





دانشکده شیمی

رساله دکتری شیمی معدنی

**بررسی فرایند تثبیت برخی آنزیم‌ها بر روی بسترهای معدنی تهیه شده
و جدید و ارزیابی بهبود خواص و کاربرد آنزیم‌ها پس از تثبیت**

نگارنده: زهره نوروزی نژاد

اساتید راهنما

دکتر بهرام بهرامیان

دکتر سامان حسینخانی

شهریور ۱۳۹۸

تصویب‌نامه

تقدیم به

ساحت مقدس یوسف زهرا
که چشم‌ها برای زیارت صبحش بیدارند....

تقدیم به پدرم

کوهی استوار و حامی من در طول تمام زندگی

تقدیم به مادرم

سنگ صبوری که الفبای زندگی به من آموخت

تقدیم به همسرم

که در سایه همیاری و همدلی او به این منظور نائل شدم

تقدیم به دلبندم

امیدبخش جانم که آسایش او آرامش من است

سپاس و حمد بی‌کران، به ذات اقدس الهی، که آدم را خلعت تعلیم عنایت فرموده و به واسطه آن مسجود ملائکه‌اش قرار گرفت...

بوسه می‌زنم بر دستان پرمهر پدر و مادرم، جلوه‌های لطف بی‌پایان خداوند، که همواره حامی و دلسوز من بوده و هستند و موفقیت‌هایم را وام‌دار ایشانم و بعد از الطاف ایزدی هرچه دارم از دعای خیر آنان است...

و سپاس فراوان از همراهی همسر عزیزم: علی عرفان دوست

بدون تردید گام نهادن در وادی دانش و پژوهش قبل از هر چیز مستلزم یاری و مساعدت اساتید و صاحب‌نظران می‌باشد. بر همین اساس این تحقیق نیز علاوه بر کوشش اینجانب، حاصل تلاش و همکاری بی‌دریغ برخی از اساتید ارجمند و دوستان گرامی است که در پرتو عنایات خداوند به انجام رسید. بدین لحاظ بر خود واجب می‌دانم مراتب سپاسگزاری خویش را از تمامی کسانی که در انجام پژوهش به نحوی مرا یاری رساندند، اعلام نمایم.

از استاد راهنمای بزرگوارم جناب آقای دکتر بهرام بهرامیان صمیمانه سپاسگزاری می‌نمایم و امیدوارم در پرتو حمایت الهی، موفق و بهروز باشند. از جناب آقای دکتر سامان حسینخانی استاد راهنمای گرانقدر و بی‌نظیر که با صبر و شکیبایی در انجام این مهم مرا یاری رساندند، تشکر و قدردانی می‌نمایم و امیدوارم در سایه لطف پروردگار متعال، همواره از موهبت وجود ایشان بهره‌مند شوم. همچنین از راهنمایی‌ها و حمایت‌های خانم دکتر مریم نیک‌خواه و آقای دکتر علی مرسلی بسیار ممنونم.

از دوستان بزرگوار و عزیزم خانم‌ها دکتر طیبه بشارتی سیدانی، فرنگیس قریب و فاطمه عباسی کمال تشکر و سپاس ویژه را دارم.

از حضور و همکاری بی‌دریغ کارشناسان بزرگوار آزمایشگاه‌های دانشگاه تربیت مدرس تهران بین‌هایت سپاسگزارم. از دوستان عزیزم در آزمایشگاه بیولومینسانس دانشگاه تربیت مدرس به‌ویژه خانم دکتر مهدیه رهبان، دکتر مریم مرادی، دکتر فاطمه ملاحباسی، دکتر آرزو گلستانی و آقای میثم بخشوده که لحظات خاطره‌انگیز و تجربیات ارزنده‌ای در کنارشان رقم خورد، سپاسگزارم.

تعهد نامه

اینجانب زهره نوروزی نژاد دانشجوی دوره دکتری رشته شیمی معدنی دانشکده شیمی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه: بررسی فرایند تثبیت برخی آنزیمها بر روی بسترهای معدنی تهیه شده و جدید و ارزیابی بهبود خواص و کاربرد آنزیمها پس از تثبیت تحت راهنمایی آقای دکتر بهرام بهرامیان و دکتر سامان حسینخانی متعهد می شوم.

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهش های محققان دیگر به مرجع مورداستفاده استناد شده است.
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « Shahrood University of Technology » به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده (یا بافت های آن ها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است .

تاریخ

امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه های رایانه ای، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد. این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود.
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

چکیده

نانو ذرات و به‌طور کلی بسترهای متخلخل به دلیل کارایی بالا در جذب سطحی ترکیبات مختلف از جمله گازها، بیومولکول‌ها و پروتئین‌ها در دهه اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. از این رو در این پژوهش میزان کارایی دو نوع از چهارچوب‌های آلی فلزی که امروزه یکی از پرکاربردترین و تقریباً مهم‌ترین نوع نانو ذرات متخلخل محسوب می‌شوند به‌عنوان بستر برای آنزیم لوسیفراز که در زمینه پزشکی و بیوتکنولوژی بسیار پر کاربرد ولی حساس به تغییرات محیطی می‌باشد مورد بحث و بررسی قرار گرفت. این پژوهش دارای سه بخش اصلی است. بخش اول شامل تثبیت آنزیم بر روی Fe-MIL-88(NH₂) و Fe-MIL-88(NH₂) متصل شده با ترفتالدهید و مطالعات دستگامی و آزمایشگاهی مربوط به آن‌هاست. در بخش دوم تثبیت آنزیم بر روی MIL-53(Al) و مطالعات دستگامی و آزمایشگاهی مربوط به آن ارائه شده است. در بخش سوم نیز بررسی کاربردها شامل آزمایش‌های مربوط به خواص آنتی‌باکتریال، آنتی‌اکسیدانی و سمیت بسترهای سنتز شده انجام شد. نتایج نشان داد که اتصال آنزیم لوسیفراز به هر دو ترکیب Fe-MIL-88(NH₂) و Fe-MIL-88(NH₂) متصل شده با ترفتالدهید از طریق پیوند کووالانسی و به MIL-53(Al) از طریق جذب سطحی است. بررسی‌ها همچنین نشان می‌دهند لوسیفراز تثبیت شده بر روی هر دو چهارچوب فلز-آلی مذکور پایداری بیشتری از لحاظ سینتیکی و ترمودینامیکی داراست. مطالعات خواص آنتی‌باکتریال، آنتی‌اکسیدانی و سمیت این ترکیبات نیز نشان می‌دهند هر دو ترکیب دارای خاصیت آنتی بیوتیکی قویتری نسبت به تتراسایکلین و کانامایسین بودند همچنین این ترکیبات دارای خاصیت آنتی اکسیدانی قابل توجهی بوده و نسبت به سه رده سلولی HeLa، MDA-MB-468 و K562 سمی هستند.

کلیدواژه: چهارچوب‌های فلز-آلی، لوسیفراز، تثبیت آنزیم، جذب سطحی و اتصال کووالانسی، خواص

آنتی‌باکتریال، خواص آنتی اکسیدانی، سمیت

مقالات مستخرج از رساله

ردیف	عنوان	نام مجله	DOI
1	Efficient immobilization of firefly luciferase in a metal organic framework: Fe-MIL-88(NH ₂) as a mighty support for this purpose	Enzyme and Microbial Technology	10.1016/j.enzmictec.2018.10.011
2	A fast and efficient stabilization of firefly luciferase on MIL-53(Al) via surface adsorption mechanism	Research on Chemical Intermediates	10.1007/s11164-019-03748-w
3	Immobilization of luciferase on MIL-53(Al): Investigation of activity and stability	The 5 th Iranian rare elements congress	20 Dec 2016 Tarbiat modares university, Tehran, Iran
4	Investigation of antibacterial and anti-cancer properties of : Fe-MIL-88(NH ₂) and MIL-53(Al)	The 4 th Iranian Applied Chemistry Conference	23-25 Jul 2019 Urumia University Urumia, Iran

فهرست مطالب

۱	مقدمه
۱-۱	بیان مساله و هدف
۲-۱	ترکیبات متخلخل
۱-۲-۱	MOF ها
۲-۲-۱	ویژگی های MOF ها
۳-۱	روش های سنتز MOF ها
۱-۳-۱	سنتز سالوترمال و گرمایی
۲-۳-۱	سنتز یونوترمال
۳-۳-۱	سنتز میکروویو
۴-۱	تثبیت آنزیم
۱-۴-۱	روش های تثبیت آنزیم
۲-۴-۱	کاربردهای تثبیت آنزیم
۳-۴-۱	عوامل ضد چسبندگی مولکولهای زیستی
۵-۱	آنزیم لوسیفراز
۱-۵-۱	مکانیسم واکنش بیولومینسانس
۲-۵-۱	نقش آنزیم لوسیفراز در واکنش های دیگر
۳-۵-۱	ساختار شیمیایی ترکیبات مرتبط با واکنش لوسیفرین-لوسیفراز:
۱-۳-۵-۱	D(-)-Luciferin
۲-۳-۵-۱	L(+)-Luciferin (L-LH ₂)
۳-۳-۵-۱	دهیدرو لوسیفرین (L)
۴-۳-۵-۱	اکسی لوسیفرین
۵-۳-۵-۱	لوسیفریل آدنیلات (LH ₂ -AMP)
۶-۳-۵-۱	دهیدرو-لوسیفریل آدنیلات (L-AMP)
۴-۵-۱	فرضیه های مطرح شده ر مورد مکانیسم نشر نورهای متنوع در فرایند بیولومینسانس

۳۷.....	۵-۵-۱ استفاده از مشتقات لوسیفیرین در سنجش‌های بیولومینسانسی:
۳۸.....	۶-۵-۱ کاربردهای بیولومینسانس
۴۳.....	۷-۵-۱ پایدارسازی آنزیم لوسیفرز
۴۷.....	۲ بخش تجربی (مواد و روش‌ها)
۴۸.....	۱-۲ مواد
۴۸.....	۲-۲ دستگاه‌ها
۴۹.....	۳-۲ تهیه چهارچوب فلز-آلی Fe-MIL-88(NH ₂)
۴۹.....	۴-۲ تهیه ترکیب Fe-MIL-88(NH ₂)- therphtalaldehyde
۴۹.....	۵-۲ تهیه چهارچوب فلز-آلی MIL-53(Al)
۵۰.....	۶-۲ بیان پروتئین
۵۰.....	۷-۲ تهیه محتوای سلولی از باکتری‌ها
۵۱.....	۸-۲ تخلیص پروتئین
۵۲.....	۹-۲ الکتروفورز SDS-PAGE
۵۳.....	۱۰-۲ سنجش غلظت پروتئین‌ها
	۱۱-۲ تثبیت آنزیم لوسیفرز بر روی Fe-MIL-88(NH ₂) و Fe-MIL-88(NH ₂)
۵۳.....	therphtalaldehyde و MIL-53(Al)
۵۴.....	۱۲-۲ مطالعه ثابت‌های پایداری ترمودینامیکی و سینتیکی آنزیم لوسیفرز خالص و تثبیت‌شده
۵۴.....	۱-۱۲-۲ اندازه‌گیری غیرفعال شدن حرارتی آنزیم خالص و تثبیت‌شده
۵۴.....	۲-۱۲-۲ بررسی pH بهینه فعالیت آنزیم خالص و تثبیت‌شده
۵۵.....	۳-۱۲-۲ اندازه‌گیری پایداری دمایی آنزیم لوسیفرز خالص و تثبیت‌شده
	۴-۱۲-۲ تعیین و مقایسه مقادیر Km و Vmax نسبت به ATP و لوسیفرین در آنزیم خالص و تثبیت‌شده
۵۵.....	
۵۶.....	۱۳-۲ بررسی خواص آنتی‌باکتریال Fe-MIL-88(NH ₂) و MIL-53(Al)
	۱-۱۳-۲ تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)
	۵۶
۵۷.....	۲-۱۳-۲ بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی Fe-MIL-88(NH ₂) و MIL-53(Al)

۲-۱۳-۳ اندازه‌گیری میزان سیتوتوکسیسیته ترکیبات Fe-MIL-88(NH₂) و MIL-

- ۵۸ MTT با رنگسنجی 53(Al)
- ۶۱ ۳ بحث و نتیجه‌گیری
- ۱-۳ شناسایی و بررسی ساختارهای Fe-MIL-88(NH₂) و Fe-MIL-88(NH₂)
- ۶۲ therephtaldehyde
- ۷۳ ۲-۳ بیان و تخلیص آنزیم لوسیفرز
- ۷۳ ۳-۳ بررسی خلوص آنزیم‌های لوسیفرز استخراج‌شده
- ۴-۳ غیرفعال شدن حرارتی آنزیم لوسیفرز خالص و تثبیت‌شده بر روی Fe-MIL-88(NH₂) و
- ۷۴ Fe-MIL-88(NH₂)-therephtaldehyde
- ۵-۳ تعیین pH بهینه آنزیم لوسیفرز خالص و تثبیت‌شده بر روی Fe-MIL-88(NH₂) و Fe-
- ۷۵ MIL-88(NH₂)-therephtaldehyde
- ۶-۳ پایداری حرارتی آنزیم لوسیفرز خالص و تثبیت‌شده بر روی Fe-MIL-88(NH₂) و Fe-
- ۷۷ MIL-88(NH₂)-therephtaldehyde
- ۸۱ ۷-۳ بررسی کارایی اتصال آنزیم
- ۸۲ ۸-۳ محاسبه مقادیر Km و Vmax نسبت به لوسیفرین و ATP
- ۸۹ ۹-۳ شناسایی و بررسی ساختار MIL-53(Al)
- ۹۵ ۱۰-۳ غیرفعال شدن حرارتی آنزیم لوسیفرز خالص و تثبیت‌شده بر روی MIL-53(Al)
- ۹۶ ۱۱-۳ تعیین pH بهینه آنزیم لوسیفرز خالص و تثبیت‌شده بر روی MIL-53(Al)
- ۹۸ ۱۲-۳ پایداری حرارتی آنزیم لوسیفرز خالص و تثبیت‌شده بر روی MIL-53(Al)
- ۱۰۱ ۱۳-۳ بررسی کارایی اتصال آنزیم
- ۱۰۲ ۱۴-۳ محاسبه مقادیر Km و Vmax نسبت به لوسیفرین و ATP
- ۱۵-۳ بررسی خواص آنتی‌باکتریال، آنتی‌اکسیدانی و ضدسمیت Fe-MIL-88(NH₂) و MIL-
- ۱۰۴ 53(Al)
- ۱۱۰ ۱۶-۳ نتیجه‌گیری
- ۱۱۱ ۱۷-۳ پیشنهادات و آینده‌نگری

فهرست جداول

- جدول (۳-۱): آنالیز عنصری EDAX ترکیبات Fe-MIL-88NH₂، لوسیفراز تثبیت شده بر روی Fe-
Fe-MIL-88NH₂ ۶۹
- جدول (۳-۲): مقدار ثابت K_m برای آنزیم لوسیفراز خالص، Fe-MIL-88(NH₂) و Fe-MIL-
88(NH₂)-therephtaldehyde ۸۸
- جدول (۳-۳): مقدار ثابت K_m برای آنزیم لوسیفراز خالص و MIL-53(Al) ۱۰۴
- جدول (۳-۴): مقادیر MIC و MBC ترکیبات سنتز شده علیه دوسویه باکتری E.Coli و
سودوموناس آئروژینوزا در مقایسه با آنتیبیوتیکهای تتراسایکلین و کانامایسین ۱۰۵
- جدول (۳-۵): IC₅₀ تقریبی ترکیبات Fe-MIL- 88(NH₂) و MIL-53(Al) بر حسب میکروگرم بر
میلی لیتر روی رده‌های سلولی Hela، MDA-MB-468 و K562 ۱۱۰

فهرست اشکال

- شکل (۱-۱): نمای شماتیک MOF ZnO₄ ۶
- شکل (۲-۱): سنتز سالوترمال MOF ها ۱۲
- شکل (۳-۱): سنتز یونوترمال MOF ها ۱۳
- شکل (۴-۱): سنتز مایکروویو MOF ها ۱۵
- شکل (۵-۱): نمای شماتیک روش‌های تثبیت آنزیم ۱۶
- شکل (۶-۱): واکنش آنزیم لوسیفراز ۲۶
- شکل (۷-۱): ساختار آنزیم لوسیفراز 1 P.pyra ۲۷
- شکل (۸-۱): آنزیم لوسیفراز گونه P.pyralis ۲۷
- شکل (۹-۱): گزارشگر ژنی 1 ۳۹
- شکل (۱۰-۱): نمای شماتیک سیستم گزارشگر دوتایی ۴۰
- شکل (۱۱-۱): مولکول‌های دو عملکردی ۴۱
- شکل (۱۲-۱): پدیده BRET ۴۲
- شکل (۱-۲): نمای شماتیک بیان و تخلیص پروتئین ۵۲
- شکل (۲-۲): نمایی از تعیین MIC و MBC ۵۷
- شکل (۳-۲): نمایی از تست MTT ۵۹
- شکل (۱-۳): طیف FT-IR مربوط به (a) Fe-MIL-88(NH₂)، (b) Fe-MIL-88(NH₂)-therephtaldehyde و (c) لوسیفراز تثبیت‌شده بر روی Fe-MIL-88(NH₂)-therephtaldehyde و (d) لوسیفراز تثبیت‌شده بر روی Fe-MIL-88(NH₂) ۶۵
- شکل (۲-۳): الگوی پراش پرتو X مربوط به Fe-MIL-88(NH₂) ۶۶
- شکل (۳-۳): (a) ایزوترم جذب و واجذب نیتروژن، (b) نمودار BET و (c) نمودار BJH ترکیب Fe- ۶۸
- MIL-88(NH₂)

- شکل (۳-۴): تصاویر FE-SEM و نمودارهای EDAX مربوط به Fe-MIL-88(NH₂) (a) و (b)، (d) و (e) لوسیفرز تثبیت شده بر روی Fe-MIL-88(NH₂)-therephtaldehyde (c) و (f) لوسیفرز تثبیت شده بر روی Fe-MIL-88(NH₂)، ۷۰.....
- شکل (۳-۵): تصاویر TEM مربوط به Fe-MIL-88(NH₂) (a) و لوسیفرز تثبیت شده بر روی Fe- (b) MIL-88(NH₂)، ۷۱.....
- شکل (۳-۶): نمودار آنالیز TGA-DTA مربوط به Fe-MIL-88(NH₂)، ۷۲.....
- شکل (۳-۷): بررسی خلوص آنزیم لوسیفرز با استفاده از الکتروفورز، ۷۴.....
- شکل (۳-۸): نمودار غیرفعال شدن حرارتی آنزیم لوسیفرز خالص با نام (Free Luc)، لوسیفرز تثبیت شده بر روی Fe-MIL-88(NH₂)-therephtaldehyde با نام MIL-Luc(B) و لوسیفرز تثبیت شده بر روی Fe-MIL-88(NH₂) با نام MIL-Luc(A)، ۷۵.....
- شکل (۳-۹): نمودار pH بهینه آنزیم لوسیفرز خالص با نام (Free Luc)، لوسیفرز تثبیت شده بر روی Fe-MIL-88(NH₂)-therephtaldehyde با نام MIL-Luc(B) و لوسیفرز تثبیت شده بر روی MIL-88(NH₂) با نام MIL-Luc(A)، ۷۷.....
- شکل (۳-۱۰): نمودار پایداری حرارتی آنزیم لوسیفرز خالص با نام (Free Luc)، لوسیفرز تثبیت شده بر روی Fe-MIL-88(NH₂)-therephtaldehyde با نام MIL-Luc(B) و لوسیفرز تثبیت شده بر روی Fe-MIL-88(NH₂) با نام MIL-Luc(A) در دمای ۲۵°C، ۷۹.....
- شکل (۳-۱۱): نمودار پایداری حرارتی آنزیم لوسیفرز خالص با نام (Free Luc)، لوسیفرز تثبیت شده بر روی Fe-MIL-88(NH₂)-therephtaldehyde با نام MIL-Luc(B) و لوسیفرز تثبیت شده بر روی Fe-MIL-88(NH₂) با نام MIL-Luc(A) در دمای ۳۰°C، ۸۰.....
- شکل (۳-۱۲): نمودار پایداری حرارتی آنزیم لوسیفرز خالص با نام (Free Luc)، لوسیفرز تثبیت شده بر روی Fe-MIL-88(NH₂)-therephtaldehyde با نام MIL-Luc(B) و لوسیفرز تثبیت شده بر روی Fe-MIL-88(NH₂) با نام MIL-Luc(A) در دمای ۳۵°C، ۸۰.....

- شکل (۳-۱۳): نمودارهای (a) کارایی اتصال و (b) پایداری آنزیم لوسیفرز تثبیت شده بر روی Fe-
 MIL-88(NH₂)-therephtaldehyde با نام MIL-Luc(B) و لوسیفرز تثبیت شده بر روی Fe-
 MIL-88(NH₂) با نام MIL-Luc(A) ۸۲
- شکل (۳-۱۴): نمودار میکائلیس منتن آنزیم لوسیفرز در غلظت‌های مختلف ATP ۸۴
- شکل (۳-۱۵): نمودار میکائلیس منتن آنزیم لوسیفرز در غلظت‌های مختلف لوسیفرین ۸۴
- شکل (۳-۱۶): نمودار لاین ویور برگ آنزیم لوسیفرز در غلظت‌های مختلف ATP ۸۵
- شکل (۳-۱۷): نمودار لاین ویور برگ آنزیم لوسیفرز در غلظت‌های مختلف لوسیفرین ۸۵
- شکل (۳-۱۸): نمودار لاین ویور برگ آنزیم لوسیفرز تثبیت شده بر روی Fe-MIL-88(NH₂)
 therephtaldehyde در غلظت‌های مختلف ATP ۸۶
- شکل (۳-۱۹): نمودار لاین ویور برگ آنزیم لوسیفرز تثبیت شده بر روی Fe-MIL-88(NH₂)
 therephtaldehyde در غلظت‌های مختلف لوسیفرین ۸۷
- شکل (۳-۲۰): نمودار لاین ویور برگ آنزیم لوسیفرز تثبیت شده بر روی Fe-MIL-88(NH₂) در
 غلظت‌های مختلف ATP ۸۷
- شکل (۳-۲۱): نمودار لاین ویور برگ آنزیم لوسیفرز تثبیت شده بر روی Fe-MIL-88(NH₂) در
 غلظت‌های مختلف لوسیفرین ۸۸
- شکل (۳-۲۲): طیف FT-IR مربوط به MIL-53(A1) (a) و (b) لوسیفرز تثبیت شده بر روی MIL-
 53(A1) ۹۰
- شکل (۳-۲۳): الگوی پراش اشعه X مربوط به MIL-53(A1) (a) و (b) لوسیفرز تثبیت شده بر روی
 MIL-53(A1) ۹۱
- شکل (۳-۲۴): (a) ایزوترم جذب و واجذب نیتروژن، (b) نمودار BET و (c) نمودار BJH ترکیب
 MIL-53(A1) ۹۲

- شکل (۳-۲۵): تصاویر FE-SEM مربوط به MIL-53(Al) (a) و لوسیفرز تثبیت شده بر روی (b)
- ۹۳..... MIL-53(Al)
- شکل (۳-۲۶): تصویر TEM مربوط به MIL-53(Al)
- ۹۴.....
- شکل (۳-۲۷): نمودار آنالیز TGA-DTG مربوط به MIL-53(Al)
- ۹۵.....
- شکل (۳-۲۸): نمودار غیرفعال شدن حرارتی آنزیم لوسیفرز خالص با نام (Free Luc) و لوسیفرز تثبیت شده بر روی MIL-53(Al) با نام MIL-53(Al)-Luc
- ۹۶.....
- شکل (۳-۲۹): نمودار pH بهینه آنزیم لوسیفرز خالص با نام (Free Luc)، لوسیفرز تثبیت شده بر روی MIL-53(Al) با نام MIL-53(Al)-Luc
- ۹۷.....
- شکل (۳-۳۰): نمودار پایداری حرارتی آنزیم لوسیفرز خالص با نام (Free Luc)، لوسیفرز تثبیت شده بر روی MIL-53(Al) با نام MIL-53(Al)-Luc در دمای ۲۵ °C
- ۹۹.....
- شکل (۳-۳۱): نمودار پایداری حرارتی آنزیم لوسیفرز خالص با نام (Free Luc)، لوسیفرز تثبیت شده بر روی MIL-53(Al) با نام MIL-53(Al)-Luc در دمای ۳۰ °C
- ۱۰۰.....
- شکل (۳-۳۲): نمودار پایداری حرارتی آنزیم لوسیفرز خالص با نام (Free Luc)، لوسیفرز تثبیت شده بر روی MIL-53(Al) با نام MIL-53(Al)-Luc در دمای ۳۵ °C
- ۱۰۰.....
- شکل (۳-۳۳): نمودارهای (a) پایداری آنزیم و (b) کارایی اتصال لوسیفرز تثبیت شده بر روی MIL-53(Al) با نام MIL-53(Al)-Luc
- ۱۰۲.....
- شکل (۳-۳۴): نمودار لاین ویوربرگ آنزیم لوسیفرز تثبیت شده بر روی MIL-53(Al) در غلظت‌های مختلف ATP
- ۱۰۳.....
- شکل (۳-۳۵): نمودار لاین ویوربرگ آنزیم لوسیفرز تثبیت شده بر روی MIL-53(Al) در غلظت‌های مختلف لوسیفرین
- ۱۰۳.....
- شکل (۳-۳۶): نمودار بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی Fe-MIL-88(NH₂) و MIL-53(Al)
- ۱۰۶.....
- شکل (۳-۳۷): نمودار سمیت Fe-MIL-88(NH₂) بر روی ۳ رده سلولی مورد آزمایش
- ۱۰۹.....

شکل (۳-۳۸): نمودار سمیت MIL-53(AI) بر روی ۳ رده سلولی مورد آزمایش ۱۰۹

فصل اول

مقدمه

۱-۱ بیان مساله و هدف

آنزیم لوسیفراز یک آنزیم بسیار حساس نسبت به دما و سایر پارامترهای محیطی است و همین حساسیت، کاربرد آن را در مصارف مختلف بسیار محدود می‌کند. این موضوع ما را بر آن داشت تا در این پژوهش به بررسی فرایند تثبیت این آنزیم و بهبود عملکرد آن پس از تثبیت پردازیم.

لوسیفراز برای اولین بار در سال ۱۹۷۷ بر روی بسترهای آلکیل آمین تثبیت شد. سپس در سال ۲۰۱۲ بر روی نوعی از مایعات یونی بر پایه متیل گوانیدین و در سال ۲۰۱۵ بر روی نانوذره عامل‌دار شده Fe_3O_4 تثبیت شد. همچنین در جدیدترین گزارش قبل از این پژوهش، لوسیفراز بر روی بستر پلی وینیل الکل کوپل شده با پلی‌اتیلن تثبیت شد و آنزیم تثبیت شده بعنوان بیوسنسور در تشخیص غلظت ATP به کار گرفته شد. در هیچکدام از گزارش‌های بالا پارامترهای پایداری لوسیفراز بصورت کامل، قبل و پس از تثبیت بررسی نشده است. در این پژوهش تمامی پارامترهای پایداری و سینتیکی لوسیفراز قبل و پس از تثبیت به هر دو روش جذبی سطحی و اتصال کوالانسی بحث و بررسی شده است.

ترکیبات فلز-آلی با ویژگی‌های منحصر بفرد از جمله گنجایش بالا و همچنین مساحت سطح بالا گزینه‌ای مناسب برای تثبیت انواع آنزیم‌ها و بیومولکول‌ها هستند. تاکنون هیچ گزارشی از تثبیت آنزیم لوسیفراز بر روی این بسترها ثبت نشده و فقط در یک گزارش در سال ۲۰۱۶ آنزیم گلوکز اکسیداز بر روی بستر $Fe-MIL-88(NH_2)$ تثبیت شده و عالیت الکتروشیمیایی آن پس از تثبیت مورد بررسی قرار گرفته است. دی‌آلدئیدها لینکرهای بسیار پرکاربردی هستند که تاکنون در فرایند تثبیت کوالانسی بسیاری از بسترها به بیومولکول‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در این پژوهش از نوع آروماتیک این لینکر با نام ترفتالدهید استفاده شد که واکنش آن با گروه آمین بستر و آنزیم منجر به تشکیل ایمین پایدارتری نسبت به لینکر آلیفاتیک گلوآرالدهید می‌شود.

۲-۱ ترکیبات متخلخل

مواد متخلخل، به دسته‌ای از ترکیبات دارای حفره، منفذ و کانال که عمق آن‌ها بیشتر از پهنای آن‌هاست اطلاق می‌شود. تخلخل این ترکیبات بر اساس اندازه، ترتیب، شکل حفرات و ترکیبات تشکیل‌دهنده آن‌ها و علاوه بر آن میزان تخلخل آن‌ها بر اساس نسبت حجم کل حفرات به حجم کل ماده سنجیده می‌شود. این ترکیبات به دلیل کوچک بودن و تخلخل بالا، مساحت سطح بالایی دارند که در میزان کارایی آن‌ها از جمله در کاربردهای کاتالیزگری، جذب آلودگی‌ها در فعالیت‌های محیط زیستی و رهایش دارو تأثیرگذار است. بر این اساس، آیوپاک نانو ذرات را بر اساس اندازه حفرات به سه دسته مختلف تقسیم کرده است: دسته اول مواد ماکرو متخلخل مانند سرامیک و آئروژل‌ها هستند که دارای حفراتی بزرگ‌تر از ۵۰ نانومترند [۱]. درحالی‌که دسته دوم دارای حفرات بین ۲ تا ۵۰ نانومتر می‌باشند که آن‌ها را مواد مزومتخلخل می‌نامند. سیلیس مزومتخلخل که در آن دیواره‌های سیلیس بی‌شکل را ایجاد می‌کنند مثالی از این دسته است [۲]. دسته سوم مواد با حفرات کوچک‌تر از ۲ نانومتر می‌باشند که می‌توان از این دسته به حفرات زئولیت‌ها اشاره کرد. دسته سوم به‌عنوان میکرو-متخلخل‌ها طبقه‌بندی می‌شوند. ذکر این نکته ضروری است که MOFها با توجه به تنوع اندازه و شکل حفرات، هم می‌توانند میکرو حفره و هم مزوحفره باشند [۳].

فناوری نانو به‌عنوان علم مهندسی مواد در مقیاس ۱ تا ۱۰۰ نانومتر تعریف می‌شود. ابعاد بسیار کوچک مواد نانو ساختار و درعین حال دارا بودن تخلخل بالا منجر به افزایش مساحت سطح در آن‌ها شده که نهایتاً منجر به بروز مجموعه‌ای از خواص ویژه می‌شود. بهره‌برداری از این ویژگی‌های جدید، هسته فناوری نانو است. تاکنون از این ویژگی‌های خاص نانو مواد در مطالعات فراوانی استفاده شده است [۴]. مواد متخلخل با ساختارهای حفره‌دار و ویژگی‌های سطحی در بسیاری از زمینه‌های علوم کاربردی و مهندسی کاربرد دارند. از جمله مواد متخلخل مورد بررسی زئولیت، کربن متخلخل، اکسیدهای فلزی، نانولوله‌ها، مواد لایه‌ای، نیتريد فلزات، پلیمر، ژل، فیبر، سرامیک، شیشه، غشاء و مواد ترموالکتریک هستند [۵]. کاهش اندازه ذرات یا منافذ به مقیاس نانو مواد منجر به خواص غیرمعمول

مانند مساحت سطح بسیار بالا و افزایش واکنش‌پذیری می‌شود [۶]. مواد متخلخل به‌طور گسترده در اطراف ما وجود دارد و در بسیاری از جنبه‌های زندگی روزمره نقش مهمی ایفا می‌کنند؛ در میان زمینه‌هایی که آن‌ها را می‌توان یافت مدیریت انرژی، عایق حرارتی، جذب صدا و فیلتراسیون مایع را می‌توان نام برد. جامدات بسیار متخلخل دارای استحکام ساختاری نسبتاً بالا و چگالی جرم کم هستند، بنابراین جامدات متخلخل اغلب به‌عنوان سازه‌های ساختاری در طبیعت، از جمله در چوب و استخوان‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند؛ اما انسان‌ها از مواد متخلخل در کارکردهایی بیش از خواص ساختاری استفاده می‌کنند و تا به امروز در بسیاری از برنامه‌های ساختاری و کاربردی آن‌ها را اصلاح کردند تا بتوانند به‌طور کامل از این مواد استفاده کنند [۷].

۱-۲-۱ MOF ها

علی‌رغم آنکه زئولیت‌های آلومینیوم سیلیکات به‌عنوان گونه‌ای از مواد متخلخل تا حدودی در صنعت موفق بوده‌اند، هنوز چالش‌های قابل توجهی باقی‌مانده و مطالعات فراوانی نیز بر آن‌ها صورت می‌گیرد. این موضوع شیمیدانان سنتز کار را برانگیخته تا روش‌های سنتزی کاملاً جدیدی را برای تولید مواد متخلخل با حفراتی با ابعاد مولکولی و با آرایش فضایی منظم ابداع کنند [۸]. طراحی مواد با ساختار غیر اکسیدی و با تخلخل ریز، از این جهت که به‌طور کلی محدود به شبکه‌های فضایی چهاروجهی زئولیت‌ها نمی‌شوند جذاب هستند. فضای داخلی این دسته از جامدات متخلخل می‌توانند قطبیت^۱، موقعیت فضایی، عملکرد و واکنش‌پذیری کاملاً متفاوتی نسبت به زئولیت‌های آلومینیوم سیلیکات معمول داشته باشند. اخیراً توجه شدیدی بر روی چهارچوب‌های فلزی-آلی (MOF)^۲ انجام شده است [۹]. ساختارهای متخلخل جدید حاصل پژوهش‌هایی در اوایل دهه ۱۹۹۰، بخصوص

¹ Polarity

² Metal Organic Frameworks

به وسیله رابسون^۱ و هاسکینز^۲ است [۱۰]. این دانشمندان با ساخت چهارچوب‌های جامد به وسیله کئوردیناسیون لیگاندهای چنددندانه به فلزات، چهارچوب‌هایی با فضایی ویژه را طراحی می‌کردند. این ساختارها از پیوندهای کووالانسی خطی لیگاندهای چنددندانه و استرئوشیمی (آرایش فضایی مولکول) اعمال شده بوسیله آرایش الکترونی و اندازه مرکز فلزی ناشی می‌شود [۱۱]. برای ایجاد ساختارهایی نامتناهی از چهارچوب‌ها، از پیوندهای کئوردیناسیونی فلز-لیگاند و پیوندهایی بین مولکول‌های دهنده و پذیرنده پیوند هیدروژنی استفاده می‌شود. تنوع شبکه‌های نامتناهی به دست آمده قابل توجه است [۱۲]. یاغی^۳ و اوکیفه^۴ پیشنهاد داده‌اند که این چهارچوب‌ها به طور پیش فرض ساختارهای فضایی شبکه مانندی را ایجاد می‌کنند که از اتصال رأس‌ها به یکدیگر به دست می‌آید. یکی از جذاب‌ترین روش‌ها استفاده از رئوس و اتصال دهنده‌هاست که ساختارهای کئوردیناسیونی و فلزات نقش رئوس و گروه‌های آلی نقش فاصله‌اندازها را دارند [۱۳]. جذابیت این دیدگاه این است که روشی را برای ایجاد حفرات بسیار بزرگ ارائه می‌دهد. اگر اندازه نسبی رأس‌ها و فاصله‌اندازها به طور مناسبی تعیین شود از درهم‌تنیدگی شبکه‌ها (که به عنوان یکی از عوامل از بین برنده تخلخل در نظر گرفته می‌شود) اجتناب می‌گردد و به طور موفقیت‌آمیزی شبکه‌هایی تزیین شده به دست می‌آید. رأس‌ها می‌توانند یک کمپلکس فلزی مجزا نباشند، بلکه یک خوشه^۵ شامل دو یا چندین مرکز فلزی باشند. برای مثال دایمرهای دو هسته‌ای با چهار پل استات مشابه چرخ‌های پرده‌دار و یا خوشه‌های کربوکسیلات Zn_4O از این دسته‌اند (شکل ۱-۱) [۱۴].

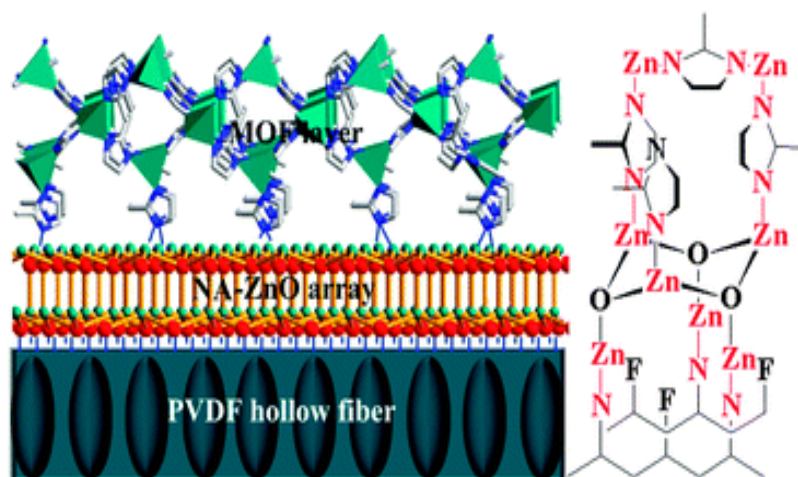
¹ Rabson

² Hoskins

³ Yaghi

⁴ O` Keeffe

⁵ Cluster



شکل (۱-۱): نمای شماتیک MOF ZnO4

اکثر لیگاندهایی که در شیمی چهارچوب‌های فلزی-آلی استفاده می‌شوند لیگاندهایی با پایه بی-پیریدینی یا کربوکسیلاتی هستند. بی‌پیریدین دو حلقه به هم پیوسته پیریدینی و کربوکسیلات گروه COO با یک بار منفی می‌باشد [۱۵].

