تثبیت آنزیم پروتئاز قلیایي تولیدشده از باسیلوس لیکني فرمیس PTCC1331 روي حامل کلسیم آلژینات و تأثیر آن بر فعالیت آنزیم

شیما صفاریون‌پور[۱] ، سهیلا یغمایی*[۲] و زهرا قبادی‌نژاد[۳]

[۱] دانش آموخته کارشناسی ارشد مهندسی شیمی- دانشکده مهندسی شیمی و نفت - دانشگاه صنعتی شریف

[۲] دانشیار مهندسی شیمی- دانشکده مهندسی شیمی و نفت - دانشگاه صنعتی شریف

[۳] کارشناس ارشد بیوشیمی- دانشگاه صنعتی شریف- مرکز تحقیقات مهندسی بیوشیمی و کنترل محیط زیست BBRC

(تاریخ دریافت ۸۷/۵/۵ , تاریخ دریافت روایت اصلاح شده ۸۸/۹/۲۳ ، تاریخ تصویب ۸۸/۱۲/۱۲)

چکیده

آنزیم پروتئاز قلیایی از گونه باسیلوس لیکنی فرمیس PTCC1331 تحت شرایط بهینه دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، دور بهینه ۱۵۰ rpm و pH بهینه برابر ۱۰ تولید شده و برای افزایش مقاومت حرارتی آن در ترکیب شوینده‌ها، در غلظت‌های مختلف از سدیم آلژینات به روش حبس کردن تثبیت و سپس فعالیت آن تعیین شده است. بیشترین فعالیت آنزیمی در محلول w/v ۲ درصد سدیم آلژینات برابر با $\left(\frac{U}{g}\right)_{Carrier}$ ۴۶ به دست آمده است. بررسی تأثیر دماهای مختلف بر فعالیت نسبی آنزیم آزاد و تثبیت‌شده نشان می‌دهد که فعالیت نسبی آنزیم آزاد در دمای بیش از ۴۵ درجه سانتیگراد کاهش یافته است، اما آنزیم تثبیت‌شده تا دمای ۵۵ درجه سانتیگراد فعالیت خود را حفظ کرده و نسبت به آنزیم آزاد پایدارتر است. همچنین پایداری حرارتی آنزیم تثبیت‌شده در دماهای ۴۰ و ۵۰ درجه سانتیگراد بررسی شده است. نتایج نشان می‌دهد که آنزیم تثبیت‌شده در ۴۰ درجه سانتیگراد به مراتب بیش از ۵۰ درجه سانتیگراد از نظر حرارتی پایدار است. تأثیر pH روی آنزیم آزاد و تثبیت‌شده در محدوده pHهای ۷ تا ۱۲ بررسی شد و نشان داده شده است که هر دو در بین pHهای ۷ و ۸ به مراتب پایداری بیشتری دارد و فعالیت نسبی آنزیم تثبیت‌شده در این محدوده pH، بیشتر از آنزیم آزاد است. نتیجه می‌شود که با استفاده از تثبیت آنزیم با روش مناسب، پایداری آنزیم بهتر و استفاده از آن در صنعت، کارآیی بیشتری خواهد داشت.

واژه های کلیدی: باسیلوس لیکنی فورمیس، پروتئاز قلیایی، تثبیت، کلسیم آلژینات

مقدمه

پروتئازها از مهم‌ترین آنزیم‌های صنعتی هستند که ۶۰ درصد فروش آنزیم دنیا به آنها اختصاص دارد.آنها تنها گروه بزرگی از آنزیم‌ها هستند که به دلیل کاربردشان جایگاه مهمی در فرآیندهای صنعتی دارند [۱].

برای تولید پروتئازها از منابع حیوانی، گیاهی و میکروبی استفاده می‌شود[۲]. میکروب‌ها برای تولید پروتئاز ترجیح داده می‌شوند، زیرا سریع رشد می‌کنند. رشد آنها فضای زیادی لازم ندارد و کار با آنها ساده است و به راحتی می‌توان آنزیم‌هایی با خواص گوناگون از آنها تولید کرد.

