

The effect of triethylammonium propionate ionic liquid on the catalytic efficiency and thermostability of urate oxidase

Shahrzad Fouladi^{1*}, Reza hajhosseini²,
Masoud Torkzadeh-Mahani³, Hooshang Hamidian⁴

1. Ph. D., Department of Biochemistry, Faculty of Science, Payam Noor University, Tehran, Iran
2. Professor, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Payam Noor University, Tehran, Iran
3. Associate Professor, Department of Biotechnology, Institute of Science, High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran
4. Associate Professor, Department of chemistry, Faculty of Science, Payam Noor University, Tehran, Iran

(Received: Jan. 27, 2021 - Accepted: Jun. 21, 2021)

Abstract

Ionic liquids (ILs) are salts that can affect the structure, stability, and function of proteins. Researchers have recently been interested in finding ionic liquids that increase the stability, activity and solubility of enzymes. In this study, efforts are made to investigate the effect of triethylammonium propionate (TEAP) on the function of urate oxidase (UOX). We treated the enzyme in different concentrations of TEAP. The volume percentages of TEAP in the solvent phase are 0.5%, 1%, 2%, 5%, 10% and 15%. The results indicate that TEAP has a concentration-dependent effect on the activity of UOX enzyme. The use of 1% TEAP ionic liquid increased the enzymatic activity in comparison to untreated enzyme. We concluded that this ionic liquid was able to alter the structure of the uricase in a way that increased the activity and improve its catalytic efficiency of the enzyme. Also the thermodynamic parameters such as $\Delta G^\#$, $\Delta H^\#$, and $\Delta S^\#$ values indicate that the use of 1% of triethylammonium propionate increases the thermostability of uricase and reduces the conformational changes of this enzyme during thermal inactivation process.

Keywords: Ionic liquid, Thermostability, Urate oxidase.

بررسی اثر مایع یونی تری اتیل آمونیوم پروپیونات بر میزان کارایی کاتالیزوری و میزان پایداری حرارتی آنزیم اوریکاز

شهرزاد فولادی^{۱*}، رضا حاجی حسینی^۲،
مسعود تorkزاده ماهانی^۳، هوشنگ حمیدیان^۴

۱. دکتری، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
۲. استاد، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
۳. دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران
۴. دانشیار، گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۶ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۳/۳۱)

چکیده

اوریکاز آنزیمی تترامر، کروی و فاقد کوفاکتور و از گروه آنزیم های اکسیدوردوکتاز است. تاکنون تحقیقات زیادی در مورد این آنزیم به دلیل کاربردهایش به عنوان یک عامل درمانی و تشخیصی انجام شده است. بخشی از کیت تشخیصی که برای اندازه گیری غلظت اسید اوریک در خون استفاده می شود، اوریکاز است. در این تحقیق، تأثیر مایع یونی غیر ایمیدازولی تری اتیل آمونیوم پروپیونات (TEAP) بر عملکرد آنزیم اوریکاز بررسی شد. مایعات یونی نمک هایی با خواص مهمی مانند پایداری حرارتی زیاد، حلالت زیاد و قطبیت زیاد هستند. برخی از مایعات یونی به عنوان تثبیت کننده برای ذخیره طولانی مدت پروتئین ها استفاده می شوند و ماندگاری پروتئین هایی مانند پروتئین های درمانی و با صنعتی را افزایش می دهند. در این مطالعه، آنزیم با غلظت های مختلف مایع یونی تری اتیل آمونیوم پروپیونات تیمار شد. نتایج نشان می دهد که تری اتیل آمونیوم پروپیونات تأثیر وابسته به غلظت بر فعالیت آنزیم اوریکاز دارد. استفاده از مایع یونی تری اتیل آمونیوم پروپیونات با غلظت ۱ درصد باعث افزایش فعالیت کاتالیزوری آنزیم در مقایسه با آنزیم تیمار نشده می شود. همچنین دما و PH بهینه برای فعالیت آنزیم بواسطه تیمار با مایع یونی مذکور تغییر می کند. بروز تغییرات در میان کنش های داخل ساختاری آنزیم از جمله تغییر در پیوندهای هیدروژنی، الکترواستاتیک و فعل و انفعالات واندروالس و در نتیجه تغییرات ساختاری آنزیم باعث افزایش فعالیت اوریکاز و بهبود کارایی کاتالیزوری و همچنین تغییر دما و PH بهینه آنزیم می شود. همچنین براساس نتایج حاصل از محاسبه پارامترهای ترمودینامیک ثابت شد که استفاده از تری اتیل آمونیوم پروپیونات با غلظت ۱ درصد باعث افزایش مقاومت حرارتی اوریکاز و جلوگیری از تغییرات ساختاری و دناتوراسیون این آنزیم در طی فرایند غیر فعال سازی حرارتی می شود.

واژه های کلیدی: اوریکاز، مایع یونی، مقاومت حرارتی.

مقدمه

مطالعه، اثر مایع یونی تری اتیل آمونیوم پروپیونات بر میزان فعالیت و پایداری یوریکاز بررسی شد. مایعات یونی نمک‌هایی با خواص مهم مانند حلالیت زیاد، پایداری حرارتی زیاد، قطبیت زیاد، اشتعال‌پذیری کم و فرارسانی و بی‌ثباتی کم است (Park & Kazlauskas, 2003)، که از یون‌هایی تشکیل شده‌اند که در دمای اتاق به شکل مایع باقی می‌مانند (Jaeger & Pfaendtner, 2016). مایعات یونی در زمینه‌های پزشکی و بیوشیمیایی نیز مورد توجه قرار گرفته‌اند، خواص آنها باعث شده است که آنها به‌عنوان یک کلاس از حلال‌های سبز در نظر گرفته شوند. علاوه بر این، آنها حلال‌های غیرآبی هستند که می‌توانند به‌عنوان یک تثبیت‌کننده برای ذخیره طولانی مدت بعضی از پروتئین‌ها مورد استفاده قرار گیرند (van Rantwijk *et al.*, 2006; Kumari *et al.*, 2014). این دسته از مواد ماندگاری پروتئین‌های مهمی مانند پروتئین‌های درمانی یا صنعتی را افزایش می‌دهند. محققان اخیراً علاقه‌مند به یافتن مایعات یونی هستند که باعث افزایش پایداری، حلالیت و فعالیت آنزیم‌ها می‌شوند (van Rantwijk *et al.*, 2006). تاکنون، بر روی بسیاری از مایعات یونی با این اهداف کار شده است، برخی از آنها با متوقف کردن تجمع ساختارهای آنزیمی، پایداری برخی از آنزیم‌ها را افزایش می‌دهند، اما برخی از مایعات یونی باعث دناتوراسیون ساختار برخی از آنزیم‌ها می‌شوند. بنابراین، مطالعه تعامل بین آنزیم و مایعات یونی برای مشخص شدن تأثیرات مایعات یونی بر ساختار آنزیم بسیار مهم است. با اتصال مولکول‌های مایع یونی به ساختار آنزیم، نیروهای بین مولکولی دست‌خوش تغییراتی می‌شوند که باعث پایداری و یا ناپایداری آنزیم می‌شوند (Kumari *et al.*, 2014). گزارش شده است که مایعات یونی مختلف برهمکنش‌های متفاوتی بر پروتئین‌های مختلف دارند که نتیجه این برهمکنش‌ها ایجاد تغییراتی در ساختار پروتئین‌هایی مانند آنزیم‌ها می‌شود (Bihari *et al.*, 2010; Constatinescu *et al.*, 2010).

