تأثیر حلالهای آلی بر فعالیت آنزیم پروتئاز سوبتیلیزین کارلسبرگ

زهرا برکشادی، یعقوب پاژنگ* و رشید جامعی

ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۳

چکیده

پروتئازها یکی از مهم ترین آنزیمهای صنعتی هستند که به طور گسترده‌ای در صنایع غذایی، نساجی ، دارویی و چرمی و به خصوص به عنوان افزودنی در صنایع شوینده استفاده می شود. سوبتیلیزین یا سابتیلیسین (Carlsberg Subtilisin) (3.4.21.62 EC) یک سرین آلکالین پروتئاز است ، که توسط باسیلوس لیکنی فرمیس تولید می شود. تحقیقات زیادی روی پایداری پروتئاز در حلالهای آلی انجام شده است. زیرا این آنزیمها کاربردهای فراوانی در حلالهای آلی دارند. حلال آلی در سنتز پپتید سودمند است برای انحلال سوبسترا و محصول نقش دارد و باعث دستکاری سینتیک واکنش و تعادل برای افزایش عملکرد محصول می باشد. در این تحقیق فعالیت و پایداری آنزیم سوبتیلیزین در غلظت مختلف حلالهای آلی اتانول، دی‌متیل سولفواکسید و هگزان بررسی شده است .به طوری که آنزیم تحت اثر غلظت مختلف اتانول، دی‌متیل سولفواکسید(DMSO) و هگزان (۰-۶۰درصد) و غلظتهای ترکیبی ۰ تا ۱۰ درصد این ۳ حلال قرار گرفت، سپس سنجش فعالیت آنزیم با سوبسترای کازئین ۰/۶ درصد و با استفاده از معرف فولین – سیکالتو جذب در طول موج ۶۶۰ نانومتر بررسی شد. نتایج نشان می دهد که ۸۲ درصد فعالیت آنزیم سوبتیلیزین بعد از ۱ ساعت انکوباسیون آنزیم در ۱۰درصد حلال آلی در دمای ۴۰ درجه حفظ شده است. فعالیت نسبی آنزیم با افزایش غلظت حلال آلی کاهش می یابد. اثر کاهشی فعالیت آنزیم در حضور DMSO کمتر از اتانول و هگزان می باشد. حلالهای آلی بر میانکنشهای الکتروستاتیک پروتئینها اثر می گذارند چرا که ثابت دی الکتریک آنها با آب متفاوت است. به طور کلی کاهش خاصیت قطبی حلال و کاهش ثابت دی الکتریک سبب افزایش دافعه الکتروستاتیک شده و منجر به باز شدن ساختار پروتئینها می شود. از آنجایی که اتانول و هگزان اثر مهاری بیشتری بر فعالیت آنزیم سوبتیلیزین دارد اثر مهاری فعالیت آنزیم با افزایش Log P افزایش می یابد.

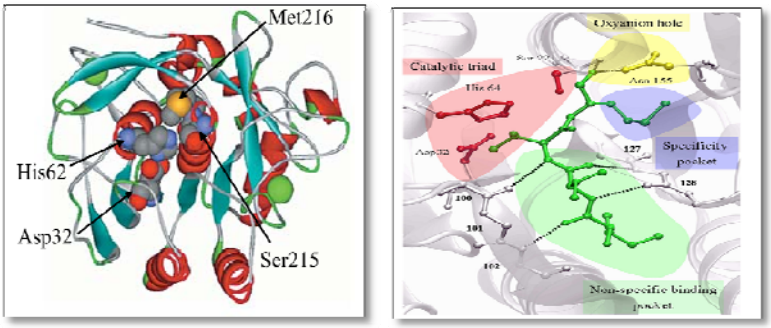
واژه های کلیدی: پروتئاز، سوبتیلیزین ، حلال آلی، اتانول ، دی‌متیل سولفواکسید،n _هگزان

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۴۱۱۹۷۳۲۹ ، پست الکترونیکی: y.pazhang@urmia.ac.ir

مقدمه

پروتئازها آنزیمهایی شکننده پیوند های پپتیدی و دارای کاربردهای تجاری هستند و یکی از مهم ترین آنزیمهای صنعتی هستند که ۳۰درصد از کل فروش آنزیمهای صنعتی را به خود اختصاص داده اند (۱۶) پروتئاز ها به طور گسترده ای در صنایع غذایی، نساجی، مواد شوینده، دارویی و چرمی و به خصوص به عنوان افزودنی در صنایع شوینده استفاده می شود. سوبتیلیزین یا سابتیلیسین (Carlsberg Subtilisin) (EC 3.4.21.62) یک سرین آلکالین پروتئاز است ، که توسط باسیلوس لیکنی فرمیس تولید می شود و از نظر فعالیت و ثبات آنها در pHهای قلیایی مورد توجه می‌باشند و به این ترتیب آنها کاربردهای فراوانی در صنایع گوناگون دارند(۱۳). سوبتیلیزین ها دارای یک باقیمانده سرین هسته دوست واقع در سایت فعال خود هستند. علاوه بر این، این پروتئازها با داشتن باقیمانده آمینواسیدی آسپارتات و هیستیدین همراه با سرین، وتشکیل شکل سه‌گانه کاتالیستی، متمایز است. اندازه سوبتیلیزین های

فعال از ۱۸ کیلو دالتون تا ۹۰ کیلو دالتون متفاوت است اما بیشتر آنها اندازه‌ای حدود ۲۷ کیلو دالتون، متشکل از ۲۶۹ تا ۲۷۵ اسید آمینه دارند (شکل ۱) (۸ و ۲۸).



