مهندسی ریزمحیط آنزیم لیپاز و اثر نانولایه سیلیکا بر پایدارسازی و تاخوردگی مجدد آنزیم

علی فروتن‌کلورزی[1]، سیده شیرین شاهنگیان[2*]

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 ٤١٩٩٦١٣٧٧٦، رشت، ایران
shahangian@guilan.ac.ir

دریافت: ۱٤۰۳/۰۲/۰۸ پذیرش: ۱٤۰۳/۰٦/۰۳

چکیده

امروزه پژوهشگران بر راهبردهای جدید پایدارسازی 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 پایدارسازی 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 برروی 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 پایدارسازی آنزیم در مقابله با استرس‌های محیطی مطالعه شد. آنزیم لایه‌گذاری شده پایداری قابل‌توجهی 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، پایدارسازی پروتئین، سیلیکا

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-30]

۱-مقدمه

لیپازها د ستهای پرکاربرد و ارز شمند از آنزیمهای صنعتی میباشـد که قابلیت هیدرولیز پیوندهای اسـتری در لیپیدها را دار ند و از آنها میتوان در صـــنایع مختلف همچون فراوری مواد غذایی، دارو سازی، صنعت شوینده و تولید سوختهای طبیعی ا ستفاده کرد [۲،۱]. با اینحال، بیشتر این آنزیمهای طبیعی درطیف وسیعی از pH و دما، و یا در حضور حلالهای آلی و سورفکتانتها غیرفعال می شوند. علاوه بر این، بازیابی آنزیمها پس از انجام واکنش آنزیمی دشـوار اسـت و جلوگیری از آلودگی محصـول مسـتلزم هزینههای جداسـازی و خالصسـازی بالایی اسـت. این دلایل باعث ایجاد محدودیت برای فعالیت گسـتردهتر آنزیمها در فرایندهای صنعتی شده است [٤،٣].

یکی از راهکارهای معمول برای مقابله با این چالشها و افزایش توانایی اسـتفاده لیپازها در محیطهای صـنعتی، اسـتفاده از تکنیکهای تثبیت آنزیم میباشـد. تثبیت آنزیم شـامل اتصـال آنزیمها به بسـترهای جامد اسـت که باعث افزایش پایداری و کارایی آنها در واکنشهای شـیمیایی میشـود. طی سـالهای گذشـته، پژوهشـگران راهبردهای مختلفی از جمله تثبیت آنزیم را توسعه دادهاند که هر کدام از آنها کاربرد و مزیت مشخصی را برای هدفی خاص ارائه میدهند [٥،٦].

اتصـال آنزیم به بسـتر جامد از پرکاربردترین روشهای تثبیت آنزیم میباشـد که شـرایط فوق العادهای را برای کاربردهای آزمایشگاهی و صنعتی از نظر پایداری، حفظ و بازیافت مواد بیوکاتالیسـتی فراهم میکند. این روش آنزیم را قادر می سازد تا فعالیت کاتالیزی و ساختار طبیعی خود را در شـرایط 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 ا ستفاده شده ا ست. اما مطالعات قبلی نشان داده ا ست که سیلیکا بهدلیل واکنشپذیری گروههای سیلانول سطحی، مقاومت شـیمیایی، حرارتی و خواص ضـدباکتریایی بالا و عدم تورم یکی از بهترین بسـترها برای تثبیت آنزیمها میباشـد. از مزایای دیگر نانوذرات سـیلیکا می توان به اتصـال کارامد بهدلیل سـطح ویژه بالا و ترکیب ثابت آن و همچنین مقاومت زیاد در برابر حلالهای آلی اشـاره کرد [۹].

اگرچه در سـالهای گذشـته روشهای تثبیت و حفاظتی مختلفی برای آنزیمها گزارش شـده اسـت، اما بسـیاری از این روش ها دارای محدودیت هایی می باشـند. اخیراً Correro و همکاران یک راهبرد شـیمیایی برای تثبیت و محافظت کامل از آنزیمها گزارش کردهاند که در آن ابتدا آنزیم تو سط پیوند کووالانسی به نانوذرات سیلیکا متصل می شود و سپس، یک لایه ارگانو سیلیکا نرم اطراف آن را احاطه میکند [۱۰]. بررسـی بیشـتر خواص نانومکانیکی لایه ارگانو سیلیکا با میکرو سکوپ نیروی اتمی (AFM)، نشـان داده اسـت که نرم شـدن این لایه محافظ پس از نگهداری در دمای اتاق به مدت چند ساعت اتفاق میافتد. تثبیت اولیه لایه ارگانو سیلیکا تو سط پیوندهای هیدروژنی و فعـل و انفعـالات یونی بین سـطح پروتئین و پلی سیلوکسانهای[1] کوتاه تولید شده در طی واکنش تراکمی میباشـد، که این موضـوع باعث تولید لایه ارگانوسـیلکا میشود. سنتز این لایه ارگانو سیلیکا با اتصال کووالانسی این پلیسـیلوکسـانهای کوتاه با یکدیگر به تشـکیل پیوندهای سیلوکسان نسبت داده شد، که منجر به افزایش پایداری مکانیکی این لایه محافظ میشـود. این لایه نرم از آنزیم در مقابل مجموعهای از تنشهای دناتورهکننده محافظت میکند تا فعالیت بیوکاتالیستی خود را حفظ کند [۱۱]. با اینحال، ضـخامت این لایه برای فعالیت آنزیم

