REVIEW ARTICLE

A Review of Enzyme Immobilization Methods and Critical Parameters for Evaluating Immobilized Enzymes

Mehdi Aghaee[1],
Mehdi Mogharabi-Manzari[2]

[1] Pharmacy Student, Student Research Commitee, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Assistant Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received November 9, 2025; Accepted February 8, 2026)

Abstract

Enzymes, natural biocatalysts with high catalytic efficiency, are essential in numerous biological and industrial processes. However, their inherent instability and sensitivity to environmental conditions often limit their direct application. To overcome these drawbacks, various immobilization techniques have been developed to enhance enzyme stability, reusability, and operational performance. This review discusses the main immobilization strategies, including physical adsorption, covalent bonding, entrapment, and cross-linked enzyme aggregates (CLEAs), highlighting the advantages and limitations of each approach. Physical adsorption is simple and cost-effective but suffers from weak binding, whereas covalent attachment provides strong and stable enzyme support interactions under harsh conditions. Entrapment and encapsulation methods offer a protective microenvironment that helps maintain enzymatic activity, whereas CLEAs present a carrier-free system with improved stability and catalytic efficiency. In addition, several analytical and instrumental techniques are reviewed for the structural and functional characterization of immobilized enzymes, enabling the assessment of conformational changes, surface morphology, and thermal or chemical stability. In evaluating the efficiency of enzyme immobilization, several key parameters are employed to determine how the process affects enzymatic properties and overall catalytic performance. Likewise, thermal and pH stability tests assess the enzyme's resistance to denaturation under extreme temperature or pH conditions, demonstrating how immobilization enhances structural rigidity and tolerance to environmental stresses. The kinetic parameters, namely the Michaelis–Menten constant (Km) and the maximum reaction velocity (Vmax), provide quantitative insight into changes in substrate affinity and catalytic turnover after immobilization. Overall, this review emphasizes that the rational selection of immobilization methods and support materials can significantly improve enzyme performance and durability, facilitating the development of robust and efficient biocatalysts for industrial and environmental applications.

Keywords: enzyme immobilization, immobilization techniques, enzyme activity, enzyme stability

J Mazandaran Univ Med Sci 2026; 35 (254): 136-151 (Persian).

Corresponding Author: Mehdi Mogharabi-Manzari - Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. (E-mail: m.mogharabi@mazums.ac.ir)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-23]

مـــروری

مجلـــه دانشـــگاه عـــلـــوم پـــزشـــکـــی مـــازنـــدران
دوره سی و پنجم شماره ۲۵۴ اسفند سال ۱۴۰۴ (۱۵۱-۱۳۶)

مروری بر روش های تثبیت آنزیم و پارامترهای اساسی در ارزیابی آنزیم تثبیت شده

مهدی آقایی[۱]

مهدی مقربی منظری[۲]

چکیده

آنزیم‌ها به عنوان بیوکاتالیست‌های طبیعی، نقش بسیار مهمی در فرآیندهای گوناگون زیستی و صنعتی ایفا می‌کنند. با این حال، ناپایداری ذاتی و حساسیت بالا نسبت به شرایط محیطی، اغلب کاربرد مستقیم آن‌ها را محدود می‌کند. برای غلبه بر این کاستی‌ها، روش‌های مختلفی برای تثبیت آنزیم‌ها توسعه یافته‌اند تا پایداری، قابلیت استفاده مجدد و عملکرد عملیاتی آن‌ها بهبود یابد. این مقاله مروری به بررسی راهبردهای اصلی تثبیت آنزیم شامل جذب فیزیکی، اتصال کووالانسی، به دام‌اندازی و تجمع‌های آنزیمی متقاطع می‌پردازد و مزایا و محدودیت‌های هر روش را مورد بحث قرار می‌دهد. جذب فیزیکی روشی ساده و مقرون‌به‌صرفه است، اما از ضعف در قدرت پیوند بین آنزیم و پایه رنج می‌برد. در مقابل، اتصال کووالانسی پیوندی قوی و پایدار میان آنزیم و حامل ایجاد می‌کند که حتی در شرایط سخت عملیاتی نیز حفظ می‌شود. روش‌های به دام‌اندازی و کپسوله‌سازی محیطی محافظ برای آنزیم فراهم می‌کنند که به حفظ فعالیت زیستی آن کمک می‌کند، در حالی که سیستم‌های متقاطع بدون نیاز به حامل، پایداری و کارایی کاتالیستی بالاتری نشان می‌دهند. در ارزیابی کارایی فرآیند تثبیت آنزیم، پارامترهای کلیدی متعددی به‌کار گرفته می‌شوند تا تأثیر تثبیت بر ویژگی‌های آنزیمی و عملکرد کاتالیستی کلی مشخص شود. آزمون‌های پایداری حرارتی و پایداری در برابر pH میزان مقاومت آنزیم در برابر تغییر ساختار یا دناتوراسیون را در شرایط شدید دما و pH ارزیابی می‌کنند و نشان می‌دهند که تثبیت چگونه بر سختی ساختاری و تحمل آنزیم نسبت به تنش تأثیر می‌گذارد. پارامترهای سینتیکی، شامل ثابت مایکل - منتن و حداکثر سرعت واکنش، دیدگاه کمی دقیقی از تغییرات میل ترکیبی آنزیم به بستر و بازده کاتالیزوری پس از تثبیت ارائه می‌دهند. در مجموع، این مرور نشان می‌دهد که انتخاب منطقی روش‌های تثبیت و مواد نگهدارنده می‌تواند به‌طور چشمگیری عملکرد و دوام آنزیم‌ها را بهبود بخشد و مسیر را برای توسعه بیوکاتالیست‌های کارآمد در کاربردهای صنعتی و زیست‌محیطی هموار سازد.

واژه های کلیدی: تثبیت آنزیم، تکنیک های تثبیت آنزیم، فعالیت آنزیم، پایداری آنزیم

مولف مسئول: مهدی مقربی–ساری: مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران **E-mail:**m.mogharabi@mazums.ac.ir

۱. دانشجوی داروسازی، کمیته تحقیقات و فناوری دانشجویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. استادیار، بیوتکنولوژی دارویی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری ایران

تاریخ دریافت : ۱۴۰۴/۸/۱۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۴۰۴/۴/۲۴ تاریخ تصویب : ۱۴۰۴/۱۱/۱۹

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-23]

مقدمه

آنزیم‌ها کاتالیزورهای بیولوژیکی هستند که توسط سلول‌های زنده تولید می‌شوند و واکنش‌های بیوشیمیایی خاص را با راندمان و گزینش پذیری بالا تسهیل می‌کنند. آن‌ها در شرایط ملایم عمل می‌کنند و در کاربردهای پزشکی و صنعتی متنوعی دارند(۱). با این حال، استفاده عملی از آن‌ها می‌تواند با چالش‌هایی مانند ناپایداری در شرایط صنعتی، غیر فعال شدن در حضور حلال های آلی، هزینه‌های بالا و دشواری بازیابی محدود شود. لذا، برای غلبه بر این موانع، تکنیک‌های پایدارسازی آنزیم توسعه یافته‌اند. پایدارسازی آنزیم به روش‌ها و استراتژی‌هایی اشاره دارد که با هدف حفظ یا افزایش فعالیت عملکردی، پایداری و طول عمر عملیاتی آنزیم‌ها در شرایطی که معمولاً باعث غیرفعال شدن یا دناتوراسیون می‌شوند انجام می‌شود(۲). در کاربردهای عملی، آنزیم‌ها اغلب در معرض محیط‌های سختی مانند دمای بالا، pH شدید، حلال‌های آلی یا عوامل پروتئولیتیک قرار می‌گیرند که می‌تواند منجر به از دست دادن فعالیت شود. تکنیک‌های پایدارسازی آنزیم به دنبال مقابله با این اثرات هستند و آنزیم‌ها را قادر می‌سازند تا کارایی کاتالیزوری خود را در دوره‌های متعدد، تحت شرایط عملیاتی متنوع و در فرآیندهای صنعتی حفظ کنند(۳). یک رویکرد کلیدی برای پایدارسازی آنزیم، تثبیت است که شامل اتصال آنزیم‌ها به پایه‌های جامد یا به دام انداختن آن ها در ماتریس‌ها می‌شود. این اتصال فیزیکی یا شیمیایی می‌تواند تغییرات ساختاری آنزیم را محدود کند، از باز شدن آن جلوگیری کند و فرآیندهایی مانند اتولیز، تجمع یا تخریب پروتئولیتیک را مهار کند. به عنوان مثال، اتصال کووالانسی چند نقطه‌ای به پایه‌ها می‌تواند استحکام ساختار آنزیم را افزایش دهد و آن را در برابر متلاشی شدن ناشی از گرما یا عوامل دناتوره کننده مقاوم‌تر کند. علاوه بر این، تثبیت می‌تواند آنزیم‌ها را از حمله میکروبی و آنزیم‌های پروتئولیتیک محافظت کند و طول عمر عملکردی آن ها را بیش‌تر افزایش دهد(۴). انتخاب روش تثبیت مانند اتصال کووالانسی، جذب، کپسوله کردن یا پیوند عرضی مستقیماً بر میزان تثبیت حاصل تأثیر می‌گذارد. به عنوان مثال، پیوند عرضی شیمیایی یا اتصال به پلیمرهای محلول در آب می‌تواند مقاومت در برابر غیرفعال شدن حرارتی، اثرات حلال‌های آلی یا آسیب اکسیداتیو را افزایش دهد. انتخاب استراتژیک تکنیک تثبیت و مواد پایه مانند پلیمرهای طبیعی مانند کیتوزان، پلیمرهای مصنوعی یا ذرات مغناطیسی معدنی می‌تواند ویژگی های سنتیکی آنزیم را تنظیم کند، پایداری حرارتی و شیمیایی را بهبود بخشد و طول عمر عملیاتی را افزایش دهد و در نتیجه فرآیندهای بیوکاتالیستی را از نظر اقتصادی مقرون به صرفه‌تر و از نظر زیست‌محیطی پایدارتر کند(۵). هدف اصلی این مقاله بررسی راهبردهای مختلف تثبیت آنزیم با تمرکز بر تأثیر نوع روش تثبیت و ماهیت پایه بر پایداری ساختاری، فعالیت کاتالیزوری و طول عمر عملیاتی آنزیم‌ها است. در این راستا، مزایا و محدودیت‌های روش‌های متداول تثبیت، از جمله جذب فیزیکی، اتصال کووالانسی، کپسوله‌سازی و پیوند عرضی، به‌صورت نظام‌مند تحلیل شده و نقش مواد پایه مختلف، به‌ویژه پلیمرهای طبیعی، پلیمرهای مصنوعی و حامل‌های معدنی، در بهبود عملکرد آنزیم‌ها مورد بررسی قرار گرفته است. افزون بر این، مهم‌ترین پارامترها و روش‌های مورد استفاده در شناسایی و ارزیابی آنزیم‌های تثبیت شده، با هدف مقایسه کارایی و پایداری آن‌ها، بررسی و تحلیل شده است(۶).

