

تثبیت همزمان آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و مالتوژنیک آمیلاز با روش تجمع آنزیمی نانو مغناطیسی جهت تهیه مالتوز از نشاسته ذرت

انیسه منتظری^۱، هما ترابی‌زاده^{۲*}

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، مهندسی کشاورزی، گرایش علوم و صنایع غذایی، پژوهشکده کشاورزی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران

۲. استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، پژوهشکده فناوری‌های شیمیایی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران

(تاریخ دریافت: ۹۷/۶/۱۱، تاریخ آخرین بازنگری: ۹۷/۸/۱۸، تاریخ پذیرش: ۹۷/۸/۲۲)

چکیده

در این تحقیق تثبیت همزمان آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و مالتوژنیک آمیلاز با روش تجمع آنزیمی با اتصالات جانبی روی نانو ذرات مغناطیسی عامل‌دار شده با لیزین جهت تهیه شربت با مالتوز بالا از نشاسته ذرت انجام شد. نانو ذرات مغناطیسی Fe_3O_4 به روش هم‌رسوبی تهیه و سپس پوشش‌دهی سطح با اسید آمینه لیزین انجام گرفت. حلال‌های استونیتریل، استن، ترت- بوتانول، ایزوپروپانول، اتانول و سولفات آمونیوم اشباع شده به‌عنوان عوامل تجمع‌کننده آنزیم‌ها مورد آزمون قرار گرفتند که حلال ترت- بوتانول بالاترین فعالیت آنزیمی را جهت تثبیت نشان داد. نسبت آنزیمی ۱:۹ مالتوژنیک آمیلاز : آلفا-آمیلاز، pH مطلوب برابر با ۶ و دمای $65^\circ C$ ، گلوتر آلدئید با غلظت ۲ mM و نسبت لیزین به آنزیم برابر با ۰/۷۵ : ۱ به‌عنوان شرایط ایده‌آل جهت تثبیت تعیین گردیدند. نتایج آنالیز DLS نشان داد که متوسط اندازه ذرات نانومغناطیس در محدوده ۸۸/۹-۸۱/۹ nm با اندیس PDI برابر با ۰/۲۴۲ و پتانسیل زتای ۲۱- و متوسط اندازه ذرات آنزیم تثبیت شده در محدوده ۵-۱۱۰/۵ nm با اندیس PDI برابر با ۰/۰۸۸ و پتانسیل زتای ۳۲- قرار دارد. ظهور طیف‌های جدید مربوط به NH_2 و NH در طیف سنجی FTIR تاییدی بر تثبیت آنزیم روی نانو ذرات مغناطیسی بود. علاوه بر این آنزیم تثبیت شده پس از ۱۰ سیکل پی در پی میزان ۸۰/۳۶٪ از فعالیت خود را حفظ نمود. پارامترهای سینتیکی آنزیم تثبیت شده در مقایسه با آنزیم آزاد نشان داد که V_{max} تغییر معنی‌داری را نداشته اما، K_m ۱/۵ برابر کاهش داشته است. نیمه عمر آنزیم تثبیت شده در دمای $95^\circ C$ نسبت به آنزیم آزاد حدود ۲/۵ برابر افزایش نشان داد. میزان بارگذاری آنزیم تثبیت شده روی نانو ذرات مغناطیسی ۸۲٪ تعیین گردید.

واژه‌های کلیدی: تثبیت هم زمان آنزیم‌ها، تجمع آنزیمی با اتصالات جانبی نانو مغناطیسی، آلفا-آمیلاز، مالتوژنیک آمیلاز، نانوبیوکاتالیست، شربت با مالتوز بالا.

* نویسنده مسئول: htoraby@alumni.ut.ac.ir

۱. مقدمه

بنابراین موجب کاهش هزینه‌ها نیز می‌گردد. روش‌های مختلفی جهت تثبیت آنزیم‌ها وجود دارد که در این مقاله از روش تثبیت آنزیم بدون حامل و از طریق ایجاد اتصالات جانبی بین توده‌های آنزیمی تجمع یافته استفاده شده است. این روش شامل دو مرحله ایجاد تجمع‌های آنزیمی^۱ و یا شکل‌گیری کریستال‌های آنزیم و سپس ایجاد اتصالات جانبی^۲ می‌باشد [۹، ۱۰]. روش CLEAs در دهه گذشته به‌عنوان روشی موثر و توسعه یافته جهت تثبیت آنزیم شناخته شده که دارای هزینه کم تولید می‌باشد؛ زیرا در این روش نیازی به استفاده از حامل گران قیمت وجود ندارد. به‌طور کلی آماده سازی CLEAs شامل دو مرحله می‌باشد: تجمع از طریق رسوب و ته نشینی و سپس ایجاد اتصالات جانبی. بدین صورت که به منظور تثبیت آنزیم به روش تجمع با اتصالات جانبی پروتئین‌های آنزیم با افزودن رسوب دهنده‌ها از قبیل حلال‌های آلی، پلیمرهای غیر یونی و نمک‌های معدنی به‌صورت فیزیکی و با حفظ فعالیت آنزیمی، رسوب داده می‌شوند و پس از آن تجمع‌های شکل گرفته به‌صورت شیمیایی و به کمک عامل ایجادکننده اتصالات جانبی^۳ که به‌طور معمول گلوتر آلدئید می‌باشد، به یکدیگر متصل می‌گردند و در نهایت آنزیم تثبیت شده توسط فرایند فیلتراسیون یا سانتریفیوژ از محیط واکنش جدا می‌گردد [۱۱]. در تثبیت هم‌زمان آنزیم‌ها، دو یا چند آنزیم به‌صورت هم‌زمان تثبیت می‌گردند تا از یک سوبسترای خاص، محصول مورد نظر را تولید نمایند. این نوع تثبیت هم‌زمان نسبت به روش‌های مرسوم دارای مزایایی مانند افزایش عملکرد ویژه آنزیم، افزایش بهره‌وری کاتالیزور زیستی، کاهش هزینه‌های تولید، استفاده دوباره از آنزیم، افزایش نیمه عمر، افزایش راندمان تولید فراورده نهایی، کاهش میزان آنزیم مورد استفاده جهت تولید مقدار معین محصول و بهبود ثبات حرارتی آنزیم‌ها. علاوه بر این، تثبیت هم‌زمان نیاز به آنزیم‌های خالص ندارد [۷]. باید توجه داشت که علی‌رغم فواید بسیار زیاد روش تثبیت آنزیم به‌صورت CLEAs، مشکلاتی در حین کاربرد آنزیم تثبیت شده با این روش در صنعت وجود دارد. اندازه ذرات که به‌طور معمول در محدوده ۵-۵۰ mm قرار دارد، تاثیر قابل توجهی روی محدودیت

آنزیم فانگامیل یک اندو آمیلاز (EC ۳,۲,۱,۱) حاصل از آسپرژیلوس اوریزه^۱ می‌باشد که پیوندهای آلفا ۱ به ۴ موجود در نشاسته مایع شده را آبکافت نموده و جهت تولید شربت با مالتوز بالا استفاده می‌شود [۱]. مالتوز یک اگزو آمیلاز مالتوزینیک نو ترکیب (EC ۳,۲,۱,۱۳۳) حاصل از باسیلوس سوبتیلیس^۲ می‌باشد که واحدهای مالتوز با اتصالات آلفا ۱ به ۴ گلیکوزیدی را از قسمت انتهایی غیراحیا کننده زنجیره در مالتوالیگو- ساکاریدها و پلی ساکاریدهایی مانند نشاسته که مجموعه‌ای از زنجیره‌های آمیلوز و آمیلو پکتین هستند آبکافت نموده و مالتوز تولید می‌کند [۲]. بنابراین یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های به‌کار رفته در تولید شربت با مالتوز بالا از نشاسته ذرت است [۳] که موجب تسریع تبدیل نشاسته به مالتوز که قندی مهم در صنایع غذایی و دارویی است می‌گردد [۴]. مالتوز دی‌ساکاریدی است که "قند جوانه جو" نیز نامیده می‌شود، از دو واحد گلوکز ساخته شده و یک قند احیاکننده می‌باشد [۵]. تولید شربت مالتوز از نشاسته به‌طور معمول طی دو مرحله مایع کردن و قندسازی انجام می‌شود. این فرایند در ابتدا با ژلاتینه کردن و مایع سازی نشاسته شروع می‌گردد [۱]. سپس بسته به میزان مالتوز در شربت، قندسازی که به‌طور معمول توسط آنزیم آمیلاز مالتوزینیک (بتا- آمیلاز) در pH برابر با ۵/۵-۵ و دمای ۵۵-۵۰ C انجام می‌پذیرد، آغاز می‌گردد [۶]. پس از قندسازی جزئی، شربت جهت توقف فعالیت آنزیم‌ها و عدم تشکیل گلوکز بیش‌تر، حرارت می‌بیند. در سیستم‌های مرسوم که از آنزیم آزاد استفاده می‌گردد، برگشت مجدد آنزیم به فرایند آبکافت امکان پذیر نبوده و در خاتمه فرایند، آنزیم همراه با پساب از سیستم خارج می‌شود. استفاده از آنزیم‌های تجاری به فرم مایع نه تنها موجب به هدر رفتن آن‌ها می‌شود، بلکه قابلیت استفاده مجدد از آن‌ها نیز سلب می‌گردد [۷]. بنابراین استفاده از آنزیم آزاد به‌دلیل هزینه بالا، ناپایداری ساختار آنزیم در pH های اسیدی و دمای بالا و خالص سازی سخت آن از محیط کشت، محدود شده است [۳]. تثبیت آنزیم یک روش موثر در راستای استفاده دوباره از آنزیم‌ها برای چندین سیکل پی در پی واکنش می‌باشد [۸].