شکل ۱- سایت فعال سوبتیلیزین . سه ویژگی اصلی سایت فعال با رنگ قرمز مشخص شده است(۱۳).

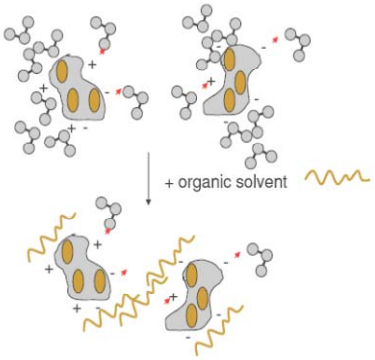
تعداد قابل توجهی از پروتئازهای قلیایی باکتریایی تجاری در دسترس هستند، از جمله سوبتیلیسین کارلسبرگ، subtilisin BPN و Savinase. با این حال، تلاشها به تولید پروتئاز های جدیدتر با کارآیی کاتالیزوری و ثبات بهتر نسبت به درجه حرارت، عوامل اکسید کننده منجر شده است (۱۴). سوبتیلیزین یکی از مهم ترین آنزیمهای صنعتی هستند که به طور گسترده ای در صنایع غذایی، نساجی، دارویی ،چرمی ، سنتز پپتید، پردازش پروتئین و دترجنتها استفاده می شود این آنزیمها از سال ۱۹۱۴به عنوان مواد افزودنی مواد شوینده به کار برده شدند و به طور گسترده‌ای در صنعت مواد شوینده استفاده می‌شوند (۱۴).

پروتئازها به عنوان بیوکاتالیست برای سنتز پپتید نیاز به پایدار شدن در حضور برخی از واکنشهای آنزیمی در حلالهای آلی دارند. و همچنین انجام واکنشهای آنزیمی در حضور حلالهای آلی چندین پیامد جذاب صنعتی دارد که برخی از آنها عبارتند از افزایش پایداری آنزیم، افزایش حلالیت سوبستراهای غیر قطبی، برگشت معادله ترمودینامیکی واکنشهای هیدرولیز، جلوگیری از واکنشهای جانبی وابسته به آب، تناوب ویژگی سوبسترا و ویژگی فضایی آن، حذف و زدودن آلودگیهای میکربی و بهبود حرارتی می باشد (شکل۲)(۲۱). از سویی دیگر استفاده از آنزیمها در محیط آلی محدودیت‌هایی دارد چون فعالیت و پایداری بیشتر آنزیمها در حلالهای آلی کاهش می یابد. انتخاب حلال مناسب در محیط کاتالیز آنزیمی از اهمیت زیادی برخوردار است. حلال نه تنها تماس مؤثرتر بین واکنش گر و آنزیم را میسر می سازد، بلکه تعیین کننده روند مراحل کار، بازیافت آنزیم و نیز استراتژیهای حذف محصولات ناخواسته از محیط می باشد (۲۴). لذا در این راستا، انتخاب و به کارگیری محیطهای ایمن و ارزان جهت کاتالیز، بسیار حائز اهمیت می باشد (۲۰). آرنولد و همکاران با آنالیز ساختاری پروتئینهای مقاوم به حلالهای آلی و بررسی نحوه اثر حلالهای آلی بر روی میانکنشهای مهم در فولدینگ پروتئین اصولی را طراحی کردند که بر اهمیت افزایش پایداری ساختاری و انطباق پذیر بودن سطح آنزیم با حلال آلی تأکید داشت (۱۰).

با وجود مزایایی استفاده آنزیم در حلال آلی به طور کلی فعالیت و پایداری آنزیم ممکن است کمتر شود . مشخص شده است که پایداری آنزیم در حلال آلی به فاکتور های مختلف مربوط هست مثل ماهیت حلال ،خواص آنزیم ، مقدار آب مورد نیاز برای کاتالیز،کنفورماسیون و پایداری آنزیم است (۲۲).

در تحقیق حاضر نیز ابتدا پایداری و فعالیت پروتئاز قلیایی سوبتیلیزین در حضور حلالهای آلی اتانول و دی متیل سولفو اکسید وn-هگزان بررسی و خصوصیات بیوشیمیایی

آنها مورد بررسی قرار گرفت و سپس فعالیت آنزیم در حضور ۳ ترکیب حلال اتانول، دی متیل سولفوکسید و هگزان ۰تا ۱۰ درصد، مطالعه شد و مکانیسم اثر حلال بر آنزیم مورد بررسی قرار گرفت.



شکل ۲- حلالهای آلی مولکولهای آب متصل به پروتئین را جدا کرده و خود به جای آنها قرار می گیرند. در نتیجه عملکرد پروتئین را تغییرمی دهند(۱۴).

