

ORIGINAL ARTICLE

Synergistic effect of selenium and calcium nanoparticles on the half-life of alkaline serine protease enzyme

Asieh Emami Nejad^{*}, Mohammad Fazilati, Hossein Salavati, Habiballah Nazem

Department of Biology, Payam Noor University (PNU), Tehran, Iran.

Correspondence

Asieh Emami Nejad

Email:

Asieh.Emaminejad@isfahan.pnu.ac.ir

How to cite

Emami Nejad, A., Fazilati, M., Salavati, H., & Nazem, H. (2024). Synergistic effect of selenium and calcium nanoparticles on the half-life of alkaline serine protease enzyme. *Experimental Animal Biology*, 12(48), 65-76.

ABSTRACT

The use of protease enzymes and their stabilization has been greatly expanded due to application in various industries. Alkaline serine protease enzymes are very important due to their thermal stability, activity and stability. In this study, a new approach to increase the half-life of alkaline serine protease enzymes using selenium and calcium nanoparticles was presented. Due to its high biocompatibility, toxicity, and low cost, these nanoparticles have become one of the most prominent non-metallic oxide nanoparticles, which, with their antioxidant and anti-inflammatory properties, can protect against the destruction of enzymes by free radicals. The results showed that these nanoparticles can significantly increase the half-life of these enzymes. On the other hand, the serine protease enzyme immobilized on selenium nanoparticles has unique biochemical characteristics in the presence and absence of calcium. The obtained results indicate that the stabilized enzyme has high activity and stability in a wide range of temperatures and pH compared to pure and impure-free enzyme. The results showed that the enzyme immobilized on selenium nanoparticles increased its activity by more than 99% in the presence of calcium at the temperature of 45°C. On the other hand, the half-life of the free enzyme increased from 95 minutes in the pure form to 115 minutes in the form immobilized on nanoparticles in the presence of calcium. These results indicate that the presence of nanoparticles can prevent the destruction of enzymes by free radicals.

KEYWORDS

Bacillus subtilis DR8806, Half-life, Nanoparticles, Selenium, Serine protease.

نشریه علمی

زیست‌شناسی جانوری تجربی

«مقاله پژوهشی»

اثر هم‌افزایی نانوذرات سلنیوم و کلسیم بر نیمه‌عمر آنزیم سرین پروتئاز قلیایی

آسیه امامی‌نژاد*، محمد فضیلتی، حسین صلواتی، حبیب‌الله ناظم

گروه زیست‌شناسی، تهران، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

چکیده

استفاده از آنزیم‌های پروتئاز و تثبیت آن‌ها به‌خاطر کاربرد در صنایع مختلف بسیار گسترش یافته است، آنزیم‌های سرین پروتئاز قلیایی به‌دلیل ثبات حرارتی، فعالیت و پایداری، از اهمیت به‌سزایی برخوردار هستند. در این مطالعه، یک رویکرد جدید برای افزایش نیمه‌عمر آنزیم‌های سرین پروتئاز قلیایی با استفاده از نانوذرات سلنیوم و کلسیم ارائه شد. این نانوذرات به‌دلیل زیست‌سازگاری بالا، سمیت و هزینه پایین به یکی از برجسته‌ترین نانوذرات اکسید غیرفلزی تبدیل شده است که با داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی می‌توانند از تخریب آنزیم‌ها به‌وسیله رادیکال‌های آزاد محافظت کنند. نتایج نشان داد که این نانوذرات می‌توانند به‌طور قابل‌توجهی نیمه‌عمر این آنزیم‌ها را افزایش دهند. از سوی دیگر، آنزیم سرین پروتئاز تثبیت‌شده روی نانوذرات سلنیوم در حضور و عدم حضور کلسیم خود دارای ویژگی‌های بیوشیمیایی منحصر به فرد است. نتایج به‌دست‌آمده حاکی از آن است که آنزیم تثبیت‌شده در محدوده وسیعی از دما و pH فعالیت و پایداری بالایی نسبت به آنزیم آزاد خالص و ناخالص دارد. نتایج نشان داد آنزیم بارگذاری‌شده روی نانوذرات سلنیوم در حضور کلسیم در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد بیش از ۹۹ درصد افزایش فعالیت داشت. از سوی دیگر، نیمه‌عمر آنزیم آزاد از ۹۵ دقیقه در حالت خالص به ۱۱۵ دقیقه در حالت بارگذاری شده روی نانوذرات در حضور کلسیم رسید. این نتایج حاکی از آن است که وجود نانوذرات می‌تواند از تخریب آنزیم‌ها به‌وسیله رادیکال‌های آزاد جلوگیری کند.

واژه‌های کلیدی

نانوذرات، سلنیوم، نیمه‌عمر، سرین پروتئاز، باسیلوس سوبتیلیس DR8806.

نویسنده مسئول:

آسیه امامی‌نژاد

رایانامه:

Asieh.Emaminejad@isfahan.pnu.ac.ir

استناد به این مقاله:

امامی‌نژاد، آسیه؛ فضیلتی، محمد؛ صلواتی، حسین و ناظم، حبیب‌الله (۱۴۰۳). اثر هم‌افزایی نانوذرات سلنیوم و کلسیم بر نیمه‌عمر آنزیم سرین پروتئاز قلیایی. فصلنامه زیست‌شناسی جانوری تجربی، ۱۲(۴۸)، ۶۵-۷۶.

مقدمه

آنزیم‌های سرین پروتئاز یک گروه از آنزیم‌های مهم هستند که در جایگاه فعال خود سرین دارند و در طیف وسیعی از فرایندهای زیستی از جمله سنتز پروتئین، تخریب پروتئین، انتقال سیگنال و پاسخ ایمنی نقش دارند. این آنزیم‌ها در یوکاریوت و پروکاریوت‌ها یافت می‌شوند و بسیار متنوع هستند. اختلال در فعالیت این آنزیم‌ها می‌تواند منجر به بیماری‌های مختلفی از جمله سرطان، بیماری‌های قلبی-عروقی و بیماری‌های عفونی شود (Sujitha & Shanthi, 2023). از سوی دیگر، آنزیم‌های سرین پروتئاز نیز در صنایع غذایی، دارویی، چرم‌سازی، صنعت نساجی، مواد آرایشی و بهداشتی و مواد شوینده مورد بررسی قرار گرفته‌اند. افزودن پروتئازهای قلیایی به فرمول شوینده‌ها به دلیل مقاوم‌بودن، پایداری و فعالیت در شرایط سخت مانند pH قلیایی و حضور عوامل سورفاکتانت یا اکسیدکننده‌ها از اهمیت به‌سزایی برخوردار است (Ferraz *et al.*, 2019). پروتئازها قادرند مولکول‌های نامحلول چسبیده به الیاف را بشکنند و باعث آزادسازی ترکیبات پروتئین‌دار در لکه‌ها شوند که علاوه بر بهبود شست‌وشو در دمای کم‌تر، امکان شست‌وشو در زمان کم‌تر را نیز مهیا می‌کنند (Jung *et al.*, 2018).

مهم‌ترین سرین پروتئازهایی که هم‌اکنون استفاده می‌شوند سابتیلیزین کارل‌زبرگ جداشده از باسیلوس لیکنی‌فورمیس، سابتیلیزین BPN از باسیلوس آمیلولیکنی‌فورمیس، سابتیلیزین E و سابتیلیزین NET از باسیلوس سوبتیلیس هستند (Shinde & Thomas, 2011). باسیلوس سوبتیلیس، یک باکتری هوازی گرم مثبت و کاتالاز مثبت با رشد سریع است. این باکتری سلول‌های میله‌ای شکل دارد که ۲ تا ۶ میکرومتر طول و کم‌تر از ۱ میکرومتر قطر دارند. دمای مطلوب رشد این باکتری‌ها حدود ۳۰ تا ۳۵ درجه سانتی‌گراد است که زمان همانندسازی آن به ۲۰ دقیقه می‌رسد. تحت برخی شرایط رشد، سلول‌ها تمایل به تشکیل زنجیره‌های بلندی دارند که توسط مواد جدا نشده دیواره سپتوم متصل می‌شوند (Errington & Aart, 2020).