روش های تثبیت آنزیم

جذب فیزیکی

جذب فیزیکی ساده‌ترین و قدیمی‌ترین روش تثبیت آنزیم است که بر اساس برهم‌کنش‌های غیرکووالانسی بین آنزیم و سطح حامل صورت می‌گیرد. این برهم‌کنش‌ها شامل نیروهای واندروالس، پیوندهای هیدروفوبیک،

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-23]

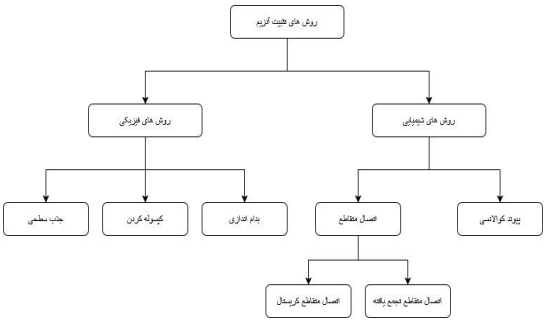
پیوندهای هیدروژنی و تعاملات الکترواستاتیکی می‌شوند. در این روش، آنزیم به صورت مستقیم روی سطح حامل قرار می‌گیرد و هیچ تغییر شیمیایی دائمی در ساختار پروتئین ایجاد نمی‌شود، بنابراین ساختار کانفورماسیونی و جایگاه فعال آن به طور نسبی حفظ می‌شود(۷). حامل‌های مورد استفاده برای جذب فیزیکی می‌توانند شامل مواد معدنی مانند سیلیکا و آلومینا، پلیمرهای طبیعی یا مصنوعی مانند سلولز، کیتوزان و رزین‌های پلیمری، و حتی نانوذرات باشند. انتخاب حامل بر اساس خصوصیات آنزیم، شامل بار سطحی، قطبیت و سایز مولکولی، و نیز شرایط عملیاتی فرآیند انجام می‌شود. از مهم‌ترین مزایای روش جذب فیزیکی می توان به سادگی روش، هزینه پایین، انجام فرآیند در دمای محیط و شرایط ملایم و همچنین عدم نیاز به تجهیزات یا واکنش‌های شیمیایی پیچیده اشاره کرد. علاوه بر این، آنزیم تثبیت شده با این روش معمولاً فعالیت کاتالیتیکی خود را حفظ می‌کند و می‌تواند در برخی کاربردها برای چند چرخه محدود مورد استفاده قرار گیرد(۸). با این حال، جذب فیزیکی دارای محدودیت‌هایی است. اتصال آنزیم به حامل معمولاً ضعیف است و تغییرات pH، شستشو یا حضور حلال‌های آلی می‌تواند موجب جدا شدن آنزیم شود. همچنین، در حامل‌های متخلخل، محدودیت انتقال جرم می‌تواند دسترسی سوبسترا به جایگاه فعال را کاهش دهد و سرعت واکنش را محدود سازد. لذا، جذب فیزیکی یک روش تثبیت ملایم و کارآمد برای آنزیم‌ها محسوب می‌شود که برای مطالعات آزمایشگاهی، بیوراکتورهای جریان پیوسته و کاربردهای صنعتی با نیاز به تثبیت سریع و غیر دائمی مناسب است. درحالی که، برای کاربردهای بلند مدت که نیاز به پایداری بالا و قابلیت استفاده مجدد طولانی دارند معمولاً نیازمند استفاده از روش‌های تثبیت شیمیایی یا ترکیبی از روش‌ها می باشد(۹).

کپسوله کردن و به دام انداختن

به دام انداختن و کپسوله کردن دو روش رایج تثبیت آنزیم هستند که در هر دو روش آنزیم در یک محیط محافظت شده قرار می گیرد، اما از نظر ساختاری و مکانیزم حفاظت تفاوت‌های قابل توجهی دارند (تصویر شماره ۱). در روش به دام انداختن، آنزیم در داخل شبکه‌ای از ماتریس پلیمری یا هیدروژل محصور می‌شود بدون این که تماس مستقیم یا پیوند کووالانسی با سطح حامل داشته باشد. این شبکه اجازه می‌دهد سوبسترا و محصول از منافذ ماتریس عبور کنند در حالی که مولکول‌های آنزیم به دام افتاده و از محیط آزاد جدا می‌شوند(۱۰). مزیت اصلی این روش، محافظت نسبی از ساختار کانفورماسیونی آنزیم و حفظ فعالیت کاتالیتیکی به ویژه برای آنزیم‌های حساس به شرایط محیطی می باشد. با این حال، محدودیت انتقال جرم از طریق ماتریس می‌تواند سرعت واکنش را کاهش دهد، که یکی از چالش‌های اصلی این تکنیک به شمار می‌رود. در مقابل، روش کپسوله کردن شامل محصور کردن آنزیم در داخل یک غشاء یا حفره کاملاً بسته است به گونه‌ای که تماس آنزیم با محیط اطراف تقریباً قطع می‌شود(۱۱). عبور سوبسترا و محصول معمولاً از طریق غشاء یا منافذ کنترل شده صورت می‌گیرد و بنابراین حفاظت از آنزیم در برابر تغییرات pH، دما و حضور حلال‌های آلی بسیار بیش‌تر است. این روش اگر چه برای کاربردهای دارویی، بیوتکنولوژیکی و صنعتی که نیاز به پایداری بالای آنزیم دارند بسیار مناسب است، اما معمولاً پیچیده‌تر و پرهزینه‌تر از روش به دام انداختن است و نیاز به کنترل دقیق ساختار غشاء یا ماتریس دارد. مقایسه این دو روش نشان می‌دهد که به دام انداختن برای آنزیم‌هایی که حساسیت متوسط دارند و نیاز به یک تثبیت ساده و سریع دارند مناسب است و کپسوله کردن برای آنزیم‌های بسیار حساس یا شرایط عملیاتی شدید که نیازمند محافظت کامل هستند ارجحیت دارد(۱۲). از منظر انتقال جرم، به دام انداختن محدودیت بیش‌تری ایجاد می‌کند چون در مقایسه با کپسوله کردن کنترل کم‌تری بر اندازه منافذ و عبور سوبسترا و محصول دارد. بنابراین می‌توان دریافت که اگر چه هر دو روش

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-23]

نقش مهمی در تثبیت آنزیم‌ها ایفا می‌کنند، انتخاب مناسب بین آن‌ها بستگی به عوامل متعددی نظیر نوع آنزیم، کاربرد صنعتی و شرایط محیطی عملیاتی دارد به طوری که تعادل بین حفاظت آنزیم، قابلیت استفاده مجدد و بازده واکنش حفظ شود.



