مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال دوازدهم، شماره 4، زمستان 1396، صفحات 110-103

تثبیت آنزیم اینولیناز حاصل از *آسپرژیلوس نایجر* بر روی نانوپپتیدهای مغناطیسی هیدرولیزات گلوتنی گندم با هدف تولید شربت پرفروکتوز

آسیه محمودی[1]، هما ترابی زاده[2]

1- کارشناسی ارشد مهندسی کشاورزی، گرایش علوم و صنایع غذایی، پژوهشکده کشاورزی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران
2- نویسنده مسئول: استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، پژوهشکده فناوری‌های شیمیایی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران
پست الکترونیکی: htoraby@alumni.ut.ac.ir

تاریخ دریافت: 95/6/11 تاریخ پذیرش: 95/10/4

چکیده

سابقه و هدف: آنزیم اینولیناز آسپرژیلوس نایجر هیدرولیز کننده اینولین بوده و در تهیه شربت پرفروکتوز مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این تحقیق، آنزیم اینولیناز از طریق ایجاد پیوند کووالانسی بر روی نانوذرات مغناطیسی هیدرولیزات گلوتنی گندم تثبیت گردید. این روش تثبیت، از نظر افزایش انتقال جرم به دلیل کاهش اندازه ذرات و افزایش سطح و در نتیجه بازدهی بیشتر فرآورده نهایی همچنین، بازیابی آنزیم تثبیت شده توسط میدان مغناطیسی از محیط واکنش و امکان استفاده مجدد از آنزیم دارای اهمیت است.

مواد و روش‌ها: در ابتدا نانوپپتیدهای هیدرولیزات گلوتنی با روش حلال زدایی و نانوذرات مغناطیسی Fe_3O_4 به روش هم رسوبی تهیه شدند. سپس سطح نانوذرات مغناطیسی توسط نانوپپتیدهای تهیه شده پوشش داده شد و آنزیم اینولیناز از طریق پیوند کووالانسی بروی آن تثبیت گردید. ویژگی‌های ساختاری و عملکردی نانوذرات تهیه شده و آنزیم تثبیت شده با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری در ناحیه UV/VIS و میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی تعیین گردید.

یافته‌ها: مورفولوژی نانوذرات مغناطیسی بشکل کروی و نانوپپتیدهای گلوتنی بصورت کروی و رشته‌های کوتاه نشان داده شد. فاکتورهای سینتیکی آنزیم تثبیت شده در مقایسه با آنزیم آزاد بهبود یافته و میزان بارگذاری آنزیم بر روی نانوپپتیدهای مغناطیسی حامل 74% محاسبه گردید. آنزیم اینولیناز تثبیت شده پس از 12 سیکل پی در پی آبکافت، 70% از فعالیت اولیه خود را حفظ نمود. نیمه عمر آنزیم تثبیت شده در دمای 60 درجه سانتی گراد در مقایسه با آنزیم آزاد حدود 1/5 برابر افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: استفاده از نانوپپتیدهای مغناطیسی هیدرولیزات گلوتنی گندم جهت تثبیت آنزیم اینولیناز، روشی کارآمد همراه با افزایش پایداری و بهبود عملکرد آنزیم به منظور تهیه شربت پرفروکتوز می‌باشد.

واژگان کلیدی: نانوپپتیدها، آنزیم اینولیناز، تثبیت کووالانسی، هیدرولیزات گلوتن گندم، نانوذرات مغناطیسی

• مقدمه

آنزیم‌های اینولیناز شامل اگزو 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، که بتا- فروکتان فروکتانو هیدرولاز می‌باشند اینولین را آبکافت 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. استفاده از آنزیم اینولیناز این امکان را فراهم کرده است تا بتوان شربت خالص پرفرکتوز را به صورت یک فرآیند تک مرحله ای آنزیمی از اینولین به جای استفاده از روش آنزیمی چند مرحله ای از نشاسته تولید نمود (1).

آبکافت صنعتی اینولین به جهت کاهش بار میکروبی و افزایش حلالیت اینولین و درنتیجه استفاده از غلظت‌های بالاتر اینولین معمولا در دماهای بالا حدود 50-60°C صورت می‌گیرد. بنابراین انتظار می‌رود که آنزیم آبکافت کننده اینولین مقاوم به حرارت بوده تا بتواند عملکرد خود را در فرآیندهای غذایی و شیمیایی جهت تولید شربت پرفروکتوز

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-10-05]

