

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۸/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۲/۱۹

وب سایت نشریه: <https://jab.alzahra.ac.ir>



10.22051/JAB.2021.34309.1398

## تثبیت کووالانسی آنزیم پراکسیداز نو ترکیب لپیدیوم درابا (LDP) بر روی ساختار آلی-فلزی روی با استفاده از گلو تار آلدئید

سودابه فرهادی<sup>۱</sup>، علی ریاحی مدوار<sup>۲\*</sup>، مجتبی مرتضوی<sup>۳</sup>، قاسم سرگزی<sup>۴</sup>

### چکیده

مقدمه: پراکسیداز لپیدیوم درابا (LDP) آنزیمی از کلاس III پراکسیدازهای گیاهی است که توالی اسید آمینه‌ای آن با پراکسیداز ترب کوهی (HRP) بیش از ۹۰ درصد تشابه دارد. روش‌ها: در این پژوهش، به منظور اتصال محکم LDP به چارچوب آلی-فلزی روی (Zn-MOF)، بعد از بیان و تخلیص آنزیم، شرایط تثبیت با استفاده از لینکر گلو تار آلدئید بهینه‌سازی شد و سپس ویژگی‌های فیزیوشیمیایی، سینتیکی و پایداری آن با آنزیم آزاد مقایسه شدند.

نتایج و بحث: بهترین شرایط تثبیت با بازده ۶۷٪، در غلظت‌های Zn-MOF ۰/۰۲ گرم، آنزیم ۰/۷۵ mg/ml و گلو تار آلدئید ۱/۲ دسی‌مولار به مدت سه ساعت انکوبه شدن بدست آمد. نتایج نشان داد که فعالیت ویژه آنزیم تثبیت شده بیش از دو برابر آنزیم آزاد افزایش یافته است و  $K_m$  آن به سوسترای TMB نسبت به آنزیم آزاد، ۴۹ درصد کاهش یافته است. همچنین پایداری سینتیکی آنزیم تثبیت شده در برابر pH و دما نسبت به آنزیم آزاد کاهش یافت.

### واژه های کلیدی: بهینه‌سازی، پایداری، سینتیکی، فعالیت ویژه

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران.
۲. دانشیار، گروه زیست‌شناسی سلولی-مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کوثر بجنورد، بجنورد، ایران. (\* نویسنده مسؤل: [Riahi.ali@gmail.com](mailto:Riahi.ali@gmail.com))
۳. استادیار، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران
۴. استادیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های غیر واگیردار، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی بم، بم، ایران

## مقدمه

توانایی آنزیم‌ها در کاتالیز واکنش‌ها بی‌نظیر است و باعث می‌شود واکنشی که تحت شرایط عادی به‌سادگی اتفاق نمی‌افتد، با سرعت بالا رخ دهد. علاوه بر این، آنزیم‌ها واکنش‌ها را به‌صورت اختصاصی انجام می‌دهند و در شرایطی همچون دما، فشار و pH خاصی فعالیت می‌کنند و با توجه به این خصوصیات، آنزیم‌ها ابزاری قدرتمند برای کاربرد در صنعت و پزشکی به‌عنوان حسگرهای زیستی هستند (Radzicka & Wolfenden, 1995). با پیشرفت در تکنیک‌های تشخیصی و بالینی، واکنش‌های اکسیداسیون-احیا از اهمیت بالایی برخوردار هستند. از این‌رو، پراکسیدازها نقش اساسی در سنجش‌های بالینی مانند کراتینین، گلوکز، اسید اوریک اسید و تعیین پراکسید هیدروژن دارند (Yujun *et al.*, 2010; Dhruvaraj, 2017). پراکسیداز ترب کوهی (HRP) به‌عنوان یک آنزیم پرکاربرد، کاتالیزوری فعال، انعطاف‌پذیر در آزمایش، پایدار و حساس در تشخیص است (Sanz *et al.*, 2005). اخیراً ژن یک آنزیم پراکسیداز از گیاه *Lepidium draba* (LDP) از یک گیاه بومی ایران شناسایی و کلون شده است (Fattahian *et al.*, 2017). گیاه *Lepidium draba* از خانواده‌ی براسیکا است که ترب کوهی نیز از همین خانواده است. مطالعات بیوانفورماتیک نشان‌دهنده‌ی تشابه بالایی این آنزیم با آنزیم HRP است به‌طوری‌که توالی پروتئینی آن با HRP بیش از ۸۷ درصد همسانی (Identity) و ۹۳ درصد تشابه (Similarity) دارد (Fattahian *et al.*, 2017). با توجه به فعالیت کاتالیتیکی و بازدهی عملکرد این آنزیم، به‌عنوان یک همولوگ پراکسیداز HRP برای کاربردهای پزشکی و بیوتکنولوژی معرفی شده است (Fattahian *et al.*, 2017).

آنزیم‌ها علیرغم قدرت کاتالیزوری، برای استفاده در محیط‌های صنعتی و پزشکی محدودیت دارند. اگرچه ذاتاً قابلیت استفاده مجدد دارند؛ اما استفاده‌ی مجدد آنزیم‌ها در محیط‌های آبی غیرممکن است و همچنین به دلیل سخت بودن مراحل خالص‌سازی، از نظر اقتصادی مقرون‌به‌صرفه نیست. همچنین محصولات واکنش و مهارکننده‌ها می‌توانند توانایی آن‌ها را محدود کند. یکی از روش‌هایی که کمک می‌کند بر این محدودیت‌ها غلبه شود، تثبیت آنزیم بر روی یک بستر جامد است (Radzicka & Wolfenden, 1995). موارد مهم در تثبیت آنزیم، شامل نوع آنزیم، نوع ماتریکس و نحوه‌ی اتصال است. سطحی که آنزیم روی آن تثبیت می‌شود چند نقش اساسی دارد از قبیل حفظ ساختار سوم آنزیم با تشکیل کمپلکس انتقال الکترون و یا با ایجاد پیوند هیدروژنی یا کوآلان با ماتریکس (Mohamad *et al.*, 2015). از این‌رو زمانی که تثبیت آنزیم بر روی یک سطح انجام می‌شود مهم است که روشی مناسب برای برقراری اتصال بین گروه فعال ماتریکس و آنزیم انتخاب شود (Tischer & Wedekind, 1999). حفظ ساختار سوم فعال کاتالیتیکی آنزیم یک عامل ضروری در به حداکثر رساندن پایداری و واکنش‌پذیری آنزیم در حالت تثبیت‌شده‌ی آن است (Nourouziyan, 2003). روش‌های مختلفی برای تثبیت آنزیم‌ها بر روی سطوح جامد وجود دارد که به سه دسته‌ی کلی جذب، محبوس‌سازی و اتصال کوآلان تقسیم می‌شوند (Barragán *et al.*, 2016). استفاده از گلوکارآلدئید به‌عنوان عامل پیونددهنده، یکی از روش‌های متداول برای تثبیت کوآلان آنزیم است (Zhou & Chen, 2001; Magnan *et al.*, 2004; Tukul & Alptekin, 2004).

همان‌گونه که گفته شد انتخاب یک حامل مناسب نقش مهمی در تکنیک‌های تثبیت آنزیم ایفا می‌کند که می‌تواند علاوه بر تسهیل فرایند تثبیت، پایداری و عملکرد کاتالیزوری را افزایش دهد (Stephens *et al.*, 2012; Cao *et al.*, 2016). نانومواد از جمله نانوذرات، نانولوله‌ها، نانوصفحات و ساختارهای آلی-فلزی (Metal-organic framework) از بسترهای مدرن مورد استفاده در تثبیت مولکول‌های پروتئینی از جمله آنزیم‌ها هستند (Ansari & Husain, 2012; Mohamed *et al.*, 2017; Sargazi *et al.*, 2018).

