تحقیقات مهندسی صنایع غذایی/جلد ۲۱/ شماره ۷۳/ پاییز و زمستان ۱۴۰۱ /ص ۹۱-۱۰۳
سایت مجله: https://fooder.areeo.ac.ir

نوع مقاله: علمی-پژوهشی

بررسی اثر کربوکسی متیل سلولز و الکل و دما بر پایداری آنزیم ترمولیزین

امیر عاقلی کهنه شهری[۱]، یعقوب پاژنگ[۲]، فاطمه قمری[۳*]

[۱]- گروه بیوشیمی، پژوهشکده زیست‌فناوری، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۲- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۳*- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور تهران، ایران، صندوق پستی ۱۹۳۹۵-۴۶۹۷
تاریخ ارسال : ۱۴۰۰/۰۲/۳۰ تاریخ پذیرش : ۱۴۰۲/۰۳/۰۲

چکیده

آنزیم ترمولیزین (EC 3.4.24.4) آنزیم متالوپروتئیناز مقاوم به حرارت است که پیوند پپتیدی دارای آمینواسید آبگریز لوسین و فنیل آلانین را هیدرولیز می‌کند. افزایش برخی ترکیبات می‌تواند باعث پایداری این آنزیم شود. در این پژوهش اثر کربوکسی متیل سلولز به‌عنوان افزودنی بر عملکرد و پایداری ترمولیزین بررسی شده است. ابتدا در شرایط سنجش فعالت آنزیم بررسی شد. پس از آن اثر دما و اتانول بر فعالیت آنزیم بررسی گردید. سپس اثر کربوکسی متیل سلولز ۲، ٤، ٦، ۸ و ۱۰ درصد بر فعالیت ترمولیزین بررسی شد. نتایج بررسی‌ها نشان داد که پایداری ترمولیزین در مقابل افزایش دما ابتدا افزایش و پس از آن در دماهای خیلی بالا کاهش می‌یابد و الکل باعث ناپایدار شدن آنزیم می‌شود. کربوکسی متیل سلولز باعث افزایش فعالیت و پایداری آنزیم ترمولیزین می‌شود و حضور کربوکسی متیل سلولز می‌تواند باعث پایداری و مقاومت آنزیم ترمولیزین در برابر اتانول شود. ازاین‌رو، استفاده از کربوکسی متیل سلولز می‌تواند برای افزایش فعالیت این آنزیم در حلال اتانول به کار رود.

واژه‌های کلیدی: پایداری آنزیم، ترمولیزین، کربوکسی متیل سلولز، الکل

مقدمه

آنزیم‌های خانواده ترمولیزین از دسته متالوپپتیدازهای خانواده M4 هستند که در باکتری‌ها، قارچ‌ها و آرکئی‌ها وجود دارند (Adekoya & Sylte, 2009). آنزیم ترمولیزین یکی از اولین آنزیم‌هایی است که ساختار بلوری آن مشخص شد. این آنزیم در برابر حرارت‌های بالا مقاوم است به‌طوری‌که T50 ترمولیزین (یعنی دمایی که در آن ۵۰ درصد از فعالیت آن در شرایط استاندارد پس از ۳۰ دقیقه مجاورت با آن دما از بین می‌رود) برابر با ۸۶/۹ درجه سلسیوس است (Eijsink *et al.*, 1995). ترمولیزین [EC.3.4.24.27] حاصل از باکتری *باسیلوس ترموپروتئو لیتیکوس* کاربرد فراوانی در زیست‌فناوری و صنایعی مانند صنایع غذایی، داروسازی و سنتز پپتید دارد و پایداری حرارتی آن بالاست. ترمولیزین در صنایع غذایی برای سنتز آسپارتام استفاده می‌شود که یک شیرین کننده غیر قندی است (Ager *et al.*,1998). این آنزیم در صنایع لبنی می‌تواند آنتی‌اکسیدان‌های قوی از آب پنیر ایجاد

*نگارنده مسئول : Email: fatemehghamari@outlook.com
http://doi: 10.22092/FOODER.2023.354142.1306
© 2023,The Author(s). Published by Agricultural Engineering Research Institute. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

کند. از این آنزیم همچنین برای سنتز سیکلودکسترین استرها استفاده می‌شود که برای رهایش دارو و پایدارسازی پروتئین‌ها استفاده می‌شوند (Pedersen *et al*- 2005). از هیدرولیز پروتئین بتالاکتالبومین توسط ترمولیزین پپتیدهای فعالی ایجاد می‌شوند که نقش‌های فیزیولوژیکی می‌توانند داشته باشند (del Mar Contreras *et al*., 2011). این آنزیم در دمین انتهای آمینی غنی از صفحات بتا و در دمین انتهای کربوکسی مارپیچ‌های آلفا دارد. ترمولیزین هیدرولیز پیوندهای پپتیدی را به‌ویژه در محل باقی‌مانده‌های آب‌گریز با کمک یون روی کاتالیز می‌کند و به‌طور گسترده در تشکیل پیوند پپتیدی از طریق واکنش معکوس هیدرولیز استفاده می‌شود. این پروتئین از ۳۱۶ اسید آمینه تشکیل‌شده است. از ترکیبات افزودنی برای پایدارسازی و افزایش فعالیت آنزیم‌ها استفاده می‌شود. ترکیبات افزودنی می‌توانند ترکیبات معدنی یا آلی باشند. در مطالعات قبلی مشخص‌شده که افزایش سدیم کلرید تا غلظت چهار مولار باعث افزایش فعالیت تا حد ۶ تا ۷ برابر می‌شود. هدف از تحقیق حاضر، بررسی نقش کربوکسی متیل سلولز بر فعال‌سازی ترمولیزین است. باکتری‌های جنس *باسیلوس* شناخته‌شده‌اند که پروتئین‌ها را با انواع مختلف عملکردها ترشح می‌کنند. بسیاری از این پروتئین‌ها در بیوژنز و یکپارچگی دیواره سلولی نقش دارند، اما پروتئین‌های خارج سلولی با نقش‌های مختلف در فرآیندهای متفاوتی مانند متابولیسم آمینواسید، تحرک، اسپورالیزاسیون و فرسایش مواد مغذی شناسایی‌شده‌اند (Arefian *et al*, 2020; Chen & Inouye, 2008; Cunningham *et al*, 1999; Demidyuk *et al*., 2010; Eder & Fersht, 1995; Jaswal *et al*, 2002; Karlin & Zhu, 1997; Marie-Claire *et al*, 1998; Silen & Agard, 1989; Zhu *et al*, 1989).

