Archive of SID

ISSN: 2476-6917; Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(3):351-361

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.

[1]Bioprocess Engineering Department, Institute of Industrial & Environmental Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering & Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran
[2]Chemistry Department, Sciences Faculty, University of Zanjan, Zanjan, Iran
[3]New Biotechnology Research Center, Ibn Sina Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Tehran, Iran
[4]Young Researcher & Elite Club, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[4]Plant 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
aliramazani@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 glycidoxypropyltrimethoxylsilane (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 H 2 O 2 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

Copyright© 2019, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

www.SID.ir

Archive of SID

تفکیک انانتیومرهای ایبوپروفن با استفاده از آنزیم Rhizomucor miehei lipase (RML) تثبیت‌شده به روش جذب سطحی و کوالانسی

مهدی محمدی* PhD
گروه مهندسی زیست فرآیند، پژوهشکده صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران
علی رمضانی* PhD
گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران
مریم گرمرودی MSc
گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران
مریم یوسفی PhD
مرکز تحقیقات فناوری‌های 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 زیست‌فرآورده‌های گیاهی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران

چکیده
در این تحقیق تفکیک انانتیومرهای ایبوپروفن راسمیک توسط آنزیم لیپاز تثبیت‌شده *Rhizomucor miehei* lipase (RML) روی مشتقات سیلیکا و نانوذره متخلخل سیلیکا SBA-15 مورد مطالعه قرار گرفت. به این منظور و برای بهره‌مندی از مزایای دو روش جذب هیدروفوب و اتصال کوالانسی، تثبیت آنزیم RML روی بسترهای حاوی دو گروه عاملی متفاوت به‌صورت همزمان صورت پذیرفت. اصلاح شیمیایی بسترهای سیلیکا و نانوذرات حفره‌دار سیلیکاتی توسط دو عامل با نسبت‌های مختلف انجام شد؛ عامل اکتیل‌تری‌اتوکسی‌سیلان (OTES) به‌عنوان عامل هیدروفوب‌کننده و ۳- گلایوکسی‌پروپیل-تری‌متوکسی‌سیلان (GPTMS) به‌منظور اتصال کووالانسی آنزیم RML انتخاب شد. نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهد، مشتقات به‌دست‌آمده از آنزیم RML تثبیت‌شده روی بسترهای حاوی گروه عامل اکتیل، فعالیت ویژه‌ای در حدود ۱/۵ تا ۲ برابر فعالیت ویژه آنزیم آزاد دارند. همچنین با افزایش تعداد گروه‌های اپوکسی، فعالیت مضاعف و میزان رهایش آنزیم کاهش یافت. مناسب‌ترین بستر، با توجه به بررسی فعالیت ویژه پس از تثبیت و رهایش آنزیم RML، مربوط به مشتق به‌دست‌آمده از بستری بود که گروه‌های عاملی اپوکسی و اکتیل را با نسبت یک‌به‌یک دارد. مشتق حاضر و همچنین مشتقات به‌دست‌آمده 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 انانتیومر S- ایبوپروفن مربوط به بسترهای سیلیکا اکتیل‌اپوکسی ۱/۱ و SBA اکتیل-اپوکسی ۱/۱ در دمای محیط بود.

کلیدواژه‌ها: *Rhizomucor miehei* lipase، تثبیت هیدروفوب، انانتیوگزین، ایبوپروفن، 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 دهه‌های گذشته بر اهمیت کایرالیته روزبه‌روز افزوده شده و به بحثی مهم در شیمی آلی و صنایع داروسازی مبدل شده است[1]. در بسیاری از ترکیبات شیمیایی که به‌عنوان دارو استفاده می‌شوند اغلب تنها یک انانتیومر دارو عامل موثر است و اثر دارویی دارد، در حالی که انانتیومر دیگر اثر دارویی کمتری دارد، یا به‌طور کل فاقد اثر است و در بدترین حالت اثرات سمی جبران‌ناپذیری دارد. یکی از انواع داروهای موفق تجاری که به‌طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد، داروهای مسکن ضدالتهابی غیراستروئیدی (NAIDs) است[1, 2]. ایبوپروفن، ٤- ایزوبوتیل پروپیونیک‌اسید، یکی از مهم‌ترین و شناخته‌شده‌ترین انواع داروهای مسکن ضدالتهابی غیراستروئیدی (NAIDs) است که به‌طور گسترده‌ای در درمان التهاب در بیماری‌هایی مانند درمان آرتروز روماتوئید مورد استفاده قرار می‌گیرد. با این که ایبوپروفن دارویی با سمیت کم و مصرف بالا در پزشکی است، اما به‌صورت یک مخلوط راسمیک عرضه می‌شود. کربن آلفا (α) گروه کربوکسیل مولکول ایبوپروفن مرکز کایرال مولکول است[3, 4]. انانتیومر S در مولکول ایبوپروفن ۱٦۰ برابر فعالیت دارویی بیشتری نسبت به فرم R این مولکول دارد[3]. این انانتیومر اغلب دارای سمیت کمتری بوده و مصرف‌کننده آن کمتر دچار عوارض مربوط به مصرف آن می‌شود. در حالی که فرم دیگر آن می‌تواند 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 آدنوزین‌تری‌فسفات (ATP) به ایزومر S تبدیل می‌شود اما در محلول بافر با میزان pH برابر با ۷/٤ یا پلاسمای انسانی چنین تبدیلی صورت نمی‌گیرد[5]. ایزومر (R) ایبوپروفن به‌علت تجمع در بافت‌های چربی و تبدیل به مخلوطی از استرهای گلیسرول دارای اثرات سمی است[6]. به همین دلیل امروزه به‌علت محدودیت استفاده از دوزهای بالا، سمیت و اثرات جانبی تمایل فزاینده‌ای به تهیه انانتیومر خالص این دارو در فرم S وجود دارد[7].

