تثبیت و بهینه سازی آنزیم گلوکز اکسیداز در حامل کتیرا

شیرین مبین[a]، مریم اوتادی[*b]، آزاده ابراهیم حبیبی[c]، علیرضا رحمن[d]

[a] کارشناس ارشد بیوشیمی-زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

[b] عضو هیئت علمی گروه مهندسی شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی

[c] عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات غدد برون ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران

[d] عضو هیئت علمی گروه مهندسی شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهریار - شهرقدس

Archive of SID

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۶/۲۲ تاریخ پذیرش مقاله:۱۳۸۹/۸/۳۰

چکیده

مقدمه: آنزیم گلوکز اکسیداز (β-D-glucose: oxygen 1-oxidoreductase; EC: 1.1.3.4) یک فلاووپروتئین است که باعث کاتالیز اکسیداسیون β-D گلوکز به مولکول δ-گلوکونولاکتون و پراکسید هیدروژن به وسیله مولکول اکسیژن به عنوان پذیرنده الکترون می گردد. آنزیم گلوکز اکسیداز علاوه بر کاربردهای پزشکی آن در بیوسنسورها، در صنایع غذایی و تخمیر نیز نقش دارد. در این تحقیق، از کتیرا به عنوان ماتریکسی برای تثبیت آنزیم گلوکز اکسیداز استفاده شده و شرایط بهینه برای این آنزیم به دست آمده و مقایسه ای بین آنزیم آزاد و تثبیت شده صورت گرفته است.

مواد و روش ها: آنزیم گلوکز اکسیداز در حامل طبیعی کتیرا به روش درگیر کردن در یک ژل پلیمری، تثبیت شد و اثرات پنج فاکتور pH، دما، غلظت گلوکز، غلظت آنزیم و فشار اکسیژن بر روی آنزیم تثبیت شده بررسی شده است. هم چنین فعالیت آنزیم به روش کنترل pH اندازه گیری شده است.

یافته ها: شرایط بهینه آنزیم گلوکز اکسیداز برای انجام واکنش مذکور در دمای ۳۶ درجه سانتی گراد ،pH= ۶ ، غلظت گلوکز ۱۰۰ میلی گرم و فشار اکسیژن ۱ لیتر بر دقیقه بدست آمده است که در این شرایط آنزیم مذکور بیشترین فعالیت را نشان میدهد و تا ۸ بار استفاده میزان ۷۵ درصد از فعالیت اولیه خود را حفظ می‌کند.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج به دست آمده از فعالیت آنزیم گلوکز اکسیداز تثبیت شده در ژل کتیرا و مقایسه آن با آنزیم آزاد می توان نتیجه گرفت که استفاده از این پلیمر طبیعی جهت تثبیت برای این آنزیم مناسب و از نظر اقتصادی مقرون به صرفه است.

واژه های کلیدی: *آنزیم گلوکز اکسیداز، بهینه سازی، ژل کتیرا، میکروکپسولاسیون*

[*] نویسنده مسئول مکاتبات email: m_otadi@iauctb.ac.ir

www.SID.ir

مقدمه

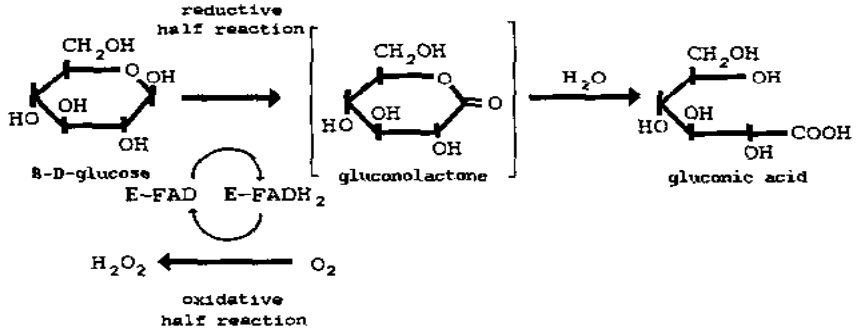
گلوکز اکسیداز(β-D-glucose: oxygen 1- oxidoreductase; EC: 1.1.3.4) باعث کاتالیز اکسیداسیون D-β گلوکز به مولکول δ-گلوکونولاکتون توسط مولکول اکسیژن می‌گردد که متعاقب آن باعث هیدرولیز خود به خودی آن به اسید گلوکونیک و پراکسید هیدروژن می گردد (Hecht *et al*., 1993).

