

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

Mehdi Aghae¹,
Mehdi Mogharabi-Manzari²

¹ Pharmacy Student, Student Research Committee, 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 (K_m) and the maximum reaction velocity (V_{max}), 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)

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

مهدی آقایی^۱

مهدی مقربی منظری^۲

چکیده

آنزیم ها به عنوان بیوکاتالیست های طبیعی، نقش بسیار مهمی در فرآیندهای گوناگون زیستی و صنعتی ایفا می کنند. با این حال، ناپایداری ذاتی و حساسیت بالا نسبت به شرایط محیطی، اغلب کاربرد مستقیم آن ها را محدود می کند. برای غلبه بر این کاستی ها، روش های مختلفی برای تثبیت آنزیم ها توسعه یافته اند تا پایداری، قابلیت استفاده مجدد و عملکرد عملیاتی آن ها بهبود یابد. این مقاله مروری به بررسی راهبردهای اصلی تثبیت آنزیم شامل جذب فیزیکی، اتصال کووالانسی، به دام اندازی و تجمع های آنزیمی متقاطع می پردازد و مزایا و محدودیت های هر روش را مورد بحث قرار می دهد. جذب فیزیکی روشی ساده و مقرون به صرفه است، اما از ضعف در قدرت پیوند بین آنزیم و پایه رنج می برد. در مقابل، اتصال کووالانسی پیوندی قوی و پایدار میان آنزیم و حامل ایجاد می کند که حتی در شرایط سخت عملیاتی نیز حفظ می شود. روش های به دام اندازی و کپسوله سازی محیطی محافظ برای آنزیم فراهم می کنند که به حفظ فعالیت زیستی آن کمک می کند، در حالی که سیستم های متقاطع بدون نیاز به حامل، پایداری و کارایی کاتالیستی بالاتری نشان می دهند. در ارزیابی کارایی فرآیند تثبیت آنزیم، پارامترهای کلیدی متعددی به کار گرفته می شوند تا تأثیر تثبیت بر ویژگی های آنزیمی و عملکرد کاتالیستی کلی مشخص شود. آزمون های پایداری حرارتی و پایداری در برابر pH میزان مقاومت آنزیم در برابر تغییر ساختار یا دناتوراسیون را در شرایط شدید دما و pH ارزیابی می کنند و نشان می دهند که تثبیت چگونه بر سختی ساختاری و تحمل آنزیم نسبت به تنش تأثیر می گذارد. 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 می دهند. در مجموع، این مرور نشان می دهد که انتخاب منطقی روش های تثبیت و مواد نگهدارنده می تواند به طور چشمگیری عملکرد و دوام آنزیم ها را بهبود بخشد و مسیر را برای توسعه بیوکاتالیست های کارآمد در کاربردهای صنعتی و زیست محیطی هموار سازد.

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

E-mail: m.mogharabi@mazums.ac.ir

مؤلف مسئول: مهدی مقربی - ساری: مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

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

مقدمه

آنزیم ها کاتالیزورهای بیولوژیکی هستند که توسط سلول های زنده تولید می شوند و واکنش های بیوشیمیایی خاص را با راندمان و گزینش پذیری بالا تسهیل می کنند. آن ها در شرایط ملایم عمل می کنند و در کاربردهای پزشکی و صنعتی متنوعی دارند (۱). با این حال، استفاده عملی از آن ها می تواند با چالش هایی مانند ناپایداری در شرایط صنعتی، غیر فعال شدن در حضور حلال های آلی، هزینه های بالا و دشواری بازیابی محدود شود. لذا، برای غلبه بر این موانع، تکنیک های پایدارسازی آنزیم توسعه یافته اند. پایدارسازی آنزیم به روش ها و استراتژی هایی اشاره دارد که با هدف حفظ یا افزایش فعالیت عملکردی، پایداری و طول عمر عملیاتی آنزیم ها در شرایطی که معمولاً باعث غیرفعال شدن یا دناتوراسیون می شوند انجام می شود (۲). در کاربردهای عملی، آنزیم ها اغلب در معرض محیط های سختی مانند دمای بالا، pH شدید، حلال های آلی یا عوامل پروتئولیتیک قرار می گیرند که می تواند منجر به از دست دادن فعالیت شود. تکنیک های پایدارسازی آنزیم به دنبال مقابله با این اثرات هستند و آنزیم ها را قادر می سازند تا کارایی کاتالیزوری خود را در دوره های متعدد، تحت شرایط عملیاتی متنوع و در فرآیندهای صنعتی حفظ کنند (۳). یک رویکرد کلیدی برای پایدارسازی آنزیم، تثبیت است که شامل اتصال آنزیم ها به پایه های جامد یا به دام انداختن آن ها در ماتریس ها می شود. این اتصال فیزیکی یا شیمیایی می تواند 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 نقطه ای به پایه ها می تواند استحکام ساختار آنزیم را افزایش دهد و آن را در برابر متلاشی شدن ناشی از گرما یا عوامل دناتوره کننده مقاوم تر کند. علاوه بر این، تثبیت می تواند آنزیم ها را از حمله میکروبی و آنزیم های پروتئولیتیک محافظت کند و

