

امکان استفاده از اندواینولیناز با پایداری حرارتی بالا جهت تولید شربت پرفروکتوز از اینولین

مهسان کریمی^{۱*}، مهران حبیبی رضایی^۲ و روح اله صادقی^۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۴/۱

^۱ استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه

^۲ استاد گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشگاه تهران

*مسئول مکاتبه: Email: Karimimahsun@gmail.com

چکیده

هدف این پژوهش بررسی ویژگی‌های ساختاری و عملکردی اندواینولیناز پس از اصلاح با PLP برای آبکافت اینولین است. برای تعیین پایداری حرارتی، فعالیت باقیمانده هر دو آنزیم (اصلاح شده و شاهد) پس از ۱۳۰ دقیقه انکوباسیون در دماهای مختلف در محدوده ۲۵-۶۵°C اندازه‌گیری و برای تعیین پایداری زمانی، فعالیت هر دو آنزیم تا ۶ روز بطور روزانه سنجیده شدند. جهت بررسی تغییرات ساختاری و نیز ارزیابی تغییرات ساختار دوم و سوم آنزیم اندواینولیناز، پس از اصلاح با PLP، از روش‌های طیف‌سنجی دورنگ‌نمایی دورانی، جذب‌سنجی در طول موج ۲۸۰ nm، فلورئوسانس برون‌زاد و درون‌زاد استفاده شد. کروماتوگرام محصولات حاصل از آبکافت اینولین توسط اندواینولیناز اصلاح شده با PLP یا اندواینولیناز دست‌نخورده با استفاده از HPLC بدست آمده و سپس پارامترهای کاتالیتیکی هر دو آنزیم محاسبه شدند. محتوای ساختار مارپیچ آلفا پس از اصلاح با PLP افزایش یافت، همچنین نتایج بررسی ساختار سوم شامل مطالعات طیف سنجی UV و نشر فلورسانس، افزایش پایداری حرارتی اندواینولیناز بعد از اصلاح با PLP را تایید نمودند. نتایج آزمون‌های پایداری زمانی، حاکی از آن بود که افت فعالیت مشاهده شده در آنزیم اصلاح شده با PLP کمتر از آنزیم شاهد است. بهبود کارایی آنزیم اندواینولیناز جهت آبکافت اینولین پس از اصلاح با PLP توسط HPLC ثابت شد. پس از اصلاح آنزیم V_{max} افزایش و K_m کاهش یافت که نشانگر بهبود عملکرد آنزیم پس از اصلاح با PLP است.

واژگان کلیدی: اینولین، اندواینولیناز، فروکتوز، اصلاح شیمیایی با PLP

مقدمه

متصل شده اند و معمولاً یک مولکول گلوکز به یک انتهای زنجیره فروکتوزی متصل شده است. در شکل ۱ ساختار شیمیایی اینولین نشان داده شده است (لوپز-مولینا و همکاران ۲۰۰۵).

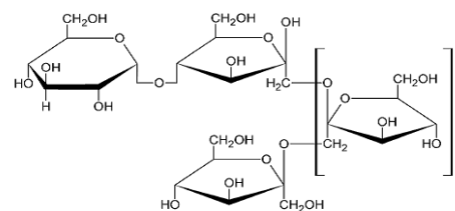
در اوایل قرن ۱۹ میلادی ماده‌ای از گیاه اینولاهیلینوم (زنجبیل‌شامی) استخراج گردید که چند سال بعد اینولین نامیده شد. در ساختار شیمیایی اینولین مولکول‌های D-فروکتوز توسط پیوند فروکتوزیل β (۱-۲) به یکدیگر

و با بازده تولید ۹۵٪ فروکتوز آبکافت کند. اندواینولیناز به طور گسترده‌ای برای آبکافت اینولین و تولید شربت با فروکتوز بالا استفاده می‌شود. اینولیناز با پایداری حرارتی بالا برای آبکافت اینولین و تولید شربت با فروکتوز بالا ترجیح داده می‌شود تا نرخ تبدیل را افزایش داده، از آلودگی میکروبی جلوگیری نماید و امکان حلالیت بیشتر سوبسترای اینولین را فراهم کند. مقایسه توالی اسیدآمینه و وجود مناطق حفظ‌شده اسیدآمینه نشان می‌دهد که اینولیناز به خانواده گلیکوزید هیدرولازها GH ۳۲ تعلق دارند.

ختار بلوری اندواینولیناز آسپرژیلوس نیکوم

جایگاههای فعال آن به رنگ قرمزند. حلقه‌های نزدیک به جایگاه به ترتیب حلقه ۱ تا ۴ نامیده می‌شوند. مولکول مانوز در حلقه سیاه رنگ دیده می‌شود. صفحات β و مارپیچها به رنگ زرد و قرمز هستند (پویز و همکاران ۲۰۱۲).

