

تهیه و تعیین ویژگی‌های نانوذره کاتالاز

سحر دهقانی، صدیقه هاشم‌نیا⁺، محمود پاک‌نیت

دانشکده علوم پایه، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران

چکیده: در این مطالعه نانوذره‌های کاتالاز با روش حلال‌زدایی تهیه شدند. فاکتورهای مؤثر بر فرایند سنتز مانند اتانول (عامل حلال‌زدا)، گلو تار آلدهید (عامل اتصال دهنده عرضی)، سرعت چرخش و زمان سنتز بهینه شدند. ویژگی‌های نانوذره‌های به دست آمده شامل اندازه ذره‌ها، ریخت شناسی سطح و تغییرهای ساختاری آن‌ها با استفاده از روش‌های مرئی - فرابنفش (UV-Visible)، پراکنندگی نور دینامیکی (DLS)، میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و طیف سنجی فروسرخ تبدیل فوریه (FT-IR) تعیین شدند. هم چنین، پارامترهای سینتیکی نانوذره‌ها بر اساس معادله میکائلیس - منتن تعیین شدند. نتیجه‌های به دست آمده از بهینه‌سازی شرایط سنتز نانوذره‌ها نشان داد که نانوذره‌های به دست آمده از برهم‌کنش ۱ میلی‌لیتر کاتالاز ۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر، ۴ میلی‌لیتر اتانول و گلو تار آلدهید ۰/۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در محیط بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار و pH ۷/۰، تا ۷۰٪ فعالیت آنزیمی باقی می‌ماند. در این شرایط شعاع متوسط نانوذره‌های سنتز شده ۵۳۸ نانومتر می‌باشد. بررسی طیف‌های فرابنفش - مرئی و فروسرخ نشان داد که تغییرهای ساختاری نانوذره‌ها در سطح ساختار سوم و دوم صورت می‌پذیرد. بررسی پارامترهای سینتیکی آنزیم طبیعی و نانوذره آنزیمی نشان داد که در مقایسه با آنزیم کاتالاز، ضمن افزایش K_m مقدار V_{max} برای نانوذره سنتز شده ثابت می‌ماند. پایداری فیزیکی نانوذره‌های کاتالاز نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه‌ها نشان داد که پس از ۷۲ ساعت نگهداری نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سلسیوس، نانوذره کاتالاز تنها ۲۰ درصد از فعالیت خود را از دست می‌دهد در صورتی که کاتالاز طبیعی در همان شرایط ۵۵ درصد از فعالیت خود را از دست می‌دهد که دلالت دارد بر این که نانوذره‌های کاتالاز پایداری تراز مولکول‌های کاتالاز هستند. بنابراین نانوذره‌های کاتالاز توان بالقوه زیادی در تولید آنزیم‌های پایدار برای کاربردهای گوناگون دارند.

واژگان کلیدی: کاتالاز، نانوذره پروتئینی، حلال‌زدایی

KEYWORDS: Catalase, Protein nanoparticles, Desolvation

مقدمه

از رادیکال‌های آزاد اکسیژن کم‌تر است، اما می‌تواند به طور مستقیم پروتئین‌ها را اکسید کند و منجر به آسیب‌های سلولی شود [۱]. فناوری نانو به عنوان یک رویکرد جدید در همه رشته‌های دانش و مهندسی تعریف شده است که با طراحی، سنتز، مشخصه‌یابی و کاربرد مواد در دستگاه‌ها و سامانه‌ها با کنترل اندازه

کاتالاز (EC:1.11.1.6; H_2O_2 : H_2O_2 Oxidoreductase) یک آنزیم از گروه اکسیدوردکتازها بوده که عملکرد اصلی آن تجزیه هیدروژن پروکسید به آب و اکسیژن می‌باشد. هیدروژن پروکسید یک فراورده طبیعی متابولیسم بدن، یک مسموم کننده سلولی و یکی از گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) است. اگرچه واکنش‌پذیری آن

* عهده دار مکاتبات

+E-mail: shashemnia@pgu.ac.ir

(۱) Reactive Oxygen Species

بخش تجربی

مواد و تجهیزات

در این مطالعه، کاتالاز استخراج شده از کبد گاو (BLC)، از شرکت Sigma-Aldrich و پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات، دی‌سدیم هیدروژن فسفات دوازده آبه، هیدروژن پروکسید ۳۰٪ خلوص تجزیه‌ای، گلو تار آلدئید ۲۵٪ حجمی و اتانول مطلق از شرکت Merck مورد استفاده قرار گرفت. همه مواد مورد استفاده با درجه خلوص بالای تجزیه‌ای تهیه و محلول‌ها با آب دوبر تقطیر و در دمای آزمایشگاه تهیه شدند.

اندازه و چگونگی توزیع اندازه مولکول‌های کاتالاز و نانوذره‌های تهیه شده از آن با استفاده از دستگاه زتا سایزر (Zetasizer) ساخت شرکت مالورن (Malvern) به روش پراکندگی نور دینامیکی (DLS) تعیین شد. ریخت شناسی نانوذره‌ها با استفاده از ثبت تصاویرهای میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) با دستگاه KYKY-EM3200 تعیین شد. طیف فرسرخ برای هر دو نمونه کاتالاز و نانوذره‌های آن با استفاده از دستگاه FT-IR ساخت شرکت PerkinElmer ثبت شد. طیف‌های مربوط به آنزیم طبیعی و نانوذرات آن، در محدوده‌ی طول موجی ۲۰۰ - ۸۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر فرابنفش - مرئی دوپرتوی Analytikjena مدل Specord 250 ثبت شدند.

تعیین غلظت محلول ذخیره کاتالاز

محلول پروتئین کاتالاز طیف نوری مشخصی در ناحیه مرئی دارد که دارای جذب بیشینه در طول موج ۴۰۵ نانومتر است. ضریب جذب مولی کاتالاز کبد گاو در این طول موج $3/24 \times 10^5$ بر مولار بر سانتی‌متر گزارش شده است [۱۱]. در اینجا بر اساس قانون بی‌یر - لامبرت، از جذب نوری محلول پروتئینی در طول موج ۴۰۵ نانومتر به عنوان معیاری جهت تعیین غلظت کاتالاز استفاده شده است.

