

تثبیت آنزیم اینولیناز روی نانوذرات مغناطیسی پتیدی و پروتئینی جهت تولید شربت پر فروکتوز

هما ترابی زاده^{۱*}، محدثه میکانی^۲، آسیه محمودی^۳

۱- دکتری علوم و صنایع غذایی- گرایش بیوتکنولوژی، استادیار گروه صنایع غذایی و تبدیلی، پژوهشکده فناوری‌های شیمیایی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران

۲- کارشناسی ارشد، مهندسی کشاورزی- گرایش علوم و صنایع غذایی، پژوهشکده کشاورزی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران

۳- کارشناسی ارشد، مهندسی کشاورزی- گرایش علوم و صنایع غذایی، پژوهشکده کشاورزی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران

(تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۱/۲۹)

چکیده

آنزیم اینولیناز قادر به تولید شربت پرفروکتوز در یک فرایند تک مرحله‌ای آنزیمی از اینولین می‌باشد. در این پژوهش در ابتدا نانوذرات مغناطیسی به روش هم رسوبی تهیه گردید. پس از آن در مرحله دوم، نانوذرات ایزوله پروتئین سویا به همراه سرم آلبومین گاوی (نانوذرات پروتئینی) و نانوپتیدهای حاصل از هیدرولیز آنزیمی گلوتن گندم با آنزیم‌های اندوپپتیداز، به روش حلال زدایی تهیه و سپس جهت اصلاح سطح و پایدار سازی نانوذرات مغناطیسی، فرآیند پوشش دهی سطح انجام گرفت. در مرحله سوم، فرآیند تثبیت آنزیم بر روی سطوح بستر مغناطیسی با استفاده از گلوترآلدهید صورت گرفت. در این تحقیق به منظور مطالعه شکل و ساختار، اندازه و ویژگی‌های عملکردی نانوذرات مغناطیسی و پروتئینی و فرآیند تثبیت آنزیم در کلیه مراحل تهیه، روش‌های تشخیص میکروسکپ الکترونی روبشی (SEM^۱) و تفرق دینامیک نور (DLS^۲) به کار گرفته شد. پس از تثبیت آنزیم، ویژگی‌های عملکردی آنزیم تثبیت شده بررسی و با ویژگی‌های آنزیم آزاد مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان داد که، مقاومت حرارتی آنزیم، همچنین پایداری در pH اسیدی بهبود یافته است. میزان فعالیت آنزیم، تعداد سیکل‌های استفاده مجدد از آنزیم، همچنین پارامترهای سینتیکی (V_{max} , K_m , $t_{1/2}$) آنزیم تثبیت شده در مقایسه با آنزیم آزاد به صورتی تغییر یافته بود که نشان دهنده افزایش پایداری و بهبود عملکرد آنزیم پس از تثبیت بود.

کلید واژگان: تثبیت اینولیناز، نانوپتیدها، نانوذرات مغناطیسی، ایزوله پروتئین سویا، هیدرولیزات گلوتن گندم.

* مسئول مکاتبات: htoraby@alumni.ut.ac.ir

1. Scanning electron microscope
2. Dynamic light scattering

۱- مقدمه

آنزیم‌های اینولیناز شامل آگرو اینولیناز (EC 3.2.1.80) و اندواینولیناز (EC 3.2.1.7) یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های صنعتی هستند که توسط تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌ها شامل کپک‌ها، مخمرها و باکتری‌ها تولید می‌گردند. اینولینازها بتا- فروکتان فروکتانو هیدرولاز بوده و اینولین را هیدرولیز کرده و در پایان واکنش فروکتوز و فروکتواولیگوساکارید تولید می‌کنند که هر دو فرآورده محصولی مهم برای مصرف در صنایع غذایی و دارویی به شمار می‌روند [۱]. استفاده از آنزیم اینولیناز این امکان را فراهم کرده است تا بتوان شربت خالص فروکتوز را به صورت یک فرآیند تک مرحله ای آنزیمی از اینولین به جای استفاده از روش آنزیمی چند مرحله ای از نشاسته تولید نمود [۲]. یکی از مهمترین روش‌های افزایش مقاومت حرارتی آنزیم اینولیناز، تثبیت از طریق ایجاد پیوندهای کووالانسی با ماده حامل (بستر) می‌باشد [۳]. علاوه بر این دلایل متعدد دیگری برای تثبیت آنزیم‌ها وجود دارد که از جمله می‌توان به سهولت در بکارگیری و استفاده مجدد از آنزیم در فرآیندها، جداسازی آسان تر آنزیم از محصول تولید شده و کاهش غلظت پروتئین در فرآورده نهایی، قابلیت بکارگیری آنزیم تثبیت شده در بیوراکتورهای با سیستم مداوم، پایداری به دناوراسیون حرارتی، حلال‌های آلی، و اتولیز اشاره نمود. در تثبیت آنزیم به روش ایجاد پیوند کووالانسی، به دلیل وجود پیوندهای قوی ایجاد شده از رها شدن آنزیم در محیط واکنش جلوگیری می‌گردد [۴]. امروزه تثبیت آنزیم‌ها بر روی نانوذرات مغناطیسی به علت امکان جمع آوری ساده، سریع و کم هزینه آنزیم از محیط واکنش با استفاده از میدان مغناطیسی، ظرفیت بالای بارگذاری آنزیم به علت سطح ویژه بزرگ و عدم محدودیت نفوذ به محلول‌ها بسیار مورد توجه قرار گرفته است [۵]. روش اصلاح سطح نانوذرات مغناطیسی (Fe₃O₄) با گروه‌های عاملی جهت تثبیت و اتصال بهتر آنزیم به سطح حامل عامل دار شده موجب افزایش پایداری نانوذرات در برابر اکسیداسیون و محیط‌های اسیدی و کاهش تجمع و اتصال نانوذرات به یکدیگر گردیده است [۶]. تحقیقات متعددی بر روی تثبیت آنزیم اینولیناز در دنیا انجام گرفته است. از جمله پژوهش‌های انجام شده می‌توان به تثبیت آنزیم اینولیناز روی بستر کیتوزان [۶] و تثبیت روی