طول عمر عملکردی آن ها را بیش تر افزایش دهد (۴). انتخاب روش تثبیت مانند اتصال کووالانسی، جذب، کپسوله کردن یا پیوند عرضی مستقیماً بر میزان تثبیت حاصل تأثیر می گذارد. به عنوان مثال، پیوند عرضی شیمیایی یا اتصال به پلیمرهای محلول در آب می تواند مقاومت در برابر غیرفعال شدن حرارتی، اثرات حلال های 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 می تواند ویژگی های سستیکی آنزیم را تنظیم کند، پایداری حرارتی و شیمیایی را بهبود بخشد و طول عمر عملیاتی را افزایش دهد و در نتیجه فرآیندهای بیوکاتالستی را از نظر اقتصادی مقرون به صرفه تر و از نظر زیست محیطی 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 آنزیم ها است. در این راستا، مزایا و محدودیت های روش های متداول تثبیت، از جمله جذب فیزیکی، اتصال کووالانسی، کپسوله سازی و پیوند عرضی، به صورت نظام مند تحلیل شده و نقش مواد پایه مختلف، به ویژه پلیمرهای طبیعی، پلیمرهای مصنوعی و حامل های معدنی، در بهبود عملکرد آنزیم ها مورد بررسی قرار گرفته است. افزون بر این، مهم ترین پارامترها و روش های مورد استفاده در شناسایی و ارزیابی آنزیم های تثبیت شده، با هدف مقایسه کارایی و پایداری آن ها، بررسی و تحلیل شده است (۶).

روش های تثبیت آنزیم

جذب فیزیکی

جذب فیزیکی ساده ترین و قدیمی ترین روش تثبیت آنزیم است که بر اساس برهم کنش های غیر کووالانسی بین آنزیم و سطح حامل صورت می گیرد. این برهم کنش ها شامل نیروهای واندروالز، پیوندهای هیدروفوبیک،

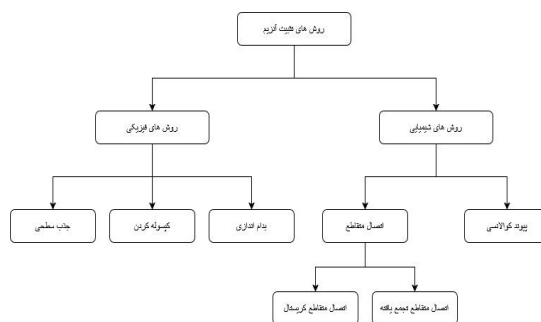
پیوندهای هیدروژنی و تعاملات الکترواستاتیکی می‌شوند. در این روش، آنزیم به صورت مستقیم روی سطح حامل قرار می‌گیرد و هیچ تغییر شیمیایی دائمی در ساختار پروتئین ایجاد نمی‌شود، بنابراین ساختار کانفورماسیونی و جایگاه فعال آن به طور نسبی حفظ می‌شود (۷). حامل‌های مورد استفاده برای جذب فیزیکی می‌توانند شامل مواد 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 می‌توان 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. درحالی‌که، 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 می‌باشد (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 می‌گیرد، 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 می‌باشد. 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

