مدل‌سازی رفتار سینتیکی آنزیم گلوکز اکسیداز تثبیت شده در حامل کتیرا

گلنار ساری[1*]، مریم اوتادی[2]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه مهندسی شیمی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی، تهران، ایران
۲. استادیار، گروه مهندسی شیمی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۸/۰۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۱۵)

چکیده

سابقه و هدف: آنزیم گلوکزاکسیداز از آنزیم‌های پر مصرف در صنعت است و در گروه اکسیدوردکتازها قرار دارد. آنزیم گلوکزاکسیداز کاتالیزور واکنش تبدیل گلوکز به گلوکونیک اسید و آب اکسیژنه است. در این تحقیق، ابتدا آنزیم گلوکز اکسیداز، عملکرد و ساختمان آن، پلیمر کتیرا، روشهای تثبیت آنزیمی و روش‌های مختلف مدل‌سازی آماری معرفی شده است.

مواد و روشها : برای مدل‌سازی و بهینه‌سازی فعالیت آنزیمی از ۳ متغیر pH، دما و زمان تثبیت با استفاده از نرم‌افزار Design Expert استفاده شده است. سپس بر اساس مدلسازی آماری، تابعی برای میزان فعالیت آنزیم گلوکز اکسیداز تثبیت شده در حامل کتیرا بر حسب ۳ متغیر انتخابی ارائه شده است. بر طبق نتایج به دست آمده هر سه متغیر مورد بررسی در فعالیت آنزیم گلوکز اکسیداز تثبیت شده بسیار اثرگذار بوده‌اند و همچنین اثرات تداخلی آنها نیز تأثیرگذار بوده است. با استفاده از روش پاسخ سطح، بهینه‌سازی فعالیت آنزیمی انجام شد.

یافته ها: برای بررسی فعالیت آنزیم گلوکز اکسیداز با استفاده از طراحی آزمایش‌ها (DOE) با روش پاسخ سطح (RSM)، از نتایج ۱۹ آزمایش انجام شده در تحقیق قبلی استفاده شد.

نتیجه گیری: شرایط بهینه برای بیشترین میزان فعالیت آنزیم گلوکزاکسیداز در pH برابر ۵/۹۸، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و مدت زمان تثبیت ۲۸/۳۳ دقیقه تعیین شد که در این حالت ماکزیمم میزان فعالیت آنزیم گلوکزاکسیداز تثبیت‌شده به میزان ۱۱۱۶/۲ µmol/min به دست آمد. از طرفی مقایسه نتایج آزمایشگاهی و مدل نشان داد که نتایج به دست آمده از مدل موجود با نتایج آزمایشگاهی سازگاری خوبی داشته است و برای این تحقیق، متوسط خطا ۲٪ محاسبه شده است.

کلیدواژگان

آنزیم تثبیت شده، آنزیم و فعالیت آنزیمی، سینتیک آنزیمی، گلوکز اکسیداز، مدلسازی آنزیمی.

* نویسنده مسئول، رایانامه: sari.golnar@gmail.com

مقدمه

آنزیم کاتالیست بیولوژیکی است که نرخ واکنش شیمیایی را زیاد مینماید(۸و۱۱).تثبیت آنزیم ها به طور ساده به معنای ساکن کردن یک گونه واکنش گر برروی بستر(سوبسترا)بی اثر و خنثی در شرایط آزمایش می باشد. یکی از اولین اهداف تثبیت، استفاده از ماده ای می باشد که در واکنش شیمیایی کمترین تاثیررا با مواد شرکت کننده در واکنش داشته باشد(۷و۹). آنزیم گلوکز اکسیداز یک گلیکوپروتئین با درصد بالای کربوهیدرات به ویژه مانوز می باشد(۴). به منظور تثبیت آنزیم گلوکز اکسیداز، استفاده از حامل های مناسب و طبیعی مانند پلیمر کتیرا در فرایند تثبیت بسیار مناسب می باشد. کتیرا یک صمغ گیاهی است که غیر سمی بوده و سازگاری زیادی با محیط و عوامل زنده مثل سلول دارد (۶). مدلسازی یکی از تکنیک های ریاضی است که نه تنها برای اهداف علمی، بلکه برای انجام فعالیت های روزمره بشر به دفعات مورد استفاده قرار می گیرد. مدلسازی فرایندهای شیمیایی یک دانش مدلسازی رایانهای است که درمدلسازی فرایندها در مهندسی شیمی کاربرد دارد. طراحی آماری در مهندسی شیمی تلفیقی از دانش ریاضی و آمار می باشد که در سالهای اخیر جهت ارائه یه تابع و مدل در فرآیندهای شیمیایی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. از طرفی با این روش می توان در خصوص وضعیت اثرگذاری هر یک از متغیرهای دخیل در تابع هدف نیز قضاوت نمود و در نهایت می توان شرایط بهینه را پیش بینی نمود و با انجام مطالعات آزمایشگاهی در خصوص میزان خطای مدل نتیجه گیری نمود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه برای بررسی فعالیت آنزیم گلوکز اکسیداز با استفاده از طراحی آزمایش‌ها با روش پاسخ سطح، از نتایج ۱۹ آزمایش انجام شده توسط شیرین مبین و همکاران در سال ۱۳۸۹ استفاده شد. برای مدل سازی و بهینه سازی فعالیت آنزیمی از ۳ متغیر pH و دما و زمان تثبیت با استفاده از نرم‌افزار Design Expert استفاده شده است. برای این منظور، ابتدا پس از شناسایی و بیان مساله به انتخاب متغیرهای سیستم و دامنه تغییرات هر یک از آنها پرداخته شده و سپس به انتخاب متغیر پا سخ یا تابع هدفی که شامل اطلاعات مفیدی درباره سیستم باشد، و با انتخاب یکی از روش های طراحی آزمایش، آزمایش های مورد نظر را طراحی نمودیم. بر طبق نتایج به دست آمده هر سه متغیر مورد بررسی در فعالیت انزیم گلوکز اکسیداز تثبیت شده بسیار اثر گذار بوده اند که توسط گراف های کانتوری در شکلهای ۱ تا ۴ نشان داده شده است. در بهینه سازی شرایط عملیاتی ، ابتدا باید هدف را تعیین نمود. در این بررسی میزان فعالیت آنزیم گلوکزاکسیداز به عنوان تابع هدف انتخاب شده و یافتن نقطه بهینه که منجر به بالاترین فعالیت آنزیمی می شود در نظر گرفته شد.برای ارزیابی فعالیت آنزیم و اتصال به پایه از روش اتصالات متقاطع استفاده شد که علت آن دو روش محبوس کردن و اتصال به سطح با یک مشکل بزرگ روبرو است و آن اشغال کردن حجم بزرگی از فضای کاتالیست نهایی توسط بستر مورد نظر است. به طوری که گاه تا ۷۰٪ فضای کلی کاتالیست توسط ژل یا پلیمر اشغال شده است. به منظور رفع این مشکل از روش خود آنزیم مورد نظر، توسط قطعات شیمیایی کوچک به هم متصل می‌شود و در نهایت یک توده پلیمری از آنزیم مورد نظر را ایجاد می‌کند که درصد زیادی از آن را آنزیم اشغال کرده است. استفاده شد(۷). با توجه به نتایج آزمایشگاهی به دست آمده از تحقیقی که قبلاً انجام شده است، از روش طراحی آزمایش‌ها استفاده شده تا بتوان مدلی برای ارزیابی فعالیت آنزیم مورد نظر ارائه کرد.