بخوبی حفظ نماید. بنابراین یکی از مهمترین روش‌های افزایش مقاومت حرارتی آنزیم اینولیناز، تثبیت از طریق ایجاد پیوندهای کووالانسی با ماده حامل (بستر) می‌باشد (2). علاوه بر این دلایل متعدد دیگری برای تثبیت آنزیم وجود دارد که از جمله می‌توان به آسان شدن به کارگیری و استفاده مجدد از آنزیم در فرآیند ها، امکان بهتر جداسازی آنزیم از محصول تولید شده و کاهش غلظت پروتئین در محصول تهیه شده و قابلیت بکارگیری آنزیم تثبیت شده در بیورآکتورهای با سیستم مداوم، پایداری به واسرشت حرارتی، حلال‌های آلی و اتولیز اشاره نمود (2). آنزیم‌ها مولکول‌های نسبتا حساسی هستند و می‌توانند به راحتی ساختار سوم خود را که برای فعالیت‌شان ضروری است، به دلیل تغییر ساختار از دست بدهند. عملکرد آنزیم تثبیت شده با افزایش پایداری در دامنه گسترده تری از pH و دما و نیز تحمل حلال‌های آلی بهبود می‌یابد. این عوامل در باز بکارگیری و استفاده مجدد از آنزیم و در نتیجه افزایش راندمان کاتالیتیکی آن (کیلوگرم محصول تولید شده نسبت به کیلوگرم آنزیم به کار گرفته شده در واکنش) مؤثر و وابسته است (3). تثبیت آنزیم از طریق متصل شدن آنزیم به ماده حامل می‌تواند به صورت کووالانت انجام گیرد. این روش جز گروه تثبیت‌های برگشت ناپذیر است که بیشترین استفاده را در تثبیت آنزیم‌ها دارا می‌باشد. پایداری پیوند تشکیل شده بین آنزیم و بستر از مزیت‌های اصلی این نوع تثبیت است (3). به دلیل وجود پیوندهای قوی کووالانسی از رها شدن آنزیم در محیط واکنش جلوگیری می‌گردد(4). در حال حاضر تثبیت آنزیم بر روی نانومواد مانند نانوپلیمرها، نانوفیبرها و نانوذرات بسیار مورد توجه قرار گرفته است. در واقع کاهش اندازه آنزیم متصل به حامل، بازده تثبیت را بهبود می‌بخشد. علاوه بر این درمورد اتصالات سطحی، ذرات کوچک تر سطح بزرگ‌تری را جهت اتصال آنزیم و بار گذاری آنزیم بر واحد جرم ذرات ایجاد می‌کنند. بازیافت نانومواد و آنزیم تثبیت شده اغلب محدودیتی را ایجاد می‌کند اما، استفاده از نانوذرات مغناطیسی به علت امکان جمع‌آوری 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 (5). روش اصلاح سطح نانوذرات مغناطیسی 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 (6). در این تحقیق، با استفاده از روش هم رسوبی نانوذرات مغناطیسی عاملدار شده با نانوپپتیدهای حاصل از هیدرولیز آنزیمی گلوتن گندم با اندوپپتیدازها، همراه با آنزیم اینولیناز در محیط حلال اتانل به کمک عامل ایجاد اتصالات جانبی (گلوتارآلدئید) در مقیاس نانو تثبیت گردید و در نهایت ویژگی‌های نانوذرات، کارایی و نحوه عملکرد آنزیم تثبیت شده مورد ارزیابی قرار گرفت. استفاده از نانوپپتیدهای حاصل از هیدرولیزات‌های گلوتن گندم جهت انجام این نوع تثبیت تا کنون در دنیا انجام نگرفته و جزء نوآوری‌های این تحقیق بشمار می‌رود.

• مواد و روش‌ها

مواد: آنزیم اینولیناز ساخت شرکت سیگما آلدریچ امریکا، اینولین حاصل از ریشه کاسنی با فرمول مولکولی $(C_6H_{10}O_5)n$ و جرم مولکولی نسبی 5000 دالتن ساخت شرکت فلوکای آمریکا استفاده شدند. هیدرولیزات گلوتنی گندم با استفاده از آنزیم‌های اندوپپتیداز آلکالاز و نوتراز با جرم مولکولی متوسط 35-45 کیلو دالتن، تهیه شده در پژوهشکده فناوری‌های شیمیایی، گروه صنایع غذایی. معرف ۵،۳ دی نیترو سالیسیلیک اسید با فرمول $C_{7H4N2O7}$ از شرکت سیگما آلدریچ آمریکا تهیه شد. سایر مواد شامل نمک‌های آهن دو و سه ظرفیتی شامل $FeCl_2.4H_2O$ و $FeCl_3.6H_2O$، تارتارات مضاعف سدیم پتاسیم (نمک راشل)، گلوترآلدهید 25% (حجمی/حجمی در آب)، توین80، دی سدیم هیدروژن فسفات، سدیم دی هیدروژن فسفات، استات سدیم، سولفیت سدیم، اسید هیدروکلریک، اسید فسفریک، هیدروکسیدسدیم، استن، اسید استیک و اتانول 96 درجه از نوع آزمایشگاهی بوده و از نمایندگی‌های شرکت مرک آلمان در ایران خریداری شد. 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. اندازه ذرات در فاز مایع با روش Dynamic light scattering (DLS) و توسط دستگاه BI-200 SM Goniometer Version 2 ساخت شرکت Brookhaven Instrument Corp امریکا تعیین گردید. پراکنش نور توسط نانوذرات در 173° با پراکنش نور لیزر دینامیک تعیین شد. علاوه بر آن، پتانسل زتا (Ζ-potential) با استفاده از روش DLS به منظور تعیین میزان پایداری نانوذرات در برابر تجمع اندازه‌گیری شد.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-10-05]