تفکیک انانتیومرها را می‌توان با روش‌های مختلفی از جمله کروماتوگرافی کایرال به روش مبادله لیگاند (CLEC)، تبلور دیاستریومریک و روش آنزیمی افزایش داد[8]. در میان این روش‌ها، استفاده از آنزیم‌های لیپاز به‌منظور تفکیک انانتیومرها روشی بسیار جذاب و سودمند است[9].

لیپازها (E.C. 3.1.1.3) طیف وسیعی از آنزیم‌ها را در بر می‌گیرند که به‌عنوان بیوکاتالیست در واکنش‌های هیدرولیز استرها، آمینولیز، استریفیکاسیون، ترانس‌استریفیکاسیون و لاکتونیزیشن مورد استفاده قرار می‌گیرند. لیپازها علاوه بر اهمیت بیولوژیکی، دارای نقش مهمی در بیوتکنولوژی هستند. آنها نه‌تنها در هیدرولیز روغن‌ها بلکه برای تهیه حدواسط‌های کایرال هم مورد استفاده قرار می‌گیرند. سایت فعال لیپازها به‌گونه‌ای است که به‌راحتی انانتیومرها را از هم تشخیص داده و همین امر سبب انانتیوگزینی بالای این آنزیم‌ها می‌شود[10]. انتخاب‌گری بالا و شرایط ملایم

www.SID.ir

Archive of SID

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 به‌نام 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. تثبیت‌کردن آنزیم‌ها روی بستر جامد علاوه بر اقتصادی‌بودن دارای مزایایی مانند استفاده مجدد از آنزیم، کنترل مداوم و آسان واکنش، جداسازی آسان محصولات، افزایش پایداری بوده و باعث به حداقل‌رساندن 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 محبوس‌شدن فیزیکی آنها اشاره کرد[12]. جذب هیدروفوب آنزیم روی بستر نیز یکی از روش‌های تثبیت فیزیکی آنزیم‌ها است که عمدتاً برای تثبیت آنزیم‌های لیپاز کاربرد دارد[15]. آن‌گونه که قبلا اشاره شد آنزیم‌های لیپاز عمدتاً 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، کم‌هزینه‌بودن 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 به‌راحتی از سطح بستر جدا شده و موجب آلودگی محیط واکنش شود. در سویی دیگر، تثبیت از طریق اتصال کووالانسی 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 کووالانسی تثبیت می‌شود و در انتهای هر واکنش در محصول هیچ‌گونه آلودگی پروتئینی ناشی از رهایش آنزیم در محیط واکنش نخواهیم داشت، در نتیجه در هر دو محیط آبی و آلی و در حضور عوامل تخریب‌کننده، پیوند کووالانسی 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 ایبوپروفن 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 ۶۳-۲۰۰میکرومتر، سایز حفرات ۶۰آنگستروم و حجم حفرات تقریباً ۰/۸سانتی‌مترمکعب بر گرم) بود. آنزیم RML، اکتیل‌تری‌اتوکسی‌سیلان ۹۷%، تترااتیل‌ارتوسیلان، پارانیتروفنیل‌بوتیرات، تری‌اتیل‌آمین، ۳-گلایوکسی پروپیل-تری متوکسی‌سیلان، استاندارد-(+)-(s) ایبوپروفن، پلی (اتیلن‌گلیکول)- بلاک- پلی (پروپیلن- گلیکول)- بلاک- پلی (اتیلن‌گلیکول) یا P123، آب‌اکسیژنه، ساکروزلوریت، تریتون X100، CTAB، استونیتریل و مولکولار سیو مصرفی (سیگما؛ ایالات متحده) تهیه شدند. حلال‌های ایزواکتان و n- هگزان مصرفی (مرک؛ آلمان) نیز به کار رفتند. ایبوپروفن 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.

www.SID.ir

Archive of SID

روش‌ها

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

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

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

سنتز SBA-15: ٦گرم سورفکتانت پلورونیک‌اسید در محلولی که حاوی ۳۰میلی‌لیتر اسیدکلریدریک غلیظ در ۱۳۷میلی‌لیتر آب مقطر بود، حل شد. پس از انحلال کامل، سورفکتانت به محلولی دو فازی که از ۱۳/۷گرم تترا اتوکسی‌ارتوسیلیکیت در ۵۰میلی‌لیتر آب مقطر تهیه شده بود، قطره‌قطره و در حال هم‌زدن اضافه شد. سپس مخلوط به یک ظرف تفلونی منتقل و به‌مدت ۴۸ساعت به آون تحت دمای ۱۰۰°C انتقال یافت. رسوب سفیدرنگ به‌دست‌آمده صاف و با آب مقطر تا رسیدن به pH خنثی شس‌وشو داده شد. ترکیب به‌دست‌آمده در دمای محیط خشک شد و به‌منظور حذف سورفکتانت به‌مدت ۶ساعت در کوره با دمای ٥٤٠°C به‌منظور تکلیس‌شدن قرار گرفت.

