۲۷۹۷
۹۴/۱/۱۹

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی استان اصفهان

دانشکده داروسازی و علوم دارویی

گروه بیوشیمی بالینی – گروه فارماسیوتیکس

پایان نامه کارشناسی ارشد

طرح تحقیقاتی شماره: ۳۹۳۷۴۰

عنوان:

بررسی پایداری آنزیم لاکتوپراکسیداز تثبیت شده بر روی نانوشیت های گرافن اکساید

به راهنمایی:

سید ضیاالدین صمصام شریعت ph.D

محمد رضا مفید ph.D

ژاله ورشوساز ph.D

توسط:

فاطمه برزویی

بهمن ۱۳۹۴

بررسی پایداری آنزیم لاکتوپراکسیداز تثبیت شده بر روی نانوشیت های گرافن اکساید

دکتر سید ضیاءالدین صمصام شریعت، دکتر محمدرضا مفید، دکتر ژاله ورشو ساز و فاطمه برزویی

مقدمه

آنزیم لاکتوپراکسیداز به دلیل خواص آنتی باکتریالی که دارد بسیار مورد توجه صنایع به‌ویژه صنایع غذایی و داروسازی قرار دارد. با توجه به کاربردهای صنعتی این آنزیم، پایدارسازی آن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. بررسی‌های آنزیماتیک بر روی گرافن اکساید نشان داده اند که گرافن اکساید یک ماتریکس بسیار ایده آل برای تثبیت بسیاری از آنزیم‌ها بوده است. بر این اساس بررسی تثبیت آنزیم لاکتوپراکسیداز جداشده از آب‌پنیر، هدف از این مطالعه بوده است.

روش‌ها

آنزیم لاکتوپراکسیداز طی دو مرحله رسوب‌دهی با سولفات آمونیوم ۴۰٪ و ۷۰٪ و یک مرحله کروماتوگرافی ستونی بر روی رزین CM-Cellulose با استفاده از بافر Tris-HCl ۵۰ میلی مولار با pH ۸/۶ از آب‌پنیر جدا شد. سپس بر روی نانوشیت های گرافن اکساید تغییر یافته با گلوتارآلدهید ۳٪ تثبیت شد. سپس کینتیک و پایداری آنزیم لاکتوپراکسیداز آزاد و تثبیت شده بررسی و مقایسه گردید.

نتایج

آنزیم لاکتوپراکسیداز ۱۰/۲۶ درصد و به میزان ۵۹/۱۳ برابر با فعالیت ویژه ۵/۷۸ واحد در میلی لیتر، از آب‌پنیر جدا شد. و با بازده ایموبیلیزاسیون ۶۹٪ بر روی نانوشیت های گرافن اکساید تثبیت شد. دمای اپتیمم آنزیم آزاد و تثبیت شده به ترتیب ۵۰ و ۶۰ درجه سانتی گراد به دست آمد. pH اپتیمم آن‌ها نیز به ترتیب ۶ و ۷/۵ به دست آمد. K_m و V_{max} آنزیم پس از تثبیت کاهش یافت و K_m آن از 178mM در حالت آزاد به 104mM در حالت تثبیت شده رسید؛ و V_{max} آن از $0.63\ (\mu mol / ml.min)^{-1}$ در حالت آزاد به $0.36\ (\mu mol/ ml.min)^{-1}$ در حالت تثبیت شده رسید. پایداری دمایی آنزیم تثبیت شده نسبت به آنزیم آزاد افزایش یافت و بعد از ۶۰ دقیقه تحمل دمای ۷۵ درجه سانتی گراد ۴۵٪ از فعالیت اولیه خود را حفظ کرد. آنزیم تثبیت شده در pH برابر با ۸ به

تحمل دمای ۷۵ درجه سانتی گراد ۴۵٪ از فعالیت اولیه خود را حفظ کرد. آنزیم تثبیت شده در pH برابر با ۸ به مدت ۱۲ ساعت توانست ۹۲ ٪ از فعالیت اولیه خود را حفظ نماید. آنزیم تثبیت شده به پس از ۳۰ روز ذخیره شدن در دمای ۴ درجه سانتی گراد ۶۴٪ از فعالیت اولیه خود را حفظ کرده بود.

بحث

کاهش k_m آنزیم پس از تثبیت نشان دهنده افزایش تمایل آنزیم به سوبسترا است. افزایش pH و دمای اپتیمم آنزیم تثبیت شده، نشان می‌دهد که آنزیم در دمای بالاتر و pH قلیایی می‌تواند به میزان بالایی فعالیت داشته باشد. افزایش پایداری ذخیره‌ای و پایداری دمایی آنزیم نشان دهنده قابلیت استفاده کارآمد آن در بیوسنسورها پس از تثبیت است. نتایج به دست آمده در این مطالعه با سایر مطالعاتی که آنزیم‌های دیگری را بر روی نانوشیت های گرافن تثبیت کرده بودند، ازجمله آنزیم آلفا- گالاکتوزیداز، اسید پکتیناز و آلکالین پروتئاز هم‌خوانی داشت.