تهیه محلول پراکسید هیدروژن

در همه آزمایش‌ها محلول پراکسید هیدروژن به‌صورت روزانه تهیه شد. تعیین غلظت محلول تهیه شده به‌صورت اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۴۰ نانومتر و با استفاده از ضریب جذب $44/6$ بر مولار بر سانتی‌متر صورت گرفت [۱۲].

مواد در مقیاس نانومتری سروکار دارد [۲].

نانوذره‌ها به دو دسته‌ی آلی و غیرآلی تقسیم می‌شوند. نانوذره‌های زیستی می‌توانند از مواد گوناگون مانند پلی‌مرهای سنتزی، پلی‌ساکاریدها، اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها تهیه شوند. که در میان این‌ها پروتئین‌ها نقش مهم‌تری را بازی می‌کنند، چرا که افزون بر زیست تخریب پذیر بودن، زیست سازگاری و کم بودن خاصیت ایمونوژنیسیته از پایداری بالا، قابل متابولیسم بودن، سمیت کم، ارزش غذایی بالا، ایجاد ساختار یکنواخت، توانایی اتصال به داروهای متنوع و تهیه آسان برخوردار هستند [۳،۴].

تشکیل نانوذره‌های پروتئینی براساس تعادل بین نیروهای جاذبه و دافعه در پروتئین‌ها استوار است [۵]. به طور کلی دو عامل، واتابی^۱ پروتئین و کاهش برهم‌کنش‌های آب‌گریز درون مولکولی تعیین کننده تشکیل نانوذره‌های پروتئینی هستند. در طی تشکیل چنین ذره‌هایی، با توجه به نوع، غلظت، روش‌های اتصال عرضی و شرایط تهیه مانند قدرت یونی و نوع حلال، پروتئین متحمل تغییرهای صورت‌بندی می‌شود [۶]. قطر یک مولکول پروتئین/ آنزیم در محلول به تقریب ۱۰ نانومتر است. وقتی که مولکول‌های آنزیم به حدود ۱۰۰ نانومتر مترکم شوند به صورت توده^۲ در می‌آیند. توده‌های آنزیمی به صورت جمعی از خوشه‌های تشکیل شده از مولکول‌های آنزیم در اندازه‌های بین ۱۰ تا ۱۰۰ نانومتر دیده شده و به عنوان نانوذره‌های آنزیمی (ENPs)^۳ نامیده می‌شوند. نانوذره‌های آنزیمی ویژگی‌های بی‌مانند نوری، الکتریکی، الکترونیکی، گرمایی، شیمیایی، مکانیکی و کاتالیتیکی (توانایی تسهیل انتقال الکترون) همراه با پایداری خوب و قابلیت زیست سازگاری از خود نشان می‌دهند [۷-۱۰].

عمده‌ترین روش‌های سنتز نانوذرات پروتئینی شامل سه روش، امولسیون سازی^۴، حلال‌زدایی^۵، هم‌رسوبی^۶ و روش خشک کردن الکترواسپری^۷ که به نسبت کم‌تر استفاده شده است، می‌شوند [۲]. در این مطالعه نانوذره‌های کاتالاز به عنوان یک مدل آنزیمی با روش حلال‌زدایی و با استفاده از اتانول و گلو تار آلدئید به ترتیب به عنوان عامل حلال‌زدا و عامل اتصال دهنده عرضی تهیه شدند. فاکتورهای مؤثر بر فرآیند سنتز مانند مقدار اتانول، مقدار گلو تار آلدئید، سرعت چرخش و مدت زمان سنتز بهینه شدند. ویژگی‌های نانوذره‌های به دست آمده شامل، اندازه ذره‌ها، ریخت شناسی سطح و تغییرهای ساختاری آن‌ها با استفاده از روش‌های اسپکتروسکوپی بررسی و همچنین پارامترهای سینتیکی نانوذره‌ها، تعیین شدند.

(۱) Unfolding

(۳) Enzyme nanoparticle

(۵) Desolvation

(۷) Electrospray drying

(۲) Aggregates

(۴) Emulsification

(۶) Coacervation

سنتر نانو ذره‌های آنزیم کاتالاز

به منظور تهیه نانوذره‌های آنزیم کاتالاز با استفاده از روش حلال‌زدایی، ۱ میلی‌لیتر محلول کاتالاز با غلظت ۷۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، در یک بشر ۲۵ میلی‌لیتری ریخته شد و درون یک ظرف دارای یخ (به منظور نگهداری آنزیم در دمای پایین و جلوگیری از غیرفعال شدن آن)، به همراه یک مگنت بر روی همزن مغناطیسی قرار داده شد. سرعت چرخش همزن در ۲۵۰ دور در دقیقه تنظیم شد. سپس ۴ میلی‌لیتر از اتانول به صورت تدریجی و قطره قطره (۵۰۰ میکرولیتر در دقیقه) به محلول آنزیمی افزوده شد. در این حالت محلول کم‌کم کدر و ذرات ریزی (توده‌های پروتئینی) تشکیل شد. پس از این مرحله حلال‌زدایی، ۱۱/۴ میکرولیتر از محلول گلو تار آلدهید ۸٪ وزنی/وزنی (معادل ۱۲/۰ میلی‌گرم گلو تار آلدهید) به محلول کلوییدی افزوده شد. و به مدت ۱۲ ساعت در درون یخچال قرار داده شد. پس از گذشت این مدت زمان، محلول به همراه رسوب‌های تشکیل شده در یک لوله سانتریفیوژ ریخته شد. پس از آن به منظور جداسازی رسوب‌ها (یا توده‌های تشکیل شده)، سه دور سانتریفیوژ با قدرت ۴۰۰۰ دور در دقیقه و هر دور به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. محلول رویی از رسوب‌ها جدا و به رسوب تشکیل شده در لوله سانتریفیوژ ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات با غلظت ۵۰ میلی‌مولار و pH ۷/۰ افزوده شد. پخش توده‌های پروتئینی در محیط بافری به مدت ۱۰ دقیقه توسط دستگاه فراصوت صورت گرفت. به این ترتیب نانوذره‌های آنزیم کاتالاز تشکیل شد. طیف جذبی هر دو، محلول رویی و نانوذره‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر، به منظور تعیین غلظت کاتالاز در آن‌ها گرفته شد.

