زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس
دوره 8، شماره 1، بهار و تابستان 1396

اثر آلومینیوم بر روی پایداری ساختمانی پپسین در حضور و غیاب حلال‌های آلی

کلثوم شهدادنژاد[1]، بهزاد شارقی[2*]
1- کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشگاه شهرکرد
2- دانشیار، دانشگاه شهرکرد

*** شهرکرد، صندوق پستی 115**
share.beh@sci.sku.ac.ir
(دریافت مقاله: 94/9/10 پذیرش مقاله: 96/3/9)

چکیده- آسپارتیک پروتئازها (EC(3.4.23.X پیوندهای پپتیدی را هیدرولیز می‌کنند، واکنشی که برای بسیاری از فرایندهای زیستی اساسی است. آسپارتیک پروتئازها در بیش‌تر قارچ‌ها و همه مهره‌داران به صورت زیموژن سنتز می‌شوند. پپسین خوک (EC(3.4.23.1، متعلق به خانواده آسپارتیک پروتئازها است. پپسین یک پروتئاز معدی و یکی از سه آنزیم‌های اصلی هضم پروتئین در سیستم هضمی است. آنزیم پپسین به عنوان یک آنزیم صنعتی در صنایع غذایی است. در این مطالعه اثر غلظت‌های مختلف **آلومینیوم** در حضور و غیاب حلال‌های آلی (بوتانول، اتانول، 1،4-بوتان‌دیول وگلیسرول) بر روی پایداری دمایی پپسین بررسی شد. نتایج حاصل از این مطالعه نمایانگر افزایش پایداری دمایی پپسین در حضور **آلومینیوم** و کاهش آن در حضور حلال‌های آلی (بوتانول، اتانول، 1،4-بوتان‌دیول) می‌باشد، و پایداری دمایی پپسین در حضور گلیسرول نیز ثابت ماند. پایداری دمایی آنزیم پپسین در حضور حلال‌های آلی بوتانول،اتانول، 1،4 -بوتان‌دیول و گلیسرول با افزودن **آلومینیوم** نسبت به غیاب آن زیاد شد. یون‌های **آلومینیوم** از طریق برهم‌کنش‌های الکتروستاتیک و داتیو با گروه‌های کربوکسیلات اسیدهای آمینه آسپارتیک اسید و گلوتامیک اسید به ساختار پپسین متصل و سبب متراکم شدن ساختار آنزیم شده که منجر به افزایش پایداری دمایی پپسین شده است. علت افزایش پایداری دمایی پپسین در حضور **آلومینیوم** ناشناخته است. با استفاده از **آلومینیوم** می‌توان اثر ناپایدارکنندگی حلال‌های آلی را بر روی پپسین کاهش داد.

کلیدواژگان: پپسین، پایداری حرارتی، **آلومینیوم**، حلال‌های آلی.

1- مقدمه

پروتئازها (پروتئینازها،پپتیدازها یا آنزیم‌های پروتئولیتیک) آنزیم‌هایی هستند که پیوندهای پپتیدی بین آمینواسیدها را می‌شکنند، این فرایند هیدرولیز پروتئولیتیک نام دارد. پروتئازها یکی از مهم‌ترین گروه‌های آنزیم‌های صنعتی می‌باشند و **60**% از کل فروش آنزیم در سراسر جهان را

تشکیل می‌دهند [1]. آنزیم‌های پروتئولیتیک بر اساس فعالیت‌های کاتالیتیکی آن‌ها دسته‌بندی می‌شوند. سرین پروتئازها از سرین، آسپارتیک پروتئازها از آسپارتات، یا متالوپروتئازها از یون‌های فلزی برای انجام عمل کاتالیتیکی خود استفاده می‌کنند [2]. آسپارتیک پروتئازها در دسته A در بانک داده‌های MEROPS طبقه بندی شده‌اند، که دسته بندی پپتیدازها و مهارکننده‌های آن‌ها بر مبنای شباهت‌های ساختار سوم و اول است [3]. 14 خانواده از آسپارتیک‌پروتئازها وجود دارد، که به طور گسترده در مهره‌داران، قارچ‌ها، گیاهان، پروتوزوآ و ویروس‌ها وجود دارند [5،4].

پپتیدازهای آسپارتیک EC(3.4.23.X) پیوندهای پپتیدی را هیدرولیز می‌کنند، واکنشی که برای بسیاری از فرایندهای زیستی اساسی است [6]. علت نامگذاری آن‌ها، وجود دو باقیمانده آسپارتات اساسی است که از نظر کاتالیتیکی مهم هستند. قبلاً به این گروه، اسیدپروتئاز اطلاق می‌شد و علت هم این بود که بیشتر آن‌ها در pH پایین فعال هستند [7]. آسپارتیک‌پروتئازها در خصوصیات کاتالیتیکی، محل سلولی، عملکرد بیولوژیکی با هم تفاوت دارند [8].