کلید واژه ها: پایداری، لاکتوپراکسیداز، تثبیت ، نانوشیت های گرافن اکساید، کروماتوگرافی

فهرست مندرجات

عنوان صفحه

فهرست مطالب..... ب

فهرست جداول..... خ

فهرست اشکال..... د

فهرست نمودارها..... ذ

فهرست اختصارات..... ر

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

خلاصه فارسی..... ۱

فصل اول..... ۳

۱-۱. آنزیم‌های پراکسیداز ۴

۱-۲. طبقه‌بندی آنزیم‌های پراکسیداز ۴

۱-۲-۱. فوق خانواده اول ۴

۱-۲-۲. فوق خانواده دوم ۵

۱-۲-۲-۱. خانواده پراکسیدازهای همی پستانداران (XPO Family) ۵

۱-۳. معرفی آنزیم لاکتوپراکسیداز (EC.1.11.1.7) ۵

۱-۴. سیستم لاکتوپراکسیداز و اهمیت این سیستم ۶

۱-۵. کاربردهای سیستم لاکتوپراکسیداز ۶

۱-۵-۱. کاربرد در صنایع غذایی ۷

۱-۵-۲. کاربرد در صنایع آرایشی- بهداشتی ۷

۱-۵-۳. کاربرد در صنایع دارویی ۷

۱-۵-۴. کاربرد در کیت‌های آزمایشگاهی ۸

۱-۶. خصوصیات فیزیکوشیمیایی آنزیم لاکتوپراکسیداز ۸

۱-۷. گروه پروستتیک آنزیم لاکتوپراکسیداز ۹

۱-۸. مکانیسم عمل لاکتوپراکسیداز ۱۲

۱-۹. سوبستراهای آنزیم لاکتوپراکسیداز ۱۵

۱-۹-۱. معرفی گوائیکول ۱۵

۱-۱۰. پایداری آنزیم لاکتوپراکسیداز ۱۶

۱-۱۰-۱. اثر حرارت ۱۶

۲-۱۰-۱. اثر pH ۱۶
۱۱-۱. هدف از تثبیت آنزیم‌ها ۱۶۷
۱۲-۱. مفهوم تثبیت آنزیمی ۱۷
۱۳-۱. تاریخچه تثبیت آنزیم‌ها ۱۷
۱۴-۱. فواید تثبیت آنزیم‌ها ۱۸
۱۵-۱. انواع روش‌های تثبیت آنزیمی ۱۹
۱-۱۵-۱. روش در تله انداختن ۱۹
۲-۱۵-۱. روش اتصالات عرضی ۱۹
۳-۱۵-۱. پیوند کووالانسی ۲۰
۴-۱۵-۱. جذب سطحی ۲۰
۵-۱۵-۱. اتصال یونی ۲۱
۱۶-۱. انتخاب بستر مناسب برای تثبیت آنزیم ۲۱
۱۷-۱. معرفی گرافن اکساید ۲۱
اهداف و فرضیات: ۲۵
الف) هدف اصلی طرح ۲۵
ب) اهداف فرعی طرح ۲۵
ج) هدف کاربردی ۲۵
د) فرضیات ۲۵
فصل دوم. مواد، دستگاه ها و روش ها ۲۶
۱-۲. مواد شیمیایی مورد استفاده ۲۷
۲-۲. دستگاه‌های مورد استفاده ۲۹
۳-۲. تهیه محلول‌ها و بافرهای موردنیاز ۳۰
۱-۳-۲. محلول ۲۵ میلی مولار گوائیکول ۳۰
۲-۳-۲. محلول ۲۵ میلی مولار H_2O_2 ۳۰
۳-۳-۲. بافر فسفات سدیم ۳۰ میلی مولار (۶-۸) pH ۳۰
۴-۳-۲. بافر سیترات سدیم ۳۰ میلی مولار (۳-۵/۵) pH ۳۱

۵-۳-۲. بافر ۵۰ میلی مولار Tris-HCl با pH (۸/۶) ۳۱
۶-۳-۲. محلول‌های لازم جهت الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید ۳۲
۱-۶-۳-۲. محلول ذخیره آکریل آمید – بیس آکریل آمید ۳۲
۲-۶-۳-۲. بافر ژل جداکننده ۳۲
۳-۶-۳-۲. بافر ژل متراکم کننده ۳۲
۴-۶-۳-۲. پرسولفات آمونیوم ۱۰٪ ۳۲
۵-۶-۳-۲. TEMED ۱۰ ٪ ۳۳
۶-۶-۳-۲. بافر نمونه (5x) ۳۳
۷-۶-۳-۲. بافر الکترود (بافر مخازن) ۳۳
۸-۶-۳-۲. محلول ذخیره SDS (W/V) ۱۰٪ ۳۳
۹-۶-۳-۲. محلول رنگ‌آمیزی ژل ۳۳
۱۰-۶-۳-۲. محلول رنگ بری ۳۴
۴- ۲. الکتروفورز ۳۴
۱-۴-۲. SDS- پلی آکریل آمید ژل الکتروفورز ۳۵
۲-۴-۲. رنگ‌آمیزی ژل الکتروفورز به وسیله رنگ کوماسی بلو ۳۶
۵-۲. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم لاکتوپراکسیداز ۳۶
۶- ۲.اندازه‌گیری غلظت پروتئین ۳۸
۷-۲. محاسبه Rz Value ۳۸
۸-۲. آماده‌سازی کیسه دیالیز ۳۹
۹-۲. دیالیز ۳۹
۱۰-۲. تخلیص آنزیم لاکتوپراکسیداز از شیر گاو ۴۰
۱-۱۰-۲. آماده‌سازی شیر بدون چربی (skim milk) ۴۰
۲-۱۰-۲. آماده‌سازی آب‌پنیر ۴۰
۳-۱۰-۲. جداسازی گلوبولین ها از آب‌پنیر با استفاده سولفات آمونیوم ۴۰٪ ۴۱
۴-۱۰-۲. رسوب پروتئین‌های باقیمانده در سوپرناتانت ۴۰٪ با استفاده از آمونیوم سولفات ۷۰٪ ۴۲
۷-۱۰-۲. آماده‌سازی رزین CM-Cellulose ۴۲