[1] polysiloxanes

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-30]

بسیار مهم است. به‌طوری 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. به‌طوری 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 به‌عنوان یک راهبرد ترکیبی برای بهبود فعالیت و پایداری آنزیم لیپاز استفاده شد. تثبیت آنزیم لیپاز بر روی نانوذرات سیلیکا به‌عنوان بستر جامد، شرایط مناسبی را برای مراحل بعدی یعنی استفاده از لایه ارگانوسیلیکا به‌عنوان 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 می شود، 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 به‌عنوان روش ترکیبی تثبیت کننده آنزیم بررسی شد.

۲-مواد و روش‌ها

۲-۱ مواد

تترا اتیل ارتوسیلیکات[2] (TEOS, ≥99%)، (۳-آمینوپروپیل)تری اتوکسی سیلان[3] (APTES, ≥98%)، ۳-(تری اتوکسی سیلیل)-پروپیلی سوسیانات[4] (۹۵ درصد)، تریس هیدروکلراید (Tris-HCl, ≥98%)، آمونیوم هیدروکسید (گرید ACS، ۲۸-۳۰ درصد)، اتانول (گرید ACS، خشک)، ۲-(N-morpholino) اتان سولفونیک اسید مونوهیدرات[5] (MES, ≥99.0%) و بی‌کربنات آمونیوم (≥۹۸٪) از Sigma- Aldrich خریداری شد. دی متیل فرمامید (DMF، خشک، ۹۹,۹ درصد) و کیت سنجش پروتئین BCA از Thermo Fisher Scientific خریداری شد. ٤-نیتروفنیل بوتیرات[6] (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. ٤۰ میلی‌لیتر آمونیوم هیدروکسید (۳۰-۲۸ درصد) و ۳٤۵ 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 ٤ گرم نانوذره سیلیکا در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد ذخیره شد.

۲-۳ بیان و تخلیص آنزیم لیپاز

در این مطالعه، از آنزیم لیپاز از باکتری *Bacillus* (WP_034624255.1) به‌عنوان آنزیم مدل استفاده شد. باکتری‌های حاوی پلاسمید نوترکیب بیانی pET-45b(+) به ۵ میلی‌لیتر محیط کشت LB حاوی آمپی‌سیلین ۱۰۰ میکرو گرم بر میلی‌لیتر تلقیح و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با هوادهی مطلوب به‌صورت شبانه انکوبه شد. سپس، ۲ میلی‌لیتر باکتری رشد یافته را به ۲۰۰

---

[2] Tetraethyl orthosilicate
[3] (3-aminopropyl) triethoxysilane
[4] 3-(triethoxysilyl)-propylisocyanate
[5] 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid monohydrate
[6] 4-Nitrophenylbutyrate

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-30]

میلی‌لیتر محیط‌کشت LB حاوی آمپی‌سیلین ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر انتقال داده و تا افزایش OD_{600} به حدود ۰/٦ 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 ٥٦٢ نانومتر و با استفاده از آلبومین سرم گاوی به‌عنوان استاندارد تعیین شد.

۲-٤ تثبیت آنزیم

سوسپانسیون $SNP\text{-}NH_2$ (۳/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، ۱۰ میلی‌لیتر) با ٤۰ میکرولیتر گلوتارآلدئید به مدت ٤۰ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد واکنش داده شد. محصول واکنش با سرعت ٤۰۰۰ 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 $MgCl_2$) معلق شد. در مرحله بعد سوسپانسیون SNPهای اصلاح شده با گلوتارآلدئید (۳/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت با لیپاز انتخاب شده تحت هم زدن مدوام، واکنش داد. آنزیم‌های تثبیت شده توسط سانتریفیوژ با سرعت ٤۰۰۰ 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 بی‌کربنات‌آمونیوم (۱۰ میلی‌مولار، ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$) بار دیگر حل شد.

۲-۵ لایه‌گذاری ارگانو سیلیکا

سوسپانسیون آنزیمی تثبیت شده (۹۰۰ میکرولیتر) با TEOS[7] (۲ میکرولیتر) واکنش داده و در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت با هم‌زدن ٤۰۰ دور در دقیقه انکوبه شد. پس از آن، APTES[8] (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.