مواد و روش‌ها

مواد مورداستفاده در این تحقیق عبارت‌اند از آنزیم ترمولیزین از شرکت سیگما، کربوکسی متیل سلولزاز شرکت سیگما، اتانول ۹۶ درصد از سیگما، کازئین از سیگما تری کلر، و استیک اسید[1] از سیگما.

سنجش فعالیت آنزیم ترمولیزین

چهل میکرولیتر از محلول آنزیمی (۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در بافر تریس دارای pH برابر ۸ با ۴۶۰ میکرولیتر محلول یک درصد کازئین (سوبسترا) مخلوط گردید و در چهار لوله‌آزمایش به ترتیب در زمان‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. پس از آن ۵۰۰ میکرولیتر محلول یک درصدتری کلرو استیک اسید افزوده شد. سپس لوله‌ها با سرعت ۱۳۰۰۰rpm در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفوژ شدند، جذب محلول رویی هر یک در طول‌موج ۲۸۰ نانومتر به دست آمد و بعد از آن جذب در برابر زمان، آنزیم با سوبسترا رسم شد (Varasteh, 2017).

محاسبه V_{max} و K_m آنزیم

غلظت ۲۰ میکروگرم از آنزیم ترمولیزین با غلظت‌های ۰/۰۵ و ۰/۱۰ و ۰/۱۵ و ۰/۲۰ و ۰/۲۵ درصد از کازئین مخلوط و در دمای آزمایشگاه انکوبه شد. برای هر غلظت کازئین ۳ لوله آزمایش انتخاب و به لوله اول ۱ دقیقه، به لوله دوم ۲ دقیقه و به لوله سوم سه دقیقه زمان داده شد. به همه آنها تری کلرو استیک اسید یک درصد افزوده گردید و بعد از سانتریفوژ و برداشت محلول رویی، جذب محلول رویی در ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. سپس، با توجه با جذب‌های به‌دست‌آمده V_{max} و K_m آنزیم محاسبه شد (Varasteh, 2017).

[1] Trichloroacetic acid (TCA)

تهیه محلول اتانولی

محلول‌های اتانول ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ درصد به‌اندازه یک میلی‌لیتر در بافر تریس تهیه گردید. پس از آن ۲۰ میکرولیتر از محلول‌های فوق برداشته و با ۲۰ میکرولیتر از آنزیم مخلوط شد و به مدت ۴ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفت.

اثر دما

چهل میکرولیتر از آنزیم با ۴۶۰ میکرولیتر ۱ درصد از کازئین مخلوط و در بن ماری در دماهای ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ درجه سلسیوس به مدت ۲، ۳ و ۴ دقیقه قرار داده شد. سپس، محلول‌تری کلرو استیک اسید یک درصد برای متوقف کردن واکنش ریخته شد و در سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و محلول رویی برداشته و سرانجام جذب آن در ۲۸۰ نانومتر خوانده شد (Varasteh, 2017).

اثر کربوکسی متیل سلولز بر ترمولیزین

بیست میکرولیتر آنزیم با ۲۰ میکرولیتر محلول‌های کربوکسی‌متیل سلولز ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ درصد مخلوط شد. پس از ۵ دقیقه انکوباسیون، به آنها کازئین با مقادیر ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴ و ۰/۵ گرم کربوکسی متیل سلولز به حجم ۰/۵ میلی‌لیتر بافر مخلوط گردید. این عمل در ۳ لوله مجزا اجرا و به ترتیب ۲، ۳ و ۴ دقیقه انکوبه شد و بعد روی آنها تری کلرو استیک اسید ریخته و بعد از سانتریفیوژ شدن جذب خوانده شد (Varasteh, 2017).

اثر کربوکسی متیل سلولز و اتانول روی ترمولیزین

محلول آنزیمی با غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در بافر تریس با pH برابر ۸ دارای کربوکسی متیل سلولز ۱۰ درصد تهیه و به مدت پنج دقیقه هم زده شد. محلول الکلی دارای درصدهای ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد در بافر تریس تهیه شد. بیست میکرولیتر از محلول دارای آنزیم با ۲۰ میکرولیتر از محلول الکلی با غلظت مشخص مخلوط و ۲ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد و بعد از آن جذب محلول رویی در طول‌موج ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Varasteh, 2017).