عامل‌دارکردن SBA-15 با گروه‌های اپوکسی: ۰/۵گرم SBA-15، ۳۰میلی‌لیتر تولوئن خشک و ۷۵میکرولیتر تری‌اتیل‌آمین درون بالن دو دهانه ریخته و در اتمسفر گاز ازت تحت عمل رفلاکس قرار گرفت. پس از گذشت ۲۰دقیقه از آغاز رفلاکس، یک‌میلی‌لیتر لینکر "۳-گلایوکسی پروپیل- تری‌اتوکسی‌سیلان" قطره‌قطره به محیط واکنش اضافه شد. پس از ۳ساعت و اتمام واکنش بستر حاصل فیلتر شده و با اتانول ۹۶% و آب مقطر شست‌وشو داده شد. در انتها ذرات بستر به‌مدت ۸ساعت در دمای ۱۰۰°C قرار گرفت.

عامل‌دارکردن SBA-15 با گروه‌های اکتیل: ۰/۵گرم SBA-15، ۳۰میلی‌لیتر تولوئن خشک و ۷۵میکرولیتر تری‌اتیل‌آمین درون بالن دو دهانه ریخته و در اتمسفر گاز ازت تحت عمل رفلاکس قرار گرفت. پس از گذشت ۲۰دقیقه از آغاز رفلاکس، یک‌میلی‌لیتر لینکر "اکتیل تری‌اتوکسی‌سیلان" قطره‌قطره به محیط واکنش اضافه شد. پس از ۳ساعت و اتمام واکنش بستر حاصل فیلتر شده و با اتانول ۹۶% و آب مقطر شست‌وشو داده شد. در انتها ذرات بستر به‌مدت ۸ساعت در دمای ۱۰۰°C قرار گرفت.

عامل‌دارکردن SBA-15 با گروه‌های اکتیل و اپوکسی با نسبت ۱:۱: سنتز مشتق SBA-15اا کتیل اپوکسی نیز مانند بسترهای SBA-15 اکتیل و اپوکسی با نسبت‌های برابر از دو لینکر صورت گرفت.

تثبیت آنزیم روی بستر سیلیکا: به ۱۰میلی‌لیتر بافر سدیم‌فسفات ۵میلی‌مولار با میزان pH برابر با ۷، ۵میلی‌گرم آنزیم RML اضافه شد. پس از بررسی فعالیت آنزیم آزاد در محلول یک‌گرم بستر عامل‌دارشده به محلول اضافه شد. در زمان‌های مختلف به‌منظور سنجش میزان تثبیت آنزیم از محلول سوپرناتانت نمونه‌برداری شد. پس از گذشت ٢٤ساعت 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 ۳میلی‌لیتر بافر سدیم‌فسفات ۵میلی‌مولار با میزان pH برابر با ۷، ۵میلی‌گرم آنزیم RML و پس از بررسی فعالیت آنزیم آزاد در محلول ۳۰۰میلی‌گرم بستر عامل‌دارشده به محلول اضافه شد. در زمان‌های مختلف به‌منظور سنجش میزان تثبیت آنزیم از محلول سوپرناتانت نمونه‌برداری شد. پس از گذشت ٢٤ساعت 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 ۳٤۸نانومتر (ε=5150 $M^{-1}cm^{-1}$) مورد بررسی قرار گرفت. افزایش جذب به‌دلیل هیدرولیز "پارانیتروفنیل‌بوتیرات" در دمای ۲۵°C در بافر ۱۰میلی‌مولار با میزان pH برابر با ۷ و تولید "پارانیتروفنل" مشاهده شد. به‌طور خلاصه، ۰/۲ تا ۰/۵میلی‌لیتر از لیپاز آزاد یا سوسپانسیون (شاهد یا سوپرناتانت بدون رقیق‌سازی) به ۲/۵میلی‌لیتر از محلول سوبسترا (۰/۸میلی‌مولار) اضافه و هم‌زده شد. هیدرولیز خودبه‌خودی *p*-NPB با استفاده از ۲/۵میلی‌لیتر از محلول سوبسترا در غیاب آنزیم به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. غلظت پروتئین آنزیم آزاد و سوپرناتانت نیز بعد از تثبیت با روش مرسوم برادفورد مورد بررسی قرار گرفت.