1. Aggregates
2. Crosslinking
3. Crosslinker
4. Co-immobilization

1. *Aspergillus oryzae*
2. *Bacillus subtilis*

نمود تا برای اتصال بیشتر با مولکول‌های فعال زیستی با کاربردهای گوناگون مناسب گردند [۲۰]. در این تحقیق از اسیدهای آمینه لیزین جهت اصلاح سطح نانو ذرات مغناطیسی استفاده گردیده است. با افزودن نانو ذرات مغناطیسی عامل‌دار شده با گروه‌های آمینه به محلول آنزیم در محیط حلال آلی (ترت-بوتانل) مولکول‌های پروتئینی آنزیم تجمع یافته و سپس ترسیب می‌گردند. در این محیط با حضور گلوترآلدئید اتصالات جانبی درون و برون مولکولی بین توده‌های آنزیمی با نانو ذرات مغناطیسی شکل گرفته و منجر به تشکیل CLEAs نانو-مغناطیسی می‌گردد [۲۱]. به علت نسبت سطح به حجم بسیار بالای نانو ذرات، استفاده از آن در تثبیت با روش CLEAs، موجب افزایش میزان بارگذاری آنزیم روی آن و بهره‌وری بیشتر می‌گردد [۲۲]. افزودن نانو ذرات مغناطیسی عامل‌دار شده با گروه‌های آمینه لیزین موجب افزایش ثبات و استحکام توده‌های آنزیمی شده و به دلیل دارا بودن خواص مغناطیسی، CLEAs حاصله را می‌توان به راحتی از مخلوط واکنش با ایجاد میدان مغناطیسی جداسازی نموده [۱۱] و امکان استفاده مجدد از آنزیم تثبیت شده میسر می‌گردد [۲۱]. تثبیت به این روش می‌تواند آرایش فضایی آنزیم را پایدارتر کرده و ثبات کاتالیتیکی آن را افزایش دهد [۲۵-۲۳]. در این پژوهش با استفاده از روشی نوین نانو ذرات Combi-CLEAs دارای خواص مغناطیسی آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و مالتوزنیک آمیلاز تولید گردید. به منظور افزایش قابلیت اتصال آنزیم با نانو ذرات مغناطیسی، از اسید آمینه لیزین جهت پوشش‌دهی سطح و عامل‌دار کردن سطوح نانو ذرات مغناطیسی بهره گرفته شد. بدین منظور در مرحله اول نانو ذرات مغناطیسی به روش هم رسوبی تهیه گردیدند. پس از آن در مرحله دوم، جهت اصلاح سطح و پایدارسازی نانو ذرات مغناطیسی، فرایند پوشش‌دهی سطح انجام گرفت. در مرحله سوم، فرایند تثبیت آنزیم بر روی نانو ذرات مغناطیسی عامل‌دار شده با لیزین، از طریق ایجاد اتصالات کووالانس بین ریشه‌های آمینو لیزین سطحی در مولکول آنزیم و NH_2 موجود در سطح نانو ذرات مغناطیسی عامل‌دار شده با لیزین با استفاده از گلوترآلدئید صورت گرفت. نانو ذرات مغناطیسی به کار گرفته شده در این تحقیق زیستی و بدون سمیت بوده و امکان به‌کارگیری آن در صنعت غذا وجود دارد [۲۶].

در انتقال جرم (انتقال سوپسترا به جایگاه فعال آنزیم و جدا شدن محصول تولید شده از جایگاه فعال) و قابلیت فیلتراسیون را دارا می‌باشد. به دلیل تخلخل بسیار کم و نرم بودن ساختار CLEAs، جرم آنزیم در حین انجام فرایند آنزیمی پخش و پراکنده شده و همین امر موجب تشکیل توده‌های چسبناک در حین فرایندهای جداسازی (فیلتراسیون و سانتریفوژ کردن) شده و بازیابی CLEAs را از محیط واکنش مشکل می‌سازد. بنابراین کنترل اندازه ذرات CLEAs و تشکیل ذرات به صورت هم‌شکل و یکنواخت در برطرف نمودن مشکلات ذکر شده تاثیر بسیار مهمی دارد [۱۲].

به تازگی از نانو ذرات مغناطیسی به عنوان افزودنی، برای آماده‌سازی CLEAs استفاده گردیده که بدین صورت می‌توان آنزیم تثبیت شده را به راحتی توسط میدان‌های مغناطیسی از محیط واکنش جدا سازی نمود در نتیجه نیاز به جداسازی توسط صافی و استفاده از سانتریفوژ نمی‌باشد [۱۳]. در خصوص کاربرد نانو ذرات مغناطیسی در مواد غذایی بررسی جنبه ایمنی یا سمیت این ذرات از اهمیت بالایی برخوردار است. از این رو در بین انواع نانو ذرات مغناطیسی نانو ذرات اکسید آهن به‌ویژه نانو ذرات سوپر پارامغناطیسی Fe_3O_4 بیش‌ترین کاربرد را در زمینه مواد غذایی به دلیل عدم سمیت، انطباق پذیری زیستی خوب و عدم حضور باقی‌مانده ذرات نانو مغناطیس پس از حذف توسط میدان مغناطیسی خارجی داشته اند [۱۶-۱۴]. روش شیمیایی هم رسوبی روشی ساده و کارآمد در رسیدن به نانو ذرات مگنتیت می‌باشد [۱۷]. نانو ذرات مغناطیسی به دلیل سطح ویژه بزرگی که دارند در برابر اکسیداسیون و تجمع بسیار حساس بوده و هم‌چنین از لحاظ شیمیایی بسیار واکنش پذیر هستند. در دما و فشار معمولی، سطح نانو ذرات به سرعت اکسید شده و در نتیجه لایه‌ای نازک از اکسید بر روی آن تشکیل می‌گردد که به شدت خواص آن را تغییر می‌دهد. تجمع طبیعی نانو ذرات مشکل دیگری است که کاربرد گسترده نانو ذرات مغناطیسی را با محدودیت مواجه می‌کند [۱۸]. به منظور مقابله با این محدودیت‌ها روش‌های مختلفی جهت اصلاح سطح نانو ذرات مغناطیسی از طریق عامل‌دار کردن توسط ترکیبات شیمیایی و یا بیولوژیک در حین فرایند سنتز یا بعد از آن به کار گرفته می‌شود [۱۹]. با روش اصلاح سطح، می‌توان نانو ذرات مغناطیسی اکسید آهن را با گروه‌های ویژه‌ای مانند OH ، COOH ، NH_2 - عامل‌دار

۲. مواد و روش‌ها

۲.۱. مواد و تجهیزات

آنزیم L ۸۰۰ Fungamyl حاصل از *Aspergillus oryzae* و آنزیم Maltogenase L حاصل از *Bacillus subtilis* از نمایندگی شرکت Novozyme دانمارک در ایران تهیه گردید. لیزین با وزن مولکولی ۱۸۲/۶۵ g/mol از شرکت Fluka، ۳ و ۵-دی نیترو سالیسیلیک اسید از شرکت Sigma-Aldrich آمریکا استفاده گردیده‌اند. سایر مواد شامل نشاسته ذرت، تارتارات مضاعف سدیم پتاسیم، گلوترآلدئید ۲۵٪ (v/v)، سدیم سولفیت، سدیم هیدروکسید، فنل، استن، کوماسی بریلیانت بلو G-۲۵۰، دی سدیم هیدروژن فسفات، سدیم دی هیدروژن فسفات، استات سدیم، اسید هیدروکلریک، اسید فسفریک، سولفات آمونیم، ایزوپروپانول، ترت بوتانول، استونیتریل، اسید استیک و اتانول ۹۶ درجه همگی از نوع آزمایشگاهی بوده و از نمایندگی‌های شرکت Merck آلمان در ایران خریداری شده‌اند.

دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Perkin Elmer, Lambda UV/VIS ساخت آمریکا، برای تعیین شدت جذب با استفاده از سل با طول مسیر ۱cm در مقایسه با بلانک استفاده گردید. هم‌چنین دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی FE-SEM مدل Tescan-Mira II ساخت آمریکا، با ولتاژ ۷-۱۵Kv پس از پوشش‌دهی نمونه‌ها با لایه نازکی از طلا استفاده شده است. اندازه ذرات نمونه‌های نانومگنتیت و آنزیم‌های تثبیت شده (NM-Combi-CLEAs) هم‌چنین پتانسیل زتا با روش پراکندگی نور دینامیکی (DLS) در فاز مایع با استفاده از دستگاه Brookhaven BI-200 SM Goniometer Version 2 شرکت Instrument Corp., Holtsville ساخت کشور آمریکا توسط تفرق نور دینامیکی لیزر در ۱۷۳° تعیین شد. طیف سنجی مادون قرمز برای کلیه نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروسکوپی FTIR مدل ۸۳۰۰ ساخت شرکت Shimadzu ژاپن انجام گرفت. تجزیه تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار Design Expert نسخه ۱۰ انجام گرفت و کلیه آزمون‌ها با ۳ تکرار و به‌صورت میانگین گزارش گردید.

۲.۲. سنتز نانو ذرات مغناطیسی آهن به روش هم رسوبی

هم رسوبی فرایندی است که در آن یک ماده محلول در محیط به یک ساختار نامحلول تبدیل می‌شود. روش هم‌رسوبی ساده‌ترین

و کارآمدترین روش شیمیایی برای سنتز نانو ذرات مغناطیسی (اکسیدهای فلزی و فریت‌ها) است که جهت سنتز نانو ذرات مگنتیت استفاده می‌گردد. این فرایند شامل دو مرحله است: زمانی که غلظت گونه‌ها به یک حد فوق اشباع می‌رسد، مقدار کمی هسته‌زایی رخ می‌دهد و سپس رشد تدریجی هسته‌ها (با نفوذ حل شونده‌ها بر روی سطح ذرات) صورت می‌پذیرد [۲۷]. کنترل این مراحل تاثیر مهمی بر روی کیفیت فرآورده نهایی تولید شده دارد. در ابتدا دو نمک آهن Fe^{2+} و Fe^{3+} با نسبت استوکیومتری ۱ به ۲ یعنی مقدار ۸/۸۶ g از $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ و ۳/۲۵ g از $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ به‌صورت جداگانه وزن گردیده و هر کدام در بالن ژوژه ۲۰۰ ml با آب یون‌زدایی شده به حجم رسیدند. سپس هر دو محلول با استفاده از همزن مغناطیسی با هم مخلوط شده و به محتویات بالن، ۱۰ ml محلول هیدروکسید سدیم تحت شرایط گاز نیتروژن (به منظور جلوگیری از تشکیل ناخالصی‌های غیر مغناطیسی) به‌صورت قطره قطره اضافه گردید و هم‌زدن به مدت ۳۰ min ادامه یافت. با افزودن محلول سود رنگ محلول از آبی تیره به سیاه تبدیل گردید. نانو ذرات مغناطیسی آهن تشکیل شده سه بار با آب دیونیزه شست‌وشو داده شد و تحت خلا خشک گردید [۲۸، ۲۹]. در نهایت با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی اندازه ذرات و هم‌چنین بررسی شکل نانو ذرات تشکیل شده صورت گرفت.

۳.۲. پوشش‌دهی نانو ذرات مغناطیسی با لیزین

نانو ذرات مگنتیت Fe_3O_4 تهیه شده به روش هم‌رسوبی به‌دلیل داشتن گروه‌های هیدروکسیل در سطح خود، ناپایدار بوده و به سرعت اکسیده می‌شوند. به منظور پایدار سازی این نانو ذرات، با استفاده از اسید آمینه لیزین سطح ذرات عامل‌دار گردید. بدین منظور ۰/۱ لی‌زین با ۰/۱ g ذرات مگنتیت مخلوط و به آن ۵۰ ml بافر فسفات با pH ۷ و ۵۰۰ μ L گلوتر آلدئید اضافه و ورتکس شد. سپس محتویات درون میکروتیوب با استفاده از روش اولترا سونیک به مدت ۱۵-۱۰ min با شدت ۳۰۰ Hz تحت امواج اولتراسونیک و در دمای اتاق به مدت ۲۴ تحت هم‌زدن ملایم قرار گرفت تا پیوند کووالانسی بین نانو ذرات مغناطیسی آهن و لیزین برقرار گردد. گلوتر آلدئید یک واکنشگر فعال است که دارای دو بازوی آلدئیدی بوده و می‌تواند با گروه‌های آمینه لیزین اتصال برقرار نماید. پس از طی زمان

۶.۲. روش تعیین دمای بهینه فعالیت آنزیم‌ها

برای تعیین دمای بهینه فعالیت آنزیم‌های فانگامیل و مالتوژنز آزاد، فعالیت این آنزیم‌ها در دماهای ۵۵، ۶۵، ۷۵، ۸۵، و ۹۵° C بررسی گردید. برای این منظور، ۹۰۰۰ μL بافر استات سدیم با pH برابر با ۶ و ۹۰۰ μL محلول نشاسته ۵٪ تهیه و در حمام آب با هر یک از دماهای ذکر شده قرار داده شد. سپس ۱۰۰ μL از مخلوط آنزیم‌های فانگامیل و مالتوژنز به آن افزوده و پس از مخلوط کردن، در حمام آب با دماهای مذکور بررسی شد. پس از ۱ min از شروع واکنش و افزودن آنزیم، از مجموعه آنزیمی حاصل با ۳ تکرار ۵۰۰ μL نمونه تهیه و به ۵۰۰ μL محلول معرف دی نیترو سالیسیلیک اسید ۱٪ افزوده شد. مطابق با روش سنجش DNS نمونه‌ها آماده و با روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۷۵ nm میزان جذب تعیین و بر اساس نمودار استاندارد مالتوز میزان فعالیت آنزیم و مقدار محصول تولید شده محاسبه گردید. در نهایت مقدار فعالیت آنزیم‌های آزاد در مقایسه با آنزیم‌های تثبیت شده در دماهای مختلف و در زمان ۱ min مشخص شد. بیش‌ترین فعالیت، دمای بهینه آنزیم‌ها را مشخص نمود.

