



تثبیت کووالانت بتا گالاکتوزیداز آسپرژیلوس اوریزه و پروتئاز باسیلوس لیکنی فورمیس بر آمینو- نانولوله‌های کربنی چند دیواره‌ای

آلان یاسین طاهر^۱، محمد علیزاده^{۲*}، یعقوب اصلان^۳

۱- دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲- استاد گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۳- استاد گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده فنی مهندسی، دانشگاه سیرت، ترکیه

چکیده

اطلاعات مقاله

این مطالعه با هدف تثبیت کووالانت بتا گالاکتوزیداز آسپرژیلوس اوریزه و پروتئاز باسیلوس لیکنی فورمیس بر روی آمینو- نانولوله‌های کربنی چند دیواره‌ای انجام شد. در این روش از طرح 2k کسری برای مطالعه اثر هفت فاکتور پیوسته (pH فعال سازی، مولاریته گلوآلآلید، زمان فعال سازی، pH محلول بافر، مولاریته محلول بافر، مقدار MWCNT-NH₃- گلوآلآلید و زمان تثبیت) بر روی راندمان تثبیت و فعالیت آنزیمی استفاده شد. از نرم افزار Design-expert برای آنالیز داده ها و رسم نمودار ها استفاده شد. نتایج نشان داد که فاکتور های مذکور میزان فعالیت آنزیمی پروتئاز باسیلوس لیکنی فورمیس و بتا گالاکتوزیداز آسپرژیلوس اوریزه به ترتیب با ضریب همبستگی ۰/۸۰ و ۰/۹۲ به میزان ۷۷ و ۸۸ درصد پیش بینی می کنند. همچنین ضریب همبستگی مدل راندمان تثبیت کووالانت بتا گالاکتوزیداز آسپرژیلوس اوریزه و پروتئاز باسیلوس لیکنی فورمیس بر روی آمینو- نانولوله‌های کربنی چند دیواره‌ای به ترتیب ۰/۸۹ و ۰/۸۲ بدست آمد و فاکتورهای مورد مطالعه توانستند به ترتیب میزان راندمان تثبیت کووالانت بتا گالاکتوزیداز آسپرژیلوس اوریزه و پروتئاز باسیلوس لیکنی فورمیس بر روی آمینو- نانولوله‌های کربنی چند دیواره‌ای به ترتیب ۸۳ و ۷۷ درصد پیش بینی کنند.

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۷/۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۸/۶

کلمات کلیدی:

پروتئاز قلیایی،

نانو لوله های کربن،

تثبیت کووالانس،

بتا گالاکتوزیداز

DOI: 10.22034/FSCT.20.145. 208

* مسئول مکاتبات:

malizadeh@outlook.com

۱- مقدمه

گالاکتولیگوساکاریدها مخلوطی از ساکاریدهای مشتق شده از لاکتوز هستند که از دو تا هشت واحد ساکارید و یک باقیمانده گلوکز تشکیل شده است. گالاکتولیگوساکاریدها تقریباً در شیر همه پستانداران وجود دارد و دارای یک اثر پری بیوتیک است که بر ترکیب میکرو فلور گوارشی تأثیر می‌گذارد که برای سلامت و رفاه میزبان مفید است [۱]. در حال حاضر، گالاکتولیگوساکاریدها عمدتاً از لاکتوز از طریق یک واکنش ترانس گالاکتوزیلاسیون توسط آنزیم β -گالاکتوزیداز تولید می‌شود، این مکانیسم شامل آزادسازی گلوکز و تشکیل یک کمپلکس آنزیمی گالاکتوزیل (EGal) است که به دلیل جدا شدن پیوند گلیکوزیدی $4\beta\text{-}1$ لاکتوز توسط یک اسید آمینه نوکلئوفیلیک است [۲]. کمپلکس E-gal متعاقباً می‌تواند گالاکتوز را به مولکول فروکتوز تولید کننده لاکتولوز یا سایر مولکول‌های لاکتوز تشکیل‌دهنده گالاکتولیگوساکارید منتقل کند، که هر دو واکنش با یکدیگر رقابتی هستند [۳]. لاکتولوز ($\text{O-}\beta\text{-D-}(4\text{-}\beta\text{-D-fructofuranosyl)-D-fructose}$) یک دی ساکارید فعال زیستی است که به عنوان دارو و به عنوان یک ماده پروبیوتیک در غذاهای فراسودمند استفاده می‌شود. لاکتولوز توسط سنتز شیمیایی تولید می‌شود [۴]، اما در سال‌های اخیر توسعه فرآیندهای سازگارتر با محیط زیست بیشتر مورد توجه قرار گرفته است؛ که در این بین β -گالاکتوزیداز حاصل از *Aspergillus oryzae* آنزیمی است که به طور گسترده در صنایع لبنی برای تولید محصولات بدون لاکتوز به عنوان یک مکمل دارویی برای افراد مبتلا به عدم تحمل لاکتوز استفاده می‌شود [۵]؛ از طرفی آلرژی به پروتئین شیرگاو واکنشی ایمنی بدن در برابر پروتئین‌های شیر گاو و یکی از شایع‌ترین آلرژی‌ها در بین نوزادان است. آلرژی به پروتئین شیرگاو که به عنوان یک بیماری شایع در جهان دیده می‌شود را می‌توان تا حد زیادی با مصرف شیر گاو بدون پروتئین کاهش داد [۶]. پروتئین‌ها آنزیم‌هایی هستند که با هیدرولیز، پروتئین‌ها را به پپتیدها و اسیدهای آمینه تبدیل می‌کنند. بنابراین می‌توان از آن‌ها در تولید شیر گاوی استفاده کرد که باعث ایجاد حساسیت به پروتئین نمی‌شود؛ که در این بین پروتئاز باسیلوس لیکنی فورمیس، یک پپتیداز سرین است که با هیدرولیز پروتئین‌ها پپتیدها را تشکیل می‌دهد و در

کاربردهای مختلفی از جمله مکمل‌های غذایی، فرآورده‌های غذا و نوشیدنی، توسعه مواد تشکیل دهنده و پردازش پروتئین استفاده می‌شود [۷]. ولی با وجود مزایایی نظیر مقرون به صرفه بودن و زیست محیطی آنزیم‌های حاصل از باکتری‌ها و قارچ‌ها در مقایسه با کاتالیزورهای شیمیایی، استفاده از آن به دلیل دشواری جداسازی آنزیم از مخلوط واکنش، پردازش پیچیده پایین دستی و خطر آلودگی محصول با مشکل مواجه است [۸]؛ بنابراین تثبیت آنزیم یک فناوری کلیدی برای غلبه بر این معایب است. کاتالیز فاز ناهمگن امکان بازیابی آسان و استفاده مجدد از بیوکاتالیست را فراهم می‌کند، که به نوبه خود امکان توسعه فرآیندهای پیوسته و کاربرد در انواع مختلف راکتورها و حالت‌های عملیاتی با کنترل واکنش بهتر را فراهم می‌کند. علاوه بر این، ثبات عملیاتی را افزایش می‌دهد، ممکن است باعث افزایش ویژگی آنزیم و مقاومت در برابر مهارکننده‌ها شود، همچنین تثبیت آنزیم ساختار آن را سفت‌تر و نامحلول‌تر می‌کند [۹]. روش‌های مختلفی را می‌توان برای تثبیت آنزیم استفاده کرد، اما صنعت همیشه از روش‌های ساده و مقرون به صرفه استفاده می‌کند. بیشترین روش‌های مورد استفاده بر پایه تثبیت فیزیکی (جذب یا به دام افتادن فیزیکی) و شیمیایی (پیوند کووالانسی و اتصال عرضی) است [۱۰]؛ که در این بین اتصال کووالانسی روش مناسب‌تری برای همه آنزیم‌ها و برای همه کاربردها است زیرا آنزیم تثبیت شده به راحتی فعالیت خود را از دست نمی‌دهد؛ همچنین انتخاب ماتریس مناسب به منظور تثبیت آنزیم به ماهیت ماتریس، سادگی روش و استفاده هدفمند از آنزیم مربوط می‌شود [۱۱]. همچنین اشکال مختلف نانو ساختار مانند نانوذرات، نانوالیاف، نانولوله‌ها و نانوکامپوزیت‌ها به عنوان پشتیبان‌های جدید برای تثبیت آنزیم استفاده شده‌اند. این ترکیبات دارای سطح بزرگی هستند که منجر به بارگذاری آنزیمی بالا و در نتیجه فعالیت حجمی آنزیم بالا می‌شود. در میان اشکال مختلف نانومواد، نانولوله‌های کربنی دارای خواص ساختاری، مکانیکی، حرارتی و زیست سازگاری منحصر به فردی هستند [۱۲]. کارایی نانومواد را می‌توان با فرآیند عامل دار کردن سطح بهبود داد. عامل‌دارسازی سطحی نانومواد شامل پیوند گروه‌های عاملی مطلوب بر روی سطح آنها برای به دست آوردن نانومواد با خواص مطلوب است. این عامل‌سازی

فورمیس به صورت جداگانه بر روی (MWCNT-NH₃) به صورت کووالانسی تثبیت شد. تاثیر پارامترهایی نظیر نسبت آنزیم به ماتریس، pH و مولاریته محلول های تثبیت، زمان تثبیت و غیره بر روی فعالیت و راندمان تثبیت مورد برآورد قرار گرفته و شرایط تثبیت بهینه سازی گردید.