پوشش‌دهی نانوذرات مغناطیسی با نانوپپتیدهای هیدرولیزات گلوتنی و تثبیت آنزیم اینولیناز بر روی آنها: نانوپپتیدهای هیدرولیزات گلوتنی با غلظت 0/1 % (w/v) با روش حلال زدایی و نانوذرات مغناطیسی Fe_3O_4 به روش هم رسوبی با نسبت استوکیومتری 1 به 2 از Fe^{2+} به Fe^{3+} تهیه شدند. در ابتدا محلول 25 میلی‌لیتر بافر فسفات با pH 7/4، حاوی 0/06 گرم نانوذرات مغناطیسی و 0/05 گرم نانوساختار هیدرولیزات گلوتنی همراه با نسبت معین گلوتارآلدهید تهیه شد و به مدت 10 دقیقه تحت تاثیر امواج اولتراسونیک قرار گرفت. سپس واکنش به مدت 24 ساعت تحت هم زدن ملایم در دمای اتاق ادامه یافت. سپس 4 میلی‌لیتر آنزیم اینولیناز بر اساس میزان پروتئین موجود به محلول اضافه شد. محلول حاصل به مدت 24 ساعت با سرعت ملایم در دمای 4°C جهت انجام واکنش همزده شد. سپس مخلوط تهیه شده در سه مرحله با بافر فسفات در pH ، 7 شستشو داده شد. پس از شستشو با بافر فسفات و سانتریفیوژ با سرعت 17172×g محلول بالایی را از ترکیب ته نشین شده جدا شد و جهت تعیین میزان پروتئین با روش برادفورد آماده گردید.

تعیین میزان پروتئین با روش براد فورد: جهت تعیین غلظت پروتئین آنزیم، از روش سنجش کمی برادفورد استفاده شد. روش کار بدین ترتیب بود که 100µl از محلول پروتئینی (محلول شامل 100µl آنزیم اینولیناز همراه با 1000µl بافر سدیم استات) به 5 ml محلول معرف بیوراد اضافه گردید و با ایجاد ورتکس نمونه‌ها کاملاً یکنواخت شد. پس از مدت 10 دقیقه نگهداری در دمای اتاق میزان جذب نمونه‌ها در مقیاسه با نمونه کنترل (نمونه بدون آنزیم) در طول موج 595 nm تعیین گردید. نمودار استاندارد پروتئین سرم آلبومین گاوی به عنوان پروتئین استاندارد استفاده شد(7).

تعیین میزان فعالیت آنزیم با روش DNS : فعالیت آنزیم اینولیناز با اندازه‌گیری میزان فروکتوز تولید شده از اینولین توسط آنزیم با استفاده از روش دی نیترو سالیسیلیک اسید (DNS) محاسبه شد(8). در این روش 1000µl محلول شفاف (1w/v%) اینولین و آنزیم اینولیناز (100µl) در 9000 میکرولیتر محلول بافر استات سدیم pH، 6 با هم ترکیب شده و واکنش هیدرولیز در pH، 6 و دمای 39-40^{0}C در مدت زمان 60- 0 دقیقه انجام گرفت. پس از خاتمه هیدرولیز به 500µl از محلول واکنش در زمان‌های مختلف آبکافت، 500 µl یعنی حجم مساوی از محلول DNS اضافه شد و به مدت 10 دقیقه در حمام آب با دمای 95-90°C حرارت داده شد تا رنگ زرد تا قهوه ای در محلول ایجاد شود. سپس محلول حاصل از آبکافت سرد گردید و به میزان (یک سوم حجم DNS) محلول 40% پتاسیم سدیم تارتارات جهت تثبیت رنگ به محلول اضافه شد. پس از آن میزان جذب محلول هیدرولیز شده در طول موج 575 nm در مقایسه با شاهد (بدون آنزیم) اندازه‌گیری شد (8).

تعیین پارامترهای سینتیکی: پارامترهای سینتیکی واکنش آبکافت اینولین توسط آنزیم تثبیت شده و آنزیم آزاد یعنی K_m (غلظتی از سوبسترا که در آن غلظت سرعت واکنش 1/2 سرعت بیشینه است) و V_{max} تعیین گردید. برای تعیین پارامترهای سینتیکی غلظت**های** مختلف از سوبسترای اینولین تهیه گردید، سپس به همراه 100 میکرولیتر آنزیم در بافر استات سدیم با pHبرابر با 6، در زمان بهینه فعالیت آنزیم آبکافت انجام گرفت. سپس به وسیله روش DNS مقدار محصول تولید شده در طول موج 575 نانومتر تعیین گردید. پس از آن نمودار غلظت محصول تولید شده نسبت به مدت زمان هیدرولیز رسم شد. سرعت واکنش آنزیمیV با استفاده از شیب خط به دست آمده برای هر غلظت به طور جداگانه مشخص شد. سپس نمودار لینو-برک (Lineweaver- Burk Plot) براساس عکس غلظت سوبسترا 1/[S] و عکس سرعت واکنش 1/V رسم گردید. در این معادله $C = 1/V_{max}$ بوده یعنی محل تلاقی خط با محور y**ها** برابر با مقدار C و در نتیجه برابر با $1/V_{max}$ است. شیب خط یا m برابر با K_m/V_{max} می‌باشد (9).