ساختار سه‌بعدی اندواینولیناز که در شکل ۲ نشان داده شده‌است شامل یک دمین کاتالیتیکی پایانه N با ه لبه با تا خوردگی β پروانه‌ای و ۴ صفحه β و دمین پایانه C با ساندویچ β در دو صفحه- β با پنج رشته β است. تجزیه و تحلیل ساختاری و مقایسه آن با سایر آنزیم های GH32 حاکی از وجود یک بسته اضافی در جایگاه فعال INU2 است که از دو حلقه و بخش حفاظت‌شده WM (I) -ND (E) -P-N-G تشکیل شده و این حفره می‌تواند فعالیت اندوآنزیم، نقش مهم Trp4 و به ویژه شکاف در واحد سوم از اینولین را توضیح دهد (پویز و همکاران ۲۰۱۲). پژوهش‌های بسیاری به تولید فروکتوز از اینولین با استفاده از اندواینولیناز پرداخته‌اند (کریمی و همکاران ۲۰۱۶a, b و ۲۰۱۴؛ ینگ و همکاران ۲۰۱۶؛ لیو و همکاران ۲۰۱۶). Jerusalem artichoke (سیب‌زمینی ترشی) غنی از اینولین بوده و ماده اولیه بسیار مهمی برای تولید صنعتی فرکتوز است (ونلینگ و همکاران



شکل ۱- ساختار شیمیایی اینولین (لوپز-مولینا و همکاران ۲۰۰۵)

اینولین در طبیعت بصورت کربوهیدرات‌های ذخیره‌ای در گیاهان یا به صورت پلی ساکاریدهای خارج سلولی در برخی میکروارگانیسم‌ها یافت می‌شود. درجه پلیمریزاسیون اینولین با توجه به نوع گیاه و میکروارگانیسم از ۲ تا ۶۰ متغیر است (روبرفرود ۲۰۰۵؛ بورنت ۲۰۰۲؛ فرانک ۲۰۰۲). گیاهان تیره کاسنی مهمترین منبع تولید اینولین به شمار می‌آیند. در بین گیاهان این تیره کنگر فرنگی (آرتیشو) و ریشه کاسنی (چیکورتی) از اهمیت خاصی برخوردارند (فرانک ۲۰۰۲). در کشور ما این گیاهان به صورت خودرو در دامنه‌های البرز و زاگرس و دشت‌ها به وفور یافت می‌شوند (زرگری ۱۹۹۲). اینولین در بخش‌های خوراکی انواع گیاهان شامل پیاز، کنگر فرنگی، تره فرنگی، سیر، چاودار و جو یافت می‌شود. از آنجا که اینولین مخلوطی از الیگومرهای با وزن مولکولی متفاوت است، نمونه‌های اینولین از روی میانگین درجه پلیمریزاسیون شناخته می‌شوند. تفاوت درجه پلیمریزاسیون در میان انواع اینولین باعث ایجاد تغییراتی در عملکرد آنها می‌شود (لوپز-مولینا و همکاران ۲۰۰۵).

ریشه کاسنی می‌تواند تا ۲۰٪ کربوهیدرات ذخیره‌ای داشته باشد که عمده آن اینولین است که پس از آبکافت به ۱۸٪ فروکتوز و ۲٪ گلوکز تبدیل می‌شود (ونلینگ و همکاران ۱۹۹۹).

اندواینولیناز (β -D فروکتان فروکتانوهیدرولاز) (۷. ۱. ۲. EC) می‌تواند اینولین را در فرآیندی تک‌مرحله‌ای

³ Glycoside Hydrolase

⁴ β -propeller

⁵ β -sheet

⁶ β -sandwich

⁷ β -strand

¹ *Cynara scolymus*

² *Cichorium intybus* L

اسپکتروفتومتری نقطه پایانی و معرف DNS استفاده شد (میلر، ۱۹۵۹)

با استفاده از محلول‌های استاندارد فروکتوز با غلظت (mg/ml) ۱، ۰/۹، ۰/۸، ۰/۷، ۰/۶، ۰/۵، ۰/۴، ۰/۳، ۰/۲، ۰/۱ و ۰ نمودار استاندارد به صورت جذب نسبت به غلظت فروکتوز در طول موج ۵۷۵ nm تعیین شد. پس از آن محلول شفاف شده اینولین (۲٪ (W/V) محلول در بافر استات سدیم (pH ۵/۴) بعنوان سوبسترای آنزیم به میزان ۴۰۰ μL و ۲۰ μL محلول آنزیم اندواینولیناز در ویال ریخته و واکنش آبکافت اینولین در دمای ۴۵°C به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. پس از خاتمه آبکافت معادل حجم محلول آبکافت شده ۴۲۰ μL معرف DNS به آن اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۰°C قرار گرفت. سپس محلول حاصل از آبکافت سرد شد و به میزان ۱۷۰ μL محلول تارتارات مضاعف سدیم پتاسیم برای تثبیت رنگ زرد تا قهوه‌ای تیره اضافه شد و جذب نوری محلول آبکافت شده در طول موج ۵۷۵ nm در مقایسه با شاهد (بدون آنزیم) با استفاده از اسپکتروفتومتر Camspec M550 اندازه‌گیری شد. مقدار جذب با استفاده از نمودار استاندارد فروکتوز (قابل تبدیل به غلظت محصول تولید شده بر حسب mg/ml بوده) و با در نظر گرفتن هر مول فروکتوز ۱۸۰/۱۶ g/mol، میزان فعالیت آنزیم بر اساس میکرومول محصول تولیدشده در هر دقیقه (μmol/min) محاسبه شد (کریمی و همکاران ۲۰۱۶a).