گرانول‌های آلژینات-کیتوزان [۱] اشاره نمود. در تحقیق حاضر، از دو نوع حامل پروتئینی (ایزوله پروتئین سویا غنی شده با سرم آلبومین گاوی و پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آنزیمی گلوتن گندم) به صورت مقایسه ای جهت تثبیت آنزیم بر روی سطوح بستر مغناطیسی، با ایجاد اتصالات کووالانس بین ریشه‌های اسپیلن-آمینو لیزین سطحی در مولکول آنزیم و ریشه‌های لیزین و گروه‌های NH₂ موجود در سطوح پروتئینی بستر با استفاده از گلوترآلدهید استفاده گردیده است.

۲- مواد و روش‌ها

آنزیم اینولیناز ساخت شرکت سیگما آلد ریچ، اینولین حاصل از ریشه کاسنی و سرم آلبومین گاوی ساخت شرکت فلوکا استفاده شدند. هیدرولیزات گلوتهی گندم با استفاده از آنزیم‌های اندوپپتیداز آلکالاز و نوتراز (شرکت Novozyme) با جرم مولکولی متوسط ۳۵-۴۵ کیلو دالتن تولید گردید. سایر مواد از نوع آزمایشگاهی بوده و از نمایندگی‌های شرکت مرک آلمان در ایران خریداری شده اند. دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Perkin Elmer, Lambda UV/VIS همچنین دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی FE-SEM مدل Tescan-Mira II ساخت آمریکا استفاده گردید.

۲-۱- سنتز نانوذرات مغناطیسی

یکی از روش‌های سنتز شیمیایی نانوذرات مغناطیسی، روش هم-رسوبی می‌باشد. هم‌رسوبی فرآیندی است که در آن یک ماده محلول در محیط به یک ساختار نامحلول تبدیل می‌شود. به طور عمومی، تشکیل محصولات کم محلول از فاز آبی اساس این روش است. روش کار ساده، زمان واکنش کوتاه و شرایط واکنش مطلوب است. همچنین می‌توان در حجم کم واکنش مقدار زیادی نانوذره تهیه کرد. ابتدا دو نمک آهن Fe²⁺ و Fe³⁺ با نسبت استوکیومتری ۱ به ۲ وزن کرده و سپس نمک‌های FeCl₃.6H₂O و FeCl₂.4H₂O را به صورت جداگانه در آب دیونیزه حل می‌نماییم. پس از آن، تحت شرایط گاز نیتروژن، محلول هیدروکسید سدیم را به صورت قطره قطره به آن اضافه نموده تا رنگ محلول به رنگ کاملاً سیاه درآید. نانوذرات مغناطیسی آهن تشکیل شده را سه بار با آب دیونیزه شستشو داده

۷۰ میلی لیتر اتانول به صورت قطره قطره به آن اضافه شد. ۵ w/v / ۰.۰٪ توئین ۸۰ به عنوان پایدارکننده سطحی به محلول اضافه گردید. با استفاده از تبخیرکننده چرخشی تحت خلا، اتانول موجود در محیط تبخیر و به همان میزان اتانول خارج شده، آب جایگزین آن شد. محلول به مدت ۵ دقیقه تحت امواج اولتراسونیک با شدت ۴۰۰ هرتز قرار گرفت. در نهایت ۱۹۷ μl گلوترآلدئید به ازای ۱g گلوتن به محلول نهایی به صورت قطره اضافه شد. میزان گلوترآلدئید با توجه به تعداد لیزین موجود در ساختار مولکولی هیدرولیزات گلوتن با استفاده از روش بیوانفورماتیک توسط نرم افزار Getarea و تعیین تعداد کل ریشه-های اسیدآمینه لیزین قابل دسترس در سطح مولکول با تخمین Accessible surface area توسط نرم افزار ذکر شده مشخص گردید. سپس به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق بر روی همزن مگنتیت قرار گرفت [۱۱].

در نهایت، اندازه ذرات و پتانسیل زتای نانوذرات ایزوله پروتئین سویا به همراه سرم آلبومین گاوی و نیز نانوذرات هیدرولیزات گلوتنی توسط روش پراکندگی لیزر به صورت دینامیکی در طول موج ۶۳۷ نانومتر در زاویه پراکنش ۹۰° با استفاده از دستگاه Laser Particle Count محاسبه شد. شکل نانوذرات پروتئینی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مورد بررسی قرار گرفت.

