

SID



سرویس های ویژه



سرویس ترجمه تخصصی



کارگاه های آموزشی



بلاگ مرکز اطلاعات علمی



سامانه ویراستاری STES



فیلم های آموزشی

کارگاه های آموزشی مرکز اطلاعات علمی



مقاله نویسی علوم انسانی

مقاله نویسی علوم انسانی



اصول تنظیم قراردادها

اصول تنظیم قراردادها



آموزش مهارت های کاربردی در تدوین و چاپ مقاله

آموزش مهارت های کاربردی در تدوین و چاپ مقاله

مطالعات ترمودینامیکی و سینتیکی بر هم کنش آنزیم آلفا آمیلاز ترموفیل و گوانیدین هیدروکلراید

بهزاد شارقى*⁺ و ابوالفضل سمنانی

شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، صندوق پستی ۱۱۵

چکیده: برهم کنش گوانیدین هیدروکلراید و آنزیم آلفا آمیلاز ترموفیل (*E.C.3.2.1.1*) از منشاء *B.subtilis* با استفاده از اندازه گیری های اسپکتروفتومتری در ناحیه ماوراء بنفش و بررسی فعالیت ویژه آنزیم مورد مطالعه قرار گرفته است. اندازه گیری های طیفی در $pH = 6/9$ و گستره دمایی ۲۰ الی ۱۰۵ درجه سانتی گراد انجام شده است. نتایج به دست آمده به این شرح قابل بیان است: ۱- پایداری حرارتی فوق العاده زیاد آنزیم ۲- افزایش پایداری حرارتی آنزیم در حضور گوانیدین هیدروکلراید ۳- کاهش فعالیت آنزیم در حضور گوانیدین هیدروکلراید ۴- عدم در معرض قرار گرفتن اسیدهای آمینه Tyr, Trp در حضور گوانیدین هیدروکلراید.

واژه های کلیدی: آلفا آمیلاز، سینتیک، ترمودینامیک، پایداری، ساختار

KEY WORDS: α - Amylase, Kinetic, Thermodynamic, Stability, Structure

مقدمه

باعث می شود آب حلال بهتری برای اسیدهای آمینه غیرقطبی شده و برهم کنش های آب گریز را تضعیف می کند. این ترکیب می تواند به عنوان دهنده یا گیرنده پروتون در تشکیل اتصالات هیدروژنی با پروتئین نقش داشته باشد. حضور اتم های هیدروژن روی اتم ازت که دارای قابلیت تشکیل اتصال هیدروژنی هستند نقش مهمی را در عمل دگرگون کردن پروتئین ها ایفا می کنند [۹].

در این مطالعه به بررسی اثر گوانیدین هیدروکلراید بر پایداری ساختمانی آنزیم آلفا آمیلاز پرداخته و پایداری این آنزیم مورد بررسی قرار می گیرد.

بخش تجربی

مواد و روش ها

آنزیم آلفا آمیلاز از منشاء *B.Subtilis* و گوانیدین هیدروکلراید از

آلفا آمیلاز (*E.C.3.2.1.1*) یکی از آنزیم های اکستراسلولار از منشاء *Bacillus subtilis* بوده که به طور وسیعی در صنعت نشاسته مورد استفاده قرار گرفته است [۱]. به طور عمده آلفا آمیلازهای باکتریایی به دو طبقه *Saccharifying* و *Liquefying* تقسیم می شوند. آلفا آمیلاز از منشاء *B.Subtilis* به طبقه دوم تعلق دارد [۳ و ۲]. مقایسه توالی آنزیم های آلفا آمیلاز نشان دهنده این نکته است که آنها از یک ژن اجدادی واحد مشتق شده اند [۴]. آنزیم آلفا آمیلاز در دامنه وسیعی از pH پایدار می باشد [۵]. وزن مولکولی آنزیم ۶۹ KD می باشد [۶]. پایداری ساختمان فضایی یک پروتئین گلوبولار به صورت تغییر انرژی آزاد برای تبدیل حالت طبیعی پروتئین به حالت دگرگون محاسبه می شود [۷]. از ترکیب گوانیدین هیدروکلراید به میزان وسیعی برای بررسی پایداری پروتئین ها استفاده شده است [۸]. گوانیدین هیدروکلراید از دگرگون کننده های قوی می باشد. این ترکیب