آنزیم پپسین خوکA[1] EC(3.4.23.1)، متعلق به آسپارتیک‌پروتئازها است [9]. پپسین در pH خنثی به صورت زیموژن غیرفعال پپسینوژن تا می‌خورد [10]. همانند دیگر زیموژن‌های آسپارتیک معده، فعال شدن پپسینوژن در مقادیر pH بین 1 و 4 اتفاق می‌افتد. در pH اسیدی پل‌نمکی که موقعیت PS ناحیه *N*-ترمینال را در جایگاه‌فعال پپسین پایدار می‌کند تخریب می‌شود و PS رها می‌شود، به این طریق تشکیلات کاتالیتیکی و جایگاه اتصال سوبسترا در معرض قرار می‌گیرد [6]. 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 [11]. آنزیم‌های آسپارتیک-پروتئاز، از مهم‌ترین گروه‌های آنزیمی هستند که 60% از فروش آنزیم‌های صنعتی مربوط به آن‌ها می‌باشد. از جمله کاربردهای صنعتی این آنزیم‌ها عبارتند از صنایع لبنی، تهیه نان، بیسکویت و ویفر، موزدائی چرم، بازیافت روغن‌های پوسته مرکبات، هیدرولیز پروتئین‌های مختلف، خردکردن گوشت و رهاسازی رنگ در تهیه آب میوه‌ها و همچنین تولید دترجنت [12]. آسپارتیک پروتئازها همچنین در داروشناسی برای درمان شرایط پاتولوژی و فیزیولوژی متنوع انسان قابل توجه هستند، شامل پپسین در بیماری زخم گوارشی، رنین در فشار خون بالا، پلاسمپسین‌ها در مالاریا، کاتپسین *D* در متاستاز سرطان، کاتپسین *E* در سیستم ایمنی، پپتیدازHIV در سندروم نقص ایمنی [6]. دگرگون‌سازی فرایندی است که بدون قطع و شکستن پیوندهای پپتیدی سبب تغییرات عمده در بنای فضایی پروتئین می‌شود. هدف اصلی از مطالعات دگرگون‌سازی پروتئین‌ها، به دست آوردن اطلاعات اضافی در مورد ساختمان، خواص و عملکرد پروتئین‌ها است. مطالعات غیر طبیعی کردن پروتئین‌ها در محلول‌های آبی انجام می‌شود و بنابراین در درک رفتار پروتئین‌ها تحت شرایط فیزیولوژیک مفید خواهد بود [13]. حلال‌ها بر روی خصوصیات کاتالیتیکی و پایداری آنزیم‌ها به طور قابل توجهی اثر می‌گذارند [14]. مزیت‌های زیادی برای استفاده از آنزیم‌ها در حلال‌های آلی وجود دارد از قبیل 1- جلوگیری از اتولیز (در مورد پروتئازها) 2- افزایش پایداری دمایی به دلیل کاهش تحرک ساختاری؛ در حقیقت، نشان داده شده‌است که آنزیم‌ها می‌توانند در حلال‌های آلی در دماهای بالاتر از دمایی که آنزیم‌ها در محیط‌های آبی دگرگون می‌شوند، کاتالیز انجام دهند؛ با این وجود غیرفعال شدن آنزیم‌ها در حلال‌های آلی گزارش شده‌است. 3- بعضی ترانسفورماسیون‌های زیستی آنزیمی نیاز دارند که حلال‌های آلی به منظور حل شدن

[1] Porcine pepsin

سوبسترا (قندها و مشتقات آن‌ها) به دلیل قطبیت بالای آن‌ها استفاده شوند. 4-جابجایی واکنش‌های تعادلی در جهت مطلوب همانند استفاده از هیدرولازها برای واکنش-های سنتزی. 5- کاهش خطر رشد میکروبی. 6- استفاده سوبستراهای حساس به رطوبت راحت باشد و غیره [15].
در مطالعه‌ای که سیمون و همکارانش، اثر حلال‌های آلی را بر روی ساختار و فعالیت آلفا کیموتریپسین و تریپسین بررسی کردند، نشان دادند که حلال‌های آلی اتانول و 1،4 دی اکسان و استونیتریل ساختار دوم این آنزیم‌ها را تغییر می‌دهند. مقدار km آلفا کیموتریپسین و تریپسین در غلظت‌های پایین حلال‌های آلی کاهش یافت و در غلظت‌های بالای آن‌ها زیاد شد. پایداری آلفا کیموتریپسین و تریپسین با افزایش غلظت حلال‌های آلی نیز تغییر پیدا کرد، تریپسین پایداری بیشتری نسبت به کیموتریپسن در همه حلال‌های آلی داشت [16]. در مطالعه‌ای که بر روی تریپسین تثبیت شده با **آلومینیوم** انجام داده‌اند، نشان داده شده است فعالیت سنتز پپتیدی تریپسین تثبیت شده با آلومینیم در حضور حلال‌های آلی آمیل الکل، تتراهیدروفوران و استونیتریل افزایش پیدا می‌کند، افزایش سنتز پپتیدی آنزیم به طور قوی با محتویات آبی مرتبط است، هر چه محتوای آبی حلال آلی کمتر باشد سنتز پپتیدی تریپسین تثبیت شده بیشتراست [17].
آلومینیوم به طور گسترده برای تولید دارو وافزودنی‌ها استفاده می‌شود [18].
در مطالعه‌ای که اثر یون‌های **آلومینیوم** را بر روی فعالیت تریپسین و کیموتریپسن بررسی کردند، نشان دادند یون‌های **آلومینیوم** اثر مهاری بر روی تریپسین و کیموتریپسن داشته‌اند [19].
در مطالعاتی که پاولیک[2] و همکارانش بر روی پایداری دمایی پپسین در حضور یون‌های **آلومینیوم** انجام دادند، نشان دادند که پپسین در دمای 70 درجه سانتی‌گراد و بالاتر باز می‌شود نتایج آن‌ها نشان داد که برگشت‌پذیری دمایی برای پپسین طبیعی تقریباً 35% و در حضور **آلومینیوم** تقریباً 80% می‌باشد [20].

2- مواد

در این مطالعه از آنزیم پپسین خوک (محصول شرکت سیگما) ، بافر گلایسین-اسیدکلریدریک (محصول شرکت مرک) با pH=2 در غلظت 100 میلی‌مولار، **آلومینیوم** و حلال‌های آلی (محصولات شرکت مرک) و از دستگاه اسپکتروفتومتر *UV-Vis* مدل فارماسیا-4000، برای اندازه‌گیری استفاده شده است.