چارچوب های آلی-فلزی (MOFs)، ترکیبات منفذدار متشکل از یون های فلزی یا خوشه هایی هستند که با مولکول های آلی همراه شده اند تا ساختار یک، دو و سه بعدی را تشکیل دهند (Magnan *et al.*, 2004). آن ها از دو جزء اصلی شامل یک یون فلزی و یک لیگاند آلی به نام اتصال دهنده تشکیل شده اند (Zhou, 2012). چنین نانو ساختارهایی به دلیل اندازه منافذ، سطح زیاد، سهولت در تنظیم اندازه منافذ و پایداری حرارتی و شیمیایی بالا گزینه های مناسب برای تثبیت آنزیم ها هستند (Ali *et al.*, 2010; Getman *et al.*, 2018). اخیرا در یک مطالعه تثبیت این آنزیم بر روی چارچوب آلی-فلزی روی با استفاده از روش جذب فیزیکی انجام شد. نتایج حاصله بیانگر افزایش فعالیت، افزایش تمایل به سوبسترا و افزایش پایداری در pH های بازی آنزیم تثبیت شده نسبت به آنزیم آزاد بود. در حالی که پایداری حرارتی در دمای بالا نسبت به آنزیم آزاد کاهش نشان داد (Farhadi *et al.*, 2021). در این پژوهش، به منظور ایجاد پیوند کووالان بین Zn-MOF و LDP، بعد از بیان و تخلیص آنزیم، شرایط تثبیت به واسطه ی گلوئارآلدئید بهینه سازی شد و سپس اثر تثبیت بر روی خصوصیات فیزیکی شیمیایی، سینتیکی و پایداری آن مورد ارزیابی قرار گرفت.

## مواد و روش ها

بسیاری از مواد شامل پتاسیم دی هیدروژن فسفات، سدیم دی هیدروژن فسفات، دی سدیم هیدروژن فسفات، اسید فسفریک، سدیم دودسیل سولفات (SDS)، ایزوپروپیل بتا-دی-۱-تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG) و گلوئارآلدئید از شرکت Merck آلمان تهیه شدند. مارکر وزن مولکولی پروتئین از شرکت Bio Basic، آنتی بیوتیک کانامایسین، سوبسترای 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)، hemin ۴-آمینوآنتی پیرین و آمونیوم هیدروکسید از شرکت سیگما خریداری شدند. برای تخلیص پروتئین نوترکیب از ستون Ni-NTA agarose خریداری شده از شرکت Invitrogene استفاده شد. سوبسته ی استفاده شده در این مطالعه برای بیان آنزیم LDP، *E. coli* BL21 (DE3) موجود در دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان بود و Zn-MOF با ابعاد نانو، حفرات منظم و دارای درصد کریستالی بالای ۵۰ درصد به عنوان بستر تثبیت مورد استفاده قرار گرفت (Farhadi *et al.*, 2021).

## بیان و تخلیص آنزیم

بیان، تخلیص و فعال سازی آنزیم پراکسیداز نوترکیب LDP در *E. coli* BL21 با سیستم بیان pET 28a(+) مطابق با شرایط بیان شده در مقاله Farhadi و همکاران (۲۰۲۱) انجام شد (Farhadi *et al.*, 2021). به طور خلاصه، سلول های *E. coli* BL21 در محیط کشت لوریا برتانی (LB) در حضور کانامایسین (۵۰ میکروگرم در میلی لیتر) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد تا زمانی که جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۶ برسد، رشد کردند. سپس با افزودن ۱ میلی مولار IPTG، عمل القا به مدت ۷ ساعت در دمای ۱۸ °C و ۲۰۰ دور در دقیقه انجام می شود و در ادامه سلول ها با ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه جمع آوری شدند. لیز سلول ها با استفاده از سونیکاتور در بافر لیز حاوی ایمیدازول (۱۰ میلی مولار)، سدیم کلرید (۳۲۰ میلی مولار) و سدیم دی هیدروژن فسفات (۶۵ میلی مولار) انجام شد. جهت جدا نمودن پروتئین محلول از باقی مانده های سلولی از سانتریفیوژ با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در

دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. سپس محلول حاوی پروتئین LDP با ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTA، تخلیص شد (Fattahian *et al.*, 2017) و برای تأیید خلوص پروتئین از ژل SDS-PAGE و برای تعیین غلظت پروتئین از روش بردفورد استفاده شد (Bradford, 1976).

### سنجش فعالیت آنزیم

جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم، مخلوط واکنش شامل  $H_2O_2$  (۱ میلی مولار) و TMB (۰/۶ میلی مولار) به‌عنوان سوبستراهای آنزیم، ۷۰ میکرولیتر (حدود ۰/۵ میلی‌گرم) آنزیم LDP و در حجم نهایی ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (۵۰ میلی مولار و pH: ۶/۵) تهیه شد و با روش Krainer و همکاران فعالیت آنزیم سنجیده شد (Krainer *et al.*, 2014). افزایش جذب در طول موج ۶۵۳ نانومتر و در فواصل ۳۰ ثانیه‌ای بررسی شد (ضریب خاموشی TMB اکسید شده در طول موج ۶۵۳ نانومتر:  $3/9 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

### بهینه‌سازی تثبیت آنزیم LDP بر روی Zn-MOF با گلوکارآلدئید

بهینه‌سازی مقدار MOF: آنزیم با غلظت ثابت ۰/۷۵ mg/ml با مقادیر مختلفی از Zn-MOF (۰/۱۵ تا ۰/۰۵ گرم) و ۱ دسی‌مولار گلوکارآلدئید در بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار و pH برابر ۶/۵ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و در ادامه برای جدا کردن آنزیم تثبیت‌شده، دو مرتبه شستشو با استفاده از بافر فسفات، سانتریفیوژ با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. سپس فعالیت ویژه‌ی آن و میزان بارگذاری (Loading) بر روی بستر اندازه‌گیری شد (Xia *et al.*, 2017).

$$\text{Enzyme loading} = \frac{A_1 - A_2}{B}$$

$A_1$  مقدار اولیه پروتئین،  $A_2$  مقدار نهایی پروتئین بعد از تثبیت بر حسب میلی‌گرم و B مقدار بستر بر حسب گرم است.

بهینه‌سازی زمان تثبیت: آنزیم LDP با غلظت ثابت ۰/۷۵ mg/ml Zn-MOF با مقدار مشخص شده در بخش ۲-۳-۱ و ۱ دسی‌مولار گلوکارآلدئید در زمان‌های متفاوت در بازه‌ی نیم ساعت الی ۵ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و بعد از شستشو با بافر فسفات (۵۰ میلی‌مولار و pH برابر ۶/۵)، فعالیت ویژه‌ی آن اندازه‌گیری شد.

بهینه‌سازی غلظت گلوکارآلدئید: برای بهینه‌سازی غلظت گلوکارآلدئید، غلظت‌های متفاوتی از آن (۰/۶ تا ۲ دسی‌مولار) به Zn-MOF با مقدار مشخص شده در ۲-۳-۱ و آنزیم با غلظت ثابت ۰/۷۵ mg/ml در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در بافر فسفات (۵۰ میلی‌مولار و pH برابر ۶/۵) افزوده شد و پس از دو مرتبه شستشو با استفاده از بافر فسفات (۵۰ میلی‌مولار و pH برابر ۶/۵)، سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، آنزیم تثبیت‌شده جدا و فعالیت ویژه‌ی آن محاسبه شد.

درصد بازدهی تثبیت (Immobilization Yield) در شرایط بهینه: درصد بازدهی تثبیت با رابطه‌ی زیر به دست آمد که در آن  $C_1$  مقدار پروتئین اولیه و  $C_2$  مقدار پروتئین از دست‌رفته در طی شستشو است (Zhang *et al.*, 2011).

$$\text{Immobilization Yield (\%)} = \frac{C_1 - C_2}{C_1} \times 100$$

## تأثیر تثبیت بر ویژگی‌های فیزیوشیمیایی آنزیم تثبیت شده و آزاد

### دمای بهینه

برای تعیین دمای بهینه‌ی فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده، واکنش با هر یک از آنزیم آزاد و تثبیت شده در دمای ۱۰ تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد در بافر فسفات (۵۰ میلی مولار و pH برابر ۶/۵) انجام شد. فعالیت ویژه‌ی آنزیم آزاد و تثبیت شده محاسبه و با هم مقایسه شد.

### pH بهینه

برای تعیین pH بهینه‌ی فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده، فعالیت آن‌ها در بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با pHهای مختلف ۶ تا ۸، سنجیده شد.

### مقایسه فعالیت ویژه‌ی آنزیم تثبیت شده با آنزیم آزاد

فعالیت ویژه‌ی آنزیم تثبیت شده در حضور سوبستراهای آن اندازه‌گیری شد و با فعالیت ویژه‌ی آنزیم آزاد مقایسه شد.

### تعیین پارامترهای سینتیکی

برای بررسی اثر تثبیت بر پارامترهای سینتیکی، سنجش فعالیت در حضور مقادیر مختلف TMB (۰/۰۲ تا ۱ میلی مولار) و  $H_2O_2$  (۰/۲۵ تا ۶ میلی مولار) در شرایط بهینه‌ی فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده، انجام شد. سپس با استفاده از رسم نمودار Hanes-Woolf و با کمک نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه‌ی ۸، برای هر کدام از سوبستراها  $K_m$  و  $V_m$  محاسبه شد.