پایداری آنزیم سوبتیلیزین در حلال آلی می تواند علاوه بر دید علمی ، دید صنعتی هم داشته باشد هدف از انتخاب این ۳ حلال اتانول، DMSO، هگزان و ترکیب این ۳ حلال، این موضوع بود که تحت اثر حلال قطبی و غیر قطبی (log P متفاوت) چه تغییراتی روی فعالیت آنزیم صنعتی سوبتیلیزین روی می دهد و آنزیم در این حلالهای آلی تا چه حد فعال باقی می‌ماند با توجه به اینکه DMSO حلال قطبی تری از اتانول هست و هگزان حلال غیرقطبی است. همچنین این حلالها در صنعت بیشتر از بقیه استفاده می‌شوند و حلالها بر اساس استفاده آنزیم در زمینه های تحقیقاتی انتخاب شده اند و هدف از کاربرد این سه حلال بررسی اثر سه حلال با خصلت متفاوت بر روی آنزیم بود و هدف از ترکیب آنها بررسی فعالیت آنزیم در سیستمهای چند حلالی است. زیرا وجود چند حلال می‌تواند با اثر بر روی جایگاه فعال و حلالیت سوبسترا واکنش آنزیم را تغییر دهد. و درصد های به کار برده شده بر اساس مطالعات انجام شده در گذشته بود و چون در این مطالعه درصدهای بالا باعث کاهش فعالیت آنزیم شد در ترکیب ۳ حلال از درصد پایین تر استفاده شد.همچنین در صنعت شوینده حلال آلی به عنوان حل شونده مواد شوینده به کار می‌رود و حلالها باعث حفظ ترکیب و شکل مواد شوینده مایع می شود. اتانول یک نمونه از حلالهایی است که کاهش نقطه انجماد مواد شوینده مایع می شود و همچنین اتانول باعث پایداری محصول نهایی می شود به طوری که از تخریب شکل فیزیکی مواد شوینده که به واسطه ذخیره سازی صورت می‌گیرد و از تشکیل دو فاز شدن مایع جلوگیری می‌کند (۱۲).

مواد و روشها

در این تحقیق آنزیم پروتئاز سوبتیلیزین کارلسبرگ و کازئین از شرکت سیگما تهیه شده است. بقیه مواد از جمله حلالهای مورد استفاده از شرکت مرک تهیه گردید.

تعیین فعالیت آنزیم سوبتیلیزین: برای تعیین فعالیت آنزیم سوبتیلیزین غلظت ۵۰۰ میکروگرم /میلی لیتر از آنزیم در بافرسدیم استات ۱۰ mM با(pH=۸) تهیه و سپس۴۰ میکرولیتر از آن به محیط واکنش آنزیمی حاوی ۴۶۰ میکرولیتر از محلول ۰/۶درصد کازئین در بافرفسفات ۵۰mM (pH=۸) افزوده شد تا حجم نهایی ۵۰۰ میکرولیتر گردد و به مدت ۱۰دقیقه در انکوباسیون شیکردار در دمایی ۳۷ درجه قرار گیرد، و سپس واکنش آنزیمی با محلول تری کلرواستیک اسید TCA متوقف گردید، و محلول مورد نظر به مدت ۳ دقیقه با سرعت rpm ۵۰۰۰ سانتریفیوژ شد. در اینجا قابل ذکر است که تری کلرو استیک اسید هم باعث متوقف شدن فعالیت آنزیم شده و هم قطعات بزرگ پپتیدی را که در محیط موجود می‌باشد را رسوب می‌دهد و قطعات پپتیدی کوتاه حاصل از عمل آنزیم در محلول رویی می‌ماند. سپس به محلول ۴۶۰ میکرولیتر سدیم کربنات و معرف فولین اضافه گردید، که در درجه اول با تیروزین آزاد شده از سوبسترای کازئین واکنش خواهد داد. سنجش فعالیت آنزیم توسط تعیین مقدار جذب به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در ۶۶۰nm

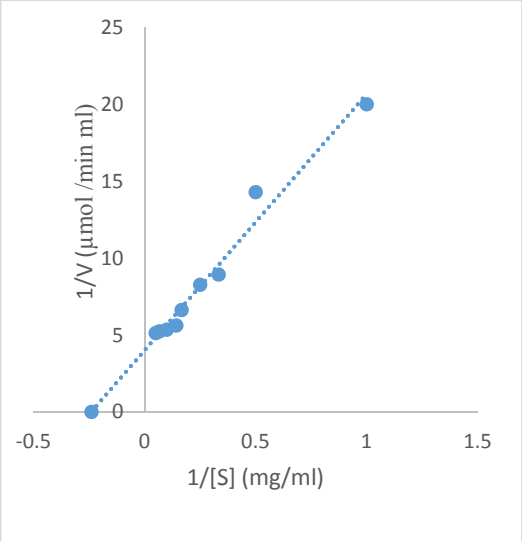
اندازه‌گیری شد. هرچقدر تیروزین تولیدی از سوبسترای کازئین بیشتر باشد، کروموفورهای بیشتری تولید شده و فعالیت پروتئاز قوی تر است. مقدار جذب و فعالیت پروتئاز در مقایسه با منحنی استاندارد تیروزین، سنجیده شد. برای به دست آوردن فعالیت آنزیمی بر حسب واحد بین اللملی (IU) ، ابتدا غلظتهای متفاوت و متوالی از ۰تا ۱۰۰میکروگرم / میلی لیتر تیروزین تهیه شد (۷غلظت متفاوت) و منحنی استاندارد تیروزین رسم گردید، پس از ثبت جذب محلولهای استاندار تیروزین و نمونه های آنزیمی، یک منحنی استاندارد (جذب علیه μmol تیروزین)رسم شد، و با کمک آن و با استفاده شیب خط منحنی ، واحد آنزیمی محاسبه گردید. بر حسب تعریف ، یک واحد آنزیمی، مقدار آنزیمی است که ۱ μmol تیروزین را در یک دقیقه آزاد کند . هنگامی که تیروزین به عنوان استاندارد استفاده می شود.