به منظور بررسی تأثیر عامل‌های گوناگون درگیر در سنتز بر ویژگی نانوذره‌ها و به دست آوردن بهترین شرایط بهینه سنتز، آزمایش با استفاده از حجم‌های گوناگون اتانول، غلظت‌های گوناگون گلو تار آلدهید و کاتالاز، سرعت‌های چرخش و زمان‌های سنتز متفاوت در آب مقطر (محیط آب) و بافر فسفات (محیط بافری) انجام شد.

تعیین فعالیت کاتالاز

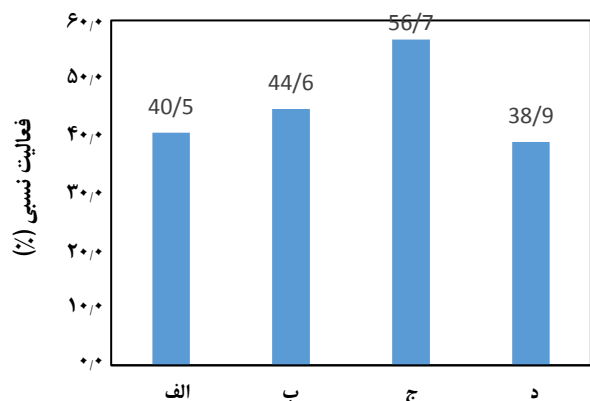
نظر به این که هر گونه تغییر در صورت بندی بخش پروتئینی بر فعالیت آنزیم تأثیر دارد در همه بررسی‌ها فعالیت آنزیمی به عنوان یک عامل تعیین کننده ارتباط بین ساختار و عملکرد مورد بررسی قرار گرفته است. فعالیت کاتالاز بر اساس اندازه‌گیری سرعت

تجزیه‌ی هیدروژن پروکسید در طول موج ۲۴۰ نانومتر تعیین می‌شود. بدین منظور به ۱ میلی‌لیتر محلول هیدروژن پراکسید ۱۰ میلی‌مولار موجود در کووت اسپکتروفوتومتر، ۱۰۰ میکرولیتر محلول کاتالاز یا (نانوذره‌های کاتالاز) افزوده شد. پس از هم زدن ملایم محلول واکنش موجود در کووت، اندازه‌گیری کاهش جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر در مدت زمان یک دقیقه صورت گرفت. شیب منحنی تغییرهای جذب بر حسب زمان در فاصله‌ی زمانی ۰ تا ۲۰ ثانیه‌ی اول واکنش به عنوان معیاری از فعالیت کاتالاز در نظر گرفته شد [۱۳، ۱۲]. این کار به طور میانگین برای ۵ بار تکرار شد و میانگین شیب منحنی‌ها تعیین شد. به منظور تعیین پارامترهای سینتیکی کاتالاز و نانوذره‌های آن، همین کار در غلظت‌های گوناگون هیدروژن پروکسید انجام شد. شایان ذکر است جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی برای مرحله‌های بهینه‌سازی، محلول کاتالاز (یا نانوذره‌های کاتالاز) تا سطح 10^{-7} تا 2×10^{-8} مولار رقیق شد.

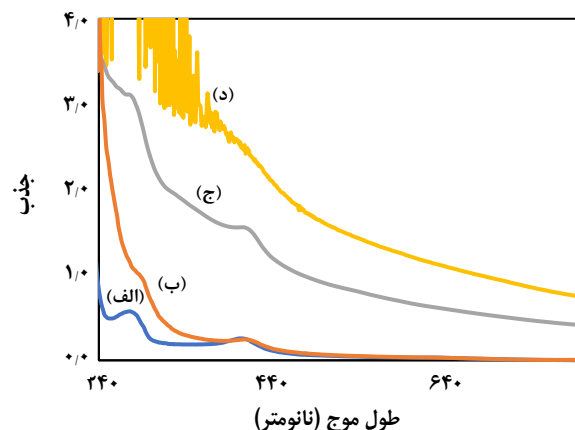
نتیجه‌ها و بحث**بهینه‌سازی شرایط تهیه نانوذره‌های آنزیم کاتالاز**

همان‌گونه که گفته شد یکی از عامل‌های تأثیر گذار در سنتز نانوذره‌های آنزیم کاتالاز مقدار اتانول مصرفی است. شکل ۱ طیف جذب فرابنفش - مرئی محلول کاتالاز و نانوذرات کاتالاز تهیه شده از آن در حجم‌های گوناگون اتانول که در حجم ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار، pH برابر ۷۰ حل شده اند، را نشان می‌دهد. همان‌گونه که دیده می‌شود کاتالاز طبیعی (طیف A) جذب بیشینه در حدود ۲۸۰ نانومتر را نشان می‌دهد که مربوط به انتقال‌های $\pi \rightarrow \pi^*$ آمینواسیدهای آروماتیک موجود در ساختار پروتئین بوده و باند جذبی دیده شده در ناحیه ۴۰۵ نانومتر مربوط به انتقال‌های $\pi \rightarrow \pi^*$ در سامانه هم کاتالاز می‌باشد [۱۶-۱۴]. مقایسه طیف جذبی نانوذره‌های کاتالاز مربوط به حجم‌های ۶ و ۱۰ اتانول (طیف‌های C و D) با طیف جذبی کاتالاز، نشان می‌دهد که اتانول باعث افزایش شدت جذب پروتئین شده و جذب بیشینه در طول موج ۲۸۰ و ۴۰۵ نانومتر به سمت طول موج‌های بلندتر جابه جا شده است. این افزایش جذب به دلیل پراکندگی نور ناشی از تشکیل ذره‌های بزرگ است. در طیف جذبی مربوط به نانوذره‌های تهیه شده با حجم ۴ میلی‌لیتر اتانول شدت پیک در طول موج ۲۸۰ نانومتر افزایش یافته ولی شکل کلی طیف حفظ شده است.