ما در این مطالعه از روش مدل رویه یا سطح پاسخ برای ارزیابی مدلسازی رفتار سینتیکی آنزیم

گلوکزاکسیداز تثبیت شده در حامل کتیرا استفاده کردیم. این روش شامل تکنیک‌های ریاضی و آماری است که برای مدل‌سازی و تحلیل مسائلی که پاسخ مورد نظر تحت تأثیر چندین متغیر مختلف قرار می گیرد مفید است و هدف آن بهینه‌سازی این پاسخ است.

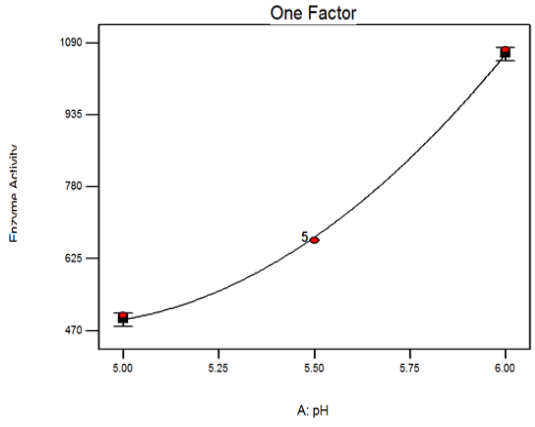
آنالیزهای آماری

از این رو بهینه سازی مدل درجه دوم به دست آمده و با استفاده از نرم افزار Design Expert 7 انجام گرفت. در این تحقیق، برای آنالیز آماری نتایج فعالیت آنزیمی به دست آمده، و تجزیه و تحلیل آنها از نرم افزار آماری Design-Expert نسخه 7 استفاده شده است.ضرایب مدل رگرسیونی از نظر معناداری با استفاده از آزمون t ارزیابی شده اند .سطح معناداری معمولاً با توجه به پیش فرض نرم افزار و مباحث آماری با مقادیر prob>F کمتر از۰/۰۵ در نظر گرفته شده است.

بررسی وضعیت تأثیر متغیرهای اصلی انتخابی بر فعالیت آنزیمی

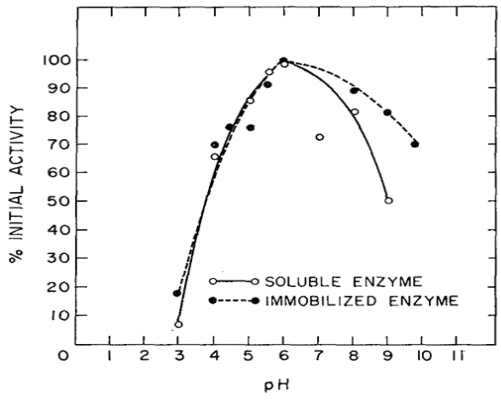
همان‌طور که گفته شد برای ارزیابی وضعیت اثرگذاری هر یک از متغیرها در فعالیت آنزیمی گلوکز اکسیداز، از معیاری به نام p value استفاده می کنیم، در صورتی که مقدار آن کمتر از ۰/۰۱ باشد، به این معنا است که تغییرات این متغیر در میزان فعالیت آنزیمی بسیار تأثیرگذار است. اگر مقدار p بین ۰/۰۱ و ۰/۰۵ باشد. متغیر موردنظر در فرآیند اثرگذار بوده و در صورتی که مقادیر p بین ۰/۰۵ و ۰/۱ بیان گر آن هستند که متغیر مربوطه احتمالاً مؤثر خواهد بود. اگر این میزان بیشتر از ۰/۱ باشد دیگر آن متغیر مؤثر نیست و هر گونه تغییر در بازه موردبررسی در میزان فعالیت آنزیمی تأثیری نخواهد داشت. نحوه اثرگذاری هریک از متغیرها در بازه تغییرات روی فعالیت آنزیم گلوکز اکسیداز در شکل‌های ۱، ۵ و ۷ نشان داده شده‌اند.

