



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.

¹Marine Biology Department, Marine Science & Technology Faculty, Hormozgan University, Bandar Abbas, Iran.

²Biochemistry 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 Fe²⁺ and Mn²⁺ significantly increased the enzyme activity, whereas a strong inhibitory effect was observed in the presence of Cd²⁺, Hg²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺, 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 merguensis* 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 ...

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

فوزیه شجعی 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 طاهری زاده 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 فیزیوشیمیایی خاص انجام می‌شوند، بایستی پایداری آنها را بهبود بخشید. در این پژوهش با استفاده از نانوذره‌های کیتوزان به عنوان بستری سازگار با سیستم‌های زیستی گامی موثر در جهت افزایش پایداری و حفظ فعالیت آنزیم پروتئاز خالص شده از میگوی پنائوس و نانمی در برابر یون‌های فلزی برداشته شد. پس از فعال‌نمودن نانوذره به منظور اتصال الکترواستاتیک آنزیم به نانوذره، محلول پروتئینی با غلظت ۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به نانوذره اضافه و به مدت ۴ ساعت در دمای ۱۰°C انکوبه شد. سپس بعد از سه بار شست‌وشو با بافر فسفات با pH برابر ۷/۵ نانوانزیم در یک میلی‌لیتر بافر فسفات حل و برای پژوهش‌های بعدی استفاده شد. نتایج این تحقیق نشان داد که یون‌های Fe^{2+} و Mn^{2+} به طور 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 تثبیت شده نسبت به همتای آزاد 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 تثبیت شده به دلیل حضور نانوذره‌های کیتوزان است. حفظ پایداری آنزیم تثبیت شده در غلظت‌های بالای یون‌های فلزی بیانگر کارایی بالای روش تثبیت در حفظ پایداری و فعالیت آنزیم تثبیت شده 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 به دلیل دارا بودن گونه‌های متعدد آبی ظرفیت بالایی برای کشف و تولید فرآورده‌های زیستی مختلف و از جمله آنزیم‌ها دارند. در سال‌های اخیر پژوهش‌های گسترده‌ای روی آنزیم‌های موجود در جانداران آبی 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 خالص‌سازی شده از میگوی پنائوس و نانمی است که دارای کارایی کاتالیتیک بالا، ویژگی سوسترایی با دامنه وسیع و توانایی پروتئولیز بالا است [3]. آنزیم پروتئاز خالص شده از میگوی و نانمی با توجه به ویژگی‌های منحصر به فردش می‌تواند دارای کاربردهای فراوان در صنایعی مانند پزشکی، غذایی، دارویی، محیط زیست، دباغی، شوینده‌ها، صنایع ابریشم، عکاسی، داروسازی، تصفیه

پساب، پنی‌سازی، 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 به طور 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 فیزیوشیمیایی 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 طولانی مدت آنزیم‌ها به منظور استفاده در صنعت می‌شود، تثبیت آنزیمی است. در بیوتکنولوژی مدرن منظور از آنزیم‌های تثبیت شده این است که آنزیم‌ها را به طریقی پاییند و تحرک آنزیم را محدود سازیم که به طور 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 به طور پیوسته در یک راکتور آنزیمی از آن استفاده می‌شود. در بعضی موارد به جای آنزیم‌های تثبیت شده 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 تثبیت شده در بسیاری از فرآیندها موفقیت آمیز 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 سنتتیک مانند پلی‌آکریل‌امید، 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 داستیل‌شدن کیتین در شرایط قلیایی تولید می‌شود. این پلی‌ساکارید از اتصال بتا ۱ به ۴ واحدهای ۲-آمینو، ۲-دئوکسی -D- گلوکوپیرانوز تشکیل شده و به علت 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 غیرسمی بودن، کاربرد آن را به طور 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 به عنوان بستری مناسب بتوان گام موثری در جهت افزایش

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

فعال کردن نانوذره کیتوزان و اتصال آنزیم به بستر

ابتدا ۲ میلی گرم نانوذره کیتوزان در یک میلی لیتر آب مقطر حل و به مدت ۳۰ دقیقه سونیکیت شد. محلول نانوذره های کیتوزان دیسپرس شده به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۵۰۰۰ rpm سانتریفوژ، سپس محلول رویی دور ریخته و رسوب سه مرتبه با بافر فسفات (با pH برابر ۸) شست و شو داده شد.

