ISSN: 2476-6917; Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(1):151-157

Enhancing Activity and Stability of Penaeus vannamei Protease against Heavy Metal Poisoning via immobilization on Chitosan Nanoparticles

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Shojaei F.[1] *PhD*,
Homaei A.*[2] *PhD*,
Taherizadeh M.R.[1] *PhD*,
Kamrani E.[1] *PhD*

How to cite this article
Shojaei F, Homaei A, Taherizadeh M R, Kamrani E. Enhancing Activity and Stability of Penaeus vannamei Protease against Heavy Metal Poisoning via immobilization on Chitosan Nanoparticles. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10 (1):151-157.

[1]Marine Biology Department, Marine Science & Technology Faculty, Hormozgan University, Bandar Abbas, Iran.
[2]Biochemistry Department, Science Faculty, Hormozgan University, Bandar Abbas, Iran

**Correspondence*
Address: Biochemistry Department, Science Faculty, Hormozgan University, Bandar Abbas, Iran.
Postal Code: 7916193145
Phone: +98 (76) 33711000
Fax: +98 (76) 33670716
a.homaei@hormozgan.ac.ir

Article History
Received: July 19, 2017
Accepted: January 13, 2018
ePublished: March 16, 2019

ABSTRACT

Enzymes of marine organisms are ideal candidates for biomonitoring of pollution in marine environments. For the widespread use of enzymes in industrial processes, carried out under certain physico-chemical conditions, their stability must be improved. In this study, for the first time, chitosan nanoparticles were used as matrices for augmenting the stability of *Penaeus vannamei* (Whiteleg shrimp)-derived purified proteases against metallic ions. For the electrostatic binding of the enzyme to the chitosan nanoparticles, the protein solution at a concentration of 7mg/ml was added to the nanoparticles, and incubated for 4 hours at 10°C. After 3 times rinsing with phosphate buffer of pH=7.5, the nano-enzyme was dissolved in 1ml phosphate buffer, and used for further studies. The results of this study showed that Fe^{2+} and Mn^{2+} significantly increased the enzyme activity, whereas a strong inhibitory effect was observed in the presence of Cd^{2+}, Hg^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Cu^{2+} and Zn^{2+}, and a weak inhibitory effect in the presence of Na+ and K+. The immobilized enzyme exhibited greater resistance to metal ions than its free counterpart. The free enzyme was susceptible to the presence of metal ions, and with the increment of their concentrations, enzyme activity declines. From this nexus, it could be inferred that the high stability of immobilized enzyme is due to the presence of chitosan nanoparticles. Stability retention of the immobilized enzyme at high concentrations of metal ions indicates the efficacy and utility of the immobilization method in industrial enzyme technology.

Keywords Immobilization; Protease Enzyme; Metal Ions; Chitosan Nanoparticles

CITATION LINKS

[1] Digestive alkaline proteases from the goby ... [2] Sources of marine superoxide dismutases ... [3] Extraction and purification of a highly ... [4] The current knowledge on the application of anti-biofilm ... [5] Industrial applications of enzyme biocatalysis ... [6] Digestive proteinases from marine organisms and ... [7] Benthic macroalgae as biological indicators of heavy ... [8] Enzymatic ... [9] Enzyme stability and stabilization - aqueous ... [10] Improving the activity and stability of actinidin by ... [11] Immobilization of α-amylase on gold nanorods ... [12] Improved activity and thermo-stability of the ... [13] The immobilization of glucose oxidase at manganese ... [14] Evaluation of enzymatic activity of commercial inulinase from ... [15] Enzyme immobilization: An overview ... [16] Immobilized enzymes: Methods and ... [17] Immobilization of α-amylase from mung beans ... [18] Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by free and nanoclay-immobilized ... [19] Immobilization of cellulase in nanofibrous PVA membranes ... [20] Enzyme immobilization in a biomimetic silica ... [21] Chitin and chitosan: Functional biopolymers from ... [22] Immobilization of soybean (Glycine max) α-amylase ... [23] Chitin and chitosan: Chemistry, properties ... [24] Application of chitin- and chitosan-based materials for ... [25] Optimization of fabrication parameters to produce ... [26] α-Glucosidase immobilization on chitosan-enriched ... [27] Immobilization of yeast inulinase on chitosan ... [28] Immobilization of pectinase onto chitosan magnetic ... [29] Immobilization of papaya laccase in chitosan led ... [30] Immobilization and controlled release of β-galactosidase ... [31] Optimum conditions for lipase immobilization on ... [32] Cysteine enhances activity and stability of immobilized ... [33] Immobilized papain on gold nanorods as heterogeneous ... [34] Immobilization of Penaeus merguiensis alkaline phosphatase ... [35] The role of metals in enzyme ... [36] What is the relationship between environmental conditions ... [37] Effect of cadmium and zinc on antioxidant enzyme ... [38] Purification and biochemical properties of highly efficient ... [39] In-vitro effects of biochemical factors on trypsin ... [40] The study of in-vitro effect of some chemical ... [41] Alkaline proteinase from intestine of Nile ... [42] Metal ions in biological ...

Copyright© 2019, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

www.SID.ir

افزایش فعالیت و پایداری *پنائوس وانامی* پروتئاز در برابر اثرات سمی فلزات سنگین با تثبیت روی نانوذرات کیتوزان

فوزیه شجاعی PhD
گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
احمد همایی* PhD
گروه بیوشیمی، دانشکده علوم، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
محمد رضا طاهری‌زاده PhD
گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
احسان کامرانی PhD
گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

