

## تهیه نانو حامل‌های مغناطیسی ایزوله پروتئین سویا با روش ژلاتیناسیون سرد به عنوان بستری مناسب جهت تثبیت آنزیم اینولیناز

محدثه میکانی<sup>۱</sup>، هما ترابی زاده<sup>۲\*</sup>، رضارحمانیان<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup>تهران- سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران- پژوهشکده کشاورزی

<sup>۲</sup>تهران- سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران- پژوهشکده فناوری‌های شیمیایی- گروه صنایع غذایی و تبدیلی

<sup>۳</sup>تهران- سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران- پژوهشکده فناوری‌های شیمیایی

تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۳/۱۱

تاریخ تصحیح: ۹۵/۰۳/۱۰

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۲/۱۴

### چکیده

امروزه تثبیت آنزیم بر روی بسترهای با ابعاد نانو در صنایع غذایی مورد توجه قرار گرفته است. آنزیم اینولیناز قادر به تولید شربت پرفروکتوز از سوبسترای پلی فروکتان اینولین در فرایندی تک مرحله‌ای بوده و تثبیت آن با این روش علاوه بر فواید مهمی مانند افزایش پایداری ساختار آنزیم، قابلیت استفاده مجدد، کاهش آلودگی‌های پروتئینی، و بکارگیری بیوراکتور با سیستم مداوم، جداسازی آنزیم را پس از خاتمه فرآیند از محیط واکنش توسط میدان مغناطیسی امکان پذیر و نیاز به استفاده از سایر روش‌های غیر اقتصادی جداسازی را مانند سانتریفوژ و فیلتراسیون مرتفع می‌نماید. در این پژوهش آنزیم اینولیناز بر روی نانوذرات مغناطیسی عامل‌دار شده با نانوذرات پروتئینی از طریق ایجاد اتصالات کووالانسی با آنزیم تثبیت شد. بدین منظور در مرحله اول نانوذرات مغناطیسی به روش هم‌رسوبی تهیه گردید. پس از آن در مرحله دوم، نانوذرات ایزوله پروتئین سویا به روش ژلاتیناسیون سرد تهیه و سپس جهت اصلاح سطح و پایدار سازی نانوذرات مغناطیسی، فرآیند پوشش دهی سطح انجام گرفت. در مرحله سوم، فرآیند تثبیت آنزیم بر روی سطوح بستر مغناطیسی، با ایجاد اتصالات کووالانسی با استفاده از گلوترآلدئید صورت گرفت. بر طبق نتایج میکروسکپ الکترونی روشی اندازه نانوذرات مغناطیسی آهن در محدوده ۵۰-۲۰ nm با میانگین اندازه ۳۵ nm بدست آمد. ذرات از نظر مورفولوژی کروی و یکنواخت بودند. اندازه نانوذرات ایزوله پروتئین سویا با توجه به تغییر میزان گرم درصد پروتئین در محدوده ۶۰۰-۱۰۰ nm با استفاده از تفرق دینامیکی نور اندازه‌گیری شد. تثبیت آنزیم بر روی نانوذرات مغناطیسی عامل‌دار شده با پروتئین با استفاده از طیف سنجی تبدیل فوریه تایید شد.

واژگان کلیدی: اینولیناز، نانوذرات مغناطیسی، تثبیت آنزیم، ایزوله پروتئین سویا، ژلاتیناسیون سرد.

### ۱- مقدمه

استفاده از نانوذرات مغناطیسی برای تثبیت آنزیم‌ها مورد توجه خاصی قرار گرفته است چراکه جداسازی آسان این نانوذرات به‌وسیله آهن‌ربا این مشکل را مرتفع کرده است [۱]. این نوع نانوذرات که در واقع اکسیدهای آهن زیست‌سازگار بوده و دارای سمیت کمی می‌باشند به دلیل دارا بودن سطح مقطع گسترده، نسبت سطح به حجم بالا و جداسازی آسان از محیط واکنش در سال‌های اخیر مورد

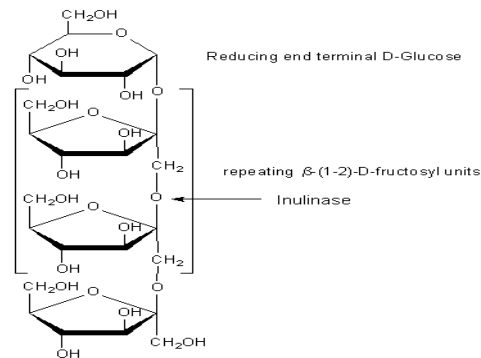
توجه قرار گرفته‌اند. با بکارگیری سه روش فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی می‌توان این گونه نانوذرات را تولید نمود. روش‌های فیزیکی مانند لیتوگرافی پرتو الکترونی<sup>۱</sup>، روش‌های شیمیایی مانند سنتز سل-ژل، اکسیداسیون، هم‌رسوبی، واکنش‌های هیدروترمال و روش‌های بیولوژیکی مانند روش میکروبی می‌باشند. هر یک از روش‌های ذکر شده مزایا و معایبی دارند. با وجود اینکه انجام روش‌های فیزیکی راحت‌تر بوده ولی کنترل اندازه ذرات در آن مشکل است. در مورد تعدادی از روش‌های آماده‌سازی شیمیایی مرطوب با تنظیم دقیق عوامل درگیر در واکنش امکان کنترل اندازه ذرات وجود دارد. روش شیمیایی هم‌رسوبی ساده‌ترین و کارآمدترین روش در تولید نانوذرات مغناطیسی می‌باشد.

