



## تثبیت آنزیم پروتئاز *Penaeus vanamei* بر روی نانولوله‌های کربنی و بررسی فعالیت و پایداری آن

پیمان دهقان<sup>۱</sup>، احمد همایی<sup>۲\*</sup>

تاریخ دریافت: تیر ۹۵

تاریخ پذیرش: شهریور ۹۵

### چکیده

پسماند صنعت آبزیان غنی از پروتئین بوده و بهترین راه بدست آوردن این مواد آلی استفاده از آنزیم‌های پروتئاز است. از این رو، انتخاب یک پروتئاز مقاوم از یک گونه آبی و استفاده از یک بستر مناسب برای تثبیت و استفاده طولانی مدت آن بسیار با اهمیت است. در این پژوهش پروتئاز خالص شده از میگوی *Penaeus vanamei* روی نانولوله‌های کربنی چندجداره (MWCNTs) تثبیت شد. پس از فعال کردن نانولوله‌ها با اسید نیتریک، به منظور اتصال الکترواستاتیک آنزیم به آن، محلول پروتئینی با غلظت ۷mg/mL به نانولوله‌ها اضافه شد و محلول به دست آمده به مدت ۴ ساعت در دمای ۱۰°C انکوبه شد. بعد از ۳ بار شستشو با بافر فسفات (pH ۷/۵)، نانوانزیم در ۱mL بافر فسفات حل شد. بر اساس نتایج به دست آمده، تثبیت آنزیم روی بستر نانولوله‌های کربنی، پایداری طولانی مدت، پایداری حرارتی و پایداری در pH های بحرانی را به میزان قابل توجهی بهبود بخشید. دمای بهینه آنزیم تثبیت شده از ۶۰ به ۸۰°C افزایش یافت و pH بهینه تغییری نکرد. شاخص‌های سینتیکی آنزیم ( $k_{cat}$  و  $K_m$ ) نیز در هنگام تثبیت دستخوش تغییر شدند. این نتایج نشان می‌دهد که از آنزیم پروتئاز *Penaeus vanamei* تثبیت شده بر روی نانولوله‌های کربنی چندجداره، به دلیل پایداری بالا، می‌توان برای کاربردهای بیوتکنولوژی استفاده کرد.

**واژگان کلیدی:** تثبیت، آنزیم پروتئاز، میگوی *Penaeus vanamei*، نانولوله‌های کربنی چندجداره.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست‌شناسی دریا، گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.

۲- استادیار گروه بیوشیمی، دانشکده علوم، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.

\* نویسنده مسئول: [a.homaei@hormozgan.ac.ir](mailto:a.homaei@hormozgan.ac.ir)

## مقدمه

تنوع ژنتیکی، شرایط مساعدی برای فعالیت آنزیم‌ها در آبزیان در مقایسه با پستانداران، گیاهان و میکروارگانیسم‌ها فراهم شده است که از این میان می‌توان به فعالیت بالای آنزیم‌ها در pH و دماهای مختلف اشاره کرد (Klomklao, 2008).

گوناگونی کاربرد آنزیم‌های پروتئاز باعث شده است تا یافتن روش‌های جدید و کارا برای تثبیت این دسته از آنزیم‌ها که در کنار حفظ فعالیت آنزیم بر میزان پایداری آن نسبت به شاخص‌های فیزیکی مانند pH و دما می‌افزاید، همواره برای پژوهشگران جالب باشد و گروه‌های پژوهشی وابسته به مراکز دانشگاهی و صنعتی را در کشورهای مختلف به بررسی و پژوهش در این زمینه وادارد (Bolivar et al., 2016; Mehta et al., 2016).

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 پایبند و تحرک آن‌ها را محدود کرد که به طور پیوسته قابل استفاده باشند (Homaei and

محیط‌های آبی، به دلیل داشتن گونه‌های متعدد آبی، ظرفیت بالایی برای کشف و تولید فرآورده‌های زیستی مختلف مانند آنزیم‌ها دارند. در سال‌های اخیر مطالعات گسترده‌ای روی آنزیم‌های موجود در گونه‌های کم‌مصرف آبی و ضایعات ناشی از فرآوری دیگر آبزیان انجام گرفته و باعث پیدایش حوزه جدیدی برای استفاده از آن‌ها در صنایع مختلف شده است (Sila et al., 2012; Zeinali et al., 2015). یکی از این آنزیم‌ها، آنزیم خالص‌سازی شده از میگوی *Penaeus vanamei* است با خاصیت کاتالیتیکی بالا، ویژگی سوبسترای با دامنه وسیع و توانایی بالای پروتئولیز است (Dadshahi et al., 2016). آنزیم پروتئاز خالص شده از میگوی *Penaeus vanamei* با توجه به ویژگی‌های منحصر به فرد، می‌تواند کاربردهای فراوانی در زمینه‌های پزشکی، صنایع غذایی و دارویی، محیط زیست، دباغی، تولید شوینده‌ها، صنایع ابریشم، عکاسی، تصفیه پساب، پنیرسازی، فرآوری گوشت، صابون‌سازی و تولید چسب داشته باشد (Choi et al., 2015; Meireles et al., 2016).

با توجه به شرایط محیطی متفاوت آبزیان و سازگاری آن‌ها با محیط اطراف خود، همراه با

تثبیت موفقیت‌آمیز مواد آلی و غیرآلی مختلفی بر روی نانولوله‌های کربنی گزارش شده است. از مواد غیرآلی تثبیت شده بر روی نانولوله‌های کربنی می‌توان به تثبیت نانوذرات آهن به منظور سم‌زدایی فاضلاب (Guodong et al., 2016) و تثبیت نانوذرات نقره روی نانولوله‌های کربنی که دارای خواص ضدباکتریایی حائز اهمیتی است، اشاره کرد (Yan et al., 2016).

در ارتباط با تثبیت مواد آلی به ویژه آنزیم‌ها بر روی نانولوله‌های کربنی، می‌توان به تثبیت آنزیم‌های لاکاز و سلولاز اشاره کرد که با حفظ قابل ملاحظه فعالیت آنزیمی و پایداری pH، دارای پایداری دمایی و ساختاری- عملکردی بود (Pedrosa et al., 2010; Mubarak et al., 2014). همچنین تثبیت آنزیم  $\alpha$ - آمیلاز روی نانولوله‌های کربنی تک‌جداره با کارایی سینتیکی بالا (Han et al., 2010) و تثبیت آنزیم زایلاناز بر روی نانولوله‌های کربنی چندجداره دارای ۹۹٪ فعالیت اولیه آنزیم پس از فرآیند تثبیت (Shweta et al., 2008) گزارش شده است.

ویژگی‌های سطح نانولوله‌های کربنی چندجداره می‌تواند فعل و انفعالات جذبی بین آنزیم و نانولوله کربنی را به طور قابل توجهی تحت تاثیر قرار می‌دهد، به طوری که با تنظیم

Etemadipour, 2015; Homaei and (Saberi, 2015).

در فرآیند تثبیت آنزیمی، آنزیم به یک ماده نگهدارنده نامحلول یا بستر متصل می‌شود یا در داخل آن قرار می‌گیرد و سپس به طور پیوسته در یک راکتور از آن استفاده می‌شود. در بعضی موارد به جای عبارت «آنزیم‌های تثبیت شده» از عبارت‌هایی مانند «آنزیم‌های نامحلول» و «آنزیم‌های متصل به بستر» نیز استفاده می‌شود (Ezhil et al., 2014; Xiaoyan et al., 2016). تثبیت آنزیمی، افزون بر مزیت پایداری آنزیم، امکان استفاده دوباره از آنزیم و نگهداری آن را در واکنشگر فراهم می‌کند (Altinkaynak et al., 2016).