تصویر شماره ۱: طبقه بندی روش های مختلف تثبیت آنزیم

اتصال کووالانسی

اتصال کووالانسی یکی از مهم‌ترین و پایدارترین روش‌های تثبیت آنزیم است که در آن مولکول‌های آنزیم به صورت شیمیایی و از طریق پیوند کووالانسی به حامل یا ماتریس متصل می‌شوند. در این روش، گروه‌های عاملی فعال روی سطح آنزیم، مانند آمین، تیول، اتر، کربوکسیل و هیدروکسیل با گروه‌های واکنشی موجود روی حامل واکنش داده و پیوند پایدار ایجاد می‌کنند. این پیوند قوی باعث می‌شود که آنزیم در طول چرخه‌های متعدد واکنش، تغییرات دما، تغییرات pH یا حضور حلال‌های آلی، از سطح حامل جدا نشود و فعالیت بیوکاتالیستی خود را حفظ کند(۱۳). این روش از آنزیم در برابر دناتوراسیون و تغییر شکل کانفورماسیونی محافظت می‌کند و اجازه می‌دهد که آنزیم برای مدت طولانی در فرآیندهای صنعتی مورد استفاده قرار گیرد. همچنین اتصال کووالانسی معمولاً باعث افزایش قابلیت استفاده مجدد آنزیم نسبت به روش های فیزیکی می‌شود که از نظر اقتصادی و عملیاتی اهمیت زیادی دارد(۱۴). با این حال، محدودیت اصلی این روش این است که پیوند کووالانسی می‌تواند بر جایگاه فعال آنزیم اثر بگذارد یا انعطاف‌پذیری پروتئین را محدود کند و در نتیجه ممکن است فعالیت اولیه آنزیم را کاهش دهد. برای کاهش این اثر منفی، طراحی حامل، انتخاب گروه‌های واکنش دهنده مناسب و کنترل شرایط واکنش (مانند pH، دما و غلظت عوامل پیوند دهنده) ضروری است(۱۵). روش اتصال کووالانسی در صنایع مختلف بسیار کاربرد دارد، به ویژه در بیوراکتورهای جریان پیوسته، واکنش‌های چند مرحله‌ای و کاربردهای صنعتی با شرایط محیطی شدید. آنزیم‌هایی مانند پروتئاز، لیپاز، سلولاز و آمیلاز معمولاً با این روش روی حامل‌های اپوکسیدی، آلدهیدی، پلی‌استری یا نانوحامل‌ها تثبیت می‌شوند. استفاده از این روش علاوه بر افزایش پایداری، نیاز به آنزیم تازه در چرخه های متعدد را کم‌تر کرده و موجب کاهش هزینه‌های عملیاتی می گردد(۱۶).

تجمعات آنزیمی با پیوند متقاطع

این روش یک متد پیشرفته و محبوب برای تثبیت آنزیم‌ها است که هم پایداری و هم قابلیت استفاده مجدد را بدون نیاز به حامل خارجی افزایش می‌دهد. در این روش، مولکول‌های آنزیم ابتدا رسوب کرده و تجمع می‌کنند تا یک ساختار متراکم ایجاد شود و سپس با استفاده از یک عامل پیوند دهنده عرضی (مانند گلوترآلدئید) بین گروه‌های عاملی پروتئین پیوندهای کووالانسی ایجاد می‌شود و یک شبکه پایدار و جامد از آنزیم‌ها تشکیل می شود که فعالیت کاتالیتیکی خود را حفظ کرده است(۱۷). مزیت اصلی این روش در این است که پایداری حرارتی و شیمیایی آنزیم به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. اتصال متقاطع بین مولکول‌ها از دناتوراسیون و از بین رفتن کانفورماسیون فعال جلوگیری می‌کند و آنزیم می‌تواند در چرخه‌های متعدد واکنش و شرایط محیطی شدید (مانند دما و pH نامطلوب یا حضور حلال‌های آلی) فعالیت خود را حفظ کند. علاوه بر این، نیاز به حامل خارجی را حذف می‌کند و بنابراین

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-23]

هزینه‌های مواد اولیه و مشکلات ناشی از محدودیت‌های انتقال جرم کاهش می‌یابد. با این حال، این روش نیز محدودیت‌هایی دارد. ایجاد تجمعات متراکم ممکن است دسترسی سوبسترا به جایگاه فعال آنزیم را محدود کند و در نتیجه V_{max} یا کارایی کاتالیتیکی در مقایسه با آنزیم آزاد کاهش یابد(۱۸).

پارامترهای مهم در شناسایی ویژگی های آنزیم تثبیت شده

فعالیت آنزیم

فعالیت مطلق آنزیم شاخصی کمی است که بیانگر نرخ واقعی تبدیل سوبسترا به محصول تحت شرایط مشخص و کنترل شده می‌باشد و معمولاً به‌صورت واحد آنزیمی گزارش می‌شود. یک واحد آنزیم به‌طور متداول به‌عنوان مقدار آنزیمی تعریف می‌شود که قادر است در یک دقیقه، یک میکرومول از زیرلایه را به محصول تبدیل کند، البته این تعریف بسته به ماهیت آنزیم و روش سنجش می‌تواند اندکی متفاوت باشد(۱۹). اندازه‌گیری فعالیت مطلق، فارغ از آن که آنزیم در حالت آزاد باشد یا تثبیت شده، با استفاده از آزمون‌های استانداردی که در آن شرایط pH، دما، غلظت بافر، نوع و غلظت زیرلایه، و مدت زمان واکنش ثابت نگه داشته می‌شوند، انجام می‌گیرد. روش‌های مختلفی برای تعیین فعالیت مطلق به‌کار می‌رود که بسته به ویژگی واکنش و محصول، شامل اسپکتروفتومتری (بررسی تغییر جذب نوری محصول یا مصرف سوبسترا)، کروماتوگرافی، هدایت سنجی، یا روش‌های کالریمتری می‌باشد(۲۰). برای گزارش فعالیت مطلق، معمولاً آن را بر حسب واحد بر میلی‌لیتر محلول آنزیمی، واحد بر میلی گرم پروتئین کل، یا واحد بر میلی گرم پروتئین تثبیت شده بیان می کنند. انتخاب مبنا به هدف مطالعه و امکان مقایسه نتایج بستگی دارد، اما رعایت یکنواختی مبنا در تمام محاسبات ضروری است(۲۱). سنجش دقیق فعالیت مطلق، پایه‌ای برای محاسبه و تفسیر سایر شاخص‌های مهم در ارزیابی سامانه‌های آنزیمی تثبیت‌شده مانند فعالیت نسبی، بازده تثبیت و کارایی تثبیت محسوب می‌شود. در فرآیند تثبیت، هرگونه تغییر در فعالیت مطلق می‌تواند بازتابی از تغییرات ساختاری در جایگاه فعال، ممانعت فضایی ناشی از حامل، یا محدودیت‌های دسترسی سوبسترا باشد(۲۲). بنابراین، بررسی فعالیت مطلق قبل و بعد از تثبیت، نخستین گام در ارزیابی کیفیت روش تثبیت و انتخاب شرایط بهینه است و معمولاً با ارائه داده‌های کمی و مقایسه مستقیم بین دو حالت آزاد و تثبیت شده همراه می‌گردد. فرمول کلی محاسبه فعالیت مطلق و فعالیت ویژه بر اساس تعریف واحد آنزیمی به شکل معادله شماره ۱و معادله شماره ۲ بیان می‌شود.

معادله شماره ۱

$$Unit_{abs} = \frac{\Delta C}{\Delta t}$$

معادله شماره ۲

$$Unit_{specific} = \frac{U_{abs}}{mg_{protein}}$$

در معادلات بالا، ΔC تغییرات غلظت محصول و یا سوبسترا بر حسب میکرومول بر گرم بوده و Δt زمان واکنش بر حسب دقیقه می باشد و در نهایت فعالیت ویژه از تقسیم فعالیت مطلق بر مقدار پروتئین بدست می آید.

در صورتی که برای اندازه گیری فعالیت از روش‌های رنگ سنجی استفاده شود، فرمول محاسبه فعالیت مطلق بصورت معادله شماره ۳ خواهد بود.

