

# تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز آس پرچی لوس نایجر در مجاورت سدیم دودسیل سولفات

Activation Changes of Interaction between *Aspergillus Niger* Catalase and Sodium n-Dodecyl Sulphate

دکتر علی اکبر موسوی موحلی

دانشگاه تهران - مرکز تحقیقات بیوشیمی - بیوفیزیک

واژه‌های کلیدی:

فعالیت آنزیمی، کاتالاز آس پرچی لوس نایجر، سدیم دو دسیل سولفات، ترمودینامیک

به دست آمده است [9-13].

در این مقاله روش فعال و غیرفعال کردن آنزیم کاتالاز قارچ آس پرچی لوس نایجر توسط سدیم دو دسیل سولفات و هم چنین مطالب مختصری درباره مطالعات ترمودینامیکی ساختاری در مورد این آنزیم ارائه می‌شود.

## تجربیه

مواد: کاتالاز آس پرچی لوس نایجر از شرکت سیگما و سدیم دو دسیل سولفات، روز آنیلین هیدروکلرید (*Rosaniline-Hydrochloride*) و سایر مواد بافری با درجه خلوص بالا از شرکت BDH تهیه شده است. لوله دیالیز مصرفی برای دیالیز تعادلی از نوع اسپکتراپور (*Spectrapore*) است که مواد با وزن مولکولی بالای ۸۰۰۰ از سوراخهای آن خارج نمی‌شوند و این لوله از شرکت پزشکی صنعتی اسپکترتسم (*Spectranum*) آمریکا خریداری شده است. بافرهای تهیه شده به قرار زیرند:

الف - محلول ۲/۵ میلی مولار بافر فسفات با  $pH$  برابر ۶/۴ و قدرت یونی ۰/۰۰۶۹

ب - محلول ۵۰ میلی مولار بافر گلیسین با  $pH$  برابر ۳/۲ و قدرت یونی ۰/۰۱۱۹

ج - محلول ۵۰ میلی مولار بافر گلیسین با  $pH$  برابر ۱۰/۰ و قدرت یونی ۰/۰۳۱۸

قدرتهای یونی مزبور طوری انتخاب شده‌اند که شامل خطای محاسباتی قاعده دونان نشوند. غلظت کاتالاز مصرفی برای محاسبات دیالیز تعادلی و میکروکالریتری ۰/۱۲۵ درصد وزنی است. وزن مولکول کاتالاز آس پرچی لوس نایجر برابر ۲۵۴۰۰۰ اندازه‌گیری شده است [9].  
وسائل اندازه‌گیری: آنتالی برهم کنش آس پرچی لوس نایجر کاتالاز با سدیم دو دسیل سولفات به وسیله ریز گرماسنجی (میکروکالریتر - نوع LKB ۱۰۷۰۰) در  $25^{\circ}C$  اندازه‌گیری شده است. در مدت چهار ساعت دستگاه به حالت تعادل گرمایی می‌رسد که در شرایط تعادل گرمایی به مدت ده ثانیه مخلوط شدن شوینده با کاتالاز انجام می‌شود

برهم کنش کاتالاز آس پرچی لوس نایجر، به عنوان یک آنزیم، با سدیم دو دسیل سولفات، به عنوان یک شوینده، از نظر ترمودینامیکی و اندازه‌گیری فعالیت در  $pH$ های ۳/۲، ۶/۴ و ۱۰/۰ مورد مطالعه قرار گرفته است. آنزیم مزبور در  $pH$  برابر ۶/۴ حدود ۱۸۰٪ فعال شده و در  $pH$ های ۳/۲ و ۱۰/۰ غیرفعال گردیده است. افزایش فعالیت آنزیم توسط سدیم دو دسیل سولفات به عنوان یک شوینده قوی زیستی یک عمل غیرعادی است و فقط در مورد چند آنزیم مشاهده شده است که یکی از آنها کاتالاز آس پرچی لوس نایجر می‌باشد.

## مقدمه

کاتالاز، آنزیم بسیار فعالی است که در اغلب موجودات هوایی، از باکتریها تا پستانداران، موجود است. نقش این آنزیم در زنجیره تنفسی بدن اهمیت پیدا می‌کند. کاتالاز تجزیه‌کننده هیدروژن پروکسید حاصل از مسائل متابولیکی به اکسیژن و آب است. تولید رادیکال آزاد توسط کاتالاز یکی از مهم‌ترین خواص ضدسرطانی این آنزیم در بدن می‌باشد. از طرف دیگر کاتالاز به عنوان یک اکسنده بسیار قوی در صنعت تکولوژی زیستی مطرح می‌باشد که اکسندگی مولکولهای کوچک و خیلی بزرگ آلی و حتی عناصر فلزی را در برمی‌گیرد [1].