تعیین نیمه عمر و بررسی مقاومت حرارتی آنزیم آزاد و تثبیت شده: بررسی پایداری حرارتی آنزیم اینولیناز قبل و پس از تثبیت در دماهای 45، 55 و 65°C صورت گرفت. سینتیک غیرفعال شدن حرارتی آنزیم اینولیناز طبق فرمول (1) محاسبه شد. ثابت سرعت غیر فعال شدن آنزیم (K_{in}) به عنوان شیب رگرسیون خطی در $\ln(A_t/A_0)$ در مقابل زمان در دمای ثابت تعیین شد. علاوه بر این نیمه عمر آنزیم ($t_{1/2}$) یا مدت زمانی که آنزیم 50% فعالیت خود را از دست **می‌**دهد، طبق فرمول (2) محاسبه گردید (10،9).

$$In[A_t] = In[A_0]-K_dt \quad (1)$$

$$t_{1/2}= In\ 2/K_d \quad (2)$$

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-10-05]

اندازه‌گیری میزان بارگذاری آنزیم به داخل نانوذرات: میزان آنزیم تثبیت شده (بارگذاری شده روی نانوذرات حامل) را می‌توان از طریق فرمول محاسبه نمود (11).

$$Q = \frac{(C1-C2)V}{W} \qquad (3)$$

Q = مقدار آنزیم تثبیت شده روی ماده حامل

C_1 = غلظت اولیه آنزیم (mg/ml)

C_2 = غلظت آنزیم باقی مانده در محلول پس از پایان فرآیند تثبیت (mg/ml)

W = وزن مواد حامل (ساپورت)(mg).

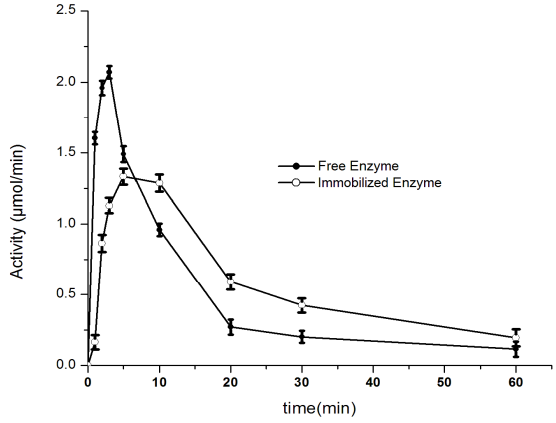
V = حجم کل محلول واکنش

قابلیت استفاده مجدد آنزیم تثبیت شده: قابلیت استفاده مجدد آنزیم تثبیت شده با اندازه‌گیری فعالیت آنزیم بعد از هربار استفاده بررسی می‌گردد. تعیین میزان فعالیت آنزیم تثبیت شده براساس روش DNS به دست می‌آید. تعیین فعالیت به تعداد 15 سیکل پی در پی با مدت زمان هیدرولیز 60 دقیقه اندازه‌گیری شد. در پایان هر سیکل هیدرولیز، نانوذرات مغناطیسی آنزیم تثبیت شده توسط میدان مغناطیسی (آهن ربا) و سانتریفیوژ 11357g از محیط واکنش جداسازی گردید و توسط بافر فسفات با pH برابر 7 شستشو داده شد. در پایان هر سیکل فعالیت باقیمانده در هر سیکل براساس نسبت فعالیت آنزیم به فعالیت آن در سیکل اول بر اساس درصد بیان شد.