معادله شماره ۳

$$Unit_{abs} = \frac{\Delta A/\Delta t}{\varepsilon \times l} \times V_{total} \times ۱۰^{۶}$$

در معادله شماره ۳، $\Delta A/\Delta t$ شیب تغییر جذب نوری در واحد زمان، ε ضریب جذب مولی ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$) برای محصول یا سوبسترا، l طول مسیر نوری کووت (cm)، V حجم کل واکنش(L) و در نهایت ضریب تبدیل مول به میکرومول می باشد.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-23]

فعالیت نسبی، فعالیت آنزیم را به‌صورت درصدی نسبت به یک شرایط مرجع که معمولاً دما یا pH بهینه در نظر گرفته می‌شود و به‌عنوان ۱۰۰ درصد تعریف می‌گردد نشان می‌دهد. این روش به‌ویژه در بررسی اثر عوامل محیطی مانند pH، دما، حلال‌های آلی یا فرآیند تثبیت آنزیم کاربرد دارد. برای مثال، ممکن است یک آنزیم تثبیت شده در شرایط بهینه فعالیت مطلق کم‌تری نسبت به نوع آزاد خود نشان دهد، اما در دماهای بالاتر یا شرایط غیر بهینه بخش قابل توجهی از فعالیت خود را حفظ کند. چنین نتایجی نشان دهنده افزایش پایداری و مقاومت آنزیم پس از تثبیت است. در نتیجه، فعالیت مطلق دید روشنی از ظرفیت واقعی کاتالیتیکی آنزیم ارائه می‌دهد، در حالی که فعالیت نسبی امکان مقایسه معنی‌دار عملکرد آنزیم در شرایط مختلف را فراهم می‌سازد(۲۳). از این رو، گزارش هر دو شاخص برای تحلیل جامع رفتار آنزیم‌ها، به‌ویژه در مطالعات مرتبط با تثبیت و کاربردهای زیست فناورانه، ضروری است. استانداردسازی فعالیت آنزیم برای حصول نتایج قابل اعتماد و قابل‌مقایسه ضروری است، زیرا فعالیت اندازه‌گیری شده به‌شدت به شرایط آزمایش مانند pH، دما، غلظت سوبسترا و روش سنجش وابسته است. تعریف واحد فعالیت تحت شرایط مشخص و یکسان امکان مقایسه دقیق بین آنزیم‌های آزاد و تثبیت‌شده، نمونه‌های مختلف و مطالعات مستقل را فراهم می‌کند و از تفسیر نادرست تغییرات فعالیت جلوگیری می‌نماید. این رویکرد پایه‌ای برای گزارش‌پذیری علمی و ارزیابی واقعی کارایی سامانه‌های بیوکاتالیستی محسوب می‌شود.

بازده و کارایی تثبیت

در پژوهش‌های مرتبط با آنزیم‌های تثبیت شده، ارزیابی عملکرد سیستم‌های بیوکاتالیتیکی نیازمند شاخص‌های کمی است که توان، پایداری و کارایی آنزیم پس از تثبیت را مشخص کنند. پنج پارامتر کلیدی در این زمینه شامل بازده تثبیت آنزیم، کارایی تثبیت، بازده فعالیت، بازده تثبیت پروتئینی و بارگذاری آنزیم روی حامل می باشند. هر یک از این شاخص‌ها جنبه متفاوتی از عملکرد سیستم تثبیت شده را توضیح می دهند و استفاده همزمان از آن‌ها به درک جامع‌تری از فرایند تثبیت و کیفیت نهایی آنزیم می‌انجامد(۲۴). بازده تثبیت آنزیم معیاری است که نشان می‌دهد چه مقدار از آنزیم مصرف شده در طول فرایند تثبیت روی حامل باقی مانده و به فعالیت خود ادامه داده است. این پارامتر معمولاً با نسبت فعالیت آنزیم تثبیت شده به فعالیت کل آنزیم مصرف شده بیان می‌شود و واحد آن درصد است. بازده تثبیت بالا نشان دهنده موفقیت فرایند تثبیت و جذب مؤثر آنزیم است، در حالی که بازده پایین می‌تواند ناشی از عدم اتصال کامل آنزیم یا از دست رفتن آن در طول فرآیند باشد. کارایی تثبیت تمرکز خود را بر حفظ فعالیت کاتالیتیکی آنزیم پس از تثبیت می‌گذارد و با نسبت فعالیت آنزیم تثبیت شده به فعالیت همان مقدار آنزیم آزاد قبل از تثبیت محاسبه می‌شود. این شاخص اطلاعات ارزشمندی در مورد اثرات فیزیکی یا شیمیایی روش تثبیت بر ساختار و عملکرد سایت فعال آنزیم فراهم می‌کند. کارایی تثبیت بالا بیانگر حفظ تقریباً کامل توان کاتالیتیکی آنزیم و سازگاری مناسب آن با حامل انتخاب شده است، در حالی که کاهش کارایی می‌تواند ناشی از تغییرات ساختاری آنزیم، اختلال در دسترسی سوبسترا یا اثرات نامطلوب محیط تثبیت باشد. بازده فعالیت یا بازیابی فعالیت به عنوان شاخصی ترکیبی از بازده تثبیت و کارایی تثبیت، درصد فعالیت آنزیم تثبیت شده را نسبت به فعالیت کل آنزیم مصرف شده یا آنزیم آزاد اولیه مشخص می‌کند. این پارامتر برای ارزیابی قابلیت عملیاتی آنزیم در شرایط صنعتی و تحقیقاتی و مقایسه روش‌های مختلف تثبیت کاربرد دارد و بیانگر توان واقعی سیستم تثبیت شده در انجام واکنش‌های کاتالیتیکی است(۲۵). بازده تثبیت پروتئینی بیانگر نسبت جرم پروتئین یا آنزیم متصل شده به حامل به کل

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-23]

پروتئین مصرف شده است. این شاخص به ارزیابی موفقیت فیزیکی یا شیمیایی اتصال آنزیم به حامل کمک می‌کند و نشان می‌دهد چه درصدی از پروتئین مصرف شده پس از تثبیت باقی مانده است، بدون آن که فعالیت واقعی آنزیم در نظر گرفته شود. بازده تثبیت پروتئینی بالا نشان دهنده جذب موفقیت‌آمیز آنزیم یا پروتئین است، اما برای تعیین عملکرد واقعی سیستم باید همراه با کارایی تثبیت و بازده فعالیت بررسی شود. بارگذاری آنزیم روی حامل معیاری است که میزان آنزیم یا پروتئین متصل شده به هر واحد جرم حامل را نشان می‌دهد(۲۶). این شاخص برای تعیین ظرفیت حامل، بهینه‌سازی نسبت آنزیم به حامل و طراحی سیستم‌های بیوکاتالیتیکی با بیش‌ترین بهره‌وری عملیاتی اهمیت دارد. بارگذاری آنزیم بالا به معنای استفاده بهینه از حامل و افزایش تراکم آنزیم در واحد حجم است، اما باید با حفظ فعالیت آنزیم همراه باشد تا از کاهش کارایی جلوگیری شود. در مجموع، این پنج پارامتر با یکدیگر مکمل هستند بازده تثبیت و بازده پروتئینی میزان اتصال آنزیم یا پروتئین به حامل را نشان می‌دهند، کارایی تثبیت و بازده فعالیت حفظ عملکرد واقعی آنزیم پس از تثبیت را مشخص می‌کنند و بارگذاری آنزیم ظرفیت حامل و چگالی آنزیم در سیستم را ارزیابی می‌کند(۲۷). تحلیل همزمان این پارامترها امکان مقایسه روش‌ها، انتخاب حامل مناسب، بهینه‌سازی شرایط تثبیت و طراحی سیستم‌های آنزیمی با عملکرد و پایداری بالا را فراهم می‌آورد و اطلاعات کاربردی و کمی ارزشمندی برای پژوهش‌های صنعتی و تحقیقاتی ارائه می‌دهد (معادله ۶-۴).