مطابق شکل ۱ با افزایش pH میزان فعالیت آنزیمی نیز افزایش پیدا کرده است. این افزایش می‌تواند به دلیل عملکرد بهینه آنزیم در pH معادل ۶ باشد.



شکل ۱- روند تأثیر تغییرات pH بر فعالیت آنزیم گلوکز اکسیداز تثبیت‌شده

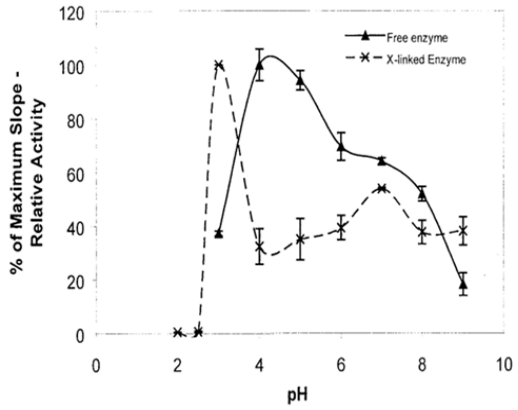
بررسی اثر pH بر فعالیت آنزیم گلوکزاکسیداز تطابق بسیار خوبی با تحقیقات قبلی دارد. این تحقیقات در شکل‌های ۲ تا ۴ آورده شده‌اند. برای مثال Constantinides و همکارانش برای گلوکزاکسیداز تثبیت‌شده روی کلاژن مشاهده کردند که مطابق شکل ۲ با افزایش pH تا ۶ فعالیت آنزیمی افزایش یافته و سپس میزان این فعالیت کاهش پیدا کرده است (Constantinides و همکاران ۱۹۷۳).



شکل ۲- روند تأثیر تغییرات pH بر فعالیت آنزیم گلوکزاکسیداز تثبیت‌شده روی کلاژن (Constantinides وهمکاران ۱۹۷۳)

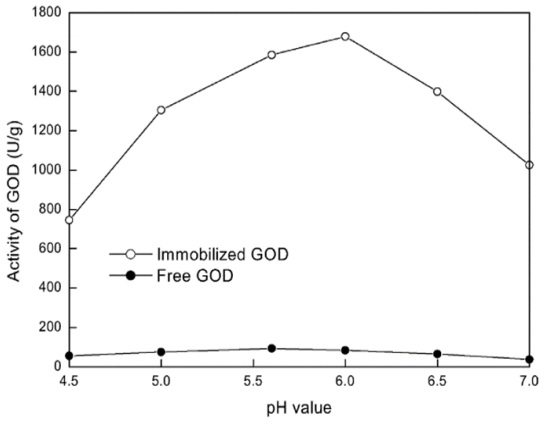
به طور مشابه Ghanem و همکاران با استفاده از گلوکزاکسیداز تثبیت‌شده روی ژل کیتوسان نشان

دادند که در محدوه ۴ تا ۷ فعالیت آنزیمی روندی افزایشی داشته است و پس از آن فعالیت آنزیمی کاهش یافته است. نتایج بررسی آنها در شکل ۳ نشان داده شده است (Ghanem و همکاران ۲۰۰۳).



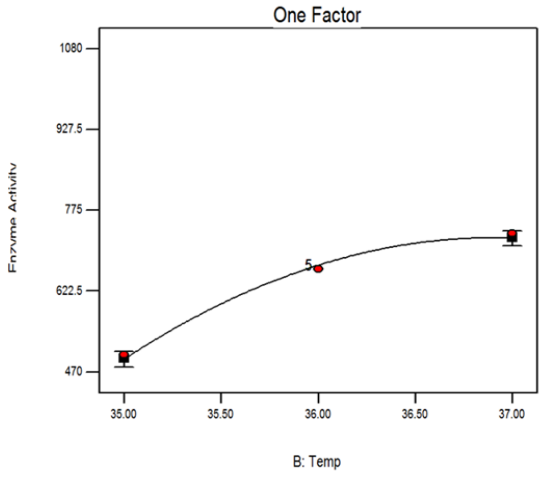
شکل ۳- روند تأثیر تغییرات pH بر فعالیت گلوکزاکسیداز تثبیت‌شده در ژل کیتوسان (Ghanem و همکاران ۲۰۰۳)

Yang و همکاران در سال ۲۰۰۴ در بررسی فعالیت آنزیم گلوکزاکسیداز تثبیت‌شده روی ژل کیتوسان و SiO_2 نتیجه مشابهی در خصوص تغییرات pH گزارش دادند. بر اساس نتایج آنها که در شکل ۴ آورده شده است میزان فعالیت آنزیم گلوکزاکسیداز با افزایش pH تا میزان ۶ افزایش یافته و پس از آن فعالیت کاهش یافته است یا به عبارتی بهینه فعالیت آنزیمی در pH معادل ۶ مشاهده شده است (Yang و همکاران ۲۰۰۴).