نقش مهمی در تثبیت آنزیم ها ایفا می کنند، انتخاب مناسب بین آن ها 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 مهم ترین و پایدارترین روش های تثبیت آنزیم است که در آن مولکول های آنزیم به صورت شیمیایی و از طریق پیوند کووالانسی به حامل یا ماتریس متصل می شوند. در این روش، گروه های عاملی فعال روی سطح آنزیم، مانند آمین، تیول، اتر، کربوکسیل و هیدروکسیل با گروه های واکنشی موجود روی حامل واکنش داده و پیوند پایدار ایجاد می کنند. این پیوند قوی باعث می شود که آنزیم در طول چرخه های متعدد واکنش، تغییرات دما، تغییرات pH یا حضور حلال های آلی، از سطح حامل جدا نشود و فعالیت بیوکاتالستی خود را حفظ کند (۱۳). این روش از آنزیم در برابر دناتوراسیون و تغییر شکل کانفورماسیونی محافظت می کند و اجازه می دهد 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 می شود که از نظر اقتصادی و عملیاتی اهمیت زیادی دارد (۱۴). با این حال، محدودیت اصلی این روش این است که پیوند کووالانسی می تواند

بر جایگاه فعال آنزیم اثر بگذارد یا انعطاف پذیری پروتئین را محدود کند و در نتیجه ممکن است فعالیت اولیه آنزیم را کاهش دهد. برای کاهش این اثر منفی، طراحی حامل، انتخاب گروه های 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، واکنش های چند مرحله ای و کاربردهای صنعتی با شرایط محیطی شدید. آنزیم هایی مانند پروتئاز، لیپاز، سلولاز و آمیلاز معمولاً با این روش روی حامل های اپوکسیدی، آلدهیدی، پلی استری یا نانوحامل ها تثبیت می شوند. استفاده از این روش علاوه بر افزایش پایداری، نیاز به آنزیم تازه در چرخه های متعدد را کم تر کرده و موجب کاهش هزینه های عملیاتی می گردد (۱۶).

تجمعات آنزیمی با پیوند متقاطع

این روش یک متد پیشرفته و محبوب برای تثبیت آنزیم ها است که هم پایداری و هم قابلیت استفاده مجدد را بدون نیاز به حامل خارجی افزایش می دهد. در این روش، مولکول های آنزیم ابتدا رسوب کرده و تجمع می کنند تا یک ساختار متراکم ایجاد شود و سپس با استفاده از یک عامل پیوند دهنده عرضی (مانند گلوترآلدئید) بین گروه های عاملی پروتئین پیوندهای کووالانسی ایجاد می شود و یک شبکه پایدار و جامد از آنزیم ها 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 می یابد. اتصال متقاطع بین مولکول ها از دناتوراسیون و از بین رفتن کانفورماسیون فعال جلوگیری می کند و آنزیم می تواند در چرخه های متعدد واکنش و شرایط محیطی شدید (مانند دما و pH نامطلوب یا حضور حلال های آلی) فعالیت خود را حفظ کند. علاوه بر این، نیاز به حامل خارجی را حذف می کند و بنابراین

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 ویژگی‌های 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 به صورت واحد آنزیمی گزارش می‌شود. یک واحد آنزیم به طور متداول به عنوان 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 استاندارد 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 به کار 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 میلی‌گرم پروتئین کل، یا واحد بر میلی‌گرم پروتئین تثبیت شده بیان می‌کنند. 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 ۱ و 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 می‌باشد و در نهایت فعالیت ویژه از تقسیم فعالیت مطلق بر مقدار پروتئین بدست می‌آید.

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

معادله شماره ۳

$$Unit_{abs} = \frac{\Delta A / \Delta t}{\epsilon \times l} \times V_{total} \times 10^6$$

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 می‌باشد.

فعالیت نسبی، فعالیت آنزیم را به صورت درصدی نسبت به یک شرایط مرجع که معمولاً دما یا pH بهینه در نظر گرفته می شود و به عنوان ۱۰۰ درصد تعریف می گردد نشان می دهد. این روش به ویژه در بررسی اثر عوامل محیطی مانند pH، دما، حلال های 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 می دهد، در حالی که فعالیت نسبی امکان مقایسه معنی دار عملکرد آنزیم در شرایط مختلف را فراهم می سازد (۲۳). از این رو، گزارش هر دو شاخص برای تحلیل جامع رفتار آنزیم ها، به ویژه در مطالعات مرتبط با تثبیت و کاربردهای زیست فناوری، ضروری است. استانداردسازی فعالیت آنزیم برای حصول نتایج قابل اعتماد و قابل مقایسه ضروری است، زیرا فعالیت اندازه گیری شده به شدت 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 آنزیم های آزاد و تثبیت شده، نمونه های مختلف و مطالعات مستقل را فراهم می کند و از تفسیر نادرست تغییرات فعالیت جلوگیری می نماید. این رویکرد پایه ای برای گزارش پذیری علمی و ارزیابی واقعی کارایی سامانه های بیوکاتالستی محسوب می شود.

