

مطالعه پایداری ساختاری آنزیم پپسین در حضور نانوذرات اکسیدروی و اکسید آهن

بهزاد شارقى*، کلثوم شهدادنزاد و هما محمدی

شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، دانشکده علوم پایه، گروه بیوشیمی

تاریخ دریافت: ۹۳/۸/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۲۴

چکیده

آنزیم پپسین خوگ A (EC 3.4.23.1) متعلق به خانواده آسپارتیک پروتئازها است، و به صورت زیموژن که پپسینوژن نام دارد ترشح می‌شود، فعال‌شدن پپسینوژن در مقادیر pH بین ۱ و ۴ اتفاق می‌افتد. پپسین شامل یک صورتبندی دو لوبی با دو رزیدو آسپارتیک کاتالیتیکی (Asp^{۲۱۵} و Asp^{۳۲}) که در دو طرف جایگاه فعال می‌باشد و ساختار آن غالباً صفحه بتا و رندوم کویل با ماریچ آلفا محدود می‌باشد. پپسین پیوندهای پپتیدی بین آمینواسیدهای هیدروفوبیک و ترجیحاً آروماتیک از قبیل تریپتوفان، فنیل آلانین و تیروزین را هیدرولیز می‌کند. با توجه به اهمیت آنزیم پپسین به عنوان یک آنزیم صنعتی در صنایع غذایی و کاربردهای نانوذرات در صنعت اثر نانوذرات اکسید مس و اکسید روی را بر روی پایداری ساختاری پپسین بررسی گردید. این مطالعه با استفاده از بافر گلیسین-اسیدکلریدریک (۰/۱ مولار) با pH=۲ و در دامنه دمایی ۳۰۳ تا ۳۶۳ درجه کلون انجام شد. پایداری پپسین در حضور نانوذرات اکسید روی و اکسید آهن تغییر نکرد. قدرت برهمکنش الکتروستاتیک و هیدروژنی بین آنزیم پپسین و نانوذرات اکسیدروی و اکسید آهن در دگرگون شدن پپسین کم بوده است.

واژه‌های کلیدی: پپسین، پایداری ساختاری، نانوذرات اکسیدروی و اکسید آهن، دگرگون شدن

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۳۱۰۹۳۷۶۴، پست الکترونیکی: b_shareghi@yahoo.com

مقدمه

می‌برند و از این طریق در درمان بیماری آلزایمر مؤثر می‌باشند (۴). آنزیم پپسین خوگ A (E_{۳,۴,۲۳,۱})، متعلق به خانواده آسپارتیک پروتئازها است. پپسین به صورت زیموژن که پپسینوژن نام دارد ترشح می‌شود (۱۳). همانند دیگر زیموژنهای آسپارتیک معده، فعال‌شدن پپسینوژن در مقادیر pH بین ۱ و ۴ اتفاق می‌افتد (۸). پپسین شامل یک صورتبندی دو لوبی با دو رزیدو آسپارتیک کاتالیتیکی (Asp^{۲۱۵} و Asp^{۳۲}) که در دو طرف جایگاه فعال می‌باشد و ساختار آن غالباً صفحه بتا و رندوم کویل با ماریچ آلفا محدود می‌باشد (۱۴). پپسین پیوندهای پپتیدی بین آمینواسیدهای هیدروفوبیک و ترجیحاً آروماتیک از قبیل تریپتوفان، فنیل آلانین و تیروزین را هیدرولیز می‌کند (۵ و ۶).

فناوری نانو یکی از مدرن‌ترین فناوریهای روز دنیاست که دارای خصوصیات منحصر به فرد و در تمام زمینه‌های علم و فناوری کاربرد دارد (۱۰). فناوری نانو در پزشکی از جمله دارورسانی، مواد کاشتنی در بدن، جراحی، وسایل تشخیصی، درمان سرطانها کاربردهای زیادی دارد (۱۶ و ۱۵). اخیراً از نانوذرات مغناطیسی مانند نانوذره اکسیدروی استفاده‌های زیادی می‌شود برای مثال در تصویربرداری رزونانس مغناطیسی MRI (Magnetic Resonance Imaging)، افزایش دما (hyperthermia) برای درمان تومور، رساندن دارو و ... کاربرد زیادی دارند. همچنین مشخص شده است که بعضی از نانوذرات مغناطیسی مانند نانوذره اکسید آهن، از تشکیل تجمعات آمیلوئیدی (مثلاً آمیلوئید بتای لیزوزیم) جلوگیری می‌کنند و یا تجمعات تشکیل شده آمیلوئیدی را از بین

منحنیهای دگرگون‌ساز در حضور نانوذره اکسید روی در طول موج ۲۸۰ نانومتر با استفاده از محلولهای پپسین با غلظت ۰/۱۳۸ میلی گرم بر میلی لیتر به دست آمده است.