۲-٦ میکروسکوپ الکترونی روبشی[9]

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. میکروگراف های الکترونی ثانویه با استفاده از حالت InLens با ولتاژ شتاب دهنده ۱۰ کیلو ولت 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 ٤۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای واکنش آنزیمی از مخلوط حاوی لیپاز تثبیت شده (۰/۳ میلی‌گرم) و ۱ میلی مولار p-NPB در بافر Tris-HCl (۵۰ میلی‌مولار، pH ۸/۵) استفاده می‌شود [١٤].

۲-۸ سنجش دمای بهینه فعالیت آنزیم

بافر Tris-HCl (۵۰ میلی مولار، 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.

[7] Tetraethyl orthosilicate
[8] (3-aminopropyl) triethoxysilane
[9] Scanning Electron Microscope

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-30]

۲-۹ پایداری آنزیم در دمای پرکاربرد صنعت

٤۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های تثبیت شــده و آنزیم آزاد در دمای ۵۰ درجه ســانتی‌گراد به مدت ٦۰ دقیقه با ســرعت شـیکر ٦۵۰ در دقیقه انکوبه شـد. 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 ســـانتی‌گراد طبق روشـــی که در بالا توضیح داده شد، ارزیابی شدند.

۲-۱۰ پایداری آنزیم در حضور مواد شیمیایی

ابتدا نمونه‌های تثبیت شــده با ۱ درصــد SDS و اوره ٦ مولار به مدت ۲۰ دقیقه تحت هم زدن با دور ٦۵۰ در دقیقه مخلوط شــد. ســپس، 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 شــد. پس از آن، فعالیت هیدرولیتیک در ۳۰ درجه ســـانتی‌گراد ارزیابی شد.

۲-۱۱ تاخوردگی مجدد

آنزیم آزاد در ابتدا با ۱ درصد SDS و اوره ٦ مولار دناتوره شـــدند. در مرحله بعد برای تاخوردگی مجددآنزیم آزاد ۱ میلی‌لیتر از آن بـا ۱۰۰ میلی‌لیتر بـافر Tris-HCl (۵۰ میلی‌مولار، pH معادل ۸) دیالیز شـــد. بافر دیالیز هر دو ساعت (سه بار) برای اطمینان از حذف کامل SDS و اوره تعویض شد. فرایند تاکردن مجدد با دیالیز به‌صورت شبانه انجام شد.

آنزیم تثبیت شده پس از دناتوره شدن با ۱در صد SDS و اوره ٦ مولار، به مدت ۵ دقیقه در ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس، رسوب حاصل سه مرتبه با بافر Tris (۵۰ میلی مولار، pH معادل ۸) شستشو و معلق شد. در نهایت، فعالیت نمونه‌های تا شــده با نمونه‌های شــاهد مقایسه شد.

۳- نتایج

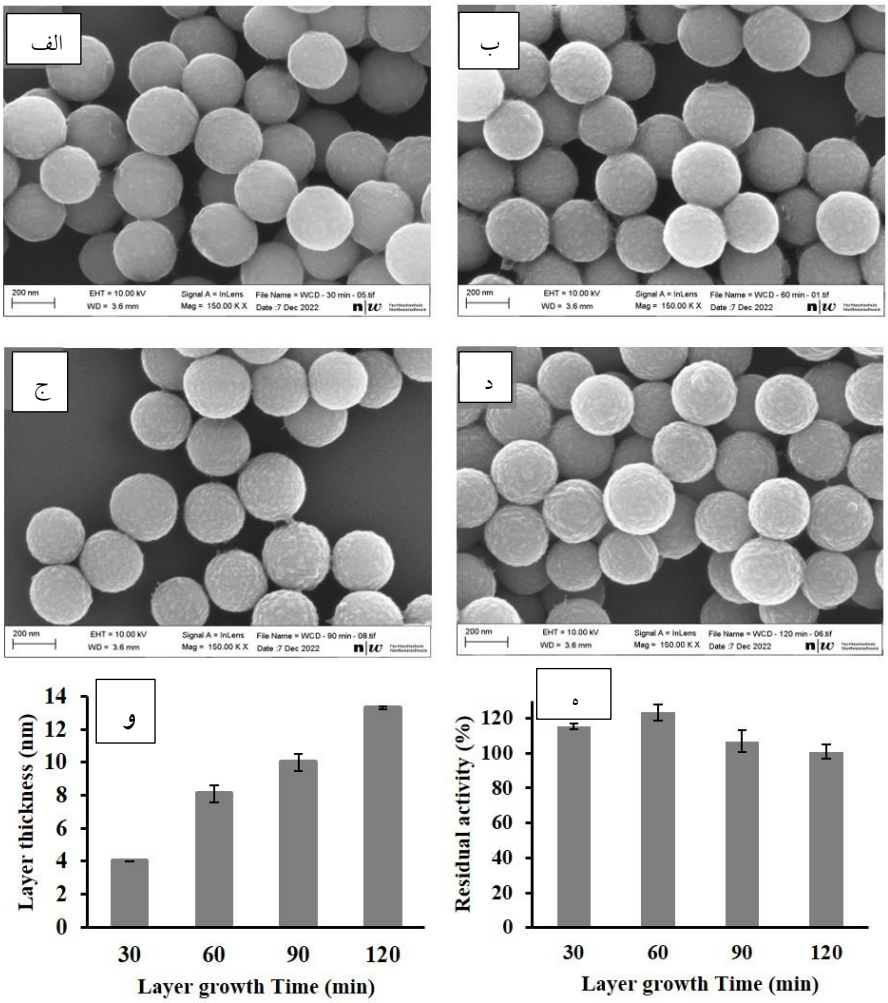
تثبیت آنزیم لیپاز در سطح نانوذرات عامل‌دار شده با آمین (میانگین قطر ۲۰ ± ۲۹۰ نانومتر) با اسـتفاده از روشـی که قبلاً گزارش شــده، انجام شــد. نانوذرات با مخلوطی از TEOS و APTES واکنش دادند، که منجر به تثبیت آنزیم برروی نانوذرات سـیلیکا شـد. میزان بازدهی فرایند تثبیت توســط تســت BCA و پس از گذشــت ۳۰ دقیقه مورد ســـنجش قرار گرفت که نشـــان داد ۸۱ درصـــد 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 روبشـی (SEM) مطالعه شـدند. آنالیز SEM نشـان داد با افزایش زمان، ضـخامت لایه ارگانوسـیلیکا افزایش می‌یابد (شکل ۱، الف–د).