پروتئازها در صنایع شوینده‌ها، چرم‌سازی، صنایع غذایی و دارویی کاربرد دارند[۳]. پروتئازهای قلیایی خارج سلولی با منشاء میکروبی از آنزیم‌های مهمی هستند که بیشترین کاربرد آنها در صنعت شوینده است[۴] که به پاکسازی لک‌های پروتئینی روی البسه، به طور مثال لک‌های ناشی از خون، شیر، تخم مرغ و گوشت، کمک می کنند.

از مهم‌ترین پروتئازهای قلیایی که تا به حال تولید شده‌اند، می‌توان به سوبتیلیسین BPN از باسیلوس لیکنی فورمیس، سوبتیلیسین کارلسبرگ از باسیلوس لیکنی فورمیس، سوبتیلیسین آمیلوساکاریتیکوس از باسیلوس آمیلوساکاریتیکوس و سوبتیلیسین E از باسیلوس سوبتیلیس اشاره کرد. سوبتیلیسین‌ها در pHهای ۱۰-۸/۵ بیشترین فعالیت را دارند. انواع پروتئازهای قلیایی، محدوده pH فعالیت بالاتری نسبت به سوبتیلیسینها

* نویسنده مسئول : تلفن : ٦٦١٦٤٥٨٤ , فاکس : ٦٦٠٢٢٨٥٣ ، Email: yaghmaei@sharif.edu

Archive of SID

www.SID.ir

دارند[۱]. آنزیم پروتئاز به کار گرفته شده در ترکیب پاک‌کننده‌ها باید در حضور محتویات دیگر شوینده‌ها پایدار و دارای فعالیت آنزیمی بالایی در محدوده وسیعی از pH و درجه حرارت باشد. به این دلیل فرآیند تثبیت آنزیم‌ها که منجر به افزایش فعالیت و پایداری آنزیم از نقطه نظر حرارتی می‌شود، در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است. پایدار کردن و تثبیت آنزیم و جلوگیری از غیرفعال شدن آن تحت اثر حرارت می‌تواند به روش‌های مختلفی مانند پیوند جانبی با حامل نامحلول توسط معرف دوکاره و یا پیوند کووالانسی با پلیمرهای طبیعی و سنتزی و یا حبس کردن درون ژل‌ها انجام گیرد.

تثبیت آنزیم پروتئاز روی حامل جامد مزایای بسیاری دارد. از جمله می‌توان به استفاده دوباره از آنزیم ، سهولت جداسازی محصول، بهبود پایداری آنزیم و امکان استفاده از آن به طور پیوسته در رآکتورهای بستر پرشده اشاره کرد.

روش حبس کردن، یکی از روش‌های تثبیت است که به صورت محدود کردن آنزیم از نظر فیزیکی بین فضا یا شبکه محدود تعریف می‌شود.ژلاسیون پلیمرهای پلی آنیونی یا پلی کاتیونی با افزودن یون‌های مولتی والان روش ساده و معمول حبس آنزیم‌ها است[۵]. آلژینات‌ها، پلیمرهایی هستند که به دلیل خواص ژلی متعادل و غیر سمی بودن آن به طور معمول استفاده می‌شوند. آلژینات، کوپلیمری آنیونی و خطی است که از لینک‌های β-D ۴ و۱ مانورونیک اسید و α-L گلورونیک اسید در آرایش‌ها و مقادیر مختلف تشکیل شده است[۶]. آنزیم با افزودن قطره‌ای محلول سدیم آلژینات و بیوکاتالیست به محلول سخت‌کننده نمک Ca2+ حبس می‌شود[۷]. کاتیون به عنوان برقرار کننده پیوند جانبی با بیوپلیمر آلژینات عمل می‌کند و ذرات شکل گرفته به شکل کرات ریزی با بیوکاتالیست حبس‌شده درون شبکه این کرات رسوب می‌کنند.

با آنکه آنزیم‌های بسیاری درون ذرات ژلی آلژینات تثبیت شده‌اند، تأثیر شرایط تثبیت روی بازدهی بارگذاری و بازدهی تثبیت، به طور کامل بررسی نشده است.

