

# مهندسی ریزمحیط آنزیم لیپاز و اثر نانولایه سیلیکا بر پایداری و تاخوردگی مجدد آنزیم

علی فروتن کلورزی<sup>۱</sup>، سیده شیرین شاهنگیان<sup>۲\*</sup>

۱- کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۲- دکتری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

\*صندوق پستی ۴۱۹۹۶۱۳۷۷۶، رشت، ایران

shahangian@guilan.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۰۳

دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۰۸

## چکیده

امروزه پژوهشگران بر راهبردهای جدید پایداری و افزایش فعالیت آنزیم‌ها برای استفاده گسترده‌تر آنها در صنایع مختلف متمرکز هستند. در این پژوهش از یک پلتفرم یکپارچه برای تثبیت و محافظت از پروتئین‌ها در محیط‌های صنعتی استفاده شده است. اگرچه لیپازها کاربردهای صنعتی گسترده‌ای دارند، استفاده از آنها در فرایندهای صنعتی اغلب به دلیل پایداری کم در شرایط سخت محیطی با محدودیت مواجه می‌شود. در مطالعه حاضر جهت پایداری آنزیم از یک راهبرد دومنظوره شامل تثبیت آنزیم و استفاده از لایه محافظ ارگانوسیلیکا استفاده شد. پس از بیان و تخلیص آنزیم لیپاز نوترکیب، تثبیت آن بر روی نانوذره سیلیکا انجام شد و در مرحله بعد، از نانولایه ارگانوسیلیکا برای لایه‌گذاری پیرامون آنزیم استفاده شد. ضخامت لایه محافظ بهینه‌سازی و میزان تاثیر آن بر پایداری آنزیم در مقابله با استرس‌های محیطی مطالعه شد. آنزیم لایه‌گذاری شده پایداری قابل توجهی نسبت به آنزیم آزاد در برابر عوامل مختلف مانند نوسانات دمایی و عوامل شیمیایی نشان داد. علاوه بر این، نمونه‌های تثبیت شده فعالیت بهینه را در محدوده دمایی گسترده‌ای نشان دادند، که بر تطبیق‌پذیری و کارایی این رویکرد تأکید می‌کند. لایه ارگانوسیلیکا به‌طور چشمگیری بازده تاخوردگی مجدد پروتئین‌های دناتوره‌شده با SDS و اوره افزایش داد، که نشانگر کاربرد چندگانه این روش می‌باشد. یافته‌های این مطالعه نشان داد پلت‌فرم حاضر می‌تواند رویکردی امیدوارکننده برای افزایش کارایی و پایداری آنزیم‌های صنعتی در برابر چالش‌های متنوع محیطی باشد.

**کلید واژگان:** لیپاز، تثبیت، لایه محافظ، پایداری پروتئین، سیلیکا

## ۱- مقدمه

لیپازها دسته‌ای پرکاربرد و ارز شمند از آنزیم‌های صنعتی می‌باشند که قابلیت هیدرولیز پیوندهای استری در لیپیدها را دارند و از آنها می‌توان در صنایع مختلف همچون فراوری مواد غذایی، دارو سازی، صنعت شوینده و تولید سوخت‌های طبیعی استفاده کرد [۲،۱]. با این حال، بیشتر این آنزیم‌های طبیعی در طیف وسیعی از pH و دما، و یا در حضور حلال‌های آلی و سورفکتانت‌ها غیرفعال می‌شوند. علاوه بر این، بازیابی آنزیم‌ها پس از انجام واکنش آنزیمی دشوار است و جلوگیری از آلودگی محصول مستلزم هزینه‌های جداسازی و خالص‌سازی بالایی است. این دلایل باعث ایجاد محدودیت برای فعالیت گسترده‌تر آنزیم‌ها در فرایندهای صنعتی شده است [۴،۳].

یکی از راهکارهای معمول برای مقابله با این چالش‌ها و افزایش توانایی استفاده لیپازها در محیط‌های صنعتی، استفاده از تکنیک‌های تثبیت آنزیم می‌باشد. تثبیت آنزیم شامل اتصال آنزیم‌ها به بسترهای جامد است که باعث افزایش پایداری و کارایی آنها در واکنش‌های شیمیایی می‌شود. طی سال‌های گذشته، پژوهشگران راهبردهای مختلفی از جمله تثبیت آنزیم را توسعه داده‌اند که هر کدام از آنها کاربرد و مزیت مشخصی را برای هدفی خاص ارائه می‌دهند [۵،۶].

اتصال آنزیم به بستر جامد از پرکاربردترین روش‌های تثبیت آنزیم می‌باشد که شرایط فوق‌العاده‌ای را برای کاربردهای آزمایشگاهی و صنعتی از نظر پایداری، حفظ و بازیافت مواد بیوکاتالیستی فراهم می‌کند. این روش آنزیم را قادر می‌سازد تا فعالیت کاتالیزی و ساختار طبیعی خود را در شرایط نامطلوب حفظ کنند. از مزایای دیگر این روش می‌توان به سهولت جداسازی و افزایش مقاومت در برابر استرس‌های فیزیکی و شیمیایی اشاره کرد [۷،۸].

از نانوذرات مختلفی به‌عنوان بستر جامد برای تثبیت آنزیم استفاده شده است. اما مطالعات قبلی نشان داده است که سیلیکا به‌دلیل واکنش‌پذیری گروه‌های سیلانول سطحی، مقاومت شیمیایی، حرارتی و خواص ضدباکتریایی بالا و عدم تورم یکی از بهترین بسترها برای تثبیت آنزیم‌ها می‌باشد. از مزایای دیگر نانوذرات سیلیکا می‌توان به اتصال کارآمد به‌دلیل سطح ویژه بالا و ترکیب ثابت آن و همچنین مقاومت زیاد در برابر حلال‌های آلی اشاره کرد [۹].

اگرچه در سال‌های گذشته روش‌های تثبیت و حفاظتی مختلفی برای آنزیم‌ها گزارش شده است، اما بسیاری از این روش‌ها دارای محدودیت‌هایی می‌باشند. اخیراً Correro و همکاران یک راهبرد شیمیایی برای تثبیت و محافظت کامل از آنزیم‌ها گزارش کرده‌اند که در آن ابتدا آنزیم توسط پیوند کووالانسی به نانوذرات سیلیکا متصل می‌شود و سپس، یک لایه ارگانوسیلیکا نرم اطراف آن را احاطه می‌کند [۱۰]. بررسی بیشتر خواص نانومکانیکی لایه ارگانوسیلیکا با میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM)، نشان داده است که نرم شدن این لایه محافظ پس از نگهداری در دمای اتاق به مدت چند ساعت اتفاق می‌افتد. تثبیت اولیه لایه ارگانوسیلیکا توسط پیوندهای هیدروژنی و فعل و انفعالات یونی بین سطح پروتئین و پلی‌سیلوکسان‌های<sup>۱</sup> کوتاه تولید شده در طی واکنش تراکمی می‌باشد، که این موضوع باعث تولید لایه ارگانوسیلیکا می‌شود. سنتز این لایه ارگانوسیلیکا با اتصال کووالانسی این پلی‌سیلوکسان‌های کوتاه با یکدیگر به تشکیل پیوندهای سیلوکسان نسبت داده شد، که منجر به افزایش پایداری مکانیکی این لایه محافظ می‌شود. این لایه نرم از آنزیم در مقابل مجموعه‌ای از تنش‌های دیناتورکننده محافظت می‌کند تا فعالیت بیوکاتالستی خود را حفظ کند [۱۱]. با این حال، ضخامت این لایه برای فعالیت آنزیم

<sup>۱</sup> polysiloxanes

تریس هیدروکلراید ( $\text{Tris-HCl}$ ,  $\geq 98\%$ )، آمونیوم هیدروکسید (گرید ACS، ۲۸-۳۰ درصد)، اتانول (گرید ACS، خشک)، ۲-(N-morpholino) اتان سولفونیک اسید مونوهیدرات<sup>۵</sup> ( $\text{MES}$ ,  $\geq 99.0\%$ ) و بی کربنات آمونیوم ( $\geq 98\%$ ) از Sigma-Aldrich خریداری شد. دی متیل فرمامید (DMF، خشک، ۹۹.۹ درصد) و کیت سنجش پروتئین BCA از Thermo Fisher Scientific خریداری شد. ۴-نیتروفنیل بوتیرات<sup>۶</sup> ( $\text{pNPB}$ ,  $>98\%$ ) از Merck خریداری شد.