اصلاح ریشه‌های لیزین آنزیم اندواینولیناز با PLP و احیاء با اسید آسکوربیک

محلول پیریدوکسال ۵' - فسفات (PLP) با غلظت‌های (۱-۱۰ mM) در بافر فسفات ۷/۵ pH تهیه شد و از هر غلظت به صورت جداگانه مقدار ۱۰۳۵ μL برداشته و در ظرف پلاستیکی درب‌دار که با فویل آلومینیومی پوشیده شده بود (ظروف تیره رنگ) قرار داده شد. به ظرف محتوی PLP مقدار ۱۱۵ μL اندواینولیناز با غلظت معین (۱۰/۹۲ μg/μL) اضافه گردید و ظرف در تاریکی و در دمای اتاق بمدت ۶۰-۰ دقیقه قرار داده شد و در شروع

۱۹۹۹) چراکه کشت آن نیاز به ورودی کم دارد، بازده محصول بالاست، سازگاری گسترده‌ای با شرایط اقلیمی و خاک دارد و مقاومت زیادی به آفات و بیماری‌های گیاهی از خود نشان می‌دهد (ینگ و همکاران ۲۰۱۵). علاوه بر آن، تولید فروکتوز از اینولین توسط آنزیم اینولیناز فرآیندی دوستدار محیط‌زیست است. مجموع این عوامل تولید صنعتی فروکتوز از اینولین را از لحاظ اقتصادی توجیه‌پذیر می‌کند و امروزه در صنعت این روش جایگزین روش‌های شیمیایی قدیمی تولید فروکتوز و فروکتوالیگوساکارید شده است (ینگ و همکاران ۲۰۱۶) ضمن آن‌که تولید محصولات ناخواسته را نیز به حداقل می‌رساند (اینز و فرناندس ۲۰۱۴). هدف این پژوهش بررسی ویژگی‌های ساختاری و عملکردی اندواینولیناز پس از اصلاح با PLP و مقایسه فعالیت آبکافتی و بازده تولید فروکتوز این دو آنزیم می‌باشد.

مواد و روش‌ها

آنزیم مورد استفاده برای انجام اصلاح ساختار اندواینولیناز (EC ۳.۲.۱.۷) *آسپرژیلیوس نایجر*، اینولین ریشه کوب (Dahlia)، فروکتوز، ساکارز و پیریدوکسال ۵' - فسفات ساخت شرکت Fluka (Fluka, Switzerland) بودند. تارتارات مضاعف سدیم و پتاسیم، معرف دی نیترو سالیسیلیک اسید، سدیم هیدروکسید و آنیلینو -۱ نفتالن سولفونیک اسید (ANS) ساخت شرکت-Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) بودند. آسکوربیک اسید ساخت شرکت Acros (New Jersey, USA) Organics بود.

تعیین فعالیت آنزیم اندواینولیناز

در ابتدا مقدار ۵۰ mg آنزیم اندواینولیناز لیوفلیزه را در ۵ mL بافر سدیم استات ۵۰ mM با ۵/۴ pH بصورت محلول درآورده و در ظرف پلاستیکی درب‌دار (ویال) با حجم ۱۰۰ μL تقسیم کرده و در فریزر ۷۰°C- نگهداری شد. بمنظور تعیین فعالیت آنزیم از روش

آزمایش (زمان $t=0$) و فواصل زمانی هر ۵ دقیقه یک نمونه $50 \mu\text{L}$ برداشت شد و به مدت ۱۵ دقیقه در یخ قرار گرفت. به نمونه آنزیم اندواینولیناز افزوده شده به PLP که فواصل مختلف زمانی ۶۰-۰ دقیقه نمونه‌برداری شده است، مقدار $230 \mu\text{L}$ محلول اسیدآسکوربیک 1 mM در بافر فسفات $\text{pH } 7$ اضافه کرده و در یخچال بمدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد. پس از آن محلول حاوی آنزیم در کیسه دیالیز با حذف برشی 12400 Da و در بافر استات سدیم در دمای یخچال در طول شب نگه‌داری شد. پس از خاتمه عمل دیالیز، آنزیم اصلاح شده با PLP از نظر فعالیت کاتالیتیکی و همچنین ویژگیهای ساختاری مورد مطالعه قرار داده شد (ترابی‌زاده و همکاران ۲۰۱۱).

بررسی ساختاری آنزیم اندواینولیناز قبل و پس از اصلاح ساختار با PLP با روش طیف سنجی فرابنفش و مرئی

در اثر برخورد پرتوی الکترومغناطیس با ماکرومولکول‌های حیاتی می‌توان مطالعات ساختمانی و نقش محیط، مطالعات دینامیک و انرژی‌تیک ماکرومولکول‌ها را در محیط آبی بررسی کرد. از مهم‌ترین کاربردهای طیف سنجی فرابنفش و مرئی در ماکرومولکول‌های حیاتی، تعیین غلظت، تعیین دقیق فرآیندهای شیمیایی، تشخیص مواد از دیدگاه کمی و کیفی و تعیین پارامترهای ساختمانی ماکرومولکول‌هاست. برای تشخیص پروتئین‌ها از جذب ناحیه 280 nm (مربوط به حلقه‌های آروماتیک اسید آمینه‌ها) استفاده می‌شود (موسوی موحدی و همکاران ۲۰۰۲). غلظت مساوی آنزیم اندواینولیناز طبیعی و اصلاح شده با PLP را در 1 mL بافر سدیم استات 1 mM با $\text{pH } 5/4$ حل کرده و جذب آنها در طول موج 280 nm با استفاده از اسپکتروفتومتر Camspec M550 اندازه‌گیری می‌شود.

روش طیف‌سنجی فلورسانس درون‌زاد و برون‌زاد
اسپکتروفلوریمتری را می‌توان بعنوان روشی بسیار حساس برای تجزیه و تحلیل ساختار پروتئین‌ها بکار برد.