بررسی اثر کربوکسی متیل سلولز روی K_m و V_{max} آنزیم

ابتدا ۲۰ میکرولیتر از محلول کربوکسی متیل سلولز با غلظت ۱۰ درصد تهیه شد و با ۲۰ میکرولیتر محلول آنزیم مخلوط و در دمای آزمایشگاه انکوبه گردید. غلظت ۱۰ درصد کربوکسی متیل و غلظت‌های مختلف کازئین (۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۱۵، ۰/۲ و ۰/۲۵) در بافر حل شد. بعد از مخلوط کردن محلول‌های کربوکسی متیل سلولز و آنزیم در ۱۵ لوله‌آزمایش بعد از ۵ دقیقه محلول کازئین (سوبسترا) افزوده شد. در ۵ لوله اول غلظت‌های مختلف کازئین افزوده شد. بعد از دو دقیقه‌تری کلرو استیک اسید ریخته شد. در ۵ لوله دوم غلظت‌های مختلف کازیین افزوده و بعد از سه دقیقه تری‌کلرواستیک اسید ریخته شد. در ۵ لوله سوم غلظت‌های مختلف کازئین افزوده و بعد از چهار دقیقه تی سی ای ریخته شد. بعد از سانتریفیوژکردن، محلول رویی برداشته و رسوب دور ریخته شد و جذب در ۲۸۰ نانومتر خوانده شد (Varasteh, 2017).

اثر کربوکسی متیل سلولز و دما بر ترمولیزین

محلول آنزیم با ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ درصد کربوکسی متیل سلولز تهیه شد. محلول سوبسترا با مقدارهای ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ درصد کربوکسی متیل سلولز تهیه شد. در داخل لوله‌های آزمایش محلول آنزیم و سوبسترا ریخته شد. سه لوله اول در دمای صفر درجه سلسیوس و سه لوله دوم در دمای ۲۰ درجه سلسیوس و سه لوله سوم در دمای ۴۰ درجه سلسیوس و

لوله‌های چهارم در ۶۰ درجه سلسیوس، و لوله‌های پنجم و ششم به‌ترتیب در ۸۰ و ۱۰۰ درجه سلسیوس انکوبه شد. پس از پایان زمان انکوبه شدن، تری کلرو استیک اسید ریخته شد. بعد، در دمای ۴ درجه سلسیوس در سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و محلول رویی برداشته شد. محلول در کوت ریخته شد و جذب آن در ۲۸۰ نانومتر در دستگاه طیف‌سنج نوری اندازه گرفته شد (Varasteh, 2017).

نتایج و بحث

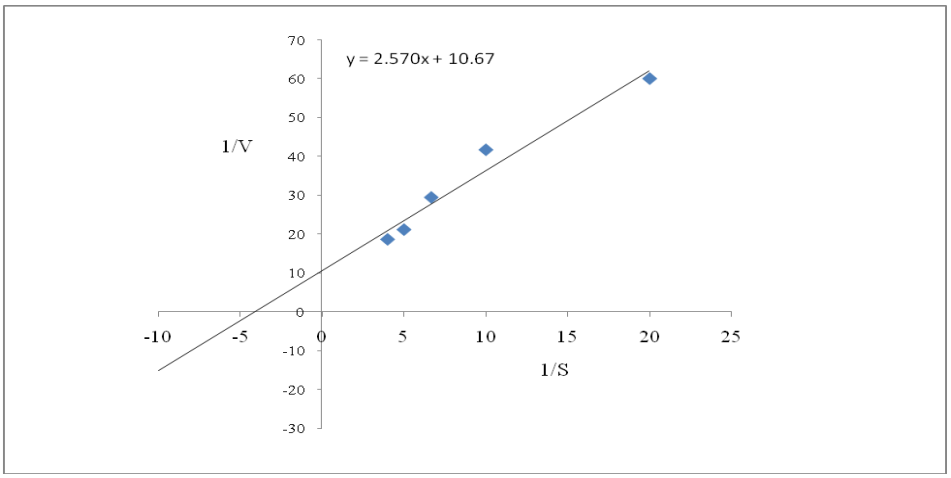
تعیین V_{max} و K_m آنزیم ترمولیزین:

شکل ۱ میزان V_{max} و K_m آنزیم ترمولیزین با استفاده از داده‌های به‌دست آمده از جذب محلول رویی مقادیر مربوط با استفاده از برنامه Excel 2019 ارزیابی شد و بر اساس نمودار لاینویور و برک نمودار مقادیر به دست آمده برای V_{max} و K_m در نمودار لاینویور-برک به ترتیب ۰/۰۹۳ OD/min و ۰/۲۳۴ میکروگرم است (جدول ۱).

جدول ۱- Vmax و Km آنزیم ترمولیزین در حضور کربوکسی متیل سلولز و در غیاب آن

Table 1-Thermolysin enzyme Vmax and Km in absence and presence of CMC

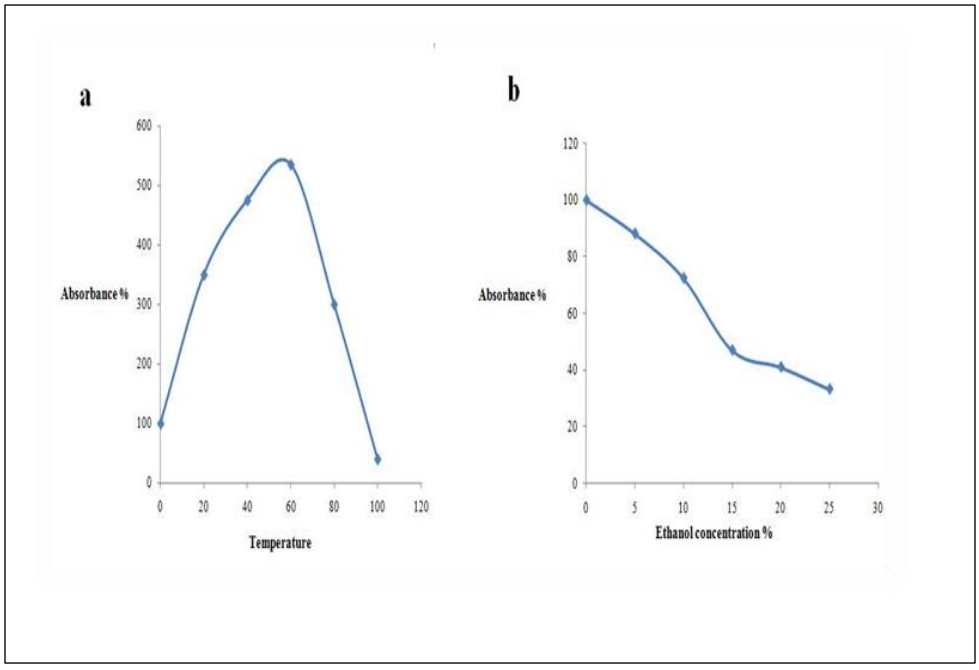
	V_{max} (OD/min)	K_m(mg)
آنزیم مخلوط نشده با کربوکسی متیل سلولز	۰/۰۹۳	۰/۲۳۴
Enzyme not mixed with carboxymethyl cellulose	0.093	0.234
آنزیم مخلوط شده با کربوکسی متیل سلول	۰/۱۷۳	۱/۱۷۸
Enzyme mixed with carboxymethyl cellulose	0.173	1.178