## ۲-۲ سنتز نانوذرات سیلیکا

نانوذرات بر اساس مطالعات پیشین و روش استوبر تولید شدند [۱۳]. مواد شیمیایی و حلال‌ها قبل از استفاده در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت در حمام آبی همگن شدند. ۴۰ میلی‌لیتر آمونیوم هیدروکسید (۲۸-۳۰ درصد) و ۳۴۵ میلی‌لیتر اتانول در یک فلاسک ۱ لیتری با دور ۶۰۰ دور بر دقیقه مخلوط شدند. ۱۵ میلی‌لیتر TEOS اضافه و محلول به مدت ۲۰ ساعت در همان شرایط هم‌زده شد. سوسپانسیون شیری حاصل در ۳۲۲۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و رسوب سفید رنگ بار دیگر در اتانول حل شد. این فرایند یک بار با اتانول و سه بار با آب تکرار شد و ۴ گرم نانوذره سیلیکا در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ذخیره شد.

## ۲-۳ بیان و تخلیص آنزیم لیپاز

در این مطالعه، از آنزیم لیپاز از باکتری *Bacillus* (WP\_034624255.1) به عنوان آنزیم مدل استفاده شد. باکتری‌های حاوی پلاسמיד نوترکیب بیانی pET-45b(+) به ۵ میلی‌لیتر محیط کشت LB حاوی آمپی‌سیلین ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تلقیح و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با هوادهی مطلوب به صورت شبانه انکوبه شد. سپس، ۲ میلی‌لیتر باکتری رشد یافته را به ۲۰۰

بسیار مهم است. به طوری که پوشش کامل آنزیم‌ها توسط لایه ارگانو سیلیکا باعث کاهش فعالیت آنزیم می‌شود و تنها به سوبستراهای کوچک اجازه می‌دهد تا با انتشار در لایه به جایگاه فعال آنزیم برسند. در نتیجه برای حفاظت از آنزیم‌های مختلف ضخامت این لایه محافظ باید بشدت کنترل شود.

در مطالعات دیگر نشان داده شد با استفاده از این لایه محافظ می‌توان با کنترل نانومحیط پیرامون آنزیم، امکان اختصاصیت و انتخاب‌پذیری سوبسترا را نیز کنترل کرد. به طوری که در این روش علاوه بر افزایش پایداری آنزیم در مقابل تنش‌های محیطی، اختصاصیت و انتخاب‌پذیری سوبسترا برای آنزیم افزایش پیدا کرد [۱۲].

در مطالعه حاضر، از تثبیت آنزیم و کنترل محیط پیرامون آنزیم توسط نانولایه نرم ارگانو سیلیکا به عنوان یک راهبرد ترکیبی برای بهبود فعالیت و پایداری آنزیم لیپاز استفاده شد. تثبیت آنزیم لیپاز بر روی نانوذرات سیلیکا به عنوان بستر جامد، شرایط مناسبی را برای مراحل بعدی یعنی استفاده از لایه ارگانوسیلیکا به عنوان لایه محافظ فراهم کرد. با توجه به ویژگی لایه ارگانوسیلیکا افزودن این لایه محافظ نه تنها باعث افزایش پایداری و کارایی آنزیم لیپاز تثبیت شده می‌شود، بلکه این نمونه‌ها در مقایسه با آنزیم تثبیت شده بدون لایه افزایش فعالیت کاتالیتیکی از خود نشان می‌دهند. علاوه بر این، مزایای متمایز لایه ارگانوسیلیکا به عنوان روش ترکیبی تثبیت کننده آنزیم بررسی شد.

## ۲-مواد و روش‌ها

### ۲-۱ مواد

تترا اتیل ار توسیلکات<sup>۲</sup> ( $\text{TEOS}$ ,  $\geq 99\%$ )، (۳-آمینوپروپیل)تری اتوکسی سیلان<sup>۳</sup> ( $\text{APTES}$ ,  $\geq 98\%$ )، (تری اتوکسی سیلیل)-پروپیل سوسیانات<sup>۴</sup> (۹۵ درصد)،

<sup>5</sup> 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid monohydrate

<sup>6</sup> 4-Nitrophenylbutyrate

<sup>2</sup> Tetraethyl orthosilicate

<sup>3</sup> (3-aminopropyl) triethoxysilane

<sup>4</sup> 3-(triethoxysilyl)-propylisocyanate

سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت با هم‌زدن ۴۰۰ دور در دقیقه انکوبه شد. پس از آن، APTES<sup>۸</sup> (۰/۸ میکرولیتر) اضافه شد و واکنش به مدت ۹۰ دقیقه دیگر تحت شرایط مشابه ادامه یافت. هر ۳۰ دقیقه یک‌بار نمونه‌ها جمع‌آوری و با بافر ۱۰ میلی‌مولار MES شسته شد و به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

#### ۲-۶ میکروسکوپ الکترونی روبشی<sup>۹</sup>

محلول‌های نانوذرات سیلیکا بدون لایه و با لایه تهیه و روی بسترهای سیلیکونی پخش شدند. نمونه‌ها در دمای اتاق و تحت شرایط جوی خشک شدند و سپس، به مدت ۱۵ ثانیه در ۲۰ میلی‌آمپر با طلا پوشش داده شدند. میکروگراف‌های الکترونی ثانویه با استفاده از حالت InLens با ولتاژ شتاب دهنده ۱۰ کیلوولت با بزرگنمایی X ۱۵۰۰۰۰ به‌دست آمد. اندازه ذرات بر روی میکروگراف‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار ImageJ اندازه‌گیری شد. حداقل ۱۰۰ اندازه‌گیری برای هر نمونه انجام شد.

#### ۲-۷ اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی

فعالیت استرازی-لیپازی به روش اسپکتروفتومتری با استفاده از p-nitrophenyl butyrate (p-NPB) به‌عنوان سوبسترا در ۴۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای واکنش آنزیمی از مخلوط حاوی لیپاز تثبیت شده (۰/۳ میلی‌گرم) و ۱ میلی‌مولار p-NPB در در بافر Tris-HCl (۵۰ میلی‌مولار، pH ۸/۵) استفاده می‌شود [۱۴].

#### ۲-۸ سنجش دمای بهینه فعالیت آنزیم

بافر Tris-HCl (۵۰ میلی‌مولار، pH ۸/۵) به مدت ۳۰ دقیقه در دماهای متفاوت از ۱۵ تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از آن، نمونه‌های آنزیمی مورد مطالعه و سوبسترا به بافر واکنش اضافه شدند و فعالیت آنزیم در دماهای مختلف ۷۰-۱۵ درجه سانتی‌گراد تحت شرایط بهینه اندازه‌گیری شد.

میلی‌لیتر محیط‌کشت LB حاوی آمپی‌سیلین ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر انتقال داده و تا افزایش OD<sub>600</sub> به حدود ۰/۶ در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، انکوبه شد. پس از این مرحله با افزودن IPTG با غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار، محیط کشت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و پس از گذشت ۵ ساعت، محیط کشت حاوی باکتری برداشته شد و برای انجام مراحل بعدی استفاده شد. برای خالص سازی آنزیم لیپاز، کروماتوگرافی تمایلی با استفاده از ستون نیکل سفارز استفاده شد. در نهایت غلظت آنزیم تخلیص شده طبق روش BCA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۶۲ نانومتر و با استفاده از آلبومین سرم گاوی به‌عنوان استاندارد تعیین شد.

