چهارمين همايش ملي بيوتكنولوژي جمهوري اسلامي ايران
كرمان مردادماه ۱۳۸٤
International Center For Science & high Technology and Environmental Sciences
The 4th National Biotechnology congress
Islamic Republic of Iran
Kerman august 2005

بررسي ميزان فعاليت تايروزيناز تثبيت شده در سيستم تک فازي دو جزئي

روشنک آقارفيعي، کمال الدين حق بين، سعيد مقصودی**
**تهران، نارمک، دانشگاه علم و صنعت ايران، دانشکده مهندسی شيمی، گروه بيوتکنولوژی.
پست الکترونيکی:R.agharafeie@ mail.iust.ac.ir

خلاصه:
با پيشرفت علم بيوتکنولوژي در چند سال اخير، استفاده از آنزيمها جايگاه بخصوصي پيدا کرده است. ممکن است فعاليت اين بيوکاتاليستها تحت تأثير عوامل محيطي کاهش پيدا کند(Rescigno, 1998).تثبيت يکي از روشهايي است که علاوه بر پايدار کردن آنزيم، امکان جداسازي آنزيم را از محيط عمل فراهم مي کند(Blanch, 1997). در همين راستا در اين تحقيق توانايي بستر پلي آکريل آمايد در حفظ فعاليت آنزيم تايروزيناز در مخلوط حلالهاي آلي- آبي بررسي شده است. اين فعاليت در سيستم تک فازي دو جزئي (حلال آلي – بافر فسفات) بررسي شده است و حلال استونيتريل بدين منظور انتخاب شده است. اثر درصدهاي مختلف آن در ميزان فعاليت آنزيم تثبيت شده مورد بررسي قرار گرفت. نتيجه آنکه آنزيم تثبيت شده در محيط 75% استونيتريل بعد از 6 روز تنها14% از فعاليت خود را از دست داد. همچنين در استفادة مجدد از آنزيم، پس از 4 بار استفاده به فواصل 48 ساعت، مقدار فعاليت از دست رفته همان 14% بدست آمد.

Abstract
Considering the increasing demand for applying immobilized enzymes. It is possible to inactivation takes place by physical parameters. Immobilization is a procedure which stabilizes enzymes and also makes it possible to remove them from solutions. In this research the ability of poly acryl amide in stabilization of tyrosinase in binary systems has been studied. Acetonitril has been chosen as organic solvent and phosphate buffer as an aqueous phase. We observed that entrapped enzyme inactivation was just 14% after 6 days and this parameter for reusability was the same after 8 days.

کلمات کليدي: تايروزيناز، پلي آکريل آمید، سيستم تک فازي دو جزئي، تثبيت، حلال آلي

مقدمه:
در طي سي سال گذشته، تايروزيناز(EC1.14.18.1) که يک آنزيم پلي فنل اکسيداز است (Seo, 2003)، يکي از آنزيمهايي است که در صنايع مختلف مصارف فراواني دارد. از آن جمله مي توان به استفاده اين آنزيم در ساخت بيوسنسورها(Canofeni,1994) ، استفاده در صنايع شيميايي جهت انجام بيوترانسفورميشن، تهيه داروهايي مانند ال- دوپا ، حذف ترکيبات فنلي از پساب ها ، استفاده در صنايع آرايشي جهت باز گرداندن رنگ به رنگدانه هاي موهاي سفيد شده اشاره کرد. پلي آکريل آمید که از پليمريزاسيون راديکالي آکريل آمايد (زنجيره خطي) و بيس آکريل آمايد(اتصالات عرضي) در حضور يک آغازگر(Hunkeler, 1991) ايجاد مي شود بدليل قابل کنترل بودن سايز حفراتش يکي از مناسبترين بسترها جهت تثبيت مي باشد. بدليل حضور گروههاي آزاد آمايدي در ساختمان اين ژل، تمايل جذب آب در آن بسيار بالاست. اين ساختمان اسفنجي پلي آکريل آمايد باعث شده که اين هيدروژل در تحقيقات بيوشيميايي و بيولوژيکي خصوصاً تثبيت بيومولکولها که معمولاً در محيط هاي مائي صورت مي گيرند بکار گرفته شود (Walker). البته تثبيت کردن بيوکاتاليست معمولاً باعث کاهش فعاليت آن مي شود ولي از نظر صنعتي داشتن يک آنزيم با اکتيويته اوليه پائين ولي مدت زمان استفاده زياد خيلي بهتر است تا اينکه اکتيويته اوليه بالا داشته باشد ولي مدت زمان ماندگاري اکتيويته آن کم باشد.