*عهده دار مکاتبات

+ E-mail: Shareghi@sci.sku.ac.ir

می‌کنند که حداکثر جذب آن در ۵۴۰ نانومتر است. فعالیت ویژه آنزیم به‌روش زیر محاسبه می‌شود:

$$\text{Unit/mgr} = \frac{\text{مالتوز تولید شده (میکرومول)}}{\text{مقدار آنزیم در مخلوط واکنش}}$$

۵- اثر گوانیدین هیدروکلراید بر فعالیت آنزیم *آلفا آمیلاز*

بافر سدیم فسفات ۰/۰۲ M با pH = ۶/۹ حاوی غلظت‌های مختلف گوانیدین هیدروکلراید مورد استفاده قرار گرفت. محلول آنزیمی با هر یک از این بافرها تهیه و فعالیت آن مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

نتایج و بحث

شکل ۱ نمایان‌گر تغییرات کسر پروتئین دگرگون در مقابل غلظت‌های مختلف گوانیدین هیدروکلراید است. چنانچه مشاهده می‌شود در غیاب گوانیدین هیدروکلراید مقدار F_d تا دمای 372°K برابر صفر است. کسر پروتئین دگرگون شده با پذیرفتن مکانیزم دو حالتی و با استفاده از رابطه زیر محاسبه شده است:

$$F_d = \frac{Y - Y_N}{Y_D - Y_N} \quad (1)$$

در این رابطه Y_D و Y_N به ترتیب مقادیر جذب نوری مولکول‌های طبیعی و دگرگون شده در حالتی می‌باشند که Y مورد اندازه‌گیری واقع شده است [۱۲]. عدم تغییر مقدار F_d تا دمای 372°K نمایان‌گر پایداری فوق‌العاده ساختمان آنزیم *آلفا آمیلاز* از منشاء *B. subtilis* می‌باشد. مطالعات انجام گرفته مؤید این نکته است که پایداری بسیار زیاد آنزیم‌های ترموفیل در مقابل حرارت به عوامل متعددی وابسته می‌باشد که می‌توان به برهم‌کنش‌های هیدروفوبیک، پیوندهای یونی و محتوی اسیدهای آمینه آلیفاتیک اشاره کرد [۱۳].

آنزیم فوق‌حاوی ۱۵/۵ درصد اسیدهای آمینه با بار منفی و ۱۳/۸ درصد اسید آمینه با بار مثبت و ۳۸ درصد اسید آمینه آب‌گریز است [۶]. یکی از علل پایداری زیاد آنزیم فوق وجود درصد بالای اسیدهای آمینه آب‌گریز و هم‌چنین برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک بین زنجیرهای جانبی اسیدهای آمینه باردار با یکدیگر می‌باشد.

چنانکه از شکل ۱ مشاهده می‌شود با افزایش غلظت گوانیدین هیدروکلراید منحنی‌های دگرگون‌سازی به سمت راست جابه‌جا می‌شوند. به عبارت دیگر حضور گوانیدین هیدروکلراید سبب

شکست مرکب و ترکیب ۳ و ۵ دی‌نیتروسالیسیلیک اسید از شرکت سیگما خریداری شد. اندازه‌گیری طیفی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر فارماسیا مدل ۴۰۰۰ مجهز به سیستم کنترل دمایی الکترونیکی در گستره ۲۰ تا ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد انجام شده است.