هرچند مثال‌های موفقیت‌آمیز و شبکه‌های قابل پیش‌بینی زیادی بر اساس این اصول ساخته شده است، به‌طور مشخص تهیه چهارچوب‌هایی که پس از حذف مولکول‌های میهمان (به‌عنوان قالب) پایدار بمانند مشکل است. این بدان معنی است که یک جامد با وجود فضای خالی درون کانال‌ها و حفره‌های ساختار خود، پایدار باقی بماند. حلال نقش یک قالب (پرکننده موقت فضاهای خالی) را در ساخت اکسیدهای متخلخل بازی می‌کند و در انتهای فرآیند سنتز از کانال‌های تشکیل‌شده در چهارچوب‌های فلزی-آلی خارج می‌شود [۱۶]. بخشی از حفره‌های چهارچوب‌های باردار بر اساس تبادل یون^۱ می‌توانند قابل دسترسی شوند. این بدان معنی است که یون‌های همراه بزرگ^۲ که معمولاً برای خنثی‌سازی بار شبکه حضور دارند، با یون همراه کوچک‌تر جابجا می‌شوند که باعث ایجاد تخلخل می‌گردد [۱۷]. در بسیاری موارد، نبود استحکام شیمیایی و مکانیکی منجر به فروریختن ساختار

¹ Ion Exchange

² Counter Ions

شبکه‌ای می‌شود. هرچند این مواد ممکن است چهارچوب‌هایی با حجم بسیار بزرگی داشته باشند، نباید آن‌ها را بر اساس مواد با تخلخل ریز طبقه‌بندی کرد. به‌رحال در سیستم‌هایی که چهارچوب-های آن‌ها کاملاً مقاوم بوده و تخلخل دائمی را نشان می‌دهند، حجم حفرات و ابعاد پنجره‌ها به‌طور رضایت بخشی از آنچه در زئولیت‌ها پیداشده بهتر است [۱۸].

۱-۲-۲ ویژگی‌های MOF ها

قابلیت طراحی بالا: کلید موفقیت برای رسیدن به مواد با عملکرد بالا، طراحی ساختار، کنترل خواص شیمیایی و فیزیکی مطلوب در سنتز ترکیبات جامد است. اکثر واکنش پلیمرهای کئوردیناسیونی متخلخل در شرایطی آرام انجام می‌شوند و انتخاب مخلوطی از واحدهای ساختاری مجزا با احتمال بالایی منجر به تولید شبکه گسترده موردنظر خواهد شد [۱۹].

نظم و قاعده: مرتب بودن و نظم حفره‌ها در یک جامد با تخلخل‌های ریز برای پدیده جذب بسیار مهم است. وقتی که اندازه حفرات ریز قابل‌مقایسه با مولکول‌های میهمان باشد، دیواره حفرات می‌توانند بر جهت‌گیری مولکول‌های میهمان جذب‌شده تأثیر بگذارند. ارتباط ساختاری بین مولکول میهمان جذب‌شده و چهارچوب میزبان، برای مثال، (۱) موقعیت مولکول میهمان در کانال، (۲) ساختار مجموعه مولکول‌های میهمان در کانال، (۳) تأثیر مولکول‌های میهمان بر روی ساختار کانال، از موضوعات کلیدی برای درک رفتار جذب و خواص فیزیکی و شیمیایی مولکول‌های میهمان جذب‌شده در نانو کانال‌ها هستند [۲۰].

انعطاف‌پذیری و پویایی: اخیراً پژوهش‌های زیادی بر روی خواص دینامیکی پلیمرهای کئوردیناسیونی متخلخل انجام‌شده است که نشان می‌دهند آن‌ها بسیار انعطاف‌پذیرتر از چیزی بودند که به‌طور معمول در نظر گرفته می‌شد. حفرات انعطاف‌پذیر در یک چهارچوب نرم و شبه‌پایدار ایجاد می‌شوند که می‌توانند بین دو حالت حد پایدار تغییر کنند. در پاسخ به مولکول میهمان با یک نوآرایی

ساختاری، حفرات از یک فاز بسته به یک فاز باز تبدیل می‌شوند. برخی از پلیمرهای کئوردیناسیونی متخلخل دارای این نوع انعطاف‌پذیری را دارند که می‌توان از آن‌ها به‌عنوان یک دسته ویژه‌ای از مواد نام برد که به‌عنوان حسگر گاز با انتخاب‌پذیری بالا و یا ترکیبات جداکننده گازها استفاده شده‌اند [۲۱]. این در حالی است که نمی‌توان از مواد متخلخل محکم و صلب^۱ در این موارد استفاده نمود. تبدیلات ساختاری پویا بر اساس چهارچوب‌های انعطاف‌پذیر یکی از جالب‌ترین خواص این ترکیبات است، به‌طوری‌که یکی از خواص پلیمرهای کئوردیناسیونی نسل سوم در نظر گرفته می‌شود. ویژگی ذاتی جامداتی که نام چهارچوب‌های فلزی-آلی به آن‌ها اطلاق شده است تشکیل پیوندهای قوی است تا استحکام چهارچوب خود را حفظ کنند. واحدهای اتصال‌دهنده گوناگونی نیز با اصلاح ساختار واحدهای آلی خود در دسترس هستند و از نظر ساختار هندسی به‌طور مناسب تنظیم شده‌اند [۲۲].

مشابه سنتز کولیم‌های آلی، واحدهای ساختاری چهارچوب‌های فلزی-آلی به‌دقت انتخاب می‌شوند تا خواص آن‌ها حفظ‌شده و در محصولات نشان داده شود. درحالی‌که در یک پلیمر آلی نوع و غلظت مونومرها در تعیین خواص فیزیکی، نوری و فرآیند‌پذیری آن‌ها مؤثر است، اتصالات شبکه‌ای واحدهای ساختاری به‌طور زیادی خواص یک چهارچوب فلزی-آلی را تعیین می‌کند. این مورد ممکن است شامل کاربردهای تبدیلات مغناطیسی، خواص نوری غیرخطی و یا ایجاد کانال‌های بزرگ در دسترس برای عبور مولکول‌ها باشد [۲۳].

جذب مراکز کایرال ساختار مولکولی با آرایش فضایی خاص و فعالیت نوری^۲ یا جایگاه‌های فعال درون یک چهارچوب باز نیز هدفی مناسب برای تولید مواد عامل‌دار است. در نتیجه، سنتز چهارچوب‌های فلزی-آلی نه تنها نیاز به انتخاب و یا تهیه مدل‌های مدنظر دارد بلکه نیاز به برخی پیش‌بینی‌هاست که آن‌ها چگونه در جامد نهایی مجتمع می‌شوند. برای کمک به فرایند پیش‌بینی،

^۱ Rigid

^۲ Chiral-centers

بخش‌هایی از واحدهای ساختاری ثانویه (SBU)^۱ به‌عنوان یک پارامتر ساختاری که از آنالیز ساختاری زئولیت‌ها به دست می‌آید، در نظر گرفته می‌شود [۲۴]. واحدهای ساختاری ثانویه (SBU) به بخش معدنی یک MOF گفته می‌شود. این بخش کمپلکس‌های فلزی حاصل از اتصال به انواع لیگاندهای پل‌ساز هستند که ساختارهای متنوعی را تولید می‌کنند و به‌عنوان یک قاعده تنظیم‌کننده برای طبقه‌بندی ساختار MOF ها استفاده می‌شوند [۲۵].

برخی MOF ها درحالی‌که منعطف‌اند، به‌اندازه کافی در حفظ ساختار محکم‌اند. حرکت در چارچوب می‌تواند با تغییر شرایط خارجی، مانند دما، فشار و محیط شیمیایی اتفاق بیفتد. ساختار MOF ها می‌تواند خود را برای قرار گرفتن گاز یا مایع ورودی، تنظیم کند. این مهم همچنین به برهمکنش‌های میزبان-میهمان و میهمان-میهمان بستگی دارد [۲۶]. حفرات یا کانال‌ها می‌توانند به هنگام پر شدن یا تخلیه شدن درون کانال‌ها و حفرات به‌صورت برگشت‌پذیر جمع یا گسترده شوند، بدون اینکه پیوندی شکسته شود. این نوع از پاسخ، اثر دینامیک یا اثر تنفسی نامیده می‌شود. شبکه‌های منعطف باید هم فضای کافی برای قرار گرفتن مولکول‌های میهمان داشته باشند و هم دارای نقاط ضعیف‌تر و کمتر سخت باشند تا شبکه بتواند تغییر کند. از طرفی اثر تنفسی می‌تواند وابسته به انعطاف‌پذیری محلی در رابطه‌ها باشد که در آنجا کلاسترهای فلزی در محل کئوردینه شدن به رابطه‌ها منعطف بوده و بتوانند زوایای پیوندی را بدون شکستن پیوندها مقداری تغییر دهند. این جابجایی می‌تواند در حد چندین آنگستروم باشد که منجر به تغییرات بسیار بزرگی در حجم حفره می‌شود. مثالی که اغلب از آن یاد می‌شود، MIL-53 یا چارچوب فلز-آلی Cr(bdc) است که در اثر فرآیندهای برگشت‌پذیر آبدار شدن و بی‌آب شدن، حجم سلول واحد حدود 30 درصد تغییر می‌کند. این حفرات هنگامی که در معرض آب قرار می‌گیرند، جمع می‌شوند و هنگامی که آب از آن‌ها خالی می‌شود، گسترش می‌یابند. در

¹ Secondary Building Units

بعضی MOF ها مانند، MIL-88D تفاوت حجم سلول واحد بین حالت باز و بسته بسیار متحیرکننده است [۲۷،۲۸].

معمولاً به منظور حذف گونه‌های مهمان در حفرات حرارت داده می‌شوند و چارچوب بسیاری از MOF ها در طی حرارت‌دهی فرومی‌ریزد. تخلخل و نظم MOF ها از بین رفته و جامد بی‌شکلی تشکیل می‌شود. طبیعت با فضاهای خالی جدال دارد و MOF ها نیز به اندازه کافی محکم نیستند که در برابر فروپاشی شبکه مقاومت کنند [۲۹]. گاهی اوقات مایعات یا گازهایی برای حمایت از شبکه لازم است. در برخی موارد، MOF ها فقط با قرار گرفتن در معرض هوا بی‌شکل می‌شوند. در صورتی که قرار است این ترکیبات در صنعت استفاده شوند، پایداری گرمایی آن‌ها باید مورد مطالعه قرار گیرد به این منظور، اتصالات، ابعاد و پایداری SBU ها مواردی هستند که باید در نظر گرفته شوند. از ویژگی‌های مهم همه آن‌ها قدرت پیوند بالا بین کلاسترهای اکسید فلزی و رابط‌هاست [۳۰]. حساسیت MOF ها نسبت به بخار آب یکی از معایب مهم برای بسیاری از کاربردهاست. تعداد کمی از MOF ها مانند ZIF در برابر رطوبت در طی آزمایشات پایداری بخار از خود پایداری خوبی نشان داده‌اند. از طرف دیگر، MOF-5 و MOF-69C,508 در مجاورت بخار آب ناپایدارند و جابجایی رابط‌ها در آن‌ها اتفاق می‌افتد با وجودی که ایراداتی این چنین ممکن است وجود داشته باشد، بایستی در مورد این که چگونه MOF ها می‌توانند استفاده شوند، فکر کرد. درهم نفوذی پدیده دیگری است که می‌تواند باعث بروز مشکل شود. چارچوب می‌تواند با چارچوب یکسان دیگری درگیر شود که سبب کاهش فضای خالی می‌شود اما مساحت سطح را افزایش می‌دهد. مثال‌های متفاوتی از درجه درهم نفوذی وجود دارد. استفاده از حلال‌هایی با دانسیته بالاتر، محلول‌های رقیق‌تر برای انجام واکنش و طراحی رابط‌هایی با ممانعت فضایی بیشتر و مثال‌هایی برای اجتناب از این پدیده‌اند. چارچوب‌های غیر درهم نفوذکننده و محصولات جانبی را می‌توان با استفاده از جداسازی برحسب دانسیته مانند استفاده از حلال‌هایی با چگالی‌های متفاوت از هم تمیز داد وجود رابط‌های پیچیده، MOF ها را بسیار خاص می‌کند [۳۱].

تهیه MOF ها گران قیمت بوده و قیمت بالای مواد اولیه، به ویژه رابط‌های آلی امکان استفاده از این مواد را در کاربردهای صنعتی محدود می‌سازد. بدین ترتیب، در صورتی استفاده از MOF ها ارزشمند است که درآمد حاصل از کاربردهای خاص بر هزینه‌های تحمیلی آن در صنعت غلبه کند.

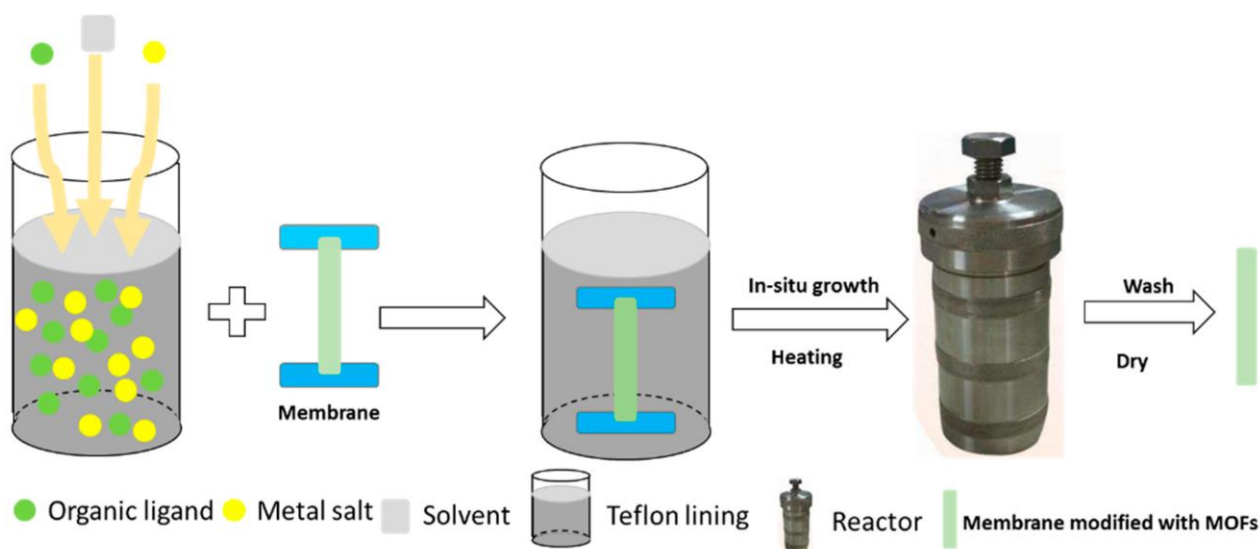
روش‌های متعددی برای تهیه MOF ها در سال‌های اخیر گسترش یافته‌اند. روش‌های سنتی مانند سنتز گرمایی و سالوترمال با روش‌های دیگری مانند یونوترمال، میکروویو، الکتروشیمی و سنتزهای مکانوشیمیایی همراه شدند.

به‌طور کلی هر نمک فلزی، مانند نیترات و استات، همراه با رابط‌های آلی، معمولاً رابط‌هایی بر پایه کربوکسیلیک اسیدها یا پیریدیل‌ها، در یک حلال یا مخلوطی از حلال‌ها می‌توانند تولید MOF کنند. برخلاف پروسه سنتز سایر مواد از جمله زئولیت‌ها، در اینجا نیاز به هیچ الگوی اضافی به‌عنوان هدایت‌کننده ساختار نیست. مسئله بسیار مهم این است که رابط‌های آلی و واحدهای ساختمانی فلزی که به‌صورت درجا شکل می‌گیرند، در طی کل واکنش صدمه ندیده باقی بمانند [۳۲]. بنابراین باید شرایط واکنش که در آن گروه‌های عاملی و پیکربندی رابط‌ها ثابت باقی می‌ماند و می‌تواند پیوندهای قوی با یون‌های فلزی ایجاد کنند را به‌دقت مشخص کرد. پارامترهای سنتز مانند دما، زمان حرارت‌دهی، سرعت گرم و سرد کردن، حلال، pH، غلظت و نوع ظرف واکنش باید به‌دقت کنترل شود تا بتوان شرایط سنتزی بهینه را تعیین کرد. یک راه برای شروع، تغییر یک پارامتر در هر بار به‌صورت سیستماتیک است. بنابراین تفاوت در ویژگی‌های محصول را باید به پارامترهای سنتزی مشخصی مربوط کرد. روش‌های متنوعی برای سنتز MOF ها به همراه ایجاد تخلخل دائمی در آن‌ها در زیر بیان می‌شود [۳۳].

۳-۱ روش‌های سنتز MOFها

۱-۳-۱ سنتز سالوترمال و گرمابی

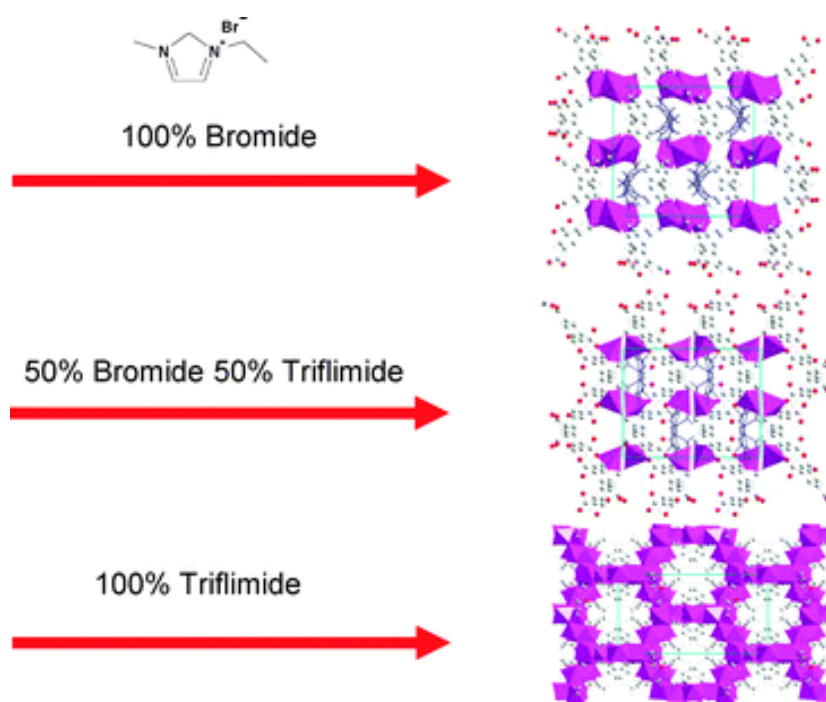
سنتز گرمابی و سالوترمال متداول‌ترین روش‌های مورد استفاده برای ساختن MOFهاست. در اینجا انتخاب حلال بر اساس توانایی آن در حل کردن رابط آلی است. در هر دو روش سنتز گرمابی و سالوترمال، واکنش در اتوکلاو از جنس فولاد ضدزنگ که داخل آن ظرف تفلونی قرار گرفته است، انجام می‌شود. مخلوط واکنش به‌طور معمول در دماهایی بین 80°C تا 220°C در طی چند ساعت تا چندین روز حرارت‌دهی می‌شود [۳۴]. در مقایسه با روش مایکروویو، الکتروشیمی و مکانوشیمیایی، استفاده از اتوکلاو روشی آهسته محسوب می‌شود. با این حال، بهترین روش سنتز برای این ترکیبات روش سنتز سالوترمال می‌باشد که در آن از حلال‌های قطبی با نقطه جوش بالا و دمای بالا استفاده می‌شود تا فلزات و اجزا آلی را به خوبی در خود حل کند و کلاسترهای فلز-لیگاند ایجاد کند. این کلاسترهای فلز-لیگاند که به‌عنوان واحد ساختاری ثانویه نامیده شده‌اند، باعث ایجاد هندسه جدیدی در ساختار شده و سختی و جهت‌یابی خاصی را در ساختار نهایی MOF سبب می‌شوند (شکل ۲-۱) [۳۵].



شکل (۲-۱): سنتز سالوترمال MOFها

۱-۳-۲ سنتز یونوترمال

سنتز یونوترمال، همان‌طور که از نام آن مشخص است، شامل مایعات یونی است که به‌عنوان حلال مورد استفاده قرار می‌گیرد. مایعات یونی دارای ویژگی‌های جذابی هستند و برای تهیه بسیاری از ساختارهای جدید مورد استفاده قرار می‌گیرند. قطبیت بالا و ساختار از قبل مشخص آن‌ها، قابلیت حل کردن فوق‌العاده‌ای را به آن‌ها می‌دهد. به علت پایداری حرارتی بالا و دارا بودن فشار بخار پایین، مایعات یونی برای واکنش‌هایی در دمای بالا مانند واکنش در اتوکلاو یا میکروویو بسیار مناسب‌اند (شکل ۱-۳) [۳۶].

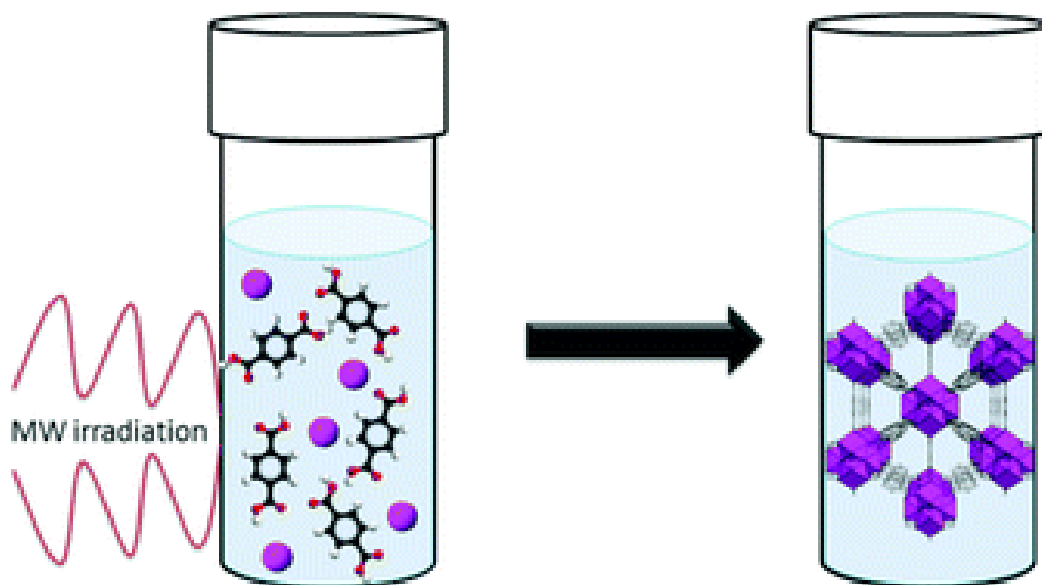


شکل (۱-۳): سنتز یونوترمال MOF ها

۱-۳-۳ سنتز مایکروویو

سنتز به کمک مایکروویو را می‌توان جهت کاهش زمان و یا دمای واکنش و افزایش خلوص محصول در تهیه MOFها بکار برد. سنتز مایکروویو در شیمی آلی در دهه اخیر به علت زمان واکنش کوتاه توجه زیادی را به خود جلب کرده است. سپس این نوع سنتز برای تهیه زئولیت‌ها و اخیراً برای تولید چارچوب‌های فلز-آلی مورد استفاده قرار گرفت. از مزایای چشمگیر این روش، سرعت واکنش بالا، راندمان و گزینش پذیری بالا، میزان هدر رفت پایین و امکان کنترل اندازه ذرات محصول در اندازه‌های کوچک‌تر در مقایسه با روش‌های سنتی می‌باشد [۳۶]. پیشرفت سریع و یکنواخت هسته‌زایی در کل مخلوط، منجر به تولید بلورهایی باکیفیت بالا و توزیع اندازه ذرات باریک در مقیاس زمانی کوتاهی می‌شود. به‌جای چند روز، آن‌طور که در روش سنتز سالوترمال است، سنتز MOFها در این روش تنها چند دقیقه زمان می‌برد و محصول ظرف یک ساعت قابل جمع‌آوری است. این واقعیت که دستگاه مایکروویو به جهت قدرت پرتودهی و تنظیمات واکنش در دستگاه‌های مختلف، متفاوت است منجر به عدم قطعیت در تکرارپذیری آزمایشات شده است. این محدودیت یکی از موضوعات مورد بحث در بین دانشمندان در زمینه‌های مختلف است. حصول تخلخل دائم در MOFها فضای خالی درون MOFها، معمولاً با مولکول‌های مهمان یا مواد اولیه واکنش نکرده بعد از سنتز پر می‌شود. برای فعال کردن این مواد و ایجاد تخلخل دائمی در آن‌ها، این‌گونه‌های اضافی باید حذف شوند. حفرات یا کانال‌ها می‌توانند با حرارت در اتمسفرهای مختلف مانند هوا یا اتمسفر بی‌اثر گاز نیتروژن و حتی تحت خلأ یا فشار محیط خالی شوند. حلالی که در طی سنتز از آن استفاده می‌شود، می‌تواند با حلال دیگری که نقطه جوش پایین‌تری دارد و تخلیه آن از درون حفرات MOFها ساده‌تر است، جایگزین شود. استفاده از خشک‌کردن فوق بحرانی روش آرام دیگری در مقابل روش خشن حرارت-دهی برای حذف حلال است. استفاده از CO₂ فوق بحرانی، MOFهایی با تخلخل دائمی به وجود آورده است که در صورتی که حلال این مواد هنگام استفاده از حرارت خارج می‌شدند، جامدی بی‌شکل

با حفرات بلاک شده به دست می‌آمد. در صورتی که حلال‌هایی با نقطه جوش بالا مانند DMF یا DEF در سنتزها استفاده شود، معمولاً خارج کردن تمام مولکول‌های حلال از درون حفرات به سختی امکان‌پذیر است. این حلال‌ها ابتدا می‌توانند با حلال دیگر مانند اتانول با نقطه جوش پایین جایگزین شوند. این روش معمولاً منجر به تهیه MOF‌هایی با مساحت سطح داخلی و ظرفیت جذب بالا می‌شود (شکل (۴-۱) [۳۷]).

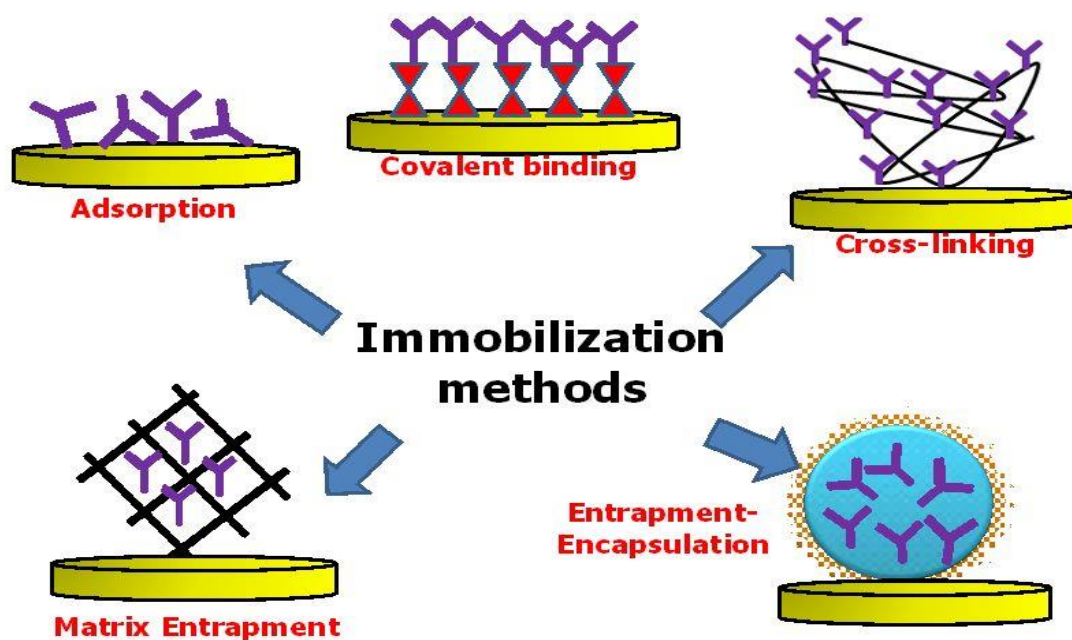


شکل (۴-۱): سنتز مایکروویو MOF ها

۴-۱ تثبیت آنزیم

فرآیندی که طی آن یک آنزیم با حفظ فعالیت کاتالیزوری خود به صورت فیزیکی یا شیمیایی به یک بستر خاص متصل شود را تثبیت آنزیم می‌گویند. این عمل به آنزیم اجازه می‌دهد که برای مدت طولانی بدون نیاز به جایگزینی آنزیم جدید مورد استفاده قرار بگیرد. تثبیت آنزیم در واقع محدود کردن یک آنزیم در یک فاز مشخص است به شکلی که امکان تماس با آن وجود دارد، ولی مولکول آنزیم در فازی، مجزا از فاز مولکول‌های سوبسترا، تحریک‌کننده و مهارکننده قرار دارد (شکل (۵-۱) [۳۸]).

به طور کلی می‌توان روند پیشرفت استفاده از بیوکاتالیزورهای تثبیت‌شده را به سه مرحله تقسیم‌بندی نمود در مرحله اول، در ابتدای قرن نوزدهم، میکروارگانیزم‌های تثبیت‌شده به صورت تجربی در صنعت تولید سرکه و شفاف‌سازی فاضلاب مورد استفاده قرار گرفتند. تاریخچه نوین تثبیت آنزیم مربوط به دهه ۱۹۴۰ می‌باشد اما اکثر کارهای اولیه انجام‌شده به علت اینکه در مجلات مربوط به سایر رشته‌ها چاپ‌شده بودند توسط بیوشیمی‌دان‌ها نادیده انگاشته شد. اساس فناوری امروزه، در دهه ۱۹۶۰ ایجاد شد و مقالات بسیار زیادی در این زمینه منتشر شد. در مرحله دوم، فقط تک مولکول‌های آنزیمی تثبیت‌شده مورد استفاده قرار گرفتند تا اینکه در دهه ۱۹۸۰ سیستم‌های پیچیده‌تر شامل واکنش‌های دو آنزیمی همراه با احیاء کوفاکتور و سلول‌های زنده توسعه یافت [۳۹].



شکل (۱-۵): نمای شماتیک روش‌های تثبیت آنزیم

مزایای ویژه‌ی آنزیم‌های تثبیت‌شده باعث به‌کارگیری آن‌ها در صنایع گوناگون شده است. دو مزیت اصلی برای تثبیت آنزیم عبارت‌اند از جداسازی آسان آنزیم از محصولات در مخلوط واکنش و استفاده

مجدد از آنزیم. توانائی جداسازی آسان آنزیم از مخلوط واکنش، آلودگی پروتئینی محصولات را به حداقل می‌رساند؛ بنابراین اطمینان و کارآمدی واکنش موردنظر، به کمک این تکنولوژی بهبود می‌یابد. همچنین توانائی استفاده مجدد از آنزیم دارای مزایای اقتصادی است که یک عامل بسیار مهم در بحث هزینه‌های مربوط به فرآیندهای کاتالیز شده به‌وسیله آنزیم‌هاست. علاوه بر جداسازی آسان و توانائی استفاده مجدد، تثبیت آنزیم سبب افزایش پایداری، افزایش پایداری نسبت به غیرطبیعی شدن با حرارت، افزایش پایداری در حلال‌های آلی می‌شود. همچنین در فرآیندهای چند آنزیمی و فرآیندهای شیمیایی- آنزیمی، تثبیت باعث افزایش مرزبندی آنزیم‌های مختلف و در نتیجه حداقل شدن مهار آنزیمی ناشی از برهمکنش‌های متقابل می‌شود [۴۰].

اما برای تثبیت آنزیم، مشکلاتی نیز وجود دارد که می‌توان به هزینه‌های تثبیت، کاهش فعالیت آنزیم طی فرآیند تثبیت، نیاز به سرمایه‌گذاری اولیه بیشتر بر روی تجهیزات موردنیاز، آموزش‌های تکنیکی پیچیده برای افزایش مهارت، مسائل بهداشتی و سم‌شناسی ویژه و قابلیت اجرائی تکنیک برای سوبستراهای محلول اشاره نمود.

در نتیجه فرایند تثبیت آنزیم بعضی از خواص مولکول آنزیم مثل فعالیت کاتالیتیکی یا پایداری حرارتی آن نسبت به حالت محلول تغییر می‌یابد. این تغییر در خواص می‌تواند به علت تغییر در فعالیت ذاتی آنزیم تثبیت‌شده باشد. دلیل دیگر برای این تغییر ایجادشده، این است که برهمکنش بین آنزیم تثبیت‌شده و سوبسترا در یک محیط میکرو رخ می‌دهد که با شرایط آنزیم در حالت محلول متفاوت است. همچنین این احتمال وجود دارد که این تغییر در ویژگی‌ها، به علت تغییرات کنفورماسیون ایجادشده در پروتئین باشد که در اثر اتصال آنزیم به بستر ایجادشده است [۴۰، ۴۱].

تثبیت آنزیم ممکن است باعث ایجاد محدودیت‌هایی در ساختار آنزیم و توانایی آن برای تغییر در ساختارش شود. از آنجائی که آنزیم‌ها به‌عنوان کاتالیزورهای اختصاصی عمل می‌کنند باید ساختار صحیح خود را داشته باشند و همچنین بتوانند ساختار خود را طی فرآیند کاتالیز تغییر دهند. چنانچه

طی فرآیند تثبیت، آنزیم از طریق چندین نقطه به بستر متصل شود آنزیم در یک موقعیت خاص نگه داشته می شود. اگر توانائی آنزیم برای انجام فعالیت کاتالیزی به تغییرات ساختاری آن وابسته باشد، این حالت می تواند موجب تغییر در مقادیر K_M (غلظتی از سوبسترا که در آن سرعت واکنش آنزیمی نصف سرعت ماکزیمم می باشد و واحد آن میلی مول در لیتر است) و V_{max} شود [۴۲].

مطالعات اولیه بر روی آنزیم های تثبیت شده، افزایش در پایداری آنزیم تثبیت شده را پیشنهاد می کردند. چراکه، چنین به نظر می آمد که بسترهای پلیمری که آنزیم ها بر روی آن تثبیت می شدند به عنوان یک لایه محافظ در برابر تغییرات دما، pH و غیره عمل می کنند. هرچند در سال های بعد مشخص شد که پایداری آنزیم در محلول آزاد تنها به شرایط فیزیکی که در آن قرار گرفته بستگی ندارد، بلکه به خود آنزیم و حتی غلظت کلی پروتئین نیز وابسته است؛ بنابراین وقتی یک آنزیم در محلول های رقیق نسبتاً ناپایدار در نظر گرفته می شود، افزایش غلظت آنزیم در محلول می تواند پایداری آن را افزایش دهد. این "افزایش در غلظت آنزیم" همان چیزی است که وقتی یک آنزیم روی یک بستر پلیمری تثبیت می شود رخ می دهد. فرآیند تثبیت باعث افزایش غلظت موضعی آنزیم می شود. بعلاوه تثبیت، دسترسی به ناخالصی های آنزیمی پروتئولیتیکی که آنها نیز تثبیت شده اند را محدود می کند، بنابراین تجزیه آنزیمی طی فرآیند پروتئولیز را کاهش می دهد. در اکثر موارد تثبیت آنزیم باعث بهبود پایداری عملکردی آن می شود؛ بنابراین پایداری آنزیم یک عامل مهم برای تمایل به استفاده از سیستم های تثبیت آنزیم است. مطالعات انجام شده نشان می دهد که یک همبستگی بین پایداری آنزیم و تعداد اتصالات کووالان موجود بین آنزیم و بستر وجود دارد [۴۳].

فرآیند تثبیت از تماس مستقیم بین مولکول های آنزیم جلوگیری می کند، همچنین با محدود کردن آنزیم در یک قفس پلیمری، آنزیم را از دسترس سوبسترا تحریک کننده خارج می کند. هرچند اگر مولکول های سوبسترا یا تحریک کننده کوچک باشند، احتمال اینکه بستر مانع دسترسی آنها به

آنزیم شود کمتر می‌شود. یکی از مهم‌ترین مشکلات در استفاده از آنزیم‌های تثبیت‌شده، کاهش فعالیت کاتالیزوری آنزیم است، به‌ویژه هنگامی که سوبسترای آنزیم ماکرومولکول باشد. به دلیل محدودیت ایجادشده در دسترسی سوبسترا به جایگاه فعال، فعالیت فقط به گروه‌های سطحی قابل‌دسترس سوبسترا محدود می‌شود. این ممانعت فضایی ممکن است الگوی اختصاصی تولید محصولات از سوبسترا را تغییر دهد. روش‌های مختلفی برای مقابله با این مشکلات فضایی وجود دارد از جمله: انتخاب بسترهایی که از شبکه‌هایی از زنجیره‌های ماکرومولکولی مجزا ساخته شده‌اند، انتخاب دقیق باقیمانده‌های آنزیم که در تثبیت دخالت دارند و استفاده از بازوهای آب‌دوست ایجادکننده فاصله [۴۴].

فرآیندهای تثبیتی که دارای شرایط واکنشی تند و ناملایم مثل pH بالا، وجود رادیکال‌ها و عوامل اکسیدکننده هستند، بسیار مستعد غیرفعال کردن بخشی یا حتی تمام آنزیم تثبیت‌شده بر روی پلیمر هستند. فعالیت ویژه نهائی آنزیم ممکن است به‌طور قابل‌توجهی کمتر از آنزیم محلول آزاد باشد [۴۵]. بسیاری از آنزیم‌ها به‌صورت تجاری در دسترس هستند. قیمت‌ها بسته به درجه سختی جداسازی آنزیم و یا آسانی به دست آوردن آن‌ها از منابع نو ترکیب می‌تواند به‌صورت قابل‌توجهی متفاوت باشد. بعضی از آن‌ها آن‌قدر ارزان هستند که در پودرهای شوینده و کاربردهای فله‌ای دیگر قابل‌استفاده‌اند. آنزیم‌ها حساس، ناپایدار و قابل‌استفاده در محیط‌های آبی هستند که این ویژگی‌ها برای یک کاتالیزگر غیر ایده‌آل و در بسیاری از سنتزها نامطلوب است. در بسیاری از موارد یکی از راه‌های جلوگیری از این مشکلات تثبیت آنزیم است. از آنجاکه تثبیت آنزیم امکان فراوری متناوب در کاربرد در مقیاس‌های صنعتی را ایجاد می‌کند، راه‌حل مناسبی است. به‌وسیله تثبیت آنزیم‌ها پایدار شده و در نتیجه حساسیت کمتری به محیط خود دارند. فرایندهایی که در آن‌ها از آنزیم‌های نامحلول معلق در محیط-های آلی آب‌گریز استفاده می‌شود برای بهینه‌سازی پراکندگی آنزیم به‌منظور بهبود دسترسی به سوبسترا و همچنین جلوگیری از تجمع ذرات هیدروفیل پروتئین، نیازمند تثبیت هستند. علاوه بر این

تثبیت امکان بازیافت را نیز تضمین می‌کند. تثبیت یک آنزیم بر روی یک بستر جامد باید مقرون به صرفه و ساده باشد [۴۶].

