



Resolution of Ibuprofen Enantiomers by Rhizomucor miehei Lipase (RML) Immobilized via Physical and Covalent Attachment

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Mohammadi M.^{*1} PhD,

Ramazani A.^{*2} PhD,

Garmroodi M.² MSc,

Yousefi M.³ PhD,

Iazdi A.⁴ MSc,

Esfahani K.⁵ PhD

How to cite this article

Mohammadi M, Ramazani A, Garmroodi M, Yousefi M, Iazdi A, Esfahani K. Resolution of Ibuprofen Enantiomers by Rhizomucor miehei Lipase (RML) Immobilized via Physical and Covalent Attachment. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(3):351-361.

¹Bioprocess Engineering Department, Institute of Industrial & Environmental Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering & Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran

²Chemistry Department, Sciences Faculty, University of Zanjan, Zanjan, Iran

³New Biotechnology Research Center, Ibn Sina Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Tehran, Iran

⁴Young Researcher & Elite Club, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

⁵Plant Bioproducts Department, Institute of Agricultural Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering & Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Bioprocess Engineering Department, Institute of Industrial & Environmental Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering & Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.

Tel: -

Fax: -

m.mohammadi@nigeb.ac.ir

Address: Sciences Faculty, University of Zanjan, Daneshgah Boulevard, Zanjan, Iran. Postal Code: 4537138791

Phone: +98 (24) 33052572

Fax: +98 (24) 33583203

alirazani@gmail.com

Article History

Received: September 4, 2017

Accepted: January 1, 2018

ePublished: September 21, 2019

ABSTRACT

Ibuprofen, 4-isobutyl-propionic acid, is an important well-known member of NSAIDs which is widely utilized in inflammatory therapy like treatment of rheumatoid arthritis and various degrees of analgesic. Despite the high medical activity and low toxicity of ibuprofen, it is supplied as a racemic mixture. In this research enantioselective resolution of (R, S)-ibuprofen by immobilized preparations of Rhizomucor miehei lipase (RML) on silica and silica nanoparticles was investigated. For this, chemical modification of silica and silica mesoporous nanoparticles was performed by the simultaneous use of two coupling linkers; Octyltriethoxysilane (OTES) for hydrophobic interaction and glycidopropyltrimethoxysilane (GPTMS) for covalent linkage of RML. The results showed that immobilization of RML on octyl-functionalized supports produces specific activity almost 1.5-2 folds greater than the specific activity of the free enzyme. The observed hyper-activation decreased with increasing epoxy groups on the supports confirming the enhancement of covalent nature of the attachment. Regarding the specific activity of the immobilized preparations and desorption percentages of RML from each support, the most suitable carrier obtained from the functionalization of the supports in the presence of GPTMS and OTES in the ratio of 1:1. The selected biocatalysts were then used for enantioselective resolution of (R, S)-ibuprofen by esterification reaction at different conditions. The results revealed that the most suitable biocatalysts are those prepared by immobilization of RML on SBA-15 and silica modified with GPTMS and OTES in the ratio of 1:1 which produced high E values at ambient temperature.

Keywords Rhizomucor Miehei Lipase; Hydrophobic Immobilization; Enantioselectivity; Ibuprofen; Silica Nanoparticles

CITATION LINKS

- [1] Isolation and characterization of rat liver microsomal R-ibuprofenoyl-CoA synthetase
- [2] Enzymatic hydrolysis of racemic ibuprofen esters using Rhizomucor miehei lipase immobilized on different supports
- [3] Immobilization of lipase with a special microstructure in composite hydrophilic CA/hydrophobic PTFE membrane for the chiral separation of racemic ibuprofen
- [4] Kinetic resolution of ibuprofen catalyzed by Candida rugosa lipase in ionic liquids
- [5] Hydrolysis of ibuprofen nitrile and ibuprofen amide and deracemisation of ibuprofen using Nocardia corallina B-276
- [6] Pharmacological differences between the optical isomers of ibuprofen: evidence for metabolic inversion of the (-)-isomer
- [7] Dibenzothiophene oxidation in a model diesel fuel using CuO/GC catalysts and H₂O₂ in the presence of acetic acid under acidic condition
- [8] Commercially viable resolution of ibuprofen
- [9] Enzymatic kinetic resolution of racemic ibuprofen: past, present and future
- [10] Lipases for biotechnology
- [11] Covalent immobilization of Candida antarctica lipase on core-shell magnetic nanoparticles for production of biodiesel from waste cooking oil
- [12] Enzyme immobilization: the quest for optimum performance
- [13] A conductometric urea biosensor by direct immobilization of urease on Pt electrode
- [14] Removal of phenols with encapsulated horseradish peroxidase in calcium alginate
- [15] Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance
- [16] A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports
- [17] The use of isocyanide-based multicomponent reaction for covalent immobilization of Rhizomucor miehei lipase on multiwall carbon nanotubes and graphene nanosheets
- [18] Covalent binding of hyper-activated Rhizomucor miehei lipase (RML) on hetero-functionalized siliceous supports
- [19] A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding

تفکیک آنانتیومرهای ایوپروپوفن با استفاده از آنزیم *Rhizomucor miehei* lipase (RML) تثبیت شده به روش جذب سطحی و کوالانسی

مهدی محمدی* PhD

گروه مهندسی زیست فرآیند، پژوهشکده صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

علی رمضانی* PhD

گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

مریم گرمودی* MSc

گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

مریم یوسفی PhD

مرکز تحقیقات فناوری های نوین زیستی، جهاد دانشگاهی ابن سینا، تهران، ایران

امیر ایزدی* MSc

باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

کسری اصفهانی PhD

گروه زیست فرآورده های گیاهی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

چکیده

در این تحقیق تفکیک آنانتیومرهای ایوپروپوفن راسمیک توسط آنزیم لیپاز تثبیت شده (*Rhizomucor miehei* lipase (RML) روی مشتقات سیلیکا و نانوذره متخلخل سیلیکا SBA-15 مورد مطالعه قرار گرفت. به این منظور و برای بهره مندی از مزایای دو روش جذب هیدروفوب و اتصال کوالانسی، تثبیت آنزیم RML روی بسترهای حاوی دو گروه عاملی متفاوت به صورت همزمان صورت پذیرفت. اصلاح شیمیایی بسترهای سیلیکا و نانوذرات حفره دار سیلیکاتی توسط دو عامل با نسبت های مختلف انجام شد؛ عامل اکتیل تری اتوکسی سیلان (OTES) به عنوان عامل هیدروفوب کننده و ۳- گلاوکسی پروپیل تری متوکسی سیلان (GPTMS) به منظور اتصال کووالانسی آنزیم RML انتخاب شد. نتایج به دست آمده نشان می دهد، مشتقات به دست آمده از آنزیم RML تثبیت شده روی بسترهای حاوی گروه عامل اکتیل، فعالیت ویژه ای در حدود ۱/۵ تا ۲ برابر فعالیت ویژه آنزیم آزاد دارند. همچنین با افزایش تعداد گروه های اپوکسی، فعالیت مضاعف و میزان رهایش آنزیم کاهش یافت. مناسب ترین بستر، با توجه به بررسی فعالیت ویژه پس از تثبیت و رهایش آنزیم RML، مربوط به مشتق به دست آمده از بستری بود که گروه های عاملی اپوکسی و اکتیل را با نسبت یک به یک دارد. مشتق حاضر و همچنین مشتقات به دست آمده با جذب صرفاً هیدروفوب برای سنتز استرهای فرم S- پروفن مورد استفاده قرار گرفت. استریفیکاسیون در شرایط دمایی مختلف و مقادیر متفاوت بیوکاتالیست انجام شد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد بهترین میزان تفکیک آنانتیومر S- ایوپروپوفن مربوط به بسترهای سیلیکا اکتیل اپوکسی ۱/۱ و SBA اکتیل- اپوکسی ۱/۱ در دمای محیط بود.