۷.۲. تعیین میزان فعالیت آنزیم‌های فانگامیل و مالتوژنز آزاد و تثبیت شده با روش DNS

فعالیت این نوع آنزیم‌های آبکافت کننده از طریق اندازه‌گیری مقدار قندهای کاهنده آزاد شده (وجود گروه‌های کربونیل آزاد (C=O) از نشاسته با استفاده از اتصال به معرف ۳و۵-دی نیترو سالیسیلیک اسید سنجیده می‌شود. این معرف با قندهای احیاکننده که در نتیجه تجزیه نشاسته تشکیل شده‌اند در محیط قلیایی واکنش داده و تولید ۳ آمینو ۵ نیترو سالیسیلیک اسید نموده که قادر به جذب نور در ۵۷۵ nm می‌باشد. مخلوط واکنش شامل ۲۰۰ μL محلول آنزیم، ۱۸۰۰۰ μL بافر استات سدیم ۵۰ mM با pH برابر با ۶ و ۱۸۰۰ μL محلول ۵٪ (W/V) نشاسته ذرت شفاف شده، در بن ماری با دمای ۶۵° C یعنی دمای مطلوب آنزیم‌ها، و مدت زمان آبکافت ۶۰ min می‌باشد [۳۰، ۳۲]. فعالیت آنزیم به صورت μmol محصول تولید شده و یا سوپ‌سترای مصرف شده در هر دقیقه بیان می‌گردد [۳۳].

مذکور، مایع رویی که حاوی گلوترالدئیدهای باند نشده، بافر و مولکول‌های لیزین آزاد بوده از رسوب توسط سانتریفوژ ($\times g$ ۱۱۳۵۷ به مدت ۱۰ min) جداسازی گردید و رسوب به جا مانده جهت تثبیت استفاده گردید.

۴.۲. تثبیت همزمان آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و مالتوژنیک آمیلاز با روش CLEAs بر روی نانو ذرات مغناطیسی عامل‌دار شده با لیزین

بدین منظور، ۱۰۰ μL مجموعه آنزیمی با نسبت آنزیمی ۱:۹ (مالتوژنز : فانگامیل) و ۱۲/۷۱ mg لیزین به همراه میزان مشخصی از نانو ذرات مغناطیسی عامل‌دار شده به ۹۰۰ μL تری بوتانول و ۱/۹ μL گلوتر آلدئید اضافه گردید. سپس محتویات با استفاده از روش اولترا سونیک با شدت ۳۰۰ Hz به مدت ۱۰ min تحت امواج اولترا سوند قرار گرفت و به مدت ۲۴ h درون یخچال نگهداری شد. سپس سانتریفوژ و مایع رویی جدا شد و رسوب به جا مانده دو بار با میزان ۹۰۰ μL بافر فسفات با pH برابر با ۷ شست‌وشو داده شد و در نهایت میزان فعالیت آنزیم تثبیت شده تعیین گردید [۱۹، ۳۰]. از میکروسکوپ الکترونی روبشی برای تعیین اندازه ذرات و هم‌چنین بررسی شکل NM-Combi-CLEAs استفاده گردید. آنزیم تثبیت با این روش را می‌توان تا زمان استفاده در فریزر با دمای ۱۸° C- نگهداری نمود [۳۱].

۵.۲. تعیین pH بهینه برای فعالیت آنزیم‌های فانگامیل و مالتوژنز

تعیین pH بهینه برای فعالیت آنزیم‌ها به صورت جداگانه و سپس به شکل مخلوط آنزیم‌ها در دمای بهینه و pH در محدوده ۵-۹ مورد بررسی قرار گرفت. فرایند هیدرولیز آنزیمی با ۹۰۰ μL نشاسته ۵٪، ۱۰۰ μL مخلوط بهینه آنزیم‌ها و ۹۰۰۰ μL بافر استات سدیم با pH به میزان ۵، ۵/۵، ۶، ۶/۵، ۷، ۸، ۹ انجام و سپس کوکتل تهیه شده در دمای بهینه آنزیم‌ها قرار گرفت. بعد از گذشت ۱ min از افزودن آنزیم و شروع واکنش، به میزان ۵۰۰ μL از مجموعه آنزیمی با دو تکرار برداشته و به ۵۰۰ μL محلول معرف DNS افزوده و طبق روش DNS فعالیت آنزیم‌ها ارزیابی و در نهایت نمودار فعالیت آنزیم نسبت به تغییرات pH رسم گردید.

پس از آن با توجه به این که واکنش کاهش فعالیت آنزیم در دمای بالا نسبت به زمان یک واکنش درجه اول می‌باشد می‌توان از معادله زیر مقدار نیمه عمر آنزیم قبل و بعد از تثبیت در دماهای بین ۵۵ تا ۹۵°C را محاسبه نمود [۲۶، ۳۳].

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{Ln2}{K_{in}} \quad (1)$$

۱۱.۲. تعیین میزان بارگذاری آنزیم تثبیت شده

میزان آنزیم متصل شده به نانو ذرات مغناطیسی با استفاده از مقایسه غلظت آنزیم اولیه با میزان آنزیم باقی‌مانده در محلول رویی پس از جداسازی ذرات آنزیمی تثبیت شده با سانتریفوژ محاسبه گردید. میزان آنزیم تثبیت شده (بارگذاری شده روی نانو ذرات مغناطیسی) را می‌توان از رابطه (۲) محاسبه نمود:

$$Q = (C_1 - C_2) \frac{V}{W} \quad (2)$$

که Q مقدار آنزیم تثبیت شده روی نانو ذرات مغناطیسی، C_1 غلظت اولیه آنزیم (mg/mL)، C_2 غلظت آنزیم باقی‌مانده در محلول پس از پایان فرایند تثبیت (mg/mL)، W وزن نانو ذرات (mg) و V حجم محلول بافر (mL) می‌باشند.

۳. نتایج و بحث

۳.۱. تعیین اندازه نانو ذرات پروتئینی با استفاده از روش DLS و بررسی شکل و ساختار با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

اندازه ذرات و پتانسیل زتای نمونه‌ها با استفاده از آنالیز DLS تعیین شد. متوسط اندازه ذرات نانومغناطیس در محدوده ۸۸/۹ - ۸۱/۹ nm با اندیس PDI (شاخص پراکندگی ذرات) برابر با ۰/۲۴۲ و پتانسیل زتای ۲۱- تعیین گردید. هم‌چنین متوسط اندازه ذرات آنزیم تثبیت شده NM-Combi-CLEAs در محدوده ۱۱۰/۵ - ۹۹/۶ nm با اندیس PDI برابر با ۰/۰۸۸ و پتانسیل زتای ۳۲- ارزیابی شد که نشان از پایداری بالای محصول نسبت به تجمع و آگلومره شدن داشت. کاهش این شاخص بیانگر عدم چسبندگی ذرات به یکدیگر است. با توجه به نتایج به‌دست آمده، میزان PDI بالاتر در نانو ذرات Fe_3O_4 نسبت به آنزیم تثبیت شده و کاهش آن پس از تثبیت همراه آنزیم بیانگر افزایش آبدوستی

۸.۲. تعیین میزان پروتئین آزاد و تثبیت شده با روش برادفورد

در روش برادفورد، که برای اندازه‌گیری پروتئین‌ها به‌کار می‌رود، بر اساس تغییر ماکزیمم جذب نوری کوماسی بریلیانت بلو از ۴۶۵ به ۵۹۵ nm در هنگام اتصال به پروتئین عمل می‌نماید. جهت تعیین میزان پروتئین هر یک آنزیم‌ها، در ابتدا محلول استاندارد سرم آلبومین گاوی (BSA, Fraction V) با غلظت‌های ۰/۱-۱ mg/mL تهیه گردید. برای سنجش میزان پروتئین آنزیم‌های فانگامیل و مالتوژنز، ۱۰۰ μL از آنزیم با ۵ ml از محلول برادفورد مخلوط شد تا رنگ آبی شفاف ایجاد گردد. با ایجاد ورتکس نمونه‌ها یکنواخت و برای مدت ۱۰ min در دمای اتاق قرار داده شد و بلافاصله میزان جذب در طول موج ۵۹۵ nm در مقایسه با شاهد تعیین و غلظت پروتئین نمونه‌ها با ۳ تکرار بر اساس نمودار استاندارد BSA تعیین شد [۲۶، ۳۴].

۹.۲. بررسی مقاومت حرارتی آنزیم‌ها قبل و بعد از تثبیت

جهت بررسی پایداری حرارتی آنزیم‌های آزاد و تثبیت شده، نمونه‌های حاوی آنزیم در دمای ۵۵، ۶۵، ۷۵، ۸۵، و ۹۵°C به مدت ۱۲۰ min نگهداری و نمونه برداری به میزان ۱۰۰ μL در فواصل زمانی مشخص از این آنزیم‌ها صورت گرفت. سپس ۱۰۰ μL آنزیم انکوبه شده به مخلوط آبکافت (۹۰۰۰ μL بافر استات سدیم، ۹۰۰ μL نشاسته ذرت با غلظت ۵٪) افزوده و در دمای ۶۰°C قرار گرفت. پس از آن، محاسبه فعالیت آنزیم بر طبق روش اسپکتروفتومتری DNS در طول موج ۵۷۵ nm انجام گرفت. در نهایت، با محاسبه درصد فعالیت باقی‌مانده آنزیم میزان پایداری آنزیم‌های آزاد و تثبیت شده در هر یک از دماهای ذکر شده تعیین گردید [۲۶].

۱۰.۲. تعیین نیمه عمر آنزیم آزاد و تثبیت شده

یکی از پارامترهای مهم و مرسوم در تعیین میزان پایداری آنزیم، نیمه عمر آنزیم ($t_{1/2}$) است. واحد نیمه عمر آنزیم زمان می‌باشد و برابر با مدت زمانی که آنزیم نصف فعالیت اولیه خود را از دست داده می‌باشد. برای محاسبه نیمه عمر آنزیم در ابتدا می‌بایست نمودار لگاریتم طبیعی درصد باقی‌مانده فعالیت آنزیم نسبت به زمان آبکافت رسم گردد. در این نمودار شیب خط برابر است با مقدار ثابت غیر فعال شدن که با k_{in} نشان داده می‌شود.