آنزیم یوریکاز (EC 1.7.3.3)، یکی از آنزیم‌های گروه آنزیم‌های اکسیدوردوکتاز است (Nishimura *et al.*, 1982; Colloc'h *et al.*, 1997; Caves *et al.*, 2013; Imani & Shahmohamadnejad, 2017; Fouladi *et al.*, 2021) این آنزیم تترامری کروی است که جرم مولکولی تقریبی ۱۳۰ کیلودالتون دارد. جرم مونومرهای این آنزیم تترامر تقریباً ۳۲ کیلودالتون است (Pitts *et al.*, 1974; Conley & Priest, 1980). تاکنون تحقیقات زیادی در مورد این آنزیم به‌دلیل کاربردهایی که به‌عنوان یک فاکتوردرمانی و تشخیصی در پزشکی دارد، انجام شده است (Caves *et al.*, 2013). آنزیم یوریکاز باعث کاتالیز تخریب‌شدن اسید اوریک و تولید آلانتوئین می‌شود. این آنزیم بیش از ۳۰ سال است که در علم پزشکی استفاده درمانی دارد (Colloc'h *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2017). از آنجا که عدم تعادل در تولید و همچنین دفع اسید اوریک باعث ایجاد مسمومیت ناشی از افزایش اسید اوریک (هیپراوریسمی) و نقرس می‌شود (Schumacher & Chen, 2006; Sherman *et al.*, 2014; Moore *et al.*, 2008). کاهش دفع اسید اوریک باعث تشکیل بلورهای مونو سدیم اورات می‌شود (Imani & Shahmohamadnejad, 2017). آنزیم یوریکاز حاصل از باکتری *Aspergillus flavus* به‌طور عمده برای درمان هایپراوریسمی و نقرس استفاده می‌شود (Pui *et al.*, 2001; Pui *et al.*, 2001; Pession *et al.*, 2008; Alakel *et al.*, 2017). بخشی از کیت تشخیصی بالینی مهم برای اندازه‌گیری غلظت اسید اوریک در خون و تشخیص نقرس، آنزیم یوریکاز است (Gochman & Schmitz, 1971; Liao *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2017). تحقیقات زیادی با هدف ثابت نگه‌داشتن آنزیم یوریکاز با هدف ایجاد حس‌گر زیستی انجام شده است (Huang *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010; Bayramoğlu *et al.*, 2011). در این

میلی مول) در مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق به ارلن مایر اضافه شد. پس از اتمام واکنش، از TLC برای اثبات خلوص محصول (تری اتیل آمونیوم پروپیونات) استفاده شد. با توجه به نتیجه کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) ماده خالص بود. این ماده یک محصول نیمه مایع قهوه‌ای تیره چسبناک بود. نتایج طیف‌های FTIR و NMR نیز خلوص محصول را تأیید کرد.

سنجش فعالیت یوریکاز تیمارنشده و یوریکاز تیمار شده با تری اتیل آمونیوم پروپیونات

فعالیت آنزیم یوریکاز در تبدیل اسید اوریک به آلانتوئین، در pH بهینه و دمای بهینه فعالیت یوریکاز (PH برابر ۹ و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد) با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۹۳ نانومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم با مخلوط کردن یوریکاز (۱۰ میکرولیتر) در بافر اسید بوریک (۷۱۰ میکرولیتر با pH برابر ۹) و محلول اسید اوریک (۷ میکرولیتر، با pH برابر ۹) مورد سنجش قرار گرفت. یک واحد یوریکاز در هر دقیقه یک میکرومول اسید اوریک را به آلانتوئین در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و PH برابر ۹ اکسید می‌کند. در این تحقیق، یوریکاز با غلظت‌های مختلف مایع یونی تری اتیل آمونیوم پروپیونات (۵/۰، ۱، ۲، ۵، ۱۰ و ۱۵ درصد (V/V) تیمار شد. فعالیت آنزیم تیمار شده در زمان‌های مختلف (۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه) اندازه‌گیری شد. غلظت بهینه مایع یونی در افزایش فعالیت کاتالیتیکی آنزیم یوریکاز در این مرحله تعیین شد.

فعالیت یوریکاز با معادله زیر اندازه‌گیری شد (Ghanbari-Ardestani *et al.*, 2019):

$$\text{Enzyme (units/ml)} = \frac{(\Delta A_{293\text{nm/min}} - \Delta A_{293\text{nm/min}} \text{Blank}) (df)}{(12.3) V}$$

df و V به ترتیب فاکتور رقت آنزیم و حجم آنزیم (میلی‌لیتر) هستند و ۱۲/۳ ضریب جذب مولی یا ضریب خاموشی اسید اوریک در طول موج ۲۹۳ نانومتر است.

مکانیسم دقیق واکنش بین مولکول‌های مایعات یونی و آنزیم‌های مختلف هنوز مشخص نیست، زیرا تأثیر قطبیت، غلظت، آب‌گریزی و طبیعت یونی مایعات یونی بر پایداری و فعالیت آنزیم‌های مختلف، متفاوت است (Arrhenius, 1889; Galani & Apenten, 1997; Marin *et al.*, 2003; Lou & Zong, Hashemzadeh 2006; Zaboli & Raissi, 2017; Raissi, 2018). بنابراین، برای بررسی تأثیر مایعات یونی متفاوت بر پایداری و فعالیت آنزیمی خاص، باید مطالعات اختصاصی بر روی آنزیم مورد نظرمان انجام شود (Fooladi *et al.*, 2016; Fouladi, 2021).