کلیدواژه ها: *Rhizomucor miehei* lipase، تثبیت هیدروفوب، آنانتیوگرن، ایوپروپوفن، نانوذرات سیلیکا

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۶/۱۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۱۱

*نویسنده مسئول: aliramazani@gmail.com

*نویسنده مسئول: m.mohammadi@nigeb.ac.ir

مقدمه

طی دهه های گذشته بر اهمیت کایرالیته روزبه روز افزوده شده و به بحثی مهم در شیمی آلی و صنایع داروسازی مبدل شده است [1]. در بسیاری از ترکیبات شیمیایی که به عنوان دارو استفاده می شوند اغلب تنها یک آنانتیومر دارو عامل موثر است و اثر دارویی دارد، در حالی که آنانتیومر دیگر اثر دارویی کمتری دارد، یا به طور کل فاقد اثر است و در بدترین حالت اثرات سمی جبران ناپذیری دارد. یکی از انواع داروهای موفق تجاری که به طور گسترده ای مورد استفاده قرار می گیرد، داروهای مسکن ضدالتهابی غیراستروئیدی (NAIDs) است [2، 1]. ایوپروپوفن، ۴- ایزوبوتیل پروپیونیک اسید، یکی از مهم ترین و شناخته شده ترین انواع داروهای مسکن ضدالتهابی غیراستروئیدی (NAIDs) است که به طور گسترده ای در درمان التهاب در بیماری هایی مانند درمان آرتروز روماتوئید مورد استفاده قرار می گیرد. با این که ایوپروپوفن دارویی با سمیت کم و مصرف بالا در پزشکی است، اما به صورت یک مخلوط راسمیک عرضه می شود. کربن آلفا (α) گروه کربوکسیل مولکول ایوپروپوفن مرکز کایرال مولکول است [3، 4]. آنانتیومر S در مولکول ایوپروپوفن ۱۶۰ برابر فعالیت دارویی بیشتری نسبت به فرم R این مولکول دارد [3]. این آنانتیومر اغلب دارای سمیت کمتری بوده و مصرف کننده آن کمتر دچار عوارض مربوط به مصرف آن می شود. در حالی که فرم دیگر آن می تواند اثرات مخربی بر سلامتی انسان داشته باشد. مشاهده شده است که در کبد و کلیه حیواناتی چون خوک و موش ایزومر R تحت تاثیر کوآنزیم A (CoA) و آدنوزین تری فسفات (ATP) به ایزومر S تبدیل می شود اما در محلول بافر با میزان pH برابر با ۷/۴ یا پلاسمای انسانی چنین تبدیلی صورت نمی گیرد [5]. ایزومر (R) ایوپروپوفن به علت تجمع در بافت های چربی و تبدیل به مخلوطی از استرهای گلیسرول دارای اثرات سمی است [6]. به همین دلیل امروزه به علت محدودیت استفاده از دوزهای بالا، سمیت و اثرات جانبی تمایل فزاینده ای به تهیه آنانتیومر خالص این دارو در فرم S وجود دارد [7].

تفکیک آنانتیومرها را می توان با روش های مختلفی از جمله کروماتوگرافی کایرال به روش مبادله لیگاند (CLEC)، تبلور دیاستریومریک و روش آنزیمی افزایش داد [8]. در میان این روش ها، استفاده از آنزیم های لیپاز به منظور تفکیک آنانتیومرها روشی بسیار جذاب و سودمند است [9].

لیپازها (E.C. 3.1.1.3) طیف وسیعی از آنزیم ها را در بر می گیرند که به عنوان بیوکاتالیست در واکنش های هیدرولیز استرها، آمینولیز، استریفیکاسیون، ترانس استریفیکاسیون و لاکتونیفیکیشن مورد استفاده قرار می گیرند. لیپازها علاوه بر اهمیت بیولوژیکی، دارای نقش مهمی در بیوتکنولوژی هستند. آنها نه تنها در هیدرولیز روغن ها بلکه برای تهیه حواسط های کایرال هم مورد استفاده قرار می گیرند. سایت فعال لیپازها به گونه ای است که به راحتی آنانتیومرها را از هم تشخیص داده و همین امر سبب آنانتیوگزینی بالای این آنزیم ها می شود [10]. انتخاب گری بالا و شرایط ملایم

انجام واکنش سبب شده تا لیپازها برای سنتز طیف گسترده‌ای از محصولات صنعتی مانند چرم، مواد شوینده، لوازم آرایشی، مواد غذایی، عطر، پزشکی و بیوسنسورها مورد استفاده قرار گیرند [10]. لیپازها معمولاً دارای دو فرم ساختاری باز و بسته هستند. ساختار لیپازها معمولاً شامل یک زنجیره کوچک آلفاهلیکس یا لوپ به نام کلاهک است. هنگامی که سایت فعال آنزیم توسط این زنجیره الیگوپپتیدی به‌طور کامل محافظت می‌شود، سایت فعال دور از دسترس سوبسترا قرار می‌گیرد، به این حالت فرم بسته می‌گویند. در صورتی که آنزیم در معرض یک ماده هیدروفوب نظیر بستر هیدروفوب یا سوبسترای هیدروفوب قرار گیرد کلاهک کنار رفته تا ماده هیدروفوب به سایت فعال متصل شود به این فرم از آنزیم فرم باز یا فعال می‌گویند [11]. در فرم باز، آنزیم‌های لیپاز دارای حداکثر فعالیت بوده و مقدار بیشتری از محصول را می‌توانند تولید کنند.

با وجود مزیت‌های استفاده آنزیم‌ها در صنایع، کاربرد آنزیم‌های محلول در تولیدات صنعتی دارای اشکالات بسیاری است که می‌توان به هزینه‌های بالا، پایداری کم در محیط واکنش، جداسازی دشوار از محصول واکنش، عدم بازیافت و استفاده مجدد اشاره کرد [12-14]. به‌منظور غلبه بر این معایب، یکی از شناخته‌شده‌ترین روش‌ها تثبیت لیپاز روی بسترهای جامد است. تثبیت کردن آنزیم‌ها روی بستر جامد علاوه بر اقتصادی بودن دارای مزایایی مانند استفاده مجدد از آنزیم، کنترل مداوم و آسان واکنش، جداسازی آسان محصولات، افزایش پایداری بوده و باعث به حداقل رساندن ضایعات و آلودگی کمتر محصولات می‌شود. روش‌های گوناگونی برای تثبیت آنزیم گزارش شده است که از جمله آنها می‌توان به جذب فیزیکی آنزیم‌ها، اتصال عرضی آنزیم‌ها، تثبیت کوالانسی و محبوس شدن فیزیکی آنها اشاره کرد [12]. جذب هیدروفوب آنزیم روی بستر نیز یکی از روش‌های تثبیت فیزیکی آنزیم‌ها است که عمده‌تاً برای تثبیت آنزیم‌های لیپاز کاربرد دارد [15]. آن‌گونه که قبلاً اشاره شد آنزیم‌های لیپاز عمده‌تاً دارای جایگاه فعال هستند که نسبت به مولکول‌های هیدروفوب حساسند و در حضور این مولکول‌ها کلاهک جایگاه فعال کنار رفته و لیپاز به فرم باز یا فعال تبدیل می‌شود. با استفاده از این ویژگی بسترهای هیدروفوب مختلفی طراحی شده و طی سال‌های گذشته گزارش شده است [16]. در این نوع تثبیت علاوه بر سادگی، کم‌هزینه بودن و شرایط ملایم واکنش، تعادل کنفورماسیونی به سمت فرم باز لیپاز بوده و در نتیجه آن فعالیت آنزیم به مقدار قابل توجهی افزایش می‌یابد به‌طوری که طبق گزارشات فعالیت آنزیم تثبیت‌شده طبق این روش از فعالیت آنزیم آزاد بیشتر بوده است. علاوه بر مزایای بسیاری که این نوع تثبیت دارد، آنزیم تثبیت‌شده با تغییر شرایط pH، قدرت یونی، دما و با در معرض سطوح هیدروفوب دیگر قرارگرفتن می‌تواند به راحتی از سطح بستر جدا شده و موجب آلودگی محیط واکنش شود. در سویی دیگر، تثبیت از طریق اتصال کوالانسی یکی از

کاربردی‌ترین روش‌های تثبیت است که با توجه به گروه‌های عاملی روی بستر می‌توان در واکنش‌های متفاوت از این روش بهره جست [17]. این روش نسبت به سایر موارد این مزیت را دارد که در آن آنزیم با پیوندهای قوی کوالانسی تثبیت می‌شود و در انتهای هر واکنش در محصول هیچ‌گونه آلودگی پروتئینی ناشی از رهايش آنزیم در محیط واکنش نخواهیم داشت، در نتیجه در هر دو محیط آبی و آلی و در حضور عوامل تخریب‌کننده، پیوند کوالانسی بر سایر موارد ترجیح داده می‌شود. اگرچه در این نوع از تثبیت، با توجه به اصلاح شیمیایی که روی بستر صورت می‌گیرد و پیوندهایی که آنزیم با بستر تشکیل می‌دهد معمولاً آنزیم مقداری از فعالیت خود را از دست می‌دهد، به‌طور تقریبی هر پیوندی که بین بستر و آنزیم برقرار می‌شود فعالیت آنزیم تا حدودی کاهش می‌یابد. در پژوهش حاضر تلاش شده است که با تلفیق دو روش کوالانسی و هیدروفوب از مزایای هر دو روش بهره برده شود و معایب آنها به حداقل مقدار خود برسد. نتایج به‌دست‌آمده حاکی از بالارفتن فعالیت آنزیم RML تثبیت‌شده روی دو بستر سیلیکا و SBA-15 بود [18]. از آنجایی که هر نوع روش تثبیت اثرات مختص خود را بر میزان گزینش‌پذیری آنزیم می‌گذارد، مشتقات تثبیت‌شده که دارای راندمان فعالیت بالایی بوده‌اند در واکنش سنتز انانتیوگزین استرهای ایوپروپوفن مورد استفاده قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد مصرفی: حلال‌های مورد استفاده شامل تولوئن، دی‌اکسان، ایزوپروپانول، پروپانول (مرک؛ آلمان) بودند، همچنین سیلیکاژل (مرک؛ آلمان) به‌کاررفته دارای مش ۷۰-۲۳۰، اندازه ۶۳-۲۰۰ میکرومتر، سایز حفرات ۶۰ آنگسترم و حجم حفرات تقریباً ۰/۸ سانتی‌مترمکعب بر گرم) بود. آنزیم RML، اکتیل‌تری‌اتوکسی‌سیلان ۹۷٪، تترااتیل‌ارتوسیلان، پارانیتروفنیل‌بوتیرات، تری‌اتیل‌آمین، ۳-گلائیوکسی پروپیل‌تری متوکسی‌سیلان، استاندارد (+) - (s) ایوپروپوفن، پلی (اتیلن‌گلیکول) - بلاک - پلی (پروپیلن - گلیکول) - بلاک - پلی (اتیلن‌گلیکول) یا P123، آب اکسیژنه، ساکروزلوریت، تربتون CTAB، X100، استونیتریل و مولکولار سیو مصرفی (سیگما؛ ایالات متحده) تهیه شدند. حلال‌های ایزواکتان و n- هگزان مصرفی (مرک؛ آلمان) نیز به کار رفتند. ایوپروپوفن مورد استفاده از قرص‌های موجود در بازار پس از حذف روکش آن و آسیاب‌نمودن آن به‌وسیله مخلوط (۱:۱) اتانول: متانول استخراج شد و پس از اطمینان از خلوص آن با طیف H-NMR و نقطه ذوب آن در واکنش‌های استری‌شدن مورد استفاده قرار گرفت.