### مطالعه پایداری آنزیم آزاد و تثبیت شده

#### در برابر حرارت

به‌منظور مقایسه پایداری حرارتی، آنزیم‌های آزاد و تثبیت شده در گستره‌ی دمایی ۲۵ تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شدند و بعد از ۵ دقیقه نگهداری بر روی یخ، فعالیت آن‌ها در شرایط بهینه سنجیده شد. فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده قبل از انکوباسیون ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد و برای مقایسه‌ی پایداری آن‌ها در برابر تغییرات دما، فعالیت باقی‌مانده به‌صورت نسبی محاسبه شد.

## در برابر تغییرات pH

آنزیم های آزاد و تثبیت شده به مدت ۱۰ دقیقه در محدوده pH های ۶ تا ۸ در بافر فسفات ۵۰ میلی مولار انکوبه شدند. پس از آن فعالیت آن ها در دمای بهینه سنجیده شد. فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده قبل از انکوباسیون ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد و برای مقایسه ی پایداری در برابر pH، فعالیت باقی مانده به صورت نسبی محاسبه شد.

## حذف فنل

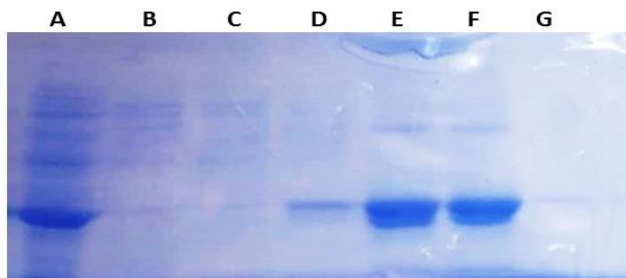
به منظور بررسی عملکرد آنزیم تثبیت شده، توانایی آن در حذف فنل مورد ارزیابی قرار گرفت. آنزیم تثبیت شده (۰/۶ میلی گرم بر میلی لیتر)، با ۵ میلی مولار  $H_2O_2$  و ۵۰ میلی مولار فنل در حجم نهایی یک میلی لیتر بافر فسفات، به مدت ۱۰ دقیقه و ۳۰ دقیقه، در دمای محیط انکوبه شد. بعد از ۱۰ دقیقه سانتیفریوژ با سرعت ۱۲۰۰۰ دور بر ثانیه، مقدار فنل باقی مانده با روش ۴-آمینوآنتی پیرین سنجش شد (Kinsley & Nicell, 2000). بدین صورت که ۵ میکرولیتر از ۴-آمینوآنتی پیرین ۲ درصد، ۱۰ میکرولیتر پتاسیم فروسیانید ۸ درصد، ۵ میکرولیتر از اسید و ۹۸۰ میکرو لیتر از محلول رویی حاصل از سانتیفریوژ را ۵ دقیقه انکوبه و جذب آن در طول موج ۵۱۰ نانومتر سنجیده شد. بازده حذف فنل از رابطه ی زیر محاسبه شد:

$$100 \times \frac{\text{غلظت ثانویه فنل} - \text{غلظت اولیه فنل}}{\text{غلظت اولیه فنل}} = \text{بازده ی حذف فنل}$$

## نتایج

### بیان و تخلیص پروتئین نو ترکیب LDP

همان طور که در شکل ۱، مشاهده می شود فرکشن های E و F از خلوص بالایی برخوردارند که برای انجام مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

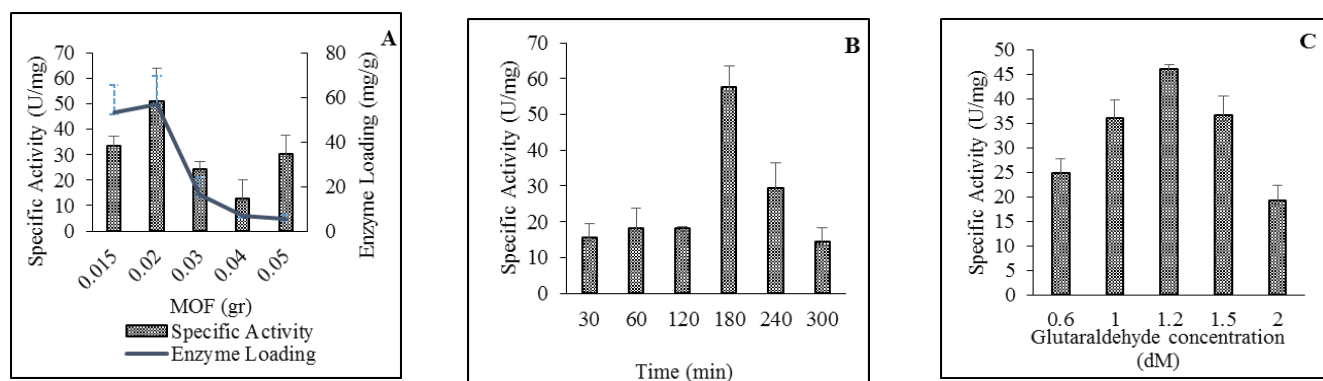


شکل ۱- تخلیص پروتئین نو ترکیب با غلظت های مختلف ایمیدازول. ردیف A نمونه قبل از ستون، ردیف B نمونه خارج شده با بافر شستشو و شماره های C تا G به ترتیب مربوط به غلظت های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و ۳۰۰ میلی مولار ایمیدازول است

**Figure 1. Purification of recombinant protein with different concentrations of imidazole. Lane A is the protein ladder, lane B is the sample passed from the column with wash buffer and lane numbers C-G are related to the imidazole concentrations of 50, 100, 200, 250 and 300 mM respectively**

### شرایط بهینه‌سازی تثبیت آنزیم بر روی MOF

همان‌گونه که در شکل ۲، A قابل مشاهده است برای تثبیت ۰/۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از آنزیم در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در بافر فسفات (۵۰ میلی‌مولار و pH برابر ۶/۵)، مقدار بهینه‌ی Zn-MOF، ۰/۰۲ گرم (شکل ۲، A) و برای تثبیت در این شرایط، بهترین غلظت گلوئارآلدئید ۱/۲ دسی‌مولار (شکل ۲، C) و زمان بهینه‌ی ۳ ساعت (شکل ۲، B) است. نتایج بارگذاری آنزیم بر روی Zn-MOF برای مقدار ۰/۰۲ گرم MOF، ۵۷mg/g محاسبه شد. بازدهی تثبیت در شرایط بهینه یعنی ۰/۰۲ گرم MOF، ۱/۲ دسی‌مولار گلوئارآلدئید و به مدت سه ساعت برابر  $67/3 \pm 16/7$  درصد محاسبه شد.

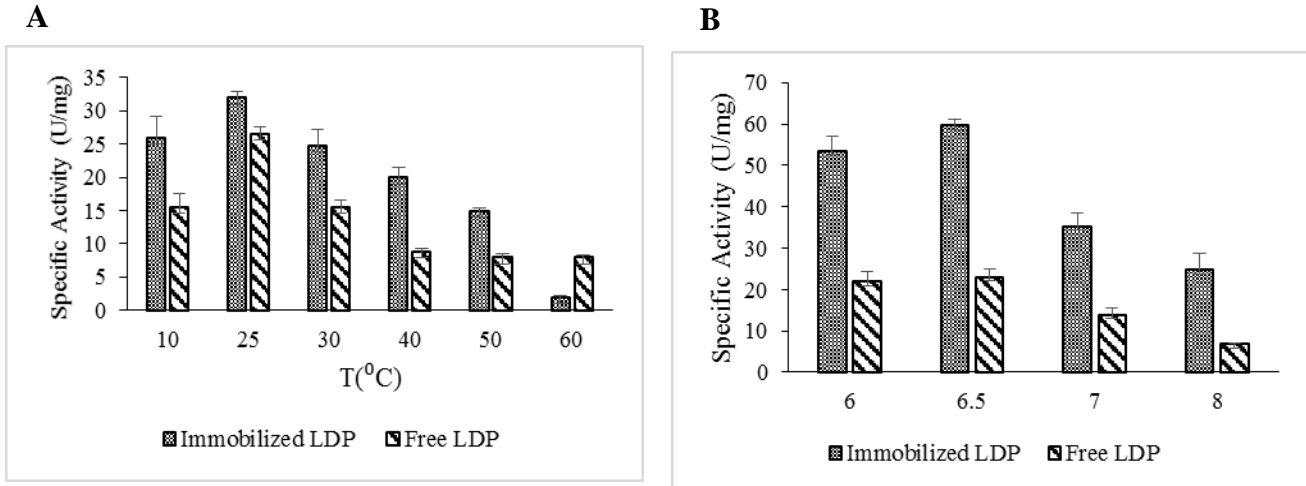


شکل ۱- بهینه‌سازی تثبیت آنزیم بر روی Zn-MOF با گلوئارآلدئید شامل مقدار (A) MOF، زمان برهمکنش (B) و غلظت گلوئارآلدئید (C)