روش‌ها

۱- بررسی اثر گوانیدین هیدروکلراید بر پایداری آنزیم *آلفا آمیلاز*

بافر سدیم فسفات ۰/۰۲ M با pH = ۶/۹ و گوانیدین هیدروکلراید با غلظت‌های مختلف تهیه شد. منحنی‌های دگرگون‌سازی در حضور گوانیدین هیدروکلراید در طول موج ۲۸۰ نانومتر با استفاده از محلول‌های *آلفا آمیلاز* با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمده است.

۲- بررسی اثر حرارت بر پایداری آنزیم *آلفا آمیلاز*

منحنی‌های دگرگون‌سازی حرارتی در گستره دمایی ۲۰ تا ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر فارماسیا مجهز به سیستم کنترل حرارتی با استفاده از محلول‌های *آلفا آمیلاز* با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در طول موج ۲۸۰ نانومتر به دست آمده است.

۳- تخمین تعداد Tyr و Trp با استفاده از روش *ادلهاگ*

روش *ادلهاگ* برای تعیین مقدار Tyr و Trp در غلظت گوانیدین هیدروکلراید ۶ مولار مورد استفاده قرار گرفت [۱۰]. تعداد گروه‌های تیروزین و تریتوفان به روش اسپکتروفتومتری در طول موج‌های ۲۸۰ و ۲۸۸ نانومتر با استفاده از روابط زیر تعیین می‌شود:

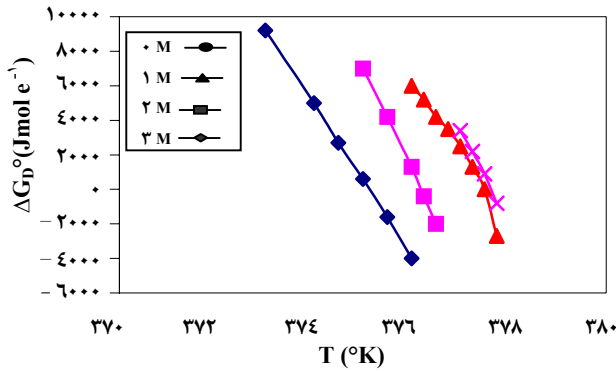
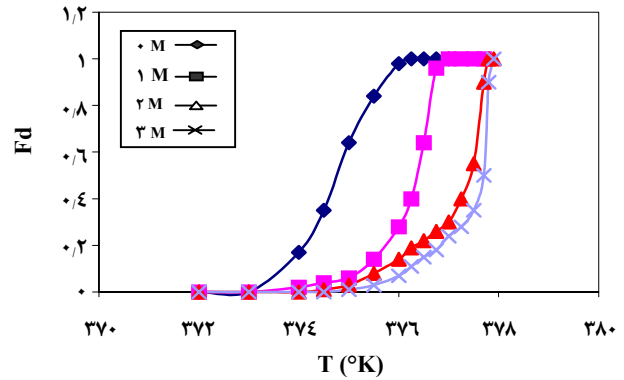
$$A_{288} = N_{\text{Trp}} 4815 + M_{\text{Tyr}} 385$$

$$A_{280} = N_{\text{Trp}} 5690 + M_{\text{Tyr}} 1280$$

N و M تعداد مول‌های Tyr و Trp به ازاء یک مول پروتئین می‌باشند.

۴- اندازه‌گیری فعالیت ویژه آنزیم *آلفا آمیلاز*

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم با استفاده از معرف رنگی ۳ و ۵ دی‌نیتروسالیسیلیک اسید و سوبسترای نشاسته ۱ درصد انجام گرفته است [۱۱]. در اثر عملکرد آنزیم *آلفا آمیلاز* روی نشاسته، قندهای احیاء‌کننده ایجاد می‌شوند که با معرف دی‌نیتروسالیسیلیک اسید ترکیب شده و کمپلکس رنگی تولید

شکل ۲- منحنی تغییرات ΔG_D^0 در مقابل دما

شکل ۱- تغییرات کسر پروتئین دگرگون شده در غلظت های مختلف گوانیدین هیدروکلراید

می باشد. توابع ترمودینامیکی ΔS_m^0 و ΔH_m^0 را می توان به صورت زیر بیان کرد [۱۵]:

$$\Delta H_m^0 = H_m^0(D) - H_m^0(N) \quad (۴)$$

$$\Delta S_m^0 = S_m^0(D) - S_m^0(N) \quad (۵)$$

در این روابط، D نمایانگر حالت دگرگون و N نمایانگر حالت طبیعی است.