شکل ۱- معادله لاینویور و برک از فعالیت آنزیم ترمولیزین

Fig.1- The Lineweaver- Burk plot for Thermolysin kinetics in presence CMC(%8 concentration)

محور عمودی مقادیر $1/V$ و محور افقی مقادیر $1/S$ را آورده است. از روی معادله لاینوروبور برک مقادیر V_{max} و K_m محاسبه شده است.



.شکل ۲- اثر دماهای مختلف و غلظت‌های مختلف اتانول بر فعالیت آنزیم ترمولیزین

Fig.2- Effects of different concentrations of ethanol and different temperatures on Thermolysin activity

a) نمودار اثر دما بر فعالیت ترمولیزین در دماهای مختلف. بیشترین فعالیت آنزیم در دمای ۶۰ درجه سلسیوس مشاهده شد. درصد جذب بر اساس فعالیت بر اساس جذب نسبت به دمای صفر درجه سلسیوس عنوان‌شده است. b) اثر غلظت‌های مختلف اتانول بر آنزیم ترمولیزین.

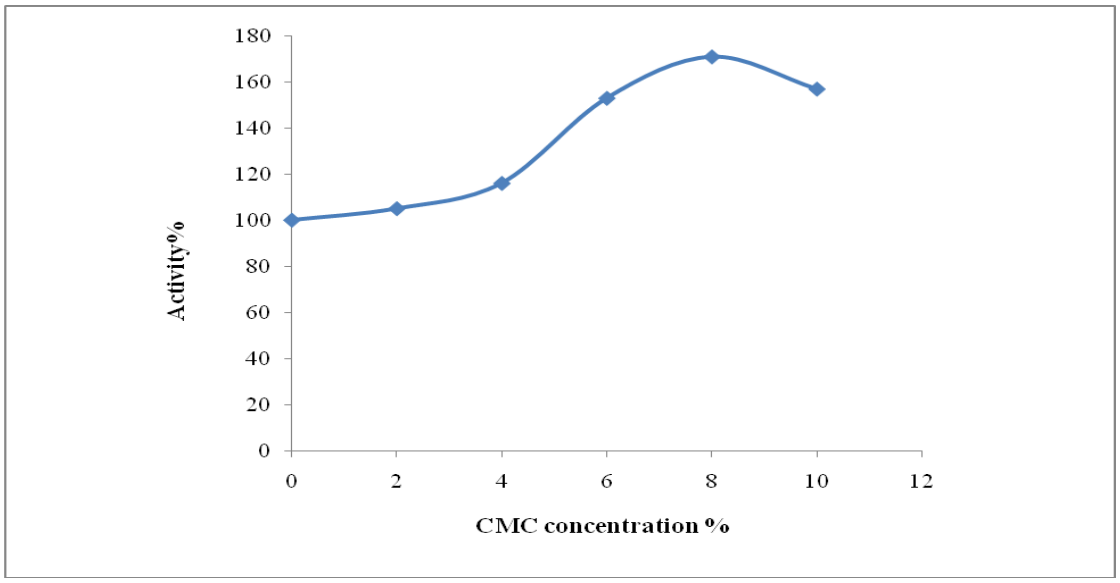
تأثیر اتانول و دما بر فعالیت آنزیم

شکل ۲ اثر غلظت‌های مختلف اتانول و دماهای مختلف را بر فعالیت آنزیم ترمولیزین نشان می‌دهد. با افزایش دما تا ۶۰ درجه سلسیوس فعالیت آنزیم افزایش و بعدازآن کاهش می‌یابد. پس در آزمایش‌ها، میزان دمای مطلوب آنزیم برابر با ۶۰ درجه سلسیوس بود. شکل ۲b نشان می‌دهد که اتانول در همه غلظت‌های مورداستفاده باعث کاهش فعالیت آنزیم شده است.

در همه غلظت‌های به‌کاررفته از اتانول کاهش فعالیت آنزیم مشاهده شد. محور عمودی بر اساس درصد فعالیت بر اساس جذب بر دقیقه نسبت به آنزیم تیمار نشده با اتانول عنوان‌شده است.