هدف از مطالعه حاضر بهره‌گیری از یک رویکرد جدید در تثبیت آنزیم سرین پروتئاز استخراج شده از باکتری باسیلوس سوبتیلیس DR8806 به وسیله نانوذرات سلنیوم (Se) در حضور و عدم حضور کلسیم (Ca) و اثرات هم‌افزایی این نانوذرات در بهبود فعالیت، نیمه‌عمر و پایداری آنزیم است. این پژوهش سعی دارد دیدگاهی جامع در مورد اهمیت ویژگی و پایداری سرین پروتئاز با توجه به کاربرد آن در صنعت شوینده ارائه دهد. چنین پروتئازهای

بهبودیافته‌ای، صنایع هدف را قادر می‌سازد تا روش‌های تولید خود را به شیوه‌ای پایدار طراحی کنند.

پیشینه پژوهش

در پژوهش سال ۲۰۰۵ پژوهشگران به این نتیجه رسیدند که پروتئاز قلیایی از باسیلوس سیرکولانس به دلیل استحکام و پتانسیل کاربرد سازگار با محیط زیست در صنایع فرآوری چرم و مواد شوینده خالص شده کاربرد دارد. وزن مولکولی آنزیم خالص شده ۳۹/۵ کیلودالتون برآورد شد. فعالیت بهینه آنزیم در محدوده دمایی وسیع حداکثر در دمای ۷۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد در محیط pH قلیایی در حضور مواد فعال‌کننده سطحی و عوامل اکسیدکننده به دست آمد. این ماده خاصیت حذف لکه و فعالیت موزدایی را برای پوست حیوانات بدون کمک شیمیایی و بدون هیدرولیز پروتئین‌های فیبری نشان داد (Rao *et al.*, 2009). علاوه بر این، در سال ۲۰۱۵ مطالعه‌ای توسط آسوده و لگزیان انجام گرفت که موفق به استخراج و خالص‌سازی یک نوع سرین پروتئاز از باسیلوس سوبتیلیس DR8806 شدند. در طی این مطالعه آنزیم با کروماتوگرافی تبادل یونی پس از رسوب با آمونیوم سولفات خالص شد. وزن مولکولی آنزیم خالص شده با استفاده از الکتروفورز ژل آکریل آمید ۶۵/۵ کیلودالتون برآورد شد. آنزیم فعالیت بالایی را در محدوده pH، ۵ تا ۱۱ نشان داد. فعالیت بهینه آنزیم در pH، ۹/۵ به دست آمد. دمای بهینه فعالیت آنزیم نیز در ۷۰ درجه سانتی‌گراد بود. این آنزیم نیازی به کلسیم نداشت و با توجه به سورفاکتانت‌ها، از جمله سدیم دودسیل سولفات (SDS) و Triton X-100 و عوامل اکسیدکننده مانند آب اکسیژنه، پایداری بسیار بالایی داشت. این ویژگی‌های آنزیم، پتانسیل امیدوارکننده‌ای را برای کاربرد در صنعت لباس‌شویی نشان داد و مشخص شد که این یک آنزیم قلیایی دوست و مقاوم در برابر حرارت است (Asoodeh & Lagzian, 2012).

در مقایسه با آنزیم‌های آزاد، اشکال تثبیت‌شده آنزیم‌ها در برابر تغییرات محیطی قوی‌تر و مقاوم‌تر هستند. برای مثال در پژوهش مغربی نشان داده شد که آنزیم‌های تثبیت‌شده دارای مقاومت بالاتری در برابر تغییرات محیطی هستند و در مقایسه با حالت آزاد به راحتی قابل بازیابی هستند. مزیت اصلی تثبیت آنزیم، محافظت از آنزیم‌ها در برابر شرایط سخت محیطی (مانند دماهای بالا، مقادیر بالای pH و غیره) است. یکی از راه‌های افزایش فعالیت آنزیم‌های سرین پروتئاز، افزایش نیمه‌عمر آن‌هاست.

برابر یون‌های فلزی افزایش یافت به‌طوری که، پس از فعال‌نمودن نانوذره به‌منظور اتصال الکترواستاتیک آنزیم به نانوذره، محلول پروتئینی با غلظت ۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به نانوذره اضافه و به‌مدت چهار ساعت در دمای ۱۰ درجه‌سانتی‌گراد انکوبه شد. نتایج این پژوهش نشان داد که یون‌های آهن (Fe^{2+}) و منگنز (Mn^{2+}) به‌طور قابل‌توجهی فعالیت آنزیم را افزایش دادند. آنزیم تثبیت‌شده نسبت به همتای آزادش مقاومت بیشتری به یون‌های فلزی از خود نشان داد، در حالی که آنزیم آزاد نسبت به حضور یون‌های فلزی حساس بوده و با افزایش غلظت آن‌ها کاهش فعالیت آنزیم محسوس‌تر بود. حفظ پایداری آنزیم تثبیت‌شده در غلظت‌های بالای یون‌های فلزی بیانگر کارایی بالای روش تثبیت در حفظ پایداری و فعالیت آنزیم تثبیت‌شده بود (Sujitha & Shanthi, 2023).

روش‌شناسی پژوهش

مواد اولیه، نمک‌ها و حلال‌ها با برند مرک و خلوص بالا بدون نیاز به خالص‌سازی بیش‌تر تهیه شد. از سوی دیگر، برای به‌دست‌آوردن آنزیم سرین پروتئاز قلیایی از باکتری باسیلوس سوبتیلیس DR8806 با شماره دسترسی IBRC-M10741 در مرکز منابع ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران استفاده شد.

کشت باکتری باسیلوس سوبتیلیس DR8806

کشت خالص میکروارگانیسم باسیلوس سوبتیلیس DR8806 در محیط کشت، نوترینت براث (NB) انجام شد. هنگامی که باکتری به بیش‌ترین زمان رشد خود رسید، میزان ۲۵۰ میکرولیتر از محیط کشت NB باکتری در آن رشد کرده در داخل ۲۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت پایه متشکل از ساکارز ۱ درصد وزنی/حجمی، عصاره مخمر ۰/۱ درصد وزنی/حجمی، پیتون ۰/۵ درصد وزنی/حجمی، نمک سدیم کلرید ۵ درصد وزنی/حجمی، منیزیم سولفات ۷ آبه ۰/۲ درصد وزنی/حجمی و پتاسیم هیدروژن فسفات ۰/۱ درصد وزنی/حجمی تلقیح داده شد. این محیط کشت دوباره به انکوباتور شیکردار با دور ۱۲۰ دور در دقیقه و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شد. در نهایت آنزیم موردنظر به‌وسیله باسیلوس سوبتیلیس DR8806 با استفاده از محیط پایه تولید شد (Asoodeh & Lagzian, 2012).