امروزه توجه بسیاری به صنایع شوینده‌ها در کشور و بهبود ترکیب آنها با استفاده از به کارگیری آنزیم‌هایی نظیر پروتئاز، لیپاز، آمیلاز و ... در آنها شده است. مقاومت حرارتی آنزیم استفاده شده در ترکیب شوینده‌ها اهمیت بسیاری دارد و فرآیند تثبیت آن را بهبود می‌بخشد، بنابراین تثبیت آنزیم پروتئاز استفاده شده در ترکیب شوینده‌ها که از گونه باسیلوس لیکنی فورمیس PTCC1331 تحت شرایط بهینه برای تولید(دمای ۳۷ درجه سانتیگراد ، pH برابر با ۱۰ و دور ۱۵۰ rpm) تولید شده است، بررسی شده است.

هدف از این تحقیق، به دست آوردن نتایج جدید از تثبیت آنزیم به دست آمده از گونه باسیلوس لیکنی فورمیس ذکر شده است که در گذشته در ایران، تحقیقی بر این گونه انجام نگرفته است.

آنزیم پروتئاز تولید شده در حامل کلسیم آلژینات تثبیت شده است. تأثیر غلظت‌های مختلف آلژینات روی بازدهی تثبیت بررسی شده و همچنین فعالیت نسبی آنزیم آزاد و تثبیت‌شده در دماهای مختلف، اندازه‌گیری شده است. پایداری آنزیم تثبیت‌شده از نظر حرارتی در دو دمای مختلف بررسی شده و در نهایت پایداری آنزیم آزاد و تثبیت‌شده در pHهای مختلف مقایسه شده است.

مواد و روش‌ها

مواد

باسیلوس لیکنی فورمیس PTCC1331 تهیه شده از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران

سدیم آلژینات تهیه شده از BDH

محیط تولید

محیط تولید برای تولید آنزیم شامل این مواد است(g/l) : ۱ , KH2PO4 ; ۰/۲ , MgSO4.7H2O ; ۵/۰ پپتون ; ۵/۰ مخمر ; ۱۰ , لاکتوز.

محتویات در بافر Glycine-NaOH pH برابر ۱۰ حل شده‌اند. ارلن مایر حاوی ۲۰۰ میلی لیتر از محیط تولید که تلقیح باکتری به میزان ۱۰ درصد آن ($10^7 \frac{cfu}{ml}$)[۸] به آن انجام گرفته، در ۳۷ درجه سانتیگراد و دور ۱۵۰rpm درون شیکر قرار گرفته است.

جداسازی آنزیم

حدود ۲۰ میلی لیتر از محیط تولید پس از ۷۲ ساعت که ماکزیمم تولید مشاهده شده است، درون ظرف

Archive of SID

www.SID.ir

سانتریفوژ ریخته و به مدت ۱۵ دقیقه و دور ۳۰۰۰g و در دمای پایین محیط سانتریفوژ شده است. در مرحله بعد آنزیم از رسوبات با استفاده از فیلتراسیون خلاء، جدا شده است.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پروتئاز

فعالیت پروتئاز تولید شده، با استفاده از کازئین به عنوان سوبسترا اندازه‌گیری شده است. ۰/۵ میلی لیتر از آنزیم پروتئاز تولیدشده به ۴/۵ میلی لیتر از محلول(کازئینw/w ۱٪ تهیه شده با بافر Tris-HCl pH برابر ۸) اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد انکوبه شده است. سپس میزان ۵ میلی لیتر از محلول(TCA ۵ ٪) برای متوقف کردن واکنش به آن اضافه شده است. پس از متوقف شدن واکنش محلول به دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شده و جذب محلول باقیمانده در ۲۸۰nm اندازه‌گیری شده است.

یک واحد فعالیت آنزیم به صورت مقدار آنزیم تعریف می‌شود که ۱µmol تیروزین را در دقیقه تحت شرایط assay آزاد می‌کند. میزان تیروزین از منحنی استاندارد تیروزین مشخص شده است[۹].

حبس کردن پروتئاز قلیایی در ذرات کلسیم آلژینات

۰/۵میلی لیتر از آنزیم پروتئاز با فعالیت ماکزیمم (U ۲۰۱/۶۴) به دست آمده، پس از ۷۲ ساعت با ۱۰میلی لیتر از محلول سدیم آلژینات غلظت‌های(w/v ۱،۲،۳ %) مخلوط شده و تا اختلاط کامل هم زده شده است[۳] . محلول حاصل با استفاده از سرنگ با شماره سوزن ۱۸درون ۱۰۰میلی لیتر محلول CaCl2.6H2O ۰/۱۵M چکانده شده و ذرات کروی شکل کلسیم آلژینات شکل گرفته‌اند [۱۰].