**Figure 2. Optimization of enzyme immobilization on Zn-MOF by glutaraldehyde including amount of MOF (A), time of interaction (B) and glutaraldehyde doses (C)**

### تأثیر تثبیت بر دما و pH بهینه‌ی فعالیت آنزیم

طبق شکل ۲، A، دمای بهینه‌ی فعالیت آنزیم تثبیت‌شده مشابه آنزیم آزاد ۲۵ درجه سانتی‌گراد به دست آمد. همان‌طور که در شکل قابل مشاهده است، در تمام دماها فعالیت ویژه آنزیم تثبیت‌شده بیشتر از آنزیم آزاد است به جز دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد که برعکس شده است. اگرچه در تمامی pH های مورد آزمایش، فعالیت ویژه آنزیم تثبیت‌شده بیشتر از آنزیم آزاد است ولی pH بهینه‌ی فعالیت آن مشابه آنزیم آزاد برابر ۶/۵ است.

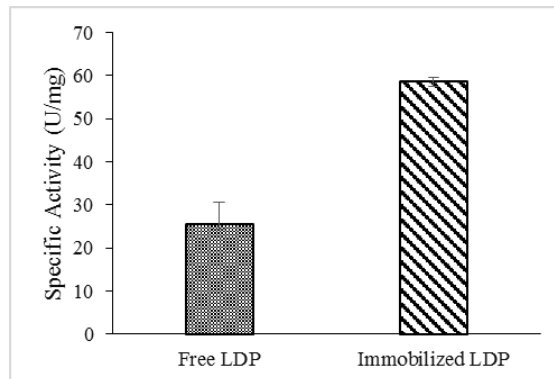


شکل ۲- تاثیر تثبیت در دمای بهینه (A) و pH بهینه (B) بر روی فعالیت آنزیم

**Figure 3. Immobilization effects on enzyme activity at optimum temperature (A) and optimum pH (B)**

#### مقایسه‌ی فعالیت ویژه آنزیم تثبیت شده و آزاد

در شرایط بهینه، فعالیت ویژه آنزیم آزاد و تثبیت شده با گلووتارالدئید محاسبه شد و مشخص گردید که فعالیت ویژه آنزیم تثبیت شده بیش از دو برابر آنزیم آزاد است (شکل ۴).



شکل ۴- مقایسه فعالیت ویژه آنزیم آزاد و تثبیت شده در شرایط بهینه

**Figure 4. Comparison of specific activity for free and immobilized enzymes under optimum condition**

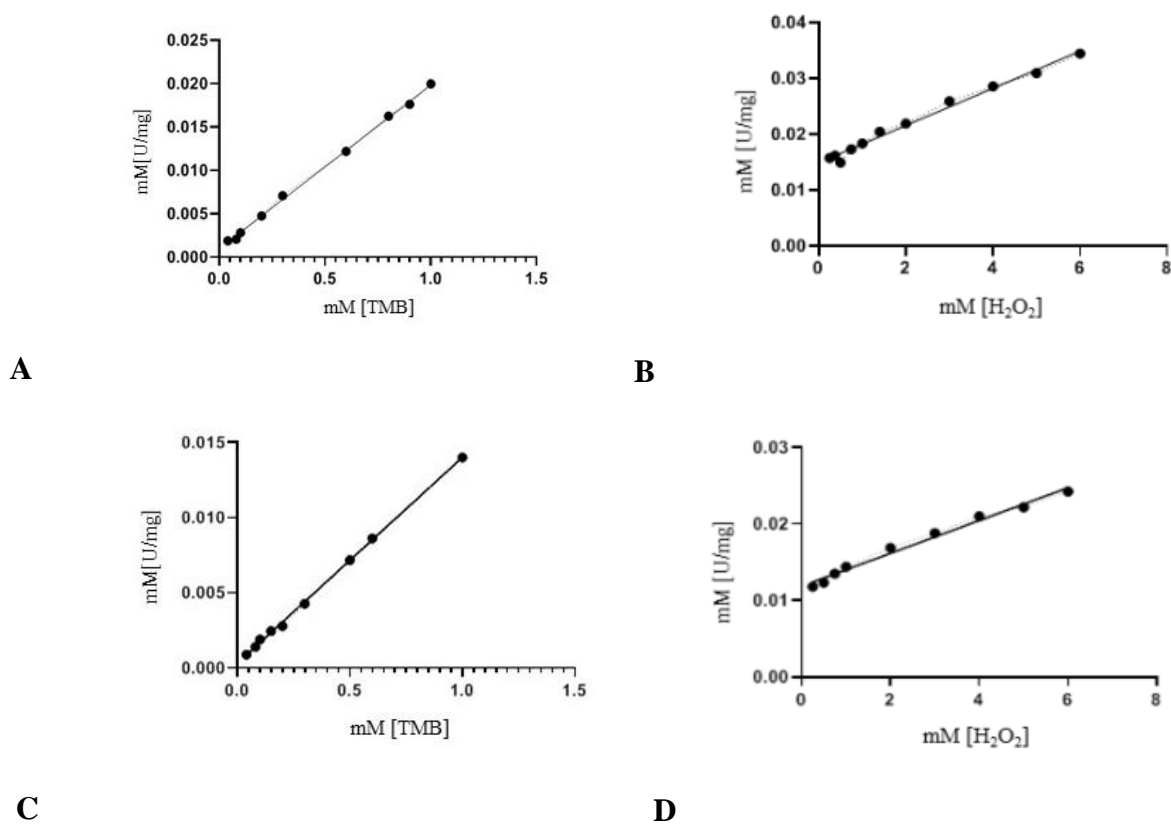
#### تعیین پارامترهای سینتیکی

همان گونه که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، برای سوبسترای TMB،  $K_m$  آنزیم تثبیت شده نسبت به آنزیم آزاد تا ۴۹ درصد کاهش پیدا کرده است ( $K_m$  آنزیم تثبیت شده و آنزیم آزاد به ترتیب  $0.26 \times 10^{-4}$  و  $0.51 \times 10^{-4}$  مولار است) همچنین  $V_m$  آنزیم تثبیت شده



نسبت به آنزیم آزاد بیش از ۳۸ درصد افزایش یافته است ( $V_m$  آنزیم تثبیت شده برابر با  $۷۳/۴۶ \times 10^{-3}$  و آنزیم آزاد  $۵۳ \times 10^{-3}$  مولار بر دقیقه است).

برای سوبسترای  $H_2O_2$ ،  $K_m$  آنزیم تثبیت شده نسبت به آنزیم آزاد تا ۲۶ درصد افزایش پیدا کرده است ( $K_m$  آنزیم تثبیت شده و آنزیم آزاد به ترتیب  $۵/۶۶ \times 10^{-3}$  و  $۴/۴۹ \times 10^{-3}$  مولار است)؛ در حالی که  $V_m$  آنزیم تثبیت شده نسبت به آنزیم آزاد بیش از ۳۶ درصد افزایش یافته است ( $V_m$  آنزیم تثبیت شده  $۴۷۴/۴ \times 10^{-3}$  و آنزیم آزاد  $۳۰۰/۲ \times 10^{-3}$  مولار بر دقیقه است). نمودار Hanes-Woolf مربوط به هر یک از سوبسترهای  $H_2O_2$  و TMB برای آنزیم آزاد و آنزیم تثبیت شده با گلو تار آلدهید در شکل ۵ نشان داده شده است.