فعالیت بیوکاتالیســتی آنزیم‌های تثبیت شــده همراه با لایه ارگانوسیلیکا ضمن سنجش هیدرولیز p-NPB اندازه‌گیری و فعالیت آنزیم تثبیت شده بدون لایه ۱۰۰ در صد در نظر گرفته و فعالیت سـایر نمونه‌ها با آن مقایســه شـد. فعالیت آنزیم با ضـــخامت لایه محافظ ٤ 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 ۱۰٦ 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 ٤۰ درجه سانتی‌گراد بود و بیش از ۸۰ درصـــد فعالیت را در محدوده دمایی وســیع ٤۵–۲۵ درجه سـانتی‌گراد حفظ کرد. آنزیم آزاد، فعالیت بهینه خود را در دمای ۳۰ درجه ســـانتی‌گراد نشـــان داد و تنها در محدوده ۳۵–۲۵ درجه ســـانتی‌گراد مقادیر فعالیت بیش از ۸۰ در صد از خود نشان داد. با افزایش بیشتر دما، فعالیت آنزیمی به شـــدت کاهش یافت، به طوری‌که در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد، آنزیم آزاد بیش از ٦۰ در صد از فعالیت خود را از دست داد (شکل ۲، الف).

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-30]

زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس ـــ

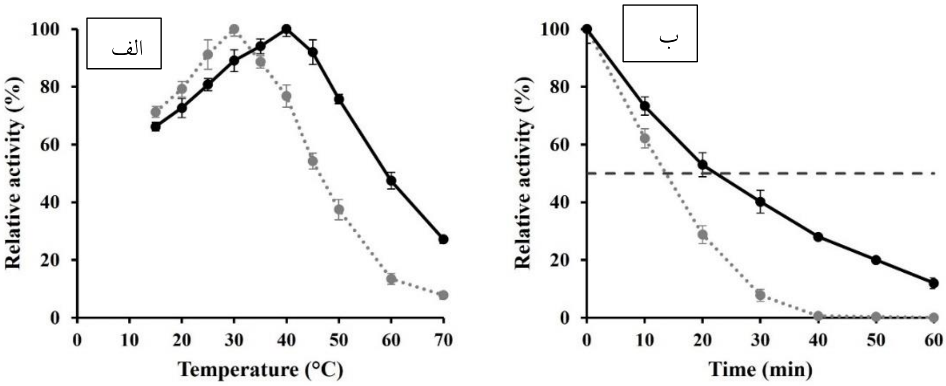


شکل۱ میکروگراف‌های SEM از نانوذرات حاوی لایه ارگانوسیلیکا پس از (A) ۳۰ دقیقه، (B) ٦۰ دقیقه، (C) ۹۰ دقیقه و (D) ۱۲۰ دقیقه از شروع واکنش رشد لایه به‌ترتیب با ضخامت لایه ٤/۰، ۸/۱، ۱۰ و ۱۳/۳ نانومتر، نوارهای مقیاس نشان‌دهنده ۳۰۰ نانومتر هستند. (E) تغییر ضخامت لایه در زمان‌های مختلف رشد لایه. میانگین حداقل 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.