برای تثبیت فاصله سر سوزن سرنگ از محلول CaCl2 برابر با ۱۰سانتی متر در نظر گرفته شده است[۱۱] [۱۲] . اندازه ذرات کروی با تغییر قطر سوزن تغییر می‌کند. بعد از مدت ۳۰ دقیقه که محلول حاصل هم زده شد و ذرات کروی شکل سخت شدند، توسط فیلتراسیون خلاء از محلول CaCl2.6H2O جدا شده‌اند[۱۳] [۱۴] . این ذرات دو بار با بافر استات M ۰/۱ و pH برابر ۴/۵ شسته شده و سپس در بافر Tris-HCl ۰/۱M و pH برابر ۹ در ۴ درجه سانتیگراد ذخیره شده‌اند تا زمانی که فعالیت آنزیم تثبیت‌شده اندازه‌گیری شود[۱۵].

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پروتئاز تثبیت‌شده در کلسیم آلژینات

مانند روش ذکر شده برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پروتئاز آزاد از ۴/۵میلی لیتر کازئین w/w ۱ درصد، به عنوان سوبسترا و ۵ میلی لیتر TCA ۵ درصد به عنوان بازدارنده استفاده شده است[۱۶]. میزان فعالیت آنزیم حبس شده در ۴۰ عدد از گوی‌های کلسیم آلژینات به دست آمده، اندازه‌گیری شده است[۲].

محلول کازئین و گوی‌های تثبیت شده به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد انکوبه شده و پس از افزودن TCA به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شده‌اند. جذب محلول باقیمانده در ۲۸۰ nm اندازه‌گیری شده است.

اندازه‌گیری میزان پروتئین

مقدار پروتئین با استفاده از روش لوری و استفاده از BSA(آلبومین سرم گاوی) به عنوان استاندارد اندازه‌گیری شده است [۱۷].

محتوای پروتئین آنزیم تثبیت‌شده با کسر مقدار پروتئین موجود در محلول CaCl2.6H2O باقیمانده پس از تثبیت از محتوای پروتئین آنزیم پروتئاز اولیه به دست آمده است.

اندازه‌گیری پایداری حرارتی آنزیم پروتئاز تثبیت‌شده در کلسیم آلژینات

ابتدا میزان ۰/۵ میلی لیتر از آنزیم پروتئاز با فعالیت(۲۰۱/۶۴U) مطابق روش تثبیت ذکرشده در محلول w/v ۲ درصد سدیم آلژینات حل شده و در نهایت در گوی‌های کلسیم آلژینات تثبیت شده است. تعداد ۲۰ عدد از این گوی‌ها در بافرGlycine-NaOH ۰/۲N pH برابر ۱۰ [۱۵] در دو دمای مختلف۴۰ و ۵۰ درجه سانتیگراد در مدت زمان‌های۰،۳۰،۴۵،۶۰،۷۵،۹۰ دقیقه انکوبه شده، سپس فعالیت آنزیم تثبیت‌شده در مدت زمان‌های ذکرشده با استفاده از روش اندازه‌گیری فعالیت به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد اندازه‌گیری شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

اندازه‌گیری پایداری آنزیم پروتئاز آزاد و تثبیت‌شده در کلسیم آلژینات در pHهای مختلف

تعداد ۲۰ عدد از گوی‌های به دست آمده حاوی آنزیم تثبیت‌شده در ۱ میلی لیتر از بافر Tris-HCl pHهای ۷ و ۸ و ۹ و بافر Glycine-NaOH pHهای ۱۰ و ۱۱ و ۱۲ در ۴۰ درجه سانتیگراد به مدت یک ساعت انکوبه شده است. سپس فعالیت آنزیم تثبیت‌شده در ذرات کلسیم آلـژینات به روش ذکرشده(مدت زمان ۱۰ دقیقه و دمای ۴۵ درجه سانتیگراد) اندازه‌گیری شده و فعالیت‌های نسبی در pHهای ذکرشده محاسبه شده‌اند.