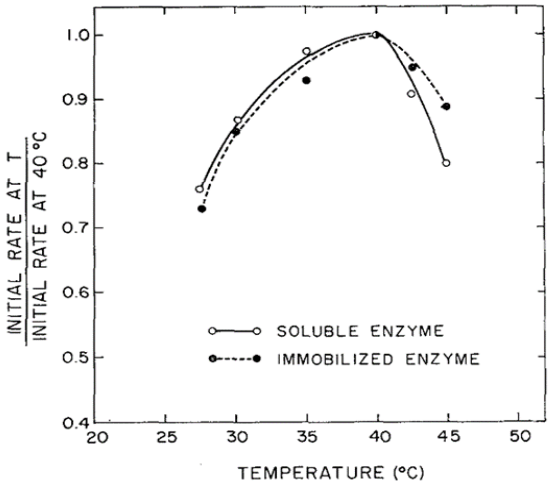


شکل ٤- روند تأثیر تغییرات pH بر فعالیت آنزیم گلوکزاکسیداز تثبیت‌شده روی ژل کیتوسان و SiO_2 (Yang و همکاران ۲۰۰٤)

مطابق شکل ۵ با افزایش دما میزان فعالیت آنزیمی نیز افزایش پیدا کرده است. این افزایش می‌تواند به دلیل عملکرد بهینه آنزیم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد باشد. این نتایج با بررسی فعالیت آنزیم گلوکز اکسیداز تثبیت شده توسط Constantinides و همکاران مطابقت دارد. براساس نتایج آنها مطابق شکل ۶ می‌توان نتیجه گرفت که فعالیت آنزیمی با افزایش دما تا حدود ۴۰ درجه سانتی‌گراد افزایش پیدا کرده است و پس از آن فعالیت کاهش یافته است که این نتیجه روند مشابه با بررسی اثر دما در تحقیق حاضر می‌باشد

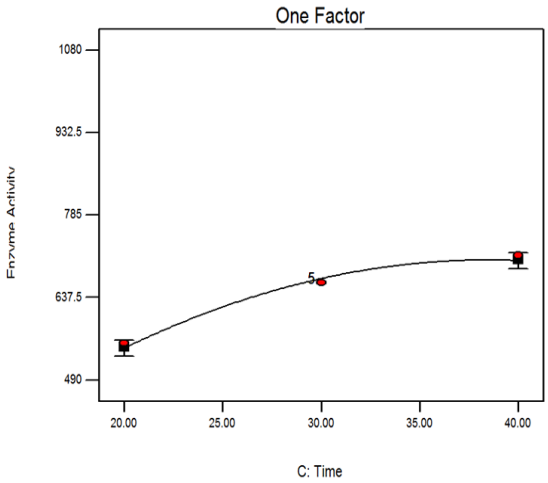


شکل ۵- روند تأثیر تغییرات دما بر فعالیت آنزیم گلوکز اکسیداز تثبیت‌شده



شکل ۶- روند تأثیر تغییرات دما بر فعالیت آنزیم گلوکزاکسیداز تثبیت‌شده روی کلاژن (Constantinides و همکاران ۱۹۷۳)

مطابق شکل ۷ با افزایش زمان تثبیت آنزیم میزان فعالیت آنزیمی به میزان اندکی افزایش پیدا کرده است. دلیل این مسأله را می‌توان در مدت زمان کافی برای تثبیت آنزیم‌ها عنوان کرد و در مدت زمان کافی آنزیم‌ها فرصت لازم برای تثبیت شدن را دارند و بنابراین میزان آنزیم آزاد به صورت رها در پلیمر کمتر شده و بنابراین عملکرد سیستم تثبیت آنزیمی بهتر خواهد شد. در نتیجه میزان فعالیت آنزیمی در این حالت افزایش می‌یابد



