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

بهزاد شارقی*+ 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 گیری‌های اسپکتروفتومتری در ناحیه ماوراء بنفش و بررسی فعالیت ویژه آنزیم مورد مطالعه قرار گرفته است. اندازه گیری‌های طیفی در pH = ٦/٩ و گستره دمایی ۲۰ الی ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد انجام شده است. نتایج به‌دست 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 ٤- عدم در معرض قرار گرفتن اسیدهای آمینه Tyr و Trp در حضور گوانیدین هیدروکلراید.

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

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

مقدمه

آلفا آمیلاز (E.C.3.2.1.1) یکی از آنزیم‌های *اکستراسلولار* از منشاء *Bacillus subtilis* بوده که به‌طور وسیعی در صنعت نشاسته مورد استفاده قرار گرفته است [۱]. به طور عمده *آلفا آمیلازهای* باکتریایی به دو طبقه *Liquefying* و *Saccharifying* تقسیم می‌شوند. *آلفا آمیلاز* از منشاء *B.Subtilis* به طبقه دوم تعلق دارد [۳ و ۲]. مقایسه توالی آنزیم‌های *آلفا آمیلاز* نشان دهندهٔ این نکته است که آنها از یک ژن اجدادی واحد مشتق شده‌اند [۴]. آنزیم *آلفا آمیلاز* در دامنه وسیعی از pH پایدار می‌باشد [۵]. وزن مولکولی آنزیم KD ۶۹ می‌باشد [۶]. پایداری ساختمان فضایی یک پروتئین گلبولار به‌صورت تغییر انرژی آزاد برای تبدیل حالت طبیعی پروتئین به‌حالت دگرگون محاسبه می‌شود [۷]. از ترکیب گوانیدین هیدروکلراید به میزان وسیعی برای بررسی پایداری پروتئین‌ها استفاده شده است [۸]. گوانیدین هیدروکلراید از دگرگون کننده‌های قوی می‌باشد. این ترکیب باعث می‌شود آب حلال بهتری برای اسیدهای آمینه غیرقطبی شده و برهم‌کنش‌های آب‌گریز را تضعیف می‌کند. این ترکیب می‌تواند به‌عنوان دهنده یا گیرندهٔ پروتون در تشکیل اتصالات هیدروژنی با پروتئین نقش داشته باشد. حضور اتم‌های هیدروژن روی اتم ازت که دارای قابلیت تشکیل اتصال هیدروژنی هستند نقش مهمی را در عمل دگرگون کردن پروتئین ها ایفا می‌کنند [۹].

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

بخش تجربی

مواد و روش‌ها

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

*عهده دار مکاتبات

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

Archive of SID

www.SID.ir

شرکت مرک و ترکیب ۳ و ۵ دی نیتروسالیسیلیک اسید از شرکت سیگما خریداری شد. اندازه گیری 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

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

بافر سدیم فسفات ۰/۰۲M با pH = ۶/۹ و گوانیدین هیدروکلراید باغلظت‌های 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 به‌دست آمده است.

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

منحنی‌های دگرگون سازی حرارتی در گستره دمایی ۲۰ تا ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به‌وسیله 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 به‌دست آمده است.

۳ـ 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 تریپتوفان به روش اسپکتروفتومتری در طول موج‌های ۲۸۰ و ۲۸۸ نانومتر با استفاده از روابط زیر تعیین می‌شود:

$$A_{۲۸۸} = N_{Trp}\,۴۸۱۵ + M_{Tyr}\,۳۸۵$$
$$A_{۲۸۰} = N_{Trp}\,۵۶۹۰ + M_{Tyr}\,۱۲۸۰$$