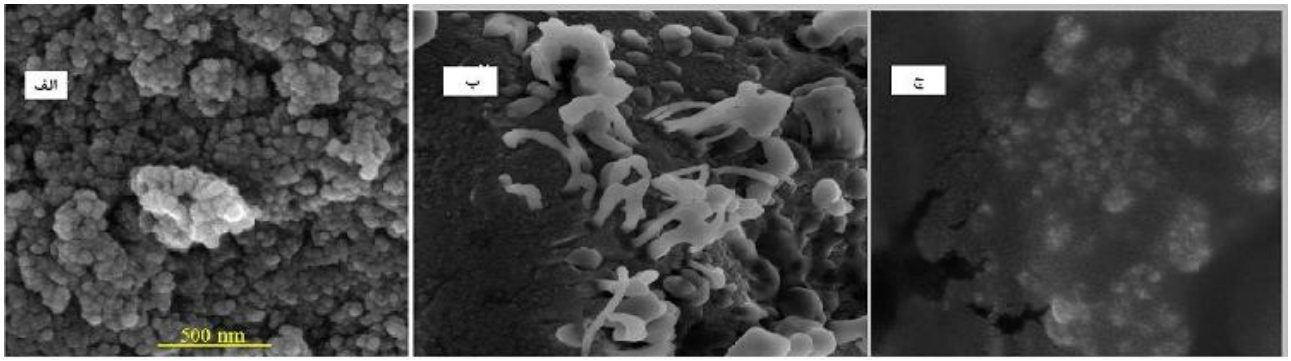
• یافته‌ها

تعیین اندازه نانوذرات پروتئینی با استفاده از روش DLS و بررسی مورفولوژی سطح آنها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی: اندازه ذرات و پتانسیل زتای نمونه‌ها با استفاده از آنالیز Dynamic light scattering (DLS) تعیین شد. متوسط اندازه ذرات هیدرولیزات گلوتنی 150 نانومتر به دست آمد. پتانسیل زتای آن نیز 27- میلی ولت تعیین گردید که نشان از پایداری بالای محصول نسبت به تجمع و آگلومره شدن داشت. بررسی تصویر میکروسکوپ الکترونی نانوذرات نشان داد که آنزیم به صورت ذراتی شفاف بر روی نانوذرات مغناطیسی هیدرولیزات گلوتنی تثبیت شده و نتایج حاصل از DLS را تأیید نمود (شکل1).

تعیین میزان فعالیت آنزیم اینولیناز آزاد و تثبیت شده طی آبکافت سوبسترای اینولین: بیشترین فعالیت آنزیم آزاد در زمان 3 دقیقه بود درحالیکه بیشترین فعالیت آنزیم تثبیت شده در بازه زمانی 10-5 دقیقه مشاهده شد. (شکل 2) بر اساس نمودار فعالیت آنزیم تثبیت شده، اختلاف معنی‌دار بین زمان‌های t=5s و t=10s مشاهده نشده است بنابراین می‌توان گفت آنزیم بیشترین فعالیت خود را در بازه زمانی t=5-10s داشته است.



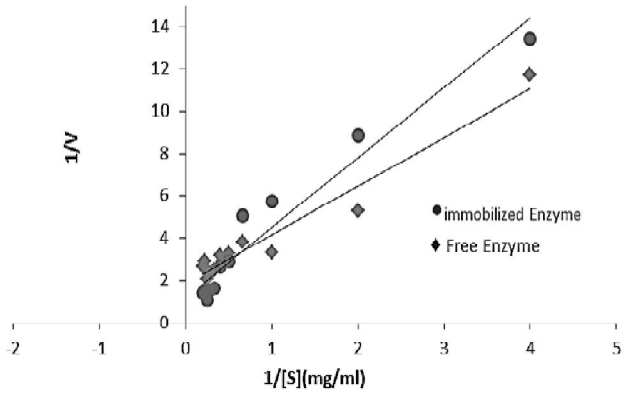
شکل 2. نمودار فعالیت آنزیم اینولیناز آزاد و تثبیت شده



شکل1. تصویر میکروسکپ الکترونی آنزیم تثبیت شده بر روی نانوذرات مغناطیسی عامل دار شده با نانوذرات پروتئینی. الف) نانوذرات مغناطیسی، ب) نانوپپتیدها، ج) آنزیم تثبیت شده روی نانوپپتیدهای مغناطیسی

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-10-05]

بررسی پارامترهای سینتیکی: با استفاده از اعدا مربوط به عکس غلظت سوبسترا 1/[s] و عکس سرعت واکنش 1/[v] نمودار Lineweavre-Burk شکل 6 رسم گردید. نتایج مربوط به محاسبه مقادیر K_m و V_{max} در جدول 1 گزارش شده است. همان طور که در جدول مشاهده می‌شود مقدار V_{max} آنزیم اینولیناز پس از تثبیت از 0/829 به 0/543(میکرومول به ازاء هر دقیقه) و همچنین مقدار K_m از 2/71 به 1/25 (میلی گرم به ازاء هر میلی لیتر) کاهش یافت.



شکل 3. نمودار Lineweavre –Burk مربوط سرعت واکنش آنزیمی در غلظت‌های مختلف سوبسترا

جدول 1. نتایج پارامترهای سینتیکی آنزیم آزادو تثبیت شده

آنزیم اینولیناز	V_{max}(µmol/min)	K_m(mg/ml)
آزاد	0/829	2/71
تثبیت شده	0/543	1/25

مقاومت حرارتی و نیمه عمر آنزیم آزاد و تثبیت شده: ثابت غیرفعال سازی (k_{in}) و نیمه عمر آنزیم در3 دمای 45، 55، 65°C محاسبه شد و در جداول 3 و 2 نشان داده شده است. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که نیمه عمر و مقاومت حرارتی آنزیم تثبیت شده نسبت به نیمه عمر آنزیم آزاد در دماهای 65، 55 و 45 درجه سانتی‌گراد افزایش یافته و نسبت به آنزیم آزاد در دماهای بالا پایدارتر بوده است.