حجمی از نانوذره های کیتوزان که مورد نیاز بود برداشته و ۱/۵ تا ۲ برابر حجم نانوذره به آن استوک آنزیمی ۷ میلی گرم بر میلی لیتر افزوده شد، سپس مخلوط آنزیم- نانوذره به مدت ۴ ساعت روی همزن مغناطیسی در دمای ۴°C قرار گرفت پس از ته نشین شدن نانوذره محلول رویی را برداشته و نانوذره چندین بار با بافر ۵۰ میلی مولار فسفات (با pH برابر ۷/۵) شست و شو و در یک میلی لیتر بافر فسفات حل شد. مایع رویی نیز به روش برادفورد با استوک اولیه ۷ میلی گرم بر میلی لیتر پنائوس وانامی پروتئاز مقایسه شد [33].

تعیین بازده فعالیت و بازده تثبیت

به منظور ارزیابی میزان فعالیت آنزیم تثبیت شده و همچنین کارایی روش تثبیت ابتدا ۱/۵ میلی لیتر استوک آنزیمی ۷ میلی گرم بر میلی لیتر پنائوس وانامی پروتئاز تهیه شد. در مرحله بعد ۷۵۰ میکرو لیتر آن را برداشته و در دمای ۴°C نگهداری، ۷۵۰ میکرو لیتر باقیمانده به نانوذره فعال اضافه شد. بعد از گذاشتن مخلوط آنزیم- نانوذره روی همزن مغناطیسی به مدت ۴ ساعت، مایع رویی آن را برداشته و به روش برادفورد و سنجش آنزیمی با استوک اولیه آنزیمی (۷۵۰ میکرو لیتر که در دمای ۴°C نگهداری شده بود) مقایسه شد. میزان آنزیم اتصال یافته (تثبیت شده) را می توان با کم کردن غلظت استوک اولیه آنزیمی از غلظت مایع رویی به دست آورد.

(۱-۱) 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 ۲-۲ و ۲-۳ کارایی روش تثبیت و فعالیت باقیمانده آنزیمی (فعالیت آنزیم بعد از تثبیت) محاسبه شد [10].

(۲-۲) مقدار آنزیم اضافه شده (میلی گرم)/مقدار آنزیم جذب نشده (میلی گرم) - مقدار آنزیم اضافه شده (میلی گرم) = Immobilized yield (%)

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

A: فعالیت استوک آنزیمی

B: فعالیت آنزیم تثبیت شده

تاثیر یون های فلزی بر فعالیت آنزیم پنائوس وانامی پروتئاز تثبیت شده و آزاد

در این تحقیق فعالیت نسبی آنزیم آزاد و تثبیت شده در حضور غلظت های مختلف (صفر الی ۱۰ میلی مولار) از نمک های کلرید سدیم، پتاسیم، کبالت، منگنز، جیوه، کادمیوم، نیکل، آهن، روی و مس در بافر ۵۰ میلی مولار تریس هیدروکلراید با pH برابر ۷/۵ اندازه گیری و فعالیت نسبی آنها محاسبه شد [34].

پایداری و حفظ فعالیت آنزیم پروتئاز خالص شده از میگوی پنائوس وانامی در برابر یون های فلزی برداشت.