از مهمترین اهداف تکولوژی زیستی امروز، دستیابی به روشی برای کنترل فعالیت آنزیمی است که به وسیله آن بتوان سرعت واکنشهای کاتالیزوری آنزیمها را تنظیم کرد و بدین ترتیب فعال و غیرفعال شدن آنها را کنترل نمود. راه اصولی و اساسی برای دستیابی به این موضوع بسیار مهم، درک و فهم ساختار بسیار پیچیده آنزیمها و پروتئینهاست. تا ساختار این ترکیبات شناخته نشود طبیعی است که نقش آنها معلوم نخواهد شد. لذا برای درک ساختار درشت مولکولها، ما پژوهشهای پایه‌ای را شروع کرده‌ایم و از قوی‌ترین و مطمئن‌ترین وسیله یعنی ترمودینامیک را برای تحلیل ساختاری زیست پلیمرهای پروتئینی به کار برده‌ایم [2-8]. با مطالعات ترمودینامیکی و سینتیکی بر روی ساختار کاتالاز، روش فعال و غیرفعال کردن این آنزیم ارزنده توسط برهم کنش آن با مواد فعال سطحی

keywords: Enzyme activity, *Aspergillus Niger* catalase, Sodium dodecyl sulphate, Thermodynamic

و سپس منحنی بر هم کنش به دست می‌آید. با درجه بندی سطح زیر منحنی مقدار آنتالپی بر هم کنش حاصل می‌شود [10].

با استفاده از روش دیالیز تعادلی، قرار دادن آنزیم درون لوله دیالیز (غشای نیمه تراوا) علیه شوینده به مدت بیش از ۹۶ ساعت، مقدار شوینده آزاد توسط رنگ‌سنجی یا استفاده از روزآنیلین هیدروکلرید محاسبه می‌شود.

فعالیت کاتالاز با استفاده از سرعت تجزیه هیدروژن پروکسید به وسیله طیف نورسنج نوع Cary ۰/۲۱۹ در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شده که قبلاً شرح آن ارائه شده است [12].

