

اثر تثبیت آنزیمی روی فعالیت و پایداری «پاپاین»

احمد ابولپور همایی^{1*}، ریحانه سریری²، رضا حسن ساجدی³

- 1- مربی بیوشیمی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
2- استاد بیوشیمی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
3- استادیار بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*بندرعباس، کدپستی 7916193145
a.homaei@hormozgan.ac.ir
(دریافت مقاله: 91/4/30، پذیرش: 91/8/15)

چکیده - پاپاین (EC2.22.4.3)، سیستمین پروتئازی با فعالیت کاتالیزوری قابل توجه است که امروزه کاربرد گسترده در صنایع دارد. استفاده از پاپاین تثبیت شده در بسیاری از فرایندها، مزایایی ارزشمند دارد و در برخی موارد ضروری است. از سیستمین بیشتر برای دستیابی به فعالیت مناسب، به عنوان فعال کننده پاپاین استفاده می شود. از طرفی، برخی از یون های دوظرفیتی مانند Ca^{2+} به عنوان مهارکننده این آنزیم عمل می کنند. در این پژوهش پس از فعال کردن ژل سفارز 6B به وسیله سیانوژن برومید، برای اتصال کووالان آنزیم، محلول پروتئینی با غلظت 5 mg/ml به ژل فعال اضافه شد. برای مسدود کردن گروه های فعال آزاد روی ژل که پس از اضافه شدن آنزیم با آن واکنش نداد بود، از محلول 2M گلیسین استفاده شد. نتایج نشان داد که تثبیت آنزیم روی این بستر موجب پایداری نسبت به زمان، دما، pH های بحرانی و همچنین افزایش مقاومت در برابر اثر مهارکنندگی یون های دوظرفیتی می شد. دمای بهینه آنزیم تثبیت شده 20°C (از 60 به 80°C) از آنزیم آزاد بیشتر بود و pH بهینه نیز از 7 به 8 رسید. شاخص های سینتیکی آنزیم (K_m و k_{cat}) نیز هنگام تثبیت دچار تغییر شدند. این نتیجه بسیار اهمیت دارد به ویژه اگر بدانیم که تثبیت آنزیم ها موجب کاهش فعالیت و کارایی کاتالیتیک آن ها می شود.

کلیدواژگان: پاپاین، تثبیت، سیستمین، فعالیت، پایداری، شاخص های سینتیکی.

1- مقدمه

آنزیم ها مورد توجه قرار گرفته است؛ زیرا تثبیت سامانه ی آنزیمی، افزون بر مزیت پایدارسازی آنزیم، امکان استفاده دوباره از آنزیم و نگهداری آن در واکنشگر را فراهم می کند [1-3]. استفاده از آنزیم های

در بیوتکنولوژی جدید، روش تثبیت به عنوان ابزاری مناسب برای توسعه فناوری آنزیمی و بهره گیری از

دانشگاهی و صنعتی در کشورهای مختلف در این زمینه مشغول بررسی و پژوهش هستند. در این پژوهش ایده‌ای دنبال شد تا با صرف هزینه کم و روشی ترکیبی، توانایی تثبیت آنزیم پاپایین روی بستر سفارز-6B را در کنار حفظ فعالیت و میزان پایداری آنزیمی بالا برد. بنابراین بهینه‌سازی تثبیت پاپایین به روش کووالانسی بررسی شد.

2- مواد و روش‌ها

2-1- مواد

مواد اولیه کازئین، پاپایین، سیانوژن برماید، سفارز-6B و گلیسین از شرکت «مرک» تهیه شد. محلول نمک‌های کلرید کلسیم، منیزیم، روی، کبالت، آهن، باریم، قلع و منگنز، EDTA، محلول برادفورد، بافرها، اسیدها و همه مواد حلال‌ها به صورت تازه تهیه و استفاده شد. همه مواد شیمیایی، خلوص تحقیقاتی داشتند و نیاز به خالص‌سازی نبود.

2-2- سنجش آنزیمی پاپایین و تعیین غلظت پروتئین

برای سنجش آنزیمی پاپایین از روش End-point استفاده شد. 25 μ l از استوک آنزیمی 1 mg/ml پاپایین به 175 μ l بافر 40mM فسفات با pH=7/5 اضافه شد. سپس محلول بالا به نسبت 1:1 با کازئین 1 درصد مخلوط شد (200 μ l کازئین). بعد از مخلوط کردن محلول آنزیمی با کازئین 1 درصد، زمان‌های مختلف انکوباسیون از 5 تا 30 دقیقه امتحان شد. بهترین زمان که 10 دقیقه بود برای آزمایش‌های بعدی استفاده شد. در این روش، همراه هر نمونه، یک شاهد (Blank) نیز گذاشته شد. ترکیب شاهد، مانند نمونه بود فقط به جای آنزیم، بافر اضافه شد و از آن

تثبیت شده برای تولید محصولاتی مانند قندها، اسیدهای آمینه و داروها، جلوتر از زمینه‌های جدید بیوتکنولوژی مانند مهندسی ژنتیک و تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال در دو دهه اخیر است. تاکنون تلاش‌های بسیاری انجام شده است تا ایده‌هایی برای بهتر کردن روند تثبیت ارائه شود [4-6].

در تثبیت آنزیم به روش کووالانسی، یکی از بسترهای کارآمد سفارز است که گروه‌های عاملی آن به وسیله واکنشگرهایی مانند سیانوژن برومید فعال شده و سپس آنزیم به ژل فعال متصل می‌شود. بررسی‌ها نشان داده که تعداد زیادی از آنزیم‌ها با اتصال کووالان بین گروه‌های عاملی آمینواسیدهای موجود در ساختار آنزیمی و گروه‌های عاملی فعال شده سفارز تثبیت می‌شوند و در حالت تثبیت شده فعالیت کاتالیتیک خوبی دارند [7-8].

آنزیم پاپایین از مهم‌ترین سیستمین پروتئازها است که اهمیت فراوانی در بیوتکنولوژی امروزی دارد. کاربرد این آنزیم در صنعت بسیار گسترده است و در تعداد زیادی از فرایندهای صنعتی مانند صنایع غذایی، پزشکی و دارویی، آرایشی، چرم، شوینده‌ها و برخی موارد نادر صنعتی استفاده می‌شود [9-12]. هر یک از فرایندهای صنعتی در شرایط فیزیکوشیمیایی خاصی انجام می‌شوند که از نظر pH، درجه حرارت و حضور یون‌های فلزی با هم متفاوت است.

گوناگونی کاربرد آنزیم پاپایین باعث شده که یافتن روش‌های جدید و نو برای تثبیت این آنزیم که در کنار حفظ فعالیت آنزیم بر میزان پایداری آن در شاخص‌های فیزیکی مانند pH و دما بیفزاید، همواره برای محققین جالب باشد و گروه‌های پژوهشی وابسته به مراکز

برای صفر کردن اسپکتروفتومتر استفاده شد. پس از 10 دقیقه به ترکیب بالا، هم حجم آن، یعنی 400 μl تری کلرواستیک اسید 10 درصد اضافه شد. بعد از گذشت نیم ساعت، این ترکیب با دور 12000 rpm، 5 دقیقه سانتریفوژ شد و بعد از صفر کردن دستگاه، جذب مایع رویی در طول موج 280 nm با اسپکتروفتومتر خوانده شد. برای به دست آوردن فعالیت آنزیمی بر حسب واحد بین المللی آنزیمی (IU)، منحنی استاندارد تیروزین رسم شد. ابتدا غلظت های متفاوت و متوالی از 0 تا 100 میکروگرم / میلی لیتر تیروزین در محلول 1 نرمال اسید کلریدریک تهیه شد (6 غلظت متفاوت). برای رسم منحنی استاندارد تیروزین از اسید کلریدریک 0/006 نرمال به عنوان پایه استفاده شد. پس از ثبت جذب محلول های استاندارد تیروزین و نمونه های آنزیمی، یک منحنی استاندارد (جذب علیه μmol تیروزین) رسم شد 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 1 μmol تیروزین را در یک دقیقه آزاد کند، هنگامی که تیروزین به عنوان استاندارد استفاده شود. سنجش آنزیم پاپاین تثبیت شده شبیه آنزیم آزاد بود با این تفاوت که مخلوط آنزیم - سوبسترا طی زمان واکنش آنزیمی (10 دقیقه) باید روی هم زن قرار گیرد تا پخش سوبسترا در فاز تثبیت شده، یکسان باشد. در نهایت، برای تعیین غلظت کل پروتئین از روش برادفورد استفاده شد.