شکل ۷- روند تأثیر تغییرات زمان تثبیت بر فعالیت آنزیم گلوکز اکسیداز تثبیت‌شده

نتایج

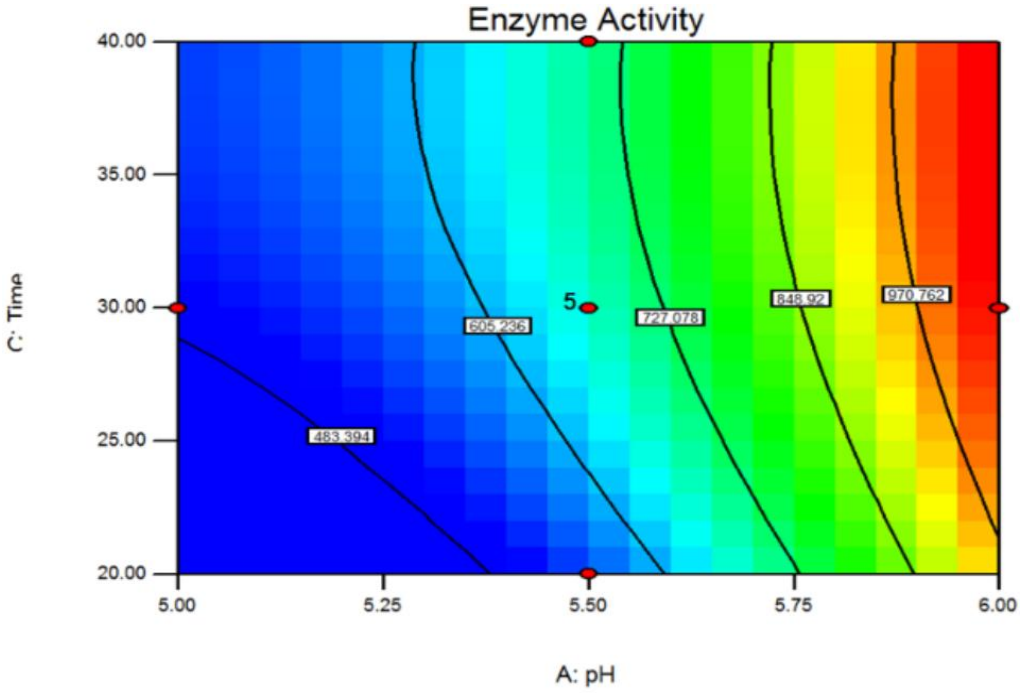
جدول مربوط به نتایج آنالیز واریانس ANOVAمحاسبه شده توسط نرم افزار می‌باشد که براساس آن، می‌توان به درجه اثرگذاری متغیرها پی برد. ارزیابی آماری معنادار بودن مدل با استفاده از آزمون فیشر انجام شده است. مقدار F و P مربوط به مدل، به ترتیب ۴۶۲/۹۴ و کوچکتر از ۰/۰۰۰۱ است و مقدار p-value (در سطح معناداری ۰/۰۱ قرار دارد) لذا می‌توان گفت که مدل درجه دوم انتخابی، مدلی بسیار مناسب و با دقت بالا برای برازش داده های آزمایشگاهی می‌باشد. براساس مقادیر P به دست آمده در جدول شماره ۱ برای متغیرهای مورد بررسی معلوم شد که تغییرات هر سه فاکتور اصلی دما، pH و زمان تثبیت در فعالیت آنزیمی اثرگذار بوده است و نتایج مربوط به اثرات تداخلی متغیرها نشان می‌دهد که متغیرها با یکدیگر تداخل و برهمکنش داشته‌اند. بنابراین استفاده از روش سنتی OFAT منجر به یافتن نقطه بهینه نمی‌شود و این درحالی است که با روش مورد استفاده در این تحقیق می‌توان نقطه بهینه قطعی را تعیین نمود.

جدول ۱- آنالیز واریانس نتایج فعالیت آنزیم گلوکز اکسیداز

Source	Sum of Squares	Degree of Freedom	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	Significance
Model	3.727E+005	9	41416.20	462.94	< 0.0001	Significant
A-pH	1.636E+005	1	1.636E+005	1828.59	< 0.0001	Significant
B-T	26106.13	1	26106.13	291.81	< 0.0001	Significant
C-Time	12246.13	1	12246.13	136.88	< 0.0001	Significant
AB	8955.06	1	8955.06	100.10	< 0.0001	Not Significant
AC	100.81	1	100.81	1.13	0.3161	Significant
BC	93750.81	1	93750.81	1047.93	< 0.0001	Significant
A^2	32226.06	1	32226.06	360.22	< 0.0001	Significant
B^2	10896.40	1	10896.40	121.80	< 0.0001	Significant
C^2	5819.39	1	5819.39	65.05	< 0.0001	Significant
Residual	805.17	9	89.46			
Lack of Fit	805.17	1	805.17			
Pure Error	0.000	8	0.000			
Cor Total	**3.736E+005**	**18**				

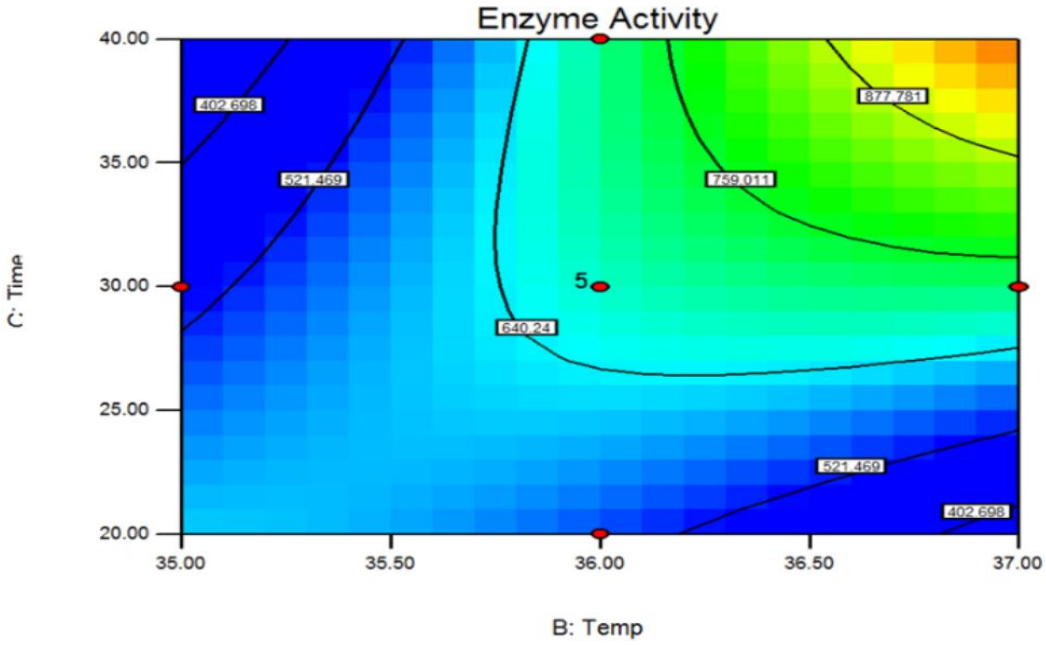
با استفاده از نتایج به دست آمده، میزان فعالیت آنزیم گلوکز اکسیداز تثبیت‌شده، با یک تابع چند جمله ای درجه دوم مطابق رابطه زیر به دست امد.