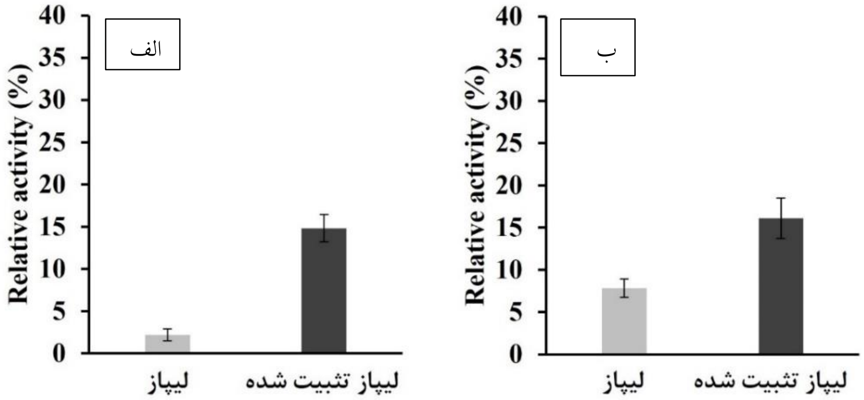
برای بررســـی پایداری دمایی نمونه‌ها هر کدام از آنها در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ٦۰ دقیقه انکوبه شدند. فعالیت آنزیم قبل از تیمار دمایی ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد. فعالیت آنزیم آزاد پس از گذشت ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه به ٦۲/۱، ۲۸/۸ و ۷/۸ درصـــد کاهش یافت. آنزیم تثبیت شـــده پایداری دمایی قابل‌توجهی نشـــان داد، به‌طوری که فعالیت آن در زمان‌های ذکر شده ۷۳، ۵۳ و ٤۰ درصد بود.

همچنین، آنزیم آزاد پس از گذ شت ٤۰ دقیقه فعالیت خود را به‌طور کامل از دست داد، اما نمونه تثبیت شده در همین مدت زمان حدود ۲۸ درصـــد فعالیت نشـــان داد. مقایســـه فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده نشان داد پس از گذ شت ۳۰ دقیقه فعالیت آنزیم تثبیت شـــده بیش از ۵ برابر آنزیم آزاد می‌باشد (شکل۲، ب).

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-30]



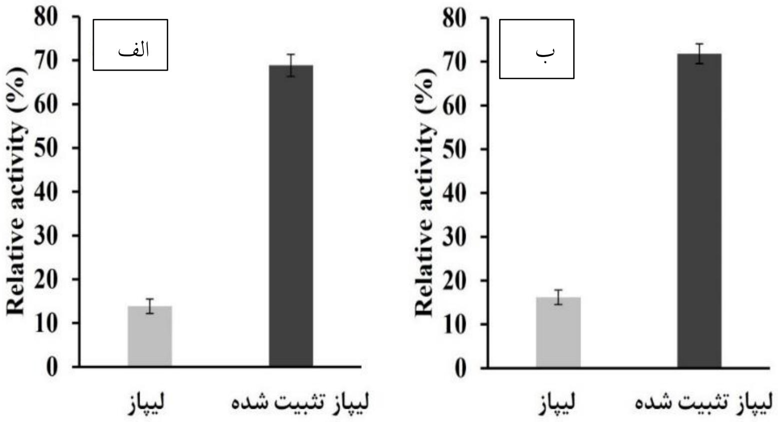
شکل ۲ (الف) نمودار اثر دما بر فعالیت آنزیم تثبیت شده (مشکی) و آنزیم آزاد (نقطه‌چین طوسی). (ب) فعالیت آنزیمی در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد در طول ۶۰ دقیقه انکوباسیون برای آنزیم تثبیت شده (مشکی) و آنزیم آزاد (نقطه‌چین طوسی) اندازه‌گیری شد.



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

نتایج امیداورکننده پایداری حرارتی، ما را بر آن داشت تا اثر تثبیت لا یه محافظ را در مواجهه با تنش شیمیایی برر سی کنیم. ابتدا تأثیر سدیم دود سیل سولفات (SDS) به‌عنوان سورفکتانتی آنیونی بر پایداری آنزیم برر سی شد. نمونه‌های مورد مطالعه، قبل از بررسی فعالیت آنزیمی به مدت ۲۰ دقیقه در حضور SDS (۱ درصد) انکوبه شدند. برا ساس شکل۳، الف آنزیم آزاد تقریبا کل فعالیت خود را از دست داد، اما آنزیم تثبیت شده تقریبا ۱۵ درصد از فعالیت اولیه خود را حفظ کرد. در مرحله بعد، اثر دناتوره کنندگی اوره روی آنزیم آزاد و تثبیت شده پس از ۲۰ دقیقه انکوبا سیون با محلول اوره (٦ M) مطالعه شد. آنزیم تثبیت شده قادر به حفظ ۱۷ درصد فعالیت پس از تیمار بود، در حالی‌که آنزیم آزاد تنها می‌تواند ۸ درصد از فعالیت اولیه خود را حفظ کند (شکل۳، ب).