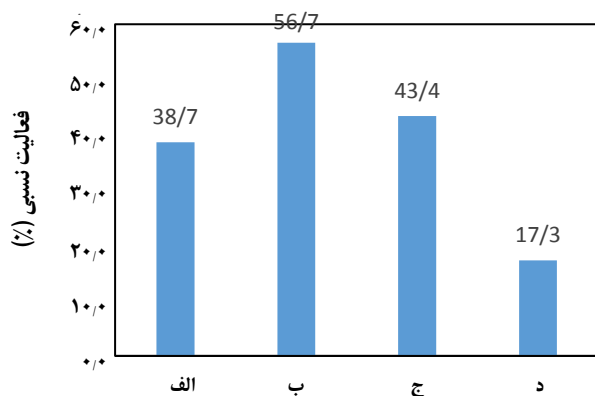
(۱) Supernatant



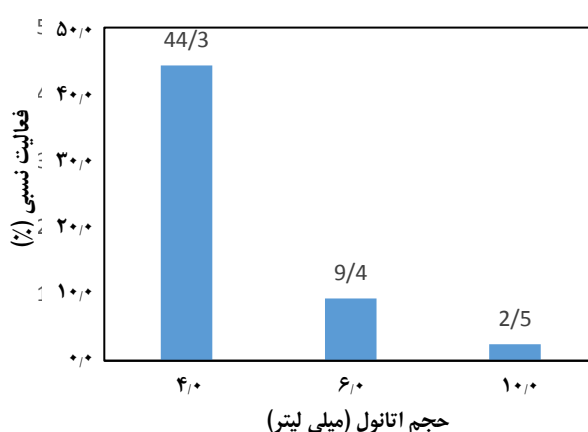
شکل ۳ - درصد فعالیت نسبی نانوذره‌های کاتالاز در حضور غلظت‌های (الف) ۰، (ب) ۰/۰۲، (ج) ۰/۱۲ و (د) ۰/۱۶ میلی گرم بر میلی لیتر گلو تار آلدهید



شکل ۱ - طیف‌های جذب فرابنفش-مرئی کاتالاز طبیعی و نانوذره‌های تهیه شده از آن با روش حلال زدایی در حجم‌های گوناگون از اتانول. (الف) ۰، (ب) ۰/۰۴، (ج) ۰/۰۶ و (د) ۰/۱۰ میلی لیتر اتانول



شکل ۴ - درصد فعالیت نسبی نانوذره‌های کاتالاز در سرعت‌های چرخش (الف) ۰، (ب) ۲۵۰، (ج) ۵۰۰ و (د) ۷۵۰ دور بر دقیقه

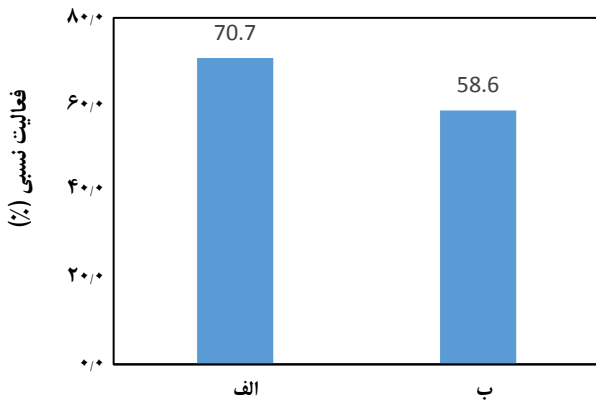


شکل ۲ - درصد فعالیت نسبی نانوذره‌های کاتالاز تهیه شده با روش حلال زدایی در حجم‌های ۰/۰۴، ۰/۰۶ و ۰/۱۰ میلی لیتر اتانول

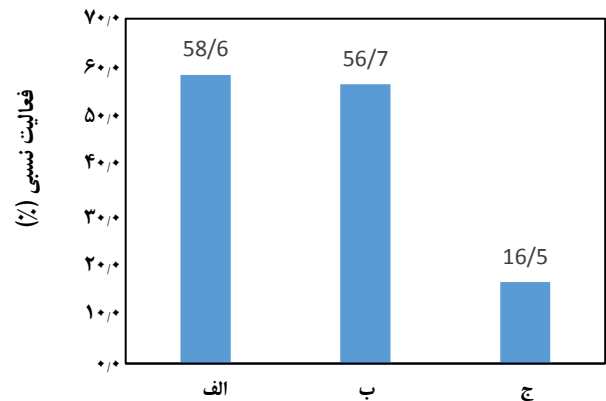
بررسی اثر مقدار گلو تار آلدهید بر سنتز نانوذره‌های کاتالاز، نشان می‌دهد که در حضور گلو تار آلدهید با غلظت ۱۲ میلی گرم بر میلی لیتر، نانوذره‌های کاتالاز بیشترین فعالیت نسبی برابر با ۵۶/۶٪ را از خود نشان می‌دهند (شکل ۳). گلو تار آلدهید یک آلدهید دو عاملی با فرمول شیمیایی $C_5O_2H_8$ بوده که به منظور برقراری اتصال عرضی میان نانوذره‌ها و بنابراین پایدار شدن ذره‌ها پس از فرآیند حلال زدایی به سامانه افزوده می‌شود.

سرعت چرخش محلول حاوی پروتئین یک عامل تاثیر گذار دیگر بر اندازه نانو ذره‌ها می‌باشد. در سرعت چرخش ۲۵۰ دور در دقیقه، درصد فعالیت نسبی به دست آمده (۵۶/۶٪) بیش تر می‌باشد (شکل ۴).

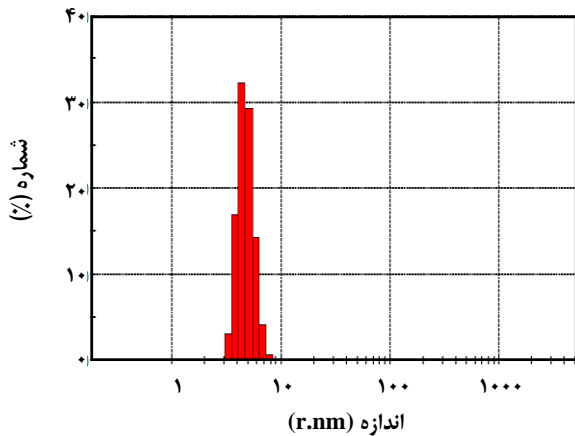
شکل ۲، درصد فعالیت نانوذره‌های کاتالاز سنتز شده نسبت به کاتالاز طبیعی را نشان می‌دهد. همان‌گونه که دیده می‌شود نانوذره‌های سنتز شده در حضور گلو تار آلدهید ۲/۰ میلی گرم بر میلی لیتر با حجم ۴ میلی لیتر اتانول درصد فعالیت نسبی (۴۴/۳٪) بیش تری از خود نشان می‌دهند. بنابراین با توجه به طیف جذبی که نشان می‌دهد ساختار کلی آنزیم بهتر حفظ شده است و همچنین بیش تر بودن فعالیت نسبی نانوذره‌های کاتالاز به دست آمده در این مقدار از اتانول، حجم ۴ میلی لیتر اتانول به عنوان حجم بهینه انتخاب شد. به نظر می‌رسد که در مقدارهای بالای اتانول، تشکیل توده‌های با اندازه بزرگ، موجب تغییرهای چشمگیر در ساختار سوم پروتئین و کاهش بیش تر در فعالیت آنزیم شده است.