۲-۴- عامل دار کردن نانوذرات مغناطیسی با

استفاده از نانوذرات پروتئینی و نانوذرات پیتیدی

به منظور عامل دار کردن نانوذرات مغناطیسی با نانوذرات پروتئینی ۰/۱ گرم نانوذرات مغناطیسی را وزن، سپس ۰/۰۶ گرم نانوذرات ایزوله پروتئین سویا به همراه سرم آلبومین گاوی مخلوط و در ۵۰ میلی لیتر بافر فسفات حل کرده و به مدت ۱۰ دقیقه تحت تاثیر امواج اولتراسونیک قرار داده شد و به مدت ۲۴ ساعت تحت هم زدن ملایم در دمای اتاق قرار گرفت تا پیوند فیزیکی بین نانوذرات مغناطیسی آهن و نانوذرات پروتئینی برقرار شود. محلول نهایی در سانتریفیوژ با سرعت ۱۳۰۰۰ هزار دور در دقیقه جهت جداسازی نانوذراتی که هیچ گونه پیوندی نداشته اند قرار گرفته و با بافر فسفات شستشو داده شد. جهت عامل دار کردن

و سپس در آن با دمای ۷۲ درجه سانتی گراد خشک می کنیم [۷،۸].

۲-۲- سنتز نانوذرات پروتئینی

جهت افزایش ریشه های اپسیلن-آمینو لیزین برای تثبیت بهتر آنزیم از نانوذرات سرم آلبومین گاوی بهره گرفته شد. بدین منظور مقدار ۰/۲ گرم از ایزوله پروتئین سویای چربی زدایی شده و ۰/۱ گرم سرم آلبومین گاوی را در ۱۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه حل گردید و برای افزایش میزان حلالیت ایزوله پروتئین سویا در آب با استفاده از هیدروکسید سدیم (NaOH) یک مولار و ۰/۱ مولار pH آن روی ۹/۵ تنظیم شد. سپس ۲۰ میلی لیتر از آن را برداشته و ۸۰ میلی لیتر استن به صورت قطره قطره به آن اضافه گردید. بعد از افزودن استن، ۴۷۰ میکرو لیتر توئین ۸۰ به عنوان سورفاکتانت به محلول اضافه شد. با استفاده از تبخیرکننده چرخشی تحت خلا استن موجود در محیط تبخیر گردید و به همان میزان استن خارج شده، آب دیونیزه جایگزین آن شد. محلول به مدت ۱۰ دقیقه تحت امواج اولتراسونیک با قدرت ۴۰۰ هرتز قرار گرفت. حدود ۳۷۰ میکرو لیتر گلوترآلدئید به محلول نهایی به صورت قطره قطره اضافه شد و به مدت ۲ ساعت بر روی همزن مگنتیک قرار گرفت. میزان آن با توجه به تعداد لیزین موجود در ساختار مولکولی ایزوله پروتئین سویا و سرم آلبومین گاوی با استفاده از روش بیوانفورماتیک توسط نرم افزار Getarea و تعیین تعداد کل ریشه های اسید آمینه لیزین قابل دسترس در سطح مولکول با تخمین Accessible surface area توسط نرم افزار ذکر شده مشخص گردیده است. در این واکنش هر مول گلوترآلدئید با دو مول لیزین واکنش می دهد [۹،۱۰].

۲-۳- سنتز نانوذرات پیتیدی

در ابتدا با استفاده از سوسپانسیون گلوتن در آب و افزودن آنزیم های اندوپپتیداز آلکالاز و نوتراز در pH حدود ۶-۸/۵ و دمای ۶۰ درجه سانتی گراد، هیدرولیزات گلوتنی با غلظت ۰/۱ w/v / و جرم مولکولی ۴۵-۳۵ دالتن تهیه شد. در مرحله بعدی برای افزایش میزان حلالیت هیدرولیزات گلوتنی در آب با استفاده از هیدروکسید سدیم (NaOH) یک مولار و ۰/۱ مولار pH آن روی ۱۰ تنظیم گردید. سپس ۳۰ میلی لیتر از محلول را برداشته و

۳- نتیجه گیری

اندازه ذرات و پتانسیل زتای نمونه‌ها با استفاده از آنالیز DLS تعیین شد. این روش غیرمخرب و سریع برای تعیین اندازه ذرات در محدوده‌ی چند نانومتر تا میکرون به کار می‌رود. این روش به برهم‌کنش نور با ذره بستگی دارد. نور پراکنده شده به وسیله‌ی نانوذرات موجود در سوسپانسیون با زمان تغییر می‌کند که می‌تواند به قطر ذره ارتباط داده شود. روش تفرق دینامیک نور، که طیف سنجی ارتباط فوتونی نیز نامیده می‌شود، برای اندازه‌گیری اندازه ذرات در محیط مایع مورد استفاده قرار می‌گیرد. DLS به‌طور گسترده‌ای برای تعیین اندازه‌ی نانوذرات براونی در سوسپانسیون کلونیدی در دامنه‌ی نانو و میکرون کاربرد دارد. متوسط اندازه ذرات ایزوله پروتئین سویا به همراه سرم آلبومین گاوی و نانوذرات هیدرولیزات گلوتن و پتانسیل زتای نانوذرات با استفاده از این روش به دست آمد که در جدول (۱) گزارش شده‌اند. با توجه به میزان پتانسیل زتای نانوذرات پروتئینی، مشخص شد که محصول پایدار با لایی نسبت به تجمع و آگلومره شدن داشت. مقدار پتانسیل زتای نانوساختار تهیه شده از هیدرولیزات گلوتن نیز نشان از پایداری نسبی محصول نسبت به تجمع و آگلومره شدن داشت.

