تأثیر حلالهای آلی بر فعالیت و پایداری آنزیم اندوگلوکاناز و پایدارسازی آن با ساکارز

معصومه محمدی[۱]، سعید نژاوند[۱*]، محمد پاژنگ[۱] و علیرضا امانی قدیم[۲]

[۱] تبریز، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان. دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

[۲] تبریز، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان. دانشکده علوم پایه، گروه شیمی

تاریخ دریافت: ۹۵/۸/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۶/۳/۱۶

ONLINE FIRST

چکیده

به کارگیری آنزیمها در حلالهای آلی برای مصارف صنعتی و صنایع داروسازی حائز اهمیت می‌باشد. کاهش فعالیت آنزیمها در حضور حلالهای آلی می‌تواند به دلیل سخت شدن ساختار پروتئینی آنزیمها در حلالهای آلی، واسرشتگی و مهار آنزیمی باشد. معمولاً پایداری آنزیمها نیز در حلالهای آلی کاهش می‌یابد. برای رفع این مشکل می‌توان از روشهای پایدارسازی پروتئینها نظیر افزودنیها، مهندسی پروتئین و تغییرات شیمیایی استفاده نمود. در این تحقیق ابتدا آنزیم اندوگلوکاناز AaCel9A تولید و سپس فعالیت و پایداری آنزیم در درصدهای مختلفی از حلالهای آلی n–پروپانول، دی متیل فرمامید (DMF) و دی متیل سولفواکسید (DMSO) مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت برای پایدارسازی آنزیم از افزودنی ساکارز استفاده گردید. نتایج نشان داد که حلال DMSO در غلظتهای ۵ و ۱۰ درصد باعث افزایش فعالیت آنزیم و در غلظتهای بالاتر باعث کاهش فعالیت آنزیم شد. بقیه حلالها از همان غلظتهای پایین باعث کاهش فعالیت آنزیم شدند که در این میان DMF بیشترین تأثیر را بر روی کاهش فعالیت آنزیم داشت. پایداری آنزیم توسط ساکارز در حضور حلال دی متیل سولفواکسید در مقایسه با سایر حلالها بیشتر بود. افزودن ساکارز تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر پایداری آنزیم در حضور حلالهای n-پروپانول و DMF نداشت.

واژه های کلیدی: آنزیم اندوگلوکاناز، حلالهای آلی، پایدارسازی، افزودنی، ساکارز

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۷۱۲۳۵۶۰، پست الکترونیکی: S.najavand@azaruniv.ac.ir

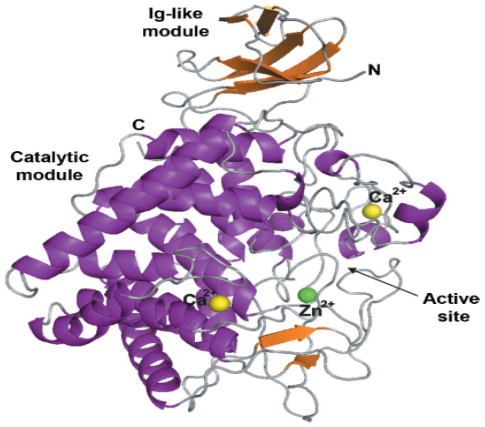
مقدمه

استفاده از آنزیمها در محیطهای حاوی حلالهای آلی روز به روز در حال افزایش است. آنزیمها در حضور حلالهای آلی خواص و ویژگیهای جدیدی پیدا می‌کنند که در محیطهای آبی این ویژگیها هرگز دیده نمی‌شود (۱۱ و ۳۲). استفاده از آنزیمها در حلالهای آلی مزایایی همچون برگشت معادله ترمودینامیکی واکنشهای هیدرولیز، جلوگیری از ایجاد واکنشهای جانبی وابسته به آب، افزایش پایداری دمایی به دلیل کاهش تحرک ساختاری، کاهش خطر رشد میکروبی، بازیابی و استفاده مجدد آنزیم و راحت‌تر شدن استفاده از سوبستراهای حساس به رطوبت دارد (۹، ۱۹، ۲۸، ۳۰ و ۳۱). با این حال اغلب حلالهای آلی فعالیت و پایداری آنزیمها را کاهش می‌دهند. کاهش فعالیت آنزیمها در حلالهای آلی می‌تواند به دلیل سخت شدن ساختار پروتئینی آنزیمها در حلالهای آلی، واسرشتگی و مهار آنزیمی باشد. حلالهای آلی با جدا کردن مولکولهای آب از اطراف پروتئین باعث تخریب ساختار سه بعدی یا دناتوره شدن آنها شود، استفاده از آنزیمها در محیطهای حاوی حلالهای آلی همواره با چالشهای بزرگی روبرو بوده است (۱۵ و ۲۳). سلولازها از آنزیمهای پرکاربرد و جزء آنزیمهای صنعتی می‌باشند که قادر به هیدرولیز پیوندهای گلیکوزیدی می‌باشند (۱۴). از کاربردهای این آنزیم می‌توان به استفاده آن در صنایع غذایی، کاغذسازی، نساجی،

Archive of SID

www.SID.ir

کشاورزی، صنایع شویندگی و نیز تولید سوختهای زیستی مانند بیواتانول اشاره کرد (۳۴). از مهمترین سلولازها، می توان به β-1,4 اندوگلوکانازها اشاره کرد زیرا این آنزیمها سوبستراهای سلولزی را به طور تصادفی از داخل مورد هدف قرار داده و سوبسترای مورد نیاز برای بقیه سلولازها را فراهم می‌کنند که هیدرولیز کامل سلولز را در پی دارد. آنزیم اندوگلوکاناز *آلیسیکلوباسیلوس اسیدوکالداریوس* یک آنزیم منومر با ۵۳۷ آمینواسید و وزن مولکولی ۵۹ کیلودالتون می‌باشد و متعلق به زیر خانواده E1 از خانواده ۹ گلیکوزیدهیدرولازهاست (۱۲ و ۱۳). شکل ۱ ساختار سوم این آنزیم را نشان می‌دهد.