استفاده از روش اولتراسونیک هم چنان در محدوده نانو قرار دارند (شکل ۲).

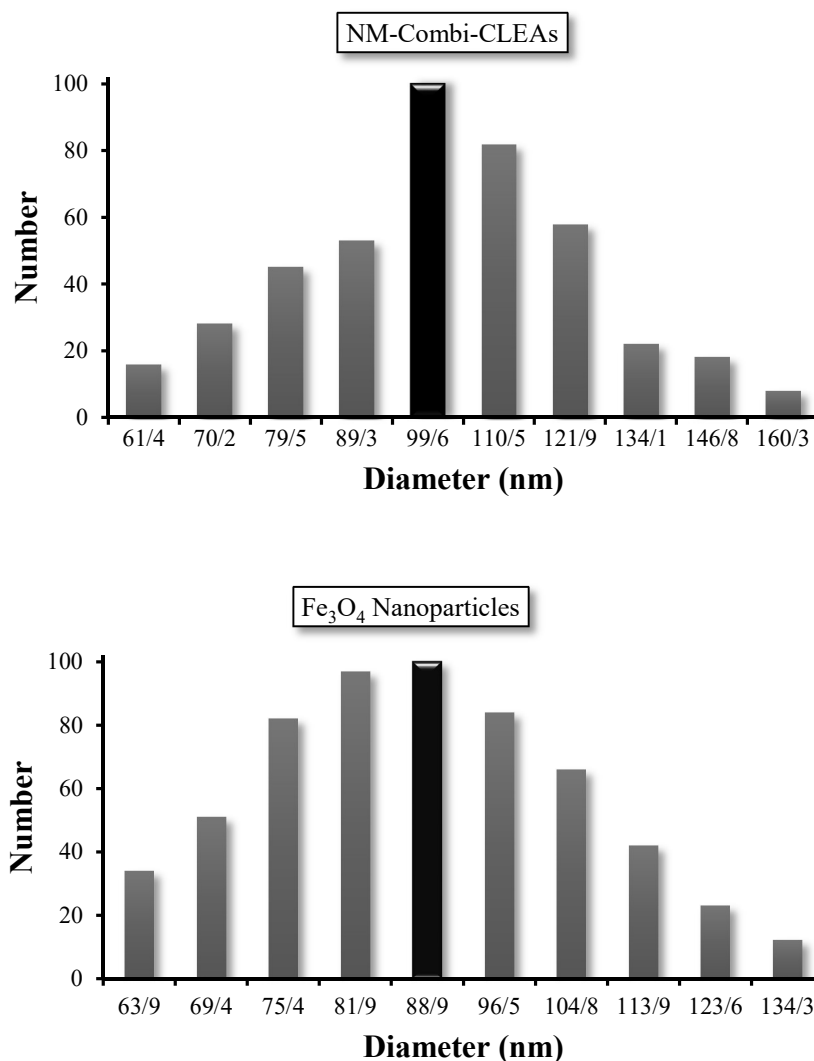
۲.۳. طیف سنجی FTIR نانو ذرات مغناطیسی و CLEAs نانو مغناطیسی آنزیم‌های آمیلاز

طیف سنجی FTIR مربوط به نانو ذرات مغناطیسی و CLEAs نانو مغناطیسی مجموعه آنزیمی فانگامیل و مالتوزنز در ناحیه $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ انجام گرفت (شکل ۳).

طیف‌های ثبت شده در ناحیه $1621, 600$ و 3400 cm^{-1} مربوط به حالت ارتعاشی پیوند Fe-O و حالت کششی مولکول‌های آب جذب سطحی شده بر روی نانو ذرات و حالت کششی پیوند O-H سطحی در نانو ساختار مغناطیسی Fe_3O_4 می‌باشند.

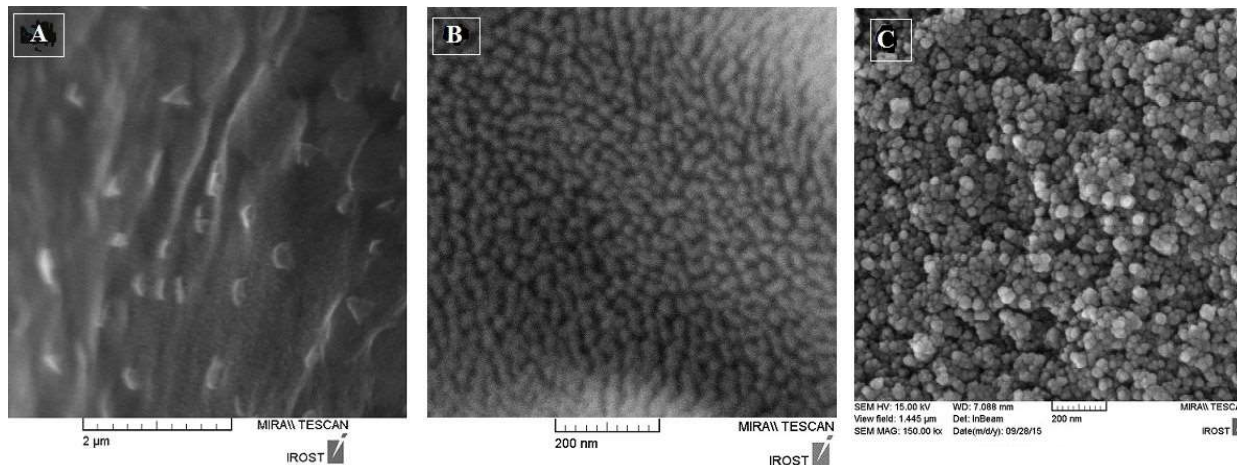
نانو ذرات مغناطیسی و در نتیجه بهبود قابلیت پخش و پراکندگی در فاز آبی و عدم چسبندگی ذرات Fe_3O_4 به هم و افزایش ثبات و پایداری ذرات است. شکل (۱) محدوده اندازه ذرات را با توجه به نتایج آزمون DLS نشان می‌دهد.

مطالعه شکل و ساختار نانو ذرات مغناطیسی و آنزیم‌های تثبیت شده با روش FE-SEM نشان می‌دهد که این ذرات به شکل کروی و نیمه کروی در اندازه نانو می‌باشند. اندازه نانو ذرات مغناطیسی با روش SEM در محدوده $40-30 \text{ nm}$ قرار دارد. نانو ذرات آنزیمی تثبیت شده (NM-Combi-CLEAs) به دلیل استفاده از نانو ذرات مغناطیسی عامل‌دار شده با اسید آمینه لیزین و ایجاد اتصال با مجموعه پروتئین‌های آنزیمی، از نظر اندازه نسبت به نانو ذرات مغناطیسی بزرگ‌تر بوده، اما به واسطه

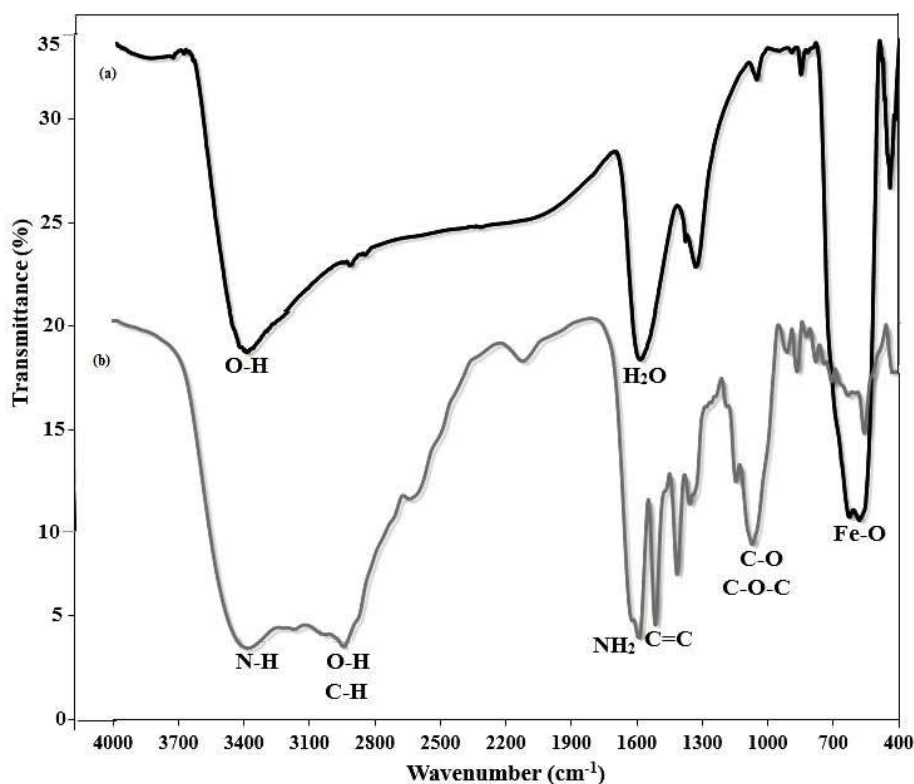


شکل (۱) توزیع اندازه ذرات نانو ذرات مغناطیسی و آنزیم تثبیت شده با روش DLS

Fig. 1 Particle size distribution of nanomagnetite and immobilized enzyme by DLS method



شکل (۲) تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (a) CLEAs غیر نانو، (b) CLEAs نانو، (c) نانو ذرات مغناطیسی
Fig. 2 FE-SEM images of CLEAs a) Nano-CLEAs b) and Nanomagnetite c)



شکل (۳) طیف FTIR (a) نانو ذرات مغناطیسی و (b) نانو مغناطیسی مجموعه آنزیمی
Fig. 3 FTIR spectrum of a) Nanomagnetite and b) NM-Combi-CLEAs

طیف‌های مربوط به NH_2 در ناحیه 1600 و NH در ناحیه 3373 در طیف FTIR نشانه‌ای از تثبیت ساختار پروتئینی مجموعه آنزیم‌های آمیلاز روی نانو ذرات مغناطیسی می‌باشد. پس از تثبیت آنزیم، ظهور طیف‌های جدید و مشخص در نواحی 1253

طیف‌های ثبت شده در ناحیه 600 ، 1621 و 3400 cm^{-1} مربوط به حالت ارتعاشی پیوند Fe-O و حالت کششی مولکول‌های آب جذب سطحی شده بر روی نانو ذرات و حالت کششی پیوند O-H سطحی در نانو ساختار مغناطیسی Fe_3O_4 می‌باشند. ظهور

جدول (۱) میزان پروتئین مجموعه آنزیم‌های فانگامیل و مالتوژنز آزاد و تثبیت شده.