خالص‌سازی نسبی آنزیم

برای خالص‌سازی نسبی آنزیم به میزان ۵۰۰ میکرولیتر از محیط

نیمه‌عمر یک آنزیم، مدت زمانی است که آنزیم می‌تواند به‌طور فعال عمل کند. افزایش نیمه‌عمر آنزیم‌ها می‌تواند منجر به افزایش فعالیت کلی آن‌ها شود. روش‌های مختلفی برای افزایش نیمه‌عمر آنزیم‌ها وجود دارد. یکی از این روش‌ها، استفاده از عوامل محافظتی است. عوامل محافظتی می‌توانند از آنزیم‌ها در برابر تخریب توسط عوامل مخرب مانند رادیکال‌های آزاد محافظت کنند. در این روش تحرک آنزیم‌ها به‌طور مصنوعی محدود به تغییر ساختار و خواص آن‌ها می‌شود. به‌دلیل ماهیت حساس، روش‌های تثبیت کلاسیک به‌دلیل کاهش فعالیت آنزیم هنوز محدود هستند (Maghraby *et al.*, 2023). در سال‌های اخیر، به‌منظور بهبود فعالیت آنزیم و خواص آن‌ها، از نانومواد به‌عنوان حامل برای تثبیت آنزیم استفاده شده است (Bhavaniramya *et al.*, 2019). یکی از راه‌های بهبود شرایط فوق، استفاده از نانوذرات است. نانوذرات هم به‌دلیل مزایای متعددی که در دارورسانی کنترل‌شده و هدفمند دارند و نیز به‌دلیل ساختار زیستی مناسب، زیست‌تخریب‌پذیری بالا، سمیت پایین و قابلیت حمل هم‌زمان ترکیبات آب‌دوست و آب‌گریز به‌طور گسترده‌ای در تحقیقات پزشکی، دارویی و بیوشیمیایی مورد‌استفاده قرار می‌گیرند. نانوذرات یکی از کارآمدترین مواد حامل مورد‌استفاده در تثبیت آنزیم هستند، زیرا دارای ویژگی‌هایی چون مساحت سطح، بارگذاری مؤثر آنزیم و مقاومت در برابر انتقال جرم هستند (Thakur, Attri, & Seth, 2021). در این میان، نانوذرات سلنیوم (Se) از موادی هستند که خاصیت ضد میکروبی، ضد قارچی و ضد انگلی آن‌ها گزارش شده است. عنصر سلنیوم یکی از عناصر موردنیاز برای سلامت انسان و یکی از کاتالیزورهای زیستی و اجزای پر شمار عملکرد آنزیم‌ها است که جهت بهبود عملکرد سیستم ایمنی و اثرات ضد سرطان ضروری است. این نانوذرات به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی سمیت بسیار کم‌تری در مقایسه با عنصر سلنیوم داشته و قدرت بالایی در پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد دارد. این ترکیب به‌علت اندازه کوچک که نسبت سطح به حجم بالایی دارند، کاربردهای ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدان داشته و در صنایع آرایشی و بهداشتی هم به‌کار می‌رود (Ashengroph & Hosseini, 2019). برای مثال فعالیت و پایداری پروتئاز پنائوس وانامی در برابر اثرات سمی فلزات سنگین با تثبیت روی نانوذرات کیتوزان موردبررسی قرار گرفت. در این مطالعه، با استفاده از نانوذرات کیتوزان به‌عنوان بستری سازگار با سیستم‌های زیستی، پایداری و حفظ فعالیت آنزیم پروتئاز خالص‌شده از میگوی پنائوس وانامی در

سنجش فعالیت آنزیم در حالت خالص

سنجش فعالیت آنزیم پروتئازی استخراج‌شده در حالت خالص و ناخالص براساس روش Moradian *et al.* (2009) تعیین شد. ابتدا ۰/۵ میلی‌لیتر کازئین در بافر Tris-HCL ۲۰ میلی‌مولار با pH ۸ حل شد. پس از آن ۰/۱ میلی‌لیتر آنزیم خالص اضافه شد. سپس این مخلوط را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از آن با متوقف‌شدن واکنش با اضافه‌کردن ۰/۷۵ میلی‌لیتر، تری کلرواستیک ۱۰ درصد و قراردادن آن به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از آن با کمک سانتریفیوژ به مدت ۲۰ دقیقه با ۸۰۰۰ دور بر دقیقه رسوب حاصل جدا شد و با استفاده از طیف‌سنجی جذبی محلول روی آن در طول موج ۲۸۰ نانومتر به دست آمد. به همین ترتیب برای آنزیم ناخالص همین مراحل انجام شد و پس از آن میزان بازده انجام شد. آزمایش با سه بار تکرار صورت گرفت.

تعیین نیمه‌عمر آنزیم

برای تعیین نیمه‌عمر آنزیم سرین پروتئاز موردنظر ۲۰۰ میکرولیتر از هریک از آنزیم‌های موردنظر (آزاد و تثبیت‌شده) به همراه یک میلی‌لیتر از بافر فسفات سالین (PBS) با pH مطلوب آنزیم و دماهایی که آنزیم موردنظر در این محدوده دمایی فعالیت بهینه داشت، انتخاب گردید. به همین منظور، دماهای ۴۰، ۴۵، ۵۰ و ۵۵ درجه سانتی‌گراد انتخاب شد. آنزیم‌های موردنظر به مدت سه ساعت در دستگاه آنکوباسیون قرار داده شد. پس از آن فعالیت آنزیم نسبت به زمان آنکوباسیون (صفر) موردبررسی قرار گرفت. برای به دست آوردن نیمه‌عمر آنزیم در هر دما از معادله $t_{1/2} = \ln 2 / ki$ استفاده شد. ki شیب نمودار است که ثابت سرعت غیرفعال‌شدن پروتئین را نشان می‌دهد. هم‌چنین نیمه‌عمر آنزیم‌ها به صورت تثبیت‌شده در حضور کلسیم و عدم حضور آن سنجش شد.

یافته‌های پژوهش

آزمون FT-IR

طیف‌های FT-IR مربوط به نمونه‌های موردبررسی نشان داده شده است. مطابق این شکل، طیف‌های مربوط به نانوذرات بر پایه سلیسیم فاقد و حاوی کلسیم جهت مقایسه بهتر بر روی یکدیگر رسم شده‌اند تا تغییرات شدت و پهنای نوارها بهتر قابل مشاهده باشد (شکل ۱).

کشت پایه به ۵۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت اختصاصی تولید شده، اضافه شد. پس از آن آنکوباسیون به مدت ۲۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه انجام شد. خالص‌سازی آنزیم در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد طی رسوب‌دهی با آمونیوم سولفات و دیالیز محیط کشت به منظور جداسازی این نمک صورت گرفت.

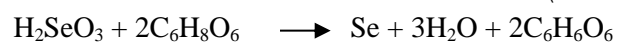
خشک کردن نمونه‌ها

برای نگهداری آنزیم سرین پروتئاز به مدت طولانی، نمونه‌های موجود در فاز محلول از آنزیم موردنظر با استفاده دستگاه فریزر درایر خشک شدند، به طوری که آب موجود در نمونه‌های موردنظر تصعید شده و در نتیجه از نمونه موردنظر پودر خشک به دست می‌آید این پودر را می‌توان تا دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد می‌توان نگهداری کرد که از خودخوری آنزیم موردنظر جلوگیری شود.

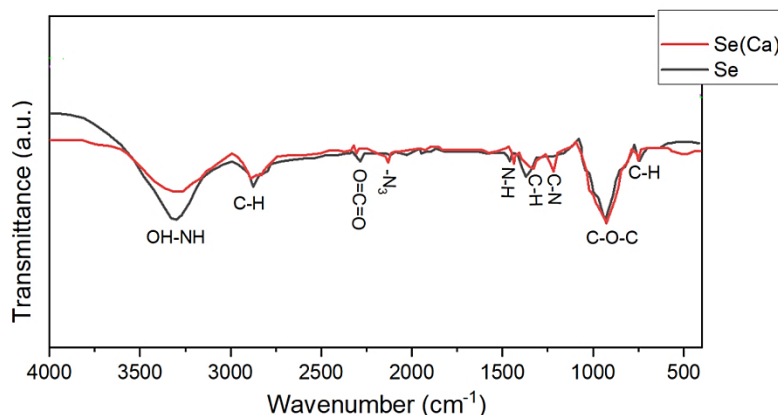
سنتز نانوذرات Se و تثبیت آن به روش جذب فیزیکی

نانوذرات SeNPs از طریق احیای اسید سلینیوس با اسید آسکوربیک در محیط آبی تهیه و برای تثبیت آنزیم سرین پروتئاز استفاده شد (Jung *et al.*, 2018). نانوکمپلکس‌های سلینیوم-سرین پروتئاز از طریق احیای اسید سلینیوس با اسید آسکوربیک در حضور آنزیم سرین پروتئاز در محیط آبی با pH ۳/۵ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به دست آمد (Mane & Bapat, 2001).