3- روش‌ها

بررسی پایداری حرارتی آنزیم پپسین در غلظت‌های مختلف **آلومینیوم** در حضور و غیاب حلال‌های آلی در دامنه حرارتی303 تا 363 درجه کلوین: از بافر گلایسین-اسیدکلریدریک با pH= 2 در غلظت 100 میلی‌مولار و غلظت‌های مختلف **آلومینیوم** (0تا50 میلی‌مولار) و حلال‌های آلی بوتانول، اتانول، 1،4-بوتان‌دیول و گلیسرول (10% حجمی-حجمی) استفاده شد. منحنی‌های دگرگون سازی در غلظت‌های مختلف **آلومینیوم** در حضور و غیاب حلال‌های آلی در طول موج 280 نانومتر با استفاده از محلول‌های پپسین با غلظت 0/138 میلی گرم بر میلی لیتر به دست آمده است.
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 بصورت رابطه (1) محاسبه می‌شود:

$$F_U=(A_N-A)/(A_N-A_U) \quad (1)$$

در این رابطه، A_N، جذب در حالت طبیعی، A، جذب مشاهده شده و A_U، جذب در حالت دگرگون‌شده

[2] V.M Pavelkic

می‌باشند. K_{eq} یا ثابت تعادل از رابطه (2) بدست می‌آید:

$$K_{eq}=F_U/(1-F_U)=(A_N-A)/(A-A_U) \quad (2)$$

تغییرات انرژی آزاد گیبس نیز از رابطه (3) محاسبه می‌شود:

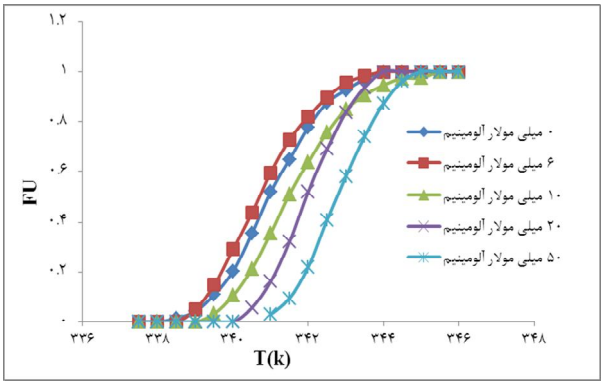
$$\Delta G°=-RTlnK_{eq}=-RTln[F_U/(1-F_U)]= -RTln[(A_N-A)/(A-A_U)] \quad (3)$$

در این رابطه، R، ثابت گازها می‌باشد و برابر با 8.314 ($JK^{-1}\ mol^{-1}$) است و T، دما بر حسب کلوین می‌باشد. T_m یا دمای ذوب یک آنزیم، دمایی است که در آن ($j.mol^{-1}$) $\Delta G°$ برابر با صفر است.

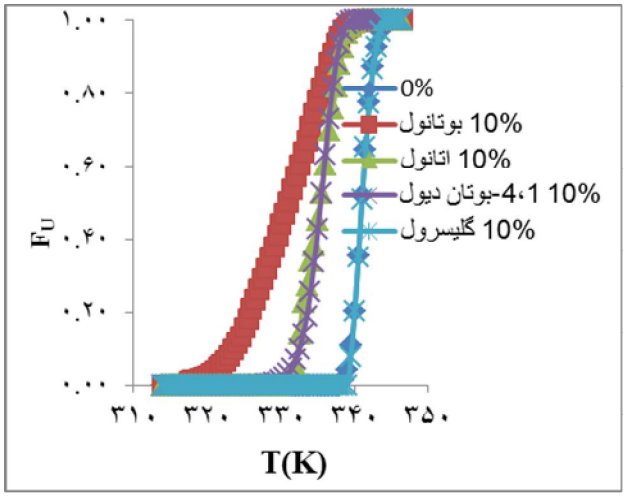
3- نتایج و بحث

دگرگون کردن پروتئین‌ها منجر به تغییراتی در خصوصیات شیمیایی فعالیت گروه‌های خاص و یا خصوصیات فیزیکی مانند تفرق چرخش نوری، طیف ماوراء بنفش و خصوصیات هیدرودینامیکی می‌شود. فرایند دگرگون‌سازی پروتئین‌ها برای مطالعه نیروهای تعیین‌کننده ساختمان سوم حائز اهمیت است. استفاده دیگر از مطالعات دگرگون-سازی مطالعه نیروهای مؤثر و نقش انواع میان‌کنش‌ها در جایگاه‌فعال آنزیم است [13].

در شکل‌های 1 و 2 به ترتیب تغییرات کسر دگرگون‌سازی علیه دما در غلظت‌های مختلف **آلومینیوم** و 10% حجمی-حجمی حلال‌های آلی بوتانول، اتانول، 1،4-بوتان‌دیول و گلیسرول در دامنه حرارتی303 تا 363 درجه کلوین در pH=2 به تصویر کشیده شده است. به طور کلی می‌توان گفت، چنان چه منحنی دگرگون سازی آنزیم به سمت راست انتقال پیدا کند، نشان دهنده این است که آنزیم در دمای بیشتری دگرگون و پایداری آن زیاد شده است و برعکس. همان‌طور که در شکل 1 دیده می‌شود، پایداری آنزیم پپسین با افزایش غلظت **آلومینیوم** زیاد شده است. در شکل 2 نیز دیده می‌شود که پایداری آنزیم پپسین در حضور حلال‌های آلی بوتانول، اتانول، 1،4-بوتان‌دیول کم و در حضور گلیسرول ثابت مانده است. پپسین در حضور بوتانول کمترین پایداری و در حضور گلیسرول بیشترین پایداری را دارد.



