

مقایسه‌ی اثر استفاده هم‌زمان اسمولیت‌های ترهالوز و سوربیتول با استفاده‌ی جداگانه از هر کدام بر فعالیت و ساختار آنزیم لیپاز سودوموناس سپاسیا

آزاده عزیزی¹، بیژن رنجبر^{2*}، خسرو خواجه³، طیبه قدس‌الهی⁴، ثریا هورنام⁵

- 1- دانشجوی دکتری بیوفیزیک، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- 2- استاد بیوفیزیک، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- 3- دانشیار بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- 4- دکتری فیزیک، پژوهشگاه دانش‌های بنیادی، گروه فیزیک، تهران، ایران
- 5- کارشناسی ارشد فیزیک، پژوهشگاه دانش‌های بنیادی، گروه فیزیک، تهران، ایران

*تهران، کدپستی 14115-111

Ranjbarb@modares.ac.ir

(دریافت مقاله: 90/9/26، پذیرش: 91/3/10)

چکیده - امروزه یکی از اهداف اصلی صنایع تولیدکننده آنزیم‌ها، پایدارسازی این ملکول‌ها بدون کاهش فعالیت آن‌ها است. اسمولیت‌های پایدارکننده نوعی افزودنی است که کاربرد گسترده در افزایش پایداری آنزیم‌ها دارد و بدون ایجاد تغییرات مخرب در ساختمان آنزیم، سبب افزایش پایداری آن می‌شود. تاکنون پژوهشات زیادی برای بررسی سازوکار اسمولیت‌ها انجام شده است ولی جزئیات سازوکار آن‌ها هنوز مشخص نشده است. در این پژوهش اثر هم‌زمان دو اسمولیت پایدارکننده سوربیتول و ترهالوز بر فعالیت و پایداری ساختار آنزیم لیپاز سودوموناس سپاسیا با روش‌های طیف‌سنجی فرابنفش-مرئی، فلورسانس و دورنگ‌نمایی دورانی بررسی شده است. برای بررسی دقیق‌تر سازوکار اثر هم‌زمان این دو اسمولیت بر ساختار آنزیم و حلال مجاور آن، برای اولین بار تغییرات ضریب شکست و ضریب دی‌الکتریک حلال با روش تشدید پلاسمون‌های سطحی (SPR) نانو ذرات طلا مطالعه شده و سپس این نتایج با اثر جداگانه هر کدام از اسمولیت‌ها مقایسه شده است. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که اسمولیت‌های ترهالوز و سوربیتول، فعالیت آنزیم را افزایش می‌دهند؛ در حالی که تأثیر هم‌زمان دو اسمولیت بر فعالیت آنزیم، بیشتر از اثر جداگانه هر یک از آن‌ها است. اسمولیت‌ها همچنین سبب افزایش محتوای ساختار دوم آنزیم می‌شوند. از طرفی نتایج بررسی طیف SPR نانوذرات طلا در حضور این دو اسمولیت نشان داد که ضریب دی‌الکتریک محیط اطراف نانو ذرات طلا، با این دو اسمولیت دچار تغییرات محسوسی نمی‌شود. این نتایج بیانگر اثر تعاونی هر دو اسمولیت در حضور یک‌دیگر برای افزایش فعالیت و پایداری ساختاری آنزیم است.

کلید واژگان: لیپاز سودوموناس سپاسیا، تشدید پلاسمون‌های سطحی، اسمولیت، دورنگ‌نمایی دورانی

1- مقدمه

آنزیم لیپاز سودوموناس سپاسیا [*Pseudomonas cepacia* lipase (PCL)] یکی از لیپازهای میکروبی است که از باکتری سودوموناس سپاسیا گرفته می شود. این آنزیم با داشتن قدرت انتخاب فضایی زیاد سوبسترا، بین آنزیم های لیپاز اهمیت زیادی دارد [1-3]. تاکنون کارهای زیادی برای افزایش پایداری سیتیکی و ترمودینامیکی آنزیم انجام شده است؛ مانند تغییرات شیمیایی¹، جهش یا دستکاری ژنتیکی، تثبیت² و استفاده از افزودنی ها [4-6]. یک نوع از افزودنی ها که در افزایش پایداری ماکرو ملکول های زیستی کاربرد فراوان دارد، اسمولیت های پایدارکننده است. اسمولیت ها ترکیباتی آلی با وزن ملکولی کم هستند که سبب افزایش پایداری ماکرو ملکول های زیستی بدون ایجاد تغییرات نامناسب در ساختار آن ها می شود و این ویژگی باعث می شود که از این ملکول ها به عنوان پایدارکننده در صنایع مختلف تولید و تخلیص آنزیم ها استفاده شود [7-11]. اولین بار گیبس³ در سال 1980 سازوکار اسمولیت ها را بر پایه مدل کشش سطحی مطرح کرد که بر این اساس، این مدل اسمولیت ها با دور شدن ترجیحی از سطح ماکرو ملکول ها سبب آب پوشی ترجیحی سطح آن ها می شوند. گیبس نتیجه آب پوشی ترجیحی ماکرو ملکول ها را افزایش کشش سطحی ملکول های آب اطراف سطح آن ها می داند که سبب پایداری ساختاری ماکرو ملکول ها می شود [8]. در بیشتر موارد اسمولیت ها اثر یکدیگر را تقویت کرده و در راستای هم دیگر عمل می کنند؛ در واقع اثرات هم سو دارند.