شکل ۱- ساختار کریستالوگرافی آنزیم AaCel9A. دمین کاتالیتیکی، دمین شبه Ig، جایگاه اتصال فلزات و جایگاه فعال نشان داده شده است.

برای استفاده آنزیم در صنعت باید پایداری آنزیم در فرآیندهای صنعتی را که در شرایط فیزیکی و شیمیایی خاصی انجام می‌شوند بهبود بخشید، زیرا ساختار آنزیم حین استفاده در فرآیندهای صنعتی ممکن است واسرشته شده و بنابراین آنزیم فعالیت کاتالیزوری خود را از دست بدهد. به دلیل استفاده گسترده سلولاز در صنایع مختلف از یک طرف و ضرورت استفاده از حلالهای آلی در صنعت از طرف دیگر، پایدارسازی سلولاز در حضور حلالهای آلی امری اجتناب ناپذیر است. برای رفع این مانع می‌توان از روشهای پایدارسازی پروتئینها همچون استفاده از افزودنیها، مهندسی پروتئین و تغییر شیمیایی آنزیمها بهره برد (۱۷، ۲۱، ۲۵، ۲۶ و ۳۶)، که در این میان افزودنیها به ویژه پلی-آلها به علت کاربرد آسان و هزینه نسبتاً پایین اهمیت قابل ملاحظه‌ای دارند. در میان افزودنیها، ساکارز در علم بیوشیمی و داروسازی توجه زیادی را به خود جلب کرده است چرا که باعث پایداری پروتئینها در مقابل شرایط حاد محیطی نظیر دماهای بالا و محلولهای نمکی می‌شود. ساکارز با افزایش کشش سطحی و دورشدگی ترجیحی باعث پایدارسازی پروتئین می‌شود (۷، ۱۰ و ۲۰). در این تحقیق ابتدا آنزیم اندوگلوکاناز AaCel9A تولید و تخلیص گردید، سپس فعالیت و پایداری آنزیم اندوگلوکاناز در حضور حلالهای آلی مختلف n–پروپانول، دی متیل فرمامید (DMF) و دی متیل سولفواکسید (DMSO) مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت از افزودنی ساکارز برای پایدارسازی آنزیم در حضور حلالها استفاده گردید.

مواد و روشها

مواد استفاده شده در این تحقیق: کربوکسی متیل سلولز (CMC)، ۵،۳–دی نیترو سالسیلیک اسید (DNS)، ساکارز و حلالهای مورد استفاده در این تحقیق از شرکت مرک تهیه گردید.

تولید آنزیم اندوگلوکاناز در باکتری *اشریشیا کلی*: وکتور نوترکیب pET21a حاوی ژن اندوگلوکاناز AaCel9A ساخته شده در آزمایشگاه (۲۷) برای بیان به *اشریشیاکلی* سویه بیانی BL21 منتقل گردید. از القاگر ایزوپروپیل بتا تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG) با غلظت یک میلی‌مولار جهت بیان آنزیم در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲۱ ساعت استفاده گردید. پروتئین نوترکیب تولید شده با روش شوک حرارتی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد تخلیص نسبی گردید. این نوع تخلیص براساس عدم پایداری پروتئینهای باکتریایی در دماهای بالا و در نتیجه غیر فعال شدن ساختار و تجمع آنهاست. در دمای بالا دمینهای هیدروفوب پروتئینهای مزوفیل در سطح

Archive of SID

www.SID.ir

قرار می‌گیرند و با هم میانکنش واندروالسی داده، باعث اتصال و در نهایت تجمع پروتئینها و رسوب آنها می‌شوند، در حالی که پروتئینهای ترموفیل همچون آنزیم اندوگلوکاناز AaCel9A در دمای بالا ساختار طبیعی خود را حفظ می‌کنند و به صورت محلول باقی می‌مانند. در نهایت تخلیص کامل این آنزیم با ستون نیکل آگارز صورت گرفت.

تعیین فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز: برای تعیین فعالیت آنزیمی، ۵۰ میکرولیتر سوبسترای CMC ۱ درصد (۱ گرم CMC حل شده در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات با pH=۷) با ۵۰ میکرولیتر آنزیم به مدت ۳ دقیقه در دمای ۶۵ درجه انکوبه شد. توقف واکنش آنزیمی با افزودن معرف ۳، ۵ دی نیترو سالسیلیک اسید (معرف برنفیلد) و جوشاندن میکروتیوب واکنش به مدت ۵ دقیقه در آبجوش صورت گرفت (۲۲). برای سنجش میزان سرهای احیاءکننده آزاد حاصل از واکنش آنزیمی بر روی سوبسترای CMC، جذب نمونه نسبت به بلانک آنزیمی در طول موج ۵۴۰ نانومتر (اسپکتروفتومتر JASCO UV/VIS) خوانش شد. میزان سرهای آزاد حاصل از واکنش آنزیمی بر طبق منحنی استاندارد گلوکز تعیین گردید (۲۷). واحد فعالیت آنزیمی به صورت مقدار آنزیمی که بتواند یک میکرومول سر احیا کننده را در مدت زمان یک دقیقه در شرایط واکنش ایجاد - کند، تعریف شد.