آنزيم ها در سيستم هاي دو جزئي آبي- آلي نيز مي توانند فعاليت خود را حفظ کنند. اين در شرايطي است که حداقل آب مورد نياز براي فعاليت آنها در محيط وجود داشته باشد(Yang, 1992). بنابراين با تثبيت آنزيم و در اختيار قرار دادن مقدار مناسبي آب در اختيار آن مي توانيم آنزيمي با فعاليت مناسب و زمان ماندگاري مناسب داشته باشيم.آنزيم تايروزيناز درپلي آکريل آمید تثبيت شده است (Crecchio, 1995) ولي استفاده از سيستم تک فازي دو جزئي در مورد آن اعمال نشده است. در اين تحقيق سعي بر آن است تا اثرات استفاده از اين سيستم را بررسي کنيم.

روش آزمايش:
تهيه آنزيم :از 100g قارچ خوراکي منجمد شده به روش (شريفي،1381) رسوب 55% اشباع آمونيوم سولفات تهيه کرده و آن را در 30 ml از محلول بافر فسفات 0.01 M و pH = 7 حل مي کنيم

تثبيت آنزيم تايروزيناز در ژل پلي آکريل آمايد:
ژل انتخاب شده جهت تثبيت تايروزيناز داراي ترکيبات 6 ml محلول آکريل آمايد 40% ، 2.6 ml محلول بيس آکريل آمايد 3% ، 20 µl محلول TEMED ، 6.5 ml محلول آنزيمي و 4.78 ml بافر فسفات 0.01 M و pH = 7 بود که با هم مخلوط شده و تحت پمپ خلاء، گاز زدايي شد و سپس ، 100 µl محلول 10% آمونيوم پرسولفات به آن اضافه شد و در قالب ريخته شد و پس از بسته شدن، ژل به ديسکهايي به وزن 0/055 گرمي تقسيم شد و در مخلوط حلالها ريخته شد.

بررسي ميزان فعاليت آنزيم تايروزيناز تثبيت شده که در مخلوط حلالها نگهداري مي شود:

جهت سنجش فعاليت آنزيم بر اساس فعاليت کرزولاز آنزيم تصميم گيري شد و از سوبستراي دي آزوئه فنليک(متيل فنل) استفاده شد. ميزان فعاليت آنزيم در حالت محلول و در هر يک از سيستم هاي حلالي در زمان صفر و در زمانهاي تکرار شوندة 48 ساعته اندازه گيري شد. همچنين جهت سنجش ميزان فعاليت آنزيم در استفاده هاي مجدد از يک ژل با فواصل 48

ساعته انجام شد. در هر آزمون 7 ديسک بدست آمده از ژل آکريل آمايد حاوي تايروزيناز در3ml از حلالي شامل درصدهاي مختلف ازMeCN و بافر فسفات 0.01 M و pH = 7 که غلظت متيل فنل آن $5 * 10^{-5}M$ بود ريخته شد. فعاليت آنزيم در مدت زمان 20 دقيقه اندازه گيري شد. اين عمل در فواصل 48 ساعته تکرار شد و فعاليت نمونه هاي تست شده نيز در 48 ساعت هاي متوالي مجدداً اندازه گيري شد.