در تثبیت آنزیم ابتدا نانو لوله های کربنی عاملی شده (functionalized) و سپس با روش انکوباسیون با آنزیم تیمارگردید تا پیوند کووالانسی با گروه های عاملی ایجاد شده تشکیل گردد. تثبیت مطابق روش Cakmakci و همکاران (۲۰۱۶) انجام شد [۱۴].

برای تعیین فعالیت بتاگالاکتوزیداز آسپرژیلوس اوریزه از معادله ۱ استفاده شد و اساس روش اندازه گیری افزایش میزان قند احیا کننده در اثر پیشرفت هیدرولیز لاکتوز می باشد [۱۵].

$$\text{Activity Yield}(\%) = \frac{\text{Activity of immobilized enzyme}}{\text{Activity of soluble enzyme}} \times 100$$

برای راندمان تثبیت از معادله ۲ استفاده می شود.

$$\text{Immobilization Yield}(\%) = \frac{\text{Enzyme used for Immobilization} - \text{enzyme in filtrate}}{\text{Enzyme used for Immobilization}}$$

2-2-2- تعیین فعالیت لاکتاز

در ابتدا، ۱ درصد (w/v) از محلول های لاکتوز، به مقدار ۵ میلی لیتر، با استفاده از محلول پوسفات دی هیدروژن سدیم ۲۵ میلی مولار (pH 4.5) برای آنزیم آزاد و ۵،۵ برای آنزیم تثبیت شده تهیه شد. سپس، ۲۰۰ میکرولیتر از AOG (*Aspergillus oryzae* β-galactosidase) آزاد یا ۰،۳۱۷ گرم از AOG تثبیت شده به ترتیب با آن مخلوط شد و در یک محفظه با تکان دادن خفیف، در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ دقیقه واکنش داده شد. ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه های مخلوط واکنش به ۱۸۰۰ میکرولیتر آب مقطر افزوده شده و به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد تا آنزیم ها غیرفعال شوند. مقدار D-گلوکوز تشکیل شده با استفاده از اندازه گیری جذب آن در طولانی موج ۵۷۵ نانومتر با استفاده از یک اسپکتروفتومتر ماورابنفش (UV)، با

می تواند بر پراکندگی و برهم کنش آن ها با آنزیم ها تأثیر بگذارد، بنابراین به طور قابل توجهی فعالیت کاتالیزوری آنزیم تثبیت شده را تغییر می دهد [۱۳]. بنابراین هدف از این مقاله شناسایی خواص آنزیم های تثبیت شده و بررسی فعالیت آنزیم و تثبیت آنزیم بر بتا گالاکتوزیداز آسپرژیلوس اوریزه و پروتئاز باسیلوس لیکنی فورمیس بر روی آمینو- نانولوله های کربنی چند دیواره ای می باشد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد

β-گالاکتوزیداز از *Aspergillus oryzae* (آنزیم پودری) پروتئاز *Bacillus licheniformis* (آنزیم محلول) توسط شرکت (Troy, VA)، ایالات متحده آمریکا با چگالی ۱۰۱۴ گرم بر سانتی متر مکعب و نقطه ذوب ۱۰۰ درجه سانتی گراد و وزن مولکولی ۳۴۰ گرم بر مول) ارائه گردیده است. Amino-MWCNT (خلوص: ۹۹٪، قطر ۱۰-۳۰ نانومتر، طول ۱۰ میکرومتر) از برند شرکت (کارناتاک، هند) و آلبومین سرم گاوی، کازئین، هیدروکسید سدیم، سدیم دی هیدروژن فسفات، اسید کلریدریک، لاکتوز، سولفیت سدیم، فنل و دی گلوکز از برند شرکت (مرک، آلمان) خریداری شدند. اسید ۳،۵-dinitrosalicylic (DNS) از Alfa Aesar (Kandel، آلمان) خریداری شد. تارتارات پتاسیم سدیم (نمک روشل) از VWR Prolabo Chemicals (Leuven Belgium) خریداری شد. سدیم آزید از (Merck Millipore دارمشتات، آلمان) خریداری شد. L-Tyrosin از Carl Roth GmbH + Co. KG (کارلسروهه، آلمان) خریداری شد. فیلترهای غشایی نیتروسلولز (قطر منافذ ۰،۴۵ میکرومتر، قطر غشاء ۴۷ میلی متر) از ISO-LAB (Wertheim، آلمان) خریداری شد.

۲-۲- روش ها

2-2-1- تثبیت آنزیم ها

بتا گالاکتوزیداز آسپرژیلوس اوریزه و پروتئاز باسیلوس لیکنی

در طولانی موج ۲۷۴ نانومتر (Lewis, 1980) تعیین شد. یک واحد فعالیت تعریف شد به عنوان مقدار آنزیمی که در شرایط بهینه آزمون فعالیت، هر دقیقه ۱ میکرومول L-تیروزین از کازئین تشکیل می‌دهد.

4-2-2- تجزیه و تحلیل آماری

در این روش از طرح 2k کسری برای مطالعه اثر هفت فاکتور پیوسته طبق جدول ۱ (pH فعال سازی، مولاریته گلوتارآلدئید، زمان فعال سازی، pH محلول بافر، مولاریته محلول بافر، مقدار MWCNT-NH3-گلتارآلدئید و زمان تثبیت) راندمان تثبیت و فعالیت آنزیمی استفاده شد. سطح خطای نوع اول در این مطالعه برابر ۰,۰۵ در نظر گرفته شد. از نرم افزار-Design expert ورژن ۱۳ برای آنالیز داده ها و رسم نمودار ها استفاده شد.

روش میلر (۱۹۵۹) تعیین شد. یک واحد فعالیت AOG تعریف شد به عنوان مقدار آنزیمی که در شرایط بهینه آزمون فعالیت، هر دقیقه ۱ میکرومول D-گلوکز از لاکتوز تشکیل می‌دهند.

3-2-2- تعیین فعالیت پروتئاز قلبایی

۵ میلی‌لیتر از محلول‌های کازئین (۱٪ وزنی/حجمی) که با استفاده از محلول پوسفات سدیم ۲۵ میلی‌مولار (pH 7.5) تهیه شده بود، با حجم ۲۰۰ میکرولیتر از BLP (*Bacillus licheniformis protease*) آزاد یا ۰,۲۸۶ گرم از BLP تثبیت شده در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ دقیقه واکنش داده شد. سپس، ۴۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های مخلوط واکنش به ۳۶۰۰ میکرولیتر آب مقطر افزوده شده و به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد تا آنزیم غیرفعال شود. مقدار تشکیل شده L-تیروزین با استفاده از اندازه‌گیری جذب آن با استفاده از یک اسپکتروفتومتر ماورابنفش (Radnor, UV-6300PC, آمریکا)

Table 1. Statistical plan for Immobilization and activity of enzymes

Run	Factor 1 A:Act.pH	Factor 2 B:Molarity of glutaraldehyde (mM)	Factor 3 C:Activation time(h)	Factor 4 D:Buffer pH	Factor 5 E:Molarity of the buffer solution(mM)	Factor 6 F:MWCNT- NH2- glutaraldehyde amount(mg/mg Enzyme)	Factor 7 G:Immobilization time(h)
1	3	100	8	8	25	100	8
2	8	100	1	8	100	25	1
3	3	500	1	3	100	25	1
4	3	100	1	8	25	25	8
5	8	100	8	8	25	25	1
6	5.5	300	4.5	5.5	62.5	62.5	4.5
7	8	100	8	3	100	25	1
8	5.5	300	4.5	5.5	62.5	62.5	4.5
9	3	100	8	8	100	25	1
10	3	500	1	3	25	100	8

11	3	100	1	8	100	100	8
12	8	500	1	3	100	100	8
13	8	500	1	8	25	100	8
14	8	500	8	3	25	100	8
15	3	500	1	8	100	100	1
16	5.5	300	4.5	5.5	62.5	62.5	4.5
17	3	500	8	3	25	25	1
18	3	100	1	3	100	100	1
19	3	100	8	3	25	100	1
20	8	100	1	3	25	100	8
21	8	100	8	8	100	25	8
22	8	500	1	3	25	100	1
23	3	500	8	8	25	25	8
24	3	100	1	8	25	100	1
25	8	500	1	8	25	25	1
26	3	500	8	3	100	100	1
27	3	500	8	3	100	25	8
28	8	500	8	8	100	25	1
29	8	100	8	8	100	100	1
30	8	500	8	8	100	100	8
31	3	100	8	3	25	25	8
32	5.5	300	4.5	5.5	62.5	62.5	4.5
33	8	100	1	3	100	25	8
34	5.5	300	4.5	5.5	62.5	62.5	4.5
35	8	500	1	3	25	25	8

۳-نتایج و بحث

۳-۱- نتایج فعالیت آنزیم پروتئاز

۲ آمده است. اثر این هفت فاکتور هم در مورد راندمان تثبیت و هم فعالیت آنزیمی معنادار بدست می باشد ($P < 0.05$) و میزان شاخص عدم برازش مدل (Lack of Fit) نیز غیر معنادار بودن را نشان می دهد و نشانگر برازش مدل جهت پاسخ به تغییرات می باشد.