تعیین فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز در حضور حلالهای آلی: برای ارزیابی فعالیت آنزیم در حضور حلالهای آلی، درصدهای مختلفی (حجمی به حجمی از صفر تا ۲۵ درصد) از حلالهای آلی n–پروپانول، DMF و DMSO در بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH=۷ تهیه و تعیین فعالیت آنزیم در حضور هر یک از این حلالها انجام پذیرفت. حلالهای مذکور به ترتیب افزایش Log P و قابل امتزاج بودن با آب انتخاب شدند (۵ و ۸). درصد فعالیت باقیمانده آنزیم با در نظر گرفتن فعالیت آنزیم در محیط واکنش بدون حلال به عنوان کنترل (فعالیت ۱۰۰ درصد)، محاسبه گردید.

بررسی پایداری آنزیم اندوگلوکاناز در مقابل حلالها: برای بررسی پایداری حرارتی آنزیم در مقابل حلالهای آلی، غلظت ۱۰ درصد از حلالهای آلی n–پروپانول، DMF و DMSO در بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH=۷ تهیه گردید. پایداری آنزیم در غلظتهای بالاتر از ۱۰ درصد حلال هم مورد بررسی قرار گرفت ولی به علت افت ناگهانی پایداری آنزیم در غلظتهای بالاتر از ۱۰ درصد (نتایج نشان داده نشده است) همان غلظت ۱۰ دصد انتخاب گردید. سپس ۵۰ میکرولیتر آنزیم به میکروتیوبهای حاوی ۱۰۰ میکرولیتر از هر یک از حلالهای آلی منتقل گردید و میکروتیوبها به مدت ۰، ۵، ۱۰، ۱۵ ،۲۰ و ۲۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد انکوبه شدند و بعد از گذشت ۳۰ دقیقه از قرارگیری آخرین میکروتیوب بر روی یخ، فعالیت آنزیمی مانند مراحل قبل اندازه‌گیری گردید. قابل ذکر است که میکروتیوب حاوی آنزیم AaCel9A بدون حلال آلی در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد و زمانهای انکوباسیون ذکر شده به عنوان نمونه کنترل در نظر گرفته شد.

بررسی پایداری آنزیم اندوگلوکاناز در حضور غلظتهای مختلف ساکارز: ابتدا غلظتهای ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ درصد از ساکارز در بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH=۷ تهیه گردید. مقدار ۵۰ میکرولیتر از این غلظتها به میکروتیوبهای حاوی ۵۰ میکرولیتر آنزیم اضافه شد به طوری که غلظت نهایی ساکارز در این میکروتیوبها به ترتیب ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ درصد گردید. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد انکوبه و سپس به مدت ۳۰ دقیقه برای بازسازی ساختار بر روی یخ منتقل شدند. بعد از گذشت ۳۰ دقیقه نمونه‌ها در مجاورت سوبسترا قرار گرفتند و فعالیت آنزیمی مانند مراحل قبل اندازه‌گیری گردید.

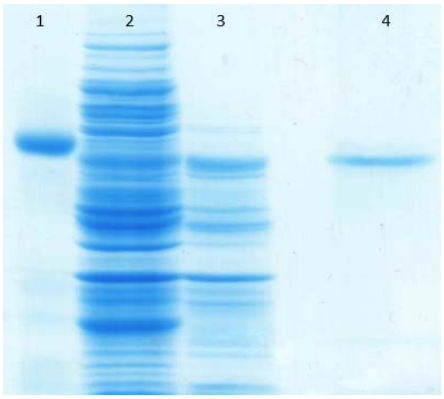
Archive of SID

www.SID.ir

بررسی پایداری آنزیم اندوگلوکاناز در مقابل حلالها با حضور ساکارز ۲۰ درصد: برای ارزیابی پایداری آنزیم به وسیله ساکارز، مقدار ۷۵ میکرولیتر از آنزیم به میکروتیوب حاوی ۷۵ میکرولیتر محلول حاوی حلالها و ساکارز اضافه شد به طوری که درصد نهایی حلال و ساکارز به ترتیب ۱۰ درصد و ۲۰ درصد شد. نمونه‌ها به مدت ۰، ۵، ۱۰، ۱۵و ۲۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد قرارگرفتند. سپس میکروتیوبها به مدت ۳۰ دقیقه در یخ گذاشته شده و فعالیت باقیمانده آنزیمی مانند مراحل قبل اندازه‌گیری گردید. زمان صفر دقیقه انکوباسیون به عنوان فعالیت ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد. نتایج فعالیت آنزیم در حضور حلالهای آلی با نتایج فعالیت آنزیم در حضور حلالهای آلی و ساکارز مقایسه شد.