فعالیت آنزیم در حضور حلالهای آلی اتانول، دی متیل سولفواکسید، هگزان: آنزیم سوبتیلیزین در حلالهای مورد نظر در درصدهای مختلف از حلالهای اتانول، DMSO،هگزان (درصدهای تهیه شده حلالهای آلی عبارتند از : ۰،۱۰،۲۰،۳۰،۴۰،۵۰،۶۰ درصد حجمی به حجمی) تهیه شد و فعالیت آنزیم بعد از ۱ ساعت انکوباسیون آنزیم در حلال مورد نظر در دمای ۴۰ درجه مورد ارزیابی قرار گرفت. برای سنجش مقاومت آنزیم در حلال آلی ، سوبسترای مورد استفاده کازئین ۰/۶ درصد وبافر مورد استفاده فسفات(pH=۸) و زمان سنجش آنزیمی ۱۰ دقیقه می باشد، بعد از اضافه کردن باید pH محیط واکنش بررسی شده تا برابر ۸ باشد. فعالیت آنزیم به صورت درصد فعالیت باقیمانده در مقایسه با کنترل (بدون حلال آلی) گزارش گردید

فعالیت آنزیم در حضور ترکیب حلالهای آلی اتانول، دی متیل سولفواکسید و هگزان: آنزیم سوبتیلیزین در ترکیب حلالهای اتانول، DMSOو هگزان (درصد های تهیه شده حلالهای آلی عبارتند از: ۰تا ۱۰ درصد حجمی به حجمی) تهیه شد و فعالیت آنزیم بعد از ۱ ساعت انکوباسیون آنزیم در ترکیب حلال مورد نظر در دمای ۴۰ درجه مورد ارزیابی قرار گرفت، سوبسترای مورد استفاده کازئین ۰/۶ درصد وبافر مورد استفاده فسفات (pH=۸) و زمان سنجش آنزیمی ۱۰ دقیقه می باشد . بعد از اضافه کردن باید pH محیط واکنش بررسی شود تا pH= ۸ باشد. فعالیت آنزیم به صورت درصد فعالیت باقیمانده در مقایسه با کنترل (بدون حلال آلی) گزارش گردید.

نتایج

تعیین پارامترهای سنتیکی آنزیم: برای تعیین پارامترهای سنتیکی آنزیم فعالیت آنزیم در غلظتهای مختلف کازئین به دست آمد و با رسم منحنی لینویور-**برک** km آنزیم (mg/ml) ۴,۱۷۶ و Vmax آنزیم برابر با (µmol/min ml) ۰,۲۵۰ به دست آمد.