معادله شماره ۴

$$\text{بازده تثبیت (\%)} = \frac{\text{فعالیت آنزیم تثبیت شده}}{\text{فعالیت کل آنزیم مصرف شده}} \times ۱۰۰$$

معادله شماره ۵

$$\text{بازده فعالیت (\%)} = \frac{\text{فعالیت آنزیم تثبیت شده}}{\text{فعالیت همان مقدار آنزیم آزاد}} \times ۱۰۰$$

معادله شماره ۶

$$\text{کارایی تثبیت (\%)} = \frac{\text{بازده فعالیت}}{\text{بازده تثبیت}} \times ۱۰۰$$

معادله شماره ۷

$$\text{بازده تثبیت پروتئین (\%)} = \frac{\text{مقدار پروتئین تثبیت شده}}{\text{مقدار کل پروتئین مصرف شده}} \times ۱۰۰$$

معادله شماره ۸

$$\text{بارگذاری آنزیم} = \frac{\text{مقدار پروتئین تثبیت شده}}{\text{وزن حامل}}$$

گزینش پذیری (Selectivity)

در فرایند تثبیت آنزیم که طی آن آنزیم به یک حامل فیزیکی یا شیمیایی متصل می‌شود، علاوه بر افزایش پایداری و امکان استفاده مجدد، می‌تواند تأثیر قابل توجهی بر سلکتیویته آن داشته باشد. سلکتیویته توانایی آنزیم برای انتخاب یک مسیر واکنشی یا سوبسترا خاص در حضور چند گزینه رقابتی را نشان می‌دهد و برای کاربردهای صنعتی که تولید محصول ویژه هدف است، اهمیت بالایی دارد(۲۸). یکی از مهم‌ترین اثرات تثبیت، تغییر در ساختار سه‌بعدی و انعطاف‌پذیری سایت فعال آنزیم است. اتصال آنزیم به حامل می‌تواند موجب محدود شدن حرکات دینامیک بخش‌های فعال شود و دسترسی برخی سوبستراها به سایت فعال را تسهیل یا محدود نماید. به همین دلیل، آنزیم ممکن است ترجیح خود برای یک سوبسترا را افزایش یا کاهش دهد. علاوه بر تغییرات ساختاری، محیط میکرو اطراف سایت فعال نیز تحت تأثیر تثبیت قرار می‌گیرد. حامل‌ها می‌توانند قطبیت و اثرات یونی محیط اطراف سایت فعال را تغییر دهند(۲۹). این تغییرات میکرو محیطی می‌توانند سرعت واکنش سوبستراهای مختلف را متفاوت کنند و به دنبال آن سلکتیویته آنزیم را افزایش یا کاهش دهند. از سوی دیگر، دسترسی

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-23]

فیزیکی سوبستراها به آنزیم تثبیت شده ممکن است محدود شود. در سیستم‌های ماتریسی یا حامل‌های متخلخل، سوبستراهایی که اندازه یا شکل مناسب ندارند ممکن است نتوانند به سایت فعال برسند، در حالی که سوبستراهای مناسب‌تر به راحتی کاتالیز می‌شوند. این پدیده نیز می‌تواند موجب تغییر سلکتیویته شود (۳۰). در عمل، تثبیت آنزیم ممکن است اثرات متنوعی بر سلکتیویته داشته باشد. در برخی موارد، سلکتیویته کاهش می‌یابد و آنزیم توانایی انتخاب محصول مورد نظر را کم‌تر حفظ می‌کند؛ در برخی موارد، سلکتیویته تغییری نمی‌کند و در مواردی دیگر، تثبیت می‌تواند سلکتیویته را بهبود دهد و آنزیم را برای یک سوبسترا یا مسیر خاص ترجیح‌دارتر سازد. بنابراین، اندازه‌گیری سلکتیویته پس از تثبیت برای اطمینان از عملکرد مطلوب آنزیم ضروری است و می‌تواند راهنمایی برای انتخاب روش تثبیت و نوع حامل مناسب ارائه دهد(۳۱). مقدار درصد ee معمولاً از طریق جداسازی انانتیومرها R و S به‌وسیله کروماتوگرافی با فاز ساکن کایرال، نظیر HPLC یا GC کایرال، محاسبه می‌شود، به‌طوری‌که پس از تفکیک کامل انانتیومرها مساحت پیک‌های مربوط به هر یک ثبت شده و مقدار درصد ee بر اساس نسبت اختلاف و مجموع مساحت پیک‌ها تعیین می‌گردد. رژیوسلکتیویتی واکنش نیز از طریق تعیین نسبت ایزومرهای ساختاری حاصل، معمولاً با استفاده از HPLC یا GC غیرکایرال، محاسبه می‌شود که در آن نسبت مساحت پیک‌های مربوط به هر رژیوایزومر به‌عنوان شاخص رژیوسلکتیویتی گزارش می‌گردد (معادله شماره ۹).

معادله شماره ۹

$$ee\% = \frac{|R-S|}{R+S} \times ۱۰۰$$

پایداری دمایی (Thermal Stability)

پایداری حرارتی آنزیم‌ها از دیدگاه کاربردی اهمیت بالایی دارد، زیرا بسیاری از فرآیندهای صنعتی در شرایط دمایی بالا انجام می‌شوند. یکی از شاخص‌های مهم برای سنجش پایداری حرارتی پروتئین‌ها، از جمله آنزیم‌ها، دمای ذوب (Tm) است(۳۲). دمای ذوب به عنوان دمایی تعریف می‌شود که در آن نیمی از مولکول‌های پروتئین ساختار طبیعی خود را از دست داده و دناتوره می‌شوند، در حالی که نیم دیگر همچنان در حالت طبیعی باقی می‌مانند. در واقع، این دما بیانگر نقطه تعادل میان پروتئین‌های سالم و دناتوره است و هر چه مقدار آن بالاتر باشد، نشان‌دهنده پایداری بیش‌تر پروتئین در برابر حرارت است(۳۳). اندازه‌گیری دمای ذوب پروتئین معمولاً با روش‌های متنوعی انجام می‌شود. کالریمتری روبشی تفاضلی دقیق‌ترین تکنیک برای تعیین این مقدار است. همچنین روش‌های دایکروئیسم دایره‌ای برای بررسی تغییرات ساختار دوم، فلورسانس ذاتی پروتئین‌ها برای ردیابی تغییر محیط اطراف باقی مانده‌های آروماتیک، و نیز فلوریمتری روبشی تفاضلی با استفاده از رنگ‌های حساس به هیدروفوبیسیته، به‌طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرند. از منظر کاربردی، تثبیت آنزیم‌ها نقش مهمی در افزایش دمای ذوب و به تبع آن پایداری حرارتی دارد. در فرآیند تثبیت، آنزیم به یک بستر جامد یا ماتریس متصل می‌شود و این اتصال باعث محدود شدن انعطاف‌پذیری بیش از حد زنجیره‌های پروتئینی و در نتیجه کاهش احتمال دناتوراسیون حرارتی می‌شود. به همین دلیل، آنزیم‌های تثبیت‌شده معمولاً دمای ذوب بالاتری نسبت به فرم آزاد خود نشان می‌دهند و این موضوع به طور مستقیم با افزایش نیمه‌عمر حرارتی آن‌ها در دماهای بالا مرتبط است(۳۴).

پایداری در برابر تغییرات pH (pH Stability)

پایداری آنزیم‌ها به شدت تحت تأثیر شرایط محیطی، به‌ویژه pH قرار دارد. هر آنزیم دارای یک بازه‌ی

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-23]

بهینه‌ی pH است که در آن ساختار سه‌بعدی فعال خود را حفظ کرده و بیش‌ترین فعالیت کاتالیتیکی را نشان می‌دهد. تغییرات شدید pH از این محدوده، منجر به پروتون‌دهی یا دپروتون‌دهی گروه‌های عاملی حساس در باقی‌مانده‌های آمینواسیدی می‌شود که این تغییرات می‌تواند بر پیوندهای هیدروژنی، برهم‌کنش‌های الکترواستاتیکی و حتی پیوندهای یونی دخیل در پایداری ساختار سوم پروتئین اثر بگذارد. در نتیجه، آنزیم دچار تغییرات کانفورماسیونی می‌شود که اغلب به کاهش فعالیت یا دناتوراسیون غیرقابل بازگشت منجر می‌گردد(۳۵). در این زمینه، تثبیت آنزیم‌ها روشی مؤثر برای افزایش مقاومت آن‌ها در برابر تغییرات pH محسوب می‌شود. در فرآیند تثبیت، اتصال آنزیم به یک بستر جامد یا محصور شدن آن در یک ماتریس، به حفظ ساختار سه‌بعدی کمک کرده و از بازشدن آسان زنجیره‌های پروتئینی در شرایط غیر بهینه جلوگیری می‌کند. این اثر محافظتی معمولاً به دلیل ایجاد یک میکرو محیط پایدار در اطراف آنزیم است. حامل‌های متخلخل یا نانوذرات، محیطی محلی با بار سطحی و قطبیت مشخص فراهم می‌کنند که تغییرات سریع pH محیط بیرونی را تا حدی تعدیل می‌نماید(۳۶). به عنوان مثال، یک ماتریس پلیمری می‌تواند نوسانات یون‌های H^+ یا OH^- را کاهش داده و از دسترسی مستقیم آن‌ها به بخش‌های حساس آنزیم جلوگیری کند(۳۷). علاوه بر این، پیوندهای کووالانسی ایجاد شده میان آنزیم و سطح حامل، موجب محدود شدن حرکت‌های ساختاری و کاهش حساسیت باقی‌مانده‌های باردار در برابر تغییرات یونش می‌شوند. در نتیجه، آنزیم تثبیت شده معمولاً دارای بازه‌ی فعالیت وسیع‌تری از نظر pH است و حتی در شرایط اسیدی یا بازی شدید، فعالیت بیش‌تری نسبت به فرم آزاد خود نشان می‌دهد(۳۸). این ویژگی به‌ویژه در فرآیندهای صنعتی که تغییرات pH اجتناب‌ناپذیر است، مزیتی بزرگ محسوب می‌شود. به طور کلی، تثبیت آنزیم‌ها با ایجاد پیوندهای پایدار، تأمین یک محیط محافظ و تعدیل نوسانات شیمیایی محیط، می‌تواند نقش مؤثری در بهبود پایداری آنزیم در برابر تغییرات pH ایفا کند و کارایی بیوکاتالیست‌ها را در کاربردهای عملی افزایش دهد.