امروزه علاقه به پژوهش در زمینه تثبیت آنزیم افزایش یافته است، از طرفی، استفاده از آنزیم‌های تثبیت شده در بسیاری از فرآیندها موفقیت‌آمیز بوده است (Silva et al., 2013). در این بین نانولوله‌های کربنی، بسترهای بسیار کارایی برای تثبیت آنزیمی هستند که به دلیل داشتن سطح وسیع و پایداری مکانیکی که ویژگی‌های مهم برای فرآیند تثبیت هستند باعث بهبود عملکرد آنزیم‌های تثبیت شده می‌شوند (Chengdong et al., 2013; Alan et al., 2014; Ran et al., 2015). تا کنون

بدین منظور ۲۵µL از استوک آنزیمی ۷mg/mL پروتئاز *Penaeus vanamei* به ۱۷۵µL بافر فسفات ۵۰mM با pH ۷/۵ اضافه شد. سپس محلول به دست آمده به نسبت ۱:۱ با کازئین ۱٪ مخلوط شد (۲۰۰µL کازئین). بعد از مخلوط کردن محلول آنزیمی با کازئین ۱٪، زمان‌های مختلف آنکوباسیون آنزیم-سوبسترا از ۵ تا ۳۰ دقیقه امتحان شد. بهترین زمان که ۱۰ دقیقه بود برای آزمایش‌های بعدی استفاده شد. در این روش به همراه هر نمونه یک شاهد (Blank) نیز گذاشته شد. ترکیب شاهد دقیقاً مانند نمونه بود فقط به جای آنزیم، بافر اضافه شد و از آن برای صفر کردن اسپکتروفتومتر (Ultraspec 3000, Pharmacia Biotech, آمریکا) در طول موج ۲۸۰nm استفاده شد. پس از سپری شدن ۱۰ دقیقه، هم حجم نمونه یعنی ۴۰۰µL تری‌کلرواستیک اسید ۱۰٪ به آن اضافه شد. بعد از گذشت نیم ساعت این ترکیب با دور ۱۲۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ (Hettich, EBA21, آلمان) شد و بعد از صفر کردن دستگاه، جذب مایع رویی در طول موج ۲۸۰nm توسط اسپکتروفتومتر خوانده شد. به منظور محاسبه فعالیت آنزیمی بر حسب واحد بین‌المللی آنزیمی (IU) منحنی استاندارد تیروزین رسم شد (یک واحد آنزیمی، مقدار

فضایی و ویژگی‌های سطح نانولوله، قابلیت اتصال آنزیم می‌تواند تنظیم شود و فعالیت زیستی بهبود یابد (Gomez et al., 2005; Chengdong et al., 2013). بهبود عملکرد آنزیم تثبیت شده را می‌توان به افزایش رسانایی الکتریکی و ریزمحیط زیست‌سازگار منتسب دانست که توسط نانولوله‌های کربنی چندجداره فراهم می‌شود (Ran et al., 2015).

در این پژوهش تلاش شده تا با صرف هزینه کم و روشی مناسب توانایی تثبیت آنزیم پروتئاز خالص شده از میگوی *Penaeus vanamei* را بر روی نانولوله‌های کربنی چندجداره در کنار حفظ فعالیت بر میزان پایداری آنزیمی افزود.

#### مواد و روش‌ها

آنزیم پروتئاز خالص شده از میگوی *Penaeus vanamei* توسط دادشاهی و همکاران (Dadshahi et al., 2016) و سایر مواد لازم از شرکت مرک تهیه شد که همگی خلوص تحقیقاتی داشتند و نیازی به خالص‌سازی نبود.

#### سنجش آنزیمی *Penaeus vanamei* پروتئاز و تعیین غلظت پروتئین

برای سنجش آنزیمی پروتئاز *Penaeus vanamei* از روش End-point استفاده شد.

سپس به مدت ۳۰ دقیقه سونیکیت شد. محلول نانولوله‌های کربنی پراکنده شده به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰rpm سانتریفوژ شد و بعد از دور ریختن محلول رویی، رسوب سه مرتبه با بافر فسفات با pH ۸ شستشو داده شد.

حجمی از نانولوله‌های کربنی که مورد نیاز بود برداشته و ۱/۵ تا ۲ برابر حجم نانولوله به آن استوک آنزیمی با غلظت ۷mg/mL افزوده شد. سپس مخلوط آنزیم- نانولوله به مدت ۴ ساعت روی، هم‌زن مغناطیسی در دمای ۴°C گذاشته شد. پس از ته‌نشین شدن نانولوله، محلول رویی برداشته شد و نانولوله چندین بار با بافر فسفات ۵۰mM با pH ۷/۵ شستشو و در یک میلی‌لیتر بافر فسفات حل شد. مایع رویی نیز به روش برادفورد با استوک اولیه ۷mg/mL پروتئاز *Penaeus vanamei* مقایسه شد.

#### تعیین بازده فعالیت آنزیم و بازده تثبیت

به منظور ارزیابی میزان فعالیت آنزیم تثبیت شده و همچنین کارایی روش تثبیت، ابتدا ۱/۵mL از استوک آنزیمی ۷mg/mL پروتئاز *Penaeus vanamei* تهیه شد. در مرحله بعد ۷۵۰μL از آن برداشته شد و در دمای ۴°C نگهداری شد. ۷۵۰μL باقیمانده نیز به نانولوله فعال اضافه شد. بعد از گذاشتن مخلوط آنزیم-

آنزیمی است که ۱μmol تیروزین- به عنوان استاندارد- را در یک دقیقه آزاد می‌کند). به این ترتیب که ابتدا غلظت‌های متفاوت و متوالی از ۰ تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تیروزین در محلول ۱ نرمال اسید کلریدریک تهیه شد. برای رسم منحنی استاندارد تیروزین از اسید کلریدریک ۰/۰۰۶ نرمال به عنوان شاهد استفاده شد. پس از ثبت جذب محلول‌های استاندارد تیروزین و نمونه‌های آنزیمی در طول موج ۲۸۰nm، یک منحنی استاندارد رسم شد و با استفاده از شیب خط منحنی، واحد آنزیمی محاسبه شد.

#### سنجش آنزیم پروتئاز *Penaeus vanamei*

تثبیت شده شبیه آنزیم آزاد است با این تفاوت که مخلوط آنزیم- سوبسترا در طول زمان واکنش آنزیمی (۱۰ دقیقه) باید روی هم‌زن (مدل SKIR-601، شرکت Fine Tech، کره جنوبی) قرار گیرد تا توزیع سوبسترا در فاز تثبیت شده یکسان باشد. در نهایت، برای تعیین غلظت کل پروتئین از روش برادفورد استفاده شد.