گلوکز اکسیداز *Aspergillus niger*، یک همودایمر با وزن مولکولی ۱۵۰ تا ۱۸۰ کیلودالتون است و حاوی دو مولکول FAD است که دارای اتصال قوی به آن هستند (Pazur *et al*., 1964). این آنزیم در زمینه های متفاوتی از جمله صنایع غذایی، آنالیزهای پزشکی، سنسورهای گلوکز برای تشخیص میزان کمی گلوکز در جریان خون و اوره استفاده می شود. این آنزیم در عسل نیز یافت شده و به عنوان یک نگهدارنده طبیعی عمل می‌کند. آنزیم گلوکز اکسیداز در سطح عسل، اکسیژن محیط را کاهش می دهد و آن را به پراکسید هیدروژن تبدیل می کند که به عنوان یک سد آنتی باکتریالی عمل می کند هم چنین یکی از محصولات مهم این آنزیم، اسید گلوکونیک می باشد که کاربردهای بسیاری در صنایع مختلف از جمله صنایع غذایی دارد. اسید گلوکونیک، یک اسید ضعیف است و یکی از اجزاء طبیعی در آبمیوه ها و عسل می باشد و هم چنین برای ترش کردن غذا استفاده می‌شود. استر داخلی آن (δ- گلوکونو لاکتون) در دهان مزه شیرینی دارد که بعدا به تدریج اسیدی می‌شود. در محصولات گوشتی و لبنیات استفاده می شود. در نانوایی به عنوان خمیرترش به کار می رود.به عنوان طعم دهنده (به عنوان مثال در شربت ها) استفاده می شود (Ramachandran *et al*., 2006).

تحقیقات زیادی بروی تثبیت آنزیم گلوکز اکسیداز در ماتریکس‌های مختلف انجام شده است. این تحقیقات بهبود قابلیت هایی از قبیل استفاده مکرر، بازیابی، پایداری عملیاتی، پایداری حرارتی و مدت نگهداری نشان می‌دهد. روش میکروکپسولاسیون شامل در برگرفتن آنزیم در یک غشاء نیمه تراوای کپسولی در داخل یک محلول آبی می‌باشد (Vikartovská *et al*., 2007; Blandino *et al*., 2001).

کتیرا (Gum Tragacanth)، بیوپلیمری است که می‌تواند به عنوان یک غشاء نیمه‌تراوا در تشکیل کپسول نقش داشته باشد. کتیرا، از ترشح گیاهان نوع *Astraglus* به دست می‌آید. صمغ آن به صورت خود به خود از شکستگی‌های وارد شده به بدنه بوته‌ها ترشح می‌شود و به عنوان امولسیون‌کننده، پایدار کننده و حجم‌دهنده در صنایع غذایی و دارویی و آرایشی کاربرد دارد (F.D.A.,1974).

در روش محبوس سازی در ژل (میکروکپسولاسیون)، برای تشکیل پلیمری که بتواند در محیط واکنش آبی، بصورت جامد غیر قابل حل، در بر گیرنده آنزیم باشد، باید از یونهای ایجاد کننده اتصال عرضی در شبکه پلیمری استفاده کرد. از آنجایی که باقی مانده های کربوکسیلیک اسید موجود در ساختار کتیرا از نوع نمک های کلسیم، منیزیم و پتاسیم است برای ایجاد اتصالات عرضی یونی آن باید از گروه های یونی سه والانسی استفاده کرد. بنابراین برای بالا بردن وزن مولکولی پلیمر و تشکیل گویه‌ها از کاتیونهای سه والانسی آهن و آلومینیوم استفاده می شود. وجود یون آهن در ابتدای عمل اتصالات عرضی کمی ایجاد کرده و ژل را غلیظ میکند و علاوه بر آن موجب می شود که رنگ گویه های کتیرا به رنگ یون‌های آهن (قرمز رنگ) شود. به محض وارد شدن قطرات محلول حاوی ژل



شکل ۱- واکنش آنزیمی کاتالیز شده توسط گلوکز اکسیداز

Archive of SID

www.SID.ir

کتیرا و سلول و یون آهن به محلول کلرید آلومینیم، اتصال عرضی بیشتری اتفاق می افتد و با گذشت زمان و اثر کردن یون آلومینیوم بطور کامل، گویه‌ها مستحکم تر می شوند (Otadi *et al*., 2005).

در این تحقیق هدف اصلی تثبیت آنزیم گلوکز اکسیداز در ژل کتیرا، به عنوان یک آنزیم مهم و کاربردی در صنعت و بهینه سازی آن در شرایط مختلف می باشد.

مواد و روش ها

در این پژوهش از کتیرا که از شرکت فلوکا سوئیس تهیه شده بعنوان ژل تثبیت کننده استفاده شده است و کلیه مواد شیمیایی شامل کلرید آلومینیوم، کلرید آهن، گلوکز از شرکت مرک آلمان و آنزیم گلوکز اکسیداز *Aspergillus niger* از شرکت فلوکا سوئیس تهیه شده است که هر میلی گرم آن دارای فعالیت U/mg ۲۰۰ می باشد.