پایداری در برابر حلال های شیمیایی

فعالیت آنزیم‌ها علاوه بر دما و pH، تحت تأثیر حضور حلال‌های شیمیایی نیز قرار می‌گیرد. بسیاری از آنزیم‌ها در محیط‌های آبی تکامل یافته‌اند و ساختار فعال آن‌ها وابسته به حضور یک لایه آب هیدراتاسیون است که اطراف سطح پروتئین را احاطه می‌کند. پروتئین‌ها برای حفظ ساختار طبیعی و عملکرد کاتالیتیکی خود نیازمند حضور لایه‌هایی از آب هستند که اطراف سطح مولکول پروتئین قرار می‌گیرند. این آب‌ها که به نام آب باند یا آب هیدراتاسیون شناخته می‌شوند، به واسطه‌ی پیوندهای هیدروژنی یا برهم‌کنش‌های الکترواستاتیکی به گروه‌های قطبی و باردار پروتئین متصل هستند(۳۹). وجود این لایه آبی باعث تثبیت ساختار سوم پروتئین شده و مانع از تغییرات شدید کانفورماسیونی می‌گردد. به بیان دیگر، آب باند همانند یک «چسب مولکولی» عمل می‌کند که ارتباط میان بخش‌های مختلف پروتئین را حفظ کرده و انعطاف‌پذیری کنترل شده‌ای به آن می‌دهد. از دیدگاه عملکردی، آب باند نقش مستقیمی در فعالیت کاتالیتیکی آنزیم‌ها دارد. جایگاه فعال آنزیم‌ها معمولاً حاوی گروه‌های قطبی یا یونی است که برای برقراری برهم‌کنش با سوبسترا نیازمند محیطی هیدراته هستند(۴۰). در غیاب آب باند، این گروه‌ها ممکن است پایداری یا جهت‌گیری مناسب خود را از دست داده و بازده واکنش کاهش یابد. به همین دلیل است که در محیط‌های غیرآبی یا حلال‌های آلی خشک، فعالیت آنزیم‌ها به شدت افت می‌کند، زیرا بخش عمده‌ای از آب باند از دست می‌رود و ساختار پروتئین ناپایدار می‌شود. ورود حلال‌های آلی یا شیمیایی می‌تواند این لایه هیدراتاسیون را مختل کرده و برهم‌کنش‌های

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-23]

ضعیف درون مولکولی نظیر پیوندهای هیدروژنی و برهم‌کنش‌های آب‌گریز را تضعیف کند(۴۱). یکی از شاخص‌های مهم در بررسی اثر حلال‌های آلی بر فعالیت و پایداری آنزیم‌ها، ضریب تقسیم اکتانول/آب (log P) است که معیاری از قطبیت یا آب‌گریزی حلال محسوب می‌شود. حلال‌هایی که log P پایینی دارند، معمولاً قطبی و آب‌دوست هستند و تمایل زیادی به امتزاج با آب نشان می‌دهند(۴۲). این ویژگی سبب می‌شود که این حلال‌ها لایه آب هیدراتاسیون اطراف پروتئین را مختل کرده و برهم‌کنش‌های ضعیف دخیل در پایداری ساختار سوم پروتئین، نظیر پیوندهای هیدروژنی و تعاملات آب‌گریز، را تضعیف کنند. در نتیجه، آنزیم در چنین محیط‌هایی به سرعت ساختار فعال خود را از دست داده و فعالیت کاتالیتیکی کاهش می‌یابد. در مقابل، حلال‌هایی با log P بالا معمولاً غیرقطبی و آب‌گریز هستند و به دلیل امتزاج‌ناپذیری با آب، لایه هیدراتاسیون پروتئین را دست نخورده باقی می‌گذارند. بنابراین، آنزیم‌ها در این دسته از حلال‌ها پایداری و فعالیت بیش‌تری حفظ می‌کنند و حتی می‌توانند در واکنش‌های سنتزی در محیط‌های غیرآبی به کار گرفته شوند(۴۳). در این میان، تثبیت آنزیم‌ها نقشی کلیدی در کاهش اثرات نامطلوب حلال‌های قطبی با log P پایین دارد. اتصال آنزیم به یک بستر جامد یا محصور شدن آن در یک ماتریس پلیمری سبب ایجاد یک ریز محیط پایدار اطراف مولکول پروتئینی می‌شود که از تماس مستقیم حلال با بخش‌های حساس آنزیم جلوگیری کرده و لایه هیدراتاسیون ضروری را حفظ می‌کند(۴۴). علاوه بر این، محدود شدن انعطاف‌پذیری ساختاری پروتئین در اثر تثبیت، مقاومت آن را در برابر دناتوراسیون ناشی از حضور حلال‌های آلی افزایش می‌دهد. در نتیجه، آنزیم تثبیت شده در مقایسه با آنزیم آزاد فعالیت بالاتری را در محیط‌هایی با log P پایین نشان می‌دهد و دامنه‌ی کاربرد آن در فرآیندهای بیوکاتالیز صنعتی گسترده‌تر می‌شود(۴۵).

پایداری طولانی مدت (Storage Stability)

پایداری ذخیره‌سازی یکی از پارامترهای کلیدی در ارزیابی قابلیت کاربردی آنزیم‌ها و بیوکاتالیست‌ها محسوب می‌شود و به توانایی آنزیم برای حفظ فعالیت کاتالیتیکی خود در طول زمان تحت شرایط نگهداری مشخص، از جمله دما، pH، رطوبت و نوع محیط نگهدارنده اشاره دارد. آنزیمی که پس از هفته‌ها یا ماه‌ها نگهداری همچنان بخش قابل توجهی از فعالیت اولیه خود را حفظ کند، از پایداری ذخیره‌سازی بالایی برخوردار است. این ویژگی اهمیت ویژه‌ای در کاربردهای صنعتی و دارویی دارد، زیرا آنزیم‌های با پایداری پایین نیازمند شرایط نگهداری پیچیده و هزینه‌بر هستند و کاهش سریع فعالیت آن‌ها می‌تواند کارایی فرآیند را تحت تأثیر قرار دهد(۴۶). عوامل متعددی بر پایداری ذخیره‌سازی اثرگذارند. ماهیت ذاتی آنزیم، شرایط محیطی نگهداری، حضور پایدارکننده‌ها (مانند گلیسرول، پلی‌اتیلن گلیکول یا نمک‌های خاص) و حالت فیزیکی آنزیم (محلول، خشک‌شده یا لیوفیلیزه) از مهم‌ترین موارد هستند. آنزیم‌های خشک شده معمولاً پایداری بیش‌تری نسبت به فرم محلول دارند، و شرایط دمای پایین و pH بهینه نیز نیمه‌عمر ذخیره‌سازی را افزایش می‌دهند. تثبیت آنزیم‌ها یکی از مؤثرترین روش‌ها برای بهبود پایداری ذخیره‌سازی است. اتصال آنزیم به حامل یا محصور کردن آن در ماتریس‌های پلیمری باعث محدود شدن حرکت‌های ساختاری، ایجاد یک محیط محافظ و جلوگیری از تجمع یا رسوب پروتئین‌ها می‌شود(۴۷).

قابلیت استفاده مجدد (Reusability)

قابلیت استفاده مجدد یکی از پارامترهای حیاتی در ارزیابی کارایی آنزیم‌ها و بیوکاتالیست‌ها در کاربردهای صنعتی محسوب می‌شود. این ویژگی به توانایی آنزیم برای حفظ فعالیت کاتالیتیکی خود در چندین چرخه

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-23]

واکـنش اشـاره دارد و مسـتقیماً بـا بهـره‌وری فرآینـد و صرفه‌جویی اقتصادی مرتبط است. آنزیم‌هایی که قابلیت استفاده مجـدد بـالایی دارنـد، می‌تواننـد چنـدین بـار در واکنش‌ها شرکت کنند و نیاز به جایگزینی مکـرر آن‌هـا کاهش می‌یابد، در حالی که آنزیم‌های آزاد معمولاً پس از یک چرخه فعالیت، بخشی از ساختار و کـارایی خـود را از دست می‌دهند. عوامـل متعـددی، از جملـه ماهیـت ذاتی آنـزیم، شـرایط واکـنش ماننـد دمـا، pH و حضـور حلال‌ها یا سوبستراهای مهارکننده، و نیز روش نگهداری آنزیم بین چرخه‌های واکنش، بر استفاده اثرگذارنـد. در این میان، تثبیت آنزیم‌ها یکی از مؤثرترین روش‌ها برای افزایش قابلیت استفاده مجدد به شمار می‌رود(۴۸).