تثبیت آنزیم مستلزم تعامل دو گونه آنزیم و حامل بوده بنابراین شناخت ویژگی‌های هردوی آنها مهم است. در مورد آنزیم گروه‌های قطبی مانند گروه‌های آمینی بر روی لیزین و یا گروه‌های اسیدی بر روی گلوتامیک اسید، مناطق غیرقطبی و یا بخش‌های قندی می‌توانند خواص سطحی را تحت تأثیر قرار دهند. حامل می‌تواند برای مطابقت با هر کدام از این خواص سطحی آماده شود. نیاز ضروری برای هر حاملی دارا بودن ناحیه سطحی بالاست. این امکان را می‌توان از طریق ذرات با اندازه بسیار کوچک به دست آورد. علاوه بر این مواد باید به صورت شیمیایی و مکانیکی پایدار باشند.

۱-۴-۱ روش‌های تثبیت آنزیم

تثبیت آنزیم به‌طور کلی به پنج روش فیزیکی و شیمیایی انجام می‌شود. اتصال کووالان، جذب سطحی، تله انداختن، کپسول‌دار کردن و ایجاد پیوند متقاطع. این روش‌ها می‌توانند به‌تنهایی مورد استفاده قرار بگیرند و یا به‌منظور بهبود خواص آنزیم تثبیت‌شده، ترکیبی از چند روش استفاده شود. در روش شیمیایی، پیوند کووالان بین باقیمانده‌های آنزیمی و گروه‌های عملکردی سطح بستر (اتصال کووالان)^۱ و یا بین دو یا چند مولکول آنزیم (ایجاد پیوند متقاطع)^۲ تشکیل می‌شود. جذب سطحی و تله انداختن، روش‌های فیزیکی هستند. در این روش‌ها برهمکنش‌های الکتروستاتیک، پیوندهای یونی و برهمکنش‌های بین پروتئین‌ها مسئول ایجاد اتصال بین مولکول‌های آنزیم و بستر هستند [۴۷]. اخیراً، فناوری نانو در بهبود روش‌های تثبیت آنزیم بسیار مؤثر بوده است. کاهش اندازه مواد حامل آنزیم سبب بهبود بازده و کارایی آنزیم تثبیت‌شده می‌شود. در حالت اتصال به سطح، ذرات

¹ Covalent Bonding

² Cross Linking

ریزتر می‌توانند سطح بزرگ‌تری برای اتصال آنزیم‌ها فراهم کنند؛ در نتیجه، بارگذاری آنزیم در واحد جرم ذرات افزایش می‌یابد. در حالت تثبیت آنزیم در مواد متخلخل نانو در مقایسه با مواد متخلخل توده‌ای، با توجه به مسیر نفوذ کوتاه‌تر سوبسترا، مقدار مقاومت انتقال جرم کمتری برای مواد متخلخل ریزتر قابل‌انتظار است [۴۸]. پراکنده شدن نانو ذرات در محلول واکنش و بازیابی آن‌ها برای استفاده دوباره یکی از چالش‌های استفاده از نانو ذرات در تثبیت آنزیم است. به نظر می‌رسد استفاده از نانوفیبرها بتواند تا حدودی این مشکل را رفع کند. برای مثال، نانوفیبرهای الکترورسی‌شده سطح بسیار بزرگی برای اتصال یا به‌دام‌انداختن آنزیم‌ها ارائه می‌دهند. نانوفیبرهای متخلخل نیز می‌توانند مسیر نفوذ سوبسترا از محیط واکنش به سایت‌های فعال آنزیم را کاهش دهند. نانوفیبرهای الکترورسی‌شده مقاوم‌اند و به‌راحتی از محیط جدا می‌شوند و نیز می‌توانند به‌صورت متخلخل تولید شوند. به‌منظور افزایش میزان بارگذاری، می‌توان با ایجاد اتصال عرضی بین آنزیم‌ها پوششی از آنزیم‌های کلوخه‌شده روی فیبر تشکیل داد. البته این روش را می‌توان در مورد انواع دیگر نانو مواد، مانند نانو ذرات و یا نانولوله‌های کربنی، نیز به‌کار برد [۴۹].

مواد مزوحفره به‌عنوان ساپورت مناسب برای کاتالیزورها، ترکیبات ارگانومتالیک و آنزیم‌ها توجه خاصی را به خود جلب کرده‌اند. در آنزیم‌های درشت مولکول باید مواد متخلخل به‌درستی انتخاب شوند، چون در صورتی که اندازه آنزیم از اندازه حفرات بزرگ‌تر باشد، جذب آن به‌شدت کاهش می‌یابد. اخیراً، تلاش می‌شود با اصلاح سیلیکای مزوحفره از طریق افزایش اندازه درونی حفرات و یا کنترل مورفولوژی، جذب آنزیم افزایش داده شود. از آنزیم‌های تثبیت‌شده در مواد مزوحفره می‌توان در حسگرهای زیستی، سنتز پپتیدها و سفیدسازی زیستی در صنعت کاغذسازی بهره‌گرفت. فرایند تثبیت آنزیم در سیلیکای مزوحفره نسبتاً ساده و راحت است؛ چالش مطرح در این زمینه رهایش آنزیم از این ساختارها و در واقع، پایداری عملیاتی کم آن‌ها است [۵۰].

اولین گزارش در مورد عدم کاهش فعالیت آنزیم در صورت کپسوله‌شدن در ماتریس سل - ژل در سال ۱۹۹۴ ارائه شد؛ از آن به بعد، روش کپسوله‌کردن آنزیم با فرایند سل - ژل به روشی محبوب در تثبیت آنزیم بدل شده است. به‌عنوان مثال، در یک شیوه متداول در این روش، تترامتیل ارتو سیلیکات یا تتراتیل‌ارتوسیلیکات به سل هیدرولیز می‌شود؛ سپس افزایش محلول آنزیم به سل سبب شروع واکنش رسوب‌دهی و تشکیل ژل می‌شود. به این ترتیب، آنزیم‌ها در ماتریس سیلیکات احاطه و اصطلاحاً کپسوله می‌شوند. در این شیوه حفرات و کانال‌هایی با اندازه‌ای در حدود ۱/۰ تا ۵۰۰ نانومتر در ماتریس نهایی تشکیل می‌شود. فرایند باید به خوبی کنترل و بهینه شود تا از رهاش آنزیم جلوگیری شود. در این روش تا حدود زیادی از باز شدن و تغییر ماهیت آنزیم جلوگیری می‌شود [۵۱].

یک راه جدید برای تثبیت آنزیم که اولین بار در سال ۲۰۰۳ ارائه شد، سنتز نانو ذرات تک آنزیم است. در این روش هر مولکول آنزیم با یک شبکه کامپوزیتی آلی / معدنی متخلخل احاطه می‌شود. تولید نانو ذرات تک آنزیم روشی جدید برای تثبیت آنزیم ارائه می‌دهد که با سایر روش‌ها (از جمله، تثبیت آنزیم در مواد متخلخل یا کپسوله‌کردن آن در سل - ژل، پلیمر، یا ساختارهای کامپوزیتی توده) متفاوت است. تبدیل آنزیم‌های آزاد به SENS سبب پایداری فوق‌العاده زیاد فعالیت کاتالیستی آنزیم‌ها می‌شود. این در حالی است که محدودیت چندانی در انتقال جرم سوبسترا به سطح آنزیم رخ نمی‌دهد. در این روش ابتدا سطح آنزیم با پیوندهای کووالانسی (مثلاً گروه‌های وینیل) اصلاح می‌شود. سپس هرکدام از آن‌ها پلیمریزه شده و در مرحله بعدی، اتصالات عرضی بین این رشته‌ها برقرار و نهایتاً نانو ذرات تک آنزیم تشکیل می‌شوند [۵۲].

۱-۴-۲ کاربردهای تثبیت آنزیم

همان‌طور که توضیح داده شد، استفاده از مواد نانوساختار برای تثبیت و پایدارسازی آنزیم نه تنها فعالیت آنزیم را پایدارتر می‌کند که سایر خواص ویژه آن به‌عنوان یک سیستم نانوکاتالیست زیستی را نیز تقویت می‌کند. از مهم‌ترین کاربردهای این نانوساختارهای آنزیمی می‌توان به حسگرهای زیستی، حذف و تصفیه زیستی، تبدیل زیستی، عامل ضد چسبندگی مولکول‌های زیستی و پیل‌های سوختی زیستی اشاره کرد. در ادامه به شکل مختصر به بررسی برخی از این کاربردها می‌پردازیم.

حسگر زیستی آنزیمی از خاصیت اختصاصی بودن یک واکنش آنزیمی بهره می‌برد و معمولاً سینتیک واکنش آنزیمی به‌وسیله سرعت تولید یک محصول یا از بین رفتن یک ماده اولیه دنبال می‌شود. اگر محصولات یا واکنش‌دهنده‌ها الکترو فعال باشند، پیشرفت واکنش را می‌توان مستقیماً به‌وسیله روش آمپرومتری دنبال کرد. در حسگرهای زیستی آنزیمی بر پایه الکتروشیمیایی معمولاً از آنزیم‌های اکسیدوردوکتاز (که واکنش کاتالیستی آن‌ها یا الکترون می‌گیرد یا الکترون می‌دهد) استفاده می‌شود. انواع مختلفی از آنزیم‌ها در حسگرهای زیستی استفاده می‌شوند. از جمله، آنزیم‌های ردوکس مانند الکل دی‌هیدروژناز، آلدئید دی‌هیدروژناز، گلوکز اکسیداز، گلوتامیناز، هورس‌ردیش پراکسیداز، زانتین اکسیداز، کولین اکسیداز، اوره‌آز، بیلروبین اکسیداز و لاکتیت اکسیداز و انواع آنزیم‌های هیدرولیتیک مانند لیپاز و استراز. نکته قابل‌توجه در مورد حسگرهای زیستی آنزیمی این است که تثبیت آنزیم روی سطح الکتروود یک قدم ضروری در رسیدن به کارایی بالاتر الکتروود آنزیمی است [۵۳].

پیل سوختی زیستی بر پایه آنزیم‌ها سیستمی است که با استفاده از زیست‌سوخت‌هایی مانند گلوکز، فروکتوز، اتانول و روغن، الکتروسیته تولید می‌کند. پیل‌های سوختی زیستی آنزیمی می‌توانند به‌عنوان منبع انرژی برای حسگرهای با توان کم، ابزارهای ارتباطی و ایمپلنت‌های پزشکی استفاده شوند. هرچند که کاربرد عملی این پیل‌ها به دلیل طول عمر کوتاه ناشی از پایداری ضعیف آنزیم و نیز

چگالی توان کم پیل، محدود شده است. در پیل‌های سوختی متداول، مانند پیل‌های سوختی مستقیم متانول، از کاتالیست‌های فلزی گران‌قیمت بهره می‌گیرند، درحالی‌که در پیل‌های سوختی زیستی از آنزیم استفاده می‌شود که دارای خاصیت ویژه اختصاصی بودن نیز هست. تثبیت آنزیم می‌تواند در افزایش طول عمر پیل‌های سوختی زیستی بسیار مؤثر باشد [۵۴].

۱-۴-۳ عوامل ضد چسبندگی مولکول‌های زیستی

چسبندگی مولکول‌های زیستی به معنی جذب پروتئین‌ها و دیگر مولکول‌های زیستی روی سطوح در مجاورت آب یا سیال زیستی است و سبب ایجاد مشکل در ایمپلنت‌های پزشکی، حسگرهای زیستی و غشاها خواهد شد. تلاش‌های فراوانی برای ساخت پوشش‌ها و غشاهای ضد چسبندگی مولکول‌های زیستی انجام شده است. هدف این تلاش‌ها جلوگیری از مشکلات مرتبط با چسبندگی مولکول‌های زیستی یا کاهش این مشکلات است. یک روش زیست‌محیطی مقابله با این مسئله استفاده از آنزیم‌ها در رنگ‌ها و پوشش‌های ضد چسبندگی مولکول‌های زیستی است. مثلاً، پروتئازها به رنگ‌های ضد چسبندگی مولکول‌های زیستی افزوده می‌شوند تا اتصال پروتئین‌ها به سطوح را کاهش دهند و از تشکیل چسب‌های پروتئینی به‌وسیله میکروارگانیسم‌ها برای اتصال به سطوح جلوگیری کند. در سیستم‌های نانوکاتالیستی زیستی افزایش پایداری آنزیم‌ها می‌تواند سبب کاهش مؤثر در اتصال پروتئین‌ها روی سطح شود. به‌عنوان مثال، فیلم‌های کاتالیستی زیستی بر پایه پروتئاز - نانولوله کربنی تک‌دیواره در یک ماتریس پلیمری، پایداری آنزیمی بهتری نسبت به آنزیم آزاد در محلول نشان می‌دهند، نیز می‌توانند به‌عنوان فیلم‌های نانوکامپوزیتی خود تمیزکننده برای مقابله با اتصال پروتئین‌ها استفاده شوند. بنابراین، پیش‌بینی می‌شود که این سیستم‌های نانوکاتالیستی زیستی با خاصیت ضد چسبندگی مولکول‌های زیستی و تمیز شوندگی بتوانند در ساخت پوشش‌های ضد چسبندگی مولکول‌های زیستی با طول عمر زیاد استفاده شوند، آن‌ها در جلوگیری از اتصال

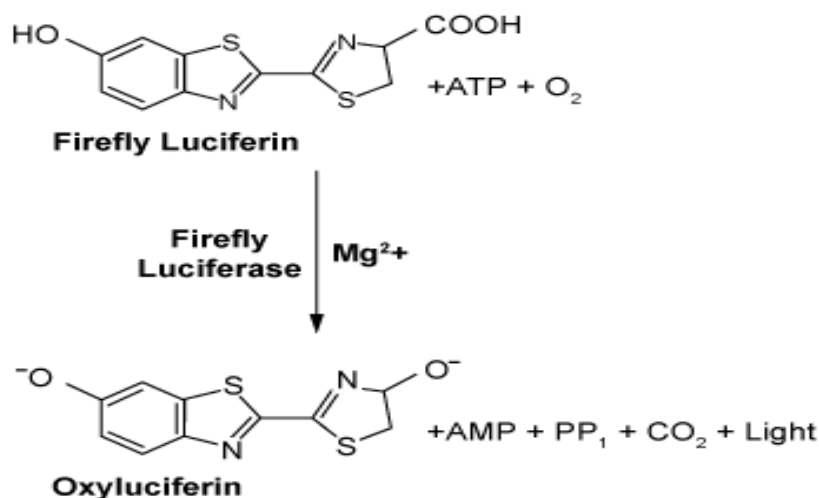
میکروارگانسیم‌ها روی سطح جداره کشتی، ایمپلنت‌های پزشکی، حسگرها و غشاها کاربرد خواهد داشت [۵۵].

۵-۱ آنزیم لوسیفراز

آنزیم لوسیفراز به همراه پیش‌ماده خود یعنی لوسیفرین، مسئول پدیده بیولومینسانس در موجودات زنده هستند. همه لوسیفرازهای شناخته‌شده، اکسیژناز می‌باشند و با استفاده از اکسیژن مولکولی، لوسیفرین خود را اکسید می‌نمایند که در نتیجه این اکسیداسیون نور تولید می‌شود (شکل ۶-۱). لوسیفرازها بر اساس نوع موجودی که در آن یافت می‌شوند به چهار نوع مرجانی، باکتریایی، داینوفلاژل و کرم شبتاب تقسیم می‌شوند که از لحاظ ساختار بیوشیمیایی و ژنتیکی کاملاً متفاوت هستند و از منشأهای تکامل‌یافته مشخص به وجود آمده‌اند امروزه از لوسیفراز به‌عنوان آنزیمی مهم در زیست‌فناوری استفاده می‌شود و کاربردهای نوین آن در حال گسترش است. کاربردهای آن عبارت‌اند از: ۱- عکس‌برداری از سلول‌ها و بافت‌های مختلف به‌واسطه تغییر خاصیت نشر نور آن ۲- استفاده به‌عنوان آشکارکننده زیستی در مطالعه بیان ژن‌ها از طریق بیان همزمان با ژن لوسیفراز ۳- تعیین میزان فعالیت راه‌اندازهای مختلف ژن به‌وسیله قرار دادن ژن لوسیفراز تحت کنترل راه‌انداز موردنظر ۴- تولید زیست حسگر برای شناسایی ترکیبات سمی، عناصر سنگین (از جمله جیوه و کادمیم)، تولوئن و مشتقات آن مثل TNT و همچنین اندازه‌گیری تغییرات مقدار کلسیم درون سلولی و ATP .

[۵۶]

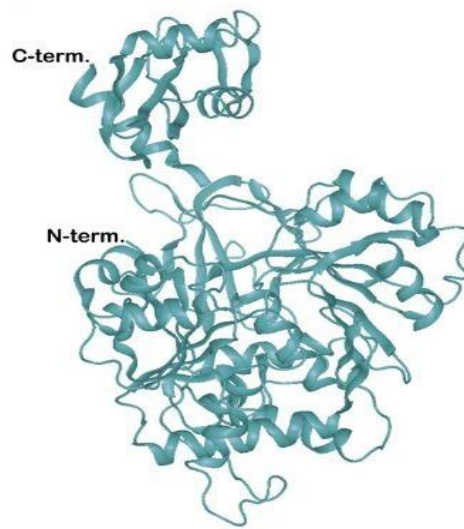
Firefly Luciferase Reaction



شکل (۱-۶): واکنش آنزیم لوسیفراز

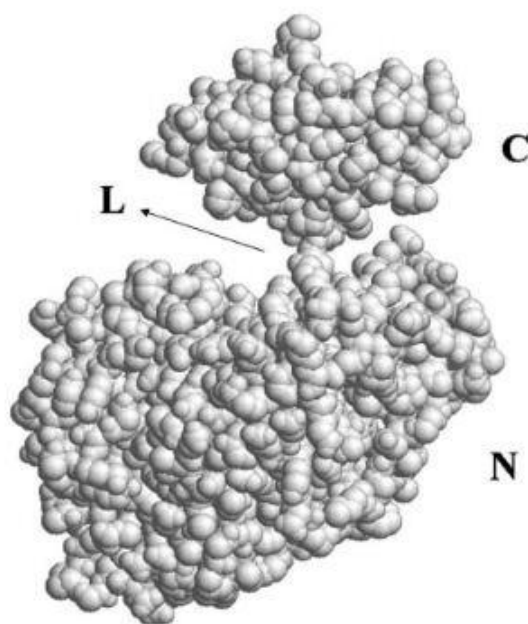
در سال ۱۹۵۶ با جمع‌آوری حشره شب‌تاب گونه *Photinus pyralis* به کمک تکنیک فیلتراسیون ژلی حدود ۳۰ میلی‌گرم آنزیم لوسیفراز لنترن ۶۰۰۰ حشره جداسازی شد. سپس چندین تکنیک کروماتوگرافی میل ترکیبی که در آن از بنزیل آمین و Cibachoron Blue F3GA به‌عنوان لیگاند استفاده می‌شد، به‌منظور جداسازی آسان‌تر آنزیم لوسیفراز به‌کاربرده شد. با استفاده از تکنیک رسوب با سولفات آمونیوم، فیلتراسیون ژلی و HPLC با هیدروکسی آپاتیت حدود ۰/۲ میلی‌گرم آنزیم لوسیفراز ۱/۵ گرم لنترن از حشره‌های شب‌تاب ژاپنی گونه‌های *Luciola* و *Lusiola cruciate* با جداسازی شد [۵۷].

آنزیم لوسیفراز گونه *P.pyralis* در سال ۱۹۸۵ کلون شد و در سال ۱۹۸۷ توالی ژنومی و cDNA آن مشخص گردید. در سال ۱۹۹۶ ساختار سه‌بعدی آنزیم لوسیفراز گونه *P.pyralis* در عدم حضور سوبسترا با حد تفکیک ۲ آنگستروم کریستالوگرافی شد (شکل ۱-۷).



شکل (۷-۱): ساختار آنزیم لوسیفر از *P.pyra* 1

آنزیم لوسیفر از گونه *P.pyralis* مونومر بوده و دارای ۵۵۰ اسید آمینه می‌باشد. وزن مولکولی آن حدود ۶۲ کیلو دالتون و PI حدود ۶/۴۲ دارد. ساختار کریستالی آنزیم لوسیفر از گونه *P.pyralis* نشان می‌دهد که از دو جایگاه فشرده تشکیل شده است: یک جایگاه بزرگ در انتهای آمین (N-terminal) و یک جایگاه کوچک‌تر در انتهای کربوکسیل (C-terminal) که به وسیله لینکر پپتیدی انعطاف پذیر به هم متصل شده‌اند و در نهایت یک شکاف گسترده بین دو جایگاه ایجاد (شکل ۸-۱) [۵۸].



شکل (۸-۱): آنزیم لوسیفر از گونه *P.pyralis*

الف) جایگاه انتهای آمین (N-terminal) مرکب از دو صفحه β در ساختار $\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ و شبکه β می-باشد. دو ورقه β روی هم قرار گرفته و شبکه β انتهای دو ورقه را می پوشاند. این جایگاه حاوی اسیدهای آمینه ۴۳۶-۱ با ساختار فشرده می باشد.

ب) جایگاه انتهای کربوکسیل (C-terminal) که به وسیله یک لولای انعطاف پذیر می تواند به جایگاه انتهای آمین متصل شود شامل اسیدهای آمینه ۵۴۲-۴۴۰ می باشد. از دو رشته ناهمسو کوتاه β و یک صفحه ترکیبی سه رشته ای β تشکیل شده است. در نهایت در اثر فشرده شدن سه ماریچ در مقابل کناره ها، ساختار $\beta+\alpha$ ایجاد می شود. همچنین در انتهای جایگاه کربوکسیل توالی سرین- لیزین- لوسین (SKL) وجود دارد که به عنوان سیگنال هدف پراکسی زومی می باشد.

ج) بخش لولایی که دو جایگاه را به هم متصل می کند دارای ساختار نامنظمی می باشد که نشان- دهنده انعطاف پذیری این قسمت است.

د) موقعیت دقیق جایگاه فعال^۱ در آنزیم لوسیفراز به طور قطعی مشخص نشده است.

و) جایگاه اتصال ATP در آنزیم لوسیفراز حشره شب تاب با مقایسه ساختار اول این آنزیم با اسیل کوالیگاز و پپتیدیل سینتتاز مورد مطالعه قرار گرفته است و مشخص گردید بین آنها بخش های همولوگی وجود دارد که در تبادل $ATP[P^{32}]PPi$ نقش دارد. در آنزیم لوسیفراز حشره شب تاب رزیدو سرین ۱۹۸ مرتبط با تمایل آنزیم به ATP بوده، لیزین ۵۲۹ در جهت گیری و اتصال ATP به لوسیفرین و رزیدو لیزین ۴۴۳ در سینتیک واکنش مونواکسیژنازی نقش دارد [۵۹،۶۰].

^۱ Active site

۱-۵-۱ مکانیسم واکنش بیولومینسانس

آنزیم لوسیفراز حشره شبتاب گونه *P.pyralis* یک آنزیم مونواکسیژنازی: اکسیژن ۴- اکسیدوردوکتاز (decarboxylating, ATP-hydrolysing) با EC 1.13.12.7 است که برای انجام واکنش و نشر نور در طول موج ۵۶۰ نانومتر محدوده سبز-زرد به لوسیفرین (LH₂) (هتروسیکلیک کربوکسیلیک اسید) به عنوان سوبسترا، ATP و Mg²⁺ نیازمند است [۶۱].

این واکنش از نوع جابجایی هسته‌دوستی SN₂ بین کربن C₄ گروه کربوکسیلیک در حلقه تiazولین D-LH₂ و گروه‌های فسفات ATP می‌باشد که طی دو نیم‌واکنش به شرح ذیل انجام می‌شود:

نیم‌واکنش اول

در طی این مرحله در حضور Mg²⁺ و ATP، پیروفسفات PPI رهاشده و ناحیه کربوکسیل لوسیفرین آدنیل‌شده و در نهایت لوسیفریل آدنیلات (LH₂-AMP) حاصل می‌شود. تشکیل کمپلکس ATP-Mg²⁺ بارهای منفی را به‌طور جزئی پوشش می‌دهد و بر کنفورماسیون گروه‌های فسفات اثر می‌گذارد که این خود نشانگر نیاز به کاتیون دو ظرفیتی در این واکنش است.

نیم‌واکنش دوم دو مرحله‌ای می‌باشد:

در مرحله اول با دپروتونه شدن کربن C₄، کربانیون تشکیل شده که با حمله هسته‌دوستی به اکسیژن مولکولی، هیدروپراکسید خطی ایجاد و سپس با یک تغییر درون مولکولی همراه با آزاد شدن AMP حد واسط حلقوی چهارضلعی فشرده دی‌اکسی‌تانون ایجاد می‌شود. در این مرحله ATP اسیدیتته را افزایش می‌دهد و نقشی به‌عنوان منبع انرژی ندارد.

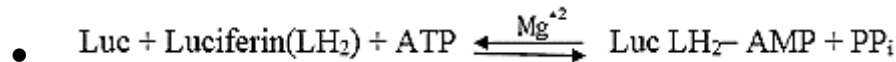
در مرحله بعد از این نیم‌واکنش، فرآیند دکربوکسیلاسیون اکسیداتیو اتفاق می‌افتد که طی آن حد واسط دی‌اکسی‌تانون شکسته شده و یک مولکول CO₂ آزاد می‌شود، در نهایت اکسی‌لوسیفرین^۱

^۱ Oxyluciferin

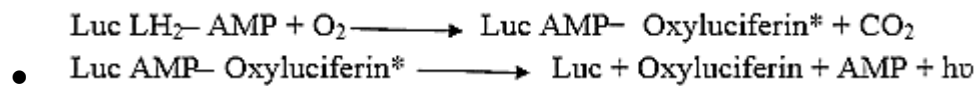
برانگیخته ایجاد می‌شود. در پایان، برگشت اکسی‌لوسیفرین برانگیخته به حالت پایه با نشر نور سبز-زرد همراه است.

به‌طور کلی می‌توان انجام این دو نیم‌واکنش را به‌صورت زیر نوشت:

(۱) نیم‌واکنش اول (واکنش ۱-۱)



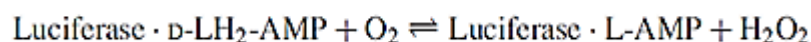
(۲) نیم‌واکنش دوم (واکنش ۲-۱)



در فرآیند نشر نور، مرحله محدودکننده سرعت مربوط به دپروتونه شدن کربن C4 و افزودن O2 به آن می‌باشد. لازم به ذکر است که ایزومر فضایی فرم L لوسیفرین^۱ نیز می‌تواند آدنیله شود و به شکل L-LH2-AMP تبدیل شود اما از آن برای تولید نور استفاده نمی‌شود [۶۲،۶۳].

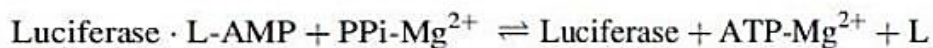
۱-۵-۲ نقش آنزیم لوسیفراز در واکنش‌های دیگر

علاوه بر واکنشی که توضیح داده شد، واکنش کمپلکس لوسیفراز - D-LH2-AMP با اکسیژن منجر به تولید دی‌هیدرولوسیفریل - AMP (L-AMP) و پراکسید هیدروژن (H2O2) می‌شود که در این واکنش هیچ نوری تولید نمی‌شود (واکنش ۳-۱).

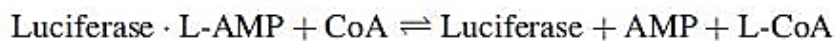


^۱ L-LH2

انجام این واکنش که منجر به تولید H_2O_2 می‌شود فقط در شرایط آزمایشگاهی امکان‌پذیر می‌باشد، چرا که اگر غلظت H_2O_2 بیشتر از میزان تقاضای سلول باشد می‌تواند فعالیت‌های بیولوژیکی را مختل کند. از آنجاکه آنزیم لوسیفراز حشره شب‌تاب در پراکسی‌زوم (اندامکی که غنی از کاتالاز می‌باشد) قرار دارد؛ با غیرممکن بودن انجام این واکنش در داخل بدن یا محیط *in vivo* مغایرتی ندارد. علاوه بر این L-AMP نیز می‌تواند با $PPi-Mg^{2+}$ تولیدشده در مسیر تولید نور واکنش داده و باعث تشکیل دهیدرو لوسیفرین (L) و بازتولید ATP شود (واکنش ۱-۴).

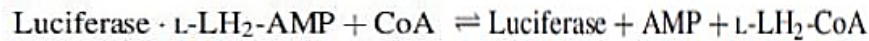


تأثیر کوآنزیم آ (CoA) روی واکنش نشر نور لوسیفراز پدیده‌ای است که به خوبی ثابت شده است: با افزودن به مخلوط واکنش در ابتدا، فارغ از مشخصات پروفایل نور، منجر به افزایش نور نشری می‌شود. همچنین وقتی به مخلوطی که نورخان‌تر نشر نور داشته اضافه شود، نشر نور ثانویه را القاء می‌کند؛ اما از آنجاکه CoA شناساگر اصلی در واکنش تولید نور نمی‌باشد نقش آن در واکنش بیولومینسانس به خوبی درک نشده است. نشان داده شده است که در واقع CoA یک سوبسترا می‌باشد که با L-AMP واکنش داده و دهیدرو لوسیفریل کوآ (L-CoA) تولید می‌کند. این واکنش با آنزیم لوسیفراز کاتالیز می‌شود (واکنش ۱-۵).

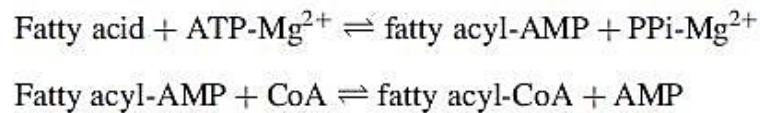


اهمیت نقش CoA در این جا می‌باشد که: هنگام واکنش با مهارکننده قوی L-AMP، محصول جدید L-CoA با قدرت مهارکنندگی کمتری ایجاد می‌کند، در نتیجه آنزیم لوسیفراز می‌تواند به واکنش بیولومینسانس خود ادامه دهد.

CoA همچنین می‌تواند با L-LH₂-AMP واکنش دهد و منجر به تولید L- لوسیفیریل کوآ (L- LH₂-CoA) شود. از آنجاکه L-LH₂ و فرم آدنیله آن L-LH₂-AMP به‌عنوان مهارکننده نور عمل می‌کند، واکنش آن با کوآ منجر به پیشبرد مسیر تولید نور می‌شود (واکنش ۱-۶) [۶۴،۶۵].



واکنش‌هایی که توسط لوسیفراز و تعدادی از لیگازها انجام می‌شود، از نظر بیوشیمیایی به واکنش‌های کاتالیز شده با اسیل کوآسینتتاز شباهت دارد. آنزیم اسیل کوآسینتتاز باعث آدنیلاسیون ریشه کربوکسیلیک اسیدهای چرب شده و با آزاد شدن PPi موجب ایجاد پیوند تیواستر بین اسیدچرب و CoA می‌شود، این مکانسیم به مراحل آدنیلاسیون واکنش بیولومینسانس بسیار شباهت دارد (واکنش ۷-۱ و ۸-۱).



بعد از آدنیله شدن گروه تیول CoA، یک حمله هسته‌دوستی انجام و AMP جابه‌جا و اسیل CoA تشکیل می‌شود. آنزیم لوسیفراز نیز در حضور اسید چرب، ATP-Mg²⁺ و CoA می‌تواند تشکیل اسیل CoA را کاتالیز کند. شباهت ساختاری بین D-LH₂ و آراشیدونیک اسید (یکی از اسیدهای چرب آزمایش‌شده به‌عنوان سوپسترا) در شناسایی لوسیفراز و واکنش به شمار می‌رود. اسیدهای چرب به‌عنوان مهارکننده واکنش لوسیفراز عمل می‌کنند، تبدیل آن‌ها به اسیل آدنیلات یکی دیگر از راه‌ها برای تولید نور می‌باشد. در کنار اثبات فعالیت شبه لیگازی آنزیم لوسیفراز واکنش عکس آن نیز صادق است به این معنی که لیگازها نیز فعالیت شبه لوسیفرازی دارند. یکی دیگر از نتایج عملکرد لیگازی لوسیفراز سنتز دی‌نوکلئوزید پلی‌فسفات‌ها در واکنش مشابه با پلی‌فسفرولیز L-AMP به ATP است.

واکنش بیولومینسانس کاتالیز شده توسط لوسیفراز باکتریایی نیز یک واکنش اکسیداتیو می‌باشد. با این تفاوت که در این واکنش باکتری از FMNH₂ به جای لوسیفرین استفاده می‌کند. در طی این واکنش فلاووین مونونوکلئوتید احیاء شده باعث اکسایش زنجیر بلند آلیفاتیک آلدهیدی به آلیفاتیک کربوکسیلیک اسید می‌شود. در این واکنش حد واسط هیدروکسی فلاووین به صورت برانگیخته تشکیل شده که ضمن برگشت به حالت پایه FMN باعث نشر نور آبی- سبز می‌شود (واکنش ۱-۹) [۶۶].



۱-۵-۳ ساختار شیمیایی ترکیبات مرتبط با واکنش لوسیفرین-لوسیفراز:

۱-۵-۳-۱ D(-)-Luciferin

به منظور شناخت مکانیسم عمل لوسیفراز حشره شب‌تاب، در ابتدا نیاز بود که ساختارهای شیمیایی لوسیفرین و ترکیبات مربوط به آن شناسایی شوند. به این منظور، در سال ۱۹۵۷ تقریباً ۹ میلی‌گرم بلور لوسیفرین از لنترن حدود ۱۵۰۰۰ حشره شب‌تاب *Photinus pyralis* گونه آمریکای شمالی جداسازی گردید. همچنین، از حشره شب‌تاب ژاپنی *Luciola cruciate* نیز حدود ۵,۵ میلی‌گرم لوسیفرین از شکم ۱۲۰۰۰ حشره بالغ جداسازی گردید. ساختار لوسیفرین حشره شب‌تاب D(-)-Luciferin به کمک سنتز شیمیایی به صورت (S)-2-(6-hydroxy-2-benzothiazolyl)-2-thiazoline-4-carboxylic acid تعیین گردید. در این ساختار، کنفیگوراسیون گروه کربوکسیل در موقعیت C₄ به صورت S می‌باشد. این کایرالیتهی لوسیفرین به منظور واکنش لومینسانس آنزیم لوسیفراز ضروری بوده و بدین ترتیب L(+)-Luciferin برای انجام واکنش لومینسانس غیرفعال می‌باشد. کنفیگوراسیون و کنفورماسیون ساختار لوسیفرین ساخته شده، با مطالعات کریستالوگرافی با پراش اشعه X تعیین شد [۶۷].

۱-۵-۳-۲ L(+)-Luciferin (L-LH₂)

ال-لوسیفرین ی انانتیومر دیگر د-لوسیفرین بوده و به منظور شناسایی ساختار شیمیایی D-Luciferin سنتز شد (۳۴). ال-لوسیفرین مهارکننده لوسیفراز بوده و میزان Ki آن $3-4 \mu M$ می‌باشد. در سال ۱۹۹۶ تولید نور ضعیفی از واکنش ال-لوسیفرین با لوسیفراز گزارش گردید و مکانیسم آن از طریق راسمیزاسیون ال-لوسیفرین به د-لوسیفرین به کمک تشکیل لوسیفریل آدنیلات پیشنهاد گردید. در لارو حشره شب‌تاب ژاپنی *Luciola cruciate* به کمک آنالیز HPLC و استفاده از ستون-های کایرال، تقریباً نسبت ۱:۱ از د-لوسیفرین و ال-لوسیفرین گزارش شد. همچنین در اندام نوری این لارو، فعالیت کاتالیتیکی تبدیل ال-لوسیفرین به د-لوسیفرین نشان داده شد. به‌رحال این نتایج مسیر بیوسنتز لوسیفرین حشره شب‌تاب را نشان نمی‌دهد [۶۸].

۱-۵-۳-۳ دهیدرو لوسیفرین (L)

دهیدرو لوسیفرین در ابتدا به‌عنوان یکی از محصولات تشکیل‌شده در طی فرایند اکسیداسیون زیستی لوسیفرین شناخته شد. دهیدرو لوسیفرین در مقادیر اندکی در حشره شب‌تاب وجود دارد و به کمک اکسیداسیون شیمیایی لوسیفرین می‌توان آن را تهیه نمود. ال-لوسیفرین و د-لوسیفرین می‌توانند به کمک اکسید شدن با فری سیانید یا گرم شدن در یک محلول الکلی به دهیدرو لوسیفرین تبدیل گردند. در این واکنش H_2O_2 تولید می‌گردد و این واکنش مهارکننده رقابتی واکنش بیولومینسانس می‌باشد. دهیدرو لوسیفرین به‌عنوان یک مهارکننده قوی واکنش لومینسانس شناخته می‌شود [۶۹].

۱-۵-۳-۴ اکسی لوسیفرین

ساختار شیمیایی اکسی لوسیفرین به وسیله داده‌های طیف‌های فلورسانس ترکیبات سینتیک تعیین گردید. اکسی لوسیفرین، به دلیل اینکه ترکیب ناپایداری می‌باشد، در محلول واکنش لوسیفرین-لوسیفراز فقط به کمک آنالیز HPLC آشکار گردیده است. اکسی لوسیفرین یک ترکیب کربونیل بوده و تاتومری از اشکال کتو-انول را نشان می‌دهد که به وسیله اسیدها و بازها کاتالیز می‌گردد. شکل کتو و انول اکسی لوسیفرین در محلول به ترتیب فلورسانس قرمز و سبز-زرد دارند. میزان K_i اکسی لوسیفرین در تولید نور حدود $2-0.5 \mu\text{M}$ می‌باشد [۷۰].

۱-۵-۳-۵ لوسیفریل آدنیلات (LH2-AMP)

لوسیفریل آدنیلات‌ها از د-لوسیفرین و ال-لوسیفرین، در حضور ATP و Mg^{2+} و به کمک لوسیفراز تشکیل می‌شوند که برگشت‌پذیری این واکنش نیز اثبات شده است. این ترکیب در محلول آبی به شدت ناپایدار بوده و در pH حدود ۸ به سرعت به لوسیفرین و آدنیلک اسید هیدرولیز می‌گردد. لوسیفریل آدنیلات به آسانی در بافر خنثی تا بازی راسمیزه می‌شود [۷۱].