با توجه به اینکه حالت دگرگون شده به صورت پیچیده بی نظم در نظر گرفته می شود، افزایش مقادیر ΔS_m^0 و ΔH_m^0 مبین فشرده تر شدن شکل طبیعی آنزیم می باشد.

ترکیب گوانیدین هیدروکلراید از یک طرف سبب کاهش پلاریته حلال و ثابت دی الکتریک آن شده و از طرف دیگر می تواند به اتصالات پپتیدی سطح پروتئین اتصال برقرار نماید.

نظر به اینکه مطالعه صورت گرفته در $pH = 6/9$ صورت گرفته است و در این pH ، گروه های آمین حاوی بار مثبت می باشند بنابراین اتصال گوانیدین هیدروکلراید و سطح پروتئین از نوع میان کنش های الکترواستاتیک بوده و چنین اتصالاتی سبب افزایش دانسیته باری در سطح پروتئین شده که این افزایش دانسیته باری در تقابل با اثر گوانیدین هیدروکلراید در کاهش پلاریته حلال، سهمی مهم تر داشته و سبب افزایش پایداری آنزیم می گردد.

مطالعات حاصل از تخمین مقادیر تعداد T_{up} و T_{up} با استفاده از روش دلهاگ در حضور گوانیدین هیدرو کلراید ۶ مولار نمایانگر در معرض قرار گرفتن ۶ اسید آمینه تیروزین و ۳ اسید آمینه تربیتوفان می باشد. مقادیر فوق یک چهارم مقادیر واقعی می باشند. در ساختمان آنزیم *آلفا آمیلاز* ۲۴ اسید آمینه تیروزین و ۱۲ اسید آمینه تربیتوفان وجود دارد [۱۶]، بنابراین می توان نتیجه گرفت

افزایش پایداری آنزیم شده است. برای محاسبه تغییر در انرژی آزاد حالت های طبیعی و دگرگون شده، ΔG_D^0 ، می توان از رابطه (۲) استفاده نمود [۱۴].

$$\Delta G_D^0 = -RT \ln [F_d / (1 - F_d)] = -RT \ln [(Y_n - Y_{obs}) / (Y_{obs} - Y_d)] \quad (۲)$$

در این رابطه R ثابت گازها و T دمای کلین است. دمای ذوب پروتئین (T_m) دمایی است که مقدار ΔG_D^0 برابر صفر می شود. منحنی تغییرات ΔG_D^0 بر حسب T در شکل ۲ ارایه شده است. مقدار T_m برای آنزیم *آلفا آمیلاز* $374/7^\circ K$ می باشد که نمایانگر پایداری حرارتی بسیار زیاد این آنزیم است. اثر گوانیدین هیدروکلراید بر مقدار T_m آنزیم در جدول ۱ ارایه شده است. چنانچه ملاحظه می شود حضور گوانیدین هیدروکلراید سبب افزایش مقدار T_m آنزیم شده است.

نکته قابل ذکر اینکه آزمایش ها به طور عملی تا غلظت ۳ مولار گوانیدین هیدروکلراید صورت گرفته است. غلظت های بالاتر سبب افزایش پایداری آنزیم و دمای ذوب بالاتر از $378^\circ K$ می شود که به وسیله دستگاه قابل اندازه گیری نبود.

