# تاثیر برخی پارامترهای فیزیکو–شیمایی بر تثبیت آنزیم پراکسیداز لیپیدیوم درابا بر بستر آلی فلزی MOF Zn_Ta

**درنا دهقانی[1]، جناب آقای مجتبی مرتضوی[2]، علی ریاحی[3]، مسعود ترک زاده ماهانی[4]، قاسم سرگزی[5]**

1- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران

2- استادیار گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران

3- دانشیار، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کوثر بجنورد، بجنورد، ایران

4- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران

5- استادیار، استادیار نانوتکنولوژی، مرکز تحقیقات بیماری‌های غیرواگیر، دانشگاه علوم پزشکی بم

**Email:do.dehghani@gmail.com**
**Email: mortezavimm@gmail.com**
**Email: riahi.ali@gmail.com**
**Email: mtmahani@gmail.com**
**Email: g.sargazi@gmail.com**

## چکیده

**آنزیم ها از جمله آنزیم لیپیدیوم درابا کاربردهای مختلفی در صنعت و پز شکی دارند و علاوه بر این آنزیم ها ن سبت به دما، PH و.... ح ساس هستند باید به دنبال راهی برای افزایش پایداری آنزیم و مقاوم کردن آن ها در شرایط سخت بود.**
**یکی از راه های افزایش پایداری آنزیم ها تثبیت کردن آن ها بر چهارچوب های آلی_ فلزی می باشد.**
**در این مطالعه به برر سی بازده تثبیت آنزیم لیپیدیوم درابا بر MOF Zn_Ta پرداخته شده و در شرایط PH خنثی، ن سبت یک MOF به آنزیم و بازه 15دقیقه انکوبه بیشترین بازده مشاهده شد.**

**کلمات کلیدی: تثبیت آنزیم، بازده تثبیت، چهارچوب آلی_فلزیZn_Ta**

## 1.مقدمه

تثبیت آنزیم جهت ساخت اندام های مصنوعی، حسگرهای زیستی یا بیوراکتورها طراحی شده است. تثبیت آنزیم به دلایل زیر کارایی زیادی داشته است:

الف) با محافظت از ماده فعال در برابر غیرفعال شدن، پایداری آنزیم را افزایش می دهد.
ب) استفاده مکرر را امکان پذیر می کند.
ج) کاهش قابل توجهی در هزینه های عملیاتی را فراهم می کند.
د) جداسازی آسان آنزیم را تسهیل و بازیابی آنزیم را سرعت می بخشد[1].

تثبیت آنزیم ها بر بسترهای نامحلول در حوزه ی فناوری آنزیم مورد مطالعه قرار گرفته و در فرآیندهای صنعتی کاربرد دا شته ا ست. تعداد زیادی از آنزیم ها با بازده فعالیت بسیار بالا بر بسترهای مناسب با موفقیت تثبیت شده اند[1].
برای تثبیت آنزیم ترکیبات مختلفی مانند نانوذرات، میکروسفرهاmicrosphere، کپسول هاو..... وجود دارد که در میان آن ها میکروسفرهای متخلخل دارای مزایای بسیاری به عنوان حامل دارا هستند که میتوان به شرح زیر نام برد [2]:
الف) ساختار متخلخل بسیار تو سعه یافته میکرو سفرها، سطح ویژه آنها را افزایش داده و به میکرو سفرها اجازه می دهد تا بار آنزیمی بالایی داشته باشند[3].
ب) ساختار منافذ توسعه‌یافته در میکروسفرها می‌تواند به طور موثر سبب انتقال سریع بستر و محصولات، کاهش مهار انتقال جرم و فعالیت کاتالیزوری آنزیم‌ها را افزایش دهد[4].
ج) منافذ منحصر به فرد میکروسفرها، محیط مطلوبی را به آنزیم فراهم کرده و موجب پایداری آن میشود.
د) میتوان بصورت همزمان چندین آنزیم را روی آن ها تثبیت کرد[4].