بحث و نتایج

تأثیر غلظت سدیم آلژینات روی فعالیت آنزیم پروتئاز تثبیت‌شده در کلسیم آلژینات

جدول (۱) تأثیر غلظت‌های مختلف سدیم آلژینات(۱،۲،۳w/v%) را روی تثبیت آنزیم پروتئاز نشان می‌دهد. بیشترین میزان فعالیت آنزیم حبس‌شده، مربوط به محلولw/v ۲٪ سدیم آلژینات و برابر $\left(\frac{U}{g}\right)_{Carrier}$ ۴۶بوده است.

جدول ۱: تأثیر غلظت‌های مختلف سدیم آلژینات روی فعالیت آنزیم تثبیت‌شده در کلسیم آلژینات.

Alginate Concentration (w/v%)	Number of Beads	activity $\left(\frac{U}{g}\right)_{Carrier}$
1	40	41
2	42	46
3	41	43.4

در غلظت‌های پایین‌تر سدیم آلژینات نشت آنزیم به دلیل منافذ بزرگ ژل که هنوز به خوبی پیوند برقرار نکرده‌اند، انجام می‌گیرد[۲]. در غلظت‌های بالاتر از ۲w/v درصد سدیم آلژینات به دلیل ویسکوزیته بالای مخلوط سدیم آلژینات و آنزیم ، پخش سوبسترای با وزن مولکولی بالا در ذرات آلژینات سخت‌تر صورت می‌گیرد. به این دلیل میزان فعالیت کمتر است. بنابراین غلظت ۲w/vدرصد محلول سدیم آلژینات به عنوان غلظت بهینه برای حبس و تثبیت آنزیم پروتئاز انتخاب می‌شود.

تأثیر غلظت‌های مختلف محلول سدیم آلژینات روی بازدهی تثبیت آنزیم پروتئاز

پس از محاسبه میزان پروتئین آنزیم آزاد و تثبیت‌شده، فعالیت‌های ویژه اندازه‌گیری شده‌اند. بازدهی تثبیت از فرمول زیر قابل دسترسی است[۷]:

$$\%immobilizationYield = \left(\frac{a_{imm.}}{a_{free}}\right) \times 100 \qquad (۱)$$

که a imm فعالیت ویژه آنـــزیم تثبیت‌شده (U/mg protein) و a free فعالیت ویژه آنـــــزیم آزاد (U/mg protein) است.

با استفاده از این فرمول، فعالیت آنزیم به میلی گرم سدیم آلژینات محاسبه شده و پس از اندازه‌گیری، میزان پروتئین فعالیت ویژه و بازدهی تثبیت آنزیم حبس‌شده در سه غلظت مختلف از محلول سدیم آلژینات اندازه‌گیری شده است. بیشترین بازدهی تثبیت مربوط به محلولw/v ۲ درصد سدیم آلژینات و برابر با ۲۴/۷ درصد بوده است. نتایج حاصل از اندازه‌گیری فعالیت و در ادامه فعالیت ویژه و بازدهی تثبیت برای سه غلظت مختلف آلژینات پس از سه بار تکرار مراحل اندازه‌گیری با درصد خطا در جدول (۲) و جدول (۳) آورده شده است.

جدول ۲: تأثیر غلظت‌های مختلف سدیم آلژینات روی فعالیت آنزیم تثبیت‌شده.

Support	Immobilized Protein (10^4) (mg Protein per mg Na-alg.)	Activity (U mg^{-1} Na-alg.)
Na-alginate (w/v) %		
1	7.3±0.9	0.04±0.007
2	2.5±0.4	0.02±0.002
3	1.4±0.1	0.006±0.0004

[a] The values reflect the mean and standard deviation of three different measurements.

فعالیت نسبی آنزیم پروتئاز آزاد و تثبیت‌شده در دماهای مختلف

با توجه به روش‌های ذکرشده برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت‌شده، با استفاده از کازئین به عنوان سوبسترا و TCA به عنوان بازدارنده، فعالیت‌های نسبی