مواد و روش‌ها

مواد

اسید اوریک و اسید بوریک با گرید آنالیتیکال از شرکت سیگما-الدريج (Sigma-Aldrich) تهیه شد. تری اتانول آمین، اسید پروپیونیک، گلیسین، پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات، تریس هیدروکلراید، استات سدیم و سایر مواد شیمیایی دارای گرید آنالیتیکال از شرکت مرک (Merck) تهیه شدند.

سنتز مایع یونی تری اتیل آمونیوم پروپیونات

سنتز تری اتیل آمونیوم پروپیونات (TEAP) به شرح زیر انجام شد: ۱۰ گرم (۰/۰۶۷ مول) تری اتانول آمین (TEA) و ۴/۹۵۸ گرم (۰/۰۶۷ مول) اسید پروپیونیک توزین شد. یک گرم از اسید پروپیونیک وزن شده به ارلن مایر حاوی تری اتانول آمین توزین شده اضافه شد. ارلن را بر روی یک هیتر با قابلیت کنترل دما و مجهز به همزن در دمای ۸۰ درجه قرار داده و محتویات آن با دور ۱۵۰۰ rpm بر روی هیتر با همزن مغناطیسی هم زده شد. پس از مشاهده تغییر رنگ، ۱ گرم اسید پروپیونیک (از کل مقدار لازم برای سنتز یعنی ۴/۹۵۸ گرم) به داخل فلاسک اضافه شد. کل مقدار اسید پروپیونیک (۴/۹۵۸ گرم، ۰/۰۶۷

انکوبه‌شده در دماهای مذکور در طول موج ۲۹۳ اندازه‌گیری شد. برای محاسبه انرژی فعال‌سازی (Ea)، از معادله آرنیوس استفاده شد (Arrhenius 1889):

$$k = Ae^{-(Ea/RT)}$$

که در آن، k، R، T و A به ترتیب عبارت از ثابت سرعت غیر فعال‌سازی با واحد اندازه‌گیری (min⁻¹)، ثابت جهانی گازها (8.314 J.mol⁻¹K)، دمای مطلق کلون و ثابت آرنیوس هستند. A و Ea به ترتیب از عرض از مبدأ و شیب منفی نمودار ln(k) در برابر معکوس دما به کلون محاسبه می‌شوند. پس از محاسبه A و Ea پارامترهای مختلف ترمودینامیکی (Marin et al., 2003) از جمله آنتالپی (ΔH#) آنتروپی (ΔS#) و انرژی آزاد گیبس (ΔG#) مطابق فرمول‌های زیر محاسبه می‌شوند (Galani & Apenten 1997).

$$\Delta H^\# = E_a - RT$$

$$\Delta S^\# = \Delta H^\# - \Delta G^\# / T$$

$$\Delta G^\# = -RT \ln(kh / K_B T)$$

که در این روابط، h و K_B عبارت از ثابت پلانک (6.6262 × 10⁻³⁴ J.s) و ثابت بولتزمن (1.3806 × 10⁻²³ J.K⁻¹) می‌باشند.

نتایج

غلظت بهینه تری اتیل آمونیوم پروپیونات
فعالیت آنزیم یوریکاز در تبدیل اسید اوریک به آلانتوئین، در pH بهینه و دمای بهینه فعالیت آنزیم (pH برابر ۹ و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد) در زمان‌های مختلف (۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه) با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۹۳ نانومتر اندازه‌گیری شد. سپس فعالیت آنزیم تیمار شده با غلظت‌های مختلف تری اتیل آمونیوم پروپیونات (۰/۵، ۱، ۲، ۵، ۱۰ و ۱۵ درصد v/v) در زمان‌های مختلف (۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه) اندازه‌گیری شد. در این مرحله غلظت بهینه مایع یونی در افزایش فعالیت کاتالیتیکی آنزیم ۱ درصد تعیین شد. با توجه به نتایج، مایع یونی تری اتیل آمونیوم پروپیونات تأثیر

تعیین دمای بهینه برای فعالیت آنزیم

فعالیت یوریکاز آزاد (تیمار نشده) و یوریکاز تیمار شده با غلظت بهینه مایع یونی در دماهای مختلف اندازه‌گیری شد. در این آزمایش، محلول سوبسترا که متشکل از بافر اسید بوریک و محلول اسیداوریک است به مدت ۵ دقیقه درون سل در دماهای مختلف (۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد) با استفاده از دستگاه Single cell peltier accessory درجه سانتی‌گراد، پس از سپری شدن این زمان و انجام گرفتن انکوباسیون در دمای مورد نظر، ۱۰ میکرولیتر آنزیم یوریکاز به محتویات سل اضافه شد و کاهش جذب که نشانه فعالیت آنزیم است، در طول موج ۲۹۳ نانومتر اندازه‌گیری شد.

تعیین pH بهینه برای فعالیت آنزیم

برای اندازه‌گیری pH بهینه، ابتدا بافر میکس (متشکل از تریس هیدروکلراید به غلظت ۵۰ میلی‌مولار، گلیسین به غلظت ۵۰ میلی‌مولار، پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات به غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار، استات سدیم به غلظت ۵۰ میلی‌مولار) تهیه شد و سپس از این بافر در ۱۰ فالكون با حجم ۵۰ میلی لیتر به مقدار مساوی ریخته شد و pH بافر هر کدام از فالكون‌ها به ترتیب از ۳ تا ۱۲ تنظیم شد. در این تست میزان فعالیت آنزیم آزاد و آنزیم تیمار شده با غلظت بهینه از تری اتیل آمونیوم پروپیونات در pHهای متفاوت در طول موج ۲۹۳ اندازه‌گیری شد، با این تفاوت که زمان صفر کردن اسپکتروفتومتر به جای بافر اسید بوریک از بافر میکس با pHهای مختلف استفاده شد.