بنابراین با استفاده هم زمان از مخلوط چند اسمولیت می توان اثر مثبت آن ها را در پایداری ساختاری ماکرو ملکول ها تقویت کرد [8-10]. در این پژوهش با استفاده از مخلوط دو اسمولیت ترهالوز و سوربیتول سعی در افزایش فعالیت و پایداری ساختاری آنزیم PCL شده است. مطالعات طیف سنجی مانند دورنگ نمایی دورانی⁴ و فلورسانس ذاتی نشان داده است که اسمولیت ها، ماکرو ملکول های زیستی را بدون ایجاد تغییر در ساختار آن ها پایدار می کنند؛ بنابراین به نظر می رسد برای دستیابی به جزئیات سازوکار این ترکیبات باید از روش هایی استفاده شود که تغییرات شیمی فیزیکی ایجاد شده در حلال اطراف ماکرو ملکول ها را نمایان کند. یکی از این روش ها تشدید پلاسمون سطحی⁵ (SPR) نانوذرات طلا است که در آن طول موج تشدید این نانوذرات به شدت تحت تأثیر محیط اطراف است و برای درک بهتر سازوکار اسمولیت ها روش مناسبی است [12]. در پژوهش قبلی، اثر هر کدام از اسمولیت های ترهالوز و سوربیتول، بر فعالیت و ساختار آنزیم PCL جداگانه بررسی شد [13]؛ در این پژوهش با توجه به اهمیت استفاده از مخلوط چند اسمولیت برای به دست آوردن نتایج مطلوب در پایداری ماکرو ملکول ها، سازوکار مخلوط دو اسمولیت ترهالوز و سوربیتول با هم، روی فعالیت و ساختار آنزیم لیپاز و نیز بر روی رفتار شیمی فیزیکی یکدیگر با روش های طیف سنجی فرابنفش-مرئی، دورنگ نمایی دورانی، فلورسانس و SPR بررسی و با اثر جداگانه هر اسمولیت مقایسه شد.

1. Chemical modification

2. Immobilization

3. Gibbs

4. Circular Dichroism

5. Surface Plasmon Resonance

2- مواد و روشها

2-1- مواد

آنزیم PCL با فعالیت ویژه 49 U/mg، ترهالوز، سوربیتول، ایزوبوتانول و تریتون X-100، از شرکت سیگما خریداری شد. کلرید سدیم و 2-پروپانول از شرکت مرک تهیه شد.

2-2- دیالیز و تعیین غلظت آنزیم

آنزیم PCL تهیه‌شده ناخالصی‌هایی مانند سورفکتانت داشت که برای جلوگیری از فرایند خودتجمعی¹ هنگام تخلیص و تهیه آنزیم به کار می‌رود؛ همچنین دارای برخی یون‌ها مانند کلسیم و سدیم نیز بود. وجود این مواد در محیط عمل آنزیم سبب اشکال در آزمایش‌های طیف‌سنجی می‌شود؛ بنابراین برای حذف این ناخالصی‌ها ابتدا آنزیم دیالیز شد. آنزیم در بافر تریس 50 میلی‌مولار با pH=8 با حجم 1 لیتر به مدت 24 ساعت در دمای 4°C با چرخش مگنت دیالیز شد. برای جلوگیری از فرایند خودتجمعی ملکول‌های پروتئین از افزودنی‌هایی مانند کلرید سدیم 50 میلی‌مولار استفاده شد. بعد از دیالیز، برای سنجش غلظت پروتئین از روش برادفورد² استفاده شد [14].

2-3- تهیه محلول‌های اسمولیت و سوبسترا

در پژوهش قبلی برای بررسی اثر هر کدام از اسمولیت‌ها روی ساختار و فعالیت آنزیم PCL، محلول‌های جداگانه دو اسمولیت ترهالوز و سوربیتول تهیه و مطالعه شد. در این پژوهش با استفاده از محلول حاوی هر دو اسمولیت ترهالوز و سوربیتول، اثر متقابل این دو اسمولیت روی

رفتار شیمی فیزیکی یک‌دیگر و نیز روی فعالیت و ساختار آنزیم بررسی و با اثر جداگانه هر کدام مقایسه شد. محلول‌های اسمولیت با غلظت 1/2 مولار در بافر تریس 50 میلی‌مولار [pH = 8] تهیه شدند. محلول سوبسترا با روش کردل³ تهیه شد؛ در این روش مقدار 1 میلی‌گرم پودر پارانیتر و فنیل پالمیتات در 500 میکرولیتر ایزوپروپانول حل شد تا یک محلول یکنواخت به‌دست آید [15].