آنزیم پراکسیداز ترب کوهی (دهنده: پراکسید هیدروژن اکسیدو ردوکتاز EC: 1.11.1.7)، HRPیک آنزیم همه کاره است که در صنایع شیمیایی، زیست محیطی، دارویی و بیوتکنولوژیکی جهت تثبیت آنزیم کاربرد دارد [5]. آنزیم لیپیدیوم درابا پراکسیداز (LDP)یک آنزیم گیاهی متعلق به گروه III پراکسیداز های گیاهی است که تقریباً 88.96٪ به آنزیم horseradish peroxidase C1A (HRP C1A) شباهت دارد[6].

## 2. مواد و روش ها

مواد استفاده شده :سویه ی باکتری E. coli BL21 (DE3) موجود در دانشگاه تحصیلات تکمیلی فناوری و صنعتی کرمان برای تولید آنزیم لیپیدیوم درابا، برای تخلیص و خالص سازی آنزیم از رزین Ni-NTA agarose، خریداری شده از شرکت اینویتروژن آمریکایی استفاده شد.

موادی همچون: همین، کانامایسین، TMB، H2O2،KH2PO4،K2HPO4 از شرکت مرک آلمان خریداری شد.

**a. کشت و بیان آنزیم لیپیدیوم درابا:**

برای کشت باکتری حاوی ژن آنزیم لیپیدیوم درابا ابتدا محیط کشت جامد آگار تهیه و باکتری را بصورت چمنی کشت داده و به مدت 24 ساعت در انکوباتور در دمای 37درجه ی سانتی گراد نگهداری شد. پس از رشد باکتری ها در محیط جامد دو الی سه کلنی از باکتری ها را به کمک لوپ به محیط کشت مایع LB انتقال داده و 16 ساعت در انکوباتور با دمای 37 درجه نگداری شد.

سپس 1000 میکرولیتر از محیط حاوی باکتری کشت داده شده به ارلن حاوی 1لیتر محیط کشت LB انتقال داده و در انکوباتور با دمای 37درجه نگهداری و پس از رسیدن OD به 0.6_0.8 ترکیبات دیگر شامل CaCl2،Heme و IPTG افزوده و در انکوباتور با دمای 18 درجه ی سانتی گراد به مدت 7 ساعت نگه داشته و پس از آن سانتریفیوژ شده و محلول رویی دور ریخته و رسوب حاصل برای تخلیص آنزیم در منفی 80 درجه سانتی گراد نگهداری شد.

**b. تخلیص آنزیم:**

برای تخلیص آنزیم رسوب حاصل شده را با ماده ی لیزکننده ترکیب و سونیکیت شده تا دیواره ها ازبین رفته و آنزیم خارج شود.

پس از آن به مدت 40 دقیقه محلول را سانتریفیوژ و در نهایت محلول رویی ایجاد شده بر روی ستون حاوی رزین نیکل که دم های هیستیدینی دارد انتقال داده و به مدت نیم ساعت هر دو دقیقه یک مرتبه پمپ را به مدت دو دقیقه روشن میکنیم تا محلول در بین رزین قرارگرفته و به دم های هیستیدینی متصل شود و پس از 30 دقیقه از 5 محلول با غلظت های مختلف ایمیدازول برای تخلیص آنزیم استفاده شد.

**c. تثبیت آنزیم:**

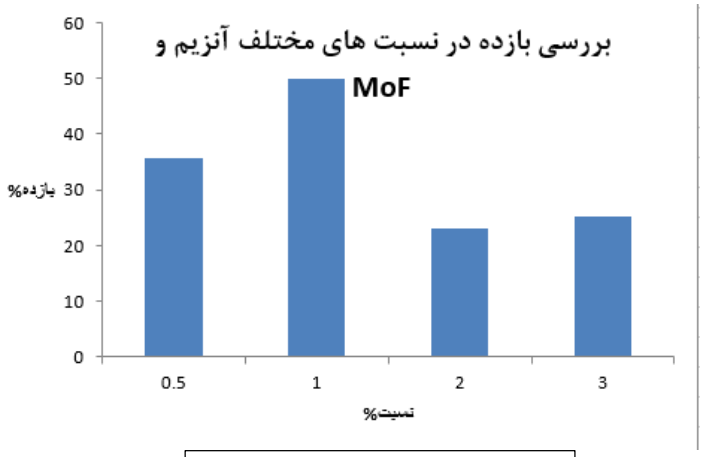
d. برای تثبیت آنزیم، از نسبت های مختلفی از آنزیم و MOF (0.5، 1، 2 و 3 درصد) در شرایط مختلف Ph(5,6,7,8)، دما(20، 30، 40 و 50 درجه سانتی گراد)، زمان (7.5، 15، 30 و 60 دقیقه) ، در بافر فسفات متشکل از KH2PO4 و K2HPO4 با سه مرتبه تکرار بررسی و بازده تثبیت بررسی شد.