Archive of SID

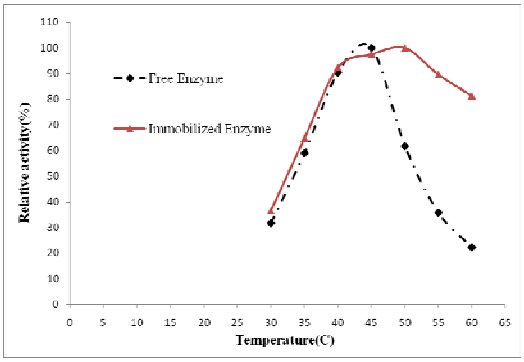
www.SID.ir

آنزیم آزاد و حبس‌شده در کلسیم آلژینات محاسبه شده‌اند. آنزیم آزاد بیشترین فعالیت را در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد از خود نشان می‌دهد و در دمای بیش از ۴۵ درجه سانتیگراد فعالیت نسبی آنزیم آزاد کاهش پیدا می‌کند. در مقایسه با آنزیم آزاد، آنزیم تثبیت‌شده، فعالیت نسبی بیشتری دارد و بیشترین فعالیت در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد مشاهده شده است. آنزیم تثبیت‌شده در دمای بیش از ۵۰ درجه سانتیگراد، فعالیت نسبی خود را به خوبی حفظ می‌کند[۳]. تأثیر دما روی فعالیت نسبی آنزیم آزاد و تثبیت‌شده در شکل (۱) مشاهده می‌شود. همان طور که در نمودار مشخص است، آنزیم تثبیت‌شده در محدوده وسیع‌تری از دما، فعالیت نسبی خود را در حد ماکزیمم، در مقایسه با آنزیم آزاد حفظ می‌کند، بنابراین استفاده از آن در ترکیب شوینده‌ها که آنزیم باید فعالیت بالا داشته باشد، پیشنهاد می‌شود.

جدول ۳: تأثیر غلظت‌های مختلف سدیم آلژینات روی بازدهی تثبیت.

Support	Specific activity (U mg^{-1} protein)	Immobilization Yield (%) b
Na-alginate (w/v) %		
1	56.2±4.4	19.7±1.5
2	70.3±1.5	24.7±0.5
3	46.5±1.7	16.3±0.6

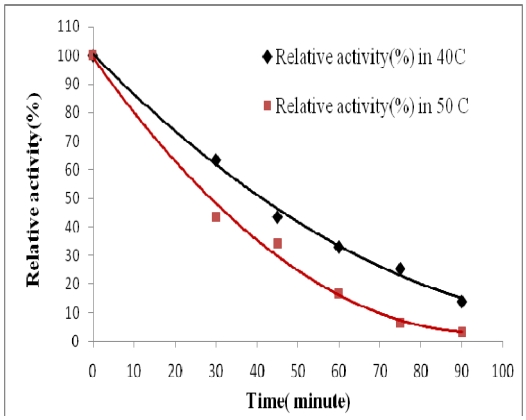
[a] The values reflect the mean and standard deviation of three different measurements.
b The Immobilization yield was calculated from the ratio: (specific activity of immobilized enzyme/specific activity of free enzyme)×100.The specific activity for free enzyme was 91.7±0.8 U(mg protein) $^{-1}$ (average ±S.D. , n=3).



شکل ۱: فعالیت نسبی آنزیم پروتئاز آزاد و تثبیت‌شده در کلسیم آلژینات در دماهای مختلف.

پایداری حرارتی آنزیم پروتئاز تثبیت‌شده در کلسیم آلژینات

فعالیت‌های نسبی آنزیم تثبیت‌شده در دو دمای ۴۰ و ۵۰ درجه سانتیگراد مطابق روش ذکرشده اندازهگیری شده و نتایج در زمان‌های ذکرشده در شکل (۲) نشان داده شده است.



شکل ۲: پایداری حرارتی آنزیم پروتئاز تثبیت‌شده در کلسیم آلژینات در دو دمای ۴۰ و ۵۰ درجه سانتیگراد.

همان طور که از شکل (۲) مشخص است، آنزیم تثبیت‌شده روی کلسیم آلژینات در ۴۰ درجه سانتیگراد فعالیت نسبی بیشتری نسبت به ۵۰ درجه سانتیگراد دارد و همان طور که مشاهده می‌شود، با گذشت زمان فعالیت نسبی آنزیم تثبیت‌شده در هر دو دما کاهش پیدا می‌کند.