شکل ۵- نمودار Hanes-Woolf مربوط به TMB (A) و  $H_2O_2$  برای آنزیم آزاد و TMB (C) و  $H_2O_2$  (D) برای آنزیم تثبیت شده

Figure 5. Hanes-Woolf plate related to TMB (A) and  $H_2O_2$  (B) for free enzyme and TMB (C) and  $H_2O_2$  (D) for immobilized enzyme

جدول ۱-  $K_m$  و  $V_m$  آنزیم‌های آزاد و تثبیت شده

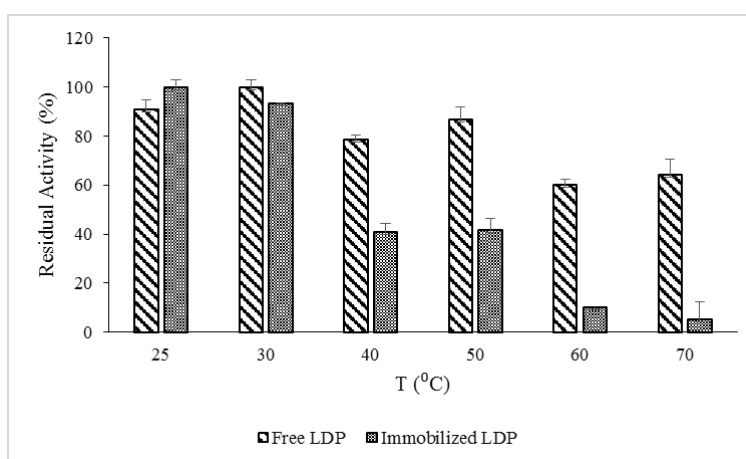
**Table 1.**  $K_m$  and  $V_m$  for free and immobilized enzymes

Substrates	TMB		$H_2O_2$	
	$K_m (M)$	$V_m (M.min^{-1})$	$K_m (M)$	$V_m (M.min^{-1})$
Free LDP	$0.51 \times 10^{-4}$	$53 \times 10^{-3}$	$4.49 \times 10^{-3}$	$300.2 \times 10^{-3}$
Immobilized LDP	$0.26 \times 10^{-4}$	$73.46 \times 10^{-3}$	$5.66 \times 10^{-3}$	$474.4 \times 10^{-3}$

### بررسی پایداری آنزیم آزاد و تثبیت شده

#### در برابر تغییرات دما

بر اساس شکل ۶، فعالیت باقی مانده دو آنزیم آزاد و تثبیت شده در گستره‌ی دمایی ۲۵ تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد مقایسه شدند. در تمامی دماها به جز ۲۵ درجه سانتی‌گراد فعالیت باقی مانده‌ی آنزیم آزاد بیشتر از آنزیم تثبیت شده است.

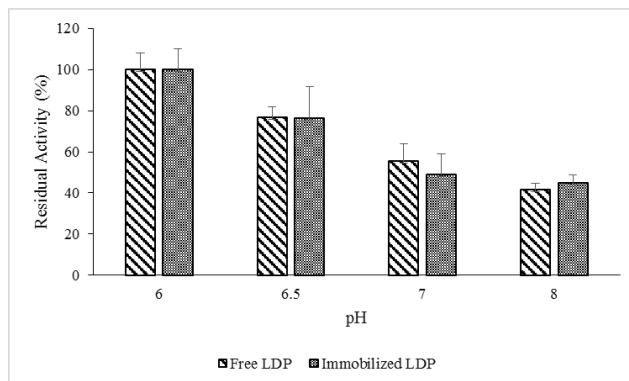


شکل ۶- پایداری حرارتی آنزیم آزاد و تثبیت شده با گلو تار آلدئید: فعالیت باقی مانده‌ی آنزیم‌ها در گستره‌ی دمایی ۲۵ تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد

**Figure 6.** Thermal stability of free and immobilized enzymes: removal activity in 25-70 °C ranges

#### در برابر تغییرات pH

بر اساس شکل ۷، فعالیت باقی مانده آنزیم تثبیت شده و آنزیم آزاد در pH ۶، بیشترین مقدار و با افزایش pH فعالیت باقی مانده‌ی هر دو آنزیم کاهش می‌یابد. اگر چه فعالیت باقی مانده آنزیم آزاد در pH ۷ بیشتر از آنزیم تثبیت شده است ولی با افزایش pH، فعالیت باقی مانده آنزیم تثبیت شده بیشتر از آنزیم آزاد می‌شود.



شکل ۷- پایداری در برابر تغییرات pH آنزیم آزاد و تثبیت شده: فعالیت باقی مانده آنزیم ها در محدوده pH ۶ تا ۸

**Figure 7. Stability of free and immobilized enzymes against pH alteration: enzymes removal activity in 6-8 pH ranges**

### حذف فنل

توانایی آنزیم تثبیت شده برای حذف فنل، در زمان کوتاه مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که این آنزیم قادر است بعد از ۱۰ دقیقه ۱۵ درصد و بعد از ۳۰ دقیقه ۴۳/۶۸ درصد فنل را حذف کند (جدول ۲).

جدول ۲- بازدهی حذف فنل آنزیم تثبیت شده در دو زمان ۱۰ دقیقه و ۳۰ دقیقه

**Table 2. Phenol removal potential of the immobilized enzyme at 10 min and 30 min**

زمان	بازده حذف فنل
۱۰ دقیقه	٪۱۵
۳۰ دقیقه	۴۳/۶۸٪

### بحث و نتیجه گیری

مسئله اساسی در استفاده صنعتی آنزیمها، مشکل جداسازی آنها از محیط واکنش و غیرفعال شدن در محلولهای آلی، دما و pH های غیرمتعارف است. تثبیت یکی از روشهای افزایش کارایی آنزیمها برای به کارگیری آنها در فرایندهای گوناگون بیوتکنولوژی است که سبب می شود آنزیم راحت تر از محصول جدا شود و در نتیجه آلودگی محصول به آنزیم کاهش پیدا کند (Sheldon, 2007; Tosa et al., 1966). نانوساختارها به دلیل سطح مقطع زیاد یکی از بسترهای مناسب جهت تثبیت معرفی شده است (Cipolatti et al., 2016; Klivanov, 2001). مطالعات Xie و همکاران نشان داده است که مساحت سطح MOFهای معمولی از ۱۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰ مترمربع بر گرم است که می تواند از سطح مواد متخلخل معمولی مانند زئولیت ها و کربن ها بیشتر باشد. منافذ MOF ها به دلیل ساختار کریستالی خود بسیار منظم هستند (Xie et al., 2019). تصاویر SEM مطالعات ما نیز نشان دهنده ی منافذ همگن در Zn-MOF است (Farhadi et al., 2021). همچنین مطالعات Bilal و همکاران نشان داده سطح بیشتر MOF ها بازده بارگذاری بالاتری از مولکول های آنزیم را ارائه می دهد (Bilal et al., 2019).

از آنجا که با پیشرفت در روش‌های بالینی و تکنیک‌های تشخیصی، واکنش‌های بر پایه‌ی احیا مورد توجه قرار گرفته‌اند، پراکسیدازها نقش‌های مهمی در تشخیص‌های کلینیکی ایفا می‌کنند. با توجه به کاربردهای زیاد پراکسیدازها، در این پژوهش پراکسیداز/لیپیدیوم در *LDP* بر روی ساختارهای نانویی آلی-فلزی روی با استفاده از گلوئارآلدئید به‌عنوان عامل پیونددهنده، تثبیت شد و ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی و پایداری آن مورد مطالعه قرار گرفت.

از مزایای اصلی تثبیت کوالانسی محکم بودن این اتصال است و همچنین آنزیم تثبیت شده پایداری لازم را در شرایط متفاوت دارد (Sakai-Kato *et al.*, 2004). استفاده از اتصال‌دهنده در این روش با ایجاد فضا نه تنها احتمال دنا توره شدن را کاهش می‌دهد بلکه باعث افزایش امکان تحرک آنزیم-سوبسترا می‌شود (Cano *et al.*, 2006). فعالیت آنزیم متصل شده با روش کوالان به شکل، اندازه و مواد تشکیل‌دهنده‌ی بستر و همچنین شرایط اعمال شده در حین اتصال آنزیم به بستر نیز بستگی دارد (Chakraborty *et al.*, 2016). تثبیت از طریق تغییر شیمیایی احتمالی، بر فعالیت آنزیم اثر می‌گذارد به‌ویژه زمانی که محل اتصال نزدیک جایگاه فعال آنزیم باشد به همین دلیل مقدار عامل پیونددهنده بهینه می‌شود (Chang, 1971). تأثیر زمان در فرایند تثبیت آنزیم از عوامل مهم دیگر است که توسط بسیاری از محققین گزارش شده و این مقدار بر اساس بستر انتخابی از یک ساعت تا ۲۴ ساعت متفاوت است (Hirsh *et al.*, 2010, Silva *et al.*, 2012, Dong *et al.*, 2014). Sahin و همکاران، زمان بهینه تثبیت کوالان تریپسین بر روی نانوذرات مغناطیسی پوشیده شده با پلی وینیل را یک ساعت در نظر گرفتند (Sahin & Ozmen, 2020).