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

٤ـ اندازه‌گیری فعالیت ویژه آنزیم *آلفا آمیلاز*

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم با استفاده از معرف رنگی ۳ و ۵ دی‌نیترو سالیسیلیک اسید و سوبسترای نشاسته ۱ درصد انجام گرفته است [۱۱]. در اثر عملکرد آنزیم *آلفا آمیلاز* روی نشاسته، قندهای احیاء کننده ایجاد می‌شوند که با معرف دی‌نیتروسالیسیلیک اسید ترکیب شده و کمپلکس رنگی تولید می‌کنند که حداکثر جذب آن در ۵۴۰ نانومتر است. فعالیت ویژه آنزیم به‌روش زیر محاسبه می‌شود:

$$\text{Unit/mgr} = \frac{\text{مالتوز تولید شده (میکرومول)}}{\text{۳× مقدار آنزیم در مخلوط واکنش}}$$

۵ ـ 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 اندازه گیری 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 ۳۷۲ °K برابر صفر است. کسر پروتئین دگرگون شده با پذیرفتن مکانیزم دو حالته و با استفاده از رابطه زیر محاسبه شده است:

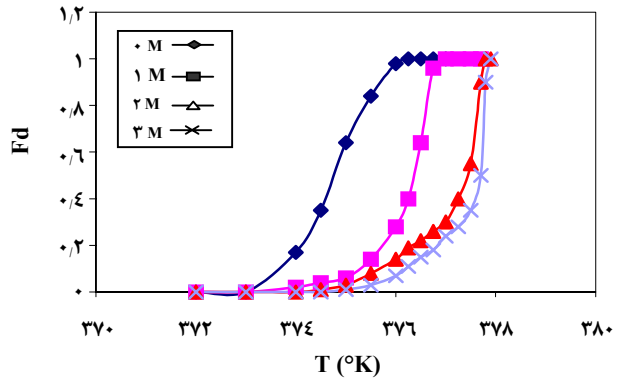
$$F_d = \frac{Y - Y_N}{Y_D - Y_N} \qquad (۱)$$

در این رابطه Y_N و Y_D به ترتیب مقادیر جذب نوری مولکول‌های طبیعی و دگرگون شده در حالتی می‌باشند که Y مورد اندازه گیری واقع شده است [۱۲]. عدم تغییر مقدار F_d تا دمای ۳۷۲ °K نمایان‌گر پایداری فوق العاده ساختمان آنزیم *آلفا آمیلاز* از منشاء *B.subtilis* می‌باشد. مطالعات انجام گرفته مؤید این نکته است که پایداری بسیار زیاد آنزیم های ترموفیل در مقابل حرارت به عوامل متعددی وابسته می‌باشد که می‌توان به برهم کنش‌های هیدروفوبیک، پیوندهای یونی و محتوی اسیدهای آمینه آلیفاتیک اشاره کرد [۱۳].

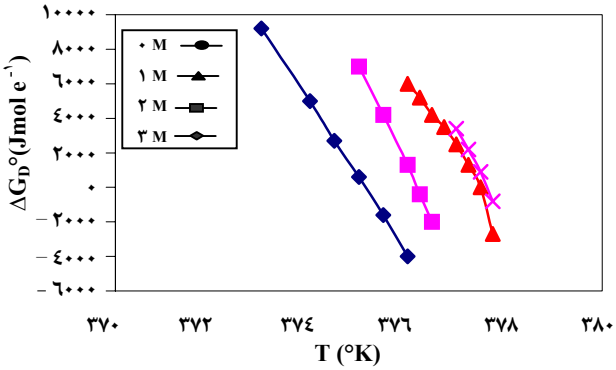
آنزیم فوق حاوی ۱۵/۵ درصد اسیدهای آمینه با بار منفی و ۱۳/۸ درصد اسید آمینه با بار مثبت و ۳۸ درصد اسید آمینه آب‌گریز است [۶]. یکی از علل پایداری زیاد آنزیم فوق وجود درصد بالای اسیدهای آمینه آب‌گریز و هم چنین برهم کنش‌های الکترواستاتیک بین زنجیرهای جانبی اسیدهای آمینه باردار بایکدیگر می‌باشد.

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

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۱- تغییرات کسر پروتئین دگرگون شده درغلظت های مختلف گوانیدین هیدروکلراید



شکل ۲ – منحنی تغییرات ΔG_D° در مقابل دما

افزایش پایداری آنزیم شده است. برای محاسبه تغییر در انرژی آزاد حالت‌های طبیعی و دگرگون شده، ΔG_D°، می‌توان از رابطه (۲) استفاده نمود [۱۴].