۸-۱۰-۲. CM-Cellulose کروماتوگرافی..... ۴۳
۹-۱۰-۲. رسوب دهی مجموع فراکشن هایی که Rz value بالاتر از ۰/۷ دارند با سولفات آمونیوم (اشباع ۹۰٪) ۴۴
۱۱-۲. تثبیت آنزیم بر روی نانوشیت های گرافن اکساید..... ۴۴۴
۱۲-۲. تعیین بازده تثبیت..... ۴۵
۱۳-۲. لیوفیلیزاسیون گرافن اکساید تغییریافته با گلوتارآلدهید و آنزیم لاکتوپراکسیداز تثبیت شده..... ۴۶
۱۴-۲. تشخیص آنزیم تثبیت شده با استفاده از تکنیک FTIR..... ۴۶
۱۵-۲. تعین سایز نانوشیت های گرافن اکساید قبل و بعد از تثبیت آنزیم..... ۴۷
۱۶-۲. تعین پتانسیل زتا برای نانوشیت های گرافن اکساید در مراحل مختلف تثبیت..... ۴۷
۱۷-۲. تعیین K_m و V_{max} آنزیم آزاد و تثبیت شده..... ۴۷
۱۸-۲. تعیین pH اپتیمم آنزیم لاکتوپراکسیداز آزاد و تثبیت شده..... ۴۸
۱۹-۲. تعیین دمای اپتیمم آنزیم لاکتوپراکسیداز آزاد و تثبیت شده..... ۴۸
۲۰-۲. تعیین پایداری دمایی آنزیم آزاد و تثبیت شده..... ۴۸
۲۱-۲. تعیین پایداری ذخیره‌ای آنزیم لاکتوپراکسیداز آزاد و تثبیت شده..... ۴۹
فصل سوم. نتایج..... ۵۰
۱-۳. تهیه آب‌پنیر..... ۵۲
۲-۳.رسوب بخشی از گلوبولین ها با آمونیوم سولفات ۴۰ ٪ و رسوب پروتئین های باقیمانده در آب پنیر با استفاده از آمونیوم سولفات ۷۰ ٪..... ۵۳
۳-۳. کروماتوگرافی ستونی با استفاده از رزین CM-Celloluse..... ۵۵
۱-۳-۳. الکتروفورز آنزیم لاکتوپراکسیداز جداشده از آب‌پنیر..... ۵۶
۴-۳. غلظت پروتئین با استفاده از روش برادفورد..... ۵۷
۵-۳. بازده تثبیت آنزیم لاکتوپراکسیداز بر روی نانوشیت های گرافن اکساید..... ۵۸
۶-۳. نتایج حاصل از FTIR..... ۵۹
۱-۶-۳. اسپکترای FTIR برای گرافن اکساید..... ۵۹
۲-۶-۳. اسپکترای FTIR گرافن اکساید تغییریافته با گلوتارآلدهید ۳٪..... ۶۰
۳-۶-۳. اسپکترای FTIR آنزیم لاکتوپراکسیداز تثبیت شده بر روی نانوشیت های گرافن اکساید..... ۶۱

۳-۷. سایز نانوشیت های گرافن اکساید قبل و پس از تثبیت آنزیم ۶۲
۳-۸. پتانسیل زتا برای نانوشیت های گرافن اکساید در مراحل مختلف تثبیت آنزیم..... ۶۳
۳-۸-۱. پتانسیل زتا برای نانوشیت های گرافن اکساید..... ۶۳
۳-۸-۲. پتاسیل زتا برای نانوشیت های گرافن اکساید تغییر یافته با گلوتارآلدهید ۶۴
۳-۸-۳. پتانسیل زتا برای آنزیم تثبیت شده بر روی نانوشیت های گرافن اکساید تغییر یافته با گلوتارآلدهید.... ۶۵
۳-۹. K_m و V_{max} آنزیم لاکتوپراکسیداز آزاد و تثبیت شده..... ۶۶
۳-۱۰. pH اپتیمم آنزیم آزاد و تثبیت شده..... ۶۷
۳-۱۱. دمای اپتیمم آنزیم آزاد و تثبیت شده..... ۶۸
۳-۱۲. پایداری دمایی آنزیم لاکتوپراکسیداز آزاد و تثبیت شده..... ۶۹
۳-۱۳. پایداری ذخیره‌ای آنزیم آزاد و تثبیت شده..... ۷۰
فصل چهارم. بحث و نتیجه گیری..... ۷۱
۴-۱. بحث..... ۷۲
۴-۲. نتیجه گیری..... ۸۱
۴-۳. پیشنهادات..... ۸۲
منابع..... ۸۲
خلاصه انگلیسی..... ۸۷