فلورسانس درون‌زاد پروتئین بخاطر گروه‌های اسیدآمینه‌ای است که بطور ذاتی خاصیت فلورسانس دارند مانند تریپتوفان و تا حدی هم تیروزین که می‌توان با این روش اطلاعاتی در مورد تغییرات ساختاری پروتئین‌ها بدست آورد. ساختار آنزیم اندواینولیناز قبل و بعد از اصلاح با PLP، توسط فلورسانس درون‌زاد و برون‌زاد با استفاده از (Hitachi spectrofluorimeter Model MPF-4, Tokyo, Japan) در کوت 1 cm در 25°C و با غلظت آنزیم $0/1 \text{ mg.mL}^{-1}$ بررسی شد. در مورد فلورسانس تریپتوفان، تحریک در 280 nm انجام گرفت، در حالی که نشر در حد فاصل بین 300 nm تا 450 ثبت گردید. طیف‌ها در شرایط مشابهی ثبت شدند و به طور گرافیکی کسر شدند. طول شکاف تحریک و نشر 5 nm تنظیم شد.

در پژوهش حاضر برای فلورسانس برون‌زاد، ANS به عنوان نشانگر بسته‌های هیدروفوبی به کار برده شد. اندواینولیناز قبل و بعد از اصلاح ساختار با PLP در بافر استات سدیم و با غلظت نهایی $0/5 \text{ M}$ ANS تهیه گردید. طول موج برانگیختگی ANS در 380 nm و نشر بین 400 و 600 nm بود.

روش طیف‌سنجی دورنگ‌نمایی دورانی

پروتئین‌ها حاوی گروه‌هایی هستند که در نواحی خاصی از ناحیه مرئی و فرابنفش دارای ناحیه جذبی بوده و کروموفور نامیده می‌شوند. ناحیه فرابنفش دور ($190-240 \text{ nm}$) برای ارزیابی محتوای کمی ساختمان دوم پروتئین‌ها استفاده می‌شود. آنزیم اندواینولیناز قبل و بعد از اصلاح ساختار با PLP با غلظت $0/4 \text{ mg.mL}^{-1}$ و در بافر استات سدیم $\text{pH } 5/4$ ساخته شد و بوسیله دستگاه اسپکتروپولاریمتر (Model 215) در دمای 25°C سنجیده شد. اسپکتروپولاریمتر ناحیه فرابنفش دور در دمای 25°C در محدوده $190-260 \text{ nm}$ در سل با طول 1 mm اندازه‌گیری شد. نرم افزار (model JWSSE-480, JASCO, Japan) برای تجزیه و تحلیل داده‌ها به کار برده شد.

بررسی پارامترهای کاتالیتیکی آنزیم اندواینولیناز

قبل و پس از اصلاح ساختار با PLP

برای مقایسه پارامترهای سینتیکی آنزیم اندواینولیناز قبل و پس از اصلاح ساختار با PLP از اینولین در غلظت های ۱/۱، ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷، ۰/۹، ۱/۲ و ۱/۵ استفاده گردید و نمودار Lineweaver-Burk بر حسب $1/[S]$ و $1/v$ بدست آمد.

نتیجه گیری

بررسی فلورسانس بر پایه ریشه‌های تریپتوفان در ناحیه ۲۸۰ nm نشانگر افزایش قله نشری آنزیم دست نخورده در ۳۳۰ nm پس از اصلاح شدن با PLP است. آزمون فلورسانس برون‌زاد و درون‌زاد نشانگر نشر فلورسانس پس از اصلاح شدن با PLP است. نتایج طیف‌سنجی دورنگ‌نمایی دورانی حاکی از کاهش محتوای β -content و در مقابل، افزایش محتوای مارپیچ آلفا پس از اصلاح شدن با PLP است (جدول ۱). افزایش محتوای مارپیچ دلالت بر پایدار شدن آنزیم پس از اصلاح با PLP دارد. کارایی آبکافت اینولین پس از اصلاح با PLP بهبود یافت و بازده تولید فروکتوز توسط آنزیم اندواینولیناز اصلاح شده با PLP ۱/۱۱ برابر افزایش یافت (جدول ۲). نسبت $\frac{\text{فروکتوز}}{\text{اینولین}}$ که نشانگر کارایی آنزیم است پس از اصلاح با PLP، ۱/۶۵ برابر افزایش یافت، لذا می‌توان نتیجه گرفت که تولید ساکارز و گلوکز پس از اصلاح با PLP کاهش و تولید فروکتوز افزایش می‌یابد. کاهش تولید گلوکز و ساکارز در آنزیم اصلاح شده با PLP به دلیل تولید بیشتر اینولولیگوساکاریدهایی است که متشکل از چندین واحد فروکتوز و نیز گلوکز انتهای زنجیر هستند که به دلیل افزایش ویژه‌گزینی آنزیم اصلاح‌شده با PLP می‌باشد (ترابی‌زاده و همکاران ۲۰۱۱).

سنجش پایداری ساختاری آنزیم اندواینولیناز قبل و

پس از اصلاح ساختار با PLP

سنجش پایداری حرارتی آنزیم اندواینولیناز قبل و بعد از اصلاح ساختار با PLP بوسیله دستگاه UV- Thermal (Model Carry100Bio) در دمای ۱۵ تا ۹۰°C تعیین گردید. دما هر ۱ دقیقه ۱°C افزایش یافت و جذب نمونه‌های آنزیم قبل و پس از اصلاح با PLP در طول موج ۲۸۰ nm در دماهای مذکور خوانده شد و سپس نمودار جذب در مقابل دما رسم گردید.

سنجش پایداری زمانی آنزیم اندواینولیناز قبل و پس

از اصلاح ساختار با PLP

امکان‌پذیر بودن واکنش‌های آنزیمی عمدتاً^۱ به حفظ فعالیت بیوکاتالیکی طی زمان بستگی دارد. برای تعیین پایداری، آنزیم اندواینولیناز قبل و بعد از اصلاح ساختار با PLP در دمای ۴°C نگهداری شد و فعالیت آنها تا ۶ روز بطور روزانه سنجیده شد.