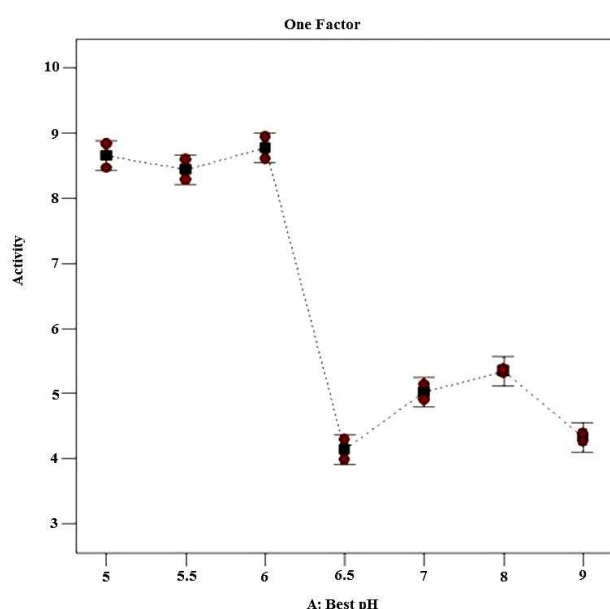
Table 1 Protein content of free and immobilized combined Fungamyl and Maltogenase enzymes.

غلظت پروتئین (mg/ml) Protein content (mg/ml)	نوع آنزیم Enzyme
107.174	آنزیم فانگامیل آزاد Free Fungamyl
6.936	آنزیم مالتوژنز آزاد Free Maltogenase
114.11	مجموعه آنزیمی آزاد Free Combined Enzymes
113.76	آنزیم تثبیت شده NM-Combi-CLEAs

واکنش داده و اتصالات جانبی مورد نظر جهت شکل گیری
CLEAs را ایجاد نمایند [۳۵، ۳۶].

۵.۳. تعیین pH بهینه برای فعالیت مجموعه آنزیم‌های آزاد فانگامیل و مالتوژنز

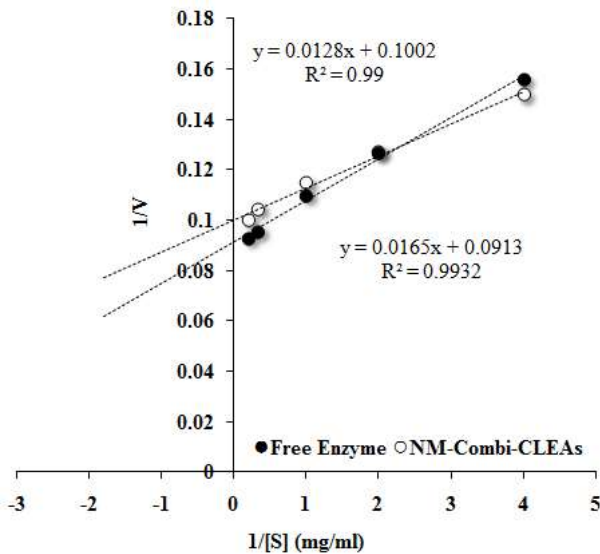
تعیین pH بهینه مجموعه آنزیم‌های آزاد (فانگامیل و مالتوژنز با نسبت ۱ به ۹) در محدوده ۵-۹ با استفاده از بافر استات سدیم (pH در محدوده ۵-۷) و بافر فسفات (pH در محدوده ۷-۹) انجام گرفت. سپس نمودار فعالیت مجموعه آنزیمی نسبت به تغییرات pH رسم گردید. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که، میزان فعالیت مجموعه آنزیم‌های آزاد در pH ۵، ۵/۵ و ۶ تفاوت معنی‌داری را نداشته که این نتایج با اطلاعات موجود در برگه اطلاعات محصول ارائه شده توسط شرکت تولیدکننده آنزیم‌های فانگامیل و مالتوژنز مطابقت دارد. بر اساس برگه اطلاعات محصول محدوده pH برای فعالیت آنزیم مالتوژنز ۵-۷ و برای آنزیم فانگامیل ۵/۵-۷ تعیین شده است. با توجه به بالاتر بودن نسبی میزان فعالیت مجموعه آنزیمی در pH برابر با ۶، این pH برای انجام کلیه آزمایشات بعدی مجموعه آنزیمی انتخاب گردید (شکل ۵). از طرف دیگر، مشخص شده است که پتانسیل زتای Fe_3O_4 در pH حدود ۷/۷-۷/۵ برابر با صفر بوده (نقطه ایزوالکتریک) و در این محدوده pH، ذرات نانومغناطیسی به صورت توده‌های تجمع یافته و متراکم در آمده و رسوب خواهند کرد [۳۵، ۳۶]. پایین‌تر از این نقطه ایزوالکتریک سطح نانو ذرات مغناطیسی دارای بار الکتریکی مثبت و بالاتر از آن سطح نانو ذرات مغناطیسی دارای بار الکتریکی منفی خواهد بود. تحت این شرایط، در pH برابر با ۶ انتخاب شده گروه‌های عاملی آزاد - NH_3^+ موجود در سطح نانو ذرات مغناطیسی عامل‌دار شده با لیزین به خوبی حفظ شده و قادر خواهند بود با حضور گلوئوتارآلدئید با گروه‌های $-NH_3^+$ موجود در سطح مجموعه آنزیمی به راحتی



شکل (۵) نمودار pH بهینه مجموعه آنزیم‌های آزاد فانگامیل و مالتوژنز
Fig. 5 Optimum pH of combined free Fungamyl and Maltogenase enzymes

۶.۳. تعیین دمای بهینه برای فعالیت مجموعه آنزیم‌های آزاد فانگامیل و مالتوژنز

تعیین دمای بهینه مجموعه آنزیم‌های آزاد (فانگامیل و مالتوژنز با نسبت ۱ به ۹) در محدوده $55-95^{\circ}C$ با استفاده از محیط بافری استات سدیم با pH برابر با ۶ انجام گرفت. سپس نمودار فعالیت مجموعه آنزیمی نسبت به تغییرات دما رسم گردید. بر طبق شکل (۵) در بررسی دمای بهینه آنزیم‌ها بین دماهای ۶۵ و



شکل (۷) نمودار Lineweaver-Burk مربوط به آبکافت نشاسته در

غلظت‌های مختلف توسط مجموعه آنزیم‌های آزاد و تثبیت شده

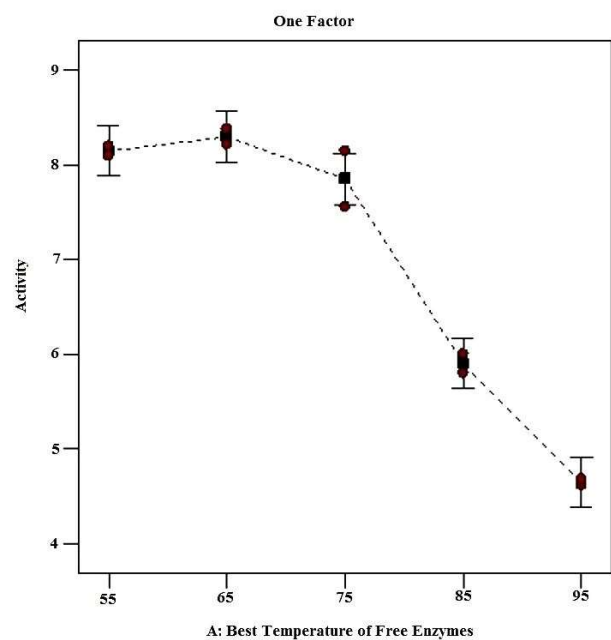
Fig. 7 Lineweaver-Burk plot of starch hydrolysis at various concentrations by combined free and immobilized enzymes

کاهش K_m پس از تثبیت آنزیم نشان دهنده افزایش تمایل جایگاه فعال آنزیم برای اتصال به سوبسترا بوده و بیانگر این امر می‌باشد که، در مقایسه با آنزیم آزاد غلظت کم‌تری از سوبسترا برای رسیدن به نصف سرعت بیشینه واکنش مورد نیاز می‌باشد. به عبارت دیگر، قابلیت دسترسی سوبسترا به جایگاه فعال هر دو آنزیم یعنی آلفا-آمیلاز و مالتوژنیک آمیلاز در اثر تغییرات ساختاری در حین فرایندهای تجمع و ایجاد اتصال جانبی افزایش یافته است. همین تغییر ساختار موجب تغییر محدود در سرعت واکنش آنزیمی یا V_{max} گردیده است. به طور کلی می‌توان چنین استنباط نمود که، این نوع تثبیت همزمان دو آنزیم ذکر شده تاثیر معنی‌داری را روی کاهش V_{max} آنزیم‌ها نداشته، اما میزان تمایل جایگاه فعال آنزیم‌ها را برای اتصال به سوبسترا افزایش داده است.

۸.۳. بررسی مقاومت حرارتی مجموعه آنزیم‌های آزاد در مقایسه با آنزیم‌های تثبیت شده

فعالیت مجموعه آنزیم‌های آزاد در مقایسه با مجموعه آنزیمی تثبیت شده NM-Combi-CLEAs در محدوده $55-95^{\circ}\text{C}$ با استفاده از روش DNS به منظور بررسی میزان پایداری حرارتی آنزیم‌ها تعیین گردید. سینتیک کاهش فعالیت و پایداری حرارتی آنزیم فانگامیل و مالتوژنز قبل و پس از تثبیت به‌وسیله نگه‌داری

75°C تفاوت معناداری وجود نداشت، اما با توجه به بالاتر بودن نسبی میزان فعالیت مجموعه آنزیمی در دمای 65°C به‌نظر می‌رسد که ساختار پروتئینی مجموعه آنزیمی مخصوصاً اسیدهای آمینه موجود جایگاه فعال آنزیم در دمای پایین‌تر بهتر حفظ شده و احتمال تغییر ساختار در اثر نگه‌داری و انجام واکنش در دمای بالاتر یعنی 75°C کاهش خواهد یافت. علاوه بر این، هدف اصلی در تثبیت آنزیم یعنی امکان استفاده مجدد از آنزیم با حفظ ساختار طبیعی آن بهتر محقق خواهد شد. بر همین اساس دمای 65°C به عنوان دمای بهینه برای انجام آزمون‌های بعدی انتخاب گردید (شکل ۶)، [۳۷].



شکل (۶) نمودار دمای بهینه مجموعه آنزیم‌های آزاد فانگامیل و مالتوژنز

Fig. 6 Optimum temperature of combined free Fungamyl and Maltogenase enzymes

۷.۳. تعیین پارامترهای سینتیکی آنزیم‌های آزاد و تثبیت شده

مهم‌ترین پارامترهای سینتیکی واکنش آبکافت آنزیمی نشاسته ذرت یعنی K_m (ثابت میکائلیس) و V_{max} (حداکثر سرعت واکنش) تعیین گردیدند. به منظور تعیین این شاخص‌ها نمودار Lineweaver-Burk آنزیم آزاد و تثبیت شده براساس عکس غلظت سوبسترا $1/[S]$ و عکس سرعت واکنش $1/V$ رسم گردید (شکل ۷). پارامترهای سینتیکی به دست آمده برای آنزیم آزاد و تثبیت شده در جدول (۲) نشان داده شده است.

جدول (۲) پارامترهای سینتیکی مجموعه آنزیم‌های آزاد و تثبیت شده.

Table 2 Kinetic parameters of combined free and immobilized enzymes.