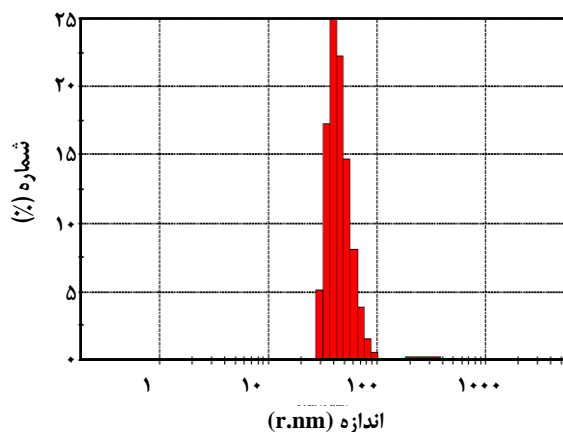
شکل ۶- درصد فعالیت نسبی نانوذره‌های کاتالاز تهیه شده در (الف) محیط بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (pH = ۷)، (ب) محیط آب.



شکل ۵- درصد فعالیت نسبی نانوذره‌های کاتالاز در زمان‌های (الف) ۱۲، (ب) ۲۴ و (ج) ۳۶ ساعت.



شکل ۷- نمودار درصد تعداد ذره‌های کاتالاز طبیعی بر حسب اندازه شعاع ذره‌ها.



شکل ۸- نمودار درصد تعداد نانوذره‌های کاتالاز سنتز شده در محیط آبی بر حسب اندازه شعاع ذره‌ها.

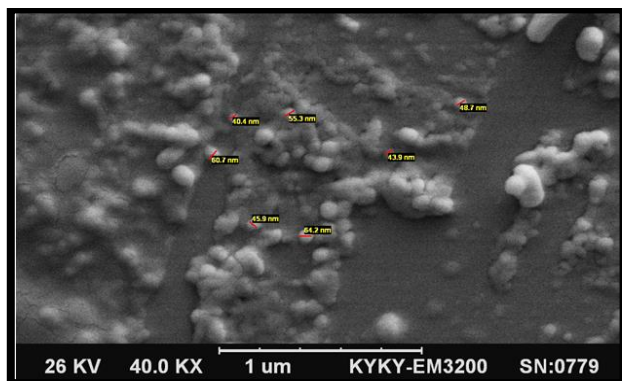
مدت زمان لازم برای تکمیل فرآیند سنتز نانوذره کاتالاز عامل موثر دیگری است که در این پروژه مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه‌های به‌دست آمده نشان می‌دهند که در فاصله زمانی ۱۲ تا ۲۴ ساعت واکنش تشکیل نانو ذره کامل می‌شود و فعالیت نسبی نانوذره‌های به‌دست آمده در این فاصله زمانی تغییر نمی‌کند.

با به‌کار بردن تمام شرایط بهینه به‌دست آمده در محیط آب (۱/۰ میلی گرم کاتالاز، ۴ میلی لیتر اتانول، ۰/۱۲ میلی گرم بر میلی لیتر گلوکونارآلدئید، سرعت چرخش ۲۵۰ دور در دقیقه و مدت زمان سنتز ۱۲ ساعت)، همه مرحله‌های سنتز در محیط بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (pH ۷/۰) انجام شد. نتیجه‌های به‌دست آمده نشان می‌دهد که در این شرایط فعالیت نسبی نانو ذره‌های سنتز شده (۷۰/۷٪) بیشتر از محیط آبی می‌باشد و مدت زمان لازم برای کامل شدن سنتز نانوذره در محیط بافری کم‌تر از ۱۲ ساعت بوده و فاصله زمانی ۲ ساعت برای تشکیل نانوذره‌ها کافی است (شکل ۶).

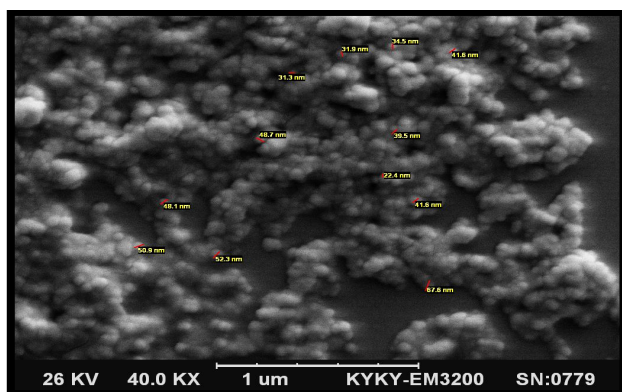
تعیین اندازه نانوذره‌ها با استفاده از DLS

نمودار درصد تعداد ذره‌ها بر حسب شعاع برای محلول کاتالاز در شکل ۷ نشان داده شده است. همان‌گونه که ملاحظه می‌شود برای کاتالاز طبیعی، محدوده شعاع ذرات بین ۷/۸-۳/۲ نانومتر بوده و بیش‌ترین درصد تعداد ذره‌ها دارای متوسط شعاع ۴/۴ نانومتر می‌باشند. شکل ۸ نمودار درصد تعداد ذره‌ها بر حسب شعاع برای محلول نانوذره‌های سنتز شده در محیط آبی را نشان می‌دهد. همان‌گونه که دیده می‌شود ۹۸/۲ درصد تعداد ذره‌ها دارای متوسط شعاع ۴۵/۵ نانومتر و ۱/۶ درصد ذره‌ها دارای متوسط شعاع ۲۸۸/۰ نانومتر می‌باشند.