برای تعیین پایداری حرارتی^۱ اندواینولیناز، فعالیت باقیمانده آنزیم در دماهای مختلف در محدوده ۲۵-۶۵°C در بافر استات سدیم با pH ۵/۴ پس از ۱۳۰ دقیقه انکوباسیون در دماهای مختلف رسم گردید.

بررسی محصولات حاصل از فعالیت آنزیم

اندواینولیناز قبل و پس از اصلاح ساختار با PLP

توسط HPLC

کروماتوگرام محصولات حاصل از آبکافت اینولیناز با استفاده از HPLC بدست آمد. محصولات آبکافت اینولین توسط آنزیم اندواینولیناز دست‌نخورده و اصلاح‌شده با PLP با استفاده از HPLC فاز معکوس (Knauer K-2301، آلمان) در ۳۰°C، نرخ جریان ۵ $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ ، با ستون Eurotech و فاز متحرک H_2SO_4 (0.01 N) مشخص شد.

^۱ Thermal stability

جدول ۱- مقایسه ساختار اندواینولیناز اصلاح شده با PLP و اندواینولیناز طبیعی

	Abs ₂₈₀ UV-VS (nm) جذب در ۲۸۰ (نانومتر)	(λ _{max}) (nm) IF حداکثر لاندا (نانومتر)	EF (λ _{max}) (nm) حداکثر لاندا (نانومتر)	CD α-Helix (%) α-هلیکس (%)	CD β-content (%) محتوی β (%)
اندواینولیناز طبیعی	۰/۳۴	۲۹/۴	۴۰/۸	۱۳/۲	۴۰
اندواینولیناز اصلاح شده با PLP	۰/۳۶	۳۵/۶	۵۳/۵	۱۷/۴	۳۳/۱

CD: طیف‌سنجی دورنگ‌نمایی دورانی، EF: فلوئورسانس برون‌زاد، IF: فلوئورسانس درون‌زاد، UV-VS: طیف‌سنجی فرابنفش و مرئی

جدول ۲- بررسی محصولات حاصل از فعالیت آنزیم اندواینولیناز قبل و پس از اصلاح ساختار با PLP توسط

HPLC					
اینولین (%)	ساکارز (%)	گلوکز (%)	فروکتوز (%)	فروکتوز اینولین	
۶/۲	۱/۷	۳۷/۸	۴۸/۱	۷/۷	اندواینولیناز طبیعی
۴/۲	—	۱۲/۴	۵۳/۳	۱۲/۷	اندواینولیناز اصلاح‌شده با PLP

جدول ۳- پارامترهای کاتالیتیکی آنزیم اندواینولیناز

قبل و پس از اصلاح ساختار با PLP

	k _{cat} /K _m	V _{max}	K _m
اندواینولیناز طبیعی	۷۵۰	۲/۲۵	۰/۰۳
اندواینولیناز اصلاح شده با PLP	۲۱۰۵	۴/۲۱	۰/۰۲

در PLP مقایسه با اندواینولیناز دست‌نخورده کمتر است که موید افزایش پایداری حرارتی اندواینولیناز بعد از اصلاح ساختار با PLP می‌باشد. پایداری حرارتی اندواینولیناز با استفاده از روش اصلاح پیریدوکسال فسفات/اسیدآسکوربیک توسط ترابی‌زاده و همکاران در سال ۲۰۱۱ گزارش شده است. فعالیت باقیمانده آنزیم در دماهای مختلف در محدوده ۲۵-۶۵°C در شکل ۴ نشان داده شده است که این نمودار نیز افزایش پایداری حرارتی اندواینولیناز مهندسی‌شده طی اصلاح PLP/اسیدآسکوربیک را نشان می‌دهد. این پایداری حرارتی و ساختاری اندواینولیناز اصلاح‌شده با PLP/اسیدآسکوربیک در مقایسه با اندواینولیناز دست‌نخورده به خاطر پیوندهای بین‌مولکولی جدیدی است که بین PLP-لیزین ۳۸۱ و آرژنین ۵۲۶ و سرین ۳۷۶ ایجاد شده است (ترابی‌زاده و همکاران ۲۰۱۱). شکل ۵ فعالیت باقیمانده اندواینولیناز دست‌نخورده و اصلاح‌شده با PLP را طی ۶ روز نگهداری در ۴ °C

نتیجه بررسی پایداری حرارتی آنزیم اندواینولیناز قبل و بعد از اصلاح ساختار با PLP بوسیله دستگاه UV-Thermal در شکل ۳ نشان داده شده است. بر این اساس، شیب خط نشانگر سرعت زوال فعالیت بوده و رابطه عکس با پایداری حرارتی آنزیم دارد. نرخ زوال فعالیت محاسبه شد که برای آنزیم اندواینولیناز قبل و بعد از اصلاح ساختار با PLP به ترتیب ۰/۰۶۱ و ۰/۰۳۴ بود. همان‌طور که در شکل دیده می‌شود سرعت زوال فعالیت آنزیم اندواینولیناز اصلاح‌شده با