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱. مقایسه مشخصات پروتئین های خانواده پراکسیدازهای همی پستانداران ۵
جدول ۱-۲. مواد مصرف شده در انجام این پایان نامه..... ۲۷
جدول ۲-۲. دستگاه های بکار رفته..... ۲۹
جدول ۳-۲. نسبت های حجمی اسید و باز برای تهیه بافر فسفات سدیم..... ۳۰
جدول ۴-۲. نسبت های حجمی اسید و باز برای تهیه بافر سیترات سدیم..... ۳۱
جدول ۵-۲. راهنمای تهیه ژل SDS-PAGE ۱۰%..... ۳۵
جدول۶ -۲. اجزای مخلوط واکنش آنزیم لاکتوپراکسیداز ۳۸
جدول۱-۳. مقایسه میزان پروتئین و فعالیت آنزیم لاکتوپراکسیداز در مراحل خالص‌سازی از آب‌پنیر..... ۵۱
جدول۱-۴. پروتئین های موجود در آب‌پنیر ۷۲

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱. نمای شماتیک ساختمان مولکولی آنزیم لاکتوپراکسیداز.. ۹
شکل ۲-۱. تعامل مولکول هم با آمینواسیدهای لاکتوپراکسیداز ۱۰
شکل۳-۱. حفره هم در آنزیم لاکتوپراکسیداز. ۱۱
شکل ۴-۱. حفره هم در آنزیم لاکتوپراکسیداز. ۱۲
شکل ۵-۱. مکانیسم واکنش آنزیم لاکتوپراکسیداز ۱۴
شکل ۶-۱. واکنش تبدیل گوائیکول به تتراگوائیکول در حضور پراکسید هیدروژن ۱۶
شکل ۷-۱. طبقه‌بندی روش های تثبیت آنزیم ها. ۱۸
شکل ۸-۱ ساختار نانوشیت های گرافن اکساید ۲۴
شکل ۱-۳. ژل الکتروفورز ۱۰ ٪ پروتئین های آب‌پنیر ۵۲
شکل ۲-۳. ژل الکتروفورز ۱۰٪ پروتئین های آب پنیر و گلوبولین های جدا شده از آن ۵۴
شکل ۳-۳. ژل الکتروفورز ۱۰٪ آنزیم لاکتوپراکسیداز خالص شده از آب‌پنیر ۵۶
شکل۴-۳. اسپکتروم FTIR نانوشیت های گرافن اکساید ۵۹
شکل ۵-۳. اسپکتروم FTIR نانوشیت های گرافن اکساید تغییریافته با گلوتارآلدهید ۶۰
شکل ۶-۳. اسپکتروم FTIR آنزیم لاکتوپراکسیداز تثبیت شده شده بر روی نانوشیت های گرافن اکساید ۶۱
شکل ۷-۳. سایز نانوشیت های گرافن اکساید طی تثبیت آنزیم ۶۲
شکل ۸-۳. پتانسیل زتا برای نانوشیت های گرافن اکساید ۶۳
شکل ۹-۳. پتانسیل زتا برای نانوشیت های گرافن اکساید تغییر یافته با گلوتارآلدهید ۶۴
شکل ۱۰-۳. پتانسیل زتا برای آنزیم تثبیت شده بر روی نانوشیت های گرافن اکساید ۶۵

فهرست نمودارها

عنوان **صفحه**

نمودار ۱-۳. نمودار استاندارد جذب غلظت های مختلف آلبومین سرم گاوی در اندازه گیری غلظت پروتئین به روش برادفورد ۵۷
نمودار ۲-۳. منحنی Lineweaver-Burk آنزیم لاکتوپراکسیداز ۶۶
نمودار ۳-۳. pH اپتیمم آنزیم لاکتوپراکسیداز آزاد و تثبیت شده ۶۷
نمودار ۴-۳. دمای اپتیمم آنزیم لاکتوپراکسیداز آزاد و تثبیت شده ۶۸
نمودار ۵-۳. پایداری دمایی آنزیم لاکتوپراکسیداز آزاد و تثبیت شده. ۶۹
نمودار ۶-۳. پایداری ذخیره ای آنزیم لاکتوپراکسیداز آزاد و تثبیت شده ۷۰

