

بررسی پایداری آنزیم لیپاز تثبیت شده بر روی غشای بسپاری اصلاح شده با نانوصفحه‌های

فرانک جعفریان^{۱*}، عبدالخالق بردبار^{۲*}

۱- دانش‌آموخته دکتری، شیمی فیزیک، گروه شیمی فیزیک، دانشکده شیمی، دانشگاه اصفهان، رایانامه: faranak.jafarian@gmail.com

۲- استاد، شیمی فیزیک، گروه شیمی فیزیک، دانشکده شیمی، دانشگاه اصفهان، رایانامه: akbordbar@gmail.com

واژگان کلیدی: تثبیت آنزیم، لیپاز کاندیدا روگوسا، پایداری، نانوصفحه‌های گرافن اکسید، واکنشگاه غشایی ترکیبی آنزیم

۱- مقدمه

لیپازها یکی از پرکاربردترین آنزیم‌های محلول در آب از گروه هیدرولازها هستند که آبکافت پیوند استری را در تری آسیل گلیسرول‌ها برای تولید دی‌گلیسرید، مونوگلیسرید، اسید چرب و گلیسرول کاتالیز می‌کنند. آنزیم لیپاز از کاندیدا روگوسا به دلیل فعالیت بالا و قیمت مناسب آن نسبت به بقیه منابع آنزیم لیپاز از توجه ویژه‌ای برخوردار است و در صنایع مختلفی همچون مواد غذایی، لوازم آرایشی و بهداشتی، سوخت‌های زیستی و مواد شوینده و داروسازی مورد استفاده قرار می‌گیرد (ریبیرو، ۲۰۱۱). از سوی دیگر، هزینه‌های بالای تولید و کاهش فعالیت آن در برابر مخلوط واکنش از مهم‌ترین محدودیت‌های کاربرد آن در صنعت است. اغلب تثبیت آنزیم بر روی یک بستر مناسب می‌تواند سبب جداسازی آسان آنزیم از مخلوط واکنش، کاهش آلودگی آنزیم در فرآورده (ها) و افزایش تولید مواد با درصد خلوص بالاتر، استفاده مجدد از آنزیم، افزایش سطح تماس آنزیم با مواد اولیه، جلوگیری از تجمع آنزیم، افزایش پایداری ساختار سه‌بعدی آنزیم و جلوگیری از غیرفعال شدن آنزیم در شرایط محیطی سخت دما و pH شود (محمد، ۲۰۱۵). از این رو برای بهینه‌سازی کارکرد عملیاتی این آنزیم، در این پژوهش، از غشای بسپاری ترکیبی با نانوصفحه‌های گرافن اکسید به عنوان بستری برای تثبیت آنزیم لیپاز از کاندیدا روگوسا استفاده گردیده است. شایان ذکر است که در این مطالعه از اختصارهای GON، PES، CRL، EHMR، p-NPP و p-NP به ترتیب برای نانوصفحه‌های گرافن اکسید، پلی اتر سولفون، لیپاز کاندیدا روگوسا، واکنشگاه غشایی ترکیبی آنزیم، پارانیتر و فنیل پالمیتات و پارانیتر و فنول استفاده شده است.

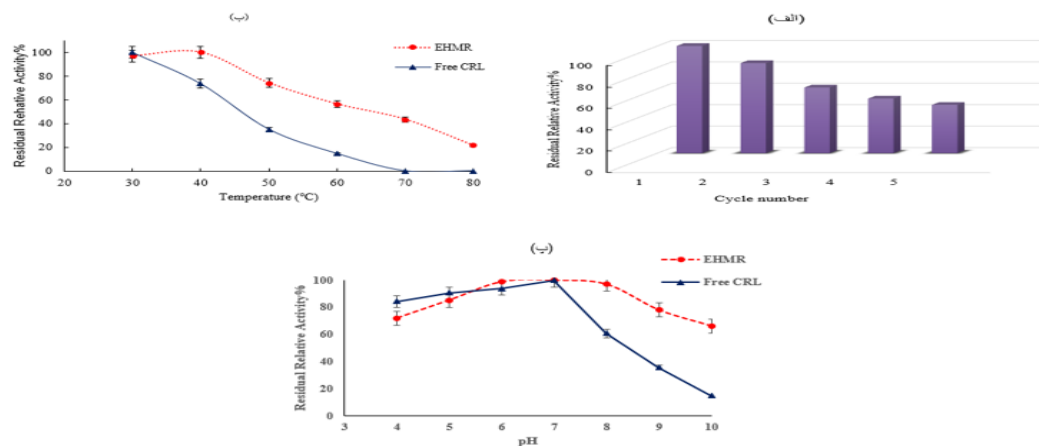
۲- روش کار

در این پژوهش، غشاهای ترکیبی از آمیختن درصد‌های مختلف GON سنتز شده به روش اصلاح‌شده‌ی هامر، با محلول PES و از طریق روش وارونگی فاز تهیه و برای تثبیت CRL مورد استفاده قرار گرفت. ترکیب شیمیایی، مورفولوژی سطح و عملکرد غشای ترکیبی و EHMR از طریق روش‌های مختلف همچون ATR-IR، XRD، AFM، اندازه‌گیری زاویه تماس، انرژی آزاد سطح، شار عبوری آب خالص و شار عبوری p-NP حاصل از واکنش آبکافت p-NPP در حضور آنزیم لیپاز بررسی شدند. برای دستیابی به واکنشگاه غشایی ترکیبی آنزیمی کارا، درصد GON در غشای ترکیبی، مقدار اولیه آنزیم، زمان تثبیت و شرایط نگهداری EHMR بهینه گردیدند. پس از آن قابلیت استفاده مجدد، پایداری pH و حرارتی EHMR مورد بررسی قرار گرفت.