نانوذرات مغناطیسی با نانوذرات پپتیدی ۰/۰۵ گرم نانو ساختار پروتئینی تهیه شده از هیدرولیزات گلوتن و ۰/۰۶ گرم نانوذرات مگنتیت (Fe_3O_4) را مخلوط و در ۲۵ میلی لیتر بافر فسفات حل کرده و به مدت ۱۰ دقیقه تحت تاثیر امواج اولتراسونیک قرار داده شد و جهت جذب سطحی نانوساختار پروتئینی بر روی نانوذرات مغناطیسی، محلول حاصل به مدت ۲۴ ساعت تحت همزدن ملایم در دمای اتاق قرار گرفت [۱۲].

۲-۵- تثبیت آنزیم اینولیناز

نانوذرات مغناطیسی عامل دار شده در ۱۰۰ میلی مول بافر استات ($pH, 5-5/5$) به همراه ۳۰۰ میکرولیتر گلوترآلدئید به مدت ۳۰ دقیقه تحت امواج اولتراسونیک قرار داده شد. سپس ۴ میلی لیتر از آنزیم اینولیناز به مخلوط اضافه گردید و با سرعت ملایم (300 rpm) در دمای یخچال (۴-۳ درجه سانتیگراد) هم زده شد. پس از آن مخلوط در سه مرحله توسط بافر فسفات با pH برابر ۷ شستشو داده شد. آنزیم تثبیت شده به روش کووالانسی تا زمان استفاده در فریزر با دمای ۱۸- درجه سانتیگراد نگهداری شد [۱۳، ۱۴].

کلیه آزمون‌ها با حداقل تعداد ۳ تکرار انجام شده و پس از تعیین میانگین و میزان انحراف از معیار در هر آزمون، نمودارهای مربوط به نتایج همراه با Error bar رسم و میزان معنی دار بودن تفاوت‌های موجود در نتایج حاصله دیده شد.

Table 1 Protein and peptide NPs size obtained by DLS technique accomplished by zeta potential

Zeta-potential (mV)	Particle Size (nm)	
-36	85	Protein nanoparticles
-27	150	Peptide nanoparticles

بر پوشش نانوذرات مغناطیسی با نانوذرات پروتئینی و پپتیدی بود. با استفاده از تصویر میکروسکوپ الکترونی، تثبیت آنزیم بر روی نانوذرات مغناطیسی عامل‌دار شده نشان داده شد. بر طبق این تصاویر آنزیم به صورت ذراتی شفاف بر روی نانوذرات مغناطیسی تثبیت شده است.

بررسی تصویر نانوذرات میکروسکوپ الکترونی نشان از تشکیل ذراتی کروی و یکنواخت در ابعاد نانو داشت و نتایج حاصل از DLS را تایید کرد. با استفاده از تصویر میکروسکوپ الکترونی روشی نانوذرات مغناطیسی عامل‌دار شده مورد بررسی قرار گرفت. اندازه نانوذرات مغناطیسی عامل‌دار شده نسبت به نانوذرات مغناطیسی قبل از پوشش‌دهی افزایش پیدا کرد که اثباتی