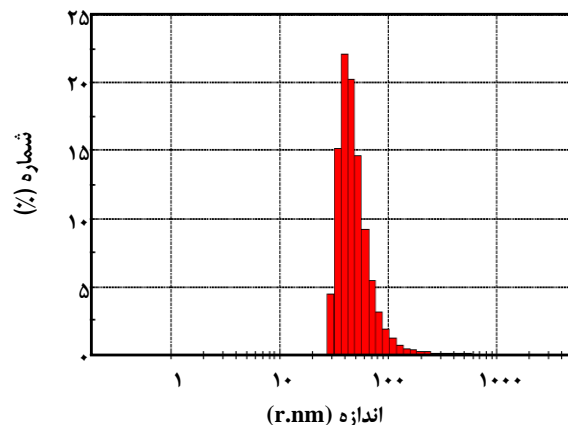
شکل ۹ نمودار درصد تعداد ذره‌ها بر حسب شعاع را برای محلول نانوذره‌های سنتز شده در محیط بافر فسفات، نشان می‌دهد. همان‌گونه



شکل ۱۰- تصویر SEM مربوط به کاتالاز طبیعی



شکل ۱۱- تصویر SEM مربوط به نانوذره‌های کاتالاز.



شکل ۹- نمودار درصد تعداد نانو ذره‌های کاتالاز سنتز شده در محیط بافر فسفات بر حسب اندازه شعاع ذره‌های.

که دیده می‌شود ۱۰۰/۰ درصد تعداد ذره‌های دارای متوسط شعاع ۵۳/۸ نانومتر می‌باشند.

مقایسه میان نمودارهای DLS نانوذره‌های کاتالاز و کاتالاز طبیعی نشان می‌دهند که مولکول‌های کاتالاز حلال‌زدایی شده به طور مناسب و کنترل شده‌ای، انباشته شده‌اند و توده‌های آنزیمی اندازه نانومتری را تشکیل داده‌اند. از بین نانوذره‌های سنتز شده، نانو ذره‌های تهیه شده در محیط بافر فسفات به دلیل داشتن فعالیت آنزیمی بیشتر و پراکندگی اندازه نانوذره‌های کوچک‌تر برای آنالیزهای SEM و FTIR و همچنین سایر بررسی‌های دیگر انتخاب شد.

آنالیز SEM نانوذره‌های کاتالاز

ریخت شناسی کاتالاز طبیعی و نانوذره‌های کاتالاز با استفاده از فناوری SEM تعیین شد، که به ترتیب در شکل‌های ۱۰ و ۱۱ نشان داده شده‌اند. همان طور که دیده می‌شود ذره‌های دارای شکل کروی و دانه‌ای بوده و تراکم تعداد نانوذره‌های کاتالاز نسبت به مولکول‌های آنزیم کاتالاز به طور چشمگیری بیشتر می‌باشد. با استفاده از این روش اندازه قطر ذره‌ها در بازه ۳۲-۶۸ نانومتر به دست آمده که به طور چشمگیری کم‌تر از میانگین اندازه ذره‌های گزارش شده از روش DLS می‌باشد. با توجه به این که آنالیز DLS میانگین اندازه ذره‌ها در محلول را نشان می‌دهد و روش‌های میکروسکوپی اندازه ذره‌های خشک را نشان می‌دهند، این تفاوت اندازه گزارش شده دور از انتظار نمی‌باشد.

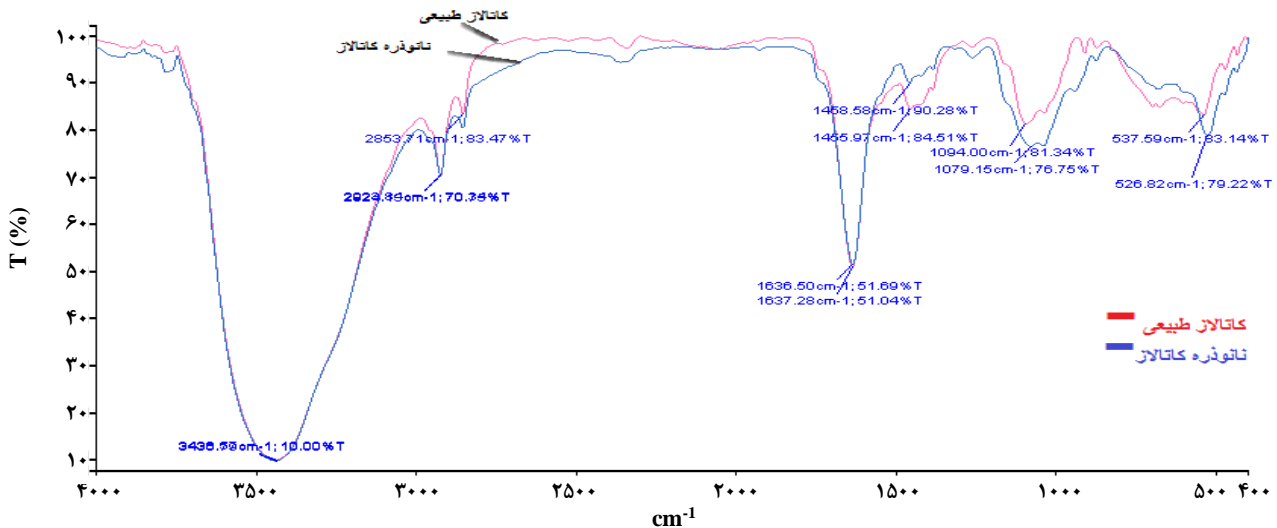
آنالیز طیف FT-IR نانوذره‌های کاتالاز

شکل (۱۲) طیف‌های FT-IR در بازه فرکانسی 4000 Cm^{-1} تا 400 Cm^{-1} کاتالاز طبیعی و نانوذره‌های کاتالاز را نشان می‌دهد. همان‌گونه که دیده می‌شود در هر دو طیف پیک دیده شده در ناحیه حدود 3400 Cm^{-1} مربوط به ارتعاش کششی باند O-H و باند حدود 1637 Cm^{-1} ناشی از ارتعاش کششی C=O نشانه‌ی ناحیه آمیدی I، فرکانس 1456 Cm^{-1} مربوط به ناحیه آمیدی II و پیک ضعیف در فرکانس 1094 Cm^{-1} نشانه‌ی ناحیه آمیدی III است.

دیدن پیک در ناحیه حدود 530 Cm^{-1} مربوط به گروه هم در ساختار پروتئین می‌باشد. در طیف FT-IR نانوذرات کاتالاز، شدت و موقعیت پیک در ناحیه آمیدی I بدون تغییر باقی مانده است. شدت پیک مربوط به ناحیه آمیدی II کاهش پیدا کرده در حالی که شدت پیک در ناحیه آمیدی III افزایش پیدا کرده است. هم‌چنین جابجایی باندها در ناحیه آمیدی III نیز دیده می‌شود (جدول ۱). این تغییرها نشان دهنده تغییر در ساختار دوم پروتئین به دلیل واکنش حلال‌زدایی و تشکیل نانوذره‌های آنزیمی است.