سنتز انانتیوگزین استرها توسط مشتقات RML تثبیت‌شده: در ظروف شیشه‌ای سرپیچ‌دار ۱۰میلی‌لیتری که حاوی ۲میلی‌لیتر ایزواکتان یا هگزان، مقدار ۱۰میلی‌مول ایبوپروفن‌راسمیک، ۲۰میلی‌مول الکل‌های (اتانول، متانول و پرپانول) اضافه و پس از آن مقادیر متفاوت بیوکاتالیست به مخلوط حاصل اضافه شد. مخلوط حاصل با همزن مغناطیسی در دماهای ٤°C، دمای محیط و ٤٥°C هم‌زده شد. به‌منظور بررسی دقیق نمونه‌گیری در بازه‌های زمانی متوالی از حلال آلی (۵۰میکرولیتر) انجام شد تا بهترین زمان برای متوقف‌ساختن واکنش به دست آید.

www.SID.ir

Archive of SID

استفاده مجدد از مشتقات تثبیت‌شده در سنتز انانتیوگزین استرها: در ظرف شیشه‌ای سرپیچ‌دار ۱۰میلی‌لیتری ۵۰میلی‌گرم از بیوکاتالیست، ۲میلی‌لیتر حلال ایزواکتان، مقدار ۱۰میلی‌مول ایبوپروفن‌راسمیک و ۲۰میلی‌مول الکل پروپانول با هم مخلوط شد. مخلوط حاصل با همزن مغناطیسی با دور ۱۰۰rpm در دمای محیط هم‌زده شد. پس از ۲٤ساعت 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 ۲٦۰°C، دمای دتکتور ۳۰۰°C و دمای آن در ۱۷۸°C ثابت نگه داشته شد. گاز هلیوم با جریان ۰/۷میلی‌لیتر بر دقیقه بود.

یافته‌ها و بحث

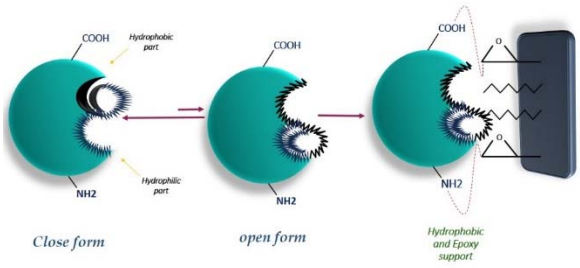
تهیه بستر و آماده‌سازی بسترها: ذرات نانو با داشتن مساحت سطحی نسبتاً بالا در مقایسه با حجمشان از سطح در دسترس بیشتری برای تثبیت برخوردار هستند. در این بین بسترهای نانوسیلیکاتی با داشتن حفرات زیاد در مقیاس نانو، قابلیت استفاده بالایی به‌عنوان حامل در واکنش‌های تثبیت دارند. بستر نانوسیلیکاتی (SBA-15) با 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 ۲۰۱٦ منتشر شد. نتایج به‌دست‌آمده از نمودار جذب و واجذب نیتروژن از حفرات مزوپورهای سیلیکاتی و تکنیک‌های BET/BJH با مشخص‌کردن مشخصات بستر سنتزشده، قطر حفرات را ۸/٦نانومتر نشان می‌دهد. همان‌گونه که جدول ۱ نشان می‌دهد برای این ذرات، اندازه سطح در واحد جرم ٥٤٤مترمکعب بر گرم و حجم کل حفره ۱/۰۵گرم 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 سنتزشده و سیلیکاژل با دو گروه اپوکسی و اکتیل به‌صورت همزمان و در نسبت‌های مختلف این دو لینکر عامل‌دارشده و با روش‌های دستگاهی مورد بررسی و شناسایی قرار گرفت[18]. به‌طور کلی بسترهای سیلیکایی به‌دلیل پایداری شیمیایی، 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 (آنگستروم)	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 کاتالیست‌های 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).



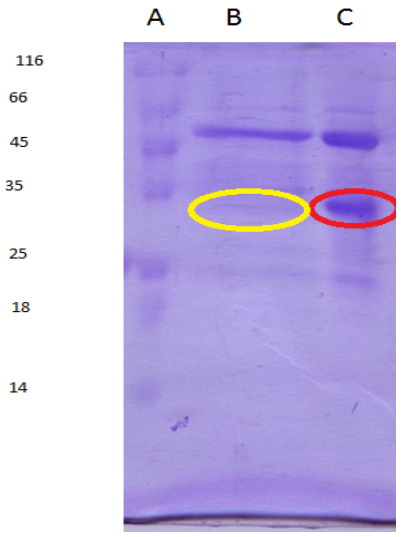
شکل ۱) تثبیت کوالانسی- هیدروفوب لیپاز روی بستر به‌صورت همزمان