روش هم‌رسوبی، دستیابی به محلول مغناطیسی در یک مرحله و با تجهیزات متداول و بازدهی تولید بهتر و ارزان‌تر را امکان‌پذیر می‌نماید. در این روش با استفاده از واکنش‌های شیمیایی مناسب، نانوذرات مغناطیسی مستقیماً در فاز مایع تولید می‌شوند [۴-۲]. این نوع نانوذرات به تنهایی ناپایدارند و همین امر موجب ایجاد محدودیت در استفاده مجدد از آن‌ها و کاهش طول عمر این ترکیبات بوده است. بالا بودن نسبت سطح به حجم منجر به تجمع ذرات و به حداقل رساندن انرژی سطحی می‌گردد. جاذبه قوی بین نانوذرات قابلیت پخش آن‌ها را در محلول‌های آبی و بسترها کاهش داده و در نهایت میزان آنزیم و یا پروتئین تثبیت شده کاهش می‌یابد. به منظور مقابله با این محدودیت‌ها روش‌های مختلفی جهت اصلاح سطح آن‌ها از طریق بارگذاری ترکیبات شیمیایی و یا بیولوژیک در حین فرایند سنتز یا بعد از آن به کار گرفته می‌شوند. این‌گونه فرایندهای اصلاحی نه تنها ویژگی‌های نانوذرات مغناطیسی آهن مانند زیست سازگار بودن، قابلیت پخش شدن و زیست تخریب پذیری را بهبود بخشیده بلکه قادر به تبدیل نانوذرات اکسید آهن هیدروفوویک به یک سیستم هیدروفیلیک را فراهم می‌آورند. ترکیبات مختلفی در این فرایند درگیر هستند. عوامل فعال کننده سطح مثل اولتیک اسید، لوریک اسید، آلکیل سولفونیک اسید و آلکیل فسفونیک اسیدها به طور معمول مورد استفاده قرار می‌گیرند [۵]. پلیمرهای چندانگانه مانند پلی اتیلن گلیکول، پلی وینیل پیرولیدین، پلی اتیلن کو وینیل استات، پلی لاکتیک کو گلیکولیک اسید و پلی وینیل الکل به عنوان ماده پوشش دهنده در سوسپانسیون مایع مورد استفاده قرار می‌گیرند [۶]. علاوه بر این، ترکیبات با منشاء زیستی مانند ژلاتین، دکستران، پلی لاکتیک اسید، نشاسته، آلبومین، لیپوزوم، کیتوزان، اتیل سلولز و ایزوله پروتئین سویا با هدف پوشش دهی در محیط مایع به کار می‌روند [۸و۷].

سویا یکی از منابع غنی پروتئین‌های گیاهی محسوب شده و شکل غنی شده‌ی پروتئین آن به عنوان ایزوله پروتئین سویا (Soy Protein Isolate: SPI) شناخته می‌شود. این ترکیب با حذف شدن چربی و کربوهیدرات از کنجاله سویا بدست می‌آید و دارای حدود ۹۰٪ پروتئین است. SPI دارای ارزش تغذیه‌ای بالایی بوده و کاربردهای بسیاری نیز در صنایع غذایی دارد. SPI شامل ترکیبات متعادلی از اسیدهای آمینه قطبی، غیر قطبی و دارای بار می‌باشد. ترکیب اصلی SPI شامل Glycinin و Conglycinin است که در محیط آبی به شکل کروی می‌باشند که سطح آن هیدروفیلیک و هسته‌ی آن هیدروفوبیک است و می‌تواند تشکیل میسل دهند. با افزودن عوامل حل کننده و اتصال دهنده‌ی عرضی، مولکولهای SPI جمع شده و تشکیل ساختارهای متنوعی مثل اجسام کروی کوچک، هیدروژل‌ها و مخلوط‌های پلیمری را می‌دهند [۹]. نانوذرات ایزوله‌ی پروتئین سویا از SPI تازه به وسیله‌ی روش ژلاتیناسیون سرد بدست می‌آیند. نانوذرات حاصل به منظور عامل دار کردن سطح نانوذرات مغناطیسی جهت تثبیت آنزیم اینولیناز، به کار گرفته می‌شوند [۱۰].

اینولیناز آنزیمی است که با هیدرولیز اینولین فروکتوز و فروکتواولیگوساکارید که کاربرد بسیاری در صنایع دارویی و غذایی دارند را تولید می‌نماید (شکل ۱) [۱۱]. آنزیم اینولیناز قادر به تولید شربت پرفروکتوز از اینولین در یک فرایند تک مرحله‌ای آنزیمی می‌باشد. در صورتی که روش مرسوم در کارخانجات صنایع غذایی تبدیل نشاسته طی چند مرحله‌ی آنزیمی به شربت پرفروکتوز است که روشی زمان‌بر و با هزینه بالا می‌باشد. هیدرولیز اینولین به دو روش اسیدی و آنزیمی امکان‌پذیر است که در روش اسیدی برای تولید شربت پرفروکتوز معمولاً مشکلاتی را از جمله کاهش کیفیت رنگ، طعم، مزه فرآورده‌ی نهایی و نیز تولید فرآورده‌های جانبی به همراه دارد. در حالی که در روش هیدرولیز اینولین با استفاده از آنزیم، کیفیت رنگ، طعم و مزه حفظ می‌شود. در ضمن میزان تولید فروکتوز در روش آنزیمی بالاتر است [۱۲-۱۴].

Inulinase Specificity



شکل ۱- ساختار آنزیم اینولیناز

در پروژه حاضر ابتدا نانوذرات مغناطیسی آهن با روش هم رسوبی تهیه، سپس با نانوذرات ایزوله پروتئین سویا که به روش ژلاتیناسیون سرد تهیه شده بود، عامل دار شد. در ادامه فرآیند تثبیت آنزیم اینولیناز از طریق پیوندهای کووالانسی انجام گردید کلیه مراحل تحقیق با تکنیک‌های میکروسکپ الکترونی روبشی (SEM)، روش تفرق دینامیک نور (DLS) و طیف سنجی تبدیل فوریه (FTIR) پایش شدند.

## ۲- بخش تجربی

### ۲-۱- مواد شیمیایی و معرف‌های مورد استفاده

آنزیم اینولیناز حاصل از اسپرژیلوس نایجر<sup>۱</sup> ساخت شرکت سیگما- آلدریج<sup>۲</sup>، اینولین حاصل از ریشه کوبک با فرمول مولکولی (C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>) و جرم مولکولی نسبی ۵۰۰۰ دالتن ساخت شرکت فلوکا<sup>۳</sup> آمریکا می باشند. سایر مواد شامل ایزوله پروتئین سویای چربی زدایی شده، گلوترآلدئید ۲۵٪ (حجمی/حجمی)، کلرید آهن (II)، کلرید آهن (III)، هیدروکلریک اسید، سدیم هیدروکسید، همگی از نوع آزمایشگاهی بوده و از نمایندگی‌های شرکت مرک<sup>۴</sup> آلمان در ایران خریداری شده اند.