پارامترهای سینتیکی Kinetic Parameters	مجموعه آنزیمی تثبیت شده NM-Combi-CLEAs	مجموعه آنزیمی آزاد Free Combined Enzymes
V_{max} ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$)	9.98	10.95
K_m (mg/ml)	0.12	0.175

محافظة نموده و این بخش حیاتی مولکول آنزیم را نسبت به تغییر شکل در اثر دمای بالا حفظ می‌نماید. با توجه به این که تولید انواع فراورده‌ها از نشاسته در صنعت در دمای بالاتر از 60°C صورت می‌گیرد، تا امکان رشد میکروبی طی فرایندهای تولیدی کاهش یابد، استفاده از آنزیم‌های تثبیت شده فانگامیل و مالتوژنز با مقاومت دمایی بالاتر در صنعت برای تولید فرآورده‌های قندی مانند شربت مالتوز دارای کارایی و بازدهی بالاتری نسبت به آنزیم‌های آزاد می‌باشد.

۹.۳. تعیین نیمه عمر آنزیم آزاد و تثبیت شده

نتایج به دست آمده در جدول (۳) نشان می‌دهد که نیمه عمر آنزیم تثبیت شده نسبت آنزیم آزاد به‌طور چشمگیری بهبود یافته به‌صورتی که نیمه عمر آنزیم تثبیت شده در دمای 95°C حدود $2/5$ برابر افزایش داشته است (جدول ۳). این افزایش را می‌توان به کاهش انعطاف پذیری و افزایش استحکام و سختی ساختار آنزیمی در اثر تثبیت همزمان آنزیم‌ها نسبت داد که این امر موجب بهبود پایداری و ثبات ساختار مجموعه آنزیمی پس از تثبیت گردیده است.

۱۰.۳. تعیین میزان بارگذاری آنزیم بر روی نانو ذرات

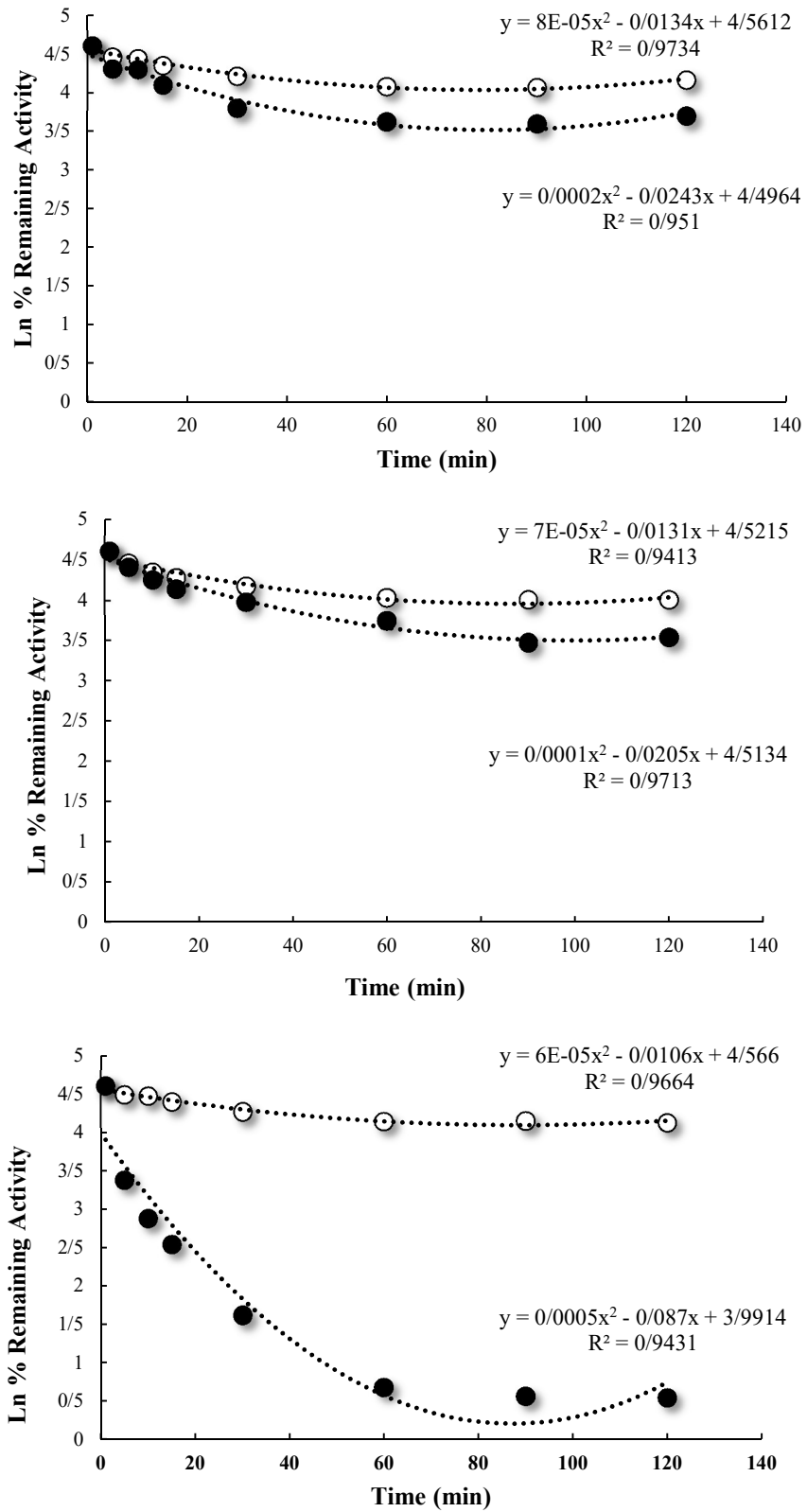
مغناطیسی عامل‌دار شده بالیزین

میزان آنزیم متصل شده به نانو ذرات مغناطیسی با استفاده از مقایسه میزان پروتئین موجود در آنزیم آزاد اولیه با میزان پروتئین آنزیم باقی‌مانده در محلول بافر پس از جداسازی ذرات آنزیمی تثبیت شده با سانتریفوژ محاسبه گردیده که بر اساس فرمول ارائه شده در بخش ۲-۱۱ این مقدار برابر با 82% بوده است. این میزان بارگذاری نشان دهنده کارایی بالای روش به‌کار گرفته شده در تثبیت می‌باشد.

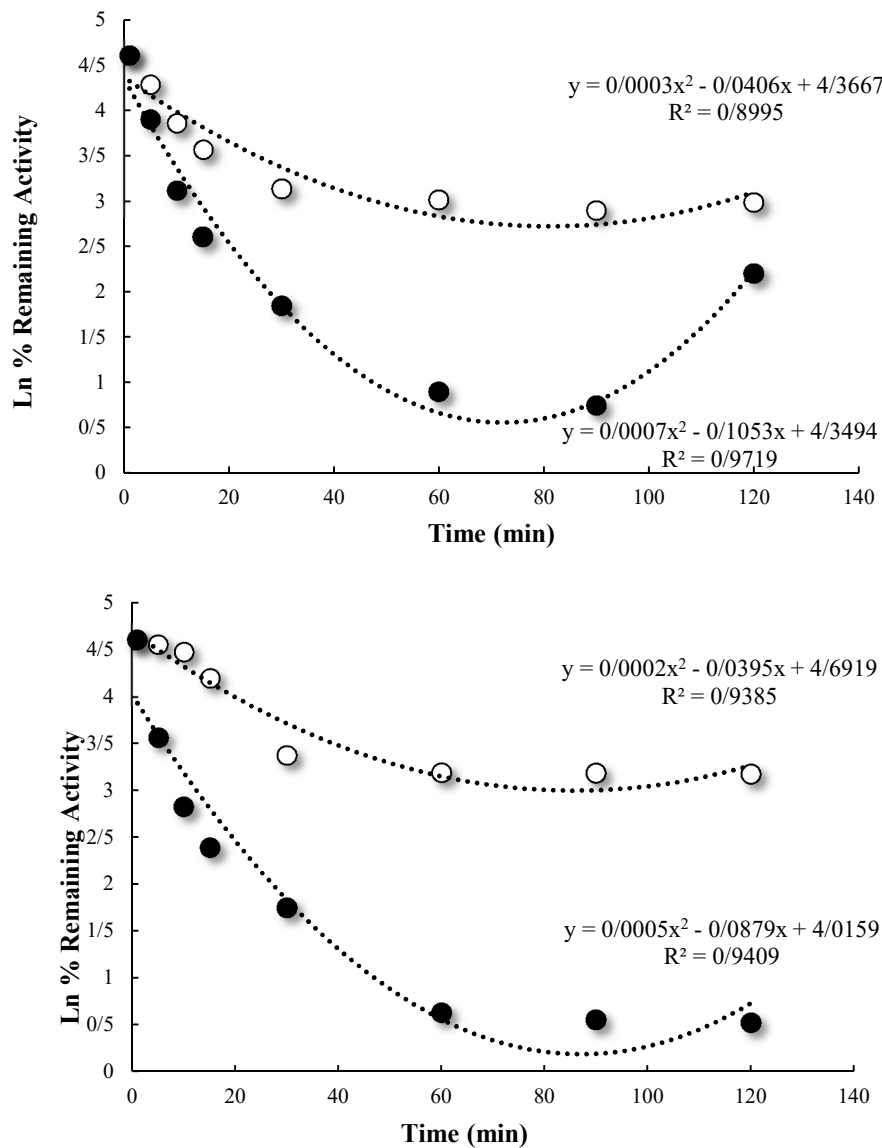
نمونه‌های حاوی آنزیم در بافر استات سدیم با pH برابر با $5/5$ بدون حضور سوبسترا در دمای 55°C ، 65°C ، 75°C ، 85°C به مدت 120 min تعیین گردید.

در طول زمان نگهداری آنزیم‌ها ($0-120\text{ min}$) در محیط بافری، در فواصل زمانی معین نمونه برداری جهت تعیین میزان فعالیت آنزیم‌ها صورت گرفت. برای هر یک از نمونه‌ها فرایند آبکافت در حضور سوبسترا (محلول نشاسته 5%) در دمای بهینه فعالیت یعنی 65°C انجام شد. پس از گذشت 1 min از آبکافت، مقدار معینی نمونه برداشت و به معرف DNS اضافه شد. پس از تعیین درصد باقی‌مانده فعالیت آنزیم‌ها در هر دما با رسم نمودار لگاریتم طبیعی درصد باقی‌مانده فعالیت آنزیم میزان پایداری حرارتی آنزیم‌های فانگامیل و مالتوژنز آزاد و تثبیت شده نسبت به زمان آبکافت بررسی و با تعیین شیب خط نمودار، ضریب غیرفعال شدن (k_{in}) در هر دما مشخص گردید. مقاومت دمایی آنزیم آزاد و تثبیت شده بر حسب زمان در دماهای $55-95^\circ\text{C}$ در شکل (۸) نشان داده شده است.