جدول2. ثابت سرعت غیر فعال سازی آنزیم ($\times 10^{-3}$min) K_d در 3 دمای 45، 55، 65 درجه سانتی‌گراد

دما (°C)	65	55	45
آنزیم آزاد	10/9	3/8	3/03
آنزیم تثبیت شده	8/5	3/4	2/7

جدول3. نیمه عمر ($t_{1/2}$) (دقیقه) آزاد و تثبیت شده در در 3 دمای 45، 55، 65 درجه سانتی‌گراد

دما (°C)	65	55	45
آنزیم آزاد	63	181	222/7
آنزیم تثبیت شده	81/5	203/8	256/6

میزان بارگذاری آنزیم بر روی بستر نانوذرات مغناطیسی عامل دار شده با نانوذرات هیدرولیزات گلوتنی: میزان آنزیم متصل شده به نانوذرات پروتئینی با استفاده از مقایسه غلظت اولیه آنزیم با میزان آنزیم باقیمانده در محلول بافر پس از جداسازی ذرات آنزیمی تثبیت شده با سانتریفوژ محاسبه شد. مقدار آنزیم تثبیت شده روی حامل 7/5 (میلی گرم آنزیم در گرم حامل) 74% محاسبه شد.

قابلیت استفاده مجدد آنزیم اینولیناز تثبیت شده: امکان استفاده مجدد از آنزیم همراه با جداسازی آسان از محیط واکنش توأم با بیشترین بازده فعالیت آنزیم جهت کاهش هزینه‌های فرآیند، از اهداف اصلی تثبیت آنزیم می‌باشد. بهمین منظور، قابلیت استفاده مجدد آنزیم اینولیناز تثبیت شده در طی12 سیکل پی در پی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که،آنزیم تثبیت شده 70% از فعالیت اولیه خود را پس از 12 سیکل فعالیت پی در پی حفظ نموده است.

• بحث

در این تحقیق آنزیم اینولیناز حاصل از آسپرژیلوس نیجر بر روی نانوذرات مغناطیسی Fe_3O_4 عامل دار شده با نانوساختار هیدرولیزات پروتئینی با اندازه ذرات 160-100 نانومتر از طریق ایجاد اتصالات کووالانسی تثبیت گردید. اینولیناز تثبیت شده با این روش در محدوده وسیع تری از pH و دمای ایده آل فعالیت داشت که می توان آن را به افزایش پایداری حرارتی و ثبات ساختار آنزیم پس از تثبیت نسبت داد (12). مقدار آنزیم بارگذاری شده بر روی نانوذرات مغناطیسی به میزان 75% تعیین گردید. علاوه بر این، نیمه عمر آنزیم تثبیت شده به میزان 12/3 برابر در دمای 75 درجه سانتی گراد نسبت به نیمه عمر آنزیم آزاد افزایش یافت. همچنین، اینولیناز تثبیت شده به میزان 12 سیکل پی در پی 75% از فعالیت اولیه خود را حفظ نمود. با تثبیت و ساکن شدن آنزیم تا حدودی کاهش فعالیت آنزیم صورت گرفت ولی بر اساس نمودار، آنزیم تثبیت شده در زمان طولانی تری بیشترین فعالیت خود را حفظ کرده و فعالیت پایدارتری نسبت به آنزیم آزاد داشته است. تعیین پارامترهای سینتیکی (V_{max}, K_m)

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-10-05]

آنزیم تثبیت شده در مقایسه با آنزیم آزاد نشان داد که K_m آنزیم تثبیت شده حدود 54% نسبت به K_m آنزیم آزاد کاهش داشته است که نشان دهنده تمایل بیشتر سوبسترا (اینولین) برای اتصال به جایگاه فعال آنزیم و افزایش میزان هیدرولیز سوبسترا توسط آنزیم تثبیت شده می باشد. کاهش محدود V_{max} احتمالاً به علت وجود تغییراتی در بار الکتریکی جایگاه فعال آنزیم بعد از اتصال به حامل بوده که انتقال جرمی سوبسترا و دسترسی آن به جایگاه فعال آنزیم با سرعت کند تری انجام گرفته است (13). به طور کلی کاهش V_{max} در آنزیم تثبیت شده نسبت به آنزیم آزاد بسیار کم بوده و تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهد و می‌توان گفت که تثبیت نمودن آنزیم اینولیناز تاثیر مهمی را بر روی V_{max} آنزیم نداشته است. آنزیم اینولیناز تثبیت شده قادر به تحمل دماهای بالاتر از دمای مطلوب فعالیت خود گردیده بطوریکه بیش از 50% از فعالیت خود را در دمای 65°C حفظ نموده است. با توجه به شکل‌گیری پیوندی پایدار بین آنزیم و بستر افزایش نیمه عمر و مقاومت حرارتی آنزیم تثبیت شده قابل توجیه می باشد (14).

