

## اثر کلسیم بر پایداری ترمولیزین

محسن عیسی زاده زارع<sup>1</sup>، سید محسن اصغری<sup>2\*</sup>، مجید تقدیر<sup>3</sup>، عبدالعلی وارسته<sup>4</sup>، الهام عصاره دزفولی<sup>1</sup>

1- کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

2- استادیار بیوشیمی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

3- استادیار بیوفیزیک، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

4- دکترای بیوشیمی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

\* کدپستی 41938-33697، رشت، ایران

sm\_asghari@guilan.ac.ir

(دریافت مقاله: 92/5/6، پذیرش: 92/5/13)

**چکیده** - ترمولیزین یک پروتئاز پایدار دمایی حاصل از باسیلوس ترموپروتولیتیکوس می باشد. این آنزیم از نظر صنعتی مهم بوده و بویژه در سنتز پپتید کاربرد دارد. با توجه به کاربردهای صنعتی ترمولیزین، مطالعات زیادی بر روی آن انجام شده است. در تحقیق حاضر، نقش کلسیم در پایداری دمایی، pH اسیدی، در برابر عوامل دناتورده کننده (اوره و SDS) و نمک NaCl مطالعه گردید. پارامتر  $t_{1/2}$  در عدم حضور کلسیم، در دماهای 80، 85 و 90 درجه سانتی گراد به ترتیب 7، 3 و 1 دقیقه، اما در حضور کلسیم به ترتیب  $>95$ ، 45 و 16 دقیقه بود. کلسیم تأثیر چندانی بر پایداری آنزیم در pH اسیدی نداشته است. همچنین، بررسی اثر دناتورانت ها نتایج متفاوتی نشان می دهد. در مورد SDS، درصدی از دناتورانت که فعالیت آنزیم را به نصف رساند، در عدم حضور کلسیم 0/1 و در حضور کلسیم 0/9 درصد (w/v) بود. اما در اوره، فعالیت آنزیم در حضور دناتورانت نه تنها دچار کاهش نشد، بلکه با افزایش روبرو شد و تفاوت قابل ملاحظه ای بین حالات حضور و عدم حضور کلسیم مشاهده نشد. تا غلظت 3 مولار NaCl، پایداری ترمولیزین در حضور کلسیم افزایش و در عدم حضور کلسیم اندکی کاهش یافته است. اما در غلظت بالاتر NaCl کاهش پایداری در هر دو مورد دیده شد. نتایج به دست آمده نشان می دهد که پایداری دمایی ترمولیزین و پایداری در برابر SDS به شدت وابسته به کلسیم می باشد، پایداری در برابر اوره و NaCl وابستگی نسبی به کلسیم را نشان می دهد و در pH اسیدی، پایداری آنزیم وابستگی به کلسیم ندارد.

**کلید واژگان:** ترمولیزین، پایداری، کلسیم، دناتورانت، pH.

**1- مقدمه**

بر پایداری و ویژگی‌های بیوشیمیایی ترمولیزین بررسی شده است.

پروتئازها کاربردهای گوناگونی در ساخت پپتید، تعیین توالی پروتئین، صنایع غذایی، دارویی و شوینده‌ها دارند [1]. این آنزیم‌ها پیوندهای پپتیدی پروتئین‌ها را در محیط آبی هیدرولیز کرده و به همین خاطر در خانواده هیدرولازها قرار می‌گیرند [2]. در محیط‌های آلی به خاطر تغییر معادله‌ی ترمودینامیکی، پیوندهای پپتیدی ساخته می‌شود [3 و 4]. سایر کاربردهای این آنزیم‌ها وابسته به ماهیت فعالیت کاتالیتیک در ارتباط با محیط واکنش‌دهنده است که منجر به دسته‌بندی پروتئازها به گروه‌های اسیدی، خنثی و بازی می‌شود [5]. پروتئازهای خانواده ترمولیزین (TLPs) یا پروتئازهای خنثی که به وسیله انواع باسیلوس‌ها تولید می‌شوند، با داشتن فعالیت بهینه در pH خنثی شناخته می‌شوند [6]. فعالیت کاتالیتیک این آنزیم‌ها وابسته به یک یون روی است که در جایگاه فعال قرار دارد. پروتئازهای خنثی به تعداد متفاوتی از یون‌های کلسیم اتصال دارند که برای پایداری آنزیم ضروری است [7]. همه این پروتئازها با دو یون کلسیم در یک جایگاه اتصال دوتایی پیوند دارند، در حالی که پروتئازهای پایدارتر مانند ترمولیزین، چهار یون کلسیم ساختاری دارند [8]. ترمولیزین [EC 3.4.24.27]، پروتئاز خارج سلولی تولیدشده به وسیله‌ی باسیلوس ترموپروتئولیتیکوس است که یک آنزیم پایدار دمایی است [9]. این آنزیم به عنوان آنزیم مهم صنعتی شناخته می‌شود که در سال‌های گذشته نقش مهمی در تولید آسپارتام به عنوان شیرین‌کننده مصنوعی داشته [10] و اکنون مهم‌ترین کاربرد آن، در تشکیل پیوندهای پپتیدی است [11 و 12]؛ به همین خاطر، بررسی و مهندسی ترمولیزین برای بهبود ویژگی‌های آنزیمی، از دیرباز مورد توجه پژوهشگران بوده است. در این پژوهش، اثر کلسیم