- روش تثبیت

برای تثبیت آنزیم درون ژل کتیرا، ابتدا محلولی از کتیرا (کتیرا در آب مقطر) با غلظت ۱٪ وزنی- حجمی، ساخته شد و سپس محلول ساخته شده بر روی همزن مغناطیسی با دور rpm ۷۰۰ و دمای $50^{\circ}C$ قرار داده شد. کتیرا درون آب یا محلول های آبی حل نمی شود، ولی آب را جذب کرده و هیدراته می شود و تشکیل ژل می‌دهد. از زمانی که کتیرا وارد محلول می شود، اگر محلول کتیرا سرد باشد پس از ۲۴ ساعت و اگر دمای محلول $50^{\circ}C$ باشد، پس از ۲ ساعت به حداکثر ویسکوزیته خواهد رسید. بنابراین برای آن که از حصول ویسکوزیته نهایی اطمینان حاصل کنیم و بعد از انجام عملیات بعدی روی ژل کتیرا با افزایش ویسکوزیته مواجه نشویم، بهتر است ژل کتیرا ۲۴ ساعت بعد از تهیه مصرف شود (Otadi *et al*., 2006).

پس از تهیه ژل کتیرا با غلظت ۱٪ وزنی-حجمی، محلول کلرید آهن III ۱۰٪ وزنی- حجمی، و ۱ میلی گرم آنزیم گلوکز اکسیداز که در ۱ میلی لیتر بافر مناسب آن حل شده، به آن اضافه شد (در مورد آنزیم گلوکز اکسیداز از بافر فسفات استفاده شده است) و تا یکنواخت شدن کامل محلول و خارج شدن کامل حباب های هوا با همزن مغناطیسی هم زده شد. سپس با استفاده از سرنگ این مخلوط به داخل محلول $AlCl_3$ ۱٪ وزنی- حجمی، چکانده شد. محلول کلرید آلومینیوم به آرامی توسط همزن مغناطیسی با دور rpm ۲۰۰ هم زده شد. فاصله نوک سوزن تا سطح محلول کلرید آلومینیوم حدود ۱۰سانتی متر می باشد. پس از تشکیل گویه ها عمل هم زدن تا یک ساعت ادامه یافت تا گویه ها پایدار شدند. سپس گویه ها توسط کاغذ صافی جمع آوری شده و با آب دیونایز و بافر فسفات pH=۶ شستشو داده شده و تا قبل از استفاده در دمای $4^{\circ}C$ نگهداری شدند (Otadi *et al*., 2006).

- نحوه سنجش فعالیت آنزیم گلوکز اکسیداز در حالت تثبیت شده

اساس روش بر مبنای هیدرولیز آنزیمی گلوکز می باشد و با استفاده از میزان محصول تولید شده (اسید گلوکونیک) سنجش انجام می گیرد. این روش بر پایه تیتراسیون اسید گلوکونیک تولید شده درخلال هیدرولیز سوبسترا (گلوکز) استوار است. آنزیم گلوکز اکسیداز، واکنش تبدیل گلوکز را به اسید گلوکونیک و پراکسیدهیدروژن را کاتالیز می کند. تولید اسید باعث کاهش pH محیط می شود. استفاده از یک باز که با اسید گلوکونیک موجود واکنش دهد، علاوه بر کنترل pH محیط که اثر قابل توجهی در انجام واکنش دارد، میزان محصول تولید شده را نیز از روی مقدار باز مصرفی نشان می‌دهد (Shin *et al*., 2004).

برای سنجش فعالیت آنزیم به این روش،۱۵۰ میلی لیتر سوبسترای گلوکز با غلظت معین در مجاورت آنزیم در داخل راکتور قرار می‌گیرد. همچنین این آنزیم برای فعالیت خود نیاز به اکسیژن دارد که به این منظور از کپسول اکسیژن برای اکسیژن‌رسانی به این آنزیم استفاده شد. در طول انجام واکنش، pH محیط واکنش دائما با pH متر اندازه‌گیری شده و توسط سود ثابت نگه داشته می‌شود. در هر فاصله زمانی میزان باز مصرفی برای ثابت نگه داشتن pH محیط واکنش به عنوان ملاکی از انجام واکنش و در نتیجه فعالیت آنزیم تلقی می شود (Shin *et al*., 2004).

از آن جایی که مقدار باز مصرف شده برابر با اسید گلوکونیک تولید شده می باشد می توان فعالیت آنزیم را با توجه به میزان باز مصرفی محاسبه کرد. در این آزمایش یک واحد فعالیت آنزیم گلوکز اکسیداز (U) عبارت است از مقدار آنزیمی که گلوکونیک اسیدی معادل µmol ۱ سود را در دقیقه و تحت شرایط آزمایشگاهی آزاد می‌کند. شرایط آزمایشگاهی تعریف شده برای این واکنش آنزیمی بصورت pH ۶ و دمای $36^{\circ}C$ و زمان ۱ ساعت برای محاسبه

Archive of SID
www.SID.ir

فعالیت آنزیم گلوکز اکسیداز استفاده می شود (Han *et al*., 2005).