2-3- فعال کردن ژل سفارز - 6B با سیانوژن

برومید

برای فعال کردن ژل سفارز از روش Buffering و از سیانوژن برومید برای فعال کردن گروه های عاملی ژل

استفاده شد [13]. برای جلوگیری از مسمومیت با سیانوژن برمید، همه ی مراحل فعال سازی زیر هود و با رعایت دقیق نکات ایمنی انجام شد. مقدار سیانوژن برومید مورد نیاز برای فعال کردن ژل سفارز - 6B، 50 تا 300 میلی گرم به ازای هر میلی لیتر از ژل است. بنابراین برای فعال کردن 10 ml از ژل سفارز، 3000 mg سیانوژن برومید استفاده شد.

2-4- استخراج هموگلوبین انسانی

5 میلی لیتر خون همراه 200 μl محلول EDTA 10 mM داخل لوله فالکن ریخته و 10 دقیقه در دور 3000 rpm در سانتریفوژ یخچال دار سانتریفوژ شد. 3 لایه ایجاد شد؛ لایه آخری که RBC بود را با پیت پاستور برداشته و در لوله فالکن دیگری ریخته و به آن محلول سرم فیزیولوژی اضافه شد. برای مخلوط شدن محتویات لوله فالکن، لوله چند بار تکان داده شد. سپس در دور 3000 rpm به مدت 10 دقیقه در سانتریفوژ یخچال دار سانتریفوژ شد. محلول رویی برداشته و دور ریخته شد. این مرحله 4 بار تکرار شد. بعد از پایان مرحله چهارم، به رسوبی که ته لوله فالکن جمع شده بود، به نسبت مساوی، آب مقطر اضافه شد. لوله فالکن چند تکان کوچک داده شد تا محتویات آن به خوبی مخلوط شوند. به محتویات لوله، چند قطره تولوئن افزوده و 30 ثانیه محتویات لوله فالکن ورتکس و سپس 10 دقیقه در دور 3000 rpm سانتریفوژ شد. سه لایه رسوب ته لوله فالکن جمع شد. لایه زیرین که هموگلوبین بود با پیت پاستور برداشته و در میکروتیوب در دمای 4°C نگهداری شد.

2-5- اتصال هموگلوبین به ژل فعال

0/5 ml ژل فعال و 0/5 ml ژل غیرفعال را داخل دو میکروتیوب جداگانه ریخته و در pH=9/5 به هر کدام 250 μl

(تثبیت شده) را می توان با کم کردن غلظت استوک اولیه آنزیمی از غلظت مایع رویی به دست آورد.

(1-1) میزان آنزیم تثبیت شده = غلظت استوک اولیه آنزیمی - غلظت مایع رویی

در نهایت با به دست آوردن فعالیت استوک اولیه آنزیمی، مایع رویی و آنزیم تثبیت شده و به کمک فرمول های (1-2) و (2-2) کارایی روش تثبیت و فعالیت باقی مانده آنزیمی (فعالیت آنزیم بعد از تثبیت) محاسبه شد.

$$\text{Immobilized yield}(\%) = (1-2)$$

مقدار آنزیم جذب نشده مایع رویی (mg) - مقدار آنزیم اضافه محاسبه شده (mg)

مقدار آنزیم اضافه شده (mg)

$$\text{Activity yield}(\%) = C/A \times 100 \quad (2-2)$$

A: فعالیت استوک آنزیمی

C: فعالیت آنزیم تثبیت شده

2-9- اثر pH روی فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده

طبق روش End point که قبلاً برای تعیین فعالیت آنزیمی ارائه شد، فعالیت نسبی آنزیم تثبیت شده و آزاد در pH های گوناگون در دمای 25°C تعیین شد. ابتدا یک بافر مختلط (mixed buffer) با ترکیب زیر به صورت تازه تهیه شد. مخلوطی با غلظت 200 mM تریس-باز، گلیسین، سدیم فسفات و سدیم استات تهیه و با استفاده از محلول NaOH یا HCl در pH های مختلف (2 تا 12)

هموگلوبین استخراج شده اضافه شد. سپس محتویات هر میکروتیوب چندین بار با آب نمک 1 مولار شسته شد.

2-6- اتصال آنزیم به ژل فعال

حجمی از ژل که مورد نیاز بود، برداشته و 1/5 تا 2 برابر حجم ژل به آن استوک آنزیمی 5 mg/ml افزوده شد. سپس مخلوط آنزیم-ژل یک شبانه روز روی هم زن مغناطیسی در دمای 4°C گذاشته شد. پس از ته نشین شدن ژل، محلول رویی را برداشته، ژل چندین بار با بافر 40 mM فسفات با pH=7/5 شست و شو داده شد. مایع رویی نیز به روش برادفورد با استوک اولیه 5 mg/ml پاپاین مقایسه شد.

2-7- بلوک کردن ژل

بعد از کامل شدن واکنش اتصال آنزیم به ژل فعال، 1/5 تا 2 برابر حجم آن به ژل فعال گلیسین 2 مولار افزوده شد تا جایگاه هایی از ژل که آنزیم به آن متصل نشده بود با گلیسین بلوک شود. سرانجام، ژل با بافر 40 mM فسفات با pH=7/5 شست و شو شد.

2-8- تعیین بازده فعالیت و بازده تثبیت

برای ارزیابی میزان فعالیت آنزیم تثبیت شده و همچنین کارایی روش تثبیت، ابتدا 1/5 ml استوک آنزیمی 5 mg/ml تهیه شد. در مرحله بعد، 750 μl آن برداشته و در دمای 4°C نگهداری شد. 750 μl باقی مانده به ژل فعال اضافه شد. بعد از گذاشتن مخلوط آنزیم-ژل روی هم زن مغناطیسی از شب تا صبح، مایع رویی آن را برداشته و به روش برادفورد و سنجش آنزیمی با استوک اولیه آنزیمی (750 μl) که در دمای 4°C نگهداری شده بود) مقایسه شد. میزان آنزیم اتصال یافته

تنظیم شد. کازئین 1 درصد نیز در آب مقطر تهیه شد. سپس آنزیم در بافر با pHهای مختلف سنجش شد. بنابراین، غلظت بافر در محیط سنجش، 100 mM بود.

10-2- اثر درجه حرارت روی پایداری آنزیم آزاد و تثبیت شده

مطابق روش پیش عمل شد با این تفاوت که در این آزمایش، pH ثابت اما درجه حرارت محیط سنجش متغیر بود (بین 30°C تا 90°C و در بافر 40 mM فسفات، pH=7/5). باید توجه داشت که برای سنجش فعالیت آنزیمی در هر دما، سوستر (کازئین 1 درصد) و محلول آنزیمی (بافر+آنزیم) هر دو باید در آن دما به تعادل برسند سپس فعالیت آنزیمی سنجیده شود. با استفاده از معادله آرنیوس (رابطه زیر) انرژی فعالسازی آنزیم (Ea) محاسبه شد:

$$k = Ae^{-E_a/RT}$$

معادله آرنیوس، رابطه بین ثابت سرعت (K)

واکنش، دما بر حسب درجه کلوین (T)

و انرژی فعال کننده (Ea) است.