### ۲-۲- دستگاه‌های مورد استفاده

ترازوی دیجیتال متلر<sup>۵</sup> با دقت ۰/۰۰۱ میلی گرم، مدل AE 240 ساخت آلمان، pH متر جانوی<sup>۶</sup> مدل 3045 ساخت آمریکا، همزن ورتکس مدل MS<sub>2</sub>(minishaker) ساخت آلمان بوده اند. دستگاه میکروسکپ الکترونی روبشی گسیل میدانی<sup>۷</sup> مدل Tescan-Mira II، دستگاه تفرق دینامیکی نور<sup>۸</sup> مدل Brookhaven ، و اسپکتروفتومتر پریکین المر<sup>۹</sup> مدل Lambda 25 ساخت کشور آمریکا متعلق به سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردیدند.

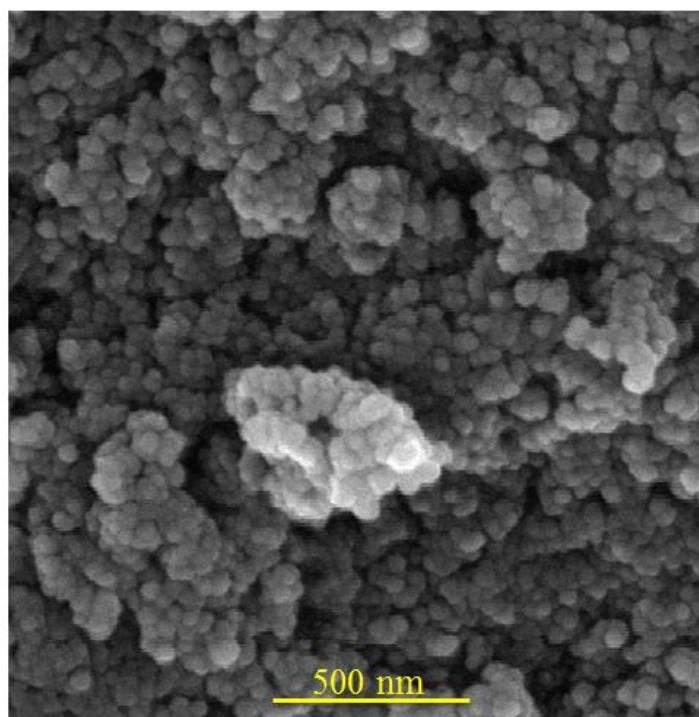
- 
- 1- Aspergillus niger
  - 2- Sigma-Aldrich
  - 3- Fluka
  - 4- Merck
  - 5- Mettler
  - 6- Janway
  - 7- FE-SEM
  - 8- Differential Light Scattering (DLS)
  - 9- Spectrophotometer Perkin Elmer

## ۳- بحث و نتیجه گیری

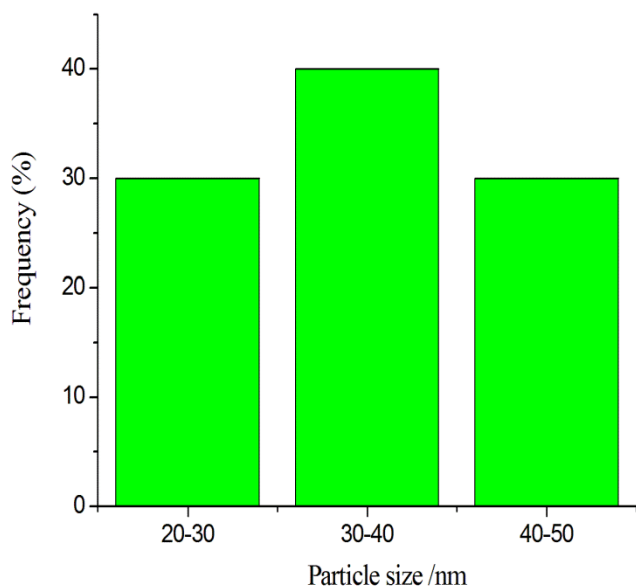
## ۳-۱- سنتز نانوذرات مغناطیسی آهن

ابتدا دو نمک آهن  $Fe^{2+}$  و  $Fe^{3+}$  با نسبت استوکیومتری ۱ به ۲ وزن شدند. ۸/۸۶ گرم از  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  و ۳/۲۵ گرم  $FeCl_2 \cdot 4H_2O$  به صورت جداگانه وزن و هر کدام در ۲۰۰ سی سی آب دیونیزه حل شدند. سپس هر دو محلول با استفاده از همزن مغناطیسی با هم مخلوط شدند و تحت گاز نیتروژن، ۱۰ میلی لیتر محلول هیدروکسید سدیم به صورت قطره قطره به آن اضافه شد که با افزودن آن محلول به رنگ سیاه درآمد. نانوذرات مغناطیسی آهن، سه بار با آب دیونیزه شستشو داده شده و سپس در آون با دمای ۷۲ درجه سانتی گراد خشک شد [۱۵]. شکل ۲ مراحل انجام سنتز  $Fe_3O_4$  را به نمایش می‌گذارد. جذب نانوذرات سیاه رنگ حاصل بر روی آهن ربا حاکی از خاصیت مغناطیسی آن‌ها می‌باشد. شکل ۲ تصویر میکروسکوپ الکترونی نانوذرات مغناطیسی و نمودار توزیع اندازه ذرات آن را نشان می‌دهد. تصاویر FE-SEM، اندازه ذرات تشکیل دهنده نانوذرات مغناطیسی آهن را در محدوده ۲۰-۵۰ nm با میانگین اندازه ۳۵nm به نمایش می‌گذارد. ذرات از نظر مورفولوژی کروی و یکنواخت می‌باشند که سطح مناسبی را جهت تثبیت آنزیم فراهم می‌آورد.