#### ۲-۴ تثبیت آنزیم

سوسپانسیون SNP-NH<sub>2</sub> (۳/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، ۱۰ میلی‌لیتر) با ۴۰ میکرولیتر گلو تار آلدئید به مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد واکنش داده شد. محصول واکنش با سرعت ۴۰۰۰ rpm و به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد، سپس، ۳ بار با آب Milli-Q شسته شد و بار دیگر در بافر MES (۱۰ میلی‌مولار، ۱/۵ میلی‌مولار MgCl<sub>2</sub>) معلق شد. در مرحله بعد سوسپانسیون SNP‌های اصلاح شده با گلو تار آلدئید (۳/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت با لیپاز انتخاب شده تحت هم‌زدن مداوم، واکنش داد. آنزیم‌های تثبیت شده توسط سانتریفیوژ با سرعت ۴۰۰۰ دور بر دقیقه و به مدت ۵ دقیقه جمع‌آوری شدند. مایع رویی برای ارزیابی عملکرد تثبیت آنزیم با استفاده از تست BCA، ارزیابی شد. رسوب در بافر بی‌کربنات آمونیوم (۱۰ میلی‌مولار، ۱/۵ میلی‌مولار MgCl<sub>2</sub>) بار دیگر حل شد.

#### ۲-۵ لایه‌گذاری ارگانو سیلیکا

سوسپانسیون آنزیمی تثبیت شده (۹۰۰ میکرولیتر) با TEOS<sup>۷</sup> (۲ میکرولیتر) واکنش داده و در دمای ۱۰ درجه

<sup>۹</sup> Scanning Electron Microscope

<sup>۷</sup> Tetraethyl orthosilicate

<sup>۸</sup> (3-aminopropyl) triethoxysilane

**۲-۹ پایداری آنزیم در دمای پر کاربرد صنعت**

۴۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های تثبیت شده و آنزیم آزاد در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه با سرعت شیکر ۶۵۰ در دقیقه انکوبه شد. هر ۱۰ دقیقه، مقادیر ۲۰ میکرولیتر از نمونه آنزیمی انکوبه شده با ۲۰ میکرولیتر p-NPB (۲ میلی‌مولار) در بافر Tris-HCl (۵۰ میلی‌مولار، pH ۸/۵) مخلوط شد و سپس، از نظر فعالیت هیدرولیتیک در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد طبق روشی که در بالا توضیح داده شد، ارزیابی شدند.

**۲-۱۰ پایداری آنزیم در حضور مواد شیمیایی**

ابتدا نمونه‌های تثبیت شده با ۱ درصد SDS و اوره ۶ مولار به مدت ۲۰ دقیقه تحت هم زدن با دور ۶۵۰ در دقیقه مخلوط شد. سپس، ۲۰ میکرولیتر از این مخلوط استخراج و با ۲۰ میکرولیتر p-NPB (۲ میلی‌مولار) در بافر Tris-HCl (۵۰ میلی‌مولار، pH معادل ۸/۵) مخلوط شد. پس از آن، فعالیت هیدرولیتیک در ۳۰ درجه سانتی‌گراد ارزیابی شد.

**۲-۱۱ تاخوردگی مجدد**

آنزیم آزاد در ابتدا با ۱ درصد SDS و اوره ۶ مولار دناتوره شدند. در مرحله بعد برای تاخوردگی مجدد آنزیم آزاد ۱ میلی‌لیتر از آن با ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر Tris-HCl (۵۰ میلی‌مولار، pH معادل ۸) دیالیز شد. بافر دیالیز هر دو ساعت (سه بار) برای اطمینان از حذف کامل SDS و اوره تعویض شد. فرایند تاکردن مجدد با دیالیز به صورت شبانه انجام شد.

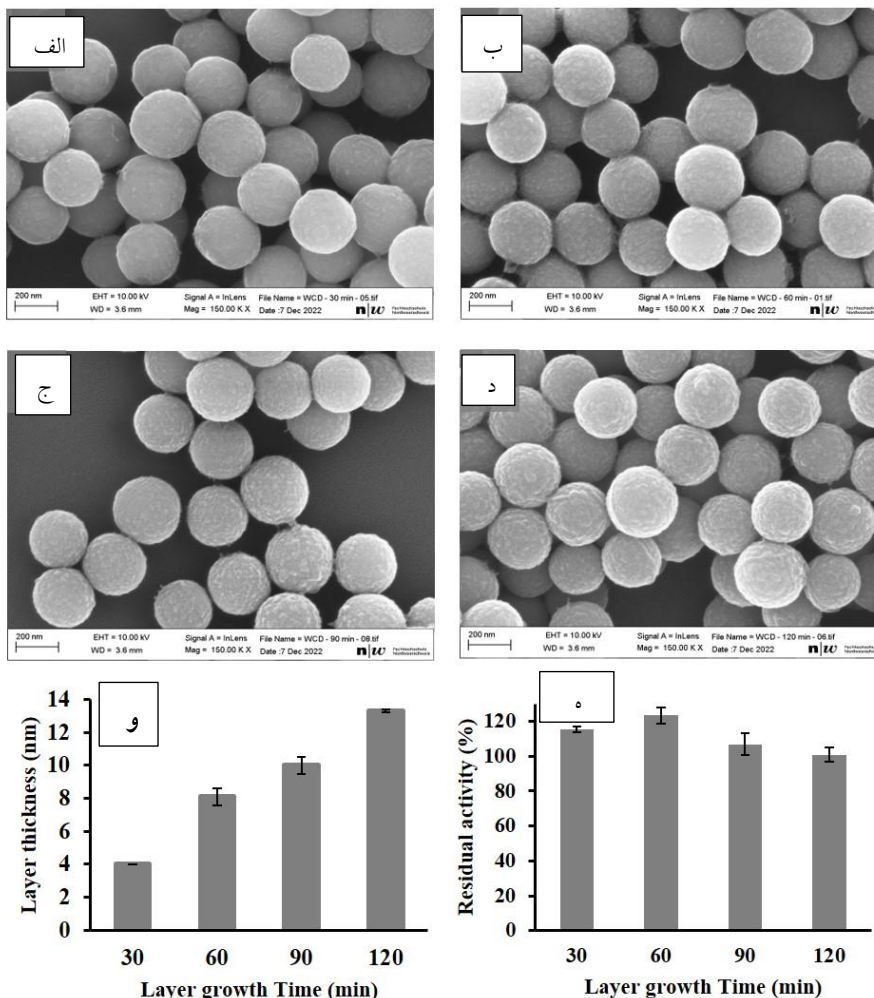
آنزیم تثبیت شده پس از دناتوره شدن با ۱ درصد SDS و اوره ۶ مولار، به مدت ۵ دقیقه در ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس، رسوب حاصل سه مرتبه با بافر Tris (۵۰ میلی‌مولار، pH معادل ۸) شستشو و معلق شد. در نهایت، فعالیت نمونه‌های تا شده با نمونه‌های شاهد مقایسه شد.

**۳- نتایج**

تثبیت آنزیم لپاز در سطح نانوذرات عامل‌دار شده با آمین (میانگین قطر  $20 \pm 290$  نانومتر) با استفاده از روشی که قبلاً گزارش شده، انجام شد. نانوذرات با مخلوطی از TEOS و APTES واکنش دادند، که منجر به تثبیت آنزیم بر روی نانوذرات سیلیکا شد. میزان بازدهی فرایند تثبیت توسط تست BCA و پس از گذشت ۳۰ دقیقه مورد سنجش قرار گرفت که نشان داد ۸۱ درصد آنزیم‌ها توانستند به سطح نانوذرات متصل شوند. در مرحله بعد برای محافظت بیشتر آنزیم فرایند لایه‌گذاری ارگانوسیلیکا انجام شد. نانو ذرات تولید شده با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مطالعه شدند. آنالیز SEM نشان داد با افزایش زمان، ضخامت لایه ارگانوسیلیکا افزایش می‌یابد (شکل ۱، الف-د).