جدول ۱ - عدددهای موج شاخص به دست آمده از طیف فروسرخ کاتالاز طبیعی و نانوذره کاتالاز

اعداد موج شاخص کاتالاز طبیعی (cm ⁻¹)	اعداد موج شاخص نانوذره کاتالاز (cm ⁻¹)	گروه عاملی مربوط
۳۴۳۷	۳۴۳۷	ارتعاش کششی بانده O-H
۱۶۳۷	۱۶۳۷	ناحیه آمیدی I
۱۴۵۶	۱۴۵۹	ناحیه آمیدی II
۱۰۹۴	۱۰۷۹	ناحیه آمیدی III
۵۳۸	۵۲۷	گروه هم در ساختار پروتئین



شکل ۱۲ - طیف مادون قرمز کاتالاز طبیعی و نانوذره کاتالاز

تعیین پارامترهای سینتیکی نانوذرات کاتالاز

به منظور تعیین اثر تشکیل نانوذره کاتالاز بر سینتیک آنزیمی، فعالیت آنزیم طبیعی و نانوذره آنزیمی اندازه گیری شد. فعالیت آنزیم در واقع مقداری از آنزیم است که تبدیل ۱ میکرومول سوبسترا را در یک دقیقه کاتالیز می کند. به این منظور افزایش سرعت اولیه واکنش در مقابل افزایش غلظت هیدروژن پروکسید به عنوان سوبسترای آنزیم مورد بررسی قرار گرفت. رابطه میکائیلیس و منتن ارتباط بین سرعت اولیه واکنش و غلظت سوبسترا را بیان می کند (معادله (۱)).

طبق این رابطه می توان پارامترهای سینتیکی K_m و V_{max} را برای کاتالاز طبیعی و نانوذره آنزیمی را به دست آورد. معادله میکائیلیس - منتن را می توان از نظر جبری به معادلاتی تبدیل نمود که برای تهیه نمودار اطلاعات تجربی و به دست آوردن پارامترهای سینتیکی مفیدتر می باشند. یکی از این تغییرهای معمول، به طور ساده با روان کردن هر دو سوی معادله میکائیلیس - منتن به دست می آید که به عنوان معادله لاینیور - برک شناخته می شود (معادله (۲)، شکل (۱۴) [۱۷]). جدول ۲ پارامترهای سینتیکی

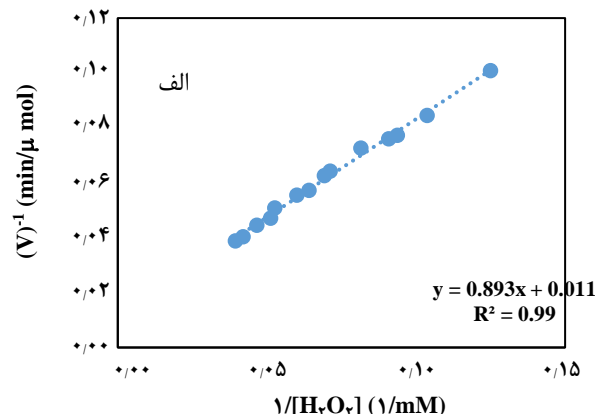
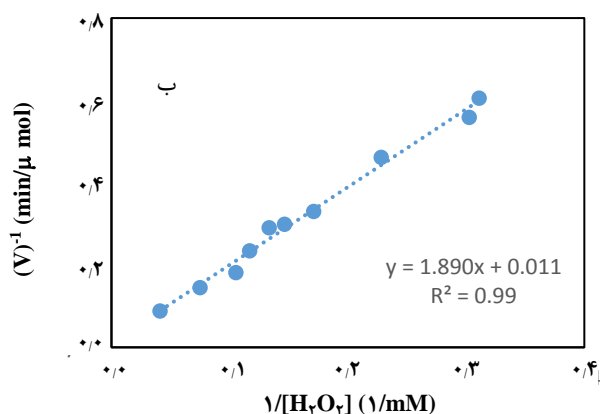
محاسبه شده از معادله لاینیور - برک را نشان می دهد. همان گونه که دیده می شود در اثر تشکیل نانوذره کاتالاز پارامتر سینتیکی V_{max} تغییر نمی نماید در حالی که K_m افزایش می یابد. به عبارت دیگر تغییر صورت بندی پروتئین به دلیل تشکیل نانوذره به طریقی است که تمایل آنزیم و سوبسترا به یکدیگر را کاهش داده و با افزایش مقدار K_m همراه شده است.

$$v = \frac{v_{max} \times [H_2O_2]}{K_m + [H_2O_2]} \quad (1)$$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{max}} + \frac{K_m}{v_{max}} \times \frac{1}{[H_2O_2]} \quad (2)$$

پایداری نانوذرات کاتالاز

از آنجا که پایداری یک عامل تعیین کننده برای کاربرد مناسب نانوذره ها است، در این جا پایداری فیزیکی نانوذره های کاتالاز مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه ها نشان داد که در بعد از ۷۲ ساعت نگهداری نمونه ها در دمای ۴ درجه سلسیوس کاهش فعالیت



شکل ۱۴- نمودار معکوس لاینویر-برک برای تعیین ثابت‌های V_{max} و K_m کاتالاز طبیعی (الف) و نانوذره کاتالاز (ب)

سینتیکی نیز نشان داد که در اثر تشکیل نانوذره کاتالاز پارامتر سینتیکی V_{max} بدون تغییر می‌ماند و پارامتر K_m نسبت به آنزیم طبیعی افزایش می‌یابد. که بیانگر تمایل کم‌تر نانوذره‌های آنزیم به برهمکنش با سوبسترای آنزیمی می‌باشد. بررسی پایداری فیزیکی نانوذرات کاتالاز نتیجه‌های نشان داد که بعد از ۷۲ ساعت نگهداری نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سلسیوس، نانوذره کاتالاز تنها ۲۰ درصد از فعالیت خود را از دست می‌دهد در صورتی که کاتالاز طبیعی در همان شرایط ۵۵ درصد از فعالیت خود را از دست می‌دهد که دلالت دارد بر این که نانوذرات کاتالاز پایدارتر از مولکول‌های کاتالاز هستند. بنابراین نانوذره‌های کاتالاز توان بالقوه زیادی در تولید آنزیم‌های پایدار برای کاربردهای گوناگون دارند. اگرچه امروزه توجه زیادی برای تهیه نانوذره‌های پروتئینی بویژه در فرایند انتقال دارو شده است، اما تهیه نانوذره‌های آنزیمی کم‌تر مورد توجه بوده است. نتیجه‌های به دست آمده از این مطالعه می‌تواند برای طراحی حسگرهای زیستی نوری و یا الکتروشیمیایی حساس به هیدروژن پروکسید مورد استفاده قرار گیرد.