پایداری آنزیم پروتئاز آزاد و تثبیت‌شده در کلسیم آلژینات در pHهای مختلف

فعالیت نسبی آنزیم آزاد و تثبیت‌شده در pHهای مختلف مطابق روش یادشده اندازه‌گیری شده و نتایج در جدول (۴) آورده شده است. بیشترین فعالیت نسبی برای آنزیم آزاد و تثبیت‌شده در pH برابر با ۸ به دست می‌آید و آنزیم تثبیت‌شده در محدوده pHهای یادشده، پایداری بیشتری نسبت به آنزیم پروتئاز آزاد دارد. همان طور که در شکل (۳) مشاهده می‌شود، بیشترین پایداری آنزیم تثبیت‌شده و آزاد بین pHهای ۷ و ۸ قابل دستیابی است.

بنابراین این گونه نتیجه می‌شود که آنزیم پروتئاز تثبیت‌شده در کلسیم آلژینات را می‌توان برای حفظ پایداری آنزیم در pH برابر با ۸ ذخیره کرد.

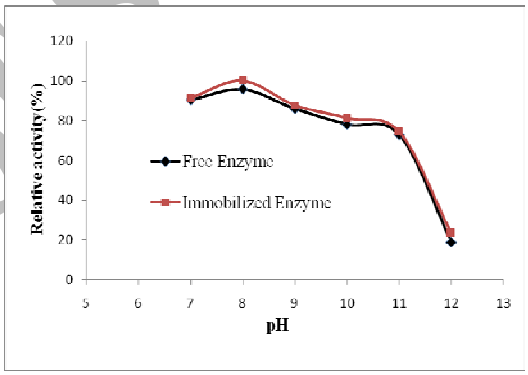
Archive of SID
www.SID.ir

همچنین با توجه به بالاتر بودن فعالیت نسبی آنزیم تثبیت‌شده در کلسیم آلژینات نسبت به آنزیم آزاد در pHهای مختلف، استفاده از این آنزیم به صورت تثبیت‌شده در این حامل در ترکیب شوینده‌ها توصیه می‌شود.

جدول ۴:سنجش پایداری آنزیم پروتئاز آزاد و تثبیت‌شده در pHهای مختلف.

pH	Relative activity% of free Enzyme	Relative activity% of Immobilized Enzyme
7	90.4	91.34
8	95.7	100
9	86	87.63
10	78.1	81.3
11	72.9	74.2
12	18.9	43.5

Activity of free Enzyme = 201.64U



شکل ۳: سنجش پایداری آنزیم پروتئاز آزاد و تثبیت‌شده در کلسیم آلژینات درpHهای مختلف.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست آمده، فرآیند تثبیت آنزیم پروتئاز قلیایی روی حامل کلسیم آلژینات، منجر به افزایش مقاومت حرارتی آنزیم می‌شود و آن را بهبود مـی‌بخشد. به این دلیل که آنزیم پروتئاز استفاده شده در ترکیب شوینده‌ها، باید از پایداری حرارتی و فعـــــالیت خوبی بهره‌مند باشد، استفاده از حامل کلسیم آلژینات برای تثبیت و افزایش پایداری حرارتی آنزیم ترجیح داده می‌شود. بازدهی تثبیت آنزیم حبس‌شده در آلژینات، زیاد مطلوب نیست، اما به دلیل افزایشی که در پایداری آنزیم در مقابل حرارت مشاهده می‌شود، می‌توان از این حامل برای تثبیت آنزیم استفاده کرد.

با توجه به بیشترین میزان فعالیت به دست آمده ($\left(\frac{U}{g}\right)_{Carrier}$ ۴۶) برای آنزیم تثبیت‌شده در سدیم آلژینات ۲ درصد، این غلظت از سدیم آلژینات به عنوان غلظت بهینه برای تثبیت آنزیم انتخاب می‌شود. نتایج به دست آمده از تحقیقات (Abdel-Fattah et al [۳])در تثبیت آنزیم پروتئاز تولیدشده از گونه باسیلوس لیکنی فورمیس ATCC21415 در حامل کلسیم آلژینات نیز گویای این مطلب است که غلظت ۲درصد سدیم آلژینات در مقایسه با سایر غلظت‌ها بازدهی بالاتری از تثبیت را به دست می‌دهد و این مطلب با نتایج به دست آمده برای آنزیم آزمایش‌شده مطابقت دارد. آنزیم تثبیت‌شده در ۴۰ درجه سانتیگراد، پایداری حرارتی خوبی داشته و آنزیم آزاد و تثبیت‌شده در کلسیم آلژینات در محدوده pH ۷ و ۸ پایداری خود را به مراتب بیشتر حفظ می‌کنند. بنابراین این گونه نتیجه می‌شود که با استفاده از فرآیند تثبیت آنزیم پروتئاز در کلسیم آلژینات، می‌توان مقاومت آنزیم را در برابر حرارت افزایش داده و از آن در ترکیب شوینده‌ها استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

از همه کارشناسان مرکز تحقیقات مهندسی بیوشیمی و کنترل محیط زیست BBRC به دلیل همکاری و در اختیار قرار دادن تجهیزات مورد نیاز برای انجام این تحقیق تشکر می‌شود.