چکیده
آنزیم‌های جانداران دریایی کاندیدای مناسبی برای پایش زیستی سنجش آلودگی‌ها در محیط‌های دریایی هستند. برای استفاده گسترده از آنزیم‌ها در فرآیندهای صنعتی که در شرایط فیزیکوشیمیایی خاص انجام می‌شوند، بایستی پایداری آنها را بهبود بخشید. در این پژوهش با استفاده از نانوذره‌های کیتوزان به‌عنوان بستری سازگار با سیستم‌های زیستی گامی موثر در جهت افزایش پایداری و حفظ فعالیت آنزیم پروتئاز خالص‌شده از میگوی *پنائوس وانامی* در برابر یون‌های فلزی برداشته شد. پس از فعال‌نمودن نانوذره به‌منظور اتصال الکترواستاتیک آنزیم به نانوذره، محلول پروتئینی با غلظت ۷میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به نانوذره اضافه و به‌مدت ۴ساعت در دمای ۱۰°C انکوبه شد، سپس بعد از سه‌بار شست‌وشو با بافر فسفات با pH برابر ۷/۵ نانوآنزیم در یک‌میلی‌لیتر بافر فسفات حل و برای پژوهش‌های بعدی استفاده شد. نتایج این تحقیق نشان داد که یون‌های Fe^{2+} و Mn^{2+} به‌طور قابل توجهی فعالیت آنزیم را افزایش دادند، اثر مهاری قوی در حضور یون‌های Cu^{2+}، Zn^{2+}، Cd^{2+}، Hg^{2+}، Co^{2+} و Ni^{2+} و اثر مهاری ضعیفی در حضور یون‌های K^{+} و Na^{+} مشاهده شد. آنزیم تثبیت‌شده نسبت به همتای آزادش مقاومت بیشتری به یون‌های فلزی از خود نشان داد، در حالی که آنزیم آزاد نسبت به حضور یون‌های فلزی حساس بود و با افزایش غلظت آنها کاهش فعالیت آنزیم محسوس‌تر بود. پایداری بالای آنزیم تثبیت‌شده به‌دلیل حضور نانوذره‌های کیتوزان است. حفظ پایداری آنزیم تثبیت‌شده در غلظت‌های بالای یون‌های فلزی بیانگر کارآیی بالای روش تثبیت در حفظ پایداری و فعالیت آنزیم تثبیت‌شده بود.

کلیدواژه‌ها: تثبیت، آنزیم پروتئاز، یون‌های فلزی، نانوذره‌های کیتوزان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۴/۲۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۲۳
*نویسنده مسئول: a.homaei@hormozgan.ac.ir

مقدمه

محیط‌های آبی به‌دلیل دارابودن گونه‌های متعدد آبزی ظرفیت بالایی برای کشف و تولید فرآورده‌های زیستی مختلف و از جمله آنزیم‌ها دارند. در سال‌های اخیر پژوهش‌های گسترده‌ای روی آنزیم‌های موجود در جانداران آبزی و ضایعات ناشی از فرآوری آبزیان صورت گرفته و باعث پیدایش حوزه جدیدی برای استفاده از آنها در صنایع مختلف شده است[1, 2]. یکی از این آنزیم‌ها، آنزیم خالص‌سازی‌شده از میگوی *پنائوس وانامی* است که دارای کارآیی کاتالیتیک بالا، ویژگی سوبسترایی با دامنه وسیع و توانایی پروتئولیز بالا است[3]. آنزیم پروتئاز خالص‌شده از میگوی وانامی با توجه به ویژگی‌های منحصربه‌فردش می‌تواند دارای کاربردهای فراوان در صنایعی مانند پزشکی، غذایی، دارویی، محیط زیست، دباغی، شوینده‌ها، صنایع ابریشم، عکاسی، داروسازی، تصفیه پساب، پنیرسازی، فرآوری گوشت، صابون‌سازی و صنعت چسب باشد[4, 5].

با توجه به شرایط محیطی مختلف آبزیان و سازگاری آنها با محیط اطراف خود همراه با تنوع ژنتیکی، شرایط مساعدی برای فعالیت آنزیم‌ها در آبزیان در مقایسه با پستانداران، گیاهان و میکرواورگانیزم‌ها فراهم شده است که از آن جمله می‌توان به داشتن فعالیت بالا در دما و pHهای بحرانی اشاره کرد[6].

آلودگی فلزات سنگین در منطقه ساحلی یک مساله جدی است که به‌طور قابل توجهی منجر به تخریب محیط زیست می‌شوند. فلزات سنگین در غلظت‌های بالا در زیستگاه‌های آبی باعث تجمع در موجودات مختلف، آسیب‌رساندن به بافت‌ها و جلوگیری از رشد می‌شوند. با این حال تجزیه و تحلیل از محتوای کل فلزات در آب، رسوبات و سمیت آلاینده‌ها به موجودات قابل پیش‌بینی نیست، بنابراین آنزیم‌های موجودات دریایی کاندیدای مناسبی برای پایش زیستی سنجش آلودگی‌ها در محیط‌های دریایی هستند[7, 8].

برای استفاده گسترده از آنزیم‌ها در فرآیندهای صنعتی باید پایداری آنها را که در شرایط فیزیکوشیمیایی خاص انجام می‌شوند، بهبود بخشید زیرا ساختار آنزیم هنگام استفاده در فرآیندهای صنعتی ممکن است واسرشته شده و بنابراین آنزیم فعالیت کاتالیزوری خود را از دست بدهد[9].

یکی از روش‌هایی که سبب افزایش پایداری طولانی‌مدت آنزیم‌ها به‌منظور استفاده در صنعت می‌شود، تثبیت آنزیمی است. در بیوتکنولوژی مدرن منظور از آنزیم‌های تثبیت‌شده این است که آنزیم‌ها را به طریقی پایبند و تحرک آنزیم را محدود سازیم که به‌طور پیوسته قابل استفاده باشند[10, 11].

در فرآیند تثبیت آنزیمی، آنزیم به یک ماده نگهدارنده نامحلول یا بستر متصل شده یا درون آن قرار می‌گیرد و سپس به‌طور پیوسته در یک راکتور آنزیمی از آن استفاده می‌شود. در بعضی موارد به‌جای آنزیم‌های تثبیت‌شده از واژه‌هایی مانند آنزیم‌های نامحلول و آنزیم‌های متصل به بستر نیز استفاده می‌شود[12, 13].