غیرفعال‌سازی حرارتی و اندازه‌گیری پارامترهای ترمودینامیک

برای بررسی غیر فعال‌سازی حرارتی آنزیم یوریکاز، آنزیم آزاد و آنزیم تیمار شده با غلظت بهینه تری اتیل آمونیوم پروپیونات در دمای مختلف (۴۰، ۵۰ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد) از ۵ تا ۶۰ دقیقه انکوبه شدند و سپس به فلاسک یخ منتقل شدند. سپس فعالیت آنزیم‌های

متفاوت در طول موج ۲۹۳ اندازه‌گیری شد، با این تفاوت که زمان صفر کردن اسپکتروفتومتر به جای بافراسید بوریک از بافر میکس با pHهای مختلف استفاده شد. با توجه به نتایج، pH بهینه یوریکاز آزاد و یوریکاز تیمار شده با غلظت بهینه تری اتیل آمونیوم پروپیونات (۱ درصد) به ترتیب ۹ و ۱۰ تعیین شد (شکل ۲-ب). این نتایج نشان می‌دهد که افزودن تری اتیل آمونیوم پروپیونات بر دمای بهینه و pH بهینه برای فعالیت یوریکاز تأثیر دارد. این تأثیر در آنزیم تیمار شده می‌تواند به دلیل بروز تغییراتی در ساختار یوریکاز ناشی از افزودن تری اتیل آمونیوم پروپیونات باشد.

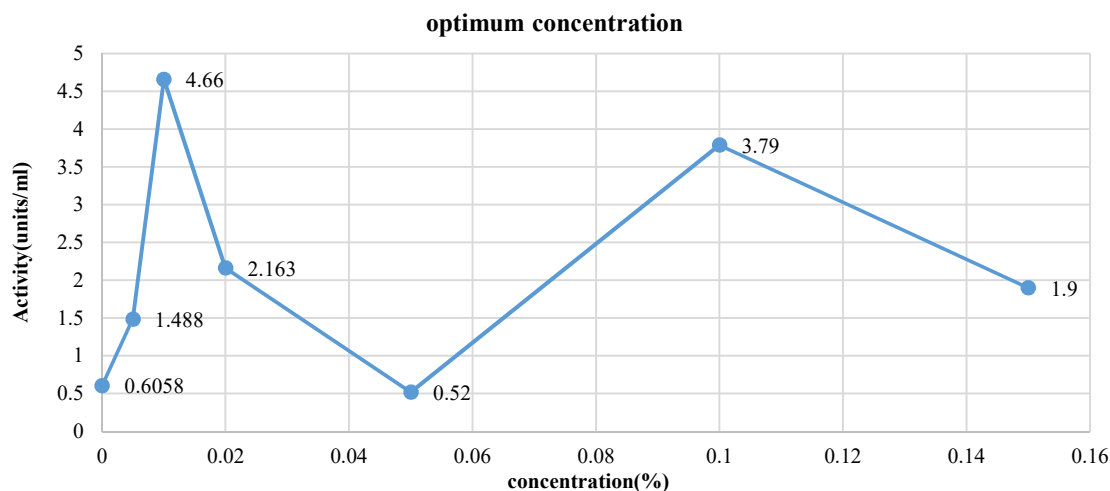
غیر فعال سازی حرارتی و پارامترهای ترمودینامیکی
با توجه به نتایج (جدول ۱)، تری اتیل آمونیوم پروپیونات با غلظت ۱ درصد باعث افزایش نیمه عمر فعالیت آنزیم یوریکاز می‌شود (شکل ۳-الف). نتایج نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم تیمار شده با این مایع یونی بیشتر از آنزیم آزاد است. ساختار آنزیم در دماهای بالا دناتوره می‌شود، در حالی که مایع یونی تری اتیل آمونیوم پروپیونات با غلظت ۱ درصد منجر به مقاومت و پایداری آنزیم در برابر درجه حرارت بالا و به عبارتی منجر به ایجاد مقاومت در برابر فرایند دناتوراسیون می‌شود.

وابسته به غلظت بر فعالیت یوریکاز دارد. افزودن ۱ درصد تری اتیل آمونیوم پروپیونات باعث بهبود کارایی کاتالیتیکی آنزیم می‌شود (شکل ۱). این افزایش فعالیت آنزیم می‌تواند به دلیل تغییرات ساختاری ایجاد شده ناشی از افزودن مایع یونی به آنزیم باشد.

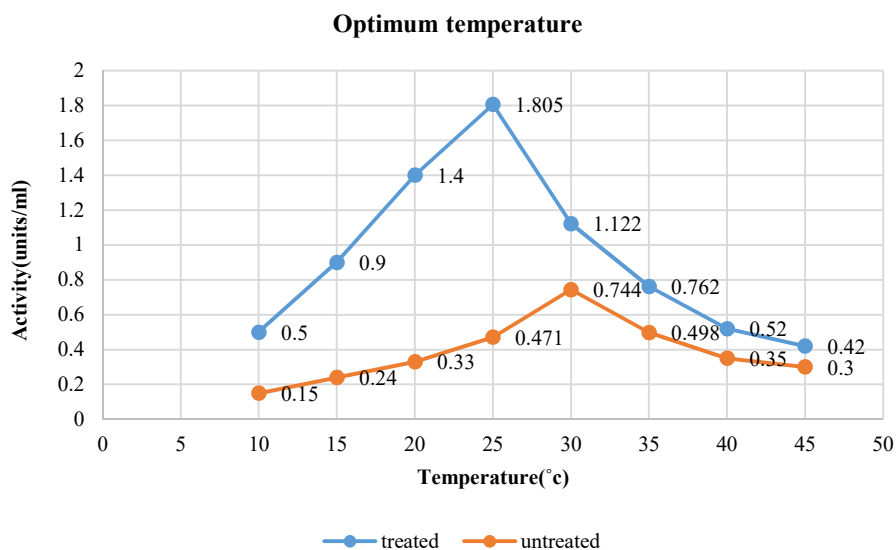
دما و pH بهینه برای فعالیت آنزیم تیمار شده با مایع یونی

فعالیت یوریکاز آزاد (تیمار نشده) و یوریکاز تیمار شده با غلظت بهینه تری اتیل آمونیوم پروپیونات (۱ درصد) در دماهای مختلف اندازه‌گیری شد. در این آزمایش، محلول سوپسترا به مدت ۵ دقیقه درون سل در دماهای مختلف با استفاده از دستگاه Single cell peltier accessory انکوبه شد، پس از انجام گرفتن انکوباسیون در دمای مورد نظر، ۱۰ میکرولیتر آنزیم به محتویات سل اضافه شد و کاهش جذب که نشانه فعالیت آنزیم است، در طول موج ۲۹۳ نانومتر اندازه‌گیری شد. حداکثر فعالیت یوریکاز آزاد و یوریکاز تیمار شده با مایع یونی (۱ درصد) به ترتیب ۳۰ درجه سانتی‌گراد و ۲۵ درجه سانتی‌گراد تعیین شد (شکل ۲-الف).