امروزه فعالیت های وسیعی در خصوص تثبیت آنزیمی برای کارکردهای بهینه در حوزه های بیوتکنولوژی و صنعتی انجام شده است. این فعالیت ها شامل تثبیت آنزیم های مختلف روی سطوح متنوع کیتوزانی بوده، که نهایتاً پایداری آنزیم های تثبیت شده در شرایط مختلف محیطی، نسبت به حالت آزاد را به همراه داشته است [26-31]، از جمله این پژوهش ها می توان به تثبیت آنزیم های مختلف شامل آلفا- گلوکوزیداز روی کامپوزیت های مغناطیسی غنی شده با کیتوزان، برای غربالگری مهارکننده آنزیمی [26]، انولیناز روی کیتوزان برای هیدرولیز انولین [27]، پکتیناز روی نانوذره های مغناطیسی کیتوسان [28]، پاپایالاکاز روی کیتوزان [29]، بتا- گالاکتوزیداز روی هیدروژل های کیتوزان [30] و لپیز روی نانوذره های مغناطیسی کیتوسان [31] اشاره کرد. تمامی پژوهش های انجام شده در زمینه تثبیت آنزیمی روی سطوح مختلف زیستی، دلالت بر این مهم دارند که می توان از تکنیک تثبیت آنزیمی به عنوان یک روش نوین زیستی جایگزین به منظور کارکرد بهینه آنزیم در حوزه های متنوع در آینده استفاده کرد.

مواد و روش ها

آنزیم پروتئاز خالص شده از میگوی وانامی توسط خانم د/دشاهی و همکاران [3] و سایر مواد اولیه لازم (مرک؛ آلمان) تهیه شدند که همگی خلوص تحقیقاتی داشتند و به خالص سازی نیازی نبود.

سنجش آنزیمی پنائوس وانامی پروتئاز و تعیین غلظت پروتئین

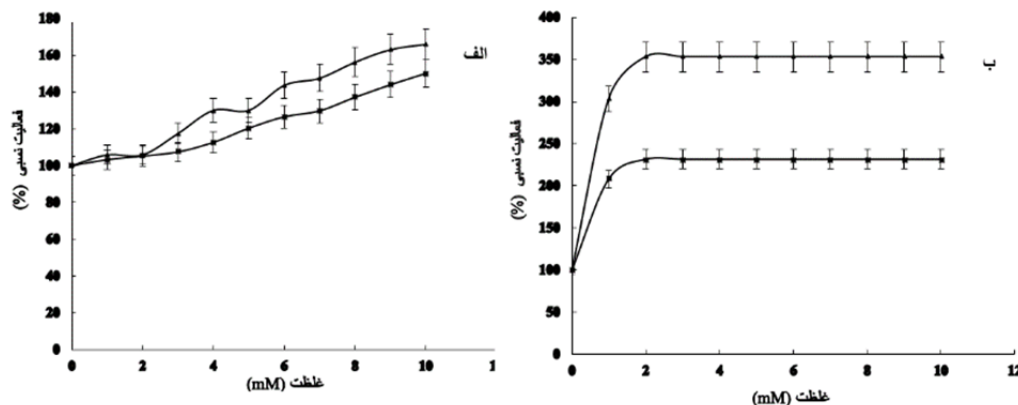
برای سنجش آنزیمی پنائوس وانامی پروتئاز از روش اندپوینت (End-point) استفاده شد بدین منظور ۲۵ میکرو لیتر از استوک آنزیمی ۷ میلی گرم بر میلی لیتر پنائوس وانامی پروتئاز به ۳۷۵ میکرو لیتر بافر ۵۰ میلی مولار فسفات با pH برابر ۷/۵ اضافه و سپس محلول بالا به نسبت ۱:۱ با کازئین ۱% مخلوط شد (۴۰۰ میکرو لیتر کازئین). پس از مخلوط کردن محلول آنزیمی با کازئین ۱% زمان های مختلف انکوباسیون از ۵ تا ۳۰ دقیقه امتحان شد. بهترین زمان که ۱۰ دقیقه بود برای آزمایش های بعدی استفاده شد، در این روش به همراه هر نمونه یک شاهد نیز به کار رفت. ترکیب شاهد دقیقاً مانند نمونه بود فقط به جای آنزیم بافر اضافه شد و برای صفر کردن اسپکتروفتومتر به کار رفت. پس از سپری شدن ۱۰ دقیقه به ترکیب بالا هم حجم آن یعنی ۸۰۰ میکرو لیتر تری کلرواستیک اسید ۱۰% اضافه و پس از گذشت نیم ساعت این ترکیب با دور ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و بعد از صفر کردن دستگاه جذب مایع رویی در طول موج ۲۸۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر خوانده شد. به منظور به دست آوردن فعالیت آنزیمی بر حسب واحد بین المللی آنزیمی (IU) منحنی استاندارد تیروزین رسم شد، ابتدا غلظت های متفاوت و متوالی از صفر تا ۱۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر تیروزین در محلول یک نرمال اسید کلریدریک تهیه شد (شش غلظت متفاوت)، برای رسم منحنی استاندارد تیروزین از اسید کلریدریک ۰/۰۰۶ نرمال به عنوان رفرنس استفاده شد. پس از ثبت جذب محلول های استاندارد تیروزین و نمونه های 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 یک میکرومول تیروزین را در یک دقیقه آزاد می نماید وقتی که تیروزین به عنوان استاندارد مورد استفاده قرار می گیرد [3].