Enzyme Activity =-20432.
31379 - 9545.29768 * pH + 3111.88789 * Temp - 827.17906 * Time + 149.62500 * pH * Temp - 1.58750 * pH * Time + 24.20625 * Temp * Time + 434.40206 * pH2 - 63.14948 * Temp2 - 0.46149 * Time2



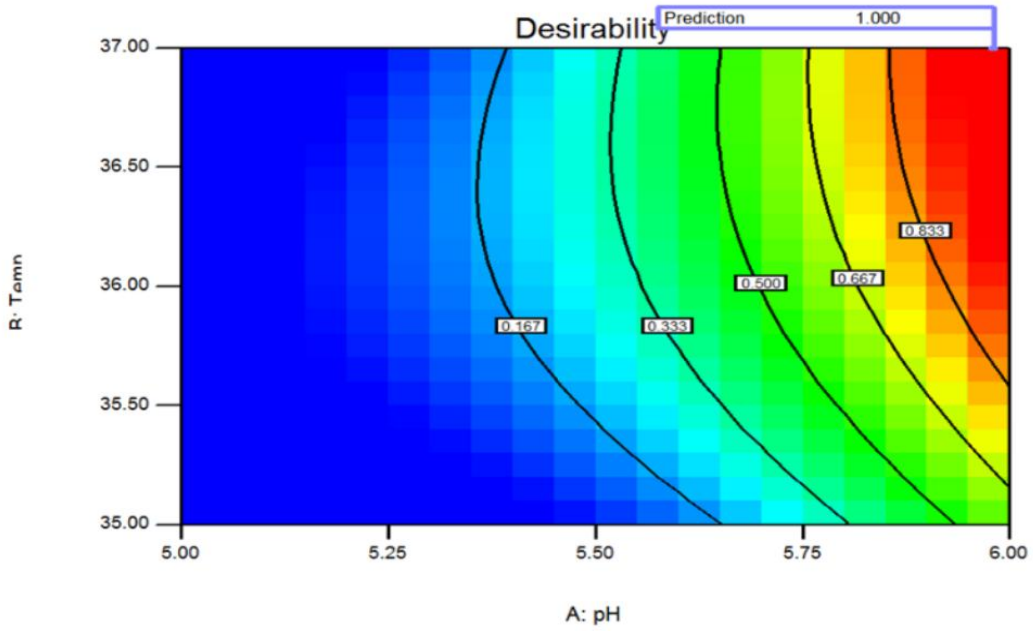
شکل ۸ – اثرات متقابل و همزمان دو متغیر pH و زمان تثبیت بر میزان فعالیت آنزیمی(دما 36 درجه سانتیگراد)

با توجه به شکل ۸ با افزایش pH میزان فعالیت آنزیمی افزایش پیدا کرده است اما در تمام pHهای مورد مطالعه، افزایش زمان تثبیت تأثیری بر میزان فعالیت آنزیمی نداشته است. بنابراین می‌توان گفت که مدت زمان تثبیت و pH بر یکدیگر اثر تداخلی نداشته و یا به عبارتی دیگر می‌توان گفت که اثر هریک از آنها به طور مستقل در میزان فعالیت آنزیمی قابل بررسی است.



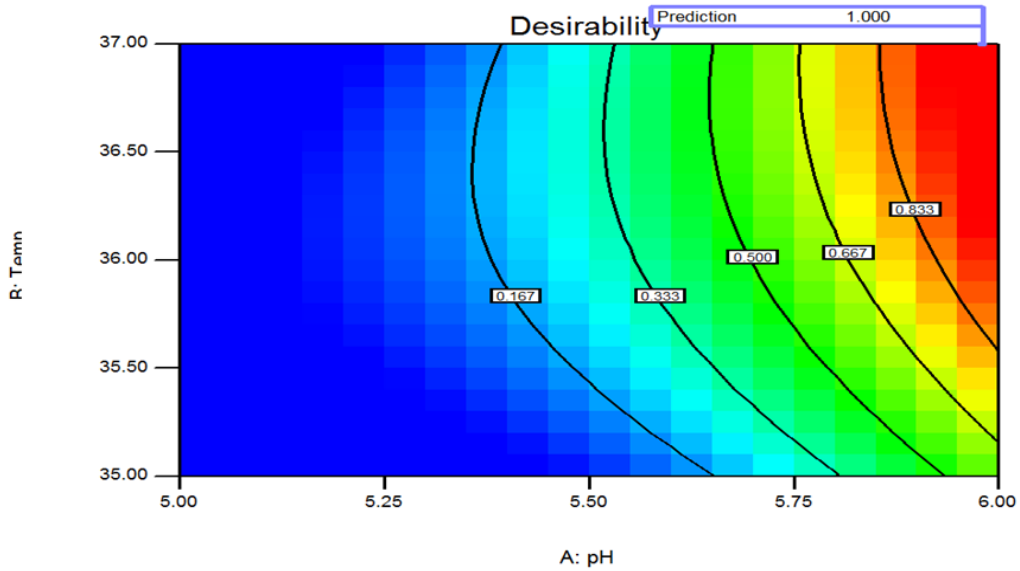
شکل ۹- اثرات متقابل و همزمان دو متغیر زمان تثبیت آنزیم و دما بر میزان فعالیت آنزیمی pH = 5 / 5

در شکل ۹ اثرات متقابل و همزمان دو متغیر زمان تثبیت آنزیم و دما بر میزان فعالیت آنزیم گلوکز اکسیداز نشان داده شده است که اثرات همزمان این دو متغیر نیز بر فعالیت آنزیمی به طور مشابه قابل بررسی است.