2-4- محاسبه فعالیت آنزیم در حضور و نبود

اسمولیت‌ها

فعالیت آنزیم PCL به روش کردل و همکارانش روی سوبسترای پارانیتر و فنیل پالمیتات اندازه‌گیری شد [14]. در این روش یک حجم از محلول پارانیتر و فنیل پالمیتات با غلظت 2 mg/ml که در ایزوپروپانول حل شده است را با 9 حجم از بافر تریس 50 میلی‌مولار با pH=8 که حاوی 100 میکرولیتر محلول تریتون X-100 حل شده در ایزوبوتانول است با یک‌دیگر مخلوط می‌کنیم. مقدار 980 میکرولیتر از این محلول را در یک کووت ریخته و با 20 میکرولیتر آنزیم به حجم 1 میلی‌لیتر می‌رسانیم (آنزیم با غلظت 1 mg/ml در بافر تریس با pH = 8 تهیه شد). با شروع واکنش آنزیمی، جذب محصول به‌دست‌آمده از واکنش آنزیمی در طول موج 410 نانومتر در مدت 1 دقیقه به‌وسیله‌ی طیف‌سنج فرابنفش - مرئی (spectrophotometer S-2100) اندازه‌گیری شد.

سرعت واکنش آنزیمی با استفاده از شیب منحنی جذب زمان و بر اساس معادله بیرلامبرت تعیین شد [14]. فعالیت آنزیم در حضور هر دو اسمولیت ترهالوز و

1. Aggregation
2. Bradford

3. Cordel

سوربیتول در غلظت‌های 0 تا 1 مولار با روند افزایشی 0/2 مولار محاسبه شد (ضریب خاموشی مولار پارانیتروفنل $15 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ است).

2-5- مطالعات دورنگ نمایی دورانی (CD)

تغییرات ایجادشده در ساختار دوم آنزیم در حضور اسمولیت‌ها با روش دورنگ‌نمایی دورانی با دستگاه اسپکتروپلاری متر Jasco مدل J-715 بررسی شد. نتایج به صورت بیضی‌واری مولی $^1 ([\theta] \text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1})$ محاسبه می‌شود. بیضی‌واری مولی از رابطه‌ی زیر به دست می‌آید:

$$[\theta] = (\theta \times 100 \text{MRW}) / Cl$$

C، غلظت پروتئین بر حسب mg/ml ، l طول مسیر نور بر حسب cm از کووت حاوی نمونه، θ ، شاخص بیضی‌واری اندازه‌گیری شده بر حسب درجه در طول موج λ است و MRW^2 ، میانگین جرم ملکولی اسیدآمینه‌های موجود در آنزیم است. از آن‌جا که آنزیم، 320 اسیدآمینه دارد و میانگین وزن ملکولی آن حدود 33 کیلودالتون است، MRW برای آنزیم PCL، 103 دالتون به دست می‌آید. مطالعات در ناحیه far-UV CD (ناحیه‌ی طول موج بین 190 تا 250 نانومتر) با غلظت ثابت آنزیمی $0/2 \text{ mg/ml}$ و غلظت‌های مختلف از محلول دارای هر دو اسمولیت ترهالوز و سوربیتول از 0 تا 1 مولار با روند افزایشی 0/2 مولار انجام شد و با نتایج به دست آمده از محلول‌های دارای یک نوع اسمولیت مقایسه شد. پردازش

1. Molar ellipticity
2. Mean residue weight

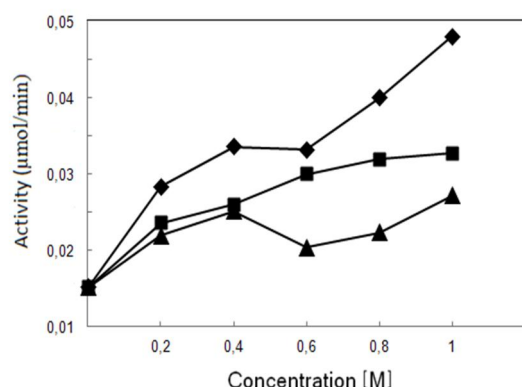
طیف‌ها به وسیله‌ی نرم‌افزار اختصاصی J-715 انجام شد [17-16].