بررسی پایداری حرارتی آنزیم پپسین در حضور غلظتهای مختلف نانوذره اکسید آهن در دامنه حرارتی ۳۰۳ تا ۳۶۳ درجه کلونین: از بافر گلايسين-اسیدکلریدریک با pH=۲ در غلظت ۰/۱ مولار و غلظتهای مختلف نانوذره اکسید آهن (۰ تا ۰/۷ میکروگرم بر میلی لیتر) استفاده شد. منحنیهای دگرگون‌ساز در حضور نانوذره اکسید آهن در طول موج ۲۸۰ نانومتر با استفاده از محلولهای پپسین با غلظت ۰/۱۳۸ میلی گرم بر میلی لیتر به دست آمده است.

نتایج و بحث

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 زیر 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 می‌باشند K_{eq} یا ثابت تعادل از رابطه زیر بدست می‌آید:

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

تغییرات انرژی آزاد گیبس نیز از این رابطه محاسبه می‌شود:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_{eq} = -RT \ln [F_U / (1 - F_U)] = -RT \ln [(A_N - A) / (A - A_U)] \quad (3)$$

در این رابطه، R ثابت گازها می‌باشد و برابر با ۸/۳۱۴ است و T دما بر حسب کلونین می‌باشد.

T_m یا دمای ذوب یک آنزیم، دمایی است که در آن ΔG° برابر با صفر است.

نمودارهای ۱ و ۲ تغییرات کسر دگرگون‌سازی علیه دما در غلظتهای مختلف نانوذرات اکسیدروی و اکسید آهن در

مواد دگرگون‌کننده پروتئین، سبب از هم گسیختن ساختمان دوم، سوم و چهارم می‌شوند بنابراین مواد دگرگون‌کننده سبب تخریب تمامی ترتیبهای ساختمان پروتئین به جز ساختمان اولیه شده و فعالیت بیولوژیک آن را از بین می‌برند (۱۱). 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. فرایند دگرگون‌سازی پروتئینها برای مطالعه نیروهای تعیین‌کننده ساختمان سوم حائز اهمیت است. استفاده دیگر از مطالعات دگرگون‌سازی مطالعه نیروهای مؤثر و نقش انواع میان‌کنشها در جایگاه فعال آنزیم است (۷).

با توجه به اهمیت آنزیم پپسین به عنوان یک آنزیم صنعتی در صنایع غذایی از جمله تهیه پنیر، نوشابه و در چاشنیهای غذایی، و همچنین کاربردهای نانوذرات در صنعت، در این تحقیق پایداری دمایی پپسین در حضور نانوذرات اکسید روی و اکسید آهن مورد بررسی قرار گرفت.