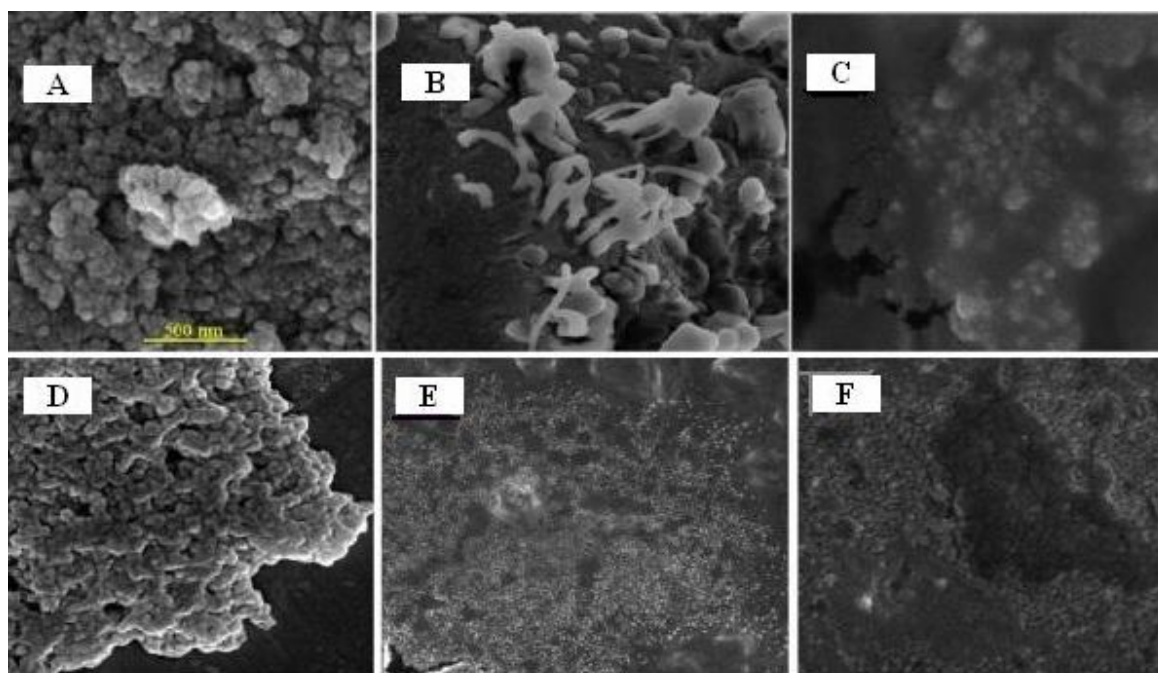


Fig 1 FE-SEM image of the nanomagnetite and immobilized inulinase on protein and peptide nanoparticles. **(A)** Magnetic (Fe_3O_4) nanoparticles, **(B)** Nanopeptides resulted by gluten hydrolysates, **(C)** Soy protein isolate (SPI) nanoparticles, **(D)** Soy protein isolate and Bovine Serum Albumin (SPI + BSA) nanoparticles, **(E & F)** Immobilized enzyme on the NPs.

SEM و DLS مورد بررسی قرار گرفتند. متوسط سایز ذرات ۲۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. از نظر شکل شناسی هم اشکالی کروی و یکنواخت داشتند. پس از اطمینان از عامل دار شدن نانوذرات مغناطیسی و تثبیت آنزیم، آنالیزهای مربوط به آنزیم از نظر فعالیت، میزان پایداری به دما و pH، نیمه عمر آنزیم و پارامترهای سینتیکی آنزیم آزاد و تثبیت شده اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از بررسی‌های انجام شده بر روی آنزیم تثبیت شده روی نانوذرات مغناطیسی عامل‌دار شده با نانوذرات پروتئینی (ایزوله پروتئین سویا و سرم آلبومین گاوی و هیدرولیزات گلوتنی) حاکی از حفظ فعالیت آنزیم تثبیت شده در مقایسه با آنزیم آزاد بوده بطوریکه آنزیم تثبیت شده با روند افزایشی کندتر اما طولانی‌تر نسبت به آنزیم آزاد فعالیت خود را حفظ کرده است. به موازات آن، مقاومت آنزیم تثبیت شده نسبت به شرایط محیطی از جمله دما و pH به طور چشمگیری بهبود پیدا کرده است.

همانطور که در مقدمه گفته شد، تثبیت آنزیم از نظر حفظ ساختار و فعالیت طبیعی آنزیم، قابلیت استفاده مجدد از آن در فرآیند و مصرف انرژی، سوخت، آب کمتر و کاهش حجم پساب و فاضلاب، در نتیجه بهره‌وری بیشتر در فرآیند تولید و افزایش راندمان و تولید فرآورده نهایی دارای اهمیت زیادی می‌باشد. در این تحقیق، حامل به کارگرفته شده در تثبیت هیچ‌گونه سمیتی نداشته و امکان به‌کارگیری آن در صنعت غذا وجود دارد. حامل‌های پروتئینی در ابعاد نانو تهیه گردیدند. کاهش اندازه‌ی مواد حامل آنزیم سبب بهبود بازده و کارایی آنزیم تثبیت شده می‌گردد چراکه در حالت اتصال به سطح، ذراتی با اندازه‌ی کوچکتر می‌توانند سطح بزرگتری برای اتصال آنزیم‌ها فراهم کنند. در نتیجه بارگذاری آنزیم در واحد سطح به حجم ذرات افزایش یافته و انتقال جرم با سهولت و کارایی بیشتری بین مولکول آنزیم و سوبسترا صورت می‌گیرد. نانوذرات مغناطیسی توسط آنالیز

می‌یابد. نتایج حاصل از بررسی‌های انجام شده بر روی آنزیم تثبیت شده روی نانوذرات مغناطیسی عامل‌دار شده با نانوذرات پپتیدی هیدرولیزات گلوآنی نیز نشان از افزایش مقاومت آن نسبت به شرایط محیطی از جمله دما و pH داشت. آنزیم تثبیت شده قادر به تحمل دماهای بالا بوده و بیش از ۵۰٪ فعالیت خود را در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد حفظ می‌کند. نتایج نشان داد که بهینه pH آنزیم تثبیت شده نسبت به آنزیم آزاد به میزان ۰/۳ واحد کاهش یافته و نشان از مقاومت نسبی بالاتر آنزیم تثبیت شده به شرایط اسیدی است. نتایج بررسی پایداری حرارتی آنزیم اینولیناز قبل و پس از تثبیت و تعیین میزان باقیمانده فعالیت آنزیم در دماهای ۳۵، ۴۵، ۵۵، ۶۵ و ۷۵ درجه سانتیگراد در هر دو بستر نشان داد که بهینه دمای آنزیم تثبیت شده نسبت به بهینه دمای آنزیم آزاد ۵ درجه سانتیگراد افزایش یافته است که می‌توان این تغییر را به افزایش استحکام ساختار آنزیم طی تثبیت با پیوندهای کووالانسی ایجاد شده و محافظت از ساختار آنزیم در برابر حرارت نسبت داد.