فعالیت بیوکاتالیستی آنزیم‌های تثبیت شده همراه با لایه ارگانوسیلیکا ضمن سنجش هیدرولیز p-NPB اندازه‌گیری و فعالیت آنزیم تثبیت شده بدون لایه ۱۰۰ درصد در نظر گرفته و فعالیت سایر نمونه‌ها با آن مقایسه شد. فعالیت آنزیم با ضخامت لایه محافظ ۴ و ۸/۱ نانومتر به ۱۱۵ و ۱۲۳ درصد افزایش یافت. هنگامی که ضخامت لایه به ۱۰ و ۱۳/۳ نانومتر افزایش یافت، فعالیت آنزیمی به ترتیب ۱۰۶ و ۹۹ درصد کاهش یافت (شکل ۱، ه-و).

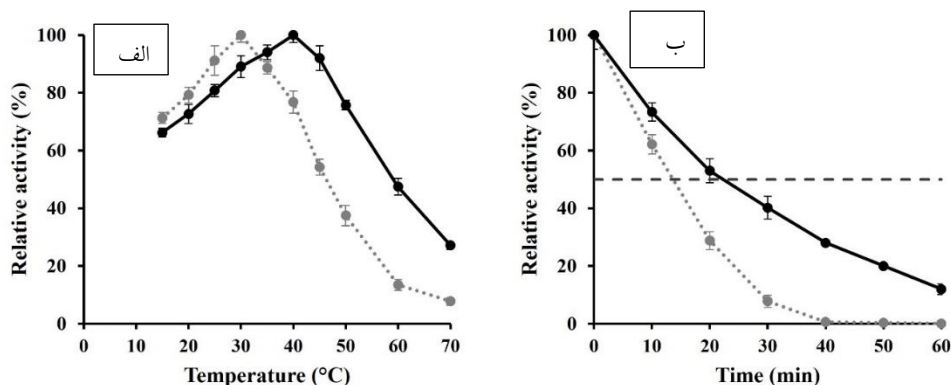
برای تعیین دمای بهینه، فعالیت نمونه‌ها در محدوده دمایی ۷۵-۱۵ درجه سانتی‌گراد بررسی شد. دمای بهینه فعالیت آنزیم لایه‌گذاری شده ۴۰ درجه سانتی‌گراد بود و بیش از ۸۰ درصد فعالیت را در محدوده دمایی وسیع ۴۵-۲۵ درجه سانتی‌گراد حفظ کرد. آنزیم آزاد، فعالیت بهینه خود را در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نشان داد و تنها در محدوده ۳۵-۲۵ درجه سانتی‌گراد مقادیر فعالیت بیش از ۸۰ درصد از خود نشان داد. با افزایش بیشتر دما، فعالیت آنزیمی به شدت کاهش یافت، به طوری که در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد، آنزیم آزاد بیش از ۶۰ درصد از فعالیت خود را از دست داد (شکل ۲، الف).



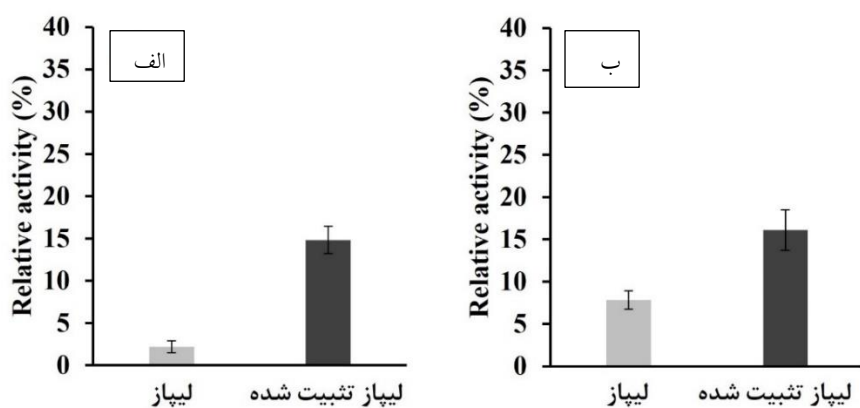
شکل ۱ میکروگراف‌های SEM از نانوذرات حاوی لایه ارگانوسیلیکا پس از (A) ۳۰ دقیقه، (B) ۶۰ دقیقه، (C) ۹۰ دقیقه و (D) ۱۲۰ دقیقه از شروع واکنش رشد لایه به ترتیب با ضخامت لایه ۴/۰، ۸/۱، ۱۰ و ۱۳/۳ نانومتر، نوارهای مقیاس نشان‌دهنده ۳۰۰ نانومتر هستند. (E) تغییر ضخامت لایه در زمان‌های مختلف رشد لایه. میانگین حداقل ضخامت ۱۰۰ نانوذره اندازه‌گیری شده است. (F) فعالیت آنزیمی نمونه‌های تثبیت شده همراه لایه محافظ با فعالیت آنزیمی در غیاب لایه محافظ مقایسه شده است. انحراف معیار با سه تکرار برای هر نمونه اندازه‌گیری شد.

همچنین، آنزیم آزاد پس از گذشت ۴۰ دقیقه فعالیت خود را به طور کامل از دست داد، اما نمونه تثبیت شده در همین مدت زمان حدود ۲۸ درصد فعالیت نشان داد. مقایسه فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده نشان داد پس از گذشت ۳۰ دقیقه فعالیت آنزیم تثبیت شده بیش از ۵ برابر آنزیم آزاد می‌باشد (شکل ۲، ب).

برای بررسی پایداری دمایی نمونه‌ها هر کدام از آنها در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه انکوبه شدند. فعالیت آنزیم قبل از تیمار دمایی ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد. فعالیت آنزیم آزاد پس از گذشت ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه به ۶۲/۱، ۲۸/۸ و ۷/۸ درصد کاهش یافت. آنزیم تثبیت شده پایداری دمایی قابل توجهی نشان داد، به طوری که فعالیت آن در زمان‌های ذکر شده ۷۳، ۵۳ و ۴۰ درصد بود.



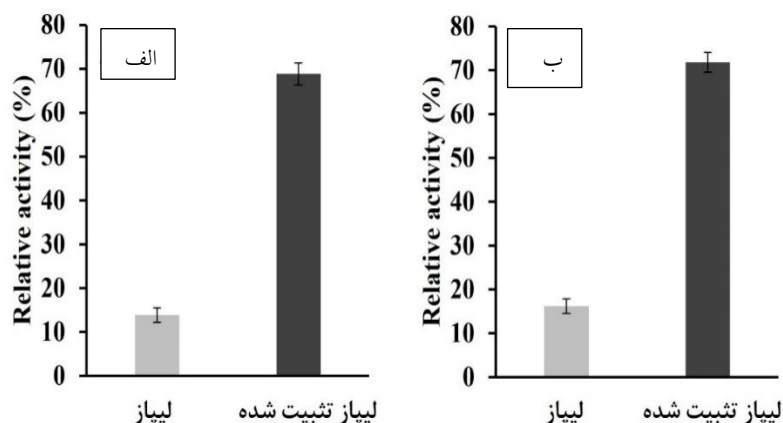
شکل ۲ (الف) نمودار اثر دما بر فعالیت آنزیم تثبیت شده (مشکی) و آنزیم آزاد (نقطه چین طوسی). (ب) فعالیت آنزیمی در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد در طول ۶۰ دقیقه آنکوباسیون برای آنزیم تثبیت شده (مشکی) و آنزیم آزاد (نقطه چین طوسی) اندازه گیری شد.