در این مطالعه، به‌منظور افزایش کارایی تثبیت برخی از پارامترها از جمله غلظت Zn-MOF، غلظت گلوئارآلدئید و زمان برهمکنش نانوساختارها، آنزیم و گلوئارآلدئید بهینه شدند. طبق نتایج، مقدار ۰/۰۲ گرم Zn-MOF، با غلظت ۱/۲ دسی مولار گلوئارآلدئید و به مدت ۳ ساعت انکوبه کردن در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد شرایط بهینه‌ی برای تثبیت در نظر گرفته شد که برای مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گرفت. در این شرایط میزان بارگذاری آنزیم ۵۷mg/g و بازدهی تثبیت ۶۷/۳ درصد محاسبه شد. اگر چه در حضور گلوئار آلدئید، احتمال اتصال آنزیم‌ها به یکدیگر وجود دارد ولی به دلیل حضور MOF و غلظت بالای آن (تقریباً ۲۵ برابر غلظت آنزیم)، احتمال اتصال آنزیم به بستر و در نتیجه تثبیت آنزیم بر روی MOF زیاد است. از طرف دیگر انتظار می‌رود در صورت اتصال تعداد محدودی از آنزیم‌ها به هم با شستشوهای متوالی بعد از فرایند تثبیت و حذف محصول رویی، تنها نمونه‌های تثبیت شده باقی بمانند. نکته قابل توجه اینکه، تثبیت این آنزیم از طریق اتصال فیزیکی با بارگذاری ۱۰۹/۹mg/g و بازدهی تثبیت ۹۳/۳ درصد انجام شد (Farhadi *et al.*, 2021). تثبیت آنزیم هیدرولاز با این اتصال‌دهنده با بارگذاری ۸۷mg/g انجام شده است (Cao *et al.*, 2016a) و بازدهی تثبیت آنزیم HRP با این اتصال‌دهنده ۸۳٪ گزارش شده است (Altikatoglu Yapaoz & Attar, 2020). در تثبیت کوالانسی احتمال ممانعت فضایی و همچنین تغییر در ساختار آنزیم وجود دارد (Zucca & Sanjust, 2014).

بر اساس نتایج مطالعات فیزیکی شیمیایی مشخص شد که تثبیت آنزیم LDP، بر دمای بهینه و pH بهینه آنزیم تأثیر ندارد. نتایج نشان داد که تمایل آنزیم پس از تثبیت نسبت به آنزیم آزاد به سوبسترا TMB و H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> تغییر کرده است و به ترتیب افزایش و کاهش یافته است. تغییر در پارامترهای سینتیکی یک آنزیم بعد از تثبیت توسط سایر محققین نیز گزارش شده است. Chang و همکاران گزارش کردند که پس از تثبیت HRP بر روی core-shell های مغناطیسی ساخته شده از نانوذرات اکسید آهن، با استفاده از گلوئارآلدئید، K<sub>m</sub> آنزیم افزایش یافته که دلیل آن را ایجاد ممانعت فضایی توسط بستر دانسته‌اند (Chae *et al.*, 1998). همچنین Cao

و همکاران، آنزیم اپوکسید هیدرولاز سویا (Soybean epoxide hydrolase) را بر روی UiO-66-NH<sub>2</sub> MOF با ۱/۳ دسی مولار گلوآرالدهید تثبیت کردند و گزارش کرده‌اند که تمایل آنزیم به سوبسترا بعد از تثبیت افزایش یافته است که دلیل آن را تغییر در ساختار سوم آنزیم دانسته‌اند (Cao *et al.*, 2016a).

چنین به نظر می‌رسد که افزایش تمایل آنزیم تثبیت‌شده به TMB ممکن است به یکی از دلایل زیر باشد: تغییر ساختار آنزیم پس از تثبیت باعث شود سوبسترا به صورت بهتری با جایگاه فعال آنزیم واکنش دهد (Danson & Hough, 1998) و یا این که چون Zn-MOF سطح مقطع زیادی دارد، در نتیجه دسترسی سوبسترا به آنزیم را بهبود می‌بخشد (Klibanov, 2001). همچنین کاهش تمایل آنزیم به H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> می‌تواند به دلیل تغییر ساختار آنزیم بعد از تثبیت باشد (Cao *et al.*, 2016, Xia *et al.*, 2017, Farhadi *et al.*, 2021).

از آنجا که تثبیت آنزیم بر روی بستر از هر سمتی می‌تواند صورت گیرد، فعالیت ویژه‌ی آنزیم تثبیت‌شده می‌تواند نسبت به آنزیم آزاد تغییر کند (Rodrigues *et al.*, 2013). همان‌گونه که در نتایج نشان داده شد، فعالیت ویژه‌ی آنزیم تثبیت‌شده حدود ۲ برابر نسبت به آنزیم آزاد افزایش یافته است؛ که با نتایج به‌دست‌آمده از تثبیت فیزیکی این آنزیم روی Zn-MOF مطابقت دارد (Farhadi *et al.*, 2021). همچنین Nadar & Rathod شاهد افزایش فعالیت آنزیم لپاز پس از تثبیت آن بر روی ساختارهای آلی-فلزی زئولیت بودند (Nadar & Rathod, 2020). تثبیت آنزیم‌ها بر روی بسترها می‌تواند تأثیرات مثبت و با منفی بر روی فعالیت آنزیم داشته باشد که این تغییرات در خواص آنزیم‌ها با شدت‌های متفاوت می‌تواند همراه با تغییر در ساختمان آنزیم باشد (Rodrigues *et al.*, 2013).

علاوه بر مطالعات خصوصیات فیزیکوشیمیایی و سینتیکی آنزیم، پایداری آنزیم تثبیت‌شده با استفاده از گلوآرالدهید در برابر حرارت و pH نیز بررسی شد. نتایج حاکی از آن است فعالیت باقی‌مانده‌ی آنزیم تثبیت‌شده با گلوآرالدهید در دماهای بالاتر از ۲۵ درجه سانتی‌گراد کمتر از آنزیم آزاد است. همچنین پایداری آنزیم در pH های اسیدی نسبت به آنزیم آزاد کمتر ولی در pH های بازی بیشتر از آنزیم آزاد است. تثبیت فیزیکی این آنزیم بر روی نانوساختار روی سبب افزایش پایداری آنزیم تثبیت‌شده نسبت به آنزیم آزاد در برابر pH های بازی و پایداری ساختاری آن در برابر حرارت شده بود (Farhadi *et al.*, 2021). بعضی از مطالعات نشان‌دهنده‌ی این هستند که استفاده از مواد احیاکننده جهت تثبیت پروتئین‌ها باعث افزایش پایداری آن‌ها نمی‌شود (Fernandez-Lafuente *et al.*, 1995). Cao با تثبیت Soybean epoxide hydrolase بر روی UiO-66-NH<sub>2</sub> MOF با استفاده از گلوآرالدهید گزارش کرده‌اند که پایداری حرارتی آنزیم تثبیت‌شده در بازه‌ی دمایی ۲۰ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد بیشتر از آنزیم آزاد بوده و همچنین پایداری در تغییرات pH آنزیم تثبیت‌شده در بازه ۶ تا ۸ بیشتر از آنزیم آزاد بوده است (Cao *et al.*, 2016a).

گزارش متعددی در مورد استفاده از پراکسیدازهای تثبیت‌شده برای حذف فنل وجود دارد (Tatsumi *et al.*, 1996, Alemzadeh & Nejadi, 2009, Ai *et al.*, 2016, Li *et al.*, 2019, Pantić *et al.*, 2021). به همین منظور، پتانسیل حذف فنل که یک آلودگی خطرناک صنعتی تلقی می‌شود (Michałowicz & Duda, 2007)، برای دو زمان بسیار کوتاه ده‌دقیقه‌ای و سی‌دقیقه‌ای سنجیده شد. بازدهی حذف فنل به ترتیب در این زمان‌ها ۱۵٪ و ۴۳/۶۸٪ بود. قابل ذکر است که LDP تثبیت‌شده به راحتی با سانتریفیوژ شدن، از

محلول واکنش کاملاً جداسازی می‌شد. Bayramoglu و همکاران حداکثر حذف فنل توسط HRP تثبیت شده را ۸۶ درصد در دو ساعت گزارش کردند (Bayramoğlu & Arica, 2008).