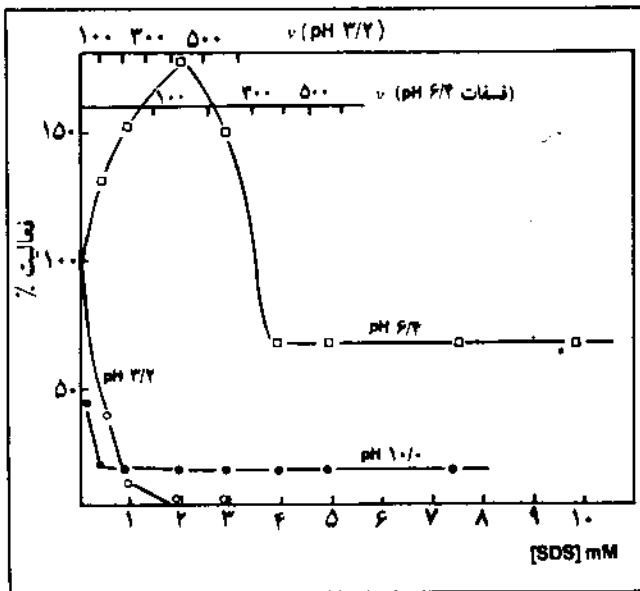
## نتایج و بحث

شکل ۱ نشان دهنده فعال و غیرفعال شدن آنزیم کاتالاز آس پرچی لوس نایجر در اثر بر هم کنش با سدیم دودسیل سولفات در  $pH$  های ۶/۴، ۳/۲ و ۱۰/۰ است. این بر هم کنش در  $pH$  برابر ۶/۴ آنزیم مزبور را فعال کرده است که معمولاً یک خاصیت غیرعادی برای کاتالاز آس پرچی لوس نایجر محسوب می‌شود. کاتالاز گاوی در تمامی  $pH$  ها در اثر بر هم کنش با سدیم دودسیل سولفات غیرفعال می‌شود و کاتالاز باکتری ام - لونس ۲۰٪ کاهش فعالیت دارد [12] و کاتالاز آس پرچی لوس نایجر در  $pH$  های ۳/۲ و ۱۰/۰ غیرفعال می‌شود. مشخصات بالای شکل ۱ نشانگر میزان پیوند شدن سدیم دودسیل سولفات با کاتالاز آس پرچی لوس نایجر، است که از طریق دیالیز تعادلی اندازه‌گیری و محاسبه گردیده است. در غلظت ۲ میلی مولار سدیم دودسیل سولفات،  $\bar{v}$  برابر ۴۰۰ است که در  $pH$  برابر ۳/۲ آنزیم کاملاً غیرفعال و در  $pH$  برابر ۱۰/۰ حدود ۸۶٪ غیرفعال می‌شود. اما در  $\bar{v} = ۱۵۰$  و  $pH$  برابر ۶/۴ به مقدار ۱۸۰٪ فعالیت آنزیم مزبور افزایش یافته و در غلظت‌های بیشتر از ۲ میلی مولار منجر به کاهش فعالیت آنزیم می‌گردد. در  $\bar{v} = ۳۰۰$  فعالیت آنزیم به حالت طبیعی می‌رسد. سرانجام در  $\bar{v} = ۴۰۰$  آنزیم حدود ۴۴٪ کاهش فعالیت نشان می‌دهد و دیگر افزایش غلظت سدیم دودسیل سولفات تأثیری بر فعالیت آن ندارد. ماکسیمم کاهش فعالیت در  $pH$  برابر ۶/۴ در  $\bar{v} = ۴۰۰$  است. تعداد پیوند شدن در  $pH$  برابر ۶/۴ در مقایسه با  $pH$  های ۳/۲ و ۱۰/۰ دارای مقدار کمتری است و این امر سبب می‌شود که در این  $pH$  فعالیت کاتالاز دو مرحله را طی کند. یک مرحله تا غلظت ۲ میلی مولار سدیم دودسیل سولفات ( $\bar{v} = ۱۵۰$ ) و مرحله دیگر غلظت تا حدود ۴ میلی مولار ( $\bar{v} = ۴۰۰$ ). لذا می‌توان نتیجه گرفت که وقتی تعداد معینی از سدیم دودسیل سولفات به کاتالاز آس پرچی لوس نایجر پیوند می‌شود ( $\bar{v} = ۴۰۰$ ) ساختار پایدار شده و فعالیت تغییر نمی‌کند. مسئله قابل توجه دیگر این است که وقتی فعالیت زیاد می‌شود زیست پلیمرها شکل یا ساختار تازه‌ای پیدا می‌کنند، مثال در  $pH$  برابر ۶/۴ در اثر کمپلکس با سدیم دودسیل سولفات یک نظم ساختاری جدیدی به وجود می‌آید که نقش خود را در افزایش فعالیت آنزیمی آشکار می‌کند. مسئله قابل بحث دیگر کاهش فعالیت در  $\bar{v} = ۴۰۰$  برای همه  $pH$  هاست که

همراه با درصد متفاوتی از کاهش فعالیت یا شکل‌گیری است. این کاهش برای  $pH$  های ۳/۲ و ۱۰/۰ در غلظت ۲ میلی مولار و برای  $pH$  برابر ۶/۴ در غلظت ۴ میلی مولار شوینده روی می‌دهد که طبیعی است، چون مقادیر زیادی از سدیم دودسیل سولفات در  $pH$  برابر ۶/۴ به صورت آزاد باقی مانده است.

مقادیر آنتالپی ( $\Delta H$ ) بر هم کنش سدیم دودسیل سولفات با کاتالاز آس پرچی لوس نایجر در  $\bar{v} = ۴۰۰$  برای  $pH$  های ۶/۴، ۱۰/۰ و ۳/۲ به ترتیب برابر ۱/۶۸، -۳/۱۱ و -۳/۵۴ ژول بر گرم است [10]. این موضوع به بهترین وجه نشان می‌دهد که شدت بر هم کنش لیگاند با کاتالاز به ترتیب در  $pH$  برابر ۶/۴ کمتر از  $pH$  برابر ۱۰/۰ و سپس در  $pH$  برابر ۳/۲ افزایش می‌یابد. مقادیر  $\Delta H$  - نشان می‌دهد که سیستم گرماده بوده و مقدار آن متناسب با میزان غیرطبیعی شدن سیستم است. اگر نسبت بین آنتالپی در  $pH$  های ۶/۴، ۱۰/۰ و ۳/۲ را به دست آوریم به ترتیب برابر ۰/۸۷ و صفر درصد می‌شود.

