

# پورفیرین فلزی M-TPP کمپلکس شده با سیستمین با بسترهای هیدروژلی و وسیکی به عنوان نانوزایم‌های پراکسیدازی و کاتالازی

زینب موسوی موحدی\*، یزدان سجادی مهر

پژوهشگاه شیمی و مهندسی شیمی ایران، تهران، ایران

محسن گلبن حقیقی

دانشکده علوم شیمی و نفت، دانشگاه شهید بهشتی، اوین، تهران، ایران

**چکیده:** پورفیرین‌ها را می‌توان به‌طور گسترده به‌عنوان بیوکمپلکس‌های جایگاه فعال در نظر گرفت، در این حال می‌توان از پورفیرین فلزی سنتزی بر مبنای زیست‌الگو (بیومیمتیک) به عنوان شبه‌آنزیم استفاده کرد. سیستم متشکل از کمپلکس فلز پورفیرین - سیستمین و پلیمر "پلی اتیلن گلیکول (پگ)" یا مواد سطحی فعال مخلوط "سدیم دودسیل سولفات و دودسیل تری اتیل آمونیوم بروماید (اس دی اس/دی تب)" برای ملل‌سازی کلروپراکسیداز طبیعی به کار برده می‌شود. کلروپراکسیداز طبیعی می‌تواند عملکرد پراکسیدازی، یعنی اکسید کردن سوسترها در pH های متفاوت داشته باشد. در غیاب سوسترای مناسب، کلروپراکسیداز هیدروژن پراکسید را تجزیه می‌کند و دارای فعالیت کاتالازی است. مثال - تترا(۲-پیریدیل) پورفیرین (M-TPP)، پررزونانس‌تر و دارای گروه‌های کشنده، قوی‌تر از همین (جایگاه فعال آنزیم طبیعی) در فعالیت شبه‌پراکسیدازی و کاتالازی عمل می‌کند. Fe-TTP دارای حداکثر فعالیت پراکسیدازی در میان فلز - پورفیرین‌ها با فلزات مرکزی از جمله آهن (III)، منگنز (III) و روی (II) است. جزء سه گانه: "Fe-TPP - سیستمین - پگ"، بیشترین کارایی را از طریق کاهش پارامتر میکائلیس - منتن ( $K_M$ ) دارا می‌باشد. مشاهده می‌شود که آبگریزی پورفیرین با تغییر فلز مرکزی به ترتیب به صورت آهن (III)، منگنز (III) و روی (II) افزایش می‌یابد. در این حالت آبگریزی بودن جایگاه فعال نانوزایم شبه‌پراکسیدازی پتانسیلی برای ورود بیشتر سوسترهای هیدروفوب (گایاکول) به چرخه واکنش و در نتیجه فعالیت و کارایی بیشتر Fe-TPP نسبت به کمپلکس‌های دیگر M-TPP است. در مرحله دیگر، برای طراحی کاتالیست زیستی کاتالازی، Mn-TPP دارای حداکثر فعالیت کاتالازی در میان دیگر فلز - پورفیرین‌های ذکر شده می‌باشد. جزء سه گانه: "Mn-TPP - سیستمین - اس دی اس/دی تب"، بیشترین کارایی را از طریق کاهش پارامتر میکائلیس - منتن ( $K_M$ ) دارا می‌باشد. میکروسکوپ الکترونی عبوری نانوزایم‌های "M-TPP - سیستمین - پگ" را به صورت کلونیدهای هیدروژلی حفره حفره نشان می‌دهد که در مقایسه با بیوکاتالیست‌های وسیکی تک حفره "M-TPP - سیستمین - اس دی اس/دی تب" از طریق سطح ویژه بالاتر برای برخورد موثر با سوسترهای آلی نانوزایم پراکسیدازی، کارایی بیشتری را ایجاد می‌کند.

**واژه‌های کلیدی:** بیومیمتیک، نانوزایم پراکسیداز، کاتالاز، مثال - تترا(۲-پیریدیل) پورفیرین (M-TPP)، هیدروژل

پلی اتیلن گلیکول (پگ)، وسیکل اس دی اس/دی تب

**KEYWORDS:** Biomimetic, Peroxidase nanozyme, Catalase, Metal-tetra (2-pyridyl) porphyrin (M-TPP), Polyethylene glycol (PEG) hydrogel, SDS/DTAB Vesicle

## مقدمه

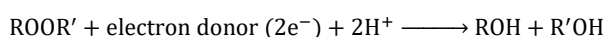
اصطلاح بیومیمتیک یا الگوبرداری از طبیعت<sup>۱</sup> علمی را توصیف می‌کند که الهام گرفته از عملکردهای سیستم‌های زنده است. این موضوع برای رشته‌های علوم پایه، مهندسی، علوم دارویی و سایرین می‌تواند الگوی زیست سازگار باشد که از مفاهیم آن بهره‌مند شوند. اساس دانش زیست الگو، از نو خلق نمودن و باز تولید برخی از جنبه‌های زیستی مانند روابط ساختار - عملکردی است که در موجودات زنده مشاهده می‌شود و سرانجام می‌تواند به الهام زیستی هدایت شود که در آن خواص ساختار - عملکرد به سطوح بسیار متعالی کشانده می‌شود [۱، ۲]. در واقع شیمی بیومیمتیک کوشش می‌کند تا سطح کارایی واکنشگرهای شیمیایی و کاتالیست‌ها را با تقلید از فرآیندهای آنزیمی بالا ببرد [۳] که به طور کلی این مسأله به شناخت و انتخابگری سوبسترا<sup>۲</sup> توسط میزبان<sup>۳</sup> مرتبط می‌باشد [۴-۶].

نوع آرایش فضایی<sup>۴</sup> کمپلکس هم در داربست پروتئینی هم‌پروتئین‌ها در عملکردهای این گروه پروستتیک نقش اساسی دارد. جایگاه‌های محوری هم قابلیت اتصال به شاخه‌های اسید آمینه‌ی پروتئین، حلال و یا سوبسترا را دارد. اسید آمینه‌ای که در مکان جایگاه اکثر هم - آنزیم‌ها وجود دارد و به صورت مستقیم و یا غیر مستقیم در فعالیت آنزیمی شرکت می‌کند. برای مثال اسید آمینه هیستیدین در برخی از هم‌آنزیم‌ها در دو جایگاه، نزدیک و دور قرار دارد که در یکی از دو جایگاه محوری نزدیک و دور واکنش کاتالیتیک صورت می‌گیرد [۷-۹]. هم - آنزیم‌ها از جمله کاتالاز<sup>۵</sup>، پرکسیداز، کلروپرکسیداز دارای گروه پروستتیک هم در جایگاه فعال خود می‌باشند و با انتقالات الکترونی در حضور یک الکترون دهنده ( $H_2O_2$ ) فعالیت کاتالیستی خود را انجام می‌دهند، که این واکنش‌ها از طریق آهن موجود در هم - آنزیم‌های ذکر شده، با اتصال محوری به اسید آمینه‌هایی مانند هیستیدین و سیستئین در ربودن الکترون‌های موجود در پیوند اکسیژن - اکسیژن نقش ایفا می‌کند [۷، ۸، ۱۰].

کلروپرکسیداز (CLP)، یکی از گروه هم - پراکسیدازها، یک آنزیم بسیار مطلوب به دلیل ویژگی سوبسترای گسترده و همچنین درج خاصیت چند عملکردی هالوژناز، پراکسیداز و کاتالاز آن است [۱۱، ۱۲]. واکنش‌های CLP را می‌توان به دو دسته اصلی تقسیم کرد. دسته اول، واکنش‌های هالوژناسیون آنزیم CLP در محیط اسیدی و دسته دوم، واکنش‌های غیر هالوژناسیون در محیط

با pH خنثی تر [۱۱، ۱۳] کاتالیست کردن واکنش‌های اپوکسیداسیون [۱۴] سولفو کسیداسیون [۱۵]، هیدروکسیلاسیون بنزیلی [۱۴]، اکسیداسیون آمینو به گروه نیتروزو [۱۶] و اکسیداسیون الکل‌های اولیه به آلدئیدها را می‌توان در دسته گسترده واکنش‌های CLP غیر هالوژناسیون قرار داد. [۱۷، ۱۸]

آنزیم پراکسیداز تربچه کوهی<sup>۶</sup> (HRP) به طور کلی اکسایش یک الکترونی را کاتالیز می‌کند. آنزیم HRP آنزیمی مربوط به خانواده‌ی اکسیدوردوکتاز می‌باشد که بیش از دیگر آنزیم‌های موجود در این دسته مطالعه شده است. پراکسیدازها خانواده بزرگی از آنزیم‌ها هستند که به صورت خاص، واکنش به شکل زیر را کاتالیز می‌نمایند [۱۹].



پیروگالول و فنول پرکاربردترین ترکیبات جهت بررسی فعالیت پراکسیدازی می‌باشند. این آنزیم در pH برابر با ۷، باعث دهیدروژنه شدن سوبسترا می‌شود، که فعالیت را تحت عنوان پراکسیدازی کلاسیک می‌شناسند. آنزیم پراکسیداز HRP توانایی کلردار کردن چشم‌گیری ندارد (افزودن استخلاف کلر به سوبسترای مناسب) در حالی که آنزیم کلروپرکسیداز تمام این واکنش‌ها را با بازده بالا انجام می‌دهد و یک آنزیم چندکاره است [۲۰].

با توجه به ساختار آنزیم HRP، گروه پروستتیک هم در پوشش پروتئینی آبریز واقع شده است به طوری که از طریق اسید آمینه‌ی هیستیدین ۱۷۰، که به صورت محوری به آهن گروه هم متصل می‌باشد، به پوشش پروتئینی چسبیده است. جایگاه محوری دیگر خالی است و جایگاهی است که واکنش در آن صورت می‌گیرد. هیستیدین شماره‌ی ۴۲ که به آهن اتصال پیدا نمی‌کند در نزدیکی این جایگاه است و نقش مهمی در کاتالیز کردن سوبسترا ایفا می‌کند [۱۹، ۲۱].