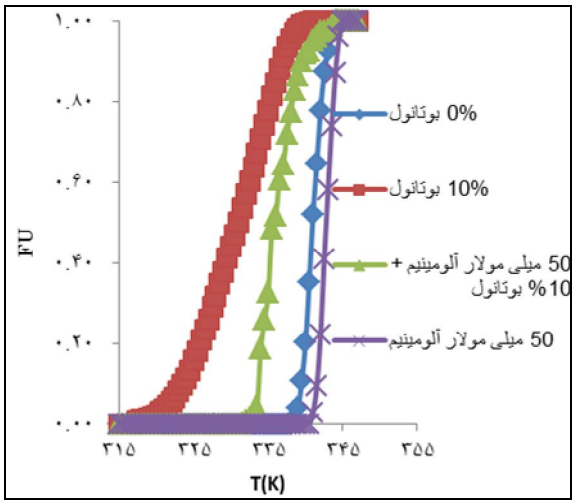
شکل 1 تغییرات F_U (کسر دگرگون‌سازی) آنزیم پپسین علیه دما در غلظت‌های مختلف آلومینیوم در pH=2 و دامنه حرارتی 303 تا 363 درجه کلوین



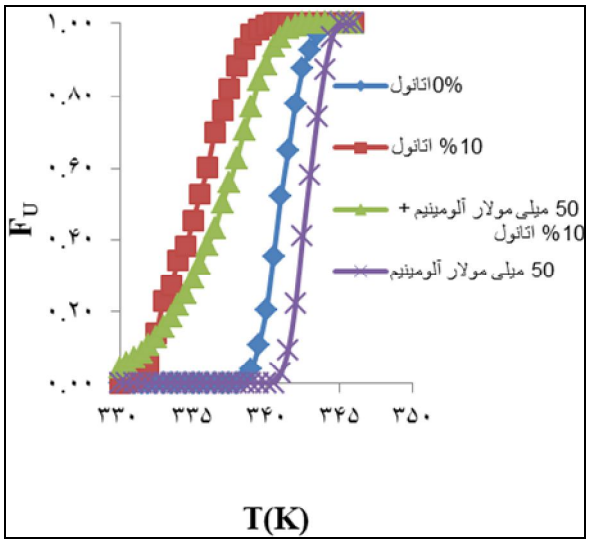
شکل 2 تغییرات F_U (کسر دگرگون‌سازی) آنزیم پپسین علیه دما در غلظت‌های 10% حجمی-حجمی حلال‌های آلی بوتانول، اتانول، 1،4 -بوتان‌دیول و گلیسرول در pH=2 و دامنه حرارتی 303 تا 363 درجه کلوین

در شکل‌های 3 تا 6 به ترتیب تغییرات کسر دگرگون-سازی علیه دما در غلظت‌های 10% حجمی-حجمی حلال‌های آلی بوتانول، اتانول، 1،4 -بوتان‌دیول و گلیسرول در حضور و غیاب **آلومینیوم** در دامنه حرارتی303 تا 363 درجه کلوین در pH=2 نشان داده

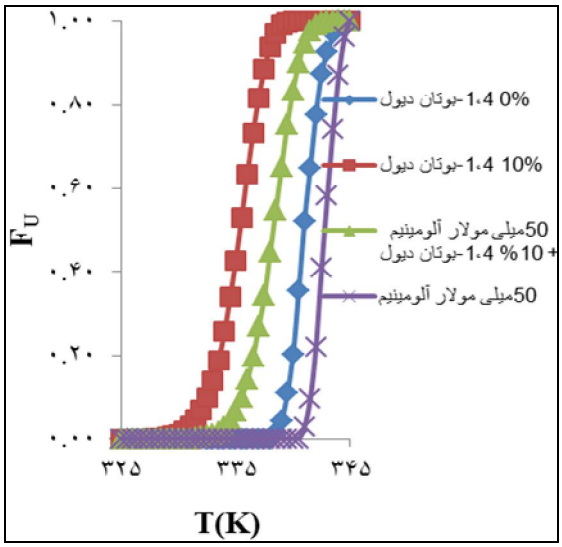
شده است. همان‌طور که دراین نمودارها دیده می‌شود، پایداری آنزیم پپسین به حلال‌های آلی بوتانول، اتانول، 1،4-بوتان‌دیول و گلیسرول در حضور **آلومینیوم** نسبت به غیاب آن زیاد شده است.



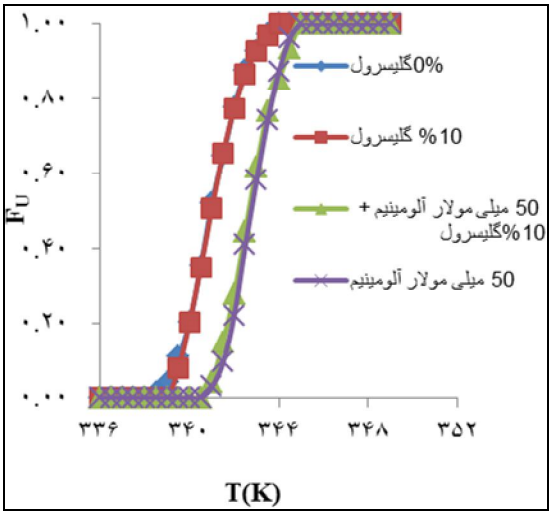
شکل 3 تغییرات F_U (کسر دگرگون‌سازی) آنزیم پپسین علیه دما در غلظت 10% حجمی-حجمی حلال آلی بوتانول در حضور و غیاب آلومینیوم در pH=2 و دامنه حرارتی 303 تا 363 درجه کلوین



شکل 4 تغییرات F_U (کسر دگرگون‌سازی) آنزیم پپسین علیه دما در غلظت 10% حجمی-حجمی حلال آلی اتانول در حضور و غیاب آلومینیوم در pH=2 و دامنه حرارتی 303 تا 363 درجه کلوین



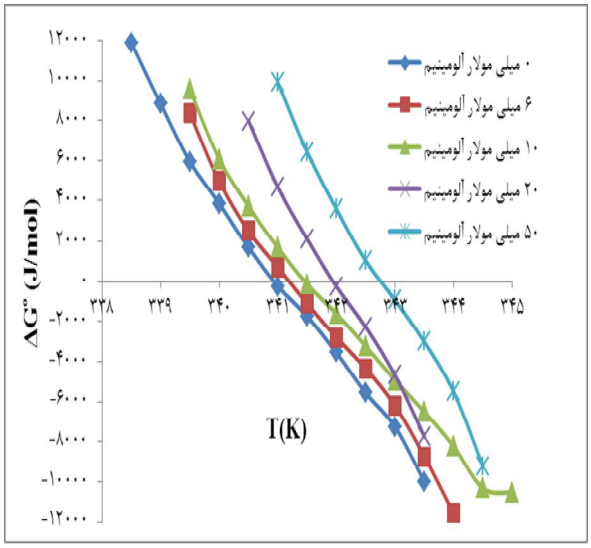
شکل 5 تغییرات F_U (کسر دگرگون‌سازی) آنزیم پپسین علیه دما در غلظت 10% حجمی-حجمی حلال آلی1،4-بوتان‌دیول در حضور و غیاب آلومینیوم در pH=2 و دامنه حرارتی 303 تا 363 درجه کلوین