سنجش آنزیم پنائوس وانامی پروتئاز تثبیت شده شبیه آنزیم آزاد

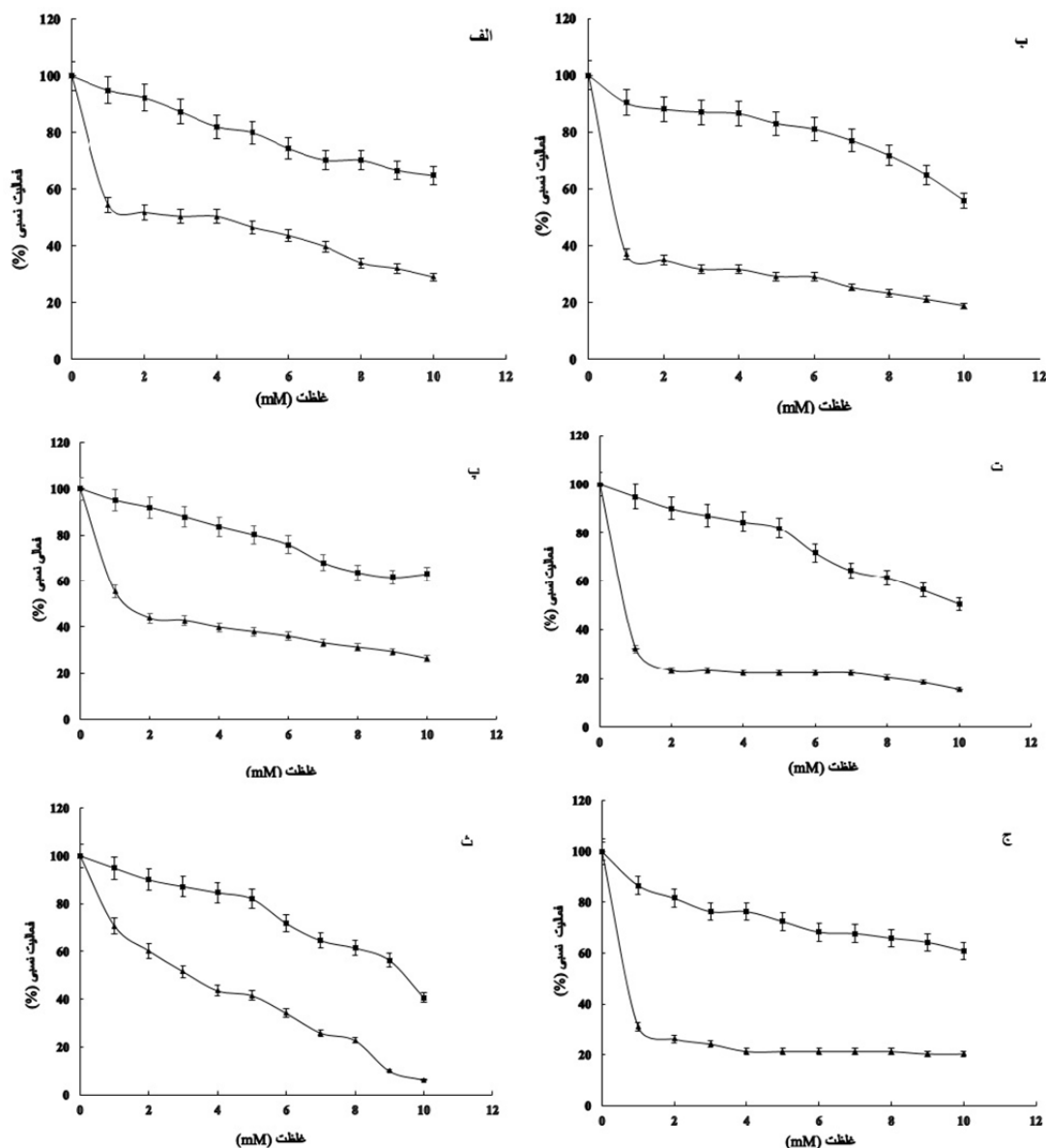
یافته‌ها

مهاری قوی در حضور یون‌های Co^{2+} ، Hg^{2+} ، Cd^{2+} ، Zn^{2+} ، Cu^{2+} و Ni^{2+} (نمودار ۲) و اثر مهاری ضعیفی در حضور یون‌های Na^{+} ، K^{+} مشاهده شد (نمودار ۳).

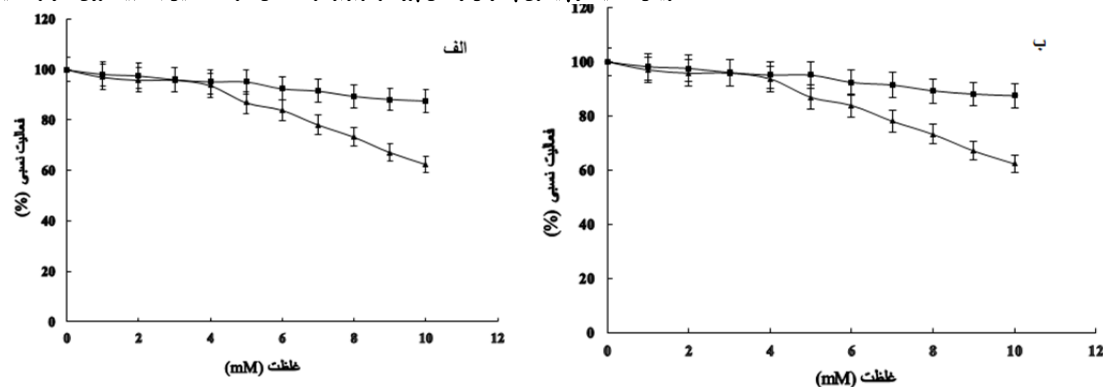
نتایج این تحقیق نشان داد یون‌های Fe^{2+} و Mn^{2+} به‌طور قابل توجهی فعالیت آنزیم را افزایش می‌دهند (نمودار ۱)، همچنین اثر



نمودار ۱) فعالیت آنزیم پئائوس وائامی پروتئاز آزاد (مثلت) و تثبیت‌شده (مربع) در برابر فلزات (فعال‌کننده قوی): الف) کلریدمنگنز ب) کلریدآهن



نمودار ۲) فعالیت آنزیم پئائوس وائامی پروتئاز آزاد (مثلت) و تثبیت‌شده (مربع) در برابر فلزات (مهارکننده قوی): الف) کلریدمس، ب) کلریدروی، پ) کلریدکادمیوم، ت) کلریدجیوه، ث) کلریدکبالت، ج) کلریدنیکل



نمودار ۳) فعالیت آنزیم پنائوس وانامی پروتئاز آزاد (مثلث) و تثبیت شده (مربع) در برابر فلزات (مهارکننده ضعیف): الف) کلرید پتاسیم، ب) کلرید سدیم