فهرست اختصارات

ABTS	2-2- azinobis (3-ethylbenzothiazolin - 6 – sulfonic acid)
BSA	Bovine Serum Albomin
CM-Cellulose	Carboxymethyl Cellulose
EPO	Eosinophilperoxidase
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
GL	Glutaraldehyde
GO	Graphene Oxide
IR	Infra-Red
KBr	Potassium bromide
LF	Lacto Ferrin
LPO	Lactoperoxidase
LPS	Lactoperoxidase System
MPO	Myeloperoxidase
$OSCN^-$	Hyptthiocyanate
PI	pH Isoelectric
SCN^-	Thiocyanate
SDS-PAG	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
TPO	Thyroid Peroxidase
XPO	Mammalian heme containing peroxidase

References

1. Nelson R, Fessler L, Takagi Y, Blumberg B, Keene D, Olson P, et al. Peroxidasin: a novel enzyme-matrix protein of Drosophila development. The EMBO journal. 1994;13(15):3438.
2. Obinger C, Regelsberger G, Furtmüller PG, Jakopitsch C, Rüker F, Pircher A ,et al. Catalase-peroxidases in cyanobacteria--similarities and differences to ascorbate peroxidases. Free radical research. 1999;31:S243-9.
3. Ruiz-Duenas F, Camarero S, Perez-Boada M, Martinez M, Martinez A. A new versatile peroxidase from Pleurotus. Biochemical Society Transactions. 2001;29(Pt 2):116-22.
4. Tognolli M, Penel C, Greppin H, Simon P. Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in Arabidopsis thaliana. Gene. 2002;288(1):129-38.
5. Furtmüller PG, Zederbauer M, Jantschko W, Helm J, Bogner M, Jakopitsch C, et al. Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases. Archives of biochemistry and biophysics. 2006;445(2):199-213.
6. De Wit J, Van Hooydonk A. Structure, functions and applications of lactoperoxidase in natural antimicrobial systems. Nederlands melk en Zuiveltijdschrift. 1996;50(2):227-44.
7. Reiter B, Marshall V, Philips S. The antibiotic activity of the lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide system in the calf abomasum. Research in veterinary science. 1980;28(1):116-22.
8. Kussendrager KD, Van Hooijdonk A. Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. British journal of nutrition. 2000;84(S1):19-25.
9. Ahariz M, Courtois P. Candida albicans susceptibility to lactoperoxidase-generated hypoiodite. Clinical, cosmetic and investigational dentistry. 2010;2:69.
10. Mikola H, Waris M, Tenovuo J. Inhibition of herpes simplex virus type 1, respiratory syncytial virus and echovirus type 11 by peroxidase-generated hypothiocyanite. Antiviral research. 1995;26(2):161-71.
11. Tenovuo J, Mäkinen K, Sievers G. Antibacterial effect of lactoperoxidase and myeloperoxidase against Bacillus cereus. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1985;27(1):96-101.
12. Bozoglu F, Swaisgood HE, Adams Jr DM. Isolation and characterization of an extracellular heat stable lipase produced by Pseudomonas fluorescens MC50. Journal of Agricultural and food chemistry. 1984;32(1):2-6.
13. Godfrey D HD, and Lingnixgton H. Antimicrobial compositions. European patent specification 1990.
14. Kirstilä V, Lenander-Lumikari M, Söderling E, Tenovuo J. Effects of oral hygiene products containing lactoperoxidase, lysozyme, and lactoferrin on the composition of whole saliva and on subjective oral symptoms in patients with xerostomia. Acta odontologica scandinavica. 1996;54(6):391-7.
15. Lefkowitz DL, Hsieh T-C, Mills K, Castro A. Induction of tumor necrosis factor and cytotoxicity by macrophages exposed to lactoperoxidase and microperoxidase. Life sciences. 1990;47(8):703-9.