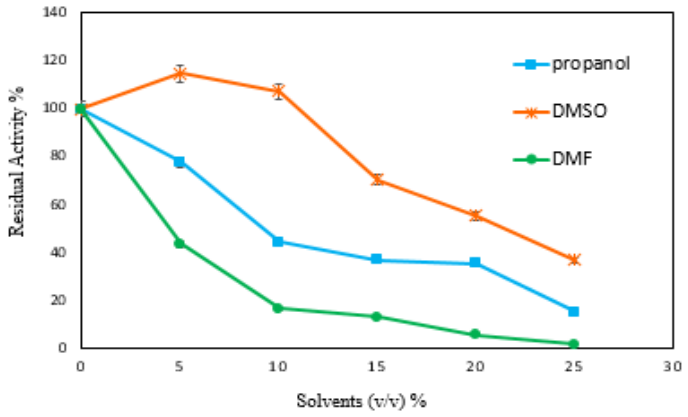
نتایج

بیان و تخلیص آنزیم اندوگلوکاناز AaCel9A: آنزیم اندوگلوکاناز با شرایط ذکر شده در قسمت قبل تولید و تخلیص گردید. نتایج نشان داد که وزن مولکولی آنزیم اندوگلوکاناز تولید شده حدود ۵۹ کیلودالتون می‌باشد (شکل۲).



شکل ۲- ژل SDS-PAGE. چاهک ۱ مربوط به پروتئین آلبومین سرم گاوی (BSA) به عنوان مارکر پروتئینی با وزن مولکولی ۶۶ کیلودالتون، چاهک ۲ مربوط به محصول سونیکاسیون، چاهک ۳ مربوط به محصول تخلیص با شوک حرارتی (تخلیص نسبی)، چاهک ۴ مربوط به محصول تخلیص با ستون Ni-NTA. همان طور که در شکل مشاهده می‌شود آنزیم اندوگلوکاناز AaCel9A با وزن مولکولی تقریباً ۵۹ کیلودالتون تولید و تخلیص شده است.

فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز در حضور حلالهای آلی: نتایج مربوط به فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز AaCel9A در حضور حلالهای آلی در شکل ۳ آمده است.



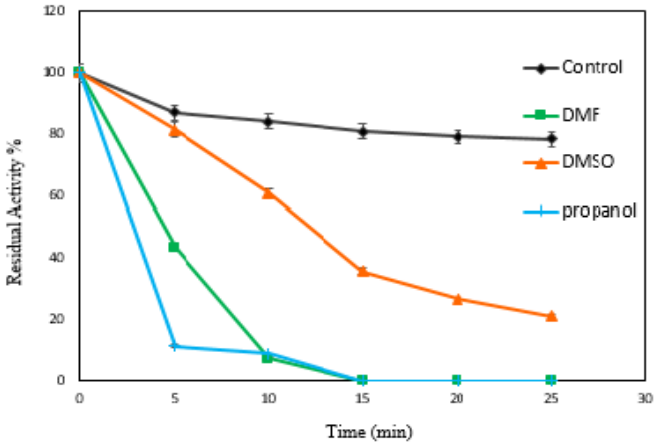
شکل۳- فعالیت اندوگلوکاناز AaCel9A در حضور حلالهای DMSO، DMF و پروپانول

چنانچه در شکل مشاهده می‌شود در غلظتهای ۵ و ۱۰ درصد از حلال DMSO فعالیت آنزیم افزایش یافته و در غلظتهای بالاتر فعالیت آن کاهش یافته است. DMF و n-پروپانول از همان غلظتهای پایین باعث کاهش فعالیت آنزیم شدند که این کاهش در مورد حلال DMF بیشتر بود.

Archive of SID

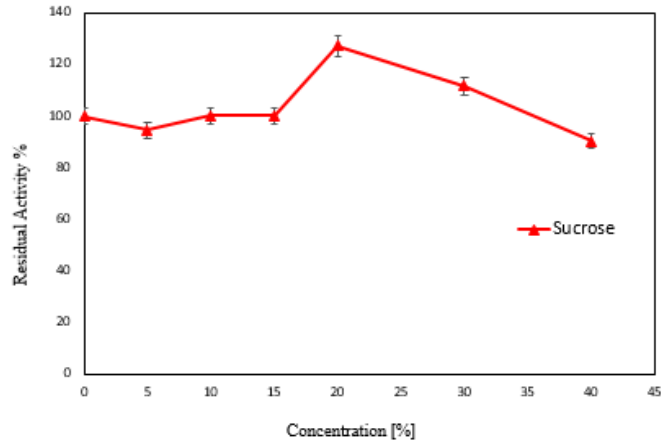
www.SID.ir

پایداری آنزیم اندوگلوکاناز در مقابل حلالهای آلی: شکل ۴ پایداری آنزیم اندوگلوکاناز AaCel9A در حضور حلالهای DMSO، DMF و n–پروپانول را نشان می‌دهد. همان طور که در شکل مشاهده می‌شود پایداری آنزیم در حضور حلالهای آلی کاهش یافته است. از بین حلالهای مورد استفاده، n–پروپانول بیشترین و DMSO کمترین تأثیر را بر روی کاهش پایداری آنزیم مورد نظر داشته‌اند.