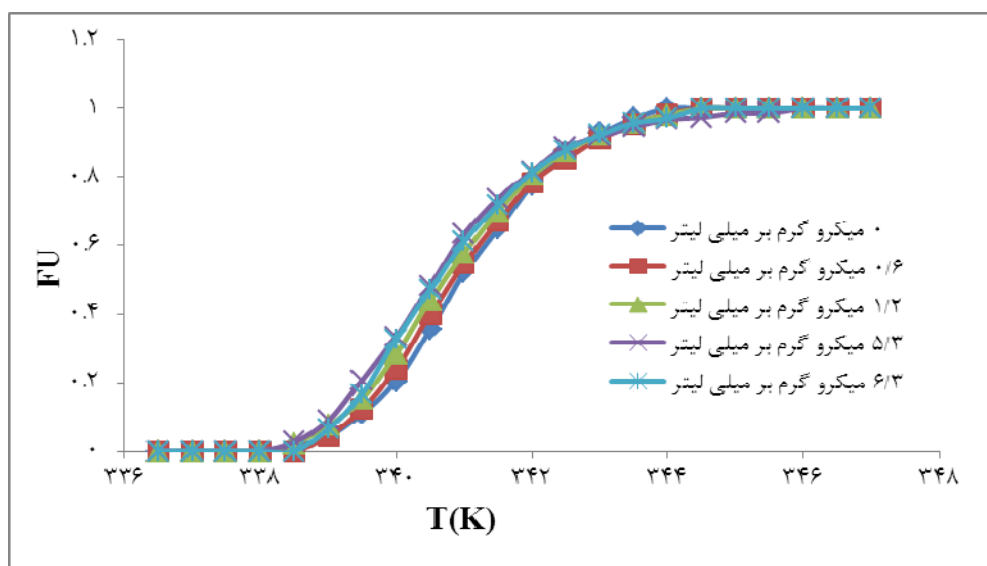
مواد و روشها

در این مطالعه از آنزیم پپسین خوک (محصول شرکت سیگما)، بافر گلايسين-اسیدکلریدریک با pH=۲ در غلظت ۰/۱ مولار و نانوذرات اکسیدروی (اندازه ۱۴-۱۰ نانومتر) و اکسید آهن (اندازه ۱۰ نانومتر) (محصولات شرکت سیگما) و از دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Vis مدل فارماسیا-۴۰۰۰، جهت اندازه‌گیری استفاده شده است.

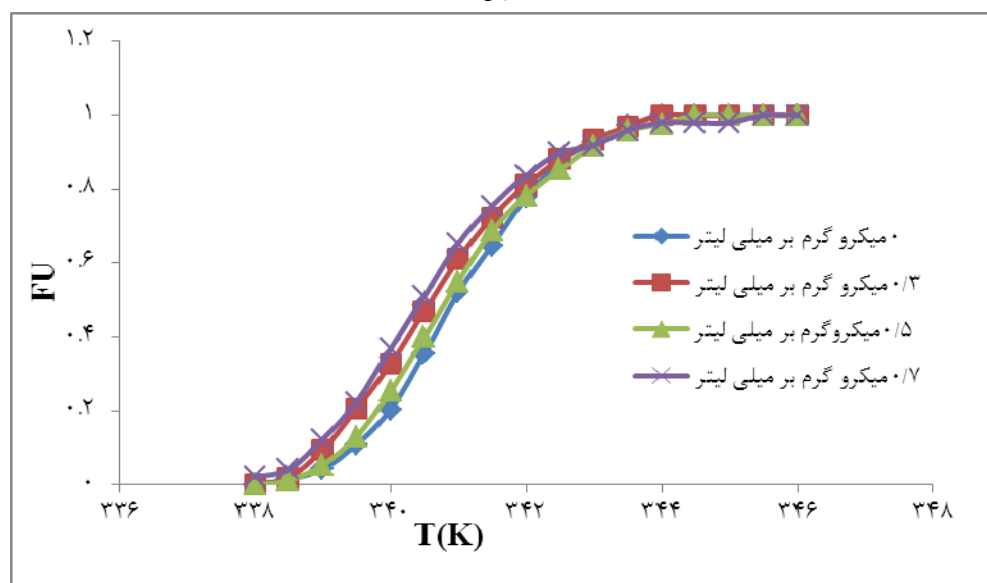
بررسی پایداری حرارتی آنزیم پپسین در حضور غلظتهای مختلف نانوذره اکسیدروی در دامنه حرارتی ۳۰۳ تا ۳۶۳ درجه کلونین: از بافر گلايسين-اسیدکلریدریک با pH=۲ در غلظت ۰/۱ مولار و غلظتهای مختلف نانوذره اکسید روی (۰ تا ۶/۳ میکروگرم بر میلی لیتر) استفاده شد.

در نمودارهای ۳ و ۴ تغییرات ΔG° علیه دما در غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسیدروی و اکسید آهن در $\text{pH}=2$ مشاهده می‌شود. در این نمودارها دیده می‌شود که با افزایش غلظت نانوذرات اکسیدروی و اکسید آهن، T_m آنزیم تقریباً تغییر نکرده است و در نتیجه پایداری حرارتی آن تقریباً ثابت مانده است.