الف



ب



شکل ۲- الف) تصویر میکروسکوپ الکترونی نانوذرات مغناطیسی، ب) نمودار توزیع اندازه ذرات مغناطیسی

### ۳-۲- تهیه نانوذرات ایزوله پروتئین سویا با استفاده از روش ژلاتیناسیون سرد

#### ۳-۲-۱- ژلاتیناسیون سرد

از این روش برای تولید نانوذرات پروتئینی استفاده می‌شود. ژلاتیناسیون سرد از تکنیکهای جدید است که شامل دو مرحله می‌باشد. در مرحله‌ی اول محلول پروتئینی تیمار گرمایی می‌بیند که منجر به متراکم شدن و رسوب پروتئین‌ها می‌گردد. در مرحله‌ی دوم با کاهش pH یا افزودن نمک در دمای اتاق، شبکه‌ی پروتئینی تشکیل می‌گردد. می‌توان با تغییر غلظت پروتئین، نمک و تغییر pH به ساختاری در ابعاد نانو دست پیدا کرد [۱۸].

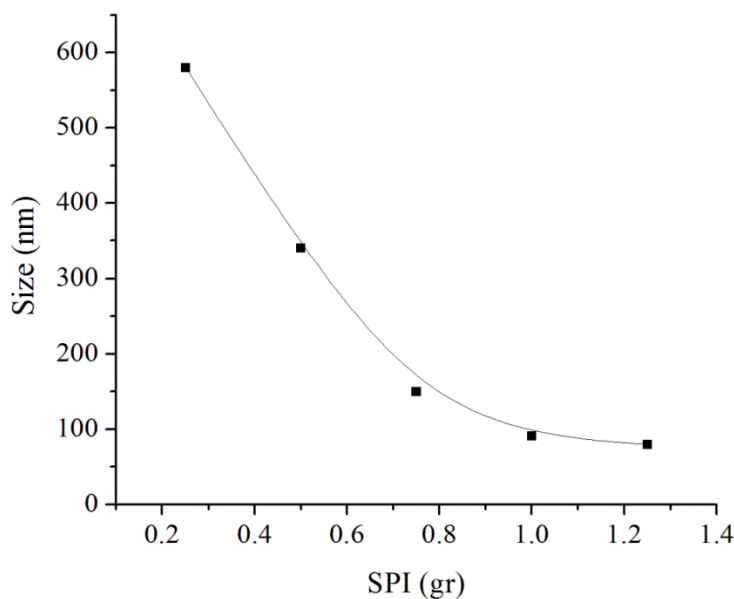
#### ۳-۲-۲- تهیه نانوذرات پروتئینی ایزوله پروتئینی سویا با استفاده از روش ژلاتیناسیون سرد

پودر SPI با مقادیر ۰/۲۵ ، ۰/۵ ، ۰/۷۵ ، ۱ ، ۱/۲۵ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه مخلوط گردید و به منظور تهیه یک سوسپانسیون کاملا یکنواخت، همزدن به مدت ۲۰ تا ۳۵ دقیقه در دمای اتاق ادامه یافت. pH مخلوط با استفاده از NaOH ۰/۱ مولار به ۱۲ رسید. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در ۷۰ تا ۱۰۰ درجه سانتیگراد در لوله‌های سربسته با استفاده از حمام آب حرارت داده شد. پس از آن pH با به‌کارگیری HCl ۰/۵ مولار به ۹-۶ رسانده شد. غلظت نهایی پروتئین به ۲ تا ۶ میلی‌گرم بر لیتر رقیق شد. سپس نمک کربنات کلسیم با غلظت ۲۰ میلی‌مولار به محلول پروتئین افزوده شده و pH مخلوط نهایی در محدوده ۸/۸-۶/۸ تنظیم گردید. غلظت پروتئین باز هم کاهش یافته و به ۵-۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر رسید [۱۶ و ۱۷].

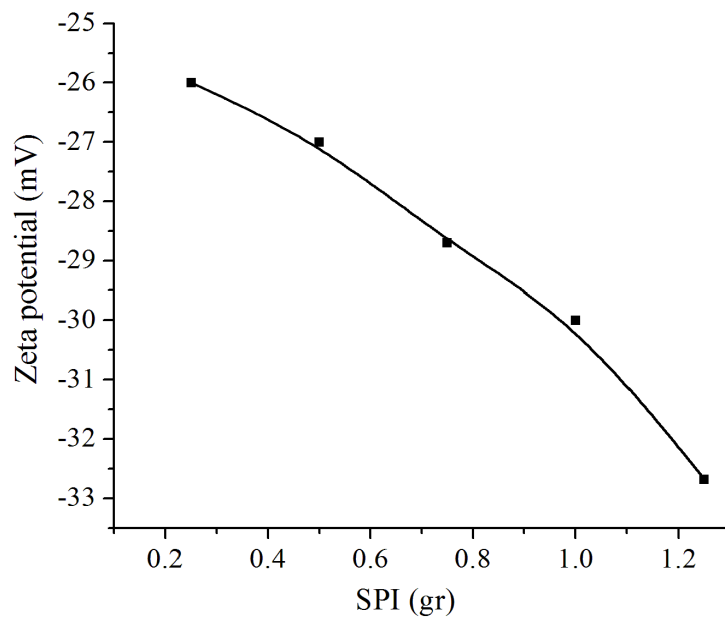
#### ۳-۲-۳- تعیین اندازه ذرات پروتئینی سنتز شده

در حال حاضر DLS سریع‌ترین و محبوب‌ترین روش تعیین اندازه ذرات می‌باشد. پراکندگی نور دینامیکی روشی فیزیکی است که برای تعیین توزیع ذرات موجود در محلول‌ها و سوسپانسیون استفاده می‌شود. این روش غیرمخرب و سریع برای تعیین اندازه ذرات در محدوده‌ی چند نانومتر تا میکرون به کار می‌رود. اندازه ذرات توسط روش پراکندگی لیزر به صورت دینامیکی (DLS) در طول موج ۶۳۷ نانومتر در زاویه پراکنش  $90^0$  با استفاده از دستگاه Laser Particle Count محاسبه می‌شود. میانگین و پراکندگی اندازه توسط نرم افزار پخش دینامیکی BIC براساس شدت نور پراکنده شده محاسبه می‌شود. تمام آنالیزها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه انجام می‌شوند [۱۹ و ۱۸ و ۱۷]. نمودار توزیع اندازه نانوذرات پروتئینی ایزوله پروتئینی سویا بر حسب میزان گرم SPI مصرفی، در شکل ۳ به نمایش درآمده است. با توجه به شکل ۳ با افزایش میزان SPI اندازه ذرات کاهش می‌یابد که به دلیل افزایش بار سطحی و غلبه دافعه الکترواستاتیک بر جاذبه الکترواستاتیک است.