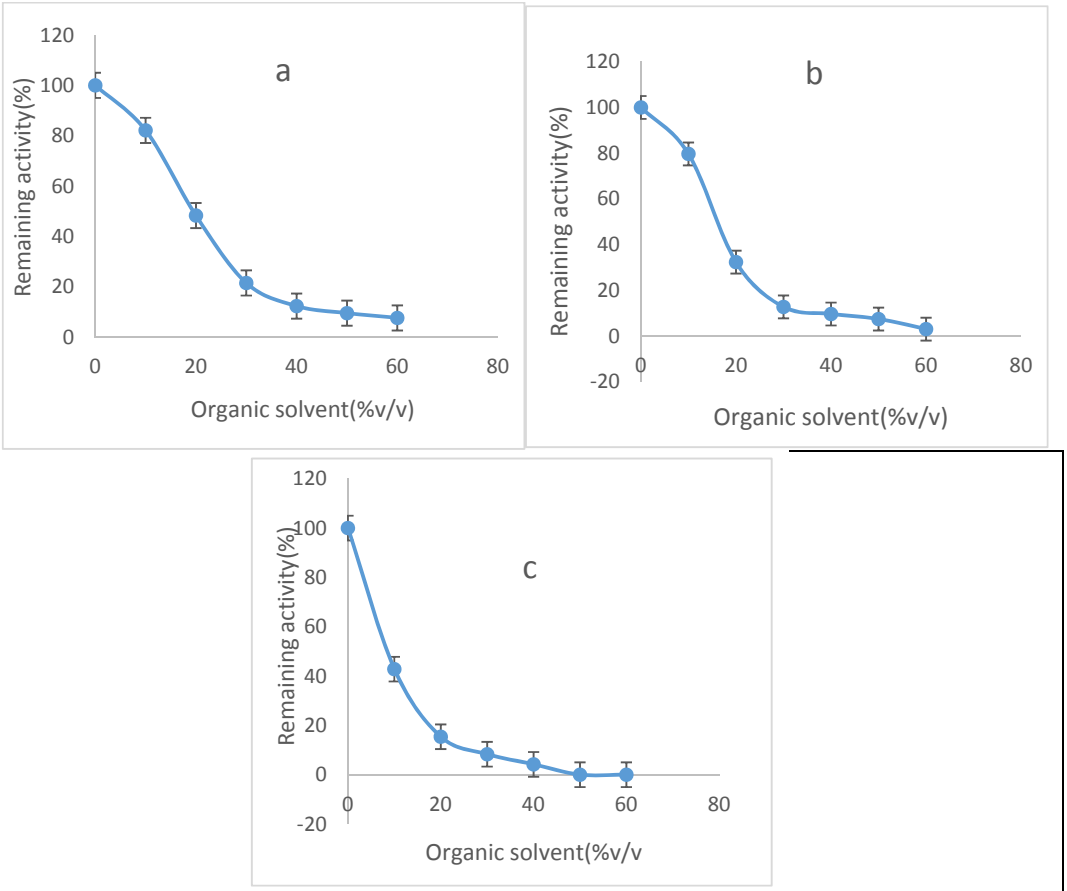


شکل۳- منحنی لینویور-**برک** آنزیم سوبتیلیزین

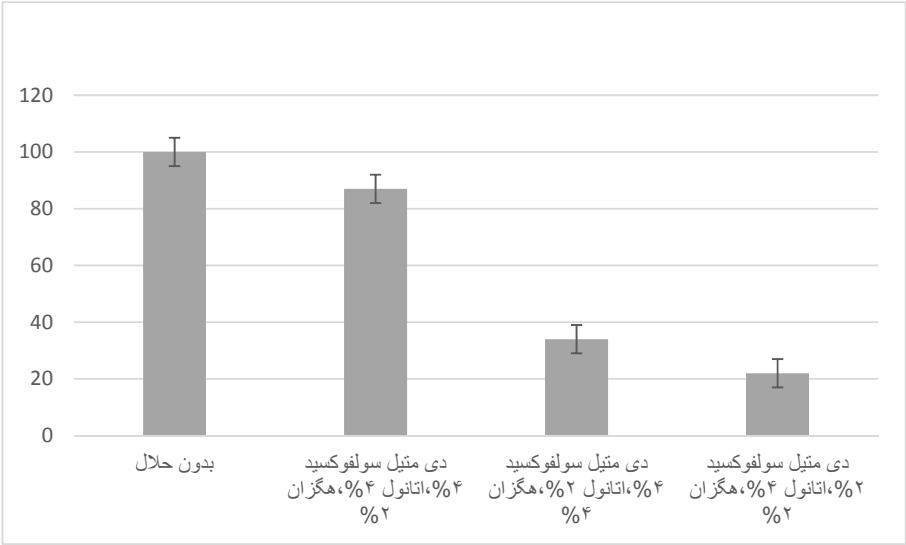
تعیین فعالیت آنزیم در حضور حلالهای آلی اتانول ، دی متیل سولفوکسید، هگزان: جهت بررسی فعالیت آنزیم سوبتیلیزین در حلالهای آلی، درصدهای مختلفی از حلالهای قطبی DMSO ، اتانول و هگزان مورد بررسی

قرار گرفت. چنانچه در شکل ۴ مشاهده می شود، از بین حلالهای آلی، DMSO نسبت به بقیه تأثیر کمتری روی فعالیت آنزیم دارد .به عنوان مثال باقیمانده فعالیت در ۲۰ درصد حلالهای آلی DMSO، اتانول و n هگزان به ترتیب ۴۸،۳۳،۱۵ درصد می‌باشد.

تعیین فعالیت آنزیم در حضور ترکیب حلالهای آلی اتانول، دی متیل سولفوکسید و هگزان: جهت بررسی فعالیت آنزیم سوبتیلیزین در ترکیب حلالهای آلی، درصدهای مختلفی از ترکیب حلالهای قطبی DMSO، اتانول و حلال ناقطبی –nهگزان از ۰تا ۱۰ درصد تهیه شد و فعالیت آنزیم مورد بررسی قرار گرفت. چنانچه در شکل ۵ مشاهده می شود، از بین حلالهای آلی، ترکیب (DMSO ۴ درصد، اتانول ۴درصد، هگزان ۲درصد) نسبت به بقیه تأثیر کمتری روی فعالیت آنزیم دارد. به طوری که باقیمانده فعالیت در این ترکیب حلالهای آلی ۸۷ درصد می‌باشد.



شکل ۴- فعالیت آنزیم سوبتیلیزین در درصد های مختلف حلالها (a) DMSO، (b) اتانول، (c) n_هگزان . همانطور که دیده می شود در حضور درصد های مختلف از حلالها فعالیت سوبتیلیزین کاهش می‌یابد. میزان کاهش فعالیت در DMSO کمتر از بقیه حلالها است. تمامی مراحل آزمایش ۳ بار تکرار شد.



شکل ۵- فعالیت آنزیم سوبتیلیزین در درصد های مختلف ترکیب حلالها .تمامی مراحل آزمایش ۳ بار تکرار شد.

حلالها بر روی خصوصیات کاتالیتیکی و پایداری آنزیمها به طور قابل توجهی اثر می گذارند در این پژوهش هیچ یک از حلالهای آلی فعالیت آنزیم را از بین نبردند و با افزایش حلال آلی میزان فعالیت آنزیم کاهش یافته است به طوری که در حضور غلظت۵۰درصد(V/V) حلال آلی فعالیت به کمتر از ۵۰ درصد کاهش یافته است و کمترین فعالیت در حضور حلال غیر قطبی _n هگزان مشاهده می‌گردد. در درصدهای بالاتر کاهش فعالیت چشمگیر است زیرا در درصد های بالاتر از حلال آلی ، آنزیم به طور توأم در اثر تخریب ساختار و مهار می‌باشد .بیشترین فعالیت در حضور DMSO مشاهده شده به طوری که در ۱۰ درصد (v/v) از DMSO، ۸۲ درصد از فعالیت آنزیم باقی مانده است.