۳- بحث

در شکل ۱- الف قابلیت استفاده مجدد از EHMR، در پنج چرخه نشان داده شده است. چنانچه ملاحظه می‌شود، بعد از پنج بار استفاده مجدد، فعالیت باقیمانده نسبی آنزیم تثبیت شده ۴۵/۰۳٪ است. این موضوع می‌تواند به مناسب بودن محیط غشا برای فعالیت آنزیم و رهایش کم‌تر آنزیم از این بستر نسبت داده شود. در شکل ۱- ب، نتایج حاصل از بررسی پایداری حرارتی EHMR و آنزیم آزاد در محدوده دمایی ۳۰ تا ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد آورده شده است. همان‌طور که مشاهده

می‌شود، فعالیت آنزیم آزاد با افزایش دمای شوک، با سرعت کاهش می‌یابد. درحالی‌که، برای آنزیم تثبیت‌شده، میزان کاهش فعالیت به‌مراتب کمتر بوده و حتی در محدوده ۳۰ تا ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، کاهش‌ی مشاهده نمی‌گردد. به‌طوری‌که در شوک دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد، ۴۳/۵۴ درصد از بیشینه فعالیت خود را حفظ کرده‌اند. درحالی‌که، آنزیم آزاد فعالیت خود را به‌طور کامل ازدست داده است. به نظر می‌رسد که برهم‌کنش‌های CRL با غشا اثر حفاظتی بیش‌تری بر روی ساختار سه‌بعدی CRL داشته و مقاومت آن را در برابر شوک حرارتی افزایش داده است. همان‌طور که در شکل ۱- پ دیده می‌شود، به‌منظور مقایسه، نتایج حاصل از بررسی پایداری در برابر تغییر pH، آنزیم آزاد و EHMR در گستره pH از ۴ تا ۱۰ آورده شده است. بیشینه باقیمانده فعالیت برای آنزیم آزاد و EHMR در pH = ۷ مشاهده گردید. با وجود آن که پایداری آنزیم آزاد در گستره pH اسیدی ۴ تا ۵/۵ بیش‌تر است، اما در pH بالاتر از ۷، پایداری آن به‌شدت کاهش می‌یابد. به‌طوری‌که، بعد از اعمال شوک در pH=۱۰، باقیمانده فعالیت آن به ۱۴/۳۷ درصد مقدار بیشینه فعالیت می‌رسد. با بررسی در کل محدوده pH، درمجموع می‌توان ادعا نمود که عملکرد غشا ترکیبی بهتر بوده و سبب پایداری بیش‌تری در آنزیم تثبیت‌شده گردیده است. از آنجایی که پایداری در مقابل شوک pH، به میزان برگشت‌پذیری ساختار CRL در اثر تغییر حالت یونیزاسیون گروه‌های یونیزه‌شونده آنزیم برمی‌گردد، می‌توان این گونه نتیجه‌گیری کرد که برهم‌کنش غشا و آنزیم به نحو مؤثرتری ساختار سه‌بعدی آنزیم را از تغییرات القائی حاصل از تغییر pH، حفظ نموده است.



شکل ۱- الف- قابلیت استفاده مجدد از EHMR-ب- مقایسه پایداری حرارتی آنزیم آزاد CRL و EHMR -پ- مقایسه پایداری آنزیم آزاد CRL و EHMR در برابر تغییر pH.

۵- نتیجه‌گیری

در این مطالعه، غشاهای ترکیبی حاوی درصد‌های وزنی مختلف از نانو صفحات گرافن اکسید تهیه و مشخصه‌یابی شدند. مشخصه‌یابی این غشاها از طریق روش‌های مختلف، بهبود ویژگی‌هایی مثل افزایش آب‌دوستی سطح، افزایش زبری سطح، افزایش انرژی آزاد سطح و افزایش شار آب خالص را نشان داد. در ادامه درصد نانو صفحه‌های گرافن اکسید در غشای ترکیبی، مقدار اولیه آنزیم، زمان تثبیت و بالاخره شرایط نگهداری واکنشگاه غشای ترکیبی آنزیمی بهینه گردیدند. نتایج بررسی قابلیت استفاده مجدد و پایداری در مقابل شوک pH و دما نشان‌دهنده آن است که این غشای ترکیبی می‌تواند بستر مناسبی برای تثبیت آنزیم باشد.

منابع و مراجع

- [1] Ribeiro, B.D., et al., (2011). Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. *Enzyme research*, 2011:615803.
- [2] Mohamad, N.R., et al. (2015). An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(2): 205-220.