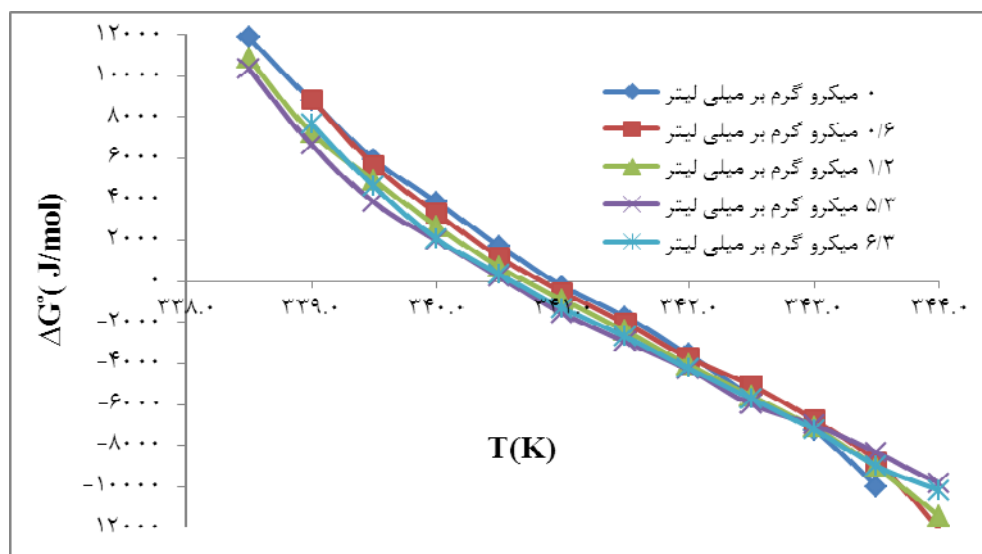
$\text{pH}=2$ را نشان می‌دهند. همان‌طور که در این نمودارها دیده می‌شود، با افزایش غلظت نانوذرات اکسیدروی و اکسید آهن، منحنی‌های دگرگون‌سازی برای آنزیم پپسین تقریباً تغییر پیدا نکرده است یعنی هرچه غلظت نانوذرات اکسیدروی و اکسید آهن افزایش می‌یابد، آنزیم پپسین تقریباً در همان دما دگرگون می‌شود.



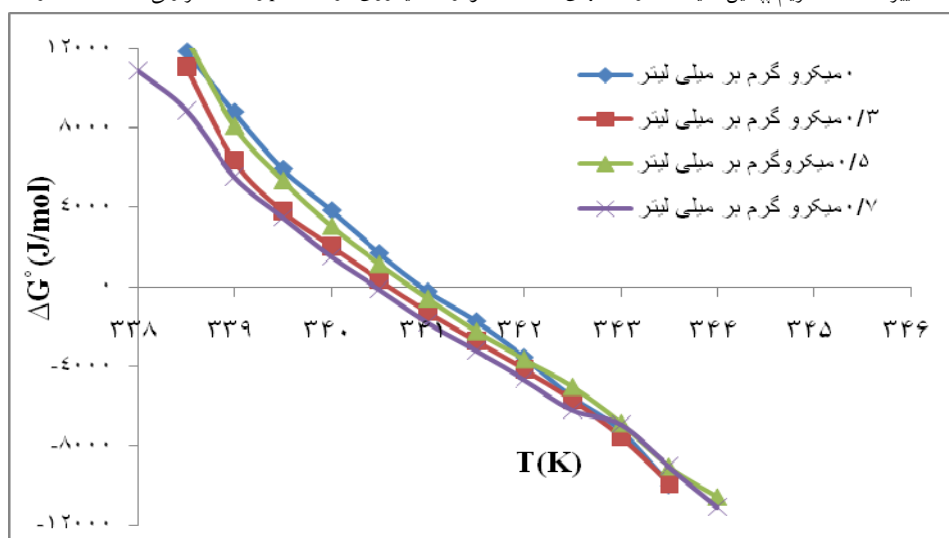
نمودار ۱- تغییرات F_U (کسر دگرگون‌سازی) آنزیم پپسین علیه دما در غلظت‌های مختلف نانوذره اکسیدروی در $\text{pH}=2$ و دامنه حرارتی 30.3 تا 36.3 درجه کلون