یون‌های K^+ و Na^+ فعالیت اولیه آنزیم به ترتیب در حدود ۶۲ و ۷۶٪ فعالیت اولیه بود در حالی که فرم تثبیت شده به ترتیب حدود ۸۸ و ۹۰٪ فعالیت اولیه اش (حدوداً ۲۵٪ بیشتر از حالت آزاد) را حفظ می‌کرد. بنابراین یون‌های تک‌ظرفیتی مانند Na^+ و K^+ تأثیر ناچیزی بر کاهش فعالیت آنزیم دارند و وقتی که غلظت این یون‌ها بین صفر تا ۱۰ میلی‌مولار باشد فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده تغییر چندانی نمی‌کند، در غلظت ۱۰ میلی‌مولار از یون‌های Cu^{2+} ، Zn^{2+} ، Cd^{2+} ، Hg^{2+} و Co^{2+} فعالیت اولیه آنزیم به ترتیب حدود ۶، ۱۵، ۱۸، ۲۰، ۲۶ و ۲۹٪ بود در حالی که فرم تثبیت شده به ترتیب حدود ۴۰، ۵۰، ۵۵، ۶۱، ۶۳، ۶۴٪ فعالیت اولیه اش (حدوداً ۳۵٪ بیشتر از حالت آزاد) را حفظ می‌کرد. چنین نتایجی در ماهیان کلیکای معمولی [39]، قزل‌آلای رنگین‌کمان [40]، ماهی نیل تیلایا [41] و میگوی پنائوس وانامی [3] نیز گزارش شد.

یون‌های فلزی می‌توانند جریان الکترون در یک سوبسترا یا آنزیم را تغییر دهند به طوری که به طور موثری واکنش کاتالیز شده 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 اسید آمینه به ویژه گروه کربوکسیلات اسید اسپارتیک و اسید گلوتمیک و حلقه اتم نیتروژن اسید آمینه هیستیدین انجام می‌شود. از دیگر زنجیره‌های جانبی برای اتصال یون‌های فلزی می‌توان به تربیتوفان (ایندول)، سیستئین (تیول)، میتونین (گوگرد)، سرین (هیدروکسیل)، ترئونین (هیدروکسیل)، تیروزین (فنول)، اسپاراژین و گلوتمین (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 تثبیت شده نسبت به همتای آزادش پایداری بالاتری نسبت به یون‌های فلزی از خود نشان می‌داد، حفظ پایداری آنزیم تثبیت شده در غلظت‌های بالا یون‌های فلزی بیانگر کارایی 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.

تاییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

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 به عنوان 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 تثبیت شده در حضور غلظت‌های مختلف (صفر الی ۱۰ میلی‌مولار) یون‌های فلزی اندازه‌گیری و فعالیت نسبی آنها محاسبه شد. آنزیم تثبیت شده 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 تثبیت شده به دلیل حضور نانوذره‌های کیتوزان است. همایی با تثبیت آنزیم مرگوبینسس آلکالین فسفاتاز روی نانولوله‌های طلا از آن برای تشخیص آلودگی محیط به فلزات سنگین استفاده کرد، بررسی‌ها حاکی از آن بود که حساسیت کمتر آنزیم تثبیت شده به یون‌های فلزات سنگین می‌تواند به دلیل 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 به دلیل پوششی از نانوذره‌های طلا روی آنزیم و نیز محدودیت انتشار باشد [33، 38].

در این پژوهش یون‌های Mn^{2+} و Fe^{2+} به طور قابل توجهی فعالیت آنزیم را افزایش دادند، به طوری که در غلظت ۱۰ میلی‌مولار فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده به بیش از دو برابر رسید، در غلظت ۱۰ میلی‌مولار از یون‌های Mn^{2+} و Fe^{2+} فعالیت اولیه آنزیم به ترتیب در حدود ۱۶۶ و ۳۵۲٪ مقدار اولیه بود در حالی که فرم تثبیت شده به ترتیب حدود ۱۵۰ و ۲۳۱٪ فعالیت اولیه اش (حدوداً دو برابر کمتر از حالت آزاد) بود. یافته‌های مربوط به اثر منگنز و آهن بر فعالیت آنزیم پروتئاز با مطالعات انجام شده 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+} و Co^{2+} و Ni^{2+} اثر مهاری ضعیفی در حضور یون‌های Na^+ و K^+ مشاهده شد. در غلظت ۱۰ میلی‌مولار از

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 *Anthracoophyllum 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

سهم نویسندگان: فزیه شجعی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی (۲۵٪)؛ احمد همایی (نویسنده دوم)، روش‌شناسی/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*

- 38- Homaei A. Purification and biochemical properties of highly efficient alkaline phosphatase from *Fenneropenaeus merguensis* 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 EJJ, 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 merguensis* 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.