بدیهی است شرایط ملایم تثبیت می‌تواند یکی از شاخصه‌های بارز هر روش تثبیت باشد. در این شرایط امکان تخریب ساختار آنزیم و در نتیجه ازبین‌رفتن 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 ۲٤ساعت به طول انجامید، تثبیت روی بستر سیلیکا حاوی اکتیل تنها ٦۰دقیقه 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

www.SID.ir

Archive of SID

حضور گروه‌های اکتیل تثبیت اولیه در مورد همه بسترها و براساس نتایج فعالیت گرفته‌شده از سوپرناتانت در مدت ۲ساعت تکمیل شد و برای اتصال کوالانسی آنزیم ۲۲ساعت دیگر زمان داده شد. شکل ۲ مربوط به ژل SDS-Page آنزیم RML قبل و پس از تثبیت پس از ۲ساعت 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 ۳۳کیلودالتون 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 ٤/٦ 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 ۹۲میکرومول از گروه‌های اپوکسی این مقدار به عدد ۳ می‌رسد و با افزایش بیشتر گروه‌های اپوکسی به ۱/۸ در حضور ۲٤۰میکرومول 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 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 جداشدن 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 ۲/۹برابر بستر سیلیکا است، از این رو مقدار آنزیمی که به‌منظور تثبیت برای بسترهای نانو مورد استفاده قرار گرفت بیش از ۱۰برابر بستر سیلیکا بود (٦۰میلی‌گرم آنزیم به‌ازای یک‌گرم 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 ۱/٦برابر آنزیم آزاد بود. با افزایش گروه‌های اپوکسی مقدار فعالیت کاهش پیدا کرده و در حضور ۷۳۰میکرومول 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 ۷۳۰میکرومول از عامل‌های اپوکسی به صفر رسیده است.

تفکیک آنزیمی انانتیومرهای ایبوپروفن به‌وسیله استریفیکاسیون مخلوط راسمیک‌ایبوپروفن

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 راسمیک‌ایبوپروفن با الکل‌های مختلف و در شرایط مختلف بهره گرفته شد (شکل ۳). مولفه‌های مختلفی در این واکنش می‌توانند تاثیرگذار 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 ایزواکتان 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

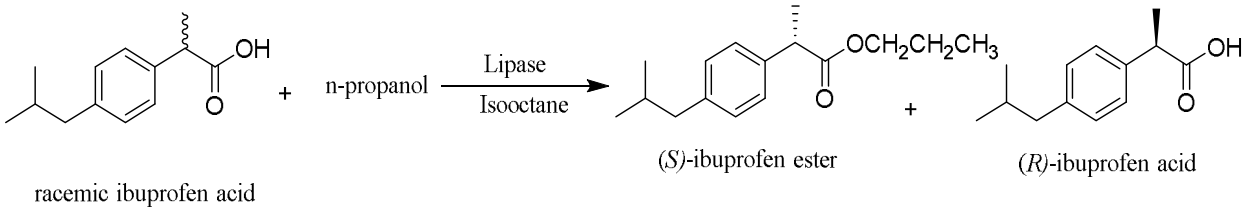
www.SID.ir

Archive of SID

تشکیل استر در این حلال بالا بوده و منجر به نتایج متفاوتی شد که در ادامه به تفصیل به آن پرداخته خواهد شد (شکل ۳).

نتایج حاصل از تفکیک انانتیوگزین مشتقات مختلف ایبوپروفن به‌وسیله آنزیم RML تثبیت‌شده روی بستر Silica-octyl-epoxy

واکنش سنتز آنزیمی استرهای راسمیک ایبوپروفن، ابتدا با بررسی استر پروپانول در دمای ٤٠°C و با استفاده از حلال ایزواکتان انجام شد (جدول ۲). در ساعات مختلف از همان آغاز واکنش، از واکنش‌ها نمونه‌برداری شد و به دستگاه کروماتوگرافی مجهز به ستون کایرال انجام شد (جدول ۲).



شکل ۳) سنتز انانتیوگزین استر ایبوپروفن

جدول ۲) نتایج سنتز استر پروپانول 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
پروپانول	۴°C	۴۰	۱۹	۵۶	۲۵	۴/۳
پروپانول	۴°C	۵۰	۴۱	۴۹	۴۵	۴/۷
پروپانول	۴°C	۷۰	۲۱	۴۹	۳۰	۳/۶
پروپانول	۴°C	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	۴۵°C	۵۰	۷۴	۲۷	۷۳	۳/۵

در همه شرایط، مشتق تثبیت‌شده استریفیکاسیون انانتیومر S را به R ترجیح می‌دهد. بنابراین با گذشت زمان در مواد اولیه مقدار کمتری از انانتیومر S باقی می‌ماند ولی در محصولات مقدار استر S بیشتر از R خواهد بود. نتایج نشان داد که با افزایش زمان درصد تبدیل افزایش می‌یابد. به‌طوری که پس از گذشت ۷۲ساعت با مقدار ۱۰۰میلی‌گرم بیوکاتالیست ۱۰۰% تبدیل در دمای ٤٠°C رخ می‌دهد که عملاً مطالعه انانتیوگزینی را ناممکن می‌سازد. با درنظرگرفتن پارامتر E، مناسب‌ترین نتیجه در این دما مربوط به استفاده از ۱۰۰میلی‌گرم بیوکاتالیست است که پس از گذشت ٤۳ساعت این مقدار به ۵/۵ رسیده است. فزونی انانتیومری ماده اولیه در این حالت به $۹۱% می‌رسد. برای بررسی اثر دما روی پارامتر E و بقیه پارامترهای مربوط به آنزیم واکنش‌های مذکور در دمای محیط و ٤۵°C نیز مورد بررسی قرار گرفت. در دمای محیط از ٤ مقدار متفاوت بیوکاتالیست برای بررسی اثر مقدار بیوکاتالیست استفاده شد. نتایج نشان می‌دهد که مقدار پارامتر E در مقدار ۵۰میلی‌گرم از بیوکاتالیست رشد بهتری پیدا کرده است. با استفاده از این مقدار بیوکاتالیست و پس از گذشت ٤۰ساعت ۵۸% مخلوط راسمیک‌ایبوپروفن به استر مربوطه تبدیل شده که ۸۹% فزونی انانتیومری را در ماده اولیه ایجاد کرده است. همان‌طور که محاسبات نشان می‌دهد مقدار انانتیوگزینی برای این مورد ۱۳/٦ است که در مقایسه با شرایط دیگر نتیجه مناسب‌تری را نشان می‌دهد.