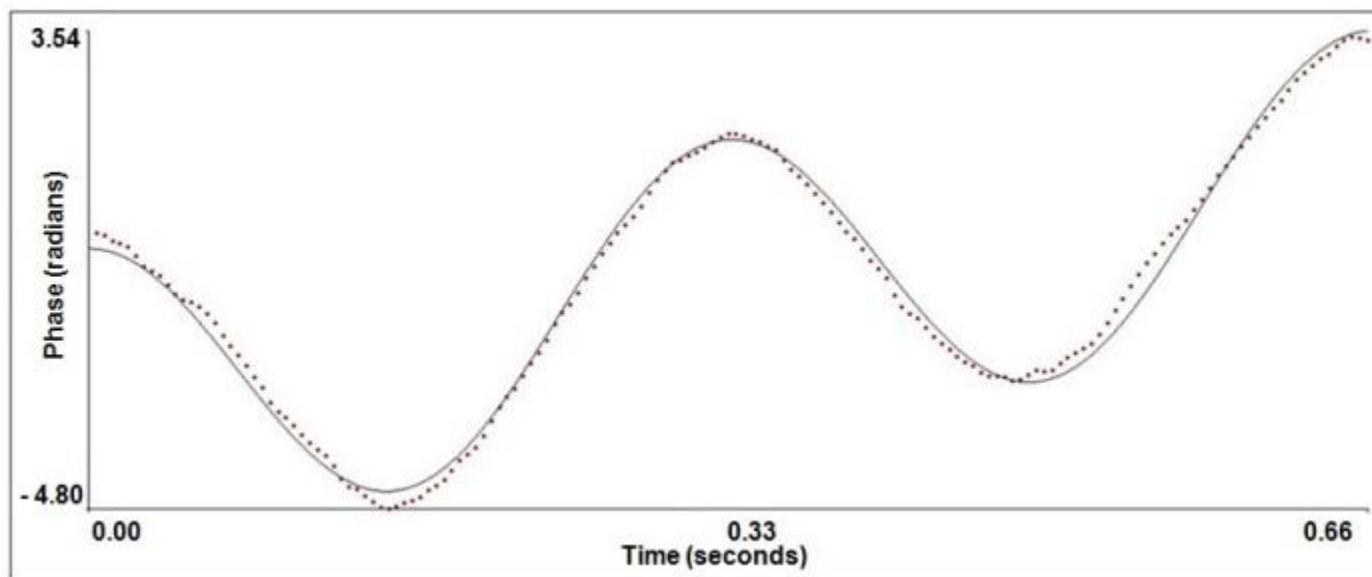
پایداری کلئید با استفاده از پتانسیل زتای نانوذرات تعیین می‌شود. این پتانسیل یک روش غیر مستقیم برای اندازه‌گیری بار سطحی می‌باشد. در واقع پتانسیل زتا یک پارامتر برای ثبات بالقوه‌ی سیستم کلئیدی است. اگر همه ذرات داخل سوسپانسیون دارای بار منفی و یا مثبت باشند، ذرات تمایل به دفع یکدیگر دارند و تمایلی به هم‌انباشتگی از خود نشان نمی‌دهند. تمایل ذرات هم‌بار به دفع یکدیگر رابطه مستقیمی با پتانسیل زتا دارد [۱۹ و ۱۸]. اندازه‌گیری پتانسیل زتا بر حسب میزان گرم SPI مصرفی، در شکل ۴ به نمایش درآمده است و شکل ۵ تصویر بررسی پتانسیل زتای نانوذرات ایزوله پروتئینی سویا با استفاده از روش DLS نشان می‌دهد. افزایش میزان پتانسیل زتا، نشان از پایداری بالای نانوذرات ایجاد شده به دلیل افزایش بار سطحی ناشی از بالا رفتن میزان SPI است.



شکل ۳- توزیع اندازه نانوذرات پروتئینی ایزوله پروتئینی سویا بر حسب میزان گرم SPI در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب



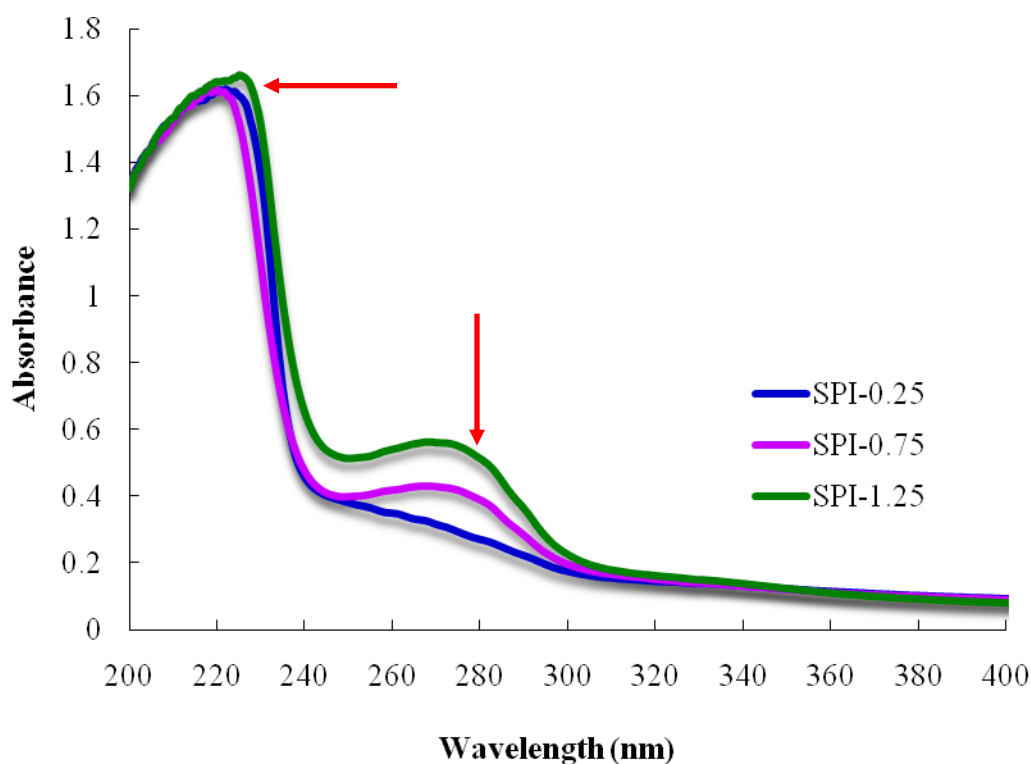
شکل ۴- اندازه گیری پتانسیل زتا بر حسب میزان گرم SPI