کاتالاز یک آنزیم رایج است که تقریباً در همه موجودات زنده‌ای که در معرض اکسیژن هستند مانند باکتری‌ها، گیاهان و حیوانات وجود دارد. این آنزیم دهیدروژن پراکسید را به آب و اکسیژن تجزیه می‌کند. کاتالاز در بدن موجودات زنده آنزیم مهمی است و سلول‌ها را در برابر گونه اکسیژن فعال حفاظت می‌کند. به همین خاطر کاتالاز در بین همه‌ی آنزیم‌ها بیشترین فعالیت را دارد [۲۲]. یک مولکول کاتالاز می‌تواند میلیون‌ها مولکول پرکسید دهیدروژن را به اکسیژن و آب تبدیل کند. کاتالاز یک تترامر است که از چهار

(۱) Biomimetic

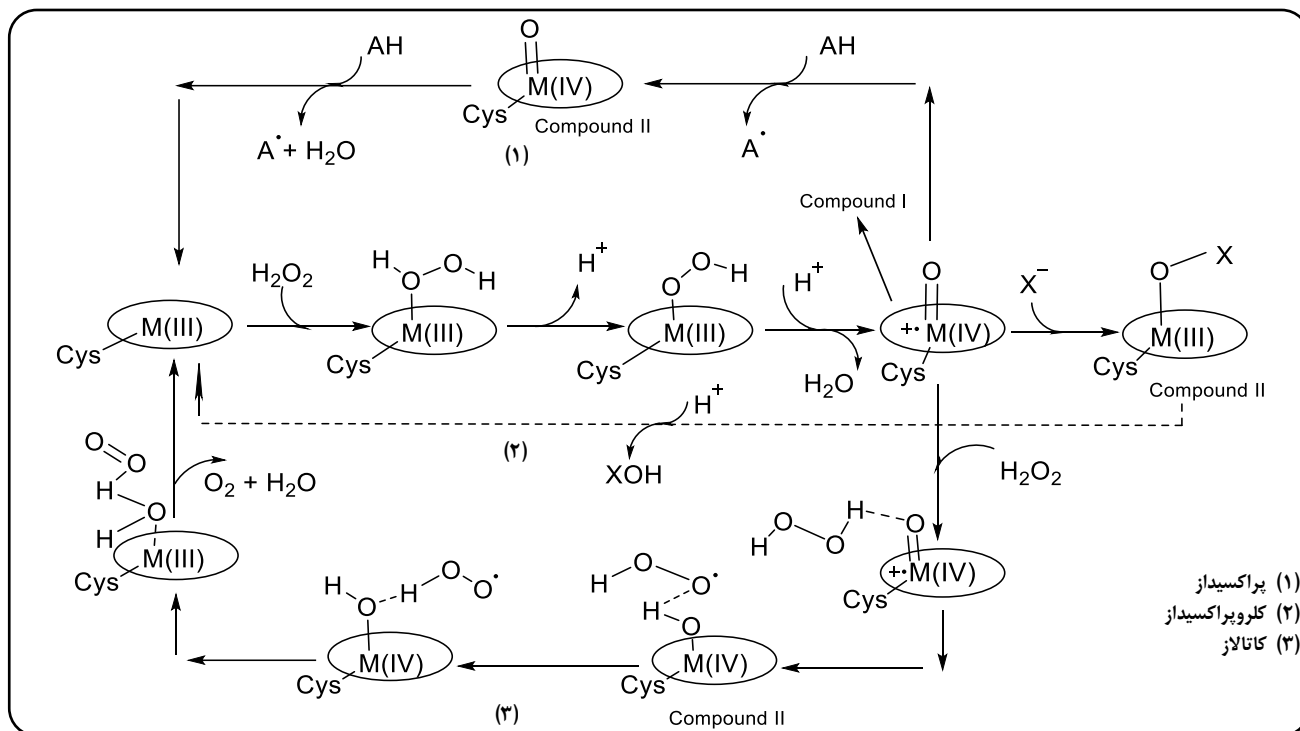
(۳) Host

(۵) Catalase

(۲) Substrate

(۴) Spatial arrangement

(۶) Horseradish peroxidase



شکل ۱- چرخه واکنش‌های پراکسیدازی و کاتالازی توسط جایگاه فعال آنزیم

کاربردی، از طریق اعمال نفوذ در دینامیک اتمی/مولکولی و کنترل آنها، استفاده می‌شوند. [۲۹، ۳۱] از جنبه بیومیمتیک، داربست‌های وسیکیلی یا میسلی معرفی شده می‌توانند رفتار کاتالیست زیستی فلزی را افزایش دهند. [۹، ۳۲] مطالعات متعدد، مزایای کاتالیست اکسیداتیو میسلی/وسیکلی را در فعالیت و همچنین گزینش پذیری نشان داده‌اند که به عنوان محفظه‌های آبریز فعال برای محصورسازی کاتالیست‌های مبتنی بر فلزات واسطه ظاهر می‌شود [۳۳، ۳۴].

از آنجا که آنزیم کلروپراکسیداز طبیعی یک آنزیم چند کاره است، این مطالعه دو نانوزایم شبه پراکسیدازی و شبه کاتالازی بر پایه CLP را از طریق جاگذاری پورفیرین‌های فلزی سنتزی به عنوان جایگاه فعال در داربست پلی اتیلن گلیکول (پگ)<sup>۱</sup> (پلیمری غیر سمی و غیر فرار [۳۵]) معرفی کرده است. در اینجا مقایسه ای بین پگ و مخلوط مواد سطحی فعال سدیم دودسیل سولفات<sup>۲</sup> و دودسیل تری اتیل آمونیوم بروماید<sup>۳</sup> (اس دی اس/دی تب<sup>۴</sup>) به عنوان پاکت برای جایگاه فعال انجام شد تا بتوان ویژگی ساختار - عملکرد نانوزایم را مورد بررسی قرار داد. ارتقای کارایی با کاهش ثابت میکائیلیس - منتن<sup>۵</sup> (KM) یا افزایش سرعت ماکسیمم (V<sub>max</sub>)

زنجره‌ی پلی پپتیدی تشکیل شده است که هر زنجره بیش از ۵۰۰ آمینواسید است که شامل چهار گروه پروتئین هم است که به آنزیم اجازه می‌دهد با هیدروژن پراکسید واکنش دهد، مقدار pH بهینه برای آنزیم کاتالاز حدوداً ۷ است.

بیشتر هموآنزیم‌ها، مانند کلروپراکسیداز، از مکانیسم پراکسید برای فعالیت کاتالیستی خود استفاده می‌کنند. واکنش‌های کاتالیز شده توسط هموآنزیم‌ها با ایجاد یک ترکیب واسطه بسیار فعال به نام ترکیب I انجام می‌شود [۲۳-۲۵]. ترکیب I از طریق شکست پیوند O-O در هیدروژن پراکسید از طریق مکانیسم اسید-باز ایجاد می‌شود (شکل ۱) [۲۶، ۲۷]. این اکسیژن رادیکال کاتیونی بسیار واکنش پذیر (ترکیب I) می‌تواند کلروپراکسیداز، پراکسیداز و کاتالاز را در چرخه‌های واکنش کاتالیستی آنها تقویت کند [۲۸].

اهمیت نانو کاتالیست‌ها در دینامیک عملکردها به خوبی مشخص شده است. [۲۹] معماری نانو کاتالیست‌ها هنری است که می‌توان از طریق آن، ترکیبات عملکردی مطلوب را در کنار هم گردآوری کرده و از طریق آن رویدادهای کاتالیستی را مشاهده نمود. [۳۰] توده‌های میسل و وسیکل خودآرایی شده، برای طراحی نانو مواد

(۱) Polyethylene glycol (PEG)

(۳) Dodecyltrimethylammonium bromide (DTAB)

(۵) Michaelis-Menten

(۲) Sodium dodecyl sulfate (SDS)

(۴) SDS/DTAB

متن  $K_M$  و سرعت ماکسیمم ( $V_{max}$ ) برای اکسیداسیون گایاکول با استفاده از معادله (۱) به دست آمدند و مورد استفاده قرار گرفتند.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (1)$$

عدد برگشتی<sup>۵</sup> (ثابت سرعت کاتالیتیکی،  $k_{cat}$ )، که نشان دهنده حداکثر مول‌های سوبسترای تبدیل شده به محصول در واحد زمان با یک مول آنزیم است، با استفاده از معادله (۲) محاسبه شد.  $[E]_t$  غلظت کل آنزیم را نشان می‌دهد.

$$V_{max} = k_{cat} \times E_t \quad (2)$$

$$\text{کارایی} = \frac{k_{cat}}{K_M} \quad (3)$$

برای به دست آوردن فعالیت کاتالاز نیز از سوبسترای هیدروژن پراکسید استفاده شد. فعالیت کاتالاز با استفاده از روشی که در بالا ذکر شد تعیین شد. تجزیه هیدروژن پراکسید در طول موج ۲۴۰ نانومتر با استفاده از ضریب جذب مولی  $H_2O_2$  مشاهده شد. میکروسکوپ الکترونی عبوری<sup>۶</sup>: نمونه‌ها برای تصویربرداری میکروسکوپی آماده سازی شدند [۳۷]. میکروگراف‌های الکترون عبوری توسط دستگاه میکروسکوپ الکترونی عبوری مدل ZEISS در ۱۰۰ kv ثبت شده‌اند.

## نتیجه‌ها و بحث

### طراحی کاتالیست زیستی شبه پراکسیدازی

برای طراحی یک کاتالیست زیستی شبه پراکسیداز، می‌توان بر روی گروه پروستتیک<sup>۲</sup> آنزیم، یعنی هم که پورفیرینی فلزی است، تمرکز نمود. شکل ۲ فلز پورفیرین‌های طراحی شده مصنوعی را به همراه همین به عنوان محل فعال آنزیم طبیعی CLP معرفی می‌کند. در اینجا، ایده مبتنی بر ارتقای کارایی با کاهش ثابت  $K_M$  یا افزایش سرعت ماکسیمم ( $V_{max}$ )، از طریق طراحی سایت فعال و پاکت آن، برای داشتن نانوزایم کارآمد است. می‌توان تصور کرد که یک سوبسترا چقدر به یک آنزیم معین کمپلکس می‌شود، که در این صورت به عنوان میل اتصال شناخته می‌شود. آنزیم با مقدار  $K_M$  کمتر، نشان دهنده میل پیوند شدن بیشتر به سوبستراست، یعنی بیانگر پیوند موثرتر آنزیم - سوبسترا است. بنابراین کمپلکس متال - تتراکیس پیریدیل

از طریق طراحی سایت فعال و پاکت آن اهمیت بالایی در این تحقیق دارد.

## بخش تجربی

### مواد شیمیایی مورد استفاده

کمپلکس‌های پورفیرینی متال - تترا(۲ - پیریدیل) پورفیرین<sup>۱</sup>،  $Fe - TPP$ ،  $Mn - TPP$  و  $Zn - TPP$  سنتز و تهیه شدند (شکل ۱) [۳۶]. نمک پتاسیم کلرید ( $KCl$ )،  $L -$  سیستین، هیدروژن پراکسید و گایاکول از شرکت مرک خریداری شدند. سدیم دو دسیل سولفات و دودسیل تری متیل آمونیوم برمایید، همین گاؤ<sup>۳</sup>، پلی اتیلن گلیکول ۴۰۰ (پگ ۴۰۰) از شرکت سیگما تهیه شدند. تمامی محلول‌ها به طور روزانه و تازه آماده شده‌اند. استوک هیدروژن پراکسید به صورت دقیق بارها در روند یک آزمایش اندازه‌گیری می‌شود. استوک هیدروژن پراکسید در فویل است تا نور نخورد و تجزیه آن به کمترین حد ممکن برسد. کمپلکس‌های پورفیرین  $M - TPP$  با نسبت بهینه به محلول سیستین اضافه شده‌اند. تمامی محلول‌های آبی ساخته شده با بافر فسفات با غلظت ۴/۴ mM و pH برابر ۷ تهیه شده‌اند. قابل ذکر است که تمامی تست‌های گرفته شده در دمای آزمایشگاه انجام شده است.