امروزه علاقه‌مندی به تثبیت آنزیم‌ها افزایش یافته و استفاده از آنزیم‌های تثبیت‌شده در بسیاری از فرآیندها موفقیت‌آمیز بوده است[14]. انتخاب روش و بستر مناسب برای تثبیت با توجه به کاربردهای متنوعی که برای آنزیم‌ها مطرح است، اهمیت بسزایی دارد[15].

استفاده از پلیمرهای طبیعی از جمله سلولز، کاراژینان، کلاژن، کیتین، کیتوزان و پلیمرهای سنتیتیک مانند پلی‌آکریل‌آمید، آمبرلیت، پلی‌وینیل‌الکل و ترکیبات معدنی نظیر سیلیس، ذرات رس و کربن فعال برای تثبیت آنزیم‌ها همواره مورد توجه محققین بوده است[16-20]. کیتوزان، پلی‌ساکاریدی خطی است که از داستیله‌شدن کیتین در شرایط قلیایی تولید می‌شود. این پلی‌ساکارید از اتصال بتا ۱ به ۴ واحدهای ۲- آمینو،۲ دئوکسی - D- گلوکوپیرانوز تشکیل شده و به‌علت وجود گروه‌های آمین و هیدروکسیل آزاد در سطح آن، بستری مناسب برای تثبیت آنزیم‌ها به شمار می‌رود[21]. ویژگی‌های فوق‌العاده کیتوزان مانند زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری و غیرسمی‌بودن، کاربرد آن را به‌طور گسترده در صنایع مختلف امکان‌پذیر کرده است[22-24]. با کاهش اندازه ذرات کیتوزان تا ابعاد نانو توانایی جذب، پوشش و قابلیت پیوند افزایش پیدا می‌کند که نتیجه افزایش سطح تماس ذرات است[25]. بنابراین احتمال می‌رود با استفاده از نانوذره‌های کیتوزان به‌عنوان بستری مناسب بتوان گام موثری در جهت افزایش

Archive of SID
www.SID.ir

پایداری و حفظ فعالیت آنزیم پروتئاز خالص‌شده از میگوی *پنائوس وانامی* در برابر یون‌های فلزی برداشت.

امروزه فعالیت‌های وسیعی در خصوص تثبیت آنزیمی برای کارکردهای بهینه در حوزه‌های بیوتکنولوژی و صنعتی انجام شده است. این فعالیت‌ها شامل تثبیت آنزیم‌های مختلف روی سطوح متنوع کیتوزانی بوده، که نهایتاً پایداری آنزیم‌های تثبیت‌شده در شرایط مختلف محیطی، نسبت به حالت آزاد را به همراه داشته است[31-26]، از جمله این پژوهش‌ها می‌توان به تثبیت آنزیم‌های مختلف شامل آلفا- گلوکوزیداز روی کامپوزیت‌های مغناطیسی غنی‌شده با کیتوزان، برای غربالگری مهارکننده آنزیمی[26]، انولیناز روی کیتوزان برای هیدرولیز انولین[27]، پکتیناز روی نانوذره‌های مغناطیسی کیتوسان[28]، پاپایالاکاز روی کیتوزان[29]، بتا- گالاکتوزیداز روی هیدروژل‌های کیتوزان[30] و لیپاز روی نانوذره‌های مغناطیسی کیتوسان[31] اشاره کرد. تمامی پژوهش‌های انجام‌شده در زمینه تثبیت آنزیمی روی سطوح مختلف زیستی، دلالت بر این مهم دارند که می‌توان از تکنیک تثبیت آنزیمی به‌عنوان یک روش نوین زیستی جایگزین به‌منظور کارکرد بهینه آنزیم در حوزه‌های متنوع در آینده استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

آنزیم پروتئاز خالص‌شده از میگوی *وانامی* توسط خانم *دادشاهی* و همکاران[3] و سایر مواد اولیه لازم (مرک؛ آلمان) تهیه شدند که همگی خلوص تحقیقاتی داشتند و به خالص‌سازی نیازی نبود.

سنجش آنزیمی *پنائوس وانامی* پروتئاز و تعیین غلظت پروتئین

برای سنجش آنزیمی *پنائوس وانامی* پروتئاز از روش اندپوینت (End-point) استفاده شد بدین‌منظور ۲۵میکرولیتر از استوک آنزیمی ۷میلی‌گرم بر میلی‌لیتر *پنائوس وانامی* پروتئاز به ۳۷۵میکرولیتر بافر ۵۰میلی‌مولار فسفات با pH برابر ۷/۵ اضافه و سپس محلول بالا به نسبت ۱:۱ با کازئین ۱% مخلوط شد (۴۰۰میکرولیتر کازئین). پس از مخلوط‌کردن محلول آنزیمی با کازئین ۱% زمان‌های مختلف انکوباسیون از ۵ تا ۳۰دقیقه امتحان شد. بهترین زمان که ۱۰دقیقه بود برای آزمایش‌های بعدی استفاده شد، در این روش به همراه هر نمونه یک شاهد نیز به کار رفت. ترکیب شاهد دقیقاً مانند نمونه بود فقط به‌جای آنزیم بافر اضافه شد و برای صفرکردن اسپکتروفتومتر به کار رفت. پس از سپری‌شدن ۱۰دقیقه به ترکیب بالا هم‌حجم آن یعنی ۸۰۰میکرولیتر تری‌کلرواستیک‌اسید ۱۰% اضافه و پس از گذشت نیم‌ساعت این ترکیب با دور ۱۲۰۰۰rpm به‌مدت ۱۰دقیقه سانتریفوژ شد و بعد از صفرکردن دستگاه جذب مایع رویی در طول موج ۲۸۰نانومتر توسط اسپکتروفتومتر خوانده شد. به‌منظور به‌دست‌آوردن فعالیت آنزیمی بر حسب واحد بین‌المللی‌آنزیمی (IU) منحنی استاندارد تیروزین رسم شد، ابتدا غلظت‌های متفاوت و متوالی از صفر تا ۱۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر تیروزین در محلول یک‌نرمال اسیدکلریدریک تهیه شد (شش غلظت متفاوت)، برای رسم منحنی استاندارد تیروزین از اسیدکلریدریک ۰/۰۰۶نرمال به‌عنوان رفرنس استفاده شد. پس از ثبت جذب محلول‌های استاندارد تیروزین و نمونه‌های آنزیمی یک منحنی استاندارد (جذب علیه میکرومول تیروزین) رسم و به کمک آن و با استفاده از شیب خط منحنی واحد آنزیمی محاسبه شد. بر حسب تعریف یک واحد آنزیمی مقدار آنزیمی است که یک‌میکرومول تیروزین را در یک‌دقیقه آزاد می‌نماید وقتی که تیروزین به‌عنوان استاندارد مورد استفاده قرار می‌گیرد[3].