#### فعال کردن نانولوله‌های کربنی و اتصال آنزیم به بستر

ابتدا یک میلی‌گرم نانولوله کربنی چندجداره در یک و نیم میلی‌لیتر اسید نیتریک حل شد و

اثر pH روی فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده طبق روش ارائه شده برای تعیین فعالیت آنزیمی به روش End-point، فعالیت نسبی آنزیم تثبیت شده و آزاد در pHهای مختلف در دمای آزمایشگاه تعیین شد. ابتدا بافر مختلط (Mixed Buffer) به صورت تازه به این ترتیب تهیه شد: مخلوطی از ۲۰۰mM تریس- باز، گلیسین، سدیم فسفات و سدیم استات که با استفاده از محلولهای NaOH و یا HCl در pHهای مختلف (۲ تا ۱۲) تنظیم شد. کارئین ۱٪ به عنوان سوبسترا نیز در آب مقطر تهیه شد. سپس آنزیم در بافر با pHهای مختلف سنجش شد. بنابراین، غلظت بافر در محیط سنجش ۱۰۰mM بود.

اثر درجه حرارت روی فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده

در این آزمایش pH ثابت اما درجه حرارت محیط سنجش متغیر بود (بین ۲۰ تا ۱۰۰°C و در بافر فسفات ۵۰mM با pH ۷/۵). باید توجه داشت که به منظور سنجش فعالیت آنزیمی در هر دما، ابتدا باید سوبسترا (کازینین ۱٪) و محلول آنزیمی (آنزیم و بافر) هر دو در آن دما به تعادل برسند، سپس فعالیت آنزیمی مورد سنجش قرار

نانونوله روی هم‌زن مغناطیسی به مدت ۴ ساعت، مایع رویی آن برداشته شد و به روش برادفورد و سنجش آنزیمی با استوک اولیه آنزیمی (۷۵۰ μL) که در دمای ۴°C نگهداری شده بود) مقایسه شد. میزان آنزیم اتصال یافته (تثبیت شده) را می‌توان طبق رابطه ۱ با کم کردن غلظت استوک اولیه آنزیمی از غلظت مایع رویی به دست آورد.

رابطه ۱:

$$C_{I.E.} = C_i - C_s$$

C<sub>I.E.</sub>: میزان آنزیم تثبیت شده؛ C<sub>i</sub>: غلظت استوک اولیه آنزیمی؛ C<sub>s</sub>: غلظت مایع رویی غلظت.

در نهایت با به دست آوردن فعالیت استوک اولیه آنزیمی، مایع رویی و آنزیم تثبیت شده با کمک رابطه‌های ۲ و ۳ کارآیی روش تثبیت و فعالیت باقیمانده آنزیمی (فعالیت آنزیم بعد از تثبیت) محاسبه شد.

رابطه ۲:

$$I.Y.(%) = [M_E(mg) - M_{A.E.}(mg)] / M_E(mg)$$

I.Y.: کارآیی تثبیت؛ M<sub>E</sub>: مقدار آنزیم اضافه شده؛ M<sub>A.E.</sub>: مقدار آنزیم جذب نشده.

رابطه ۳:

$$A.Y.(%) = B/A \times 100$$

A.Y.: فعالیت باقیمانده آنزیمی؛ A: فعالیت استوک آنزیمی؛ B: فعالیت آنزیم تثبیت شده.

گردد. با استفاده از معادله آرنیوس (رابطه ۴) انرژی فعال‌سازی آنزیم ( $E_a$ ) محاسبه شد.

رابطه ۴:

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

$k$ : ثابت سرعت واکنش؛  $T$ : دما (درجه کلونین)؛  $E_a$ : انرژی فعال‌سازی؛  $A$ : پیش فاکتور؛  $R$ : ثابت گازها.

### بررسی پایداری آنزیم در pHهای اسیدی و بازی

در این روش آنزیم در زمان‌های مختلف در بافر مختلط با pHهای ۳ و ۱۲ انکوبه شد. سپس محلول آنزیمی با افزودن بافر مختلط با pH مناسب در دمای آزمایشگاه به pH ۷/۵ رسانده شد و فعالیت نسبی نمونه‌ها اندازه‌گیری شد (نسبت به فعالیت زمان صفر انکوباسیون که عبارت بود از نمونه آنزیمی انکوبه شده در بافر مختلط با pH ۷/۵).

### بررسی غیرفعال شدن حرارتی برگشت ناپذیر آنزیم

ابتدا محلول‌های آنزیمی در بافر فسفات ۵۰ mM با pH ۷/۵ تهیه و در دماهای مختلف انکوبه شدند. نمونه‌ها در فواصل زمانی مشخص برداشته شدند و بلافاصله به یخ منتقل شدند. پس از نیم ساعت نمونه‌ها از یخ خارج شده فعالیت نسبی آن‌ها در دمای محیط اندازه‌گیری

### تعیین شاخص‌های سینتیکی ( $V_{max}$ و $K_m$ )

شاخص‌های سینتیکی آنزیم آزاد و تثبیت شده با استفاده از سوبسترای کازئین با نسبت‌های صفر تا یک درصد وزنی به دست آمدند. استفاده از درصد وزنی کازئین خطا را تا حد زیادی کاهش می‌دهد و محلول تهیه شده با دقت بیشتری ایجاد می‌شود. در محاسبات نهایی این درصدها به میکرومولار کازئین در حجم مخلوط آزمایش تبدیل شدند و شاخص‌های سینتیکی از رسم و بررسی منحنی میکائیلیس-منتن به دست آمد. فعالیت آنزیم در غلظت‌های مختلف کازئین در شرایط معمول با رسم منحنی استاندارد تیروزین (بر حسب  $\mu\text{mol/mL}$ ) محاسبه شد.

در این پژوهش برای جلوگیری از غیرفعال شدن آنزیم پروتئاز *Penaeus vanamei* در اثر هضم خود به خودی، سعی شد که کلیه مراحل تثبیت و سنجش آنزیمی در زمان کوتاه انجام شود و هر بار محلول آنزیمی تازه تهیه شد. از طرف دیگر، با توجه به پایداری نسبی پروتئاز *Penaeus vanamei* در مقایسه با سایر پروتئازها (Dadshahi et al., 2016) و این احتمال که افزودن بازدارنده‌های پروتئاز در

بررسی فاکتورهای مورد نظر اشکال ایجاد کند، همه بررسی‌ها در این پژوهش بدون حضور بازدارنده‌های پروتئاز انجام شد.

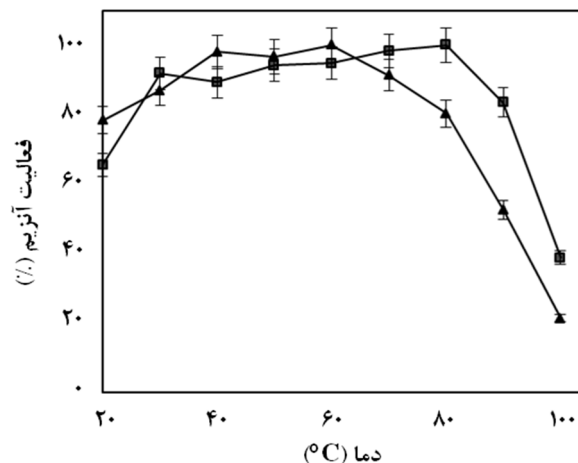
## نتایج

### بازده فعالیت آنزیم و بازده تثبیت

کارایی اتصال تثبیت آنزیمی (میزان پروتئین اتصال یافته) به ازای هر میلی‌گرم نانولوله کربنی چندجداره فعال و استوک آنزیمی  $7\text{mg/mL}$  در محلول فسفات  $50\text{mM}$  با  $\text{pH } 7/5$  (نسبت حجمی  $1:1/5$ ) برابر با  $4/2$  میلی‌گرم پروتئین در میلی‌لیتر نانولوله کربنی و بازده فعالیت آنزیم و بازده تثبیت به ترتیب در حدود  $61\%$  و  $78\%$  بود.