2-6- مطالعات فلورسانس ذاتی

فلورسانس ذاتی آنزیم در حضور اسمولیت‌ها با دستگاه فلوریتر Perkin-Elmer LS55 با جذب در طول موج 290 nm و نشر ذاتی با طول موج $300\text{-}400 \text{ nm}$ پردازش شد. این مطالعات روی آنزیم با غلظت ثابت $0/2 \text{ mg/ml}$ و در حضور هم‌زمان دو اسمولیت ترهالوز و سوربیتول هر کدام با غلظت 0/25 مولار (محلول نهایی 0/5 مولار) انجام شد. اطلاعات با نرم‌افزار پردازش شد [18].

2-7- روش تشدید پلاسمون‌های سطحی طلا (SPR)

برای انجام بررسی SPR، نخست یک لایه‌ی نازک از نانوذرات کروی طلا در ابعاد حدود 6 نانومتر تهیه شد؛ این لایه‌ی نازک با روش لایه نشانی پلاسمای امواج رادیویی (RF-Sputtering) تهیه شد [19]. سپس با یک دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Visible در ناحیه‌ی طول موج بین 350 تا 800 نانومتر، جذب پلاسمون‌های سطحی نانو ذرات طلا، نخست در حضور دی‌اکتریک هوا و سپس در حضور بافر تریس 50 میلی‌مولار با $\text{pH}=8$ اندازه‌گیری شد. مطالعات طیف SPR آنزیم با غلظت $0/2 \text{ mg/ml}$ و در حضور اسمولیت‌های سوربیتول و ترهالوز با غلظت‌های مختلف از 0/2 تا 1 مولار در زمان 4 دقیقه، هر دو دقیقه، اندازه‌گیری شده و نتایج به دست آمده به وسیله‌ی نرم‌افزار Curve Tabl بررسی شد.



شکل 1 مقایسه فعالیت آنزیم PCL در حضور سه محلول مختلف ترهالوز (▲)، سوربیتول (■) و ترهالوز + سوربیتول (◆) در غلظت‌های متفاوت اسمولیت از 0 تا 1 مولار

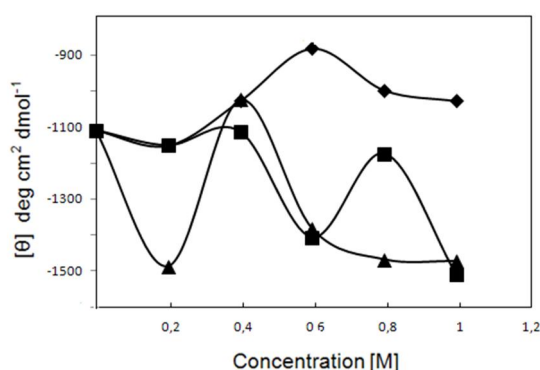
3-2- مطالعات دورنگ‌نمایی دورانی

بررسی اثر اسمولیت‌ها روی تغییرات ساختار دوم آنزیم PCL، نشان داد که حضور هم‌زمان اسمولیت‌های ترهالوز و سوربیتول سبب افزایش درصد ساختار دوم آنزیم می‌شود (شکل 2). در مطالعه‌ی پیشین دیده شد که در حضور ترهالوز، درصد ساختار دوم آنزیم افزایش یافته در حالی که در حضور سوربیتول، میزان فشردگی ساختاری آنزیم کم شد و درصد ساختار دوم آن نیز کاهش یافت. در این بررسی، محتوای ساختار دوم آنزیم در حضور هم‌زمان هر دو اسمولیت ترهالوز و سوربیتول افزایش یافته و روندی شبیه ترهالوز دارد (شکل 3). پس دو نوع اسمولیت آثار یک‌دیگر را در راستای پایداری ساختاری آنزیم تقویت می‌کنند، به‌گونه‌ای که اثر سوربیتول، هم‌سو با ترهالوز شده و هر دو اسمولیت از سطح پروتئین دور می‌شوند؛ در نتیجه، کشش سطحی آب اطراف سطح بیشتر شده سبب افزایش پایداری ساختار آنزیم می‌شود. این نتایج نشان می‌دهد که اثر ترهالوز روی پایداری ساختاری آنزیم،