۱-۵-۳-۶ دهیدرو-لوسیفریل آدنیلات (L-AMP)

دهیدرو-لوسیفریل آدنیلات مهارکننده واکنش لومینسانس می‌باشد. میزان K_i این ترکیب برای نشر نور حدود $1/25-0.025 \mu\text{M}$ می‌باشد [۷۲].

۱-۵-۴ فرضیه‌های مطرح شده ر مورد مکانیسم نشر نورهای متنوع در فرایند بیولومینسانس

طیف نشری لوسیفر از گونه *P. yralis* در محیط *in vitro* در pH حدود ۷/۶، سبز-زرد ($\lambda_{max} 620$ nm) و در pH حدود ۵/۴ در محدوده قرمز ($\lambda_{max} 620$ nm) می‌باشد. تا سال ۱۹۹۰، رابطه بین نشر نور اکسی لوسیفرین و رنگ لومینسانس به کمک توتومریزاسیون کتو و انول اکسی لوسیفرین برانگیخته‌شده توضیح داده می‌شد. بررسی طیف فلورسانس در شرایط اسیدی و بازی نشان‌دهنده رنگ قرمز و سبز-زرد می‌باشد که به ترتیب مطابق شکل کتو و انول از اکسی لوسیفرین می‌باشد. به‌منظور درک بیشتر این فرایند، خصوصیات فلورسانسی مشتقات ۵-متیل و اکسی-متیل از اکسی لوسیفرین نیز مورد بررسی قرار گرفت. در سال ۱۹۹۱، ایجاد جهش در ساختار آنزیم لوسیفر از گونه *L. cruciata* و تبدیل سرین به آسپارژین منجر به ایجاد نشر نور قرمز در این آنزیم شد. همچنین، این تغییرات طیف نشری در محدوده سبز-زرد، سبز-نارنجی و قرمز با ایجاد جهش در لوسیفر ازهای گونه‌های دیگر نیز مشاهده شد. این نتایج نشان می‌داد که نشر نور نمی‌تواند تنها به کمک توتومریزاسیون کتو و انول اکسی لوسیفرین توضیح داده شود. در سال ۲۰۰۲، ۵-۵-دی متیل لوسیفرین و مشتقات آدنیل آن‌ها سنتز و از آن‌ها در واکنش لوسیفر از استفاده شد. با استفاده از آدنیلات د-۵ و ۵-دی متیل لوسیفرین به‌عنوان سوبسترای آنزیم لوسیفر از گونه‌های *P. pyralis* و *P. plagiophthala* به ترتیب نشر نور سبز-زرد و قرمز مشاهده شد [۷۳، ۷۴]. این نتیجه نیز پیشنهاد می‌کند که توتومریزاسیون کتو و انول لوسیفرین نمی‌تواند توجیه‌کننده علت نشر دو نور متفاوت لومینسانسی باشد به علت اینکه لومینسانس د-۵-دی متیل لوسیفرین در موقعیت کربن شماره ۵ هیدروژنی ندارد و نمی‌تواند بر روی خود، واکنش توتومریزاسیون کتو و انول را انجام دهد. به همین دلیل، فرضیه‌های دیگری در این زمینه ارائه گردید. اولین فرضیه، تحت عنوان چرخش درون مولکولی انتقال بار ارائه گردید. حلقه‌های بنزوتیازول و تیازولون در اکسی لوسیفرین، حول باند C2-C2' چرخش می‌کنند و پیشنهاد می‌شود که کنفورماسیون‌های متفاوتی از اکسی لوسیفرین برانگیخته، طیف نشری متفاوتی ایجاد می‌کنند. طبق

فرضیه سوم، اکسی لوسیفرین برانگیخته در حالت ۹۰ درجه چرخش که پایین ترین سطح انرژی را دارا است، نور قرمز از خود تابش می کند؛ اما شکل فضایی مسطح که بالاترین سطح انرژی را دارد نور سبز ساطع می کند. رنگ های دیگر هم بین این دو آرایش فضایی لوسیفرین به وجود می آیند. با وجود آنکه نشان دادن چرخش حالت برانگیخته حلقه های تیزولین مؤثر بر طیف بیولومینسانس هنوز ممکن نشده است، ولی چگونگی نشر هر دو نور سبز و قرمز توسط فرم کتونی اکسی لوسیفرین با این فرضیه قابل توجیه است [۷۵]. با این حال این فرضیه نمی تواند فلورسانس سبز-آبی در محلول های آبی را توجیه کند. نظریه دیگر در این زمینه، قطبیت جایگاه فعال می باشد. طبق این مکانیسم، تغییر رنگ ایجاد شده به علت تغییر در قطبیت جایگاه اتصال اکسی لوسیفرین به لوسیفراز می باشد. طیف فلورسانس در حلال هایی با ثابت دی الکتریکی مشخص می تواند تا حدود ۴۰ nm جابجا شود که این تغییر بیانگر اثر متفاوت محیط جایگاه فعال لوسیفراز بر طول موج بیولومینسانس می باشد. عموماً در حلال های قطبی طیف نشری به سمت رنگ قرمز و در حلال های غیر قطبی به سمت رنگ آبی جابجا می شود. این نظریه قادر به توضیح حضور دو شکل کتو و انول اکسی لوسیفرین نمی باشد. به هر حال، این نوسانات اثر قطبیت جایگاه فعال، در لوسیفراز های گونه *Railroad Worms* مشاهده نمی شود. با اینکه طبق مطالعات تغییرات دینامیکی و صورت بندی جایگاه فعال نقش مهمی در تعیین رنگ بیولومینسانس گونه های مختلف دارند، مطالعه چگونگی تغییر کنفورماسیون جایگاه فعال بر طول موج بیولومینسانس در لوسیفراز های مختلف می تواند نتایج ارزشمندی را در برداشته باشد [۷۶، ۷۷].

۱-۵-۵ استفاده از مشتقات لوسیفرین در سنجش های بیولومینسانسی:

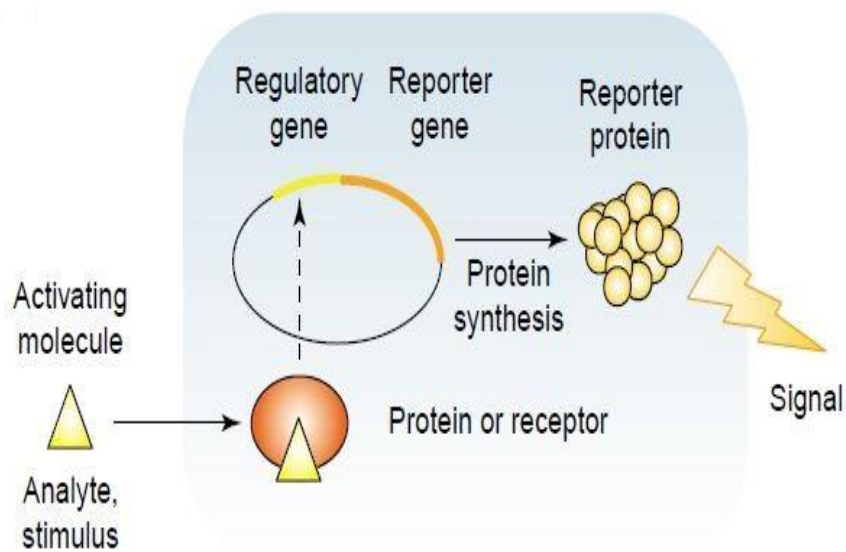
به منظور توسعه سنجش های آنزیمی و سنجش های ایمنی، مشتقات استر و آمید لوسیفرین ساخته شده اند. آنزیم های مورد مطالعه، مشتقات لوسیفرین را هیدرولیز کرده و د-لوسیفرین آزاد شده در واکنش لوسیفراز مورد استفاده قرار می گیرد. مشتقات سولفات و فسفات لوسیفرین به ترتیب به عنوان سوبسترای آسیل سولفاتاز و آلکالین فسفاتاز مورد استفاده قرار می گیرند. همچنین، د-

لوسیفیرین گلیکوزیدها در بررسی فعالیت گلیکو-هیدرولازی مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۷۸]. بعلاوه استرها و آمیدها در گروه کربوکسیل، به ترتیب به‌منظور مطالعه کربوکسیلیک استرازی و کربوکسی پپتیدازی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. سوپسترای دوکاره لومینوژنیک نیز برای استفاده لوسیفراز حشره شب‌تاب و پراکسیداز گزارش شده است. به‌منظور تعیین فعالیت مونوآمین اکسیدازی در سیستم سنجش هموژن، مشتقات آمین غیر حلقوی از لوسیفیرین ساخته شده و بکار رفته است. در تصویربرداری بیولومینسانسی از سلول‌های پستانداران با استفاده از لوسیفراز حشره شب‌تاب به‌عنوان ژن گزارشگر، استفاده از استرهای قابل عبور لوسیفیرین از غشا، آمیدهای ۶-آمینو-د-لوسیفیرین شامل گلیاسین و کانژوگه‌های ناقل در موش سنتز و بکار رفته است. همچنین به‌منظور بهبود نیمه‌عمر لوسیفیرین در تصویربرداری تومورها در محیط *in vivo*، استفاده از ۶-آمینو-د-لوسیفیرین تغییر یافته با پلی‌اتیلن گلیکول گزارش شده است [۷۹].

۱-۵-۶ کاربردهای بیولومینسانس

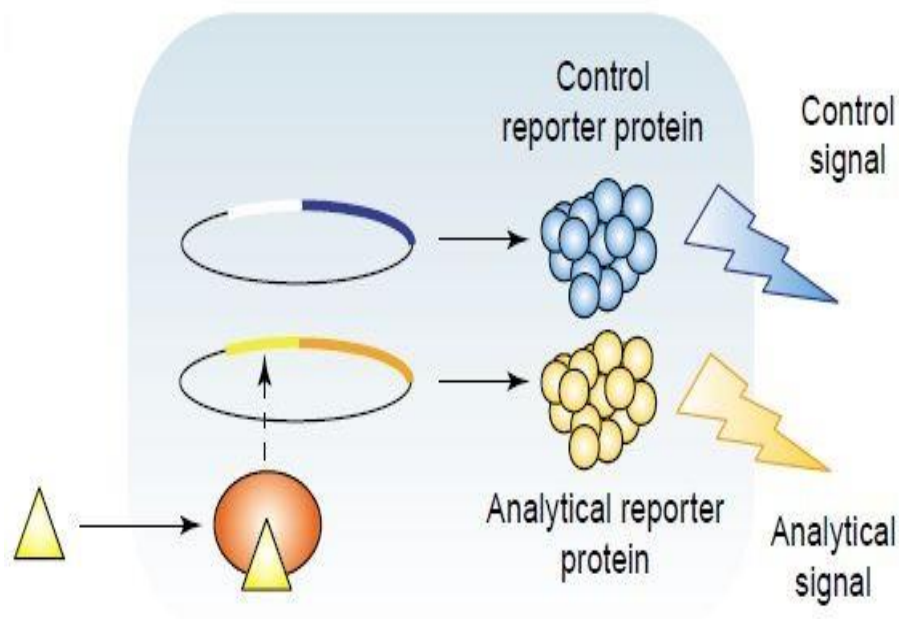
گزارشگر ژنی یکی از کاربردهای بیولومینسانس است. گزارشگرهای ژنی ترادف‌های DNA هستند که پروتئین یا آنزیمی را کد می‌کنند که بروز یا سنجش آن‌ها آسان و آشکار است. می‌تواند به‌صورت مصنوعی به سلول معرفی شده تا بیان ژنی را آشکار کند، برای تبدیل سلول به بیوسنسور و یا برای اهداف مکان‌یابی سلولی به کار رود [۸۰]. استفاده از تکنولوژی گزارشگر ژنی^۱ در شکل ۱-۹ آمده است.

^۱ Bioluminescence/Chemoluminescence



شکل (۱-۹): گزارشگر ژنی ۱

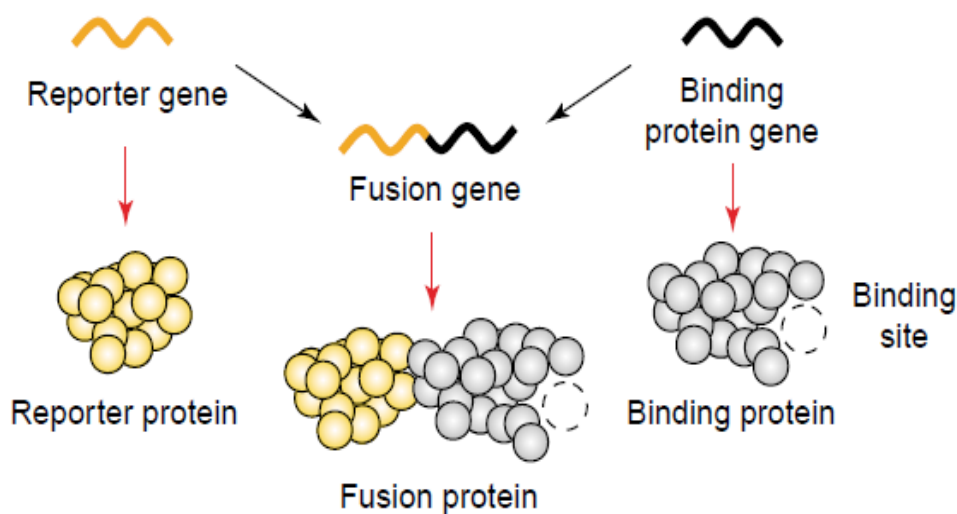
کاربرد دیگر بیولومینسانس در سیستم‌های گزارشگر دوتایی است. در سنجش‌های لومینسانس چندتایی، سیگنال‌ها بلافاصله ایجاد شده و مستقل از هم به کمک تغییر در پروفایل کینتیکی واکنش-های لومینسانس یا تفاوت در طول موج نشری سنجش می‌شوند [۸۱]. در یک گزارشگر تجاری از لوسیفراز *Renilla* و حشره شب‌تاب سیستم دوتایی تولید شده که نمای شماتیکی از آن در شکل ۱-۱۰ نشان داده شده است.



شکل (۱-۱۰): نمای شماتیک سیستم گزارشگر دوتایی

بررسی مولکول‌های دو عملکردی کاربرد دیگر بیولومینسانس است. مولکول دو عملکردی قادر به ایفای نقش به‌عنوان سوپسترای لومینسانسی برای هر دو آنزیم، لوسیفراز حشره شب‌تاب و پراکسیداز ترب (HRP) می‌باشد. در این صورت هر دو آنزیم می‌توانند به‌صورت مستقل در یک چاهک سنجش شوند و طیف نوری متفاوتی ایجاد کنند. پروتئین‌های به هم متصل شده از اتصال ژن کدکننده آنزیم BL و ژن یک فتوپروتئین کدکننده پروتئین اتصال (مثل پروتئین A، پروتئین G، استرپت آویدین یا پپتید پذیرنده بیوتین) ایجاد می‌شوند که برای اهداف سنجش ایمنی^۱ و immunoblotting در سراسر جهان کاربرد دارند (شکل ۱-۱۱) [۸۲].

^۱ Immunoassay

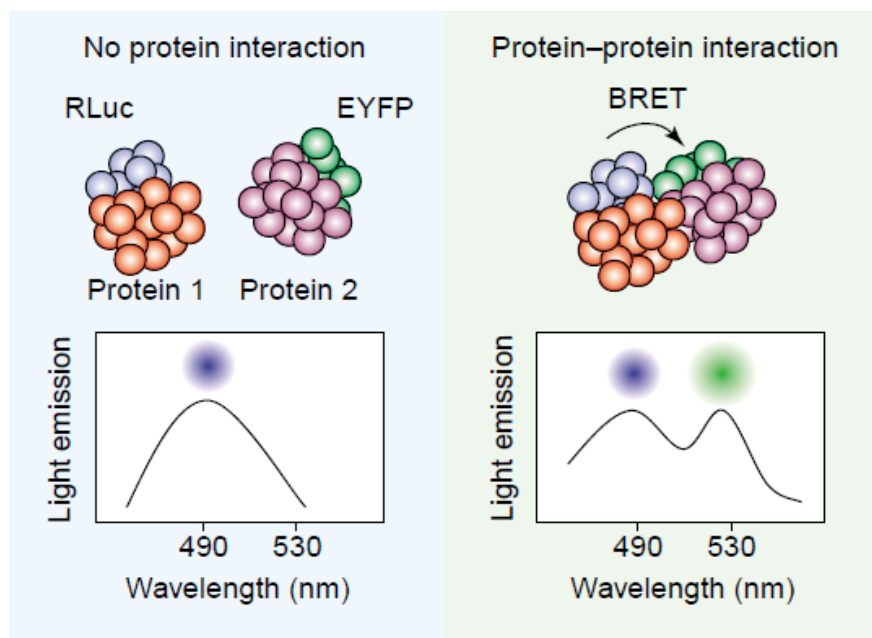


شکل (۱-۱۱): مولکول‌های دو عملکردی

انتقال انرژی رزونانس بیولومینسانس کاربرد دیگری برای بیولومینسانس است. این تکنیک مبتنی بر انتقال انرژی است که بین دهنده لومینسانس یا فلئورسانس و پذیرنده فلئورسانس مثل GFP رخ می‌دهد برای مثال BRET انتقال انرژی طبیعی در بعضی از موجودات دریازی مثل *jellyfish* *Aequorea Victoria* و بنفشه دریایی *R. reniformis* می‌باشد. در این فرآیند لوسیفراز (*Renilla luciferase*) (Rluc) که نور آبی (۴۸۰ نانومتر) نشر می‌کند در حضور سوپسترای کولنترازین^۱ انرژی را به نوعی GFP زردرنگ انتقال می‌دهد که در عوض نور سبز، در ۳۵۰ نانومتر نشر می‌کند. میان‌کنش بین این دو پروتئین با اتصال یکی از آن‌ها به Rluc و دیگری به GFP زردرنگ و افزودن سوپسترا منجر به نشر Rluc شده، در صورتی که انتقال انرژی بین دو پروتئین تنها در صورت نزدیکی > 100 آنگستروم رخ دهد. سیگنال BRET، سنجشی از میزان نشر نور سبز بوسیله GFP زردرنگ در مقایسه با نشر نور آبی بوسیله Rluc است. از این روش به خوبی در مطالعه دایمر شدن گیرنده‌های سلول مثل انسولین و میان-کنش گیرنده در سلول‌های زنده استفاده می‌شود. BRET همچنین روشی حساس برای نمایش میان-

^۱ Coelenterazine

کنش پروتئین‌های فعال از نظر رونویسی در هسته سلول‌های زنده می‌باشد. این تکنیک برای غربالگری در مقیاس بالا بسیار مناسب بوده و در نتیجه در صنعت داروسازی کاربرد دارد (شکل ۱-۱۲) [۸۳،۸۴].



شکل (۱-۱۲): پدیده BRET

کاربرد پنجم تصویربرداری BL/CL است. دستگاه‌های تصویربرداری نور کم مبتنی بر دوربین‌های CCD فوق حساس می‌باشد که قادر به شناسایی نور خروجی تولیدشده بوسیله واکنش‌های اختصاصی زیستی در حال رخداد در سطح نمونه است؛ این دستگاه‌ها می‌توانند میزان نور نشر شده را در حد تک فوتون محاسبه و همچنین مکانی سیگنال در سطح نمونه را مشخص نمایند. کاربردهای تصویربرداری BL/CL عبارتند از: الف) در مطالعه‌ی الگوی بیان ژنی *in vivo* در موجودات تراریخته‌ی تولیدکننده نور، ب) مطالعه پیشرفت بیماری و تأثیر عوامل درمانی در بیماری‌های عفونی ناشی از میکروارگانیسم‌های پاتوژنیک مهندسی‌شده، نحوه‌ی کلونی‌سازی آن‌ها و تأثیر آن‌ها در بدن، ج) در تحقیقات رشد و متاستاز تومورها و مطالعه‌ی میزان تأثیر داروهای ضد سرطان، د) پیوند سلول *in*

vivo در جهت مکان‌یابی و بقاء سلول‌ها و فرآیندهایی چون آپاپتوز، میان‌کنش‌های پروتئین-پروتئین، سرنوشت سلولی و عملکرد آن. [۸۵].

کاربرد ششم BL/CL است. استفاده از BL/CL به‌عنوان سیستم شناسایی توسعه‌ی بیوسنسورها که ابزاری آنالیزی در شناسایی سیستم‌های زیستی در تماس با دستگاه‌های رساناست، محدود به استفاده از آنزیم‌های تثبیت‌شده در اشکال مختلف می‌شود. این سیستم‌ها اصولاً مبتنی بر واکنش‌های آنزیمی جفت شده و منتج به تولید نور می‌باشند [۸۶]. استفاده از BL در کنترل داخلی نمایشگرهای فرآیندهای تخمیر پیوسته، کاربرد پیدا کرده است. ژن گزارشگر BL به پلاسمید حاوی ژن کدکننده محصول تخمیر معرفی شده است. دستگاه سنجش لومینسانس آنلاین^۱ با سیستم تخمیر اتوماتیک تلفیق شده، در نتیجه دنبال کردن دقیق تشکیل محصول تخمیر و کنترل کل فرآیند حاصل می‌شود. همچنین ژن گزارشگر لومینسانس در دست‌یابی به وضعیت باکتری مورد استفاده در فرآیند صنعتی مانند تولید مواد شیمیایی یا تجزیه مواد آلاینده^۲ آب‌های زیرزمینی کاربرد دارد [۸۷]. سنجش BL در برآورد فعالیت پروتئازی توسعه‌یافته است. پروتئین متصل به آکوآرین که دارای محل برش پروتئاز طبیعی است در سطوح چاهک‌های میکروتیتر پلیت تثبیت شده است که سوپسترای پروتئاز HIV-1 می‌باشد. برش پروتئولیتیک منجر به رهائش آکوآرین از فاز جامد شده و سیگنال BL را کاهش می‌دهد [۸۸، ۸۹، ۹۰].

۷-۵-۱ پایدارسازی آنزیم لوسیفراز

به‌منظور توسعه کارکردهای تجاری و علمی آنزیم لوسیفراز روش‌های متعددی برای پایدارسازی این آنزیم استفاده شده است. از جمله این روش‌ها استفاده از اسمولیت‌ها، تثبیت آنزیم و استفاده از

^۱ Online

^۲ Bioremediation

مهندسی پروتئین به دو روش جهش‌زایی هدف‌دار^۱ و تکامل جهت‌دار^۲ می‌باشد [۹۱]. بیشتر دست‌کاری‌های انجام‌شده روی آنزیم لوسیفرز به روش جهش‌زایی هدف‌دار می‌باشد، در این روش باید اطلاعات ساختاری کافی پروتئین موجود باشد. برای نمونه می‌توان به آنزیم لوسیفرز جهش‌یافته گونه *P.pyralis* در آمریکای شمالی اشاره کرد که در آن با استفاده از یکی از روش‌های جهش‌زایی هدف‌دار saturation mutagenesis، با تغییر G به A ($E^{354}K$) در موقعیت ۳۵۴، پایداری آنزیم افزایش یافته است. در روش تکامل جهت‌دار نیازی به داشتن اطلاعات ساختاری نمی‌باشد بلکه با اعمال شرایط آزمایشگاهی به‌نحوی که ارگانیسم تحت فشار جهت‌دار، تغییر متناسب با شرایط جدید را کسب کند، انجام می‌شود. در این پایان‌نامه از روش جهش‌زایی هدف‌دار به‌منظور تغییر در آنزیم لوسیفرز استفاده شده است، بر این اساس به اطلاعات ساختاری آنزیم لوسیفرز نیاز است. این اطلاعات از بانک داده‌های پروتئینی^۳ و مطالعات دینامیک مولکولی^۴ به‌دست‌آمده است [۹۲].

تثبیت آنزیم لوسیفرز نیز مانند سایر آنزیم‌ها بر قواعد ذکرشده در قسمت‌های قبل استوار است. تثبیت این آنزیم برای اولین بار در سال ۱۹۷۷ توسط لی^۵ و همکارانش بر روی بسترهای آلکیل آمین صورت گرفت [۹۳]. در ادامه در سال ۱۹۸۲ تثبیت این آنزیم بر روی ستون‌های کروماتوگرافی سفارز و در سال ۲۰۰۶ بر روی بسترهای بیوتین انجام شد. در جدیدترین پژوهش که در سال ۲۰۱۵ صورت گرفته، لوسیفرز بر روی غشاءهای پلیمری عامل‌دار شده با پلی وینیل الکل به‌صورت کووالانسی تثبیت شده است [۹۴]. لوسیفرز حشره شب‌تاب از مهم‌ترین آنزیم‌هایی است که در زمینه‌های مختلف به‌ویژه در سنجش مقدار ATP از طریق لومینومتری، در تشخیص آلودگی‌های میکروبی، اندازه‌گیری

^۱ Site-directed mutagenesis

^۲ Directed evolution

^۳ Protein Data Bank (PDB)

^۴ Molecular Dynamics

^۵ Lee

میزان حیات سلولی، تهیه کیت‌های تشخیص سرطان و زیست حسگرها، غربالگری داروها، بررسی روابط، برهمکنش و تاخوردگی پروتئین‌ها، توالی‌یابی DNA به روش prysequencing¹، تصویربرداری-های بیولومینسانس و در سیستم‌های گزارشگر کاربرد فراوان دارد. از این رو تثبیت این آنزیم سبب افزایش فعالیت و پایداری آن جهت استفاده در مصارف ذکرشده، می‌شود [۹۵].

¹ Prysequencing

فصل دوم

بخش تجربی (مواد و روش‌ها)

۱-۲ مواد

ATP از شرکت Roche، دی لوسیفرین از شرکت Resem BV (The Netherland)، مواد محیط کشت، IPTG، آمپی سیلین، نمک NaCl و تریس از Sigma Aldrich و ستون Ni-NTA Sepharose از شرکت Novagene خریداری شد. همچنین مواد اولیه شیمیایی برای سنتز MOF ها از شرکت های تجاری فلوکا و مرک خریداری شده و بدون خالص سازی مورد استفاده قرار گرفته اند. حلال ها نیز از شرکت مرک تهیه شدند.

۲-۲ دستگاه ها

طیف های مادون قرمز به وسیله ی دستگاه اسپکتروفتومتر شیمادزو^۱ مدل IR8400 به صورت قرص های KBr به طور مشترک در مرکز تحصیلات تکمیلی زنجان و دانشگاه تربیت مدرس تهران ثبت شدند. طیف های XRD نمونه ها با دستگاه Philips (PW1730) و لامپ مس در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه صنعتی شریف ثبت شدند. تصاویر Fe-SEM به وسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی تسکن مدل VEGA-II TESCANA و آنالیز حرارتی (TGA-DTA) به وسیله دستگاه TGA/SDTA 851 (Sweden) در آزمایشگاه بیم گستر تابان گرفته شدند. تصاویر TEM به وسیله دستگاه (Zeiss - EM10C) در دانشگاه صنعتی خواجه نصیر طوسی ثبت شدند. مساحت سطح، حجم و توزیع اندازه ذرات حفرات با دستگاه جذب و واجذب گاز نیتروژن مدل Belsorp, BEL در ۷۷ °K متعلق به مرکز تحصیلات تکمیلی زنجان انجام پذیرفت. مطالعات بیولومینسانس نمونه ها با Luminometer (Berthold) در دانشگاه تربیت مدرس تهران انجام شد.

¹ Shimadzu

۲-۳ تهیه چهارچوب فلز-آلی (Fe-MIL-88(NH₂))

این ترکیب از مخلوط کردن ۰/۵ گرم نمک کلرید آهن سه ظرفیتی ۶ آبه و ۰/۳۳ گرم آمینوترفتالیک اسید به عنوان پیش ماده در حضور ۱۵ میلی لیتر حلال DMF و ۵۰۰ میکرولیتر استیک اسید (به صورت قطره قطره) تهیه شد و سپس به مدت ۴ ساعت در دمای ۱۲۰°C در حمام روغن قرار داده شد. سوسپانسیون حاصل در دمای اتاق سرد شد و سپس ذرات آن با سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰ دور جدا شدند و در نهایت رسوب قهوه‌ای رنگ حاصل جهت خشک شدن به آون در دمای ۱۰۰°C منتقل شد [۹۶].

۲-۴ تهیه ترکیب Fe-MIL-88(NH₂)-terphthalaldehyde

این ترکیب از اختلاط ۰/۰۳ گرم ترپتالدهید و ۰/۱۶ گرم Fe-MIL-88(NH₂) در حضور ۶ میلی لیتر حلال اتانول و افزودن سدیم هیدروکسید تا رسیدن به pH برابر با ۷ تهیه شد. این مخلوط سپس تحت شرایط رفلاکس به مدت ۳ ساعت در دمای ۸۰°C قرار داده شد. در نهایت سوسپانسیون حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفوژ شد سپس رسوب حاصل با اتانول داغ شسته و در دمای محیط خشک شد.

۲-۵ تهیه چهارچوب فلز-آلی (MIL-53(Al))

این ترکیب از اختلاط ۰/۲۵ گرم نمک آلومینیوم نترات ۹ آبه و ۰/۱۲۵ گرم ترپتالیک اسید در حضور ۱۵ میلی لیتر آب دیونیزه به عنوان حلال تهیه شد. ترکیب مذکور سپس به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۲۰°C در کوره حرارتی قرار داده شد. سپس سوسپانسیون حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در ۵۰۰۰ دور سانتریفوژ شده و رسوب سفید رنگ حاصل جهت خشک شدن به آون منتقل شد [۹۷].

۲-۶ بیان پروتئین

بدین منظور، یک تک کلون که فعالیت نسبتاً بالایی داشت در ابتدا انتخاب شد و از آن کشت اولیه، در ۱۰ میلی‌لیتر محیط LB مایع همراه با ۱۰ میکرولیتر آمپی‌سیلین ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. سپس، از این کشت حدود ۱ میلی‌لیتر به ۳۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت اصلی 2XYT که حاوی ۱۶ گرم بر لیتر تریپتون، ۵ گرم بر لیتر کلرید سدیم و ۱۰ گرم بر لیتر عصاره مخمر است، منتقل شد. کشت در حضور ۳۰۰ میکرولیتر آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در دمای $^{\circ}\text{C}$ ۳۷ و سرعت ۲۲۰ rpm انجام شد. بعداً اینکه جذب باکتری‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر، به حدود ۰/۵ - ۰/۶ رسید، IPTG با غلظت ۱ میلی‌مولار و به مقدار ۱ درصد به محیط کشت اضافه و دما تا $^{\circ}\text{C}$ ۲۲ پایین آورده شد و به مدت ۱۶ ساعت محیط کشت باکتری در حالت تکانی با دور ۲۲۰ rpm در این دما باقی ماند.

۲-۷ تهیه محتوای سلولی از باکتری‌ها

به منظور تهیه محتوای سلولی از باکتری‌ها، محیط کشت القاء شده به مدت ۵ دقیقه در دور ۷۰۰۰g و دمای $^{\circ}\text{C}$ ۴ سانتریفیوژ شد. رسوب باکتری به دست آمده با افزودن ۱۰ ml بافر لیز کننده، به حالت سوسپانسیون درآمد. بافر لیز کننده حاوی ۵۰ میلی‌مولار Tris/HCl، ۳۰۰ میلی‌مولار NaCl و ۱۰ میلی‌مولار ایمیدازول و pH برابر ۷/۸ است. بعد از آن سوسپانسیون باکتری در تابش فراصوت قرار گرفت. این کار ۱۵ مرتبه به مدت ۲۰ ثانیه و به فاصله زمانی ۴۰ ثانیه انجام گرفت. به علاوه برای جلوگیری از تخریب گرمایی، تمامی مراحل فراصوت در حضور یخ انجام شد. سلول‌های لیز شده، در ۱۵۰۰۰g و در دمای $^{\circ}\text{C}$ ۴ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. میزان فعالیت و بیان سوپ رویی به ترتیب با اضافه کردن کوکتل (ATP، Luciferin، MgSO_4 در Tris/HCl با pH ۷/۸) و SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های دارای فعالیت و بیان بالا در این مرحله برای خالص‌سازی پروتئین

استفاده شدند. در مطالعات انجام شده منظور از کوکتل مجموعه (ATP, Luciferin, MgSO₄) در Tris/HCl با pH برابر با ۷/۸ می‌باشد. غلظت ترکیبات کوکتل در واکنش نهایی (به جز موارد ذکر شده) به صورت ۱ میلی‌مولار Luciferin، ۴ میلی‌مولار ATP، ۱۰ میلی‌مولار MgSO₄ و ۲۰ میلی‌مولار Tris/HCl در غلظت نهایی ۱ میلی‌لیتر می‌باشد.

۲-۸ تخلیص پروتئین

به منظور تخلیص آنزیم لوسیفراز، از روش کروماتوگرافی تمایلی^۱ و ستون نیکل سفارز^۲ استفاده شد. آنزیم لوسیفراز بیان شده دارای دنباله‌ی هیستیدینی^۳ در انتهای آمین^۴ خود می‌باشد. این دنباله هیستیدینی دارای تمایل زیادی به نیکل بوده و میانکش محکمی با آن برقرار می‌کند. بدین منظور، ابتدا ستون با بافر تعادلی^۵ حاوی ۵۰ میلی‌مولار Tris/HCl، ۳۰۰ میلی‌مولار NaCl و ۱۰ میلی‌مولار ایمیدازول در pH برابر ۷/۸ به تعادل رسید. سپس نمونه حاصله از مرحله قبل به ستون منتقل و به آرامی از روی ستون عبور داده شد و به دنبال آن حذف پروتئین‌های متصل نشده به ستون به وسیله بافر شستشو^۶ حاوی ۵۰ میلی‌مولار Tris/HCl، ۳۰۰ میلی‌مولار NaCl و ۱۰ میلی‌مولار ایمیدازول و pH برابر ۷/۸ انجام شد و در آخر برای جداسازی پروتئین‌های متصل به ستون از بافر جداکننده^۷ استفاده شد. بافر جداکننده حاوی ۳۰۰ میلی‌مولار NaCl، ۲۵۰ میلی‌مولار ایمیدازول، ۵۰ میلی‌مولار Tris/HCl و pH برابر با ۷/۸ می‌باشد. رقابت ایمیدازول موجود در این بافر با هیستیدین برای اتصال به نیکل سبب خروج پروتئین از ستون می‌شود. برای جلوگیری از تخریب گرمایی پروتئین، تخلیص در

^۱ Affinity Chromatography

^۲ Nickel-Sepharose

^۳ His₆-tag

^۴ N-Terminal

^۵ Lysis Buffer

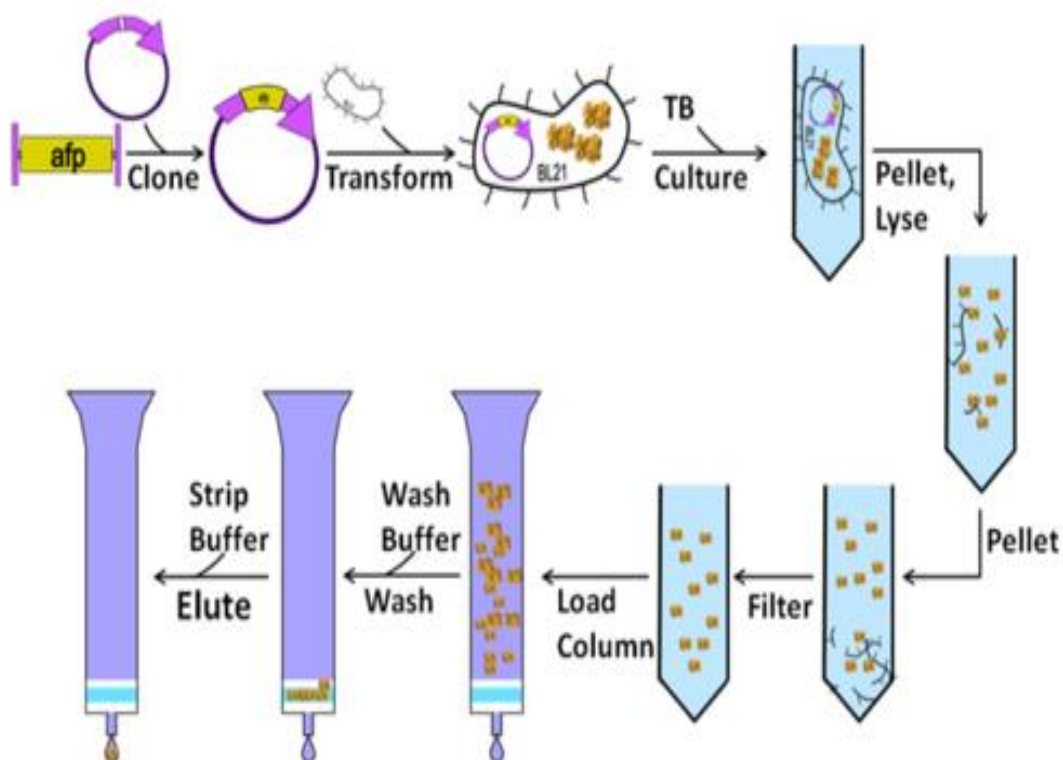
^۶ Washing Buffer

^۷ Elution Buffer

یخ و با استفاده از بافرهای سرد انجام گرفت. در نهایت پروتئین تخلیص شده در حضور گلیسرول ۱۰ درصد جمع‌آوری و در فریزر -20°C نگهداری شد.

۹-۲ الکتروفورز SDS-PAGE

آنزیم لوسیفراز به دلیل توانایی تولید نور، این قابلیت را دارد که به صورت مستقیم حضور آن سنجش شود که این کار با دستگاه لومینومتر (که میزان نور تولیدشده در حضور سوبسترا را اندازه می‌گیرد) انجام می‌شود. برای حصول اطمینان و ارائه مدرک جهت تأیید حضور و خلوص نمونه‌ها از تکنیک الکتروفورز استفاده شد. در تمام آزمایش‌ها از الکتروفورز SDS-PAGE حیاتی استفاده شد. ژل بالا با غلظت ۵٪ و ژل پائین با غلظت ۱۲/۵٪ مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱-۲).



