰ میلی مولار و غلظت‌های مختلف حلاّل‌های آلی بوتانول، اتانول، ۱/۴-بوتان‌دیول و گلیسرول (۰ تا ۵۰٪ حجمی-حجمی) استفاده شد. منحنی های دگرگون سازی در حضور حلاّل‌های آلی در طول موج ۲۸۰ نانومتر با استفاده از محلول‌های پپسین با غلظت ۰/۱۳۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمده است.

بررسی فعالیت آنزیم پپسین در حضور حلاّل‌های آلی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و pH=۲: جهت اندازه‌گیری فعالیت پپسین از نمونه آنزیمی با غلظت ۰/۱۳۸ میلی‌گرم بر میلی لیتر محلول درHCl ۰/۰۱ نرمال و سوبسترای هموگلوبین گاوی با غلظت ۱/۱میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده شده است. بعد از ده دقیقه از شروع واکنش در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و pH=۲، ۰/۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک‌اسید ۲۰٪ وزنی-حجمی اضافه کرده تا واکنش متوقف گردد و بعد از ۵ دقیقه نمونه را برداشته و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، ۱۴۰۰۰rpm، سانتریفوژ کرده و سپس محلول رویی رسوب را که حاوی قطعات اسیدی هموگلوبین است، برداشته و جذب ۲۸۰ نانومتر را خوانده و سپس فعالیت آنزیم از فرمول زیر به دست آمده است.

$$Units/mg = \frac{[A280(Filtrate) - A280(Blank)]}{10\text{minutes} \times \text{mg enzyme in reaction mixture}}$$

سپس اثر غلظت‌های مختلف بوتانول، اتانول، ۱/۴-بوتان‌دیول و گلیسرول (۰ تا ۶٪ حجمی-حجمی) را بر فعالیت پپسین بررسی کردیم.

نتایج و بحث

پایداری حرارتی آنزیم پپسین، با اندازه‌گیری تغییرات انرژی آزاد گیبس و T_m محاسبه می‌گردد. برای این هدف با تغییر آنزیم از حالت طبیعی به حالت دگرگون‌شده، کسر دگرگون‌سازی به صورت زیر محاسبه می‌شود:

$$F_U = (A_N - A) / (A_N - A_U) \quad (۱$$

در این رابطه، A_N، جذب در حالت طبیعی، A، جذب مشاهده شده و A_U، جذب در حالت دگرگون‌شده می‌باشند، K_{eq} یا ثابت تعادل از رابطه زیر به‌دست می‌آید:

$$K_{eq} = F_U / (1-F_U) = (A_N - A) / (A - A_U) \quad (۲$$

تغییرات انرژی آزاد گیبس نیز از این رابطه محاسبه می‌شود:

$$\Delta G° = -RT\ln K_{eq} \quad (۳$$
$$= -RT\ln [F_U / (1-F_U)]$$
$$= -RT\ln [(A_N - A) / (A - A_U)]$$

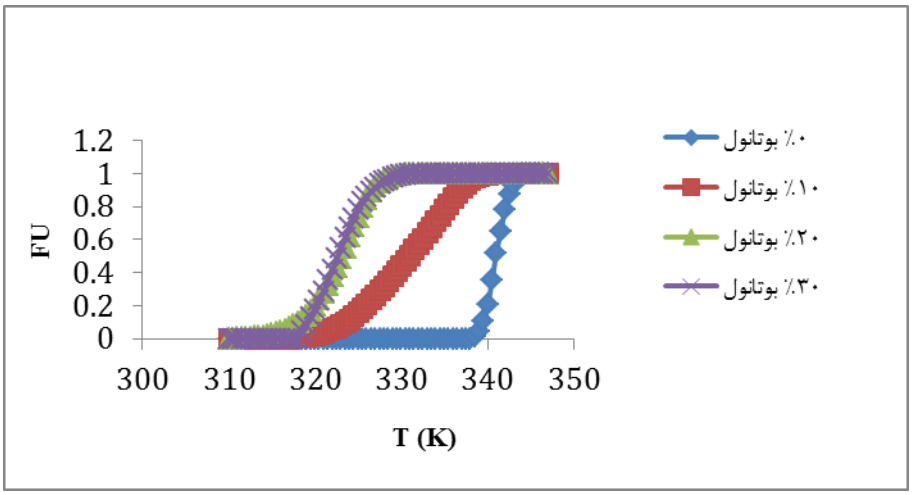
در این رابطه: R، ثابت گازها و برابر با ۸/۳۱۴ است و T، دما بر حسب کلوین می‌باشد.