**2- مواد و روش‌ها****2-1- مواد**

آنزیم ترمولیزین از شرکت سیگما و SDS، اوره، کازئین،  $\text{CaCl}_2$  و سایر مواد استفاده شده از شرکت مرک آلمان خریداری شد.

**2-2- سنجش فعالیت آنزیمی**

فعالیت ترمولیزین با اسپکتروفوتومتری و تعیین مقدار جذب در طول موج 280 nm و با روش Endpoint تعیین شد. پیش‌ماده‌ی استفاده شده برای واکنش، کازئین 1 درصد (W/V) بود. از تریس 20 میلی‌مولار با  $\text{pH} = 7.5$  به عنوان بافر و از TCA 10 درصد به عنوان متوقف‌کننده واکنش استفاده شد. واکنش پروتئولیز، 10 دقیقه در 60 درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از پایان واکنش، به اندازه حجم محیط سنجش (250  $\mu\text{l}$ )، TCA اضافه شد. پس از متوقف کردن واکنش، مقدار جذب در طول موج 280 nm به عنوان فعالیت آنزیم در نظر گرفته شد. برای به دست آوردن Unit آنزیم، منحنی استاندارد غلظت‌های کازئین رسم شد.

**2-3- غیرفعال‌سازی حرارتی**

برای تعیین پایداری ترمودینامیکی و پایداری سینتیکی، ترمولیزین در 80، 85 و 90 درجه سانتی‌گراد و در بازه 0-90 دقیقه دماهی شد. انکوباسیون در حضور و نبود کلسیم انجام شد. در زمان‌های مشخص (0-90 دقیقه) نمونه‌ها برداشته و فوراً به یخ انتقال داده شدند. پس از 30 دقیقه دماهی در یخ، فعالیت آنزیمی پیش‌ماده کازئین 1

رابطه  $\Delta S^\ddagger = (\Delta H^\ddagger - \Delta G^\ddagger)/T$  تعیین شد. دما در روابط بالا، 85 درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد.

#### 2-4- اثر pH اسیدی روی فعالیت آنزیم

برای بررسی اثر pH اسیدی و نقش کلسیم، آنزیم در بازه 45-0 دقیقه در pH=3 به‌عنوان یک pH شاخص اسیدی دماهی شد. دماهی در دمای اتاق (25 درجه سانتی‌گراد) و در سه غلظت کلسیم (0، 2 و 10 میلی‌مولار) انجام شد. پس از پایان دماهی، فعالیت آنزیم سنجیده شد. فعالیت به‌دست آمده از دماهی در زمان صفر به‌عنوان شاهد (100 درصد) در نظر گرفته شد.

#### 2-5- اثر غلظت‌های مختلف دنا‌تورانت‌ها و NaCl بر روی فعالیت

پس از دماهی ترمولیزین در غلظت‌های مختلف SDS و اوره به‌عنوان دنا‌تورانت و نمک NaCl در 37 درجه سانتی‌گراد، فعالیت آنزیم سنجیده شد. دماهی در دو غلظت کلسیم (0 و 20 میلی‌مولار) انجام شد. فعالیت آنزیم ترمولیزین در غلظت‌های صفر دنا‌تورانت‌ها و نمک به‌عنوان شاهد (100 درصد) در نظر گرفته شد.