معادله (۱)



آنزیم خالص بر روی نانوذره سنتز شده از طریق روش جذب فیزیکی تثبیت شد. به همین منظور با مخلوط‌کردن ۳ میلی‌لیتر محلول استوک آنزیم سرین پروتئاز (۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) تهیه‌شده در ۰/۰۵ مولار بافر سیترات سدیم (pH ۴/۸) با ۵۰ میلی‌گرم نانوذره Se معلق در ۱ میلی‌لیتر محلول سدیم سیترات انجام شد. محلول بافر سیترات در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با تکان دادن مداوم روی شیکرگردان به مدت چهار ساعت آنکوبه شد. پس از آنکوباسیون، نمونه‌ها با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت پنج دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. نانوذره حاوی آنزیم جذب شده با بافر سدیم سیترات دو بار شسته شدند. فعالیت آنزیم و پروتئین در هر دو بخش اتصال یافته و غیرمتصل برای محاسبه فعالیت‌های باقیمانده و بازده تثبیت تعیین شد (Kuma *et al.*, 2017).



شکل ۱. طیف‌های FT-IR مربوط به آنزیم تثبیت‌شده روی نانوذرات Se و در حضور Ca

سلنیوم مشهود است و این می‌تواند ناشی از پیوند هیدروژنی بین ترکیبات آنزیم با سطح نانوذرات باشد، که نشان‌دهنده که جذب فیزیکی آنزیم بر روی این نانوذرات است. همچنین ارتعاش کششی پیوندهای C-N و C-O به ترتیب در عدد موج‌های حدود 1220 cm^{-1} و 990 cm^{-1} واقع شده است (Nandiyanto *et al.*, 2019) که عدم وجود نوار مربوط به ارتعاش کششی C-N در نمونه سلنیوم فاقد کلسیم می‌تواند دلیل دیگری بر پایداری کم آنزیم بر روی این نانوذرات باشد.

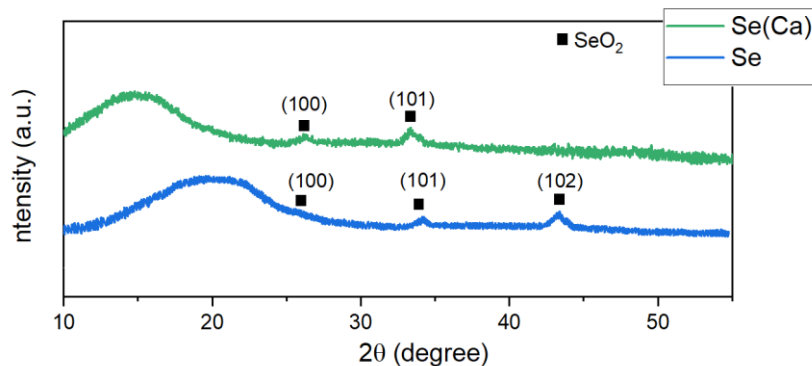
آزمون پراش پرتو ایکس (XRD)

آزمون XRD تشکیل کریستال‌های سلنیوم را در نمونه موردبررسی تأیید کرد. الگوی پیک‌های حاصل از XRD در شکل (۲) نشان داده شده است. جهت شناسایی فاز از روی نتایج الگوهای حاصل از این نمونه‌ها از نرم‌افزار X'Pert استفاده شد. در تمامی این الگوهای پراش یک پیک پهن در زوایای کم‌تر از 30° درجه قابل مشاهده است که مربوط به ساختار نامنظم (غیرکریستالی) آنزیم جذب‌شده به نانوذرات می‌باشد (Rajan *et al.*, 2014). بنابراین از روی الگوهای پراش XRD می‌توان به حضور آنزیم بر روی سطح همه نانوذرات پی‌برد که در تأیید نتایج آزمون FT-IR می‌باشد.

در نمونه بر پایه سلنیوم، فاز سلنیوم‌اکسید (SeO_2) با کد مرجع JCPDS No. 00-006-0362 قابل مشاهده است. این فاز دارای ساختار کریستالی مونوکلینیک و گروه فضایی $P21/n$ می‌باشد. در این ساختار صفحات پراش (100) ، (101) و (102) به ترتیب در زوایای $25/8^\circ$ ، 33° و $43/2^\circ$ درجه مشاهده شده است.

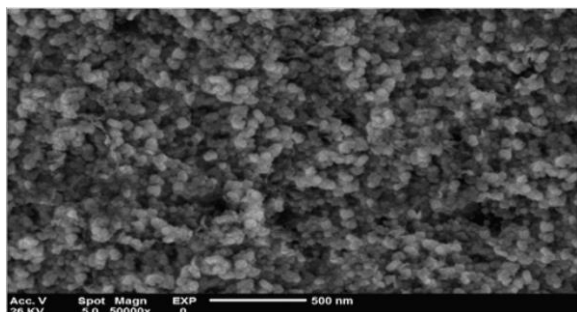
در طیف FT-IR مربوط به این نمونه‌ها، نوار پهن ظاهرشده در عدد موج حدود 3300 cm^{-1} مربوط به ارتعاش کششی پیوند O-H و N-H در ساختار هیدروکسیلی و آمیدی آنزیم پروتئاز در نمونه موردبررسی است (Nandiyanto *et al.*, 2019) (Hajipour *et al.*, 2021) مشخص است که در نمونه برپایه سلنیوم، وجود عنصر کلسیم در ساختار باعث پهن‌تر شدن این نوار شده است که می‌تواند بیان‌گر وجود مقدار آنزیم بیش‌تر در این نمونه‌ها باشد. همچنین نوارهای قرار گرفته در عدد موج‌های حدود 2840 cm^{-1} و 2910 cm^{-1} به ترتیب مربوط به ارتعاش کششی متقارن و نامتقارن پیوندهای C-H در ساختار آنزیم است (Shahmoradi *et al.*, 2023). نوار قابل مشاهده در عدد موج حدود 2300 cm^{-1} مربوط به نمونه‌ها نبوده و از گاز کربن دی‌اکسید باقی مانده در محفظه آزمون ناشی شده است (Xin *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2020).