شکل ۵- تصویر بررسی پتانسیل زتای نانوذرات ایزوله پروتئین سویا توسط روش DLS



طیف جذبی نانوذرات ایزوله پروتئینی حاصل از میزان غلظت‌های اولیه ۰/۲۵، ۰/۷۵، ۱/۲۵ گرم در صد میلی‌لیتر آب در ناحیه UV و در محدوده ۲۰۰-۴۰۰ نانومتر جهت بررسی ساختار پروتئینی در شکل ۶ نشان داده شده است. طیف جذبی در ناحیه UV دارای دو قله جذب یکی در طول موج ۲۲۰ نانومتر (ماکزیمم جذب پیوندهای پپتیدی) و دیگری در ناحیه ۲۸۰ نانومتر (ماکزیمم جذب اسیدهای آمینه حلقوی مانند تریپتوفان، تیروزین و فنیل آلانین) تاییدی بر حفظ ساختار پروتئینی نانوذرات ایزوله‌ی سویا می‌باشد. در صورت عدم مشاهده واضح چنین نواحی جذبی، احتمال اینکه ساختار صدمه دیده داده باشد، وجود دارد [۲۰ و ۲۱].



شکل ۶- طیف جذبی نانوذرات ایزوله پروتئین سویا

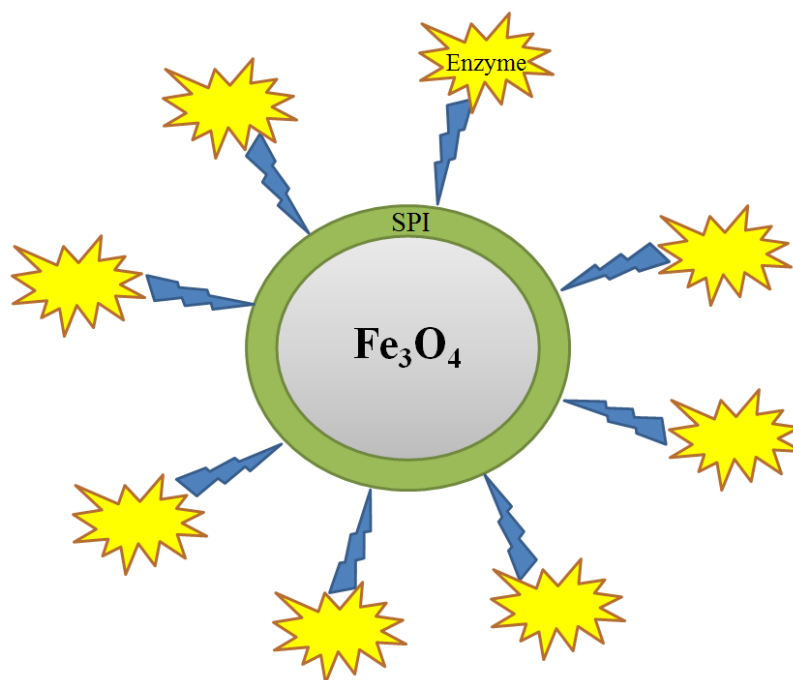
### ۳-۳- اصلاح سطح نانوذرات مغناطیسی با نانوذرات پروتئینی

میزان ۰/۰۳ گرم از نانوذرات پروتئینی SPI در ۲۵ میلی لیتر بافر فسفات حل گردید. سپس مقدار ۰/۵ گرم نانوذرات مغناطیسی به محلول SPI اضافه شده و به مدت ۲۴ ساعت مخلوط حاصل، به منظور جذب سطحی نانوذرات پروتئینی بر روی نانوذرات مغناطیسی،

تحت هم زدن ملایم در دمای اتاق قرار گرفت. محلول نهایی در سانتریفیوژ با سرعت ۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه جهت جداسازی نانوذرات بدون پیوند، قرار گرفته و با بافر فسفات شستشو داده شد.

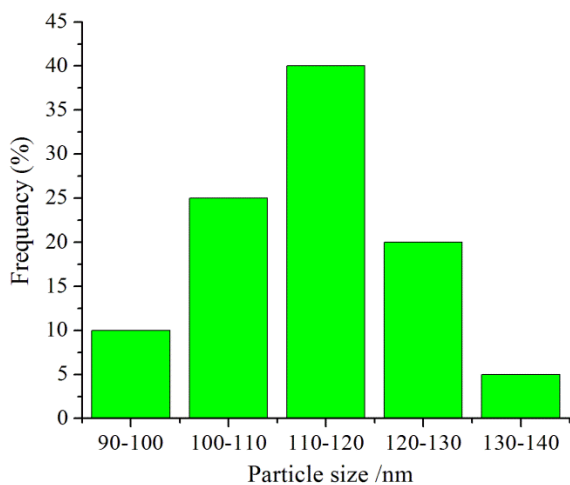
### ۳-۴- تثبیت آنزیم اینولیناز بر روی نانوذرات مغناطیسی اصلاح شده

نانوذرات مغناطیسی عامل دار شده در ۱۰۰ میلی مول بافر استات (pH = ۵-۵/۵) به همراه ۳۰۰ میکرولیتر گلوترآلدئید به مدت ۳۰ دقیقه تحت امواج اولتراسونیک قرار داده شد. سپس ۴ میلی لیتر از آنزیم اندواینولیناز به مخلوط اضافه گردید و با سرعت ملایم (۳۰۰ rpm) در دمای یخچال (۳-۴ درجه سانتیگراد) هم زده شده و سپس مخلوط در سه مرحله با بافر فسفات در pH=۷ شستشو داده شد. آنزیم تثبیت شده به روش کووالانسی تا زمان استفاده در فریزر با دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود [۲۲]. شکل ۷ شمای نحوه تثبیت آنزیم به روش کووالانسی بر روی سطح نانوذرات مغناطیسی عامل دار شده با نانوذرات SPI را نمایش می‌دهد.