T_m یا دمای ذوب یک آنزیم، دمایی است که در آن $\Delta G°$ برابر با صفر است. شیب خط منحنی $\Delta G°$، $\Delta S°_m$ (تغییر آنتروپی در نقطهT_m) می‌باشد. همچنین می‌توان با استفاده از رابطه زیر، $\Delta H°_m$ را که

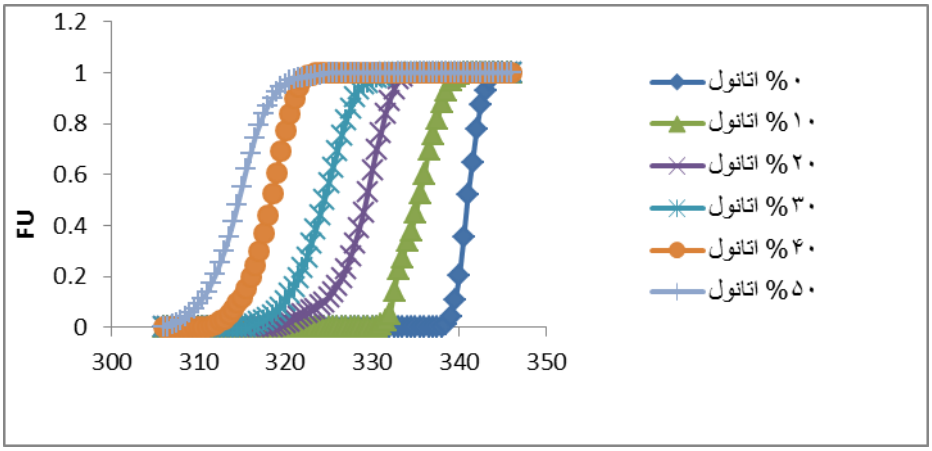
نمایانگر تغییر آنتالپی در نقطه T_m است، به‌دست آورد:

$$\Delta H^\circ_m = T_m \Delta S^\circ_m \quad (۴$$

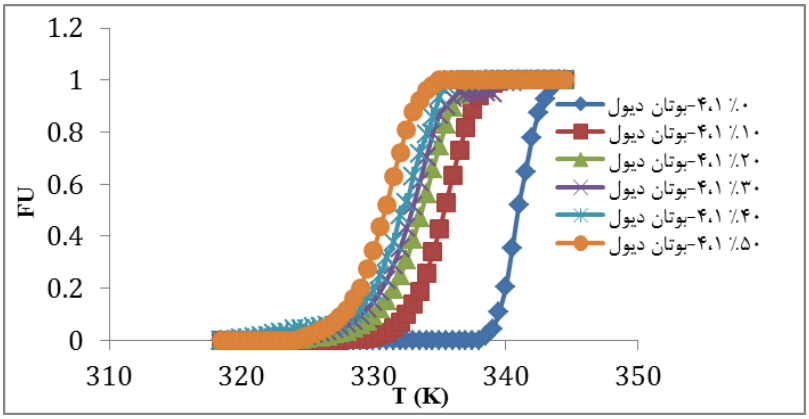
در نمودارهای ۱، ۲، ۳ و ۴ به ترتیب تغییرات کسر دگرگون‌سازی علیه دما در غلظت‌های مختلف بوتانول، اتانول، ۱/۴- بوتان‌دیول و گلیسرول در دامنه حرارتی ۳۰۳ تا ۳۶۳ درجه کلوین در pH=۲ به تصویر کشیده شده است. همان‌طور که در این نمودارها دیده می‌شود، با افزایش غلظت بوتانول، اتانول و ۴،۱- بوتان‌دیول منحنی‌های دگرگون‌سازی برای آنزیم پپسین به طرف چپ انتقال پیدا می‌کند؛ یعنی هرچه غلظت این حلاّل‌ها بیشتر می‌شود، آنزیم پپسین در دمای کمتری دگرگون می‌شود. به عبارت دیگر، می‌توان گفت با افزایش غلظت این حلاّل‌ها، پایداری پپسین کمتر می‌شود و با افزایش غلظت گلیسرول، منحنی‌های دگرگون‌سازی برای آنزیم پپسین به طرف راست انتقال پیدا می‌کند؛ یعنی هرچه غلظت گلیسرول افزایش می‌یابد، آنزیم پپسین در دمای بیشتری دگرگون می‌شود. به‌عبارت دیگر، می‌توان گفت با افزایش غلظت گلیسرول، پایداری پپسین زیاد می‌شود.