در این رابطه، A، پیش عامل نمائی و R، ثابت گازها است.

11-2- بررسی پایداری آنزیم در pHهای اسیدی و بازی

در این روش، آنزیم در زمانهای 0، 1، 5، 10، 15، 30 و 60 دقیقه در Mixed buffer با pHهای 3 و 12 انکوبه شد. سپس محلول آنزیمی با افزودن Mixed buffer با pH مناسب در دمای 25°C به pH=7/5 رسانده و فعالیت

نسبی نمونه‌ها اندازه‌گیری شد (نسبت به فعالیت زمان صفر انکوباسیون که عبارت بود از نمونه آنزیمی انکوبه شده در Mixed buffer، pH=7/5).

12-2- بررسی غیر فعال شدن حرارتی برگشت ناپذیر آنزیم

ابتدا محلول‌های آنزیمی در بافر 40 mM فسفات با pH=7/5 تهیه و در دماهای 20°C-90°C انکوبه شدند. نمونه‌ها در فواصل زمانی مشخص برداشته و به یخ منتقل شدند. نمونه‌ها پس از نیم ساعت از یخ خارج شده، فعالیت نسبی آن‌ها در دمای محیط و مطابق روش معمول اندازه‌گیری شد (نسبت به فعالیت زمان صفر انکوباسیون دمایی).

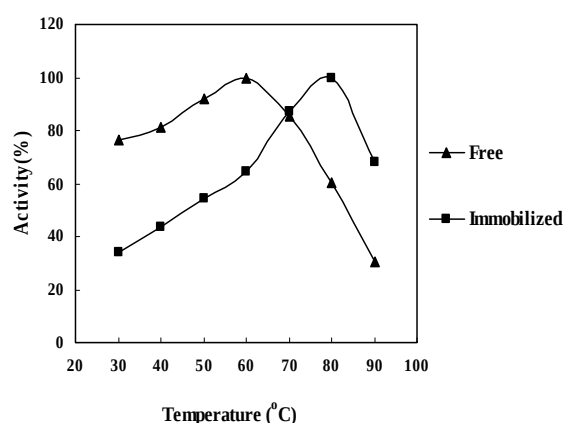
13-2- اثر یون‌های فلزی و EDTA روی فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده

غلظت‌های مورد نظر از نمک‌های کلرید کلسیم، منیزیم، روی، کبالت، آهن، باریم، قلع و منگنز، همچنین EDTA، در بافر 40 mM فسفات با pH=7/5، تهیه و فعالیت نسبی آنزیم طبق روش معمول اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم در شرایط مختلف نسبت به فعالیت آن در بافر بدون هیچ افزودنی، نیز بررسی شد. در تهیه محلول‌های بالا باید به این نکته توجه شود که پس از افزودن ترکیب مورد نظر، pH بافر در صورت تغییر، تنظیم شود و برای هر نمونه یون فلزی از یک نمونه شاهد استفاده شود.

14-2- تعیین شاخص‌های سینتیکی (V_{max}، K_m)

شاخص‌های سینتیکی آنزیم آزاد و تثبیت شده با استفاده از سوسترای طبیعی آنزیم یعنی کازئین با نسبت‌های صفر تا یک در صد وزنی به دست آمد. استفاده از درصد وزنی کازئین، خطا را تا حد زیادی کاهش داده

آنزیم آزاد، 60°C بود. در دمای بالاتر از 70°C ، فعالیت آنزیم دچار یک افت ناگهانی می شد، به گونه ای که در دمای 90°C ، آنزیم آزاد فقط 30 درصد فعالیت بیشینه خود را حفظ می کرد. بیشینه فعالیت آنزیم تثبیت شده در دمای 80°C بود (20°C جابه جایی در بهینه درجه حرارت). همچنین در دمای 90°C ، آنزیم تثبیت شده 68 درصد فعالیت بیشینه خود را حفظ می کرد، در حالی که آنزیم آزاد تنها 35 درصد فعالیت بیشینه را در این دما نشان می داد.



شکل 1 اثر درجه حرارت روی فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده

3-4- منحنی آرنیوس و به دست آوردن انرژی فعال سازی

انرژی فعال سازی (Activation energy) برای آنزیم آزاد و تثبیت شده در محدوده دمایی 30°C تا 70°C با رسم منحنی آرنیوس و معادله خط آن محاسبه شد (شکل 2). این مقدار برای آنزیم آزاد، $1/86 \text{ kcal/mol.k}$ و برای آنزیم تثبیت شده، $4/68 \text{ kcal/mol.k}$ محاسبه شد.

و محلول با دقت بیشتری تهیه خواهد شد. در محاسبات نهایی، این درصدها به میکرومولار کازئین در حجم مخلوط آزمایش تبدیل شدند و شاخص های سینتیکی از رسم و بررسی منحنی Lineweaver-Burk به دست آمد. فعالیت آنزیم در غلظت های مختلف کازئین در شرایط معمول با رسم منحنی استاندارد تیروزین بر حسب $\mu\text{mol/ml}$ اندازه گیری شد.

3- یافته ها

3-1- بررسی فعال شدن ژل

در این بررسی برای اطمینان از فعال شدن ژل، از هموگلوبین که پروتئینی رنگی است استفاده شد. بعد از اضافه کردن هموگلوبین به ژل فعال و چند بار شست و شو ژل فعال شده، رنگ قرمز به خود می گرفت در حالی که ژل فعال نشده، رنگ قرمز خود را از دست می داد و بی رنگ می شد.

3-2- نتایج مربوط به بازده فعالیت و بازده تثبیت

کارایی اتصال تثبیت آنزیمی (میزان پروتئین اتصال یافته) با 200 mg سیانوزن برومید و برای هر میلی لیتر ژل سفارز-6B فعال و استوک آنزیمی 5 mg/ml در محلول $0/2 \text{ M}$ بی کربنات سدیم با $\text{pH}=9/5$ (نسبت حجمی $1/1/5$) برابر با $7/3 \text{ mg.proteine/ml.gel}$ و بازده فعالیت و بازده تثبیت به ترتیب در حدود 53 و 76 درصد بود.