- بهینه‌سازی شرایط عملیاتی آنزیم گلوکز اکسیداز تثبیت شده

عملکرد آنزیمها به شدت به شرایط عملیاتی مثل دما، pH ، غلظت سوبسترا وابسته است، استفاده از حامل برای تثبیت یک آنزیم ممکن است که این شرایط را تغییر بدهد که این تغییرات ممکن است که مشکلاتی را برای عملکرد آنزیم ایجاد کند. بنابراین هر قدر این شرایط در حالت تثبیت شده و آزاد بهم نزدیکتر باشند، تثبیت بهتر خواهد بود.

- اثر pH بر فعالیت آنزیم

برای بهینه سازی pH بافر سوبسترا بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار استفاده می شود، بافر فسفات پتاسیم با pH های متفاوت تهیه کرده و در شرایط واکنش یکسان (دما، غلظت سوبسترا، فشار اکسیژن، غلظت بافر، غلظت آنزیم) با استفاده از گویه های تثبیت شده، اثر pH سوبسترا بر فعالیت آنزیم سنجیده می شود. مقدار آنزیم به کار گرفته شده در حالت آزاد و تثبیت شده ۱ میلی گرم بر میلی لیتر می باشد. با استفاده از نمودار فعالیت آنزیم و میزان تولید محصول، مناسبترین pH برای هیدرولیز در شرایط تثبیت انجام شده تعیین می شود.

- اثر دمای محیط واکنش بر فعالیت آنزیم

برای تعیین بهترین دمای عملکرد آنزیم تثبیت شده، تعداد معینی گویه در شرایط کاملا یکسان (pH، غلظت سوبسترا، فشار اکسیژن، غلظت بافر، غلظت آنزیم) و در دماهای متفاوت برای واکنش هیدرولیز استفاده و بهترین دما برای شرایط تثبیت آنزیم تعیین گردید. مقدار آنزیم به کار گرفته شده در حالت آزاد و تثبیت شده ۱ میلی گرم بر میلی لیتر می‌باشد. با استفاده از نمودار فعالیت آنزیم و میزان تولید محصول، مناسبترین دما برای هیدرولیز در شرایط تثبیت انجام شده تعیین می شود.

- اثر غلظت سوبسترا بر فعالیت آنزیم

برای تعیین بهینه غلظت، تعداد معینی گویه در شرایط کاملا یکسان (pH، دما، فشار اکسیژن، غلظت بافر، غلظت آنزیم) و غلظت های متفاوت گلوکز برای واکنش آنزیمی استفاده گردید و بهترین غلظت که در آن آنزیم حداکثر فعالیت را دارد، تعیین شد.

- اثر اکسیژن بر فعالیت آنزیم

برای بررسی اثر اکسیژن بر فعالیت آنزیم از کپسول اکسیژن و پمپ هوا استفاده شده است. تعداد معینی گویه در شرایط کاملا یکسان (pH، دما، غلظت سوبسترا، غلظت بافر، غلظت آنزیم) و سرعت های متفاوت جریان هوا و سرعت اکسیژن ۱ L/min استفاده شد و تاثیرات ناشی از میزان اکسیژن ورودی به محلول واکنش مورد بررسی قرار گرفت.

در نهایت پس از تعیین شرایط بهینه آنزیم تثبیت شده، از آن آنزیم تثبیت شده در شرایط بهینه و در آزمایشهای مکرر استفاده شد تا بتوان اثر حامل استفاده شده را در نگهداری فعالیت آنزیم بدست آورد.

یافته ها

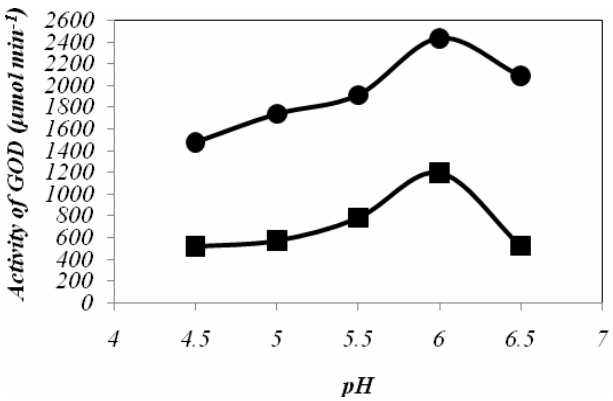
در کلیه نتایجی که آورده می شود زمان واکنش ۱ ساعت در نظر گرفته شده است. در زمان اولیه هم سرعت واکنش بالاتر است و هم میزان سوبسترای بیشتری در اختیار آنزیم است. بنابراین این زمان میتواند مبنای نتیجه گیری از عملکرد آنزیم باشد.