16. Jago G. The antibacterial action of lactoperidoxase. The nature of the bacterial inhibitor. Biochemical jornal. 1970;117:779-90.
17. MV. G. oxidase Peroxidase kit for etanol assay. Food technol Biotechnol. 2001.
18. Ranta Chaterjee UB, Abijit mazumdar and Ranajit K. Bamerjee. Lactoperoxidase- catalyzed oxidation of indomethacin, a non stroidal anti inflammatory drug, through the formation of a free radical .1996. Biomedical pharmacology. 1996:1169-75.
19. Zeng J, Fenna R. X-ray crystal structure of canine myeloperoxidase at 3 Å resolution. Journal of molecular biology. 1992;226(1):185-207.
20. Paul K, Ohlsson P. The chemical structure of lactoperoxidase. Marcel Dekker: New York; 1985. p. 15-30.
21. Dull TJ, Uyeda C, Strosberg AD, Nedwin G, Seilhamer JJ. Molecular cloning of cDNAs encoding bovine and human lactoperoxidase. DNA and cell biology. 1990;9(7):499-509.
22. Pako PI. in the Lactoperoxidase system: Chemistry and biological significance dekker. 1985;6:15-29.
23. yoshida YX. isolation of Lactoperoxidase and lactofrrin from bovine milk rennt whey and acid whey by sulphopropyl cation-exchange chromatography. Net milk and dairy 1991;45:273-80.
24. Kohler H, Jenzer H. Interaction of lactoperoxidase with hydrogen peroxide: formation of enzyme intermediates and generation of free radicals. Free radical biology and medicine. 1989;6(3):323-39.
25. Sujata Sharma AKS, Sanket Kaushik, Mau Sinha, Rashmi Prabha Singh, Pradeep Sharma, Harshverdhan Sirohi, Punit Kaur, Tej P Singh. Lactoperoxidase: structural insights into the function, ligand binding and inhibition. International journal of biochemistry and molecular biology. 2013;4(3):108-28.
26. Alan WN LA, Theres M, and Peter SC. Lactoperoxidase heam, and iron porphyrin thiol. Biochemical jornal. 1987;247:147-50.
27. Pruitt K, Kamau D. The lactoperoxidase system of bovine and human milk. Oxidative Enzymes in Foods, Elsevier Applied Sciences, London. 1991:133-74.
28. Pruitt KM, Tenovuo JO. The lactoperoxidase system. Chemistry and biological significance1985.
29. Furtmüller PG, Jantschko W, Regelsberger G, Jakopitsch C, Arnhold J, Obinger C. Reaction of lactoperoxidase compound I with halides and thiocyanate. Biochemistry. 2002;41(39):11895-900.
30. Monzani E, Gatti AL, Profumo A, Casella L, Gullotti M. Oxidation of phenolic compounds by lactoperoxidase. Evidence for the presence of a low-potential compound II during catalytic turnover. Biochemistry. 1997;36(7):1918-26.
31. Doerge DR, Decker CJ. Inhibition of peroxidase-catalyzed reactions by arylamines: mechanism for the anti-thyroid action of sulfamethazine. Chemical research in toxicology. 1994;7(2):164-9.
32. Oakley GG, Devanaboyina U-s, Robertson LW, Gupta RC. Oxidative DNA damage induced by activation of polychlorinated biphenyls (PCBs): implications for PCB-induced oxidative stress in breast cancer. Chemical research in toxicology. 1996;9(8):1285-92.
33. Ferrari RP, Laurenti E, Casella L, Poli S. Oxidation of catechols and catecholamines by horseradish peroxidase and lactoperoxidase: ESR spin stabilization approach combined with optical methods. Spectrochimica acta part A: Molecular spectroscopy. 1993;49(9):1261-7.

34. Ghibaudi EM, Laurenti E, Beltramo P, Ferrari RP. Can estrogenic radicals, generated by lactoperoxidase, be involved in the molecular mechanism of breast carcinogenesis? Redox report. 2000;5(4):229-35.
35. Ozdemir H, Aygul I, Küfrevioglu OI. Purification of lactoperoxidase from bovine milk and investigation of the kinetic properties. Preparative biochemistry and Biotechnology. 2001;31(2):125-34.
36. Griffith M. J. J. Food Protection. 1986;49.
37. Boscolo B, Leal SS, Ghibaudi EM, Gomes CM. Lactoperoxidase folding and catalysis relies on the stabilization of the α-helix rich core domain: A thermal unfolding study. Biochimica et biophysica acta (BBA)-Proteins and proteomics. 2007;1774(9):1164-72.
38. Booth KS, Kimura S, Lee HC, Ikeda-Saito M, Caughey WS. Bovine myeloperoxidase and lactoperoxidase each contain a high affinity site for calcium. Biochemical and biophysical research communications. 1989;160(2): 897-902.
39. Hernandez K, Fernandez-Lafuente R. Control of protein immobilization: Coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance. Enzyme and microbial technology. 2011;48(2):107-22.
40. Sheldon RA. Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. Advanced synthesis & catalysis. 2007;349(8-9):1289-307.
41. Hartmann M, Kostrov X. Immobilization of enzymes on porous silicas–benefits and challenges. Chemical Society Reviews. 2013;42(15):6277.۸۹-
42. Nisha S, Karthick A, Gobi N. A review on methods, application and properties of immobilized enzyme. Chemical Science Review and Letters. 2012;1(3):148-55.
43. Singh N, Srivastava G, Talat M, Raghubanshi H, Srivastava ON, Kayastha AM. Cicer α-galactosidase immobilization onto functionalized graphene nanosheets using response surface method and its applications. Food chemistry. 2014;142:430-8.
44. Brena BM, Batista-Viera F. Immobilization of enzymes. Immobilization of enzymes and cells: Springer ;2006 .p. 15-30.
45. Wingard LB, Katchalski-Katzir E, Goldstein L. Immobilized enzyme principles: applied biochemistry and bioengineering: Elsevier; 2014.
46. Riaz A, Qader SAU, Anwar A, Iqbal S. Immobilization of a thermostable A-amylase on calcium alginate beads from Bacillus subtilis KIBGE-HAR. Australian journal of basic and applied sciences. 2009;3(3):2883-7.
47. Wong LS, Thirlway J, Micklefield J. Direct site-selective covalent protein immobilization catalyzed by a phosphopantetheinyl transferase. Journal of the american chemical society. 2008;130(37):12456-64.
48. Chae HJ, In M-J, Kim EY. Optimization of protease immobilization by covalent binding using glutaraldehyde. Applied biochemistry and biotechnology. 1998;73(2-3):195-204.
49. Quirk RA, Chan WC, Davies MC, Tendler SJ, Shakesheff KM. Poly (l-lysine)–GRGDS as a biomimetic surface modifier for poly (lactic acid). Biomaterials. 2001;22(8):865-72.
50. Nisha S, Arun Karthick S, Gobi N. A review on methods, application and properties of immobilized enzyme. Chemical Science Review and Letters. 2012;1(3):148-55.
51. Tanyolaç D, Yürüksoy BI, Özdural AR. Immobilization of a thermostable α-amylase, Termamyl®, onto nitrocellulose membrane by Cibacron Blue F3GA dye binding. Biochemical engineering journal.1998;2(3):179-86.