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-30]



شکل ٤ فعالیت آنزیمی بعد از تاخوردگی مجدد برای آنزیم آزاد (طوسی) و آنزیم تثبیت شده (مشکی) اندازه گیری شد. (الف) بعد از دناتوره شدن با SDS. (ب) بعد از دناتوره شدن با اوره.

در مرحله بعد، امکان بازیابی عملکرد آنزیم پس از تیمار با مواد شیمیایی مطالعه شد. بدین‌منظور، 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 نمونه ها پس از تیمار SDS با در شکل٤، الف نشان داد در حالی‌که آنزیم آزاد تنها ۱۳ درصد از فعالیت اولیه خود را بازیابی کرد، آنزیم تثبیت شده ٦٨ درصد از فعالیت اولیه خود را به‌دست 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 ۱٦ درصد از فعالیت اولیه خود را نشان داد (شکل٤، ب).

٤- 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 زیستی می‌باشد. اما استفاده از آن‌ها در فرایندهای صنعتی در محیط های 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 طولانی‌مدت 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 [۱٥،۱٦].

در این پژوهش تلاش شد با استفاده از این روش جدید تثبیت و محافظت، لیپازی پایدار با کارآیی 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

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-30]

اتصـال بیشـتر منجر به اتصـال کارآمد آنزیم‌ها می‌شـود. قابلیت تنظیم شـیمی سـطح این نانوذرات، روش های مختلف تثبیت مانند جذب[10]، به دام انداختن[11]، اتصـال عرضـی[12] و کووالانسـی را ممکن می‌سـازد و این تطبیق پذیری امکان بهینه‌سازی تثبیت آنزیم‌های مختلف را فراهم می‌کند [۱۷]. در مطالعه حاضـر برای تثبیت آنزیم از روش اتصـال عرضـی اسـتفاده شـد. سـپس، مولکول‌های آنزیم توسـط نانولایه سـیلیکا انکپسـوله شـدند. در اغلب موارد تثبیت آنزیم ها اگر چه افزایش پا یداری را بهمراه دارد، فعالیت آنزیم پس از تثبیت کاهش می یابد. لیپاز مورد مطالعه پس از تثبیت نسبت به آنزیم آزاد ۲۰ درصد کاهش فعالیت نشـان داد. در حالی‌که شـیلدینگ توسـط نانولایه فعالیت آنزیم را تقریبا به میزان اولیه بازگرداند و بدین ترتیب با حفظ فعالیت آنزیم افزایش پایداری ارزیابی شد. زیست سازگار، غیر سمی و بی‌اثر بودن این نانوذرات آنها را به‌عنوان گزینه منا سبی برای صنایع زی ست پز شکی و غذایی نیز مطرح می‌کند. پایدارسازی آنزیم با تثبیت بر این نانوذرات در برابر شـرایط سـخت مانند pH شـدید، دما و حلال‌های آلی گزارش شده‌است که قابلیت استفاده مجدد از آنزیم را افزایش و هزینه‌های مرتبط با جایگزینی آنزیم را کاهش می‌دهد [۱۱]. اسـتفاده از نانولایه ارگانوسـیلیکا بهمراه تثبیت نیز عملا برای آنزیم در مقابل اسـترس‌های مختلف محیطی، به‌ویژه در مقابل ترکیبات شـیمیایی و دناتورانت‌ها سـدی حفاظتی فراهم می‌کند. همچنین، این نانولایه ریزمحیطی فراهم می‌کند که در مواردی مانع مهار سـوبسـترایی و مهار توسـط محصـول می‌شـود [۱۸]. ماتریکس های پشـتیبان به‌عنوان یک نانو محیط محافظ نوسـانات دما، pH، یا تغییرات حلال را تعدیل و موجب حفظ سـاختار و ممانعت از دناتوراسـیون آنزیم می‌شـوند [۱۹،۲۰]. در صـنایع مختلف مواجهه آنزیم‌ها با پروتئازها اجتناب‌ناپذیر اسـت. لیپازها نیز در صـنایع غذایی، لبنی، فراوری گوشت و شویندگی از این مساله مستثنی نیستند. آنزیم‌های آزاد اغلب در برابر تخریب پروتئولیتیک آسـیب پذیر هستند. در خصوص آنزیم‌های تثبیت و شیلد شده، این موانع دسـترسـی به مولکول های آنزیم را محدود می کنند و باعث افزایش پایداری آنزیم و نیمه‌عمر می‌شـود [۲۱،۲۲]. تثبیت امکان بازیابی کارآمد آنزیم را فراهم می کند که می‌توان در چرخه‌های چندین‌باره واکنش به‌ویژه در فرایندهای صنعتی از آنزیم‌ها استفاده کرد. فرایند تثبیت مانع تجمع آنزیم‌ها نیز می‌شـود، پدیده‌ای که در شـرایط محلول بسیار رخ می‌دهد و منجر به از دست رفتن فعالیت می‌شـود. نانولایه ها نیز علاوه بر اینکه در برخی موارد ذکرشـده نقش ایفا می‌کنند، به‌عنوان مانعی فیزیکی از آنزیم ها در برابر تنش های محیطی محافظت و به حفظ سـاختار بومی آنزیم کمک می‌کنند. با ایجاد یک پوشـش پایدار و منسجم در اطراف سطح تثبیت آنزیم، از لیچینگ[13] آنزیم جلوگیری می‌کنند، بدین‌ترتیب انتشـار آنزیم را کاهش و پایداری را افزایش می‌دهند [۲۳].