مقادیر آنتالپی ( $-\Delta H$ ) بر هم کنش کاتالازها از منابع مختلف با سدیم دودسیل سولفات کاملاً متفاوت‌اند که نشانگر ساختارهای متفاوت آنهاست. مثلاً بر هم کنش کاتالاز گاوی با سدیم دودسیل سولفات دارای مقادیر آنتالپی بیشتری نسبت به کاتالاز آس پرچی لوس نایجر است علی‌رغم اینکه وزن مولکولی کاتالاز آس پرچی لوس نایجر ۱۴۰ درصد از کاتالاز گاوی زیادتر است علت این امر می‌تواند نسبت اسیدهای آمینه کاتیونی به آنیونی باشد که برای کاتالاز آس پرچی لوس نایجر ۰/۳۷ و



توضیح زیرنویس شکل ۱

فعالیت نسبی آنزیمی کاتالاز آس پرچی لوس نایجر در مجاورت سدیم دودسیل سولفات. مشخصات بالا نشان دهنده تعداد مولکولهای پیوند شده سدیم دودسیل سولفات به یک مولکول کاتالاز می‌باشد.

● :  $pH = ۱۰/۰$    ● :  $pH = ۳/۲$    ■ :  $pH = ۶/۴$

- [9] Moosavi - Movahedi, A.A., Wilkinson, A.E. and Jones, M.N. "Characterization of Aspergillus Niger Catalase" Int. J. Biol. Macromol. Vol. 9 pp 327, 1987.
- [10] Moosavi - Movahedi, A.A. Jones, M. N. and Pilcher, G. "Thermodynamic of the Interaction of Sodium n - Dodecyl Sulphate with Aspergillus Niger Catalase in Low Ionic Strength Aqueous Solution" Int. J. Biol. Macromol. Vol. 10 pp 75, 1988.
- [11] Moosavi - Movahedi, A.A. Jones, M.N. and Pilcher, G. "Thermodynamic of the Interaction of Sodium n - Dodecyl Sulphate with Aspergillus Niger Catalase in High Ionic Strength Aqueous Solution" Int. J. Biol. Macromol., Vol. 11 pp 26, 1989.
- [12] Jones, M.N., Finn, A., Moosavi - Movahedi, A.A. and Waller, B.J. "The Activation of Aspergillus Niger - Catalase by Sodium n - Dodecyl Sulphate" Biochem. Biophys. Acta Vol. 913 pp 395, 1987.
- [13] Moosavi - Movahedi, A.A., Pilcher, G. and Jones, M.N. "Thermodynamic of the Interaction between n - Dodecyl Trimethyl ammonium bromide and Catalase" Thermochemica Acta, Vol 146 pp 215, 1989.
- [14] Fila, I - and Rossmann, G. M. "The Active Center of Catalase" J. Mol. Biol. Vol. 185 pp 21, 1985.

بقیه از صفحه ۱۲۹

- [1] Ross, R. T. and Laurence, R. L. "Gel Effect and Free Volume in the Bulk Polymerization of Methylmethacrylate", AIChE Symp. Series, No 160, Vol 72, 1976.
- [2] Bondy, F. and Lippa, S. "Heat Transfer in Agitated Vessels", Chem. Eng. Apr. 4 1983.
- [3] Liptak B. G; "Controlling and Optimizing Chemical Reactors", Chem. Eng. May, 26, 1986.
- [4] Seborg, "Process Dynamics and Control" John Wiley & Sons, 1989.