سنجش آنزیم *پنائوس وانامی* پروتئاز تثبیت‌شده شبیه آنزیم آزاد است با این تفاوت که مخلوط آنزیم- سوبسترا در طول زمان واکنش آنزیمی باید روی همزن قرار گیرد تا توزیع سوبسترا در فاز تثبیت‌شده یکسان باشد، در نهایت برای تعیین غلظت کل پروتئین از روش برادفورد استفاده شد[32].

فعال‌کردن نانوذره کیتوزان و اتصال آنزیم به بستر

ابتدا ۲میلی‌گرم نانوذره کیتوزان در یک‌میلی‌لیتر آب مقطر حل و به‌مدت ۳۰دقیقه سونیکیت شد. محلول نانوذره‌های کیتوزان دیسپرس‌شده به‌مدت ۱۰دقیقه در دور ۱۵۰۰۰rpm سانتریفوژ، سپس محلول رویی دور ریخته و رسوب سه مرتبه با بافر فسفات (با pH برابر ۸) شست‌وشو داده شد.

حجمی از نانوذره‌های کیتوزان که مورد نیاز بود برداشته و ۱/۵ تا ۲برابر حجم نانوذره به آن استوک آنزیمی ۷میلی‌گرم بر میلی‌لیتر افزوده شد، سپس مخلوط آنزیم- نانوذره به‌مدت ۴ساعت روی همزن مغناطیسی در دمای ۴°C قرار گرفت پس از ته‌نشین‌شدن نانوذره محلول رویی را برداشته و نانوذره چندین‌بار با بافر ۵۰میلی‌مولار فسفات (با pH برابر ۷/۵) شست‌وشو و در یک‌میلی‌لیتر بافر فسفات حل شد. مایع رویی نیز به روش برادفورد با استوک اولیه ۷میلی‌گرم بر میلی‌لیتر *پنائوس وانامی* پروتئاز مقایسه شد[33].

تعیین بازده فعالیت و بازده تثبیت

به‌منظور ارزیابی میزان فعالیت آنزیم تثبیت‌شده و همچنین کارآیی روش تثبیت ابتدا ۱/۵میلی‌لیتر استوک آنزیمی ۷میلی‌گرم بر میلی‌لیتر *پنائوس وانامی* پروتئاز تهیه شد. در مرحله بعد ۷۵۰میکرولیتر آن را برداشته و در دمای ۴°C نگهداری،۷۵۰میکرولیتر باقیمانده به نانوذره فعال اضافه شد. بعد از گذاشتن مخلوط آنزیم- نانوذره روی همزن مغناطیسی به‌مدت ۴ساعت، مایع رویی آن را برداشته و به روش برادفورد و سنجش آنزیمی با استوک اولیه آنزیمی (۷۵۰میکرولیتر که در دمای ۴°C نگهداری شده بود) مقایسه شد. میزان آنزیم اتصال‌یافته (تثبیت‌شده) را می‌توان با کم‌کردن غلظت استوک اولیه آنزیمی از غلظت مایع رویی به دست آورد.

(۱-۱) میزان آنزیم تثبیت‌شده=غلظت استوک اولیه آنزیمی-غلظت مایع رویی

در نهایت با به‌دست‌آوردن فعالیت استوک اولیه آنزیمی، مایع رویی و آنزیم تثبیت‌شده و به کمک فرمول‌های ۲-۲ و ۲-۳ کارآیی روش تثبیت و فعالیت باقیمانده آنزیمی (فعالیت آنزیم بعد از تثبیت) محاسبه شد[10].

(۲-۱) مقدار آنزیم اضافه‌شده (میلی‌گرم)/مقدار آنزیم جذب‌نشده (میلی‌گرم)-مقدار آنزیم اضافه‌شده (میلی‌گرم)= Immobilized yield (%)

(۲-۲) $\text{Activity yield (\%)}=B/A\times100$

A: فعالیت استوک آنزیمی

B: فعالیت آنزیم تثبیت‌شده

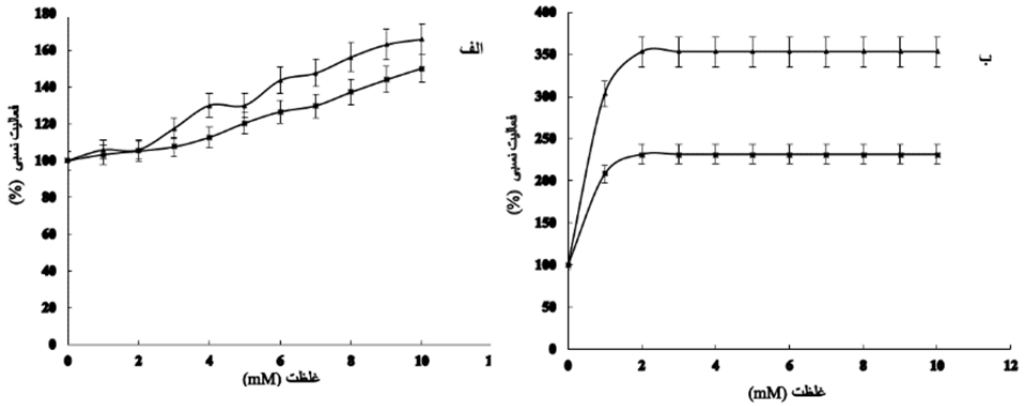
تاثیر یون‌های فلزی بر فعالیت آنزیم *پنائوس وانامی* پروتئاز تثبیت‌شده و آزاد

در این تحقیق فعالیت نسبی آنزیم آزاد و تثبیت‌شده در حضور غلظت‌های مختلف (صفر الی ۱۰میلی‌مولار) از نمک‌های کلریدسدیم، پتاسیم، کبالت، منگنز، جیوه، کادمیوم، نیکل، آهن، روی و مس در بافر ۵۰میلی‌مولار تریس‌هیدروکلراید با pH برابر ۷/۵ اندازه‌گیری و فعالیت نسبی آنها محاسبه شد[34].