در نمودار ۱ فعالیت آنزیم گلوکز اکسیداز تثبیت شده با آنزیم آزاد بر حسب pH های مختلف با هم مقایسه شده است. مطالعات روی آنزیمهای مختلف نشان می‌دهد که در بیشتر موارد پایداری یک آنزیم تابع pH می باشد و همان طور که در نمودار ۱ مشاهده می شود در pH های متفاوت فعالیت آنزیم گلوکز اکسیداز تغییر می کند و در pH =۶ فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده حداکثر است.

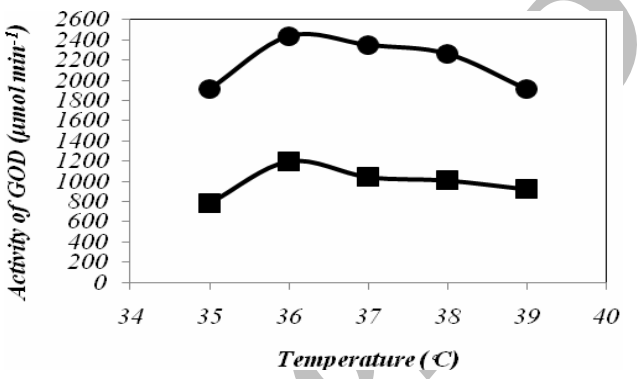
در نمودار۲ فعالیت آنزیم گلوکز اکسیداز تثبیت شده با آنزیم آزاد بر حسب دماهای مختلف با هم مقایسه شده است. مطابق نتایج به دست آمده از این نمودار، مشاهده می‌گردد که آنزیم تثبیت شده و آنزیم آزاد بالاترین فعالیت را در دمای ۳۶ °C نسبت به دماهای دیگراز خود نشان می‌دهند سپس به ترتیب در دماهای ۳۷، ۳۸، ۳۵ و ۳۹ درجه سانتی‌گراد بیشترین فعالیت را از آنزیم تثبیت شده مشاهده می کنیم.

Archive of SID

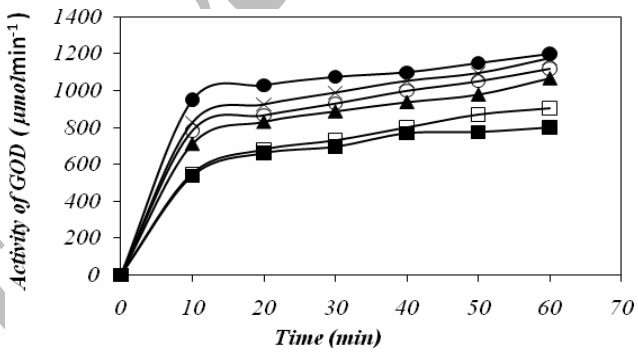
www.SID.ir



نمودار ۱- فعالیت آنزیم گلوکز اکسیداز تثبیت شده (■) و آنزیم آزاد (●) در pH های مختلف (دما 36 °C ، غلظت گلوکز = ۰/۱ مولار، آنزیم تثبیت شده و یا آنزیم آزاد= 1mg/ml و سرعت جریان اکسیژن =1 L/min)



نمودار ۲- فعالیت آنزیم گلوکز اکسیداز تثبیت شده (■) و آنزیم آزاد (●) در دماهای مختلف (pH = 6 ، غلظت گلوکز = ۰/۱ مولار، آنزیم تثبیت شده و یا آنزیم آزاد= 1mg/ml و سرعت جریان اکسیژن =1L/min)



نمودار ۳- تاثیر غلظت های مختلف سوبسترا بر فعالیت آنزیم گلوکز اکسیداز تثبیت شده در مدت زمان ۶۰ دقیقه (pH = 6، دما= ۳۶ ° C ، واحد آنزیم تثبیت شده= 50U و سرعت جریان اکسیژن = 1 L/min)

علائم : (■) غلظت = ۰/۰۲ M ؛ (□) غلظت = ۰/۰۳ M؛ (▲)غلظت = ۰/۰۵ M ؛ (●) غلظت = ۰/۱۰M ؛ (×) غلظت = ۰/۱۵ M ؛(○) غلظت = ۰/۲۰ M

در نمودار ۳ فعالیت آنزیم گلوکز اکسیداز تثبیت شده در غلظت های مختلف سوبسترا (گلوگز) با هم مقایسه شده است. غلظت سوبسترا بر روی سرعت واکنش های آنزیمی تاثیر به سزایی دارد. مطابق نتایج به دست آمده از نمودار ۳، مشاهده می گردد که آنزیم تثبیت شده بالاترین فعالیت را در غلظت ۰/۱ مولار از خود نشان می دهد.

در نمودار ۴ مقایسه ای بین فعالیت آنزیم گلوکز اکسیداز حاصل از سرعت جریان های متفاوت هوا و سرعت جریان اکسیژن صورت گرفته است. با توجه به واکنش آنزیمی گلوکز اکسیداز در شکل ۱، اکسیژن علاوه بر گلوکز سوبسترای دیگر این آنزیم می باشد. همان طور که در نمودار ۴ مشاهده می کنید میزان فعالیت آنزیم گلوکز اکسیداز که از اکسیژن خالص برای انجام فعالیت خود استفاده کرده در مقایسه با حداکثر فعالیت این آنزیم که از پمپ هوا برای واکنش کاتالیزوری خود استفاده کرده است، حدود ۵ برابر بیشتر می باشد.