معادله اثر فاکتورها بر روی فعالیت آنزیمی پروتئاز باسیلوس

در این مطالعه نتایج تجزیه واریانس اثر هفت فاکتور پیوسته pH فعال سازی، مولاریته گلو تار آل دئید، زمان فعال سازی، pH محلول بافر، مولاریته محلول بافر، مقدار MWCNT-NH₃-گلو تار آل دئید و زمان تثبیت بر روی راندمان تثبیت و فعالیت آنزیمی در جدول

لیکنی فورمیس برروی آمینو نانولوله ای کربنی چند دیواره ای با $R^2=0/80$ و $\text{Adjusted } R^2=0/77$ به صورت معادله شماره ۵ بدست آمد.

$$\text{Protease Activity} = 52.30 - 5.59C + 1.57D - 7.13F + 23.23G + 11.15DG \quad (3)$$

شاخص R^2 بالاست و نشان دهنده مناسب بودن مدل بدست آمده بوده و این مدل می تواند ۷۷ درصد از تغییرات پیش بینی کند.

در شرایطی که pH به طور قابل توجهی از محدوده خنثی خارج شود، گروه های آمینی و کربوکسیلیک اسیدهای آمینواسیدهای آنزیم را به شکل آنیونی تبدیل می کنند. این تغییرات آیونی

می تواند ساختار سه بعدی آنزیم را تغییر داده و باعث ضعیف شدن جذب آنزیم به سوبسترا و کاهش فعالیت آن شود. علاوه بر این، در دماهای بالا، انرژی حرارتی به آنزیم وارد می شود و این باعث تغییر در ساختار سه بعدی آن می شود. این تغییر در ساختار ممکن است باعث کاهش یا از بین رفتن فعالیت آنزیم شود. همچنین، حضور یون های سنگین فلزی می تواند با آنزیمات متصل شده و ساختار آنزیم را تغییر داده و فعالیت آن را کاهش دهد یا غیرفعال کند. این یون ها می توانند به گروه های فعال آنزیم متصل شده و تغییرات در ساختار سه بعدی آن ایجاد کنند [16، 17]. در نتیجه، در شرایطی که pH شدید، دمای بالا، حضور یون های سنگین فلزی و مواد نامطلوب دیگر وجود داشته باشد، ساختار محکم پروتئازهای خنثی تخریب می شود و این باعث کاهش و یا حتی غیرفعال شدن فعالیت آنزیم می شود [۱۸]

Table 2. Analysis of variance the effect of factors on the covalent immobilization of *Aspergillus oryzae* beta-galactosidase and *Bacillus licheniformis* protease, as well as enzyme activity on multi-walled carbon nanotubes

Factor	Protease Activity	Protease immob	Lactase Activity	Lactase immob
Model	4158.82**	3614.26**	698.24**	12319.74**
A-Act.Ph	0	0	3.02 ^{NS}	143.07 ^{NS}
B-Molarity of glutaraldehyde (mM)	0	0	576.19**	902.05**
C-Activation time(h)	851.95**	741.74 ^{NS}	3220.84**	78 ^{NS}
D-Buffer pH	73.46**	264.93 ^{NS}	50.23 ^{NS}	825.81**
E-Molarity of the buffer solution(mM)	0	308.17 ^{NS}	957.32**	0.15 ^{NS}
F-MWCNT-NH2-glutaraldehyde amount(mg)	1418.17**	47.86 ^{NS}	5.07 ^{NS}	582.17**
G-Immobilization time(h)	16013**	21509.54**	1679.09**	1376.27**
AC	0	0	0	1799.70**
AD	0	0	0	2029.24**
AE	0	0	0	449.57**
AF	0	0	1196.60**	0
AG	0	0	0	283.31 ^{NS}

BE	0	0	0	942.54 ^{**}
BG	0	0	126.16 ^{NS}	0
CE	0	1952.21 ^{**}	0	0
CF	0	0	1324.25 ^{**}	0
DE	0	0	122.03 ^{NS}	0
DF	0	1712.58 ^{**}	0	402.13 ^{**}
DG	3552.03 ^{**}	0	0	0
FG	0	0	140.89 ^{NS}	0
Curvature	6561.92	2604.43	1171.91	7856.77
Residual	176.86	208.42	35.66	68.61
Lack of Fit	176.86 ^{NS}	208.42 ^{NS}	35.66 ^{NS}	68.61 ^{NS}
R ²	0.8077	0/82	0/92	0.89
Adj-R ²	0.7733	0/77	0/87	0.83
CV%	23.22	26/78	9.05	17.93

NS: غیرمعتادار و ** نشاگر معتادار در سطح احتمال ۰.۰۵

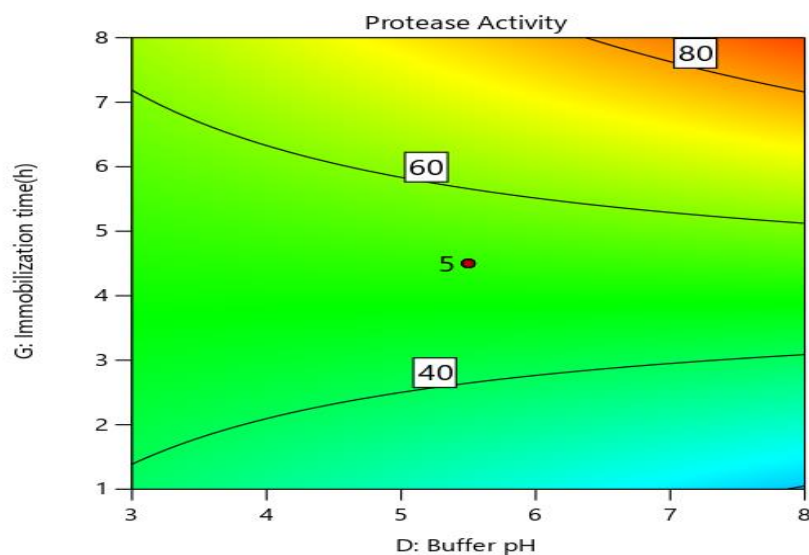


Figure 1. Contour plot of the effect of buffer pH and incubation time on enzyme activity.

سویسترا، دما، پایداری، جایگاه فعال و مکانیسم‌های کاتالیتیکی، دسته‌بندی کرد. ویژگی‌های آنزیم‌های پروتئولیتیک به ماهیت

از طرفی با توجه به شرایط بهینه برای فعالیت ویژه پروتازها، آنها را می‌توان بر اساس تفاوت‌هایشان در پارامترهایی مانند pH

اسیدهای آمینه نزدیک باند هیدرولیز شونده بستگی دارد [۱۹]. پروتئازها بر اساس pH مناسب برای فعالیت به سه دسته تقسیم می‌شوند: پروتئازهای اسیدی، پروتئازهای خنثی و پروتئازهای قلیایی. حداکثر فعالیت پروتئازهای اسیدی در بازه pH ۲ تا ۶، پروتئازهای خنثی در بازه pH ۶٫۵ تا ۷٫۵ و پروتئازهای قلیایی در بازه pH ۸ تا ۱۱ است. پروتئازهای میکروبی برون‌سلولی نقش حیاتی در تغذیه ارگانیسم‌های مولد را با انجام هیدرولیز مولکولهای پلی‌پپتیدی بزرگ به مولکولهای کوچکتر، قابل جذب توسط سلول، ایفا می‌کنند. در کلیه سیستم های سلولی میان فرآیندهای متابولیکی که شامل سنتز و تخریب پروتئین است تعادل وجود داشته و پروتئازهای درون سلولی در این فرآیندهای نوسازی پروتئینی نقش حیاتی بازی می‌کنند. پروتئازهای خنثی نسبت به دیگر انواع پروتئازها دارای کاربرد صنعتی کمی هستند و معمولاً توسط گونه های باسیلوس و اسپریلوس تولید می‌شوند [۲۰، ۲۱]. در خصوص اثر منفی بر فعالیت پروتئازی می‌توان گفت که تأثیر منفی مقدار MWCNT-NH₃ گلو تار آل دئید بر فعالیت آنزیم پروتئاز می‌تواند به علت تداخل با ساختار و عملکرد طبیعی آنزیم یا تغییر در شرایط بهینه برای فعالیت آنزیم باشد [22].