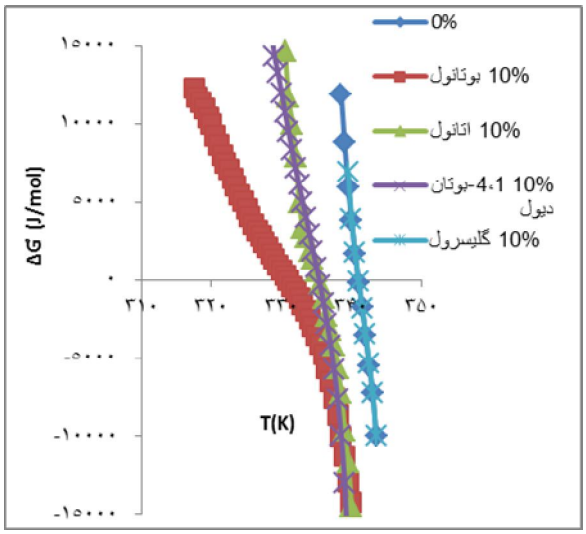
شکل 6 تغییرات F_U (کسر دگرگون‌سازی) آنزیم پپسین علیه دما در غلظت 10% حجمی-حجمی حلال آلیگلیسرول در حضور و غیاب آلومینیوم در pH=2 و دامنه حرارتی 303 تا 363 درجه کلوین

در شکل‌های 7 و 8، به ترتیب تغییرات $\Delta G°$ علیه دما در غلظت‌های مختلف **آلومینیوم** و 10% حجمی-حجمی حلال‌های آلی بوتانول، اتانول، 1،4-بوتان‌دیول و گلیسرول در pH=2 به تصویر کشیده شده است. در شکل

7 دیده می‌شود که با افزایش غلظت **آلومینیوم**، T_m آنزیم پپسین زیاد شده و در نتیجه پایداری حرارتی آن افزایش یافته است. در شکل 8 نیز دیده می‌شود، T_m آنزیم پپسین در حضور حلال‌های آلی بوتانول، اتانول، 1،4-بوتان‌دیول کم و در حضور گلیسرول ثابت مانده است.

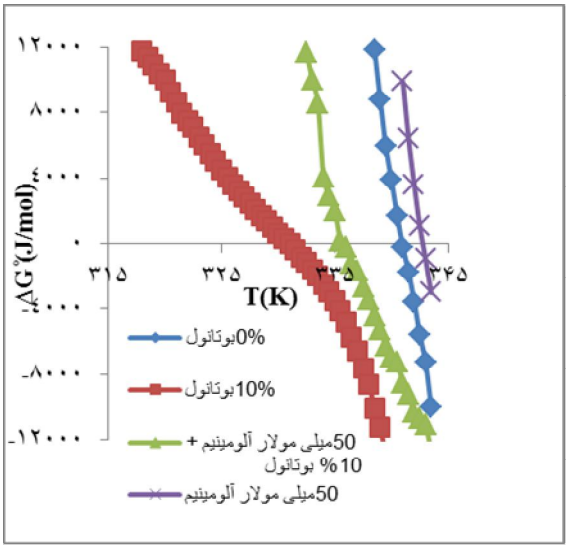


شکل 7 تغییرات $\Delta G°$ آنزیم پپسین علیه دما در غلظت‌های مختلف آلومینیوم در pH=2 و دامنه حرارتی 303 تا 363 درجه کلوین

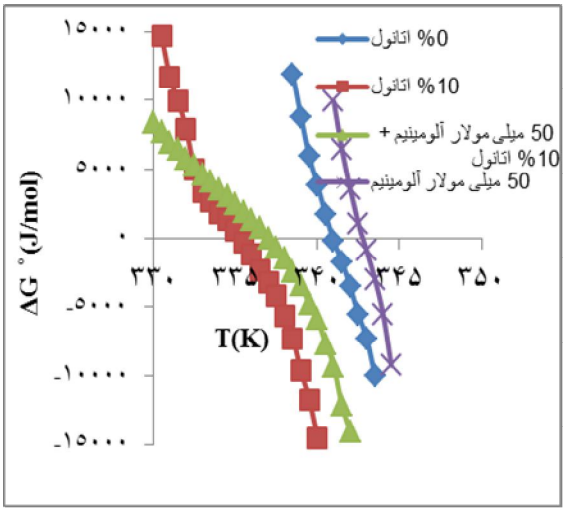


شکل 8 تغییرات $\Delta G°$ آنزیم پپسین علیه دما در غلظت‌های 10% حجمی-حجمی حلال‌های آلی بوتانول، اتانول، 1،4-بوتان‌دیول و گلیسرول در pH=2 و دامنه حرارتی 303 تا 363 درجه کلوین

در شکل‌های 9 تا 12، به ترتیب تغییرات $\Delta G°$ علیه دما در غلظت‌های 10% حجمی-حجمی حلال‌های آلی بوتانول، اتانول، 1،4-بوتان‌دیول و گلیسرول در حضور و غیاب **آلومینیوم** در pH=2 به تصویر کشیده شده است.