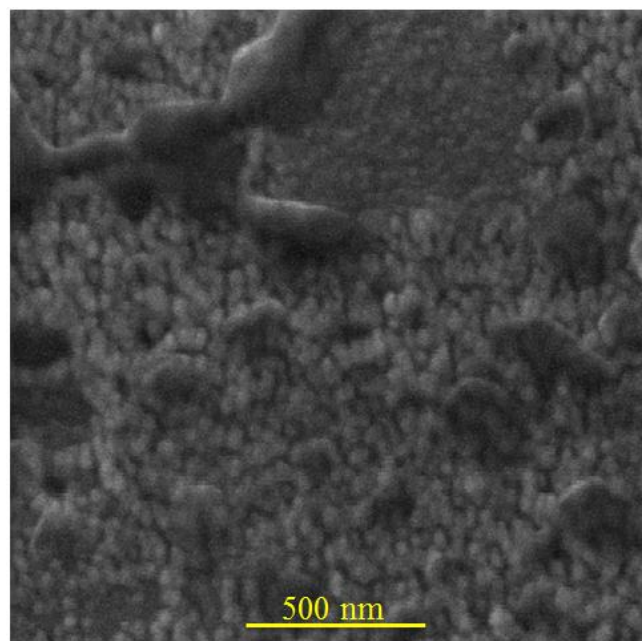


شکل ۷- تصویر شماتیک تثبیت آنزیم اینولیناز بر روی سطح نانوذرات مغناطیسی عامل دار شده با نانوذرات SPI

در شکل ۸ الف، تصویر SEM نانوذرات مغناطیسی اصلاح شده توسط نانوذرات ایزوله پروتئین سویا که تثبیت آنزیم بر روی آنها صورت پذیرفته است، نشان داده شده است. نحوه توزیع اندازه نانوذرات اصلاح شده در شکل ۸ ب، نشان از افزایش قطر نانوذرات مغناطیسی آهن عامل دار شده است.

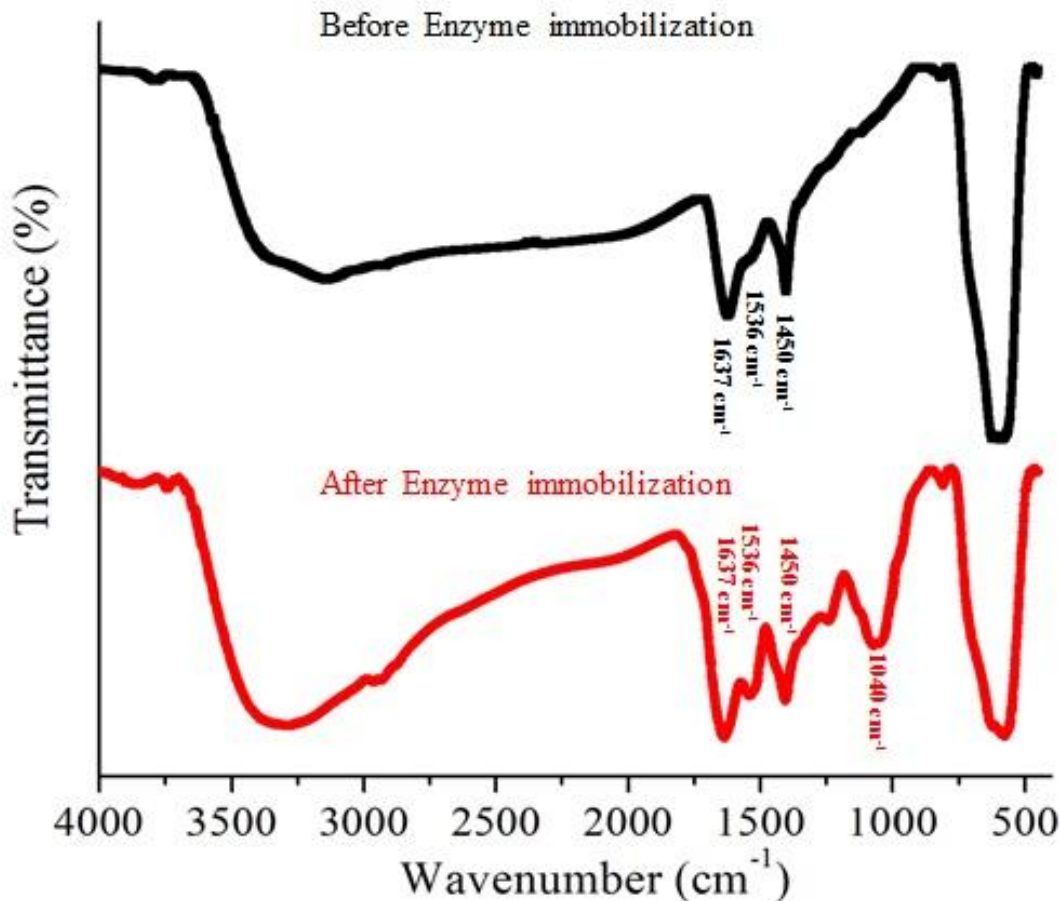


ب



الف

شکل ۸- الف) تصویر میکروسکپ الکترونی تثبیت آنزیم اینولیناز بر روی نانوذرات مغناطیسی اصلاح شده با SPI، ب) منحنی توزیع اندازه ذرات مغناطیسی طیف سنجی مادون قرمز یکی از پر کاربردترین روش‌ها در شناسایی کیفی، تعیین ساختار مولکولی گونه مختلف (مخصوصاً گونه‌های آلی) و شناسایی گروه‌های عاملی موجود در ساختار یک گونه می‌باشد. شکل ۹، طیف FTIR قبل و بعد از تثبیت آنزیم را بر روی نانوذرات اصلاح شده، نشان می‌دهد. مهمترین پیک‌های ثبت شده نانوذرات مغناطیسی اصلاح شده قبل از تثبیت آنزیم مربوط به SPI در ناحیه  $1637$ ،  $1536$  و  $1450$   $\text{cm}^{-1}$  به ترتیب مربوط به آمید نوع ۱، آمید نوع ۲ و گروه کربوکسیلیک می‌باشد و این در حالیست که پس از فرآیند تثبیت آنزیم مهمترین پیک ظاهر شده در  $1040$   $\text{cm}^{-1}$  مربوط به پیوند C-O-C موجود در ساختار پروتئینی آنزیم می‌باشد [۱۹ و ۱۰].