مراجع

1- Falahat pishe, H., Jalali, M., Badami, N. and Mardani, N. (2005). “Production & purification of alkaline protease enzyme produced from bacillus licheniformis of soil.” *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences.*

2- Sharma , J., Singh , A., Kumar , R. and Mittal ,A. (2006) . “Partial purification of an alkaline protease from a new strain of aspergillus oryzae AWT20 and its enhanced stabilization in entrapped ca-alginate beads.” *Internet Journal of Microbiology*. , Vol.2, No.2.

Archive of SID

www.SID.ir

3- A. Ahmed, S., A. Saleh, Sh. and F. Abdel-Fattah, A. (2007). "Stabilization of bacillus licheniformis ATCC21415 alkaline protease by Immobilization & modification." *Australian Journal of Basic & Applied Sciences*.

4- A. Abdel-Naby , M., S. Ismail , A-M., Ahmed, S.A. and F. Abdel Fattah, A. (1998) . "Production and Immobilization of alkaline protease from bacillus Mycoides." *Bioresource Technology*.

5- Mateo, C., M. Palomo , J., Fernandez-Lorente , G., M. Guisan , J. and Fernandez-Laufuente , R., Jan(2007). "Improvement of enzyme activity, stability & selectivity via immobilization techniques." *Enzyme &Microbial technology.*

6- SP,Kaplan, C., "Methods in enzymology." *Immobilized Enzymes*, volume 44 , Newyork,Ny,academic press 1.

7- Won, K., kim , S., kim , K. J., Woo Park, H. and Moon, S. J. (2004). "Optimization of lipase entrapment in ca-alginate gel beads." *Process Biochemistry*.

8- Parish, M.E. and Winniczuk , P.P. (1997). " Minimum inhibitory concentrations of antimicrobials against microorganisms related to citrus Juice." *Food microbiology*, 14:373-381.

9- Potumarthi, R., Subhakar, Ch. And Jetty, A., Dec. (2006). "Alkaline protease production by submerged fermentation in stirred tank reactor using bacillus licheniformis NCIM-2042: effect of aeration and agitation regimes." *Biochemical Engineering Journal*.

10- F. Bickerstaff, G. (1997). *Immobilization of enzymes & cells.*

11- Veliky , I.A. and Mclean , J.C. , "Immobilized biosystems." *Theory & Practical Applications, Imprint of Chapman & Hall.*

12 - Elibol , M. and R. Moreira, A.,Dec.(2002). "Production of extracellular alkaline Protease by immobilization of the marine bacterium teredinobacter turnirae." *Process Biochemistry*.

13- Haider, T. and Husain , Q., Jan. (2007). "Calcium alginate entrapped preparation of aspergillus oryzae β galactosidase: Its stability and applications in the hydrolysis of lactose." *Biological Macromolecules*.

14- Markvicheva , E.A., Kuptsova , S. V., Buryakov , A.N., Babak, V.G., Varlamova , E.A., Dugina , T. N., Strukova , S. M., Lange, M. A., Vasilieva , T.V. and Rumsh, L.D. (2000). "Proteases entrapped in polymer composite hydrogels : preparation methods & applications." *Vestnik Moskovskogo Universiteta, Khimiya*, vol 41 No 6 Supplement.

15 -Michaelis , L. (1930). *General preparative procedures., production of buffers*, J. Biol. Chem. 87 33.

16-*Enzymatic Assay of Protease Casein as a Substrate* , Protease From Bacillus Licheniformis , Sigma Prod. No. P 5459.

17-*Determination of Total Protein by the Lowry Method Using the Biotek Instruments ElX808 Microplate Reader* , 2006.

Archive of SID

www.SID.ir