### 3- یافته‌ها

#### 3-1- غیرفعال‌سازی حرارتی برگشت‌ناپذیر

##### ترمولیزین

غیرفعال شدن حرارتی آنزیم ترمولیزین در دماهای 80، 85 و 90 درجه‌ی سانتی‌گراد بررسی شد. داده‌های به‌دست آمده از سنجش فعالیت آنزیم ترمولیزین، پس از دماهی در دماهای گفته شده، در شکل 1 آمده است.

درصد ارزیابی شد. با به‌دست آوردن میزان فعالیت در زمان‌های انکوباسیون مختلف برای هر دما، منحنی لگاریتم فعالیت باقیمانده بر زمان به صورت خطی به‌دست آمد. زمان صفر انکوباسیون شاهد (100 درصد) در نظر گرفته شد. با استفاده از داده‌های به‌دست آمده از سنجش فعالیت آنزیم، پارامتر  $t_{1/2}$  در دماهای مختلف محاسبه شد. همچنین با استفاده از ثابت سرعت غیرفعال‌سازی ( $k_{inactivation}$ ) که در واقع شیب خط نمودار غیرفعال‌سازی در 80، 85 و 90 درجه سانتی‌گراد است، منحنی آرنیوس رسم شد. با استفاده از منحنی آرنیوس، نخست، انرژی فعال‌سازی ( $E_a$ ) بر پایه‌ی معادله آرنیوس (Arrhenius) تعیین شد:

$$k = A e^{-E_a/RT}$$

$k$ ، ثابت سرعت در دمای  $T$ ،  $A$ ، فاکتور pre-exponential مربوط به آثار استری و شدت تصادم مولکولی،  $R$ ، ثابت گازها (8.314 J/mol.K) و  $E_a$ ، انرژی فعال‌سازی واکنش است. بنابراین منحنی  $\ln$  فعالیت ویژه بر  $1/T$ ، یک خط با شیب  $-E_a/R$  به‌دست می‌دهد. پارامتر ترمودینامیکی  $\Delta G^\ddagger$  از رابطه زیر تعیین شد:

$$\Delta G^\ddagger = (RT \ln k_B T/h) - (RT \ln k_{inact})$$

$k_B$ ، ثابت بولتزمن ( $1.3805 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$ )،  $h$ ، ثابت پلانک ( $6.6256 \times 10^{-34} \text{ J.S}$ ) و  $k_{inact}$ ، ثابت سرعت غیرفعال‌سازی بر اساس مقدار به‌دست آمده در 85 درجه سانتی‌گراد است. با انرژی فعال‌سازی، میزان آنتالپی فعال‌سازی واکنش دنا‌توراسیون ( $\Delta H^\ddagger$ ) با رابطه  $\Delta H^\ddagger = E_a - RT$  تعیین شد. میزان  $\Delta S^\ddagger$  نیز با داشتن مقادیر  $\Delta H^\ddagger$  و  $\Delta G^\ddagger$  و با استفاده از

برای بیان کمی میزان پایداری حرارتی ترمولیزین، پارامتر  $t_{1/2}$  (نیمه عمر غیرفعال سازی) در دماهای مختلف بر اساس داده‌های شکل 1 تعیین شد (جدول 1). بر اساس داده‌ها، با افزایش دمای دماهی، نیمه عمر غیرفعال سازی آنزیم کاهش یافته است.