بحث و نتیجه گیری

پروتئازها یکی از مهمترین رده از آنزیمهای هیدرولیتیک هستند که براساس فعالیت کاتالیتیک انواعی همچون متالوپروتئازها ، سرین پروتئازها و سیستئین پروتئازها و آسپارتیک پروتئازها تقسیم می شوند، تحقیقات گسترده ای در پایداری پروتئازها برروی درحلالهای آلی انجام شده است، زیرا این آنزیمها کاربردهای فراوانی درحلالهای آلی دارند.(۲)

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 می توان از روشهای پایدارسازی پروتئینها نظیر افزودنیها، مهندسی پروتئین و تغییرات شیمیایی استفاده نمود. (۱)

فعالیت آنزیمها در حلالهای آلی بنا به دلایلی همچون مهار ، تخریب ساختار و کاهش میزان فعالیت آب کاهش می یابد (۱۷). مکانیسم غیر فعال شدن نسبی آنزیم در حلالهای آلی هنوز به طور کامل مشخص نشده است. مطالعات اخیر بر روی سرین پروتئاز سوبتیلیزین (SC) نشان داده که اثر تخریبی آنزیم تحت شرایط مختلف آزمایشگاهی در حلالهای مختلف مشاهده شده است و پیشنهاد داده که این اثر به خواص فیزیکوشیمیایی حلال ، درجه حرارت واکنش ، تغییر در حالت هیدراتاسیون آنزیم که می‌تواند

تغییر در انعطاف پذیری آنزیم شود و سازوکارهای احتمالی مانند تغییر در حالت یونیزاسیون آمینواسیدهای باقیمانده آنزیم بستگی دارد (۲۶). پایداری آنزیمها یکی از پیچیده ترین مسائل در شیمی پروتئین است، مولکولهای پروتئین در محلولهای آبی به وسیله یک پوسته هیدراته احاطه می شود، که از مولکولهای آب تشکیل شده است که به سطح پروتئین می چسبند. اگر یک حلال آلی حضور داشته باشد، مولکولهای حلال تمایل دارند جایگزین مولکولهای آب در هر دو قفسه هیدراته و داخلی پروتئین شوند، بنابراین اینترکشنهای تعیین کننده آرایش فضایی آنزیم تخریب می شوند (۱۴). طبق مطالعات انجام شده قبلی نشان داده شده است که بیشتر پروتئینها در DMSO با غلظت کمتر از ۱۰درصد پایدار است (۱۵).

در این مطالعه نیز معلوم شد که DMSO در مقایسه با حلالهای دیگر مورد استفاده اثر کمتری در غیرفعال سازی آنزیم دارد (شکل۳). مکانیسم پایداری بیشتر پروتئین در DMSO به طور کامل مشخص نشده است، با این حال، تعاملات مناسب بین حلال و پروتئین می‌تواند توضیح دهنده تأثیر مثبت در پایداری ساختار پروتئین در حلالهای آبی باشد (۷). احتمالاً افزایش فعالیت پروتئازی در حضور DMSO با افزایش تداخلات هیدروفیلی درون مولکولهای پروتئین می‌باشد که باعث تغییرات مطلوب کنفورماسیون برای اینترکنش بین سایت فعال می‌باشد(۳).

مطالعات اخیردر مورد آنزیمهایی مانند لیپاز LipS ولیپاز PML نشان داده شده است که حلالهای قطبی مانند DMSO ،اتانول و متانول منجر به تغییرات کنفورماسیون در این آنزیم شده است و آن نیز باعث افزایش انعطاف پذیری این آنزیمها گردیده است، ارتباط بین انعطاف پذیری آنزیم و فعالیت کم است ، با این حال در آنزیم لیپاز LipS ، DMSO باعث افزایش انعطاف پذیری آنزیم ، افزایش پایداری آنزیم و ماندگاری فعالیت گردیده است (۲۷). بر طبق یک مکانیسم ، با افزایش غلظت الکل، ساختار سوم پروتئین بر اثرات هیدروفوبیک و میانکنشهای یونی و پیوند هیدروژنی تداخل ایجاد می‌نماید و باعث تغییر در پیوند هیدروژنی علاوه بر ناپایدار کردن ساختار سوم ، منجر به باز شدن برخی ساختارهای دوم می شود. الکلهای با زنجیره هیدروکربنی طویل تر و بدون شاخه نسبت به الکلهای کوتاه تر داری انشعاب، هیدروفوبیسیته بیشتری داشته و اثرات قوی‌تری را بر دگرگون‌سازی پروتئین اعمال می‌نماید(۴ و ۲۵).

پایداری و فعال بودن آنزیم در حلال آلی در بیوتکنولوژی سنتزی اهمیت دارد. آنزیم فعال در حلال آلی می‌تواند در صنعت برای سنتز ترکیبات با ارزش دارویی و صنعتی در حضور حلال آلی ، استفاد شود و همچنین منجر به کاربردهای فراوانی در صنایع شیمیایی، پلیمر و سنتز آنانتیومر زیستی گردد، که در حالت بدون حلال به سختی انجام می شود .به عنوان مثال درصنعت با افزودن حلال قطبی DMF به آنزیم سوبتیلیزین باعث بهبود واکنشهای آمینولیز می شود (۱۹ و ۲۳). علاوه بر این، مزیتهای دیگر استفاده از آنزیمها در حلالهای آلی از قبیل: جلوگیری از اتولیز در مورد پروتئازها ، افزایش پایداری دمایی به دلیل کاهش تحریک ساختاری، بازیابی و استفاده مجدد آنزیم حتی بدون ایموبیلیزه می‌باشد (۹).