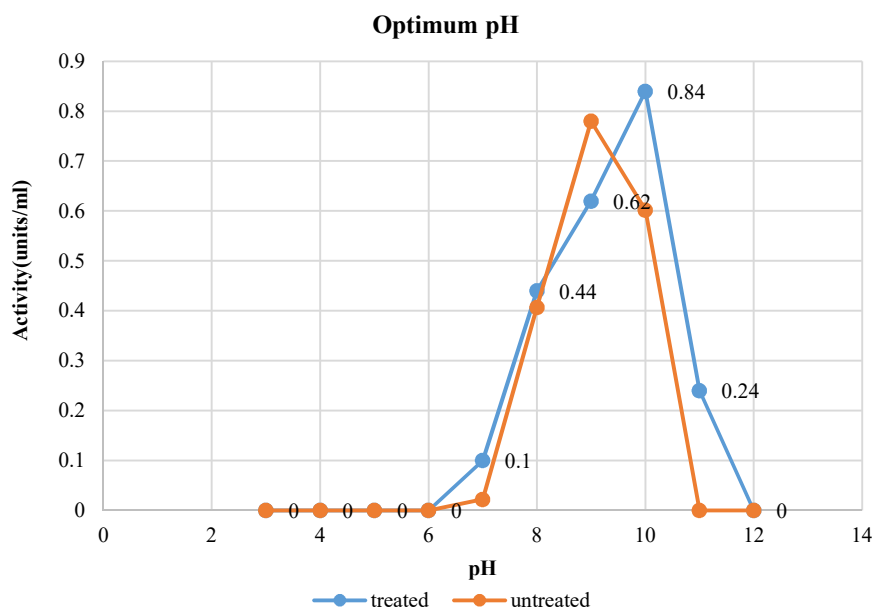
برای اندازه‌گیری pH بهینه برای فعالیت آنزیم، میزان فعالیت آنزیم آزاد و آنزیم تیمار شده با غلظت بهینه از تری اتیل آمونیوم پروپیونات در pHهای



شکل ۱. اثر غلظت‌های مختلف مایع یونی تری اتیل آمونیوم پروپیونات بر فعالیت آنزیم یوریکاز



(الف)



(ب)

شکل ۲. الف) اثر دماهای مختلف بر فعالیت یوریکاز آزاد و تیمار شده با تری اتیل آمونیوم پروپیونات با غلظت ۱ درصد؛

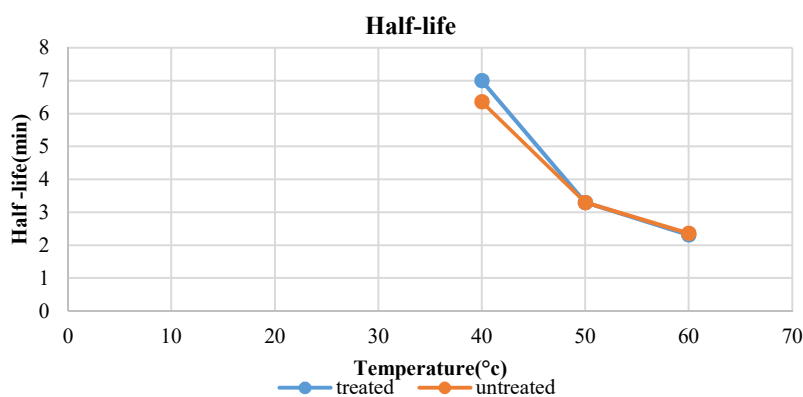
ب) اثر pH های مختلف بر فعالیت یوریکاز آزاد و تیمار شده با تری اتیل آمونیوم پروپیونات با غلظت ۱ درصد

جدول ۱. پارامترهای ترمودینامیکی غیر فعال سازی حرارتی و نیمه عمر اوریکاز آزاد و تیمار شده

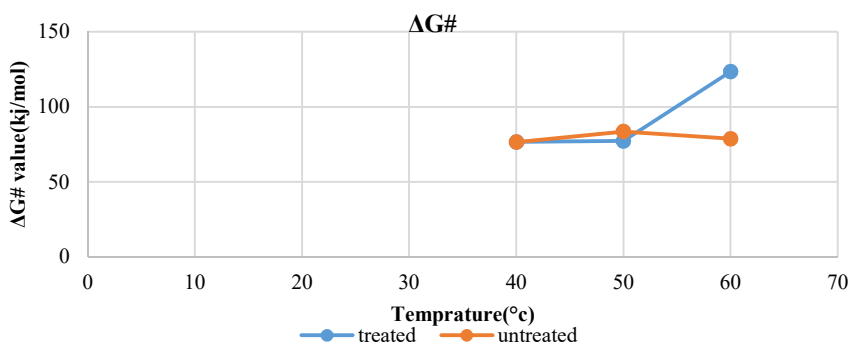
	Ea (kj/mol)	T (°C)	T (°K)	K (1/min)	ΔG (kj/mol)	ΔH (kj/mol)	ΔS (j/mol)	Half-life (min)
UOX	41.32	40	313	0,109~0.1	76.56	38.72	-120.89	6.36
		50	323	0,206~0.2	83.63	38.64	-139.31	3.3
		60	333	0,294~0.3	78.87	38.55	-121.09	2.357
1%IL	74.99	40	313	0.1	76.78	72.4	-13.9	7
		50	323	0.21~0.2	77.33	72.31	-15.5	3.3
		60	333	0.3	123,45	72.22	-153,84	2.31

قابل ذکر است که بیشتر بودن انرژی آزاد گیبس برای آنزیم تیمار شده با میزان تحمل زیادتر در برابر غیرفعال سازی حرارتی ارتباط دارد (Shikha *et al.*, 2017). پارامترهای $\Delta H^\#$ و $\Delta S^\#$ تغییرات آنتالپی و انتروپی در فرایند غیرفعال سازی حرارتی هستند. تغییرات پارامتر $\Delta H^\#$ نشان دهنده بروز تغییرات در میان کنش های داخل ساختاری آنزیم از جمله تغییر در پیوندهای هیدروژنی، الکترواستاتیک و فعل و انفعالات واندروالس و نشانه تغییرات ساختاری آنزیم است (Grunwald, 1997; Liu & Guo, 2001). قابل ذکر است که با توجه به مقادیر مثبت $\Delta H^\#$ دناتوراسیون یوریکاز یک واکنش گرمازا است. مقایسه پارامترهای $\Delta H^\#$ یوریکاز آزاد و تیمار شده ثابت می کند که یوریکاز تیمار شده با تری اتیل آمونیوم پروپیونات با غلظت ۱ درصد دارای ساختار متراکم تری نسبت به ساختار آنزیم آزاد است (شکل ۳-ج).