52. Brady D, Jordaan J. Advances in enzyme immobilisation. Biotechnology letters. 2009;31(11):1639-50.
53. Guisán JM, Penzol G, Armisen P, Bastida A, Blanco RM, Fernandez-Lafuente R, et al. Immobilization of enzymes acting on macromolecular substrates. Immobilization of enzymes and cells: Springer; 1997. p. 261-75.
54. Kim J, Grate JW, Wang P. Nanobiocatalysis and its potential applications. Trends in biotechnology. 2008;26(11):639-46.
55. Dwevedi A, Singh AK, Singh DP, Srivastava ON ,Kayastha AM. Lactose nano-probe optimized using response surface methodology. Biosensors and bioelectronics. 2009;25(4):784-90.
56. Singh N, Kayastha AM. Cicer α-galactosidase immobilization onto chitosan and Amberlite MB-150: optimization, characterization, and its applications. Carbohydrate research. 2012;358:61-6.
57. Kishore D, Kayastha AM. Optimisation of immobilisation conditions for chick pea β-galactosidase (CpGAL) to alkylamine glass using response surface methodology and its applications in lactose hydrolysis. Food chemistry. 2012;134(3):1650-7.
58. Ansari SA, Husain Q. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. Biotechnology advances. 2012;30(3):512-23.
59. Chen D, Tang L, Li J. Graphene-based materials in electrochemistry. Chemical Society Reviews. 2010;39(8):3157-80.
60. Ruoff R. Graphene: Calling all chemists. Nature nanotechnology. 2008;3(1):1-10.
61. Rao CeNeR, Sood AeK, Subrahmanyam KeS, Govindaraj A. Graphene: The New Two-Dimensional Nanomaterial. Angewandte Chemie International Edition. 2009;48(42):7752-77.
62. Hummers W, Offeman R. Graphite oxide (GO) was prepared using the well-known Hummers method described by Hummers. J Am Chem Soc. 1958;80:1339.-
63. Wang Y, Li Z, Wang J, Li J, Lin Y. Graphene and graphene oxide: biofunctionalization and applications in biotechnology. Trends in biotechnology. 2011;29(5):205-12.
64. Liu J, Cui L, Losic D. Graphene and graphene oxide as new nanocarriers for drug delivery applications. Acta biomaterialia. 2013;9(12):9243-57.
65. Srivastava G, Singh K, Talat M, Srivastava ON, Kayastha AM. Functionalized graphene sheets as immobilization matrix for fenugreek β-Amylase: enzyme kinetics and stability studies. PloS one. 2014;9(11):e113408.
66. Liu Y, Li Q, Feng Y-Y, Ji G-S, Li T-C, Tu J, et al. Immobilisation of acid pectinase on graphene oxide nanosheets. Chemical papers. 2014;68(6):732-8.
67. Kishore D, Talat M, Srivastava ON, Kayastha AM. Immobilization of β-galactosidase onto functionalized graphene nano-sheets using response surface methodology and its analytical applications. PloS one. 2012;7(7):e40708.
68. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227(5259):680-5.
69. - Chance B MA. Assay of catalases and peroxidases. Methods Enzymol. 1955;2:764-75.
70. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry. 1976;72(1):248-54.