پژوهش‌های زیادی روی تثبیت آنزیم اینولیناز به روش‌های مختلف از جمله اتصال به یک حامل، ریزدرون پوشانی و یا تثبیت با ایجاد اتصالات جانبی انجام شده است اما، تثبیت آنزیم اینولیناز روی نانوذرات پروتئینی مغناطیسی تاکنون صورت نگرفته است. از مزایای روش انجام شده در تحقیق حاضر، سهولت در جداسازی آنزیم تثبیت شده روی نانوذرات مغناطیسی با استفاده از یک میدان مغناطیسی و کاهش هزینه های جداسازی آنزیم از محیط واکنش و افزایش خلوص فرآورده نهایی تولید شده می باشد (12). به طورکلی با شکل گیری اتصالات قوی کووالانسی بین مولکول های آنزیم و بستر استحکام ساختار آنزیم افزایش یافته و احتمال تغییر ساختار آن را در دماهای بالا کاهش می دهد. در سال 2011 Quang و همکاران آنزیم اندواینولیناز حاصل از آسپرژیلوس نیجر را روی بستری از کیتین تثبیت نمودند. آنزیم اندو اینولیناز تثبیت شده در دمای 65°C (5°C بالاتر از دمای اپتیمم برای آنزیم آزاد) بیشترین فعالیت را از خود نشان داد (15). Yewale و همکاران در سال 2013 آنزیم اینولیناز حاصل از *آسپرژیلوس نیجر* (NCIM 945) را با ایجاد پیوند کووالانسی روی بستری از کیتوزان جهت هیدرولیز پیوسته اینولین تثبیت کردند. مقاومت دمایی آنزیم پس از تثبیت بر روی کیتوزان در دمای 50 و 60 درجه سانتی‌گراد افزایش پیدا کرد (16). در سال 2010 آنزیم اینولیناز توسط Danial و همکاران بر روی بستری از آلژینات تثبیت شد. تثبیت اینولیناز مقاومت دمایی آنزیم را از دمای 50°C به 60°C که مناسب‌ترین دمای مورد استفاده در صنایع غذایی جهت جلوگیری از آلودگی میکروبی است، افزایش داد (17).

با توجه به افزایش پایداری دمایی و pH ، بهبود پارامترهای سینتیکی آنزیم تثبیت شده، افزایش نیمه عمر آنزیم تثبیت شده در دماهای بالا (دمای 75 درجه سانتی گراد)، همچنین قابلیت استفاده مجدد از آنزیم به میزان 12 سیکل پی در پی با حفظ 75% از فعالیت اولیه آنزیم در مقایسه با سایر پژوهشگران که تثبیت اینولیناز را با قابلیت استفاده مجدد از آنزیم به میزان 7 سیکل پی در پی با حفظ 80% انجام داده اند (18)، و امکان جداسازی آنزیم تثبیت شده با بکارگیری میدان مغناطیسی و در نتیجه کاهش هزینه های جداسازی آنزیم از محیط واکنش و بهبود کیفیت فرآورده نهایی تولید شده، می توان ادعا نمود که تثبیت آنزیم اینولیناز روی نانوذرات مغناطیسی Fe_3O_4 عامل دار شده با نانو پپتید های تهیه شده از هیدرولیز آنزیمی (اندوپپتیداز ها) گلوتن گندم، روشی کارآمد در تثبیت آنزیم اینولیناز بوده که می توان آن را در جهت کاربرد در صنایع غذایی و دارویی جهت تولید فروکتواولیگوساکاریدها و فروکتوز مورد توجه قرار داد (19).

• References

1. Vandamme EJ, Derycke DG. Microbial inulinases: fermentation. process. properties, and applications. Adv Appl Microbiol. 1983;29:139-176.
2. Magdy M , Elnashar M, Enas N, Danial E, Ghada. Novel Carrier of Grafted Alginate for Covalent Immobilization of Inulinase. Ind Eng Chem Res .2009;48:9781–9785
3. Sheldon R.A.S.,Janssen M.H.A.. Use of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) for performing biotransformations. Chem. Toda. 2007;25: 62-67.
4. Hernandez M, Kispert E,Ramirez E, Rosales D,Ulloa J, Ferrara T. Electron.paramagnetic resonance analyses of biotransformation reactions with cytochrome P-450 immobilized on mesoporous molecular sieves. J .Biotech Let 2011;29:919–924.
5. Yangyang J, Chen G, Hansong X, Iram M, Chunzhao L, Huizhou L. Magnetic nanoparticles supported ionic liquids for lipase immobilization. J. Mol Catal. B:Enzym .2009;58:103–109.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-10-05]

6. Wenjuan Z, Jianhui Q, Huixia F, Limin Z, Eiichi S, Increase in stability of cellulase immobilized on functionalized magnetic nanospheres J. Magn Magn Mater .2014;375:117–123.