3-3- اثر درجه حرارت روی فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده

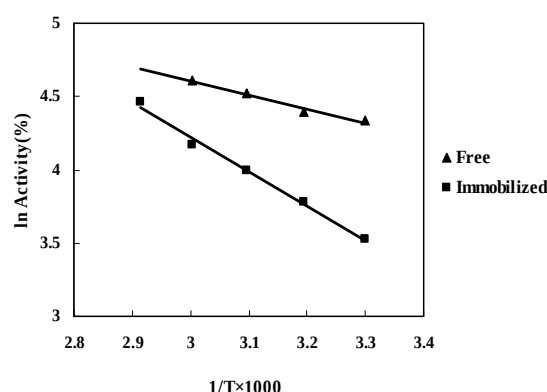
تأثیر درجه حرارت روی فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده در شکل 1 نشان داده شده است. درجه حرارت بهینه

3-6- غیرفعال شدن حرارتی برگشت ناپذیر آنزیم

در اثر حرارت در دمای 80°C و 90°C

غیرفعال شدن حرارتی برگشت ناپذیر آنزیم در دمای 80°C در 200mM Mixed buffer و $\text{pH}=7/5$ بررسی شد. همان گونه که در شکل 4 مشاهده می شود، در دمای 80°C با افزایش زمان انکوباسیون میزان فعالیت آنزیم آزاد کاهش یافته و بعد از انکوباسیون دمایی به مدت 15 دقیقه، فعالیت آنزیم آزاد تقریباً به نصف می رسید. در حالی که آنزیم تثبیت شده بعد از انکوباسیون دمایی به مدت 5 دقیقه بیشینه فعالیت را داشت و با سپری شدن زمان انکوباسیون، آنزیم تثبیت شده فعالیت خود را به میزان چشم گیری حفظ می کرد. بعد از گذشت 15 دقیقه از انکوباسیون دمایی، 98 درصد، بعد از 30 دقیقه، 84 درصد و بعد از 60 دقیقه 68 درصد فعالیت اولیه خود را حفظ می کرد. افزایش فعالیت آنزیم تا 150 درصد طی مراحل اولیه واکنش می تواند به این دلیل باشد که با عمل تثبیت، جایگاه فعال آنزیم بهتر در دسترس سوبسترا قرار می گرفت. در آنزیم تثبیت شده جنبش های غیر ضروری مولکول ها در جایگاه فعال آنزیم به کمترین میزان رسیده و دسترسی سوبسترا را مفیدتر می کند. از طرفی، افزایش دما اثر بیشتری روی زیاده تر شدن جنبش های مولکولی در فرم آزاد نسبت به تثبیت شده دارد و به این ترتیب، نمودارهای کاهش فعالیت نسبت به دما در آنزیم آزاد و تثبیت شده (شکل های 4 و 5) نیز توجیه می شوند.

بررسی غیرفعال شدن حرارتی برگشت ناپذیر آنزیم نیز نشان داد که کاهش فعالیت آنزیم آزاد در دمای 90°C (شکل 5) بسیار سریع تر از دمای 80°C بود. بعد از گذشت 15 دقیقه از انکوباسیون دمایی، فعالیت آنزیم

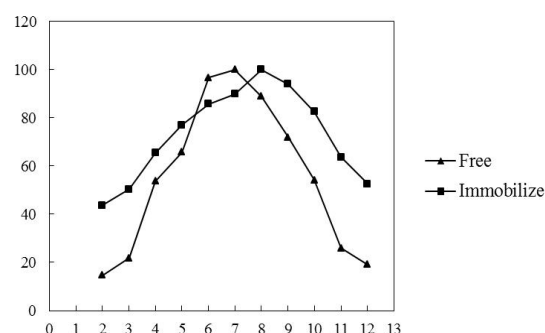


شکل 2 منحنی آرنیوس برای محاسبه انرژی فعال سازی مربوط به آنزیم آزاد و تثبیت شده

3-5- اثر pH روی فعالیت آنزیم آزاد و

تثبیت شده

اثر pH های مختلف روی فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده (pH-profile) در شکل 3 نشان داده شده است. بیشینه فعالیت آنزیم آزاد در محدوده pH بین 6/5 تا 7 بود. فعالیت آنزیم آزاد از $\text{pH}=9$ به بعد دچار افت شدید می شد به گونه ای که در $\text{pH}=12$ ، آنزیم آزاد تنها 20 درصد فعالیت اولیه خود را حفظ می کرد. ولی pH بهینه آنزیم تثبیت شده، 8 بود و در pH های 6 تا 10 فعالیت بالایی داشت. همچنین آنزیم تثبیت شده در $\text{pH}=12$ 53 درصد فعالیت اولیه خود را حفظ می کرد.

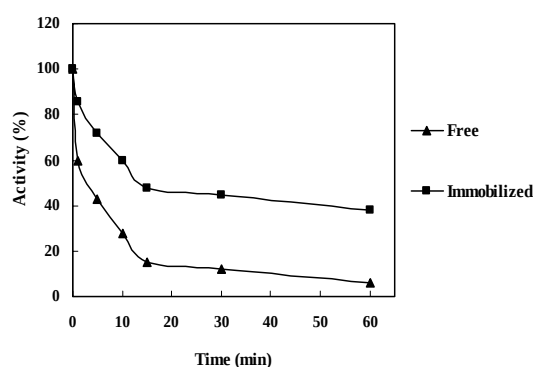


شکل 3 اثر pH روی فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده

3-7- بررسی پایداری آنزیم آزاد و تثبیت شده در

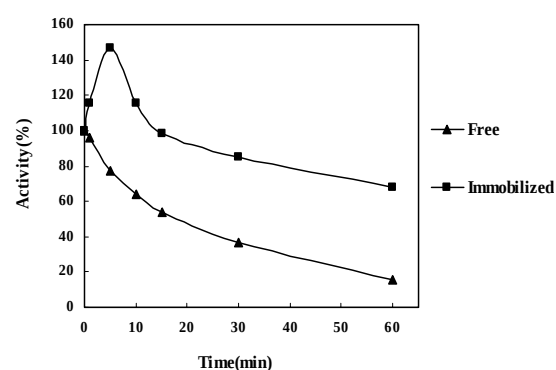
pHهای اسیدی و بازی

پایداری آنزیم آزاد و تثبیت شده در $\text{pH}=12$ و $\text{pH}=3$ بررسی و مقایسه شد (غیرفعال شدن برگشت ناپذیر در pH اسیدی و بازی). در $\text{pH}=3$ با افزایش زمان انکوباسیون، فعالیت آنزیم آزاد کاهش محسوسی نشان می داد. فعالیت اولیه آنزیم آزاد پس از 30 دقیقه از زمان انکوباسیون، 12 درصد و پس از 60 دقیقه، 5 درصد قابل برگشت بود. در همین شرایط، آنزیم تثبیت شده نسبت به آنزیم آزاد، شرایط اسیدی را بهتر تحمل می کرد. پس از 30 دقیقه، 52 درصد و پس از 60 دقیقه 43 درصد فعالیت اولیه آنزیم تثبیت شده قابل برگشت بود (شکل 6). در $\text{pH}=12$ نیز، با افزایش زمان انکوباسیون، فعالیت آنزیم آزاد کاهش پیدا می کرد (شکل 7). فعالیت اولیه آنزیم آزاد پس از 30 دقیقه از زمان انکوباسیون، 16 درصد و پس از 60 دقیقه 9 درصد قابل برگشت بود. در شرایط مشابه، آنزیم تثبیت شده نسبت به آنزیم آزاد، شرایط بازی را بهتر تحمل می کرد؛ پس از 30 دقیقه، 52 درصد و پس از 60 دقیقه 43 درصد فعالیت اولیه اش قابل برگشت بود.

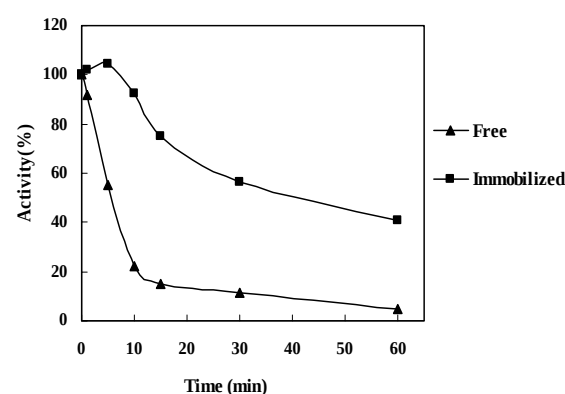


شکل 6 بررسی پایداری آنزیم آزاد و تثبیت شده در $\text{pH}=3$

آزاد به حدود صفر می رسید. در مورد آنزیم تثبیت شده، بعد از 5 دقیقه از انکوباسیون دمایی، افزایش فعالیت مشاهده می شد. همانند دمای 80°C با سپری شدن زمان انکوباسیون، آنزیم تثبیت شده فعالیت خود را حفظ می کرد، به گونه ای که بعد از 15 دقیقه از انکوباسیون دمایی، 75 درصد، بعد از 30 دقیقه، 56 درصد و بعد از 60 دقیقه 40 درصد فعالیت اولیه خود را حفظ می کرد.