همان‌طور که مشهود است پایداری حرارتی آنزیم پس از تثبیت به‌طور قابل ملاحظه‌ای نسبت به آنزیم آزاد افزایش یافته و آنزیم تثبیت شده نسبت به غیرفعال سازی حرارتی مقاوم‌تر شده است که می‌توان آن را به افزایش استحکام ساختار آنزیم پس از تثبیت توسط ایجاد پیوندهای کووالانسی نسبت داد. این نوع اتصالات کووالانسی هم در اثر ایجاد پیوندهای درون مولکولی بین مولکول‌های آنزیمی تجمع یافته و متصل شده با گلوترآلدئید (اتصالات جانبی درون و برون مولکولی) ایجاد شده و علاوه بر این، در نتیجه اتصال مولکول‌های آنزیمی با نانو ذرات مغناطیسی در نقاط مختلف شکل گرفته که موجب ایجاد استحکام بیش‌تر ساختار مولکولی در اثر کاهش انعطاف پذیری و افزایش سختی ساختار آنزیم‌ها گردیده و در نهایت احتمال فروپاشی و یا ایجاد تغییرات نامطلوب را کاهش می‌دهد. از طرف دیگر، اتصالات کووالانسی یاد شده ساختار جایگاه فعال آنزیم‌ها را به‌خوبی



شکل (۸) مقاومت دمایی مجموعه آنزیم‌های آزاد و تثبیت شده در دماهای ۵۵، ۶۵، ۷۵، ۸۵، و ۹۵° C
 Fig. 8. Thermal stability of combined free and immobilized enzymes at 55, 65, 75, 85, and 95° C



ادامه شکل (۸) مقاومت دمایی مجموعه آنزیم‌های آزاد و تثبیت شده در دماهای ۵۵، ۶۵، ۷۵، ۸۵، ۹۵°C
Fig. 8. Thermal stability of combined free and immobilized enzymes at 55, 65, 75, 85, and 95°C

جدول (۳) نیمه عمر آنزیم‌های آزاد و تثبیت شده در دماهای ۵۵، ۶۵، ۷۵، ۸۵، ۹۵°C.
Table 3. Enzyme half-life of combined free and immobilized enzymes at 55, 65, 75, 85, and 95°C.

دما Temperature (° C)	نیمه عمر آنزیم (t _{1/2}) Enzyme half-lives (t _{1/2}) min	
	آنزیم‌های آزاد Free Enzymes	آنزیم‌های تثبیت شده Immobilized Enzymes
55	3465	4950
65	1733	4331
75	693	3850
85	495	1155
95	385	866

از تثبیت هم زمان دو آنزیم فانگامیل و مالتوزن با استفاده از پیوندهای کوالانسی بر روی نانو ذرات مغناطیسی عامل‌دار شده با لیزین استفاده شده است. تثبیت دو آنزیمی انجام شده در این تحقیق به صورت Combi-CLEAs در مقیاس نانو همراه با نانو ذرات مغناطیسی عامل‌دار شده با لیزین برای اولین بار در جهان انجام شده و به عنوان نوآوری این تحقیق محسوب می‌گردد. روش CLEAs در چند دهه گذشته به عنوان روشی موثر و توسعه یافته جهت تثبیت آنزیم شناخته شده، زیرا در این روش عدم استفاده از حامل‌های گران قیمت موجب کاهش هزینه‌های تولید می‌گردد. به منظور تثبیت آنزیم به روش CLEAs با افزودن حلال‌های آلی، ساختار سوم مولکول پروتئینی آنزیم به صورت فیزیکی و با حفظ فعالیت آنزیم رسوب داده شده (تجمع آنزیمی) و پس از آن تجمع‌های مولکولی به صورت شیمیایی و به کمک کراس لینکر گلوتر آلدئید به یکدیگر متصل گردیده و در نهایت CLEAs توسط فرایند صافی و یا سانتریفیوژ جدا سازی می‌گردد.

مولکول‌های پروتئینی قادر به تشکیل ساختارهای تجمع یافته با حفظ ساختار سه بعدی اولیه خود در محیط‌های با قدرت یونی بالا (نمک‌ها)، پلیمرهای غیر یونی، و یا حلال‌های آلی می‌باشند. مرحله ترسیب پروتئین، به شدت پایداری و فعالیت CLEAs تولید شده را تحت تاثیر قرار می‌دهد. به همان نسبت انتخاب عوامل تجمع کننده در فرایند ترسیب بسیار مهم بوده و به طبیعت آنزیم، روش و مدت زمان فرایند، درجه حرارت و pH محیط واکنش بستگی دارد [۳۸]. در حقیقت، ترت-بوتانل که یک حلال آلی محلول در آب قطبی می‌باشد باعث کاهش ثابت دی الکتریک مولکول‌های آب اطراف مولکول‌های آنزیم شده (ثابت دی الکتریک مولکول‌های آب ۷۸/۳ و ترت-بوتانل ۱۲/۵ می‌باشد) و به تدریج جایگزین آب موجود در سطح پروتئین می‌گردد. با کوچک شدن این لایه هیدراته، مولکول‌های آنزیم به وسیله جاذبه‌های الکترواستاتیک و نیروهای دی پل به صورت تجمع یافته در می‌آیند [۳۹].

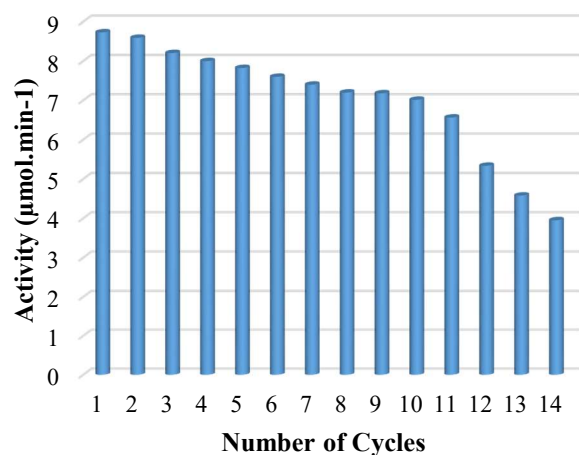
همانگونه که قبلاً نیز اشاره گردید، با وجود فواید بسیار زیاد روش تثبیت آنزیم به صورت CLEAs، مشکلاتی مانند محدودیت در انتقال جرم به علت بزرگی اندازه توده‌های آنزیمی شکل گرفته، هم‌چنین پخش و پراکنده شدن توده آنزیمی بخاطر وجود تخلخل بسیار کم و نرم بودن ساختار CLEAs در حین فرایندهای

۱۱.۳. تعیین تعداد سیکل‌های استفاده مجدد از آنزیم

تثبیت شده

قابلیت استفاده مجدد آنزیم تثبیت شده با اندازه‌گیری فعالیت آنزیم بعد از هر بار استفاده بررسی می‌شود. تعیین فعالیت به تعداد ۱۴ سیکل اندازه‌گیری شد. فعالیت باقی‌مانده در هر سیکل بر اساس نسبت فعالیت آنزیم به فعالیت آن در سیکل اول بر اساس درصد بیان می‌شود. از مزایای تثبیت آنزیم جداسازی آسان و استفاده دوباره از آن می‌باشد. با توجه به نتایج به دست آمده، مشخص شد که آنزیم تثبیت شده پس از ۱۰ سیکل ۸۰/۳۶٪ و پس از ۱۳ سیکل بیش از ۵۰ درصد از فعالیت خود را حفظ کرده است (شکل ۹). بنابراین نشان دهنده این است که پتانسیل بیو کاتالیست به خوبی حفظ شده است.

قابلیت استفاده مجدد آنزیم تثبیت شده منجر به صرفه جویی در زمان و مقدار آنزیم می‌شود و فرایند را از نظر اقتصادی با صرفه می‌سازد و قیمت تمام شده فرآورده نهایی را کاهش می‌دهد.



شکل (۹) قابلیت استفاده مجدد از آنزیم تثبیت شده طی سیکل‌های متناوب
Fig. 9. Reusability of immobilized enzyme during successive cycles

۴. نتیجه گیری

هدف اصلی این تحقیق تهیه شربت با مالتوز بالا از نشاسته ذرت با استفاده از آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و مالتوزنیک آمیلاز تثبیت شده با روش تجمع آنزیمی با اتصالات جانبی و نانو مغناطیسی NM-Combi-CLEAs بوده است. در این تحقیق

به شرایط محیطی از جمله دما و pH به‌طور چشمگیری بهبود پیدا کرد. با انجام این روش تثبیت میزان پایداری دمایی آنزیم تثبیت شده بهبود یافت بطوری که نیمه عمر ($t_{1/2}$) آنزیم تثبیت شده به میزان ۲/۵ برابر در دمای 95°C نسبت به آنزیم آزاد افزایش نشان داد.

از دیگر نتیجه‌های مثبت این تحقیق استفاده مکرر از آنزیم در فرایند و حفظ فعالیت آن نسبت به فعالیت اولیه خود بود به‌طوری‌که آنزیم تثبیت شده پس از گذشت ۱۰ سیکل پی در پی هم چنان ۸۰/۳۶٪ از فعالیت اولیه خود را حفظ نمود. قابلیت استفاده مجدد آنزیم تثبیت شده منجر به صرفه جویی در زمان و میزان آنزیم مورد استفاده می‌شود و فرایند را از نظر اقتصادی مقرون به صرفه می‌سازد.

بهبود پارامترهای سینتیکی آنزیم مخصوصاً کاهش میزان K_m پس از تثبیت نشان داد که میزان تمایل جایگاه فعال آنزیم برای اتصال به سوبسترا افزایش یافته است. می‌توان این افزایش تمایل را به ایجاد تغییرات ساختاری تصادفی در CLEAs شکل گرفته و در نتیجه قابلیت دسترسی آسان‌تر سوبسترا به جایگاه فعال آنزیم نسبت داد.

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان ادعا نمود که تثبیت هم زمان دو آنزیم فانگامیل و مالتوزن با استفاده از روش تجمع آنزیمی با اتصالات جانبی روشی کارآمد برای تثبیت آنزیم آزاد می‌باشد. دارا بودن قابلیت استفاده مجدد از آنزیم تثبیت شده به میزان ۱۴ سیکل همراه با باقی‌مانده فعالیت کاتالیتیکی توام با راندمان بالا جهت آبکافت نشاسته ذرت و تبدیل آن به شربت با مالتوز بالا با حفظ مقاومت حرارتی تا دمای 95°C و افزایش چند برابری نیمه عمر آنزیم تثبیت شده نسبت به آنزیم آزاد، هم‌چنین جداسازی آسان آن از مخلوط واکنش توسط میدان مغناطیسی تاییدی بر این ادعا می‌باشند.

جداسازی (صاف نمودن و سانتریفوژ کردن) و مشکلات مربوط به بازیابی CLEAs از محیط واکنش، مخصوصاً در حین فرایندهای صنعتی، موجود است.

به همین دلیل برای رفع چنین مشکلاتی، در این تحقیق کاهش اندازه CLEAs در مقیاس نانو با هدف افزایش انتقال جرم و سهولت در اتصال جایگاه فعال آنزیم به سوبسترا و جدا شدن آسان تر محصول تولید شده از جایگاه فعال صورت گرفت. علاوه بر این به خاطر جداسازی آسان تر ذرات آنزیمی تشکیل شده از محیط واکنش، از اتصال نانو ذرات مغناطیسی عامل‌دار شده با اسید آمینه لیزین استفاده گردید [۱۲، ۴۰].