اثر درجه حرارت روی فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده

تاثیر درجه حرارت روی فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده در شکل ۱ آورده شده است. درجه حرارت بهینه آنزیم آزاد  $60^\circ\text{C}$  بود. در دمای بالاتر از  $70^\circ\text{C}$  فعالیت آنزیم دچار یک افت ناگهانی شد، به طوری که در دمای  $100^\circ\text{C}$  آنزیم آزاد فقط  $20\%$  از فعالیت بیشینه خود را حفظ کرد. بیشینه فعالیت آنزیم تثبیت شده در دمای  $80^\circ\text{C}$  بود ( $20^\circ\text{C}$  جابه‌جایی در بهینه درجه حرارت). همچنین در دمای  $100^\circ\text{C}$ ، آنزیم تثبیت شده  $40\%$  فعالیت بیشینه خود را حفظ کرد، در حالی که آنزیم آزاد تنها  $20\%$  از فعالیت بیشینه را در این دما نشان داد.



شکل ۱: اثر درجه حرارت بر فعالیت آنزیم آزاد (▲) و تثبیت شده (■)

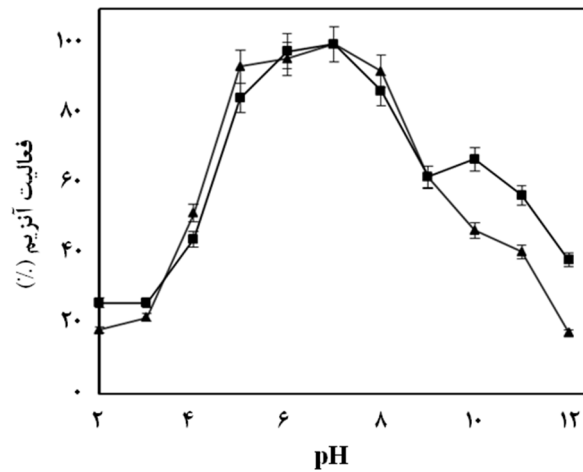


منحنی آرنیوس و محاسبه انرژی فعال‌سازی انرژی فعال‌سازی برای آنزیم آزاد و تثبیت شده در محدوده دمایی ۲۰ تا ۶۰°C با رسم منحنی آرنیوس و معادله خط آن محاسبه شد. این مقدار برای آنزیم آزاد ۶/۴ kcal/mol.k و برای آنزیم تثبیت شده ۸/۷ kcal/mol.k به دست آمد.

اثر pH بر فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده اثر pHهای مختلف روی فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده در شکل ۲ نشان داده شده است. بیشینه فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده در محدوده pH بین ۶ تا ۷/۵ بود. فعالیت آنزیم

آزاد از pH ۱۰ به بعد دچار افت شدیدی شد به طوری که در pH ۱۲ آنزیم آزاد تنها ۱۸٪ فعالیت اولیه خود را حفظ کرد. در حالی که pH بهینه آنزیم تثبیت شده ۷ بود و در pHهای ۶ تا ۱۱ دارای فعالیت بالایی بود. همچنین آنزیم تثبیت شده در pH ۱۲، ۴۰٪ فعالیت اولیه خود را حفظ کرد.

غیرفعال شدن حرارتی برگشت‌ناپذیر آنزیم نتایج حاصل از بررسی غیرفعال شدن حرارتی برگشت‌ناپذیر آنزیم که در دمای ۸۰°C در بافر مختلط ۲۰۰mM با pH ۷/۵ انجام شد در شکل ۳ نشان داده شده است.



شکل ۲: اثر pH بر فعالیت آنزیم آزاد (▲) و تثبیت شده (■)

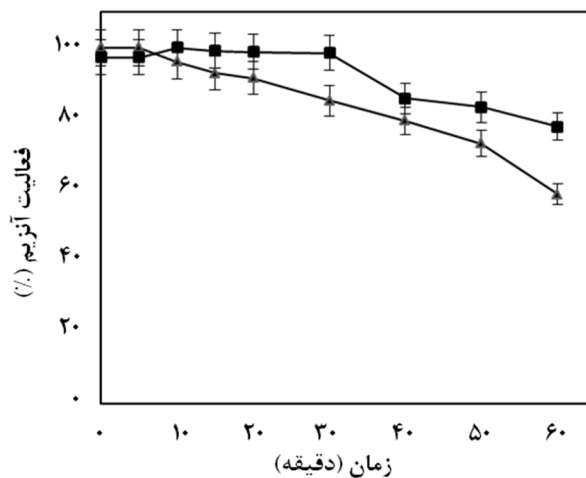
انکوباسیون دمایی، فعالیت آنزیم آزاد به حدود ۳۰٪ رسید. همانند دمای  $80^{\circ}\text{C}$ ، با سپری شدن زمان انکوباسیون، آنزیم تثبیت شده فعالیت خود را حفظ کرد، به طوری که بعد از ۱۰ دقیقه از انکوباسیون دمایی، آنزیم تثبیت شده ۶۰٪ و بعد از ۶۰ دقیقه ۵۵٪ فعالیت اولیه خود را حفظ کرد.

#### بررسی پایداری آنزیم آزاد و تثبیت شده در pH های اسیدی و بازی

پایداری آنزیم آزاد و تثبیت شده در pH ۳ و pH ۱۲ مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت (غیرفعال شدن برگشتناپذیر در pH اسیدی و بازی).

در دمای  $80^{\circ}\text{C}$  با افزایش زمان انکوباسیون از میزان فعالیت آنزیم آزاد کاسته شد و بعد از انکوباسیون دمایی به مدت ۶۰ دقیقه فعالیت آنزیم آزاد تقریباً به نصف رسید. در حالی که با سپری شدن زمان انکوباسیون، آنزیم تثبیت شده فعالیت خود را به میزان قابل توجهی حفظ کرد. بعد از گذشت ۳۰ دقیقه از انکوباسیون دمایی، آنزیم تثبیت شده ۱۰۰٪، بعد از ۴۰ دقیقه ۹۰٪ و بعد از ۶۰ دقیقه ۸۵٪ فعالیت اولیه خود را حفظ کرد.