قدردانی

نویسندگان از حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه خلیج فارس در اجرای پروژه قدردانی می‌نمایند.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱/۱۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۴/۱۱

جدول ۲- پارامترهای سینتیکی مربوط به کاتالاز طبیعی و نانوذره‌ها کاتالاز:

نمونه	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	K_m (mM)
کاتالاز طبیعی	۹۰٫۹	۸۱٫۲
نانوذره‌ها کاتالاز	۹۰٫۹	۱۷۱٫۸

کاتالاز طبیعی با زمان بسیار بیش‌تر از کاهش فعالیت نانوذره‌های کاتالاز است. در این فاصله زمانی نانوذره‌های ۸۰ درصد فعالیت اولیه خود را حفظ نمودند در صورتی که فقط ۴۵ درصد از فعالیت کاتالاز طبیعی حفظ شده بود.

نتیجه گیری

در این کار پژوهشی نانوذره‌های کاتالاز با استفاده از روش حلال‌زدایی تهیه شدند. نتیجه آنالیز SEM شاهد این بود که مولکول‌های کاتالاز حلال‌زدایی شده در شرایط بهینه، نانوذره‌های به دست آمده دارای شکل کروی و دانه‌ای بوده و تراکم تعداد نانوذره‌های کاتالاز نسبت به مولکول‌های آنزیم کاتالاز به طور چشمگیری بیش‌تر می‌باشد.

بر اساس آنالیز DLS متوسط شعاع نانوذرات ۵۳/۸ نانومتر می‌باشند. با به کار بردن شرایط بهینه در محیط بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (pH ۷/۰) تا ۷۰/۷٪ فعالیت آنزیمی باقی ماند. بررسی تغییرهای ساختاری این نانوذره‌ها با روش‌های اسپکتروسکوپی فروسرخ و فرابنفش - مرئی انجام شد. نتیجه‌های FT-IR نشان دادند که ساختار دوم پروتئین به دلیل واکنش حلال‌زدایی تغییر پیدا کرده است. نتیجه‌های به دست آمده از بررسی پارامترهای

مراجع

- [1] Mhamdi A., Noctor G., Baker A., Plant Catalases: Peroxisomal Redox Guardians, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **525**: 181-194 (2012).
- [2] Sundar S., Kundu J., Kundu S. C., Biopolymeric Nanoparticles, *Science and Technology of Advanced Materials*, **11:1**, 014104 (2010).
- [3] Zabihi F., Akbarnejad M.M., Vaziri Yazdi A., Arjomand M., Safekordi A.A., Drug Nanoparticles Formation by Supercritical Rapid Expansion Method; Operational Condition Effects Investigation, *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering (IJCCE)*, **30(1)**: 7-15 (2011).
- [4] Lohcharoenkal W., Wang L., Chen Y. C., Rojanasakul Y., Protein Nanoparticles as Drug Delivery Carriers for Cancer Therapy, *BioMed Research International*, **2014**: Article ID180549 (2014).
- [5] Ko S., Gunasekaran S., Preparation of Sub-100-Nm B-Lactoglobulin (BLG) Nanoparticles, *Journal of Microencapsulation*, **23**: 887-898 (2006).
- [6] Bock N., Woodruff M. A., Hutmacher D. W., Dargaville T. R., Electrospraying, a Reproducible Method for Production of Polymeric Microspheres for Biomedical Applications, *Polymers*, **3**:131-149 (2011).
- [7] Pundir C.S., "Enzyme Nanoparticles: Preparation, Characterisation, Properties and Applications", William Andrew, Elsevier (2015).
- [8] Chawla Sh., Rawal R., Ramrati S., Pundir C.S., Preparation of Cholesterol Oxidase Nanoparticles and Their Application In Amperometric Determination of Cholesterol, *Journal of Nanoparticle Research*, **15**: 1934- (2013).
- [9] Kundu N., Yadav S., Pundir C. S., Preparation and Characterization of Glucose Oxidase Nanoparticles and Their Application in Dissolved Oxygen Metric Determination of Serum Glucose, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, **13**, 1710-1716 (2013).
- [10] Chauhan N., Kumar A., Pundir C. S., Construction of an Uricase Nanoparticles Modified Au Electrode for Amperometric Determination of Uric Acid, *Applied Biochemistry Biotechnology*, **174**, 1683-1694 (2014).
- [11] Samejima T., Yang J., Reconstitution of Acid-Denatured Catalase, *Journal of Biological Chemistry*, **238**: 3256-3267 (1963).
- [12] Beers R., Sizer I., A Spectrophotometric Method for Measuring The Breakdown of Hydrogen Peroxide by Catalase, *Journal of Biological Chemistry*, **195**: 133-140 (1952).
- [13] Aebi H., Catalase in Vitro, *Methods in Enzymology*, **105**: 121-126 (1984).
- [14] Wang F., Huang W., Dai Z., Spectroscopic Investigation of the Interaction Between Riboflavin and Bovine Serum Albumin, *Journal of Molecular Structure*, **875**, 509-514 (2008).
- [15] Andrade A. A., Neto N.B., Misoguti L., Boni L. De, Zilio S.C., Mendonça C.R., Two-Photon Absorption Investigation in Reduced and Oxidized Cytochrome C Solutions, *Chemical Physics Letters*, **390**: 506-510 (2004).

[16] Li D., Ji B., Jin J., Spectrophotometric Studies on the Binding of Vitamin C to Lysozyme and Bovine Liver Catalase, *Journal of Luminescence*, **128**, 1399-1406 (2008).

[۱۷] موسوی موحدی، علی اکبر، صبوری، علی اکبر، سینتیک آنزیمی، مؤسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، (۱۳۷۵) ص ۱۱۴، ۱۱۵، ۱۱۷-۱۲۳.