پارامترهای کینتیکی آنزیم تثبیت شده

پارامترهـای کینتیکـی آنزیم‌هـا، از جملـه حـداکثر سـرعت واکـنش (V_{max})، ثابـت مـایکلیس (K_m)، ثابـت نرخ کاتالیز (k_{cat}) و نسبت کارایی کاتـالیتیکی (k_{cat}/K_m) شـاخص‌های اصـلی بـرای ارزیـابی عملکـرد آنزیم‌هـا و مقایسه بین فرم آزاد و تثبیت شده هستند. تثبیـت آنزیم‌هـا، چـه از طریـق اتصـال کووالانسـی بـه حامل‌هـای جامـد، محصـور کـردن در ماتریس‌هـای پلیمـری یـا اسـتفاده از نانوذرات، تأثیر قابل توجهی بـر ایـن پارامترهـا دارد، زیـرا محـیط میکـرو اطـراف مولکـول و انعطاف‌پـذیری کانفورماسـیونی آن تغییـر می‌کنـد. K_m کـه نشـان‌دهنده تمایل آنزیم به سوبسـترا اسـت، در بسـیاری از آنزیم‌هـای تثبیت شده افزایش می‌یابد(۴۹). این افزایش معمـولاً ناشـی از محدودیت‌های انتقال جرم یا کاهش دسترسـی مسـتقیم سوبسترا به جایگاه فعال است، به ویژه زمانی که آنـزیم در ماتریس‌های متخلخل یا حامل‌های فشـرده محصـور شـده باشد. با این حال، اگر تثبیت کانفورماسیون فعال آنـزیم را حفظ کند، K_m ممکن است تغییر انـدکی داشـته باشـد یـا حتـی کـاهش جزئـی نشـان دهـد، کـه بیـانگر بهبـود انتخاب‌پذیری آنزیم نسبت بـه سوبستراسـت(۵۰). از سـوی دیگر، V_{max} بیـانگر حـداکثر سـرعت واکـنش در شـرایط اشـباع سوبسـترا اسـت. در آنزیم‌هـای تثبیـت شـده، محدودیت انتقال جرم و کـاهش انعطاف‌پـذیری پـروتئین می‌توانـد منجـر بـه کـاهش جزئـی V_{max} شـود، امـا ایـن آنزیم‌ها در شرایط عملیاتی طولانی مدت یـا دماهـای بـالا پایدارتر باقی می‌مانند، زیرا تثبیت از دناتوراسیون و از بـین رفـتن جایگـاه فعـال جلـوگیری می‌کنـد. k_{cat} کـه تعـداد مولکول‌های سوبسترا کاتالیز شـده توسـط یـک مولکـول آنزیم در واحد زمـان را نشـان می‌دهـد، ممکـن اسـت در آنزیم‌های تثبیـت شـده کمـی کـاهش یابـد. ایـن کـاهش معمولاً ناشی از محدودیت انعطاف‌پذیری پروتئین اسـت، اما با افزایش پایـداری حرارتـی و قابلیـت اسـتفاده مجـدد جبران می‌شود(۵۱). به همـین ترتیـب، نسـبت k_{cat}/K_m کـه شاخص کارایی کاتالیتیکی آنزیم است، ممکـن اسـت بـه دلیـل تغییـرات K_m و k_{cat} کمـی کـاهش یابـد، امـا دوام عملیاتی و مقاومت آنزیم در شرایط محیطی مختلف، ایـن کاهش نسبی را جبران می‌کند. علاوه بـر ایـن، آنزیم‌هـای تثبیت شده نسبت به تغییرات دمـا، pH و حضـور حلال‌هـا مقاوم‌تر هسـتند و پارامترهـای کینتیکـی آن‌هـا در شـرایط شدید محیطی کـم‌تـر تغییـر می‌کنـد. ایـن ویژگـی باعـث می‌شود کـه آنـزیم تثبیـت شـده در چرخـه‌های متعـدد یـا شـرایط عملیـاتی متغیـر عملکـرد قابـل اعتمـادی داشـته باشـد(۵۲). بـا وجـود محـدودیت‌هایی ماننـد کـاهش انعطاف‌پذیری و محدودیت انتقال جرم، تثبیت آنزیم‌ها بـا افزایش پایداری، قابلیت استفاده مجـدد و دوام فعالیـت در طول زمان، قابلیت استفاده عملیاتی و اقتصادی آن‌ها را در بیوکاتالیز صنعتی به طور چشمگیری ارتقاء می‌دهد.

بحث

تثبیت آنزیم‌ها به‌عنوان یکی از مؤثرترین رویکردها برای غلبه بر محدودیت‌های ذاتی آن‌هـا، نقشـی کلیـدی در ارتقای پایداری، تکرارپذیری و بازده کاتالیستی ایفـا می‌کند. مقایسه روش‌های مختلف نشان می‌دهد که هیچ شیوه‌ای به‌تنهایی جامع و بی‌نقص نیسـت؛ بلکـه انتخـاب بهینه به نوع آنزیم، ماهیـت تکیـه‌گاه و شـرایط عملیـاتی

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-23]

بستگی دارد. جذب فیزیکی به‌دلیل سادگی و هزینه پایین، برای کاربردهای موقت مناسب است، در حالی که اتصال کووالانسی به‌واسطه پیوندهای قوی‌تر، برای سیستم‌های با نیاز به پایداری طولانی مدت ترجیح داده می‌شود. روش‌های به دام‌اندازی و سیستم‌های متقاطع نیز در حفاظت از ساختار فعال آنزیم و بهبود مقاومت در برابر تغییرات محیطی مؤثرند. افزون بر این، تحلیل دقیق ویژگی‌های سینتیکی و پایداری حرارتی یا شیمیایی، درک عمیق‌تری از رفتار آنزیم تثبیت شده فراهم می‌آورد. در نهایت، تلفیق دانش مواد و بیوتکنولوژی می‌تواند مسیر توسعه بیوکاتالیست‌های نوین، کارآمد و سازگار با محیط زیست را هموار سازد.

سپاسگزاری

مطالعه حاضر مستخرج از طرح شماره ۲۴۶۶۷ کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی مازندران می باشد.

References

1. Victorino da Silva Amatto I, Gonsales da Rosa-Garzon N, Antônio de Oliveira Simões F, Santiago F, Pereira da Silva Leite N, Raspante Martins J, et al. Enzyme engineering and its industrial applications. Biotechnol Appl Biochem 2022; 69(2) 389-409 PMID: 33555054.
2. Robescu MS, Bavaro T. A Comprehensive Guide to Enzyme Immobilization: All You Need to Know. Molecules 2025; 30(4): 939 PMID: 40005249. **Error! Hyperlink reference not valid.**.
3. Ma Y, Tayefi SH, Mogharabi-Manzari M, Luo X. Advances in immobilized enzyme systems for enhanced microplastic biodegradation: A review. Int J Biol Macromol 2025; 328(Pt 2): 147656 PMID: 40946998.
4. Hashempour Y, Mortezazadeh F, Rezaei S, Salehipour M, Gholami-Borujeni F, Ebrahimnejad P, et al. Co-immobilization of laccase and zinc oxide nanoparticles onto bacterial cellulose to achieve synergistic effect of photo and enzymatic catalysis for biodegradation of favipiravir. Int J Macromol 2025; 292: 139288 PMID: 39736296.
5. Nikpour S, Salehipour M, Rezaei S, Mogharabi-Manzari M. Design and fabrication of magnetic cross-linked laccase aggregate using superparamagnetic metal-organic frameworks for phenol removal. Biochem Eng J 2024;209: 109385.
6. Aghaee M, Salehipour M, Rezaei S, Mogharabi-Manzari M. Bioremediation of organic pollutants by laccase-metal–organic framework composites: A review of current knowledge and future perspective. Bioresour Technol 2024; 406: 131072 PMID: 38971387.
7. Khan MR. Immobilized enzymes: a comprehensive review. Bull Natl Res Cent 2021;45(1): 207.
8. Asaduzzaman F, Salmon S. Enzyme immobilization: polymer–solvent–enzyme compatibility. Molecular Systems Design & Engineering 2022; 7(11): 1385-1414.
9. Li JJ, Yin L, Wang ZF, Jing YC, Jiang ZL, Ding Y, et al. enzyme-Immobilized Metal-Organic Frameworks: From Preparation to Application. Chem Asian J 2022;17(21): e202200751 PMID: 36029234.
10. Wang C, Liao K. Recent Advances in Emerging Metal– and Covalent–Organic

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-23]

Frameworks for Enzyme Encapsulation. ACS Appl Mater Interfaces 2021; 13(48): 56752-56776 PMID: 34809426.