ضـخامت لایه ارگانوسـیلیکا اثر بسـزایی بر پایداری و فعالیت آنزیم دارد و تنظیم آن مرحله‌ای حسـاس در این روش پایدارسازی است. اگرچه حدی از ضخامت نانولایه برای کارامدی آن به‌عنوان سد حفاظتی ضرورت دارد، اما با افزایش ضـخامت، دسـترسـی آنزیم به سـوبسـترا، کونفورماسـیون طبیعی و انعطاف‌پذیری سـاختار آنزیم نیز شـدیدا تحت تاثیر قرار می‌گیرد و می‌تواند منجر به کاهش فعالیت شود که بر اهمیت تنظیم ظریف ضخامت نانولایه تاکید دارد [۲٤]. به‌طور کلی می توان گفت نتایج به‌دست آمده در این آزمایش با نتایج مطالعات پیشـین بر روی آنزیم‌های β-گالاکتوزیداز و استراز مطابقت دارد [۱۰،۱۲]. پایداری حرارتی از ویژگی‌های مهم آنزیم‌های صـنعتی می‌باشـد که برای ارزیابی ارزش اقتصـادی آنها علاوه بر سنجش میزان فعالیت کاتالیتیکی، بررسی می شود. لیپازها

[10] adsorption
[11] entrapment
[12] cross-linking
[13] Leaching

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-30]

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 کارامد باشند [۲۵،۲۶].

آنزیم تثبیت شده برای فعالیت بیوکاتالیستی در دماهای مختلف واکنش از ۲۰ تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد بررسی شد (شکل۲، الف). طبق این مطالعه، دمای بهینه برای آنزیم آزاد حدود ۳۰ درجه سانتی‌گراد بود. با این‌حال، هنگامی که آنزیم تثبیت شد، دمای بهینه به حدود ٤۰ 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 برروی 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 دناتوره شدن مولکول‌های آنزیم پس از افزایش دما را کاهش می‌دهد [۲۹]. این موضوع می‌تواند دلیل دیگر برای افزایش دمای بهینه به دمای ٤۰ درجه سانتی‌گراد باشد. به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت تغییر دمای بهینه برای آنزیم تثبیت شده احتمالاً به‌دلیل 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 پایدارسازی 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 بیوکاتالیست ها 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 [۳٤]. 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 دناتورانت‌هایی هستند که برای افزایش قدرت پاک‌کنندگی و بهبود فرایند شستشو

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-30]

استفاده می‌شوند [۳٥،۳٦]. بنابراین، بررسی پایداری لیپاز و حفظ فعالیت آنزیم در حضور این مواد شیمیایی با کاربرد عملی آن در شوینده‌ها ارتباط مستقیم دارد. به همین علت اثر مواد شـیمیایی مثل اوره و SDS بر آنزیم تثبیت شـده بررسی شد. یافته‌های ما نشان داد آنزیم‌های تثبیت شده پس از تیمار با مواد شیمیایی نیز پایداری بهتری نسبت به آنزیم آزاد نشـان دادند که این موضـوع نیز دلالت بر نقش محافظتی لایه ارگانوسیلیکا در حفظ ساختار آنزیم دارد. به طور کلی می‌توان پایداری آنزیم تثبیت شـده پس از تیمار با SDS و اوره را به مقاوم بودن بسـتر سـیلیکا در برابر تخریب توسـط عوامل دناتوره کننده مانند SDS و اوره نسـبت داد. این مقاومت باعث به‌وجود آمدن اثر هم‌افزایی نانوذره سلیکا و لایه محافظ می شود که از آزادسازی لیپاز تثبیت شـده، جلوگیری می‌کند و باعث به‌وجود آمدن نانو محیط مناسـب برای فعالیت آنزیمی می‌شـود [۲۲]. نتایج به‌دست آمده در این بخش مؤید تأثیر مثبت لایه محافظ بر پایداری پروتئین در حضـور مواد شـیمیایی بود. پیشـنهاد می‌شـود لایه محافظ طراحی شـده 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 صـنعتی بسـیار ارزشـمند اسـت. بازیابی فعـالیـت آنزیم پس از قرار گرفتن در معرض شـرایط دناتوره، استفاده مجدد از آنزیم را امکان‌پذیر می‌کند، که در آن آسـان و سـریع 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 حالی‌که دیالیز تکنیکی اسـت که به‌طور گسـترده برای تاخوردگی مجدد سـاختار پروتئین اسـتفاده می‌شـود، اما یافته‌های ما و همچنین مطالعات قبلی چندین محدودیت مرتبط با این رویکرد را برجسته می‌کند. یکی از اشکالات قابل توجه دیالیز ماهیت زمان‌بر آن است. مشاهده شد که دستیابی مجدد به ساختار مناسب آنزیم لیپاز استفاده شده از طریق دیالیز نیازمند زمانی طولانی‌مدت اسـت که از محدودیت‌های مهم صنعت می‌باشد [۳۸].