شکل ۴- پایداری آنزیم اندوگلوکاناز AaCel9A در حضور حلالهای DMSO، DMF و n–پروپانول. (نمونه کنترل مربوط به واکنش آنزیمی بدون حلال می‌باشد)

پایداری آنزیم اندوگلوکاناز در حضور غلظتهای مختلف ساکارز: همان طوری که در شکل ۵ مشاهده می‌شود آنزیم مورد نظر بهترین پایداری خود را در غلظت ۲۰ درصد ساکارز نشان داد. با توجه به نتایج شکل ۵، غلظت ۲۰ درصد ساکارز برای پایدارسازی آنزیم اندوگلوکاناز AaCel9A مورد استفاده قرار گرفت.



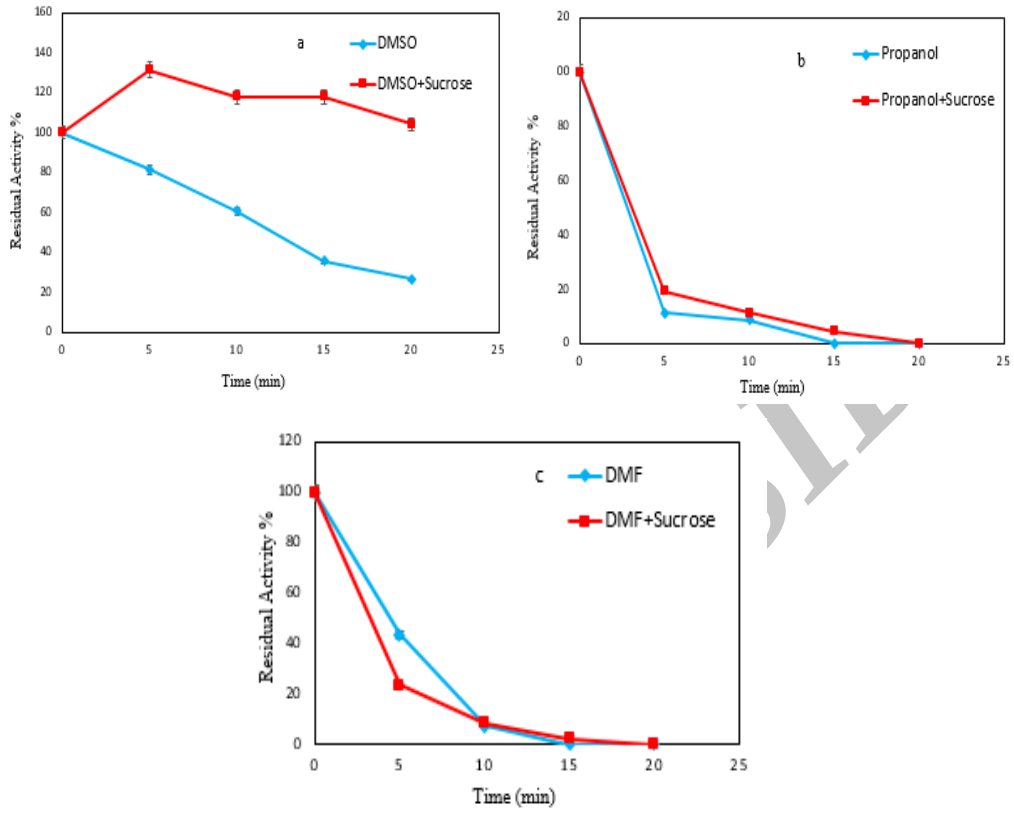
شکل ۵- پایداری آنزیم در غلظتهای مختلف ساکارز

پایداری آنزیم اندوگلوکاناز در مقابل حلالها با حضور ساکارز ۲۰ درصد: برای بررسی اثر ساکارز بر روی پایداری آنزیم اندوگلوکاناز AaCel9A، تأثیر آن بر روی پایداری آنزیم در حضور حلالهای مختلف مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که ساکارز در حضور حلال DMSO باعث پایداری آنزیم اندوگلوکاناز AaCel9A

Archive of SID

www.SID.ir

گردید. در حضور حلال n-پروپانول ساکارز تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر روی پایداری آنزیم نداشت و در مورد حلال DMF تقریباً هیچ تأثیری مشاهده نگردید (شکل ۶).



شکل ۶- پایداری آنزیم اندوگلوکاناز AaCel9A در مقابل حلالها با حضور ساکارز ۲۰ درصد. (منحنی a: پایداری آنزیم در مقابل حلال DMSO، منحنی b: پایداری آنزیم در مقابل حلال پروپانول، منحنی c: پایداری آنزیم در مقابل حلال DMF)

بحث

اغلب فرآیندهای آنزیمی در صنعت در دماهای بسیار بالا صورت می‌گیرند و در این رابطه آنزیمهای ترموفیل از اهمیت ویژه ای برخوردار می‌باشند. با توجه به کاربرد گسترده آنزیمهای ترموفیل نظیر اندوگلوکاناز AaCel9A و آنزیمهایی نظیر پلی گالاکتوروناز در صنایع، بررسی پایداری این آنزیمها امری ضروری به نظر می‌رسد (۱). آنزیمها معمولاً در حلالهای آلی فعالیت و پایداری خود را از دست می‌دهند. پروتئینها در محلولهای آبی به وسیله یک پوسته هیدراته احاطه می‌شوند، در حضور حلالهای آلی، مولکولهای حلال تمایل دارند جایگزین مولکولهای آب موجود در سطح پروتئین شوند که نتیجه‌اش تغییر فعالیت و ساختار پروتئین خواهد بود که اکثراً منجر به واسرشته شدن پروتئین نیز می‌گردد (۱۸ و ۳۲). فعالیت آنزیمها در حلالهای آلی بنا به دلایلی همچون مهار، سخت شدگی و تخریب ساختار پروتئین کاهش می‌یابد. در این مطالعه نیز فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز در حضور حلالهای آلی کاهش یافته است. استثنای این امر غلظتهای پایین DMSO می‌باشد چرا که در غلظتهای پایین DMSO فعالیت آنزیم به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافته است. این افزایش فعالیت دلایل مختلفی می‌تواند داشته باشد. شان و هرسلیگ در سال ۱۹۹۹ نشان دادند که حضور غلظتهای پایین DMSO منجر به قوی‌تر شدن پیوندهای هیدروژنی بین آنزیم تریوز فسفات ایزومراز و سوبسترا می‌شود به