### روش‌ها

سینتیک حالت پایا؛ طیف UV - vis کمپلکس فلز پورفیرین با استفاده از اسپکتروفتومتر Shimadzu - ۳۱۰۰ به دست آمد. سینتیک حالت پایای اکسیداسیون گایاکول (به عنوان یک دهنده هیدروژن) توسط هیدروژن پراکسید، کاتالیز شده توسط آنزیم پراکسیداز مصنوعی، در ۴۷۰ نانومتر (محصول رنگی واکنش) [۹] در PBS به دست آمد. منحنی‌های پیشرفت واکنش‌ها در غلظت‌های مختلف گایاکول به دست آمدند و از سرعت‌های اولیه (در ۱۰ ثانیه اول) آنان برای ترسیم منحنی‌های میکائیلیس - منتن<sup>۴</sup> استفاده شد. غلظت هیدروژن پراکسید بالا (۱/۴ میلی‌مولار) و با توجه به دهنده هیدروژن در طول واکنش ثابت نگه داشته شد تا از سینتیک مرتبه اول اطمینان حاصل شود. غلظت هیدروژن پراکسید از اندازه‌گیری‌های جذب در ۲۴۰ نانومتر، با ضریب جذب مولی  $43/6 M^{-1}cm^{-1}$  تعیین شد. نمودارهای لاینور - برک<sup>۴</sup> برای اندازه‌گیری ثابت میکائیلیس -

(۱) Metal-tetra(2-pyridyl)porphyrins

(۳) Michaelis-Menten

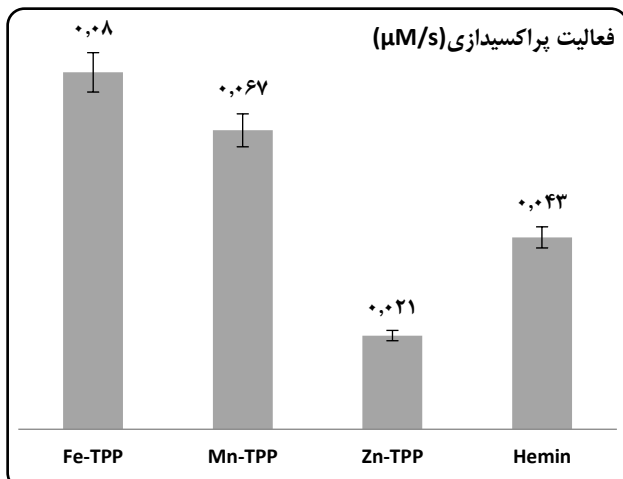
(۵) Turnover number

(۷) Prosthetic group

(۲) Hemin bovine

(۴) Lineweaver-Burk

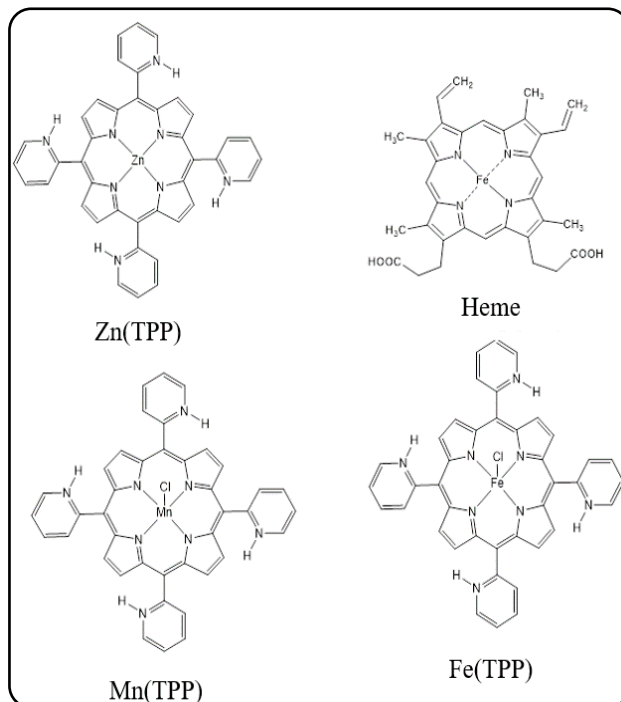
(۶) Transmission electron microscopy (TEM)



شکل ۳- مقایسه فعالیت کمپلکس‌های فلزی پورفیرین آهن، منگنز، روی و همین به ترتیب با غلظت‌های بهینه  $6 \mu\text{M}$ ،  $12 \mu\text{M}$  و  $22 \mu\text{M}$  و  $6 \mu\text{M}$ ، در حضور سوبستراهای گایاکول با غلظت  $40 \mu\text{M}$  و هیدروژن پراکسید با غلظت  $1/5 \text{ mM}$  در واکنش شبه‌پراکسیدازی در بافر فسفات با pH برابر ۷

دستگاه UV-Vis، سرعت واکنش شبه پراکسیدازی کمپلکس‌های پورفیرینی سنتزی Fe-TPP، Mn-TPP و Zn-TPP در حضور سوبستراهای گایاکول با غلظت  $40 \mu\text{M}$  و هیدروژن پراکسید با غلظت  $1/4 \text{ mM}$  در بافر فسفات با pH برابر با ۷ اندازه‌گیری می‌شود. بررسی مقایسه‌ای فعالیت پراکسیدازی کاتالیست‌های زیستی طراحی شده در شکل ۳ نشان داده شده است. همانطور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، پورفیرین Fe-TPP از پورفیرین‌های دیگر (شکل ۲) حتی پورفیرین همین (جایگاه فعال CLP طبیعی)، فعالیت پراکسیدازی بیشتری را نشان می‌دهد. آرایش الکترونی اتم مرکزی (آهن - منگنز - روی) نقش اساسی در ساختارهای پورفیرین ایفا می‌کند. این بدان معنی است که Fe-TPP سنتزی ساختار الکترونیکی خاصی را پیدا کرده است که می‌تواند باعث ایجاد برخی آرایش‌های مزدوج<sup>۱</sup> مناسب پورفیرین شود. در این راستا از این پس، از "Fe-TPP" به عنوان کمپلکس فعال کاتالیستی زیستی در آنزیم مصنوعی پراکسیدازی استفاده می‌شود.

حال در ادامه طراحی به بررسی روند بیومیمتیک آنزیم مصنوعی در شرایط فعالیتی شبه‌پراکسیداز می‌پردازیم. در اینجا، ایده بیومیمتیک این است که "ساختار کاتالیست زیستی نزدیکتر به کلروپراکسیداز طبیعی، عملکرد آن را به سمت آنزیم طبیعی بهبود می‌بخشد." در طی انجام بررسی روند بیومیمتیک، حالت‌های مختلفی از آنزیم مصنوعی طراحی شد تا بهترین شرایط کاتالیتیکی برای طراحی و دنبال کردن پارامترهای سینتیکی آنزیم مصنوعی شبه‌پراکسیدازی تعیین شود.

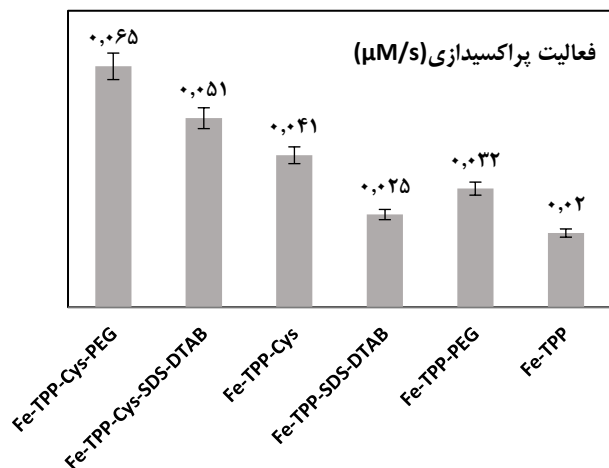


شکل ۲- ساختار پورفیرین‌های متال-تترا(۲-پیریدیل) پورفیرین با اختصار M-TPP در کنار پورفیرین هم

پورفیرین (M-TPP) به‌عنوان سایت فعال کاتالیست زیستی شبه کلروپراکسیداز بر اساس داشتن ساختار شبه هم، متصل به گروه‌های الکترون‌گاتیو آروماتیک طراحی و سنتز می‌شود تا پتانسیل بیشتری برای جذب یا اتصال به سوبستراهای هیدروژن پراکسید یا گایاکول نسبت به هم طبیعی داشته باشد. همچنین گروه‌های آروماتیکی پیریدیل متصل به پورفیرین‌های در کمپلکس‌های M-TPP موجب احتمال رزونانس بیشتری نسبت به پورفیرین هم به عنوان سایت فعال آنزیم طبیعی می‌گردد. در این حالت احتمال نیروی محرکه برای ایجاد حد واسط‌ها، از جمله حد واسط مهم یون - رادیکال ترکیب I (شکل ۱)، افزایش می‌یابد و در نتیجه می‌توان انتظار فعالیت و سرعت بالا از کمپلکس‌های M-TPP داشت. بنابراین در اولین قدم، این کمپلکس‌های جدید طراحی شده می‌توانند برای کاهش  $K_M$  و همچنین افزایش  $V_{max}$  برای معماری نانوزیم پراکسیدازی دسته بندی شوند.

در اینجا ابتدا به بررسی ترتیب سرعت واکنش‌های آنزیمی شبه پراکسیدازی در پورفیرین‌های فلزی سنتزی پرداخته شد. در این بررسی با قرار دادن کمپلکس‌های پورفیرینی Mn-، Fe-TPP، TPP و Zn-TPP در شرایط واکنش شبه پراکسیدازی، ترتیب این ترکیبات برای آنزیم پراکسیداز را بدست آوردیم. پس از آماده کردن

(۱) Conjugation



شکل ۴- بررسی روند زیست الگویی آنزیم مصنوعی شبه پراکسیداز در شرایط مختلف در بافر فسفات با pH برابر ۷، کمپلکس Fe-TPP با غلظت ۶ μM، سیستئین با نسبت غلظتی ۲/۵ نسبت به پورفیرین فلزی، پگ با غلظت ۰/۵mM و اس دی/اس دی تب با غلظت های ۱۰ mM / ۳۰ mM و هیدروژن پراکسید با غلظت ۱/۴mM

همان طور که از شکل ۴ نیز مشخص است بهترین روند بیومیمیکی برای آنزیم شبه پراکسیداز، کمپلکس سه تایی "پورفیرین فلزی آهن - سیستئین - پگ" است.

در شکل ۵، آنزیم مصنوعی طراحی شده "کمپلکس پورفیرین Fe-TPP - سیستئین - اس دی/اس دی تب" با شرایط مشابه برای یون آهن (III)، و کمپلکس پورفیرین بدون فلز نشان داده می شود تا تاثیر محیط مجاور اتم مرکزی و همچنین تاثیر اتم مرکزی در واکنش شبه پراکسیدازی نسبت به آنزیم مصنوعی طراحی شده سنجیده شود. بر اساس شکل ۵ اینگونه به نظر می رسد که نقش اصلی آنزیم شبه پراکسیداز فلز واسطه است که در کنار پورفیرین قوی تر عمل می کند. حال برای بدست آوردن پارامترهای سینتیک آنزیمی اکسید کردن سوپسترا توسط کاتالیست های زیستی طراحی شده شبه پراکسیدازی، لازم است به ترسیم نمودارهای میکائیلیس - منتن و لاینور - برک پردازیم. شکل ۶ نمودارهای میکائیلیس - منتن و لاینور - برک مربوط به کاتالیست مصنوعی شبه پراکسیدازی خودسازماندهی شده برای کمپلکس "Fe-TPP-سیستئین - پگ" را نشان می دهد. همچنین شکل ۷ نمودارهای میکائیلیس - منتن و لاینور - برک مربوط به کاتالیست مصنوعی "Fe-TPP - سیستئین - اس دی - اس دی/اس دی تب" که دارای توانایی اکسید کردن سوپسترای پراکسیدازی در شرایط بهینه است را ارائه می دهد.