نمودار ۲- تغییرات F_U (کسر دگرگون‌سازی) آنزیم پپسین علیه دما در غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید آهن در $\text{pH}=2$ و دامنه حرارتی 30.3 تا 36.3 درجه کلون



نمودار ۳- تغییرات ΔG° آنزیم پیپسین علیه دما در غلظت‌های مختلف نانوذره اکسیدروی در $pH=2$ و دامنه حرارتی 30.3 تا 36.3 درجه کلوین



نمودار ۴- تغییرات ΔG° آنزیم پیپسین علیه دما در غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید آهن در $pH=2$ و دامنه حرارتی 30.3 تا 36.3 درجه کلوین

این وجود نانوذرات به خاطر اندازه کوچکشان از طریق استنشاق، هضم، نفوذ پوستی یا تزریق وارد بدن می‌شوند و باعث ایجاد آسیب فیزیکی یا القای پاسخ التهابی زیان باری در بدن خواهند شد. در چندین مطالعه نشان داده شده‌است که نانوذرات می‌توانند از سد خونی-مغزی عبور کنند و وارد سیستم عصبی مرکزی (CNS) شوند. همچنین استرس اکسیداتیو ایجاد شده از طریق نانوذرات باعث از بین رفتن لیپیدها، کربوهیدرات‌ها، پروتئینها و DNA خواهد

در طی چند سال اخیر، مشخص شده‌است که نانومواد کاربردهای زیادی در صنایع دارند. برای مثال، این نانومواد در کرمهای ضد آفتاب به منظور جذب نور UV استفاده می‌شوند و یا در خمیر دندان و رنگها برای تثبیت رنگ سفید به مدت طولانی، به کار می‌روند، تعدادی از آنها نیز در صنعت الکترونیک مورد استفاده قرار می‌گیرند. علاوه بر این نانومواد کاربردهای زیادی در پزشکی، لوازم آرایشی، وسایل ورزشی، سلولهای سوختی و دیگر صنایع دارند. با

نشان داده‌اند که وقتی لیزوزیم بر روی سطح نانوذره مغناطیسی اکسید آهن جذب می‌شود، محتوای صفحه بتای آن از ۲۵/۴۲ درصد به ۲۷/۴۹ درصد افزایش می‌یابد و محتوای آلفا-هلیکس آن نیز از ۱۵/۹ درصد به ۲۴/۲۹ درصد افزایش پیدا می‌کند. برعکس، محتوای رندوم‌کوئل و T -ترن کاهش می‌یابد (۱۷).

در مطالعه ای که اثر نانوذره TiO_2 را بر روی لیزوزیم بررسی کردند نشان داده شده است که اثر TiO_2 روی ساختار دوم لیزوزیم اثر می‌گذارد به این صورت است که میزان آلفا هلیکس آنزیم را به شدت کاهش می‌دهد ولی بتا شیت را افزایش می‌دهد و پیچ-بتا را همراه با رندوم کوئله‌ها کاهش می‌دهد. با نزدیک شدن لیزوزیم به سطح TiO_2 هیدروژن باندهایی از نوع $N-H \dots O$, $O-H \dots O$ تشکیل می‌شوند. دلیل این تغییرات گسترده بر روی ساختمان دوم لیزوزیم این است که تعداد زیادی از گروه‌های زنجیره‌های قطبی به TiO_2 باند هستند لیزوزیم دچار پیچ خوردگی و تغییر ساختار زنجیره‌ها می‌شود که از این رو هیدروژن باندهای آلفا هلیکسهای داخلی از بین می‌روند (۲۲).