شکل ۹ - طیف‌های FTIR ثبت شده نانوذرات مغناطیسی اصلاح شده قبل (نمودار سیاه رنگ) و بعد از تثبیت آنزیم (نمودار قرمز رنگ).

#### ۴- نتیجه‌گیری

یکی از مهمترین کاربردهای نانوساختارها در حوزه زیست فناوری، بکارگیری این نوع ساختارها در تثبیت آنزیم‌ها با هدف افزایش پایداری آن‌ها می‌باشد. از آنجا که نانوذرات مغناطیسی دارای اندازه کوچک و سطحی بزرگ هستند، حامل مناسبی برای تثبیت آنزیم‌ها بشمار می‌روند. در این پژوهش، با استفاده از اصلاح سطح نانوذرات مغناطیسی با روشی کارآمد تثبیت آنزیم اینولیناز صورت گرفت. بدین منظور، ایزوله پروتئین سویا در ابعاد نانو که حاوی مقادیر قابل توجهی اسیدهای آمینه لیزین سطحی به عنوان گروه‌های عاملی بوده، بر روی سطوح نانوذرات مغناطیسی پوشش داده شد و سپس آنزیم اینولیناز با ایجاد پیوند‌های کووالانسی روی نانوساختارهای شکل گرفته تثبیت گردید. بررسی‌های انجام شده نشان داد که، آنزیم تثبیت شده دارای پایداری بیشتر، سهولت بالاتر در جداسازی آنزیم از محصول، امکان استفاده مجدد از آنزیم، و افزایش سطح تماس آنزیم با سوبسترای اینولین را داشته است. علاوه بر این، آنزیم

تثبیت شده در مقایسه با آنزیم آزاد محدوده وسیع تری از pH و دما را تحمل نموده و همین قابلیت موجب کاهش تغییرات ساختاری آنزیم و افزایش پایداری آن گردیده و امکان استفاده مجدد از آنزیم را در واکنش های بعدی میسر ساخته است. نتایج این تحقیق نشان داد که، با تهیه نانو حامل های مغناطیسی ایزوله پروتئین سویا با روش ژلاتیناسیون سرد می توان بستری مناسب با عملکرد بالا برای تثبیت آنزیم اینولیناز را به منظور تولید شربت پر فروکتوز که دارای کاربردهای وسیعی در صنایع غذایی و دارویی می باشد را تهیه نمود.

## ۵- منابع

- [1] م. فرجی و ق. فدوی، نشریه‌ی علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، **۸** (۱۳۹۲) ۲۵۲.
- [2] س. عظیمی پور میبد، س. مداح حسینی، ر. احمدی، دومین همایش مشترک انجمن مهندسی متالوژی ایران و جامعه ریخته‌گران ایران. (۱۳۹۲).
- [3] ن. عزیزی و س. دهقان، نشریه‌ی اندیشه علوم سمنان، **۷** (۱۳۹۱) ۲۱.
- [4] J. Xu, C. Ju, J. Sheng, F. Wang, Q. Zhang, G. Sun, M. Sun, Bull. Korean Chem. Soc., **34** (2013) 2408.
- [5] Y. Sahoo, H. Pizem, T. Fried, D. Golodnitsky, L. Burstein, C. Sukenik, G. Markovich, Langmuir, **17** (2001) 7907.
- [6] H. Lee, E. Lee, D. Kim, N. Jang, Y. Jeong, S. Jon, J. Am. Chem. Soc., **128** (2006) 7383.
- [7] K. Souza, J. Ardisson, E. Sousa, J. Mater. Sci., **20** (2009) 507.
- [8] م. فتحی و ف. مقدمیان پور، نشریه‌ی اندیشه علوم سمنان، **۳۹** (۱۳۹۵) ۲۵.
- [9] W. Lohcharoenkal, L. Wang, Y.C. Chen, Y. Rojanasakul, Biomed. Biotech., **2014** (2014) 1.
- [10] Z. Teng, Y. Luo, Q. Wang, J. Agric. Food. Chem., **60** (2012) 2712.
- [11] D. Derycke and E.J. Vandamme, J. Chem. Technol. Biotechnol., **34** (1984) 45.
- [12] T. Nakamura, Y. Ogata, S. Akichika, A. Nakamura, K. Ohta, J. Ferment. Bioeng., **80** (1995) 164.
- [13] C.H. Kim and S.K. Rhee., Biotechnol. Lett., **11** (1989) 201.
- [14] D.L. Vullo, C.E. Coto, F. Sineriz, Appl. Environ. Microbiol., **57** (1991) 232.
- [15] م. بهمنی، ل. عباسی، م. فرجی، نشریه‌ی اندیشه علوم سمنان، **۷** (۱۳۹۲) ۲۹.
- [16] J. Zhang, L. Liang, Z. Tian, L. Chen, M. Subirade, Food Chem., **133** (2012) 390.
- [17] A.C. Alting, R.J. Hamer, C.G. Kruif, R.W. Visschers, Agric. Food. Chem., **51** (2003) 3150.
- [18] J.Y. Jun, H.H. Nguyen, S.Y.R Paik, H.S. Chun, B.C. Kang, S. Ko, Food chem., **4** (2011) 1892.
- [19] S. Sundar, J. Kundu, S.C. Kundu, Sci. Tech. Adv. Mat., **11** (2010) 1.
- [20] D.A. Skoog, F.J. Holler, S.R. Crouch, Principles of instrumental analysis, 6<sup>th</sup> ed, Canada, (2007).

[21] P. Singh and P.K. Gill, *Biotechnol.*, **44** (2006) 151.

[22] M.L. Verma, R. Chaudhary, T. Tsuzuki, C.J. Barrow, M. Puri, *Bioresour. Technol.*, **135** (2013) 2.