شکل ۱۰- اثرات متقابل و همزمان دو متغیر PH و دما بر میزان فعالیت آنزیمی (زمان تثبیت ۳۰ دقیقه)

همانطور که در شکل ۱۰ مشاهده می‌شود در مطالعه فعالیت آنزیمی، دو متغیر pH و دما بر یکدیگر اثرگذار هستند.



شکل ۱۱- کانتور مربوط به نقطه بهینه فعالیت آنزیم گلوکز اکسیداز تثبیت شده

در بهینه سازی شرایط عملیاتی، گام اول تعیین هدف می باشد .در این بررسی میزان فعالیت آنزیم گلوکز اکسیداز به عنوان تابع هدف انتخاب شده و یافتن نقطه بهینه که منجر به بالاترین فعالیت آنزیمی می باشد مورد نظر است این رو بهینه سازی مدل درجه دوم به دست آمده و با استفاده از نرم افزار Design Expert انجام شد که بر اساس نتایج به دست آمده، در pH معادل ۵/۹۸، دمای 37 درجه سانتیگراد و زمان تثبیت ۲۸/۳۳دقیقه، میزان فعالیت آنزیم گلوکزاکسیداز، ۱۱۱۶/۲µmol/minو ماکزیمم مقدار خود میباشد. مطالعه آنزیم ها دارای اهمیت عملی بسیار زیاد است . در حال حاضر، آنزیم ها در زمینه های جدیدی مانند سنتز شیمیایی خالص، داروسازی، حسگر زیستی، حذف زیستی آلاینده ها، جداسازی زیستی، کاربرد گسترده ای یافته اند. آنزیم ها کاتالیزورهای فرایندهای زیستی هستند و نسبت به کاتالیزورهای شیمیایی کارایی بسیار بالایی دارند .اغلب آنزیم ها ساختار پروتئینی دارند. در ابتدا آنزیم گلوکز اکسیداز، عملکرد و ساختار آن و روش های مختلف تثبیت معرفی شد در ادامه، فعالیت آنزیم گلوکزاکسیداز با استفاده از طرح آزمایش رویه پاسخ و ۱۹ آزمایش انجام گرفته شده توسط شیرین مبین و مریم اوتادی(۷) و مطابق با جدول ۲ و اثر ۳ متغیر pH، دما و زمان تثبیت در فعالیت آنزیمی با استفاده از نرم‌افزار Design Expert مورد بررسی قرار گرفت. سپس بر اساس مدلسازی آماری، تابعی برای میزان فعالیت آنزیم گلوکز اکسیداز تثبیت شده در حامل کتیرا بر حسب ۳ متغیر انتخابی ارائه شده است. بر طبق نتایج به دست آمده هر سه متغیر مورد بررسی در فعالیت آنزیم گلوکز اکسیداز تثبیت شده اثرگذار بوده‌اند و همچنین اثرات تداخلی آن ها نیز قابل توجه بوده است. با استفاده از روش پاسخ سطح ، بهینه‌سازی فعالیت آنزیمی انجام شد شرایط بهینه برای بیشترین میزان فعالیت آنزیم گلوکزاکسیداز در pH برابر ۵/۹۸، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و مدت زمان تثبیت ۲۸/۳۳ دقیقه تعیین شد که در این حالت ماکزیمم میزان فعالیت آنزیم گلوکزاکسیداز تثبیت‌شده به میزان ۱۱۱۶/۲ µmol/min به دست آمد. از طرفی مقایسه نتایج آزمایشگاهی و مدل نشان داد که نتایج به دست آمده از مدل موجود با نتایج آزمایشگاهی سازگاری خوبی داشته است و برای این تحقیق، متوسط خطا ۲٪ محاسبه شده است.

جدول ۲- اثر ۳ متغیر pH، دما و زمان تثبیت در فعالیت آنزیمی

Run	A:pH	B:Temp	C:Time	Enzyme Activity
1	5.00	35.00	20.00	498.75
2	5.50	36.00	30.00	664
3	5.50	36.00	40.00	712.5
4	5.00	35.00	20.00	498.75
5	5.00	37.00	40.00	750
6	6.00	37.00	20.00	831
7	5.50	36.00	30.00	664
8	5.50	36.00	30.00	664
9	5.50	35.00	30.00	503
10	5.50	36.00	30.00	664
11	6.00	37.00	20.00	831
12	6.00	36.00	30.00	1075
13	5.00	37.00	40.00	750
14	5.50	36.00	30.00	664
15	5.50	37.00	30.00	731.5
16	5.50	36.00	20.00	556
17	5.00	36.00	30.00	503
18	6.00	35.00	40.00	593.5
19	6.00	35.00	40.00	593.5