Archive of SID

www.SID.ir

طوری که بار در طی تبدیل حالت پایه به حالت انتقال بازآرایی می‌شود و منجر به افزایش سرعت واکنش نسبت به آنزیم بدون حلال می‌گردد، اما در غلظتهای بالاتر با توجه به رقابت مولکولهای حلال با مولکولهای سوبسترا در جایگاه فعال آنزیم مهار شروع می‌گردد (۲۹). در این مطالعه نیز فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز در حضور غلظتهای پایین DMSO افزایش یافته است. احتمالاً آبپوشی ترجیحی و یا اتصال غیرترجیحی DMSO در غلظتهای پایین این حلال باعث می‌شود که ساختار آنزیم در حالت طبیعی حفظ شود. با افزایش غلظت DMSO، آبپوشی ترجیحی جای خود را به اتصال ترجیحی DMSO می‌دهد. اتصال ترجیحی DMSO با تغییرات ساختاری و دناتوره شدن آنزیم در ارتباط است (۴). در مطالعه حاضر نیز با افزایش غلظت DMSO فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز کاهش یافته است به طوری که در حضور غلظت ۲۵ درصد از حلال DMSO، آنزیم توانسته است تنها ۴۰ درصد از فعالیت کاتالیزی خود را حفظ نماید (شکل۳). در مورد حلال n–پروپانول از همان غلظتهای پایین کاهش فعالیت آنزیم مشاهده شده که این کاهش احتمالاً بیشتر به دلیل تخریب ساختاری بوده چرا که حلالهای هیدروفیلیک تمایل بیشتری به جدا کردن آب ضروری اطراف پروتئین دارند. از آنجایی که بیش از ۶۰ درصد فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز در حضور غلظت ۵ درصد DMF از بین رفته است (شکل ۳) می‌توان این کاهش فعالیت را به مهار آنزیم ربط داد (۱۸ و ۲۵). در مطالعه‌ای مشابه نیز که توسط صدر ممتاز و همکاران انجام شده بود فعالیت آنزیم ترمولیزین در حضور غلظتهای (v/v) ۵۰-۰ درصد حلالهای آلی دی متیل - فرمامید، اتانول، متانول و ایزوپروپانول کاهش یافته بود (۲). در مورد پایداری نیز آنزیم اندوگلوکاناز در مقابل حلال DMSO نسبت به بقیه حلالها پایداری بیشتری از خود نشان داد به طوری که آنزیم در حضور حلال ۱۰ درصد در مدت زمان ۱۰ دقیقه توانست بیش از ۶۰ درصد از فعالیت خود را حفظ نماید در حالی که این میزان در مورد حلالهای DMF و n–پروپانول به کمتر از ۱۰ درصد رسید (شکل ۴). ژربرگ و همکاران نشان دادند که در غلظتهای پایین DMSO به علت کاهش بار سطحی آنزیم، فشردگی ساختار نسبتاً زیاد شده و این مساله باعث پایداری آنزیم در مقابل حلال DMSO نسبت به بقیه حلالها می‌گردد (۳۵). در این مطالعه از افزودنی ساکارز جهت پایدارسازی آنزیم اندوگلوکاناز در مقابل حلالها استفاده گردید. پایداری آنزیمها معمولاً با افزایش Log P حلالها کاهش می‌یابد. با افزایش میزان Log P، آبگریزی حلال و نیز میل به باز شدن ساختار پروتئین نیز افزایش می‌یابد. ساکارز با افزایش کشش سطحی و دور شدن از سطح پروتئین باعث پایدارسازی آنزیم می‌گردد (۳، ۲۰، ۲۴ و ۳۳). بر اساس نتایج، افزودن ساکارز تأثیر قابل قبولی بر پایداری آنزیم در حضور حلالهای n–پروپانول و DMF نداشت که این امر احتمالاً به عدم مؤثر بودن افزایش کشش سطحی توسط ساکارز در حلالهای مذکور مربوط می‌باشد (۱۰). تأثیر ساکارز بر پایداری آنزیم در حضور حلال DMSO قابل ملاحظه بود (شکل ۶a). در حضور ساکارز به دلیل افزایش کشش سطحی و افزایش تعداد پیوندهای هیدروژنی بین مولکولهای آب اطراف پروتئین اتصالات آنها به یکدیگر زیاد شده و بنابراین توانایی حلالها خصوصاً حلال DMSO در جدا کردن آب ضروری از اطراف پروتئین کاهش می‌یابد و این امر می‌تواند دلیل اصلی پایدار شدن آنزیم توسط ساکارز در حضور حلال DMSO باشد اما در مورد حلال DMF تقریباً هیچ تأثیری مشاهده نگردید. پروپانول مورد استفاده در این تحقیق الکل بوده و قطبیت کمتری دارد و از طریق میانکنش با پاکتهای آبگریز سطحی موجود در آنزیم باعث کاهش پایداری آنزیم می‌شود (۶ و ۱۶). در حضور این حلال ساکارز تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر روی پایداری آنزیم نداشت. با توجه به مکانیسم متفاوت تخریب ساختار پروتئین در حضور این حلال نسبت به حلالهای قطبی اثر پایدارسازی ساکارز در حضور n–پروپانول کمتر می‌باشد. با توجه به نتایج، حلال