با توجه به نتایج حاصل از محاسبات پارامترهای ترمودینامیکی، یوریکاز در حضور تری اتیل آمونیوم پروپیونات ۱ درصد می تواند در برابر حرارت های بالاتر مقاومت نشان بدهد. انرژی آزاد گیبس ($\Delta G^\#$) نشان دهنده مقدار انرژی برای غیرفعال سازی آنزیم است و همچنین نشانه میزان پیشروی خودبه خودی روند غیرفعال سازی است (Hashemzadeh & Raissi, 2018). در حقیقت، انرژی آزاد گیبس بالاتر، پایداری بیشتر آنزیم را در برابر دماهای بالاتر نشان می دهد (Zaboli & Raissi, 2017). مقدار این پارامتر برای یوریکاز آزاد و تیمار شده نشان می دهد که برای غیرفعال سازی حرارتی آنزیم تیمار شده در مقایسه با آنزیم آزاد به انرژی بیشتری نیاز است. بنابراین مقدار بیشتر این پارامتر برای یوریکاز تیمار شده نسبت به یوریکاز آزاد، ثابت پذیری بیشتری یوریکاز تیمار شده را ثابت می کند (شکل ۳-ب).



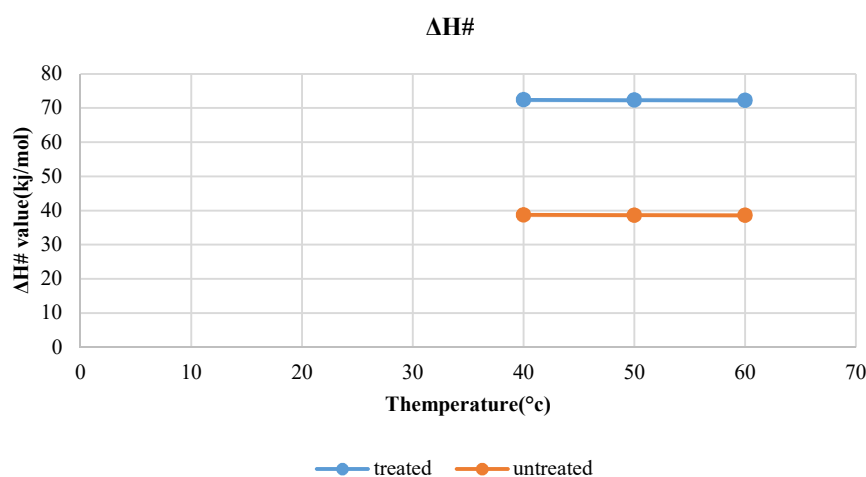
نمودار ۳. الف) مقایسه نتایج نیمه عمر برای آنزیم آزاد و آنزیم تیمار شده با مایع یونی به غلظت ۱٪



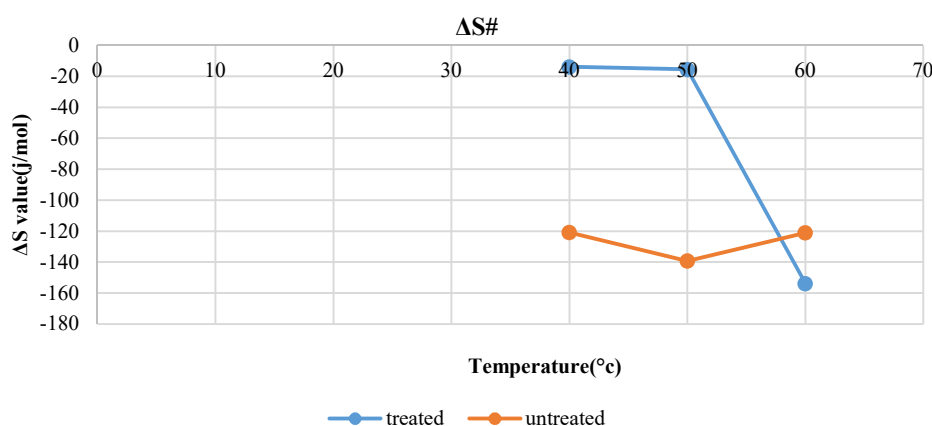
نمودار ۳. ب) مقایسه نتایج پارامتر ترمودینامیکی $\Delta G^\#$ برای آنزیم آزاد و آنزیم تیمار شده با مایع یونی به غلظت ۱٪

تجمع پیوندهای بین مولکولی و درون مولکولی (Pession *et al.*, 2008) و همچنین به دلیل کاهش انعطاف‌پذیری در ساختار آنزیم باشد (Lohrasbi-Nejad *et al.*, 2016). همچنین، مقایسه پارامترهای ΔS^\ddagger یوریکاز آزاد و تیمارشده ثابت می‌کند که ساختار آنزیم آزاد انعطاف‌پذیرتر از ساختار آنزیم تیمارشده است (شکل ۳-د). بنابراین با توجه به نتایج محاسبات مقادیر ΔG^\ddagger ، ΔH^\ddagger و ΔS^\ddagger در اینجا ثابت می‌شود که استفاده از مایع یونی تری اتیل آمونیوم پروپیونات با غلظت ۱ درصد باعث افزایش مقاومت حرارتی یوریکاز و کاهش تغییرات ساختاری این آنزیم در طی فرایند غیر فعال‌سازی حرارتی می‌شود.