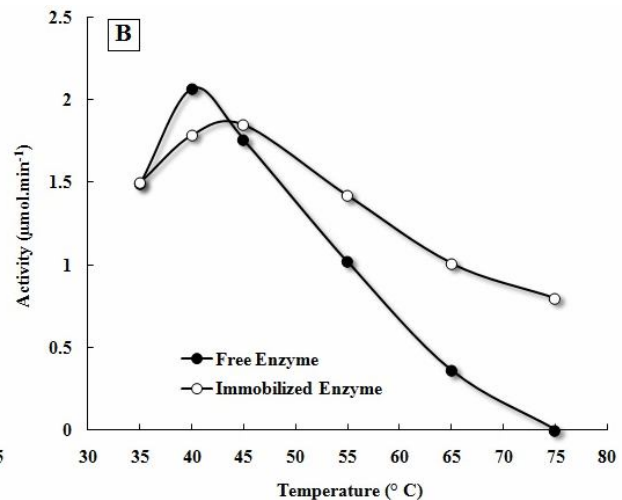
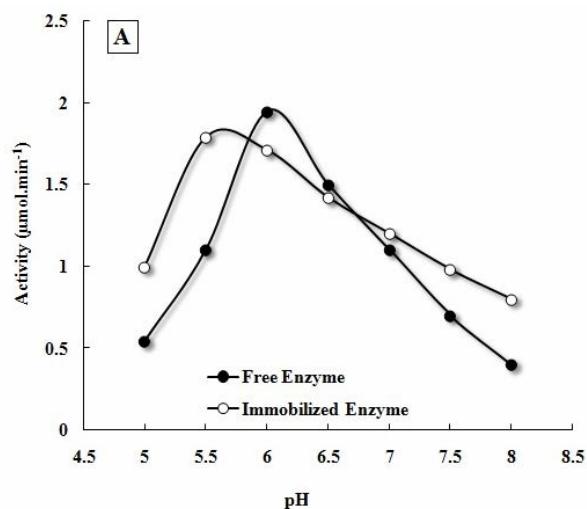


Fig 3 Comparison between optimum pH and temperature of free enzyme and immobilized inulinase

کرده که میزان این کاهش در رابطه با آنزیم تثبیت شده بر روی نانوذرات مغناطیسی پروتئینی بالاتر از نانوذرات مغناطیسی پپتیدی بوده است.

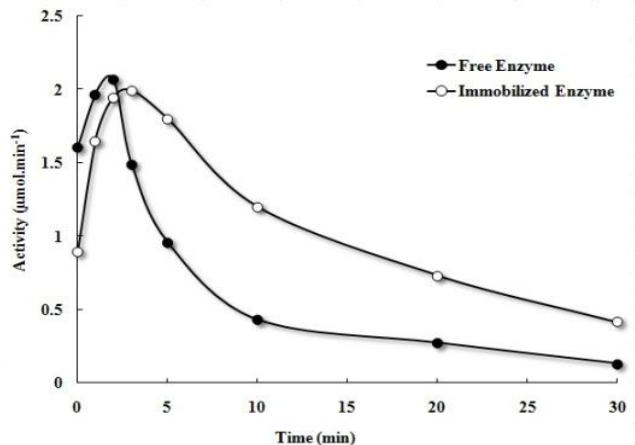


Fig 2 Comparison between Free enzyme and immobilized inulinase on protein and peptides magnetic nanoparticles

مقدار بهینه pH در آنزیم تثبیت شده نسبت به آنزیم آزاد، ۰/۵ واحد به سمت محیط اسیدی گرایش داشته است. هر دو آنزیم آزاد و تثبیت شده در محدوده pH برابر با ۸-۵/۵ پایدار می‌باشند. به طور کلی پایداری آنزیم پس از تثبیت، نسبت به pH افزایش

در جدول ۲ میزان ثابت غیر فعال‌سازی آنزیم (k_{in}) که میزان ثابت دنا‌توره شدن یا کاهش فعالیت آنزیم را نشان می‌دهد در آنزیم آزاد و آنزیم تثبیت شده بر روی دو بستر نانوذرات مغناطیسی پپتیدی و پروتئینی نشان داده شده است. مطابق نتایج به دست آمده ثابت غیر فعال‌سازی آنزیم تثبیت شده نسبت به آنزیم آزاد کاهش پیدا

Table 2 Inactivation rate constant of free and immobilized enzymes at 55 and 65°C

65°C	55°C	
$k_{in} (\times 10^{-3} \text{ min}^{-1})$	$k_{in} (\times 10^{-3} \text{ min}^{-1})$	
10.9	3.8	Free enzyme
1.7	1.4	Immobilized enzyme on protein magnetic nanoparticles
8.5	3.4	Immobilized enzyme on peptide magnetic nanoparticles

باقیمانده فعالیت آنزیم نسبت به زمان رسم گردید. میزان محاسبه شده نیمه عمر آنزیم آزاد و تثبیت شده بر روی دو بستر در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد در جدول ۳ گزارش شده است.