اثر افزایش بیشتر دما بر خصوصیات آنزیم و نتایج واکنش نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از انجام واکنش سنتز استر *S*- ایبوپروفن‌پروپانوات در دمای ٤۵°C در جدول ۲ ذکر شده است. اگرچه با افزایش دما سرعت انجام واکنش زیاد می‌شود، مقادیر مربوط به انانتیوگزینی نتایج بسیار کمتری را نسبت به دمای محیط نشان می‌دهد. در این شرایط بالاترین میزان انانتیوگزینی مربوط به ۷۰میلی‌گرم بیوکاتالیست و پس از ۸ساعت از ابتدای واکنش بود که برابر با ٤ است. در این شرایط فزونی انانتیومری محصولات ۵۳% بوده است. نتایج کلی بیانگر این است که دمای محیط شرایط مناسب‌تری را برای انجام این واکنش ایجاد می‌کند. نتایج به‌دست‌آمده در دماهای بالا و پایین‌تر از دمای محیط افت محسوسی را نشان می‌دهند. بررسی‌های بیشتر برای این واکنش در حضور دو الکل متانول و اتانول در دمای بهینه محیط به‌منظور ارزیابی نقش الکل مورد استفاده انجام شد (جدول ۳).

بررسی‌ها نشان داد که هیچ‌کدام از الکل‌ها تاثیر محسوسی بر روند انانتیوگزینی آنزیم ایجاد نمی‌کنند. در حضور متانول، بیشترین مقدار انانتیوگزینی مربوط به مقدار ۵۰میلی‌گرم بیوکاتالیست در دمای ٤۵°C است که برابر با ٤ است که در مقدار تبدیل برابر با

www.SID.ir

Archive of SID

۳۶% اتفاق افتاده است. این مقدار تفکیک در زمان ۲ساعت 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 ۷۰میلی‌گرم 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 استری‌شدن، و همچنین بررسی تاثیر آن در انانتیوگزینی مشتق تثبیت‌شده، هگزان نرمال به‌عنوان حلال در واکنش مورد استفاده قرار گرفت.. نتایج به‌دست‌آمده حاکی از تاثیر منفی این حلال در پارامترهای این واکنش بود. به‌گونه‌ای که بهترین نتیجه مربوط به استفاده از ۵۰میلی‌گرم بیوکاتالیست در دمای محیط و پس از گذشت ۲۴ساعت 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 استری‌شدن و تاثیر زیادی که مولکول‌های آب در خواص آنزیم می‌توانند ایفا کنند، تاثیر حذف مولکول‌های آب تولیدشده از محیط واکنش نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور در حین انجام واکنش استریفیکاسیون توسط الکل پروپانول از مولکولارسیو به‌عنوان جاذب آب استفاده شد. نتایج به‌دست‌آمده نشان از تاثیر منفی حذف آب بر پارامترهای گزینش‌پذیری آنزیم بود. به‌طوری که در بهترین حالت، در حضور ۵۰میلی‌گرم بیوکاتالیست و در دمای محیط میزان پارامتر E پس از گذشت ۴ساعت از ابتدای واکنش ۱/۳ و پس از ۲۴ساعت از ابتدای واکنش یک به دست آمد.

نتایج حاصل از تفکیک انانتیوگزین مشتقات مختلف ایبوپروفن به‌وسیله آنزیم RML تثبیت‌شده روی بستر Silica-octyl

با توجه به یافته‌های مربوط به آزمایش قبل، بررسی روی مشتق دیگر تثبیت‌شده 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 ایبوپروفن‌متانوات و پروپانوات توسط آنزیم تثبیت‌شده روی بستر Silica-octyl در جدول ٤ ذکر شده است.

همان‌گونه که جدول بالا نشان می‌دهد در هر دو الکل استفاده‌شده مقادیر E تفاوت اندکی با هم دارند که این رفتار با تغییر مقدار آنزیم استفاده‌شده نیز تغییری پیدا نمی‌کند. با این حال در شرایط دمای محیط بهترین نتایج از سنتز استر S- ایبوپروفن پروپانوات با مقدار ۷۰میلی‌گرم 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 می‌دهد. با افزایش دما به ٤٥°C بیشترین مقدار با ۳/۹ برای سنتز استر متانول پس از ۸ساعت از ابتدای واکنش با مقدار ۵۰میلی‌گرم بیوکاتالیست بوده است. ارزیابی کلی نشان می‌دهد که آنزیم تثبیت‌شده روی بستر سیلیکای عامل‌دارشده با اکتیل اگرچه دارای سرعت تبدیل بالاتری است اما خواص گزینش‌پذیری کمتری در مقایسه با آنزیم تثبیت‌شده روی بستر Silica-octyl-epoxy که در آن تثبیت همزمان کوالانسی و هیدروفوب صورت گرفته است، نشان می‌دهد.