Archive of SID

www.SID.ir

DMSO حلال مناسبی برای مصارف صنعتی سلولازها می‌باشد، چرا که در حضور این حلال فعالیت و پایداری آنزیم به میزان کمی دستخوش تغییر می‌شود همچنین در صورت نیاز می‌توان از افزودنی ساکارز برای پایداری آنزیم در شرایط فیزیکوشیمیایی سخت بهره برد.

منابع

۱- فهیمی بایرامی، ا.، فرخی، ن.، امین زاده، س. ۱۳۹۵. استخراج و پایداری و پارامترهای ترمودینامیکی یکی از پلی گالاکتورونازهای قارچ *Macrophomiona phaseolina*. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران). جلد ۲۹، ص ۲۴۳-۲۳۴.

۲- صدر ممتاز، ا.، اصغری، م. ۱۳۹۴. مطالعات مقایسه‌ای مقاومت پروتئاز حاصل از *سودوموناس آئروجینوزا* در مقایسه با ترمولیزین حاصل از *باسیلوس ترموپروتئولیتیکوس* در حلالهای آلی. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران). جلد ۲۸، ص ۵۶۰-۵۶۷.

3- Arakawa, T., & Timasheff, S. N. (1982). Stabilization of protein structure by sugars. Biochemistry, 21(25), 6536-6544.

4- Arakawa, T., Kita, Y., & Timasheff, S. N. (2007). Protein precipitation and denaturation by dimethyl sulfoxide. Biophysical chemistry, 131(1), 62-70.

5- Asghari, S. M., Khajeh, K., Dalfard, A. B., Pazhang, M., & Karbalaei-Heidari, H. R. (2011). Temperature, organic solvent and pH stabilization of the neutral protease from Salinovibrio proteolyticus: significance of the structural calcium. BMB reports, 44(10), 665-668.

6- Avdulov, N. A., Chochina, S. V., Daragan, V. A., Schroeder, F., Mayo, K. H., & Wood, W. G. (1996). Direct binding of ethanol to bovine serum albumin: a fluorescent and 13C NMR multiplet relaxation study. Biochemistry, 35(1), 340-347.

7- Back, J. F., Oakenfull, D., & Smith, M. B. (1979). Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols. Biochemistry, 18(23), 5191-5196.

8- Badoei-Dalfard, A., Khajeh, K., Asghari, S. M., Ranjbar, B., & Karbalaei-Heidari, H. R. (2010). Enhanced activity and stability in the presence of organic solvents by increased active site polarity and stabilization of a surface loop in a metalloprotease. Journal of biochemistry, 148(2), 231-238.

9- 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), 147-153.

10- Cioni, P., Bramanti, E., & Strambini, G. B. (2005). Effects of sucrose on the internal dynamics of azurin. Biophysical journal, 88(6), 4213-4222.

11- Davis, B. G., & Boyer, V. (2001). Biocatalysis and enzymes in organic synthesis. Natural Product Reports, 18(6), 618-640.

12- Eckert, K., Zielinski, F., Leggio, L. L., & Schneider, E. (2002). Gene cloning, sequencing, and characterization of a family 9 endoglucanase (CelA) with an unusual pattern of activity from the thermoacidophile *Alicyclobacillus acidocaldarius* ATCC27009. Applied microbiology and biotechnology, 60(4), 428-436.

13- Eckert, K., Vigouroux, A., Leggio, L. L., & Moréra, S. (2009). Crystal structures of *Aacidocaldarius* endoglucanase Cel9A in complex with cello-oligosaccharides: strong− 1 and− 2 subsites mimic cellobiohydrolase activity. Journal of molecular biology, 394(1), 61-70.

14- Fogarty, W. M., & Kelly, C. T. (Eds.). (2012). Microbial enzymes and biotechnology. Springer Science & Business Media.

15- Griebenow, K., & Klibanov, A. M. (1996). On protein denaturation in aqueous-organic mixtures but not in pure organic solvents.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از حمایت‌های مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه شهید مدنی آذربایجان نهایت تشکر و قدردانی را دارند.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of the American Chemical Society, 118(47), 11695-11700.

16- Herskovits, T. T., Gadegbeku, B., & Jaillet, H. (1970). On the structural stability and solvent denaturation of proteins I. Denaturation by the alcohols and glycols. Journal of Biological Chemistry, 245(10), 2588-2598.

17- Khajeh, K., Ranjbar, B., Naderi-Manesh, H., Habibi, A. E., & Nemat-Gorgani, M. (2001). Chemical modification of bacterial α-amylases: changes in tertiary structures and the effect of additional calcium. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, 1548(2), 229-237.