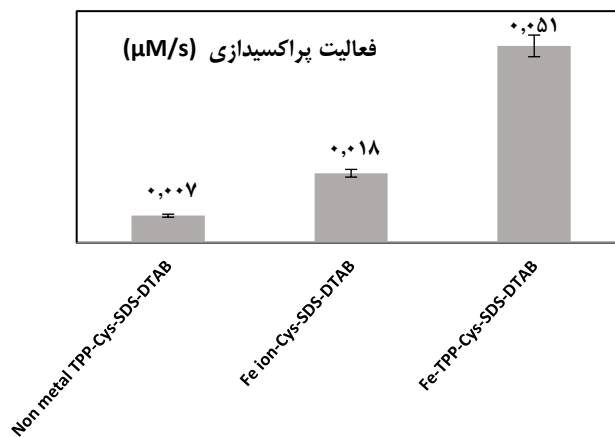
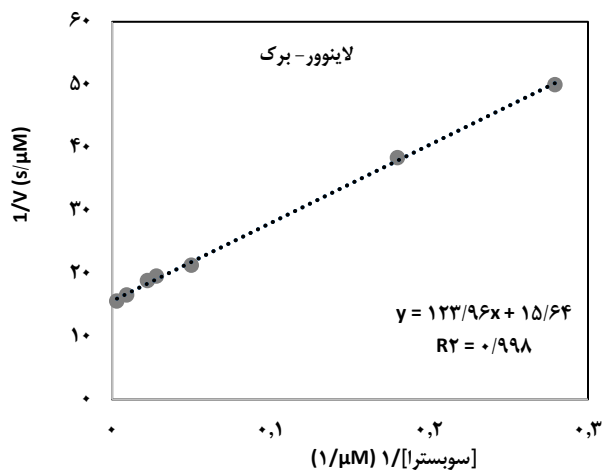
از آنجا که آنزیم کلروپراکسیداز طبیعی یک آنزیم چند کاره است و دارای فعالیت پراکسیدازی نیز هست، پارامترهای محیطی برای ارائه فعالیت مناسب برای واکنش پراکسیدازی بر پایه CLP طبیعی بهینه شده اند. در اینجا مخلوط های مختلف شامل Fe-TPP برای طراحی ریز محیط مناسب برای واکنش کاتالیستی ارائه شد. سیستئین به عنوان یک لیگاند محوری برای مرکز آهن به تقلید از جایگاه فعال CLP طبیعی استفاده شد [۳۸]. همان طور که در شکل ۴ نشان داده شده است، فعالیت کمپلکس "Fe-TPP - سیستئین" باعث افزایش فعالیت شبه پراکسیدازی نسبت به Fe-TPP تنها شده است. ماهیت لیگاند محوری می تواند برای عملکرد فلز - پورفیرین در هموپروتئین ها تعیین کننده باشد، زیرا موقعیت خاصی را در طول واکنش به مرکز فلز اعمال می کند [۳۹].

کاتالیست های زیستی مناسب می تواند با محصور کردن گروه پروستتیک در یک پاکت آبگریز مانند میسل تشکیل شوند [۳۲]. کلوئیدهای وسیکیلی و میسلی را می توان برای طراحی و تهیه مواد کاربردی از طریق نانو معماری از طریق دستکاری و کنترل دینامیکی اتمی یا مولکولی استفاده نمود [۲۹]. ماده سطحی فعال "اس دی/اس" یک داربست میسلی جالب را تشکیل می دهد که کاتالیز مبتنی برهم را به طور موثر بهبود می بخشد [۴۰]. همان طور که شکل ۴ نشان می دهد، افزودن مخلوط مواد سطحی فعال اس دی/اس دی تب به محل فعال آهن پورفیرین، فعالیت کاتالیست زیستی را بهبود می بخشد. مخلوط سورفکتانت های مثبت و منفی، میسل ها یا سوپرمولکول های پاکت آبگریز را تشکیل می دهند که خاصیت سطح باردار داربست پروتئینی را تقلید می کنند و بنابراین می توانند مانند پروتئین بستر مناسبی برای جایگاه فعال باشند. پگ ۴۰۰، داربست دیگری است که برای سایت فعال آهن - پورفیرین استفاده می شود، شکل ۴ نشان می دهد که فعالیت بهتری نسبت به پاکت آبگریز اس دی/اس دی تب دارد.

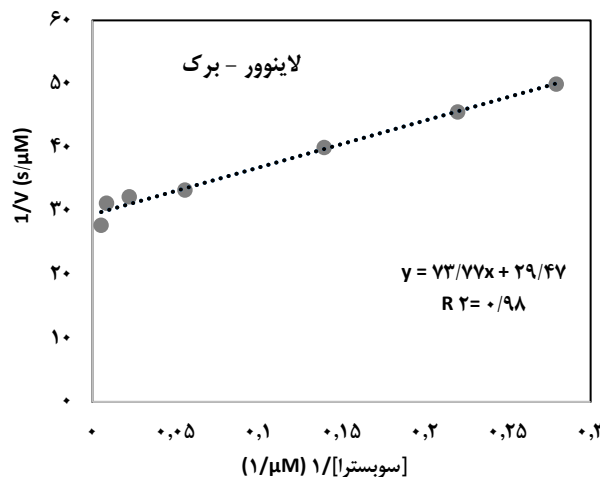
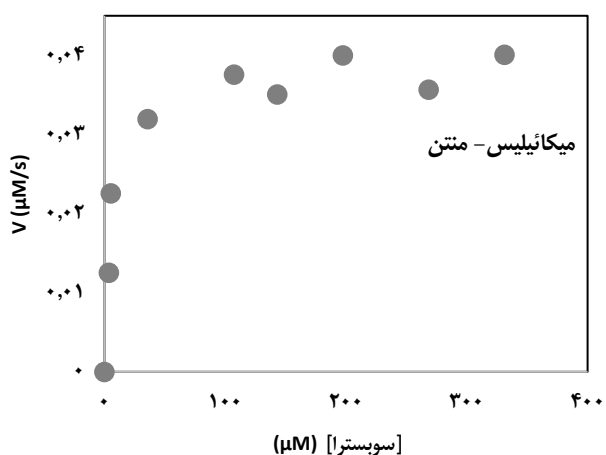
تعدادی از مطالعات اخیر شیمی پگ و کاربردهای آن در پزشکی، بیوتکنولوژی و کاتالیز با پشتیبانی از پگ را پوشش داده است [۴۱، ۴۲]. پگ با وزن ملکولی ۴۰۰ با فرمول  $(\text{H}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH})$  دارای n حدود ۸.۲ الی ۹.۱ می باشد که در این حالت زنجیره اتمی آن در حدود دو برابر تعداد اس دی/اس دی تب (با طول زنجیره تقریباً ۱۵ اتمی) یعنی زنجیره اتمی حدود ۳۰ اتم است. بنابراین می توان اشاره کرد که داربست پگ در کنار سایت فعال Fe-TPP نسبت به پاکت انباشته اس دی/اس دی تب، بیشتر به حالت پلیمری آپوپروتئین<sup>۲</sup> CLP طبیعی شباهت دارد.

(۱) Microenvironment

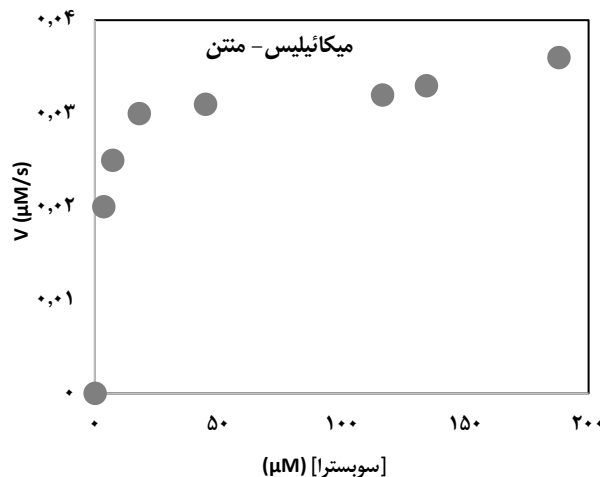
(۲) Apoprotein



شکل ۵- بررسی فعالیت شبه پراکسیدازی کمپلکس پورفیرین فلزی Fe-TPP، یون آهن (III)، و پورفیرین بدون فلز - سیستئین - اس دی اس/دی تب، هیدروژن پراکسید با غلظت ۱/۴ mM در بافر فسفات با pH برابر ۷



شکل ۷- نمودار میکائلیس-متن و نمودار لاینوور-برک آنزیم مصنوعی پراکسیدازی در حضور اس دی اس/دی تب و سوبسترای گایاکول، هیدروژن پراکسید با غلظت ۱/۴ mM در بافر فسفات با pH برابر ۷

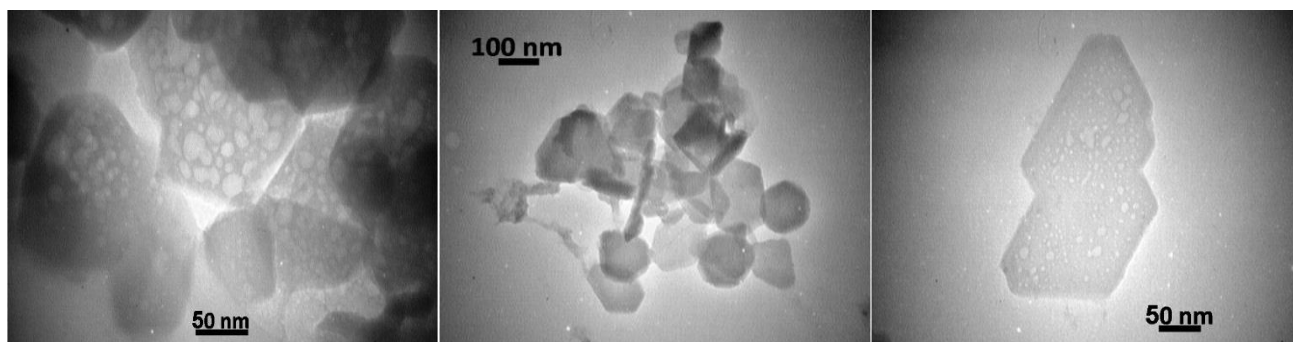


شکل ۶- نمودار میکائلیس-متن و نمودار لاینوور-برک آنزیم مصنوعی پراکسیدازی در حضور پگ و سوبسترای گایاکول، هیدروژن پراکسید با غلظت ۱/۴ mM در بافر فسفات با pH برابر ۷

با استفاده از معادله ۱ و ۲، همچنین معادله‌های خطی بدست آمده در شکل‌های ۶ و ۷، پارامترهای سینتیکی در جدول ۱ خلاصه شده‌اند. لازم به ذکر است که سرعت واکنش پراکسیدازی در عدم حضور هر نوع کاتالیست زیستی (یعنی تنها گایاکول و هیدروژن پراکسید در کنار هم) بسیار ناچیز و قابل صرف نظر است. همان طور که در جدول مشاهده می‌شود در کاتالیست زیستی پراکسیدازی "Fe-TPP - سیستئین - اس دی اس/دی تب" پارامتر  $k_{cat}$  از کاتالیست زیستی دیگر بالاتر است. همان طور که می‌دانیم کارایی کاتالیستی بر اساس معادله ۳ رابطه مستقیم با  $k_{cat}$  و رابطه عکس با  $K_M$  دارد. جدول ۱ نشان می‌دهد که کاتالیست زیستی با بستر وسیکی با  $k_{cat}$  بالاتری دارد.  $V_{max}$  بیشتری را داراست به معنی اینکه  $V_{max}$  بالاتری دارد. اما بالاتر می‌تواند به سرعت بیشتر رهایش محصول تعبیر شود. اما نانوزایم با بستر پگ، نسبت به کاتالیست زیستی با بستر وسیکی،

جدول ۱- پارامترهای سینتیکی آنزیم مصنوعی طراحی شده شبه پراکسیداز و آنزیم طبیعی CLP