نتایج حاصل از تفکیک انانتیوگزین مشتقات مختلف ایبوپروفن به‌وس‌یله آنزیم RML تثبیت‌شده روی بستر SBA-octyl

با توجه به این که مورفولوژی بستر استفاده‌شده نیز ممکن بود بر خواص گزینش‌پذیری آنزیم اثرگذار باشد، مشتق حاصل از تثبیت هیدروفوب آنزیم روی بستر SBA-octyl نیز در استریفیکاسیون مخلوط راسمیک‌ایبوپروفن مورد بررسی قرار گرفت.

این بررسی در دماهای محیط ٤٥°C و ٤°C و با مقادیر ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۵۰میلی‌گرم آنزیم تثبیت‌شده صورت گرفت. بهترین نتایج از سنتز استر S- ایبوپروفن‌پروپانوات بود که در جدول ۵ به آنها اشاره شده است. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، با گذشت زمان میزان انانتیوگزینی (E) تغییر محسوسی نکرده است. همچنین بهترین نتیجه در دمای ٤°C مربوط به ۲۰میلی‌گرم بیوکاتالیست است که مقدار انانتیوگزینی برابر با ۲/۷ دارد. در این شرایط مقدار فزونی انانتیومری محصول برابر با ٤۱% بوده است. همچنین بار دیگر تاثیر منفی کاهش دما بر خواص گزینش‌پذیری آنزیم استفاده‌شده ثابت شد.

با افزایش‌یافتن دما به دمای محیط، رشد قابل توجهی در میزان انانتیوگزینی مشاهده می‌شود. در این شرایط بهترین میزان پارامتر E مربوط به ۲۰میلی‌گرم بیوکاتالیست پس از گذشت زمان ۲۴ساعت 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 می‌دهد. به‌طوری که در مقادیر کمتر و بیشتر از ۲۰میلی‌گرم، مقدار E کاهش پیدا کرده است. برای بررسی اثر دمای بالاتر بر گزینش‌پذیری این مشتق، واکنش استریفیکاسیون در دمای ۴۵°C با مقادیر متفاوتی از بیوکاتالیست انجام شد. اگرچه سرعت واکنش در این دما به‌نحو چشمگیری افزایش پیدا کرده است و لیکن مقادیر E برای این مشتق نیز اثرات منفی دمای بالا را نشان می‌دهد. مشابه نتایج به‌دست‌آمده، تاثیر منفی دما در خواص کاتالیزوری دیگر مشتقات نیز در بخش‌های قبلی گزارش شده است.

نتایج حاصل از تفکیک انانتیوگزین مشتقات مختلف ایبوپروفن به‌وسیله آنزیم RML تثبیت‌شده روی بستر-SBA-octyl epoxy

آنزیم تثبیت‌شده روی بستر حاوی دو گروه عاملی هیدروفوب-کووالانسی نتایج مطلوبی از نظر میزان فعالیت، کاهش رهایش آنزیم، پایداری حرارتی و پایداری در برابر حلال‌های آلی از خود نشان داد. این خواص ارتقایافته در کنار گزینش‌پذیری احتمالی مشتق به‌دست‌آمده، می‌تواند بیوکاتالیست به‌دست‌آمده را از جهات مختلف به بیوکاتالیستی با قابلیت‌های کاربردی فراوان تبدیل

www.SID.ir

Archive of SID

نماید. از این رو همانند دیگر بیوکاتالیست‌ها، خواص گزینش‌پذیری این مشتق نیز در استریفیکاسیون مخلوط راسمیک‌ایبوپروفن 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 ۵۰میلی‌گرم بیوکاتالیست مورد بررسی قرار گرفت. در همه دماها میزان تبدیل با سرعت بالایی انجام شد و بیشترین مقدار پارامتر E مربوط به ۵۰میلی‌گرم 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 بوده‌اند. الکل پروپانول نیز برای استریفیکاسیون آنزیمی ایبوپروفندر شرایط بهینه به‌دست‌آمده از آزمایش‌های قبلی مورد استفاده قرار گرفت که نتایج آن در جدول ٦ 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 ۵۰میلی‌گرم 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.