شکل (۱-۲): نمای شماتیک بیان و تخلیص پروتئین

۲-۱۰ سنجش غلظت پروتئین‌ها

برای سنجش غلظت پروتئین‌ها از روش برادفورد استفاده شد. بدین منظور ابتدا معرف واکنش برادفورد به صورت زیر تهیه شد. ۱۰۰ میلی گرم کوماسی بلو G-250 در اتانول ۹۶ درصد حل و با ۱۰۰ میلی لیتر اسید فسفریک ۸۵ درصد مخلوط و با آب مقطر به حجم یک لیتر رسید. محلول حاصل به وسیله کاغذ صافی، صاف شد. به منظور ساخت محلول استاندارد از پروتئین BSA با غلظت ۱ میلی-گرم بر میلی لیتر استفاده شد. برای رسم منحنی استاندارد مقادیر ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میکرولیتر از پروتئین استاندارد در میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری ریخته و با بافر تریس به حجم ۵۰ میکرولیتر رسانده شد. سپس ۱ میلی لیتر از محلول واکنش گر بردفورد به هر میکروتیوب اضافه و بعد از پیتاژ به میزان مساوی برای هر میکروتیوب، به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه شد. به طور مشابه ۵۰ میکرولیتر از نمونه‌های پروتئینی مجهول به ۱ میلی لیتر از محلول بردفورد افزوده شد و با اندازه گیری جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر نمودار استاندارد رسم و غلظت پروتئین‌های مجهول به دست آمد. در مواردی که نمونه‌های مجهول غلیظ بودند به نسبت مناسب رقیق شده و دوباره به روش فوق تعیین غلظت شدند و پس از تعیین غلظت اولیه، به منظور محاسبه غلظت نهایی و دقیق آن‌ها، در ضریب رقتشان ضرب شدند.

۲-۱۱ تثبیت آنزیم لوسیفراز بر روی Fe-MIL-88(NH₂) و Fe-MIL-88(NH₂)

therphtalaldehyde و MIL-53(Al)

بدین منظور آنزیم لوسیفراز تخلیص شده به غلظت ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر در حضور بافر ۵۰ میلی مولار تریس با pH برابر با ۷/۸ به محلول شامل ۱ میلی گرم Fe-MIL-88(NH₂) و Fe-MIL-88(NH₂) معلق شده در ۲ میلی لیتر بافر تریس ۵۰ میلی مولار therphtalaldehyde و MIL-53(Al) معلق شده در ۲ میلی لیتر بافر تریس ۵۰ میلی مولار با pH برابر با ۷/۸ اضافه شد. سوسپانسیون حاصل در دمای ۴ °C به مدت ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه

انکوبه شد سپس به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شد و به منظور آزمایش‌های بعدی در دمای 4°C در یخچال نگهداری شد.

۱۲-۲ مطالعه ثابت‌های پایداری ترمودینامیکی و سینتیکی آنزیم لوسیفراز خالص و تثبیت‌شده

۱-۱۲-۲ اندازه‌گیری غیرفعال شدن حرارتی آنزیم خالص و تثبیت‌شده

به‌منظور بررسی غیرفعال شدن حرارتی، هر دو آنزیم خالص و تثبیت‌شده با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در دامنه دمایی 15°C تا 40°C ، به فاصله ۵ درجه و به مدت ۵ دقیقه در هر دما انکوبه گردید. سپس فعالیت باقیمانده پس از ۲ دقیقه انکوباسیون بر روی یخ (دمای صفر درجه) و اضافه کردن ۲/۵ میکرولیتر از آنزیم خالص و تثبیت‌شده به ۲۲/۵ میکرولیتر ۵۰ میلی‌مولار Tris/HCl و ۲۵ میکرولیتر کوکتل در دمای 25°C اندازه‌گیری شد.

۲-۱۲-۲ بررسی pH بهینه فعالیت آنزیم خالص و تثبیت‌شده

در تعیین pH بهینه آنزیم لوسیفراز ابتدا یک بافر Mix در محدوده pH بین ۴ تا ۱۲ با فاصله ۱ درجه تهیه شد. این بافر شامل گلیسین ۱۰۰ میلی‌مولار، سوکسینیک اسید ۱۰۰ میلی‌مولار و Tris/HCl ۵۰ میلی‌مولار بود. با اضافه کردن ۵ میکرولیتر کوکتل به ۹۰ میکرولیتر بافر مخلوط و سپس اضافه کردن ۵ میکرولیتر از آنزیم‌ها با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به این مجموعه، میزان فعالیت آنزیم با دستگاه لومینومتر در هر pH به دست آمد.

۲-۱۲-۳ اندازه‌گیری پایداری دمایی آنزیم لوسیفراز خالص و تثبیت شده

پایداری دمایی با انکوباسیون ۵ دقیقه‌ای هر دو آنزیم خالص و تثبیت شده با غلظت ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر در دماهای ثابت 25°C ، 30°C و 35°C در دامنه زمانی ۰-۲۰ دقیقه به فاصله ۵ دقیقه انجام شد. بعد از انکوباسیون هر آنزیم به مدت ۲ دقیقه بر روی یخ، با اضافه کردن ۲/۵ میکرولیتر از آنزیم به ۲۲/۵ میکرولیتر ۵۰ میلی مولار Tris/HCl و ۲۵ میکرولیتر کوکتل در دمای 25°C ، فعالیت باقی مانده اندازه‌گیری شد. فعالیت باقیمانده آنزیم به صورت درصد فعالیت اولیه گزارش گردید.

۴-۱۲-۲ تعیین و مقایسه مقادیر V_{\max} و K_m نسبت به ATP و لوسیفراز در آنزیم خالص و تثبیت شده

برای تعیین مقادیر V_{\max} و K_m ، واکنش آنزیمی با اضافه کردن ۵ میکرولیتر لوسیفراز به داخل ۹۵ میکرولیتر بافر سنجش در حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر انجام گرفت. مقادیر V_{\max} و K_m آنزیم‌های لوسیفراز نسبت به ATP در حضور بافر سنجش با غلظت نهایی در واکنش شامل ۱۰ میلی مولار MgSO_4 ، ۰/۵ میلی مولار لوسیفراز، ۲۰ میلی مولار Tris/HCl در pH ۷/۸ و در غلظت‌های مختلف ۰/۰۰۳۹، ۰/۰۰۰۷، ۰/۰۱۵، ۰/۰۰۳، ۰/۰۰۶، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی مولار ATP اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری مقادیر V_{\max} و K_m آنزیم نسبت به لوسیفراز در حضور بافر سنجش با غلظت نهایی در واکنش شامل ۱۰ میلی مولار MgSO_4 ، ۲ میلی مولار ATP، ۲۰ میلی مولار Tris/HCl در pH ۷/۸ و در غلظت‌های مختلف ۰/۰۰۱۹۵، ۰/۰۰۰۳۹، ۰/۰۰۰۷، ۰/۰۱۵، ۰/۰۰۳، ۰/۰۰۶، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی مولار لوسیفراز به دست آمد. حداکثر نور نشر شده به‌عنوان سرعت اولیه اندازه‌گیری و برحسب واحد نسبی نور (RLU) بیان شد. نمودارهای میکائیلیس-منتن و لاین ویوربرگ ترسیم و مقادیر K_m و V_{\max} برای ATP و لوسیفراز محاسبه شد. قابل ذکر است که مقادیر K_m برای هر یک از آنزیم

خالص و تثبیت شده نسبت به لوسیفیرین و ATP سه بار تکرار شد. سپس میانگین و انحراف معیار هر یک محاسبه شد.

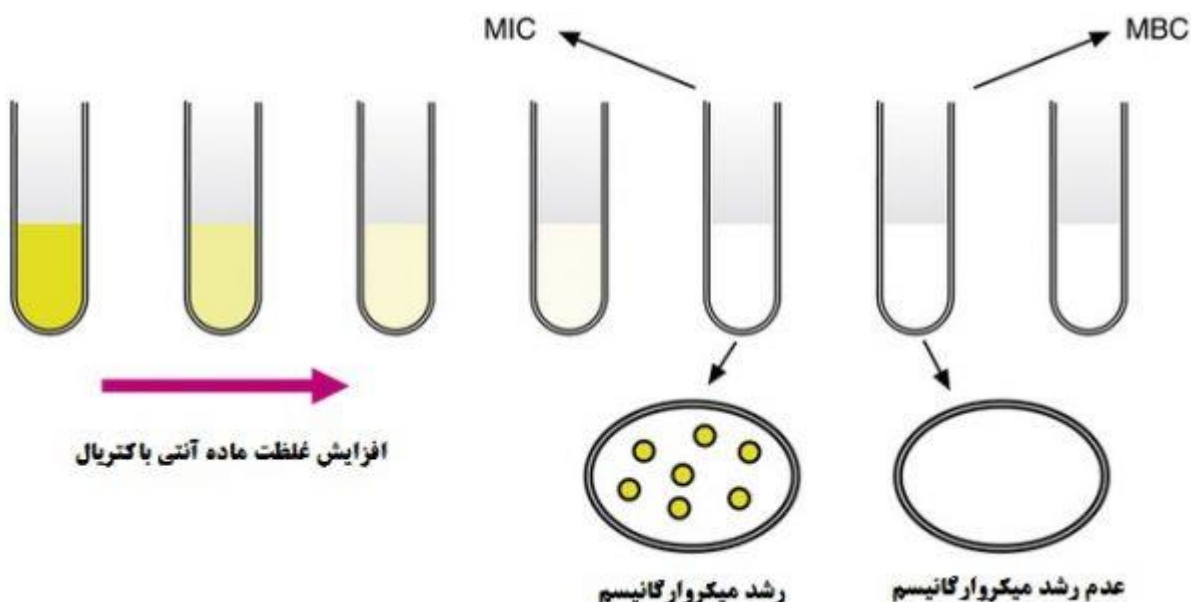
۱۳-۲ بررسی خواص آنتی باکتریال Fe-MIL-88(NH₂) و MIL-53(Al)

۱-۱۳-۲ تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

معمولاً اولین تستی که جهت تعیین خصوصیات یک میکروارگانیسم انجام می‌گیرد تست تعیین MIC است. از این روش برای تعیین حداقل غلظت بازدارنده از ماده آلاینده که می‌تواند از رشد باکتری در محیط کشت جلوگیری کند، استفاده می‌شود. برای تعیین این پارامتر می‌توان از دو روش تحت عناوین agar dilution method و broth dilution method استفاده کرد که در این تحقیق از روش دوم استفاده شده است. به‌طور کلی در این روش ابتدا سوبیه‌ی موردنظر در محیط فاقد عامل مهارکننده‌ی رشد کشت داده می‌شوند و از این باکتری‌ها به‌عنوان پیش‌کشت برای کشت در محیط‌هایی که با استفاده از روش رقیق‌سازی دارای غلظت‌های مشخص از عامل مهارکننده‌ی رشد هستند، استفاده می‌شود. برای اطمینان از اینکه مقدار مشخصی باکتری در این محیط‌ها القا شده است از استاندارد مک‌فارلند استفاده گردید.

در این تحقیق ابتدا محلول نیم مک‌فارلند تهیه گردید به این ترتیب که محلول شماره‌ی ۱ یعنی ۱/۱۷۵ درصد از باریوم کلراید دوآبه (BaCl₂.2H₂O) و محلول شماره‌ی ۲ یعنی ۱ درصد اسیدسولفوریک (H₂SO₄) تهیه شد سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول شماره‌ی ۱ به ۹۹/۵ میلی‌لیتر از محلول شماره‌ی ۲ اضافه شد. محلول حاصل محلول نیم مک‌فارلند است و از مقایسه‌ی کدورت نمونه‌ی پیش‌کشت با این محلول می‌توان برای تخمین تعداد سلول‌های باکتری در حین القا استفاده کرد.

پس از تهیهی محیط‌های موردنیاز در لوله‌های آزمایش و ایجاد غلظت‌های مختلف با استفاده از روش رقیق‌سازی، با اضافه کردن محیط کشت فاقد باکتری به پیش‌کشت، کدورت پیش‌کشت به کدورت محلول نیم مک‌فارلند رسانده شد. سپس از این محیط به مقدار ۵۰۰ میکرولیتر به محیط‌های کشت اضافه شد. البته یک لولهی فاقد کروم هم به‌عنوان کنترل، کشت داده شد. سپس این لوله‌ها در انکوباتور در دمای 37°C و هوادهی ۱۸۰ rpm به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. پس از گذشت این زمان، رشد قابل‌رؤیت باکتری‌ها در هر کدام از این لوله به‌عنوان معیاری از حداقل غلظت متوقف‌کننده-ی رشد در نظر گرفته می‌شود. برای اطمینان از قابلیت رشد باکتری‌ها در این محیط‌ها، مقداری از این محیط‌های کشت در پلیت‌های فاقد کروم به‌صورت ۴ مرحله‌ای کشت داده شدند. تشکیل تک کلونی بر سطح پلیت زنده‌بودن باکتری‌ها را تأیید می‌کند. در برخی موارد نیز می‌توان با سانتیفریژ محیط حاوی عامل مهارکننده رشد باکتری در محیط را تشخیص داد (شکل ۲-۲) [۹۸].



شکل (۲-۲): نمایی از تعیین MIC و MBC

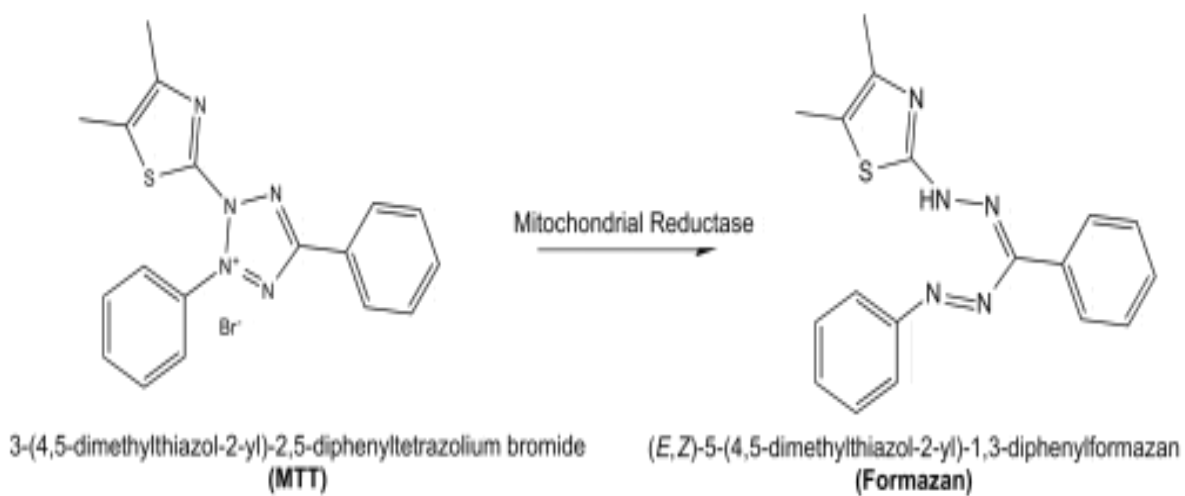
۲-۱۳-۲ بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی $\text{Fe-MIL-88}(\text{NH}_2)$ و $\text{MIL-53}(\text{Al})$

برای تعیین خاصیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات مذکور، ابتدا ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول متانولی نمونه موردنظر در یک لوله آزمایش ریخته شد. سپس به آن ۱ میلی‌لیتر محلول متانولی DPPH اضافه شد. محتویات هر لوله با ورتکس کاملاً مخلوط شد و پس از گذشت ۳۰ دقیقه، در دمای اتاق و در تاریکی، جذب آن‌ها در طول موج ۵۱۸ nm با استفاده از اسپکتروفوتومتر UV/Vis در برابر شاهد حاوی متانول خوانده شد. در این روش از ویتامین C به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. با توجه به مکانیسم ذکرشده هرچه قدرت آنتی‌اکسیدان نمونه بیشتر باشد رنگ محلول حاصل زردتر است. درصد مهار رادیکال با استفاده از معادله $I(\%) = 100 \times (A_0 - A_s) / A_0$ محاسبه گردید که A_0 جذب کنترل حاوی همه اجزا واکنشر بدون نمونه و A_s جذب نمونه بود. سپس نتایج به‌صورت IC_{50} (مقداری از آنتی‌اکسیدان که لازم است تا غلظت DPPH به ۵۰ درصد مقدار اولیه برسد) بیان گردید [۹۹].

۲-۱۳-۳ اندازه‌گیری میزان سیتوتوکسیسیتی ترکیبات Fe-MIL-88(NH₂) و MIL-53(Al) با رنگ‌سنجی MTT

این آزمون بر اساس استاندارد ISO10993-5 و به روش آزمون سمیت سلولی MTT انجام می‌پذیرد. در آزمون MTT ابتدا تعداد مناسبی سلول (ترجیحاً ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک) در هر یک از چاهک‌ها کشت داده‌شده و اجازه داده شد تا سلول‌ها به کف پلیت چسبیده و به حالت پایدار خود درآیند. سپس چاهک‌های کنترل و آزمایش انتخاب‌شده و مقدار مناسبی از ماده مورد آزمون به چاهک‌های تست اضافه شد و پلیت تا زمان موردنیاز جهت تأثیر ماده موردنظر، انکوبه شد. پس از اتمام زمان انکوباسیون محیط کشت روئی دور ریخته شد و به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی نیم میلی‌گرم در میلی‌لیتر محلول MTT اضافه‌شده و به مدت ۰ تا ۴ ساعت در انکوباتور CO₂ در ۷۳ °C قرار داده شد. در طی زمان انکوباسیون، MTT با سیستم سوکسینات دهیدروژناز که یکی از آنزیم‌های چرخه تنفسی میتوکندری‌هاست احیا می‌شود. احیا و شکسته شدن این حلقه موجب

تولید کریستال‌های آبی‌رنگ فورمازان می‌شود که در زیر میکروسکوپ به راحتی قابل تشخیص هستند. میزان رنگ تولیدشده با تعداد سلول‌هایی که از نظر متابولیک فعال هستند رابطه مستقیم دارد. کریستال‌های فورمازان در آب غیرمحلول بوده و بایستی قبل از رنگ سنجی در حلالی نظیر DMSO به حالت محلول درآیند. در نهایت جذب نوری محلول به دست آمده در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد و به کمک منحنی استاندارد تعداد سلول‌ها محاسبه شدند (شکل ۲-۳) [۱۰۰].



شکل (۲-۳): نمایی از تست MTT

فصل سوم

بحث و نتیجه گیری

مطالعات این فصل شامل سه بخش می‌باشد که به تفصیل در ادامه آمده است.

بخش اول شامل روش‌های شناسایی ترکیب Fe-MIL-88(NH₂) و Fe-MIL-88(NH₂)-therephthaldehyde، روش تخلیص آنزیم لوسیفراز و سنجش غلظت آن و بررسی و مقایسه پارامترهای پایداری و سینتیکی آنزیم پس از تثبیت می‌باشد.

بخش دوم شامل روش‌های شناسایی ترکیب MIL-53(Al) و بررسی و مقایسه پارامترهای پایداری و سینتیکی آنزیم پس از تثبیت بوده و در نهایت نتیجه‌گیری میان دو روش تثبیت آنزیم انجام گرفته است.

بخش سوم شامل تست‌های آنتی باکتریال، آنتی اکسیدان و ضد سمیت ترکیبات Fe-MIL-88(NH₂) و MIL-53(Al) می‌باشد.

بخش اول

۱-۳ شناسایی و بررسی ساختارهای Fe-MIL-88(NH₂) و Fe-MIL-88(NH₂)-therephthaldehyde

ترکیب Fe-MIL-88(NH₂) به روش متداول حمام حرارتی سنتز شد. بازدهی بالای تولید این ترکیب در طی این روش، کم‌هزینه بودن و صرف مدت‌زمان کمتر نسبت به سایر روش‌ها یکی از دلایل استفاده از این روش در اکثر پژوهش‌های مربوط به این ترکیب می‌باشد.

هرچند سازوکار واکنش‌های شیف باز و تشکیل ایمین بسیار ساده به نظر می‌رسد اما با توجه به ممانعت فضایی بالای چهارچوب‌های فلز-آلی، فرایند متصل شده به لینکرهای آروماتیک از سوی آن‌ها با مشکلات خاصی روبروست. ترفالتدهید به دلیل ساختار آروماتیک و داشتن ممانعت فضایی بیشتر نسبت به لینکرهای خطی مشابه همچون گلوآلدهید به راحتی به چهارچوب‌های فلز-آلی همچون

Fe-MIL-88(NH₂) متصل نمی‌شود. از این رو سازوکار تشکیل شیف باز در این واکنش با واکنش‌هایی از این دست کمی متفاوت است [۱۰۱].

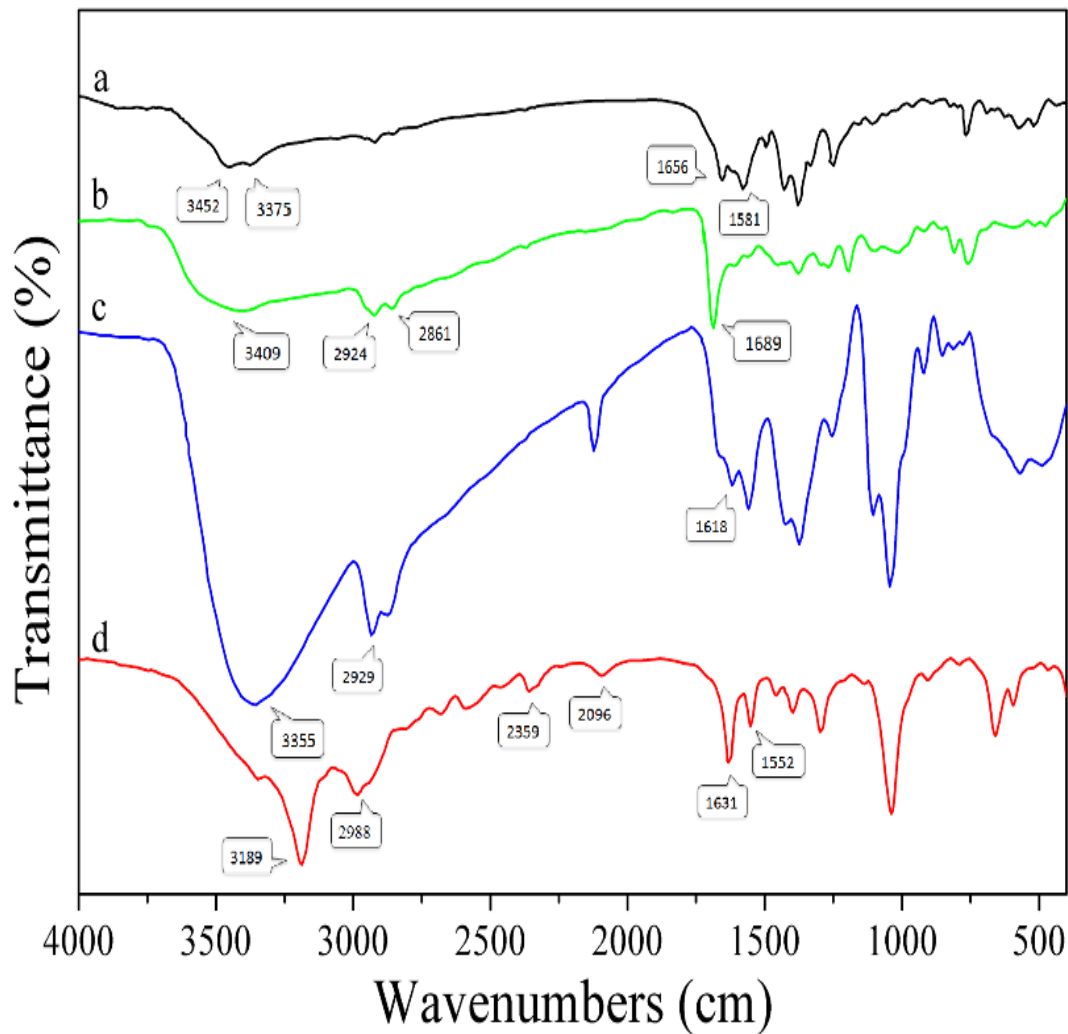
در طی آزمایش‌های پی‌درپی، سرانجام از روش رفلکس در حمام روغن برای سنتز Fe-MIL-88(NH₂)-therephtaldehyde استفاده شد و اتانول داغ به‌عنوان آغازگر واکنش و فعال کردن حلقه‌های آروماتیک ترفتالدهید انتخاب شد. در نهایت با تغییرات درجه به درجه دما محصول موردنظر به دست آمد. از آنجاکه اکثر واکنش‌های تشکیل شیف باز در pH‌های بازی به‌خوبی پیش می‌روند از سود خالص به‌عنوان کاتالیزور واکنش و همچنین تنظیم‌کننده pH واکنش استفاده شد. از آنجاکه نسبت آمین به آلدهید در این واکنش‌ها باید به‌گونه‌ای باشد که هیچ آلدهید اضافی در محیط واکنش باقی نماند، نسبت آمین به آلدهید بصورت وزنی ۱ به ۳ انتخاب شد.

در ابتدا برای شناسایی و تعیین خلوص ترکیبات Fe-MIL-88(NH₂)- و Fe-MIL-88(NH₂)-therephtaldehyde از تکنیک متداول FT-IR استفاده شد.

پیک‌های مربوط به گروه‌های کربوکسیل و آمین در محدوده 1656 cm^{-1} ، 1581 cm^{-1} و 3375 cm^{-1} و 3452 cm^{-1} در شکل (۱a-۳) خلوص و صحت سنتز ترکیب Fe-MIL-88(NH₂)- را به‌درستی بیان می‌کند. پیک آلدهید موجود در 1689 cm^{-1} در طیف ترکیب Fe-MIL-88(NH₂)-therephtaldehyde در شکل (۱b-۳) سپس حذف و تبدیل آن به پیک ایمین در 1618 cm^{-1} در شکل (۱c-۳) صحت اتصال کووالانسی لوسیفراز طریق گروه‌های آمین به بستر را به‌خوبی تأیید می‌کند. شکل (۱d-۳) نیز به‌خوبی اتصال جذب سطحی لوسیفراز به ترکیب Fe-MIL-88(NH₂)- را نشان می‌دهد.

در توضیح طیف‌های FT-IR، ذکر این نکته ضروری است که در اتصال کووالانسی بیومولکول‌ها و پروتئین‌ها به انواع چهارچوب‌های فلز-آلی به‌طورقطع باید گروه یا گروه‌های فعال اتصالی از جمله آمین، کربوکسیل، تیول و غیره حضور داشته باشند [۱۰۲]. ردیابی اتصال کووالانسی بیومولکول به بستر از

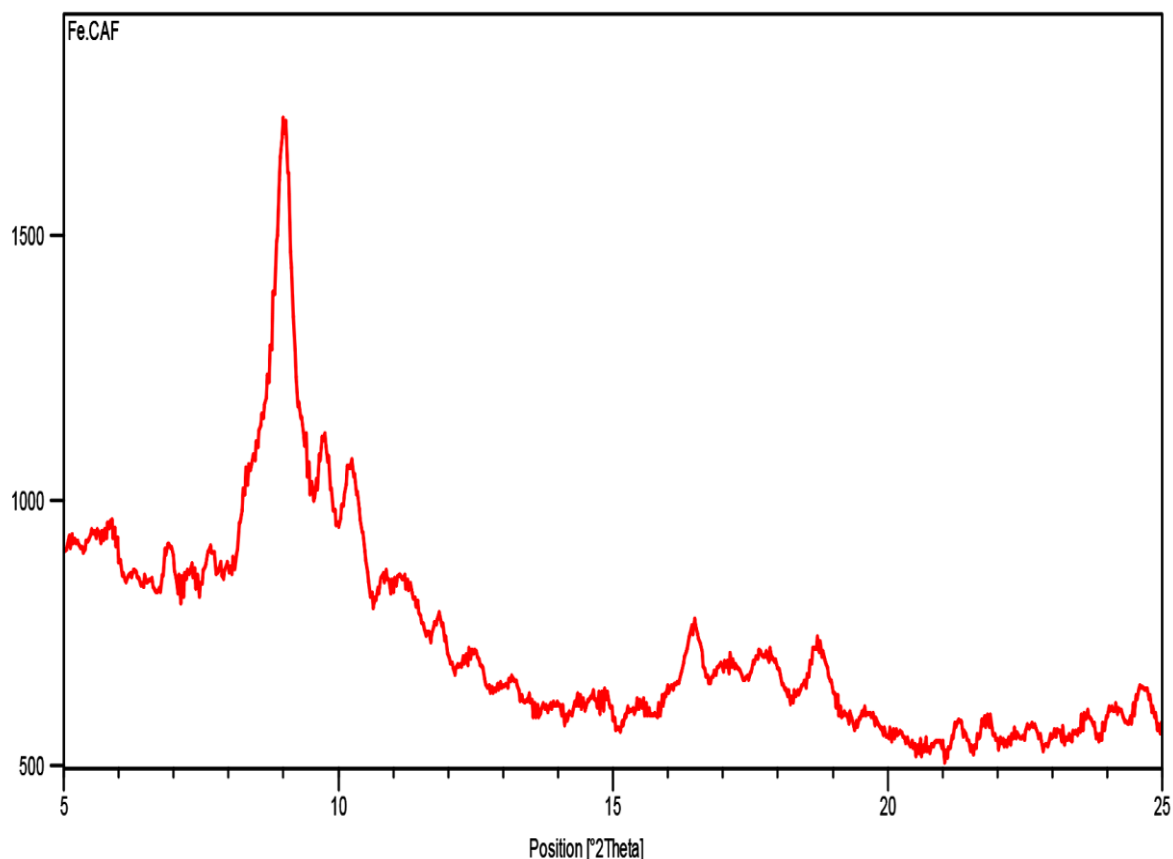
طریق این گروه‌ها به خوبی از طریق طیف مادون قرمز امکان پذیر و قابل اثبات است؛ اما در مورد اتصال - های جذب سطحی موضوع کمی متفاوت است. از آنجاکه در این نوع اتصالات باند یا پیوند به معنای حقیقی آن وجود ندارد در نتیجه هرگونه تغییرات یا جابجایی در پیک‌ها می‌تواند دلیلی بر اتصال بیومولکول به بستر باشد. در حقیقت اندرکنش‌های میان گروه‌های بستر و بیومولکول است که سبب تغییرات و جابجایی پیک‌ها در طیف مادون قرمز می‌شوند [۱۰۳]. لذا در اتصال جذب سطحی نوع گروه‌های عاملی موجود در طیف مادون قرمز یکسان و فقط شدت و مکان آن‌ها متفاوت است. این موضوع در مقایسه طیف‌های مربوط به تثبیت لوسیفرز بر روی Fe-MIL-88(NH₂)- therephtaldehyde و Fe-MIL-88(NH₂) کاملاً مشخص است. در مورد اتصال لوسیفرز بر روی Fe-MIL-88(NH₂) اما به طور قطع نمی‌توان نظر داد چرا که پیک‌های موجود در ۱۶۳۱ cm⁻¹ و ۱۵۵۲ cm⁻¹ می‌توانند مربوط به گروه‌های آمید تشکیل شده در طی فرایند تثبیت باشند؛ بنابراین می‌توان گفت اتصال لوسیفرز به Fe-MIL-88(NH₂) هم از طریق کووالانسی و هم از طریق جذب سطحی پیش رفته است اما با توجه به اصل عدم حضور گروه‌های فعال اتصالی در Fe-MIL-88(NH₂) و اینکه طیف‌سنجی FT-IR یک روش کیفی و نه کمی برای تشخیص و شناسایی ترکیبات می‌باشد، احتمالاً در تثبیت لوسیفرز بر روی Fe-MIL-88(NH₂) سهم اتصال جذب سطحی بیشتر است [۱۰۴].



شکل (۱-۳): طیف FT-IR مربوط به (a) Fe-MIL-88(NH₂)، (b) Fe-MIL-88(NH₂)-terephthalaldehyde و (c) لوسیفران تثبیت شده بر روی Fe-MIL-88(NH₂) و (d) لوسیفران تثبیت شده بر روی Fe-MIL-88(NH₂)

جهت تأیید میزان کریستالی شدن Fe-MIL-88(NH₂) از روش پراش پرتو X استفاده شد. شکل (۲-۳) نشان می‌دهد این بستر بر طبق داده‌های موجود در طی فرایند سنتز خود، کریستالینیته موردنظر را به دست آورده است [۱۰۵]. مقایسه این طیف با طیف گزارش شده در مرجع ۱۰۵ نیز این مورد را تأیید می‌کند.

Counts



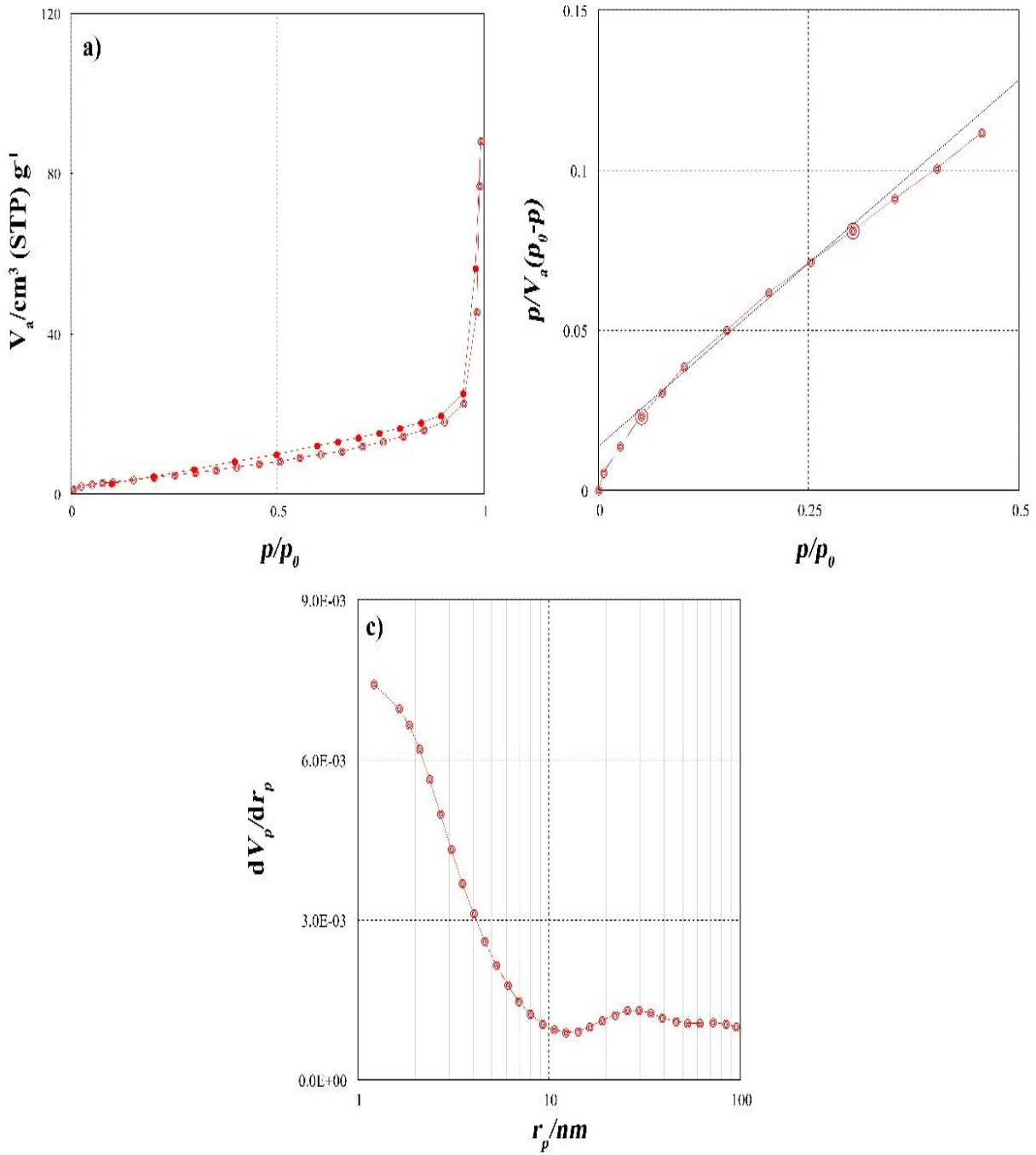
شکل (۳-۲): الگوی پراش پرتو X مربوط به Fe-MIL-88(NH₂)

نتایج مربوط به ایزوترم‌های جذب و واجذب نیتروژن در شکل (۳-۳) نشان می‌دهند:

اولاً ایزوترم‌های ترکیب Fe-MIL-88(NH₂) از نوع اول و دوم می‌باشند و ثانیاً کاهش مساحت سطح در این ترکیب ناشی از حضور گروه‌های آمین و به دنبال آن ایجاد تغییر در کنفورماسیون سایر گروه‌های عاملی این ترکیب می‌باشد. آمینوترفتالیک اسیدهای موجود در این ترکیب ممانعت فضایی قابل توجهی در کل شبکه ایجاد کرده که این امر بر روی تخلخل نمونه موثر است. همچنین شرایط آماده سازی نمونه و خلوص گاز نیتروژن مورد استفاده در روند آنالیز ترکیب، بر روی تغییرات این پارامتر تاثیرگذار است [۱۰۶].

در ادامه، به منظور ارزیابی حجم واقعی حفرات MOF قبل و بعد از تثبیت آنزیم، مدل BJH به کار رفت. در نمونه Fe-MIL-88(NH₂) متوسط قطر حفرات نانو ذره بر طبق داده‌های به دست آمده از

نمودار BJH ، حدود ۳/۲۸ نانومتر است که بر اساس طبقه بندی مواد متخلخل در طبقه ترکیبات مزوپور قرار می گیرد. مقدار مساحت سطح در این ترکیب برابر ۱۷/۹۲ متر مربع بر گرم و حجم کل نیز برابر ۰/۱۲۸ سانتی متر مکعب بر گرم می باشد.