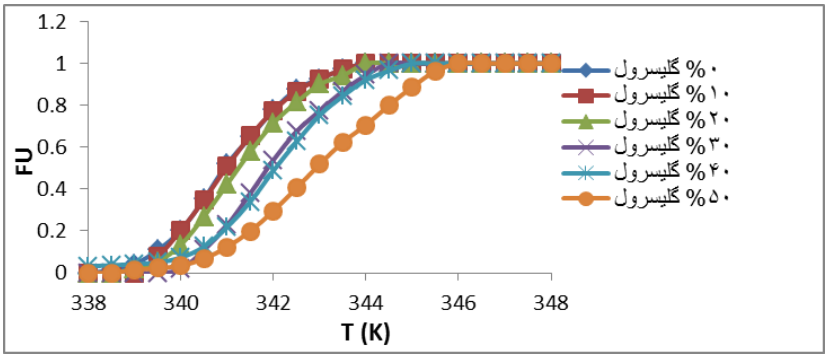
نمودار ۱. تغییرات F_U (کسر دگرگون‌سازی) آنزیم پپسین علیه دما در غلظت‌های مختلف بوتانول



نمودار ۲. تغییرات F_U (کسر دگرگون‌سازی) آنزیم پپسین علیه دما در غلظت‌های مختلف اتانول



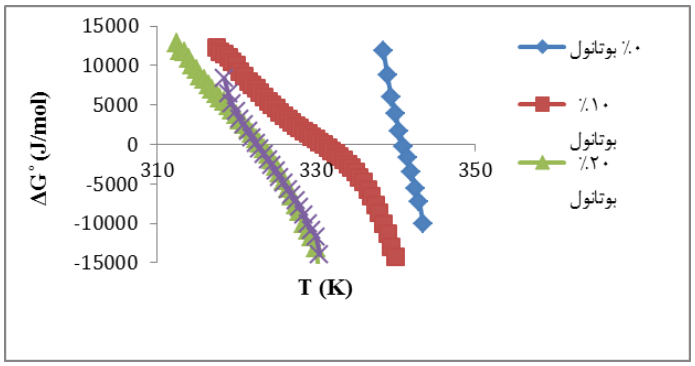
نمودار ۳. تغییرات F_U (کسر دگرگون‌سازی) آنزیم پپسین علیه دما در غلظت‌های مختلف ۱/۴ بوتان دیول



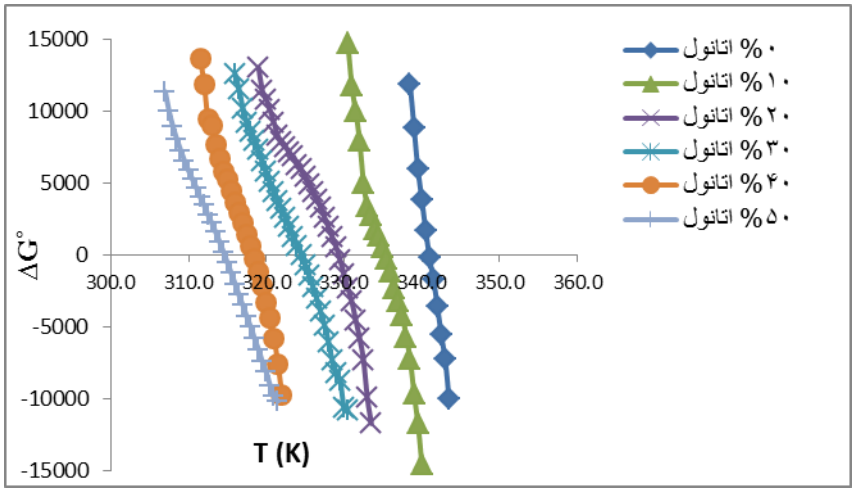
نمودار ٤. تغییرات F_U (کسر دگرگون‌سازی) آنزیم پپسین علیه دما در غلظت‌های مختلف گلیسرول

در نمودارهای ۵، ۶، ۷ و ۸ به ترتیب تغییرات $\Delta G°$ علیه دما در غلظت‌های مختلف بوتانول، اتانول، ۴/۱- بوتان‌دیول و گلیسرول در دامنه حرارتی ۳۰۳ تا ۳۶۳ درجه کلوین در pH=۲ به تصویر کشیده شده است. همان‌طور که در این نمودارها دیده می‌شود، با افزایش غلظت بوتانول، اتانول و ۴/۱- بوتان دیول T_m آنزیم پپسین کم شده و در نتیجه پایداری حرارتی آن کاهش می‌یابد؛ با افزایش غلظت گلیسرول T_m پپسین زیاد شده است.