بازده و کارایی تثبیت

در پژوهش های مرتبط با آنزیم های تثبیت شده، ارزیابی عملکرد سیستم های بیوکاتالیتیکی نیازمند شاخص های 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 شاخص ها جنبه متفاوتی از عملکرد سیستم تثبیت شده را توضیح می دهند و استفاده همزمان از آن ها به درک جامع تری از فرایند تثبیت و کیفیت نهایی آنزیم می انجامد (۲۴). بازده تثبیت آنزیم معیاری است که نشان می دهد 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 می شود و واحد آن درصد است. بازده تثبیت بالا نشان دهنده موفقیت فرایند تثبیت و جذب مؤثر آنزیم است، در حالی که بازده پایین می تواند 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 می گذارد و با نسبت فعالیت آنزیم تثبیت شده به فعالیت همان مقدار آنزیم آزاد قبل از تثبیت محاسبه می شود. این شاخص اطلاعات ارزشمندی در مورد اثرات فیزیکی یا شیمیایی روش تثبیت بر ساختار و عملکرد سایت فعال آنزیم فراهم می کند. کارایی تثبیت بالا بیانگر حفظ تقریباً کامل توان کاتالیتیکی آنزیم و سازگاری مناسب آن با حامل انتخاب شده است، در حالی که کاهش کارایی می تواند 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 می کند. این پارامتر برای ارزیابی قابلیت عملیاتی آنزیم در شرایط صنعتی و تحقیقاتی و مقایسه روش های مختلف تثبیت کاربرد دارد و بیانگر توان واقعی سیستم تثبیت شده در انجام واکنش های کاتالیتیکی است (۲۵). بازده تثبیت پروتئینی بیانگر نسبت جرم پروتئین یا آنزیم متصل شده به حامل به کل

$$\text{بازده فعالیت (\%)} = \frac{\text{فعالیت آنزیم تثبیت شده}}{\text{فعالیت همان مقدار آنزیم آزاد}} \times 100$$

معادله شماره ۶

$$\text{کارایی تثبیت (\%)} = \frac{\text{بازده فعالیت}}{\text{بازده تثبیت}} \times 100$$

معادله شماره ۷

$$\text{بازده تثبیت پروتئین (\%)} = \frac{\text{مقدار پروتئین تثبیت شده}}{\text{مقدار کل پروتئین مصرف شده}} \times 100$$

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 سوپسترا 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 داینامیک بخش‌های فعال شود و دسترسی برخی سوپستراها به سایت فعال را تسهیل یا محدود نماید. به همین دلیل، آنزیم ممکن است ترجیح خود برای یک سوپسترا 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 سوپستراهای مختلف را متفاوت کنند و به دنبال آن سلکتیویته آنزیم را افزایش یا کاهش دهند. از سوی دیگر، دسترسی

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

$$\text{بازده تثبیت (\%)} = \frac{\text{فعالیت آنزیم تثبیت شده}}{\text{فعالیت کل آنزیم مصرف شده}} \times 100$$

معادله شماره

۵

فیزیکی سوبستراها به آنزیم تثبیت شده ممکن است محدود شود. در سیستم های ماتریسی یا حامل های متخلخل، سوبستراهایی که اندازه یا شکل مناسب ندارند ممکن است نتوانند به سایت فعال برسند، در حالی که سوبستراهای مناسب تر به راحتی کاتالیز می شوند. این پدیده نیز می تواند موجب تغییر سلکتیویته شود (۳۰). در عمل، تثبیت آنزیم ممکن است اثرات متنوعی بر سلکتیویته داشته باشد. در برخی موارد، سلکتیویته کاهش می یابد و آنزیم توانایی انتخاب محصول مورد نظر را کم تر حفظ می کند؛ در برخی موارد، سلکتیویته تغییری نمی کند و در مواردی دیگر، تثبیت می تواند سلکتیویته را بهبود دهد و آنزیم را برای یک سوبسترا یا مسیر خاص ترجیح دارتر سازد. بنابراین، اندازه گیری سلکتیویته پس از تثبیت برای اطمینان از عملکرد مطلوب آنزیم ضروری است و می تواند راهنمایی برای انتخاب روش تثبیت و نوع حامل مناسب ارائه دهد (۳۱). مقدار درصد ee معمولاً از طریق جداسازی انانتیومرها R و S به وسیله کروماتوگرافی با فاز ساکن کایرال، نظیر HPLC یا GC کایرال، محاسبه می شود، به طوری که پس از تفکیک کامل انانتیومرها مساحت پیک های مربوط به هر یک ثبت شده و مقدار درصد ee بر اساس نسبت اختلاف و مجموع مساحت پیک ها تعیین می گردد. رژیوسلکتیویته و اکنش نیز از طریق تعیین نسبت ایزومرهای ساختاری حاصل، معمولاً با استفاده از HPLC یا GC غیر کایرال، محاسبه می شود که در آن نسبت مساحت پیک های مربوط به هر رژیوایزومر به عنوان شاخص رژیوسلکتیویته گزارش می گردد (معادله شماره ۹).