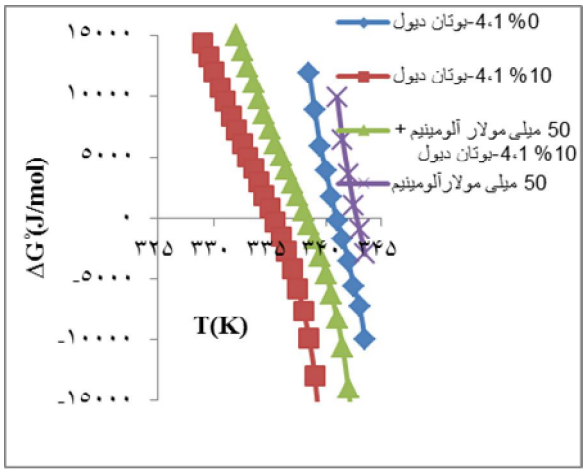


شکل 9 تغییرات $\Delta G°$ آنزیم پپسین علیه دما در غلظت 10% حجمی-حجمی حلال آلی بوتانول در حضور و غیاب آلومینیوم در pH=2 و دامنه حرارتی 303 تا 363 درجه کلوین

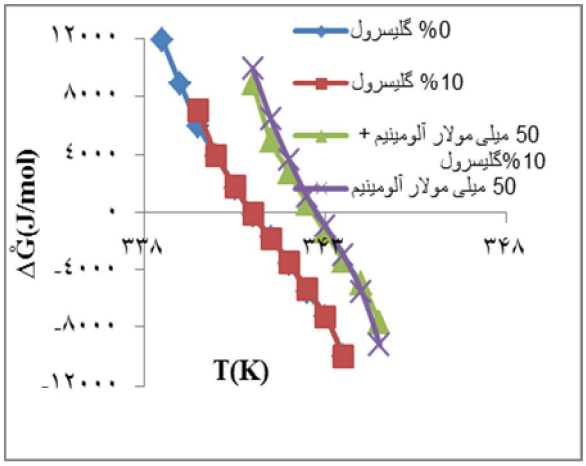


شکل 10 تغییرات $\Delta G°$ آنزیم پپسین علیه دما در غلظت 10% حجمی-حجمی حلال آلی اتانول در حضور و غیاب آلومینیوم در pH=2 و دامنه حرارتی 303 تا 363 درجه کلوین

در این نمودارها دیده می‌شود که T_m آنزیم پپسین در غلظت‌های 10% حجمی-حجمی حلال‌های آلی بوتانول، اتانول، 1،4-بوتان‌دیول و گلیسرول در حضور **آلومینیوم** نسبت به غیاب آن زیاد شده است.



شکل 11 تغییرات $\Delta G°$ آنزیم پپسین علیه دما در غلظت 10% حجمی-حجمی حلال آلی 1،4-بوتان‌دیول در حضور و غیاب آلومینیوم در pH=2 و دامنه حرارتی 303 تا 363 درجه کلوین



شکل 12 تغییرات $\Delta G°$ آنزیم پپسین علیه دما در غلظت 10% حجمی-حجمی حلال آلی گلیسرول در حضور و غیاب آلومینیوم در pH=2 و دامنه حرارتی 303 تا 363 درجه کلوین

در جداول 1 و 2 به ترتیب تغییرات T_m، در غلظت‌های مختلف **آلومینیوم**، غلظت‌های 10% حجمی-حجمی حلال‌های آلی بوتانول، اتانول، 1،4-بوتان‌دیول و گلیسرول در حضور و غیاب **آلومینیوم** نشان شده است.

جدول 1 تغییرات T_m، آنزیم پپسین در غلظت‌های مختلف آلومینیوم در pH=2 و دامنه حرارتی 303 تا 363 درجه کلوین

[Aluminium]mM	Tm(K)
0 میلی‌مولار	341
6 میلی‌مولار	341/2
10 میلی‌مولار	341/4
20 میلی‌مولار	341/9
50 میلی‌مولار	342/7

جدول 2 تغییرات T_m، آنزیم پپسین در غلظت‌های 10% حجمی-حجمی حلال‌های آلی بوتانول، اتانول، 1،4-بوتان‌دیول و گلیسرول در حضور و غیاب آلومینیوم در pH=2 و دامنه حرارتی 303 تا 363 درجه کلوین

[Alchol]%V/V	*Tm*(°K)
0%	341
%10Butanol	330/8
%10Butanol+50mM Al3+	335/8
%10Ethanol	335/2
%10Ethanol+50mM Al3+	336/9
%101,4-Butanediol	335/4
%101,4- Butanediol+50mM Al3+	338/3
%10Glycerol	341
%10Glycerol+50mM Al3+	342/6

اثر غلظت‌های بالای حلال‌های آلی (بوتانول، اتانول و 1،4-بوتان‌دیول)10 تا 50 درصد حجمی-حجمی بر روی پایداری پپسین بررسی شد که اثرات مشابهی داشتند؛ در واقع با افزایش غلظت حلال‌های آلی میزان پایداری پپسین بیشتر کاهش یافت، اما در مورد گلیسرول با افزایش غلظت گلیسرول، پایداری پپسین بیشتر شد.

یون آلومینیم یک فلزی خاص است که در pH اسیدی به صورت هیدراته است. هضم اسیدی باعث حلالیت بیش‌تر ترکیبات **آلومینیوم** وارد شده به بدن به صورت گونه‌های تک مولکولی Al^{3+} می‌شود. بعد جذب **آلومینیوم** به طور نامساوی به همه بافت‌ها منتقل می‌شود و در بعضی جاها تجمع می‌کند. تقریباً نیمی از **آلومینیوم** بدن در اسکلت است و تقریباً یک چهارم آن در شش‌ها (از تجمع ترکیبات **آلومینیوم** نامحلول استنشاقی) است، **آلومینیوم** به طور گسترده برای تولید دارو و افزودنی‌ها استفاده می‌شود. یکسری از ترکیبات در سیستم زیستی و یا در غذاها به عنوان لیگاند می‌باشند. در نتیجه اتصال لیگاندها با **آلومینیوم**، خصوصیات فیزیولوژیکی آن‌ها از قبیل حلالیت در محیط آبی، پایداری در pH مختلف، بار الکتریکی، متفاوت می‌شود، بنابراین **آلومینیوم** خاصیت سمی دارد. **آلومینیوم** برای انسان‌ها، حیوانات و گیاهان سمّی است و کمتر در حوزه بیوشیمی مطالعه شده‌است. **آلومینیوم** با تعداد بزرگی از پروتئین‌ها، گلیکوپروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها برهم‌کنش می‌دهد. نحوه اتصال **آلومینیوم** با ترکیبات زیستی ناشناخته است. بیشترین جایگاه‌های اتصال **آلومینیوم** هیدراته در سیستم‌های زیستی، دهنده‌های اکسیژن و خصوصاً دهنده‌های اکسیژن با بار منفی هستند. کربوکسیلات، فسفات، فنولات قوی‌ترین اتصال را دارند [18].