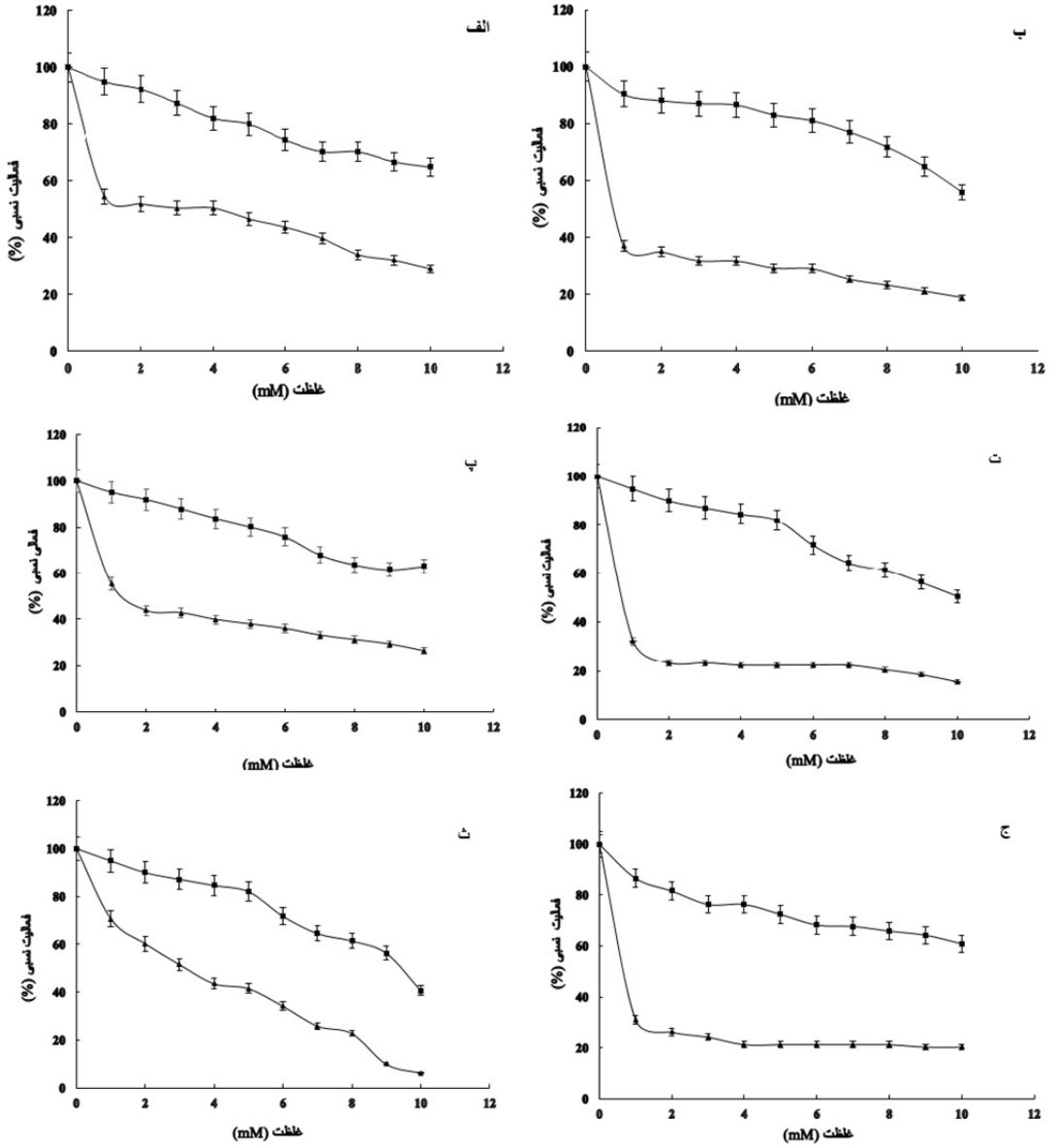
Archive of SID
www.SID.ir

یافته‌ها

نتایج این تحقیق نشان داد یون‌های Mn^{2+} و Fe^{2+} به‌طور قابل توجهی فعالیت آنزیم را افزایش می‌دهند (نمودار ۱)، همچنین اثر مهاری قوی در حضور یون‌های Cu^{2+}، Zn^{2+}، Cd^{2+}، Hg^{2+}، Co^{2+} و Ni^{2+} (نمودار ۲) و اثر مهاری ضعیفی در حضور یون‌های K^{+}، Na^{+} مشاهده شد (نمودار ۳).