جدول 1 نیمه عمر غیرفعال سازی ( $t_{1/2}$ ) ترمولیزین در دماهای مختلف

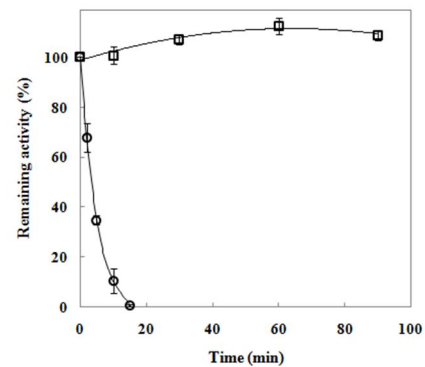
دما (درجه سانتی گراد)	80		85		90	
غلظت $\text{CaCl}_2$ (میلی مولار)	0	20	0	20	0	20
$t_{1/2}$ (دقیقه)	7	>95	3	45	1	16

با به دست آوردن ثابت سرعت غیرفعال سازی ( $k_{\text{inactivation}}$ ) ترمولیزین در 80، 85 و 90 درجه سانتی گراد، نمودار آرنیوس غیرفعال سازی حرارتی رسم شد. با استفاده از نمودار آرنیوس، نخست پارامتر انرژی فعال سازی ( $E_a$ ) به دست آمد. با داشتن انرژی فعال سازی، میزان آنتالپی فعال سازی و اکشن دانتوراسیون ( $\Delta H^\ddagger$ ) و  $\Delta G^\ddagger$  و اکشن دانتوراسیون در 85 درجه سانتی گراد و میزان  $\Delta S^\ddagger$  با استفاده از روابط گفته شده در بخش مواد و روش‌ها، تعیین شد (جدول 2).

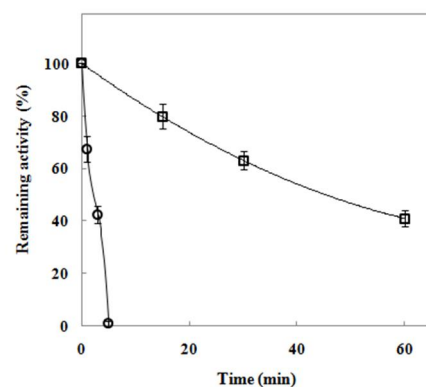
جدول 2 پارامترهای ترمودینامیکی غیرفعال سازی حرارتی آنزیم ترمولیزین در 85 درجه سانتی گراد

غلظت کلسیم (میلی مولار)	$k_{\text{inactivation}}$ ( $\text{s}^{-1} \times 10^3$ )	$E_a$ (kcal/mol)	$\Delta H^\ddagger$ (kcal/mol)	$\Delta G^\ddagger$ (kcal/mol)	$\Delta S^\ddagger$ (cal/mol.K <sup>-1</sup> )
0	387	57/4	56/7	21/2	415
20	6	103/6	102/9	24/1	920/6

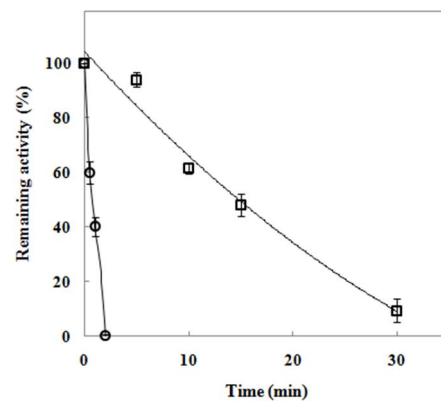
2-3- اثر pH اسیدی بر فعالیت ترمولیزین  
فعالیت آنزیم ترمولیزین در pH=3 به عنوان یک pH شاخص اسیدی سنجیده شد. نتایج سنجش فعالیت آنزیم



(الف)



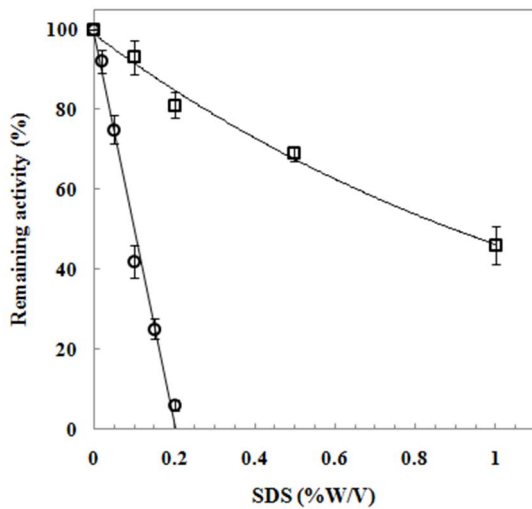
(ب)