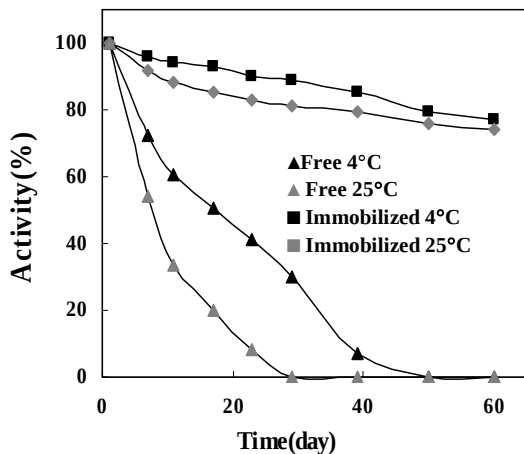


شکل 4 غیرفعال شدن حرارتی برگشت ناپذیر آنزیم آزاد و تثبیت شده در دمای 80°C



شکل 5 غیرفعال شدن حرارتی برگشت ناپذیر آنزیم آزاد و تثبیت شده در دمای 90°C

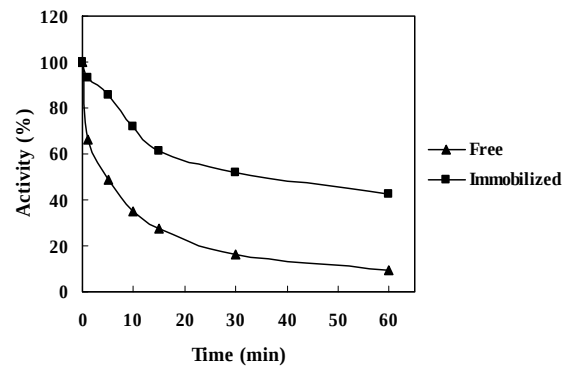
پایین در مقایسه با سایر تیول پروتئازها [14] و این احتمال که افزودن بازدارنده‌های پروتئاز در بررسی‌های فاکتورهای مورد نظر ما اشکال ایجاد می‌کند، همه بررسی‌ها در این پژوهش بدون حضور بازدارنده‌های پروتئاز انجام شد.



شکل 8 بررسی پایداری طولانی مدت آنزیم آزاد و تثبیت شده

3-9- اثر یون‌های فلزی روی فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده

فعالیت نسبی آنزیم آزاد و تثبیت شده در حضور غلظت‌های مختلف (1, 5, 10, 20, 40mM) یون‌های فلزی، اندازه گیری و فعالیت نسبی آن‌ها در شرایط یکسان نسبت به فعالیت آنزیم در نبود آن‌ها بررسی شد (جدول 1). آنزیم تثبیت شده نسبت به آنزیم آزاد مقاومت بیشتری نسبت به حضور یون‌های فلزی از خود نشان می‌داد، در حالی که آنزیم آزاد نسبت به حضور یون‌های فلزی حساس بود و با افزایش غلظت آن‌ها کاهش فعالیت محسوس بود. پژوهش‌ها نشان داده که تیول پروتئازها در اثر یون‌های فلزی، مهار آنزیمی شده و مقدار این مهار افزون بر غلظت فلز به بار آن نیز بستگی دارد. بیشترین مهار آنزیمی تحت اثر یون‌هایی با دو



شکل 7 بررسی پایداری آنزیم آزاد و تثبیت شده در pH = 12

3-8- تعیین پایداری طولانی مدت آنزیم آزاد و تثبیت شده

پایداری طولانی مدت آنزیم آزاد و تثبیت شده به مدت 60 روز در دمای 4°C و دمای آزمایشگاه (25°C) تحت شرایط استاندارد و به طور هم‌زمان اندازه‌گیری شد. همان‌گونه که در (شکل 8) آشکار است، میزان کاهش فعالیت آنزیم آزاد محسوس بود و با گذشت زمان کاهش چشم‌گیری نسبت به همتای تثبیت شده‌اش نشان می‌داد. بعد از انکوباسیون، زمانی به مدت 30 روز در دمای 25°C و 40 روز در دمای 4°C فعالیت آنزیم آزاد به صفر می‌رسید و آنزیم کاملاً غیرفعال می‌شد. در همین شرایط، آنزیم تثبیت شده با حفظ پایداری، فعالیت خود را به میزان چشم‌گیری نسبت به حالت اولیه حفظ می‌کرد. بعد از انکوباسیون زمانی به مدت 40 روز، بیش از 80 درصد فعالیت اولیه خود را حفظ می‌کرد.

با توجه به این که آنزیم پایین یک پروتئاز است، ممکن است در اثر هضم خود به خودی نیز تا حدی غیرفعال شود. در این پژوهش سعی شد که همه مراحل تثبیت و سنجش آنزیمی در زمان کوتاه انجام شده و هر بار محلول آنزیمی تازه تهیه شود تا از هضم خود به خودی تا حد زیادی جلوگیری شود. از سوی دیگر، با توجه به پایداری نسبی

10-3- مطالعه شاخص های سینتیکی آنزیم آزاد و

تثبیت شده

شاخص های سینتیکی آنزیم آزاد و تثبیت شده در غلظت های مختلف کازئین، ارزیابی و مطالعه شد. برای به دست آوردن مقادیر عددی K_m و V_{max} آنزیم آزاد و تثبیت شده، منحنی لاین و یور-برک آن ها رسم شد. در محاسبات مربوط به K_m ، درصد های وزنی (W/V) کازئین در حجم مخلوط سنجش آنزیمی، تبدیل به میکرومولار شدند. نتایج حاکی از آن بود که تثبیت آنزیم سبب افزایش K_m و کاهش کارآئی کاتالیتیک (k_{cat}/K_m) آنزیم تثبیت شده نسبت به همتای آزاد آن می شد (جدول 2).

جدول 2 محاسبه پارامترهای سینتیکی آنزیم آزاد و تثبیت شده

فرم آنزیم	$k_{cat} (min^{-1})$	$K_m (\mu M)$	k_{cat}/K_m
آزاد	27×10^{-5}	0.62	43×10^{-5}
تثبیت شده	17×10^{-5}	0.79	22×10^{-5}

4- بحث و نتیجه گیری

بررسی فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده در pH های مختلف (شکل 3) نشان داد که آنزیم آزاد در pH=7 بیشترین فعالیت را دارد. در pH های بالا و پایین، فعالیت آنزیم به میزان چشم گیری کاهش می یافت در حالی که آنزیم تثبیت شده در pH=8 بیشترین فعالیت را داشت (1 واحد افزایش نسبت به آنزیم آزاد). افزون بر آن، آنزیم تثبیت شده در pH های بالا و پایین نیز فعالیت چشم گیری در مقایسه با فرم آزاد آنزیمی از خود نشان می داد. در pH=12، آنزیم تثبیت شده حدود 52 درصد از فعالیت اولیه خود را حفظ می کرد. جابه جایی pH بهینه آنزیم پاپایین تثبیت شده به روش کووالان به طرف pH های بازی به وسیله ی دیگر پژوهشگران نیز گزارش

بار مثبت است و با افزایش تعداد بار، مهار کاهش می یابد [15]. یون های استفاده شده در این پژوهش دوظرفیتی بودند، بنابراین فاکتور تعیین کننده میزان مهار آنزیمی، تنها غلظت یون بود (جدول 1). پاپایین از گروه تیول پروتئازها و آنزیمی پایدار است که نسبت به سایر سیستمین پروتئازها و سرین پروتئازها کمتر تحت اثر مهار یون های فلزی قرار می گیرد [14]. آنزیم تثبیت شده به خاطر ثابت بودن کنفورماسیون نسبت به آنزیم آزاد، پایداری بیشتری در حضور یون های فلزی نشان می داد.