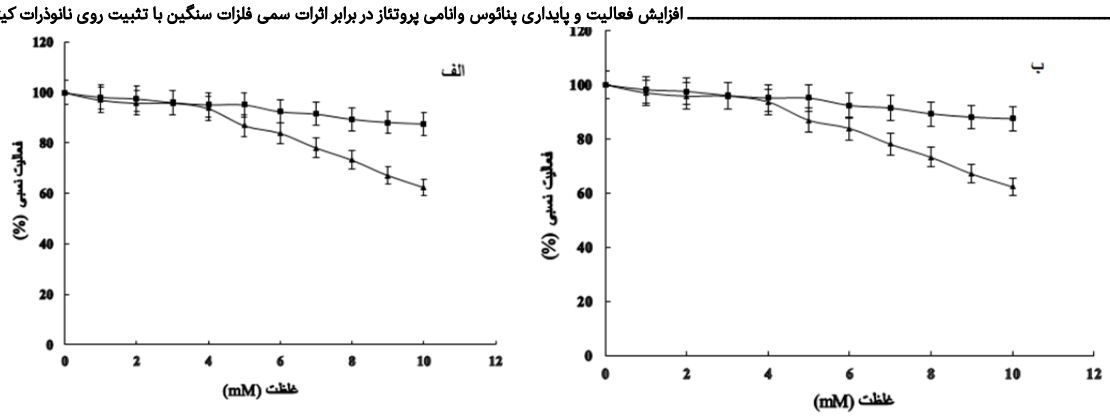


نمودار ۱) فعالیت آنزیم *پنائوس وانامی* پروتئاز آزاد (مثلث) و تثبیت‌شده (مربع) در برابر فلزات (فعال‌کننده قوی)؛ الف) کلریدمنگنز ب) کلریدآهن



نمودار ۲) فعالیت آنزیم *پنائوس وانامی* پروتئاز آزاد (مثلث) و تثبیت‌شده (مربع) در برابر فلزات (مهارکننده قوی)؛ الف) کلریدمس، ب) کلریدروی، پ) کلریدکادمیوم، ت) کلریدجیوه، ث) کلریدکبالت، ج) کلریدنیکل

www.SID.ir



نمودار ۳) فعالیت آنزیم *پنائوس وانامی* پروتئاز آزاد (مثلث) و تثبیت‌شده (مربع) در برابر فلزات (مهارکننده ضعیف)؛ الف) کلریدپتاسیم، ب) کلریدسدیم

بحث

یون‌های فلزی نقش مهمی در عملکرد بیولوژیکی بسیاری از آنزیم‌ها دارند. حالت‌های مختلف از تعامل فلز- پروتئین شامل فلز- لیگاند و مجموعه‌های آنزیم- پل نمکی وجود دارد. فلزات می‌توانند به‌عنوان دهنده یا گیرنده الکترون، اسیدهای لوئیس یا تنظیم‌کننده ساختاری باشند[35]. یون‌های فلزات سنگین اتم‌هایی با بار مثبت هستند، آنها با تداخل در پل‌های نمکی عملکرد آنزیم را مختل می‌کنند[36]. فلزات در شرایط محیطی مختلف و نیز در گونه‌های مختلف، مکانیزم‌های متفاوتی را برای سمیت از خود نشان می‌دهند[37].

در این پژوهش فعالیت نسبی آنزیم آزاد و تثبیت‌شده در حضور غلظت‌های مختلف (صفر الی ۱۰میلی‌مولار) یون‌های فلزی اندازه‌گیری و فعالیت نسبی آنها محاسبه شد. آنزیم تثبیت‌شده نسبت به همتای آزادش، پایداری بیشتری در برابر یون‌های فلزی از خود نشان داد در حالی که آنزیم آزاد نسبت به حضور یون‌های فلزی حساس بود و با افزایش غلظت آنها کاهش فعالیت آنزیم محسوس‌تر بود. این پایداری بالای آنزیم تثبیت‌شده به‌دلیل حضور نانوذره‌های کیتوزان است. *همایی* با تثبیت آنزیم مرگوئینسس آلکالین‌فسفاتاز روی نانولوله‌های طلا از آن برای تشخیص آلودگی محیط به فلزات سنگین استفاده کرد، بررسی‌ها حاکی از آن بود که حساسیت کمتر آنزیم تثبیت‌شده به یون‌های فلزات سنگین می‌تواند به‌دلیل سطح نانولوله‌های طلا باشد که باعث انتشار بارهای مثبت می‌شوند که می‌توانند یون‌های دوظرفیتی را به عقب برانند و در نتیجه یک محیط کوچک که دارای غلظت یونی کمتری است را در اطراف آنزیم ایجاد کنند[34]. چنین نقش حفاظتی ممکن است به‌دلیل پوششی از نانوذره‌های طلا روی آنزیم و نیز محدودیت انتشار باشد[33, 38].

در این پژوهش یون‌های Mn^{2+} و Fe^{2+} به‌طور قابل توجهی فعالیت آنزیم را افزایش دادند، به‌طوری که در غلظت ۱۰میلی‌مولار فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت‌شده به بیش از دوبرابر رسید، در غلظت ۱۰میلی‌مولار از یون‌های Mn^{2+} و Fe^{2+} فعالیت اولیه آنزیم به‌ترتیب در حدود ۱۶۶ و ۳۵۲% مقدار اولیه بود در حالی که فرم تثبیت‌شده به‌ترتیب حدود ۱۵۰ و ۲۳۱% فعالیت اولیه‌اش (حدوداً دوبرابر کمتر از حالت آزاد) بود. یافته‌های مربوط به اثر منگنز و آهن بر فعالیت آنزیم پروتئاز با مطالعات انجام‌شده در مورد ماهیان کلیکای معمولی[39]، قزل‌آلای رنگین‌کمان[40] و میگوی *پنائوس وانامی*[3] همخوانی داشت. اثر مهاری قوی در حضور یون‌های Cu^{2+}، Zn^{2+}، Cd^{2+}، Hg^{2+}، Co^{2+} و Ni^{2+} و اثر مهاری ضعیفی در حضور یون‌های Na^{+} و K^{+} مشاهده شد. در غلظت ۱۰میلی‌مولار از یون‌های K^{+} و Na^{+} فعالیت اولیه آنزیم به‌ترتیب در حدود ۶۲ و ۷۶% فعالیت اولیه بود در حالی که فرم تثبیت‌شده به‌ترتیب حدود ۸۸ و ۹۰% فعالیت اولیه‌اش (حدوداً ۲۵% بیشتر از حالت آزاد) را حفظ می‌کرد. بنابراین یون‌های تک‌ظرفیتی مانند Na^{+} و K^{+} تاثیر ناچیزی بر کاهش فعالیت آنزیم دارند و وقتی که غلظت این یون‌ها بین صفر تا ۱۰میلی‌مولار باشد فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت‌شده تغییر چندانی نمی‌کند، در غلظت ۱۰میلی‌مولار از یون‌های Cu^{2+}، Zn^{2+}، Cd^{2+}، Hg^{2+}، Co^{2+} و Ni^{2+} فعالیت اولیه آنزیم به‌ترتیب حدود ۶، ۱۵، ۱۸، ۲۰، ۲۶ و ۲۹% بود در حالی که فرم تثبیت‌شده به‌ترتیب حدود ۴۰، ۵۰، ۵۵، ۶۱، ۶۳، ۶۴% فعالیت اولیه‌اش (حدوداً ۳۵% بیشتر از حالت آزاد) را حفظ می‌کرد. چنین نتایجی در ماهیان کلیکای معمولی[39]، قزل‌آلای رنگین‌کمان[40]، ماهی نیل تیلاپیا[41] و میگوی *پنائوس وانامی* [3] نیز گزارش شد.