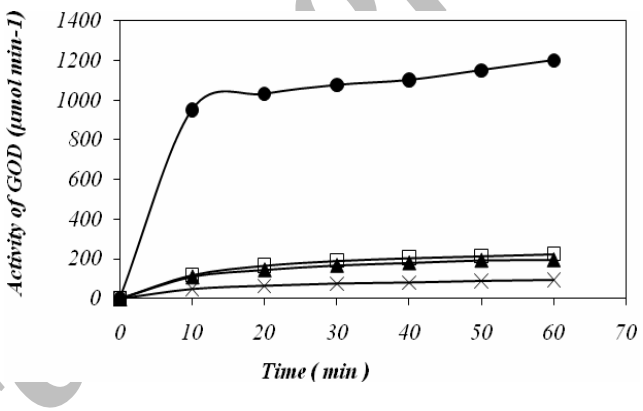
Archive of SID
www.SID.ir

نمودار ۵ نشان دهنده نتایج حاصل از استفاده مکرر آنزیم تثبیت شده در محیط واکنش است. همانطور که در نمودار دیده می شود پس از ۸ بار استفاده از آنزیم هنوز بیش از ۷۵ درصد از فعالیت آنزیم باقیمانده است.

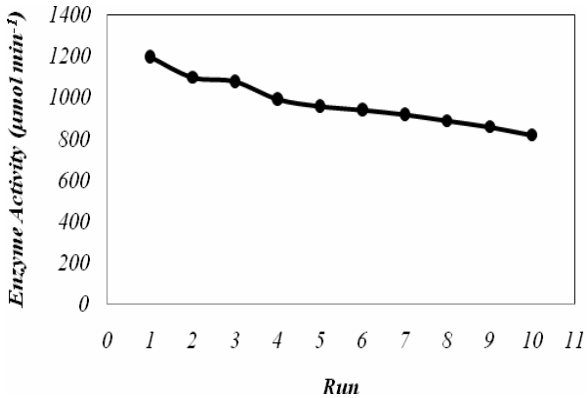
بحث

در نمودار ۱ با توجه به فعالیت آنزیم گلوکز اکسیداز تثبیت شده و آنزیم آزاد هر دو با افزایش pH ، افزایش می یابد و حداکثر فعالیت در pH= ۶ برای هر دو آنزیم مشاهده می‌شود. با افزایش pH از ۶ به ۶/۵ با کاهش شدید فعالیت آنزیم روبرو هستیم که این کاهش فعالیت ممکن است ناشی از تشکیل یک حالت یونی نامناسب برای سوبسترا یا آنزیم (یا هر دو)، یا ناشی از غیرفعال شدن آنزیم و یا تلفیقی از همه اثرات باشد. در مقایسه‌ای که بین pH آنزیم تثبیت شده و آنزیم آزاد صورت گرفته است مشاهده می کنید pH بهینه آنزیم آزاد و تثبیت شده برابر ۶ می باشد و آنزیم تغییر pH ای پس از تثبیت نشان نمی دهد. تغییر نکردن pH آنزیم پس از تثبیت ممکن است به این دلیل باشد که گروه های کاتالیتیکی آنزیم تحت تاثیر جریان تثبیت قرار نگرفته اند. عدم تغییر در pH آنزیم پس از تثبیت در انواع دیگر ژلها توسط دیگر محققین نیز گزارش شده است (Vikartovská *et al*., 2007; Yang *et al*., 2004).

در نمودار ۲ در مقایسه‌ای که بین دمای آنزیم تثبیت شده و آنزیم آزاد صورت گرفته است مشاهده می کنید تفاوتی بین دمای بهینه آنزیم آزاد و تثبیت شده نمی باشد. عدم تغییر در دمای بهینه آنزیم آزاد و تثبیت شده توسط دیگر محققین نیز گزارش شده است (Vikartovská *et al*., 2007; Yang *et al*., 2004) هم چنین عامل اصلی کاهش فعالیت آنزیم در دمای ۳۹ درجه سانتی گراد احتمالا ناشی از پدیده دناتوره شدن آنزیم می باشد، که طی آن ساختمان سه بعدی آنزیم که لازمه فعالیت آنزیم می باشد، از بین می‌رود.