18- Klibanov, A. M. (1997). Why are enzymes less active in organic solvents than in water? Trends in biotechnology, 15(3), 97-101.

19- Klibanov, A. M. (2001). Improving enzymes by using them in organic solvents. Nature, 409(6817), 241-246.

20- Kumar, V., Chari, R., Sharma, V. K., & Kalonia, D. S. (2011). Modulation of the thermodynamic stability of proteins by polyols: significance of polyol hydrophobicity and impact on the chemical potential of water. International journal of pharmaceutics, 413(1), 19-28.

21- Lee, J. C., & Timasheff, S. N. (1981). The stabilization of proteins by sucrose. Journal of Biological Chemistry, 256(14), 7193-7201.

22- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical chemistry, 31(3), 426-428.

23- Miroliaei, M., & Nemat-Gorgani, M. (2002). Effect of organic solvents on stability and activity of two related alcohol dehydrogenases: a comparative study. The international journal of biochemistry & cell biology, 34(2), 169-175.

24- Ohtake, S., Kita, Y., & Arakawa, T. (2011). Interactions of formulation excipients with proteins in solution and in the dried state. Advanced drug delivery reviews, 63(13), 1053-1073.

25- Pazhang, M., Khajeh, K., Ranjbar, B., & Hosseinkhani, S. (2006). Effects of water-miscible solvents and polyhydroxy compounds on the structure and enzymatic activity of thermolysin. Journal of biotechnology, 127(1), 45-53.

26- Pazhang, M., Mehrnejad, F., Pazhang, Y., Falahati, H., & Chaparzadeh, N. (2015). Effect of sorbitol and glycerol on the stability of trypsin and difference between their stabilization effects in the various solvents. Biotechnology and applied biochemistry.

27- Rahimizadeh, P., Najavand, S., & Pazhang, M. (2015). A comparative Study of Activity and Stability of the Free and the Immobilized Endoglucanase from *Alicyclobacillus Acidocaldarius*. Biomacromolecular Journal, 1(2), 167-176.

28- Rodakiewicz-Nowak, J., Kasture, S. M., Dudek, B., & Haber, J. (2000). Effect of various water-miscible solvents on enzymatic activity of fungal laccases. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 11(1), 1-11.

29- Shan, S. O., & Herschlag, D. (1996). The change in hydrogen bond strength accompanying charge rearrangement: Implications for enzymatic catalysis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 93(25), 14474-14479.

30- Simon, L. M., László, K., Vértesi, A., Bagi, K., & Szajáni, B. (1998). Stability of hydrolytic enzymes in water-organic solvent systems. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 4(1), 41-45.

31- Simon, L. M., Kotorman, M., Garab, G., & Laczko, I. (2001). Structure and activity of α-chymotrypsin and trypsin in aqueous organic media. Biochemical and biophysical research communications, 280(5), 1367-1371.

32- Simon, L. M., 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.

33- Street, T. O., Bolen, D. W., & Rose, G. D. (2006). A molecular mechanism for osmolyte-induced protein stability. Proceedings of the National Academy of Sciences, 103(38), 13997-14002.

34- Sukumaran, R. K., Singhania, R. R., & Pandey, A. (2005). Microbial cellulases-production, applications and challenges. Journal of Scientific and Industrial Research, 64(11), 832.

35- Tjernberg, A., Markova, N., Griffiths, W. J., & Hallén, D. (2006). DMSO-related effects in protein characterization. Journal of biomolecular screening, 11(2), 131-137.

Archive of SID

www.SID.ir

36- Villalonga, R., Fernández, M., Fragoso, A., Cao, R., Mariniello, L., & Porta, R. (2003). Thermal stabilization of trypsin by enzymic modification with β-cyclodextrin derivatives. Biotechnology and applied biochemistry, 38(1), 53-59.

Archive of SID

The effect of organic solvents on the activity and stability of the endoglucanase and stabilization with sucrose

Mohammadi M.[1], Najavand S. [1], Pazhang M.[1] and Amani ghadim A.R.[2]

[1]Biology Dept., Faculty of Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, I.R. Iran.

[2]Chemistry Dept., Faculty of Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, I.R. Iran.

Abstract

The use of enzymes in organic solvents is the important for industrial and pharmaceutical industries. Reduced activity of enzymes in the presence of organic solvent could be due to the rigidity of the protein structure, denaturation and inhibition. Usually, the stability of enzymes in organic solvents decreases. To fix the problem, protein stabilization methods such as additives, protein engineering and chemical changes used. In this study, endoglucanase enzyme was produced, then the activity and stability of the enzyme in the different percentages of organic solvents, n-Propanol, Dimethylformamide (DMF) and dimethyl sulfoxide (DMSO) were studied. Finally, sucrose as additive was used for the stabilization of enzyme. The results showed that the solvent DMSO in concentrations of %5 and %10 increased the enzyme activity. The enzyme activity was reduced at higher concentrations of this solvent. Other solvents reduced the activity of enzyme from the low concentrations, among which DMF had the most effect on the reduction of enzyme activity. Stability of the enzyme by sucrose in the presence of the solvent DMSO was more in comparison with other solvents. Added sucrose had no effect on the stability of the enzyme in the presence of solvents n-propanol and DMF.

Key words: endoglucanase enzyme, organic solvents, stability, additive, sucrose

www.SID.ir