MWCNT (نانولوله کربنی چند دیواره) به عنوان یک نانومواد، به طور معمول بر روی فعالیت آنزیم‌ها تأثیراتی اعمال می‌کند. نانولوله‌های کربنی می‌توانند به آنزیم‌ها متصل شوند و ساختار و فعالیت آنزیم را تغییر دهند. در اینجا، MWCNT-NH₃ گلو تار آل دئید به آنزیم پروتئاز متصل می‌شود و احتمالاً باعث تغییر در ساختار فیزیکی یا مکانیزم کاتالیتیک پروتئاز می‌شود. علاوه بر این، واکنش آنزیم پروتئاز ممکن است به علت تغییر در شرایط بهینه برای فعالیت آنزیم تحت تأثیر قرار بگیرد. به عنوان مثال، مقدار MWCNT-NH₃ گلو تار آل دئید ممکن است باعث تغییر در pH، دما یا سایر پارامترهای مورد نیاز برای فعالیت آنزیم پروتئاز شود، که موجب کاهش فعالیت آن می‌شود [۲۳، ۲۴].

بنابراین، مقدار MWCNT-NH₃ گلو تار آل دئید می‌تواند باعث کاهش فعالیت آنزیم پروتئاز شود و تأثیر منفی بر روی فعالیت آن داشته باشد. از طرفی تأخیر یا اثر منفی زمان فعال سازی بر روی فعالیت آنزیم‌ها می‌تواند به دلیل عوامل مختلفی رخ دهد. با گذشت زمان و در معرض تأثیر عوامل خارجی مانند حرارت، رطوبت و pH، آنزیم‌ها ممکن است تغییرات ساختاری و کاهش پایداری آنزیم را تجربه کنند. این تغییرات می‌تواند به عدم توانایی آنزیم در انجام وظایف خود و کاهش فعالیت آن منجر شود. در مدت طولانی، آنزیم‌ها ممکن است با اکسیژن هوا و سایر عوامل اکسیدانت در تعامل باشند و اکسیده شوند. این پدیده به عنوان اکسیداسیون شناخته می‌شود و می‌تواند منجر به تغییرات ساختاری آنزیم و کاهش فعالیت آن شود [۲۵]. در برخی موارد، آنزیم‌ها ممکن است تجزیه و هضم شوند. در این فرآیند، عواملی مانند پروتئازها و پپتیدازها به آنزیم وارد شده و آن را غیرفعال می‌کنند. این تجزیه و هضم می‌تواند به کاهش فعالیت آنزیم و تحت تأثیر قرار گرفتن از طریق زمان فعال سازی آنزیم رخ دهد. بنابراین، اگر زمان فعال سازی پروتئاز باسیلوس لیکنی فورمیس بر روی آمینو-نانولوله‌های کربنی چند دیواره‌ای منجر به کاهش فعالیت این پروتئاز شود، احتمالاً دلیل آن به تغییرات ساختاری و کاهش پایداری آنزیم در زمان فعال سازی مربوط است [۲۶].

تثبیت کووالانت پروتئاز باسیلوس لیکنی فورمیس بر روی آمینو-نانولوله‌های کربنی چند دیواره‌ای می‌تواند تحت تأثیر مثبت زمان تثبیت و pH بافر قرار بگیرد. زمان تثبیت به مدتی اشاره دارد که آنزیم‌ها و نانولوله‌های کربنی در تماس با یکدیگر قرار می‌گیرند و ارتباطات کووالانت بتا را بین آنها ایجاد می‌کنند. زمان تثبیت طولانی‌تر می‌تواند بهترین فرصت را برای تشکیل این ارتباطات فراهم کند و بهبود قابل توجهی در عملکرد آنزیم‌ها روی سطح نانولوله‌ها ایجاد کند [27].

همچنین، pH بافر محلول مورد استفاده در فرآیند تثبیت می‌تواند تأثیر مهمی بر روی عملکرد آنزیم‌ها و نانولوله‌ها داشته باشد pH بافر بایستی در محدوده‌ای باشد که مناسب برای فعالیت آنزیم‌ها

$$\text{Protease Immobilization} = 57.416 + 5.09C - 3.01D - 3.32E - 1.29F - 27.81G + 8.17CE + 7.76 \quad (4)$$

مقدار شاخص R^2 بالاست و نشان دهنده مناسب بودن مدل بدست آمده بوده و این مدل می تواند ۷۷ درصد از تغییرات راندمان عمل تثبیت کووالانت پروتئاز باسیلوس لیکنی فورمیس بر روی آمینو نانولوله ای کربنی چند دیواره ای پیش بینی کند.

افزایش ترکیب زمان فعال سازی و مولاریته محلول بافر و همچنین اثر متقابل pH بافر و MWCNT-NH₃ گلاتارآلدئید می تواند به طرز قابل توجهی راندمان تثبیت آنزیم پروتئاز باسیلوس لیکنی فورمیس بر روی آمینو-نانولوله های کربنی چند دیواره ای را افزایش دهد. زمان فعال سازی به مدت زمانی اشاره دارد که آنزیم در آن با محلول بافر تعامل می کند. با افزایش زمان فعال سازی، فرصت بیشتری برای تعامل آنزیم با نانولوله های کربنی فراهم می شود، که می تواند منجر به اتصال و تثبیت بهتر پروتئاز باسیلوس لیکنی فورمیس بر روی سطح نانولوله ها شود. این اتصال و تثبیت بهبود راندمان تثبیت آنزیم را ایجاد می کند [۲۹]. علاوه بر آن، مولاریته محلول بافر نیز در افزایش راندمان تثبیت آنزیم نقش دارد. با افزایش مولاریته محلول بافر، تعداد بیشتری از یونها و مولکول های بافر در محیط حاضر خواهند بود. این یونها و مولکول ها می توانند به عنوان جاذب های برای پروتئاز باسیلوس لیکنی فورمیس و نانولوله های کربنی عمل کنند و باعث تثبیت بهتر آنزیم بر روی نانولوله ها شوند [۳۰].

همچنین، اثر متقابل pH بافر و MWCNT-NH₃ گلاتارآلدئید نیز می تواند راندمان تثبیت آنزیم را تحت تأثیر قرار دهد pH بافر می تواند سطح بار الکتریکی نانولوله های کربنی و پروتئاز را تغییر دهد. با تنظیم pH به مقدار مناسب، بار الکتریکی سطح نانولوله ها و پروتئاز همگرا می شود و اتصال بهتری بین آنزیم و نانولوله ها برقرار می شود، که بازهم بهبود راندمان تثبیت آنزیم را به همراه دارد [26].

باشد و همچنین بتواند ارتباطات کووالانت بتا بین آنزیم و نانولوله ها را تسهیل کند. انتخاب pH مناسب می تواند جذب آنزیم ها بر روی سطح نانولوله ها را افزایش داده و در نتیجه بهبود قابل توجهی در فعالیت آنزیم ها را به همراه داشته باشد. در نهایت، تثبیت کووالانت پروتئاز باسیلوس لیکنی فورمیس بر روی آمینو-نانولوله های کربنی چند دیواره ای تحت تأثیر مثبت زمان تثبیت و pH بافر قرار می گیرد همچنین زمان تثبیت طولانی تر و pH بافر مناسب می تواند بهبود قابل توجهی در عملکرد آنزیم ها روی سطح نانولوله ها ایجاد کنند و ارتباطات کووالانت بتا بین آنزیم و نانولوله ها را تسهیل کنند [۲۸].

۲-۳- راندمان عمل تثبیت کووالانت پروتئاز باسیلوس لیکنی فورمیس بر روی آمینو نانولوله ای کربنی چند دیواره ای

همانطور که اشاره شد، پروتئاز یکی از آنزیم های فعال بیولوژیکی است و گونه های باسیلوس از مهمترین تولیدکننده های (سویه) این آنزیم می باشند. می تواند کاتالیز واکنش هیدرولیز مولکول های پروتئین به پپتیدها و اسید آمینه ها تحت شرایط قلیایی باشد. نتایج راندمان تثبیت آنزیم پروتئاز در جدول ۲ نشان می دهد که این راندمان بیشتر تحت تأثیر زمان تثبیت آنزیم، اثر متقابل زمان فعال سازی + مولاریته محلول بافر و همچنین اثر متقابل pH بافر و MWCNT-NH₃-گلاتارآلدئید است (شکل ۲). در این بین اثر متقابل زمان فعال سازی و مولاریته محلول بافر از همه فاکتورها بیشتر است ($p < 0.05$) و این تأثیر ها مثبت است به طوری که افزایش ترکیب زمان فعال سازی و مولاریته محلول بافر و همچنین اثر متقابل pH بافر و MWCNT-NH₃-گلاتارآلدئید موجب افزایش راندمان تثبیت آنزیم پروتئاز باسیلوس لیکنی فورمیس بر روی آمینو- نانولوله های کربنی چند دیواره ای می شوند. معادله اثر فاکتورها بر روی راندمان عمل تثبیت کووالانت پروتئاز باسیلوس لیکنی فورمیس بر روی آمینو نانولوله ای کربنی چند دیواره ای با $R^2=0.82$ و $\text{Adjusted } R^2=0.77$ به صورت معادله شماره 4 بدست آمد.