نمودار ۴- مقایسه فعالیت آنزیم گلوکز اکسیداز حاصل از سرعت جریان های متفاوت هوا و سرعت جریان اکسیژن در مدت زمان ۶۰دقیقه (pH = 6، غلظت گلوکز = ۰/۱۰ مولار، دما = 36 °C و واحد آنزیم تثبیت شده =U 50)
علائم: (×) سرعت جریان هوا = ۰/۵ L/min ؛ (▲) سرعت جریان هوا = ۱/۵ L/min ؛ (□) سرعت جریان هوا = ۲/۰ L/min ؛ (●) سرعت جریان اکسیژن = ۱/۰ L/min



نمودار ۵- فعالیت آنزیم گلوکز اکسیداز در استفاده مکرر در شرایط بهینه

www.SID.ir

ساختمان سوم آنزیم ها با پیوندهای ضعیف به یکدیگر متصل شده‌اند. این پیوندها قادرند که مولکول‌های آنزیم را در محلول در وضع ثابتی نگاه دارند تا عوامل مختلف ساختمانی با دقت خاصی در کنار یکدیگر قرار گیرند. به این ترتیب، افزایش درجه حرارت تا زمانی قادر است موجب افزایش فعالیت آنزیمی گردد که عوامل مختلف ساختمان سه بعدی آنزیم، دچار تغییراتی نگردیده باشند. از آن جا که لازمه افزایش سرعت واکنش آنزیمی، افزایش سرعت تصادمات بین مولکول های آنزیم و سوبسترا است، چنان چه بالا رفتن درجه حرارت اختلالی در ایجاد کمپلکس آنزیم- سوبسترا بنماید، سرعت واکنش آنزیمی با افزایش دما کاهش می‌یابد

با توجه به نمودار ۳ مشاهده می شود در غلظتهای بسیار کم بدلیل کم بودن سوبسترا، همه جایگاه های فعال آنزیم توسط سوبسترا پر نخواهد شد و فعالیت آنزیم کم خواهد بود. با افزایش تدریجی غلظت سوبسترا، این فعالیت آنزیمی افزایش مییابد تا زمانی که در یک غلظت معین کلیه جایگاههای فعال آنزیمها با سوبسترا پر می‌شود و فعالیت آنزیم به حداکثر مقدار خود در شرایط عملیاتی می‌رسد. با افزایش غلظت سوبسترا بیش از این مقدار، غلظت سوبسترا تاثیری بر فعالیت آنزیم نخواهد داشت زیرا سوبسترا های اضافی محلی برای قرارگیری و انجام واکنش نخواهند داشت، بنابراین با افزایش غلظت سوبسترا فعالیت آنزیم افزایش نمی یابد.

در نمودار ۴ اختلاف زیاد در فعالیت آنزیم ناشی از میزان اکسیژن موجود در هوا با اکسیژن خالص می باشد و با مقایسه سرعت جریان ۱ لیتر بر دقیقه هوا با سرعت جریان ۱ لیتر بر دقیقه اکسیژن اختلاف زیاد فعالیت آنزیم مشاهده می شود. بنابراین استفاده از اکسیژن خالص برای انجام این واکنش، تاثیر زیادی در افزایش فعالیت آنزیمی و افزایش سرعت واکنش خواهد داشت.

نمودار ۵ نشان دهنده امکان استفاده مکرر از آنزیم در شرایط تثبیت است. با توجه به نتایج بدست آمده، آنزیم پس از تثبیت شدن در حامل کتیرا، قابلیت نگهداری فعالیت خود را در استفاده های مکرر دارد و بنابراین می‌توان از این حامل برای تثبیت آنزیم استفاده کرد و با راندمان بالایی در استفاده های مکرر آن را بکار برد.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده از آزمایشات مربوط به بهینه سازی آنزیم، پلیمر کتیرا حاملی مناسب برای تثبیت آنزیم‌ها می‌باشد. زیرا کتیرا یک پلیمر طبیعی است که فاقد هر گونه مواد سمی می‌باشد و تاثیری بر روی ساختار آنزیم ندارد. تثبیت کردن اجازه استفاده مکرر آنزیم و جداسازی راحت آنرا از محیط واکنش می‌دهد. یکسان بودن شرایط بهینه آنزیم در حالت تثبیت شده و آزاد اثر مثبت در فرایند تثبیت دارد و نشان دهنده شرایط ملایم تثبیت با ژل کتیراست که می‌تواند بعنوان یک ژل مهم و موثر در تثبیت سایر آنزیمها نیز استفاده شود. شرایط بهینه آنزیم گلوکز اکسیداز در دمای ۳۶ درجه سانتی گراد، pH ۶، غلظت گلوکز ۱۰۰ میلی گرم و فشار اکسیژن ۱ لیتر بر دقیقه بدست آمده است که در این شرایط آنزیم مذکور بیشترین فعالیت را نشان می‌دهد و قابل استفاده در عملیات مکرر می‌باشد. هم چنین با توجه به اینکه این گیاه در ایران با کیفیت بسیار خوب موجود است و کشت می‌شود می‌توان از این پلیمر طبیعی که از نظر اقتصادی مقرون به‌صرفه و قابل دسترس می‌باشد، در صنایع آنزیمی مانند صنایع غذایی، آنالیزهای پزشکی و سنسورهای گلوکز استفاده بیشتری کرد.