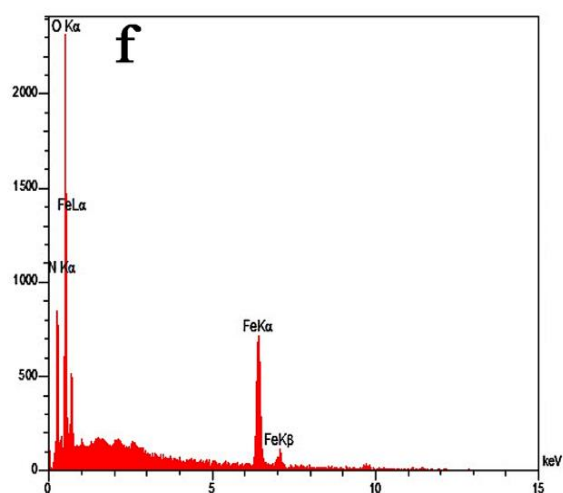
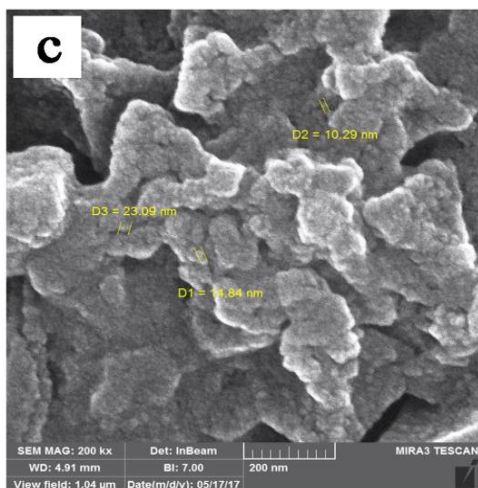
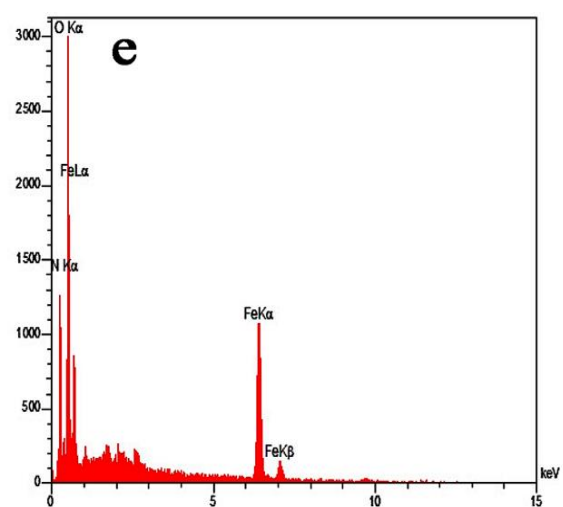
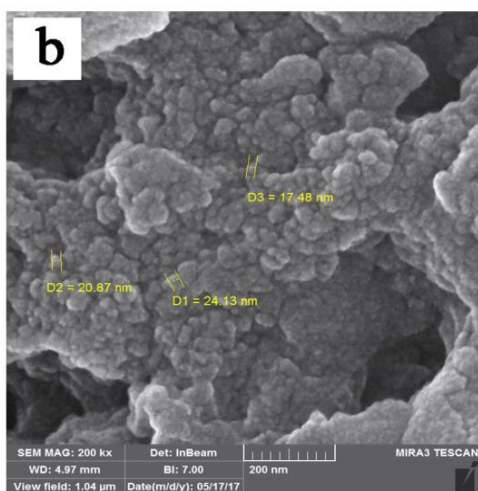
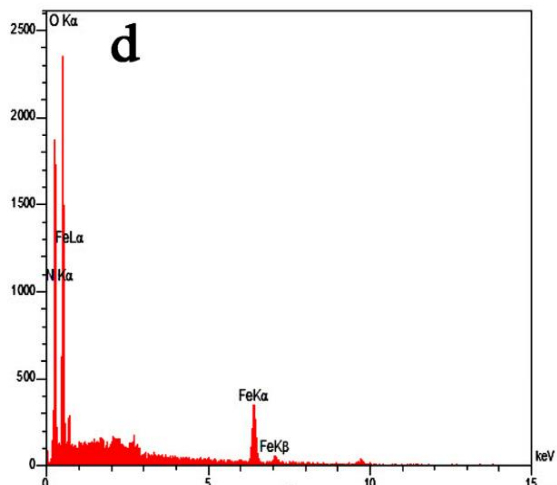
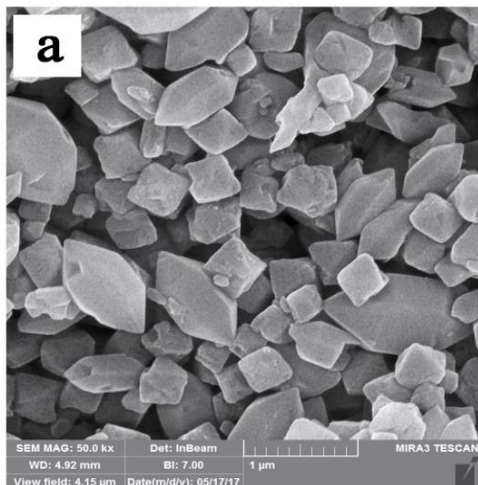


شکل (۳-۳): (a) ایزوترم جذب و واجذب نیتروژن، (b) نمودار BET و (c) نمودار BJH ترکیب Fe-MIL-88(NH₂)

شکل (۳-۴) ساختار منظم هگزاگونالی ترکیب Fe-MIL-88(NH₂) را که پیشتر در گزارش‌ها و مقالات مربوط به این ترکیب به ثبت رسیده را به‌وضوح نشان می‌دهد. اگرچه در ظاهر ممکن است تفاوتی میان شکل (۳-۴b) و (۳-۴c) وجود نداشته باشد اما هر دو آن‌ها به‌خوبی فرایند تثبیت آنزیم لوسیفراز را نشان می‌دهند. البته صرفاً با تکیه بر نتایج تصویری ثبت‌شده با هر دو میکروسکوپ الکترونی SEM و TEM نمی‌توان به‌طور قطع بر کووالانسی بودن اتصال آنزیم بر روی بستر نظر داد اما مقایسه درصد عناصر موجود در ترکیبات در طیف‌های EDAX، می‌تواند دلیلی بر این ادعا باشد (جدول ۳-۱) [۱۰۷]. افزایش درصد عنصر گوگرد که یکی از عناصر اصلی تشکیل‌دهنده آنزیم لوسیفراز است اتصال این آنزیم به بسترها را به‌خوبی اثبات می‌کند. حتی در مورد اتصال لوسیفراز به Fe-MIL-88(NH₂) نیز که تا حدود زیادی یک تثبیت جذب سطحی در نظر گرفته شد اندرکنش‌های گروه‌های تیول لوسیفراز و Fe-MIL-88(NH₂) دیده می‌شود.

جدول (۳-۱): آنالیز عنصری EDAX ترکیبات Fe-MIL-88NH₂، لوسیفراز تثبیت‌شده بر روی Fe-MIL-88NH₂ و 88(NH₂)-therephtaldehyde لوسیفراز تثبیت‌شده بر روی Fe-MIL-88NH₂

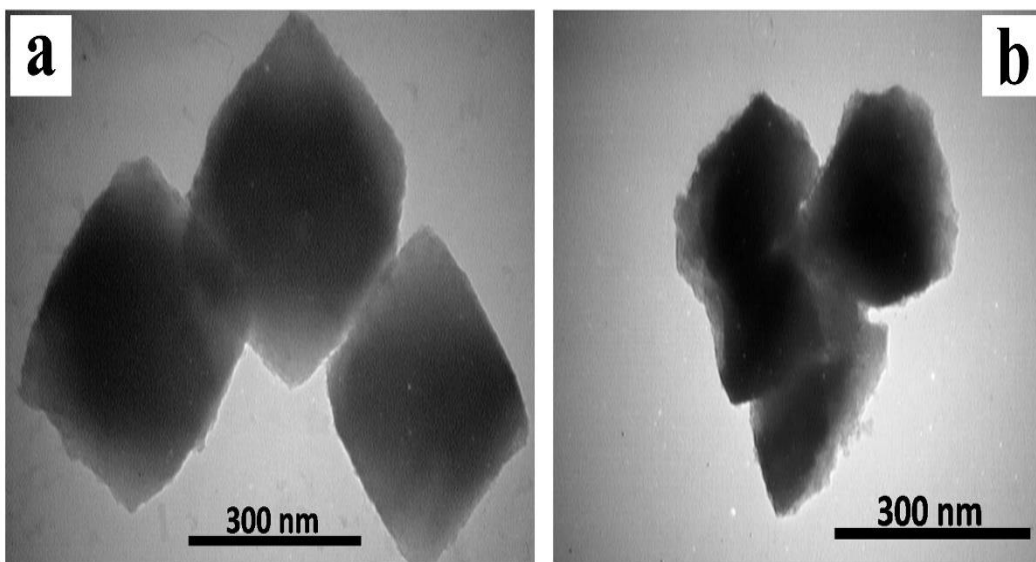
Elt	W%		
	Fe-MIL-88NH ₂	MIL-Luc (A)	MIL-Luc (B)
C	24	20.2	17.1
N	11	5.5	3.5
O	45	45	45.3
S	0	15	22



شکل (۳-۴): تصاویر FE-SEM و نمودارهای EDAX مربوط به (a) و (d)، (b) و (e) و (c) و (f) لوسیفراز تثبیت شده بر روی Fe-MIL-88(NH₂)-threptaldehyde.

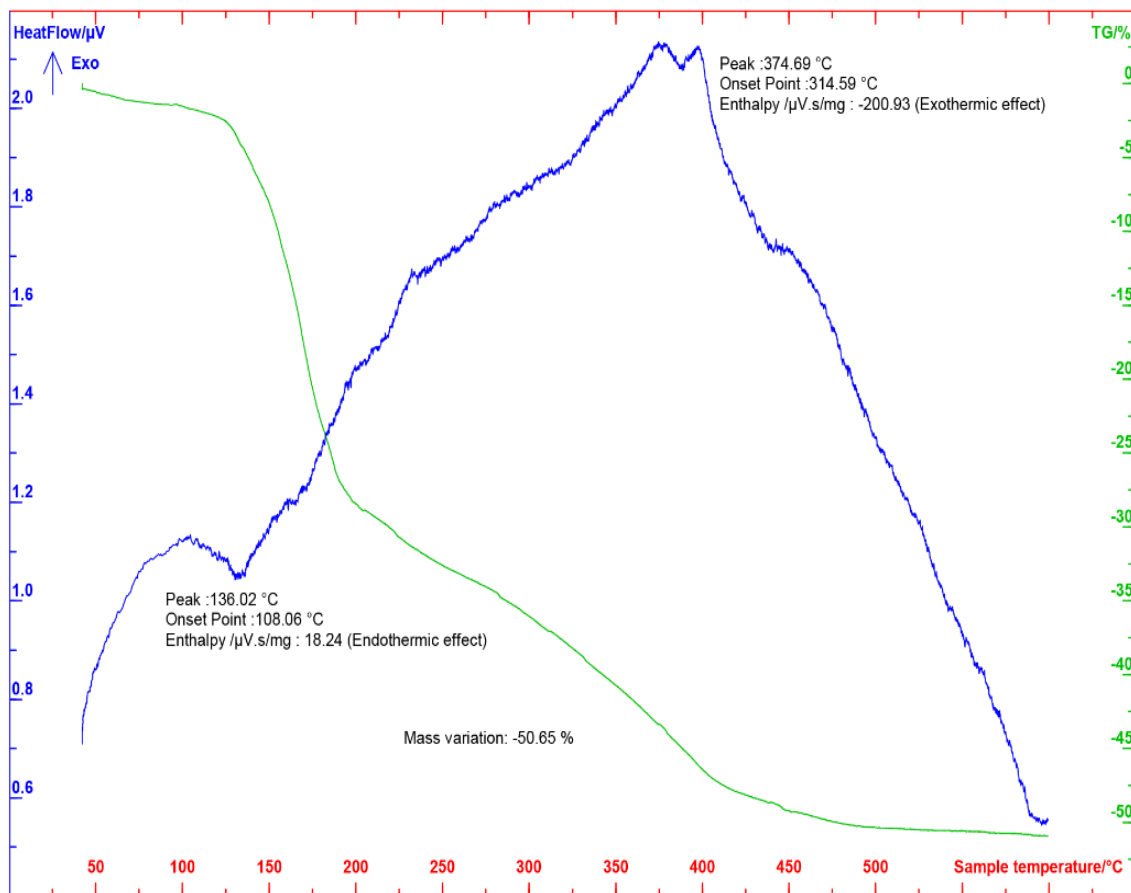
شکل (۵-۳) نیز تصویر TEM مربوط به ترکیب $\text{Fe-MIL-88(NH}_2\text{)}$ و $\text{Fe-MIL-88(NH}_2\text{)}$ متصل شده به ترفتالدهید را نشان می‌دهد. استیک اسید در روند سنتز $\text{Fe-MIL-88(NH}_2\text{)}$ بر روی اندازه ذرات بسیار مؤثر است به طوری که افزایش آن همراه با تغییرات غلظت DMF سبب کاهش اندازه و یکدست شدن شکل ذرات و کاهش آن سبب افزایش اندازه ذرات و پراکندگی نامنظم آنها می‌شود [۱۰۸].

شکل (۵b-۳) نیز مربوط به اتصال کووالانسی آنزیم لوسیفراز بر روی $\text{Fe-MIL-88(NH}_2\text{)}$ می‌باشد. در مورد تثبیت لوسیفراز بر روی بستر $\text{Fe-MIL-88(NH}_2\text{)}$ در واقع تفاوت اندازه زیاد میان حامل و حمل‌شونده سبب بروز خطا در انجام این آزمایش می‌شود و تصویر مشخصی از آنزیم تثبیت شده بر روی بستر نشان نمی‌دهد. لذا از انجام این آزمایش در مورد اتصال جذب سطحی لوسیفراز به $\text{Fe-MIL-88(NH}_2\text{)}$ صرف نظر شد. در مورد بستر متصل شده با ترفتالدهید نیز این تکنیک فقط تا حدی تغییر شکل بستر بر اثر تثبیت آنزیم را نشان می‌دهد.



شکل (۵-۳): تصاویر TEM مربوط به (a) $\text{Fe-MIL-88(NH}_2\text{)}$ و لوسیفراز تثبیت شده بر روی $\text{Fe-MIL-88(NH}_2\text{)}$ (b)

شکل‌های (۳-۶) نمودار آنالیز TGA-DTA مربوط به Fe-MIL-88(NH₂) را نشان می‌دهند. در دمای ۱۱۰°C یک پیک گرماگیر مشاهده می‌شود که ممکن است مربوط به بخار آب جذب‌شده بوسیله Fe-MIL-88(NH₂) باشد. یک کاهش وزن دیگر نیز بین دماهای ۱۵۰°C تا ۲۵۰°C وجود دارد که احتمالاً مربوط به از میان رفتن حلال DMF و تغییر ساختار Fe-MIL-88(NH₂) می‌باشد. پیک گرمازا موجود در دمای ۳۰۰°C نیز می‌تواند ناشی فروپاشی ساختار Fe-MIL-88(NH₂) باشد [۱۰۹].



شکل (۳-۶): نمودار آنالیز TGA-DTA مربوط به Fe-MIL-88(NH₂)

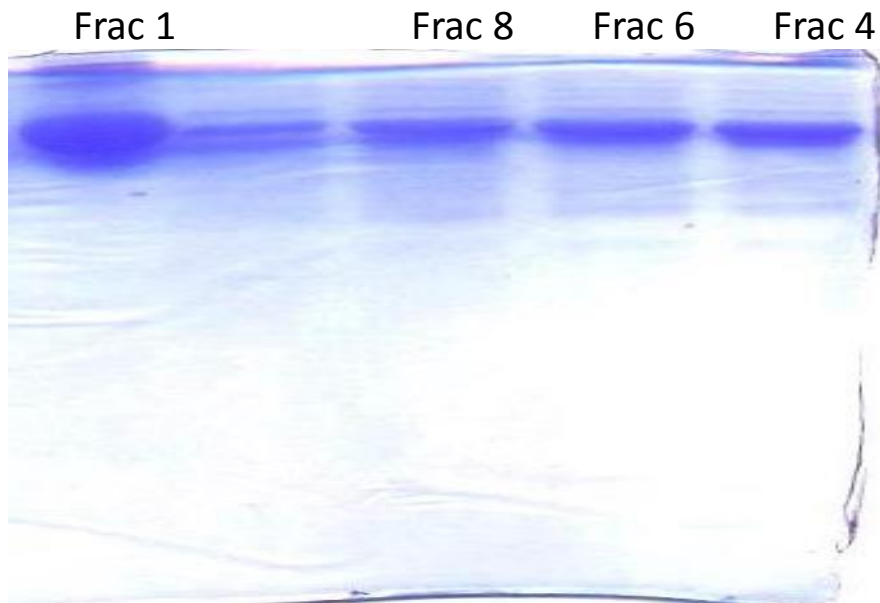
۲-۳ بیان و تخلیص آنزیم لوسیفرز

به منظور بیان آنزیم لوسیفرز محیط کشت 2XYT و برای القاء از IPTG ۱ میلی مولار استفاده شد. سپس در دمای ۲۲°C که قبلاً در آزمایشگاه دکتر حسینخانی برای بیان آنزیم لوسیفرز بهینه شده بود و دور ۲۲۰ rpm قرار داده شد. به منظور بهینه سازی مدت زمان بیان آنزیم لوسیفرز در فواصل زمانی ۲ ساعت از کشت مورد نظر نمونه برداری انجام شد و میزان فعالیت آنزیم در باکتری با دستگاه لومینومتر و کوکتل مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت زمان ۱۶ ساعت بعنوان زمان بهینه القاء تعیین شد. بعد از بیان پروتئین، باکتری های موجود در محیط کشت رسوب داده شد و با استفاده بافر لیزکننده^۱ و سونیکیتور باکتری ها لیز شدند. وکتور pET16b در انتهای آمین دارای دنباله هیستیدینی می باشد. با توجه به این که این توالی هیستیدینی تمایل بالایی به نیکل دارد، بنابراین با استفاده از تکنیک کروماتوگرافی تمایلی از ستون نیکل سفارز برای استخراج و خالص سازی آنزیم لوسیفرز استفاده گردید [۱۱۰، ۱۱۱].

۳-۳ بررسی خلوص آنزیم های لوسیفرز استخراج شده

بعد از استخراج و تخلیص آنزیم لوسیفرز با ستون نیکل سفارز، به منظور بررسی نحوه عملکرد و میزان خلوص آنزیم لوسیفرز استخراج شده از الکتروفورز SDS-PAGE در شرایط احیای با ژل پایین ۱۲/۵ درصد و ژل بالای ۵ درصد استفاده شد. در پایان میزان خلوص آنزیم بیش از ۹۵ درصد تعیین گردید (شکل ۳-۷).

^۱ lysis buffer

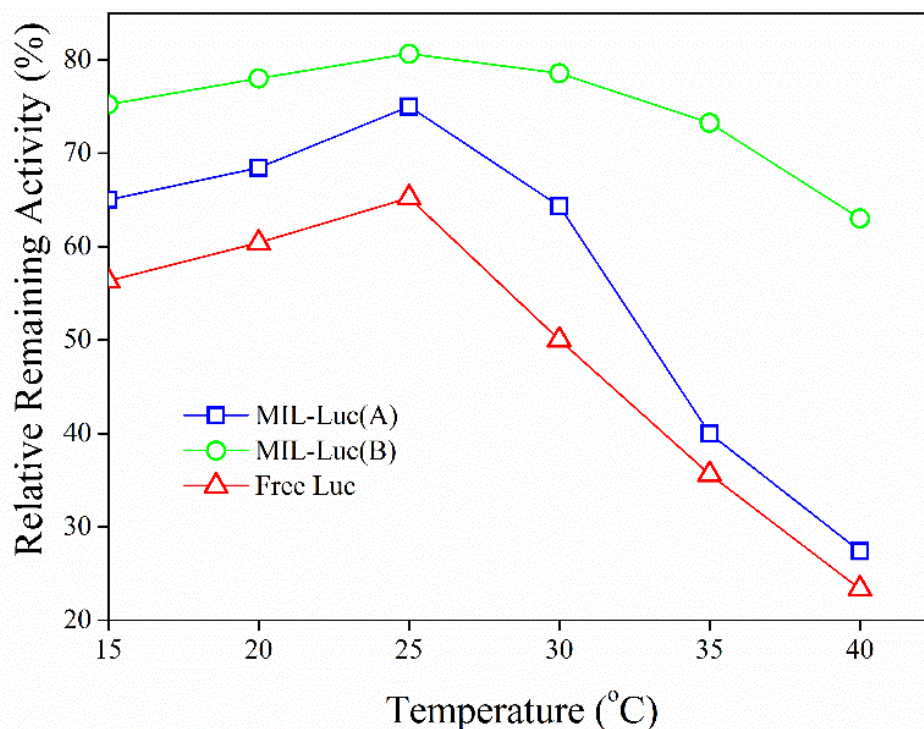


شکل (۳-۷): بررسی خلوص آنزیم لوسیفرز با استفاده از الکتروفورز

۳-۴ غیرفعال شدن حرارتی آنزیم لوسیفرز خالص و تثبیت شده بر روی Fe- MIL-88(NH₂)-therephtaldehyde و MIL-88(NH₂)

پس از انکوباسیون آنزیم‌های لوسیفرز خالص و تثبیت شده در محدوده دمایی ۱۵°C تا ۴۰°C به مدت ۵ دقیقه، میزان فعالیت آن‌ها محاسبه شد و نمودار مربوط به آن رسم گردید. شکل (۳-۸) نشان می‌دهد آنزیم لوسیفرز تثبیت شده بر روی بستر Fe-MIL-88(NH₂) متصل شده به ترفتالدهید تا دمای ۲۵°C به میزان ۸۰ درصد فعالیت خود را حفظ کرده و پس از این دما با شیب بسیار ملایم فعالیت خود را از دست می‌دهد. مقدار حفظ فعالیت تا دمای ۲۵°C برای آنزیم تثبیت شده بر روی Fe-MIL-88(NH₂) حدود ۷۳ درصد بوده و پس از این دما کاهش فعالیت با سرعت بیشتری نسبت به حالت پیوند کووالانسی اتفاق می‌افتد تا اینکه در نهایت در دمای ۴۰°C فعالیت آنزیم تثبیت شده با گونه تثبیت نشده تقریباً برابر است. بدیهی است که اتصال کووالانسی آنزیم بر روی بستر متصل شده با لینکر ترفتالدهید تأثیر مثبت و بسزایی بر روی روند حفظ فعالیت اولیه بخصوص در دماهای بالاتر

داشته است. در واقع اتصال کووالانسی آنزیم به بستر به نفع پایداری آنزیم در دماهای بالاست. چرا که هر چه پایداری آنزیم در دماهای بالاتر افزایش یابد به طبع کاربرد آن در زمینه‌های مختلف وسیع‌تر خواهد شد لذا فرایند تثبیت از این جهت بسیار با اهمیت است. هرچند تثبیت کووالانسی آنزیم در دماهای پایین‌تر نیز به نفع حفظ فعالیت اولیه آنزیم است [۱۱۲، ۱۱۳].

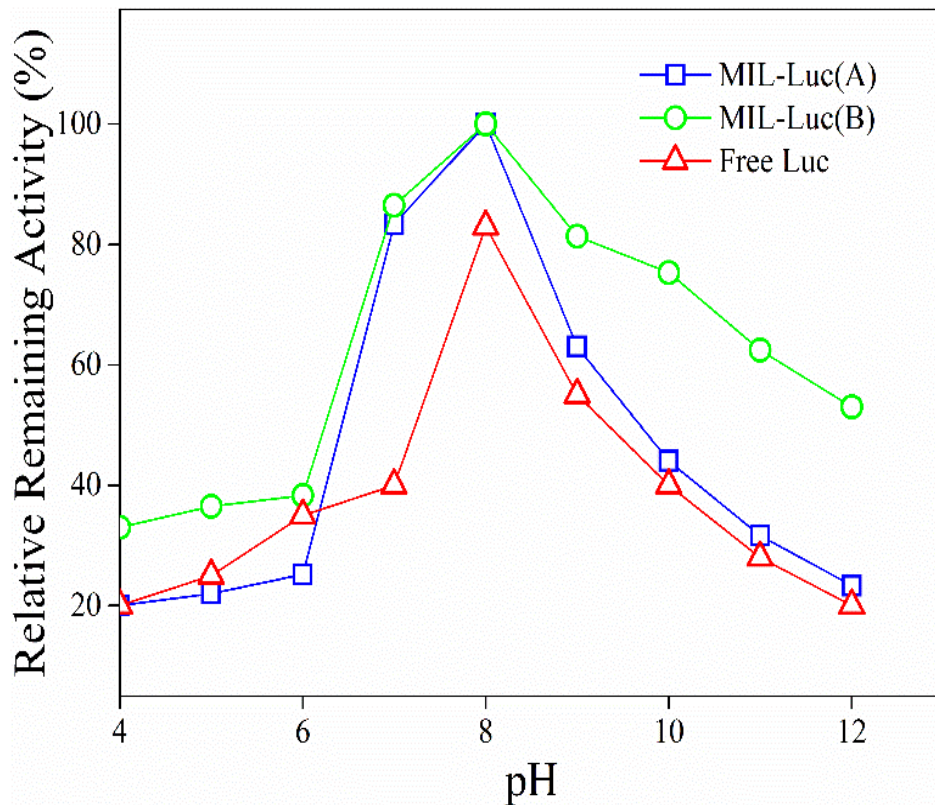


شکل (۳-۸): نمودار غیرفعال شدن حرارتی آنزیم لوسیفراز خالص با نام (Free Luc)، لوسیفراز تثبیت‌شده بر روی Fe-MIL-88(NH₂)-therephtaldehyde با نام MIL-Luc(B) و لوسیفراز تثبیت‌شده بر روی Fe-MIL-88(NH₂) با نام MIL-Luc(A)

۳-۵ تعیین pH بهینه آنزیم لوسیفراز خالص و تثبیت‌شده بر روی Fe-MIL-88(NH₂)-therephtaldehyde و 88(NH₂)

برای تعیین pH بهینه آنزیم‌های لوسیفراز خالص و تثبیت‌شده، میزان فعالیت این آنزیم‌ها در محدوده pH برابر با ۴ تا ۱۲ به فاصله ۱ واحد اندازه‌گیری شد و نمودار آن‌ها رسم گردید. هرچند بحث تغییرات pH در فرایند تثبیت آنزیم‌ها چندان قابل توجیه نیست چرا که عواملی همچون نقطه

ایزوالکتریک آنزیم و بحث اتصال الکترواستاتیک می‌تواند بر روی تغییرات pH تأثیر بسزایی داشته باشد اما با توجه به اطلاعات به دست آمده مشخص گردید که بر طبق انتظار در هر سه مورد تثبیت، pH برابر با ۸ مقدار بهینه pH بوده و ۱۰۰ درصد فعالیت اولیه آنزیم حفظ شده است (شکل ۳-۹). با توجه به این نکته که فعالیت مفید یک آنزیم در رنج وسیعی از pH می‌تواند جهت به کارگیری آن در زمینه‌های مختلف صنعتی بسیار مفید باشد از این رو تثبیت کووالانسی آنزیم راه حل مورد توجهی در این امر است. همان طور که نمودارها نشان می‌دهند لوسیفراز تثبیت شده بر روی Fe-MIL-88(NH₂) متصل شده به ترفالدهید در pH برابر با ۱۲ حدود ۴۵ درصد از فعالیت اولیه خود را حفظ کرده است. این مقدار برای لوسیفراز تثبیت شده بر روی Fe-MIL-88(NH₂) حدود ۲۰ درصد و برابر با آنزیم لوسیفراز است. فرض دیگر در مورد نتایج بدست آمده این است که ممکن است در pH های بالای ۸ بستر فلز-آلی دستخوش تغییرات ساختاری شود و این تغییرات در کاهش فعالیت آنزیم تاثیر داشته باشد [۱۱۴، ۱۱۵].



شکل (۳-۹): نمودار pH بهینه آنزیم لوسیفراز خالص با نام (Free Luc)، لوسیفراز تثبیت شده بر روی Fe-MIL-88(NH₂)-therephthaldehyde با نام MIL-Luc(B) و لوسیفراز تثبیت شده بر روی Fe-MIL-88(NH₂) با نام MIL-Luc(A)

۳-۶ پایداری حرارتی آنزیم لوسیفراز خالص و تثبیت شده بر روی Fe-MIL-88(NH₂)-therephthaldehyde و 88(NH₂)

به منظور بررسی پایداری حرارتی آنزیم‌های لوسیفراز خالص و تثبیت شده، آنزیم به مدت ۲۰ دقیقه در دماهای ثابت ۳۰°C، ۲۵°C و ۳۵°C انکوبه شد و میزان فعالیت آن‌ها در فاصله زمانی ۵ دقیقه محاسبه گردید. شکل (۳-۱۰) نشان می‌دهد، آنزیم تثبیت شده بر روی Fe-MIL-88(NH₂) متصل شده به ترفتالدهید پس از مدت زمان ۵ دقیقه به میزان ۸۰ درصد فعالیت خود را حفظ کرده است. این مقدار پس از مدت زمان ۲۰ دقیقه نیز حدود ۶۵ درصد است. حفظ فعالیت برای لوسیفراز تثبیت شده بر روی Fe-MIL-88(NH₂) پس از ۵ دقیقه حدود ۷۰ درصد و پس از ۲۰ دقیقه حدود ۴۵ درصد است. شکل (۳-۱۱) مربوط به پایداری حرارتی در دمای ۳۰°C نشان می‌دهد، آنزیم تثبیت شده بر

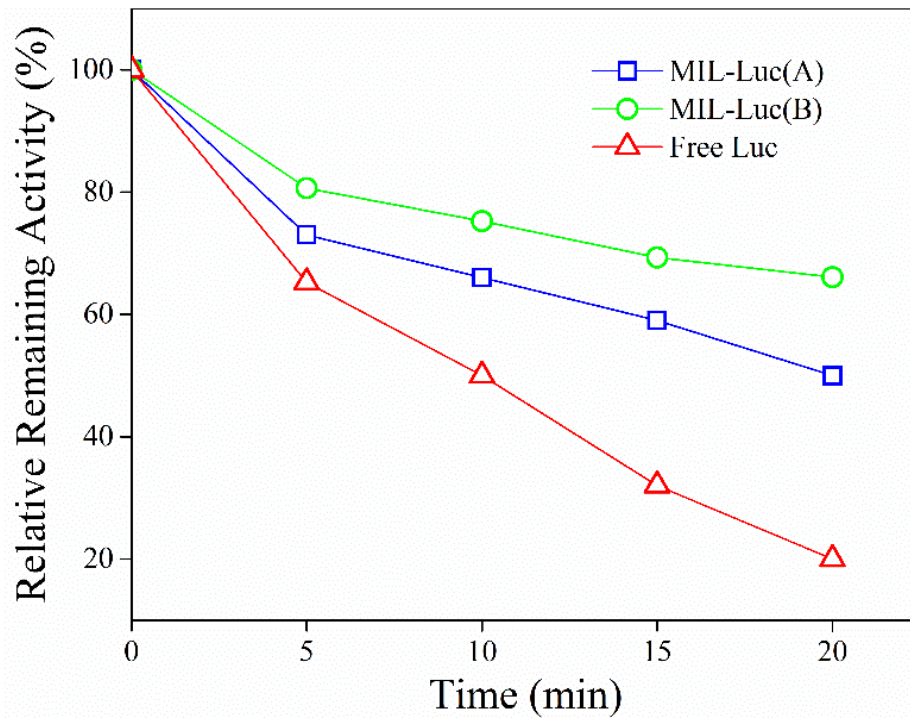
روی Fe-MIL-88(NH₂) متصل شده به ترفتالدهید پس از مدت زمان ۵ دقیقه به میزان ۷۸ درصد و پس از ۲۰ دقیقه حدود ۶۵ درصد حفظ فعالیت داشته است. شکل (۳-۱۲) مربوط به پایداری حرارتی در دمای ۳۵ °C نشان می‌دهد، آنزیم تثبیت شده بر روی Fe-MIL-88(NH₂) متصل شده به ترفتالدهید پس از مدت زمان ۵ دقیقه به میزان ۷۰ درصد و پس از ۲۰ دقیقه حدوداً ۵۸ درصد حفظ فعالیت داشته است [۱۱۶].

اتصال کووالانسی آنزیم به بستر سبب کاهش از میان رفتن یا جدا شدن آنزیم از بستر شده و در واقع تعداد آنزیم‌های مفید متصل به بستر را افزایش می‌دهد. این تعداد آنزیم متصل شده طبعاً توانایی بیشتری در حفظ فعالیت اولیه خود نسبت به آنزیم آزاد خواهند داشت. آنزیم‌های آزاد با سرعت بیشتری در مقابل تغییرات دمایی غیرفعال شده و پایداری خود را از دست می‌دهند لذا تثبیت آنزیم در کاهش یکنواخت فعالیت و پایداری آنزیم تأثیر مثبت و قابل توجهی دارد [۱۱۷، ۱۱۸].

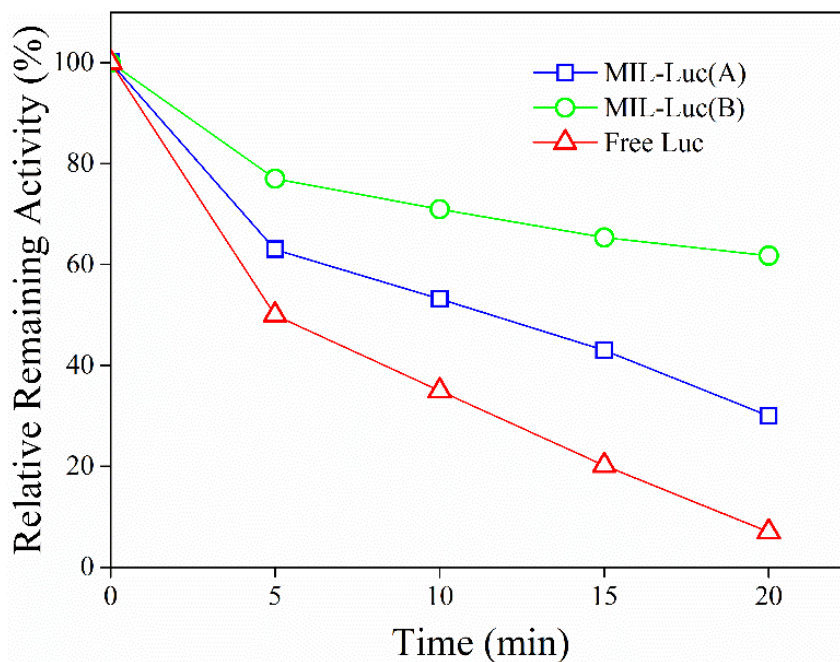
حفظ فعالیت آنزیم نه تنها در دماهای بالا حائز اهمیت است که این امر برای آنزیمی همانند لوسیفراز در دمای اتاق نیز بسیار مهم و قابل توجه است. بسیاری از کاربردها و فعالیت‌های این آنزیم در دمای محیط صورت می‌پذیرد لذا حفظ فعالیت در رنج دمایی ۲۵°C تا ۳۵°C زمینه‌های فعالیت بیشتری برای این آنزیم فراهم می‌آورد [۱۱۹].

با اشاره به نتایج به دست آمده می‌توان گفت هر دو بستر توانایی قابل توجهی در حفظ فعالیت و پایداری اولیه لوسیفراز در دماهای مذکور داشته‌اند. مقادیر عددی به دست آمده از مقادیر گزارش شده در مقالات و گزارش‌های قبلی در زمینه تثبیت آنزیم لوسیفراز بیشتر است. یکی دیگر از دلایل مهم افزایش پایداری دمایی آنزیم پس از تثبیت، فشرده شدن آنزیم است. آنزیم در حضور بستر فشرده شده و اگر این فشردگی منجر به تغییر ساختار سه بعدی آنزیم نشود، پایداری حرارتی آن را بیشتر می‌کند. خود عامل فشردگی نیز ماحصل افزایش آنتروپی محیط در حضور بستر می‌باشد. اتصال آنزیم به بستر

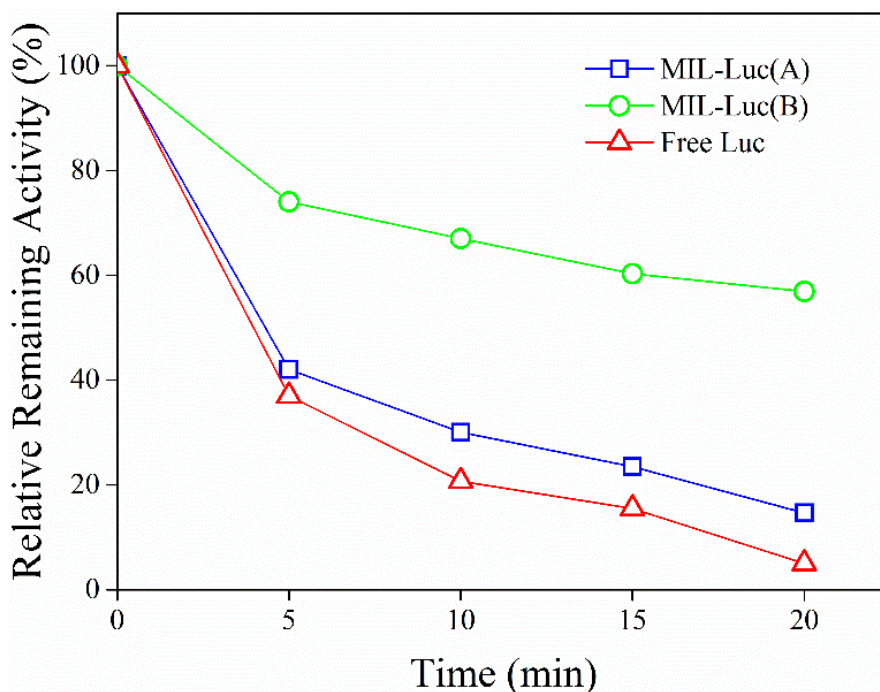
اندرکنش‌های بین‌مولکولی آنزیم‌ها را تحت تأثیر قرار داده و از طریق کاهش این اندرکنش‌ها سبب پایداری بیشتر آنزیم می‌شود [۱۲۰، ۱۲۱].