شکل ۳ (الف) فعالیت آنزیمی بعد از تیمار با SDS برای آنزیم آزاد (طوسی) و آنزیم تثبیت شده (مشکی) اندازه گیری شد. (ب) فعالیت آنزیمی بعد از تیمار با اوره برای آنزیم آزاد (طوسی) و آنزیم تثبیت شده (مشکی) اندازه گیری شد.

از دست داد، اما آنزیم تثبیت شده تقریباً ۱۵ درصد از فعالیت اولیه خود را حفظ کرد. در مرحله بعد، اثر دنا توره کندنگی اوره روی آنزیم آزاد و تثبیت شده پس از ۲۰ دقیقه آنکوباسیون با محلول اوره (۶ M) مطالعه شد. آنزیم تثبیت شده قادر به حفظ ۱۷ درصد فعالیت پس از تیمار بود، در حالی که آنزیم آزاد تنها می تواند ۸ درصد از فعالیت اولیه خود را حفظ کند (شکل ۳، ب).

نتایج امیدوارکننده پایداری حرارتی، ما را بر آن داشت تا اثر تثبیت لایه محافظ را در مواجهه با تنش شیمیایی بررسی کنیم. ابتدا تأثیر سدیم دود سیل سولفات (SDS) به عنوان سورفکتانتی آنیونی بر پایداری آنزیم بررسی شد. نمونه های مورد مطالعه، قبل از بررسی فعالیت آنزیمی به مدت ۲۰ دقیقه در حضور SDS (۱ درصد) آنکوبه شدند. براساس شکل ۳، الف آنزیم آزاد تقریباً کل فعالیت خود را



شکل ۴ فعالیت آنزیمی بعد از تاخوردگی مجدد برای آنزیم آزاد (طوسی) و آنزیم تثبیت شده (مشکی) اندازه گیری شد. (الف) بعد از دناتور شدن با SDS. (ب) بعد از دناتور شدن با اوره.

زیستی می‌باشد. اما استفاده از آن‌ها در فرایندهای صنعتی در محیط‌های غیرفیزیولوژیک محدود است. به همین علت آنزیم‌هایی که بتوانند استرس‌های محیطی صنایع را تحمل کنند از لحاظ اقتصادی بسیار باارزش‌اند. پایدارسازی آنها برای کاتالیز کارآمد و قابلیت استفاده مجدد در طولانی مدت بسیار مهم است. شرکت‌های مطرحی در دنیا با صنایع وابسته به لیپازها تلاش بر افزایش پایداری این آنزیم‌ها دارند. تثبیت آنزیم بر روی بسترهای جامد همچون نانوذرات سیلیکا رویکردی ارزشمند در این زمینه است که از این طریق امکان حفظ فعالیت آنزیم تثبیت شده برای فرایندهای مداوم میسر می‌شود. در مطالعات قبلی یک راهبرد شیمیایی برای محافظت کامل از آنزیم‌های تثبیت شده در سطح ذرات سیلیکا توسط یک نانولایه ارگانوسیلیکا معرفی شده است [۱۵، ۱۶].

در این پژوهش تلاش شد با استفاده از این روش جدید تثبیت و محافظت، لیپازی پایدار با کارایی بالا برای صنعت تولید شود. با توجه به مزایای منحصربفرد نانوذرات سیلیکا، از این بستر در مرحله تثبیت استفاده شد. سطح بالا و اندازه قابل تنظیم نانوذرات با فراهم کردن محل‌های

در مرحله بعد، امکان بازیابی عملکرد آنزیم پس از تیمار با مواد شیمیایی مطالعه شد. بدین منظور، برای حذف عوامل شیمیایی از محیط واکنش آنزیمی از دو روش مختلف استفاده شد. آنزیم تثبیت شده سانتریفیوژ و سپس توسط بافر Tris-HCl شستشو داده شد. اما برای آنزیم آزاد ناگزیر از روش دیالیز برای حذف SDS و اوره استفاده شد. اندازه‌گیری فعالیت نمونه‌ها پس از تیمار SDS با در شکل ۴، الف نشان داد در حالی که آنزیم آزاد تنها ۱۳ درصد از فعالیت اولیه خود را بازیابی کرد، آنزیم تثبیت شده ۶۸ درصد از فعالیت اولیه خود را به دست آورد. همچنین، مطابق یافته‌های تاخوردگی مجدد بعد از تیمار با اوره، آنزیم تثبیت شده توانایی بازیابی ۷۱ درصد از فعالیت خود را داشت، در حالی که آنزیم آزاد بعد از فرایند تاخوردگی مجدد تنها ۱۶ درصد از فعالیت اولیه خود را نشان داد (شکل ۴، ب).

#### ۴- بحث

آنزیم لیپاز از محصولات بیوتکنولوژیک مهم، با ارزش افزوده بالا و مصرف بسیار زیاد در صنایع مختلف از جمله صنایع غذایی، لبنی، دارویی، شویندگی و سوخت‌های



فراوری گوشت و شویندگی از این مساله مستثنی نیستند. آنزیم‌های آزاد اغلب در برابر تخریب پروتئولیتیک آسیب پذیر هستند. در خصوص آنزیم‌های تثبیت و شیلد شده، این موانع دسترسی به مولکول‌های آنزیم را محدود می‌کنند و باعث افزایش پایداری آنزیم و نیمه‌عمر می‌شود [۲۱، ۲۲]. تثبیت امکان بازیابی کارآمد آنزیم را فراهم می‌کند که می‌توان در چرخه‌های چندین باره واکنش به‌ویژه در فرایندهای صنعتی از آنزیم‌ها استفاده کرد. فرایند تثبیت مانع تجمع آنزیم‌ها نیز می‌شود، پدیده‌ای که در شرایط محلول بسیار رخ می‌دهد و منجر به از دست رفتن فعالیت می‌شود. نانولایه‌ها نیز علاوه بر اینکه در برخی موارد ذکر شده نقش ایفا می‌کنند، به‌عنوان مانعی فیزیکی از آنزیم‌ها در برابر تنش‌های محیطی محافظت و به حفظ ساختار بومی آنزیم کمک می‌کنند. با ایجاد یک پوشش پایدار و منسجم در اطراف سطح تثبیت آنزیم، از لیچینگ<sup>۱۳</sup> آنزیم جلوگیری می‌کنند، بدین ترتیب انتشار آنزیم را کاهش و پایداری را افزایش می‌دهند [۲۳].

ضخامت لایه ارگانوسیلیکا اثر بسزایی بر پایداری و فعالیت آنزیم دارد و تنظیم آن مرحله‌ای حساس در این روش پایدارسازی است. اگرچه حدی از ضخامت نانولایه برای کارآمدی آن به‌عنوان سد حفاظتی ضرورت دارد، اما با افزایش ضخامت، دسترسی آنزیم به سوبسترا، کونفورماسیون طبیعی و انعطاف‌پذیری ساختار آنزیم نیز شدیداً تحت تاثیر قرار می‌گیرد و می‌تواند منجر به کاهش فعالیت شود که بر اهمیت تنظیم ظریف ضخامت نانولایه تاکید دارد [۲۴]. به‌طور کلی می‌توان گفت نتایج به‌دست آمده در این آزمایش با نتایج مطالعات پیشین بر روی آنزیم‌های  $\beta$ -گالاکتوزیداز و استراز مطابقت دارد [۱۰، ۱۲]. پایداری حرارتی از ویژگی‌های مهم آنزیم‌های صنعتی می‌باشد که برای ارزیابی ارزش اقتصادی آنها علاوه بر سنجش میزان فعالیت کاتالیتیکی، بررسی می‌شود. لیپازها