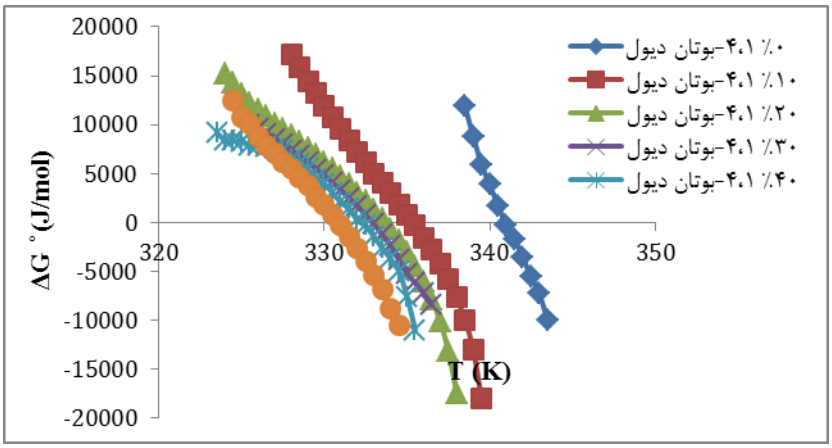
در جدول‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ تغییرات T_m، $\Delta S°_m$ و $\Delta H°_m$ به ترتیب در غلظت‌های مختلف بوتانول، اتانول، ۱/۴ بوتان دیول و گلیسرول نشان داده شده است. نتایج نشان داد که Tm و به تبع آن تغییرات آنتالپی و آنتروپی پپسین در حضور بوتانول، اتانول و ۱/۴ بوتان دیول کاهش و در حضور گلیسرول افزایش داشته است.



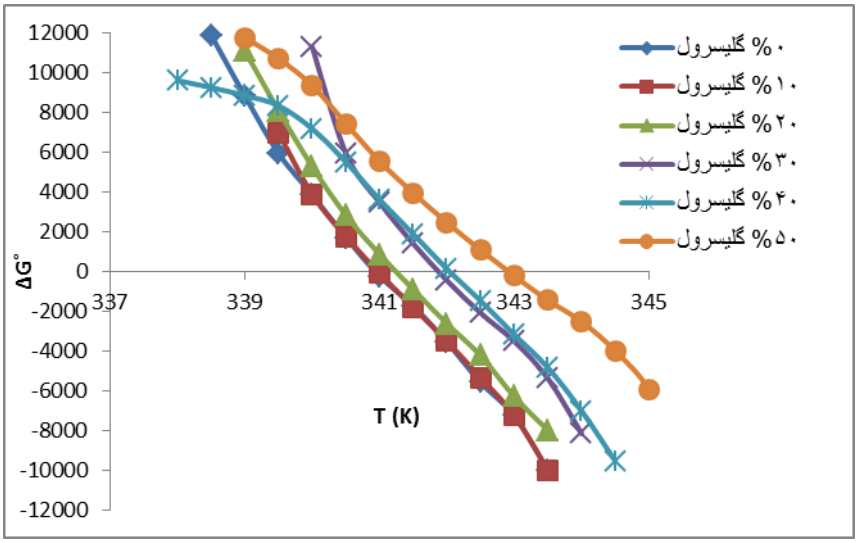
نمودار ۵. تغییرات $\Delta G°$ آنزیم پپسین علیه دما در غلظت‌های مختلف بوتانول



نمودار ٦. تغییرات ΔG° آنزیم پپسین علیه دما در غلظت‌های مختلف اتانول



نمودار ۷. تغییرات ΔG° آنزیم پپسین علیه دما در غلظت‌های مختلف ۱/۴ بوتان دیول



نمودار ۸. تغییرات ΔG° آنزیم پپسین علیه دما در غلظت‌های مختلف گلیسرول

جدول ۱. تغییرات T_m، $\Delta S°_m$ و $\Delta H°_m$ آنزیم پپسین در غلظت‌های مختلف بوتانول