یکی از پارامترهای مهم و مرسوم در تعیین میزان پایداری آنزیم، نیمه عمر آنزیم ($t_{1/2}$) است. نیمه عمر آنزیم برابر است با مدت زمانی که آنزیم نیمی از فعالیت اولیه خود را از دست داده است. برای محاسبه نیمه عمر آنزیم، نمودار لگاریتم طبیعی درصد

Table 3 Half- life of the free and immobilized enzyme on the magnetic peptide and protein nanoparticles at 55 and 65°C

65°C	55°C	
$t_{1/2} (\text{min})$	$t_{1/2} (\text{min})$	
63	182	Free enzyme
407	495	Immobilized enzyme on protein magnetic nanoparticles
81.5	203.8	Immobilized enzyme on peptide magnetic nanoparticles

مقدار انرژی بیشتری نسبت به آنزیم آزاد مورد نیاز است و نشان دهنده افزایش پایداری آنزیم می‌باشد. این فرض را افزایش مقادیر آنتالپی غیر فعال شدن آنزیم (ΔH) تایید کرد زیرا مقادیر بالاتری از انرژی مورد نیاز است تا فرایند دناتورده شدن آنزیم تثبیت شده انجام پذیرد. در جدول ۴ نتایج مربوط به انرژی غیرفعال‌سازی آنزیم آزاد و تثبیت شده بر روی دو بستر و همچنین میزان آنتالپی غیرفعال شدن آنزیم گزارش شده است.

مطابق نتایج به دست آمده میزان نیمه عمر آنزیم تثبیت شده با نانوذرات مغناطیسی ایزوله پروتئین سویا در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد نسبت به آنزیم آزاد حدود ۶/۵ برابر افزایش داشته است. میزان افزایش نیمه عمر آنزیم تثبیت شده بر روی نانوذرات مغناطیسی هیدرولیزات گلوتن در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد نسبت به آنزیم آزاد ۱/۵ برابر بوده است.

علاوه بر این افزایش مقادیر $E_{a(d)}$ یا انرژی غیرفعال شدن آنزیم پس از تثبیت نشان داد که برای غیرفعال شدن آنزیم تثبیت شده

Table 4. Thermodynamic parameters of free and immobilized enzyme on the magnetic peptide and protein nanoparticles.

$\Delta H (\text{kJ mol}^{-1})$	$E_{a(d)} (\text{kJ mol}^{-1})$	
9.88	12.6	Free enzyme
15.11	17.9	Immobilized enzyme on protein magnetic nanoparticles
12.82	15.63	Immobilized enzyme on peptide magnetic nanoparticles

زمان و میزان آنزیم مورد استفاده گردیده و فرایند را از نظر اقتصادی مقرون به صرفه می‌سازد. مقایسه پارامترهای سینتیکی (V_{max} و K_m) آنزیم تثبیت شده با نانوذرات مغناطیسی ایزوله پروتئین سویا و نانوپپتیدهای مغناطیسی در مقایسه با آنزیم آزاد نشان داد که قابلیت دسترسی آنزیم به جایگاه فعال در هر دو روش تثبیت افزایش داشته است. در جدول ۵ مقادیر پارامترهای سینتیکی در حالت آزاد و تثبیت شده بر روی هر دو بستر جهت مقایسه گزارش شده است.

میزان انرژی غیرفعال‌سازی آنزیم و آنتالپی غیرفعال شدن آنزیم در حالت تثبیت شده نسبت به حالت آزاد افزایش یافته و میزان این افزایش در آنزیم تثبیت شده بر روی نانوذرات مغناطیسی پروتئینی تا حدودی بالاتر از آنزیم تثبیت شده بر روی نانوذرات مغناطیسی پپتیدی بوده است. از دیگر نتیجه‌های مثبت این تحقیق استفاده مکرر آنزیم در فرایند و حفظ فعالیت آن نسبت به فعالیت اولیه خود می‌باشد. آنزیم تثبیت شده بر روی هر دو بستر پس از ۱۲ سیکل پی در پی بیش از ۶۰٪ فعالیت خود را حفظ نموده است. قابلیت استفاده مجدد آنزیم تثبیت شده منجر به صرفه جویی در

Table 5. Kinetic parameters of free and immobilized enzyme on the magnetic peptide and protein nanoparticles

K_m (mg ml ⁻¹)	V_{max} (μmol min ⁻¹)	enzyme
2.72	0.83	Free enzyme
2.03	0.67	Immobilized enzyme on protein magnetic nanoparticles
1.25	0.64	Immobilized enzyme on peptide magnetic nanoparticles

۴- منابع

- [1] Vandamme, E.J., Missau, J., Scheid, A.J., Foletto, E.L., Jahn, S.L., Mazutti, M.A., Kuhn, R.C. (2014) Immobilization of commercial inulinase on alginate-chitosan beads. *Sustainable Chemical Processes*, 2(1):13.
- [2] Magdy, M., Elnashar, M., Enas, N., Danial, E.G. (2009) Novel Carrier of Grafted Alginate for Covalent Immobilization of Inulinase. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48:9781-9785.
- [3] Sheldon, R.A.S., Janssen, M.H.A. (2007) Use of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) for performing biotransformations. *Chemistry Today*, 25: 62-67.
- [4] Hernandez, M., Kispert, E., Ramirez, E., Rosales, D., Ulloa, J., Ferrara, T. (2011) Electron paramagnetic resonance analyses of biotransformation reactions with cytochrome P-450 immobilized on mesoporous molecular sieves. *Journal of Biotechnology Letters*, 29:919-924.