در مطالعه ای که اثر نانوذره TiO_2 را بر روی پپسین بررسی کردند نشان دادند که نانو TiO_2 ، β -sheet و β -turn را کاهش می‌دهد و همچنین لوپ β -hairpin را که از جایگاه فعال محافظت می‌کند، تخریب می‌نماید. نانو TiO_2 یک اثر اتصال‌ی قوی دارد و می‌تواند $-OH$ در سطح ذرات در شرایط آبی تولید کند. اثر اتصال‌ی و تجمع $-OH$ ممکن است سبب تغییر در قطبیت پپسین و ساختار جایگاه فعال شود، به این صورت منجر به کاهش فعالیت پپسین شود. برهمکنش بین نانو TiO_2 و پپسین بیشتر الکتروستاتیک، همراه با اتصالات هیدروفوبیک می‌باشد. برهمکنش نانو TiO_2 با پپسین از نوع غیرکوالان است. اتصال غیر-کوالان، شامل نیروهای الکتروستاتیک، اتصالات هیدروفوبیک و پیوند هیدروژنی، اغلب ضعیف و غیر-

شد که در این بین، پروکسیداسیون لیپید، بیشترین آسیب را به بدن وارد می‌کند چون سبب می‌شود که در غشای سلول تغییراتی ایجاد شود (۲۰ و ۱۹). از نانوذرات اکسیدروی در زمینه‌های متعددی از جمله در پوشش‌های رسانای اکسیدی با قابلیت هدایت بالا برای سلول‌های خورشیدی، حسگرهای گازی، آشکار سازهای نوری ماوراء بنفش، جاذب شیمیایی، کاتالیزتهایی برای هیدروژن دار کردن در فاز مایع، کاتالیزتهایی برای تخریب نوری به جای نانو ذره‌های تیتانیوم، ساخت نیمه هادیها، فیلترکننده‌های اشعه ماوراء بنفش و در زمینه‌های علوم پزشکی و دارویی به عنوان یکی از پرکاربردترین نانوذرات برای مقابله با عفونت‌های بیمارستانی ناشی از باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی استفاده می‌شود (۱).

نانوذرات از جمله اکسید کادمیوم در طراحی حسگرهای زیستی نیز کاربرد دارند، نقش مؤثر نانوذرات در حسگرهای زیستی افزایش سرعت انتقال الکترون بین گونه احیاء و اکسایش می‌باشد (۲).

در مطالعه ای که اثر نانوذره SiO_2 را بر روی آنزیم لیزوزیم بررسی کردند نشان دادند با افزایش غلظت نانوذره SiO_2 میزان آلفا هلیکس لیزوزیم نسبت به آنزیم طبیعی کمتر می‌گردد. علاوه بر این با افزایش سایز نانوذره SiO_2 نیز میزان آلفاهلیکس لیزوزیم کاهش می‌یابد (۱۸). نانوذره SiO_2 دارای بار منفی است و از طریق برهمکنش الکتروستاتیک با لیزوزیم واکنش می‌دهد و سبب باز شدن تاخوردگی آنزیم می‌شود و ساختار دوم لیزوزیم از بین می‌رود میزان آلفا هلیکس کم شده ولی پیچ‌های تصادفی زیادی می‌شوند، همچنین محتوای صفحه بتا کمی افزایش می‌یابد (۲۱). در مطالعه‌ای که اثر نانوذرات اکسیدروی بر روی پروتئین میوگلوبین بررسی شده، نشان داده شده است که جزء آلفاهلیکس میوگلوبین کاهش می‌یابد اگرچه حتی در حضور بیشترین غلظت نانوذرات اکسیدروی ساختار مارپیچی میوگلوبین حفظ می‌شود (۹). آزمایشات مختلف

غلظت نانوذره اکسیدروی و اکسید آهن افزایش می‌یابد، آنزیم پپسین تقریباً در همان دما دگرگون می‌شود. با توجه به اینکه pH ایزوالکتریک آنزیم پپسین تقریباً ۱ می‌باشد (۵). آنزیم پپسین در pHهای بالاتر از نقطه ایزوالکتریک دارای بار منفی و در pHهای پایین‌تر از آن دارای بار مثبت است. پس در نتیجه آنزیم پپسین در pH=۲ دارای بار منفی می‌باشد. از طرفی نانوذرات اکسیدروی و اکسید آهن به ترتیب دارای نقطه ایزوالکتریک ۹ و ۵/۱ هستند (۱۲). پس این نانوذرات در pH=۲ دارای بار مثبت هستند و پپسین هم که دارای بار منفی است، بنابراین نانوذرات اکسیدروی و اکسید آهن از طریق برهمکنش الکتروستاتیک و همچنین از طریق پیوند هیدروژنی در صورتی که زاویه و فاصله بین آنها به اندازه‌ای باشد که برای تشکیل پیوند هیدروژنی مجاز باشد، به پپسین متصل می‌شوند، با توجه به نتایج به دست آمده از آزمایش می‌توان گفت که میزان برهمکنش‌های هیدروژنی و الکتروستاتیک بین نانوذرات اکسیدروی با پپسین به اندازه‌ای نبوده که سبب تغییر ساختار سه‌بعدی آنزیم و دناتوراسیون آن شود.