حلالهای آلی بر میانکنشهای الکتروستاتیک پروتئینها اثر می گذارند چرا که ثابت دی الکتریک آنها با آب متفاوت است. به طور کلی کاهش خاصیت قطبی حلال و کاهش ثابت دی الکتریک سبب افزایش دافعه الکتروستاتیک شده و منجر به باز شدن ساختار پروتئینها می شود. دیده شده که پایداری آنزیمها درحلال آلی با افزایش Log P حلال کاهش می یابد (۵). جهت بررسی دقیق اثر حلالهای آلی بر فعالیت و پایداری آنزیمها لازم است به میزان قطبیت حلالها توجه گردد. پارامتری که میزان قطبیت حلال را به طور کمی بیان می دارد LogP نام دارد که عبارت است از

لگاریتم بر پایه ۱۰ ثابت تفکیک (P) که به عنوان نسبت غلظت حلال آلی به غلظت فاز آبی تعریف می شود:

Partition coefficient (P) =(organic)/(aqueous)

ثابت تفکیک برابر با مقدار حلالیت یک ترکیب در n – اکتان نسبت به حلالیت آن در آب است و هر چقد میزان Log P بیشتر باشد میزان قطبیت حلال کاهش می یابد. مولکولهای آنزیم در محلولهای آبی هر دو بخش آب دوست که درتماس با آب و دمینهای آب گریز که در داخل مولکول فولد شده اند را دارا هستند .زمانی که قطبیت محیط اطراف مولکولها یا آنزیم توسط یک حلال آلی کاهش می‌یابد، دمینهای آب گریز در معرض قرار گرفته، و در نتیجه منجر به واسرشته شدن آنزیم می شود. می‌توان گفت که با افزایش Log P پایداری آنزیم کاهش می‌یابد که این امر با افزایش آب گریزی محیط و در نتیجه میل به باز شدن ساختار پروتئین در ارتباط است (۱۱). با توجه به اینکه در هگزان میزان Log P = ۳، دارای بیشترین آب گریزی بوده و کمترین فعالیت آنزیم در این حلال قرار دارد و DMSO با داشتن LogP= -1.3 نسبت به بقیه حلالهای مورد استفاده در این پژوهش قطبی تر بوده و اثر تخربی کمتری بر ساختار آنزیم دارد. همچنین می‌توان توضیح داد که افزایش غلظت DMSO ، باعث جدا کردن آب ضروری موجود در اطراف پروتئین و ایجاد پیوند هیدروژنی با مولکولهای پروتئین می شود و این منجر به کاهش پایداری آنزیم در غلظتهای بالای DMSO شده است (۱۸).حلال دیگر مورد استفاده در این تحقیق الکل بوده و نسبت به DMSO قطبیت کمتری دارد. الکلها از طریق میانکنش با پاکت آب گریز سطحی موجود در پروتئینها باعث کاهش پایداری آنها می شود (۶). تحقیق حاضر نشان داد که حلالهای مورد استفاده باعث کاهش فعالیت سوبتیلیزین شدند ولی DMSO نقش مهاری کمتری نسبت به بقیه حلالها داشت. در نتیجه می‌توان DMSO را به عنوان حلالی که اثرکاهشی کمتری در فعالیت سوبتیلیزین دارد، به کار برد.

منابع

۱.صدرممتاز، ا. اصغری ،م. ۱۳۹۴. مطالعات مقایسه‌ای مقاومت پروتئازحاصل ازسودوموناس آئروجینوزا در مقایسه با ترمولیزین حاصل از باسیلوس ترموپروتئولیتیکوس در حلالهای آلی.مجله زیست شناسی ایران.جلد ۲۸.شماره ۴.ص ۵۶۰.

۲. شارقی، ب. شهدادنژاد، ک. محمدی،ه . ۱۳۹۴. مطالعه پایداری ساختاری آنزیم پپسین در حضور نانوذرات اکسیدروی و اکسیدآهن. مجله زیست شناسی ایران. جلد ۲۸ ،شماره ۳.ص ۳۴۵.

3 .J. Singh, N. Batra, R.C. Sobti .2001.Serine alkaline protease from a newly isolated Bacillussp.SSR1.Process Biochemistry 36 .781–785

4. Graycar TP. 1999. Proteolytic Cleavage, Reaction Mechanisms. Encyclopedia of Bioprocess Technology.

5. Bryan PN, Pantoliano MW, Rollence ML. 1990. Subtilisin with increased thermal stability. Google Patents.

6.Vojcic L. 2012. Directed evolution of a Subtilisin Carlsberg Variant towards increased oxidative stability: Universitätsbibliothek;

7. Gupta R, Beg QK, Lorenz P .2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. Appl Microbiol Biotechnol 59:15-32

8. Noriyuki Doukyu, Hiroyasu Ogino .2010. Organic solvent-tolerant enzymes Biochemical Engineering Journal 48 270–282

9.Simon, LM.; 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.