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

در این رابطه R ثابت گازها و T دمای کلوین است. دمای ذوب پروتئین (T_m) دمایی است که مقدار ΔG_D° برابر صفر می‌شود. منحنی تغییرات ΔG_D° برحسب T در شکل ۲ ارایه شده است. مقدار T_m برای آنزیم *آلفا آمیلاز* ۳۷۴/۷ °K می‌باشد 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 می‌شود حضور گوانیدین هیدروکلراید سبب افزایش مقدار T_m آنزیم شده است.

نکته قابل ذکر اینکه آزمایش‌ها به‌طور عملی تا غلظت ۳ مولار گوانیدین هیدروکلراید صورت گرفته است. غلظت‌های بالاتر سبب افزایش پایداری آنزیم و دمای ذوب بالاتر از ۳۷۸ °K می‌شود که به‌وسیله دستگاه قابل اندازه‌گیری نبود.

شیب منحنی ΔG_D° برحسب دما در نقطه T_m برابر ΔS_m° است. برای محاسبه ΔH_m° ، با در نظر گرفتن مقدار صفر برای ΔG_D° می‌توان از رابطه (۳) استفاده کرد.

$$\Delta H_m^{\circ} = T_m \Delta S_m^{\circ} \qquad (۳)$$

ΔS_m° و ΔH_m° به ترتیب تغییر انتروپی و آنتالپی در دمای T_m می‌باشند. جدول ۲ نشان‌دهنده مقادیر پارامترهای فوق می‌باشد. مقادیر ΔH_m° و ΔS_m° با افزایش غلظت گوانیدین هیدروکلراید ، افزایش می‌یابد. افزایش مقادیر این دو پارامتر به منزله جمع‌تر شدن شکل طبیعی آنزیم و کاهش کسر پروتئین دگرگون شده می‌باشد. توابع ترمودینامیکی ΔS_m° و ΔH_m° را می‌توان به‌صورت زیر بیان کرد [۱۵]:

$$\Delta H_m^{\circ} = H_m^{\circ}(D) - H_m^{\circ}(N) \qquad (۴)$$

$$\Delta S_m^{\circ} = S_m^{\circ}(D) - S_m^{\circ}(N) \qquad (۵)$$

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

با توجه به اینکه حالت دگرگون شده به‌صورت پیچه بی‌نظم در نظر گرفته می‌شود، افزایش مقادیر ΔS_m° و ΔH_m° مبین فشرده‌تر شدن شکل طبیعی آنزیم می‌باشد.

ترکیب گوانیدین هیدروکلرید از یک طرف سبب کاهش پلاریته حلال و ثابت دی‌الکتریک آن شده و از طرف دیگر می‌تواند به اتصالات پپتیدی سطح پروتئین اتصال برقرار نماید.

نظر به اینکه مطالعه صورت گرفته در pH = ۶/۹ صورت گرفته است و دراین pH ، گروه‌های آمین حاوی بار مثبت می‌باشند بنابراین اتصال گوانیدین هیدروکلرید و سطح پروتئین از نوع میان‌کنش‌های الکترواستاتیک بوده وچنین اتصالاتی سبب افزایش دانسیته باری در سطح پروتئین شده که این افزایش دانسیتهٔ باری در تقابل با اثر گوانیدین هیدروکلراید در کاهش پلاریته حلال، سهمی مهم‌تر داشته و سبب افزایش پایداری آنزیم می‌گردد.