نشان می‌دهد. افت فعالیت مشاهده شده در آنزیم اصلاح شده با PLP کمتر از آنزیم طبیعی است که اثر پایدارکنندگی اصلاح شیمیایی اندواینولیناز را اثبات می‌کند. در تحقیقی که توسط ینگ و همکاران در ۲۰۱۶ انجام شد اندواینولیناز جدیدی با استفاده از روش‌های اصلاح ژنتیکی مانند برشی C ترمینال و جهش سایت پروتئاز با موفقیت کلون شد که تحت شرایط بهینه، اینولین را به اولیگوفروکتوز آبکافت نمود. این مطالعه تولید عمده اینولیناز را تسهیل کرده و یک مرجع قوی برای کاربردهای صنعتی اینولیناز برای تولید اولیگوفروکتوز فراهم می‌کند. ژن نو ترکیب حاصل از ژن اگزواینولیناز *کلپورومایسس مارکسیانوس*^۱ و ژن اندواینولیناز *آسپرژیلوس نایجر*^۲ به تنهایی یا ترکیب با یکدیگر برای آبکافت اینولین در غده سیب‌زمینی ترشی استفاده شدند. تحقیقات اثر هم‌افزایی آنها در آبکافت اینولین را ثابت کرد. در فرآیند آبکافت طیف گسترده‌ای از الیگوساکاریدها در ابتدا تولید شدند که سپس به فروکتوز تبدیل شدند (لیو و همکاران ۲۰۱۶).

نتایج تحقیق اینز و فرناندس در سال ۲۰۱۴ نشانگر افزایش ثبات حرارتی، عملیاتی و زمانی اینولیناز پس از استفاده از گلو تار آلدئید در روش تثبیت است. تولید پیوسته فروکتوز از محلول (W/V) ۵٪ اینولین به مدت ۲۰ روز با بهروری حجمی اولیه $(g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1})$ ۱۴۶/۴ و بازده محصول ۱۰۰٪ انجام شد که نشانگر قابلیت استفاده روش مورد مطالعه در فرآیندهای در مقیاس بزرگ است. در تحقیق ریکو و همکاران در سال ۲۰۰۹ یک مدل غیرفعال کردن برای اینولیناز قارچ *آسپرژیلوس نایجر* ارائه شده است؛ یک کینتیک مرتبه اول با ثابت غیرفعال کردن k_d که از طریق مدل آرنیوس به درجه حرارت مربوط می‌شود. این مدل یک ابزار قدرتمند برای درک مسیر واکنش و انتخاب شرایط بهینه واکنش برای فرآیندهای با مقیاس زمانی طولانی است. مشکل مربوط

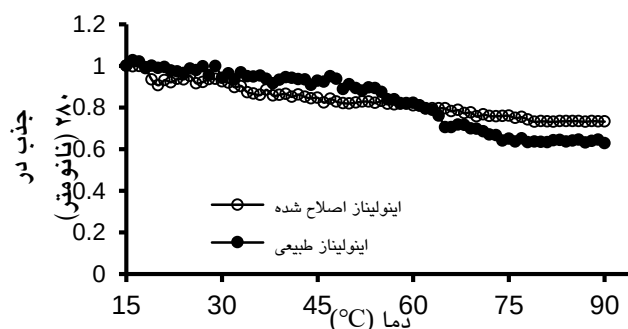
به بهینه‌سازی دما در فرایند آنزیمی با استفاده از مدل پیش‌بینی شده حل می‌شود. کیم و همکاران در سال ۲۰۰۹، آنزیم اگزواینولیناز را در حلقه‌ای از یک پروتئین گرمادوست متصل به مالتودکستریلین بدست آمده از *پیروکوکوس فوروسوس*^۳ وارد کردند و پایداری کینتیکی در $37^{\circ}C$ را بدون هیچ‌گونه تغییر در فعالیت آنزیم بهبود بخشیدند. تحقیقات نشان می‌دهد که پایداری کینتیکی بهبود یافته ممکن است از یک مانع جنبشی افزایش یافته برای تبدیل غیرقابل برگشت واسطه های تانخورده به انواع کاملاً "غیرفعال ناشی شده باشد. در مطالعه، اثرات گروه‌های زنجیره‌جانبی اسید آمینه در اگزواینولیناز و اندواینولیناز از *آسپرژیلوس فیکوم* بر فعالیت اینولیناز توسط اصلاح شیمیایی با استفاده از ان-بروموسوکسینیمید، دی‌اتیل‌پیروکربنات، بوتانیدین، کرامین-تی، (EDC)، فنیل‌متان‌سولفونیل، کربودیمید، فلوراید و دیتئوتریتول به عنوان معرف اصلاح مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که باقی‌مانده اسیدهای آمینه حاوی تریپتوفان و کربوکسیل در جایگاه‌های فعال در اگزواینولیناز و اندواینولیناز درگیر شدند. با استفاده از روش طرح زو برآورد شد که تعداد باقی‌مانده تریپتوفان یکی برای اندواینولیناز و دو تا برای اگزواینولیناز است. باقی‌مانده هیستیدین ممکن است برای جایگاه فعال اینولیناز ضروری باشد (چن و همکاران ۲۰۰۹). باقی‌مانده تریپتوفان در اینولیناز توسط معرف‌های شیمیایی ان-بروموسوکسینیمید اصلاح شد. نتایج روش اسپاند نشان می‌دهد که هفده باقی‌مانده تریپتوفان در اینولیناز وجود دارد و پنج تا از آنها در سطح آنزیم واقع شدند. سه تا از این باقی‌مانده های تریپتوفان باقی‌مانده‌های غیرضروری بودند که سریع‌ترین نرخ‌ها را با طرح ژو نشان دادند. دو باقی مانده نسبتاً سریعتر واکنش هر دو برای فعالیت آنزیم ضروری بود. دوازده باقی‌مانده دیگر کمترین سرعت را

^۱ *Kluyveromyces marxianus*^۲ *Aspergillus niger*^۳ *Pyrococcus furiosus*

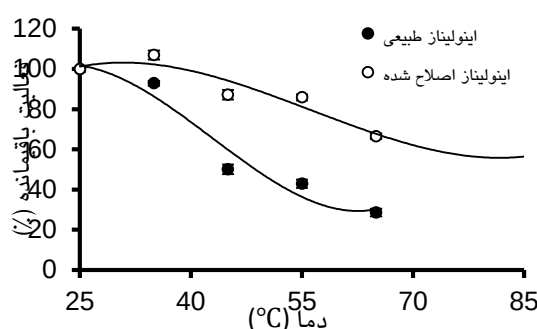
داشتند و یا هیچ‌کدام برای واکنش ضروری نبودند (لیو و همکاران ۲۰۰۷).