بقیه از صفحه ۱۳۱

- [39] Uhl, V. W., Voznick, H. P., The Anchor Agitator, Chem. Eng. Progr., 59, No. 3 (1960).
- [40] Foresti, R., Liu, T., Agitation of Non - Newtonian Liquids, Ind. Eng. Chem., 51, No. 7 (1959).
- [41] Calderbank, P. H., Moo - Young, M. B., The Power Characteristics of Agitators for the Mixing of Newtonian and Non - Newtonian Fluids, Trans. Inst. Chem. Engrs. (London), 39 (1961).
- [42] Sandall, O. C., Patel, K. G., Heat Transfer to Non - Newtonian Pseudoplastic Fluids in Agitated Vessels, Ind. Eng. Chem. Process Design Develop., 9, No. 1 (1970).
- [43] Su, Y. S., Holland, F. A., Agitation and Mixing of Non - Newtonian Fluids, Chem. Process Eng., Sept. 1968.
- [44] Uhl, V. W., Heat Transfer to Viscous Materials in Jacketed Agitated Kettles, Chem. Eng. Progr. Symp. Ser., 51, No. 17 (1955).
- [45] Peters, D. C., Smith, J. M., Mixing in Anchor Agitated Vessels. Paper 25C Presented at the 1968 Tripartite Chem. Eng. Conf., Montreal, Can., 1968.
- [46] Coyle, C. K., others, Heat Transfer to Jackets with close Clearance Impellers in Viscous Materials, Can. J. Chem. Eng., June 1970.
- [47] Dinglinger, G., Kaltechnik, 16, No. 6 (1964).
- [48] Ho, F. C., Cyr, J. C., "Effect of Baffles and Rotational Speed of Anchor Agitator on the Mixing Time." Report RR - 71 - 2A, Toronto Coppersmithing Co., Toronto, Can., 1971.

برای کاتالاز گاوی ۰/۶۷ است. از آنجا که سدیم دودسیل سولفات یک شوینده آنیونی است لذا موجب افزایش آنتالپی می گردد، در مقابل کاتالاز باکتریایی ام لوتس بسیار مقاوم است علی رغم اینکه نسبت اسیدهای آمینه کاتیونی به آنیونی آن برابر ۰/۵۸ است و در برهم کنش با سدیم دودسیل سولفات، کاهش فعالیت آن بیشتر از ۲۰٪ نیست. این مسئله می تواند مربوط به نزدیکی گروههای پروستاتیک (هم) باشد که از فاصله هم های کاتالاز گاوی و فارچی کمتر است [14].

از مطالب مزبور می توان نتیجه گرفت که با تغییر pH و غلظت سدیم دودسیل سولفات، فعالیت آنزیمی کاتالاز آس پرچی لوس نایجر، قابل تنظیم است. از نظر ترمودینامیکی آنتالپی در  $\bar{v} = 400$  به ترتیب برای pH های ۶/۴، ۱۰/۰ و ۳/۲ کاهش می یابد. چون سیستم گرماده است می توان نتیجه گرفت که در pH برابر ۶/۴ کاتالاز ساختاری تا خورده تر به خود می گیرد و این موجب افزایش فعالیت آنزیمی می شود.



- [1] Sichak, S. P and Dounce, A. L. "Analysis of the Peroxidation Mode of Action of Catalase" Arc. Bio Phys., Vol. 249 pp 286 - (1986).
- [2] Moosavi - Movahedi, A. A. and Housaindokht, M. R. "Thermodynamic Studies of the Interaction of Sodium n - Dodecyl Sulphate with Histone H<sub>2</sub>B" Physiological Chem. Physics 8 Med. NMR Vol. 22 pp 19 - (1990).
- [3] Moosavi - Movahedi, A. A. and Housaindokht, M. R. "Unusual Property of Interaction between Histone H<sub>2</sub>B and Sodium n - Dodecyl Sulphate" Int. J. Biol. Macromol. Vol. 13 pp 50 - (1991).
- [4] Moosavi - Movahedi, A. A. Goodarzi, M. and Housaindokht, M. R. "Folding of the Interaction between Histone H 1 and Sodium n - Dodecyl Sulphate" J. Sci, I.R. Iran, Vol 1 pp 81, 1990.
- [5] Moosavi - Movahedi, A. A., Rabbani, A., Goodarzi, M. and Goliaei, B. "Thermodynamic Studies of the Interaction of Sodium n - Dodecyl Sulphate with Histone H 1" Thermochemica Acta Vol. 154 pp 205, 1989.
- [6] Moosavi - Movahedi, A.A. and Razeghifard, M.R. "Thermodynamic Studies of the Interaction of Sodium n - Dodecyl Sulphate with Histone H 3" J. Sci, I.R. Iran, Vol. 1 pp 244, 1990.
- [7] Moosavi - Movahedi, A.A. and Housaindokht, M.R. "The Influence of Charge Density on the Interaction of Sodium n - Dodecyl Sulphate with Histone H 1" J. Sci, I.R. Iran, Vol. 1 pp 253, 1990.
- [8] Moosavi - Movahedi, A.A., Goodarzi, M. and Housaindokht, M.R., "Protein Structure Function" Ed. Z. Zaidi, etal TWEL, New York, pp 225, 1990.