نتايج و بحث:

همانطور که از جدول 1 مشخص مي شود، آنزيم تثبيت شده در تمام درصدهاي استونيتريل(MeCN) فعاليت نشان مي دهد. به عبارت ديگر با افزايش سهم استونيتريل در محيطهاي تک فازي دو جزئي مربوطه، نه تنها توقف فعاليت کرزولاز مشاهده نشد بلکه آنچنانکه شکل 1 نيز نشان مي دهد ميزان فعاليت کرزولاز تايروزيناز تثبيت شده در طول زمان در سيتمهاي ذکر شده با همديگر قابل قياس مي باشد. با توجه به نتايج دست آمده، سرعت غيرفعال شدن تايروزيناز تثبيت شده در اين محيطها حداکثر به ميزان 53% براي محيط (MeCN %100) و 14% براي محيط (MeCN%75) در طول شش روز بوده است. همچنين پس از 4 بار استفاده پي در پي از ديسکهاي حاوي آنزيم در محيطهاي ذکر شده در طي 8 روز، فعاليت هيچ يک از آنها نه تنها به صفر نرسيده بلکه عموماً در سطح بسيار خوبي باقيمانده است. اين نتايج در شکل 2 نشان داده شده است. بررسي شيب کاهش فعاليت کرزولاز آنزيم تثبيت شده در اين محيطها طي 8 روز مؤيد اين واقعيت است که حداکثر کاهش فعاليت مشاهده شده براي آنزيم تثبيت شده در طي اين آزمايشات در محيط 100% استونيتريل و معادل 28% بوده است ولي کاهش فعاليت بموجب استفاده مکرر در محيط 75% استونيتريل فقط 14% بوده است که نسبت به گزارشات قبلي بطور چشمگيري کمتر مي باشد.

Refrences:

1. A. Rescigno, E. Sanjust, G. Soddu, A. C. Rinaldi, F. Sollai, N. Curreli, A. Rinaldi, Biochim. Biophys. Acta, 1998, 1384, P: 268-276 .
2. H. W. Blanch, D. S. Clark, Biochemical Engineering,1997, P: 103-112 .
3. S. Y. Seo, V. K. Sharma, N. Sharma, J. Agr. Food Chem. , 2003, 51, P: 2837-2853 .
4. S. Canofeni, S. Di Sario and R. Pilloton , Life Chem. Rep. 11 (1994), pp. 321–331.
5. D. Hunkeler, Macromolecules, 24 (1991) 2160-2171.
6. J. M. Walker; The Proteins Protocols Handbook.
7. Z. Yang, D. A. Robb, P. J. Halling, J. Trampet et al. (eds.) ,Biocatalysis in nonconvensial media, Elsevier, Amsterdam, 1992, P: 585-592 .
8. C.Crecchio, P.Ruggiero ,and M.D.R. Pizzigallo, Biotechnology and Bioengineering, Vol.48, P: 585-591, 1995.
9. ش. شريفي، پايان نامه كارشناسي ارشد، 1381.

Time (hr)	MeCN 25%	MeCN 50%	MeCN 75%	MeCN 100%
1	0/00697	0/0088	0/0062	0/00403
48	0/00757	0/00567	0/0072	0/00675
96	0/00353	0/0054	0/0044	0/00707
144	0/00395	0/0044	0/0053	0/0032

جدول1- سرعت واكنش تايروزيناز تثبيت شده در درصدهاي مختلف MeCN

Time (hr)	MeCN 25%	MeCN 50%	MeCN 75%	MeCN 100%
1	0/0071	0/0084	0/0064	0/0038
48	0/0075	0/0057	0/0077	0/0065
96	0/0063	0/0056	0/0079	0/0055
144	0/0076	0/0063	0/0085	0/004
196	0/0066	0/006	0/0066	0/0047

جدول 2- **سرعت كاربري تكراري آنزيم تثبيت شده در درصدهاي مختلف MeCN**

Surf and download all data from SID.ir: www.SID.ir

Translate via STRS.ir: www.STRS.ir

Follow our scientific posts via our Blog: www.sid.ir/blog

Use our educational service (Courses, Workshops, Videos and etc.) via Workshop: www.sid.ir/workshop