معادله شماره ۹

$$ee\% = \frac{|R-S|}{R+S} \times 100$$

پایداری دمایی (Thermal Stability)

پایداری حرارتی آنزیم ها از دیدگاه کاربردی اهمیت بالایی دارد، زیرا بسیاری از فرآیندهای صنعتی در شرایط دمایی بالا انجام می شوند. یکی از شاخص های مهم برای سنجش پایداری حرارتی پروتئین ها، از جمله آنزیم ها، دمای ذوب (Tm) است (۳۲). دمای ذوب به عنوان دمایی تعریف می شود که در آن نیمی از مولکول های پروتئین ساختار طبیعی خود را از دست داده و دناتوره می شوند، در حالی که نیم دیگر همچنان در حالت طبیعی باقی می ماند. در واقع، این دما بیانگر نقطه تعادل میان پروتئین های سالم و دناتوره است و هر چه مقدار آن بالاتر باشد، نشان دهنده پایداری بیش تر پروتئین در برابر حرارت است (۳۳). اندازه گیری دمای ذوب پروتئین معمولاً با روش های متنوعی انجام می شود. کالریمتری روبشی تفاضلی دقیق ترین تکنیک برای تعیین این مقدار است. همچنین روش های دایکروئیسیم دایره ای برای بررسی تغییرات ساختار دوم، فلورسانس ذاتی پروتئین ها برای ردیابی تغییر محیط اطراف باقی مانده های آروماتیک، و نیز فلوریمتری روبشی تفاضلی با استفاده از رنگ های حساس به هیدروفوبیسیته، به طور گسترده مورد استفاده قرار می گیرند. از منظر کاربردی، تثبیت آنزیم ها نقش مهمی در افزایش دمای ذوب و به تبع آن پایداری حرارتی دارد. در فرآیند تثبیت، آنزیم به یک بستر جامد یا ماتریس متصل می شود و این اتصال باعث محدود شدن انعطاف پذیری بیش از حد زنجیره های پروتئینی و در نتیجه کاهش احتمال دناتوراسیون حرارتی می شود. به همین دلیل، آنزیم های تثبیت شده معمولاً دمای ذوب بالاتری نسبت به فرم آزاد خود نشان می دهند و این موضوع به طور مستقیم با افزایش نیمه عمر حرارتی آن ها در دماهای بالا مرتبط است (۳۴).

پایداری در برابر تغییرات pH (pH Stability)

پایداری آنزیم ها به شدت تحت تأثیر شرایط محیطی، به ویژه pH قرار دارد. هر آنزیم دارای یک بازه ی

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 حلال‌های 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

پایداری طولانی مدت (Storage Stability)