اتصال بیشتر منجر به اتصال کارآمد آنزیم‌ها می‌شود. قابلیت تنظیم شیمی سطح این نانوذرات، روش‌های مختلف تثبیت مانند جذب<sup>۱۰</sup>، به دام انداختن<sup>۱۱</sup>، اتصال عرضی<sup>۱۲</sup> و کووالانسی را ممکن می‌سازد و این تطبیق پذیری امکان بهینه‌سازی تثبیت آنزیم‌های مختلف را فراهم می‌کند [۱۷]. در مطالعه حاضر برای تثبیت آنزیم از روش اتصال عرضی استفاده شد. سپس، مولکول‌های آنزیم توسط نانولایه سیلیکا انکپسوله شدند. در اغلب موارد تثبیت آنزیم‌ها اگرچه افزایش پایداری را به همراه دارد، فعالیت آنزیم پس از تثبیت کاهش می‌یابد. لیپاز مورد مطالعه پس از تثبیت نسبت به آنزیم آزاد ۲۰ درصد کاهش فعالیت نشان داد. در حالی که شیلدینگ توسط نانولایه فعالیت آنزیم را تقریباً به میزان اولیه بازگرداند و بدین ترتیب با حفظ فعالیت آنزیم افزایش پایداری ارزیابی شد. زیست‌سازگار، غیر سمی و بی‌اثر بودن این نانوذرات آنها را به‌عنوان گزینه مناسبی برای صنایع زیست‌پزشکی و غذایی نیز مطرح می‌کند. پایدارسازی آنزیم با تثبیت بر این نانوذرات در برابر شرایط سخت مانند pH شدید، دما و حلال‌های آلی گزارش شده‌است که قابلیت استفاده مجدد از آنزیم را افزایش و هزینه‌های مرتبط با جایگزینی آنزیم را کاهش می‌دهد [۱۱]. استفاده از نانولایه ارگانوسیلیکا به‌همراه تثبیت نیز عملاً برای آنزیم در مقابل استرس‌های مختلف محیطی، به‌ویژه در مقابل ترکیبات شیمیایی و دنا تورانت‌ها سدی حفاظتی فراهم می‌کند. همچنین، این نانولایه ریزمحیطی فراهم می‌کند که در مواردی مانع مهار سوبسترای و مهار توسط محصول می‌شود [۱۸]. ماتریکس‌های پشتیبان به‌عنوان یک نانو محیط محافظت نوسانات دما، pH، یا تغییرات حلال را تعدیل و موجب حفظ ساختار و ممانعت از دنا توراسیون آنزیم می‌شوند [۱۹، ۲۰]. در صنایع مختلف مواجهه آنزیم‌ها با پروتئازها اجتناب‌ناپذیر است. لیپازها نیز در صنایع غذایی، لبنی،

<sup>12</sup> cross-linking

<sup>13</sup> Leaching

<sup>10</sup> adsorption

<sup>11</sup> entrapment

با پایداری حرارتی بالا ضمن تحمل دماهای بالاتر در طول مراحل تولید یا فراوری، امکان افزایش توان عملیاتی، زمان کوتاه‌تر واکنش و بهبود راندمان فرایند را فراهم می‌کنند. همچنین، فعالیت آنزیمی در دمای بالا باعث افزایش حلالیت سوبستراهای کم‌محلول می‌شود. علاوه بر این، پایداری حرارتی برای ذخیره‌سازی و حمل‌ونقل آنزیم‌های صنعتی نیز بسیار مهم است. لیپازهایی با این خصوصیت می‌توانند در فرایندهای صنعتی با دمای بالا مانند فراوری مواد غذایی، تولید سوخت زیستی و مواد شوینده کارآمد باشند [۲۵،۲۶].

آنزیم تثبیت شده برای فعالیت بیوکاتالیستی در دماهای مختلف واکنش از ۲۰ تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد بررسی شد (شکل ۲، الف). طبق این مطالعه، دمای بهینه برای آنزیم آزاد حدود ۳۰ درجه سانتی‌گراد بود. با این حال، هنگامی که آنزیم تثبیت شد، دمای بهینه به حدود ۴۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت. این نتایج مشابه مطالعات قبلی بود که بیان می‌کند تثبیت آنزیم به‌طور قابل‌توجهی بر رفتار حرارتی آنزیم تأثیر می‌گذارد و فعالیت بهینه را در محدوده دمایی وسیع‌تری نسبت به آنزیم آزاد نشان می‌دهد [۲۷]. این موضوع نمایانگر مناسب بودن این روش برای کاربردهای مختلف صنعتی و بیوتکنولوژیکی است که در آنها از دماهای مختلف استفاده می‌شود. محدودیت حرکت آنزیمی پس از تثبیت بر روی نانوذره سیلیکا، به همراه انتشار بهتر سوبسترا در دمای بالاتر و به تبع آن برخورد موثر آنزیم-سوبسترا، می‌تواند دلیل افزایش دما و همچنین گسترش دمای بهینه فعالیت آنزیم تثبیت شده باشد [۲۸]. همچنین، برهمکنش چند نقطه‌ای بین آنزیم و لایه محافظ باعث محدودیت‌هایی در دینامیک ساختاری آنزیم می‌شود که احتمال دنا توره شدن مولکول‌های آنزیم پس از افزایش دما را کاهش می‌دهد [۲۹]. این موضوع می‌تواند دلیل دیگر برای افزایش دمای بهینه به دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد باشد. به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت تغییر

دمای بهینه برای آنزیم تثبیت شده احتمالاً به دلیل تغییرات ساختاری و کاهش تحرک مولکولی ناشی از تثبیت آنزیم در سطح نانوذره می‌باشد. برخی از فرایندهای صنعتی در محدوده دمایی وسیع‌تری انجام می‌شوند و استفاده از آنزیم‌هایی با دمای بهینه گسترده بسیار مهم است. زیرا اگر نوسانات دمایی رخ دهد بازده آنزیم به‌طور محسوسی تغییر نخواهد کرد که این موضوع باعث حفظ عملکرد فرایند و صرفه‌جویی در انرژی می‌شود. در نتیجه گسترش دمای بهینه آنزیم تثبیت شده موجب انعطاف‌پذیری در طراحی فرایند، افزایش نرخ واکنش، تضمین ثبات فرایند، انطباق با شرایط محیطی، کاهش هزینه‌ها و گسترش دامنه کاربردهای فرایندهای بیوکاتالیستی می‌شود. معمولاً از لیپازها در دمای حدود ۵۰ درجه سانتی‌گراد در صنعت استفاده می‌شود، به همین دلیل در بسیاری از مطالعات اغلب از این دما به‌عنوان معیاری برای ارزیابی پایداری حرارتی لیپاز و همچنین ارزیابی روش پایداری آنزیم استفاده می‌شود [۳۰-۳۳]. ارزیابی پایداری دمایی آنزیم در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد نشان‌دهنده کارایی روش تثبیت آنزیم با لایه ارگانوسیلیکا بود. زیرا با افزایش زمان آنزیم تثبیت شده پایداری بهتری نسبت به آنزیم آزاد نشان داد. پتانسیل این رویکرد را برای بهبود عملکرد و طول عمر بیوکاتالیست‌ها در کاربرد های مختلف صنعتی و بیوتکنولوژیکی که نیازمند فعالیت در دمای بالا هستند، نشان می‌دهد.

پایداری شیمیایی آنزیم‌ها در صنایع مختلفی همچون داروسازی، سوخت‌های زیستی، لوازم آرایشی و به‌ویژه مواد شوینده بسیار مهم و کاربردی هست [۳۴]. این مزیت مهم باعث آسان شدن فرایند تولید، کاهش هزینه و تضمین کیفیت محصول می‌شود. همچنین، از مهم‌ترین کاربردهای لیپازها استفاده در صنعت شویندگی است. مواد شوینده حاوی سورفکتانت‌ها و گاه‌ا دنا توره‌هایی هستند که برای افزایش قدرت پاک‌کنندگی و بهبود فرایند شسته‌شو

قابل توجه دیالیز ماهیت زمان بر آن است. مشاهده شد که دستیابی مجدد به ساختار مناسب آنزیم لپاز استفاده شده از طریق دیالیز نیازمند زمانی طولانی مدت است که از محدودیت‌های مهم صنعت می‌باشد [۳۸].