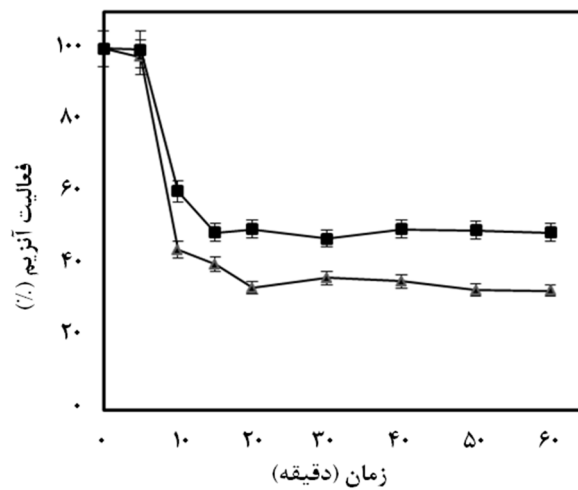
بررسی غیرفعال شدن حرارتی برگشتناپذیر آنزیم در دمای  $90^{\circ}\text{C}$  (شکل ۴) نیز نشان داد که میزان کاهش فعالیت آنزیم آزاد بسیار سریع‌تر از دمای  $80^{\circ}\text{C}$  بود. بعد از گذشت ۶۰ دقیقه از



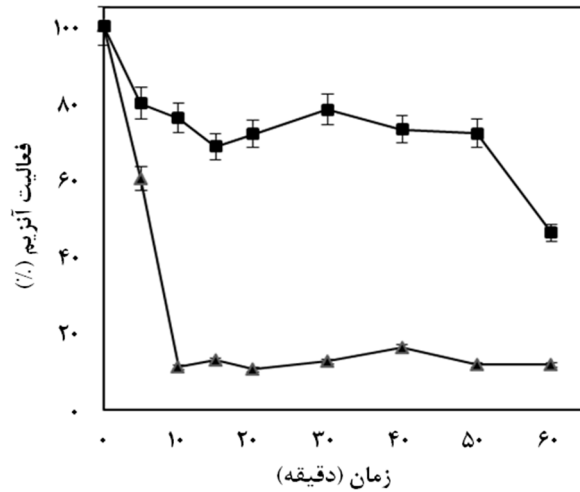
شکل ۳: غیرفعال شدن حرارتی برگشتناپذیر آنزیم آزاد (▲) و تثبیت شده (■) در دمای  $80^{\circ}\text{C}$

در pH ۳ با افزایش زمان انکوباسیون، فعالیت آنزیم آزاد کاهش محسوسی را نشان داد. برای آنزیم آزاد، پس از ۶۰ دقیقه از زمان انکوباسیون ۱۰٪ فعالیت اولیه آن قابل برگشت بود. در همین شرایط آنزیم تثبیت شده نسبت به آنزیم آزاد شرایط اسیدی را بهتر تحمل می‌کرد. پس از ۳۰ دقیقه ۸۰٪ و پس از ۶۰ دقیقه ۵۵٪ فعالیت اولیه آنزیم تثبیت شده قابل برگشت بود (شکل ۵).

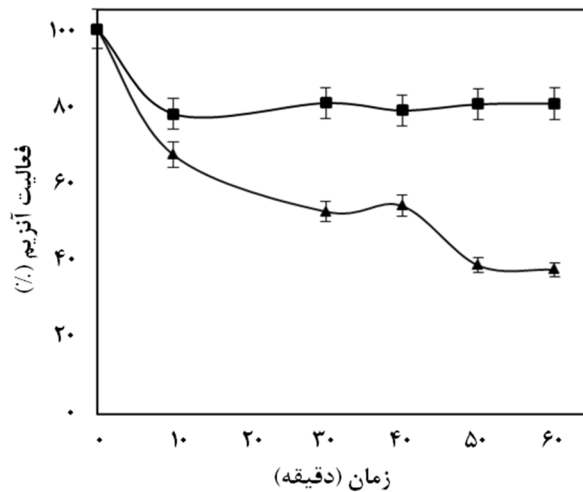
در pH ۱۲ نیز با افزایش زمان انکوباسیون، فعالیت آنزیم آزاد کاهش یافت (شکل ۶). برای آنزیم آزاد، پس از ۳۰ دقیقه از زمان انکوباسیون ۴۰٪ و پس از ۶۰ دقیقه ۵۵٪ فعالیت اولیه آن قابل برگشت بود. در شرایط مشابه آنزیم تثبیت شده نسبت به آنزیم آزاد شرایط بازی را بهتر تحمل می‌کرد. به طوری که پس از ۶۰ دقیقه ۸۰٪ فعالیت اولیه آن قابل برگشت بود.



شکل ۴: غیرفعال شدن حرارتی برگشت‌ناپذیر آنزیم آزاد (▲) و تثبیت شده (■) در دمای ۹۰°C



شکل ۵: بررسی پایداری آنزیم آزاد (▲) و تثبیت شده (■) در pH ۳

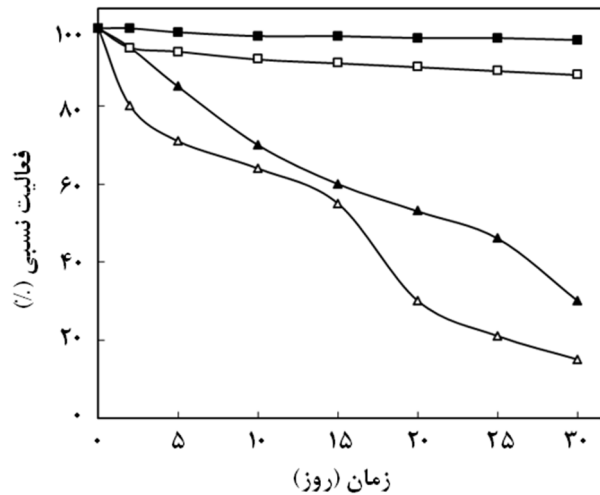


شکل ۶: بررسی پایداری آنزیم آزاد (▲) و تثبیت شده (■) در pH ۱۲

تعیین پایداری طولانی مدت آنزیم آزاد و تثبیت شده  
 شده به مدت ۳۰ روز در دمای ۴°C و دمای آزمایشگاه (۲۵°C) تحت شرایط استاندارد و به  
 پایداری طولانی مدت آنزیم آزاد و تثبیت شده  
 طور همزمان اندازه‌گیری شد. همان طور که از

شکل ۷ آشکار است، میزان کاهش فعالیت آنزیم آزاد محسوس بود و با گذشت زمان کاهش چشمگیری نسبت به همتای تثبیت شده خود نشان داد. بعد از انکوباسیون زمانی، به مدت ۲۰ روز در دمای  $25^{\circ}\text{C}$  و ۳۰ روز در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  فعالیت آنزیم آزاد به ۳۰٪ فعالیت اولیه خود رسید. در همین شرایط آنزیم تثبیت شده با حفظ پایداری، فعالیت خود را به میزان قابل توجهی نسبت به حالت اولیه حفظ کرد و بعد از انکوباسیون زمانی، به مدت ۳۰ روز بیش از ۹۰٪ فعالیت اولیه خود را حفظ کرد.

محاسبه شاخص‌های سینتیکی آنزیم آزاد و تثبیت شده  
 شاخص‌های سینتیکی آنزیم آزاد و تثبیت شده در غلظت‌های مختلف کارژین مورد ارزیابی و مطالعه قرار گرفت. برای به دست آوردن مقادیر عددی  $K_m$  و  $V_{max}$  آنزیم آزاد و تثبیت شده، منحنی میکائلیس- منتن آن‌ها رسم شد. نتایج حاکی از آن بود که تثبیت آنزیم سبب افزایش  $K_m$  و کاهش کارایی کاتالیتیک ( $k_{cat}/K_m$ ) آنزیم تثبیت شده نسبت به همتای آزاد آن شد (جدول ۱).