نوار واقع‌شده در عدد موج حدود 2100 cm^{-1} یکی از مهم‌ترین نوارها جهت بررسی پایداری آنزیم بر روی نانوذرات است چرا که مطابق گزارش‌های مشابه، وجود این نوار به معنی پایداری ترکیبات نیتروژنی موجود در آنزیم بر روی سطح نانوذرات است (Santos *et al.*, 2018) با مقایسه این نوار در نانوذرات بر پایه سلنیوم مشخص است که این نوار تنها پس از افزودن کلسیم به ساختار نانوذرات قابل مشاهده است که بیانگر اثر قابل‌توجه وجود عنصر کلسیم در پایداری آنزیم بر روی این نانوذرات می‌باشد. به علاوه، ارتعاش خمشی پیوندهای N-H و C-H نیز به ترتیب در عدد موج‌های حدود 1430 cm^{-1} و 1320 cm^{-1} واقع شده است (Jung *et al.*, 2018)، که جابه‌جایی این نوارها به سمت عدد موج‌های کم‌تر در حضور کلسیم در نانوذرات بر پایه

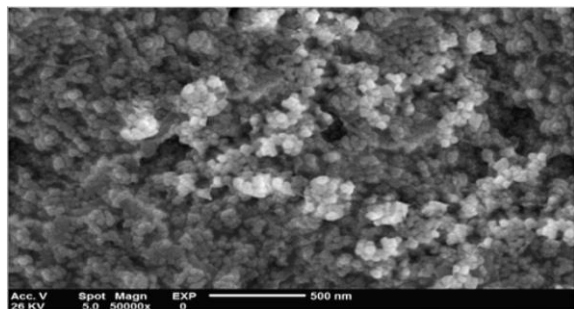


شکل ۲. الگوهای XRD مربوط به آنزیم تثبیت‌شده روی نانوذرات Se و در حضور Ca

SEM از چندین بلورک متصل به هم تشکیل شده است. بنابراین اندازه ذرات در نتایج آزمون میکروسکوپی از اندازه بلورک‌ها بزرگ‌تر به‌دست‌آمده است.



(الف)



(ب)

شکل ۳. الف) تصاویر SEM مربوط به نمونه‌های SeNPs و ب) مربوط به نمونه‌های SeNPs + Ca

جهت بررسی حضور کلسیم بر توزیع اندازه نانوذرات سنتز شده، ۱۰۰ ذره از تصاویر SEM با استفاده از نرم‌افزار پردازش تصویر J Image اندازه‌گیری شده و هیستوگرام توزیع اندازه ذرات حاصل از این اندازه‌گیری در شکل (۴) نشان داده شده است.

یکی از تغییراتی که با افزودن عنصر کلسیم به این نانوذرات قابل مشاهده است، جابه‌جایی پیک پهن مربوط به فاز نامنظم به زوایای کم‌تر در نانوذرات بر پایه سلنیوم است. در واقع با توجه به رابطه معکوس زاویه وقوع پیک در الگوی پراش با فاصله صفحات مطابق رابطه براگ هر چقدر پیک به زوایای کم‌تر منتقل شود، بیانگر وجود فاصله بیش‌تر بین صفحات ماده مورد بررسی است (Weiergräber *et al.*, 2017). بنابراین به نظر می‌رسد که وجود کلسیم در ساختار نانوذرات باعث شده است که ضمن تشکیل کمپلکس با مولکول‌های موجود در آنزیم، پایداری این ترکیبات بر روی سطح نانوذرات را افزایش دهد. برای یافتن اندازه بلورک فازهای SeO₂ از رابطه دبی-شرر (معادله ۲) استفاده شد.

$$D = K\lambda / (FWHM) \times \cos(\theta) \quad \text{(معادله ۲)}$$

با داشتن مقدار $\cos(\theta)$ و FWHM و هم‌چنین مقادیر ثابت λ (۰/۹) آنگستروم و K (۰/۹) مقدار اندازه بلورک طبق رابطه شرر به‌دست می‌آید. این مقدار برای نانوذرات سلنیوم فاقد و حاوی کلسیم به ترتیب برابر با ۲۳/۵ و ۲۸/۲ نانومتر به‌دست‌آمده است که افزایش اندازه بلورک با افزودن کلسیم به ساختار این نانوذرات در تأیید نتایج تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) می‌باشد.

آزمون SEM

جهت بررسی ریخت‌شناسی (مورفولوژی) و سطح نانوذرات مورد بررسی از آزمون SEM استفاده شده و تصاویر مربوط به نمونه‌های تهیه‌شده در حضور و غیاب کلسیم در شکل (۳) نشان داده شده است. مشخص است که ذرات سنتز شده دارای مورفولوژی چندوجهی و شبه‌کروی هستند و حضور کلسیم در ساختار آن‌ها تغییر قابل توجهی در شکل نانوذرات به‌وجود نیاورده است. لازم به ذکر است که هر ذره قابل مشاهده در تصاویر

سنجش فعالیت آنزیم در حالت آزاد، استاندارد و

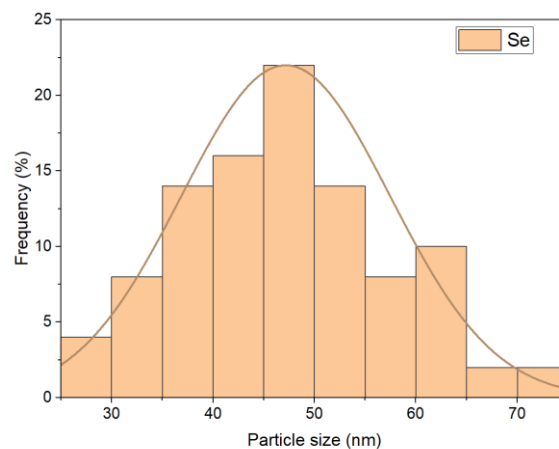
ناخالص

فعالیت آنزیم سرین پروتئاز در حضور سوبسترای کازئین انجام شد. فعالیت یک آنزیم عبارت است از مقدار آنزیمی که بتواند در یک دقیقه یک میکرومول سوبسترا را در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تحت شرایط استاندارد به محصول تبدیل کند که اصطلاحاً این مقدار آنزیم را یک واحد بین‌المللی می‌گویند. فعالیت آنزیم در حالت آزاد به صورت ناخالص ($U \times 1000$) ۲۲/۹۱ و فعالیت آنزیم خالص ($U \times 1000$) ۲۹۶/۲۸۲ گزارش شد (شکل ۵).

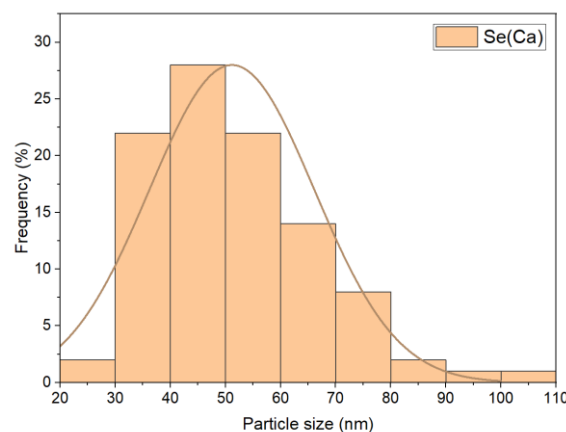
جدول ۱. نتایج آماری حاصل از هیستوگرام رسم شده برای نمونه‌های

مورد بررسی

نمونه	تعداد کل اندازه‌گیری	میانگین (نانومتر)	انحراف معیار (نانومتر)	اندازه‌گیری کوچک‌ترین ذره	اندازه‌گیری بزرگ‌ترین ذره
Se	۱۰۰	۴۷/۱۶	۱۰/۲۹	۲۵/۶۷	۷۱/۷۱
Se(Ca)	۱۰۰	۵۱/۱۶	۱۴/۹۸	۲۴/۲۱	۱۰۹/۸۷

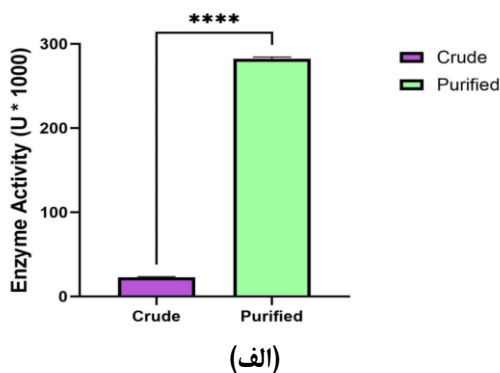


(الف)