علاوه بر این، علی‌رغم استفاده گسترده از دیالیز، ممکن است تاخوردگی مجدد ساختار پروتئین همیشه بازده بالایی نداشته باشد. نتایج ما نشان داد بازیابی فعالیت آنزیم به کمک روش دیالیز بسیار پایین بود. از دیگر محدودیت‌های قابل توجه دیالیز برای بازیابی ساختار پروتئین، تجمع پروتئین‌های آزاد در محیط و رسوب آنها است. که این مشکل برای پروتئین‌هایی با انحلال‌پذیری یا پایداری کم، بیشتر بروز می‌کند [۳۹،۴۰]، که بر نیاز معرفی راهبرد های جدید تاخوردگی مجدد پروتئین ها تاکید می‌کند. در روش به کار رفته در این مطالعه از خاصیت بازیابی آسان آنزیم تثبیت شده روی نانوذره سیلیکا استفاده شد. به طوری که می‌توان نمونه‌های تثبیت شده را با سانتریفیوژ به راحتی و در زمانی کوتاه از محلول حاوی مواد شیمیایی دناتورانت جدا کرد. وجود لایه محافظ نانوسیلیکا احتمالاً مانع آن‌فولدینگ و دناتوراسیون کامل آنزیم شده است و آنزیم‌ها با غیرطبیعی شدن جزئی و موقت در حضور دناتورانت‌ها کاهش فعالیت نشان دادند. بدین ترتیب که با به دام انداختن مولکول‌های آنزیم در حالت حد واسط فولدینگ اگرچه در مرحله دناتوراسیون با دترجنت‌ها و ترکیبات کائوتروپیک فعالیت آنزیم تا حد زیادی کاهش یافت، اما در بازگشت فعالیت، مولکول‌های آنزیم مجبور به بازیابی ساختار از فرم کاملاً غیرطبیعی (د نانوره) نبوده و وجود لایه محافظ برگشت حد واسط‌های ساختاری به کونفورماسیون طبیعی را تسهیل می‌کند. تثبیت آنزیم به همراه لایه محافظ می‌تواند با محدود کردن دسترسی آزاد مولکول‌های پروتئین به یکدیگر، به طور قابل توجهی از تجمع پروتئین در طول فرایند تاخوردگی مجدد جلوگیری کند و همچنین، بر

استفاده می‌شوند [۳۵،۳۶]. بنابراین، بررسی پایداری لپاز و حفظ فعالیت آنزیم در حضور این مواد شیمیایی با کاربرد عملی آن در شوینده‌ها ارتباط مستقیم دارد. به همین علت اثر مواد شیمیایی مثل اوره و SDS بر آنزیم تثبیت شده بررسی شد. یافته‌های ما نشان داد آنزیم‌های تثبیت شده پس از تیمار با مواد شیمیایی نیز پایداری بهتری نسبت به آنزیم آزاد نشان دادند که این موضوع نیز دلالت بر نقش محافظتی لایه ارگانوسیلیکا در حفظ ساختار آنزیم دارد. به طور کلی می‌توان پایداری آنزیم تثبیت شده پس از تیمار با SDS و اوره را به مقاوم بودن بستر سیلیکا در برابر تخریب توسط عوامل دناتور کننده مانند SDS و اوره نسبت داد. این مقاومت باعث به وجود آمدن اثر هم‌افزایی نانوذره سیلیکا و لایه محافظ می‌شود که از آزادسازی لپاز تثبیت شده، جلوگیری می‌کند و باعث به وجود آمدن نانو محیط مناسب برای فعالیت آنزیمی می‌شود [۲۲]. نتایج به دست آمده در این بخش مؤید تأثیر مثبت لایه محافظ بر پایداری پروتئین در حضور مواد شیمیایی بود. پیشنهاد می‌شود لایه محافظ طراحی شده نقش مؤثری در حفظ ساختار سه‌بعدی آنزیم در شرایط سخت دارد که با نتایج مطالعات گذشته مطابقت داشت [۳۲،۳۷].

تاخوردگی مجدد پروتئین یا آنزیم تثبیت شده توسط لایه محافظ از دیدگاه صنعتی بسیار ارزشمند است. بازیابی فعالیت آنزیم پس از قرار گرفتن در معرض شرایط دناتور، استفاده مجدد از آنزیم را امکان‌پذیر می‌کند، که در آن آسان و سریع بودن روش بازیابی فعالیت آنزیمی نیز ضروری است. در این مطالعه نتایج حاصل از تاخوردگی توسط روش دیالیز و راهبردی نوین مبتنی بر لایه محافظ، ارزیابی شد.

در حالی که دیالیز تکنیکی است که به طور گسترده برای تاخوردگی مجدد ساختار پروتئین استفاده می‌شود، اما یافته‌های ما و همچنین مطالعات قبلی چندین محدودیت مرتبط با این رویکرد را برجسته می‌کند. یکی از اشکالات

بهره‌وری بیشتری در فرایندهای بیوتکنولوژیکی به ارمغان آورد.

#### تشکر و قدردانی

نویسندگان از دانشگاه گیلان برای فراهم نمودن امکانات آزمایشگاهی و حمایت مالی از این پژوهش کمال تشکر را دارند.

#### تاییدیه اخلاقی

پژوهش حاضر توسط همه نویسندگان تأیید شده است. همچنین، نتایج مندرج در این مقاله از صحت و اصالت علمی برخوردار هستند.

#### تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

#### سهم نویسندگان

علی فروتن کلورزی (نویسنده اول)، پژوهشگر اصلی / ایده پرداز / تحلیلگر آماری / نگارنده مقدمه و بحث ( ۵۰ درصد)؛ سیده شیرین شاهنگیان (نویسنده دوم)، ایده‌پرداز / تحلیلگر آماری / نگارنده بحث و روش‌شناسی ( ۵۰ درصد).

#### ۶- منابع

- [1] Gupta R, Kumari A, Syal P, Singh Y. 2015. Progress in lipid research 57:40-54
- [2] Contesini FJ, Calzado F, Madeira J, Rubio MV, Zubieta MP, et al. 2017. Fungal Metabolites. Reference Series in Phytochemistry:639-66
- [3] Maghraby YR, El-Shabasy RM, Ibrahim AH, Azzazy HME-S. 2023. ACS omega 8:5184-96
- [4] Franssen MC, Steunenberg P, Scott EL, Zuilhof H, Sanders JP. 2013. Chemical Society Reviews 42:6491-533
- [5] Bernal C, Rodriguez K, Martinez R. 2018. Biotechnology Advances 36:1470-80
- [6] Rodríguez-Núñez K, Bernal C, Martínez R. 2021. International Journal of Biological Macromolecules 170:61-70

تاخوردگی مجدد پروتئین نیز تأثیر مثبت بگذارد [۴۱]. نتایج نشان داد لایه ارگانوسیلیکا که آنزیم را احاطه کرده است، همانطور که بر پایداری آنزیم تأثیر می‌گذارد، موجب بازیابی ساختار سه‌بعدی آنزیم در زمان کوتاه و با بازده بالا پس از دناتوراسیون می‌شود.