علاوه بر این، علی‌رغم اسـتفاده گسـترده از دیالیز، ممکن اسـت تاخوردگی مجدد سـاختار پروتئین همیشـه بازده بالایی نداشته باشد. نتایج ما نشان داد بازیابی فعالیت آنزیم بـه کمـک روش دیـالیز بسـیـار پـایین بود. از دیگر محدودیت‌های قابل توجه دیالیز برای بازیابی سـاختار پروتئین، تجمع پروتئین‌های آزاد در محیط و رسـوب آنها است. که این مشکل برای پروتئین‌هایی با انحلال‌پذیری یا پایداری کم، بیشتر بروز می‌کند [۳۹،٤۰]، که بر نیاز معرفی راهبردهای جدید تاخوردگی مجدد پروتئین‌ها تاکید می‌کند. در روش به‌کار رفته در این مطالعه از خاصـیت بازیابی آسان آنزیم تثبیت شده روی نانوذره سیلیکا استفاده شـد. به‌طوری که می‌توان نمونه‌های تثبیت شـده را با سـانتریفیوژ به‌راحتی و در زمانی کوتاه از محلول حاوی مواد شـیمیایی دناتورانت جدا کرد. وجود لایه محافظ نانوسـیلیکا احتمالاً مانع آن‌فولدینگ و دناتوراسـیون کامل آنزیم شـده اسـت و آنزیم‌ها با غیرطبیعی شـدن جزئی و موقت در حضور دناتورانت‌ها کاهش فعالیت نشان دادند. بدین ترتیب که با به دام انداختن مولکول‌های آنزیم در حالت حدواسط فولدینگ اگرچه در مرحله دناتوراسیون با دترجنت‌ها و ترکیبات کائوتروپیک فعالیت آنزیم تا حد زیادی کاهش یافت، اما در بازگشـت فعالیت، مولکول‌های آنزیم مجبور به بازیابی سـاختار از فرم کاملا غیرطبیعی (دناتوره) نبوده و وجود لایه محافظ برگشـت حدواسط‌های ساختاری به کونفورماسیون طبیعی را تسهیل می‌کند. تثبیت آنزیم به همراه لایه محافظ می‌تواند با محدود کردن دسـترسـی آزاد مولکول‌های پروتئین به یکدیگر، به‌طور قابل توجهی از تجمع پروتئین در طول فرایند تاخوردگی مجدد جلوگیری کند و همچنین، بر

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-30]

تاخوردگی مجدد پروتئین نیز تأثیر مثبت بگذارد [٤١]. نتایج نشان داد لایه ارگانوسیلیکا که آنزیم را احاطه کرده است، همانطور که بر پایداری آنزیم تاثیر می گذارد، موجب بازیابی ساختار سه‌بعدی آنزیم در زمان کوتاه و با بازده بالا پس از دناتوراسیون می‌شود.

۵- نتیجه‌گیری

در این مطالعه، تثبیت آنزیم لیپاز 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، به‌طوری 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 محافظتی 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. به‌طور 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 بهره‌وری بیشتری در فرایندهای بیوتکنولوژیکی به ارمغان آورد.

تشکر و قدردانی

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

تاییدیه‌اخلاقی

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 منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان

علی فروتن کلورزی (نویسنده اول)، پژوهشگر اصلی/ ایده پرداز/ تحلیلگر آماری /نگارنده مقدمه و بحث (٥٠ درصد)؛ سیده‌شیرین شاهنگیان (نویسنده دوم)، ایده‌پرداز /تحلیلگر آماری/نگارنده بحث و روش‌شناسی (٥٠ درصد).

٦- 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

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-30]

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-30]

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

Ali Foroutan Kalourazi[1], S. Shirin Shahangian[2*]

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

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-30]