جدول 1 اثر یون های فلزی بر فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده

یون فلزی	فعالیت نسبی آنزیم	
	آزاد	تثبیت شده
کنترل	1	1
Ca^{2+} 5 mM	0.785	0.948
	10	0.87
	20	0.72
	40	0.487
Mg^{2+} 5 mM	0.814	0.967
	10	0.888
	20	0.772
	40	0.571
Ba^{2+} 5 mM	0.767	0.914
	10	0.729
	20	0.571
	40	0.383
Co^{2+} 5 mM	0.54	0.708
	10	0.587
	20	0.476
	40	0.2
Zn^{2+} 5 mM	0.49	0.658
	10	0.549
	20	0.45
	40	0.164
Fe^{2+} 5 mM	0.56	0.68
	10	0.565
	20	0.472
	40	0.164
Mn^{2+} 5 mM	0.568	0.695
	10	0.602
	20	0.485
	40	0.182

شده بود [16-17]. در محلول، ریزمحیط ملکول‌های آنزیم، همگن بوده و تحت این شرایط، آنزیم قادر است با همه‌ی اجزای محلول در تماس باشد. تثبیت آنزیم موجب ناهمگن شدن محیط به دو فاز یعنی فاز آنزیم تثبیت شده و فاز محلول می‌شود. جابه‌جایی pH بهینه آنزیم تثبیت شده بیانگر تغییر رفتار گروه‌های عاملی شرکت‌کننده در جایگاه فعال آنزیم و در نتیجه تغییر ریزمحیط آن‌ها است؛ به دنبال آن کاهش قطبیت محیط و نیز کاهش ثابت دی‌الکتریک بافر و تماس گروه‌های مجاور با گروه عاملی کاتالیزور جایگاه فعال به گونه‌ای تغییر می‌یابد که یونیزاسیون آن به سوی pHهای قلیایی جابه‌جا شود [18]. به بیان دیگر تغییرات انجام شده به‌خاطر حضور یک گروه پروتون‌دهنده (His-159) در سازوکار اسید و باز کاتالیزور هیدرولیز کازئین است. مشابه چنین تاثیری روی گروه بازی (Cys-25) موجود در جایگاه فعال آنزیم نیز روی می‌دهد. از سویی کاهش فعالیت آنزیم در pHهای اسیدی و قلیایی در نتیجه افزایش برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک در ساختار آنزیم در محیط دارای ثابت دی‌الکتریک پایین است که باعث از بین رفتن فعالیت آنزیم می‌شود. همچنین فاز تثبیت شده به‌خاطر تغییر تعادل برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک می‌تواند روی سازوکار کاتالیزور اسید و باز تأثیر بگذارد [19]. نتایج به‌دست آمده از این بررسی می‌تواند آغازی برای پژوهش‌های گسترده‌تر در زمینه اثر ریزمحیط بر pH بهینه آنزیم‌های تثبیت شده و در نهایت استفاده صنعتی از آنزیم‌ها به ویژه آنزیم پاپائین در شرایط گوناگون باشد.

بررسی فعالیت آنزیم در دماهای مختلف و رسم Temperature profile که در شکل 1 آمده است،

نشان می‌داد که درجه حرارت بهینه آنزیم آزاد 60°C است. آنزیم آزاد در محدوده دمایی 30°C تا 70°C حدود 80 درصد و در دمای 80°C و 90°C به ترتیب 60 و 30 درصد فعالیت بیشینه را داشت. در شرایط مشابه، آنزیم تثبیت شده در دماهای پایین، فعالیت کمتری نسبت به آنزیم آزاد از خود نشان می‌داد و بیشینه فعالیت خود را در دمای 80°C داشت (20°C جابه‌جایی در بهینه درجه حرارت). اگرچه افزایش پایداری حرارتی آنزیم پاپائین تثبیت شده به‌وسیله دیگر محققین نیز گزارش شده بود [16، 17 و 20]؛ اما نکته مهم در این پژوهش آن بود که در دمای 90°C ، آنزیم تثبیت شده 70 درصد فعالیت بیشینه خود را حفظ می‌کرد که در هیچ یک از پژوهش‌های قبلی گزارش نشده بود. این افزایش پایداری حرارتی آنزیم پاپائین تثبیت شده برای کاربردهای صنعتی بسیار ارزشمند است.

انرژی فعال‌سازی آنزیم آزاد و تثبیت شده در بازه‌ی دمایی 30°C تا 70°C از طریق رسم منحنی آرنیوس محاسبه شد که برای آنزیم آزاد، $1/86 \text{ kcal/mol.k}$ و برای آنزیم تثبیت شده، $4/68 \text{ kcal/mol.k}$ بود که نشان می‌داد ساختار آنزیم تثبیت شده سخت‌تر و انعطاف‌پذیری آن کمتر شده است. بررسی اثر تغییرات دما بر سرعت واکنش‌های آنزیمی، اطلاعات چندانی در مورد سازوکار واکنش کاتالیز آنزیمی در اختیار ما قرار نمی‌داد اما این آثار در تشخیص تغییرات ساختاری آنزیم و فعالیت آن بسیار ارزشمند است. طبق معادله آرنیوس، با افزایش دما، افزایش نمایی در سرعت واکنش آنزیمی به وجود می‌آید. در مورد آنزیم آزاد، هنگامی که دما از حد خاصی بگذرد ساختار فشرده سه‌بعدی خود را که برای فعالیت کاتالیتیک آن ضروری است از دست می‌داد. در دماهای بالاتر از

70°C، آنزیم آزاد به سرعت غیرفعال می‌شد؛ اما آنزیم تثبیت شده به خاطر وجود ریزمحیط کمتر تحت تأثیر درجه حرارت قرار می‌گرفت [21 و 22].

نتایج به دست آمده از بررسی غیرفعال شدن حرارتی برگشت ناپذیر در دماهای 80°C و 90°C نشان داد که هر چه از زمان انکوباسیون آنزیم آزاد می‌گذشت، فعالیت آنزیم بیشتر کاهش می‌یافت. بعد از گذشت یک ساعت از زمان انکوباسیون در دمای 80°C، آنزیم آزاد تنها 15 درصد فعالیت اولیه خود را حفظ می‌کرد. در مورد آنزیم تثبیت شده شاهد یک مرحله افزایش فعالیت بودیم و آنزیم تثبیت شده بعد از 5 دقیقه انکوباسیون بیشینه فعالیت را داشت. نکته ارزنده در این پژوهش آن است که بعد از گذشت یک ساعت از زمان انکوباسیون، آنزیم تثبیت شده حدود 70 درصد از فعالیت اولیه خود را حفظ می‌کرد. همچنین بررسی پایداری طولانی مدت آنزیم آزاد و تثبیت شده، بیانگر افزایش چشم‌گیر پایداری حرارتی آنزیم تثبیت شده نسبت به همتای آزادش بود. آنزیم آزاد بعد از 30 روز در دمای 4°C و 40 روز در دمای 25°C (دمای اتاق) فعالیتش را به طور کامل از دست می‌داد. در همین شرایط، آنزیم تثبیت شده بعد از 60 روز با حفظ پایداری، حدود 80 درصد فعالیت بیشینه خود را حفظ می‌کرد.