دستگاه‌ها: برای تعیین فعالیت آنزیم و بیوکاتالیست‌ها جذب آنها با دستگاه اسپکترومتر Jenway مدل Genova خوانده و بررسی میزان انانتیومرگزینی بیوکاتالیست‌ها با دستگاه GC مدل ACME 6100 اندازه‌گیری شد.

با وجود مزیت‌های استفاده آنزیم‌ها در صنایع، کاربرد آنزیم‌های محلول در تولیدات صنعتی دارای اشکالات بسیاری است که می‌توان به هزینه‌های بالا، پایداری کم در محیط واکنش، جداسازی دشوار از محصول واکنش، عدم بازیافت و استفاده مجدد اشاره کرد [12-14]. به‌منظور غلبه بر این معایب، یکی از شناخته‌شده‌ترین روش‌ها تثبیت لیپاز روی بسترهای جامد است. تثبیت کردن آنزیم‌ها روی بستر جامد علاوه بر اقتصادی بودن دارای مزایایی مانند استفاده مجدد از آنزیم، کنترل مداوم و آسان واکنش، جداسازی آسان محصولات، افزایش پایداری بوده و باعث به حداقل رساندن ضایعات و آلودگی کمتر محصولات می‌شود. روش‌های گوناگونی برای تثبیت آنزیم گزارش شده است که از جمله آنها می‌توان به جذب فیزیکی آنزیم‌ها، اتصال عرضی آنزیم‌ها، تثبیت کوالانسی و محبوس شدن فیزیکی آنها اشاره کرد [12]. جذب هیدروفوب آنزیم روی بستر نیز یکی از روش‌های تثبیت فیزیکی آنزیم‌ها است که عمده‌تاً برای تثبیت آنزیم‌های لیپاز کاربرد دارد [15]. آن‌گونه که قبلاً اشاره شد آنزیم‌های لیپاز عمده‌تاً دارای جایگاه فعال هستند که نسبت به مولکول‌های هیدروفوب حساسند و در حضور این مولکول‌ها کلاهک جایگاه فعال کنار رفته و لیپاز به فرم باز یا فعال تبدیل می‌شود. با استفاده از این ویژگی بسترهای هیدروفوب مختلفی طراحی شده و طی سال‌های گذشته گزارش شده است [16]. در این نوع تثبیت علاوه بر سادگی، کم‌هزینه بودن و شرایط ملایم واکنش، تعادل کنفورماسیونی به سمت فرم باز لیپاز بوده و در نتیجه آن فعالیت آنزیم به مقدار قابل توجهی افزایش می‌یابد به‌طوری که طبق گزارشات فعالیت آنزیم تثبیت‌شده طبق این روش از فعالیت آنزیم آزاد بیشتر بوده است. علاوه بر مزایای بسیاری که این نوع تثبیت دارد، آنزیم تثبیت‌شده با تغییر شرایط pH، قدرت یونی، دما و با در معرض سطوح هیدروفوب دیگر قرارگرفتن می‌تواند به راحتی از سطح بستر جدا شده و موجب آلودگی محیط واکنش شود. در سویی دیگر، تثبیت از طریق اتصال کوالانسی یکی از

روش‌ها

عامل‌دارکردن سیلیکا با گروه‌های اکتیل: یک گرم سیلیکا خشک، ۵۰ میلی‌لیتر تولوئن خشک و ۱۵۰ میکرولیتر تری‌اتیل‌آمین درون بالن دو دهانه ریخته و در اتمسفر گاز ازن تحت عمل رفلکس قرار گرفت. پس از گذشت ۲۰ دقیقه از آغاز رفلکس، یک میلی‌لیتر لینکر "اکتیل‌تری‌اتوکسی‌سیلان" قطره‌قطره به محیط واکنش اضافه شد. پس از ۳ ساعت و اتمام واکنش بستر حاصل فیلتر شده و با اتانول ۹۶٪ و آب مقطر شست‌وشو داده شد. در انتها ذرات بستر به مدت ۸ ساعت در دمای ۱۰۰°C قرار گرفت.

عامل‌دارکردن سیلیکا با گروه‌های اپوکسی: یک گرم سیلیکا خشک، ۵۰ میلی‌لیتر تولوئن خشک و ۱۵۰ میکرولیتر تری‌اتیل‌آمین درون بالن دو دهانه ریخته و در اتمسفر گاز ازن تحت عمل رفلکس قرار گرفت. پس از گذشت ۲۰ دقیقه از آغاز رفلکس، یک میلی‌لیتر لینکر "۳-گلاپوکسی پروپیل‌تری‌اتوکسی‌سیلان" قطره‌قطره به محیط واکنش اضافه شد. پس از ۳ ساعت و اتمام واکنش بستر حاصل فیلتر شده و با اتانول ۹۶٪ و آب مقطر شست‌وشو داده شد. در انتها ذرات بستر به مدت ۸ ساعت در دمای ۱۰۰°C قرار گرفت.

عامل‌دارکردن سیلیکا با گروه‌های اپوکسی و اکتیل به نسبت ۱:۱: سنتز مشتقات سیلیکا اکتیل‌اپوکسی نیز مانند سنتز بسترهای سیلیکا اکتیل و سیلیکا اپوکسی و با نسبت یک‌به‌یک از دو لینکر صورت گرفت.

سنتز SBA-15: ۶ گرم سورفکتانت پلورونیک اسید در محلولی که حاوی ۳۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک غلیظ در ۱۳۷ میلی‌لیتر آب مقطر بود، حل شد. پس از انحلال کامل، سورفکتانت به محلولی دو فاز که از ۱۳/۷ گرم تترا اتوکسی‌ارتوسیلیکیت در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر تهیه شده بود، قطره‌قطره و در حال هم‌زدن اضافه شد. سپس مخلوط به یک ظرف تفلونی منتقل و به مدت ۴۸ ساعت به آون تحت دمای ۱۰۰°C انتقال یافت. رسوب سفیدرنگ به دست آمده صاف و با آب مقطر تا رسیدن به pH خنثی شست‌وشو داده شد. ترکیب به دست آمده در دمای محیط خشک شد و به منظور حذف سورفکتانت به مدت ۶ ساعت در کوره با دمای ۵۴۰°C به منظور تکلیس شدن قرار گرفت.

عامل‌دارکردن SBA-15 با گروه‌های اپوکسی: ۵ گرم SBA-15، ۳۰ میلی‌لیتر تولوئن خشک و ۷۵ میکرولیتر تری‌اتیل‌آمین درون بالن دو دهانه ریخته و در اتمسفر گاز ازن تحت عمل رفلکس قرار گرفت. پس از گذشت ۲۰ دقیقه از آغاز رفلکس، یک میلی‌لیتر لینکر "۳-گلاپوکسی پروپیل-تری‌اتوکسی‌سیلان" قطره‌قطره به محیط واکنش اضافه شد. پس از ۳ ساعت و اتمام واکنش بستر حاصل فیلتر شده و با اتانول ۹۶٪ و آب مقطر شست‌وشو داده شد. در انتها ذرات بستر به مدت ۸ ساعت در دمای ۱۰۰°C قرار گرفت.

عامل‌دارکردن SBA-15 با گروه‌های اکتیل: ۵ گرم SBA-15، ۳۰ میلی‌لیتر تولوئن خشک و ۷۵ میکرولیتر تری‌اتیل‌آمین درون بالن دو دهانه ریخته و در اتمسفر گاز ازن تحت عمل رفلکس قرار گرفت. پس از گذشت ۲۰ دقیقه از آغاز رفلکس، یک میلی‌لیتر لینکر

"اکتیل‌تری‌اتوکسی‌سیلان" قطره‌قطره به محیط واکنش اضافه شد. پس از ۳ ساعت و اتمام واکنش بستر حاصل فیلتر شده و با اتانول ۹۶٪ و آب مقطر شست‌وشو داده شد. در انتها ذرات بستر به مدت ۸ ساعت در دمای ۱۰۰°C قرار گرفت.