مطالعات حاصل از تخمین مقادیر تعداد Tyr و Trp با استفاده از روش *ادلهاگ* در حضور گوانیدین هیدرو کلراید ۶ مولار نمایانگر در معرض قرار گفتن ۶ اسید آمنیه تیروزین و ۳ آسید آمینه تریپتوفان می‌باشد. مقادیر فوق یک چهارم مقادیر واقعی می‌باشند. در ساختمان آنزیم *آلفا آمیلاز* ۲۴ اسید آمینه تیروزین و ۱۲ اسید آمینه تریپنوفان وجود دارد [۱۶]، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت

Archive of SID

www.SID.ir

کـه درحضـور گوانیدین هیـدروکلرایـد ساختمـان آنزیم به‌صـورت فشرده باقی مانده و دچار بازشدگی نشده است. شکل ۳ نمایانگر تغییرات فعالیت آنزیم *آلفا آمیلاز* در مقابل مقادیر مختلف pH می‌باشد. چنانچه مشاهده می شود 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 به‌واسطه تجمع بارهای مثبت در سطح پروتئین و به‌دنبال آن دگرگون شدن دانسیته باری ساختار آنزیم و همچنین تیتر 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 به‌وقوع می پیوندد. علت این امر می‌تواند به‌واسطه تجمع بارهای منفی در سطح آنزیم و تیتر شدن اسیدهای آمینه Lys و Arg و His موجود در جایگاه فعال آنزیم باشد [۱۷].

شـکل ۴ نمایـان‌گر تغییرات فعالیت آنزیم *آلفا آمیلاز* در مقابل دمـا است. آنزیم در دامنه وسیعی از دما فعالیت خود را حفظ نموده و دمای بهینه فعالیت آنزیم برابر ۳۶۸ درجه کلوین است.

شـکل ۵ نمایـان‌گـر تغییرات فعالیت آنزیم *آلفا آمیلاز* در دمای ۹۵ درجـه سـانتی‌گـراد در مقـابل غلظـت‌هـای مخـتلف گوانیدیـن هـیدروکلراید مـی‌باشـد. چنانچه مشاهده می‌شود، فعالیت آنزیم تا غلظت ۱ مولار گوانیدین هیدروکلرید به‌طور تقریبی ثابت می‌ماند. افـزایش غلظـت گوانیدین هیدروکلراید سبب کاهش فعالیت ویژه آنـزیم شده به نحوی که در غلظت ۶ مولار گوانیدین هیدروکلراید بـه مـیزان ۴۰ درصد فعالیت اولیه می‌رسد. چنانچه فعالیت ویژه را بـه‌عنوان یک پارامتر فیزیکی به‌کار بریم، می‌توان با استفاده از آن کسـر پروتئیـن دگـرگون شده (F_d) و سپس تغییرات انرژی آزاد را محاسبه کرد.

شـکل ۶ نمایـان‌گـر تغیـیرات انـرژی آزاد برحسـب غلظـت گوانیدیـن هیدروکلراید است. تغییرات ΔG_D° علیه غلظت دگرگون کننده با رابطه زیر بیان می‌شود:

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

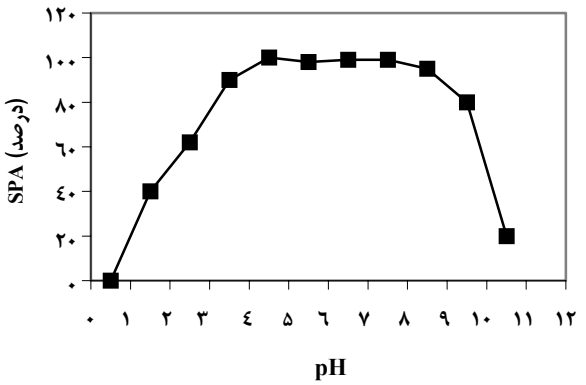
در رابطـــه بـــالا $\Delta G_D^\circ [H_2O]$ تخمیـــن مقـــدار ΔG_D° در غـیـاب دگـرگون کـنـنده و m نمایانگـر وابستگی ΔG_D° به غلظت دگرگون کننده است.