71. Andersson LA, Bylkas SA, Wilson AE. Spectral Analysis of Lactoperoxidase evidence for a common heme in mammalian peroxidases. Journal of biological chemistry. 1996;271(7):3406-12.
72. Wu M, Wang R, Wang X, Zhang Z. Isolation and Purification of Bioactive Proteins from Bovine Colostrum: INTECH Open Access Publisher; 2011.
73. Odunuga OO, Shazhko A. Ammonium sulfate precipitation combined with liquid chromatography is sufficient for purification of bovine serum albumin that is suitable for most routine laboratory applications. Biochemical compounds. 2013;1(1):3.
74. Su R, Shi P, Zhu M, Hong F, Li D. Studies on the properties of graphene oxide–alkaline protease bio-composites. Bioresource technology. 2012;115:136-40.
75. Hahn R, Schulz P, Schaupp C, Jungbauer A. Bovine whey fractionation based on cation-exchange chromatography. Journal of Chromatography A. 1998;795(2):277-87.
76. Krimm S BJ. Vibrational spectroscopy and conformation of peptides,polypeptides, and proteins. Advances in Protein Chemistry. 1986;38:181-364.
77. Susi H BD. Resolution-enhanced fourier transform infrared spectroscopy of enzymes. Methods in Enzymology. 1986;130:290-311.
78. Jafary F, Kashanian S, Sharieat ZS, Jafary F, Omidfar K, Paknejad M. Stability improvement of immobilized lactoperoxidase using polyaniline polymer. Molecular biology reports. 2012;39(12):10407-12.
79. Mecitoğlu Ç, Yemenicioğlu A. Partial purification and preparation of bovine lactoperoxidase and characterization of kinetic properties of its immobilized form incorporated into cross-linked alginate films. Food chemistry. 2007;104(2):726-33.
80. Miroliaei M, Nayeri H, Samsam-Shariat S, Atar AM. Biospeci c immobilization of lactoperoxidase on Con A-Sepharose 4B. Scientia iranica. 2007;14(4):303-7.
81. Tenovuo J, Kurkijärvi K. Immobilized lactoperoxidase as a biologically active and stable form of an antimicrobial enzyme. Archives of oral biology. 1981;26(4):309-14.
82. Nouaimi M, Möschel K, Bisswanger H. Immobilization of trypsin on polyester fleece via different spacers. Enzyme and Microbial Technology. 2001;29(8):567-74.
83. Zhou L, Jiang Y, Gao J, Zhao X, Ma L. Graphene oxide as a matrix for the immobilization of glucose oxidase. Applied biochemistry and biotechnology. 2012;168(6):1635-42.
84. He C, Liu J, Xie L, Zhang Q, Li C, Gui D, et al. Activity and thermal stability improvements of glucose oxidase upon adsorption on core–shell PMMA–BSA nanoparticles. Langmuir. 2009;25(23):13456-60.

Evaluation of the Stability of immobilized lactoperoxidase on graphene oxide nanosheets

S. Z. A. Samsam Shariat, M. R. Mophid, J. Varshosaz and F. Borzouee

Introduction

Lactoperoxidase (LPO) (EC 1.11.1.7) is one of the most prominent enzymes in bovine milk. This enzyme due to its anti-bacterial properties have great attention from various industries. In order to its industrial applications, the enzyme stabilization is very important. Enzymatic evaluation on graphene oxide nanosheets have demonstrated that graphene oxide is an ideal matrix for immobilization of different enzymes. Therefore, in this study the stability of immobilized lactoperoxidase onto graphene oxide nano sheets was evaluated.

Methods

LPO was purified from bovine whey by two steps of ammonium sulfate precipitation (40 % and 70%) and one step ion-exchange chromatography on CM-Cellulose resin with 50mM Tris-HCl buffer (pH 8.6). For immobilization of enzyme onto the graphen oxide nanoseets, 1000µg of GO nanosheets was incubated for 4h with glutaraldehyde at room temperature (25°C). After this reaction, the glutaraldehyde modified GO was separated by centrifugation at 15000 rpm for 10 min, the pellet was washed with 30mM phosphate buffer (pH 6) for three times then, 1000µl of Lactoperoxidase (0.277mg/ml) was added into the previous pellet and incubated for 1 h at room temperature. The GO-LPO bio-conjugate material was separated by centrifugation at 15000 rpm for 10 min. The obtained supernatant was collected and the amount of immobilized Lactoperoxidase was calculated by subtracting the protein estimated in supernatant after immobilization from the total amount of protein used for immobilization.

The obtained pellet was rinsed three times with phosphate buffer and was resuspended in 1000µl of 30mM phosphate buffer (pH 6). Following kinetic properties and stability of free and immobilized lactoperoxidase was evaluated and comparded with each other.

Results

Lactoperoxidase was purified from bovine whey, 59.13 Fold with a recovery of 10.26% and a specific activity of 5.78 U/mg protein. LPO was immobilized on GO nanosheets with an immobilization efficiency of 69%. Optimum temperature of free and immobilized LPO were 50°C and 60°C respectively. Optimum pH for free and immobilized LPO was 6 and 7.5, respectively. Thermal stability of immobilized enzyme was increased and after 60 min incubation in 75°C, 45% of its initial activity was remained while free enzyme had been inactive less than 5 min. Storage stability of immobilized enzyme was raised and after 30 days storage in 4°C, it could save 64% of its initial activity. Although free enzyme become inactive after 15 days.

Discussion

LPO enzyme was immobilized on GO nanosheets with an immobilization efficiency of 69%. Decrease in K_m value of immobilized enzyme indicated that tendency of immobilized enzyme to its substrate was increased. Increase in optimum pH and optimum temperature showed that enzyme in high temperature and alkaline pH is in the most active stat. high storage stability and thermal stability of immobilized enzyme was illustrated that immobilized enzyme can be used in biosensors. All obtained result in this study were similar to other studies, which immobilized other enzymes on GO nanosheets, such as Alkaline-protease, Cicer α-galagtosidase and Acid pectinase.