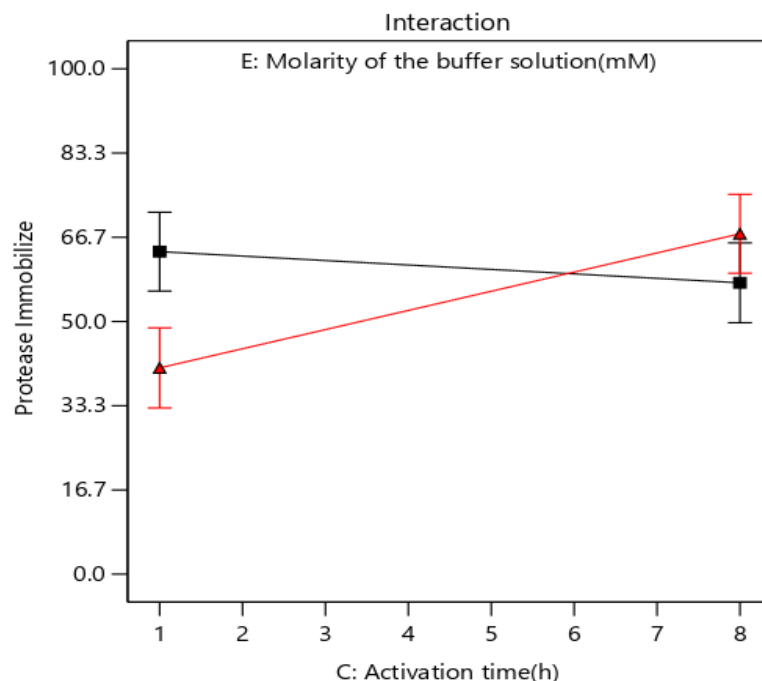


Figure 2- Interaction of buffer solution molarity and activation time on the efficiency of protease enzyme immobilization

شده و آن را غیرفعال می‌کنند. این تجزیه و هضم می‌تواند به کاهش فعالیت آنزیم و تحت تأثیر قرار گرفتن از طریق زمان فعال‌سازی آنزیم رخ دهد [۲۵، ۲۶]. در نتیجه، اگر زمان فعال‌سازی پروتئاز باسیلوس لیکنی فورمیس بر روی آمینو-نانولوله‌های کربنی چند دیواره‌ای منجر به کاهش فعالیت این پروتئاز شود، احتمالاً دلیل آن به تغییرات ساختاری و کاهش پایداری آنزیم در زمان فعال‌سازی مربوط است.

۳-۳- فعالیت آنزیم بتا گالاکتوزیداز اسپرژیلوس اوریزه

آنزیم بتا-گالاکتوزیداز (Beta-galactosidase) یک آنزیم است که قابلیت هیدرولیز گلوکزیدها و لاکتوز را دارد. گروهی از این آنزیم‌ها توسط باکتری‌ها تولید می‌شوند و می‌توانند در فرآوردهایی مانند تولید لبنیات، تولید قند و همچنین در تجزیه

بنابراین، با افزایش ترکیب زمان فعال‌سازی و مولاریته محلول بافر و با تنظیم مناسب pH بافر و MWCNT-NH₃ گلوکارآلدئید، می‌توان راندمان تثبیت آنزیم پروتئاز را به تأخیر یا اثر منفی زمان فعال‌سازی بر روی فعالیت آنزیم‌ها می‌تواند به دلیل عوامل مختلفی رخ دهد. با گذشت زمان و در معرض تأثیر عوامل خارجی مانند حرارت، رطوبت و pH، آنزیم‌ها ممکن است تغییرات ساختاری و کاهش پایداری آنزیم را تجربه کنند. این تغییرات می‌تواند به عدم توانایی آنزیم در انجام وظایف خود و کاهش فعالیت آن منجر شود. در مدت طولانی، آنزیم‌ها ممکن است با اکسیژن هوا و سایر عوامل اکسیدانت در تعامل باشند و اکسیده شوند. این پدیده به عنوان اکسیداسیون شناخته می‌شود و می‌تواند منجر به تغییرات ساختاری آنزیم و کاهش فعالیت آن شود. در برخی موارد، آنزیم‌ها ممکن است تجزیه و هضم شوند. در این فرآیند، عواملی مانند پروتئازها و پپتیدازها به آنزیم وارد

اوریزه در تجزیه لاکتوز در سیستم گوارشی انسان نیز مورد توجه قرار گرفته است. از دیگر کاربردهای آنزیم بتا-گالاکتوزیداز در صنایع مختلف می‌توان به تولید قند، تجزیه کننده‌های غذایی، تولید پره‌های شیرین کننده و تولید مواد غذایی کم لاکتوز اشاره کرد [۳۲].

در این تحقیق اثر اثر هفت فاکتور پیوسته pH فعال سازی، مولاریته گلوکارآلدئید، زمان فعال سازی، pH محلول بافر، مولاریته محلول بافر، مقدار MWCNT-NH₃-گلوکارآلدئید و زمان تثبیت بر روی راندمان تثبیت و فعالیت آنزیمی آنزیم مذکور در جدول ۲ آمده است.

مطابق با نتایج بدست آمده، مولاریته گلوکارآلدئید، زمان فعال‌سازی و اثر متقابل زمان فعال‌سازی و مقدار MWCNT-NH₃-گلوکارآلدئید تنهایی عواملی از مجموع هفت فاکتور مطرح شده در این تحقیق هستند که می‌تواند بر روی میزان فعالیت آنزیمی آنزیم بتا گالاکتوزیداز آسپرژیلوس اوریزه اثر مثبت معنادار داشته باشند ($p < 0.05$) (شکل ۳):

قندها و ساکاریدها در سیستم گوارشی انسان نقش بسزایی ایفا کنند. یکی از آنزیم‌های بتا-گالاکتوزیداز، آنزیم بتا-گالاکتوزیداز آسپرژیلوس اوریزه است. آسپرژیلوس اوریزه یک قارچ است که در محیط‌های طبیعی یافت می‌شود و قابلیت تولید آنزیم‌های مختلف را دارد [31].

فعالیت آنزیم بتا-گالاکتوزیداز آسپرژیلوس اوریزه در هیدرولیز گلوکزیدها و لاکتوز بسیار مهم است. این آنزیم به واسطه برش گلوکزیدها در موقعیت بتا-۱،۴ از طریق هیدرولیز پیوند گلیکوز-گلیکوز، گلوکز را آزاد می‌کند. همچنین، با هیدرولیز پیوند بتا-۱،۴ لاکتوز، به صورت مستقیم منجر به تولید گلوکز و گالاکتوز می‌شود. فعالیت بتا-گالاکتوزیداز آسپرژیلوس اوریزه به ویژه در صنعت لبنیات بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرد. این آنزیم قادر است لاکتوز موجود در شیر را به گلوکز و گالاکتوز تجزیه کند. این فرایند به تولید محصولاتی مانند شیرینی‌ها، لبنیات تجاری بدون لاکتوز و محصولات دیگر کم لاکتوز کمک می‌کند. همچنین، استفاده از آنزیم بتا-گالاکتوزیداز آسپرژیلوس

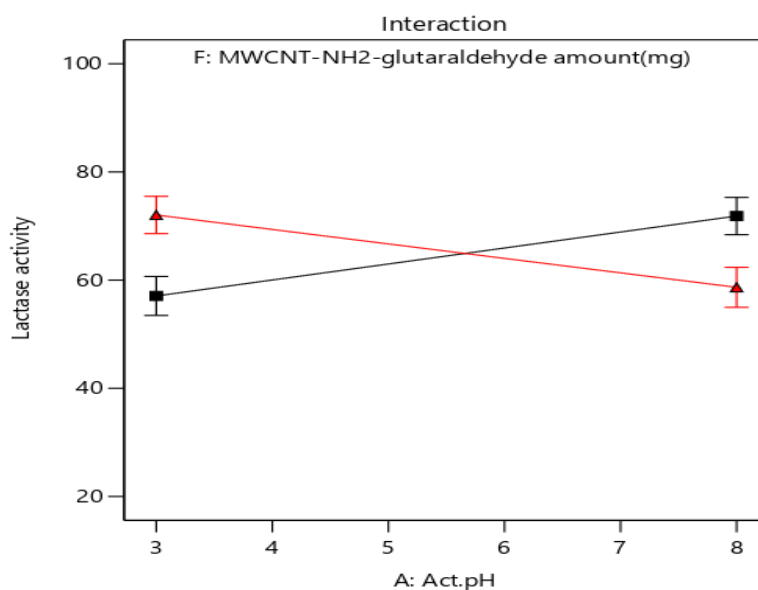


Figure 3- Interaction of pH activation and the amount of MWCNT-NH₃-glutaraldehyde on the activity of *Aspergillus oryzae* beta-galactosidase enzyme.