کارایی کاتالیتیکی (1/μM.1/min)	$k_{cat}$ (1/min)	$V_{max}$ (μM/min)	$K_M$ (μM)	نام کاتالیست
۰/۰۵۸	۰/۳۹	۲/۳۲	۶/۶۹	کمپلکس پورفیرین Fe-TPP (۶μM) - سیستین (۱۵μM) - اس دی اس (۱۰mM) - دی تب (۳۰mM) در حضور گایاکول
۰/۱۳۶	۰/۳۴	۲/۰۳	۲/۵۰	کمپلکس پورفیرین Fe-TPP (۶μM) - سیستین (۱۵μM) - پگ (۰/۵mM) در حضور گایاکول
-	۱۲/۵	۰/۱۸۸	-	آنزیم طبیعی CLP (۱۵ nM) در حضور گایاکول pH=۷ [43]



شکل ۸ - تصاویر گرفته شده از میکروسکوپ الکترونی عبوری برای نانوزایم شبه پراکسیداز "Fe-TPP - سیستین - پگ" در بافر فسفات pH برابر با ۷

همان طور که در شکل ۸ نشان داده شده است، پلی اتیلن گلیکول (پگ) ساختار نانوزایمی حفره حفره ای را حاصل می کند. این نوع ساختار شبیه به کلوییدهای هیدروژلی می باشد [۴۵، ۴۶]. این در حالی است بستر اس دی اس/دی تب، وسیکیلی و تک حفره است. [۳۶، ۳۸، ۴۷] به نظر می رسد که سطح ویژه ساختار حفره حفره ای در حالت بستر پگ زیاد و برای سوبسترای گایاکول بسیار در دسترس است و به همین دلیل ساختار نانوزایم پراکسیدازی با بستر پگ کارآمدتر شده است. در منابع گزارش شده است که هیچ F یا پاکتی برای پگ تنها و خالص، در غلظت ۰/۵ میلی مولار (غلظت پگ در نانوزایم شبه کاتالاز) وجود ندارد، [۳۶] در حالی که افزودن سایت فعال Mn-TPP - سیستین، به عنوان هسته جاذب پگ مونومر، باعث ایجاد تجمع و نانوذره هیدروژلی شده است.

#### طراحی کاتالیست شبه کاتالازی

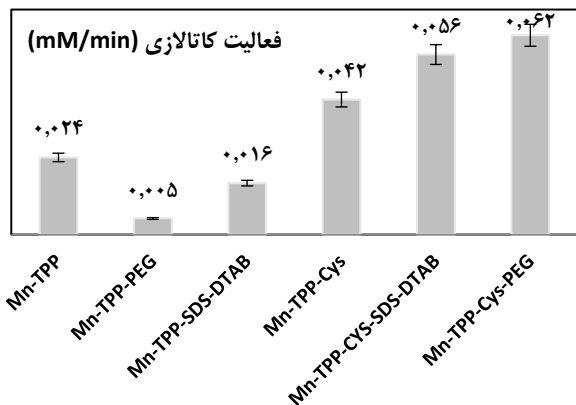
بررسی ترتیب پورفیرین های فلزی در انجام واکنش های آنزیمی شبه کاتالازی در انجام واکنش شبه کاتالازی نیز سه کمپلکس پورفیرین سنتزی آهن، منگنز و روی به کار گرفته شدند که همچون آنزیم پیشین بررسی های سینتیکی بر پایه ی اولین هسته کاتالیستی زیستی خودسازماندهی<sup>۱</sup> شده انجام شد. برای فعالیت کاتالازی،

$K_M$  کوچکتری دارد که نشان دهنده آن است که نانوزایم میل اتصال قوی تری به سوبسترا دارد. به هر حال اثر پارامتر  $K_M$  در اینجا باعث شده است که کارایی نانوزایم با بستر پگ بیشتر و بهتر باشد. جدول ۱ نشان می دهد که  $V_{max}$  نانوزایم شبه پراکسیداز در مقایسه با شکل طبیعی آن افزایش یافته است. با توجه به معادله ۲،  $V_{max}$  بدون در نظر گرفتن غلظت آنزیم دارای معنی  $k_{cat}$  است (که ۱۵ نانومولار برای کلروپراکسیداز طبیعی و ۶ میکرومولار برای مدل های شبه پراکسیداز است (جدول ۱)). از آنجایی که استفاده از غلظت پورفیرین فلزی یا اجزای دیگر آن در این نانوزایم بسیار مقرون به صرفه تر از غلظت کلروپراکسیداز طبیعی است، مقادیر پارامتر " $V_{max}$ " می تواند به عنوان نماینده ای از  $k_{cat}$  استفاده شود و مقدار آن می تواند برای کاتالیست های زیستی به صورت قابل مقایسه آنزیم طبیعی گزارش شود. [۴۴]

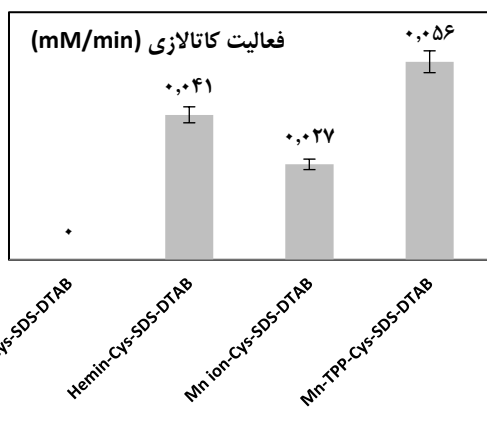
برای مشاهده دقیق تر ساختار کاتالیست زیستی، نمونه نانوزایم شبه پراکسیداز "Fe-TPP - سیستین - پگ" توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری آنالیز شدند. تصاویر (شکل ۸) ساختار کلوییدی "Fe-TPP - سیستین - پگ" در اندازه های نانو ساختار نشان می دهد و بنابراین در دسته نانوکاتالیست زیستی یا نانوزایم قرار می گیرد.

(۱) Self-assembly



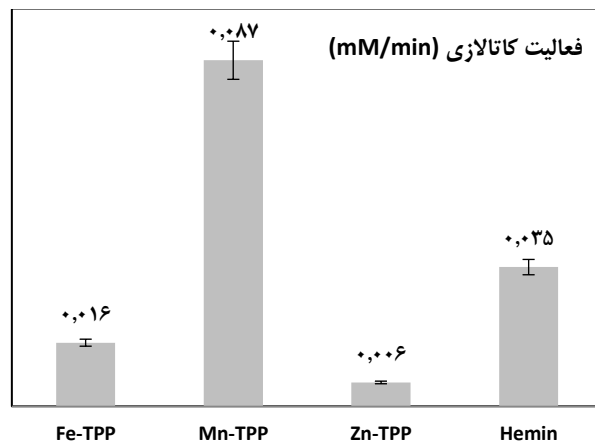


شکل ۱۰- بررسی روند زیست الگوی آنزیم مصنوعی شبه کاتالازی در شرایط مختلف در بافر فسفات با pH برابر ۷، کمپلکس پورفیرین فلزی منگنز با غلظت  $6 \mu\text{M}$ ، سیستئین با نسبت غلظتی ۲/۵ نسبت به پورفیرین فلزی منگنز، پگ با غلظت  $0.5 \text{ mM}$  و اس دی اس/دی تب با نسبت غلظتی  $10 \text{ mM} / 20 \text{ mM}$  و همچنین هیدروژن پراکسید با غلظت  $1/4 \text{ mM}$  در سل



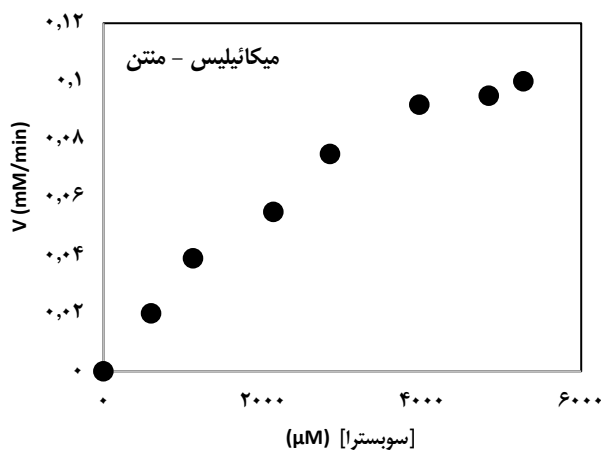
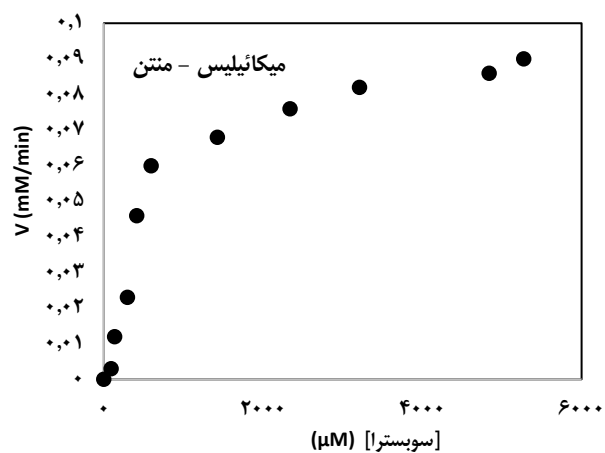
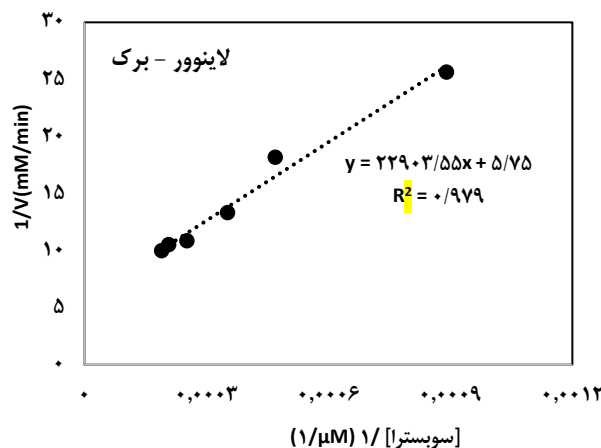
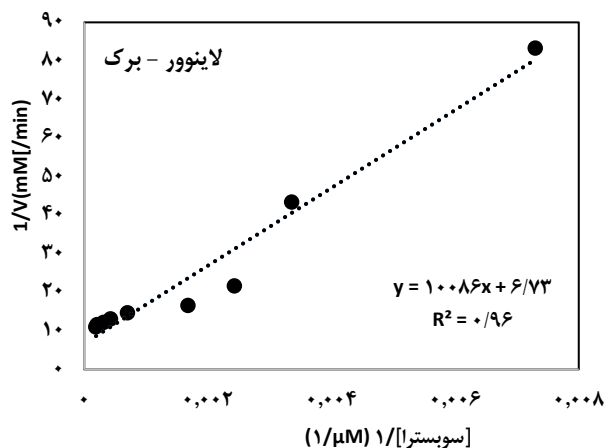
شکل ۱۱- بررسی فعالیت شبه کاتالازی کمپلکس پورفیرین فلزی آهن، یون آهن، هemin و پورفیرین بدون فلز-سیستئین-اس دی اس/دی تب، هیدروژن پراکسید با غلظت  $1/4 \text{ mM}$  در بافر فسفات با pH برابر ۷