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

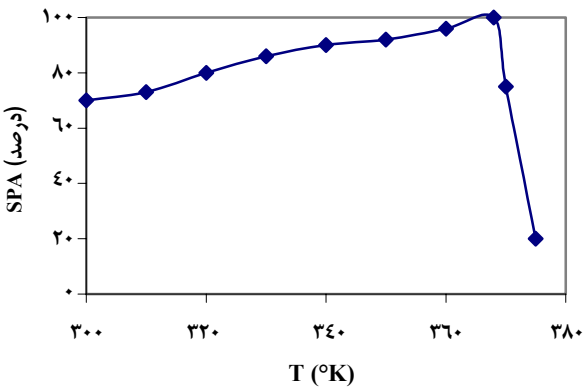
[Gd-HCl]M	T_m (°K)
۰	۳۷۴/۷
۱	۳۷۵/۹
۲	۳۷۷/۵
۳	۳۷۷/۷
۴	>۳۷۸

جـدول ۲ـ پارامـترهای ترمودینامیکـی بـر هم کنش گوانیدین هیدرو کلراید 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

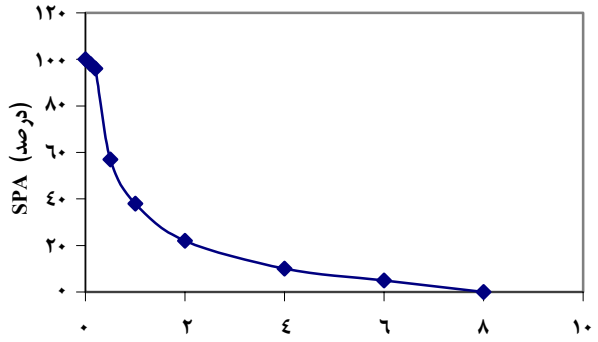


شکل ۳ـ تغییرات فعالیت آنزیم *آلفا آمیلاز* در مقابل pH

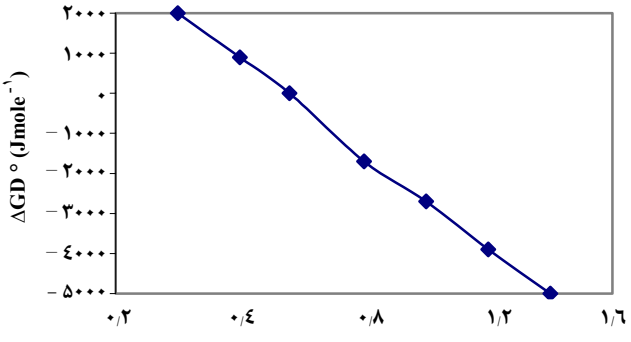


شکل ٤ـ تغییرات فعالیت آنزیم *آلفا آمیلاز* در مقابل دما

www.SID.ir



شکل ۵ ـ تغییرات فعالیت آنزیم *آلفا آمیلاز* در مقابل غلظت‌های مختلف گوانیدین هیدروکلراید در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد



شکل ٦ـ تغییرات ΔG_D^0 در مقابل غلظت های مختلف گوانیدین هیدروکلراید

مقدار $[GdHCl]_{1/2}$ غلظتی از گوانیدین هیدروکلراید که مقدار ΔG_D° برابر صفر است، برابر ۰/۵۶ مولار و مقدار ΔG_D° [H_2O] برابر ۳ کیلوژول بر مول می‌باشد. نکته قابل توجه اینکه اگر چه منحنی تغییرات جذب برحسب غلظت گوانیدین هیدروکلراید در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد هیچ‌گونه تغییراتی از خود نشان نمی‌دهد ولی تغییرات منحنی‌های مربوط به فعالیت آنزیم در این دما به‌طور کامل قابل ملاحظه می‌باشد. بنابراین می‌توان از مطالعات سینتیکی برای بررسی حساس‌تر و دقیق‌تر تغییرات ساختاری سطح آنزیم‌هایی که جایگاه فعال آنها همانند *آلفا آمیلاز* در ناحیه سطحی قرار دارد استفاده نمود.

تاریخ دریافت: ۸۱/٤/۲۹ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۲/٤/۱۱

مراجـع

[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. Biophs. Acta*, 10, 10 (1973).

[9] Robinson. D. R., *J. Am. Chem. Soc.*, 87.1462 (1965).

[10] Edelhoch, 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 Approch (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).

Archive of SID
www.SID.ir