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

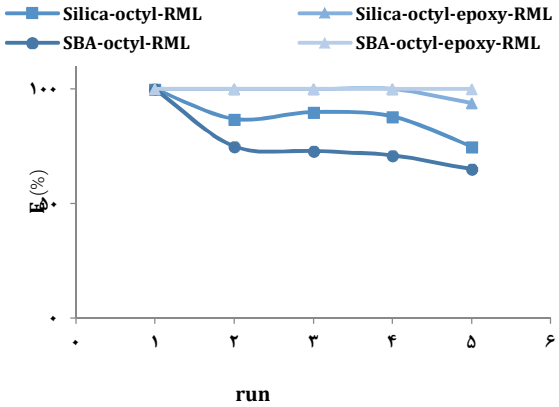
نوع الکل	دمای واکنش	بیوکاتالیست (میلی‌گرم)	فزونی انانتیومری ماده اولیه (%)	فزونی انانتیومری محصول (%)	درصد تبدیل	E
پروپانول	دمای محیط	۳۰	۹۹	۲۵	۷۹	۸/۵
پروپانول	دمای محیط	۵۰	۹۹	۳۵	۷۴	۱۰/۱
پروپانول	۴۵°C	۳۰	۳۴	۱۴	۷۱	۱/۸
پروپانول	۴۵°C	۵۰	۵۰	۱۱	۸۳	۱/۸

www.SID.ir

Archive of SID

استفاده چندباره از مشتقات تثبیت‌شده در سنتز انانتیوگزین استر پروپانول

نگرانی اصلی از واکنش‌های آنزیمی در مقیاس صنعتی هزینه‌های بالای آنزیم‌ها است که معمولاً بیشتر از قیمت کل یک فرآیند است. تولید یک بیوکاتالیست ناهمگن از طریق تثبیت آنزیم بر بستر جامد جذاب‌ترین استراتژی است که اجازه می‌دهد تا از آنزیم به‌طور مکرر استفاده کرده و در نتیجه موجب کاهش هزینه تولیدات صنعتی خواهد شد که توسط آنزیم‌ها کاتالیز می‌شوند. همان‌طور که اشاره شد یکی از مزایای اقتصادی تثبیت آنزیم توانایی به‌کاربردن چندین باره مشتقات تثبیت‌شده در واکنش‌های شیمیایی است. به‌منظور بررسی قابلیت استفاده مجدد مشتقات به‌دست‌آمده 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 به‌مدت ۲٤ساعت به طول انجامید، بیوکاتالیست استفاده‌شده توسط سانتریفیوژ جدا شد و پس از شست‌وشو 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 واکنش‌های پس از آن بر همین اساس محاسبه شد. همان‌طور که نمودار ۱ نشان می‌دهد، مشتقات بعد از پنج سیکل واکنش در حدود ٦٥-۱۰۰% فعالیت خود را حفظ کرده‌اند. نتایج نشان داد مشتقات حاوی هر دو عامل اکتیل و اپوکسی به‌طور موثرتری موجب بهبود بیوکاتالیست و حفظ فعالیت آنزیم در مقایسه با نتایج به‌دست‌آمده از مشتقات حاصل از یک گروه عاملی اکتیل شده است. مناسب‌ترین 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 تثبیت‌شده بر فعالیت بیوکاتالیست در واکنش سنتز انانتیوگزین استر پروپانول ایبوپروفن

از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به عدم توانایی مشتقات تثبیت‌شده در هیدرولیز استرها به‌صورت انانتیوگزین اشاره کرد که خود موجب افزایش مراحل واکنش و تحمیل هزینه‌های بیشتر به آن می‌شود. برای غلبه بر این مشکل پیشنهاد می‌شود که از روش‌های دیگری برای تثبیت آنزیم روی مواد سیلیکاتی استفاده شود.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از تفکیک انانتیوگزین استرهای ایبوپروفن نشان داد که هیدرولیز انانتیوگزین استرها توسط بیوکاتالیست‌های سنتزشده منجر به نتایج ضعیفی شده و عملاً بیوکاتالیست‌های مورد نظر کارآیی مناسبی در این نوع واکنش نداشتند. از این رو سنتز استرها با استفاده از الکل‌های مختلف و در شرایط گوناگون مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌داد که این روش بسیار کارآمدتر از روش قبلی بوده و منجر به تفکیک مناسب و انانتیوگزین انانتیومرهای ایبوپروفن می‌شود. بهترین پارامتر انانتیوگزینی هم متعلق به واکنش‌هایی بود که در آنها از پروپانول به‌عنوان 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 بیوکاتالیست‌های دارای دو گروه عاملی اکتیل و اپوکسی بهترین عملکرد را در تفکیک انانتیوگزین انانتیومرهای ایبوپروفن نشان داده و عمدتاً منجر به انانتیوگزینی بالاتری نسبت به دیگر مشتقات شدند. همچنین با درنظرگرفتن پارامتر انانتیوگزینی، انجام واکنش در دمای محیط مناسب‌تر از سایر دماها بود که خود از نظر اقتصادی و مصرف انرژی نیز بسیار مقرون‌به‌صرفه است. نتایج حاصل از مصرف چندباره بیوکاتالیست‌ها نیز به‌عنوان مولفه‌ای تاثیرگذار ارزش اقتصادی واکنش مورد بررسی قرار گرفت که نتایج به‌دست‌آمده حاکی از قابلیت بالای مشتقات به‌دست‌آمده در استفاده مجدد در این واکنش بود.

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

تاییدیه‌اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: مهدی محمدی (نویسنده اول)، پژوهشگر اصلی (٤٠%)؛ علی رمضانی (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/نویسنده بحث (۳۵%)؛ مریم گرمرودی (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.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

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 H 2 O 2 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 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, Moulaie 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.

www.SID.ir