در این بخش برای بررسی سینتیکی و تعیین پارامترهای سینتیکی کاتالیست‌های زیستی شبه کاتالازی کمپلکس Mn-TPP - سیستئین در میسل ترکیبی اس دی اس/دی تب و پگ ۴۰۰ انتخاب شدند. در بررسی سینتیکی انجام شده توسط کاتالیست‌های زیستی با اندازه‌گیری شیب اولیه نمودار و کاهش غلظت هیدروژن پراکسید (با استفاده از ضریب خاموشی  $43/6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  هیدروژن پراکسید) می‌توان سرعت اولیه واکنش را بدست آورد. به ترتیب نمودارهای میکائلیس - متن و لاینوربرک برای کاتالیست خود سازماندهی شدهی کمپلکس Mn-TPP - سیستئین - پگ در شکل‌های ۱۲ همچنین



شکل ۹- مقایسه فعالیت واکنش شبه کاتالازی در کمپلکس‌های فلزی پورفیرین آهن، منگنز، روی و هemin به ترتیب با غلظت‌های بهینه  $6 \mu\text{M}$ ،  $12 \mu\text{M}$  و  $22 \mu\text{M}$  و  $6 \mu\text{M}$  در بافر فسفات با pH برابر ۷، در حضور سوبسترای هیدروژن پراکسید با غلظت  $1/5 \text{ mM}$

مقایسه‌ای در کاتالیست‌های مصنوعی طراحی شده در شکل ۹ نشان داده شده است و نتایج نشان‌دهنده‌ی عملکرد بهتر کمپلکس Mn-TPP و ارجحیت آن نسبت به دو کمپلکس پورفیرین فلزی دیگر و حتی کمپلکس هemin جهت انجام واکنش شبه کاتالازی است. مطالعات گذشته نشان داده است که در حضور یون فلزی بدون پورفیرین فعالیت کاتالازی یون منگنز از یون آهن بیشتر بوده است [۴۷]. در ادامه به منظور دنبال کردن پارامترهای سینتیکی آنزیم مصنوعی شبه کاتالازی روند بیومیمتیک آن مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که از شکل ۱۰ نیز مشخص است بهترین روند بیومیمتیک برای آنزیم شبه کاتالازی، کمپلکس سه‌تایی "Mn-TPP به همراه سیستئین - پگ" است. این بررسی نشان می‌دهد که همان‌طور که قدم به قدم به ساختار آنزیم کلروپراکسیداز طبیعی نزدیک‌تر می‌شویم، عملکرد شبه آنزیم نیز به عملکرد آنزیم طبیعی نزدیک‌تر می‌شود. نقش لیگاند محوری سیستئین، نقش پاکت آبریز و نقش بستر به خوبی در شکل ۹، نشان داده شده است. حال به بررسی تاثیر محیط اطراف حلقه‌های پورفیرین در واکنش شبه کاتالازی می‌پردازیم. در شکل ۱۱ مقایسه فعالیت آنزیم مصنوعی شبه کاتالازی طراحی شده با هemin، یون منگنز (III) و پورفیرین بدون فلز انجام شده است که مطابق آن کمپلکس Mn-TPP - سیستئین - اس دی اس/دی تب نسبت به هemin و یون منگنز (III) دارای فعالیت شبه کاتالازی بیشتری است، نکته مهم در انجام این آزمایش غیر فعال بودن پورفیرین بدون فلز است که این نتیجه می‌تواند شاهدهی بر اهمیت اتم مرکزی در فعالیت شبه کاتالازی آنزیم‌های مصنوعی طراحی شده باشد.



شکل ۱۳- نمودار میکائیلیس - متن و نمودار لاینوور - برگ آنزیم مصنوعی کاتالاز در حضور اس دی/اس دی/تیب و سوبسترای هیدروژن پراکسید، کمپلکس پورفیرین منگنز ۶ μM، سیستئین با غلظت ۲ mM، میسل ترکیبی اس دی/اس دی/تیب با نسبت غلظتی ۱۰ mM / ۲۰ mM و هیدروژن پراکسید در دامنه‌ی غلظتی ۱-۵ mM در بافر فسفات با غلظت ۴/۴ mM در pH برابر ۷

شکل ۱۲- نمودار میکائیلیس - متن و نمودار لاینوور - برگ آنزیم مصنوعی کاتالاز در حضور پگ و سوبسترای هیدروژن پراکسید، کمپلکس پورفیرین منگنز ۶ μM، سیستئین با غلظت ۲ mM، پگ با غلظت ۵ mM و هیدروژن پراکسید در دامنه‌ی غلظتی ۱-۵ mM در بافر فسفات با غلظت ۴/۴ mM در pH برابر ۷

این جدول نشان می‌دهد که کاتالیست زیستی با بستر پگ،  $k_{cat}$  بیشتری را نسبت به بستر وسیکیلی اس دی/اس دی/تیب دارد که به معنی این است که  $V_{max}$  بالاتری دارد که مربوط به رهایش محصول بهتر توسط بستر پگ می‌باشد. اما کاتالیست زیستی با بستر وسیکیلی اس دی/اس دی/تیب، نسبت به کاتالیست زیستی با بستر پگ،  $K_M$  کوچکتری دارد. به هر حال اثر پارامتر  $K_M$  در اینجا باعث شده است که کارایی نانوزایم با بستر اس دی/اس دی/تیب بیشتر و بهتر باشد که نشان می‌دهد پیوند شدن سوبسترا- جایگاه فعال در این محیط بهتر است.

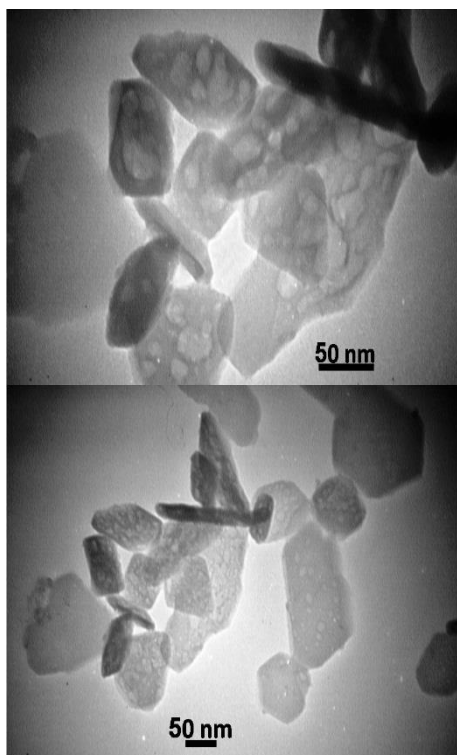
همان‌طور که جدول ۲ نشان می‌دهد  $V_{max}$  نانوزایم شبه کاتالاز در مقایسه با آنزیم طبیعی کلروپراکسیداز با خاصیت کاتالازی قابل

شکل‌های ۱۳ برای آنزیم مصنوعی کمپلکس پورفیرین Mn-TPP - سیستئین - میسل ترکیبی (اس دی/اس دی/تیب) آورده شده است. پارامترهای سینتیکی آنزیمی با استفاده از معادله ۱ و ۲، همچنین معادله‌های خطی میکائیلیس - متن بدست آمده از شکل‌های لاینوور برگ ۱۱ و ۱۲ در جدول ۲ خلاصه شده‌اند. لازم به ذکر است که سرعت واکنش کاتالازی در عدم حضور هر نوع کاتالیست زیستی (یعنی تجزیه هیدروژن پراکسید تنها) بسیار ناچیز و صفر است. عدد برگشتی<sup>۱</sup> یا ثابت سرعت کاتالیتیکی،  $k_{cat}$ ، نشان‌دهنده ماکسیمم تبدیل مول‌های سوبسترا به محصول به ازای یک مول کاتالیست در واحد زمان می‌باشد و بهره کاتالیتیکی ( $K_{cat} / K_M$ ) که در جدول ۲ برای کاتالیست‌های زیستی مختلف آمده است.

(۱) Turnover

جدول ۲- پارامترهای سینتیکی آنزیم مصنوعی طراحی شده شبه کاتالازی و آنزیم طبیعی CLP

کارایی کاتالیتیکی (1/mM.1/min)	$k_{cat}$ (1/min)	$V_{max}$ (mM/min)	$K_M$ (mM)	نام کاتالیست
۱۶/۳۳	۱۸/۶۷	۰/۱۱۲	۱/۱۵	کمپلکس Mn-TPP (۶μM) - سیستئین (۲mM) - اس دی اس/دی تب (با نسبت غلظتی ۱۰/۲۰ mM) در حضور حضور هیدروژن پراکسید
۷/۲۹	۲۸/۶۷	۰/۱۷۲	۳/۹۳	کمپلکس Mn-TPP (۶μM) - سیستئین (۲mM) - پگ (۰/۵mM) در حضور هیدروژن پراکسید
۹۷۶۵۶	۱۸۷۵۰۰	۰/۵۶	۱/۹۲	آنزیم CLP (۳nM) در حضور هیدروژن پراکسید



شکل ۱۴- تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری برای نانوزایم شبه کاتالاز "Mn-TPP - سیستئین - پگ" در بافر فسفات با pH برابر ۷

آب تجمع یابند [۴۷]. بنابراین لازمه هر ارتباط آبگریز یک ارتباط الکترواستاتیک است. حتی مولکول‌هایی که به ظاهر غیرقطبی کامل به نظر می‌رسند، در بدو ورود به محیط آبی بر اثر به وجود آمدن دوقطبی‌های لحظه‌ای و گذرا، ابتدا یک برهمکنش الکترواستاتیک با مولکول‌های آب به وجود می‌آورند که این حرکت منشاء حرکت‌های بعدی آبگریز<sup>۳</sup> خواهد بود. بخش‌های غیرقطبی با برهمکنش واندروالسی کنارهم قرار می‌گیرند و در نظم مولکول‌های آب در نزدیکی سطح گروه‌های آبگریز تغییر به وجود می‌آید، این به معنی اثر آبگریز است [۴۸].

مقایسه است. با توجه به معادله ۲،  $V_{max}$  بدون در نظر گرفتن غلظت آنزیم دارای معنی  $k_{cat}$  می‌باشد. از آنجایی که استفاده از غلظت پورفیرین فلزی یا اجزای دیگر آن در این نانوزایم بسیار مقرون به صرفه‌تر از غلظت کلروپراکسیداز طبیعی است (که ۳ نانومولار برای کلروپراکسیداز طبیعی و ۶ میکرومولار برای مدل‌های شبه کاتالاز است)، [۴۴] مقدار  $V_{max}$  می‌تواند برای کاتالیست‌های زیستی ساخته شده مزیت مطلوبی باشد.

اما آنچه که از شکل ۱۰ دیده می‌شد بهترین روند بیومیمتیکی برای آنزیم شبه کاتالازی، کمپلکس سه‌تایی "Mn-TPP - سیستئین - پگ" بود. این موضوع با جدول ۲ نیز سازگار است زیرا فعالیتی که در شکل ۱۰ نمایش داده می‌شود بیشتر متمایل به  $V_{max}$  یا  $k_{cat}$  است. شکل ۱۴ تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نمونه نانوزایم شبه کاتالاز "Mn-TPP - سیستئین - پگ" را نشان می‌دهد. تصاویر ساختار کلئیدی "Mn-TPP - سیستئین - پگ" را در اندازه‌های نانوساختار نشان می‌دهد و بنابراین در دسته نانوزایم‌ها قرار می‌گیرد. همان‌طور که در شکل نشان داده شده است، بستر پلی اتیلن گلیکول (پگ) ساختار هیدروژلی [۴۵، ۴۶] حفره حفره‌ای نانوزایم شبه کاتالاز را حاصل می‌کند. لیکن با توجه به کارایی بالاتر نانوزایم "Mn-TPP - سیستئین - اس دی اس/دی تب"، اینبار بستر اس دی اس/دی تب وسیکلی و تک حفره برای سوسترای کوچک، هیدروفیل و فعال هیدروژن پراکسید کارآمدتر گشته است. شکل میکروسکوپ الکترونی پورفیرین - اس دی اس/دی تب در کارهای گذشته این گروه آمده است [۳۸].