## 3. بحث و نتیجه:

**i. بررسی نسبت های آنزیم به MOF در بازده تثبیت:**

اولین مرحله برای بررسی عمل تثبیت یافتن نسبتی از آنزیم و MOF می باشد که در آن نسبت بیشترین بازده مشاهده شود. برای بررسی این مورد در بافرفسفات با PH7، غلظت های 0.5، 1، 2 و3 ازMOF سونیکیت شده را با آنزیم ترکیب شده و تحت شرایط یکسان انکوبه و بازده بررسی شد. همان طور که در شکل یک دیده می شود بازده تثبیت در نسبت 0.5درصد(35٪)، نسبت یک(50٪)،

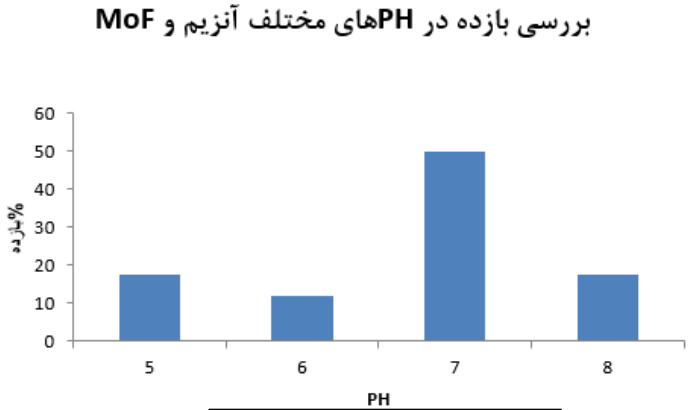
نسبت2(26٪) و نسبت سه(305) می باشد که افزایش نسبت MOF به آنزیم در ابتدا با افزایش بازده تثبیت نیز افزایش می یابد اما بعد از نسبت یک بجای افزایش بازده کاهش بازده مشاهده می شود.
بنابراین در نسبت یک با بازده 50درصد بهترین نقطه ی برای عمل تثبیت به شمار می رود.




شکل یک: بازده تثبیت در نسبت های مختلف MOF به آنزیم

### ii. بررسی PH در بازده تثبیت:

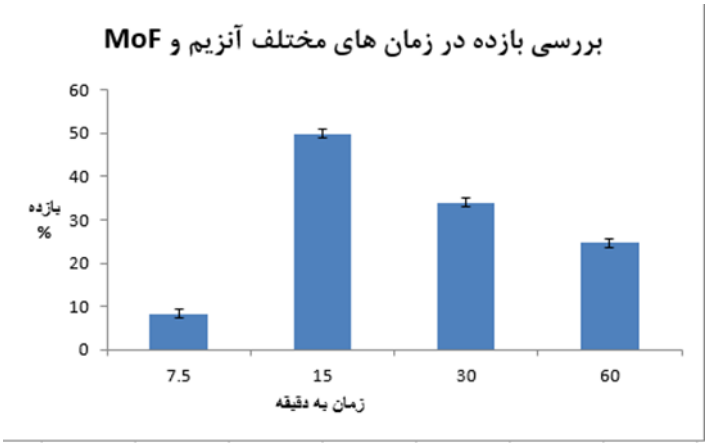
همان طور که در شکل دو مشاهده می شود، بازده تثبیت در PH5(18٪)، در PH6(10٪)، در PH7(50٪) و در PH8(19٪) می باشد. در PH7 به دلیل خنثی بودن و در نتیجه حذف بارهای احتمالی محیط، اتصال فیزیکی آنزیم و MOF بهتر صورت پذیرفته است.