شیب منحنی ΔG_D^0 بر حسب دما در نقطه T_m برابر ΔS_m^0 است. برای محاسبه ΔH_m^0 ، با در نظر گرفتن مقدار صفر برای ΔG_D^0 می توان از رابطه (۳) استفاده کرد.

$$\Delta H_m^0 = T_m \Delta S_m^0 \quad (۳)$$

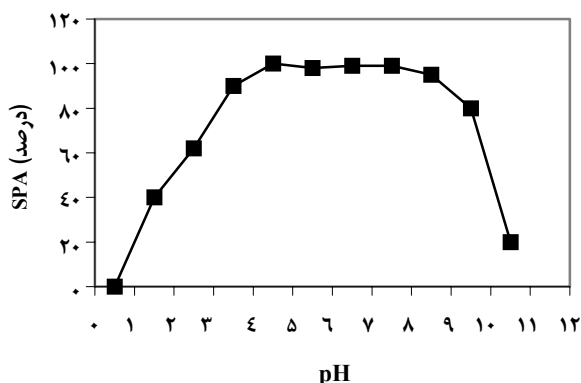
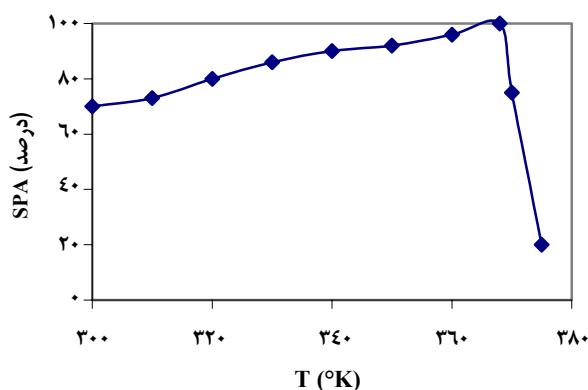
ΔS_m^0 و ΔH_m^0 به ترتیب تغییر انتروپی و آنتالپی در دمای T_m می باشند. جدول ۲ نشان دهنده مقادیر پارامترهای فوق می باشد. مقادیر ΔS_m^0 و ΔH_m^0 با افزایش غلظت گوانیدین هیدروکلراید، افزایش می یابد. افزایش مقادیر این دو پارامتر به منزله جمع تر شدن شکل طبیعی آنزیم و کاهش کسر پروتئین دگرگون شده

جدول ۱- تغییرات T_m آنزیم *آلفا آمیلاز* در حضور گوانیدین هیدروکلراید

[Gd-HCl]M	T_m (°K)
۰	۳۷۴/۷
۱	۳۷۵/۹
۲	۳۷۷/۵
۳	۳۷۷/۷
۴	>۳۷۸

جدول ۲- پارامترهای ترمودینامیکی بر هم کنش گوانیدین هیدروکلراید و آنزیم *آلفا آمیلاز*

[GdHCl]M	ΔS_m° Jmole ⁻¹ K ⁻¹	ΔH_m° KJmole ⁻¹
۰	۴۳۰۰	۱۶۱۱/۲
۱	۶۶۰۰	۲۸۱۹/۲
۲	۸۰۰۰	۳۰۲۰
۳	۸۷۱۴	۳۲۲۱/۷

شکل ۳- تغییرات فعالیت آنزیم *آلفا آمیلاز* در مقابل pHشکل ۴- تغییرات فعالیت آنزیم *آلفا آمیلاز* در مقابل دما