شکل ۷: بررسی پایداری طولانی مدت آنزیم آزاد (مثلث) و تثبیت شده (مربع) در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  (توپر) و دمای اتاق (توخالی)

جدول ۱: شاخص‌های سینتیکی آنزیم پروتئاز *Penaeus vanamei* آزاد و تثبیت شده

$k_{cat}/K_m$	$K_m$ ( $\mu M$ )	$k_{cat}$ ( $min^{-1}$ )	$V_{max}$ ( $\mu M \cdot min^{-1}$ )	
۲/۳۱	۱۶/۰±۵/۴	۳۸/۰±۲/۶	۸۲/۰±۳/۸	آنزیم آزاد
۲/۰۰	۱۷/۰±۸/۵	۳۵/۰±۷/۲	۷۵/۰±۶/۳	آنزیم تثبیت شده

## بحث

دمایی ۲۰ تا ۶۰°C از طریق رسم منحنی آرنیوس محاسبه شد که برای آنزیم آزاد  $6/4 kcal \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$  و برای آنزیم تثبیت شده برابر با  $8/7 kcal \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$  بود که نشان می‌داد ساختار آنزیم تثبیت شده سخت‌تر و انعطاف‌پذیری آن کمتر شده است. بررسی اثر تغییرات دما بر روی سرعت واکنش‌های آنزیمی اطلاعات چندانی در مورد مکانیسم واکنش کاتالیز آنزیمی در اختیار قرار نداد اما این اثرات در تشخیص تغییرات ساختاری آنزیم و فعالیت آن بسیار ارزشمند است (Li et al., 2016; Sojitra et al., 2016). بر طبق معادله آرنیوس با افزایش دما یک افزایش نمایی در سرعت واکنش آنزیمی به وجود می‌آید (Bayramoglu et al., 2016). در مورد آنزیم آزاد، هنگامی که دما از حد خاصی بگذرد آنزیم ساختار فشرده سه بعدی خود را که برای فعالیت کاتالیتیک آن ضروری است از دست می‌دهد. در دماهای بالاتر از ۶۰°C آنزیم آزاد به سرعت غیرفعال می‌شود. اما آنزیم تثبیت

بررسی فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده در دماهای مختلف نشان داد که دمای بهینه آنزیم تثبیت شده ۲۰ درجه سانتی‌گراد نسبت به آنزیم آزاد افزایش داشت. البته در دیگر پژوهش‌ها هم افزایش دمای بهینه پس از تثبیت آنزیم گزارش شده است (Homaei, 2015). اما در برخی پژوهش‌های مشابه، تثبیت آنزیم بر روی نانولوله کربنی، دمای بهینه تغییری نکرد (Mubarak et al., 2014). در مطالعه حاضر در دمای ۹۰°C آنزیم آزاد ۵۲ درصد از فعالیت خود را حفظ کرد اما آنزیم تثبیت شده در دمای ۸۰°C، ۱۰۰ درصد و در دمای ۹۰°C بیش از ۸۳ درصد از فعالیت اولیه خود را حفظ کرد که این موضوع بسیار حائز اهمیت است و در هیچ یک از پژوهش‌های قبلی گزارش نشده بود. این افزایش پایداری حرارتی آنزیم پروتئاز *Penaeus vanamei* تثبیت شده به لحاظ کاربردهای صنعتی بسیار ارزشمند است. انرژی فعال‌سازی آنزیم آزاد و تثبیت شده در محدوده

الکترواستاتیک سبب افزایش قابل ملاحظه‌ای در پایداری حرارتی آنزیم تثبیت شده نسبت به همتای آزاد آن می‌شود. پایداری حرارتی حاصل شده در اثر فرآیند تثبیت اغلب ناشی از سختی و انعطاف‌ناپذیری ملکولی و نیز ایجاد یک محیط حفاظت شده است. همچنین اثرات 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 نانولوله‌های کربنی چندجداره است که اندازه بهینه منافذ این بستر، پایداری و فعال بودن آنزیم تثبیت شده را به دنبال داشته است (NurRoyhaila et al., 2015; Ana et al., 2015). دلیل دیگر افزایش پایداری حرارتی آنزیم تثبیت شده کاهش میزان آب در فاز تثبیت شده است. از آنجایی که آب نقش مهمی در برهم‌کنش‌های هیدروفوب دارد، دستکاری طبیعت محیط و مقدار آب اطراف آنزیم اثری عمیقی 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 پایدارسازی پروتئین‌ها در محلول‌های آبی است، می‌شود (Pieroni Vaz et al., 2016).

شده به علت وجود ریزمحیط، کمتر تحت تاثیر درجه حرارت قرار می‌گیرد (Homaei et al., 2014).

نتایج حاصل از بررسی‌های غیرفعال شدن حرارتی برگشت‌ناپذیر در دماهای ۸۰ و ۹۰°C نشان داد که هر چه از زمان انکوباسیون آنزیم آزاد می‌گذشت، فعالیت آنزیم کاهش بیشتری می‌یافت. بعد از گذشت یک ساعت از زمان انکوباسیون در دمای ۸۰°C، آنزیم آزاد ۶۰٪ فعالیت اولیه خود را حفظ کرد. اما در مورد آنزیم تثبیت شده، نکته ارزنده در این پژوهش آن بود که بعد از گذشت یک ساعت از زمان انکوباسیون، آنزیم تثبیت شده در حدود ۸۰٪ از فعالیت اولیه خود را حفظ کرد. همچنین بررسی پایداری طولانی مدت آنزیم آزاد و تثبیت شده، بیانگر افزایش قابل ملاحظه پایداری حرارتی آنزیم تثبیت شده نسبت به همتای آزاد آن بود. آنزیم آزاد بعد از ۲۰ روز در دمای ۴°C و ۳۰ روز در دمای ۲۵°C (دمای اتاق) در حدود ۷۰٪ فعالیت خود را از دست داد. در همین شرایط آنزیم تثبیت شده بعد از ۳۰ روز با حفظ پایداری، حدود ۹۰٪ فعالیت بیشینه خود را حفظ کرد.

این نتایج حاکی از آن بود که تثبیت آنزیم پروتئاز *Penaeus vanamei* به روش

وقتی پروتئین‌ها برای مدت زمان طولانی در دماهای بالا قرار می‌گیرند ساختمان آن‌ها دچار فرآیند باز شدن حرارتی می‌شود 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 (Verhaeghe et al., 2016). این فرآیندهای شیمیایی در دماهای بالا بسیار سریع انجام می‌گیرند و اغلب باعث غیرفعال شدن‌هایی مانند دامیناسیون زیرواحدهای آسپاراژین و گلوتامین، هیدرولیز پیوندهای پپتیدی در زیرواحدهای آسپارتیک اسید، تخریب پیوندهای دی‌سولفیدی، اکسیداسیون سیستئین، ایزومریزاسیون پرولین و گلایکوزیله شدن گروه‌های آمین می‌شوند (Fagain, 1995; Vieille and Zeikus, 2001). انجام تمام فرآیندهای ذکر شده به دلیل آن که مستلزم وجود آب است، در محیط‌های فاقد آب مانند فاز تثبیت شده رخ نمی‌دهند. علاوه 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 (Rehman

et al., 2016; Sampaio et al., 2016). در pHهای بالا و پایین فعالیت آنزیم آزاد بسیار کاهش یافت. در حالی که آنزیم تثبیت شده در pHهای ۳ و ۱۲ در مقایسه با آنزیم آزاد فعالیت چشمگیری را از خود نشان داد. در مطالعه حاضر، pH بهینه آنزیم تثبیت شده و آزاد ۷ بود. عدم تغییر pH بهینه پس از تثبیت توسط دیگر پژوهشگران نیز گزارش شده بود (Mubarak et al., 2014). در pH ۱۲ آنزیم تثبیت شده ۳۸ درصد از فعالیت اولیه خود را حفظ کرد و در مقابل، آنزیم آزاد تنها ۱۷ درصد از فعالیت خود را حفظ کرد. همچنین فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده در pHهای بحرانی ۳ و ۱۲ با گذشت زمان نشان داد که آنزیم تثبیت شده پس از گذشت یک ساعت در pH ۳، ۴۶ درصد از فعالیت خود را حفظ کرد که در مقایسه با آنزیم آزاد که تنها ۱۲ درصد از فعالیت خود را حفظ کرده بود، بسیار قابل توجه است.