عامل‌دارکردن SBA-15 با گروه‌های اکتیل و اپوکسی با نسبت ۱:۱: سنتز مشتق SBA-15 اکتیل اپوکسی نیز مانند بسترهای SBA-15 اکتیل و اپوکسی با نسبت‌های برابر از دو لینکر صورت گرفت. **تثبیت آنزیم روی بستر سیلیکا:** به ۱۰ میلی‌لیتر بافر سدیم فسفات ۵ میلی‌مولار با میزان pH برابر با ۷، ۵ میلی‌گرم آنزیم RML اضافه شد. پس از بررسی فعالیت آنزیم آزاد در محلول یک گرم بستر عامل‌دار شده به محلول اضافه شد. در زمان‌های مختلف به منظور سنجش میزان تثبیت آنزیم از محلول سوپرناتانت نمونه برداری شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت و اطمینان از تثبیت کامل آنزیم روی بستر، سوسپانسیون صاف، شسته و آنزیم تثبیت‌شده روی بستر جمع‌آوری شد.

تثبیت آنزیم روی بستر SBA-15: به ۳ میلی‌لیتر بافر سدیم فسفات ۵ میلی‌مولار با میزان pH برابر با ۷، ۵ میلی‌گرم آنزیم RML و پس از بررسی فعالیت آنزیم آزاد در محلول ۳۰۰ میلی‌گرم بستر عامل‌دار شده به محلول اضافه شد. در زمان‌های مختلف به منظور سنجش میزان تثبیت آنزیم از محلول سوپرناتانت نمونه برداری شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت و اطمینان از تثبیت کامل آنزیم روی بستر، سوسپانسیون صاف، شسته و آنزیم تثبیت‌شده روی بستر جمع‌آوری شد.

بررسی فعالیت آنزیم: فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت‌شده با روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۳۴۸ نانومتر ($\epsilon = 5150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) مورد بررسی قرار گرفت. افزایش جذب به دلیل هیدرولیز "پارانیتروفنیل بوتیرات" در دمای ۲۵°C در بافر ۱۰ میلی‌مولار با میزان pH برابر با ۷ و تولید "پارانیتروفنل" مشاهده شد. به طور خلاصه، ۲/۰ تا ۵/۰ میلی‌لیتر از لیپاز آزاد یا سوسپانسیون (شاهد یا سوپرناتانت بدون رقیق‌سازی) به ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول سوپسترا (۸/۰ میلی‌مولار) اضافه و هم‌زده شد. هیدرولیز خودبه‌خودی p -NPB با استفاده از ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول سوپسترا در غیاب آنزیم به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. غلظت پروتئین آنزیم آزاد و سوپرناتانت نیز بعد از تثبیت با روش مرسوم برادفورد مورد بررسی قرار گرفت.

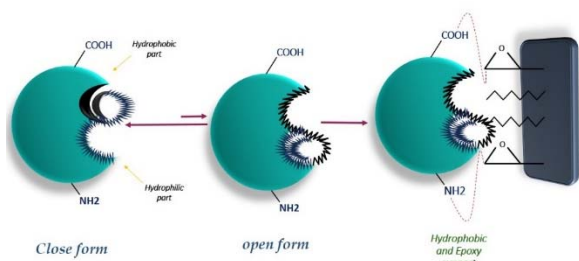
سنتز آنانتیوگزینه استرها توسط مشتقات RML تثبیت‌شده: در ظروف شیشه‌ای سرپیچ‌دار ۱۰ میلی‌لیتری که حاوی ۲ میلی‌لیتر ایزواکتان یا هگزان، مقدار ۱۰ میلی‌مول ایوپروفن راسمیک، ۲۰ میلی‌مول الکل‌های (اتانول، متانول و پریپانول) اضافه و پس از آن مقادیر متفاوت بیوکاتالیست به مخلوط حاصل اضافه شد. مخلوط حاصل با همزن مغناطیسی در دماهای ۴°C، دمای محیط و ۴۵°C هم‌زده شد. به منظور بررسی دقیق نمونه‌گیری در بازه‌های زمانی متوالی از حلال آلی (۵۰ میکرولیتر) انجام شد تا بهترین زمان برای متوقف ساختن واکنش به دست آید.

مکانیکی، میکروبی، قیمت پایین و سادگی کاربرد آن بستر متداول برای تثبیت به حساب می‌آیند. به علاوه شیمی سطح این بسترها به‌گونه‌ای است که اصلاح سطح آنها به‌راحتی امکان‌پذیر بوده و همچنین می‌توان گروه‌های مختلف عاملی را بر سطح آنها وارد کرد.

جدول ۱) خواص ساختاری ترکیب SBA-15 قبل و بعد از عامل‌دارشدن

ترکیب	قطر منافذ ذرات (انگستروم)	حجم کل منافذ (میلی‌لیتر بر گرم)	سطح (مترمربع بر گرم)
SBA-15	۸/۶	۱/۰۵	۵۴۴
SBA-octyl	۷/۸	۰/۹۸	۵۲۲
SBA-octyl-epoxy (1:1)	۷/۷	۰/۸۵	۴۷۵
SBA-octyl-epoxy-RML	۷/۰	۰/۲۸	۴۳۱

تثبیت آنزیم روی بسترهای عامل‌دارشده: تبدیل آنزیم‌های آزاد به کاتالیزست‌های ناهمگن، استفاده مجدد آنزیم‌ها در واکنش و افزایش پایداری حرارتی و شیمیایی آنها از مهم‌ترین دلایل تثبیت آنزیم به شمار می‌آیند. ناهمگن‌سازی آنزیم‌های آزاد با اتصال آنها به بسترهای جامد انجام می‌شود. با توجه به هدف تعریف‌شده سطح دو بستر گفته‌شده پس از آماده‌سازی اولیه مورد اصلاح شیمیایی با نسبت‌های مختلف گروه‌های اپوکسی و اکتیل (گروه‌های اکتیل برای جذب اولیه هیدروفوب و گروه‌های اپوکسی برای اتصال کوالانسی) قرار گرفتند (شکل ۱). مشتقات مختلف به‌دست‌آمده از هر دو بستر که حاوی نسبت‌های مختلف گروه‌های اپوکسی و اکتیل بودند برای تثبیت آنزیم در شرایط کاملاً ملایم استفاده شدند (شکل ۱).



شکل ۱) تثبیت کوالانسی-هیدروفوب لیپاز روی بستر به‌صورت همزمان

بدیهی است شرایط ملایم تثبیت می‌تواند یکی از شاخصه‌های بارز هر روش تثبیت باشد. در این شرایط امکان تخریب ساختار آنزیم و در نتیجه از بین رفتن فعالیت آن کاهش می‌یابد. همچنین حضور گروه‌های اکتیل باعث تسریع در جذب اولیه آنزیم روی سطح بستر شد. برای مثال در حالی که تثبیت آنزیم روی بستر سیلیکا حاوی گروه‌های اپوکسی ۲۴ ساعت به طول انجامید، تثبیت روی بستر سیلیکا حاوی اکتیل تنها ۶ دقیقه طول کشید. بنابراین حضور گروه‌های اکتیل روی سطح بستر می‌تواند سرعت تثبیت را بهبود بخشد. این نتیجه به‌خصوص زمانی با اهمیت است که بدانیم برای تثبیت روی بسترهای هیدروفیلی مانند اپوکسی، نیاز به قدرت یونی محلول بافر وجود دارد که خود باعث کاهش فعالیت آنزیم می‌شود. با

استفاده مجدد از مشتقات تثبیت‌شده در سنتز آنانتیوگزین استرها:

در ظرف شیشه‌ای سرپیچ‌دار ۱۰ میلی‌لیتری ۵۰ میلی‌گرم از بیوکاتالیزست، ۲ میلی‌لیتر حلال ایزواکتان، مقدار ۱۰ میلی‌مول ایوپروفن‌راسمیک و ۲۰ میلی‌مول الکل پروپانول با هم مخلوط شد. مخلوط حاصل با همزن مغناطیسی با دور ۱۰۰rpm در دمای محیط هم‌زده شد. پس از ۲۴ ساعت نمونه‌برداری و توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی بررسی شد.

شرایط کروماتوگرافی: کروماتوگرافی گازی به‌وسیله دستگاه گاز کروماتوگراف Thermo-Finnigan که مجهز به دتکتور یونی‌زاسیون شعله‌ای (FID) و ستون کایرال (HP-Chiral-20B- (Agilent 30m×0.32mm×0.25μm) بود، انجام شد. دمای تزریق ۲۶۰°C، دمای دتکتور ۳۰۰°C و دمای آن در ۱۷۸°C ثابت نگه داشته شد. گاز هلیوم با جریان ۰/۷ میلی‌لیتر بر دقیقه بود.