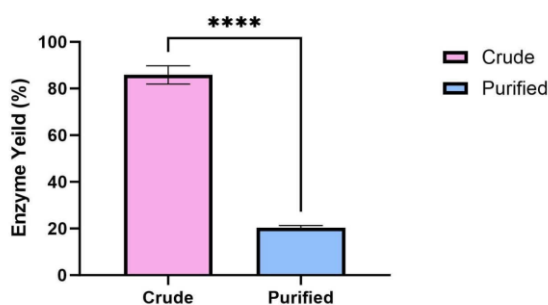


(ب)

شکل ۴. هیستوگرام توزیع اندازه ذرات مربوط به (الف) Se NPs و (ب) Se NPs + Ca



(الف)

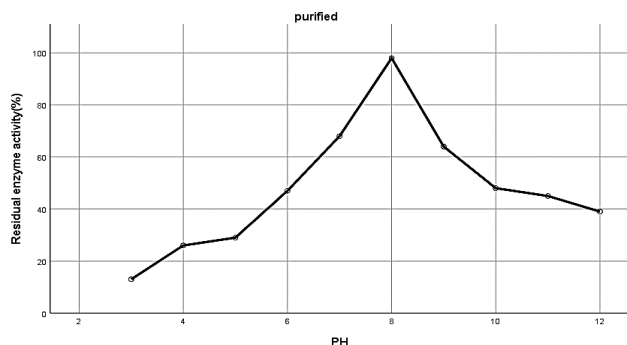


(ب)

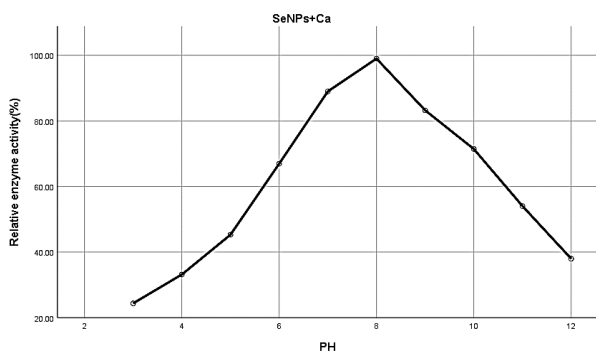
شکل ۵. الف) مقایسه فعالیت آنزیم خالص با آنزیم ناخالص (خام)، ب) مقایسه درصد بازده آنزیم خالص با آنزیم ناخالص (خام)

مطابق جدول (۱) میانگین اندازه ذرات اندازه‌گیری شده برای نمونه‌های سلنیوم و سلنیوم به همراه کلسیم به ترتیب برابر با ۴۷/۱۶ و ۵۱/۱۶ نانومتر بوده و مقدار انحراف معیار برای این نمونه‌ها به ترتیب برابر با ۱۰/۲۹ و ۱۴/۹۸ نانومتر به دست آمده است. این نتایج بیانگر آن است که با افزودن کلسیم به نانوذرات مورد نظر میانگین اندازه ذرات افزایش یافته است که این می‌تواند به دلیل قرارگیری عنصر کلسیم در نواحی خالی به صورت دوپ شده (Doped) و جانشینی در ساختار کریستالی SeO_2 باشد. هم‌چنین با توجه به این که مقدار انحراف معیار به دست آمده کم‌تر از ۳۰ درصد مقدار میانگین بوده است، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که توزیع اندازه ذرات در این نمونه‌ها نسبتاً باریک بوده و تفاوت کوچک‌ترین و بزرگ‌ترین ذره اندازه‌گیری شده نسبت به مقدار میانگین نسبتاً کم بوده است.

تا ۱۱ در مقدار بهینه pH، ۹ و کاهش فعالیت آن در pH کم‌تر از ۹، قلیایی‌بودن پروتئاز استخراج‌شده را تأیید می‌کند (Giri *et al.*, 2011). افزون‌براین، در پژوهشی فرهادیان و همکاران نیز محدوده وسیع فعالیت و پایداری آنزیم در محدوده pH بین ۵ تا ۱۰ گزارش کردند و بالاترین پایداری آنزیم سرین پروتئاز در pH برابر با ۸ بیان شده است (Weiergräber *et al.*, 2017).



(الف)



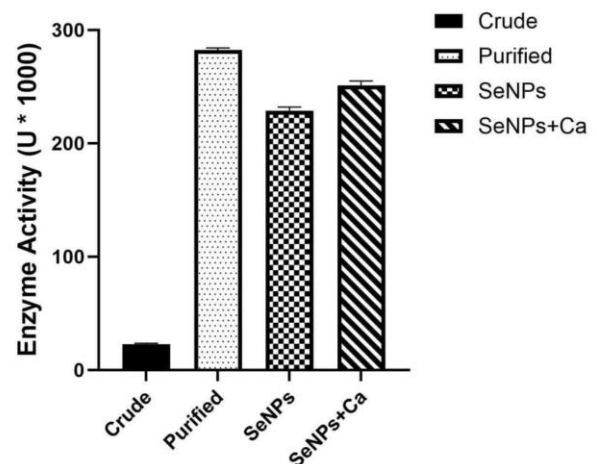
(ب)

شکل ۷. الف) منحنی پایداری آنزیم آزاد خالص، **ب)** تثبیت‌شده روی نانوذرات Se در حضور Ca در محدوده pH مختلف

بررسی اثر دما بر روی فعالیت و پایداری آنزیم

با توجه به شکل (۸) محدوده دمایی ۲۰ تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد با فاصله دمایی ۵ درجه سانتی‌گراد برای بررسی تأثیر دما روی فعالیت و پایداری آنزیم در حالت آزاد و خالص انتخاب شد. نتایج نشان داد که بیش‌ترین فعالیت آنزیم خالص در محدوده دمایی ۳۵ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار دارد و فعالیت بهینه آنزیم آزاد خالص در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد برابر با ۹۳ درصد بوده که حدود ۱۵ درصد بیش‌تر از آنزیم خالص است. با افزایش دما، میزان فعالیت آنزیم آزاد به سرعت کاهش پیدا کرد. از سوی دیگر، آنزیم بارگذاری‌شده روی نانوذرات سلنیوم در حضور کلسیم در دمای بهینه ۴۵ درجه سانتی‌گراد بیش از ۹۹ درصد افزایش فعالیت

هنگامی که آنزیم به‌وسیله نانوذره به‌صورت تثبیت‌شده در می‌آید میزان تحرک آنزیم کاهش پیدا کرده و همین امر کاهش فعالیت آنزیم را نشان می‌دهد (شکل ۶). تثبیت آنزیم در شرایط غیراستاندارد مانند تغییرات در دما و pH محیط و سایر عوامل‌های شیمیایی موردنیاز در صنعت فعالیت آنزیم سرین پروتئاز را نسبت به حالت آزاد افزایش می‌دهد.