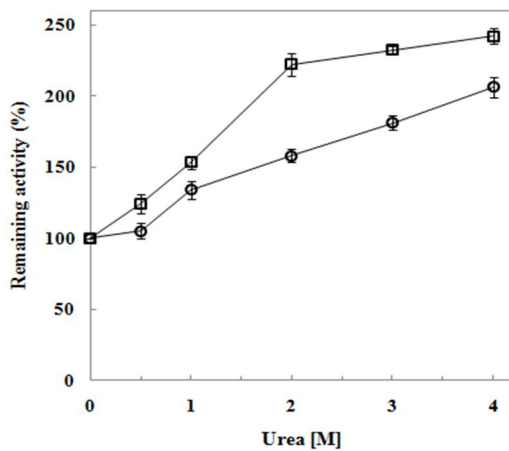
(ج)

شکل 1 غیرفعال سازی حرارتی آنزیم ترمولیزین در 80،

(ب) 85 و (ج) 90 درجه سانتی گراد و در غلظت‌های 0 (○) و 20 (□) میلی مولار کلسیم، میزان خطای استاندارد پس از دو تکرار، کمتر از 5 درصد بوده است.

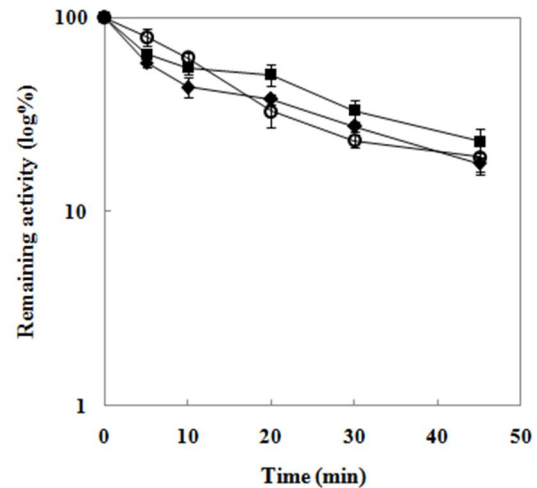


شکل 3 اثر درصدهای مختلف SDS بر فعالیت ترمولیزین در غلظت‌های 0 (○) و 20 میلی‌مولار کلسیم. میزان خطای استاندارد پس از دو تکرار، کمتر از 5 درصد بوده است.



شکل 4 اثر غلظت‌های مختلف اوره بر فعالیت ترمولیزین در غلظت‌های 0 (○) و 20 میلی‌مولار کلسیم. میزان خطای استاندارد پس از چهار تکرار، کمتر از 5 درصد بوده است.

در غلظت‌های مختلف کلسیم در شکل 2 آمده است. نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم در غلظت‌های مختلف کلسیم، تفاوت معناداری ندارد.



شکل 2 اثر pH = 3 بر روی فعالیت ترمولیزین در غلظت‌های 0 (○)، 2 (◆) و 10 میلی‌مولار کلسیم. میزان خطای استاندارد پس از دو تکرار کمتر از 5 درصد بوده است.

### 3-3- اثر دنا تورانت‌ها بر روی فعالیت ترمولیزین

اثر دو دنا تورانت SDS و اوره بر فعالیت ترمولیزین در شکل 3 و 4 دیده می‌شود. SDS با غلظت 0/2 درصد در نبود کلسیم، فعالیت آنزیم را به صفر رساند، در حالی که در غلظت 1 درصد SDS و در حضور کلسیم 20 میلی‌مولار، 46 درصد فعالیت باقی‌مانده دیده شد. در غلظت‌های مختلف اوره، فعالیت آنزیم نه تنها کاهش نداشت، بلکه با افزایش غلظت اوره تا 4 مولار، فعالیت آنزیم افزایش یافت؛ به گونه‌ای که افزایش فعالیت دیده شده در حضور کلسیم، اندکی بیشتر بود.

خارج سلولی، 4 جایگاه اتصال کلسیم Ca1-Ca4 دارد. اعتقاد بر این است که در این میان، جایگاه Ca3 تمایل کمتری برای اتصال به کلسیم دارد و همین جایگاه است که مهم ترین نقش را در آنزیم های ترمولیزین باسیلوسی بر عهده دارد [7، 13].