افزایش فعالیت آنزیم در حضور کربوکسی‌متیل سلولز

در شکل ۳ نشان داده شده است که کربوکسی متیل سلولز در غلظت‌های به کار رفته باعث افزایش فعالیت آنزیم ترمولیزین شده است. ولی در غلظت ده درصد از کربوکسی‌متیل سلولز کاهش فعالیت مشاهده می‌شود. برای این منظور غلظت ۸ درصد از کربوکسی‌متیل سلولز برای آزمایش‌های بعدی انتخاب شد، زیرا بیشتر فعالیت آنزیم در این غلظت مشاهده شده است. V_{max} و K_m آنزیم در حضور کربوکسی متیل سلولز با استفاده از داده‌های جذب و برنامه Excel 2019 از طریق رسم نمودار و معادله لاینویور برک محاسبه گردید. جدول ۱ نشان می‌دهد میزان V_{max} آنزیم نسبت به آنزیم مخلوط نشده با کربوکسی‌متیل سلولز افزایش و K_m نیز افزایش‌یافته است.



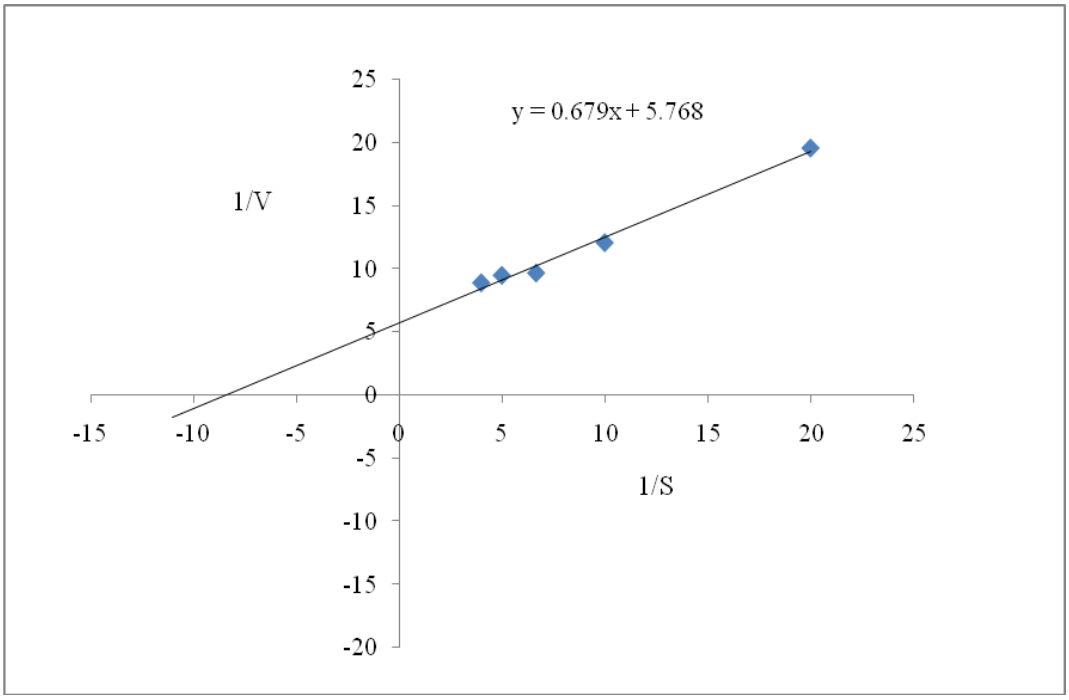
شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف کربوکسی متیل سلولز بر فعالیت آنزیم ترمولیزین

Fig.3-effects of different concentrations of CMC on Thermolysin activity

در شکل ۳ مشاهده می‌شود که با افزایش غلظت کربوکسی متیل سلولز تا ۸ درصد، فعالیت آنزیم افزایش نشان می‌دهد و بعدازآن کاهش می‌یابد. محور عمودی فعالیت آنزیم را بر اساس درصد فعالیت بر اساس جذب بر دقیقه نسب به حالت آنزیم تیمار نشده نشان می‌دهد.CMC: کربوکسی‌متیل سلولز

افزایش میزان K_m و V_{max} آنزیم مخلوط شده با کربوکسی متیل سلولز

پس از تعیین غلظتی از کربوکسی متیل سلولز که باعث بیشترین افزایش فعالیت آنزیم می‌شود (غلظت ۸ درصد)، آنزیم با این غلظت از کربوکسی متیل سلولز مخلوط و K_m, V_{max} آنزیم با استفاده از داده‌های جذب و نرم‌افزارExcel 2019 محاسبه شد. شکل ۴ نمودار و معادله لاینویور-برک حاصل را نشان می‌دهد که از روی آن معادله مقادیر K_m و V_{max} آنزیم به دست آمدند و همان‌طور که در جدول ۱ آورده شده است به ترتیب برابر است با ۱/۱۷۸ میلی‌گرم و ۰/۱۷۳ OD/min. نتایج جدول یک و شکل ۴ نشان می‌دهند که کربوکسی متیل سلولز مقدار K_m و نیز V_{max} آنزیم را افزایش داده است. پس، کربوکسی متیل سلولز برخلاف کاهش تمایل آنزیم به سوبسترا، باعث افزایش فعالیت آن شده است.



شکل ٤- نمودار لاینویور برک از فعالیت آنزیم ترمولیزین در حضور غلظت ۸ درصد از کربوکسی‌متیل سلولز

Fig.4- The Lineweaver Burk plot for Thermolysin kinetics in presence CMC (%8 concentration)

با استفاده از داده‌های جذب بر دقیقه فعالیت آنزیم منحنی لاینویور برک در حضور غلظت‌های مختلف کازئین محاسبه و V_{max} و K_m آنزیم از روی معادله لاینویور برک که در شکل مشخص هست محاسبه شد.