3- یافته‌ها و بحث

3-1- بررسی فعالیت آنزیم در حضور اسمولیت‌ها

نتایج به‌دست‌آمده از بررسی فعالیت آنزیم در حضور هر دو اسمولیت ترهالوز و سوربیتول در شکل 1 آمده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، فعالیت آنزیم PCL در حضور این اسمولیت‌ها افزایش یافته است. در مطالعه‌ی پیشین دیده شد که در حضور هر کدام از اسمولیت‌های ترهالوز و سوربیتول فعالیت به‌طور جداگانه، فعالیت آنزیم افزایش یافت؛ در حالی که این‌جا، فعالیت آنزیم در حضور هر دو اسمولیت، بیشتر از حالت اول است. این نتایج نشان می‌دهد که هر اسمولیت، اثر دیگری را در افزایش فعالیت آنزیم تقویت می‌کند. تأثیر اسمولیت‌ها در افزایش فعالیت آنزیم ممکن است به‌خاطر اثر آن‌ها در جلوگیری از فرایند خودتجمعی غیرطبیعی ملکول‌های آنزیم باشد؛ این فرایند سبب افزایش تعداد جایگاه‌های فعال در دسترس برای اتصال ملکول‌های سوبسترا به آنزیم می‌شود که این اثر در حضور هم‌زمان دو اسمولیت گفته‌شده بیشتر می‌شود. دور شدن ترجیحی اسمولیت‌ها از سطح آنزیم سبب افزایش کشش سطحی آب اطراف سطح می‌شود که کاهش دینامیک ساختاری آنزیم را به دنبال دارد. سرانجام این وقایع سبب می‌شود شکل فضایی جایگاه فعال آنزیم به‌گونه‌ای تغییر کند که بیشترین تمایل برای اتصال به سوبسترا را داشته باشد [9]. پس هم‌سو بودن تأثیر اسمولیت‌ها در تقویت آثار یک‌دیگر سبب می‌شود که فعالیت آنزیم در حضور هر دو اسمولیت، بیشتر از حالتی باشد که اسمولیت‌ها، جداگانه در محیط آنزیم قرار می‌گیرند [1 و 11].

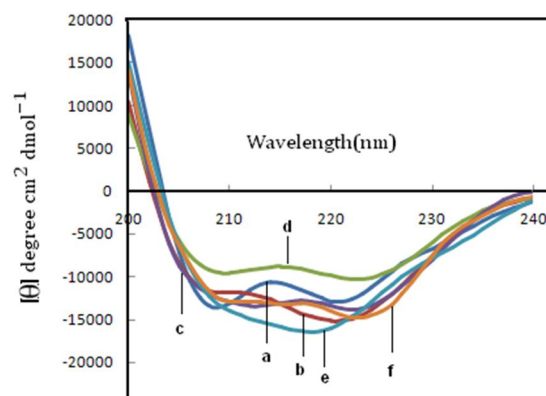


شکل 3 محتوای ساختار دوم آنزیم PCL در حضور سه محلول مختلف [ترهالوز (■)، سوربیتول (◆) و ترهالوز + سوربیتول (▲)] در غلظت‌های متفاوت اسمولیت از 0 تا 1 مولار.

3-3- مطالعات طیف‌سنجی فلورسانس

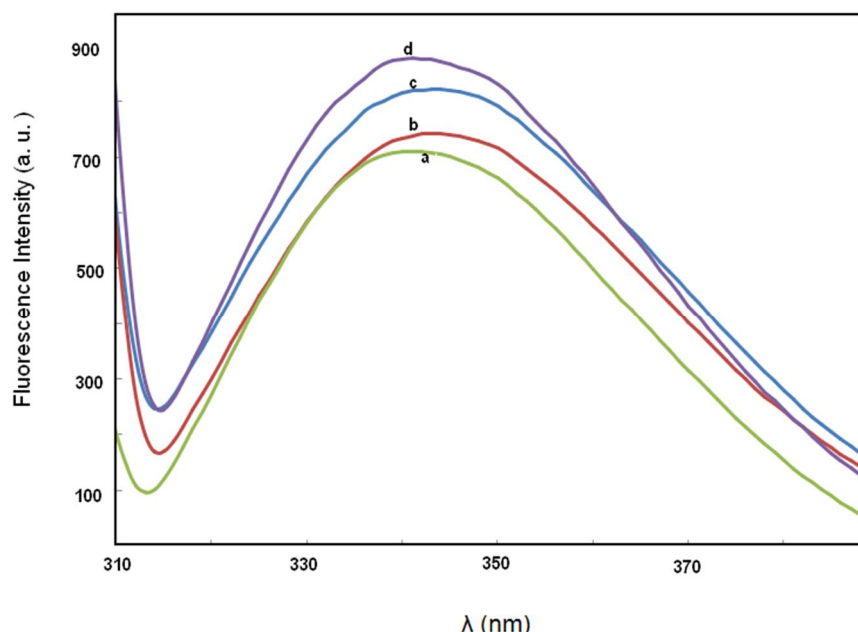
برای درک بهتر سازوکار اثر اسمولیت‌ها در پایداری ساختاری آنزیم PCL، تأثیر اسمولیت‌ها بر ساختار آنزیم به‌گونه‌ای اختصاصی در مکان اسیدآمینه‌های تریپتوفان، بررسی شد. نتایج به‌دست آمده از اندازه‌گیری طیف فلورسانس آنزیم PCL، نشان داد که در مجاورت هم‌زمان اسمولیت‌های ترهالوز و سوربیتول، شدت نشر فلورسانس آنزیم افزایش می‌یابد (شکل 4)؛ ولی شدت نشر فلورسانس در حضور دو اسمولیت با هم نسبت به شدت نشر فلورسانس در حضور هر کدام از آن‌ها به‌تنهایی، دو برابر افزایش پیدا نکرده است. این نتیجه نشان از هم‌سو بودن اثر اسمولیت‌های ترهالوز و سوربیتول در حفظ پایداری ساختاری آنزیم دارد. در واقع اسمولیت‌ها با افزایش کشش سطحی آب اطراف سطح پروتئین و در نتیجه افزایش فشردگی آن سبب افزایش سختی ساختار در اطراف اسیدآمینه‌های تریپتوفان می‌شوند. پس در حضور اسمولیت‌ها، شدت فلورسانس آنزیم در مکان اسیدآمینه‌های تریپتوفان افزایش یافته و این عمل اسمولیت‌ها در حضور یک‌دیگر تقویت می‌شود [1 و 11]. در شکل 4 تغییرات شدت فلورسانس در حضور اسمولیت‌های ترهالوز و سوربیتول در حالت جداگانه و در حالت باهم مقایسه شده است.