معادله اثر فاکتورها بر روی فعالیت آنزیم بتا گالاکتوزیداز آسپرژیلوس اوریزه بر روی آمینو نانولوله ای کربنی چند دیواره ای با $R^2=0/92$ و $Adjusted R^2=0/87$ به صورت معادله شماره 5 بدست آمد.

$$LactaseActivity=64.91+0.35A+4.73B+11.57C-1.37D+5.92E+0.44F-7.03AF+2.18BG+7.21CF-2.15DE+2.34FG \quad (5)$$

مقدار شاخص R^2 بسیار بالاست و نشان دهنده مناسب بودن مدل بدست آمده بوده و این مدل می تواند ۸۷ درصد از تغییرات فعالسازی فعالیت آنزیم بتا گالاکتوزیداز آسپرژیلوس اوریزه بر روی آمینو نانولوله ای کربنی چند دیواره ای پیش بینی کند. در این بین سهم پیش بینی زمان فعالسازی از همه فاکتورها در جهت مثبت بیشتر است.

در کل، این یافته نشان می دهد که استفاده از آمینو- نانولوله های کربنی چند دیواره ای به عنوان پایه برای آنزیم بتا گالاکتوزیداز آسپرژیلوس اوریزه، با افزایش مولاریته گلو تار آلدهید و مقدار MWCNT-NH3 گلو تار آلدهید و زمان فعالسازی، می تواند بهبود یافته و فعالیت آنزیمی بتا گالاکتوزیداز را افزایش دهد [۳۳]. زمان فعالسازی آنزیمی می تواند بر روی میزان فعالیت آنزیمی فعالیت بتا-گالاکتوزیداز آسپرژیلوس اوریزه تأثیر بگذارد. برای مثال، زمان فعالسازی آنزیمی می تواند باعث افزایش فعالیت آنزیمی شود. یک مطالعه نشان داد که فعالیت بتا-گالاکتوزیداز آسپرژیلوس اوریزه در دمای ۵۰ درجه سلسیوس و pH ۶.۵ بعد از ۲۴ ساعت فعالسازی بیشتر از ۱۰ برابر فعالیت قبلی بوده است [۲۶]. همچنین، مطالعات دیگر نشان داده اند که زمان فعالسازی آنزیمی می تواند بهبود قابل توجهی در فعالیت بتا-گالاکتوزیداز آسپرژیلوس اوریزه ایجاد کند [۳۴]. بنابراین، زمان فعالسازی آنزیمی می تواند برای بهبود فعالیت بتا-گالاکتوزیداز آسپرژیلوس اوریزه مورد استفاده قرار گیرد MWCNT-NH3-glutaraldehyde یک نانو لوله کربنی است که به وسیله ۰ گروه آمینی (NH3) و گلو تار آلدهید (glutaraldehyde) تغییر داده شده است. گروه آمینی به نانو لوله کربنی متصل شده است و

گلو تار آلدهید به گروه آمینی متصل شده است. این تغییرات ساختاری می تواند بهبود قابل توجهی در خواص نانو لوله کربنی ایجاد کند، از جمله افزایش پایداری، افزایش مقاومت به اکسیداسیون، و افزایش قابلیت اتصال به سایر مواد شیمیایی.

MWCNT-NH3-glutaraldehyde می تواند نقش مهمی در افزایش فعالیت آنزیمی بتا گالاکتوزیداز آسپرژیلوس اوریزه داشته باشد. به طور خاص، این نانو لوله کربنی می تواند به عنوان یک پایه برای اتصال آنزیم به سطح خود استفاده شود. این اتصال می تواند بهبود قابل توجهی در پایداری و فعالیت آنزیمی ایجاد کند. همچنین، MWCNT-NH3-glutaraldehyde می تواند به عنوان یک فعال کننده برای فعالسازی آنزیم بتا گالاکتوزیداز آسپرژیلوس اوریزه استفاده شود. این فعال کننده می تواند باعث افزایش فعالیت آنزیمی شود و در نتیجه بهبود قابل توجهی در عملکرد آنزیم بتا گالاکتوزیداز آسپرژیلوس اوریزه ایجاد کند [۳۵].

همچنین مولاریته گلو تار آلدهید به مقدار گلو تار آلدهیدی اطلاق می شود که در یک مول از ماده وجود دارد. در مورد تأثیر مثبت گلو تار آلدهید بر روی افزایش فعالیت آنزیمی بتا گالاکتوزیداز آسپرژیلوس اوریزه، باید گفت که گلو تار آلدهید به عنوان یک فعال کننده برای فعالسازی آنزیم بتا گالاکتوزیداز آسپرژیلوس اوریزه استفاده می شود [۳۶]. مطالعات نشان داده اند که افزایش مولاریته گلو تار آلدهید می تواند منجر به افزایش فعالیت آنزیمی بتا گالاکتوزیداز آسپرژیلوس اوریزه شود. به عنوان مثال، یک مطالعه نشان داد که افزایش مولاریته گلو تار آلدهید از ۰.۰۰۱ تا ۰.۰۰۵ مولار باعث افزایش فعالیت آنزیمی بتا گالاکتوزیداز آسپرژیلوس اوریزه شده است [۳۷]. بنابراین، مولاریته گلو تار آلدهید می تواند به عنوان یک عامل مهم در افزایش فعالیت آنزیمی بتا گالاکتوزیداز آسپرژیلوس اوریزه مورد استفاده قرار گیرد.

۳-۴- راندمان عمل تثبیت کووالانت بتا گالاکتوزیداز

آسپرژیلوس اوریزه بر روی آمینو نانولوله ای کربنی چند دیواره‌ای

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که راندمان عمل تثبیت کووالانت بتا گالاکتوزیداز آسپرژیلوس اوریزه بر روی آمینو نانولوله ای کربنی چند دیواره‌ای متأثر از مولاریته گلو تارآلدئید، pH بافر، MWCNT-NH₃-glutaraldehyde زمان تثبیت و همچنین اثر متقابل pH فعالسازی+زمان فعالسازی، pH بافر+ pH فعالسازی، pH فعالسازی+ مولاریته بافر، مولاریته گلو تارآلدئید + MWCNT-NH₃-glutaraldehyde می باشد ($p < 0.05$) (شکل ۴).

معادله اثر فاکتورها بر راندمان عمل تثبیت کووالانت بتا گالاکتوزیداز آسپرژیلوس اوریزه بر روی آمینو نانولوله ای کربنی چند دیواره‌ای با $R^2=0.89$ و $\text{Adjusted } R^2=0.83$ به صورت معادله شماره 6 بدست آمد.

$$\text{Lactase Immobilization} = 51.24 - 2.32A + 5.97B - 1.77C + 5.73D - 0.08E - 4.83F - 7.45G - 8.61AC + 9.15AD - 4.33AE + 3.44AG - 5.98BE + 3.82DF \quad (6)$$

مقدار شاخص R^2 بسیار بالاست و نشان دهنده مناسب بودن مدل بدست آمده بوده و این مدل می تواند ۸۳ درصد از تغییرات راندمان عمل تثبیت کووالانت بتا گالاکتوزیداز آسپرژیلوس اوریزه بر روی آمینو نانولوله ای کربنی چند دیواره‌ای را پیش بینی کند. در این بین سهم پیش بینی اثر متقابل زمان فعالسازی و pH فعالسازی از همه فاکتورها در جهت عکس بیشتر است.