کاهش دمای مطلوب آنزیم و افزایش پایداری آن به اتانول توسط کربوکسی متیل سلولز

نمودار a از شکل ۵ نشان می‌دهد میزان دمای مطلوب آنزیم در حضور کربوکسی متیل سلولز ۴۰ درجه سلسیوس است که در مقایسه با آنزیم معمولی ۲۰ درجه سلسیوس کاهش نشان می‌دهد. در مقابل، با توجه به اطلاعات نمودار b از شکل ۵ کربوکسی متیل سلولز باعث افزایش فعالیت آنزیم در حضور غلظت‌های مختلف اتانول شده است. جدول ۲ خلاصه‌ای از نتایج شکل ۲ و شکل ۵ را در مورد اثر اتانول نشان می‌دهد، همچنان که جدول ۲ نشان می‌دهد در غلظت‌های مختلف از اتانول در مورد آنزیم مخلوط شده با کربوکسی متیل سلولز افزایش فعالیت نسبت به حالت بدون کربوکسی متیل سلولز شده است.

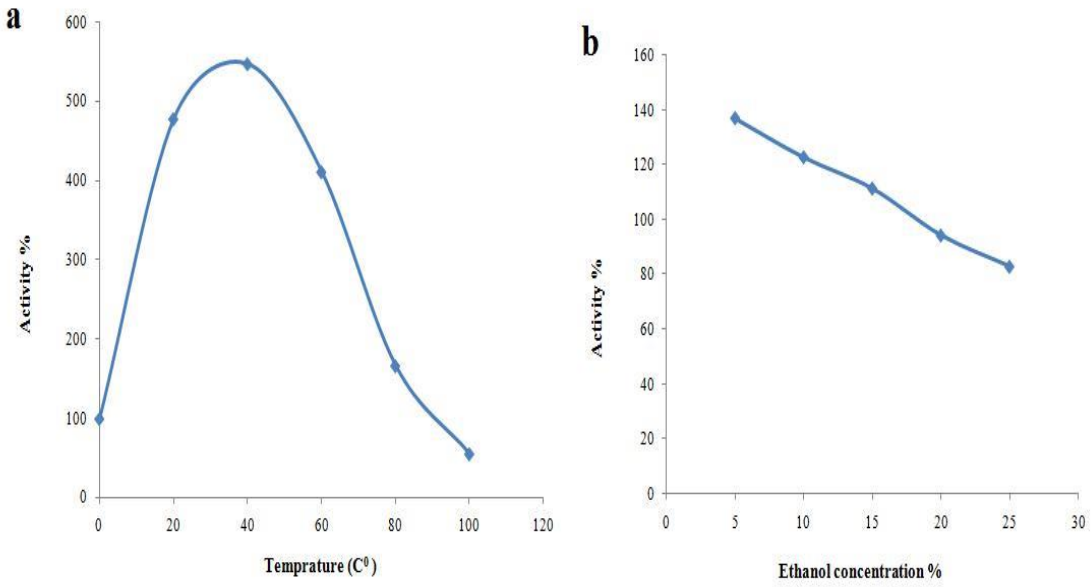
جدول ۲- مقایسه اثر غلظت‌های مختلف اتانول بر روی نسبت فعالیت آنزیم مخلوط با کربوکسی متیل سلولز به آنزیم مخلوط نشده با کربوکسی متیل سلولز

Table 1-Comparison effects of ethanol concentrations on enzyme activity in absent and present of CMC

غلظت اتانول (درصد)	۰	۵	۱۰	۱۵	۲۰	۲۵
Ethanol concentration (percentage)	**0**	**5**	**10**	**15**	**20**	**25**
فعالیت آنزیم مخلوط شده با کربوکسی متیل سلولز نسبت به فعالیت آنزیم مخلوط نشده	**۱/۷۱**	**۱/۵۶**	**۱/۶۹**	**۲/۴۲**	**۲/۲۸**	**۲/۴۶**
Activity of the enzyme mixed with carboxymethyl cellulose compared to the activity of the unmixed enzyme	**1.71**	**1.56**	**1.69**	**2.42**	**2.28**	**2.46**

شکل ۵- a اثر دما و اتانول بر آنزیم ترمولیزین در حضور غلظت ۸ درصد از کربوکسی متیل سلولز b) فعالیت آنزیم مخلوط با کربوکسی متیل سلولز در حضور غلظت‌های مختلف اتانول

Fig.5-a)Temperature effect on Thermolysin enzyme in presence of CMC(%8concentration).b)Enzyme activity in presence .of CMC and ethanol concentrations



a) اثر دما بر آنزیم ترمولیزین در حضور کربوکسی‌متیل سلولز. با افزایش دما تا ۴۰ درجه سلسیوس، فعالیت افزایش پیدا می‌کند و در دمای ۴۰ درجه سلسیوس بیشترین فعالیت آنزیم دیده می‌شود. محور عمودی فعالیت آنزیم را بر اساس درصد نسبت به دمای صفر درجه سلسیوس نشان می‌دهد. b) فعالیت آنزیم مخلوط با کربوکسی متیل سلولز در حضور غلظت‌های مختلف اتانول. فعالیت آنزیم نسبت به آنزیم بدون حضور کربوکسی متیل سلولز آورده شده است. افت فعالیت آنزیم دارای شیب ملایم است.در تحقیقات صدر ممتاز و اصغری (Sadrmomtaz & Asghari, 2015) الاستاز حاصل از *سودوموناس آئروجینوزا* ازجمله Zn-متالوپروتئازهای مقاوم به حلال‌های آلی است. اما، آنزیم هومولوگ آن، ترمولیزین *باسیلوس ترموپروتئولیتیکوس*، دارای پایداری دمایی بالا است درحالی‌که پایداری بسیار کمی در حلال‌های آلی دارد. فعالیت آنزیم‌های الاستاز و ترمولیزین در غلظت‌های صفر تا۵۰ درصد(حجمی/حجمی) از حلال‌های آلی اتانول، متانول، ایزوپروپانول، دی متیل فرمامید، گلیسرول و اتیلن گلیکول اندازه‌گیری شد. فعالیت الاستاز در حضور همه حلال‌های آلی، به کار رفته به‌جز اتانول، در تمامی غلظت‌ها نه‌تنها کاهش نیافته بلکه روند افزایشی را نشان داد، درحالی‌که فعالیت ترمولیزین در شرایط مشابه کاملاً از دست رفت. از سوی دیگر، فعالیت الاستاز در حضور دی‌تیوتریتول یک میلی مولار در تمام حلال‌ها به‌شدت کاهش یافت. با توجه به اینکه الاستاز دارای یک پیوند دی سولفیدی در دمین آمینوترمینال و یک پیوند دی سولفیدی در دمین کربوکسی ترمینال است می‌توان پیشنهاد کرد که دلیل پایداری الاستاز در حلال‌های آلی وجود این پیوندهای