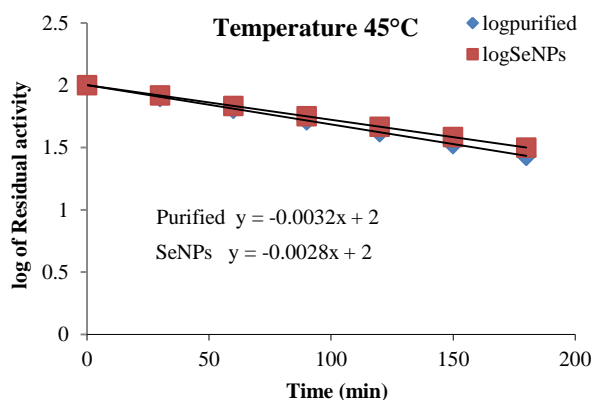
شکل ۶. مقایسه فعالیت آنزیم در حالت آزاد (خالص و ناخالص) و تثبیت‌شده با نانوذرات Se در حضور و نبود Ca

بررسی اثر pH بر روی فعالیت و پایداری آنزیم

در بررسی اثر pH بر روی فعالیت آنزیم در دو حالت آنزیم آزاد و تثبیت‌شده روی نانوذرات سلنیوم در حضور کلسیم در محدوده pH، ۳ تا ۱۲ بررسی شد. با توجه به شکل (۷) آنزیم در هر دو حالت خالص و ناخالص در مقدار pH، ۸ بالاترین فعالیت را دارد و نشان می‌دهد که آنزیم جزو آلكالین پروتئازهاست. فعالیت آنزیم در pH، ۸ به‌صورت ناخالص و خالص به ترتیب ۸۸/۷ و ۹۳/۷ گزارش شد. هم‌چنین آنزیم در حالت آزاد در محدوده pH بین ۶ تا ۱۰ از خود فعالیت بالایی نشان داد به گونه‌ای که آنزیم ناخالص در pH، ۵ برابر با ۳۲ درصد و در pH، ۱۰، ۵۱ درصد از خود فعالیت نشان داد و پس از این محدوده کاهش فعالیت را از خود نشان داد. بررسی pH بر روی پایداری آنزیم در دو حالت آنزیم آزاد و تثبیت‌شده روی نانوذرات سلنیوم بررسی شد. فعالیت آنزیم تثبیت‌شده روی نانوذرات در حضور و عدم حضور کلسیم به ترتیب ۹۵ و ۹۹ درصد گزارش شد. از طرفی فعالیت آنزیم‌های تثبیت‌شده در محدوده وسیع pH اسیدی و بازی گزارش شد. در برخی از پژوهش‌ها نشان داده شده است که فعالیت آنزیم پروتئاز استخراج‌شده از باسیلوس سوبتیلیس VSG-4 در محدوده pH، ۹

تعیین نیمه‌عمر آنزیم

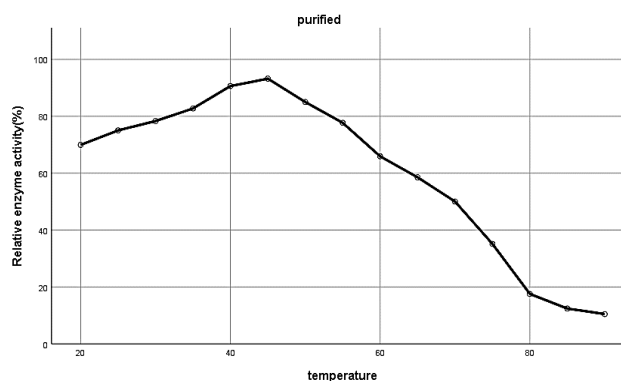
نیمه‌عمر آنزیم در دماهای ۴۰، ۴۵، ۵۰ و ۵۵ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد نیمه‌عمر آنزیم سرین پروتئاز در حالت آزاد (خالص) ۹۵ دقیقه، ناخالص ۹۰ دقیقه است. با توجه به نتایج در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد کاهش نیمه‌عمر در آنزیم نسبت به دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در آنزیم خالص مشهود است، اما زمانی که آنزیم خالص به صورت تثبیت‌شده درآمد، افزایش قابل توجهی در نیمه‌عمر آنزیم مشاهده شد. به طوری که در نانوذرات سلنیوم به ۱۰۸ دقیقه و نانوذرات سلنیوم در حضور کلسیم به ۱۱۵ دقیقه رسید (شکل ۹).



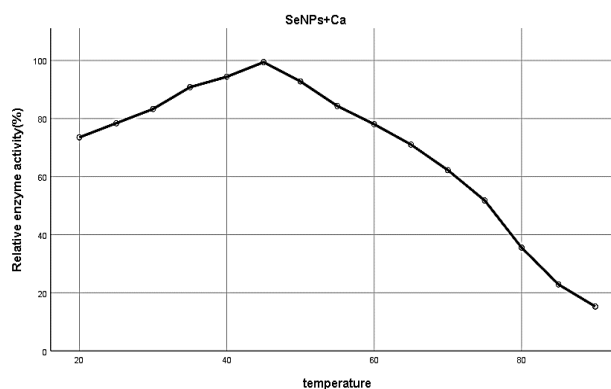
شکل ۹. نمودار لگاریتمی، مقایسه پایداری در مقابل زمان در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد، میزان فعالیت آنزیم در دو حالت خالص و تثبیت‌شده روی نانوذرات Se

نیمه‌عمر آنزیم پروتئاز در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به صورت آزاد و تثبیت‌شده نیز بررسی شد. نیمه‌عمر آنزیم در حالت ناخالص ۷۴ دقیقه، در حالت خالص ۸۲ دقیقه و در حالت تثبیت‌شده روی نانوذرات سلنیوم و در حضور کلسیم به ترتیب ۹۳ و ۱۰۲ دقیقه گزارش شد. این نتایج بیان می‌کند که نیمه‌عمر آنزیم در دمای بالاتر کاهش می‌یابد، اما با تثبیت آنزیم می‌توان باعث افزایش نیمه‌عمر در آن شد. علاوه بر این، نیمه‌عمر آنزیم پروتئاز در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به صورت آزاد و تثبیت‌شده نیز بررسی گردید. نیمه‌عمر آنزیم در حالت ناخالص ۶۸ دقیقه، در حالت خالص ۷۶ دقیقه و در حالت تثبیت‌شده به ترتیب ۸۷ و ۹۷ دقیقه گزارش شد. با توجه به نتایج به دست آمده حضور نانوذره سلنیوم در حضور کلسیم، بیش‌ترین اثر هم‌افزایی را بر روی بهبود نیمه‌عمر در آنزیم سرین پروتئاز دارند. براساس برخی پژوهش‌ها، نیمه‌عمر آنزیم سرین پروتئاز استخراج‌شده از باکتری باسیلوس سوبتیلیس

داشت. همچنین آنزیم خالص تثبیت‌شده در دماهای بالاتر (۶۰ درجه سانتی‌گراد) نسبت به آنزیم آزاد خالص فعالیت بیش‌تری را از خود نشان داد. لازم به ذکر است که آنزیم سرین پروتئاز خالص در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد ۱۰/۶ درصد فعالیت از خود نشان داد، در صورتی که آنزیم تثبیت‌شده روی نانو ذره سلنیوم در حضور کلسیم فعالیت ۱۷ درصد را نشان داد.



(الف)



(ب)

شکل ۸. منحنی فعالیت و پایداری با تغییرات دمایی مختلف مربوط به آنزیم خالص و (ب) SeNPs+Ca

نتایج به دست آمده از برخی پژوهش‌ها نشان می‌دهد آنزیم سلولاز تثبیت‌شده در دمای بالاتر از ۶۰ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با آنزیم آزاد فعالیت بیش‌تری از خود نشان می‌دهد (Chen & Duan, 2015). بسیاری از پژوهش‌گران، فعالیت بالای کمپلکس آنزیم- نانوذره در دماهای بالاتر را ناشی از پیوند کووالانسی گزارش کردند. افزایش دمای بهینه آنزیم‌های تثبیت‌شده ممکن است به دلیل کاهش انعطاف‌پذیری آن‌ها بر روی بسترهای جامد و افزایش تحمل به باز شدن به دلیل تغییرات ساختاری باشد.