11. Bai H, Yu D, Du X. Review of porous microspheres for enzyme immobilization: Strategies, applications, and prospects. Int J Biol Macromol 2025; 295: 139627 PMID: 39788228.
12. Patti S, Magrini Alunno I, Pedroni S, Riva S, Ferrandi EE, Monti D. Advances and Challenges in the Development of Immobilized Enzymes for Batch and Flow Biocatalyzed Processes. ChemSusChem 2025;18(8): e202402007 PMID: 39585729.
13. Maghraby YR, El-Shabasy RM, Ibrahim AH, Azzazy HMES. Enzyme Immobilization Technologies and Industrial Applications.ACS Omega 2023; 8(6): 5184-5196 PMID: 36816672.
14. Xu K, Appiah B, Zhang BW, Yang ZH, Quan C. Recent advances in enzyme immobilization based on nanoflowers. Journal of Catalysis 2023; 418: 31-39.
15. Wu H, Mu W. Application prospects and opportunities of inorganic nanomaterials for enzyme immobilization in the food-processing industry. Curr Opin Food Sci 2022; 47: 100909.
16. Ghasemitabesh R, Merker D, Bröckel JW, Bertinetti D, Zakaria Y, Welle A, etal. Non-covalent and covalent binding of proteins on ultrananocrystalline diamond films with different surface terminations. Diamond and Related Materials 2025; 156 112432.
17. Chen N, Chang B, Shi N, Yan W, Lu F, Liu F. Cross-linked enzyme aggregates immobilization: preparation, characterization, and applications, Crit Rev Biotechnol 2023; 43(3): 369-383 PMID: 35430938.
18. Bouguerra OM, Wahab RA, Huyop F, Al-Fakih AM, Mahmood WMAW, Mahat NA, Sabullah MK. An Overview of Crosslinked Enzyme Aggregates: Concept of Development and Trends of Applications, Appl Biochem. Biotechnol 2024; 196(9): 5711-5739.
19. Rodrigues RC, Ortiz C, Berenguer-Murcia A, Torres R, Fernández-Lafuente R. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. Chem Soc Rev 2013;42: 6290-6307.
20. Mateo c, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. Enzyme Microb Technol 2007; 40(6): \1451-1463.
21. BaruchA, JefferyDA, M. Bogyo, Enzyme activity – it's all about image, Trends Cell Biol2004; 14(1): 29-35.
22. Harris TK, Keshwani MM. Measurement of Enzyme Activity.Methods Enzymol 2009; 463: 57-71PMID: 19892167.
23. De Medeiros EV, Notaro KAD, De Barros JA, Moraes WDS, Moreira KA. Absolute and specific enzymatic activities of sandy entisol from tropical dry forest, monoculture and intercropping areas. Soil Tillage Res 2015; 145: 208-215.
24. Bolivar JM, López-Gallego F. Characterization and evaluation of immobilized enzymes for applications in flow reactors. Curr Opin Green Sustain Chem2020; 25.
25. SheldonRA. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. Adv SynthCatal2007; 349: 1289-1307.
26. Fernandez-LopezL, PedreroSG, Lopez-CarroblesN, GorinesBC, Virgen-OrtízJJ, Fernandez-LafuenteR. Effect of protein load on stability of immobilized enzymes.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-23]

Enzyme Microb Technol2017; 98: 18-25PMID: 28110660.

27. ZhangDH, YuwenLX, PengLJ. Parameters Affecting the Performance of Immobilized Enzyme.J Chem 2013;2013(1): 946248.
28. BolivarJM, Woodley M, Fernandez-LafuenteR. Is enzyme immobilization a mature discipline? Some critical considerations to capitalize on the benefits of immobilization. Chem Soc Rev 2022; 51: 6251-6290.
29. Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R, Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. Enzyme Microb Technol2007; 40(6): 1451-1463.
30. RodriguesRC, OrtizC, Berenguer-MurciaA, Torres R, Fernández-Lafuente R. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. Chem Soc Rev2013; 42 6290-6307.
31. Garcia-Galan C, Berenguer-Murcia A, Fernandez-Lafuente R, Rodrigues RC. Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. Adv SynthCatal 2011; 353: 2885-2904.
32. Dos Santos JCS, BarbosaO, OrtizC, Murcia AB, Rodrigues RC, et al. Importance of the Support Properties for Immobilization or Purification of Enzymes.ChemCatChem 2015;16(7): 2413-2432.
33. Hei DJ, Clark DS. Estimation of melting curves from enzymatic activity–temperature profiles. Biotechnol Bioeng 1993; 42(10): 1245- 1251PMID: 18609674.
34. Santos AMP, Oliveira MG, Maugeri F. Modelling thermal stability and activity of free and immobilized enzymes as a novel tool for enzyme reactor design. Bioresour Technol 2007; 98: 3142-3148.
35. Suplatov D, Panin N, Kirilin E, Shcherbakova T, Kudryavtsev P, ŠvedasV.Computational Design of a pH Stable Enzyme: Understanding Molecular Mechanism of Penicillin Acylase's Adaptation to Alkaline Conditions. PLOS ONE2014; 9(6): e100643PMID: 24959852.
36. FrankenbergerWT, JohansonJB. Effect of pH on enzyme stability in soils. Soil BiolBiochem1982;14(5): 433-437.
37. Iyer PV, AnanthanarayanL. Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment. Process Biochem 2008; 43(10): 1019-1032.
38. Reshmi R, Sanjay G, SugunanS. Enhanced activity and stability of α-amylase immobilized on alumina. Catal Commun 2006; 7(7): 460-465.
39. Doukyu N, Ogino H. Organic solvent-tolerant enzymes. Biochem Eng J 2010; 48 : 270-282.
40. Klibanov AM. Improving enzymes by using them in organic solvents. Nature 2001; 409(6817): 241-246PMID: 11196652.
41. SerdakowskiAL, DordickJS, Enzyme activation for organic solvents made easy. Trends Biotechnol2008;26: 48-54PMID: 18037518.
42. Hirakawa H, Kamiya N, Kawarabayashi Y, Nagamune T. Log *P* effect of organic solvents on a thermophilic alcohol dehydrogenase. Biochim Biophys Acta2005; 1748 : 94-99PMID: 15752697.
43. OginoH, IshikawaH. Enzymes which are stable in the presence of organic solvents. J BiosciBioeng2001;91(2): 109-116.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-23]

44. Ansorge-Schumacher MB, Plikat C. Key technology to non-aqueous and multi-step biocatalysis: Pickering emulsions. Front Catal 2022; 2.
45. WangS, XiongY, Sartin MM, Zhan D. Research Advances in Regulating the Microenviroment of Enzyme Electrodes in Non-aqueous Systems: A Minireview. Electroanalysis 2022; 34(4): 590-598.
46. Zahirinejad S, HemmatiR, Homaei A, Dinari A, HosseinkhaniS, Mohammadi S, etal. Nano-organic supports for enzyme immobilization: Scopes and perspectives, Colloids Surf B Biointerfaces 2021; 204 :111774 PMID: 33932893.
47. Atiroğlu A, Atiroğlu A, ÖzacarM. Immobilization of α-amylase enzyme on a protein @metal–organic framework nanocomposite: A new strategy to develop the reusability and stability of the enzyme. Food Chem 2021; 349: 129127.
48. Pathania S, Jyoti A, Rathour A. Understanding Enzyme Immobilization: Methods, Technologies, and Applications. EnzymeImmobil Nanomater Appl Chall American Chemical Society 2025: 29-50.
49. Rajaraman R. Modeling Immobilized Enzyme Reactions: Nonlinear Kinetics with Fractional- and Integer-Order Analysis. Math Methods Appl Sci 2025; 48(8): 9177-9193.
50. Laidler KJ, Bunting PS. The kinetics of immobilized enzyme systems. Methods Enzymo1980; 64: pp. 227-248 PMID: 6768959.
51. CooneyMJ. Kinetic Measurements for Enzyme Immobilization. Methods in Molecular Biology 2011; 679: 207-225 PMID: 20865399.
52. HD Neira, HerrAE. Kinetic Analysis of Enzymes Immobilized in Porous Film Arrays. Anal Chem 2017; 89(19): 10311-10320 PMID: 28858525.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-23]