در مطالعه‌ای که اثر یون‌های **آلومینیوم** را بر روی پپسین و تریپسین بررسی کردند، نشان دادند که یون‌های **آلومینیوم** سبب افزایش فعالیت پپسین می‌شوند ولی بر روی فعالیت تریپسین اثری ندارند [21].

پاولیک[3] و همکارانش در مطالعات کالریمتری اسکن تفاضلی (*DSC*) که بر روی پایداری دمایی پپسین در حضور یون‌های **آلومینیوم** انجام دادند، نشان دادند دو نوع جایگاه اتصال برای یون‌های **آلومینیوم** روی پپسین است. تمایل آلومینیم برای اتصال به جایگاه دوم بیشتر از جایگاه اول است. طبق منابع بررسی شده در مورد آلومینیم، هنوز مشخص نشده است **آلومینیوم** از چه طریق سبب افزایش پایداری پپسین می‌شود [20]. یون‌های **آلومینیوم** نیز باعث افزایش فعالیت پپسین می‌شوند. در نتیجه اتصال **آلومینیوم** به پپسین سبب تغییر صورت‌بندی و افزایش صفحات بتا در پپسین می‌شود. احتمالاً **آلومینیوم** بر روی جایگاه اتصال سوبسترا به پپسین اثر ندارد اما با تغییر صورت‌بندی آنزیم، سرعت تبدیل سوبسترا به محصول را افزایش می‌دهد [18].

مولکول‌های پروتئین در محلول‌های آبی به وسیله یک پوسته هیدراته احاطه می‌شوند، که از مولکول‌های آب تشکیل شده است و به سطح پروتئین می‌چسبند. اگر یک حلال آلی حضور داشته باشد، مولکول‌های حلال تمایل دارند جایگزین مولکول‌های آب در هر دو قفسه هیدراته و داخلی پروتئین شوند، بنابراین برهم‌کنش‌هایی که مسئول برای صورت‌بندی آنزیم هستند تخریب می‌شوند. در مطالعه‌ای که سیمون و همکارانش بر روی فعالیت پپسین داشتند، نشان دادند که حلال‌های آلی اتانول و استونیتریل تا غلظت 60 % حجمی-حجمی بر فعالیت پپسین اثری ندارند اما از غلظت 60% تا 90 % فعالیت پپسین کم شده است و ۱،۴ دی اکسان نیز تا غلظت 30 % بر فعالیت پپسین اثر نداشته است اما از غلظت 30 تا 90% فعالیت آن را کاهش داده است. احتمالاً حلال‌های آلی از طریق تغییر محیط کوچک آنزیم (قفسه هیدراته یا جایگاه فعال آنزیم) سبب کاهش فعالیت آن شده‌اند [14].

در مطالعه‌ای که مارتا کوتورمان و هکارانش بر روی آلفا کیموتریپسین داشتند، نشان دادند اگر گروه‌های آمینی آلفا کیموتریپسین با انیدریداسیداستیک، پروپیونیک، سیتراکونیک و فتالیک تغییر پیدا کنند، این تغییرات پایداری آنزیم را در محلول‌های آبی 60% اتانول و 4،1

[3] V.M Pavelkic

دی اکسان و استونیتریل افزایش می‌دهند. استیله شدن گروه‌های آمینی پایداری آنزیم را کم می‌کنند اما سیتراته شدن، پروپیونیله شدن و سوکسیلینه شدن کیمو تریپسین پایداری آن را در حلال‌های آلی زیاد می‌کنند، پایداری بیشتر آنزیم ممکن است مربوط به افزایش برهم‌کنش‌های زنجیره‌های جانبی آروماتیک باشد (خصوصاً در مورد مشتقات فتالیک انیدرید) [22].

در مطالعه‌ای که اثر حلال‌های آلی را بر روی فعالیت و ساختار آنزیم لیپاز بررسی کرده‌اند، نشان داده شده است، فعالیت لیپاز با افزایش غلظت استون، استونیتریل و دی متیل سولفوکساید کاهش یافته است اما در غلظت‌های کم (تا 20% درصد حجمی-حجمی) ایزوپروپانول، متانول و دی متیل سولفوکساید افزایش یافته است، احتمالاً تغییر فعالیت مربوط به تغییر جایگاه فعال می‌باشد. مقدار *km* لیپاز در حضور حلال‌های آلی کاهش یافت و پایداری لیپاز نیز در همه حلال‌های آلی تغییر پیدا کرد [23].

بر طبق یک مکانیسم، الکل‌ها از طریق به هم ریختن اثر هیدروفوبیک و تغییر میان‌کنش‌های یونی و پیوندهای هیدروژنی ساختار سوم پروتئین را ناپایدار می‌نمایند. تغییردر پیوند هیدروژنی علاوه بر ناپایدار کردن ساختار سوم منجر به باز شدن برخی از ساختارهای دوم می‌شود. الکل‌های با زنجیره هیدروکربنی طویل‌تر و بدون شاخه نسبت به الکل‌های کوتاه‌تر دارای انشعاب، هیدروفوبیسته بیش‌تری داشته و اثرات قوی‌تری را بر دگرگون‌سازی پروتئین اعمال می‌نمایند[24-26].