10.L.M. Simon, M. Kotorma´n, A. Szabo´ J. Nemcso´k, I. Laczko´ . 2007 .The effects of organic solvent/water mixtures on the structure and catalytic activity of porcine pepsin Process Biochemistry 42 909–912

11. Chen, K.; Arnold, F. H. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1993, 90,5618−5622

12. Rajeshwari Sinha, S.K. Khare .2013. Characterization of detergent compatible protease of a halophilic Bacillus sp. EMB9: Differential role of metal ions in stability and activity. Bioresource Technology 145 357–361

13. .Divya Bajpai and V.K.Tyagi.2007. laundry detergent: An overview.Journal of Oleo

14. Klibanov, A. M. 1997. Why are enzymes less active in organic solvents than in water?,*Trends Biotechnol.* 15, 97-101.
15. Vibha Bansala, Yamixa Delgadoa .2010. Effect of prolonged exposure to organic solvents on the active site environment of subtilisin Carlsberg Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 64 38–44
16. HuangP,DongA, CaugheyWS. 1995.Effects of dimethylsulfoxide,glycerol,and ethyleneglycol on secondary structures of cytochrome*c* and lysozymeas observed by infrared spectroscopy. JPharmSci;84:387–92.
17. Batista ANL,Batista JMJr,Bolzani VS,Furlan M. 2013.Selective DMSO-induced conformational changes in proteins from Raman optical activity.Phys Chem Chem Phys;15:20147–52.
18.Arakawa,T,Kita,Y,Timasheff,SN.2007.Protein precipitation and denaturation by dimethylsulfoxide.Biophys.Chem ;131:62–70.
19.Vinaykumar Dachuri, Jerusha Boyinenia,1, Sora Choia, Hye-Shin Chungb, Sei-Heon Janga,ChangWoo Leea.2016. Organic solvent-tolerant, cold-adapted lipases PML and LipS exhibitincreased conformational flexibility in polar organic solvent Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 131 73–78
20. Arakawa, T.; Timasheff, SN. 1982 Stabilization of protein structure by sugars. Biochemistry, 21(25): 6536-6544.
21. Timasheff, SN. 1998. Control of protein stability and reactions by weakly interacting cosolvents: the simplicity of the complicated. Advances in Protein Chemistry, 51: 355-432.
22. Schmid A, Dordick JS, Hauer B, Kiener A, Wubboltz M, Witholt B. 2001.Industrial biocatalysis today and tomorrow. Nature;409:258–68.
23. Koeller KM, Wong C-H .2001. Enzymes for chemical synthesis. Nature409:232–40
24. 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 Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 35(4-6): 147-153.
25. Arastoo Badoei-Dalfard1, Khosro Khajeh S. Mohsen Asghari, Bijan Ranjbar and Hamid Reza Karbalaei-Heidari .2010. Enhanced activity and stability in the presence of organicsolvents by increased active site polarity and stabilization of a surface loop in a metalloprotease. J. Biochem. 148(2):231–238
26. Diego M. Ruiz · Rosana E. De Castro. 2007 . Efect of organic solvents on the activity and stability of an extracellular protease secreted by the haloalkaliphilic archaeon Natrialba magadii. J Ind Microbiol Biotechnol 34:111–115
27. Knubovets, T., Osterhout, J. J., and Klibanov,A. M. 1999 Structure of lysozyme dissolved in neat organic solvents as assessed by NMR and CD spectroscopies. *Biotechnol Bioeng.* 63,242-248.
28. Avdulov, N. A., Chochina, S. V., Daragan, V.A., Schroeder, F., Mayo, K. H., and Wood, W.G. .1996. Direct binding of ethanol to bovine serum albumin: a fluorescent and 13C NMR multiplet relaxation study. Biochemistry. 35,340-347.

Effects of organic solvents on the enzyme activity of Subtilisin Carlsberg protease

Bargeshadi Z., Pazhang Y. and Jamei R.

Dept. of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, I.R. of Iran

Abstract

Proteases are one of the most important groups of industrial enzymes. They are extensively used in food, textile, detergent, pharmaceutical,and leather industries and especially as additives in laundry detergent industry. Subtilisin (EC 3.4.21.62) is important serine protease from *Bacillus licheniformis*. Extensive research has been conducted on the stability of proteases in organic solvents, because they have numerous applications in organic media. Organic solvents are advantageous in enzyme-catalyzed peptide synthesis, both to solubilize substrates and product and to manipulate reaction kinetics and equilibrium to increase product yield. In this study, the activity and stability of the subtilisin were investigated at different concentrations of organic solvent of ethanol , DMSO and n-hexane. For study of activity and stability of the subtilisin, it was treated with different concentrations of ethanol , n-hexane and DMSO (0-60%) and their combinations(0-10%), then was assayed at 0/65% of casein as substrate, after that Folin Ciocalteau reagent absorbance was measured at 660 nm.The results showed that subtilisin retained more than 82% of its initial activity after 1 h incubation with 10% organic solvent at 40°C. Relative activity of the enzyme monotonically decreased with increasing concentration of this organic solvent . The reducing effect of DMSO on enzymatic activity was lower than ethanol and n-hexane. Organic solvents have effect on electrostatic interactions of proteins because their dielectric constant differs from water. In general reduction in solvent polarity and dielectric constant, lead to loosening the protein structure. Inhibitory effect of solvent on enzyme activity increases with LogP elevation, since hexane and ethanol has more inhibitory effect on subtilisin activity than DMSO

Key words: Protease, subtilisin, Organic solvents, DMSO, ethanol, n-hexane