دی‌سولفیدی است (*Lamazares et al.*, 2021). نتایج تحقیق ما نشان داد که در حضور الکل فعالیت و پایداری آنزیم با افزایش درصد الکل اتانول کاهش پیدا می‌کند یعنی اتانول باعث ناپایدار شدن آنزیم شده است. با توجه به اینکه آنزیم ترمولیزین یک آنزیم صنعتی است و عموماً در صنعت برای واکنش از حلال‌های آلی استفاده می‌شود، پس با پایدارسازی این آنزیم در حلال آلی می‌توان کاربرد صنعتی آن را بیشتر کرد. یکی از روش‌های پایدارسازی آنزیم‌ها، پایدارسازی آنها با استفاده از مواد افزودنی است (Silva *et al.*, 2018). در تحقیق حاضر کربوکسی متیل سلولز استفاده‌شده است که دو گروه سلولز و کربوکسی متیل را با بار منفی دارد. تحقیقات نشان داده است که پلی اول‌ها که سلولز هم از آن دسته است می‌تواند باعث افزایش پایداری آنزیم شود (Balcão & Vila, 2015). از طرفی، ترکیبات باردار نیز نشان داده‌شده است که باعث افزایش پایداری آنزیم می‌شوند (Kumar *et al.*, 2011). K_m و V_{max}آنزیم دو پارامتر کینتیکی آنزیم هستند که برای برآورد عملکرد آنزیم بررسی می‌شوند. در تحقیق حاضر کربوکسی‌متیل سلولز باعث افزایش K_m آنزیم شده است که این می‌تواند به دلیل جذب سوبسترای آنزیم ترمولیزین توسط پیوندهای هیدروژنی و میانکش یونی توسط کربوکسی متیل سلولز باشد و این خصلت همچنین باعث انعطاف‌پذیر شدن ساختار آنزیم می‌شود تا واکنش سریع‌تر صورت پذیرد. از طرفی، چون کربوکسی متیل سلولز باعث انعطاف‌پذیری ساختار آنزیم ترمولیزین شده است این امر باعث شده تا علاوه بر اینکه V_{max}آنزیم نسبت به حالت بدون کربوکسی متیل سلولز افزایش یابد(جدول ۱) باعث حساس‌تر شدن آنزیم به دما و کاهش دمای مطلوب آن شده است(شکل ۵). همان‌طور که نمودار شکل ۵b و جدول ۲ نشان داده است کربوکسی متیل سلولز فعالیت آنزیم را در حضور اتانول افزایش داده است، با توجه به اینکه سلولز پلی اول هست با جذب اتانول توسط پیوند هیدروژنی باعث شده است که اثر اتانول بر ساختار آنزیم از بین برود تا آنزیم مخلوط شده نسبت به آنزیم مخلوط نشده فعالیت بیشتری نشان دهد.

نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه در صنایع ممکن است واکنش‌ها در محیط‌های غیر آبی انجام شوند، وجود ترکیباتی که باعث افزایش پایداری آنزیم‌ها در مقابل حلال‌های آلی شوند اهمیت دارد. ترکیب کربوکسی متیل سلولز باعث افزایش پایداری آنزیم ترمولیزین در مقابل حلال اتانول شده است. پس می‌توان این ترکیب را برای استفاده به‌عنوان پایدارساز آنزیم در مقابل حلال اتانول پیشنهاد داد.

تعارض منافع

نویسندگان در خصوص انتشار مقاله ارائه شده به طور کامل از سو اخلاق، از جمله سرقت ادبی، سو رفتار، جعل داده ها و یا ارسال و انتشار دوگانه پرهیز نموده اند و منافی تجاری در این راستا وجود ندارد.

مراجع

Arefian, M., Hojjati, M., Tajzad, I., Mokhtarzade, A., Mazhar, M. and Jamavari, A. 2020. A review of Polyvinyl alcohol/Carboxiy methyl cellulose (PVA/CMC) composites for various applications. Journal of Composites and Compounds. 2(3): 69-76.

Adekoya, O. A. and Sylte, I. 2009. The thermolysin family (M4) of enzymes: therapeutic and biotechnological potential. Chemical biology & drug design. 73(1): 7-16.

Ager, D. J., Pantaleone, D. P., Henderson, S. A., Katrizki, A. R., Prakash, I., Walters, D. E. 1998.Commercial,syntheticnonnutri- tive sweeteners. Angewandte Chemie International Edition. 37(13-14): 1802-1817.

Balcão, V. M. and Vila, M. M. D. C. 2015. Structural and functional stabilization of protein entities: state-of-the-art. Advanced Drug Delivery Reviews. 93, 25-41.

Chen, Y.-J. and Inouye, M. 2008. The intramolecular chaperone-mediated protein folding. Current Opinion in Structural Biology. 18(6): 765-770.