کاهش اندازه ذرات در محدوده نانو سبب بهبود بازدهی و کارایی آنزیم تثبیت شده گردید زیرا سطح بزرگ‌تری برای اتصال آنزیم با نانو ذرات مغناطیسی فراهم شد. در نتیجه بارگذاری آنزیم در واحد سطح به حجم ذرات و تولید محصول نهایی افزایش می‌یافت. بهینه سازی شرایط تثبیت آنزیم صورت گرفت و مشخص شد که استفاده از نسبت آنزیم مالتوزن ۹ برابر فانگامیل، ترت بوتانول به‌عنوان حلال بهینه، pH و دمای مناسب کار به ترتیب ۶ و 65°C ، گلوتر آلدئید با غلظت ۲ mM، میزان لیزین ۰/۷۵ برابر پروتئین کل آنزیم و مدت زمان نگهداری ۲۴ h در دمای 4°C – 3°C شرایط ایده‌آل برای شکل‌گیری NM-Combi-CLEAs آنزیم‌های ذکر شده می‌باشند. انجام طیف‌سنجی FTIR مربوط به نانو ذرات مغناطیسی و CLEAs نانو مغناطیسی مجموعه آنزیمی در ناحیه 4000 – 400 cm^{-1} ، ظهور طیف‌های جدید مربوط به NH_2 در ناحیه 1600 و NH در ناحیه 3373 را در مقایسه با طیف نانو ذرات مغناطیسی، نشان از تثبیت ساختار پروتئینی مجموعه آنزیم‌های آمیلاز روی نانو ذرات مغناطیسی بود. آزمون‌های مربوط به تعیین اندازه ذرات، بررسی شکل و ساختار نانو ذرات تشکیل شده، تعیین میزان فعالیت آنزیم تثبیت شده در مقایسه با آنزیم آزاد در محدوده دمایی مختلف، هم‌چنین مقایسه نیمه عمر و پارامترهای سینتیکی آنزیم آزاد و تثبیت شده و قابلیت استفاده مجدد از آنزیم تثبیت شده، مجموعاً کارایی و عملکرد بالای کاتالیزور زیستی تهیه شده با این روش را اثبات نمودند.

اگرچه فعالیت آنزیم تثبیت شده نسبت به مخلوط آنزیم‌های آزاد اندکی کاهش یافت اما میزان محصول تولید شده (مالتوز) با گذشت زمان سیر صعودی یافت. علاوه بر این، مقاومت آن نسبت

منابع

- lignocellulolytic enzymes. *Enzyme. Microb. Technol.*, 61-62, 17-27
- [14] Lu, A.H., Salabas, E.L., Schüth, F. (2007). Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 46 (8), 1222-44.
- [15] Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Elst, L.V. (2008). Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem. Rev.*, 108, 2064-2110.
- [16] Cao, M., Wang, J., Li, Z., Ge, W., Yue, T., Li, R. (2012). Food related applications of magnetic iron oxide nanoparticles: Enzyme immobilization, protein purification, and food analysis. *Trends Food Sci. Technol.*, 27, 47-56.
- [17] Gupta, A., Gupta, M. (2005). Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials.*, 26, 3995-4021.
- [18] Schüth, F., Lu, A.H., Salbas, E.L. (2007). Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 46, 1222-1244.
- [19] Reddy, L., Arias, J., Nicolas, J., Couvreur, P. (2012). Magnetic nanoparticles: Design and Characterization, Toxicity and Biocompatibility. Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Chem. Rev.*, 112, 5818-5878.
- [20] Berry, C.C., Curtis, A.S.G. (2003). Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 36, 198-206.
- [21] Cruz-Izquierdo, A., Pico, E.A., Lopez, C., Serra, J.L., Liama, M. J. (2014). Magnetic Cross-Linked Enzyme Aggregates (mCLEAs) of *Candida antarctica* Lipase: An Efficient and Stable Biocatalyst for Biodiesel Synthesis. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 436, 1145-1151.
- [22] Liu, W., Bai, S., Sun, Y. (2004). Preparation of nanoparticles and its application in lipase immobilization. *J. Process. Eng.*, 4, 362-366.
- [23] Khoshnevisan, K., Bordbar, A.K., Zare, D., Davoodi, D., Noruzi, M., Barkhi, M. (2011). Immobilization of cellulase enzyme on superparamagnetic nanoparticles and determination of its activity and stability. *Chem. Eng. J.*, 171, 669-673.
- [24] Hsieh, H.C., Kuan, I.C., Lee, S.L., Tien, G.Y., Wang, Y.J., Yu, C.Y. (2009). Stabilization of D-amino acid oxidase from *Rhodospiridium toruloides* by immobilization onto magnetic nanoparticles. *Biotechnol. Lett.*, 31(4), 557-563.
- [25] Namdeo, M., Bajpai, S.K. (2009). Immobilization of α -amylase onto cellulose-coated magnetite (CCM) nanoparticles and preliminary starch degradation study. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 59, 134-139.
- [26] Torabizadeh, H., Habibi-Rezaei, M., Safari, M., Moosavi-Movahedi, A.A., Sharifzadeh, A., Azizian, H., Amanlou, M. (2011). Endo-inulinase stabilization by pyridoxal phosphate modification: A kinetics,
- [1] Tomasik, P., Horton D. (2012). Enzymatic Conversions of starch. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 68, 59-436.
- [2] Romaškevič, T., Budrienė, S., Liubertienė, A., Gerasimčik, I., Zubrienė, A., Dienys, G. (2007). Synthesis of chitosan-graft-poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate copolymer and its application for immobilization of maltogenase. *Chemija.*, 18, 33-38.
- [3] Bakker, M., van de Velde, F., van Rantwijk, F., Sheldon, R.A. (2000). Highly efficient immobilization of glycosylated enzymes into polyurethane foams. *Biotechnol. Bioeng.*, 70, 342-348.
- [4] Straksys, A., Kochane, T., Budriene, S. (2016). Catalytic properties of maltogenic α -amylase from *Bacillus stearothermophilus* immobilized onto poly(urethane urea) microparticles. *Food Chem.*, 294-299
- [5] Demir, A., Topkaya, R., Baykal, A. (2013). Green synthesis of superparamagnetic Fe_3O_4 nanoparticles with maltose: Its magnetic investigation. *Polyhedron.*, 65, 282-287.
- [6] Saha, B.C., Jordan, D.B., Bothast, R.J. (2009). Enzymes, Industrial (overview), 3rd ed. *Encyclopedia of Microbiology.*, 281-294.
- [7] Talekar, S., Pandharbale, A., Ladole, M., Nadar, S.H., Mulla, M., Japhalekar, K., Pattankude, K., Arage, D. (2013). Carrier free co-immobilization of α amylase, glucoamylase and pullulanase as combined cross-linked enzyme aggregates (combi-CLEAs): a tri-enzyme biocatalyst with one pot starch hydrolytic activity. *Bioresour. Technol.*, 147, 269-275.
- [8] Naadar, S.S., Rathod, V.K. (2015). Magnetic macromolecular cross linked enzyme aggregates (CLEAs) of glucoamylase. *Enzyme. Microb. Technol.*, 83, 78-87.
- [9] Cao L., Langen L., Sheldon R.A. (2003). Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? *Curr. Opin. Biotechnol.*, 14(4), 387-394.
- [10] Matijosević, I., Arends, I.W.C.E., Vries, S., Sheldon, R.A. (2010). Preparation and use of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of laccases. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 62, 142-148.
- [11] Talekar, S., Ghodake, V., Ghotage, T., Rathod, P., Deshmukh, P., Nadar, S.H., Mulla, M., Ladole, M. (2012). Novel magnetic cross-linked enzyme aggregates (magnetic CLEAs) of α amylase. *Bioresour. Technol.*, 123, 542-547.
- [12] Torabizadeh, H., Mikani, M. (2018). Kinetic and thermodynamic features of nanomagnetic cross-linked enzyme aggregates of naringinase nanobiocatalyst in naringin hydrolysis. *Int. J. Biol. Macromol.*, 119, 717-725.
- [13] Bhattacharya, A. B., Pletschke, I. (2014). Magnetic cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel concept towards carrier free immobilization of

- [38] Ribeiro, M.H.L., Rabaça, M. (2011). Cross-linked enzyme aggregates of naringinase: novel biocatalysts for naringin hydrolysis. *Enzyme Res.*, 2011, 1-8.
- [39] Ramachandran, N., Hamborg, E.S., Versteeg, G.F. (2013). The effect of aqueous alcohols (methanol, t-butanol) and sulfolane on the dissociation constants and thermodynamic properties of alkanolamines. *Fluid Phase Equilib.*, 360, 36-43.
- [40] Sheldon, R.A., van Pelt, S. (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chem. Soci. Rev.*, 42, 6223-6235.
- thermodynamics, and simulation approach. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 165, 1661-1673.
- [27] Zia, M., Ali, A., Zafar, H., Haq, I.U., Phull, A.R., Ali, J.S., Hussain, A. (2016). Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. *Nanotechnol. Sci. Appl.*, 9, 49-67.
- [28] Couto, G., Klein, J., Schreiner, W., Mosca, D., Oliveira, A., Zarbin, A. (2007). Nickel nanoparticles obtained by a modified polyol process: Synthesis, Characterization, and Magnetic Properties. *J. Colloid Interface Sci.*, 311, 461-468.
- [29] Bahmaie, M., Abbasi, L., Faraji, M. (2013). Synthesis of magnetic nanoparticles (Fe₃O₄) and its application for extraction and preconcentration of drug sample from environmental samples. *J. Semnan.*, 8, 29-37.
- [30] Gao, Y., Kyrtziz, I. (2008). Covalent immobilization of proteins on carbon nanotubes using the cross-linker 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide-A critical assessment. *Bioconjugate Chem.*, 19, 1945-1950.
- [31] Nakamura, T., Ogata, Y., Akichika, S., Nakamura, A., Ohta, K. (1995). Continuous production of fructose syrups from inulin by immobilized inulinase from *Aspergillus niger* mutant 817. *J. Ferment. Bioeng.*, 80, 164-169.
- [32] Missau, J., Scheid, A.J., Foletto, E.L., Jahn, S.L., Mazutti, M.A., Kuhn, R.C. (2014). Immobilization of commercial inulinase on alginate-chitosan beads. *Enzyme Microb Technol.*, 2, 2-13.
- [33] Torabizadeh, H., Tavakoli, M., Safari, M. (2014). Immobilization of thermostable Alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* by cross-linked enzyme aggregates method using calcium and sodium ions as additives. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 108, 13-20.
- [34] Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- [35] Viota, J.L., Arroyo, F.J., Delgado, A.V., Horno, J. (2010). Electrokinetic characterization of magnetite nanoparticles functionalized with amino acids. *J. Colloid Interface Sci.* 344, 144-149.
- [36] Antal, I., Koneracka, M., Kubovcikova, M., Zavisova, V., Khmara, I., Lucanska, D., Jelenska, L., Vidlickova, I., Zatovicova, M., Pastorekova, S., Bugarova, N., Micusik, M., Omastova, M., Kopcansky, P. (2018). D,L-lysine functionalized Fe₃O₄ nanoparticles for detection of cancer cells. *Colloids Surf. B: Biointerfaces.* 163, 236-245.
- [37] Vršanská, M., Voběrková, S., Jiménez Jiménez, A.M., Strmiska, V., Adam, V. (2017). Preparation and Optimisation of Cross-Linked Enzyme Aggregates Using Native Isolate White Rot Fungi *Trametes versicolor* and *Fomes fomentarius* for the Decolourisation of Synthetic Dyes. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 23, 1-15.