یون‌های فلزی می‌توانند جریان الکترون در یک سوبسترا یا آنزیم را تغییر دهند به‌طوری که به‌طور موثری واکنش کاتالیزشده توسط آنزیم را کنترل نمایند. یون‌های فلزی ممکن است به گروه‌های کربونیل و آمین زنجیره اصلی متصل شوند، اما اتصال ویژه از طریق زنجیره جانبی اسیدآمینه به‌ویژه گروه کربوکسیلات اسیدآسپارتیک و اسیدگلوتامیک و حلقه اتم نیتروژن اسیدآمینه هیستیدین انجام می‌شود. از دیگر زنجیره‌های جانبی برای اتصال یون‌های فلزی می‌توان به تریپتوفان (ایندول)، سیستئین (تیول)، میتونین (گوگرد)، سرین (هیدروکسیل)، ترئونین (هیدروکسیل)، تیروزین (فنول)، آسپاراژین و گلوتامین (بنیان آمیدی) اشاره نمود. محیط الکترواستاتیک در جایگاه فعال آنزیم یک عامل عمده برای هدایت سوبسترا به جایگاه اتصال در جهت صحیح خود است که یون‌های فلزی می‌توانند در این روند دخالت کرده و در نتیجه در مکانیزم عمل آنزیم تغییر ایجاد کنند[42].

نتیجه‌گیری

در این پژوهش آنزیم تثبیت‌شده نسبت به همتای آزادش پایداری بالاتری نسبت به یون‌های فلزی از خود نشان می‌داد، حفظ پایداری آنزیم تثبیت‌شده در غلظت‌های بالا یون‌های فلزی بیانگر کارآیی بالا روش تثبیت در حفظ پایداری و فعالیت آنزیم تثبیت شده است که به لحاظ کاربرد در صنایع مختلف و سنجش آلودگی‌های محیطی بسیار ارزشمند است.

تشکر و قدردانی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.
تاییدیه‌اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.
تعارض منافع: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

Archive of SID
www.SID.ir

سهم نویسندگان: فوزیه شجاعی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی (۲۵%)؛ احمد همایی (نویسنده دوم)، روش‌شناس/نگارنده بحث (۲۵%)؛ محمدرضا طاهری‌زاده (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی (۲۵%)؛ احسان کامرانی (نویسنده چهارم)، پژوهشگر کمکی (۲۵%)

منابع مالی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

منابع

1- Sila A, Nasir R, Bougatef A, Nasri M. Digestive alkaline proteases from the goby (Zosterisessor ophiocephalus): Characterization and potential application as detergent additive and in the deproteinization of shrimp wastes. J Aquat Food Prod Technol. 2012;21:118-33.

2- Zeinali F, Homaei A, Kamrani E. Sources of marine superoxide dismutases: Characteristics and applications. Int J Biol Macromol. 2015;79:627-37.

3- Dadshahi Z, Homaei A, Zeinali F, Sajedi RH, Khajeh K. Extraction and purification of a highly thermostable alkaline caseinolytic protease from wastes Penaeus vannamei suitable for food and detergent industries. Food Chem. 2016;202:110-5.

4- Meireles A, Borges A, Giaouris E, Simões M. The current knowledge on the application of anti-biofilm enzymes in the food industry. Food Res Int. 2016;86:140-6.

5- Choi JM, Han SS, Kim HS. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. Biotechnol Adv. 2015;33(7):1443-54.

6- Klomklao S. Digestive proteinases from marine organisms and their applications. Songklanakarin J Sci Technol. 2008;30(1):37-46.

7- Chakraborty S, Bhattacharya T, Singh G, Maity JP. Benthic macroalgae as biological indicators of heavy metal pollution in the marine environments: A biomonitoring approach for pollution assessment. Ecotoxicol Environ Saf. 2014;100:61-8.

8- Karunakaran C, Madasamy T, Sethy NK. Enzymatic biosensors. In: Karunakaran C, Bhargava K, Benjamin R, editors. Biosensors and bioelectronics. Amsterdam: Elsevier; 2015. pp. 133-204.

9- Iyer PV, Ananthanarayan L. Enzyme stability and stabilization - aqueous and non-aqueous environment. Process Biochem. 2008;43(10):1019-32.

10- Homaei A, Etemadipour R. Improving the activity and stability of actinidin by immobilization on gold nanorods. Int J Biol Macromol. 2015;72:1176-81.

11- Homaei A, Saberi D. Immobilization of α-amylase on gold nanorods: An ideal system for starch processing. Process Biochem. 2015;50(9):1394-9.

12- Xiaoyan Z, Yuanyuan J, Zaijun L, Zhiguo G, Guangli W. Improved activity and thermo-stability of the horse radish peroxidase with graphene quantum dots and its application in fluorometric detection of hydrogen peroxide. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 2016;165:106-13.

13- Ezhil Vilian AT, Mani V, Chen SM, Dinesh B, Huang ST. The immobilization of glucose oxidase at manganese dioxide particles-decorated reduced graphene oxide sheets for the fabrication of a glucose biosensor. Ind Eng Chem Res. 2014;53(40):15582-9.