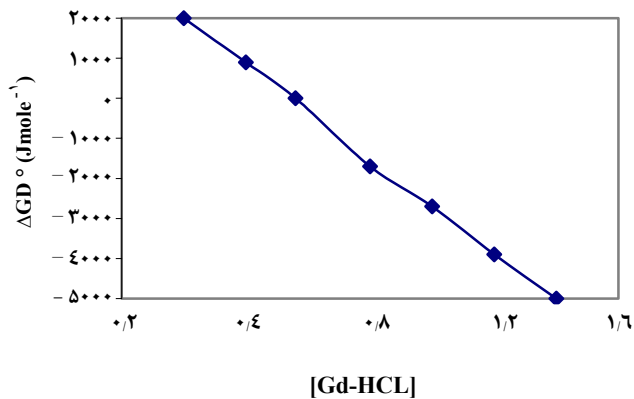
که در حضور گوانیدین هیدروکلراید ساختمان آنزیم به صورت فشرده باقی مانده و دچار بازشدگی نشده است. شکل ۳ نمایانگر تغییرات فعالیت آنزیم *آلفا آمیلاز* در مقابل مقادیر مختلف pH می‌باشد. چنانچه مشاهده می‌شود pH مطلوب برای فعالیت آنزیم در دامنه ۶ الی ۸ قرار دارد. البته آنزیم تا pH حدود ۱۰ به میزان زیادی فعالیت خود را حفظ می‌کند. فعالیت آنزیم در محلول‌هایی با pH کم‌تر از ۶، افت قابل توجهی می‌کند و در pH برابر ۲ به صفر می‌رسد. علت این امر احتمالاً به واسطه تجمع بارهای مثبت در سطح پروتئین و به دنبال آن دگرگون شدن دانسیته باری ساختار آنزیم و همچنین تیترا شدن اسیدهای آمینه Asp و Glu موجود در جایگاه فعال آنزیم می‌باشد [۱۷]. چنانچه اسیدهای آمینه فوق پروتونه شوند، آنزیم قادر به انجام واکنش کاتالیزوری نخواهد بود. همچنین با افزایش pH از مقدار ۱۰ به بالا دوباره کاهش شدید فعالیت به وقوع می‌پیوندد. علت این امر می‌تواند به واسطه تجمع بارهای منفی در سطح آنزیم و تیترا شدن اسیدهای آمینه Lys و Arg و His موجود در جایگاه فعال آنزیم باشد [۱۷].

شکل ۴ نمایانگر تغییرات فعالیت آنزیم *آلفا آمیلاز* در مقابل دما است. آنزیم در دامنه وسیعی از دما فعالیت خود را حفظ نموده و دمای بهینه فعالیت آنزیم برابر ۳۶۸ درجه کلون است. شکل ۵ نمایانگر تغییرات فعالیت آنزیم *آلفا آمیلاز* در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد در مقابل غلظت‌های مختلف گوانیدین هیدروکلراید می‌باشد. چنانچه مشاهده می‌شود، فعالیت آنزیم تا غلظت ۱ مولار گوانیدین هیدروکلراید به‌طور تقریبی ثابت می‌ماند. افزایش غلظت گوانیدین هیدروکلراید سبب کاهش فعالیت ویژه آنزیم شده به نحوی که در غلظت ۶ مولار گوانیدین هیدروکلراید به میزان ۴۰ درصد فعالیت اولیه می‌رسد. چنانچه فعالیت ویژه را به‌عنوان یک پارامتر فیزیکی به کار ببریم، می‌توان با استفاده از آن کسر پروتئین دگرگون شده (F_d) و سپس تغییرات انرژی آزاد را محاسبه کرد.

شکل ۶ نمایانگر تغییرات انرژی آزاد برحسب غلظت گوانیدین هیدروکلراید است. تغییرات ΔG_D° علیه غلظت دگرگون کننده با رابطه زیر بیان می‌شود:

$$\Delta G_D^\circ = \Delta G_D^\circ [H_2O] - m[D] \quad (۶)$$

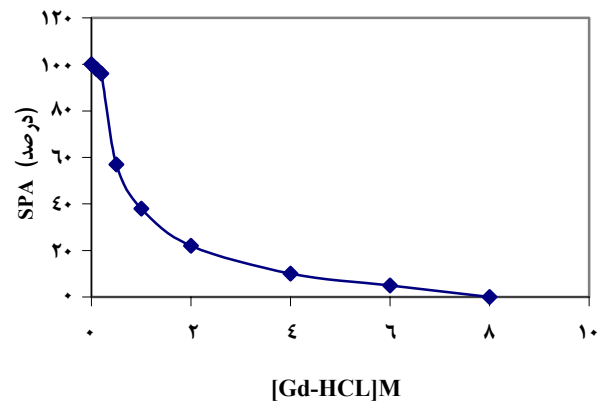
در رابطه بالا $\Delta G_D^\circ [H_2O]$ تخمین مقدار ΔG_D° در غیاب دگرگون کننده و m نمایانگر وابستگی ΔG_D° به غلظت دگرگون کننده است.