منابع

Barin, M., Otadi, M., Khorasheh, F. & Kheirolomoom, A. (2009). Effect of Cell Concentration on Acylation of Penicillin G Enzymatic Reaction in Immobilized Cells., Scientia Iranica J., 16 (1), 69-73.

Blandino, A., Macias, M. & Cantero, D. (2001). Immobilization of glucose oxidase within calcium alginate gel capsules. Process Biochem., 36, 601–606.

F.D.A. Washington, Fed. Register 39 (185) (1974) 34207.

Han, K., Wu, Z., Lee, J., Ahn, Ik-S., Park, J. W., Min, B. R. & Lee, K. (2005).Activity of glucose oxidase entrapped in mesoporous gels. Biochem. Eng. J., 22,161-166.

Hecht, H. J., Kalisz, H. M., Hendle, J., Schmid, R. D. & Schomburg, D. (1993). Crystal structure of glucose oxidase from Aspergillus niger refined at 2.3 A resolution. J. Mol. Biol., 229, 153-172.

Archive of SID

www.SID.ir

Otadi, M., Vaziri, A., Seifkordi, A. & Kheirolomoom, A. (2005). Gum tragacanth as a new supporting matrix for immobilizing of whole cell. Iran. J. Chem. Chem. Eng., 24 (4), 1-7.

Otadi, M., Soltani, F., Vaziri, A., Seifkordi, A. & Kheirolomoom, A. (2006); Optimum Condition for production of 6-APA with immobilized E.Coli ATCC11105. Iran. J. Chem. Chem. Eng., 25 (2).

Pazur, J. H., Kleppe, K. & Cepure, A. (1965). A glycoprotein structure for glucose oxidase from Aspergillus niger. Archives of Biochemistry and Biophysics, 111, 351–357.

Ramachandran, S., Fontanille, P., Pandey, A. & Larroche, C. (2006). Gluconic acid: properties,applications and microbial production. Food Technol. Biotechnol., 44, 185-195.

Shin, Y., Hwang S. & Ahn, I. (2004). Enzymatic bleaching of desized cotton fabrics withhydrogen peroxide produced by glucose oxidase, 10, 577-581.

Vikartovská, A., Bučko, M., Mislovičová, D., Pätoprsty, V., Lacík, I. & Gemeiner, P. (2007). Improvement of the stability of glucose oxidase via encapsulation in sodium alginate–cellulose sulfate–poly (methylene-co-guanidine) capsules. Enzyme Microb. Technol., 41, 748-755.

Yang, Y. M., Wang, J. W. & Tan, R. X. (2004). Immobilization of glucose oxidase on chitosan–SiO2 gel. Enzyme and Microbial Technology, 34, 126–131.

Archive of SID

www.SID.ir

Optimization and Immobilization of Glucose Oxidase on Gum Tragacanth Carrier

S. Mobayen [a], M. Otadi [b]*, A. Ebrahim-Habibi [c], A. Rahman[d]

[a] M.Sc. of Biochemistry, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[b] Academic Member of Chemical Engineering Department, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[c] Assistant Professor of Endocrinology and Metabolism Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

[d] Academic Member of Chemical Engineering Department, Shahre-Ghods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Archive of SID

Received: 14 September 2010 Accepted: 21 November 2010

Abstracts

Introduction: Glucose oxidase (β-D-glucose: oxygen-oxidoreductase, EC 1.1.3.4) from *Aspergillus niger*, is a flavoprotein which catalyses the oxidation of β-D-glucose to D-δ glucono-lactone, which subsequently hydrolyzes spontaneously to gluconic acid using molecular oxygen as the electron acceptor. Apart from being an analytical tool in biosensors for medical applications and environmental monitoring glucose oxidase (GOD) finds application in food and fermentation industry. In this study, glucose oxidase (GOD) was encapsulated within tragacanth gel capsules and the optimal conditions for immobilized GOD were obtained.

Materials and Methods: Glucose oxidase was immobilized on gum tragacanth carrier with Microencapsulation method and the effects of pH, temperature, oxygen, concentrations of substrate (glucose) were studied and the optimal conditions for immobilized GOD were obtained. The enzyme activity was measured through pH- control.

Results: The optimal conditions for immobilized enzyme were: T= 36 °C, pH= 6, glucose concentration 0.1 M and the oxygen flow rate = 1 L/min. In optimum condition the activity of immobilized enzyme is preserved up to 75% after 8 repeated uses.

Conclusion: As the results are shown gum tragacanth is a proper and economic biopolymer that might be used for immobilization.

Keywords: *Glucose Oxidase, Gum Tragacanth, Microncapsulaion, Optimum Condition.*

* Corresponding Author: *m_otadi@iauctb.ac.ir*

www.SID.ir