به‌طور کلی، تثبیت در بیشتر موارد تغییر جزئی در ساختار آنزیم‌ها ایجاد می‌کند و این ممکن است خصوصیات آنزیم را تغییر دهد (Hanefeld *et al.*, 2009). این موضوع می‌تواند به دلیل برهم‌کنش غیراختصاصی میان بستر و آنزیم و یا همان برهم‌کنش‌هایی باشد باعث تثبیت می‌شوند، (Mateo *et al.*, 2007, Garcia-Galan *et al.*, 2011, Hernandez & Fernandez-Lafuente, 2011). همچنین در بسیاری از مواقع، تثبیت آنزیم موجب تغییراتی در فعالیت آنزیم می‌شود که ممکن است به دلیل تغییر ساختار آنزیم باشد (Rodrigues *et al.*, 2013). در مجموع، اگرچه تثبیت با گلو تار آلدئید نسبت به روش جذب فیزیکی محکمتر می‌باشد ولی در این مطالعه، پایداری آنزیم تثبیت شده در برابر تغییرات pH و دما بهبود نیافت. بنابراین به منظور افزایش پایداری آنزیم تثبیت شده نسبت به تغییرات pH و دما، تثبیت کوالان این آنزیم بر بسترهای دیگر و یا استفاده از لینکرها دیگر پیشنهاد می‌شود.

## منابع

- Ai, J., Zhang, W., Liao, G., Xia, H. and Wang, D. (2016). Immobilization of horseradish peroxidase enzymes on hydrous-titanium and application for phenol removal. *RSC advances* 6(44): 38117-38123.
- Alemzadeh, I. and Nejati, S. (2009). Phenols removal by immobilized horseradish peroxidase. *Journal of Hazardous Materials* 166(2-3): 1082-1086.
- Ali, S. M. U., Nur, O., Willander, M. and Danielsson, B. (2010). A fast and sensitive potentiometric glucose microsensor based on glucose oxidase coated ZnO nanowires grown on a thin silver wire. *Sensors and Actuators B: Chemical* 145(2): 869-874.
- Altikatoglu Yapaoz, M. and Attar, A. (2020). An accomplished procedure of horseradish peroxidase immobilization for removal of acid yellow 11 in aqueous solutions. *Water Science and Technology* 81(12): 2664-2673.
- Ansari, S. A. and Husain, Q. (2012). Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. *Biotechnology advances* 30(3): 512-523.
- Barragán, L. P., Buenrostro-Figueroa, J., González, C. A. and Marañón, I. (2016). Production, Stabilization, and Uses of Enzymes From Fruit and Vegetable Byproducts. *Biotransformation of Agricultural Waste and By-Products*, Elsevier: 271-286.
- Bayramoğlu, G. and Arica, M. Y. (2008). Enzymatic removal of phenol and p-chlorophenol in enzyme reactor: horseradish peroxidase immobilized on magnetic beads. *Journal of hazardous materials* 156(1-3): 148-155.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72(1-2): 248-254.
- Bilal, M., Adeel, M., Rasheed, T., L, H.M.N. (2019) Multifunctional metal-organic frameworks-based biocatalytic platforms: recent developments and future prospects. *Journal of Materials Research and Technology* 8(2): 2359-2371.
- Cano, À., Minguillón, C. and Palet, C. (2006). Immobilization of endo-1, 4- $\beta$ -xylanase on polysulfone acrylate membranes: Synthesis and characterization. *Journal of membrane science* 383:(2-1)280.
- Cao, S.-L., Yue, D.-M., Li, X.-H., Smith, T. J., Li, N., Zong, M.-H., Wu, H., Ma, Y.-Z. and Lou, W.-Y. (2016a). Novel nano-/micro-biocatalyst: soybean epoxide hydrolase immobilized on UiO-66-NH<sub>2</sub> MOF for efficient biosynthesis of enantiopure (R)-1, 2-octanediol in deep eutectic solvents. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 4(6): 3586-3595.

- Cao, S., Xu, P., Ma, Y., Yao, X., Yao, Y., Zong, M., Li, X. and Lou, W. (2016). Recent advances in immobilized enzymes on nanocarriers. *Chinese Journal of Catalysis* 37(11): 1814-1823.
- Chae, H. J., In, M.-J. and Kim, E. Y. (1998). Optimization of protease immobilization by covalent binding using glutaraldehyde. *Applied biochemistry and biotechnology* 73(2-3): 195-204.
- Chakraborty, S., Rusli, H., Nath, A., Sikder, J., Bhattacharjee, C., Curcio, S. and Drioli, E. (2016). Immobilized biocatalytic process development and potential application in membrane separation: a review. *Critical reviews in biotechnology* 36(1): 43-58.
- Chang, T. (1971). Stabilization of enzyme by microencapsulation with a concentrated protein solution or by crosslinking with glutaraldehyde. *Biochem Biophys Res Com* 44(6): 1531-1533.
- Cipolatti, E. P., Valerio, A., Henriques, R. O., Moritz, D. E., Ninow, J. L., Freire, D. M., Manoel, E. A., Fernandez-Lafuente, R. and de Oliveira, D. (2016). Nanomaterials for biocatalyst immobilization—state of the art and future trends. *RSC Advances* 6(106): 104675-104692.
- Danson, M. J. and Hough, D. W. (1998). Structure, function and stability of enzymes from the Archaea. *Trends in microbiology* 6(8): 307-314.
- Dhruvaraj, M. (2017). Role of peroxidase in clinical assays: A short review. *Journal of Clinical Nutrition* 3(2): 14.
- Dong, L., Ge, C., Qin, P., Chen, Y. and Xu, Q. (2014). Immobilization and catalytic properties of candida lipolytic lipase on surface of organic intercalated and modified MgAl-LDHs. *Solid State Sciences* 31: 8-15.
- Farhadi, S., Riahi-Madvar, A., Sargazi, G. and Mortazavi, M. (2021). Immobilization of *Lepidium draba* peroxidase on a novel Zn-MOF nanostructure. *International Journal of Biological Macromolecules* 173: 366-378.
- Fattahian, Y., Riahi-Madvar, A., Mirzaee, R., Asadikaram, G. and Rahbar, M. R. (2017). In silico locating the immune-reactive segments of *Lepidium draba* peroxidase and designing a less immune-reactive enzyme derivative. *Computational biology and chemistry* 70: 21-30.
- Fattahian, Y., Riahi-Madvar, A., Mirzaee, R., Torkzadeh-Mahani, M. and Asadikaram, G. (2017). Heterologous expression, purification and characterization of a peroxidase isolated from *Lepidium draba*. *The protein journal* 36(6): 461-471.
- Fernandez-Lafuente, R., Rosell, C., Rodriguez, V. and Guisan, J. (1995). Strategies for enzyme stabilization by intramolecular crosslinking with bifunctional reagents. *Enzyme and microbial technology* 17(6): 517-523.
- Garcia-Galan, C., Berenguer-Murcia, Á., Fernandez-Lafuente, R. and Rodrigues, R. C. (2011). Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. *Advanced Synthesis & Catalysis* 3532904-2885:(16).
- Getman, R. B., Bae, Y.-S., Wilmer, C. E. and Snurr, R. Q. (2012). Review and analysis of molecular simulations of methane, hydrogen, and acetylene storage in metal-organic frameworks. *Chemical reviews* 112(2): 703-723.
- Hanefeld, U., Gardossi, L. and Magner, E. (2009). Understanding enzyme immobilisation. *Chemical Society Reviews* 38(2): 453-468.
- Hassanzadeh, J., Khataee, A. and Eskandari, H. (2018). Encapsulated cholesterol oxidase in metal-organic framework and biomimetic Ag nanocluster decorated MoS<sub>2</sub> nanosheets for sensitive detection of cholesterol. *Sensors and Actuators B: Chemical* 259: 402-410.
- Hernandez, K. and Fernandez-Lafuente, R. (2011). Control of protein immobilization: Coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance. *Enzyme and microbial technology* 48(2): 107-122.
- Hirsh, S., Bilek, M., Nosworthy, N., Kondyurin, A., Dos Remedios, C. and McKenzie, D. (2010). A comparison of covalent immobilization and physical adsorption of a cellulase enzyme mixture. *Langmuir* 26(17): 14380-14388.
- Kinsley, C. and Nicell, J. A. (2000). Treatment of aqueous phenol with soybean peroxidase in the presence of polyethylene glycol. *Bioresource Technology* 73(2): 139-146.