نتایج حاکی از این است که pH نقش تعیین کننده ای در میزان راندمان تثبیت ایفا کرده است. اثر pH فعالسازی و pH بافر بر روی راندمان عمل تثبیت کووالانت بتا گالاکتوزیداز آسپرژیلوس

اوریزه بر روی آمینو نانولوله ای کربنی چند دیواره‌ای می تواند قابل توجه باشد. مطالعات نشان داده اند که pH بافر می تواند تأثیر قابل توجهی بر روی راندمان عمل تثبیت کووالانت بتا گالاکتوزیداز آسپرژیلوس اوریزه داشته باشد [۳۸]. به طور خاص، pH بافر می تواند تأثیر مستقیمی بر روی بار الکتریکی سطح آمینو نانولوله ای کربنی چند دیواره‌ای داشته باشد که می تواند بهبود قابل توجهی در راندمان عمل تثبیت کووالانت بتا گالاکتوزیداز آسپرژیلوس اوریزه ایجاد کند. همچنین، Ph فعالسازی نیز می تواند تأثیر مستقیمی بر روی راندمان عمل تثبیت کووالانت بتا گالاکتوزیداز آسپرژیلوس اوریزه بر روی آمینو نانولوله ای کربنی چند دیواره‌ای داشته باشد. در تایید این نتیجه، یک مطالعه نشان داده است که pH فعالسازی برای تثبیت کووالانت بتا گالاکتوزیداز آسپرژیلوس اوریزه بر روی آمینو نانولوله ای کربنی چند دیواره‌ای باید در محدوده ۶ تا ۸ باشد تا بهبود قابل توجهی در راندمان عمل تثبیت ایجاد شود. MWCNT-NH₃-glutaraldehyde می تواند نقش مهمی در افزایش راندمان عمل تثبیت کووالانت بتا گالاکتوزیداز آسپرژیلوس اوریزه بر روی آمینو نانولوله ای کربنی چند دیواره‌ای داشته باشد. به طور خاص، MWCNT-NH₃-glutaraldehyde می تواند به عنوان یک پایه برای اتصال آنزیم به سطح خود استفاده شود [۳۹]. این اتصال می تواند بهبود قابل توجهی در پایداری و فعالیت آنزیمی ایجاد کند. همچنین، MWCNT-NH₃-glutaraldehyde می تواند به عنوان یک فعال کننده برای فعالسازی آنزیم بتا گالاکتوزیداز آسپرژیلوس اوریزه استفاده شود. این فعال کننده می تواند باعث افزایش فعالیت آنزیمی شود و در نتیجه بهبود قابل توجهی در راندمان عمل تثبیت کووالانت بتا گالاکتوزیداز آسپرژیلوس اوریزه بر روی آمینو نانولوله ای کربنی چند دیواره‌ای ایجاد کند [۴۰].

[۴۱].

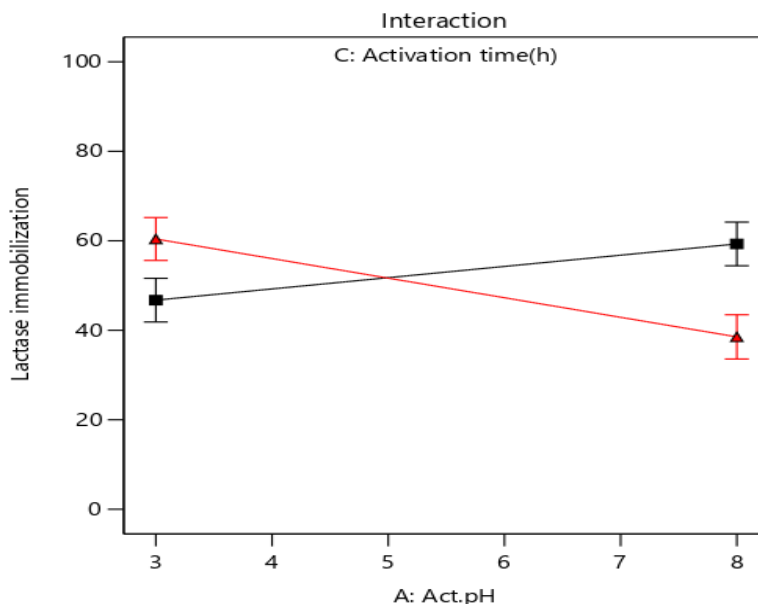


Figure 4. Interaction effect of pH activation and activation time on the efficiency of covalent immobilization of *Aspergillus oryzae* beta-galactosidase onto multi-walled amino-functionalized carbon nanotubes

می توان گفت این فاکتور می توانند در جایگاه خود اثر سایر فاکتورهای موثر دیگر را نیز تشدید کنند از جمله می توان به اثر متقابل اثر متقابل pH فعالسازی+زمان فعالسازی، pH بافر+ pH فعالسازی، pH فعالسازی+ مولاریته بافر، مولاریته گلوآلدهید + MWCNT-NH₃-glutaraldehyde اشاره کرد.

۴- نتیجه گیری کلی

در این تحقیق، تأثیر هفت فاکتور پیوسته بر روی راندمان تثبیت و فعالیت آنزیمی بتا گالاکتوزیداز آسپرژیلوس اوریزه بر روی آمینو نانولوله ای کربنی چند دیواره ای بررسی شد. نتایج نشان داد که مولاریته گلوآلدهید، زمان فعالسازی و اثر متقابل زمان فعالسازی و مقدار MWCNT-NH₃ گلوآلدهید تنها عواملی هستند که می توانند بر روی فعالیت آنزیمی مثبت تأثیر بگذارند. همچنین، نتایج نشان داد که راندمان تثبیت کووالانت بتا گالاکتوزیداز آسپرژیلوس اوریزه بر روی آمینو نانولوله ای کربنی چند دیواره ای تحت تأثیر مولاریته گلوآلدهید، pH بافر، MWCNT-NH₃-glutaraldehyde، زمان تثبیت و اثر متقابل pH فعالسازی+زمان فعالسازی، pH فعالسازی+ مولاریته

همانطور که در بخش اثر فعالسازی آنزیم ذکر شد، مولاریته گلوآلدهید و زمان فعالسازی می توانند در افزایش راندمان عمل تثبیت کووالانت بتا گالاکتوزیداز آسپرژیلوس اوریزه بر روی آمینو نانولوله ای کربنی چند دیواره ای نقش مهمی داشته باشند. مطالعات نشان داده اند که افزایش مولاریته گلوآلدهید می تواند منجر به افزایش راندمان عمل تثبیت کووالانت بتا گالاکتوزیداز آسپرژیلوس اوریزه بر روی آمینو نانولوله ای کربنی چند دیواره ای شود. به عنوان مثال، یک مطالعه نشان داده است که افزایش مولاریته گلوآلدهید از ۰.۰۰۱ تا ۰.۰۰۵ مولار، باعث افزایش راندمان عمل تثبیت کووالانت بتا گالاکتوزیداز آسپرژیلوس اوریزه شده است [۳۷]. همچنین، زمان فعالسازی نیز می تواند تأثیر مستقیمی بر روی راندمان عمل تثبیت کووالانت بتا گالاکتوزیداز آسپرژیلوس اوریزه بر روی آمینو نانولوله ای کربنی چند دیواره ای داشته باشد. برای مثال، یک مطالعه نشان داده است که زمان فعالسازی برای تثبیت کووالانت بتا گالاکتوزیداز آسپرژیلوس اوریزه بر روی آمینو نانولوله ای کربنی چند دیواره ای باید بین ۲ تا ۴ ساعت باشد تا بهبود قابل توجهی در راندمان عمل تثبیت ایجاد شود [۲]. در تبیین نتایج اثر جداگانه هر کدام از فاکتورهای موثر،

بافر، مولاریته گلو تار آلدئید-MWCNT-NH3 + glutaraldehyde هستند.

۵- منابع

- [1] Sass, A.-C. and H.-J. Jördening, *Immobilization of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* on electrospun gelatin nanofiber mats for the production of galactooligosaccharides*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2020. **191**: p. 1155-1170.
- [2] Guerrero, C., et al., *Improvements in the production of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase crosslinked aggregates and their use in repeated-batch synthesis of lactulose*. International journal of biological macromolecules, 2020. **142**: p. 452-462.
- [3] Gao, X., J. Wu, and D. Wu, *Rational design of the beta-galactosidase from *Aspergillus oryzae* to improve galactooligosaccharide production*. Food chemistry, 2019. **286**: p. 362-367.
- [4] Serey, M., C. Vera, C. Guerrero, and A. Illanes, *Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase in cation functionalized agarose matrix and its application in the synthesis of lactulose*. International journal of biological macromolecules, 2021. **167**: p. 1564-1574.
- [5] Vera, C., et al., *Conventional and non-conventional applications of β -galactosidases*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-proteins and proteomics, 2020. **1868**(1): p. 140271.
- [6] Aslan, Y., D. Ömerosmanoğlu, and E.Ö. Koç, *Covalent immobilization of an alkaline protease from *Bacillus licheniformis**. Turkish Journal of Biochemistry, 2018. **43**(6): p. 595-604.
- [7] Wahba, M.I., *Gum tragacanth for immobilization of *Bacillus licheniformis* protease: optimization, thermodynamics and application*. Reactive and Functional Polymers, 2022. **179**: p. 105366.
- [8] Kuribayashi, L.M., et al., *Immobilization of β -galactosidase from *Bacillus licheniformis* for application in the dairy industry*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021. **105**: p. 3601-3610.
- [9] de Souza, T.C., et al., *Modulation of lipase B from *Candida antarctica* properties via covalent immobilization on eco-friendly support for enzymatic kinetic resolution of rac-indanyl acetate*. Bioprocess and biosystems engineering, 2020. **43**: p. 2253-2268.
- [10] Basso, A. and S. Serban, *Industrial applications of immobilized enzymes—A review*. Molecular Catalysis, 2019. **479**: p. 110607.
- [11] Glomm, W.R., et al., *Immobilized protease on magnetic particles for enzymatic protein hydrolysis of poultry by-products*. LWT, 2021. **152**: p. 112327.
- [12] Ansari, S.A. and Q. Husain, *Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review*. Biotechnology advances, 2012. **30**(3): p. 512-523.
- [13] Verma, M.L., M. Naebe, C.J. Barrow, and M. Puri, *Enzyme immobilisation on amino-functionalised multi-walled carbon nanotubes: structural and biocatalytic characterisation*. PloS one, 2013. **8**(9): p. e73642.
- [14] Çakmakçı, R., *Screening of multi-trait rhizobacteria for improving the growth, enzyme activities, and nutrient uptake of tea (*Camellia sinensis*)*. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 2016. **47**(13-14): p. 1680-1690.