در غربالگری قارچ اینولینیتیک، پنی سیلیوم تی ان-۱۸ به عنوان بهترین تولیدکننده اینولیناز انتخاب شد. این سویه بهره‌وری اینولیناز بالای میلی لیتر/۹/۹ U، با نسبت فعالیت اینولیناز به فعالیت انورتاز ۱۱/۲ نشان داد. این آنزیم توسط ژل الکتروفورز SDS-پلی آکریل آمید با M_r ظاهری ۶۸/۰ کیلودالتون، همگن نشان داده شد. فعالیت ویژه ۱۰۵ U/mg بوده است. فعالیت آنزیم در pH ۵/۲ و 50°C ، بالاترین بود. اندواینولیناز P-II اینولین را به میزان ۷۰٪ آبکافت نمود و اینولتریوز محصول اصلی آزاد بود، اما فاقد فعالیت برای ساکارز، رافینوز یا لوان بود (ناکامورا و همکاران ۱۹۹۷). جهت

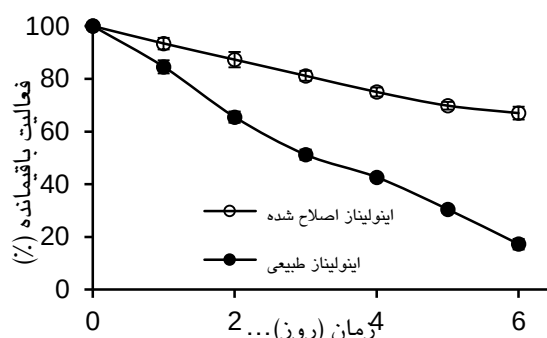
شناسایی منابع ژنتیکی جدید ژن اندو اینولیناز و تسهیل برنامه‌های صنعتی برای تولید اولیگوفروکتوز، یک ژن اندو اینولیناز از یک سویه قارچ فوزاریوم اکسی پوروم کلون گردید و بیان در سطح بالا در اصلاح شده ژنتیکی سویه مخمر پیچیا پائتوریس در یک بیوراکتور در مقیاس پایلوت با استفاده از استراتژی‌های مانند برشی C ترمینال و جهش‌زایی از سایت‌های حساس پروتئاز به دست آمد. پس از آن پارامترهای واکنش اینولیناز و مقدار آنزیم مورد استفاده برای هیدرولیز اینولین و تولید اولیگوفروکتوز بهینه شد. نتایج حاصل از این مطالعه می‌تواند تولید عمده اینولیناز را تسهیل نماید و یک مرجع برای تولید صنعتی اولیگوفروکتوز از اینولین ارائه دهد (ما و همکاران ۲۰۱۵).



شکل ۳- اسکن حرارتی اندواینولیناز طبیعی و اندواینولیناز اصلاح شده با PLP



شکل ۴- فعالیت باقیمانده اینولیناز دست‌نخورده و اصلاح‌شده با PLP پس از ۱۳۰ دقیقه انکوباسیون در بافر استات سدیم با pH ۵/۴ در دماهای مختلف