بیشتر از اثر سوربیتول است و این اسمولیت، اثر سوربیتول را نیز با خود هم‌سو می‌کند تا هر دو اسمولیت با هم سبب افزایش پایداری ساختاری پروتئین شوند [11-18]. ترهالوز، یک ملکول آب‌ساز¹ است و با دور شدن ترجیحی از سطح آنزیم سبب افزایش کشش سطحی آب اطراف آنزیم می‌شود؛ در حالی که سازوکار اثر سوربیتول درست عکس ترهالوز است. در واقع سوربیتول تمایل دارد به‌وسیله‌ی گروه هیدروکسیل قطبی خود با سطح آنزیم برهم‌کنش هیدروژنی ایجاد کند که سبب باز شدن مقداری از ساختار دوم آنزیم می‌شود. اثر سوربیتول در حضور ترهالوز به دلیل قدرت بالای ترهالوز در آب‌پوشی سطح آنزیم، از بین می‌رود و بنابراین در حضور هر دو اسمولیت نیز پایداری ساختاری آنزیم افزایش می‌یابد [20-21].



شکل 2 مقایسه طیف CD آنزیم PCL در حضور غلظت‌های مختلف مخلوط ترهالوز و سوربیتول (طیف‌های a تا f به‌ترتیب بیانگر افزایش غلظت اسمولیت‌ها از 0 تا 1 مولار با روند افزایشی 0/2 مولار است).

1. Kosmotrop



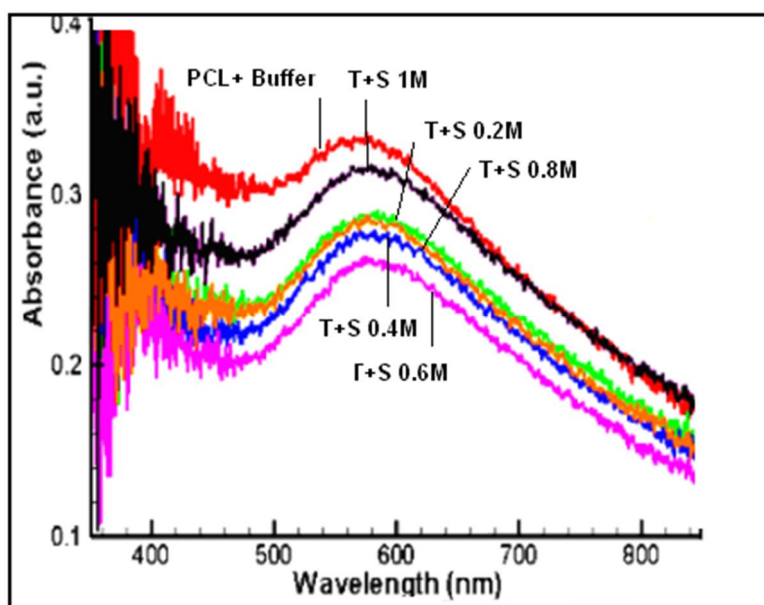
شکل 4 نمودار تغییرات شدت فلورسانس آنزیم PCL در حضور غلظت ثابت 0/5 مولار از سه محلول متفاوت؛ ترهالوز (b)، سوربیتول (c) و ترهالوز + سوربیتول (d)؛ نمودار (a)، طیف فلورسانس آنزیم در نبود اسمولیت‌ها است.