- [15] Carrara, C.R. and A.C. Rubiolo, *Immobilization of. beta.-galactosidase on chitosan*. Biotechnology Progress, 1994. **10**(2): p. 220-224.
- [16] Macfarlane, G., C. Allison, and G. Gibson, *Effect of pH on protease activities in the large intestine*. Letters in applied microbiology, 1988. **7**(6): p. 161-164.
- [17] Bhunia, B., et al., *Effect of pH and temperature on stability and kinetics of novel extracellular serine alkaline protease (70 kDa)*. International journal of biological macromolecules, 2013. **54**: p. 1-8.
- [18] Otte, J., et al., *Protease-induced gelation of unheated and heated whey proteins: effects of pH, temperature, and concentrations of protein, enzyme and salts*. International Dairy Journal, 1999. **9**(11): p. 801-812.
- [19] Yang, L., et al., *Enhancing biogas generation performance from food wastes by high-solids thermophilic anaerobic digestion: Effect of pH adjustment*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2015. **105**: p. 153-159.
- [20] da Silva, O.S., E.M. de Almeida, A.H.F. de Melo, and T.S. Porto, *Purification and characterization of a novel extracellular serine-protease with collagenolytic activity from *Aspergillus tamarii* URM4634*. International journal of biological macromolecules, 2018. **117**: p. 1081-1088.
- [21] Jones, E.M., C.A. Cochrane, and S.L. Percival, *The effect of pH on the extracellular matrix and biofilms*. Advances in wound care, 2015. **4**(7): p. 431-439.
- [22] López-Cervantes, J., D.I. Sánchez-Machado, R.G. Sánchez-Duarte, and M.A. Correa-Murrieta, *Study of a fixed-bed column in the adsorption of an azo dye from an aqueous medium using a chitosan-glutaraldehyde biosorbent*. Adsorption Science & Technology, 2018. **36**(1-2): p. 215-232.
- [23] Rathinam, K., S.P. Singh, C.J. Arnusch, and R. Kasher, *An environmentally-friendly chitosan-lysozyme biocomposite for the effective removal of dyes and heavy metals from aqueous solutions*. Carbohydrate Polymers, 2018. **199**: p. 506-515.
- [24] Rodrigues de Melo, R., et al., *New heterofunctional supports based on glutaraldehyde-activation: A tool for enzyme immobilization at neutral pH*. Molecules, 2017. **22**(7): p. 1088.
- [25] Dal Magro, L., et al., *Pectin lyase immobilization using the glutaraldehyde chemistry increases the enzyme operation range*. Enzyme and Microbial Technology, 2020. **132**: p. 109397.
- [26] de Andrades, D., et al., *Immobilization and stabilization of different β -glucosidases using the glutaraldehyde chemistry: Optimal protocol depends on the enzyme*. International journal of biological macromolecules, 2019. **129**: p. 672-678.
- [27] Ibrahim, A.S.S., et al., *Enhancement of alkaline protease activity and stability via covalent immobilization onto hollow core-mesoporous shell silica nanospheres*. International journal of molecular sciences, 2016. **17**(2): p. 184.
- [28] Duman, Y.A. and N. Tekin, *Kinetic and thermodynamic properties of purified alkaline protease from *Bacillus pumilus* Y7 and non-covalent immobilization to poly (vinylimidazole)/clay hydrogel*. Engineering in Life Sciences, 2020. **20**(1-2): p. 36-49.
- [29] Minteer, S.D., *Enzyme stabilization and immobilization*. 2017: Springer.
- [30] Rodrigues, R.C., et al., *Stabilization of enzymes via immobilization: Multipoint covalent attachment and other*

- stabilization strategies*. Biotechnology advances, 2021. **52**: p. 107821.
- [31] Ahmed, F., S.M. Faisal, A. Ahmed, and Q. Husain, *Beta galactosidase mediated bio-enzymatically synthesized nano-gold with aggrandized cytotoxic potential against pathogenic bacteria and cancer cells*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2020. **209**: p. 111923.
- [32] Bashir, N., M. Sood, and J.D. Bandral, *Enzyme immobilization and its applications in food processing: A review*. Int. J. Chem. Stud, 2020. **8**(2): p. 254-261.
- [33] Ait Braham, S., et al., *Cooperativity of covalent attachment and ion exchange on alcalase immobilization using glutaraldehyde chemistry: Enzyme stabilization and improved proteolytic activity*. Biotechnology progress, 2019. **35**(2): p. e2768.
- [34] Zaak, H., et al., *Improved stability of immobilized lipases via modification with polyethylenimine and glutaraldehyde*. Enzyme and Microbial Technology, 2017. **106**: p. 67-74.
- [35] Siar, E.-H., et al., *Immobilization/stabilization of ficin extract on glutaraldehyde-activated agarose beads. Variables that control the final stability and activity in protein hydrolyses*. Catalysts, 2018. **8**(4): p. 149.
- [36] Zaak, H., M. Sassi, and R. Fernandez-Lafuente, *A new heterofunctional amino-vinyl sulfone support to immobilize enzymes: Application to the stabilization of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae**. Process Biochemistry, 2018. **64**: p. 200-205.
- [37] Cardoso, B.B., et al., *β -galactosidase from *Aspergillus lacticoffeatus*: A promising biocatalyst for the synthesis of novel prebiotics*. International Journal of Food Microbiology, 2017. **257**: p. 67-74.
- [38] Khan, M., Q. Husain, and R. Bushra, *Immobilization of β -galactosidase on surface modified cobalt/multiwalled carbon nanotube nanocomposite improves enzyme stability and resistance to inhibitor*. International journal of biological macromolecules, 2017. **105**: p. 693-701.
- [39] Zaak, H., et al., *Exploiting the versatility of aminated supports activated with glutaraldehyde to immobilize β -galactosidase from *Aspergillus oryzae**. Catalysts, 2017. **7**(9): p. 250.
- [40] Ansari, S.A. and A.A. Damanhory, *Biotechnological application of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase immobilized on glutaraldehyde modified zinc oxide nanoparticles*. Heliyon, 2023. **9**(2).
- [41] de Freitas, L.A., et al., *Magnetic CLEAs of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* as a potential biocatalyst to produce tagatose from lactose*. Catalysts, 2023. **13**(2): p. 306.



Scientific Research

Covalent immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase and *Bacillus licheniformis* protease with Amino-Multi Walled Carbon Nanotubes

Alan Yaseen Taher¹, Mohammad Alizadeh*¹, Yakup Aslan²

1- Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

2- Siirt University Faculty of Engineering Department of Food Engineering

ABSTRACT

ARTICLE INFO

This study was carried out with the aim of covalent immobilization of *Aspergillus oryzae* beta-galactosidase and *Bacillus licheniformis* protease on multi-walled amino-carbon nanotubes. In this method, fractional 2k design was used to study the effect of seven continuous factors (activation pH, glutaraldehyde molarity, activation time, buffer solution pH, buffer solution molarity, MWCNT-NH₃-glutaraldehyde amount and stabilization time) on the stabilization efficiency and enzyme activity. . Design-expert software was used to analyze data and draw graphs. The results showed that the aforementioned factors predict the level of enzyme activity of *Bacillus licheniformis* protease and *Aspergillus oryzae* beta-galactosidase with correlation coefficients of 0.80 and 0.92 at the rate of 77 and 88%, respectively. Also, the correlation coefficient of the covalent fixation efficiency model of *Aspergillus oryzae* beta-galactosidase and *Bacillus licheniformis* protease on multi-walled carbon nanotubes was 0.89 and 0.82, respectively, and the studied factors were able to determine the covalent fixation beta efficiency, respectively. *Aspergillus oryzae* galactosidase and *Bacillus licheniformis* protease on multi-walled amino-carbon nanotubes predict 83 and 77%, respectively.

Article History:

Received: 2023/9/24
Accepted: 2023/10/28

Keywords:

Alkaline protease,
carbon nanotubes,
covalent immobilization,
 β -galactosidase

DOI: 10.22034/FSC.T.20.145.208

*Corresponding Author E-Mail:
malizadeh@outlook.com