پایداری ذخیره سازی یکی از پارامترهای کلیدی در ارزیابی قابلیت کاربردی آنزیم ها و بیوکاتالیست ها محسوب می شود 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 هفته ها یا ماه ها نگهداری همچنان بخش قابل توجهی از فعالیت اولیه خود را حفظ کند، از پایداری ذخیره سازی بالایی برخوردار است. این ویژگی اهمیت ویژه ای در کاربردهای صنعتی و دارویی دارد، زیرا آنزیم های با پایداری پایین نیازمند شرایط نگهداری پیچیده و هزینه بر هستند و کاهش سریع فعالیت آن ها می تواند کارایی فرآیند را تحت تأثیر قرار دهد (۴۶). عوامل متعددی بر پایداری ذخیره سازی اثر گذارند. ماهیت ذاتی آنزیم، شرایط محیطی نگهداری، حضور پایدارکننده ها (مانند گلیسرول، پلی اتیلن گلیکول یا نمک های خاص) و حالت فیزیکی آنزیم (محلول، خشک شده یا لیوفیلزه) از مهم ترین موارد هستند. آنزیم های خشک شده معمولاً پایداری بیش تری نسبت به فرم محلول دارند، و شرایط دمای پایین و pH بهینه نیز نیمه عمر ذخیره سازی را افزایش می دهند. تثبیت آنزیم ها یکی از مؤثرترین روش ها برای بهبود پایداری ذخیره سازی است. اتصال آنزیم به حامل یا محصور کردن آن در ماتریس های پلیمری باعث محدود شدن حرکت های ساختاری، ایجاد یک محیط محافظ و جلوگیری از تجمع یا رسوب پروتئین ها می شود (۴۷).

قابلیت استفاده مجدد (Reusability)

قابلیت استفاده مجدد یکی از پارامترهای حیاتی در ارزیابی کارایی آنزیم ها و بیوکاتالیست ها در کاربردهای صنعتی محسوب می شود. این ویژگی به توانایی آنزیم برای حفظ فعالیت کاتالیتیکی خود در چندین چرخه

ضعیف درون مولکولی نظیر پیوندهای هیدروژنی و برهم کنش های آب گریز را تضعیف کند (۴۱). یکی از شاخص های مهم در بررسی اثر حلال های آلی بر فعالیت و پایداری آنزیم ها، ضریب تقسیم اکتانول/آب ($\log P$) است که معیاری از قطبیت یا آب گریزی حلال محسوب می شود. حلال هایی که $\log P$ پایینی دارند، معمولاً قطبی و آب دوست هستند و تمایل زیادی به امتزاج با آب نشان می دهند (۴۲). این ویژگی سبب می شود که این حلال ها لایه آب هیدراتاسیون اطراف پروتئین را مختل کرده و برهم کنش های ضعیف دخیل در پایداری ساختار سوم پروتئین، نظیر پیوندهای هیدروژنی و تعاملات آب گریز، را تضعیف کنند. در نتیجه، آنزیم در چنین محیط هایی به سرعت ساختار فعال خود را از دست داده و فعالیت کاتالیتیکی کاهش می یابد. در مقابل، حلال هایی با $\log P$ بالا معمولاً غیر قطبی و آب گریز هستند و به دلیل امتزاج ناپذیری با آب، لایه هیدراتاسیون پروتئین را دست نخورده باقی می گذارند. بنابراین، آنزیم ها در این دسته از حلال ها پایداری و فعالیت بیش تری حفظ می کنند و حتی می توانند در واکنش های سنتزی در محیط های غیر آبی به کار گرفته شوند (۴۳). در این میان، تثبیت آنزیم ها نقشی کلیدی در کاهش اثرات نامطلوب حلال های 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 می شود که از تماس مستقیم حلال با بخش های حساس آنزیم جلوگیری کرده و لایه هیدراتاسیون ضروری را حفظ می کند (۴۴). علاوه بر این، محدود شدن انعطاف پذیری ساختاری پروتئین در اثر تثبیت، مقاومت آن را در برابر دناتوراسیون ناشی از حضور حلال های آلی افزایش می دهد. در نتیجه، آنزیم تثبیت شده در مقایسه با آنزیم آزاد فعالیت بالاتری را در محیط هایی با $\log P$ پایین نشان می دهد و دامنه ی کاربرد آن در فرآیندهای بیوکاتالیز صنعتی گسترده تر می شود (۴۵).

واکنش اشاره دارد و مستقیماً با بهره‌وری فرآیند و صرفه‌جویی اقتصادی مرتبط است. آنزیم‌هایی که قابلیت استفاده مجدد بالایی دارند، می‌توانند چندین بار در واکنش‌ها شرکت کنند و نیاز به جایگزینی مکرر آن‌ها کاهش می‌یابد، در حالی که آنزیم‌های آزاد معمولاً پس از یک چرخه فعالیت، بخشی از ساختار و کارایی خود را از دست می‌دهند. عوامل متعددی، از جمله ماهیت ذاتی آنزیم، شرایط واکنش مانند دما، pH و حضور حلال‌ها یا سوبستراهای مهارکننده، و نیز روش نگهداری آنزیم بین چرخه‌های واکنش، بر استفاده اثر گذارند. در این میان، تثبیت آنزیم‌ها یکی از مؤثرترین روش‌ها برای افزایش قابلیت استفاده مجدد به شمار می‌رود (۴۸).