با توجه به نتایج محاسبات پارامترهای ترمودینامیکی این‌که آنزیم تیمارشده در طی مراحل غیر فعال‌سازی حرارتی پایدار است شاید به دلیل همین ساختار متراکمتری باشد که در اثر اتصال با مولکول‌های تری اتیل آمونیوم پروپیونات برایش حاصل شده است. پارامتر ΔS^\ddagger تصادفی بودن سیستم را نشان می‌دهد. ΔS^\ddagger سیستم هنگامی تغییر می‌یابد که ساختار آنزیم از ساختار طبیعی خودش خارج شود (Alakel *et al.*, 2017). علاوه بر این، مقدار ΔS^\ddagger تغییرات ساختاری و انعطاف‌پذیری ساختاری آنزیم را نشان می‌دهد (Middleton *et al.*, 2002). دلیل منفی شدن نتایج پارامتر ΔS^\ddagger در اینجا ممکن است به دلیل افزایش نظم سیستم از طریق فرایند



نمودار ۳. ج. مقایسه نتایج پارامتر ترمودینامیکی ΔH^\ddagger برای آنزیم آزاد و آنزیم تیمارشده با مایع یونی به غلظت ۱ درصد



نمودار ۳. د) مقایسه نتایج پارامتر ترمودینامیکی ΔS^\ddagger برای آنزیم آزاد و آنزیم تیمارشده با مایع یونی به غلظت ۱ درصد

آنزیم است. مقایسه پارامترهای $\Delta H^\#$ یوریکاز آزاد و تیمارشده ثابت می‌کند که یوریکاز تیمارشده با تری اتیل آمونیوم پروپیونات با غلظت ۱ درصد دارای ساختار متراکم تری نسبت به ساختار آنزیم آزاد دارد. با توجه به نتایج محاسبات پارامترهای ترمودینامیکی، این که آنزیم تیمارشده در طی مراحل غیر فعال سازی حرارتی پایدار است شاید به دلیل همین ساختار متراکم تری باشد که در اثر اتصال با مولکول‌های تری اتیل آمونیوم پروپیونات برایش حاصل شده است. پارامتر $\Delta S^\#$ سیستم هنگامی تغییر می‌یابد که ساختار آنزیم از ساختار طبیعی خودش خارج شود. علاوه بر این، مقدار $\Delta S^\#$ میزان تغییرات ساختاری و انعطاف پذیری ساختاری آنزیم را نشان می‌دهد. مقایسه پارامترهای $\Delta S^\#$ یوریکاز آزاد و تیمارشده ثابت می‌کند که ساختار آنزیم آزاد انعطاف پذیرتر از ساختار آنزیم تیمارشده است و آنزیم تیمارشده ساختار متراکم تری دارد که دقیقاً همین نتیجه از محاسبه پارامتر $\Delta H^\#$ هم ثابت شده بود. بنابراین با توجه به نتایج محاسبات مقادیر پارامترهای ترمودینامیکی در اینجا ثابت می‌شود که استفاده از مایع یونی تری اتیل آمونیوم پروپیونات با غلظت ۱ درصد باعث افزایش مقاومت حرارتی یوریکاز می‌شود و از دنا تورا سیون آنزیم در طی فرایند غیر فعال سازی حرارتی جلوگیری می‌کند.

بحث و نتیجه گیری

این تحقیق به منظور بررسی اثرات مایع یونی تری اتیل آمونیوم پروپیونات بر میزان فعالیت آنزیم یوریکاز و همچنین بررسی اثر مایع یونی مذکور بر پایداری و مقاومت حرارتی آنزیم انجام شد. تیمار آنزیم آزاد با تری اتیل آمونیوم پروپیونات با غلظت ۱ درصد باعث بهبود کارایی کاتالیزوری یوریکاز می‌شود. بنابراین این غلظت از مایع یونی، غلظت بهینه محسوب می‌شود. نتایج تجربی نشان می‌دهد که افزودن تری اتیل آمونیوم پروپیونات با غلظت ۱ درصد بر دمای بهینه و pH بهینه برای فعالیت آنزیم یوریکاز تأثیر می‌گذارد. تغییرات در ساختار یوریکاز احتمالاً باعث افزایش فعالیت یوریکاز و بهبود کارایی کاتالیزوری و تغییر دما و pH بهینه آنزیم است. همچنین محاسبه پارامترهای ترمودینامیکی مانند $\Delta G^\#$ ، $\Delta H^\#$ و $\Delta S^\#$ ثابت می‌کند که استفاده از تری اتیل آمونیوم پروپیونات با غلظت ۱ درصد باعث افزایش مقاومت حرارتی یوریکاز می‌شود. مقدار بیشتر انرژی آزاد گیبس ($\Delta G^\#$) برای یوریکاز تیمارشده نسبت به یوریکاز آزاد، ثبات پذیری بیشتر یوریکاز تیمارشده را در برابر دماهای بالاتر ثابت می‌کند. تغییرات پارامتر $\Delta H^\#$ نشان دهنده بروز تغییرات در میان کنش‌های داخل ساختاری آنزیم از جمله تغییر در پیوندهای هیدروژنی، الکترواستاتیک و فعل و انفعالات و اندروالس و نشانه تغییرات ساختاری

REFERENCES

- Alakel, N., *et al.* (2017). Prevention and treatment of tumor lysis syndrome, and the efficacy and role of rasburicase. *OncoTargets and therapy*; 10: 597.
- Arrhenius, S. (1889). About the reaction rate during the inversion of cane sugar by acids. *Phys. Chem.*; 4: 226.
- Bayramoğlu, G., *et al.* (2011). Reversible immobilization of uricase on conductive polyaniline brushes grafted on polyacrylonitrile film. *Bioprocess and biosystems engineering*; 34(2): 127-134.
- Bihari, M., *et al.* (2010). Dissolution and dissolved state of cytochrome c in a neat, hydrophilic ionic liquid. *Biomacromolecules*; 11(11): 2944-2948.
- Caves, M. S., *et al.* (2013). Thermal inactivation of uricase (urate oxidase): mechanism and effects of additives. *Biochemistry*; 52(3): 497-507.
- Chen, D., *et al.* (2010). Low-Potential Detection of Endogenous and Physiological Uric Acid at Uricase-Thionine-Single-Walled Carbon Nanotube Modified Electrodes. *Analytical chemistry*; 82(6): 2448-2455.
- Colloc'h, N., *et al.* (1997). Crystal structure of the protein drug urate oxidase-inhibitor complex at 2.05 Å resolution. *Nature structural biology*; 4(11): 947-952.