#### اثر هیدروفوبیسیته<sup>۱</sup>

نکته اساسی در مورد برهمکنش‌های آبگریز این می‌باشد که ابتدا باید یک برهمکنش الکترواستاتیک<sup>۲</sup> بین مولکول‌های آب و بخش‌های باردار که مولکول به وجود آید تا بخش‌های غیر قطبی آن بتوانند به دور

(۱) Hydrophobicity  
(۳) hydrophobic

(۲) Electrostatic interaction

واکنش شبه پراکسیدازی و پورفیرین منگنز در انجام واکنش شبه کاتالازی عملکرد بهتری داشتند. همچنین اضافه کردن کمپلکس‌های پورفیرین فلزی - سیستئین به محیط میسل ترکیبی و پلی اتیلن گلیکول سبب پایدار کردن و افزایش کارایی آنزیم‌های طراحی شده، شد. نکته قابل توجه فعالیت ناچیز لیگاندهای پورفیرین بدون فلز مرکزی است که این مقدار کم هم می‌تواند به خاصیت اکسید و احیای خود لیگاند پورفیرین نسبت داد. طبق منابع خود پورفیرین در واکنش‌های اکسایش و کاهش شرکت می‌کند و اکسیداسیون در حلقه پورفیرین پدید می‌آید. اکسیداسیون حلقه پورفیرین به حالت یون - رادیکال آن (ترکیب I در شکل ۱) یا دی کاتیون از جمله حالت‌های اکسیداسیونی حلقه است [۴۹]. بنابراین فلز مرکزی در کمپلکس‌های پورفیرین فلزی سنتز شده به‌عنوان قلب آنزیم‌های مصنوعی طراحی شده است. از عواملی که در میزان کارایی کاتالیست زیستی موثر است را می‌توان اول به عامل پتانسیل‌های اکسایش - کاهش در کمپلکس‌های فلزی در چرخه واکنش اشاره کرد. برای مثال در آغاز چرخه‌های پراکسیدازی و کاتالازی (شکل ۱) بار منفی در فلز، به حالت اکسایش بالاتر کشش دارد، هرچه بار منفی بیشتر باشد پتانسیل اکسایش کمتر خواهد بود. بنابراین کمپلکس پورفیرین فلزی آهن (III) چون دارای آرایش الکترونی  $d^5$  است به آسانی به کمپلکس پورفیرین فلزی (IV) اکسید می‌شود در حالی که کمپلکس پورفیرین فلزی منگنز (III) دارای  $d^4$  است و بار منفی کم‌تری نسبت به پورفیرین آهن دارد. بنابراین پورفیرین فلزی آهن تبدیل حدواسطها را در طی واکنش شبه پراکسیداز با سهولت بیشتری انجام می‌دهد [۵۰]. دومین عامل که می‌تواند در کارایی این نوع کاتالیست‌های زیستی موثر باشد ثابت تشکیل پورفیرین فلزی - لیگاند محوری می‌باشد. در بررسی‌های انجام شده برای کاتالیست‌های زیستی طراحی شده از لیگاند سیستئین به‌عنوان لیگاند جایگزین در جایگاه محوری آنزیم‌های طبیعی استفاده شده است، از طرفی ساختار سیستئین شامل گروه‌های S، N و O می‌باشد و مطابق با سری فوق و مطالعات پیشین می‌توان پیش‌بینی کرد که اتصال گروه تیولی به فلز واسطه رخ می‌دهد [۳۸، ۴۷] که شبیه آنزیم کلروپراکسیداز طبیعی است. نکته قابل توجه دیگری که می‌توان از سری ایروینگ فهمید این است که در ترتیب ثابت تشکیل این کمپلکس‌ها، فلز واسطه آهن دارای بزرگ‌ترین ثابت تشکیل است. فعالیت سینتیکی بیش‌تر، نیازمند تشکیل بیشتر کمپلکس پیشرفته پورفیرین فلزی - سیستئین است به عبارت دیگر هرچه ثابت تشکیل یک کمپلکس بزرگ‌تر باشد فعالیت سینتیکی کمپلکس بیش‌تر است که این خود دلیلی بر افزایش

جدول ۳- پارامترهای آگریزی و حلالیت کمپلکس‌های پورفیرین فلزی آهن - منگنز و روی

Mol_Name	Log P
Mol_Fe	۱/۸۱
Mol_Mn	۱/۴۳
Mol_Zn	۱/۴۳

تفاوت ساختاری فلز پورفیرین سنتز شده به‌عنوان یک سایت فعال را می‌توان از طریق پارامتر آگریز مشاهده کرد. برای تعیین آگریزی (به‌عنوان یک پارامتر عملکردی - ساختاری) فلز-پورفیرین، شاخص‌های آگریز تقریبی با استفاده از برنامه "ALOGPS 2.1" تعیین شدند (<http://www.vcclab.org/lab/alogps/>). پارامتر Log P نماینده پارامتر آگریزی است که همان تمایل کمپلکس‌ها به روغن نسبت به آب است. طبق جدول ۳، نتایج نشان می‌دهد که کمپلکس آهن - پورفیرین دارای بالاترین آگریزی در مقایسه با منگنز - پورفیرین و روی - پورفیرین می‌باشد. این نتیجه می‌تواند دلیلی بر عملکرد بهتر آهن و داشتن بازده بیشتر در کاتالیست زیستی شبه پراکسیدازی باشد. همانطور که در مکانیسم شکل ۱ مشاهده می‌شود، چرخه واکنش پراکسیدازی شامل دو سوستر است، سوستر اول هیدروژن پراکسید است که موجب تشکیل ترکیب I می‌شود، سوستر دوم یک اسید یا اکسید شونده آلی و هیدروفوب مانند گایاکول می‌باشد. در این حالت هیدروفوب بودن جایگاه فعال نانوزایم شبه پراکسیدازی پتانسیلی برای ورود بیشتر واکنشگر اسید آلی و هیدروفوب (گایاکول) به چرخه واکنش و در نتیجه فعالیت و کارایی بیشتر Fe-TPP نسبت به Mn-TPP است. این در حالی است که چرخه واکنش کاتالازی تک سوسترایی (هیدروژن پراکسید) است. هیدروژن پراکسید هیدروفوب نمی‌باشد، پس نیازی به هیدروفوب بودن جایگاه فعال نیست. کمپلکس منگنز نسبت به آهن هیدروفیل‌تر است و برای سوسترهای هیدروفیل هیدروژن پراکسید مناسب‌تر می‌باشد. لذا کمپلکس Mn-TPP فعالیت و کارایی بیشتر نسبت به Fe-TPP در کاتالیست زیستی شبه کاتالازی دارد.

## نتیجه گیری

کمپلکس‌های پورفیرین فلزی آهن، منگنز و روی همراه با سیستئین به‌عنوان لیگاند محوری متصل شده به اتم مرکزی این ترکیبات، پایه‌ی کاتالیتیکی آنزیم‌های مصنوعی در نظر گرفته شدند. در میان این سه پورفیرین فلزی سنتزی، پورفیرین آهن در انجام

نانوکاتالیست زیستی با بستر پگ است. ساختار نانوزایم شبه پراکسیدازی پگ به‌ویژه می‌تواند سوبسترای پراکسیدهدیروژن فعال را فراهم کند و تامین سوبسترای آلی را با دسترسی بالا به سمت جایگاه فعال تسهیل کند ( $K_M$  کوچک). ساختار نانوزایم شبه کاتالازی پگ نیز به‌ویژه می‌تواند محصول بالا آزاد کند ( $V_{max}$  بزرگ). لیکن نانوزایم شبه کاتالازی اس‌دی‌اس/دی‌تب در حالی که وسیکی و تک حفره است سوبسترای هیدروژن پراکسید را بهتر جذب کرده ( $K_M$  کوچک) و اینگونه کارایی شبه کاتالاز را بالا می‌برد.

### قدردانی

نویسندگان مقاله از حمایت‌های پژوهشگاه شیمی و مهندسی شیمی ایران صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۱۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۲۸

سینتتیک فلز واسطه آهن در انجام فعالیت‌های کلروپراکسیدازی، پراکسیدازی است. سومین عامل نوع سوبسترا در هر نوع کاتالیست زیستی و نوع ورود آن‌ها به کنار جایگاه فعال یا برخورد موثر ملکولی می‌باشد. برای مثال هیدروژن پراکسید تک سوبسترای کاتالاز، ملکولی کوچک، هیدروفیل و فعال است در حالی که چرخه واکنش پراکسیدازی شامل دو سوبسترا است، سوبسترای اول هیدروژن پراکسید است سوبسترای دوم یک اسید یا اکسید شونده آلی و هیدروفوب مانند گایاکول می‌باشد. نوع فلز و مقدار ایجاد هیدروفوبیسیته در آن پتانسیل‌های متفاوتی در برخورد موثر ملکولی ایجاد خواهد نمود. در کاتالیست زیستی شبه کاتالاز طراحی شده حاضر، این عامل سوم در مورد فلز واسطه منگنز از دو عامل دیگر پیشی گرفته است. با مقایسه بهره کاتالیستی در کاتالیست‌های زیستی جداول ارائه شده، می‌توان دریافت که محیط اطراف یک کمپلکس فلزپورفیرین - سیستئین یکی از عوامل تاثیرگذار بر عملکرد آنزیمی است. عملکرد بالاتر پلی اتیلن گلیکول نسبت به میسل ترکیبی ناشی از مقدار بالای سطح ویژه و موثر آن، برای در دسترس بودن سوبسترای گایاکول در نانوزایم پراکسیدازی است، که حاصل از حفره حفره‌ای بودن

### مراجع

- [۱] موسوی موحدی ز، فناوری‌های جدید بر مبنای دانش زیست الگو و الهام زیستی، *نشاء علم*، ۷(۱): ۵۳-۶۱ (۲۰۱۶).
- [2] Abedanzadeh S., Nourisefat M., Moosavi-Movahedi Z., "Bioinspiration and Biomimicry in Lifestyle, Rationality and Scientific Lifestyle for Health", Springer International Publishing, Cham (2021).
- [3] Moosavi-Movahedi Z., Gharibi H., Hadi-Alijanvand H., Akbarzadeh M., Esmaili M., Atri M.S., Sefidbakht Y., Bohlooli M., Nazari K., Javadian S., Hong J., Saboury A.A., Sheibani N., Moosavi-Movahedi A.A., *Caseoperoxidase, Mixed B-Casein-SDS-Hemin-Imidazole Complex: A Nano Artificial Enzyme*, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 33(12) 2619-2632 (2015).
- [4] Breslow R., *Biomimetic Chemistry: Biology as An Inspiration*, *J. Biol. Chem.* 284(3): 1337-42 (2009).
- [5] Breslow R., *Biomimetic Chemistry*, *Pure Appl. Chem.* 66(8): 1573-1582 (1994).
- [6] Moiani D., Salvalaglio M., Cavallotti C., Bujacz A., Redzynia I., Bujacz G., Dinon F., Pengo P., Fassina G., *Structural Characterization of a Protein A Mimetic Peptide Dendrimer Bound To Human IgG*, *J. Phys. Chem. B* 113(50): 16268-75 (2009).
- [7] Liu W., Groves J.T., *Manganese Porphyrins Catalyze Selective C-H Bond Halogenations*, *J. Am. Chem. Soc.* 132(37): 12847-9 (2010).