یافته‌ها و بحث

تهیه بستر و آماده‌سازی بسترها: ذرات نانو با داشتن مساحت سطحی نسبتاً بالا در مقایسه با حجمشان از سطح در دسترس بیشتری برای تثبیت برخوردار هستند. در این بین بسترهای نانوسیلیکاتی با داشتن حفرات زیاد در مقیاس نانو، قابلیت استفاده بالایی به‌عنوان حامل در واکنش‌های تثبیت دارند. بستر نانوسیلیکاتی (SBA-15) با روش هیدروترمال سنتز و با تکنیک‌هایی مانند SEM، XRD و BET مورد بررسی قرار گرفت^[18]. سپس این بستر با استفاده از گروه‌های عاملی مختلف مورد اصلاح سطح قرار گرفت. حضور گروه‌های عاملی روی آن توسط تکنیک‌هایی همانند FT-IR، TGA مورد مطالعه قرار گرفت که نتایج حاصل‌شده در سال ۲۰۱۶ منتشر شد. نتایج به‌دست‌آمده از نمودار جذب و واجذب نیتروژن از حفرات مزوپوره‌های سیلیکاتی و تکنیک‌های BET/BJH با مشخص کردن مشخصات بستر سنتز شده، قطر حفرات را ۸/۶ نانومتر نشان می‌دهد. همان‌گونه که جدول ۱ نشان می‌دهد برای این ذرات، اندازه سطح در واحد جرم ۵۴۴ مترمکعب بر گرم و حجم کل حفره ۱/۰۵ گرم بر سانتی‌متر مکعب به دست آمده است. با عامل‌دارشدن نانوذرات SBA-15 توسط لینکر حاوی گروه‌های اکتیل و اپوکسی، آن گونه که انتظار می‌رود باعث کاهش تمام مقادیر شده که خود تاییدی بر عامل‌دارشدن این نانوذرات است. همچنین پس از تثبیت آنزیم RML روی بستر عامل‌دارشده مقادیر کاهش دوباره‌ای را نشان می‌دهد. کاهش در ابعاد حفرات پس از تثبیت آنزیم، به‌دلیل استفاده آنزیم از سطح درونی حفرات، علاوه بر سطح خارجی بستر است (جدول ۱).

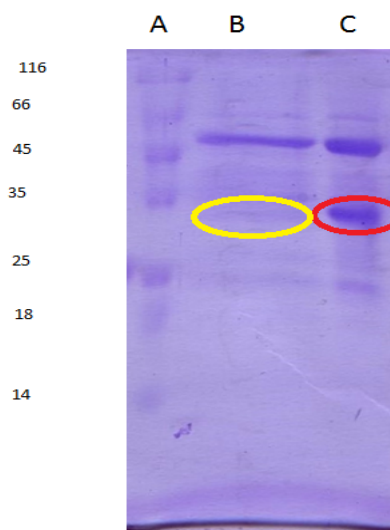
برای دست‌یافتن به بسترهایی با قابلیت تثبیت همزمان کوالانسی و هیدروفوب، نانوذرات سنتز شده و سیلیکاژل با دو گروه اپوکسی و اکتیل به‌صورت همزمان و در نسبت‌های مختلف این دو لینکر عامل‌دار شده و با روش‌های دستگاهی مورد بررسی و شناسایی قرار گرفت^[18]. به‌طور کلی بسترهای سیلیکایی به‌دلیل پایداری شیمیایی،

که دارند، آنزیم‌هایی که به‌صورت برهم‌کنش‌های ضعیف هیدروفوب روی سطح بستر اتصال پیدا کرده‌اند را از سطح جدا کرده و وارد محلول می‌کنند. به این ترتیب با سنجش میزان پروتئین موجود در محلول می‌توان به مقدار رهایش آنزیم پی برد. به این منظور مشتق به‌دست‌آمده از تثبیت آنزیم روی بستر سیلیکا-اکتیل، در درصد‌های متفاوت ۰/۱، ۰/۵، ۱ و ۲٪ CTAB، ساکروزلوریت و تریتون X-100 مورد بررسی قرار گرفت. این نوع بستر فقط توانایی جذب هیدروفوب را داشته و رهایش آنزیم در آن بیشتر اتفاق می‌افتد. نتایج نشان داد که مناسب‌ترین معرف برای انجام آزمایش رهایش آنزیم، محلول ۲٪ ساکروزلوریت است. بنابراین بررسی‌های کامل‌تر برای دیگر مشتقات تثبیت‌شده در حضور ساکروزلوریت ۲٪ صورت گرفت. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که در عدم حضور گروه‌های اپوکسی تمایل آنزیم برای جداسدن از سطح بستر بسیار بالا بوده و حضور گروه‌های اپوکسی و ایجاد پیوند کوالانسی منجر به کاهش رهایش آنزیم می‌شود. نتایج مشابهی در تثبیت آنزیم روی بستر SBA-15 نیز به دست آمد. تعداد گروه‌های اپوکسی روی سطح بستر SBA-15 به‌دلیل مساحت بالای بسترهای نانو ۲/۹ برابر بستر سیلیکا است، از این رو مقدار آنزیمی که به‌منظور تثبیت برای بسترهای نانو مورد استفاده قرار گرفت بیش از ۱۰ برابر بستر سیلیکا بود (۶۰ میلی‌گرم آنزیم به‌ازای یک گرم بستر). همانند آنچه که در مورد بستر سیلیکا مشخص شد، جذب صرفاً هیدروفوب آنزیم موجب افزایش فعالیت آن شد. به‌طوری که فعالیت ویژه آنزیم تثبیت‌شده روی بستر دارای گروه‌های اکتیل ۱/۶ برابر آنزیم آزاد بود. با افزایش گروه‌های اپوکسی مقدار فعالیت کاهش پیدا کرده و در حضور ۷۳۰ میکرومول از گروه‌های اپوکسی به ۱/۸ رسید. همچنین آزمایش واجذب پروتئین‌های جذب‌شده به‌صورت هیدروفوب در شرایط کاملاً مشابه با بستر سیلیکا انجام شد. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که با افزایش مقدار گروه‌های اپوکسی از میزان رهایش آنزیم کم می‌شود. به‌طوری که در بهترین حالت و در حضور ۷۳۰ میکرومول از عامل‌های اپوکسی به صفر رسیده است.

تفکیک آنزیمی انانتیومرهای ایبوپروفن به‌وسیله استریفیکاسیون مخلوط راسمیک ایبوپروفن

برای تفکیک انانتیومرهای پروفن می‌توان از دو روش سنتز انانتیوگزین استرهای پروفن یا هیدرولیز انتخابی استرهای راسمیک پروفن استفاده نمود. در این گزارش برای تفکیک انانتیومرهای داروی ایبوپروفن، از واکنش استریفیکاسیون مخلوط راسمیک ایبوپروفن با الکل‌های مختلف و در شرایط مختلف بهره گرفته شد (شکل ۳). مولفه‌های مختلفی در این واکنش می‌توانند تأثیرگذار باشند که بر این اساس و در گزارش‌های گوناگون اثر پارامترهای متفاوتی چون دما، حلال، محتوای آب، غلظت آنزیم و سوبسترا روی این واکنش مورد مطالعه قرار گرفته است. یکی از مهم‌ترین این مولفه‌ها انتخاب نوع حلال برای انجام واکنش آنزیمی است. حلال ایزوکتان با مقدار $\log P$ بزرگ‌تر از ۲ برای این واکنش انتخاب شد. این حلال آلی هیدروفوب بوده و اثرات مخرب کمتری روی آنزیم به‌جای می‌گذارد. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که سرعت

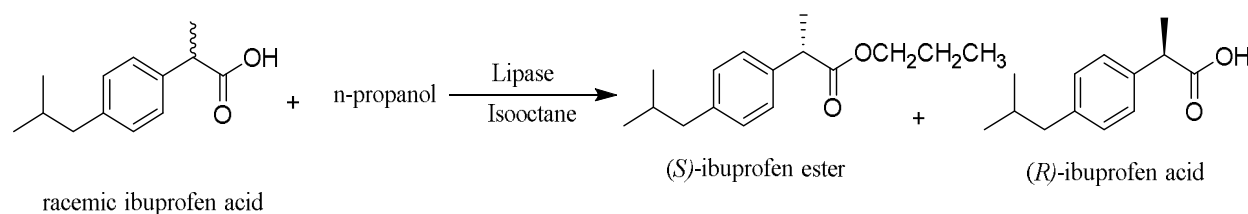
حضور گروه‌های اکتیل تثبیت اولیه در مورد همه بسترها و براساس نتایج فعالیت گرفته‌شده از سوپرناتانت در مدت ۲ ساعت تکمیل شد و برای اتصال کوالانسی آنزیم ۲۲ ساعت دیگر زمان داده شد. شکل ۲ مربوط به ژل SDS-Page آنزیم RML قبل و پس از تثبیت پس از ۲ ساعت است. همان‌طور که در ژل مشاهده می‌شود، با توجه به خطوط مارکر، مخوط اولیه پروتئین که دارای دو باند پروتئینی شاخص است، پس از تثبیت باند مربوط به ناحیه ۳۳ کیلودالتون پروتئین مورد نظر را نشان نمی‌دهد.