ضریب دی‌الکتریک آن می‌شود (شکل 6) [22]. در حالی که ترهالوز با دور شدن از سطح آنزیم سبب افزایش کشش سطحی آب اطراف سطح آنزیم شده و سبب تغییر شدیدی در ضریب دی‌الکتریک محیط ایجاد نمی‌کند [11]. هنگامی که هر دو اسمولیت با هم در محیط باشند، اثر ترهالوز در حلال اطراف آنزیم بر اثر سوربیتول چیره شده و در مجموع، ضریب شکست و در نتیجه ضریب دی‌الکتریک محیط تغییر زیادی نمی‌کند.

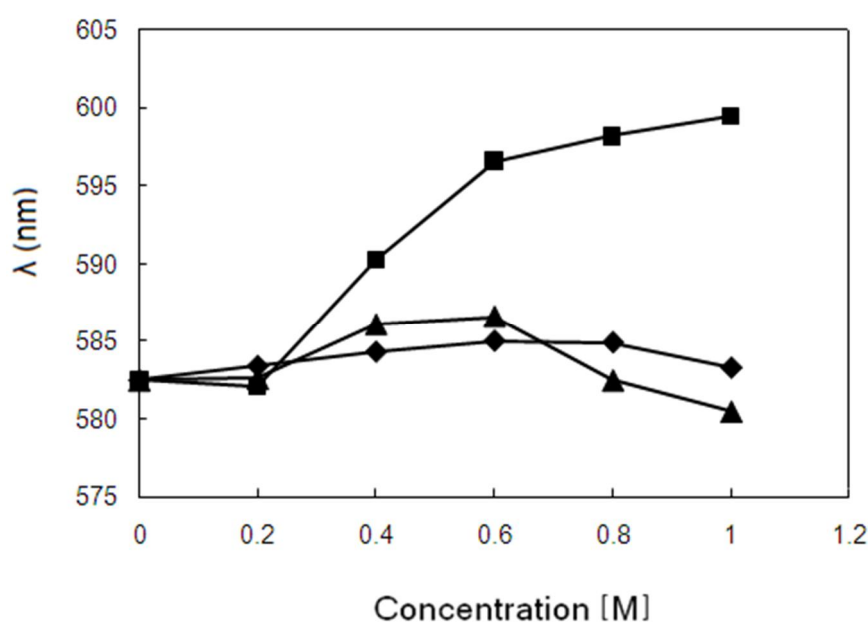
به‌طور کلی، نتایج این تحقیق نشان داد که اثر هر دو اسمولیت در افزایش فعالیت آنزیم و حفظ پایداری ساختاری آن، هم‌سو است و هر دو اسمولیت، رفتاری به سمت تقویت آثار مثبت یک‌دیگر داشته است. این نتایج، فواید استفاده از مخلوط چند اسمولیت با هم را با هدف پایداری سیتیکی و ترمودینامیکی آنزیم‌ها در صنایع گوناگون نشان می‌دهد.

3-4- روش تشدید پلاسمون‌های سطحی (SPR)

طیف SPR نانوذرات طلا در مجاورت آنزیم PCL و مخلوط دو اسمولیت ترهالوز و سوربیتول در شکل 5 نشان داده شده است. در حضور مخلوط هر دو اسمولیت ترهالوز و سوربیتول، طول موج تشدید نانوذرات طلا اندکی به سمت طول موج‌های قرمز جابه‌جا شده است. جابه‌جایی قرمز طول موج تشدید به معنی افزایش ضریب شکست و در نتیجه افزایش ضریب دی‌الکتریک محیط اطراف نانوذرات طلا است. در مطالعات پیشین نشان داده شد که در حضور جداگانه سوربیتول در مقایسه با ترهالوز، تغییرات ایجادشده در ضریب شکست محیط، بسیار زیاد است؛ اما در حضور هر دو اسمولیت، روند تغییر ضریب شکست محیط، مانند ترهالوز است. در واقع سوربیتول با برقراری پیوندهای هیدروژنی با سطح آنزیم سبب کاهش فشردگی آنزیم و افزایش



شکل 5 طیف SPR نانوذرات طلا در حضور غلظت‌های متفاوت محلول مخلوط ترهالوز و سوربیتول. شامل طیف SPR نانوذرات طلا در حضور پروتئین بدون اسمولیت، پروتئین در حضور محلول 1/2، 1/4، 1/6، 1/8، 1 مولار و 1 مولار مخلوط سوربیتول و ترهالوز.



شکل 6 نمودار تغییرات طول موج رزونانس پلاسمون‌های سطحی نانوذرات طلا در حضور محلول‌های مختلف ترهالوز (▲)، سوربیتول (■) و ترهالوز+ سوربیتول (◆) در غلظت‌های متفاوت اسمولیت، از 0 تا 1 مولار.

secondary alcohols: a quantitative model, *Pro. Science*. 9, 1053-1062.