شکل (۳-۱۰): نمودار پایداری حرارتی آنزیم لوسیفراز خالص با نام (Free Luc)، لوسیفراز تثبیت‌شده بر روی Fe-MIL-88(NH₂)-therephtaldehyde با نام MIL-Luc(B) و لوسیفراز تثبیت‌شده بر روی Fe-MIL-88(NH₂) با نام MIL-Luc(A) در دمای ۲۵°C



شکل (۳-۱۱): نمودار پایداری حرارتی آنزیم لوسیفرز خالص با نام (Free Luc)، لوسیفرز تثبیت شده بر روی Fe-MIL-88(NH₂)-therephthaldehyde با نام MIL-Luc(B) و لوسیفرز تثبیت شده بر روی Fe-MIL-88(NH₂) با نام MIL-Luc(A) در دمای ۳۰°C



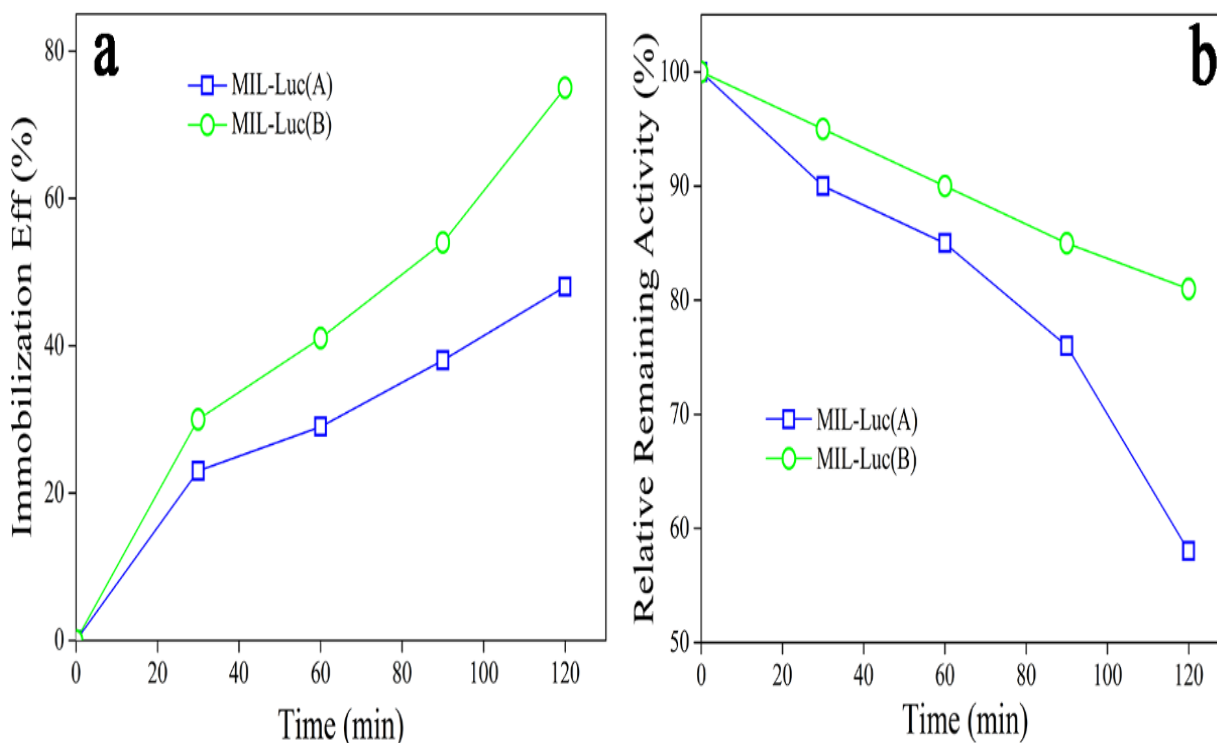
شکل (۳-۱۲): نمودار پایداری حرارتی آنزیم لوسیفرز خالص با نام (Free Luc)، لوسیفرز تثبیت شده بر روی Fe-MIL-88(NH₂)-therephthaldehyde با نام MIL-Luc(B) و لوسیفرز تثبیت شده بر روی Fe-MIL-88(NH₂) با نام MIL-Luc(A) در دمای ۳۵°C

۳-۷ بررسی کارایی اتصال آنزیم

یکی از نکات کلیدی و مهم در فرایند تثبیت هر آنزیم بحث کارایی اتصال یا همان غلظت آنزیم متصل شده به بستر علیه زمان است. شکل (۳-۱۳) نشان می‌دهد آنزیم لوسیفراز در مدت ۱۲۰ دقیقه به میزان ۸۰ درصد بر روی بستر آهن متصل شده به ترفتالدهید تثبیت شده و به میزان ۸۰ درصد هم فعالیت خود را در همین مدت زمان حفظ کرده است. همچنین لوسیفراز پس از مدت زمان ۲ ساعت بر روی بستر آهن به میزان ۴۵ درصد تثبیت شده و ۵۵ درصد حفظ فعالیت داشته است. بدیهی است که حضور گروه‌های آلدهید به‌عنوان گروه‌های فعال اتصالی در لینکر مذکور و پیوند کووالانسی آن‌ها با گروه‌های آمین موجود در بستر آهن امکان اتصال این ترکیب به لوسیفراز را تا حد زیادی تسهیل می‌کند. گروه‌های آمین موجود در آمینواسیدهای لیزین و سیستئین به‌راحتی با سر دیگر ترفتالدهید وارد واکنش می‌شوند. همچنین این آمینواسیدها به‌راحتی می‌توانند با گروه‌های کربوکسیل موجود در بستر آهن متصل شده اندرکنش بدهند [۱۲۲، ۱۲۳].

جاذبه الکترواستاتیکی نیز یکی از عوامل مهم در جذب سطحی آنزیم به بستر است. در هنگام تشکیل ایمین حد واسط بار مثبتی به وجود می‌آید که ممکن است به گروه‌های بار منفی لوسیفراز متصل شود. از طرفی در اثر تغییرات pH گروه‌های آمین پروتون شده در بستر یا آنزیم به گروه‌های بار منفی مقابل متصل شوند [۱۲۴].

در مورد به دام افتادن و یا تثبیت لوسیفراز درون حفرات بسترها نیز باید اشاره کرد که با توجه به سایز لوسیفراز که بیشتر از سایز حفرات بسترهاست امکان این پیشامد نیز کاملاً منتفی است. ابعاد لوسیفراز با وزن ۶۲ کیلو دالتون حدوداً ۷ نانومتر می‌باشد که این مقدار از اندازه فضای سه‌بعدی حفرات بسترها بیشتر است [۱۲۵].



شکل (۳-۱۳): نمودارهای (a) کارایی اتصال و (b) پایداری آنزیم لوسیفراز تثبیت شده بر روی Fe-MIL-88(NH₂)-therephtaldehyde با نام MIL-Luc(B) و لوسیفراز تثبیت شده بر روی Fe-MIL-88(NH₂) با نام MIL-Luc(A)

۳-۸ محاسبه مقادیر V_{max} و K_m نسبت به لوسیفیرین و ATP

با توجه به این که آنزیم لوسیفراز برای فعالیت به هر دو سوبسترای لوسیفیرین و ATP نیاز دارد پس لازم می باشد میزان تمایل آنزیم (K_m) به هر دو سوبسترا را محاسبه کرد. محاسبه K_m با کمک نمودار میکائلیس منتن و لاین ویور برگ انجام شد. در نمودار میکائلیس منتن V نسبت به $[S]$ رسم می شود، در حالی که نمودار لاین ویور برگ $1/V$ نسبت به $1/[S]$ می باشد. به عنوان نمونه نحوه رسم نمودار میکائلیس منتن و لاین ویور برگ و نحوه محاسبه K_m برای ATP و لوسیفیرین در مورد آنزیم لوسیفراز خالص ذکر شده و در مورد دیگر آنزیم های تثبیت شده نیز دقیقاً همین مراحل انجام گرفته است. در ابتدا گرادسانی از غلظت های مختلف برای هر دو سوبسترا (لوسیفیرین و ATP) به طور جداگانه تهیه شد.

میزان فعالیت آنزیم لوسیفراز در غلظت‌های مختلف این دو سوبسترا محاسبه شد. سپس برای رسم نمودار میکائلیس منتن میانگین میزان فعالیت نسبت به غلظت‌های مختلف هر یک از دو سوبسترا رسم شد [۱۲۶].

در نهایت با توجه به معادله لاین ویور برگ و معادله خط $Y = aX + b$ بدست آمده، می‌توان میزان K_m و V_{max} را محاسبه کرد (معادله ۱-۳).

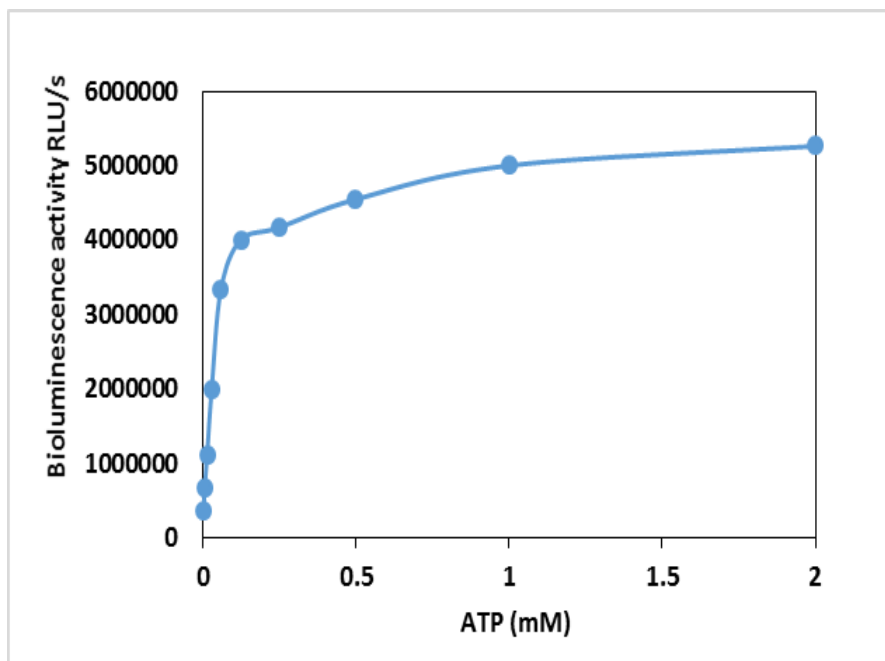
$$\frac{1}{V} = \frac{K_m + [S]}{V_{max}[S]} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

$$Y = aX + b$$

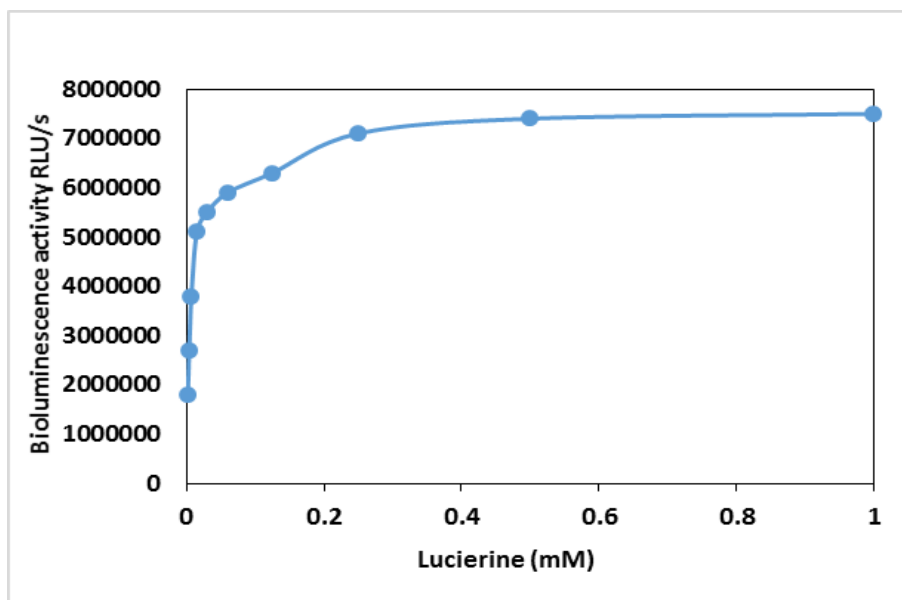
$$a = \frac{K_m}{V_{max}}$$

$$b = \frac{1}{V_{max}}$$

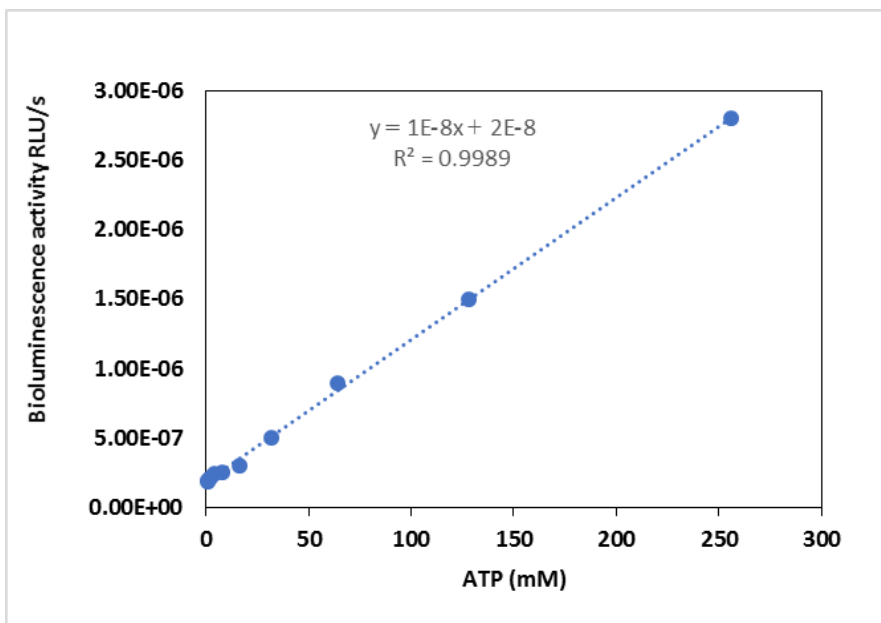
$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{1}{V} = 0 \Rightarrow \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} = 0 \\ \frac{1}{[S]} = -\frac{1}{K_m} \\ Y = 0 \Rightarrow 0 = aX + b \\ X = \frac{b}{a} = -\frac{1}{K_m} \quad \text{or} \quad \frac{a}{b} = -K_m \end{array} \right.$$



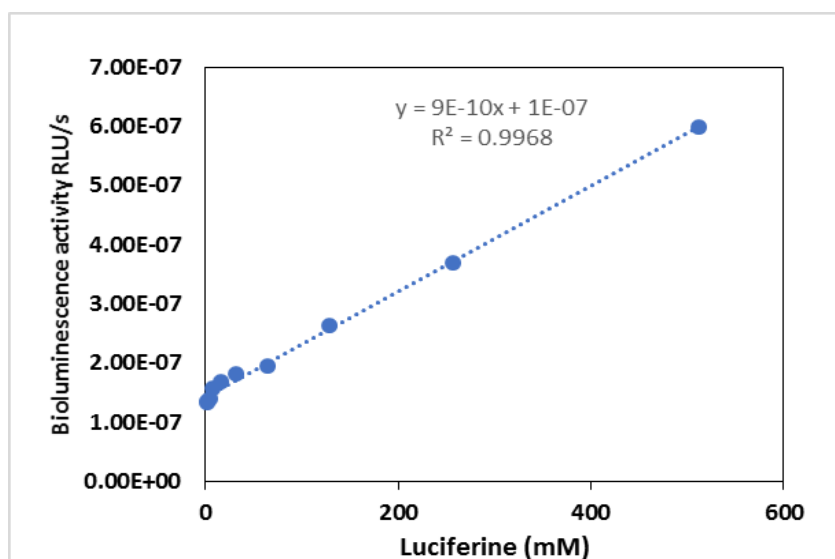
شکل (۳-۱۴): نمودار میکائلیس منتن آنزیم لوسیفراز در غلظت‌های مختلف ATP



شکل (۳-۱۵): نمودار میکائلیس منتن آنزیم لوسیفراز در غلظت‌های مختلف لوسیفرین

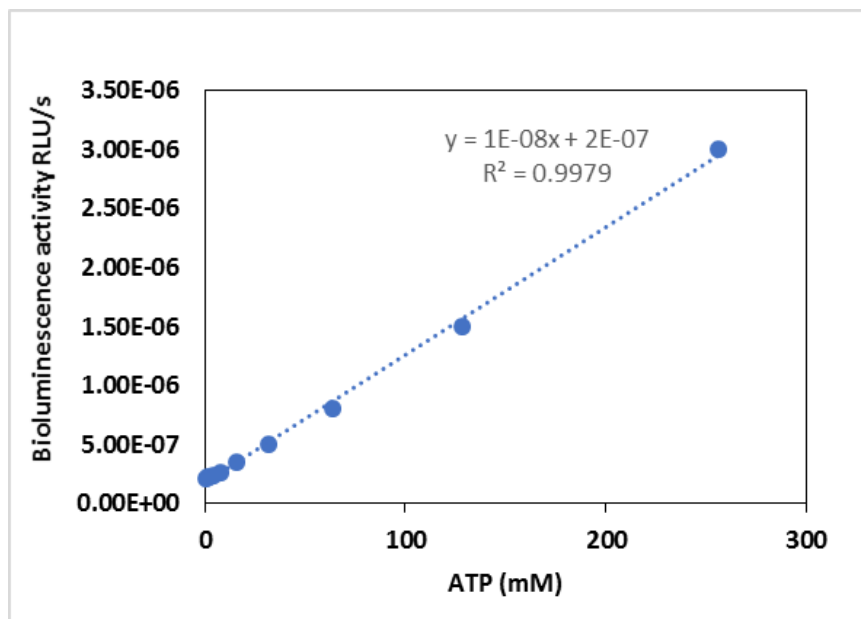


شکل (۱۶-۳): نمودار لاین ویور برگ آنزیم لوسیفراز در غلظت‌های مختلف ATP

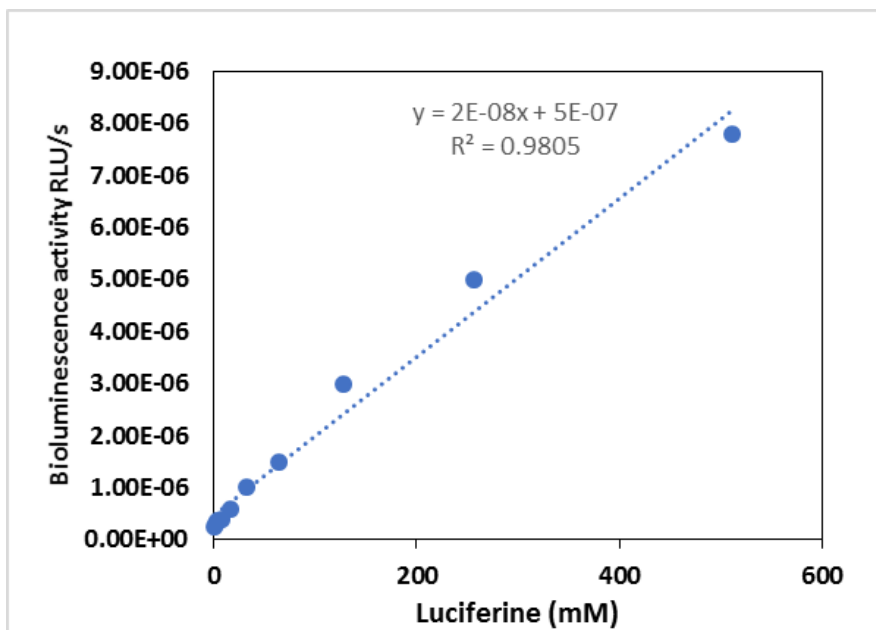


شکل (۱۷-۳): نمودار لاین ویور برگ آنزیم لوسیفراز در غلظت‌های مختلف لوسیفیرین

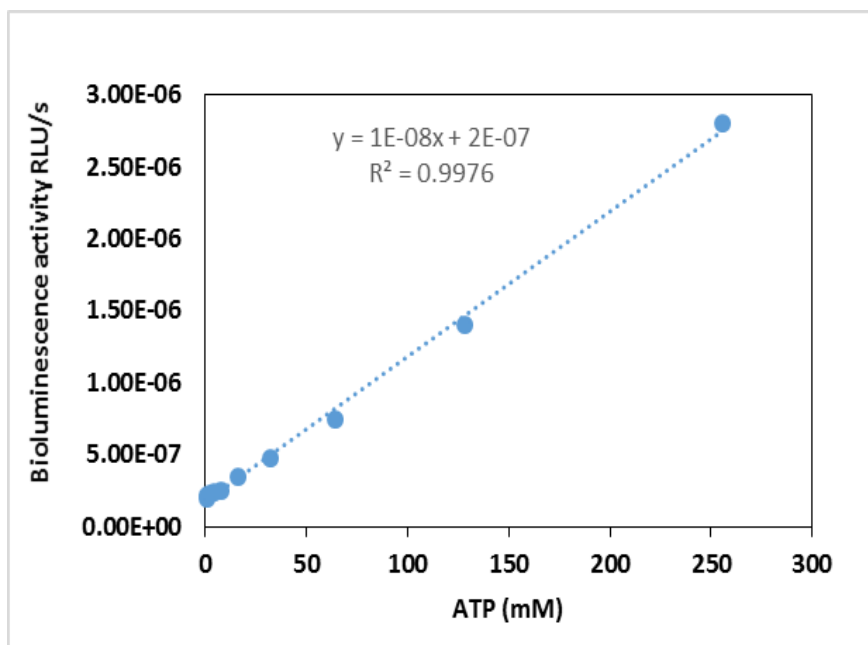
در ادامه به منظور محاسبه میزان K_m ، نمودار لاین ویوربرگ، معکوس میزان فعالیت آنزیم لوسیفراز علیه معکوس غلظت‌های مختلف هر دو سوبسترا، رسم گردید. در نهایت با توجه به معادله لاین ویور برگ و معادله خط $Y = aX + b$ به دست آمده، می‌توان میزان K_m و V_{max} را محاسبه کرد. نتایج به دست آمده از محاسبه K_m و V_{max} آنزیم‌های لوسیفراز تثبیت شده به صورت ذیل می‌باشد.



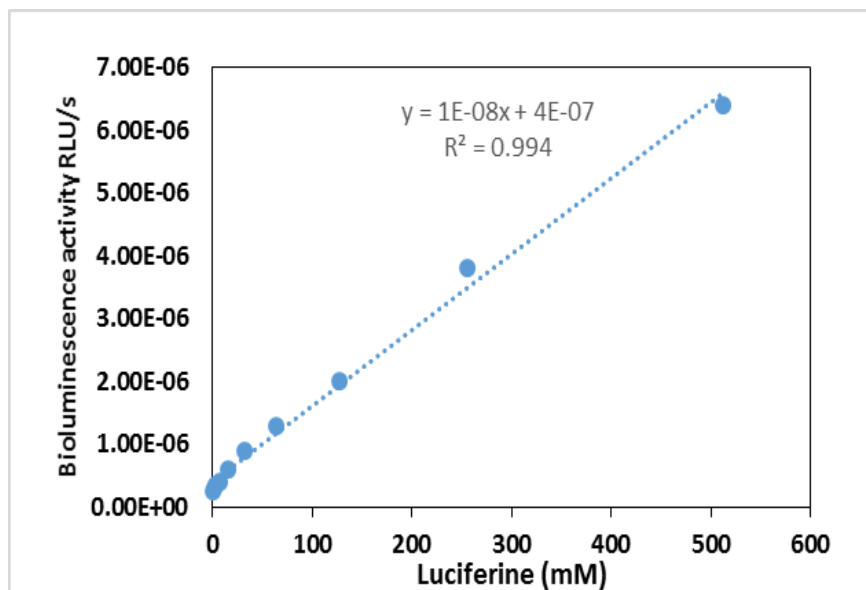
شکل (۳-۱۸): نمودار لاین ویوربرگ آنزیم لوسیفراز تثبیت شده بر روی Fe-MIL-88(NH₂)-terephthaldehyde در غلظت‌های مختلف ATP



شکل (۳-۱۹): نمودار لاین ویوربرگ آنزیم لوسیفراز تثبیت شده بر روی Fe-MIL-88(NH₂)-terephthaldehyde در غلظت‌های مختلف لوسیفیرین



شکل (۳-۲۰): نمودار لاین ویوربرگ آنزیم لوسیفراز تثبیت شده بر روی Fe-MIL-88(NH₂) در غلظت‌های مختلف ATP



شکل (۳-۲۱): نمودار لاین ویوربرگ آنزیم لوسیفراز تثبیت شده بر روی Fe-MIL-88(NH₂) در غلظت های مختلف لوسیفیرین

نتایج حاصل از مطالعه و مقایسه K_m برای ATP و لوسیفیرین در جدول (۳-۲) گردآوری شده است.

جدول (۳-۲): مقدار ثابت K_m برای آنزیم لوسیفراز خالص، Fe-MIL-88(NH₂) و Fe-MIL-88(NH₂)-therephtaldehyde

	K _m	
	ATP (μm)	Luciferin(μm)
Free luciferase	50 ± 2	9 ± 2
MIL- Luc (A)	50 ± 2	25 ± 2.5
MIL- Luc (B)	50 ± 2.5	40 ± 2.5

افزایش ثابت K_m به معنای کاهش تمایل آنزیم به اتصال به سوبسترای موردنظر است. در مورد ATP این مقدار تقریباً ثابت مانده است. به عبارتی تثبیت آنزیم تأثیری بر روی تمایل اتصال آنزیم به سوبسترای ATP نداشته است. درگیر نشدن آن دسته از گروه‌های عاملی جایگاه فعال آنزیم که به ATP متصل می‌شوند می‌تواند دلیلی بر این اتفاق باشد؛ اما در مورد لوسیفرین مقدار K_m در اثر فرایند تثبیت در هر دو ترکیب افزایش یافته است [۱۲۷]. احتمالاً جایگاه‌های فعال مربوط به اتصال لوسیفرین به لوسیفراز بیشتر درگیر اتصال با بستر بوده و به همین دلیل مقدار K_m برای آن افزایش یافته است.

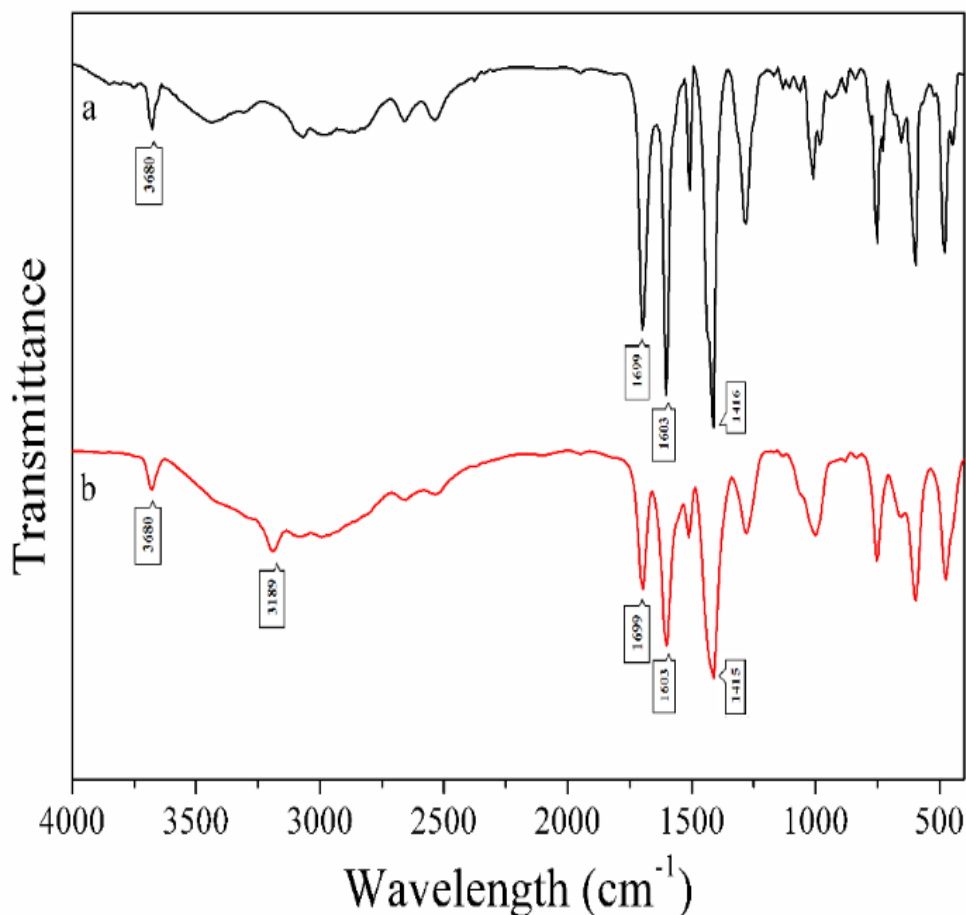
بخش دوم

۳-۹ شناسایی و بررسی ساختار MIL-53(AI)

جذب سطحی آنزیم بر روی بسترهای گوناگون یکی از کم هزینه و به صرفه‌ترین روش‌ها برای افزایش پایداری آنزیم و بهبود خواص آنزیم است. از مزایای دیگر این روش این است که، تقریباً بر روی تمامی بسترهای دارای گروه‌های فعال و غیرفعال قابل انجام بوده و از این جهت نیز محدودیتی ندارد. در این بخش به تفصیل به بررسی تثبیت آنزیم لوسیفراز بر روی بستر MIL-53(AI) به روش جذب سطحی می‌پردازیم.

مطالعات مربوط به طیف‌بینی مادون قرمز نشان می‌دهند، پیک موجود در 1699 cm^{-1} در شکل (۲۲a-۳) مربوط به گروه‌های کربوکسیل ترفتالیک‌اسید و پیک‌های نواحی 1608 cm^{-1} و 1417 cm^{-1} به ترتیب مربوط به کششی نامتقارن و متقارن گروه‌های COO^- در ترکیب MIL-53(AI) می‌باشند. در شکل (۲۲b-۳) تغییرات پیک‌ها در نواحی 1512 cm^{-1} ، 2500 cm^{-1} تا 3800 cm^{-1} و 2800 cm^{-1} تا 2900 cm^{-1} نیز حاکی از اتصال جذب سطحی لوسیفراز به بستر آلومینیوم است. همانطور که در بخش

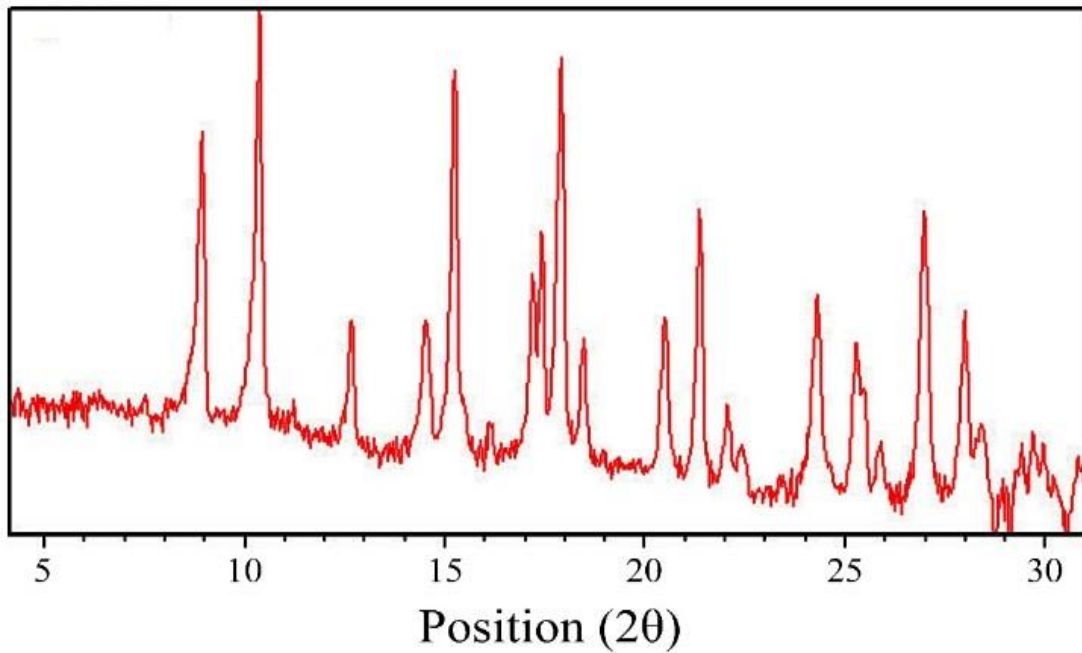
قبل ذکر شد، در اثر فرایند جذب سطحی بیومولکول‌ها بر روی بستری که گروه عاملی فعالی ندارد، فقط موقعیت پیک‌ها و اندازه آنها تغییر می‌کند.



شکل (۳-۲۲): طیف FT-IR مربوط به (a) MIL-53(Al) و (b) لوسیفراز تثبیت‌شده بر روی MIL-53(Al)

شکل XRD ترکیب MIL-53(Al) شکل (۳-۲۳) نشان داده شده است. مقایسه این شکل و شکل

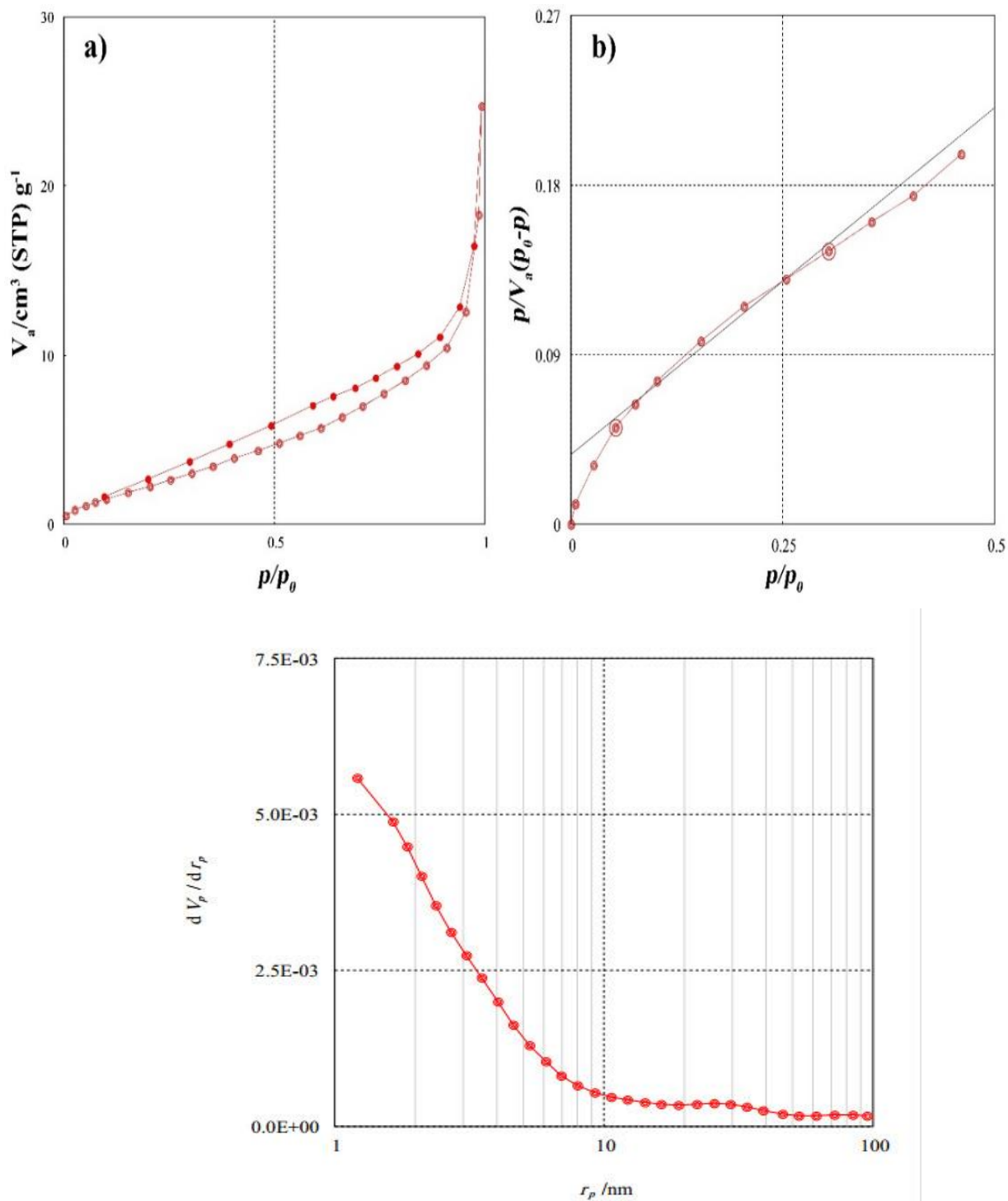
XRD ثبت شد در مرجع ۱۲۸ صحت سنتز MIL-53(Al) را نشان می‌دهد [۱۲۸].



شکل (۳-۲۳): الگوی پراش اشعه X مربوط به MIL-53(Al) (a) و لوسیفرز تثبیت شده بر روی MIL-53(Al) (b)

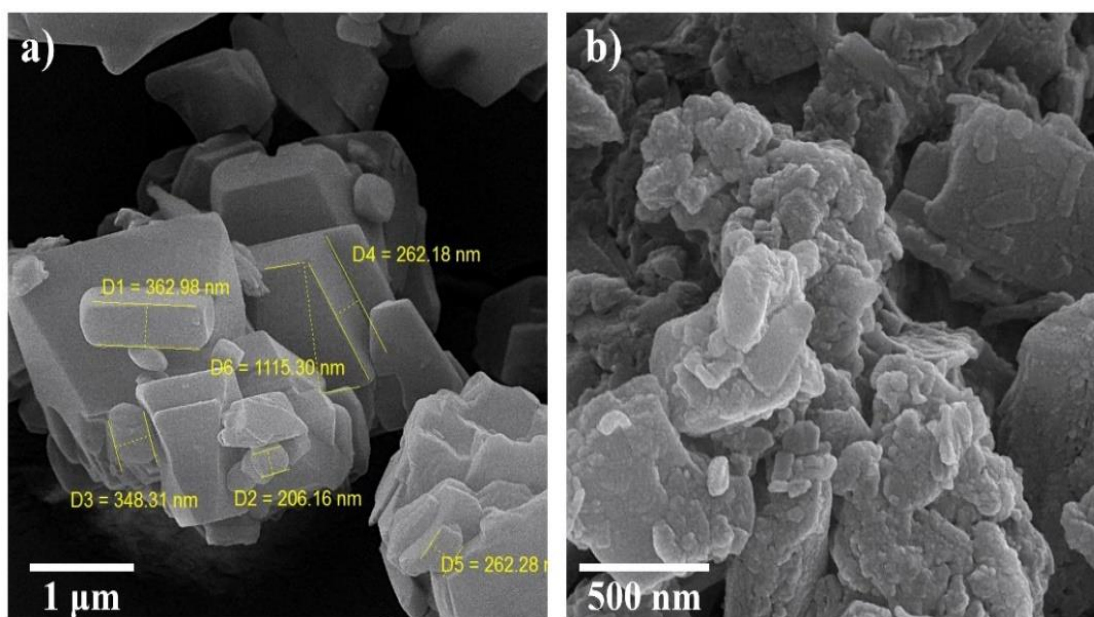
ایزوترم‌های جذب و واجذب نیتروژن ترکیب MIL-53(Al) در شکل (۳-۲۴) نشان داده شده است. برخی مولکول‌های ترفتالیک اسید موجود در حفرات بستر که در طی عملیات جذب و واجذب نیتروژن از آن خارج نشده‌اند موجب کاهش نسبت سطح به حجم در ترکیبات متخلخلی از این دست می‌شوند. مانند ترکیب Fe-MIL-88(NH₂)، دلایلی همچون خلوص گاز نیتروژن و آماده سازی نمونه در کاهش پارامتر نسبت سطح به حجم در این ترکیب موثر است. مقدار مساحت سطح برای این ترکیب ۱۰/۷۴ متر مربع بر گرم و حجم حفرات برابر ۰/۰۳۵ سانتی متر مکعب بر گرم می‌باشد [۱۲۹].