در این پژوهش، بررسی پایداری حرارتی در حضور و نبود کلسیم، نشان داد که پایداری به شدت تحت اثر کلسیم قرار می گیرد. عامل ناپایداری حرارتی در دماهای بالا، پدیده اتولیز است [8]. به نظر می رسد که وصل نشدن کلسیم به جایگاه Ca3 موجب افزایش پویایی پروتئین در این جایگاه شده و غیرفعال شدن سریع آنزیم در دماهای بالا را به دنبال دارد؛ در حالی که در حضور کلسیم، احتمال اتصال به این جایگاه، افزایش یافته و یون کلسیم با استحکام بخشیدن به این ناحیه، آنزیم را از اتولیز محافظت می کند. برای نمونه،  $t_{1/2}$  در دمای 85 درجه در حضور کلسیم، 15 برابر بیشتر از عدم حضور کلسیم است.

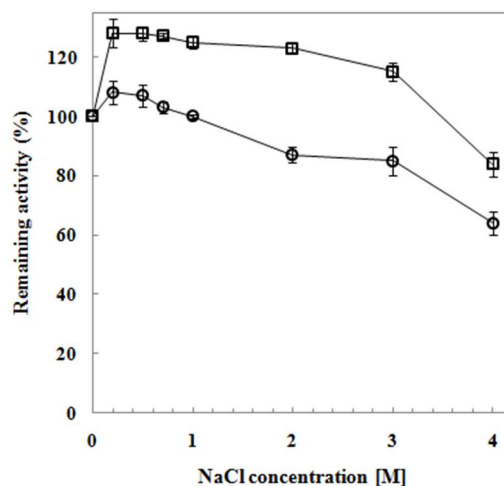
در پایداری pH، تفاوت بین دو حالت حضور و نبود کلسیم، معنی دار نیست و این موضوع پیشنهاد می کند که سازوکارهای دناتوراسیون pH با دناتوراسیون گرمایی متفاوت است. به عبارتی، اتصال کلسیم به جایگاه Ca3، در پایداری آنزیم نسبت به pH های اسیدی نقش چندانی ندارد.

در مورد اثر کلسیم بر پایداری آنزیم در حضور دناتورانت SDS، نتایج همانند دناتوراسیون گرمایی است. بررسی های پیشین روی آنزیم شبه-ترمولیزین به دست آمده از باسیلوس استئاروترموفیلوس هم نتایج مشابهی را نشان داده است [14]؛ به گونه ای که با مهندسی پروتئین، پایداری دمایی و پایداری نسبت به SDS، همزمان در این آنزیم افزایش یافته است. پیشنهاد می شود که هسته

### 3-4- اثر غلظت های مختلف NaCl بر روی فعالیت

#### ترمولیزین

در فرایند ساخت پپتید با ترمولیزین، محیط واکنش، غلظت بالای NaCl دارد [11]؛ بنابراین، پایداری ترمولیزین در حضور این نمک اهمیت زیادی دارد و مورد توجه است. در این بخش، اثر غلظت های مختلف NaCl بر فعالیت ترمولیزین، در حضور و نبود کلسیم بررسی شد. همان گونه که در شکل 5 دیده می شود، در حضور و نبود کلسیم، فعالیت آنزیم در غلظت های پایین نمک، افزایش، اما در غلظت های بالای نمک با کاهش روبرو می شود. در همه ی غلظت های نمک، فعالیت ترمولیزین در حضور کلسیم بیش از نبود آن است.



شکل 5 اثر غلظت های مختلف NaCl بر فعالیت ترمولیزین در غلظت های 0 (○) و 20 (□) میلی مولار کلسیم. میزان خطای استاندارد پس از چهار تکرار کمتر از 5 درصد بوده است.