- Conley, T.G. & Priest, D.G. (1980). Thermodynamics and stoichiometry of the binding of substrate analogues to uricase. *Biochemical Journal*; 187(3): 727-732.
- Constatinescu, D., *et al.* (2010). Patterns of protein unfolding and protein aggregation in ionic liquids. *Physical Chemistry Chemical Physics*; 12(8): 1756-1763.
- Fooladi, S.; *et al.* (2016). Effect of *Salvia rhytidea* Benth. extract on serum glucose, gut α -glucosidase in healthy and streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ayurvedic and Herbal Medicine*; 2(2): 40-42.
- Fouladi, S. (2021). Investigation of Metabolites And Pharmacological Effects of Medicinal Plant *Salvia Rhytidea* Benth.
- Fouladi, S.; *et al.* (2021). Evaluation of the Effect of Non-Imidazolium Based Ionic Liquid Triethylammonium Maleate on Uricase Enzyme. *Experimental animal Biology*; 10(2): 31-38.
- Galani, D. & Apenten, R.K.O. (1997). The comparative heat stability of bovine β -lactoglobulin in buffer and complex media. *Journal of the Science of Food and Agriculture*; 74(1): 89-98.
- Ghanbari-Ardestani, S., *et al.* (2019). The effect of different percentages of triethanolammonium butyrate ionic liquid on the structure and activity of urate oxidase: Molecular docking, molecular dynamics simulation, and experimental study. *Journal of Molecular Liquids*; 292: 111318.
- Gochman, N. & Schmitz, J.M. (1971). Automated determination of uric acid, with use of a uricase-peroxidase system. *Clinical chemistry*; 17(12): 1154-1159.
- Grunwald, E. (1997). *Thermodynamics of molecular species*, Wiley.
- Hashemzadeh, H. & Raissi, H. (2018). Covalent organic framework as smart and high efficient carrier for anticancer drug delivery: a DFT calculations and molecular dynamics simulation study. *Journal of Physics D: Applied Physics*; 51(34): 345401.
- Huang, S.-H., *et al.* (2004). Detection of serum uric acid using the optical polymeric enzyme biochip system. *Biosensors and Bioelectronics*; 19(12): 1627-1633.
- Imani, M. & Shahmohamadnejad, S. (2017). Recombinant production of *Aspergillus Flavus* uricase and investigation of its thermal stability in the presence of raffinose and lactose. *3 Biotech*; 7(3): 1-9.
- Jaeger, V.W. & Pfaendtner, J. (2016). Destabilization of human serum albumin by ionic liquids studied using enhanced molecular dynamics simulations. *The Journal of Physical Chemistry B*; 120(47): 12079-12087.
- Kumari, M., *et al.* (2014). Probing HSA-ionic liquid interactions by spectroscopic and molecular docking methods. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*; 138: 27-35.
- Li, W., *et al.* (2017). Directed evolution to improve the catalytic efficiency of urate oxidase from *Bacillus subtilis*. *PloSone*; 12(5): e0177877.
- Liao, F., *et al.* (2006). Evaluation of a kinetic uricase method for serum uric acid assay by predicting background absorbance of uricase reaction solution with an integrated method. *Journal of Zhejiang University Science B*; 7(6): 497-502.
- Liu, L. & Guo, Q.-X. (2001). Isokinetic relationship, isoequilibrium relationship, and enthalpy-entropy compensation. *Chemical Reviews*; 101(3): 673-696.
- Lohrasbi-Nejad, A., *et al.* (2016). Hydrophobin-1 promotes thermostability of firefly luciferase. *The FEBS journal*; 283(13): 2494-2507.
- Lou, W.Y. & Zong, M.H. (2006). Efficient kinetic resolution of (R, S)-1-trimethylsilylethanol via lipase-mediated enantioselective acylation in ionic liquids. *Chirality: The Pharmacological, Biological, and Chemical Consequences of Molecular Asymmetry*; 18(10): 814-821.

- Marin, E., *et al.* (2003). Effect of heat treatment on bovine lactoperoxidase activity in skim milk: kinetic and thermodynamic analysis. *Journal of Food Science*; 68(1): 89-93.
- Middleton, J. K., *et al.* (2002). Thermostability of reovirus disassembly intermediates (ISVPs) correlates with genetic, biochemical, and thermodynamic properties of major surface protein $\mu 1$. *Journal of virology*; 76(3): 1051-1061.
- Moore, J. B., *et al.* (2014). The role of dietary sugars and de novo lipogenesis in non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrients*; 6(12): 5679-5703.
- Nishimura, H., *et al.* (1982). Physicochemical properties and states of sulfhydryl groups of uricase from *Candida utilis*. *The journal of biochemistry*; 91(1): 41-48.
- Park, S. & Kazlauskas, R.J. (2003). Biocatalysis in ionic liquids-advantages beyond green technology. *Current opinion in Biotechnology*; 14(4):432-437.
- Pession, A., *et al.* (2008). Pitfalls, prevention, and treatment of hyperuricemia during tumor lysis syndrome in the era of rasburicase (recombinant urate oxidase). *Biologics: targets & therapy*; 2(1): 129.
- Pitts, O., *et al.* (1974). Uricase. Subunit composition and resistance to denaturants. *Biochemistry*; 13(5): 888-892.
- Pui, C.-H., *et al.* (2001). Recombinant urate oxidase for the prophylaxis or treatment of hyperuricemia in patients with leukemia or lymphoma. *Journal of clinical oncology*; 19(3): 697-704.
- Pui, C., *et al.* (2001). Recombinant urate oxidase (rasburicase) in the prevention and treatment of malignancy-associated hyperuricemia in pediatric and adult patients: results of a compassionate-use trial. *Leukemia*; 15(10): 1505-1509.
- Schumacher, H.R. & Chen, L.X. (2006). Newer therapeutic approaches: gout. *Rheumatic Disease Clinics*; 32(1): 235-244.
- Sherman, M. R., *et al.* (2008). PEG-uricase in the management of treatment-resistant gout and hyperuricemia. *Advanced drug delivery reviews*; 60(1): 59-68.
- Shikha, S., *et al.* (2017). Facile fabrication of lipase to amine functionalized gold nanoparticles to enhance stability and activity. *RSC advances*; 7(68): 42845-42855.
- van Rantwijk, F., *et al.* (2006). Structure and activity of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids. *Green Chemistry*; 8(3): 282-286.
- Vasantha, T., *et al.* (2012). Structural basis for the enhanced stability of protein model compounds and peptide backbone unit in ammonium ionic liquids. *The Journal of Physical Chemistry B*; 116(39): 11968-11978.
- Zaboli, M. & Raissi, H. (2017). The influence of nicotine on pioglitazone encapsulation into carbon nanotube: the investigation of molecular dynamic and density functional theory. *Journal of Biomolecular structure and dynamics*; 35(3): 520-534.
- Zhao, C., *et al.* (2009). Highly sensitive and selective uric acid biosensor based on direct electron transfer of hemoglobin-encapsulated chitosan-modified glassy carbon electrode. *Analytical Sciences*; 25(8): 1013-1017.