بررسی مقایسه‌ای پایداری آنزیم آزاد و تثبیت شده در pH اسیدی (pH ۳) و قلیایی (pH ۱۲) نشان داد که آنزیم تثبیت شده نسبت به همتای آزاد آن در برابر pHهای بحرانی پایدارتر است. در مطالعه حاضر، با گذشت زمان انکوباسیون فعالیت آنزیم آزاد کاهش پیدا کرد و بعد از گذشت یک ساعت از



این وضعیت در پژوهش حاضر با تغییر در ثابت‌های سینتیکی آشکار شده است. از موارد بارز این پژوهش تغییر سرعت بیشینه واکنش آنزیمی است. در شرایط یکسان سرعت ماکزیمم پروتئاز *Penaeus vanamei* تثبیت شده کمتر از مورد مشابه برای آنزیم محلول بود. ثابت میکائیلیس که بیانگر تمایل آنزیم به سوبسترای کازئین است نسبت به همتای آزاد آن افزایش پیدا کرد. تغییر ثابت‌های سینتیکی به دلایل مختلف از جمله تغییر در جایگاه فعال آنزیم در طی فرآیند تثبیت آنزیمی و تاثیر در اتصال سوبسترا به آنزیم تثبیت شده به علت ممانعت فضایی ناشی می‌شود (Antony et al., 2016; Basak et al., 2016).

در نهایت می‌توان ادعا کرد که حاصل این پژوهش ارائه راهکاری جدید برای بهینه‌سازی تثبیت آنزیم پروتئاز *Penaeus vanamei* به منظور استفاده طولانی مدت آن در صنعت است که به طور موفقیت‌آمیزی منجر به افزایش پایداری آنزیم تثبیت شده نسبت به فرم آزاد آن شده است که در مورد این آنزیم تا به حال انجام نشده بود.

زمان انکوباسیون در pH ۳ فعالیت آنزیم آزاد به ۱۰٪ فعالیت اولیه رسید. در همین شرایط آنزیم تثبیت شده نسبت به آنزیم آزاد شرایط اسیدی و قلیایی را بهتر تحمل می‌کرد. با گذشت زمان میزان کاهش فعالیت آنزیم تثبیت شده چندان محسوس نبود. بعد از سپری شدن یک ساعت از زمان انکوباسیون، آنزیم تثبیت شده در pH ۱۲ حدود ۸۰٪ فعالیت اولیه خود را حفظ کرد. فعالیت آنزیم تثبیت شده در pH ۱۲ پس از گذشت یک ساعت در مقایسه با فعالیت آنزیم آزاد در شرایط مشابه بسیار بالا بود. به طوری که آنزیم تثبیت شده پس از یک ساعت قرارگیری در بافر مختلط با pH ۱۲ هنوز ۸۰٪ از فعالیت خود را حفظ کرد که در مقایسه با آنزیم آزاد که در این دما ۳۸ درصد فعالیت داشت، بسیار قابل توجه است. نتایج به دست آمده از این بررسی می‌تواند آغازی برای پژوهش‌های گسترده‌تر در زمینه استفاده از آنزیم‌های پروتئاز در محیط‌هایی با دماها و pHهای بحرانی در صنعت باشد.

تثبیت آنزیم تقریباً همیشه فعالیت کاتالیزوری آن را کاهش می‌دهد (Wahba et al., 2016; Pieroni Vaz et al., 2016)

## منابع

- Alan C., Chenbo D., Fanke M., Jeremy H., Gabriela P., Nianqiang W. and Cerasela Z. 2014.** Enzyme catalytic efficiency: A function of bio-nano interface reactions. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 6: 5393–5403.
- Altinkaynak C., Tavlasoglu S., Ozdemir N. and Ocoy I. 2016.** A new generation approach in enzyme immobilization: Organic-inorganic hybrid nanoflowers with enhanced catalytic activity and stability. *Enzyme and Microbial Technology*, 93: 105–112.
- Ana T., Claudia S., Goran D., Adrian S., Jose L. and Joaquim F. 2015.** Laccase immobilization over multi-walled carbon nanotubes: Kinetic, thermodynamic and stability studies. *Journal of Colloid and Interface Science*, 454: 52–60.
- Antony N., Balachandran S. and Mohanan P.V. 2016.** Immobilization of diastase  $\alpha$ -amylase on nano zinc oxide. *Food Chemistry*, 211: 624–630.
- Basak Y.D., Asli B.C., Dilek Z., Vezir K., Ayse O. and Serap D. 2016.** Preparation and characterization of sol-gel hybrid coating films for covalent immobilization of lipase enzyme. *Journal of Molecular Catalysis B*, 127: 18–25.
- Bayramoglu G., Akbulut A. and Arica M.Y. 2016.** Immobilization of tyrosinase on modified diatom biosilica: Enzymatic removal of phenolic compounds from aqueous solution. *Journal of Hazardous Materials*, 244: 528–536.
- Bolivar J.M., Eisl I. and Nidetzky B. 2016.** Advanced characterization of immobilized enzymes as heterogeneous biocatalysts. *Catalysis Today*, 259: 66–80.
- Chengdong Z., Shuiming L. and Wei C. 2013.** Activity of catalase adsorbed to carbon nanotubes: Effects of carbon nanotube surface properties. *Talanta*, 113: 142–147.
- Choi J.M., Han S.S. and Kim H.S. 2015.** Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnology Advances*, 33: 1443–1454.
- Dadshahi Z., Homaei A., Zeinali F., sajadi R. and Khajeh K. 2016.** Extraction and purification of a highly thermostable alkaline caseinolytic protease from wastes *Litopenaeus vanamei* suitable for food and detergent industries. *Food Chemistry*, 202: 110–115.
- Ezhil V., Veerappan M., Shen-Ming C., Bose D. and Sheng-**

- Tung H.** 2014. The immobilization of glucose oxidase at manganese dioxide particles-decorated reduced graphene oxide sheets for the fabrication of a glucose biosensor. *Industrial Engineering Chemistry Research*, 53: 15582–15589.
- Fagain C.O.** 1995. Understanding and increasing protein stability, Review article. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1252(1): 1–14.
- Gomez M. Romero M. and Fernandez T.** 2005. Immobilization of  $\beta$ -glucosidase on carbon nanotubes. *Catalysis Letters*, 101: 275–278.
- Guodong S., Ahmed A., Wafa S., Shatha M., Jiang S., Xiangke W., Hui L. and Yuying H.** 2016. Enhanced sequestration of selenite in water by nanoscale zero valent iron immobilization on carbon nanotubes by a combined batch, XPS and XAFS investigation. *Carbon*, 99: 123–130.
- Han K., Jae K., Mahn-Joo K. and Cheol J.** 2010. Immobilization of lipase on single walled carbon nanotubes in ionic liquid. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 31: 650–652.
- Homaei A.** 2015. Enhanced activity and stability of papain immobilized on CNBr-activated sepharose. *International Journal of Biological Macromolecules*, 75: 373–377.
- Homaei A. and Etemadipour R.** 2015. Improving the activity and stability of actinidin by immobilization on gold nanorods. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72: 1176–1181.
- Homaei A. and Saberi D.** 2015. Immobilization of  $\alpha$ -amylase on gold nanorods: An ideal system for starch processing. *Process Biochemistry*, 50: 1394–1399.
- Homaei A., Barkheh H., Sariri R. and Stevanato R.** 2014. Immobilized papain on gold nanorods as heterogeneous biocatalysts. *Amino Acids*, 46: 1649–1657.
- Klomkiao S.** 2008. Digestive proteinases from marine organisms and their applications. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 30(1): 37–46.
- Li W., Wen H., Shi Q. and Zheng G.** 2016. Study on immobilization of (+)  $\gamma$ -lactamase using a new type of epoxy graphene oxide carrier. *Process Biochemistry*, 51: 270–276.
- Mehta J., Bhardwaj N., Bhardwaj S.K., Kim K.H. and Deep A.** 2016. Recent advances in enzyme immobilization techniques: Metal-organic frameworks as novel substrates. *Coordination Chemistry Reviews*, 322: 30–40.