### 4- بحث

کلسیم در پایداری آنزیم ها به ویژه آنزیم های خارج سلولی، نقش مهمی دارد. ترمولیزین به عنوان یک پروتئاز

- [3] Ogino, H., Yokoo, J., Watanabe, F., Ishikawa, H. (2000) Cloning and Sequencing of a Gene of Organic Solvent-Stable Protease Secreted From *Pseudomonas aeruginosa* PST-01 and Its Expression in *Escherichia coli*. *Biochemical Eng J.* 5., 191-200
- [4] Doukyu, N., Ogino, H. (2010) Organic solvent-tolerant enzymes. *Biochem. Eng. J.* 48., 270-282
- [5] Anwar, A., Saleemuddin, M. (1998) Alkaline Protease: A Reveiw, *Bioresource Technol.* 64., 175-183
- [6] Priest, F. G. (1989) in *Biotechnology Handbooks*, Plenum Press, New York and London, vol. 2, PP 293-320
- [7] Matthews, B. W. (1988) Structural basis of the action of thermolysin and related zinc peptidases. *Acc. Chem. Res.* 21., 333-340
- [8] Dahlquist, F. W., Long, J. W., Bigbee, W. L. (1976) Role of calcium in the thermal stability of thermolysin. *Biochemistry.* 15., 1103-1111
- [9] Endo, S. (1962) Studies on protease produced by thermophilic bacteria. *J. Ferment. Technol.* 40., 346-353
- [10] Furukawa, S. H., Hasegawa, K., Fuke, I., Kittaka, K., Nakakoba, T., Kamiya, N., Goto, M. (2012) Enzymatic synthesis of Z-aspartame in liquefied amino acid substrates. *BIOCHEMICAL ENGINEERING JOURNAL.* 70., 84-87
- [11] Fernandez, M. M., Margot, A. O., Falender, C. A., Blanch, H. W., Clark, D. S. (1995) Enzymatic synthesis of peptides containing unnatural amino acids. *Enzyme and Microbial Technology.* 17., 964-971

دنا‌توراسیون پروتئین در هر دو نوع پدیده دنا‌توراسیون حرارتی و دنا‌توراسیون با SDS، بخشی یگانه از پروتئین است. نتیجه جالب توجه این پژوهش، اثر اوره بر فعالیت آنزیم است. نتایج نشان داده است که در هر دو حالت حضور و نبود کلسیم، اوره موجب افزایش فعالیت آنزیم می‌شود. در حالی که انتظار می‌رود افزایش غلظت اوره به‌عنوان یک دنا‌توره‌کننده، موجب کاهش فعالیت آنزیم شود. پیشنهاد می‌شود که اوره، با تأثیری که روی کارژین، به‌عنوان یک پیش‌ماده پروتئینی دارد، باعث دسترسی آسان‌تر آنزیم به جایگاه‌های برش پیش‌ماده شده و بدین ترتیب، فعالیت آنزیم افزایش می‌یابد.

در مورد اثر نمک NaCl بر پایداری آنزیم، نتایج نشان داد که پایداری ترمولیزین در حضور غلظت‌های مختلف نمک، کاهش چشم‌گیری نداشته و تفاوت اندکی میان حالات حضور و نبود کلسیم دیده می‌شود، به گونه‌ای که می‌توان گفت در نبود کلسیم نیز، آنزیم فعالیت خود را حفظ می‌کند؛ بنابراین، دلیل حفظ پایداری در غلظت‌های NaCl، حضور کلسیم نیست.

## 5- سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه گیلان به خاطر حمایت مالی و فراهم کردن امکانات آزمایشگاهی، بسیار سپاسگزارند.

## 6- مراجع

- [1] Gupta, M. N., Roy, I. (2004) Enzymes in organic media. Forms, functions and applications. *Eur. J. Biochem.* 271., 2575-2583
- [2] Leatherbarrow, R. J., Fersht, AR. (1986) Protein Engineering. *Protein Engin.* 1., 7-16

- [14] van den Burg, B., Vriend, G., Veltman, O. R., Venema, G., Eijssink, V. G. H. (1998) Engineering an enzyme to resist boiling. Proc. Natl. Acad. Sci. 95, 2056-2060
- [12] Trusek-Holownia, A. (2003) Synthesis of ZAlaPheOMe, the precursor of bitter dipeptide in the two-phase ethyl acetate-water system catalysed by thermolysin. Journal of Biotechnology. 102, 153-163
- [13] Weaver, L. H., Kester, W. R., Ten Eyck, L. F., Matthews, B. W. (1976) Structure and stability of thermolysin, in: Symposium on enzymes and proteins from thermophilic microorganisms, (Zuber ed) Birkhauser-Verlag, Basel, pp. 31