- [5] Weissfloch, E., Cuccia, L. A. (1991) A rule to predict Which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas cepacia*, and lipase from *candida rugosa*, *J. Org Chem*. 56, 2656-2665.
- [6] Pencreac'h, G., Baratti, J. C. (1998) Thermal stability of free and immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase in aqueous and organic media, *Progr Biotechnol*. 15, 459-464.
- [7] Arakawa, T., Timasheff, S. N. (1985) The stabilization of protein by osmolytes, *Biophys. J*. 47, 411-414.
- [8] Timasheff, S. N. (2002) Protein-solvent preferential interactions, protein hydration, and the modulation of biochemical reactions by solvent components, *Biochem*. 99, 9721-9726.
- [9] Paper, O., Kumar, P. R., Prakash, V. (2009) The stabilizing effects of polyols and sugars on Porcine pancreatic lipase, *J Am Oil Chem Soc*. 86, 773-781.
- [10] Anjum, F., Rishi, V., Ahmad, F. (2000)

4- سپاسگزاری

با تشکر از خانم اکرم شیردل که در نوشتن این مقاله همکاری کردند؛ همچنین از خانم نگار ندافی سمنانی، کارشناس گروه بیوفیزیک و همهی همکاران دانشگاه تربیت مدرس به‌ویژه معاونت پژوهشی دانشگاه که در جمع‌آوری این مقاله سهیم بودند کمال تشکر را داریم.

5- مراجع

- [1] Secundo, F., Carrea, G. (2005) Mono- and disaccharides enhance the activity and enantioselectivity of Burkholderiacepacia lipase in organic solvent but do not significantly affect its conformation, *Biotechnol Bioeng*. 92, 438-446.
- [2] Quyen, D. T., Schmidt-Dannert, C., Schmid, R. D. (1999) High-level formation of active *Pseudomonas cepacia* lipase after heterologous expression of the encoding gene and Its modified chaperone in *escherichia coli* and rapid in vitro refolding, *Appl Environ Microb*. 65, 787-794.
- [3] Seitz, E. W. (1974) Industrial application of microbial lipases: A review, *Am Oil Chem Soc*. 51, 12-16.
- [4] Schulz, T., Pleiss, R., Schmid, R. D. (2000) Stereoselectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase toward

- Progr Biotechnol.* 15, 459-464.
- [16] Protasevich, I., Ranjbar, B., Labachov, V., Makarov, A., Gilli, R., Briad, C. (1997) Conformation and thermal denaturation of apocalmodulin: role of electrostatic mutation, *Biochem.* 36, 2017-2024.
- [17] Ranjbar, B., Gill, P. (2009) Circular dichroism techniques, biomolecular and nanostructural analyses-a review, *Chem Biol Drug Des.* 74, 101-120.
- [18] Chen, Y., Barkely, M. (1998) Toward understanding tryptophan fluorescence in proteins, *Biochem.* 37, 9976-9982.
- [19] Ballarin, B., Cassan, M. C., Maccato, C., Gasparotto, A. (2009) RF-sputtering preparation of gold-nanoparticle-modified ITO electrodes for electro catalytic applications, *Nanotechnol.* 22, 275711-275720.
- [20] Ganjalikhany, M. R., Ranjbar, B., Hosseinkhani, S., Khalifeh, K., Hassani, L. (2009) Roles of trehalose and magnesium sulfate on structural and functional stability of firefly luciferase, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 62, 127-132.
- [21] Allison, S. D., Chang, B., Randolph, T. Compatibility of osmolytes with Gibbs energy of stabilization of proteins, *Biochim et Biophys Acta.* 1476, 75-84.
- [11] Jai, R. B., Kaushik, K., (2003) Why is trehalose an exceptional protein stabilizer, *J Biol Chem.* 278, 26458-26465.
- [12] Homola, J., Yee, S. S., Gauglitz, G. (1999) Surface plasmon resonance sensors: review, *Sensor Actuat B-Chem.* 54, 3-15.
- [13] Azizi, A., Ranjbar, B., Khajeh, K., Ghodselahi, T., Hoornam, S., Mobasheri, H., Ganjalikhany, M. R. (2011) Effects of trehalose and sorbitol on the activity and structure of *Pseudomons cepacia* lipase: Spectroscopic insight, *Int J of Biol Macromol.* 49, 652-656.
- [14] Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- [15] Pencreac'h, G., Baratti, J. C. (1998) Thermal stability of free and immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase in aqueous and organic media,

- [22] Jung, Y. S., Wuenschell, J., Kim, H. K., Kaur, P., Waldeck, D. H. (2009) Blue-shift of surface plasmon resonance in a metal nanoslit array structure, *Opt. Express*. 17, 16081-16091.
- W., Carpenter, J. F. (1999) Hydrogen bonding between sugar and protein is responsible for inhibition of dehydration-induced protein unfolding, *Arch Biochem Biophys*. 365, 289–298.