14- Silva MF, Rigo D, Mossi V, Dallago RM, Henrick P, Kuhn GDO, et al. Evaluation of enzymatic activity of commercial inulinase from Aspergillus niger immobilized in polyurethane foam. Food Bioprod Process. 2013;91(1):54-9.

15- Datta S, Rene Christena L, Sriramulu Rajaram YR. Enzyme immobilization: An overview on techniques and support materials. 3 Biotech. 2013;3(1):1-9.

16- Tischer W, Wedekind F. Immobilized enzymes: Methods and applications. In: Fessner WD, Archelas A, Demirjian DC, Furstoss R, Griengl H, Jaeger KE, et al, editors. Biocatalysis - from discovery to application, topics in current chemistry. 200th Volume. Berlin/Heidelberg: Springer; 1999. pp. 95-126.

17- Tripathi P, Kumari A, Rath P, Kayastha AM. Immobilization of α-amylase from mung beans (Vigna radiata) on Amberlite MB 150 and chitosan beads: A comparative study. J Mol Catal B Enzym. 2007;49(1-4):69-74.

18- Acevedo F, Pizzul L, Castillo MD, González ME, Cea M, Gianfreda L, et al. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by free and nanoclay-immobilized manganese peroxidase from Anthracophyllum discolor. Chemosphere. 2010;80(3):271-8.

19- Wu L, Yuan X, Sheng J. Immobilization of cellulase in nanofibrous PVA membranes by electrospinning. J Membr Sci. 2005;250(1-2):167-73.

20- Luckarift HR, Spain JC, Naik RR, Stone MO. Enzyme immobilization in a biomimetic silica support. Nat Biotechnol. 2004;22(2):211-3.

21- Kurita K. Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustaceans. Mar Biotechnol (NY). 2006;8(3):203-26.

22- Kumari A, Kayastha AM. Immobilization of soybean (Glycine max) α-amylase onto Chitosan and Amberlite MB-150 beads: Optimization and characterization. J Mol Catal B Enzym. 2011;69(1-2):8-14.

23- Dutta PK, Dutta J, Tripathi VS. Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. J Sci Ind Res. 2004;63:20-31.

24- Krajewska B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. Enzyme Microb Technol. 2004;35(2-3):126-39.

25- Hu B, Pan C, Sun Y, Hou Z, Ye H, Zeng X. Optimization of fabrication parameters to produce chitosan-tripolyphosphate nanoparticles for delivery of tea catechins. J Agric Food Chem. 2008;56(16):7451-8.

26- Liu DM, Chen J, Shi YP. α-Glucosidase immobilization on chitosan-enriched magnetic composites for enzyme inhibitors screening. Int J Biol Macromol. 2017;105(Pt 1):308-16.

27- Singh RS, Singh RP, Kennedy JF. Immobilization of yeast inulinase on chitosan beads for the hydrolysis of inulin in a batch system. Int J Biol Macromol. 2017;95:87-93.

28- Sojitra UV, Nadar SS, Rathod VK. Immobilization of pectinase onto chitosan magnetic nanoparticles by macromolecular cross-linker. Carbohydr Polym. 2017;157:677-85.

29- Jaiswal N, Pandey VP, Dwivedi UN. Immobilization of papaya laccase in chitosan led to improved multipronged stability and dye discoloration. Int J Biol Macromol. 2016;86:288-95.

30- Facin BR, Moret B, Baretta D, Belfiore LA, Paulino AT. Immobilization and controlled release of β-galactosidase from chitosan-grafted hydrogels. Food Chem. 2015;179:44-51.

31- Kuo CH, Liu YC, Chang CMJ, Chen JH, Chang C, Shieh CJ. Optimum conditions for lipase immobilization on

Archive of SID

www.SID.ir

38- Homaei A. Purification and biochemical properties of highly efficient alkaline phosphatase from Fenneropenaeus merguiensis brain. J Mol Catal B Enzym. 2015;118:16-22.
39- Zamani A, Rezaei M, Madani R. In-vitro effects of biochemical factors on trypsin activity from intestine and pyloric caeca of common kilka (Clupeonella cultriventris caspia) for inhibition of belly bursting. Iran Sci Fish J. 2012;20(4):53-62. [Persian]
40- Khajavi M, Zamani A, Oujifard A. The study of in-vitro effect of some chemical factors on enzymes activity of trypsin and chymotrypsin in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) fry. Bahrehbardari va Parvaresh Abziyan. 2015;4(1):93-108. [Persian]
41- Bezerra RS, Lins EJF, Alencar RB, Paiva PMG, Chaves MEC, Coelho LCBB, et al. Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (Oreochromis niloticus). Process Biochem. 2005;40(5):1829-34.
42- Glusker JP, Katz AK, Bock CW. Metal ions in biological systems. Rigaku J. 1999;16(2):8-17.
chitosan-coated Fe_3O_4 nanoparticles. Carbohydr Polym. 2012;87(4):2538-45.
32- Homaei AA, Sajedi RH, Sariri R, Seyfzadeh S, Stevanato R. Cysteine enhances activity and stability of immobilized papain. Amino Acids. 2010;38(3):937-42.
33- Homaei A, Barkheh H, Sariri R, Stevanato R. Immobilized papain on gold nanorods as heterogeneous biocatalysts. Amino Acids. 2014;46(7):1649-57.
34- Homaei A. Immobilization of Penaeus merguiensis alkaline phosphatase on gold nanorods for heavy metal detection. Ecotoxicol Environ Saf. 2017;136:1-7.
35- Riordan JF. The role of metals in enzyme activity. Ann Clin Lab Sci. 1977;7(2):119-29.
36- Nguyen DH. What is the relationship between environmental conditions & enzyme function?. In: Hearst Seattle Media, LLC. 2016.
37- Chandran R, Sivakumar AA, Mohandass S, Aruchami M. Effect of cadmium and zinc on antioxidant enzyme activity in the gastropod, Achatina fulica. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2005;140(3-4):422-6.

Archive of SID

www.SID.ir