پارمترهای کینتیکی آنزیم تثبیت شده

پارامترهای کینتیکی آنزیم‌ها، از جمله حداکثر سرعت واکنش (V_{max})، ثابت مایکلیس (K_m)، ثابت نرخ کاتالیز (k_{cat}) و نسبت کارایی کاتالیتیکی (k_{cat}/K_m) شاخص‌های اصلی برای ارزیابی عملکرد آنزیم‌ها و مقایسه بین فرم آزاد و تثبیت شده هستند. تثبیت آنزیم‌ها، چه از طریق اتصال کووالانسی به حامل‌های جامد، محصور کردن در ماتریس‌های پلیمری یا استفاده از نانوذرات، تأثیر قابل توجهی بر این پارامترها دارد، زیرا محیط میکرو اطراف مولکول و انعطاف‌پذیری کانفورماسیونی آن تغییر می‌کند. K_m که نشان‌دهنده تمایل آنزیم به سوبسترا است، در بسیاری از آنزیم‌های تثبیت شده افزایش می‌یابد (۴۹). این افزایش معمولاً ناشی از محدودیت‌های انتقال جرم یا کاهش دسترسی مستقیم سوبسترا به جایگاه فعال است، به ویژه زمانی که آنزیم در ماتریس‌های متخلخل یا حامل‌های فشرده محصور شده باشد. با این حال، اگر تثبیت کانفورماسیون فعال آنزیم را حفظ کند، K_m ممکن است تغییر اندکی داشته باشد یا حتی کاهش جزئی نشان دهد، که بیانگر بهبود انتخاب‌پذیری آنزیم نسبت به سوبستراست (۵۰). از سوی دیگر، V_{max} بیانگر حداکثر سرعت واکنش در شرایط

اشباع سوبسترا است. در آنزیم‌های تثبیت شده، محدودیت انتقال جرم و کاهش انعطاف‌پذیری پروتئین می‌تواند منجر به کاهش جزئی V_{max} شود، اما این آنزیم‌ها در شرایط عملیاتی طولانی مدت یا دماهای بالا پایدارتر باقی می‌مانند، زیرا تثبیت از دناتوراسیون و از بین رفتن جایگاه فعال جلوگیری می‌کند. k_{cat} که تعداد مولکول‌های سوبسترا کاتالیز شده توسط یک مولکول آنزیم در واحد زمان را نشان می‌دهد، ممکن است در آنزیم‌های تثبیت شده کمی کاهش یابد. این کاهش معمولاً ناشی از محدودیت انعطاف‌پذیری پروتئین است، اما با افزایش پایداری حرارتی و قابلیت استفاده مجدد جبران می‌شود (۵۱). به همین ترتیب، نسبت k_{cat}/K_m که شاخص کارایی کاتالیتیکی آنزیم است، ممکن است به دلیل تغییرات K_m و k_{cat} کمی کاهش یابد، اما دوام عملیاتی و مقاومت آنزیم در شرایط محیطی مختلف، این کاهش نسبی را جبران می‌کند. علاوه بر این، آنزیم‌های تثبیت شده نسبت به تغییرات دما، pH و حضور حلال‌ها مقاوم‌تر هستند و پارامترهای کینتیکی آن‌ها در شرایط شدید محیطی کم‌تر تغییر می‌کند. این ویژگی باعث می‌شود که آنزیم تثبیت شده در چرخه‌های متعدد یا شرایط عملیاتی متغیر عملکرد قابل اعتمادی داشته باشد (۵۲). با وجود محدودیت‌هایی مانند کاهش انعطاف‌پذیری و محدودیت انتقال جرم، تثبیت آنزیم‌ها با افزایش پایداری، قابلیت استفاده مجدد و دوام فعالیت در طول زمان، قابلیت استفاده عملیاتی و اقتصادی آن‌ها را در بیوکاتالیز صنعتی به طور چشمگیری ارتقاء می‌دهد.