7. Bradford M,M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding**.** Anal Biochem. 1976**;**72:248–254.

8. Miller G L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar.Anal Biochem. 1959**;**31:426–429.

9. Torabizadeh H, Habibi-Rezaei M, Safari M, Moosavi-Movahedi AA, Sharifizadeh A, Azizian H, Amanlou M. Endo-inulinase Stabilization by Pyridoxal Phosphate Modification: A Kinetics, Thermodynamics, and Simulation Approach. Appl Biochem Biotechnol. 201; 165:1661–1673.

10. Pal A, Khanum F. Covalent Immobilization of Xylanase on Glutaraldehyde Activated Alginate Beads Using Response Surface Methodology: Characterization of Immobilized Enzyme. Process Biochem. 2011;46:1315–1322.

11**.** Ahmad R, Sardar M**.** Enzyme Immobilization: An Overview on Nanoparticles as Immobilization Matrix. Biochem Anal Biochem. 2015; 2: 1-8.

12. Almeida RV, Branco RV, Peixoto B, CdS Lima, Alqueres SMC, Martins OB, Antunes OAC, Freire DMG. Immobilization of a recombinant thermostable esterase (Pf2001) from Pyrococcus furiosus on microporous polypropylene: isotherms, hyperactivation and purification. Biochem Eng J. 2008; 39:531–537.

13. Quang D, Nguyena J, Rezessy M, Balint C, Agoston H. Continuous production of oligofructose syrup from Jerusalem artichoke juice by immobilized endo-inulinase. Process Biochem. 2011;(46): 298–30.

14. Yewale T, Rekha S, Singhal A, Vaidya A. Immobilization of inulinase from Aspergillus niger NCIM 9 on chitosan and its application in continuous inulin hydrolysis. Biocatal Agri Biotech. 2013; 2:96–101.

15. Danial M, Enas N. Elnashar M,Ghada E. Awad A, Immobilized Inulinase on Grafted Alginate Beads Prepared by the One-Step and the Two-Steps Methods . Ind Eng Chem Res. 2010; 49: 3120–3125.

16. Mohamad NR, Che Marzuki NH, Buang NA, Huyop F, Abdul Wahab R, An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. Biotechnol Biotechnol Equip. 2015; 29: 205-220.

17. Keerti PS, Gupta A, Kumar V, Dubey A, Verma AK, Kinetic Characterization and Effect of Immobilized Thermostable β-Glucosidase in Alginate Gel Beads on Sugarcane Juice. ISRN Biochem. 2014; 1-8.

18. Rahimizadeh P, Najavand S, Pazhang M, A Comparative Study of Activity and Stability of the Free and the Immobilized Endoglucanase from *Alicyclobacillus acidocaldarius.* Biomacromol J. 2015;1: 167-176.

19. Karimi M, Chaudhury I, Jianjun C, Safari M, Sadeghi R, Habibi-Rezaei M, Kokini J, Immobilization of endo-inulinase on non-porous amino functionalized silica nanoparticles. J Mol Catal B Enzym. 2014; 104: 48–55.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-10-05]

Immobilization of Inulinase from *Aspergillus niger* on Magnetic Nanopeptides of Wheat Gluten Hydrolysates for High Fructose Syrup Production

Mahmoudi A[1], Torabizadeh H[2]*

1- Department of Agriculture Research, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran.

*2- *Corresponding author: Department of Chemical Technology, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran. Email: htoraby@alumni.ut.ac.ir*

Received 1 Sept, 2016 **Accepted 24 Dec, 2016**

Background and Objectives: Inulinase from *Aspergillus niger* hydrolysis inulin is used for high fructose syrup preparation. In this study inulinase was immobilized covalently on magnetic wheat gluten hydrolysates. This immobilization method for the increase in mass transfer is due to particle size reduction and increases in higher yields, and recovery of immobilized enzyme by the magnetic field from reaction medium and the reusability of the enzyme is important.

Materials and Methods: Firstly, nanopeptides from wheat gluten hydrolysates were prepared by desolvation method and Fe_3O_4 magnetic nanoparticles were prepared by co-precipitation method. Afterwards, the surface of magnetic nanopeptides were coated with prepared nanopeptides and inulinase was immobilized on prepared magnetic nanopeptides by covalent bonding. The structural and functional characteristics of prepared nanoparticles and immobilized enzyme were determined by using spectrophotometry in UV / VIS region and field emission scanning electron microscope methods.

Results: The morphology of magnetic nanoparticles were shown spherical also gluten peptides were spherical with short fibers. Kinetic parameters of immobilized enzyme, compared with the free enzyme, were improved and the enzyme loading on magnetic nanopeptides was calculated (7.5 mg Enzyme /g Support) 74%. Immobilize enzyme preserved 69.9% of their initial activity after 12 cycles of hydrolysis. Half-Life of immobilized enzyme at 60°C compared to the free enzyme was increased about 1.5 times.

Conclusion: The use of magnetic nanopeptides of wheat gluten hydrolysates for immobilization of the inulinase is an efficient method along with the increase in stability and improvement in enzyme performance for high fructose syrup production.

Keywords: Nanopeptides, Inulinase, Covalent immobilization, Wheat gluten hydrolysates, Magnetic nanoparticles

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-10-05]