[Butanol]%	T_m (°K)	$\Delta S°_m$ (Cal/mol. °K)	$\Delta H°_m$ (Kcal/mol)
٪۰	۳۴۱	۹۴۲/۵	۳۲۳/۲
٪۱۰	۳۳۰/۸	۲۴۶/۷	۸۱/۶
٪۲۰	۳۲۳/۲	۲۳۵/۱	۷۵/۹
٪۳۰	۳۲۲/۶	۲۱۶/۸	۶۹/۶

جدول ۲. تغییرات T_m، $\Delta S°_m$ و $\Delta H°_m$ آنزیم پپسین در غلظت‌های مختلف اتانول

[Ethanol]%	T_m (°K)	$\Delta S°_m$ (Cal/mol. °K)	$\Delta H°_m$ (Kcal/mol)
٪۰	۳۴۱	۹۴۲/۵	۳۲۳/۲
٪۱۰	۳۳۵/۲	۴۸۶/۲	۱۶۳
٪۲۰	۳۲۹/۴	۴۰۴/۶	۱۳۳/۲
٪۳۰	۳۲۴/۴	۳۷۰/۷	۱۲۰/۲
٪۴۰	۳۱۸/۳	۳۳۸/۲	۱۰۷/۶
٪۵۰	۳۱۴/۸	۳۱۵/۱	۹۹/۱

جدول ۳. تغییرات T_m، $\Delta S°_m$ و $\Delta H°_m$ آنزیم پپسین در غلظت‌های مختلف ۴/۱- بوتان‌دیول

[1,4-Butanediol]%	T_m (°K)	$\Delta S°_m$ (Cal/mol. °K)	$\Delta H°_m$ (Kcal/mol)
٪۰	۳۴۱	۹۴۲/۵	۳۲۳/۲
٪۱۰	۳۳۵/۴	۵۵۵/۴	۱۸۶/۲
٪۲۰	۳۳۳/۷	۴۸۴/۱	۱۶۱/۵
٪۳۰	۳۳۲/۸	۴۶۶/۲	۱۵۵/۱
٪۴۰	۳۳۲/۴	۲۵۱	۸۳/۴
٪۵۰	۳۳۰/۸	۲۲۶/۲	۷۴/۸

جدول ٤. تغییرات T_m، $\Delta S°_m$ و $\Delta H°_m$ آنزیم پپسین در غلظت‌های مختلف گلیسرول

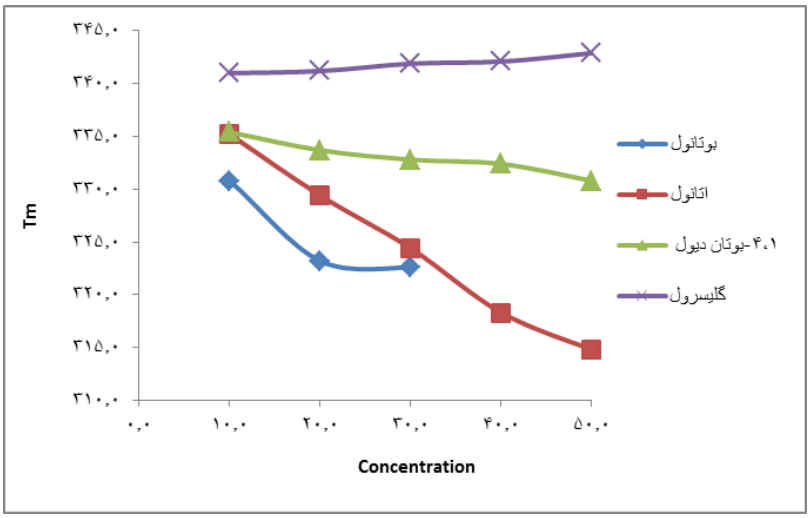
[Glycerol]%	T_m (°K)	$\Delta S°_m$ (Cal/mol. °K)	$\Delta H°_m$ (Kcal/mol)
٪۰	۳۴۱	۹۴۲/۵	۳۲۳/۲
٪۱۰	۳۴۱	۹۴۲/۵	۳۲۳/۲
٪۲۰	۳۴۱/۲	۹۷۴/۴	۳۳۲/۴
٪۳۰	۳۴۱/۹	۱۰۱۲/۵	۳۴۶/۱
٪۴۰	۳۴۲/۱	۱۰۲۳/۹	۳۵۰/۲
٪۵۰	۳۴۲/۹	۱۰۵۷/۲	۳۶۲/۵

در نمودار ۹ مشاهده می‌شود که آنزیم پپسین در حضور بوتانول با کمترین قطبیت، دارای کمترین پایداری و در حضور گلیسرول با بیشترین قطبیت، دارای بیشترین پایداری است.