اختصاصی است اما ترکیبی از پیوندهای غیرکوالان ممکن است سبب تغییر صورتبندی و عملکرد پروتئین شود (۲۳).

T_m ، یک شاخص پایداری گرمایی پروتئین است، T_m بالاتر نشان دهنده پایداری بیش‌تر پروتئین است. دگرگون‌سازی پروتئین یک متد کلیدی در ترمودینامیک و آنالیز جایگاه اتصال است که می‌تواند درک و فهم را از ارتباط ساختار و عملکرد پروتئین افزایش دهد (۳). T_m یا دمای ذوب یک آنزیم، دمایی است که در آن ΔG° برابر با صفر است. که نحوه محاسبه آن در ابتدای مبحث نتایج بیان شده است. در نمودارهای تغییرات کسر دگرگون‌سازی علیه دما چنانچه نمودار به سمت دمای بیشتر شیف‌ت کند یعنی میزان پایداری آنزیم بیشتر شده است در واقع آنزیم در دمای بیشتری دگرگون می‌شود، چنانچه چنانچه نمودار به سمت دمای کمتر شیف‌ت کند یعنی میزان پایداری آنزیم کمتر شده است در واقع آنزیم در دمای کمتری دگرگون می‌شود.

همان‌طور که در نمودارهای کسر دگرگون‌سازی و تغییرات انرژی آزاد گیبس نشان داده شد با افزایش غلظت نانوذره اکسیدروی و اکسید آهن منحنیهای دگرگون‌سازی برای آنزیم پپسین تقریباً تغییر پیدا نکرده است یعنی هرچه

منابع

۱. آشننگرف، مراحم (۱۳۹۳) معرفی سویه جدید مخمری *Candida sp. strain MY2* با توان بالقوه سنتز سریع و برون سلولی نانوکریستالهای اکسید روی. مجله زیست‌شناسی، ۲۷:۲، ص. ۱۶۶-۱۵۵.
۲. رضایی زارچی، سعید، نگهداری، مسعود. ۱۳۹۳ طراحی حسگر زیستی اندازه‌گیری گلوکز با استفاده از الکتروود اصلاح شده با نانوذرات کسید کادمیوم و آنزیم گلوکز اکسیداز، ۲۷:۳، ص ۳۶۶-۳۵۴.
3. Behbehani G. R., Saboury A. A. and Taleshi E. 2008. A direct calorimetric determination of denaturation enthalpy for lysozyme in sodium dodecyl sulfate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 61(2): 224-228.
4. Bellova, A., E. Bystrenova, et al. 2010. Effect of Fe_3O_4 magnetic nanoparticles on lysozyme amyloid aggregation. *Nanotechnology* 21: 065103.
5. 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.
6. Dunn, B.M. 2001. Overview of Pepsin-like Aspartic Peptidases. *Current Protocols in Protein Science*, 21-3.
7. 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.
8. Horimoto, Y., Dee, D.R. & Yada, R.Y. 2009. Multifunctional aspartic peptidase prosegments. *New biotechnology*, 25(5): 318-324.