با توجه به اینکه آنزیم پپسین یک آنزیم صنعتی است در این مطالعه اثر **آلومینیوم** و حلال‌های آلی بر روی پپسین در محیط in vitro بررسی شده است.

در این مطالعه نشان داده شد که پایداری دمایی پپسین در حضور **آلومینیوم** زیاد و در حضور حلال‌های آلی بوتانول، اتانول، 1،4 -بوتان‌دیول به ترتیب کم شده، و در حضور گلیسرول ثابت می‌ماند. در واقع هر چه حلال آلی غیرقطبی‌تر باشد، بیشتر پایداری آنزیم را کاهش می‌دهد. لذا پپسین در حضور گلیسرول که بیشترین قطبیت را دارد دارای بیشترین پایداری و در حضور بوتانول با کمترین قطبیت دارای کمترین پایداری می‌باشد، در ضمن پایداری دمایی آنزیم پپسین در حضور حلال‌های آلی بوتانول، اتانول، 1،4-بوتان‌دیول و گلیسرول با افزودن **آلومینیوم** نسبت به غیاب آن زیاد می‌شود. تصور می‌شود یون‌های **آلومینیوم** از طریق برهم‌کنش‌های الکتروستاتیک و داتیو به گروه‌های کربوکسیلات اسیدهای آمینه آسپارتیک اسید و گلوتامیک اسید در ساختار پپسین متصل و از طریق متراکم کردن ساختار آنزیم منجر به افزایش پایداری دمایی پپسین شده‌اند. بنابراین بااستفاده از **آلومینیوم** می‌توان اثرات ناپایدارکنندگی حلال‌های آلی را بر وی پپسین کاهش داد.

4- منابع

[1] Mohd Fadli, A. 2006. The production of extracellular protease using bacillus subtilis: effect of temperature and agitation speed.

[2] Devlin T. M. 1992. Textbook of biochemistry.Wiley-Liss New York.

[3] Rawlings, N. D., Morton, F. R. & Barrett, A. J. 2006. Merops: The peptidase database. Nucleic Acids Research, 34:D270-D272.

[4] Mutlu, A. & Gal, S. 1999. Plant aspartic proteinases: enzymes on the way to a function. Physiologia Plantarum, 105(3):569-576.

[5] Simões, I. & Faro, C. 2004. Structure and function of plant aspartic proteinases. European Journal of Biochemistry, 271(11): 2067-2075.

[6] Horimoto, Y., Dee, D. R. & Yada, R. Y. 2009. Multifunctional aspartic peptidase prosegments. New biotechnology, 25(5): 318-324.

[7] Davies, D. R. 1990. The structure and function of the aspartic proteinases. Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry, 19:189-215.

[8] Koelsch, G., Mareš, M., Metcalf, P. & Fusek,

M. 1994. Multiple functions of pro-parts of aspartic proteinase zymogens. FebsLetters, 343(1): 6-10.

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

[10] Dunn, B. M. 2002. Structure and mechanism of the pepsin-like family of aspartic peptidases. Chemical Reviews, 102(12): 4431-4458.

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

[12] Uhlig, H. & Linsmaier-Bednar, E. M. 1998. Industrial enzymes and their applications, Wiley New York.

[13] Fink, A. L., Calciano, L. J., Goto, Y., Kurotsu, T. & Palleros, D. R. 1994. Classification of acid denaturation of proteins: intermediates and unfolded states. Biochemistry, 33(41): 12504-12511

[14] 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.

[15] Simon, L. M., 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.

[16] Simon LM[1], Kotormán M, Garab G, Laczkó I .2001.Structure and activity of alpha-chymotrypsin and trypsin in aqueous organic media. Biochem Biophys Res Commun.,280(5):1367-71.

[17] YESILOGLU, L. SAGIROGLU, A .2001. Trypsin-Catalyzed Peptide Synthesis in Acetonitrile with Low Water Content., Department of Chemistry, Trakya University, 22030 Edirne-TURKEY, 26 (2002): 529 - 534.

[18] Pavelkic, V., Brdaric, T. & Gopcevic, K. 2012.Aluminium–non-essential activator of pepsin: kinetics and thermodynamics. Medicinal Chemistry and Drug Design, Prof. Deniz Ekinci (Ed.) ISBN: 978-953- 51-0513-8, InTechAvailablfrom:http://www.intechopen.com/books/medicinal-chemistry-and drugdesign/aluminium-non-essential-activator-of-pepsin-kinetics-and-thermodynamics.

[19] Zatta, P. Bordin, C. Favarato, M.1993. The Inhibition of Trypsin and α-Chymotrypsin Proteolytic Activity by Aluminum(III). Archives of Biochemistry and Biophysics, 303(2): 407–411

[20] Pavelkić, V. M., Beljanski, M. V., Antić, K. M., Babić, M. M., Brdarić, T. P. & Gopčević, K. R. 2011. Thermal stability of porcine pepsin influenced by Al (III) ion: DSC study. Russian Journal of Physical Chemistry A, 85(13): 2245-2250.

[21] Krejpcio, Z. Wójciak, R.W.2001. The Influence of Al3+ Ions on Pepsin and Trypsin Activity in Vitro. The Journal of Environmental Studies ,11 (3): 251-254

[22] Kotormán, M. Cseri, A. Laczkó, I. Simon[a],' L. M.2009. Stabilization of α- chymotrypsin in aqueous organic solvents by chemical modification with organic acid anhydrides. PubMed - indexed for MEDLINE.

[23] Zahid Kamal, Md. Yedavalli, P . Deshmukh, M V and Madhusudhana Rao, N. 2013. Lipase in aqueous-polar organic solvents: Activity, structure, and stability. Protein Science, 22(7): 904–915.

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

[25] Kaushik, J. K. & 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.

[26] Timasheff, S. N. 1998. Control of protein stability and reactions by weakly interacting cosolvents: the simplicity of the complicated. Advances in Protein Chemistry, 51: 355-432.