این نتایج حاکی از آن بود که تثبیت آنزیم پاپایین به روش کووالانسی سبب افزایش چشم‌گیر در پایداری حرارتی آنزیم تثبیت شده نسبت به همتای آزاد آن می‌شد. پایداری حرارتی به دست آمده در اثر فرایند تثبیت، بیشتر ناشی از سختی و انعطاف ناپذیری ملکولی و نیز ایجاد یک محیط حفاظت شده است. همچنین آثار انتشار درونی نیز سبب بهبود پایداری دمایی می‌شود. عامل مهم دیگر در افزایش پایداری حرارتی آنزیم تثبیت شده در این پژوهش،

استفاده از بستر متخلخل سفارز-6B بود که اندازه بهینه منافذ این بستر موجب پایداری و فعال بودن آنزیم تثبیت شده بود [23-24].

دلیل دیگر افزایش پایداری حرارتی آنزیم تثبیت شده، کاهش میزان آب در فاز تثبیت شده است. از آنجا که آب نقش مهمی در برهم‌کنش‌های آب‌گریز دارد، دستکاری محیط و مقدار آب اطراف آنزیم اثری عمیق بر میزان پایداری آنزیم دارد. کاهش میزان آب در فاز تثبیت شده سبب کاهش قطبیت محیط و تجمع هیدروفوبیک ملکول‌های پروتئینی که در واقع نیروی اصلی پایداری پروتئین‌ها در محلول‌های آبی است، می‌شود [25]. برداشت آب از سامانه، سبب کاهش تعداد کلی پیوندهای هیدروژنی بین ملکول آب و آنزیم می‌شود و پایداری پیوندهای هیدروژنی درون ملکولی و در نهایت افزایش سختی و انعطاف ناپذیری پروتئین را به دنبال دارد. در تثبیت آنزیمی با حلال‌هایی با ثابت دی‌الکتریک کم، پیوندهای هیدروژنی قوی‌تر است. وقتی پروتئین‌ها برای مدت زمان طولانی در دماهای بالا قرار می‌گیرند دچار فرایند باز شدن حرارتی ساختمان می‌شوند که در نتیجه آن گروه‌های واکنشگر و نواحی هیدروفوب موجود در بخش درونی آنزیم در سطح قرار می‌گیرند که منجر به یک سری تغییرات شیمیایی برگشت‌پذیر از جمله انباشتگی، تجمع و آشفستگی ملکولی می‌شود [26-28]. این فرایندهای شیمیایی در دماهای بالا بسیار سریع انجام می‌گیرند و بیشتر باعث فرایندهایی مانند دآمیناسیون زیرواحدهای آسپاراژین و گلوتامین، هیدرولیز پیوندهای پپتیدی در زیر واحدهای آسپارتیک اسید، تخریب پیوندهای دی‌سولفیدی، اکسیداسیون سیستئین، ایزومریزاسیون پرولین و گلایکوزیله شدن گروه‌های آمین می‌شوند [27]. به خاطر آن که انجام همه‌ی فرایندهای

گفته شده مستلزم وجود آب است، در محیط‌های بدون آب مانند فاز تثبیت شده رخ نمی‌دهند. افزون بر آن، سختی و انعطاف‌ناپذیری پروتئین‌ها در فاز تثبیت شده مانع باز شدن برگشت‌پذیر آنزیم‌ها می‌شود. در نتیجه، آنزیم‌های تثبیت شده، پایداری حرارتی بیشتری نسبت به آنزیم‌های تثبیت نشده از خود نشان می‌دهند.

بررسی مقایسه‌ای پایداری آنزیم آزاد و تثبیت شده در pH اسیدی (pH=3) و pH قلیایی (pH=12) نشان داد که آنزیم تثبیت شده نسبت به همتای آزادش در برابر pH‌های بحرانی پایداری است. با گذشت زمان انکوباسیون، فعالیت آنزیم آزاد کاهش پیدا می‌کرد و بعد از گذشت یک ساعت از زمان انکوباسیون فعالیت آنزیم نزدیک به صفر می‌رسید. در همین شرایط آنزیم تثبیت شده نسبت به آنزیم آزاد شرایط اسیدی و قلیایی را بهتر تحمل می‌کرد. با گذشت زمان، کاهش فعالیت آنزیم تثبیت شده چندان محسوس نبود. بعد از سپری شدن یک ساعت از زمان انکوباسیون، آنزیم تثبیت شده حدود 50 درصد فعالیت اولیه خود را حفظ می‌کرد. اگرچه گزارش‌هایی مبنی بر بهبود پایداری آنزیم پاپایین تثبیت شده نسبت به pH‌های بحرانی وجود دارد [29-30] ولی در هیچ‌کدام دامنه پایداری آنزیم نسبت به pH‌های اسیدی و بازی تا این حد نبوده است.

اثر یون‌های فلزی در غلظت‌های 5mM تا 40mM روی دو فرم آزاد و تثبیت شده آنزیم بررسی شد. همان‌گونه که در جدول 1 مشاهده می‌شود، در غلظت‌های پایین 5mM و 10mM از یون‌های فلزی، فعالیت آنزیم آزاد به میزان چشم‌گیری کاهش پیدا می‌کرد. آنزیم آزاد در غلظت 5mM از یون‌های Co^{2+} ، Fe^{2+} ، Zn^{2+} ، Mn^{2+} ، 50 درصد فعالیت اولیه و در غلظت 10 mM از این یون‌ها،

حدود 70 درصد فعالیت اولیه خود را از دست می‌داد. در همین شرایط، فعالیت آنزیم تثبیت شده در این غلظت‌ها در حضور یون‌های Ca^{2+} ، Mg^{2+} ، Ba^{2+} تقریباً بدون تغییر باقی می‌ماند (بیش از 90 درصد فعالیت اولیه آنزیم حفظ می‌شد). همچنین در حضور یون‌های Co^{2+} ، Fe^{2+} ، Zn^{2+} ، Mn^{2+} ، آنزیم تثبیت شده حدود 60 درصد فعالیت اولیه‌اش (30 درصد بیشتر از حالت آزاد) را حفظ می‌کرد. در غلظت‌های بالا (30mM و 40mM) از یون‌های فلزی، فعالیت آنزیم آزاد تقریباً به صفر می‌رسید در حالی که فرم تثبیت شده آنزیم به میزان چشم‌گیری فعالیت اولیه خود را حفظ می‌کرد و حساسیت آنزیم نسبت به آثار مهار یون‌های دوظرفیتی کاهش می‌یافت. حفظ پایداری آنزیم تثبیت شده در غلظت‌های بالای یون‌های فلزی بیانگر کارایی زیاد روش تثبیت در حفظ پایداری و فعالیت آنزیم تثبیت شده است. همچنین این ویژگی از لحاظ کاربردی در صنایع مختلف بسیار ارزشمند است. برای نمونه، می‌توان از آنزیم پاپایین تثبیت شده به عنوان یک بیوسنسور برای برآورد آلودگی‌های محیطی با فلزات سنگین بهره گرفت [31].