کاهش K_m پس از تثبیت آنزیم نشان می‌دهد که غلظت کمتر سوبسترا نسبت به آنزیم آزاد جهت رسیدن به ۱/۲ سرعت بیشینه مورد نیاز است که این امر نشان دهنده قابلیت بالاتر دسترسی سوبسترا به سایت فعال آنزیم تثبیت شده می‌باشد. میزان کاهش K_m در مورد آنزیم تثبیت شده بر روی نانوذرات مغناطیسی پپتیدی نسبت به نانوذرات مغناطیسی پروتئینی بالاتر می‌باشد. با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان ادعا نمود که تثبیت آنزیم اینولیناز با استفاده از اتصالات کووالانسی روشی کارآمد برای تثبیت آنزیم آزاد است. دارا بودن قابلیت برگشت مجدد و استفاده از آنزیم تثبیت شده به میزان ۱۲ سیکل همراه با باقیمانده فعالیت کاتالیتیکی بیش از ۵۰٪ توام با راندمان بالا جهت هیدرولیز اینولین و تبدیل آن به فروکتوز و فروکتوالیگوساکاریدها با حفظ مقاومت حرارتی در دمای ۷۵ درجه سانتیگراد و افزایش چند برابری نیمه عمر آنزیم تثبیت شده نسبت به آنزیم آزاد، تاییدی بر این ادعا می‌باشد.

- [10] Teng, Z., Luo, Y., Wang, Q. (2012) Nanoparticles synthesized from soy protein: Preparation, characterization, and application for nutraceutical encapsulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 2712-2720.
- [11] Duclairoir, C., Nakache, E., Marchais, H., Orecchioni, A.M. (1998) Formation of gliadin nanoparticles: Influence of the solubility parameter of the protein solvent. *Colloid and Polymer Science*, 276: 321-327.
- [12] Zhanfeng, L., Linhui, Q., Shuangling, Z., Hongyan, W., Xuejun, C. (2013) Synthesis and characterization of monodisperse magnetic $Fe_3O_4@BSA$ core-shell nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Engineering Aspects*, 436: 1145-1151.
- [13] Gao, Y. and Kyratzis, I. (2008). Covalent immobilization of proteins on carbon nanotubes using the cross-linker 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide-A critical assessment. *Bioconjugate Chemistry*, 19: 1945-1950.
- [14] Gill, P.K., Manhas, R.K., Singh, P. (2006). Hydrolysis of inulin by immobilized thermostable extracellular exoinulinase from *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Food Engineering*, 76: 369-375.
- [5] Yangyang, J., Chen, G., Hansong, X., Iram, M., Chunzhao, L., Huizhou, L. (2009) Magnetic nanoparticles supported ionic liquids for lipase immobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 58:103-109.
- [6] Yewale, T., Rekha, S., Singhal, A., Vaidya, A. (2013) Immobilization of inulinase from *Aspergillus niger* NCIM 945 on chitosan and its application in continuous inulin hydrolysis. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2:96-101.
- [7] Bahmaie, M., Abbasi, L., Faraji, M. (2013) Synthesis of magnetic nanoparticles (Fe_3O_4) and its application for extraction and preconcentration of drug sample from environmental samples. *Journal of Semnan*, 8: 29-37.
- [8] Couto, G., Klein, J., Schreiner, W., Mosca, D., Oliveira, A., Zarbin, A. (2007) Nickel nanoparticles obtained by a modified polyol process: Synthesis, Characterization, and Magnetic Properties. *Colloid Interface Science*, 311: 461-468.
- [9] Lohcharoenkal, W., Wang, L., Chen, Y.C., Rojanasakul, Y. (2014) Protein nanoparticles as drug delivery carriers for cancer therapy. *Biomedicine and Biotechnology*, 2014: 1-15.

Inulinase Immobilization on Magnetic Peptide and Protein Nanoparticles for High Fructose Syrup Production

Torabizadeh, H. ^{1*}, Mikani, M. ², Mahmoudi, A. ³

1. Ph.D., Assistant Prof. of Department of Food Science & Technology, Institute of Chemical Technology, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST)

2. MSc, Department of Agriculture, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST)

3. MSc, Department of Agriculture, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST)

(Received: 2017/02/15 Accepted: 2017/04/18)

Inulinase can produce high fructose syrup from inulin in a one-step enzymatic process. In this research, Inulinase was immobilized on the magnetic nanoparticles functionalized with protein and peptide nanoparticles through covalent attachment to improve the stability of the enzyme. At the first step, the magnetite nanoparticles were prepared by co-precipitation method. Then, in the second step, a mixture of soy protein isolate and bovine serum albumin nanoparticles, and wheat gluten hydrolysates prepared by endopeptidases were synthesized by desolvation method and then the magnetite nanoparticle's surface were coated for modification and stabilization. In The third step, the enzyme was immobilized on the surface of the magnetite carrier by using of glutaraldehyde. In this study, scanning electron microscope (SEM) and dynamic light scattering (DLS) were used for analyzing the particle size, shape, morphology and functional characteristics of magnetite and protein nanoparticles and enzyme immobilization in all steps of preparation. After enzyme immobilization the functional properties were compared with the free enzyme. The results implied that thermal stability and resistance to acidic pH were increased. The activity of the enzyme, reusability, and kinetic parameters (V_{max} , K_m , $t_{1/2}$) were assayed and the results revealed better operational stability compared to free enzyme.

Keywords: Inulinase immobilization, Nanopeptides, Magnetic nanoparticles, Soy protein isolate, Wheat gluten hydrolysates.

* Corresponding Author E-Mail Address: htoraby@alumni.ut.ac.ir