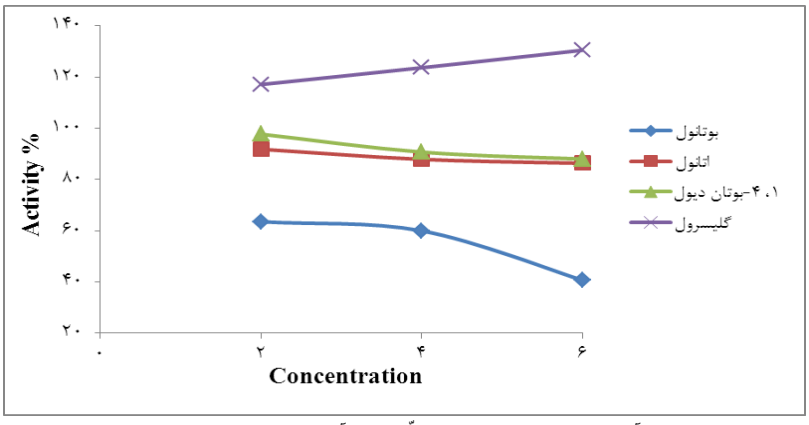
در نمودار ۱۰، مشاهده می شود پپسین در حضور بوتانول با کمترین قطبیت، دارای کمترین فعالیت و در حضور گلیسرول با بیشترین قطبیت، دارای بیشترین فعالیت است.

مولکول‌های پروتئین در محلول‌های آبی به وسیله یک پوسته هیدراته احاطه می‌شوند که از مولکول‌های آب تشکیل شده است که به سطح پروتئین می‌چسبند. با وجود یک حلاّل آلی، مولکول‌های حلاّل تمایل دارند جایگزین مولکول‌های آب در هر دو قفسه هیدراته و داخلی پروتئین شوند، بنابراین اینترکشن‌هایی که مسئول صورت‌بندی آنزیم هستند تخریب می‌شوند (Simon *et al*., 2007). حلاّل‌ها نقش مهمی در باقی ماندن ساختار طبیعی پروتئین دارند. مطالعه پروتئین‌ها در حضور حلاّل‌های مختلف اطلاعاتی در مورد نیروهای پایدارکننده و یا ناپایدارکننده درگیر در تاشدن پروتئین به دست می‌دهد. حلاّل‌های آلی اغلب به عنوان رسوب دهنده و یا نگهدارنده پروتئین مورد استفاده قرار می‌گیرند. با افزایش هیدروکسیل بر روی الکل‌ها از میزان ناپایدارکنندگی آنها کاسته می‌شود. میزان ناپایدارکنندگی اتانول کمتر از بوتانول، و ۴/۱- بوتان‌دیول کمتر از اتانول است و گلیسرول که به عنوان یک پلی‌ال شناخته شده، است باعث پایداری پروتئین می‌شود (Pittz & Timasheff, 1978). مکانیسم‌های گوناگونی برای اثر پلی‌ال‌ها بر روی ثابت تعادل دگرگون شده پروتئین وجود دارد. یکی از مهمترین این مکانیسم‌ها توسط «تیما چف» بیان شده است. اسمولیت‌ها حلاّلیت پروتئین را با محدود کردن ترجیحی سطح پروتئین و کاهش سطحی از پروتئین که در معرض حلاّل قرار می‌گیرد پایدار می‌کنند. بنابراین اسمولیت‌ها تمایل بیشتری برای حالت طبیعی دارند و بر طبق این مکانیسم، تغییرات انرژی آزاد گیبس ΔG_D برای فرایند دگرگون شده در حضور اسمولیت‌ها افزایش

می‌یابد. در مکانیسم دیگری که توسط «برلین» بیان شده است، اسمولیت‌ها پیوندهای هیدروژنی نامطلوب بین مولکول‌های آب و اسکلت پپتیدی را محدود نموده و باعث تقویت پیوندهای هیدروژنی درون مولکولی و افزایش پایداری حالت طبیعی می‌شوند که منجر به افزایش تغییرات انرژی آزاد گیبس در حضور اسمولیت‌ها می‌شود. گلیسرول نیز به عنوان یک اسمولیت است؛ الکل‌هایی هستند که به عنوان ناپایدارکننده پروتئین شناخته می‌شوند، اما مکانیسم مولکولی آن‌ها هنوز مشخص نشده است.