تثبیت تقریباً همیشه فعالیت کاتالیزوری آنزیم را کاهش می‌دهد که در تغییر ثابت‌های سینتیکی در این پژوهش آشکار است [32-34]. از نتایج بارز این پژوهش، تغییر سرعت بیشینه واکنش آنزیمی ($V_{\max}$) است. در شرایط یکسان، سرعت بیشینه پاپایین تثبیت شده کمتر از مورد مشابه برای آنزیم محلول بود. ثابت میکائیلیس که بیانگر تمایل آنزیم به سوبسترای کازئین است نسبت به همتای آزادش افزایش پیدا کرد. ثابت‌های سینتیکی به دلایل مختلف مانند تغییر در جایگاه فعال آنزیم طی فرایند تثبیت آنزیمی و تأثیر بر

- اتصال سوبسترا به آنزیم تثبیت شده به خاطر جلوگیری فضایی، تغییر می کند [18، 33 و 35].
- در نهایت می توان ادعا کرد که در این پژوهش با ارائه راهکاری جدید برای بهینه سازی تثبیت آنزیم پاپایین، موفق به افزایش پایداری آنزیم تثبیت شده نسبت به فرم آزاد شدیم که در مورد این آنزیم تا به حال انجام نشده بود.
- ### 5- مراجع
- [1] Gianfreda, L. and Scarfi, M. R. (1991) Enzyme stabilization: state of the art. *J. Mol. Cell Biochem.* 100, 97-128.
 - [2] Wessa, T., Rapp, M. And Ache, H. J. (1999) new immobilization method for SAW-biosensors: covalent attachment of antibodies via CNBr. *Biosens. Bioelectron.* 14, 93-98.
 - [3] Reshmi, R., Sanjay, G. and Sugunan, S. (2006) Enhanced activity and stability of α -amylase immobilized on alumina. *Catal. Commu.* 7, 460-465.
 - [4] Bruggink, A. Roos, E. C. and de Vroom, E. (1998) Penicillin acylase in the industrial production of β -lactam antibiotics. *Org. Process. Res.* 2, 128-133.
 - [5] Chang, T. M. S. and Poznansky, M. J. (1968) Semipermeable microcapsules. Containing catalase for enzyme replacement in acatalsaemic mice. *Nature* 218, 242-245.
 - [6] Marshall, J.J. (1978) Quantitative determination of alpha-amylase in glucoamylase preparations. *Anal. Biochem.* 85, 541-50.
 - [7] Micheel, F. and Evers, J. (1949) Synthesis of cellulose-bound proteins. *Macromol Chem.* 3, 200-209.
 - [8] Gale, E. F. and Epps, M. R. (1944) Studies on bacterial amino-acid decarboxylases 1. 1-(+)-lysine decarboxylase. *Biochem. J.* 38, 232-242.
 - [9] Matsumoto, K., Murata, M., Sumiya, S., Mizoue, K., Kitamura, K. and Ishida, T. (1998) X-Ray crystal structure of papain complexed with cathepsin B-specific covalent-type inhibitor substrate specificity and inhibitory activity. *Biochimica. Biophysica. Acta* 1383, 93-100.
 - [10] Sumantha, A., Larroche, C. and Pandey, A. (2006) Microbiology and Industrial Biotechnology of Food-Grade Proteases: A Perspective. *Food Technol. Biotechnol.* 44, 211-220.
 - [11] Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., and Deshpande, V. V. (1998) Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology. J. Mol. Biol. Rev.* 35, 597-635.

- (4-formyl phenoxy) cyanurate. *Enzyme Microb. Technol.* 39, 958-962.
- [18] Bickerstaff, G.F. (1997) Enzymes in Industry and Medicine. Publisher, Edward Arnold London.
- [19] Harrison, M. J., Burton, N. A. and Hillier, I. H. (1997) Catalytic Mechanism of the Enzyme Papain: Predictions with a Hybrid Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Potential. *J. Am. Chem. Soc.* 119, 12285-12291
- [20] Afaaq, S. and Iqbal, J. (2001) Immobilization and stabilization of papain on chelating sepharose: a metal chelate regenerable carrier. *Elec. J. Biochem.* 4 (3), 120-124.
- [21] Marshall, J.J. (1978) Quantitative determination of alpha-amylase in glucoamylase preparations. *Anal. Biochem.* 85, 541-50.
- [22] Duvnjak, Z. (1976) the Immobilization of Glucose Oxidase to Manganese Oxide. *Biotech. Bioeng.* 18, 737-740.
- [23] Lucas, C. C. And King, J.E. (1932) The Iodimetric Titration of Cysteine and Allied Substances. *Biochem. J.* 26, 2076-2089.
- [24] Miyamoto, D., Watanabe, J. and Ishihara, K. (2004) Effect of Water-Soluble Phospholipid Polymers Conjugated with
- [12] Mansfield, L. E., Ting, S., Haverly, R.W. and Yoo, T. J. (1985) the incidence and clinical implications of hypersensitivity to papain in an allergic population, confirmed by blinded oral challenge. *Ann. Aller.* 55, 541-543.
- [13] March, S. C., Parikh, I. and Cuatrecasas, P. (1974) A simple method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography. *Annal. Biochem.* 60, 149-152.
- [14] Guerrieri, N., Cerletti, P., De Vincentiis, M., Salvati, A. and Scippa, S. (1999) Vanadium inhibition of serine and cysteine proteases. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 122, 331-336.
- [15] Crans, D. C., Bunch, R. L. and Theisen, L.A. (1989) Interaction of trace levels of vanadium(IV) and vanadium(V) in biological systems. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 7597-607.
- [16] Sangeetha, K. and Abraham, E. (2006) Chemical modification of papain for use in alkaline medium. *J. Mol. Catal. B-Enzyme* 38, 171-177.
- [17] Srinivasa, R., Borkar, P. S., Khobragade, C. N. and Sagar, A. D. (2006) enzymatic activities of protease immobilized on tri

- using papain. *Analytica. Chimica. Acta* 566(2), 283-289.
- [32] Chang, M. Y. and Juang, R.S. (2005) Activities, stabilities, and reaction kinetics of three free and chitosan-clay composite immobilized enzymes. *Enzyme Microb. Technolo.* 36, 75-82.
- [33] Marconi, W., Faiola, V. and Piozzi, A. (2001) Catalytic activity of immobilized fumarase. *J. Mol. Catal.* 15, 93-99.
- [34] Fang, F., Satulovsky, J. and Szleifer, I. (2005) Kinetics of Protein Adsorption and Desorption on Surfaces with Grafted Polymers. *Biophys. J.* 89, 1516-1533.
- [35] Klibanov, A. M. (1983) Immobilized enzymes and cells as practical Catalysts. *Science* 219, 722-727.
- Papain on the enzymatic Stability. *Biomaterials* 25, 71-76.
- [25] Kausmann, W. (1959) some factor in the interpretation of protein denaturation. *Adv. Protein. Chem.* 14, 1-63.
- [26] Gupta, M. N. and Roy, I. (2004) Enzymes in organic media Forms, functions and applications. *Eur. J. Biochem.* 271, 2575-2583.
- [27] Volkin, D.B. and Klibanov, A.M. (1989) Minimizing protein inactivation in "Protein function, a practical approach" IRL Press, Oxford, pp. 1-24.
- [28] Gupta, M. M. (1992) Enzyme Function in Organic solvent. *Eur. J. Biochem.* 203, 25-32.
- [29] Sangeetha, K. and Emilia Abraham, T. (2006) Chemical modification of papain for use in alkaline medium. *J. Mol. Catal. B-Enzyme.* 38(3-6), 171-177
- [30] Lei, H., Wang, W., Chen, L.L., Li, X.C., Yi, B. and Deng L. (2004) the preparation and catalytically active characterization of papain immobilized on magnetic composite microspheres. *Enzyme Microb. Technol.* 35(1), 15-21.
- [31] Shukor, u., Baharom, N. A., Rahman, F. A., Abdullah, M. P., Shamaan, N. A. And Arif syed, M. (2006) Development of a heavy metals enzymatic-based assay