- Meireles A., Borges A., Giaouris E. and Simoes M. 2016.** The current knowledge on the application of anti-biofilm enzymes in the food industry. *Food Research International*, 86: 140–146.
- Mubarak N.M., Wong J.R., Tan K.W., Sahuc J.N., Abdullah E.C., Jayakumar N.S. and Ganesan P. 2014.** Immobilization of cellulase enzyme on functionalized multiwall carbon nanotubes. *Journal of Molecular Catalysis B*, 107: 124–131.
- NurRoyhaila M., Nor A.B., Naji A.M., Joazaizulfazli J., Fahrul H., Hassan Y.A. and Roswanira A.W. 2015.** Simple adsorption of *Candida rugosa* lipase onto multi-walled carbon nanotubes for sustainable production of the flavor ester geranyl propionate. *Journal of Industrial and Engineering*, 32: 99–108.
- Pedrosa V.A., Paliwal S., Balasubramanian S., Nepal D., Davis V. and Wild J. 2010.** Enhanced stability of enzyme organophosphate hydrolase interfaced on the carbon nanotubes. *Colloids and Surfaces B*, 77: 69–74.
- Pieroni Vaz R., Moreira L. and Filho E. 2016.** An overview of holocellulose-degrading enzyme immobilization for use in bioethanol production. *Journal of Molecular Catalysis B*, 133: 127–135.
- Ran X., Rongzhi T., Qijun Z., Fengting L. and Bingru Z. 2015.** Enhancement of catalytic activity of immobilized laccase for diclofenac biodegradation by carbon nanotubes. *Chemical Engineering Journal*, 262: 88–95.
- Rehman S., Haq Bhatti N., Bilal M. and Asgher M. 2016.** Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of *Penicillium notatum* lipase enzyme with improved activity, stability and reusability characteristics. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91: 1161–1169.
- Sampaio L., Padrao J., Faria J., Silva J.P., Silva C.J., Dourado F. and Zille A. 2016.** Laccase immobilization on bacterial nanocellulose membranes: Antimicrobial, kinetic and stability properties. *Carbohydrate Polymers*, 145: 1–12.
- Shweta S. and Gupta M.N. 2008.** Simultaneous refolding, purification and immobilization of xylanase with multi-walled carbon nanotubes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1784: 363–367.
- Sila A., Nasri R., Bougateg A. and Nasri M. 2012.** Digestive alkaline proteases from the goby (*Zosterisessor ophiocephalus*): Characterization and potential application as detergent additive and in the deproteinization of shrimp wastes. *Journal of Aquatic*

- Food Product Technology, 21: 118–133.
- Silva M.F., Rigo D., Mossi V., Dallago R.M., Henrick P., Kuhn G.O., Rosa C.D., Oliveira D., Oliveira J.V. and Treichel H. 2013.** Evaluation of enzymatic activity of commercial inulinase from *Aspergillus niger* immobilized in polyurethane foam. Food and Bioproducts Processing, 91: 54–59.
- Sojitra U.V., Nadar S.S. and Rathod V.K. 2016.** A magnetic tri-enzyme nanobiocatalyst for fruit juice clarification. Food Chemistry, 213: 296–305.
- Verhaeghe T., Vlaemynck G., Block J.D., Van Weyenberg S., Braeckman R. and Hendrickx M. 2016.** Kinetics of heat induced muscle protein denaturation of brown shrimp (*Crangon crangon*). Journal of Food Engineering, 191: 88–94.
- Vieille C. and Zeikus G.J. 2001.** Hyperthermophilic Enzymes: Sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 65(1): 1–43.
- Wahba M. 2016.** Treated calcium pectinate beads for the covalent immobilization of  $\beta$ -D-galactosidase. International Journal of Biological Macromolecules, 91: 877–886.
- Xiaoyan Z., Yuanyuan J., Zaijun L., Zhiguo G. and Guangli W. 2016.** Improved activity and thermostability of the horse radish peroxidase with graphene quantum dots and its application in fluorometric detection of hydrogen peroxide. Spectrochimica Acta A, 165: 106–113.
- Yan X., Li S., Bao J., Zhang N., Fan B., Li R., Liu X. and Pan Y.X. 2016.** Immobilization of highly dispersed Ag nanoparticles on carbon nanotubes using electron-assisted reduction for antibacterial performance. ACS Applied Materials and Interfaces, 8: 17060–17067.
- Zeinali F., Homaei A. and Kamrani E. 2015.** Sources of marine superoxide dismutases: Characteristics and applications. International Journal of Biological Macromolecules, 79: 627–637.



## Immobilization of *Penaeus vanamei* protease on carbon nanotubes and investigation of its activity and stability

Peyman Deghan<sup>1</sup>, Ahmad Homaei<sup>2\*</sup>

Received: July 2016

Accepted: September 2016

### Abstract

Aquatic industrial waste is rich in protein and the best way to reach this organic material is using a protease enzyme. Therefore, the selection of a resistant protease from an aquatic species and using a suitable substrate for immobilization is very important. In this study, the purified protease from shrimp *Penaeus vanamei* was immobilized on multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs). After activating MWCNTs with nitric acid, in order to binding of enzyme to MWCNTs, enzyme solution with concentration of 7mg/mL was added to MWCNTs and incubated at 10°C for 4 hours. After three washing with phosphate buffer (pH 7.5), the nano-enzyme was dissolved in 1mL of phosphate buffer. Based on the results, the enzyme immobilizations on the MWCNTs enhance significantly the stability to temperature and extreme pH values. The optimum temperature of immobilized enzyme increased from 60 to 80°C and optimum pH did not change. The kinetic indexes of the enzyme ( $K_m$  and  $k_{cat}$ ) changed during the immobilization. These results indicate that immobilized *Penaeus vanamei* protease on MWCNTs could be used for biotechnological applications due to the high stability.

**Key words:** Immobilization, Protease Enzyme, *Penaeus vanamei* Shrimp, Multi-walled Carbon Nanotubes.

1- M.Sc. Student in Marine Biology, Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, Hormozgan University, Bandar Abbas, Iran.

2- Assistant Professor, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Hormozgan University, Bandar Abbas, Iran.

\*Corresponding Author: [a.homaei@hormozgan.ac.ir](mailto:a.homaei@hormozgan.ac.ir)