شکل ۲) ژل SDS-Page آنزیم RML قبل و بعد از تثبیت (خط A مربوط به مارکر پروتئین، خط B مربوط به سوپرناتانت پس از تثبیت و خط C مربوط به سوپرناتانت قبل از تثبیت)

با گردآوری بیوکاتالیست‌های هتروژن از طریف فیلتراسیون، خصوصیات آنها مورد ارزیابی قرار گرفت. دو فاکتور مهم فعالیت و مقدار رهایش آنزیم برای همه مشتقات مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت آنزیم نشان‌دهنده میزان اثرگذاری گروه‌های اکتیل در جذب هیدروفوب و افزایش فعالیت مشتق تثبیت‌شده نسبت به آنزیم آزاد است. بر این اساس فعالیت ویژه مشتق به‌دست‌آمده از تثبیت آنزیم روی بستر سیلیکا حاوی اکتیل ۶/۴ بود که بیش از دو برابر فعالیت آنزیم آزاد است (۲/۱). این مقدار با جایگزین‌شدن تدریجی گروه‌های اکتیل توسط گروه‌های اپوکسی و متعاقب آن با افزایش اتصالات کوالانسی کاهش پیدا کرد. به‌طور مثال در حضور ۹۲ میکرومول از گروه‌های اپوکسی این مقدار به عدد ۳ می‌رسد و با افزایش بیشتر گروه‌های اپوکسی به ۱/۸ در حضور ۲۴۰ میکرومول از گروه‌های اپوکسی می‌رسد. در همه مشتقات به‌دست‌آمده از سیلیکا بازده تثبیت بین ۹۵ تا ۱۰۰٪ بود که براساس نتایج ارزیابی فعالیت آنزیم و همچنین آزمایش تعیین مقدار پروتئین (برادفورد) مشخص شد [19]. مقدار رهایش آنزیم که پارامتر مورد اهمیت دیگر بود مورد سنجش قرار گرفت. به این منظور از معرف‌های مختلفی استفاده شد. این معرف‌ها براساس منابع مختلف و به‌دلیل خاصیت آب‌گریزی بالایی

نتایج حاصل از تفکیک آنالیتوگترین مشتقات مختلف ایوپروفن به‌وسیله آزمون RML تثبیت‌شده روی بستر Silica-octyl-epoxy



جدول ۲) نتایج سنتز استر پروپانول به‌وسیله آزمون RML تثبیت‌شده روی بستر Silica-octyl-epoxy در حلال ایزواکتان

نوع الکک	دمای واکنش	بیوکاتالیست (میلی گرم)	فزونى انانتیومرى ماده اولیه (%)	فزونى انانتیومرى محصول (%)	درصد تبدیل	E
پروپانول	۴۰C	۴۰	۱۹	۵۶	۲۵	۴/۳
پروپانول	۴۰C	۵۰	۴۱	۴۹	۴۵	۴/۷
پروپانول	۴۰C	۷۰	۲۱	۴۹	۳۰	۳/۶
پروپانول	۴۰C	۱۰۰	۹۱	۳۳	۷۳	۵/۵
پروپانول	دمای محیط	۴۰	۵۴	۳۷	۵۹	۳/۵
پروپانول	دمای محیط	۵۰	۸۹	۶۴	۵۸	۱۳/۶
پروپانول	دمای محیط	۷۰	۹۲	۲۵	۷۹	۴/۵
پروپانول	دمای محیط	۱۰۰	۸۹	۳۷	۷۰	۵/۹
پروپانول	۴۵C	۵۰	۷۴	۲۷	۷۳	۳/۵

بررسی‌ها نشان داد که هیچ‌کدام از الکل‌ها تاثیر محسوسی بر روند انانتیوگزینی آتزیم ایجاد نمی‌کنند. در حضور متانول، بیشترین مقدار انانتیوگزینی مربوط به مقدار ۵۰ میلی‌گرم بیوکاتالیست در دمای ۴۵°C است که برابر با ۴ است که در مقدار تبدیل برابر با

Volume 10, Issue 3, Summer 2019

۳۶٪ اتفاق افتاده است. این مقدار تفکیک در زمان ۲ ساعت پس از واکنش صورت گرفته است. در حضور اتانول نیز بررسی‌ها با دو مقدار متفاوت بیوکاتالیست صورت گرفت که بهترین نتایج حاصل از انانتیوگزینی مربوط به مقدار ۷۰ میلی گرم بیوکاتالیست بود که مقدار پارامتر E در این شرایط ۳/۹ بوده و مقدار فزونی انانتیومری محصول به ۵۸٪ رسید (نتایج نشان داده نشده‌اند).

اثر حلال و جاذب آب

برای بررسی تاثیر نوع حلال در واکنش آنزیمی استری شدن، و همچنین بررسی تاثیر آن در انانتیوگزینی مشتق تثبیت شده، هگزان نرمال به عنوان حلال در واکنش مورد استفاده قرار گرفت. نتایج به دست آمده حاکی از تاثیر منفی این حلال در پارامترهای این واکنش بود. به گونه ای که بهترین نتیجه مربوط به استفاده از ۵۰ میلی گرم بیوکاتالیست در دمای محیط و پس از گذشت ۲۴ ساعت از ابتدای واکنش بود که مقدار پارامتر E در این شرایط ۲/۷ و درصد تبدیل انانتیومری ۴۷٪ بود.

همچنین با توجه به تولید آب در فرآیند استری شدن و تاثیر زیادی که مولکول های آب در خواص آنزیم می توانند ایفا کنند، تاثیر حذف مولکول های آب تولید شده از محیط واکنش نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور در حین انجام واکنش استریفیکاسیون توسط الکل پروپانول از مولکولارسیو به عنوان جاذب آب استفاده شد. نتایج به دست آمده نشان از تاثیر منفی حذف آب بر پارامترهای گزینش پذیری آنزیم بود. به طوری که در بهترین حالت، در حضور ۵۰ میلی گرم بیوکاتالیست و در دمای محیط میزان پارامتر E پس از گذشت ۴ ساعت از ابتدای واکنش ۱/۳ و پس از ۲۴ ساعت از ابتدای واکنش یک به دست آمد.

نتایج حاصل از تفکیک انانتیوگزین مشتقات مختلف ایبوپروفن به وسیله آنزیم RML تثبیت شده روی بستر Silica-octyl

با توجه به یافته های مربوط به آزمایش قبل، بررسی روی مشتق دیگر تثبیت شده در استریفیکاسیون ایبوپروفن در حضور دو الکل پروپانول و متانول صورت پذیرفت. مطابق انتظار انانتیومر ترجیحی برای استریفیکاسیون توسط این مشتق نیز در همه شرایط انانتیومر S بود. نتایج حاصل از سنتز آنزیمی دو استر ایبوپروفن متانوات و پروپانوات توسط آنزیم تثبیت شده روی بستر Silica-octyl در جدول ۴ ذکر شده است.

همان گونه که جدول بالا نشان می دهد در هر دو الکل استفاده شده مقادیر E تفاوت اندکی با هم دارند که این رفتار با تغییر مقدار آنزیم استفاده شده نیز تغییری پیدا نمی کند. با این حال در شرایط دمای محیط بهترین نتایج از سنتز استر S- ایبوپروفن پروپانوات با مقدار ۷۰ میلی گرم بیوکاتالیست حاصل شده است که مقدار انانتیوگزینی (E) برابر با ۳/۵ و میزان تبدیل برابر با ۷۵٪ است و فزونی انانتیومری ۷۷٪ را نشان می دهد. با افزایش دما به ۴۵°C بیشترین مقدار با ۳/۹ برای سنتز استر متانول پس از ۸ ساعت از ابتدای واکنش با مقدار ۵۰ میلی گرم بیوکاتالیست بوده است. ارزیابی کلی نشان می دهد که آنزیم تثبیت شده روی بستر

سیلیکای عامل دار شده با اکتیل اگرچه دارای سرعت تبدیل بالاتری است اما خواص گزینش پذیری کمتری در مقایسه با آنزیم تثبیت شده روی بستر Silica-octyl-epoxy که در آن تثبیت همزمان کوالانسی و هیدروفوب صورت گرفته است، نشان می دهد.

نتایج حاصل از تفکیک انانتیوگزین مشتقات مختلف ایبوپروفن به وسیله آنزیم RML تثبیت شده روی بستر SBA-octyl

با توجه به این که مورفولوژی بستر استفاده شده نیز ممکن بود بر خواص گزینش پذیری آنزیم اثرگذار باشد، مشتق حاصل از تثبیت هیدروفوب آنزیم روی بستر SBA-octyl نیز در استریفیکاسیون مخلوط راسمیک ایبوپروفن مورد بررسی قرار گرفت.

این بررسی در دماهای محیط ۴۵°C و ۴°C و با مقادیر ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۵۰ میلی گرم آنزیم تثبیت شده صورت گرفت. بهترین نتایج از سنتز استر S- ایبوپروفن پروپانوات بود که در جدول ۵ به آنها اشاره شده است. با توجه به نتایج به دست آمده، با گذشت زمان میزان انانتیوگزینی (E) تغییر محسوسی نکرده است. همچنین بهترین نتیجه در دمای ۴°C مربوط به ۲۰ میلی گرم بیوکاتالیست است که مقدار انانتیوگزینی برابر با ۲/۷ دارد. در این شرایط مقدار فزونی انانتیومری محصول برابر با ۴۱٪ بوده است. همچنین بار دیگر تاثیر منفی کاهش دما بر خواص گزینش پذیری آنزیم استفاده شده ثابت شد.