9. Mandal, G., Bhattacharya, S. & Ganguly, T. 2011. Mode of bindings of zinc oxide nanoparticles to myoglobin and horseradish peroxidase: A spectroscopic investigations. *Journal of Applied Physics*, 110(2): 024701-024701.
10. Mnyusiwalla, A., A.S. Daar, et al. 2003. Mind the gap': science and ethics in nanotechnology. *Nanotechnology* 14: R9.
11. Murray, K., Rodwell, V., Bender, D., Botham, K. M., Weil, P. A. & Kennelly, P. J. 2009. *Harper's Illustrated Biochemistry*. 28, New York: McGraw-Hill.
12. Norouzi, P., Ganjali, H., Larijani, B., Ganjali, M.R., Faridbod, F. & Zamani, H.A. 2011. A glucose biosensor based on nanographene and ZnO nanoparticles using FFT continuous cyclic voltammetry. *International Journal of Electrochemical Science*, 6: 5189-5199.
13. 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.
14. Sielecki, A.R., Fedorov, A.A., Boodhoo, A., Andreeva, N.S. & James, M.N.G. 1990. Molecular and crystal structures of monoclinic porcine pepsin refined at 1.8 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 214(1):143-170.
15. Silva, G.A. 2004. Introduction to nanotechnology and its applications to medicine. *Surgical Neurology*, 61(3): 216-220
16. Singh, M., S. Singh, et al. 2008. Nanotechnology in medicine and antibacterial effect of silver nanoparticles. *Digest J. Nanomater. Biostructures*, 3(3): 115-122
17. Sun, J., R. Xu, et al. 2011. Conformational changes and bioactivity of lysozyme on binding to and desorption from magnetite nanoparticles. *Journal of Chromatography B* 879(13): 3053-3058.
18. Vertegel, A. A., Siegel, R. W. & Dordick, J. S. 2004. Silica nanoparticle size influences the structure and enzymatic activity of adsorbed lysozyme. *Langmuir*, 20(16):6800-6807.
19. Wang, Y., B. Wang, et al. 2011. Microglial activation, recruitment and phagocytosis as linked phenomena in ferric oxide nanoparticle exposure. *Toxicology Letters* 205(1): 26-37.
20. Xu, Z., X.W. Liu, et al. 2009. Interaction of nano-TiO₂ with lysozyme: insights into the enzyme toxicity of nanosized particles. *Environmental Science and Pollution Research* 17(3): 798-80.
21. Wu X. and Narsimhan G. 2008. Effect of surface concentration on secondary and tertiary conformational changes of lysozyme adsorbed on silica nanoparticles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins & Proteomics*, 1784(11): 1694-1701.
22. Yongli C., Xiufang Z., Yandao G., Nanming Z., Tingying Z. and Xinqi S. 1999. Conformational Changes of Fibrinogen Adsorption onto Hydroxyapatite and Titanium Oxide Nanoparticles. *Journal of colloid and interface science*, 214(1): 38-45.
23. Zhu, R.-R., Wang, W.-R., Sun, X.-Y., Liu, H. & Wang, S.-L. 2010. Enzyme activity inhibition and secondary structure disruption of nano-TiO₂ on pepsin. *Toxicology in Vitro*, 24(6): 1639-1647.

Structural study on pepsin stability in the presence of ZnO and Fe₃O₄ nanoparticles

Shareghi B., Shahdadnejad K. and Mohammadi H.

Biochemistry Dept., Faculty of Science, University of Shahrekord, Shahrekord, I.R. of Iran

Abstract

Porcine pepsin A (EC 3.4.23.1), belongs to the aspartic protease family, and is secreted as a zymogen called pepsinogen. Pepsinogen activation occurs at pH values between 1 and 4. Pepsin consists of a bilobal conformation with two catalytic aspartic residues (Asp32 and Asp215) on either side of the active site, The structure of porcine pepsin is predominantly β -strand and random coil with limited α -helix. Porcine Pepsin is most efficient cleaving peptide bonds between hydrophobic and preferably aromatic amino acids such as phenylalanine, tryptophan, and tyrosine. Because the importance of pepsin enzyme as an industrial enzyme in the food industry and nano particles functions in industry, we investigated Structural stability of pepsin in presence and absence of ZnO and Fe₃O₄ nanoparticles. This study were performed using glycine-HCl(0.1M) buffer at pH=2 and temperature range (303 to 363) K. porcine Pepsin stability Was not changed in the presence of ZnO and Fe₃O₄ nanoparticles. Strength of the electrostatic and hydrogen interactions between pepsin enzyme and ZnO , Fe₃O₄ nanoparticles Were a low level in denaturation of pepsin.

Key words: pepsin, Structural stability, ZnO and Fe₃O₄ nanoparticles, denaturation