شکل ۵- پایداری زمانی اینولیناز دست‌نخورده و اصلاح‌شده با PLP

منابع مورد استفاده

- زرگری ع ۱۳۷۱. گیاهان دارویی، انتشارات دانشگاه تهران، چاپ پنجم، جلد سوم، صفحات ۵۰-۲۰۰. موسوی موحدی ع ا، صبوری ع ا، خان چمنی ج ۱۳۸۱. روش‌های بیوشیمی و بیوفیزیک، انتشارات دانشگاه تهران، چاپ سوم، صفحات ۵۰-۲۰۰.
- Anes J, Fernandes P, 2014. Towards the continuous production of fructose syrups from inulin using inulinase entrapped in PVA-based particles. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 3 4: 296-302.
- Bornet FRJ, Brouns F, Tashiro F, Duvillier V, 2002. Nutritional aspects of short-chain fructooligosaccharides: natural occurrence, chemistry, physiology and health implications. *Digestion Liver Disease* 34: 111-120.
- Chen X, Chen H, Wang J, Jin Z, Xu X, 2009. Chemical modification and fluorescence spectrum of inulinase from *aspergillus ficuum*. *Jiangsu Daxue Xuebao (Ziran Kexue Ban) / Journal of Jiangsu University (Natural Science Edition)* 30 (4): 334-337+361.
- Frank A, 2002. Technological functionality of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition* 87: 287-291.
- Karimi M, Habibi-Rezaei M, Rezaei K, Moosavi-Movahedi AA, Kokini J, 2016. Immobilization of inulinase from *Aspergillus niger* on octadecyl substituted nanoporous silica: Inulin hydrolysis in a continuous mode operation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*: 174-180.
- Karimi M, Habibi-Rezaei M, Safari M, Chaudhury I, Jianjun C, Kokini J, 2014 a. Immobilization of endo-inulinase on non-porous amino functionalized silica nanoparticles, *Journal of Molecular Catalysis B enzymatic* 104: 48-55.
- Karimi M, Habibi-Rezaei M, Safari M, Moosavi-Movahedi AA, Sayyah M, Sadeghi R, Kokini J, 2014 b. Immobilization of endo-inulinase on poly-d-lysine coated CaCO_3 micro-particles. *Food Research International* 66: 485-492.
- Kim C, Pierre B, Ostermeier M, Looger LL, Kim JR, 2009. Enzyme stabilization by domain insertion into a thermophilic protein. *Protein Engineering, Design and Selection* 22 (10): 615-623.
- Liu Y, Zhou S, Cheng Y, Chi Z, Chi Z, Liu G, 2016. Synergistic effect between the recombinant exo-inulinase and endo-inulinase on inulin hydrolysis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 128: 27-38.
- Liu X, Gao G, Yang L, He X, Meng Z, Teng L, 2007. Tryptophan modification and fluorescence spectrum of inulinase. *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao/Chemical Journal of Chinese Universities* 28(1): 103-105.
- Lopez-Molina D, Navarro-Martinez MD, Melgarejo FR, Hiner ANP, Chazarra S, Rodriguez-Lopez JN, 2005. Molecular properties and prebiotic effect of inulin obtained from artichoke *Cynara scolymus L.* *Phytochem* 66: 1476-1484.
- Ma Z, Liu N, Chi Z, Liu G, Chi Z, 2015. Genetic modification of the marine-isolated yeast *aureobasidium melanogenum* P16 for efficient pullulan production from inulin. *Marine Biotechnology* 17(4): 511-522.
- Miller G, 1959. Use of Dinitrosalicylic acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry* 31: 426-0428.

- Nakamura T, Shitara A, Matsuda S, Matsuo T, Suiko M, Ohta K, 1997. Production, purification and properties of an endoinulinase of *penicillium* sp. TN-88 that liberates inulotriose. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 84(4): 313-318.
- Pouyez J, Mayard A, Vandamme A, Roussel G, Perpete EA, Wouters J, Housen I, Michaux C, 2012. First crystal structure of an endo-inulinase, INU2, from *Aspergillus ficuum*: Discovery of an extra-pocket in the catalytic domain responsible for its, endo-activity, *Biochimie* 94: 2423- 2430.
- Ricca E, Calabrò V, Curcio S, Iorio G, 2009. Optimization of inulin hydrolysis by inulinase accounting for enzyme time- and temperature-dependent deactivation. *Biochemical Engineering Journal* 48 1: 81-86.
- Roberfroid MB, 2005. Introducing inulin-type fructans, *British Journal of Nutrition* 93: 13-25.
- Torabizadeh H, Habibi-Rezaei M, Safari M, Moosavi-Movahedi AA, Sharifizadeh A, Azizian H, et al. 2011. Endo-inulinase Stabilization by Pyridoxal Phosphate Modification: A Kinetics, Thermodynamics, and Simulation Approach *Applied Biochemistry and Biotechnology* 165: 1661–1673.
- Wenling W, Huiying WWL, Shiyuan W. 1999. Continuous preparation of fructose syrups from Jerusalem artichoke tuber using immobilized intracellular inulinase from *Kluyveromyces* sp Y-85, *Process Biochemistry* 34: 643–646.
- Yang J, Zhang J, Mao L, You X, Chen G, 2016. Genetic modification and optimization of endo-inulinase for the enzymatic production of oligofructose from inulin, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 134: 225-232.
- Yang L, He QS, Corscadden K, Udenigwe CC, 2015. The prospects of jerusalem artichoke in functional food ingredients and bioenergy production. *Biotechnology Reports* 5 1: 77-88.

Possibility of using endo-inulinase with high thermal stability to produce high fructose syrup from inulin

M Karimi¹, M Habib-Rezaei² and R Sadeghi¹

Received: March 29, 2016 Accepted: June 22, 2017

¹Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Islamic Azad University, Kermanshah Branch, Kermanshah, Iran.

²Professor, Department of Cellular and Molecular Biology, University of Tehran, Tehran, Iran.

*Corresponding author: Karimimahsun@gmail.com

Abstract

Inulinase with high thermal stability is preferred to hydrolyze inulin and produce high fructose syrup to increase the rate of conversion, prevent microbial contamination and make inulin more soluble. The aim of this study was to evaluate the structural and functional characteristics of endo inulinase after modification with PLP. To determine the thermal stability, the residual activities of the endo inulinase before and after modification with PLP was measured after 130-minute incubation at 25-65°C while, their activities were measured daily to estimate the shelf stability. Circular Dichroism, absorbance in 280 nm, extrinsic and intrinsic fluorescence were carried out to assay the structural changes and the secondary and tertiary structure of the endo inulinase before and after modification with PLP. Chromatograms of inulin hydrolysis products were plotted after hydrolysis with either native or PLP modified endo-inulinase using HPLC and the catalytic parameters of both enzymes were calculated. α -helix content increased after modification with PLP. The results of assaying the tertiary structure including UV-vis and fluorescence emissions confirmed the improved thermal stability of endo inulinase after PLP modification. The results of the shelf stability proved the reduced activity loss of PLP modified inulinase, compared to the native one. Efficiency improvement of PLP modified inulinase for inulin hydrolysis was demonstrated by HPLC. After enzyme modification, V_{max} increased and K_m decreased which proves the improved efficiency of the PLP modified enzyme.

Keywords: Inulin, Endo-inulinase, Fructose, PLP modification