با افزایش یافتن دما به دمای محیط، رشد قابل توجهی در میزان انانتیوگزینی مشاهده می شود. در این شرایط بهترین میزان پارامتر E مربوط به ۲۰ میلی گرم بیوکاتالیست پس از گذشت زمان ۲۴ ساعت است که برابر با ۴/۱ است که ۵۱٪ فزونی انانتیومری را به همراه داشته است. کاهش و افزایش مقدار آنزیم بر سرعت واکنش اثر گذاشته و میزان انانتیوگزینی آنزیم را تحت تاثیر خود قرار می دهد. به طوری که در مقادیر کمتر و بیشتر از ۲۰ میلی گرم، مقدار E کاهش پیدا کرده است. برای بررسی اثر دمای بالاتر بر گزینش پذیری این مشتق، واکنش استریفیکاسیون در دمای ۴۵°C با مقادیر متفاوتی از بیوکاتالیست انجام شد. اگرچه سرعت واکنش در این دما به نحو چشمگیری افزایش پیدا کرده است و لیکن مقادیر E برای این مشتق نیز اثرات منفی دمای بالا را نشان می دهد. مشابه نتایج به دست آمده، تاثیر منفی دما در خواص کاتالیزوری دیگر مشتقات نیز در بخش های قبلی گزارش شده است.

نتایج حاصل از تفکیک انانتیوگزین مشتقات مختلف ایبوپروفن به وسیله آنزیم RML تثبیت شده روی بستر SBA-octyl-epoxy

آنزیم تثبیت شده روی بستر حاوی دو گروه عاملی هیدروفوب-کوالانسی نتایج مطلوبی از نظر میزان فعالیت، کاهش رهایش آنزیم، پایداری حرارتی و پایداری در برابر حلال های آلی از خود نشان داد. این خواص ارتقایافته در کنار گزینش پذیری احتمالی مشتق به دست آمده، می تواند بیوکاتالیست به دست آمده را از جهات مختلف به بیوکاتالیستی با قابلیت های کاربردی فراوان تبدیل

بوده‌اند. الکل پروپانول نیز برای استریفیکاسیون آنزیمی ایوپروفن در شرایط بهینه به‌دست‌آمده از آزمایش‌های قبلی مورد استفاده قرار گرفت که نتایج آن در جدول ۶ گزارش شده است.

همان‌طور که مشاهده می‌شود نتایج حاصل از سنتز استر پروپانول در دمای محیط مطلوب‌تر از استر متانول بوده است. در این شرایط برای مقدار ۵۰ میلی‌گرم آنزیم میزان پارامتر E برابر با ۱۰/۱ است که نشان می‌دهد با افزایش مقدار بیوکاتالیست شرایط انانتیوگزینی مطلوب‌تر شده است. مقدار فزونی انانتیومری ماده اولیه نیز در این حالت ۹۹٪ به دست آمده است. این واکنش در دمای ۴۵°C هم مورد بررسی قرار گرفت که نتایج به‌دست‌آمده حاکی از اثر منفی دما بر انانتیوگزینی مشتق استفاده‌شده بود.

نماید. از این رو همانند دیگر بیوکاتالیست‌ها، خواص گزینش‌پذیری این مشتق نیز در استریفیکاسیون مخلوط راسمیک‌ایوپروفن در حضور دو الکل پروپانول و متانول مورد ارزیابی قرار گرفت.

ابتدا این مشتق در استریفیکاسیون بروفن در حضور متانول و در حلال ایزواکتان در دماهای محیط ۴°C و ۴۵°C با مقادیر ۳۰ و ۵۰ میلی‌گرم بیوکاتالیست مورد بررسی قرار گرفت. در همه دماها میزان تبدیل با سرعت بالایی انجام شد و بیشترین مقدار پارامتر E مربوط به ۵۰ میلی‌گرم بیوکاتالیست در دمای محیط است که برابر با ۵/۵ بوده و فزونی انانتیومری ۸۸٪ برای ماده اولیه را ایجاد کرده است. در بقیه شرایط مقادیر به‌دست‌آمده برای E مشابه هم

جدول ۳) نتایج سنتز استر متانول به‌وسیله آنزیم RML تثبیت‌شده روی بستر Silica-octyl-epoxy در حلال ایزواکتان

نوع الکل	دمای واکنش	بیوکاتالیست (میلی‌گرم)	فزونی انانتیومری ماده اولیه (%)	فزونی انانتیومری محصول (%)	درصد تبدیل	E
متانول	دمای محیط	۵۰	۴۰	۴۳	۴۹	۳/۶
متانول	دمای محیط	۷۰	۶۳	۴۴	۵۹	۳/۸
متانول	۴۵°C	۵۰	۱۷	۷۰	۱۹	۲/۹
متانول	۴۵°C	۷۰	۲۲	۴۰	۳۶	۴

جدول ۴) نتایج سنتز استر پروپانول و متانول به‌وسیله آنزیم RML تثبیت‌شده روی بستر Silica-octyl در حلال ایزواکتان

نوع الکل	دمای واکنش	بیوکاتالیست (میلی‌گرم)	فزونی انانتیومری ماده اولیه (%)	فزونی انانتیومری محصول (%)	درصد تبدیل	E
پروپانول	دمای محیط	۵۰	۲۰	۴۵	۳۱	۳/۲
پروپانول	دمای محیط	۷۰	۷۷	۲۵	۷۵	۳/۵
پروپانول	۴۵°C	۵۰	۳۰	۴۰	۴۳	۳/۱
پروپانول	۴۵°C	۷۰	۳۸	۴۱	۵۴	۳/۱
متانول	دمای محیط	۵۰	۲۱	۴۹	۳۰	۳/۶
متانول	دمای محیط	۷۰	۶۴	۲۹	۶۹	۳/۲
متانول	۴۵°C	۵۰	۲۶	۵۱	۳۴	۳/۹
متانول	۴۵°C	۷۰	۲۴	۴۰	۳۸	۲/۹

جدول ۵) نتایج سنتز استر پروپانول به‌وسیله آنزیم RML تثبیت‌شده روی بستر SBA-octyl در حلال ایزواکتان

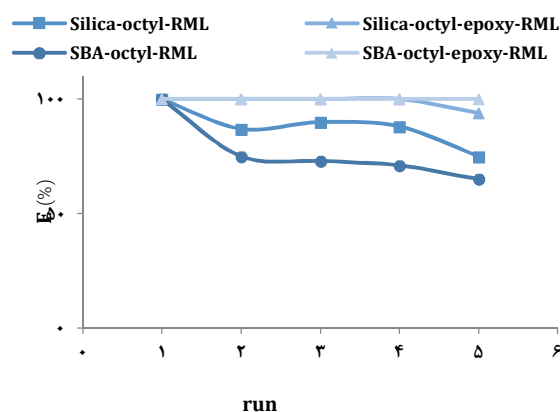
نوع الکل	دمای واکنش	بیوکاتالیست (میلی‌گرم)	فزونی انانتیومری ماده اولیه (%)	فزونی انانتیومری محصول (%)	درصد تبدیل	E
پروپانول	۴°C	۱۰	۲	۳۵	۶	۲/۱
پروپانول	۴°C	۲۰	۱۳	۴۱	۲۴	۲/۷
پروپانول	۴°C	۳۰	۱۸	۳۱	۳۷	۲/۲
پروپانول	۴°C	۵۰	۲۱	۱۰	۷	۱/۵
پروپانول	دمای محیط	۱۰	۱۷	۵۰	۲۶	۳/۵
پروپانول	دمای محیط	۲۰	۵۳	۴۲	۵۵	۴/۱
پروپانول	دمای محیط	۳۰	۵۵	۱۷	۷۶	۳/۳
پروپانول	دمای محیط	۵۰	۷۰	۹	۸۸	۲/۱
پروپانول	۴۵°C	۱۰	۲۵	۴۲	۳۱	۲/۲
پروپانول	۴۵°C	۲۰	۱۸	۳۷	۳۳	۲/۶
پروپانول	۴۵°C	۳۰	۲۶	۳۸	۴۱	۲/۹
پروپانول	۴۵°C	۵۰	۳۶	۳۵	۵۰	۲/۹

جدول ۶) نتایج سنتز استر متانول به‌وسیله آنزیم RML تثبیت‌شده روی بستر SBA-octyl-epoxy در حلال ایزواکتان

نوع الکل	دمای واکنش	بیوکاتالیست (میلی‌گرم)	فزونی انانتیومری ماده اولیه (%)	فزونی انانتیومری محصول (%)	درصد تبدیل	E
پروپانول	دمای محیط	۳۰	۹۹	۲۵	۷۹	۸/۵
پروپانول	دمای محیط	۵۰	۹۹	۳۵	۷۴	۱۰/۱
پروپانول	۴۵°C	۳۰	۳۴	۱۴	۷۱	۱/۸
پروپانول	۴۵°C	۵۰	۵۰	۱۱	۸۳	۱/۸