نمودار ۹. مقایسه پایداری حرارتی آنزیم پپسین در حضور حلاّل‌های آلی بوتانول، اتانول، ۴/۱- بوتان‌دیول و گلیسرول



نمودار ۱۰. مقایسه فعالیت آنزیم پپسین در حضور حلاّل‌های آلی بوتانول، اتانول، ۴/۱- بوتان‌دیول و گلیسرول

برطبق یک مکانیسم، الکل‌ها از طریق به هم ریختن اثر هیدروفوبیک و تغییر میان‌کنش‌های یونی و پیوندهای هیدروژنی ساختار سوم پروتئین را ناپایدار می‌نمایند. تغییر در پیوند هیدروژنی علاوه بر ناپایدار کردن ساختار سوم، منجر به باز شدن برخی ساختارهای دوم می‌شود. الکل‌های با زنجیره هیدروکربنی طویل‌تر و بدون شاخه نسبت به الکل‌های کوتاه‌تر دارای انشعاب، هیدروفوبیسیته بیشتری داشته و اثرات قوی تری را بر دگرگون‌سازی پروتئین اعمال می‌نمایند (Arakawa & Timasheff, 1982; Kaushik & Bhat,1998; Timasheff, 1998). لگاریتم p یا ضریب تفکیک بهترین ارتباط را با فعالیت آنزیم می‌دهد. ضریب p مشابه سیستم دو فازی استاندارد آب/اکتان می‌باشد که نشان‌دهنده میزان

هیدروفوبیسیته است. یک قانون که می‌تواند دنبال شود این است که: حلاّل‌هایی که لگاریتم p کمتر از ۲ دارند از نظر انتخابی ضعیف و آنهایی که لگاریتم p بیشتر از ۴ دارند مناسب هستند. حلاّل‌هایی که لگاریتم p متوسط بین ۲ تا ۴ دارند غیرقابل پیش‌بینی هستند و نیاز به مهندسی بیوکاتالیست دارند. مهندسی محیط کشت و مهندسی بیوکاتالیست شبیه هم هستند و برای استفاده بیش از پیش در شیوه مفید برای اپتیمم کردن کارایی آنزیم‌ها در محیط‌های آب کم / آلی استفاده می‌شوند (Gupta, 1993).

به طور کلی حلاّل‌هایی خوب هستند که قادر باشند محتوای آبی سیستم‌های واکنش را، بدون این که باعث کاهش مهمی در فعالیت آنزیم شوند کاهش دهند. بهترین حلاّل‌ها، آن‌هایی هستند که بیشتر هیدروفیلیک می‌باشند. باید تأکید شود که این معیار وقتی درست است که برای یکسری حلاّل آلی که دارای عاملیت یکسان هستند استفاده شود و نمی‌تواند برای حلاّل‌های با عاملیت مختلف به کار رود. یک معیار خوب که حدس زده می‌شود آن است که بهترین حلاّل‌های آلی غیرمخلوط در آب به منظور استفاده در سیستم‌های واکنش، آنهایی هستند که هیدروفوبیسیته آن‌ها بیشتر است (تشخیص با مقدار بالای لگاریتم p). این حلاّل‌ها با هیدروفوبیسیته بیشتر، کمتر می‌توانند وارد فاز آبی شوند. بنابراین آسیب بیوکاتالیست محلول در آب کمتر است (Mozhaev *et al*., 1989).

فعالیت کاتالیتیک آنزیم‌ها در حلاّل‌های آلی به وسیله تعدادی از فاکتورها تحت تأثیر قرار می‌گیرد: درستی ساختار و دینامیک آنزیم، کاهش رزدیوهای آبی حیاتی از سطح آنزیم و تغییر در پلاریته محیط کوچک آنزیم (Prasad & Suguna, 2002). حلاّل‌های آلی مخلوط آبی تمایل دارند آب را از محیط کوچک آنزیم بکشند و به این طریق ممکن است سبب غیرفعال شدن آن شوند (Mozhaev *et al*., 1989). بنابراین بوتانول، اتانول، ۴/۱- بوتان دیول ممکن است از طریق تغییرات ساختاری که توسط پایداری دمایی نیز نشان داده شد و همچنین تغییر محیط کوچک آنزیم (قفسه هیدراته یا جایگاه فعال آنزیم) سبب کاهش فعالیت آن شوند.