- Klibanov, A. M. (2001). Improving enzymes by using them in organic solvents. *nature* 409(6817): 241.
- Krainer, F. W., Pletzenauer, R., Rossetti, L., Herwig, C., Glieder, A. and Spadiut, O. (2014). Purification and basic biochemical characterization of 19 recombinant plant peroxidase isoenzymes produced in *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification* 95: 104-112.
- Li, J., Chen, X., Xu, D. and Pan, K. (2019). Immobilization of horseradish peroxidase on electrospun magnetic nanofibers for phenol removal. *Ecotoxicology and environmental safety* 170: 716-721.
- Magnan, E., Catarino, I., Paolucci-Jeanjean, D., Preziosi-Belloy, L. and Belleville, M.-P. (2004). Immobilization of lipase on a ceramic membrane: activity and stability. *Journal of Membrane Science* 241(1): 161-166.
- Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M. and Fernandez-Lafuente, R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and microbial technology* 40(6): 1451-1463.
- Michałowicz, J. and Duda, W. (2007). Phenols--Sources and Toxicity. *Polish Journal of Environmental Studies* 16(3).
- Mohamad, N. R., Marzuki, N. H. C., Buang, N. A., Huyop, F. and Wahab, R. A. (2015). An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 29(2): 205-220.
- Mohamed, S. A., Al-Harbi, M. H., Almulaiky, Y. Q., Ibrahim, I. H. and El-Shishtawy, R. M. (2017). Immobilization of horseradish peroxidase on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles. *Electronic Journal of Biotechnology* 27: 84-90.
- Nadar, S. S. and Rathod, V. K. (2020). Immobilization of proline activated lipase within metal organic framework (MOF). *International journal of biological macromolecules* 152: 1108-1112.
- NOUROUZIAN, D. (2003) Enzyme immobilization: the state of art in biotechnology.
- Pantić, N., Prodanović, R., Đurđić, K. I., Polović, N., Spasojević, M. and Prodanović, O. (2021). Optimization of phenol removal with horseradish peroxidase encapsulated within tyramine-alginate micro-beads. *Environmental Technology & Innovation* 21: 101211.
- Radzicka, A. and Wolfenden, R. (1995). A proficient enzyme. *Science* 267(5194): 90-93.
- Rodrigues, R. C., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Torres, R. and Fernández-Lafuente, R. (2013). Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chemical Society Reviews* 42(15): 6290-6307.
- Sahin, S. and Ozmen, I. (2020). Covalent immobilization of trypsin on polyvinyl alcohol-coated magnetic nanoparticles activated with glutaraldehyde. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 184: 113195.
- Sakai-Kato, K., Kato, M., Ishihara, K. and Toyo'oka, T. (2004). An enzyme-immobilization method for integration of biofunctions on a microchip using a water-soluble amphiphilic phospholipid polymer having a reacting group. *Lab on a Chip* 4(1): 4-6.
- Sanz, V., De Marcos, S., Castillo, J. R. and Galbán, J. (2005). Application of molecular absorption properties of horseradish peroxidase for self-indicating enzymatic interactions and analytical methods. *Journal of the American Chemical Society* 127(3): 1038-1048.
- Sargazi, G., Afzali, D., Ebrahimi, A. K., Badoei-Dalfard, A., Malekabadi, S. and Karami, Z. (2018). Ultrasound assisted reverse micelle efficient synthesis of new Ta-MOF@ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> core/shell nanostructures as a novel candidate for lipase immobilization. *Materials Science and Engineering: C* 93: 768-775.
- Sheldon, R. A. (2007). Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. *Advanced Synthesis & Catalysis* 349(8-9): 1289-1307.
- Silva, J., Macedo, G., Rodrigues, D., Giordano, R. and Gonçalves, L. (2012). Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. *Biochemical Engineering Journal* 60: 16-24.
- Stephens, J. E., Bondarenko, A. S., Bech, L. and Chorkendorff, I. (2012). Oxygen Electroreduction Activity and X-Ray Photoelectron Spectroscopy of Platinum and Early Transition Metal Alloys. *ChemCatChem* 4(3): 341-349.



- Tatsumi, K., Wada, S. and Ichikawa, H. (1996). (Removal of chlorophenols from wastewater by immobilized horseradish peroxidase. *Biotechnology and Bioengineering* 51(1): 126-130.
- Tischer, W. and Wedekind, F. (1999). *Immobilized enzymes: methods and applications. Biocatalysis-from discovery to application*, Springer: 95-126.
- Tosa, T., Mori, T., Fuse, N. and Chibata, I. (1966). Studies on continuous enzyme reactions. I. Screening of carriers for preparation of water-insoluble aminoacylase. *Enzymologia* 31(4): 214.
- Tukel, S. S. and Alptekin, O. (2004). Immobilization and kinetics of catalase onto magnesium silicate. *Process Biochemistry* 39(12): 2149-2155.
- Xia, G. H., Cao, S. L., Xu, P., Li, X. H., Zhou, J., Zong, M. H. and Lou, W. Y. (2017). Preparation of a nanobiocatalyst by efficiently immobilizing *Aspergillus niger* lipase onto magnetic metal-biomolecule frameworks (BioMOF). *ChemCatChem* 9(10): 1794-1800.
- Xie, Y., Chen, C., Ren, X., Wang, X., Wang, H., Wang, X. (2019) Emerging natural and tailored materials for uranium-contaminated water treatment and environmental remediation. *Progress in Materials Science* 103: 180-234.
- Yujun, S., Konggang, Q., Chao, Z., Jinsong, R. and Xiaogang, Q. (2010). Graphene oxide: intrinsic peroxidase catalytic activity and its application to glucose detection. *Adv. Mater.* 22: 2206-2210.
- Zhang, Y.-W., Tiwari, M. K., Jeya, M. and Lee, J.-K. (2011). Covalent immobilization of recombinant *Rhizobium etli* CFN42 xylitol dehydrogenase onto modified silica nanoparticles. *Applied microbiology and biotechnology* 90(2): 499-507.
- Zhou, H. (2012). J. r. long, OM yaghi. *Chem. Rev* 112: 673.
- Zhou, H. (2014). C.; Kitagawa, S. Metal-Organic Frameworks (MOFs). *Chem. Soc. Rev* 43: 5415-5418.
- Zhou, Q. Z. and Chen, X. D. (2001). Immobilization of  $\beta$ -galactosidase on graphite surface by glutaraldehyde. *Journal of food engineering* 48(1): 69-74.
- Zucca, P. and Sanjust, E. (2014). Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: methods and mechanisms. *Molecules* 19(9): 14139-14194.

## Covalent Immobilization of *Lepidium draba* peroxidase recombinant on zinc metal-organic framework using glutaraldehyde

S. Farhadi<sup>1</sup>, A. Riahi-Madvar<sup>2\*</sup>, M. Mortazavi<sup>3</sup>, G. Sargazi<sup>4</sup>

Received: 2021.11.1

Accepted: 2022.5.9

### Abstract

**Introduction:** *Lepidium draba* peroxidase (LDP) belonging to the class III plant peroxidases that its amino acid sequence shows over 90% similarity with horseradish peroxidase (HRP).

**Methods:** In this study, after expression and purification of LDP, its immobilization conditions were optimized on the Zinc metal-organic framework (Zn-MOF) using glutaraldehyde as a cross-linking agent for firm binding. Then physicochemical properties, kinetic parameters and stability of the immobilized enzyme were compared with the free one.

**Results and discussion:** The best conditions for enzyme immobilization with 67% yield were optimized at concentration of 0.02 g of Zn-MOF, 0.75mg/ml and 1.2 dM of glutaraldehyde, after 3h incubation. The results showed that the specific activity of the immobilized enzyme increased more than doubled that of free enzyme and its  $K_m$  was reduced by 49% compared to the free one for TMB substrate. Also its kinetic stability reduced against pH and temperature in compared to the free enzyme.

**Keywords:** Kinetics, Optimization, Specific Activity, Stability

---

1 MSc Graduate, Department of Biotechnology, Institute of Science and High technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran.

2 Associate Professor, Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Sciences, Kosar University of Bojnord, Bojnord, Iran (\*corresponding author: [riahi.ali@gmail.com](mailto:riahi.ali@gmail.com))

3 Assistance Professor, Department of Biotechnology, Institute of Science and High technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran.

4. Assistance Professor, Noncommunicable Diseases Research Center, Bam University of Medical Sciences, Bam, Iran