استفاده چندباره از مشتقات تثبیت شده در سنتز انانتیوگزین استر پروپانول

نگرانی اصلی از واکنش های آنزیمی در مقیاس صنعتی هزینه های بالای آنزیم ها است که معمولاً بیشتر از قیمت کل یک فرآیند است. تولید یک بیوکاتالیست ناهمگن از طریق تثبیت آنزیم بر بستر جامد جذاب ترین استراتژی است که اجازه می دهد تا از آنزیم به طور مکرر استفاده کرده و در نتیجه موجب کاهش هزینه تولیدات صنعتی خواهد شد که توسط آنزیم ها کاتالیز می شوند. همان طور که اشاره شد یکی از مزایای اقتصادی تثبیت آنزیم توانایی به کار بردن چندین باره مشتقات تثبیت شده در واکنش های شیمیایی است. به منظور بررسی قابلیت استفاده مجدد مشتقات به دست آمده و از آنجایی که بهترین نتایج انانتیوگزینی از استر پروپانول به دست آمده بود، از آنها در واکنش سنتز انانتیوگزین استر پروپانول برای پنج چرخه استفاده شد. پس از هر چرخه که به مدت ۲۴ ساعت به طول انجامید، بیوکاتالیست استفاده شده توسط سانتریفیوژ جدا شد و پس از شست و شو با ایزواکتان مجدداً برای یک واکنش جدید تحت همان شرایط مورد استفاده قرار گرفت. پارامتر E چرخه اول واکنش ۱۰۰٪ در نظر گرفته شد و فعالیت بیوکاتالیست در واکنش های پس از آن بر همین اساس محاسبه شد. همان طور که نمودار ۱ نشان می دهد، مشتقات بعد از پنج سیکل واکنش در حدود ۶۵-۱۰۰٪ فعالیت خود را حفظ کرده اند. نتایج نشان داد مشتقات حاوی هر دو عامل اکتیل و اپوکسی به طور موثرتری موجب بهبود بیوکاتالیست و حفظ فعالیت آنزیم در مقایسه با نتایج به دست آمده از مشتقات حاصل از یک گروه عاملی اکتیل شده است. مناسب ترین نتیجه از واکنش سنتزی استر توسط SBA-octyl-epoxy با حفظ ۱۰۰٪ فعالیت آنزیم پس از پنج سیکل مشاهده شد (نمودار ۱).



نمودار ۱ اثر استفاده چندباره مشتقات تثبیت شده بر فعالیت بیوکاتالیست در واکنش سنتز انانتیوگزین استر پروپانول ایوپروپون

از محدودیت های مطالعه حاضر می توان به عدم توانایی مشتقات تثبیت شده در هیدرولیز استرها به صورت انانتیوگزین اشاره کرد که

خود موجب افزایش مراحل واکنش و تحمیل هزینه های بیشتر به آن می شود. برای غلبه بر این مشکل پیشنهاد می شود که از روش های دیگری برای تثبیت آنزیم روی مواد سیلیکاتی استفاده شود.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از تفکیک انانتیوگزین استرهای ایوپروپون نشان داد که هیدرولیز انانتیوگزین استرها توسط بیوکاتالیست های سنتز شده منجر به نتایج ضعیفی شده و عملاً بیوکاتالیست های مورد نظر کارایی مناسبی در این نوع واکنش نداشتند. از این رو سنتز استرها با استفاده از الکل های مختلف و در شرایط گوناگون مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان می داد که این روش بسیار کارآمدتر از روش قبلی بوده و منجر به تفکیک مناسب و انانتیوگزین انانتیومرهای ایوپروپون می شود. بهترین پارامتر انانتیوگزینی هم متعلق به واکنش هایی بود که در آنها از پروپانول به عنوان الکل استفاده شد. همچنین مشتق بیوکاتالیستی که از تثبیت آنزیم روی بستر هیدروفوب حاصل شد اگرچه دارای سرعت بالا در واکنش استریفیکاسیون بود و لیکن در همه شرایط منجر به تفکیک انانتیومری نسبتاً پایین شد. در این شرایط بیوکاتالیست های دارای دو گروه عاملی اکتیل و اپوکسی بهترین عملکرد را در تفکیک انانتیوگزین انانتیومرهای ایوپروپون نشان داده و عمدتاً منجر به انانتیوگزینی بالاتری نسبت به دیگر مشتقات شدند. همچنین با در نظر گرفتن پارامتر انانتیوگزینی، انجام واکنش در دمای محیط مناسب تر از سایر دماها بود که خود از نظر اقتصادی و مصرف انرژی نیز بسیار مقرون به صرفه است. نتایج حاصل از مصرف چندباره بیوکاتالیست ها نیز به عنوان مولفه ای تاثیرگذار ارزش اقتصادی واکنش مورد بررسی قرار گرفت که نتایج به دست آمده حاکی از قابلیت بالای مشتقات به دست آمده در استفاده مجدد در این واکنش بود.

تشکر و قدردانی: نویسندگان مقاله از حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران کشور قدردانی و تشکر می نمایند.

تأییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می دارند که هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: مهدی محمدی (نویسنده اول)، پژوهشگر اصلی (۴۰٪)؛ علی رضائی (نویسنده دوم)، روش شناس/پژوهشگر اصلی/نویسنده بحث (۳۵٪)؛ مریم گرمودی (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی (۱۱٪)؛ مریم یوسفی (نویسنده چهارم)، پژوهشگر کمکی (۱۰٪)؛ امیر یزدی (نویسنده پنجم)، نگارنده مقدمه (۲٪)؛ کسری اصفهانی (نویسنده ششم)، نگارنده مقدمه (۲٪)

منابع مالی: مطالعه حاضر تحت حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران کشور بوده است.

- M. Covalent immobilization of *Candida antarctica* lipase on core-shell magnetic nanoparticles for production of biodiesel from waste cooking oil. *Renew Energy*. 2017;101:593-602.
- 12- Sheldon RA. Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. *Adv Synthesis Catalysis*. 2007;349(8-9):1289-307.
- 13- Ghourchian H, Moulai Rad A, Elyasvandi H. A conductometric urea biosensor by direct immobilization of urease on Pt electrode. *Iran J Chem Chem Eng*. 2004;23(2):55-63.
- 14- Alemzadeh I, Nejati S. Removal of phenols with encapsulated horseradish peroxidase in calcium alginate. *Iran J Chem Chem Eng*. 2009;28(2):43-9.
- 15- Garcia-Galan C, Berenguer-Murcia Á, Fernandez-Lafuente R, Rodrigues RC. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. *Adv Synthesis Catalysis*. 2011;353(6):2885-904.
- 16- Bastida A, Sabuquillo P, Armisen P, Fernandez-Lafuente R, Huguet J, Guisan JM. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnol Bioeng*. 1998;58(5):486-93.
- 17- Mohammadi M, Ashjari M, Garmroodi M, Yousefi M, Karkhane AA. The use of isocyanide-based multicomponent reaction for covalent immobilization of *Rhizomucor miehei* lipase on multiwall carbon nanotubes and graphene nanosheets. *RSC Adv*. 2016;6(76):72275-85.
- 18- Garmroodi M, Mohammadi M, Ramazani A, Ashjari M, Mohammadi J, Sabour B, et al. Covalent binding of hyper-activated *Rhizomucor miehei* lipase (RML) on hetero-functionalized siliceous supports. *Int J Biol Macromol*. 2016;86:208-15.
- 19- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.
- 1- Brugger R, Alía BG, Reichel C, Waibel R, Menzel S, Brune K, et al. Isolation and characterization of rat liver microsomal R-ibuprofenoyl-CoA synthetase. *Biochem Pharmacol*. 1996;52(7):1007-13.
- 2- Habibi Z, Mohammadi M, Yousefi M. Enzymatic hydrolysis of racemic ibuprofen esters using *Rhizomucor miehei* lipase immobilized on different supports. *Proc Biochem*. 2013;48(4):669-76.
- 3- Wang Y, Hu Y, Xu J, Luo G, Dai Y. 2007. Immobilization of lipase with a special microstructure in composite hydrophilic CA/hydrophobic PTFE membrane for the chiral separation of racemic ibuprofen. *J Membr Sci*. 2007;293(1-2):133-41.
- 4- Hongwei Y, Jinchuan W, Chi Bun C. Kinetic resolution of ibuprofen catalyzed by *Candida rugosa* lipase in ionic liquids. *Chirality*. 2005;17(1):16-21.
- 5- Lievano R, Pérez HI, Manjarrez N, Solís A, Solís-Oba M. Hydrolysis of ibuprofen nitrile and ibuprofen amide and deracemisation of ibuprofen using *Nocardia corallina* B-276. *Molecules*. 2012;17(3):3148-54.
- 6- Adams SS, Bresloff P, Mason CG. Pharmacological differences between the optical isomers of ibuprofen: evidence for metabolic inversion of the (-)-isomer. *J Pharm Pharmacol*. 1976;28(3):256-7.
- 7- Arellano U, Shen JM, Wang JA, Timko MT, Chen LF, Rodríguez JTV, et al. Dibenzothiophene oxidation in a model diesel fuel using CuO/GC catalysts and H₂O₂ in the presence of acetic acid under acidic condition. *Fuel*. 2015;149:15-25.
- 8- Chávez-Flores D, Salvador JM. Commercially viable resolution of ibuprofen. *Biotechnol J*. 2009;4(8):1222-4.
- 9- José C, Toledo MV, Briand LE. Enzymatic kinetic resolution of racemic ibuprofen: past, present and future. *Crit Rev Biotechnol*. 2016;36(5):891-903.
- 10- Jaeger KE, Eggert T. Lipases for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol*. 2002;13(4):390-7.
- 11- Mehrasbi MR, Mohammadi J, Peyda M, Mohammadi