Cunningham, E. L., Jaswal, S. S., Sohl, J. L. and Agard, D. A. 1999. Kinetic stability as a mechanism for protease longevity. Proceedings of the National Academy of Sciences. 96(20): 11008-11014.

Demidyuk, I. V., Gromova, T. Y., Polyakov, K. M., Melik-Adamyan, W. R., Kuranova, I. P. and Kostrov, S. V. 2010. Crystal structure of the protealysin precursor: insights into propeptide function. Journal of Biological Chemistry. 285(3): 2003-2013.

del Mar Contreras, M., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Martín-Álvarez, P. J. and Recio, I. 2011. Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with thermolysin: Optimization by response surface methodology. LWT-Food Science and Technology. 44(1): 9-15.

Eder, J. and Fersht, A. R. 1995. Pro-sequence-assisted protein folding. Molecular Microbiology. 16(4): 609-614.

Eijsink, V. G. H., Veltman, O. R., Aukema, W., Vriend, G. and Venema, G. 1995. Structural determinants of the stability of thermolysin-like proteinases. Nature Structural Biology. 2(5): 374-379.

Jaswal, S. S., Sohl, J. L., Davis, J. H. and Agard, D. A. 2002. Energetic landscape of α-lytic protease optimizes longevity through kinetic stability. Nature. 415(6869): 343-346.

Karlin, S. and Zhu, Z.-Y. 1997. Classification of mononuclear zinc metal sites in protein structures. Proceedings of the National Academy of Sciences. 94(26): 14231-14236.

Kumar, V., Chari, R., Sharma, V. K. and Kalonia, D. S. 2011. Modulation of the thermodynamic stability of proteins by polyols: Significance of polyol hydrophobicity and impact on the chemical potential of water. International Journal of Pharmaceutics. 413(1): 19-28.

Lamazares, E., MacLeod-Carey, D., Miranda, F. P. and Mena-Ulecia, K. 2021. Theoretical Evaluation of Novel Thermolysin Inhibitors from Bacillus thermoproteolyticus. Possible Antibacterial Agents. Molecules. 26(2):386.

Marie-Claire, C., Roques, B. P. and Beaumont, A. 1998. Intramolecular Processing of Prothermolysin. Journal of Biological Chemistry. 273(10): 5697-5701.

Matthews, B. W., Colman, P. M., Jansonius, J. N., Titani, K., Walsh, K. A. and Neurath, H. 1972. Structure of thermolysin. Nature New Biology. 238(80): 41-43.

Pedersen, N. R., Kristensen, J. B., Bauw, G., Ravoo, B. J., Darcy, R., Larsen, K. L. and Pedersen, L. H. 2005. Thermolysin catalyses the synthesis of cyclodextrin esters in DMSO. Tetrahedron: Asymmetry. 16(3): 615-622.

Sadrmomtaz, A. and Asghari, M. 2015. comparable studies on the stability of proteases from Pseudomonas aeruginosa against thermolysin from Bacillus thermoproteolyticus in the presence of organic solvents. Molecular and Cellular Researches (Iranian Journal of Biology). 28(4): 560-567. [in persian]

Silen, J. L. and Agard, D. A. 1989. The αlytic protease pro-region does not require a physical linkage to activate the protease domain in vivo. Nature. 341(6241): 462-464.

Silva, C., Martins, M., Jing, S., Fu, J. and Cavaco-Paulo, A. 2018. Practical insights on enzyme stabilization. Critical Reviews in Biotechnology. 38(3): 335-350.

Varasteh, A. 2017. The effect of calcium on the activation of thermolysin by salt. Journal of Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology). 30(1): 100-105. [in Persian]

Zhu, X., Ohta, Y., Jordan, F. and Inouye, M. 1989. Pro-sequence of subtilisin can guide the refolding of denatured subtilisin in an intermolecular process. Nature. 339(6224): 483-484.

Food Engineering Research/Vol.21/No.73/Autumn & Winter 2022/P: 91-103

Journal Home page: https://fooder.areeo.ac.ir/

Original Research

Investigation of the Effect of Carboxymethyl Cellulose (CMC), Alcohol, and Temperature on Thermolysin Enzyme Stability

Fatemeh Ghamari*, Amir Agheli kohne shahri, Yaghob Pazhang

Assistant professor Department of science payam-e-noor university, P.O.Box 19395-4697,Tehran,Iran.
fatemehghamari@outlook.com
Received:20 May 2021 Accepted: 23 May 2023
http://doi: 10.22092/FOODER.2023.354142.1306

Abstract

Thermolysin enzyme is a heat-resistant metalloproteinase enzyme that binds (EC 3.4.24.4) a peptide containing hydrophobic amino acids leucine and phenylalanine. This enzyme`s immobilization is very important. Enzyme immobilization enhances the stability and reuse of the enzyme, improves its properties, and facilitates the enzyme readiness of the product. In order to study the adsorption in the presence of ethanol, different concentrations of ethanol were investigated with enzymes. To investigate the presence of CMC, the enzyme was mixed with different percentages of CMC solution, and the casein (substrate) was mixed with different amounts. The effect of CMC and alcohol on the enzymatic solution of CMC was obtained. The effects of CMC and alcohol were investigated. The effect of CMC 2%, 4%, 6%, 8%, and 10% with 1% casein on the enzyme was investigated. In this study, it was shown that thermolysin increases activity and stability against temperature rise and then decreases at very high temperatures, and alcohol causes enzyme instability. CMC increases the activity and stability of the thermolysin enzyme, but the presence of CMC can also increase the stability and resistance of the enzyme to alcohol. CMC has been shown to stabilize thermolysin.

Keywords: Alcohol, CMC, Enzyme Stability, Thermolysin