#### ۵- نتیجه‌گیری

در این مطالعه، تثبیت آنزیم لپاز بر روی نانوذرات سیلیکا با استفاده از روشی جدید ارائه شد. نتایج نشان داد فرایند تثبیت بازدهی قابل توجهی داشته و لایه ارگانوسیلیکا اثر حفاظتی مؤثری برای آنزیم فراهم کرده است. ضخامت لایه محافظ نقش مهمی در برقراری تعادل میان حفاظت و فعالیت آنزیم ایفا می‌کند، به طوری که در ضخامت‌های بهینه‌شده علاوه بر افزایش پایداری، افزایش فعالیت کاتالیتیک در مقایسه با آنزیم تثبیت شده بدون لایه ارگانوسیلیکا مشاهده شد. آنزیم تثبیت شده پایداری حرارتی بهتری در مقایسه با آنزیم آزاد نشان داد و پتانسیل آن برای کاربردهای صنعتی تحت شرایط نوسان دمایی قابل قبول بود. همچنین، لایه ارگانوسیلیکا موجب پایداری آنزیم در حضور دناتورانت‌هایی مانند SDS و اوره شد که این موضوع بر نقش حفاظتی آن تأکید بیشتری می‌کند. افزایش پایداری را می‌توان به برهمکنش قوی بین لایه محافظ و پروتئین نسبت داد که اثرات مضر نوسانات دما و دناتورانت‌های شیمیایی را کاهش می‌دهد. در آزمایشی دیگر برای غلبه بر محدودیت‌های ناشی از روش دیالیز، از روشی جدید و کارآمد برای تاخوردگی مجدد آنزیم استفاده شد. نتایج نشان داد وجود نانو لایه سیلیکا می‌تواند از تجمع پروتئین در طول فرایند تاخوردگی مجدد جلوگیری کند و بازیابی ساختار طبیعی پروتئین را تسهیل کند. به طور کلی، یافته‌های این مطالعه نشان داد تثبیت آنزیم به همراه لایه محافظ می‌تواند اثرات مثبتی بر پایداری و بازیابی آنزیم در شرایط سخت داشته باشد و

- [24] Briand ML, Gebleux R, Richina F, Correro MR, Grether Y, et al. 2020. *Chemical communications* 56:5170-3
- [25] Siódmiak T, Duleba J, Haraldsson GG, Siódmiak J, Marszałł MP. 2023. *Catalysts* 13:887
- [26] Hamdan SH, Maiangwa J, Ali MSM, Normi YM, Sabri S, Leow TC. 2021. *Applied microbiology and biotechnology*:1-26
- [27] Ozmen EY, Sezgin M, Yilmaz M. 2009. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 57:109-14
- [28] Arica MY. 2000. *Journal of applied polymer science* 77:2000-8
- [29] Arica MY, Bayramoğlu G. 2004. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 27:255-65
- [30] Niu W-N, Li Z-P, Zhang D-W, Yu M-R, Tan T-W. 2006. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 43:33-9
- [31] Matsumoto M, Ohashi K. 2003. *Biochemical Engineering Journal* 14:75-7
- [32] Nazemi SA, Olesińska M, Pezzella C, Varriale S, Lin C-W, et al. 2021. *Chemical Communications* 57:11960-3
- [33] Sood A, Kaur M, Gupta R. 2023. *Current Biotechnology* 12:25-36
- [34] Guerrand D. 2017. *OCL Oilseeds and fats crops and lipids* 24:D403
- [35] Sahoo RK, Das A, Gaur M, Sahu A, Sahoo S, et al. 2020. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* 50:578-84
- [36] Al-Ghanayem AA, Joseph B, Alhussaini MS, Ramteke PW. 2022. *Microbial extremozymes*:223-30
- [37] Cumbo A, Lorber B, Corvini PF-X, Meier W, Shahgaldian P. 2013. *Nature communications* 4:1503
- [38] Kato A, Ohashi H. 2021. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 60:10076-82
- [39] Odunuga O, Tovar CN. 2020. *The FASEB Journal* 34:1-
- [40] Yamaguchi S, Yamamoto E, Mannen T, Nagamune T, Nagamune T. 2013. *Biotechnology journal* 8:17-31
- [41] Attique SA, Hussain N, Bilal M, Iqbal HM. 2023. In *Biocatalyst Immobilization*:37-54: Elsevier. Number of 37-54 pp.
- [7] Dragomirescu M, Radulov I, Berbecea A, Hotea I, Crista L, et al. 2022. *Journal of Pharmaceutical Negative Results*:125-34
- [8] Antony C, Ghodke PK, Thiyagarajan S. 2022. In *Enzymes in the Valorization of Waste*:97-128: CRC Press. Number of 97-128 pp.
- [9] Sun T, Dong Z, Wang J, Huang F-H, Zheng M-M. 2020. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 8:17280-90
- [10] Correro MR, Takacs M, Sykora S, Corvini PF-X, Shahgaldian P. 2016. *RSC advances* 6:89966-71
- [11] Correro MR, Moridi N, Schützinger H, Sykora S, Ammann EM, et al. 2016. *Angewandte Chemie* 128:6393-7
- [12] Giunta CI, Cea-Rama I, Alonso S, Briand ML, Bargiela R, et al. 2020. *ACS nano* 14:17652-64
- [13] Stöber W, Fink A, Bohn E. 1968. *Journal of colloid and interface science* 26:62-9
- [14] Ghasemi S, Heidary M, Faramarzi MA, Habibi Z. 2014. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 100:121-8
- [15] Ismail AR, Baek K-H. 2020. *International Journal of Biological Macromolecules* 163:1624-9
- [16] Shuai W, Das RK, Naghdi M, Brar SK, Verma M. 2017. *Biotechnology and applied biochemistry* 64:496-508
- [17] Popat A, Hartono SB, Stahr F, Liu J, Qiao SZ, Lu GQM. 2011. *Nanoscale* 3:2801-18
- [18] Breger JC, Vranish JN, Oh E, Stewart MH, Susumu K, et al. 2023. *Nature Communications* 14:1757
- [19] Lin N, Gao L, Chen Z, Zhu JH. 2011. *New Journal of Chemistry* 35:1867-75
- [20] Ayub J, Saeed MU, Hussain N, Zulfiqar I, Mehmood T, et al. 2023. *Topics in Catalysis* 66:625-48
- [21] Briand ML, Bikaki M, Puorger C, Corvini PF-X, Shahgaldian P. 2021. *RSC advances* 11:810-6
- [22] Cui J, Sun B, Lin T, Feng Y, Jia S. 2018. *International journal of biological macromolecules* 117:673-82
- [23] Shi J, Tian Y, Liu H, Yang D, Zhang S, et al. 2017. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 56:10615-22

# Microenvironmental engineering of lipase enzyme and effect of silica nanolayer on stabilization and refolding of enzyme

Ali Foroutan Kalourazi<sup>1</sup>, S. Shirin Shahangian<sup>2\*</sup>

1. MSc, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.
2. PhD, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

shahangian@guilan.ac.ir

Receipt: 2024/04/27

Accepted: 2024/08/24

## Abstract

Researchers are currently directing their efforts toward developing new enzyme stabilization and enhancement strategies to broaden their application in various industries. This study utilized a unified platform to stabilize and safeguard proteins in industrial settings. Despite the wide-ranging industrial applications of lipases, their utility in industrial processes is limited by their susceptibility to degradation under harsh environmental conditions. In our study, we used a dual-purpose strategy that involved both enzyme stabilization and the shielding of an organosilica protective layer. After expressing and purifying the recombinant lipase enzyme, we immobilized it onto silica nanoparticles and shielded it with an organosilica nanolayer to protect the enzyme. We meticulously examined the optimal thickness of the protective layer and its influence on enzyme stabilization against environmental stressors. Our research findings demonstrate that the immobilized enzyme exhibited a remarkable level of stability compared to its free enzyme when subjected to various factors, such as fluctuations in temperature and exposure to chemical agents. Furthermore, the immobilized samples displayed optimal activity across a broad range of temperatures, highlighting this approach's adaptability and efficacy. Notably, the organosilica layer significantly bolstered the reactivity recovery of denatured proteins with SDS and urea, highlighting the versatile applications of this method. These findings indicated that our present platform has great potential to improve the efficiency and stability of industrial enzymes against various environmental challenges.

**Keywords:** lipase, Immobilization, Shielding, Protein stability, silica