- [8] Groves J.T., Stern M.K., [Olefin Epoxidation by Manganese \(IV\) Porphyrins: Evidence for Two Reaction Pathways](#), *J. Am. Chem. Soc.* **109(12)**: 3812-3814 (2002).
- [9] Gharibi H., Moosavi-Movahedi Z., Javadian S., Nazari K., Moosavi-Movahedi A.A., [Vesicular Mixed Gemini-SDS-Hemin-Imidazole Complex as A Peroxidase-Like Nano Artificial Enzyme](#), *J. Phys. Chem. B* **115(16)**: 4671-9 (2011).
- [10] Das C., Goswami S., [Transition Metal Promoted Oxidative C–N Fusion Reactions of Aromatic Amines and Their Coordination Chemistry](#), *Comments Inorg. Chem.* **24(3-4)** 137-163 (2003).
- [11] Manoj K.M., Hager L.P., [Chloroperoxidase, A Janus Enzyme](#), *Biochemistry*, **47(9)**: 2997-3003 (2008).
- [12] van Deurzen M.P.J., van Rantwijk F., Sheldon R.A., [Selective Oxidations Catalyzed By Peroxidases](#), *Tetrahedron*, **53(39)**: 13183-13220 (1997).
- [13] Colonna S., Gaggero N., Manfredi A., Casella L., Gullotti M., Carrea G., Pasta P., [Enantioselective Oxidations of Sulfides Catalyzed by Chloroperoxidase](#), *Biochemistry*, **29(46)**: 10465-8 (1990).
- [14] Lakner F.J., Hager L.P., [Chloroperoxidase as Enantioselective Epoxidation Catalyst: An Efficient Synthesis of \(R\)-\(-\)-Mevalonolactone](#), *J. Org. Chem.* **61(11)**: 3923-3925 (1996).
- [15] Colonna S., Gaggero N., Richelmi C., Pasta P., [Recent Biotechnological Developments in the Use of Peroxidases](#), *Trends Biotechnol.* **17**: 163-168. (1999).
- [16] Corbett M.D., Chipko B.R., Baden D.G., [Chloroperoxidase-Catalysed Oxidation of 4-Chloroaniline to 4-Chloronitrosobenze](#), *Biochem. J* **175(2)**: 353-60 (1978).
- [17] Geigert J., Dalietos D.J., Neidleman S.L., Lee T.D., Wadsworth J., [Peroxide Oxidation of Primary Alcohols to Aldehydes by Chloroperoxidase Catalysis](#), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **114(3)**: 1104-1108 (1983).
- [18] Pešić M., López C., Álvaro G., López-Santín J., [A Novel Immobilized Chloroperoxidase Biocatalyst with Improved Stability for the Oxidation of Amino Alcohols to Amino Aldehydes](#), *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **84**: 144-151 (2012).
- [19] Veitch N.C., [Horseradish Peroxidase: A Modern View of a Classic Enzyme](#), *Phytochemistry*, **65(3)**: 249-59 (2004).
- [20] Zhang Y., Akilesh S., Wilcox D.E., [Isothermal Titration Calorimetry Measurements of Ni\(II\) and Cu\(II\) Binding to His, GlyGlyHis, HisGlyHis, and Bovine Serum Albumin: A Critical Evaluation](#), *Inorg. Chem.* **39(14)**: 3057-64 (2000).
- [21] Filizola M., Loew G.H., [Role of Protein Environment in Horseradish Peroxidase Compound I Formation: Molecular Dynamics Simulations of Horseradish Peroxidase–HOOH Complex](#), *J. Am. Chem. Soc.* **122(1)**: 18-25 (1999).
- [22] Loewen P.C., Villanueva J., Switala J., Donald L.J., Ivancich A., [Unprecedented Access of Phenolic Substrates to the Heme Active Site of A Catalase: Substrate Binding and Peroxidase-Like Reactivity of Bacillus Pumilus Catalase Monitored by X-Ray Crystallography and EPR Spectroscopy](#), *Proteins*, **83(5)**: 853-66 (2015).

- [23] Derat E., Cohen S., Shaik S., Altun A., Thiel W., [Principal Active Species of Horseradish Peroxidase, Compound I: A Hybrid Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Study](#), *J. Am. Chem. Soc.* **127(39)**: 13611-21 (2005).
- [24] Dunford H.B., "[Heme Peroxidases](#)", John Wiley, New York (1999).
- [25] Ivancich A., Jouve H.M., Sartor B., Gaillard J., [EPR Investigation Of Compound I in Proteus Mirabilis and Bovine Liver Catalases: Formation of Porphyrin and Tyrosyl Radical Intermediates](#), *Biochemistry*, **36(31)**: 9356-64 (1997).
- [26] Shevelkova A., Ryabov A., [Irreversible Inactivation of Caldariomyces Fumago Chloroperoxidase by Hydrogen Peroxide](#), *IUBMB Life*, **39(4)**: 665-670 (1996).
- [27] Poulos T.L., Kraut J., [A Hypothetical Model of the Cytochrome C Peroxidase . Cytochrome C Electron Transfer Complex](#), *J. Biol. Chem.* **255(21)**: 10322-10330 (1980).
- [28] Matsunaga I., Shiro Y., [Peroxide-Utilizing Biocatalysts: Structural and Functional Diversity of Heme-Containing Enzymes](#), *Curr. Opin. Chem. Biol.* **8(2)**: 127-132 (2004).
- [29] Ariga K., Li J., Fei J., Ji Q., Hill J.P., [Nanoarchitectonics for Dynamic Functional Materials from Atomic-/Molecular-Level Manipulation to Macroscopic Action](#), *Adv. Mater.* **28(6)**: 1251-86 (2016).
- [30] Abe H., Liu J., Ariga K., [Catalytic Nanoarchitectonics for Environmentally Compatible Energy Generation](#), *Mater. Today*, **19**: 12-18 (2016).
- [31] Hong J., Huang K., Wang W., Yang W.-Y., Zhao Y.-X., Xiao B.-L., Moosavi-Movahedi Z., Ghourchian H., Bohlooli M., Sheibani N., Moosavi-Movahedi A.A., [Cytochrome C Embraced in Sodium Dodecyl Sulfate Nano-Micelle As A Homogeneous Nanostructured Peroxidase](#), *Journal of the Iranian Chemical Society*, **9(5)**: 775-782 (2012).
- [32] Moosavi-Movahedi A.A., Semsarha F., Heli H., Nazari K., Ghourchian H., Hong J., Hakimelahi G.H., Saboury A.A., Sefidbakht Y., [Micellar Histidinate Hematin Complex as An Artificial Peroxidase Enzyme Model: Voltammetric and Spectroscopic Investigations](#), *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Aspects*, **320(1-3)**: 213-221 (2008).
- [33] Chadha G., Zhao Y., [Properties of Surface-Cross-Linked Micelles Probed by Fluorescence Spectroscopy and Their Catalysis of Phosphate Ester Hydrolysis](#), *J. Colloid Interface Sci.* **390(1)**: 151-7 (2013).
- [34] Moosavi-Movahedi Z., Kalejahi E.S., Nourisfat M., Maghami P., Poursasan N., Moosavi-Movahedi A.A., [Mixed SDS-Hemin-Imidazole at Low Ionic Strength Being Efficient Peroxidase-Like As A Nanozyme](#), *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, **522**: 233-241 (2017).

[۳۵] معصومی ح.، جنگجوی شالدهی ط.، قنادزاده گیلانی ح.، بررسی عامل‌های مؤثر بر سامانه دو فازای دارای پلی اتیلن گلیکول ۴۰۰۰ گرم بر مول و نمک‌های فسفات در استخراج مالیک اسید، نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران **۳۹(۴)**: ۱۷۷-۱۸۴ (۲۰۲۱).

- [36] Sajadimehr Y., Moosavi-Movahedi Z., Haghghi M.G., Miyardan A.B., Nourisefat M., Moosavi-Movahedi A.A., [Iron-Porphyrin/Cysteine/PEG as Pseudo-Chloroperoxidase Nanozyme](#), *ChemistrySelect*, **4(35)**: 10357-10364 (2019).
- [37] Morshedi D., Rezaei-Ghaleh N., Ebrahim-Habibi A., Ahmadian S., Nemat-Gorgani M., [Inhibition of Amyloid Fibrillation of Lysozyme by Indole Derivatives--Possible Mechanism of Action](#), *FEBS J.* **274(24)**: 6415-25 (2007).
- [38] Akbarzadeh M., Moosavi-Movahedi Z., Shockravi A., Jafari R., Nazari K., Sheibani N., Moosavi-Movahedi A.A., [Metallo-Vesicular Catalysis: A Mixture of Vesicular Cysteine/Iron Mediates Oxidative pH Switchable Catalysis](#), *J. Mol. Catal. A: Chem.* **424**: 181-193 (2016).
- [39] Marques H.M., [Insights Into Porphyrin Chemistry Provided by the Microperoxidases, The Haempeptides Derived From Cytochrome C](#), *Dalton Trans*, **39**: 4371-85 (2007).
- [40] Zuev Y., Faizullin D., Idiyatullin B., Mukhitova F., Chobert J.-M., Fedotov V., Haertlé T., [Aggregation of Sodium Dodecyl Sulfate in Micellar Solution of  \$\beta\$ -Casein Analyzed by <sup>1</sup>H-NMR Self-Diffusion, Relaxation and Fourier Transform IR Spectroscopy](#), *Colloid & Polymer Science*, **282(3)**: 264-269 (2004).
- [41] Milton H.J., "Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications", Plenum Press, New York, (1992).
- [42] Starks C.M., Liotta C.L., M. H., "Phase-Transfer Catalysis: Fundamentals, Applications and Industrial Perspectives", Chapman and Hall, New York (1994).
- [43] Thomas J.A., Morris D.R., Hager L.P., [Chloroperoxidase : VII. Classical Peroxidatic, Catalatic, And Halogenating Forms Of The Enzyme](#), *J. Biol. Chem.* **245(12)**: 3129-3134 (1970).
- [44] Northrop D.B., [On the Meaning of Km and V/K in Enzyme Kinetics](#), *J. Chem. Educ.* **75(9)**: 1153 (1998).
- [45] Parlato M., Reichert S., Barney N., Murphy W.L., [Poly \(Ethylene Glycol\) Hydrogels with Adaptable Mechanical and Degradation Properties for Use in Biomedical Applications](#), *Macromol. Biosci.* **14(5)**: 687-698 (2014).
- [46] Li Z., Su Y., Xie B., Wang H., Wen T., He C., Shen H., Wu D., Wang D., [A Tough Hydrogel-Hydroxyapatite Bone-Like Composite Fabricated In Situ By The Electrophoresis Approach](#), *Journal of Materials Chemistry B*, **1(12)**: 1755-1764 (2013).
- [47] Moosavi-Movahedi Z., Kafi M.M., Sajadimehr Y., Abedanzadeh S., [Mixed Copper\(II\)-Cysteine-SDS-DTAB as Multi-Oxidative Vesicular Nanozyme](#), *Journal of the Iranian Chemical Society*, **19**: 475-487 (2021).
- [48] Abeles R.H., Frey P.A., Frey, Jencks W.P., "Biochemistry", Jones and Bartlett (1992).
- [49] Tezuka M., Ohkatsu Y., Osa T., [Reduction and Oxidation Potentials of Metal-free and Cobalt Tetra \(p-substituted phenyl\) porphyrins](#), *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **49(5)**: 1435-1436 (1976).
- [50] Harrison P.M., "Metalloproteins: Metal Proteins With Non-Redox Roles", Macmillan (1985).