بحث

Constantinides و همکارانش در سال ۱۹۷۳ برای گلوکزاکسیداز تثبیت‌شده روی کلاژن مشاهده کردند با افزایش pH تا ۶ فعالیت آنزیمی افزایش یافته و سپس میزان این فعالیت کاهش پیدا کرده است. همچنین در سال ۲۰۰۳ Ghanem و همکاران با استفاده از گلوکزاکسیداز تثبیت‌شده روی ژل کیتوسان نشان دادند که در محدوه ۴ تا ۷ فعالیت آنزیمی روندی افزایشی داشته است و پس از آن فعالیت آنزیمی کاهش یافته است. Yang و همکاران در سال ۲۰۰۴ در بررسی فعالیت آنزیم گلوکزاکسیداز تثبیت‌شده روی ژل کیتوسان و SiO_2 نتیجه مشابهی در خصوص تغییرات pH گزارش دادند. بر اساس نتایج آنها میزان فعالیت آنزیم گلوکزاکسیداز با افزایش pH تا میزان ۶ افزایش یافته و پس از آن فعالیت کاهش یافته است یا به عبارتی بهینه فعالیت آنزیمی در pH معادل ۶ مشاهده شده است. با افزایش دما میزان فعالیت آنزیمی نیز افزایش پیدا کرده است. این افزایش می‌تواند به دلیل عملکرد بهینه آنزیم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد باشد. این نتایج با بررسی فعالیت آنزیم گلوکز اکسیداز تثبیت شده توسط Constantinides و همکاران مطابقت دارد. براساس نتایج آنها می‌توان نتیجه گرفت که فعالیت آنزیمی با افزایش دما تا حدود ۴۰ درجه سانتی‌گراد افزایش پیدا کرده است و پس از آن فعالیت کاهش یافته است که این نتیجه روند مشابه با بررسی اثر دما در تحقیق حاضر می‌باشد. Rodriguez-Nogales و همکاران در سال ۲۰۰۴ در بررسی فعالیت آنزیم گلوکزاکسیداز تثبیت‌شده روی لیپوزوم به این نتیجه رسیدند که دو متغیر pH و دما بر یکدیگر اثرگذار بوده و نمی‌توان تأثیر آنها را به صورت مستقل در فعالیت آنزیمی بررسی نمود. که این مطالعه نیز مطابق مطالعه حاضر می باشد.

نتیجه گیری

بر طبق نتایج به دست آمده هر سه متغیر مورد بررسی در فعالیت آنزیم گلوکز اکسیداز تثبیت‌شده اثرگذار بوده‌اند و همچنین اثرات تداخلی آنها نیز قابل توجه بوده است. با استفاده از روش پاسخ سطح، بهینه‌سازی فعالیت آنزیمی انجام شد شرایط بهینه برای بیشترین میزان فعالیت آنزیم گلوکزاکسیداز در pH برابر ۵/۹۸، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و مدت زمان تثبیت ۲۸/۳۳ دقیقه تعیین شد که در این حالت ماکزیمم میزان فعالیت آنزیم گلوکزاکسیداز تثبیت‌شده به میزان ۱۱۱۶/۲ µmol/min به دست آمد. از طرفی مقایسه نتایج آزمایشگاهی و مدل نشان داد که نتایج به دست آمده از مدل موجود با نتایج آزمایشگاهی سازگاری خوبی داشته است و برای این تحقیق، متوسط خطا ۲٪ محاسبه شده است.

سپاسگزاری

از بخش معاونت پژوهش و فن آوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی تشکر و قدردانی می شود.

منابع و مآخذ

۱. تقی زاده پارچه بافی، بهاره، بررسی سینتیک تثبیت آنزیم آلفا آمیلاز در پلیمر کتیرا، ۱۳۸۷، هجدهمین کنگره صنایع غذایی.

2. Amyl, Ghanem. Ahmed, Ghaly. 2003. Immobilization of Glucose oxidase in chitosan gel beads. Applied polymer,91(2):861-866.
3. Constantinides, A. Vieth, W.R. Fernandes, P.M. 1973. Characterization of glucose oxidase immobilized on collagen. Mol Cell Biochem, 1(1):127-33.
4. Hosseinkhani, S. Ranjbar, B. 2004. Chemical modification of glucose oxidase possible formation of molten globule-like intermediate stracture. FEBS letters, 561:213-216.
5. José Manuel, Rodriguez Nogales. Manuel Pérez, Mateos. Ma Dolores, Busto. 2004. Application of experimental design to the formulation of glucose oxidase encapsulation by liposomes. Chemical Technology and Biotechnology, 79(7):700-705.
6. Kulkarni, V. Batte, S. Kishor, D. Rathod,.S. 2012. Natural Polymers-A comprehensive Review. International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences, 2229-3701.
7. Mobin, Sh. Otadi, M. Habibi, A. 2010. Kinetic of the behavior of immobilized Glucose Oxidase on Gum Trangacanth carrier. Food sciences and Nutrition, 8(4):5-12.
8. Schomburg, I. Chang, A. 2013. Integrated reactions, kinetic data, enzyme function data, improved disease classification: new options and contents in BRENDA. US National Library of Medicine National Institutes of Health, 41:64-72.
9. Sheldon, R. A. Roger, A. 2007. Enzyme immobilization the quest for optimum performance. Advanced Synthesis & Catalysis, 349:8-9.
10. Y.M, Yang. R.X, Tan. J.W,Wang. 2004. Immobilization of glucose oxidase on chitosan–SiO 2 gel. Enzyme and Microbial Technology, 34(2):126-131.
11. Zuwei, M. Zhengwei, M. Changyou, G. 2007. Surface modification and Property Analysis of biomedical polymers used for eissue engineering. Colloids and surfaces Bioniterfaces, 60: 137-157.