شکل ۶- تغییرات ΔG_D^0 در مقابل غلظت های مختلف گوانیدین هیدروکلراید

دما به طور کامل قابل ملاحظه می باشد. بنابراین می توان از مطالعات سینتیکی برای بررسی حساس تر و دقیق تر تغییرات ساختاری سطح آنزیم هایی که جایگاه فعال آنها همانند آلفا آمیلاز در ناحیه سطحی قرار دارد استفاده نمود.

تاریخ دریافت: ۱۱/۴/۸۱ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۱/۴/۸۲



شکل ۵- تغییرات فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در مقابل غلظت های مختلف گوانیدین هیدروکلراید در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد

مقدار $[GdHCl]_{1/2}$ غلظتی از گوانیدین هیدروکلراید که مقدار ΔG_D^0 برابر صفر است، برابر ۰/۵۶ مولار و مقدار $[H_2O]$ برابر ۳ کیلوژول بر مول می باشد. نکته قابل توجه اینکه اگر چه منحنی تغییرات جذب برحسب غلظت گوانیدین هیدروکلراید در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد هیچ گونه تغییراتی از خود نشان نمی دهد ولی تغییرات منحنی های مربوط به فعالیت آنزیم در این

مراجع

- [1] Cho, H. Y., Kim, Y. W., Kim, T., *J. Biochim. Biophys. Acta*, 1478, 333(2000).
- [2] Yuuki, T., Nomura, T., Udaka, S., *J. Biochim*, **98**, 1148 (1985).
- [3] Jespersen, H., Henrissat, B., Srensson, B., *J. Protein. Chem*, **12**, 791 (1993).
- [4] Leveque, E., Haye, B., Belarbi, A., *FEMS Microbiology Letters*, 186, 67 (2000).
- [5] Matsuura, K., *J. Biochem*, **86**, 1773 (1979).
- [6] Yamazaki, H., Otozai, K., *J. Of Bacteriology*, **156**, 12327 (1983).
- [7] Pace, C. N., *Trends biochem. Sci*, 15, 14 (1990).
- [8] Bradbury, J., *J. Biochem. Biophys. Acta*, 10, 10 (1973).
- [9] Robinson. D. R., *J. Am. Chem. Soc.*, 87.1462 (1965).
- [10] Edelhoeh, H., *Biochemistry*, 6, 1948 (1967).
- [11] Bernfeld, P., *Method in Enzymology.*, Vol 1. Academic Pres, New York (1995).
- [12] Pace, C. N., *TIBTECK*, **8**,93 (1990).
- [13] Kilbanov, A. M. L., Ahern T., *J. Prot. Engin*, 213, 218 (1987).
- [14] Pace, C. N., Shirley, B. A., *Protein Structure: A Practical Approach* (Creighton, T. E. ed.) 311, (1989).
- [15] Privalov, P. L., *J. Mol. Biol.*, 190, 487 (1986).
- [16] Yamazaki, H., *J. Bactriol.*, 327, 156 (1983).
- [17] Yamaguchi, H. and Matsushima. Y., *J. Biol Chem*, 70, 587 (1971).

SID



سرویس های ویژه



سرویس ترجمه تخصصی



کارگاه های آموزشی



بلاگ مرکز اطلاعات علمی



سامانه ویراستاری STES



فیلم های آموزشی

کارگاه های آموزشی مرکز اطلاعات علمی



مقاله نویسی علوم انسانی

مقاله نویسی علوم انسانی



اصول تنظیم قراردادها

اصول تنظیم قراردادها



آموزش مهارت های کاربردی در تدوین و چاپ مقاله

آموزش مهارت های کاربردی در تدوین و چاپ مقاله