بحث

تثبیت آنزیم‌ها به عنوان یکی از مؤثرترین رویکردها برای غلبه بر محدودیت‌های ذاتی آن‌ها، نقشی کلیدی در ارتقای پایداری، تکرارپذیری و بازده کاتالستی ایفا می‌کند. مقایسه روش‌های مختلف نشان می‌دهد که هیچ شیوه‌ای به تنهایی جامع و بی نقص نیست؛ بلکه انتخاب بهینه به نوع آنزیم، ماهیت تکیه‌گاه و شرایط عملیاتی

می آورد. در نهایت، تلفیق دانش مواد و بیوتکنولوژی می تواند مسیر توسعه بیوکاتالیست های 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.

بستگی دارد. جذب فیزیکی به دلیل سادگی و هزینه پایین، برای کاربردهای موقت مناسب است، در حالی که اتصال کووالانسی به واسطه پیوندهای قوی تر، برای سیستم های با نیاز به پایداری طولانی مدت ترجیح داده می شود. روش های به دام اندازی و سیستم های متقاطع نیز در حفاظت از ساختار فعال آنزیم و بهبود مقاومت در برابر تغییرات محیطی مؤثرند. افزون بر این، تحلیل دقیق ویژگی های سینتیکی و پایداری حرارتی یا شیمیایی، درک عمیق تری از رفتار آنزیم تثبیت شده فراهم

References

- 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.
- 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..**
- 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.
- Hashempour Y, Mortezaazadeh 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.
- 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.
- 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.
- Khan MR. Immobilized enzymes: a comprehensive review. *Bull Natl Res Cent* 2021;45(1): 207.
- Asaduzzaman F, Salmon S. Enzyme immobilization: polymer-solvent-enzyme compatibility. *Molecular Systems Design & Engineering* 2022; 7(11): 1385-1414.
- 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.
- Wang C, Liao K. Recent Advances in Emerging Metal- and Covalent-Organic

- 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, et al. 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 Biol*2004; 14(1): 29-35.
 22. Harris TK, Keshwani MM. Measurement of Enzyme Activity. *Methods Enzymol* 2009; 463: 57-71 PMID: 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 Chem*2020; 25.
 25. SheldonRA. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. *Adv SynthCatal*2007; 349: 1289-1307.
 26. Fernandez-LopezL, PedreroSG, Lopez-CarroblesN, GorinesBC, Virgen-OrtizJJ, Fernandez-LafuenteR. Effect of protein load on stability of immobilized enzymes.

- Enzyme Microb Technol 2017; 98: 18-25 PMID: 28110660.
27. Zhang DH, Yuwen LX, Peng LJ. Parameters Affecting the Performance of Immobilized Enzyme. *J Chem* 2013; 2013(1): 946248.
 28. Bolivar JM, Woodley M, Fernandez-Lafuente R. 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 Technol* 2007; 40(6): 1451-1463.
 30. 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.
 31. Garcia-Galan C, Berenguer-Murcia A, Fernandez-Lafuente R, Rodrigues RC. Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. *Adv Synth Catal* 2011; 353: 2885-2904.
 32. Dos Santos JCS, Barbosa O, Ortiz C, 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): 1245-1251 PMID: 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, Švedas V. Computational Design of a pH Stable Enzyme: Understanding Molecular Mechanism of Penicillin Acylase's Adaptation to Alkaline Conditions. *PLOS ONE* 2014; 9(6): e100643 PMID: 24959852.
 36. Frankenberger WT, Johanson JB. Effect of pH on enzyme stability in soils. *Soil Biol Biochem* 1982; 14(5): 433-437.
 37. Iyer PV, Ananthanarayan L. Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochem* 2008; 43(10): 1019-1032.
 38. Reshmi R, Sanjay G, Sugunan S. 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. Klivanov AM. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* 2001; 409(6817): 241-246 PMID: 11196652.
 41. Serdakowski AL, Dordick JS. Enzyme activation for organic solvents made easy. *Trends Biotechnol* 2008; 26: 48-54 PMID: 18037518.
 42. Hirakawa H, Kamiya N, Kawarabayashi Y, Nagamune T. Log *P* effect of organic solvents on a thermophilic alcohol dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1748: 94-99 PMID: 15752697.
 43. Ogino H, Ishikawa H. Enzymes which are stable in the presence of organic solvents. *J Biosci Bioeng* 2001; 91(2): 109-116.

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 Enzymo*1980; 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.