پایداری بالا گزارش شد. آنزیم تثبیت شده با کمک نانوذرات سلنیوم در حضور کلسیم می‌تواند برای صنعت مواد شوینده و سایر صنایع که نیازمند مقاومت بالا هستند استفاده شود هرچند که نیازمند آزمایش‌های بیش‌تر در مقیاس بزرگ است، اما ممکن است نقطه عطفی در گسترش فناوری‌های بومی برای تولید و تثبیت مقرون‌به‌صرفه آنزیم از باکتری باسیلوس سوبتیلیتیس باشد. افزون بر این بتوان از این نتایج به‌منظور توسعه درمان‌های جدید برای بیماری‌های مرتبط با اختلال در عملکرد آنزیم‌های سرین پروتئاز استفاده کرد. بنابراین پیشنهاد بر این است که مطالعات بیش‌تر و عمیق‌تری در این حوزه چون مطالعه بر روی سایر آنزیم‌های سرین پروتئاز، بررسی مکانیسم دقیق اثرهم‌افزایی نانوذرات سلنیوم بر نیمه‌عمر آنزیم‌ها و بررسی اثر نانوذرات بر فعالیت سایر آنزیم‌های زیستی صورت گیرد.

NCIM2713 در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد ۳۰ دقیقه گزارش شده است (Mane & Bapat, 2001). در حالی که نیمه‌عمر آنزیم پروتئاز خالص در این پژوهش در مقایسه با برخی از پروتئازهای مشابه و جدا شده از باکتری باسیلوس بیش‌تر است.

نتیجه‌گیری و بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات سلنیوم می‌توانند به‌عنوان یک ابزار بالقوه برای افزایش نیمه‌عمر آنزیم سرین پروتئاز استفاده شوند. این نتایج نشان می‌دهد که نانوذرات می‌توانند از آنزیم‌ها در برابر تخریب به‌وسیله رادیکال‌های آزاد محافظت کنند. این امر می‌تواند منجر به افزایش فعالیت کلی آنزیم‌ها شود. از سوی دیگر، در این مطالعه برای نخستین بار استفاده از آنزیم سرین پروتئاز بومی برای کاربرد با مقاومت و

References

- Ashengroph, M., & Hosseini, S. R. (2019). Synthesis analysis and antibacterial activity of selenium nanoparticles produced by *Pseudomonas alcaligenes*. *Journal of Microbial World*, 12(3), 252-266.
- Asoodeh, A., & Lagzian, M. (2012). Purification and characterization of a new glucoamylpullulanase from thermotolerant alkaliphilic *Bacillus subtilis* DR8806 of a hot mineral spring. *Process Biochemistry*, 47(5), 806-815.
- Bhavanirama, S., Vanajothi, R., Vishnupriya, S., Premkumar, K., Al-Aboody, M. S., Vijayakumar, R., & Baskaran, D. (2019). Enzyme immobilization on nanomaterials for biosensor and biocatalyst in food and biomedical industry. *Current Pharmaceutical Design*, 25(24), 2661-2676.
- Chen, S.-C., & Duan, K.-J. (2015). Production of galactooligosaccharides using β -galactosidase immobilized on chitosan-coated magnetic nanoparticles with tris (hydroxymethyl) phosphine as an optional coupling agent. *International journal of molecular sciences*, 16(6), 12499-12512.
- Errington, J., & Aart, L. T. v. d. (2020). Microbe Profile: *Bacillus subtilis*: model organism for cellular development, and industrial workhorse. *Microbiology*, 166(5), 425-427.
- Ferraz, C. R., Arrahman, A., Xie, C., Casewell, N. R., Lewis, R. J., Kool, J., & Cardoso, F. C. (2019). Multifunctional toxins in snake venoms and therapeutic implications: From pain to hemorrhage and necrosis. *Frontiers in ecology and evolution*, 7, 218.
- Giri, S. S., Sukumaran, V., Sen, S. S., Oviya, M., Banu, B. N., & Jena, P. K. (2011). Purification and partial characterization of a detergent and oxidizing agent stable alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* VSG-4 of tropical soil. *The Journal of Microbiology*, 49, 455-461.
- Hajipour, F., Asad, S., Amoozgar, M. A., Javidparvar, A. A., Tang, J., Zhong, H., & Khajeh, K. (2021). Developing a fluorescent hybrid nanobiosensor based on quantum dots and azoreductase enzyme for methyl red monitoring. *Iranian Biomedical Journal*, 25(1), 8.
- Jung, M. R., Horgen, F. D., Orski, S. V., Rodriguez, V., Beers, K. L., Balazs, G. H., Jones, T. T., Work, T. M., Brignac, K. C., & Royer, S.-J. (2018). Validation of ATR FT-IR to identify polymers of plastic marine debris, including those ingested by marine organisms. *Marine pollution bulletin*, 127, 704-716.
- Kumar, A., Singh, S., Tiwari, R., Goel, R., & Nain, L. (2017). Immobilization of indigenous holo cellulase on iron oxide (Fe₂O₃) nanoparticles enhanced hydrolysis of alkali pretreated paddy straw. *International journal of biological macromolecules*, 96, 538-549.
- Maghraby, Y. R., El-Shabasy, R. M., Ibrahim, A. H., & Azzazy, H. M. E.-S. (2023). Enzyme immobilization technologies and industrial applications. *ACS omega*, 8(6), 5184-5196.
- Mane, R., & Bapat, M. (2001). A study of extracellular alkaline protease from *Bacillus subtilis* NCIM 2713.
- Moradian, F., Khajeh, K., Naderi-Manesh, H., & Sadeghizadeh, M. (2009). Isolation, purification and characterization of a surfactants-, laundry detergents- and organic solvents-resistant alkaline protease from *Bacillus* sp. HR-08. *Applied biochemistry and biotechnology*, 159, 33-45.
- Nandiyanto, A. B. D., Oktiani, R., & Ragadhita, R. (2019). How to read and interpret FTIR spectroscopy of organic material. *Indonesian Journal of Science and Technology*, 4(1), 97-118.
- Rajan, A. S., Sampath, S., & Shukla, A. K. (2014). An in situ carbon-grafted alkaline iron electrode for iron-based accumulators. *Energy & Environmental Science*, 7(3), 1110-1116.

- Rao, C. S., Sathish, T., Ravichandra, P., & Prakasham, R. S. (2009). Characterization of thermo-and detergent stable serine protease from isolated *Bacillus circulans* and evaluation of eco-friendly applications. *Process Biochemistry*, 44(3), 262-268.
- Santos, A. C., Alves, S., Godinho, M. H., Baleizão, C., & Farinha, J. P. S. (2018). Temperature-responsive fibres of cellulose-based copolymers. *Polymer Chemistry*, 9(26), 3615-3623.
- Shahmoradi, A. R., Bejandi, M. S., Rasanani, E. H., Javidparvar, A. A., & Ramezanzadeh, B. (2023). Graphene oxide nano-layers functionalized/reduced by L-Citrulline/Pectin bio-molecules for epoxy nanocomposite coating mechanical properties reinforcement. *Progress in Organic Coatings*, 178, 107493.
- Shinde, U., & Thomas, G. (2011). Insights from bacterial subtilases into the mechanisms of intramolecular chaperone-mediated activation of furin. *Protein convertases*, 59-106.
- Sujitha, P., & Shanthi, C. (2023). Importance of enzyme specificity and stability for the application of proteases in greener industrial processing-a review. *Journal of Cleaner Production*, 138915.
- Thakur, K., Attri, C., & Seth, A. (2021). Nanocarriers-based immobilization of enzymes for industrial application. *3 Biotech*, 11(10), 427.
- Wei, X., Li, Q., Hao, H., Yang, H., Li, Y., Sun, T., & Li, X. (2020). Preparation, physicochemical and preservation properties of Ti/ZnO/in situ SiO₂ chitosan composite coatings. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(2), 570-577.
- Weiergräber, O., Schwarten, M., Strodel, B., & Willbold, D. (2017). Investigating structure and dynamics of Atg8 family proteins. *Methods in enzymology*, 587, 115-142.
- Xin, M., Liu, D. P., Yu, N. S., Qi, X. H., & Li, H. (2012). Luminescence properties of ZnS: Cu, Tm semiconductor nanocrystals synthesized by a hydrothermal process. *Advanced Materials Research*, 415, 499-503.