شکل دو: بازده تثبیت آنزیم در PH های مختلف

### iii. بررسی زمان در بازده تثبیت:

همان طور که مشاهده می شود، پس از 7.5دقیقه انکوبه شده بازده تثبیت (9٪)، 15دقیقه( 50٪)، 30 دقیقه(32٪) و 60 دقیقه(28٪) می باشد. براساس شکل سه می توان بیان کرد بازده تثبیت ابتدا با افزایش زمان انکوبه افزایش و سپس با افزایش زمان انکوبه کاهش می یابد. می توان نتیجه گرفت که افزایش زمان بیش از حد شیکر شدن می تواند اتصالات فیزیکی آنزیم و MOF را بشکند و در نهایت بازده تثبیت کاهش یابد.




شکل سه: بازده تثبیت در بازه های زمانی

وانگ و همکاران در سال 2011 به بررسی تثبیت کووالانسی Rhizobium etli CFN42 زایلیتول دهیدروژناز نوترکیب بر روی نانوذرات سیلیس اصلاح شده پرداختند. آن ها به این نتیجه رسیدند که تثبیت بر نانوذرات سیلیسی مشتق شده با اپوکسی بیشترین بازده(92درصد) را دارا می باشد[7]

فرهادی و همکاران در سال 2021 به بررسی تثبیت آنزیم لیپیدیوم درابا بر چهارچوب آلی_فلزی Zn پرداختند و به بازده تثبیت 93درصدی رسیدند[8]

براساس مطالعات و بررسی های انجام شده تثبیت آنزیم یکی از مسائل مهم در مبحث آنزیمی به شمار می رود. بنابراین باید به دنبال راه های تثبیت آنزیم با کمترین هزینه و بیشترین بازده بود.

چهارچوب های آلی_ فلزی بدلیل دارابودن منافذ و متخلل بودن بیشتر گزینه ی مناسبی برای تثبیت آنزیم ها می باشد که اتصال فیزیکی بدون پرداخت هزینه های دیگر میتوان ای اتصال صورت گیرد.

## 4. مراجع

.1 Akgöl, S., et al., *Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized onto novel magnetic polyvinylalcohol microspheres.* Food Chemistry, 2001. **74**(3): p. 281-288.

.2 Chao, C., et al., *Natural nanotube-based biomimetic porous microspheres for significantly enhanced biomolecule immobilization.* Acs sustainable chemistry & engineering, 2014. **2**(3): p. 396-403.

.3 Han, P., et al., *Facile preparation of porous magnetic polydopamine microspheres through an inverse replication strategy for efficient enzyme immobilization.* Journal of Materials Chemistry B, 2015. **3**(36): p. 7194-7202.

.4 Liang, H., et al., *Co-immobilization of multiple enzymes by metal coordinated nucleotide hydrogel nanofibers: Improved stability and an enzyme cascade for glucose detection.* Nanoscale, .2016 :(11)8p. 6071-6078.

.5 Forgiarini, E. and A.A.U. de Souza, *Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP).* Journal of Hazardous Materials, 2007. **147**(3): p. 1073-1078.

.6 Fattahian, Y., et al., *Heterologous expression, purification and characterization of a peroxidase isolated from Lepidium draba.* The Protein Journal, 2017. **36**(6): p. 461-471.

.7 Zhang, Y.-W., et al., *Covalent immobilization of recombinant Rhizobium etli CFN42 xylitol dehydrogenase onto modified silica nanoparticles.* Applied microbiology and biotechnology, 2011. **90**(2): p. 499-507.

.8 Farhadi, S., et al., *Immobilization of Lepidium draba peroxidase on a novel Zn-MOF nanostructure.* International Journal of Biological Macromolecules, 2021. **173** :p. 366-378.