REFERENCES

Arakawa, T.; Timasheff, SN.; (1982) Stabilization of protein structure by sugars. Biochemistry, 21(25): 6536-6544.

Castillo, B.; Pacheco, Y.; AL-Azzam, W.; Griebenow, K.; Devi, M.; Ferrer, A.; Barletta, G.; (2005) On the activity loss of hydrolases in organic solvents: I. Rapid loss of activity of a variety of enzymes and formulations in a range of organic solvents. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 35 (4-6): 147-153.

Chakraborty, T.; Chakraborty, I.; Moulik, SP.; Ghosh, S.; (2007) Physicochemical studies on pepsin-CTAB interaction: Energetics and structural changes. the Journal of Physical Chemistry B, 111(10): 2736-2746.

Cooper, JB.; Khan, G.; Taylor, G.; Tickle, IJ.; Blundell, TL.; (1990) X-ray analyses of aspartic proteinases: II. Three-dimensional structure of the hexagonal crystal form of porcine pepsin at 2. 3 A° resolution. Journal of Molecular Biology, 214 (1): 199-222.

Dunn, BM.; (2001) Overview of Pepsin-like Aspartic Peptidases. Current Protocols in Protein Science, 21-3.

Dunn, BM.; (2002) Structure and mechanism of the pepsin-like family of aspartic peptidases. Chemical Reviews, 102 (12) : 4431-4458.

Fitzpatrick, PA.; Ringe, D.; Klibanov, AM.; (1994) X-ray crystal structure of cross-linked subtilisin carlsberg in water vs acetonitrile. Biochemical and Biophysical Research Communications, 198 (2) : 675-681.

Gupta, MN.; (1993) Enzyme function in

organic solvents. EJB Reviews. Springer, 203: 25-32

Griebenow, K.; Klibanov, AM.; (1995) Lyophilization-induced reversible changes in the secondary structure of proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences, 92(24): 10969-10976.

Kaushik, JK.; Bhat, R.; (1998) Thermal stability of proteins in aqueous polyol solutions: role of the surface tension of water in the stabilizing effect of polyols. the Journal of Physical Chemistry B, 102 (36): 7058-7066.

Mozhaev, VV.; Khmelnitsky, YL.; Sergeeva, MV.; Belova, AB.; Klyachko, NL.; Levashov, AV.; Martinek, K.; (1989) Catalytic activity and denaturation of enzymes in water/organic cosolvent mixtures. European Journal of Biochemistry, 184 (3): 597-602.

Okoniewska, M.; Tanaka, T.; Yada, RY.; (1999) The role of the flap residue, threonine 77, in the activation and catalytic activity of pepsin A. Protein Engineering, 12 (1): 55-61.

Pittz, EP.; Timasheff, SN.; (1978) Interaction of ribonuclease A with aqueous 2-methyl-2, 4-pentanediol at pH 5. 8. Biochemistry, 17(4): 615-623.

Prasad, B.; Suguna, K.; (2002) Role of water molecules in the structure and function of aspartic proteinases. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 58: 250-259.

Sielecki, AR.; Fujinaga, M.; Read, RJ.; James, MNG.; (1991) Refined structure of porcine pepsinogen at 1·8 Å resolution. Journal of Molecular Biology, 219 (4): 671-692.

Simon, LM.; Kotormán, M.; Szabó, A.; Nemcsók, J.; Laczkó, I.; (2007) The effects of organic solvent/water mixtures on the structure and catalytic activity of porcine pepsin. Process Biochemistry, 42 (5): 909-912.

Simon, LM.; László, K.; Vertesi, A.; Bagi, K.; Szajáni, B.; (1998) Stability of hydrolytic enzymes in water-organic solvent systems. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 4(1-2): 41-45.

Tang, J.; Sepulveda, P.; Marciniszyn, J.; Chen, KCS.; Huang, WY.; Tao, N.; Liu, D.; Lanier, JP.; (1973) Amino-acid sequence of porcine pepsin. Proceedings of the National Academy of Sciences, 70 (12): 3437-3439.

Timasheff, SN.; (1998) Control of protein stability and reactions by weakly interacting cosolvents: the simplicity of the complicated. Advances in Protein Chemistry, 51: 355-432.

Wikipedia. URL: www. wikipedia. org (accessed: 1392.8.8).