نمودار BJH ترکیب MIL-53(Al) نشان می‌دهد اندازه قطر حفرات این ترکیب ۲/۴۲ نانومتر بوده که با توجه به آن این ترکیب نیز در دسته ترکیبات مزوپور قرار می‌گیرد. با توجه به حجم حفرات این ترکیب ابعاد لوسیفرز، تثبیت و به دام افتادن لوسیفرز در داخل این بستر نیز مانند نمونه Fe-MIL-88(NH₂) کاملاً منتفی است [۱۳۰].



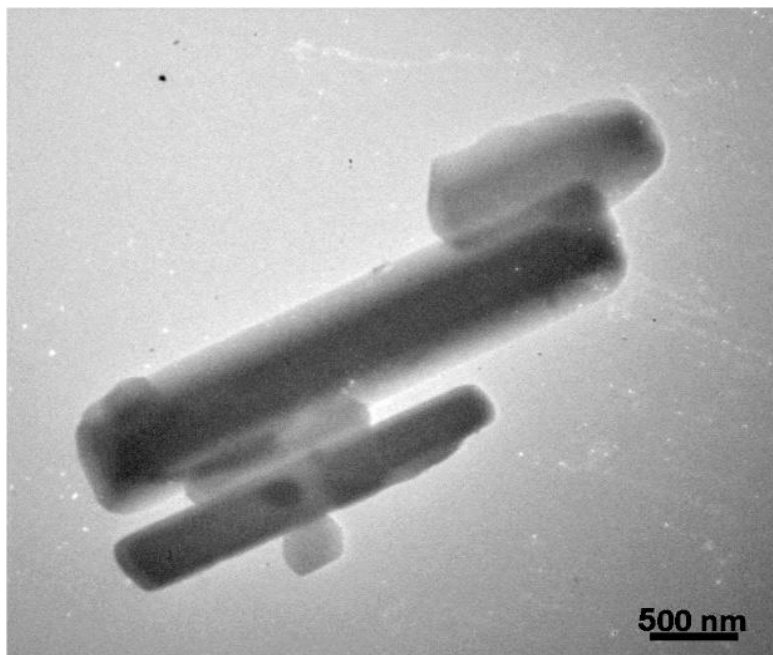
شکل (۳-۲۴): (a) ایزوترم جذب و واجذب نیتروژن، (b) نمودار BET و (c) نمودار BJH ترکیب MIL-53(Al)

تصویر SEM ثبت شده از ترکیب MIL-53(Al) نیز ساختار مکعبی اما نامنظمی را از این ترکیب نشان می‌دهد. شکل ۲۵a-۳ مربوط به MIL-53(Al) و شکل ۲۵b-۳ مربوط به لوسیفراز تثبیت شده بر روی آن می‌باشد. این ناهمواری و پراکندگی در ذرات ممکن است به دلیل نحوه خشک شدن در فرایند سنتز و یا نحوه آماده‌سازی نمونه برای این آزمایش باشد. تجمع پروتئین‌ها نیز در این تصاویر بخوبی دیده می‌شود که این امر بدلیل ماندگاری آنزیم جهت انجام آنالیز بوده است [۱۳۱].



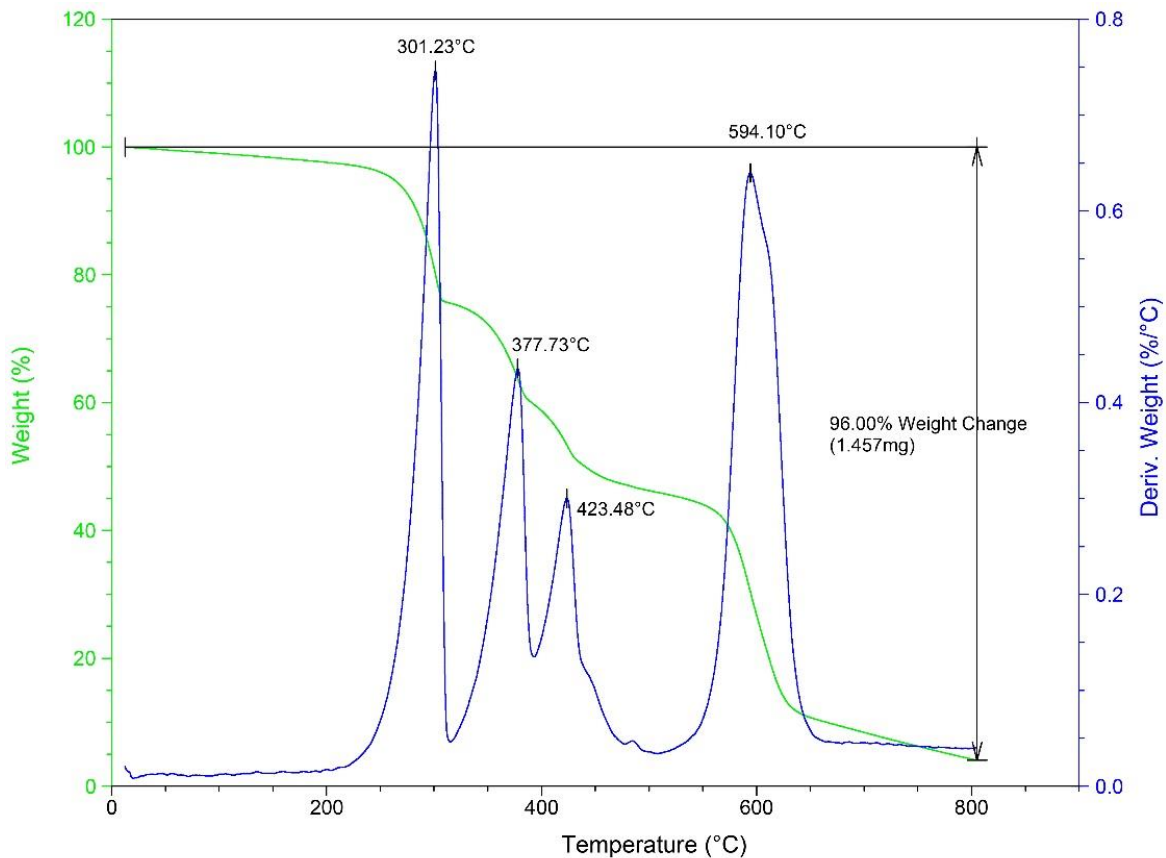
شکل (۲۵-۳): تصاویر FE-SEM مربوط به MIL-53(Al) (a) و لوسیفراز تثبیت‌شده بر روی MIL-53(Al) (b)

تصویر TEM ترکیب MIL-53(Al) در شکل (۲۶-۳) نشان داده شده است. ساختار مکعبی این ترکیب تصویر SEM آن را تایید می‌کند. نکته قابل توجه در مورد روش‌های الکترونی این است که این روش‌ها عمدتاً نمی‌توانند دلیل متقنی بر تثبیت آنزیم بر روی بسترهای مزو باشند. به خصوص در مواردی که اختلاف سایز بستر و آنزیم بسیار زیاد باشد و نوع تثبیت هم روش غیر کووالانسی باشد، استفاده از این روش‌ها با آن هم در رزولوشن پایین تقریباً بهبود یافته است. همچنین در روند آماده‌سازی نمونه برای این روش‌ها به طور قطع مقدار زیادی از آنزیم از بستر جدا شده و از بین می‌رود از این رو از ثبت تصویر TEM نمونه MIL-53(Al)-Luc صرف نظر شد [۱۳۲].



شکل (۳-۲۶): تصویر TEM مربوط به MIL-53(Al)

شکل (۳-۲۷) مربوط به نمودار TGA-DTG ترکیب MIL-53(Al) می‌باشد. کاهش وزن در دماهای 377°C و 423°C نیز مربوط به خروج آب از لایه‌های درونی تر و کانال‌های ترکیب است. از دست ندادن حلال بصورت یکجا، یکی از ویژگی‌های بارز ساختارهای شبکه‌ای فلز-آلی است که به ثابت ماندن و پایداری ساختار آنها در دماهای بالا بسیار کمک می‌کند. حلال، از سیستم‌های شبکه‌ای در مقابل خشک شدن و فروپاشی در دماهای بالا محافظت می‌کند. کاهش وزن مشخص دیگر در 592°C مربوط به فروپاشی ساختار MIL-53(Al) می‌باشد چرا که این ترکیب تا 500°C پایدار است [۱۳۳].

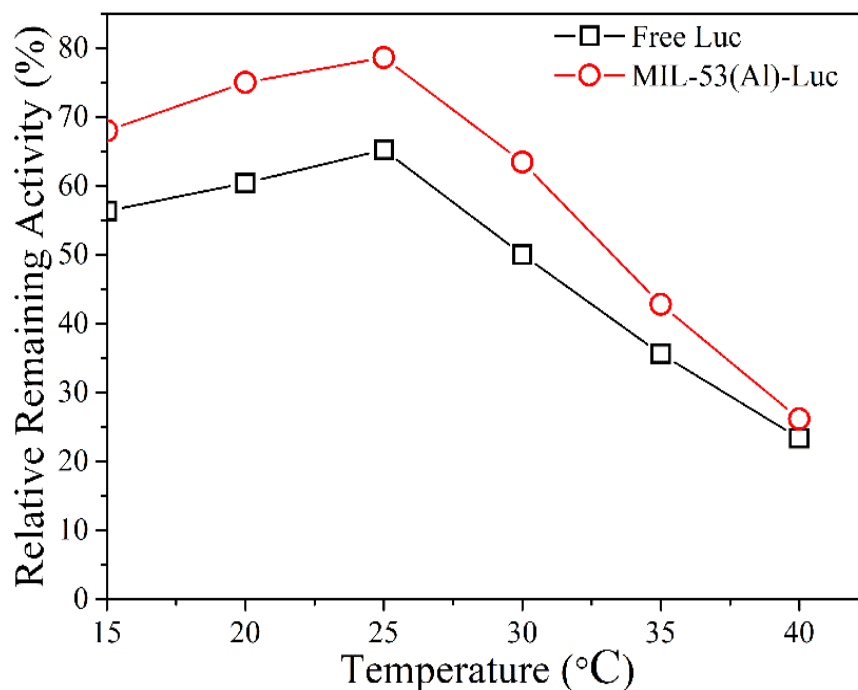


شکل (۳-۲۷): نمودار آنالیز TGA-DTG مربوط به MIL-53(AI)

۳-۱۰ غیرفعال شدن حرارتی آنزیم لوسیفراز خالص و تثبیت شده بر روی MIL-53(AI)

بررسی اثر تغییرات دما بر سرعت واکنش‌های آنزیمی اطلاعات چندانی در مورد سازوکار واکنش کاتالیز آنزیمی در اختیار ما قرار نمی‌دهد اما این آثار در تشخیص تغییرات ساختاری آنزیم و فعالیت آن بسیار ارزشمند است. طبق معادله آرنیوس با افزایش دما، افزایش در سرعت واکنش آنزیمی به وجود می‌آید. در مورد آنزیم آزاد، هنگامی که دما از حد خاصی بگذرد آنزیم ساختار سه‌بعدی فشرده خود را که برای فعالیت کاتالیتیک آن ضروری است از دست می‌دهد. در دماهای بالاتر از 70°C آنزیم آزاد به سرعت غیرفعال می‌شود؛ اما آنزیم تثبیت شده به دلیل وجود ریز محیط کمتر تحت تأثیر درجه حرارت قرار می‌گیرد [۱۳۴، ۱۳۵].

با توجه به شکل (۳-۲۸)، پس از دمای 25°C سرعت از دست رفتن فعالیت آنزیم نسبت به تثبیت کووالانسی افزایش بیشتری می‌یابد که این خود از دلایل اثبات تثبیت آنزیم بر روی بستر به روش جذب سطحی است. تا دمای 25°C آنزیم تثبیت شده به میزان ۸۰ درصد فعالیت خود را حفظ کرده است، چیزی برابر تثبیت آنزیم در حالت کووالانسی در بخش قبل، و پس از این دما با سرعت بسیار زیادی فعالیت آنزیم کاهش یافته است و در نهایت در دمای 40°C به حدود ۲۰ درصد رسیده است.



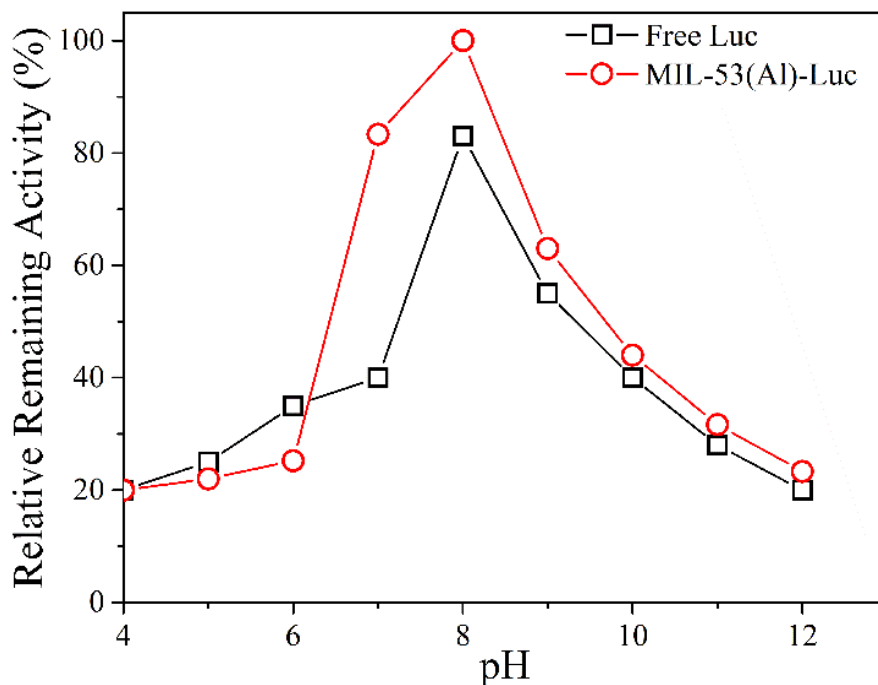
شکل (۳-۲۸): نمودار غیرفعال شدن حرارتی آنزیم لوسیفراز خالص با نام (Free Luc) و لوسیفراز تثبیت شده بر روی MIL-53(Al) با نام MIL-53(Al)-Luc

۳-۱۱ تعیین pH بهینه آنزیم لوسیفراز خالص و تثبیت شده بر روی MIL-53(Al)

در یک محلول همگن آنزیم قادر است با تمامی اجزای محلول در تماس باشد. تثبیت آنزیم موجب ناهمگن شدن محیط و تبدیل آن به دو فاز یعنی آنزیم تثبیت شده و فاز محلول می‌شود. جابجایی pH بهینه آنزیم تثبیت شده بیانگر تغییر رفتار گروه‌های عاملی شرکت کننده در جایگاه فعال آنزیم و در نتیجه تغییر محیط آن‌هاست. به دنبال آن کاهش قطبیت محیط و نیز کاهش ثابت دی‌الکتریک بافر

و تماس گروه‌های مجاور با گروه‌های عاملی کاتالیزور جایگاه فعال به‌گونه‌ای تغییر می‌یابد که یونیزاسیون آن به‌سوی pHهای قلیایی جابجا می‌شود. کاهش فعالیت آنزیم در pHهای اسیدی و قلیایی در نتیجه افزایش برهمکنش‌های الکترواستاتیک در ساخت آنزیم در محیط دارای ثابت دی-الکتریک پایین است که سبب از بین رفتن فعالیت آنزیم می‌شود. همچنین فاز تثبیت‌شده به دلیل تغییر تعادل برهمکنش‌های الکترواستاتیک می‌تواند روی سازوکار کاتالیزور اسید و باز تأثیر بگذارد [۱۳۶، ۱۳۷].

با توجه به شکل (۳-۲۹)، pH بهینه آنزیم تثبیت شده دقیقاً برابر با آنزیم در حالت خالص است و پس از عبور از آن و رفتن به pHهای قلیایی مقدار فعالیت باقیمانده آنزیم کاهش یافته و در نهایت در pH برابر با ۱۲ به آنزیم خالص می‌رسد. تغییر در ساختار چهارچوب فلز-آلی با تغییرات pH می‌تواند از دلایل کاهش فعالیت باقیمانده آنزیم تثبیت شده باشد.



شکل (۳-۲۹): نمودار pH بهینه آنزیم لوسیفرز خالص با نام (Free Luc)، لوسیفرز تثبیت‌شده بر روی MIL-53(Al) با نام MIL-53(Al)-Luc

۱۲-۳ پایداری حرارتی آنزیم لوسیفرز خالص و تثبیت شده بر روی MIL-53(Al)

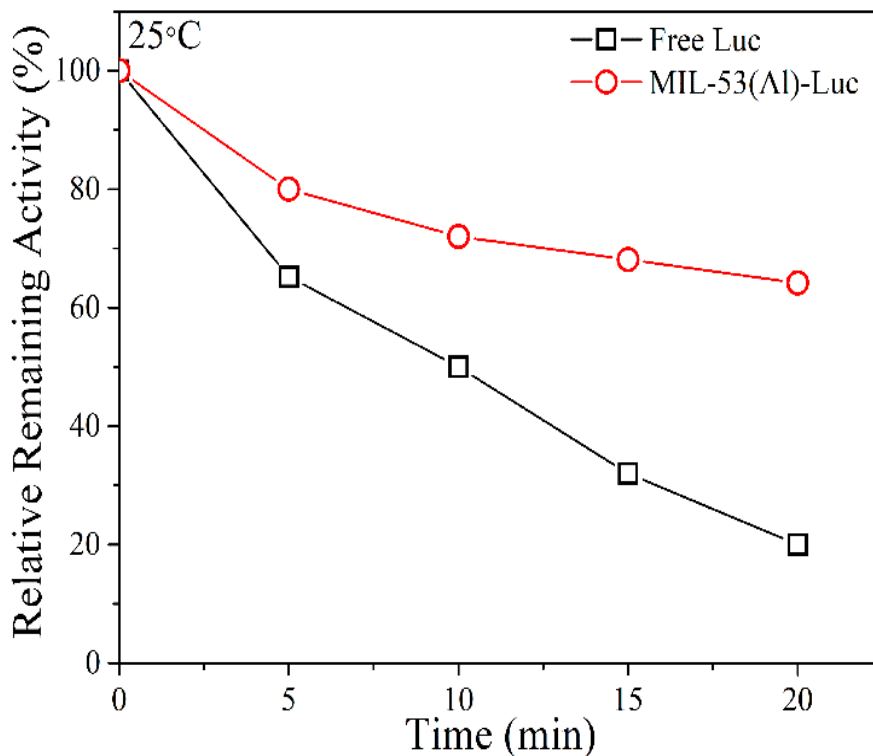
شکل (۳-۳۰) نمودار پایداری حرارتی آنزیم لوسیفرز تثبیت شده بر روی بستر آلومینیوم در $^{\circ}\text{C}$ ۲۵ را نشان می‌دهد. مقدار حفظ فعالیت پس از ۵ دقیقه حدود ۸۰ درصد و پس از ۲۰ دقیقه حدود ۶۵ درصد بوده است که این مقدار در مقایسه با اتصال کووالانسی آنزیم به بستر آهن در همین دما کمتر است. شکل (۳-۳۱) نیز مربوط به پایداری حرارتی لوسیفرز تثبیت شده در دمای $^{\circ}\text{C}$ ۳۰ می‌باشد. در این دما، پس از مدت زمان ۵ دقیقه آنزیم با سرعت بیشتری فعالیت خود را از دست می‌دهد. همچنین در شکل (۳-۳۲) که مربوط به پایداری حرارتی لوسیفرز تثبیت شده در دمای $^{\circ}\text{C}$ ۳۵ است یک کاهش شدید در مقدار فعالیت باقیمانده از زمان صفر آنزیم مشاهده می‌شود.

پایداری حرارتی به دست آمده در اثر تثبیت بیشتر ناشی از سختی و انعطاف پذیری مولکولی و نیز ناشی از ایجاد یک محیط حفاظت شده است. همچنین آثار انتشار درونی نیز سبب بهبود پایداری دمایی می‌شود. عامل دیگر در افزایش پایداری حرارتی آنزیم تثبیت شده در این پژوهش استفاده از بسترهای متخلخل بود که اندازه بهینه منافذ این بستر موجب پایداری و فعال بودن آنزیم تثبیت شده بود.

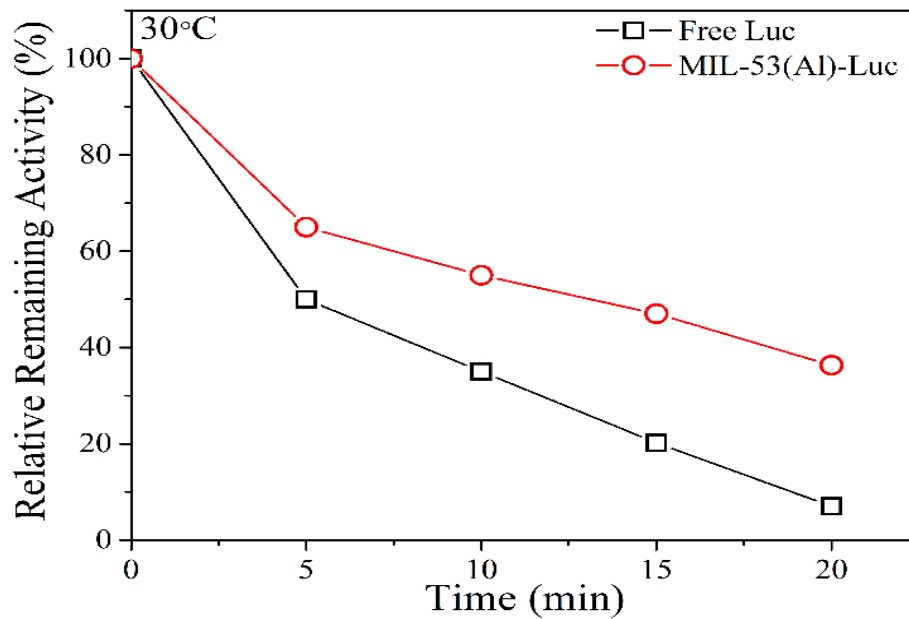
دلیل دیگر افزایش پایداری حرارتی آنزیم تثبیت شده، کاهش میزان آب در فاز تثبیت شده است. از آنجاکه آب نقش بسیار مهمی در برهمکنش‌های آب‌گریز دارد، دست‌کاری محیط و مقدار آب اطراف آنزیم تأثیر بسزایی بر میزان پایداری آنزیم دارد. کاهش میزان آب در فاز تثبیت شده سبب کاهش قطبیت محیط و تجمع هیدروفوبیک مولکول‌های پروتئینی که در واقع نیروی اصلی پایداری پروتئین‌ها در محلول‌های آبی است، می‌شود [۱۳۸، ۱۳۹].

برداشت آب از سامانه سبب کاهش تعداد کلی پیوندهای هیدروژنی بین مولکول آب و آنزیم می‌شود و پایداری پیوندهای هیدروژنی درون مولکولی و در نهایت افزایش سختی و انعطاف پذیری پروتئین را به دنبال دارد.

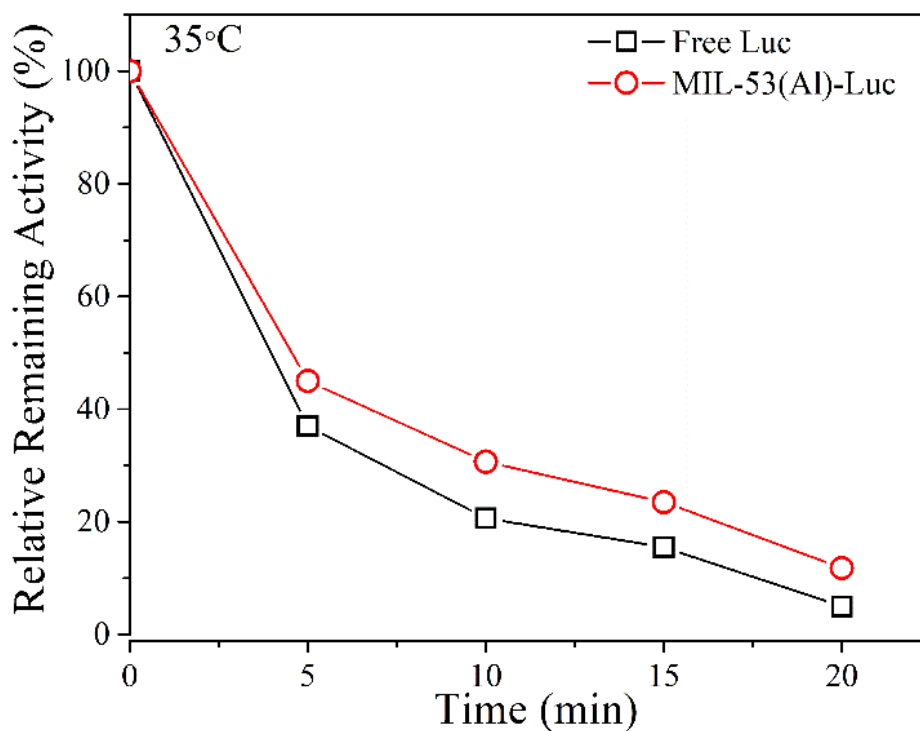
در تثبیت آنزیم با حلال‌هایی با ثابت دی‌الکتریک کم، پیوندهای هیدروژنی قوی‌تر می‌شود. وقتی پروتئین‌ها مدت‌زمان طولانی در دماهای بالا قرار می‌گیرند، دچار فرایند باز شدن حرارتی ساختمان می‌شوند که در نتیجه آن گروه‌های واکنشگر و نواحی هیدروفوب موجود در بخش درونی آنزیم در سطح قرار می‌گیرند که منجر به یک سری تغییرات شیمیایی برگشت‌پذیر از جمله انباشتگی و آشفستگی مولکولی می‌شود. این فرایندهای شیمیایی در دماهای بالا بسیار سریع انجام می‌شوند و سبب وقوع فرایندهایی مانند دامیناسیون زیر واحدهای آسپارژین و گلوتامین، هیدرولیز پیوندهای پپتیدی، تخریب پیوندهای دی‌سولفیدی، اکسیداسیون سیستئین، ایزومریزاسیون پرولین و گلایکوزیله شدن گروه‌های آمین می‌شود. از این رو انجام تمامی فرایندهای ذکر شده مستلزم حضور آب است و در محیط‌های بدون آب مانند فاز تثبیت‌شده رخ نمی‌دهد. افزون بر آن سختی و انعطاف‌پذیری پروتئین‌ها در فاز تثبیت‌شده مانع باز شدن برگشت‌پذیر آنزیم‌ها می‌شود. در نتیجه آنزیم‌های تثبیت‌شده پایداری حرارتی بیشتری نسبت به آنزیم‌های آزاد از خود نشان می‌دهند [۱۴۰].



شکل (۳-۳۰): نمودار پایداری حرارتی آنزیم لوسیفراز خالص با نام (Free Luc)، لوسیفراز تثبیت‌شده بر روی MIL-53(Al) با نام MIL-53(Al)-Luc در دمای ۲۵ °C



شکل (۳-۳۱): نمودار پایداری حرارتی آنزیم لوسیفرز خالص با نام (Free Luc)، لوسیفرز تثبیت شده بر روی MIL-53(Al) با نام MIL-53(Al)-Luc در دمای ۳۰°C

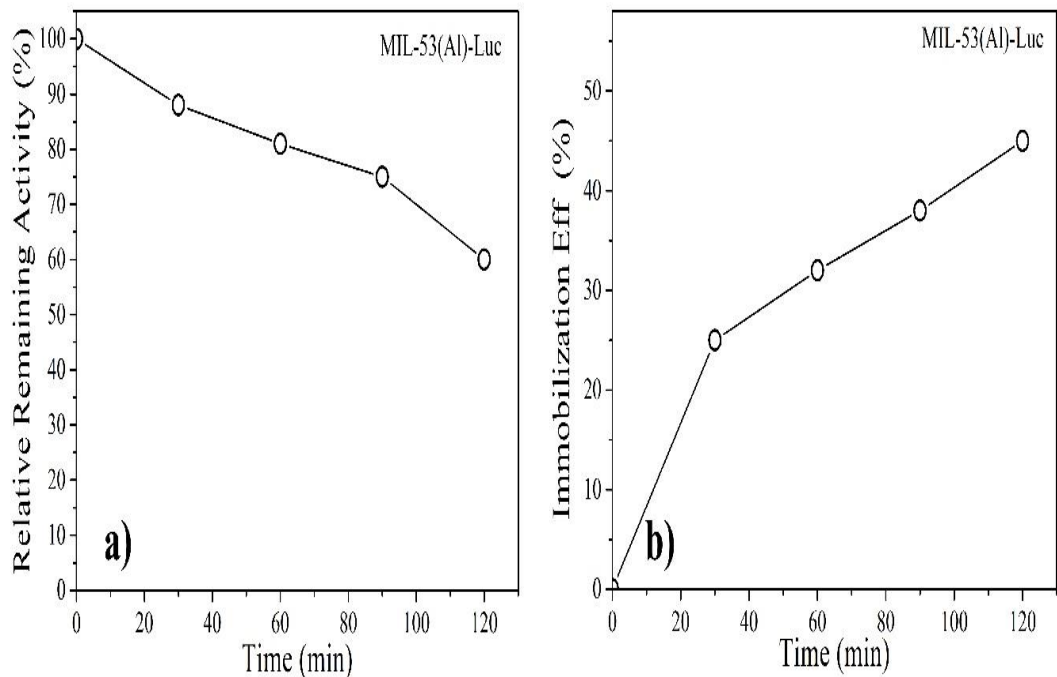


شکل (۳-۳۲): نمودار پایداری حرارتی آنزیم لوسیفرز خالص با نام (Free Luc)، لوسیفرز تثبیت شده بر روی MIL-53(Al) با نام MIL-53(Al)-Luc در دمای ۳۵°C

۱۳-۳ بررسی کارایی اتصال آنزیم

شکل (۳-۳۳) کارایی آنزیم تثبیت شده پس از مدت ۱۲۰ دقیقه و مقدار حفظ فعالیت آنزیم در همین مدت را نشان می‌دهد. پس از این مدت، لوسیفراز به میزان ۵۵ درصد به بستر متصل شده و حدود ۴۵ درصد نیز فعالیت خود را حفظ کرده است.

کارایی اتصال آنزیم در مورد بسترهای $\text{Fe-MIL-88}(\text{NH}_2)$ و $\text{MIL-53}(\text{Al})$ کمی با هم متفاوت است. با وجود حضور گروه‌های آمین در بستر آهن چون این گروه‌ها فعال نبوده و یا به‌وسیله کاتالیستی در محیط واکنش فعال نشده‌اند نمی‌توانند وارد واکنش کووالانسی با آنزیم شوند. این امر در مورد بستر آلومینیوم هم صادق است. این بستر نیز به دلیل عدم حضور گروه‌های فعال اتصالی توانایی تشکیل پیوند کووالانسی با آنزیم را حداقل به‌صورت تئوری ندارد. چنانچه مطالعات طیف‌سنجی مادون قرمز در ابتدای همین فصل نیز این نکته را نشان داد؛ اما تغییرات و جابجایی‌های پیک‌ها در طیف‌های IR و همچنین مطالعات پایداری آنزیم نشان می‌دهد لوسیفراز اگرچه به‌صورت کووالانسی و یا حتی درون مولکولی بر روی بسترها تثبیت نشده اما قطعاً از طریق برهمکنش‌های جذب سطحی و نیروهای هیدروفیل و هیدروفوبی این اتفاق افتاده است. نکته جالب و حائز اهمیت در مورد هر دو بستر آهن و آلومینیوم بدون لینکر و گروه فعال اتصالی این است که به‌احتمال قوی نیروهای هیدروفوبی و هیدروفیلی عامل اصلی اتصال لوسیفراز به آن‌ها بوده‌اند. بستر آلومینیوم با زاویه تماس برابر صفر درجه به‌عنوان یک بستر کاملاً هیدروفوب شناخته‌شده و به‌راحتی می‌تواند به جایگاه‌های هیدروفوب لوسیفراز متصل شود. همچنین بستر آهن نیز با دارا بودن گروه‌های آمین به‌عنوان بستری هیدروفیل می‌تواند به گروه‌های هیدروفیل لوسیفراز متصل شود. در این میان قطعاً اندرکنش‌های ضعیفی نیز میان گروه‌های عاملی مختلف در بسترها و لوسیفراز برقرار خواهد شد که خود مؤید اتصال از طریق جذب سطحی است [۱۴۱].

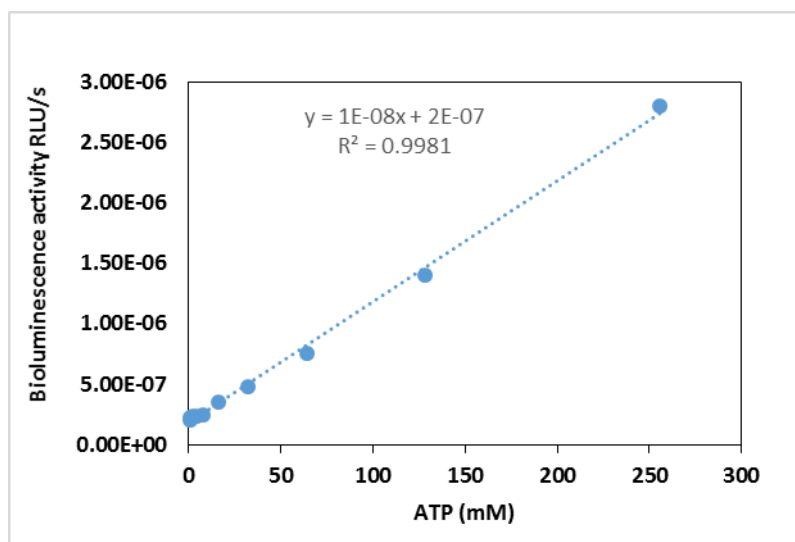


شکل (۳-۳۳): نمودارهای (a) پایداری آنزیم و (b) کارایی اتصال لوسیفراز تثبیت شده بر روی MIL-53(Al) با نام MIL-53(Al)-Luc

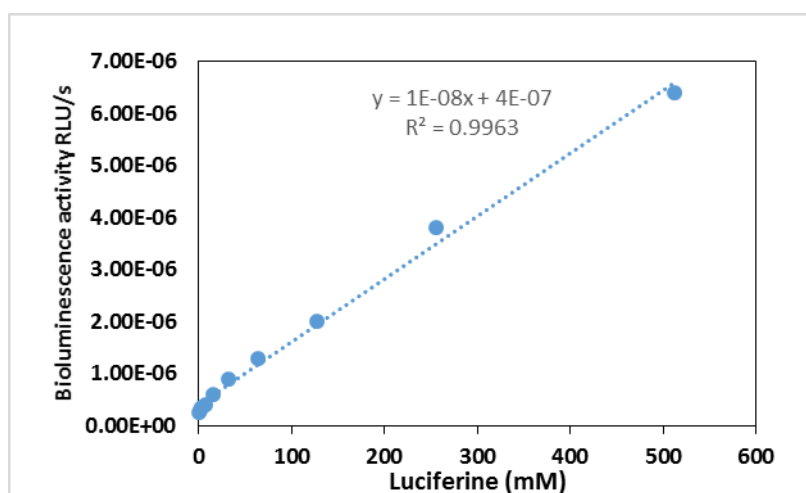
۳-۱۴ محاسبه مقادیر K_m و V_{max} نسبت به لوسیفرین و ATP

شکل‌های (۳-۳۴) و (۳-۳۵) مربوط به نمودارهای لاین ویوربرگ ترکیب MIL-53(Al) نسبت به ATP و لوسیفرین می‌باشد که داده‌های جدول (۳-۳) با توجه به معادله (۳-۱) از آن استخراج شده است.

با توجه به جدول (۳-۳) مقدار K_m نسبت به ATP ثابت و نسبت به لوسیفرین افزایش یافته است. افزایش K_m نسبت به لوسیفرین به معنای کاهش تمایل لوسیفراز نسبت به اتصال به لوسیفرین است. جایگاه فعال لوسیفرین در آنزیم لوسیفراز از خاصیت هیدروفوبی بسیار بالایی برخوردار است. همچنین با توجه به هیدروفوبیسیته بالای MIL-53(Al) اتصال این ترکیب از طریق نیروهای هیدروفوبی به جایگاه فعال مربوط به اتصال لوسیفرین در آنزیم لوسیفراز می‌تواند یکی از دلایل افزایش مقدار K_m باشد.



شکل (۳-۳۴): نمودار لاین ویوربرگ آنزیم لوسیفراز تثبیت شده بر روی MIL-53(Al) در غلظت‌های مختلف ATP



شکل (۳-۳۵): نمودار لاین ویوربرگ آنزیم لوسیفراز تثبیت شده بر روی MIL-53(Al) در غلظت‌های مختلف لوسیفرین

جدول (۳-۳): مقدار ثابت K_m برای آنزیم لوسیفراز خالص و MIL-53(AI)

	Km	
	ATP (μm)	Luciferin (μm)
Free luciferase	50 ± 2	9 ± 2
MIL-53(AI)-Luc	50 ± 2	25 ± 2.5

بخش سوم

۱۵-۳ بررسی خواص آنتی‌باکتریال، آنتی‌اکسیدانی و ضدسمیت Fe-MIL-88(NH₂) و MIL-53(AI)

آزمایش‌های مربوط به خواص ضد باکتری این ترکیبات بر روی دوسویه باکتری بیماری‌زای *E. Coli* و سودوموناس آئروژینوزا انجام شد. جدول (۳-۴) مقادیر MIC و MBC این ترکیبات را نشان می‌دهد. بر طبق نتایج این جدول، حداقل غلظت بازدارنده رشد برای هر دو ترکیب Fe-MIL-88(NH₂) و MIL-53(AI) نسبت به دوسویه باکتری *E. Coli* و سودوموناس کمتر از آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین و کانامایسین می‌باشد. در نتیجه در شرایط مشابه، این ترکیبات می‌تواند در تهیه آنتی‌بیوتیک‌های صنعتی مورد استفاده قرار بگیرند.

جدول (۳-۴): مقادیر MIC و MBC ترکیبات سنتز شده علیه دوسویه باکتری *E. Coli* و سودوموناس

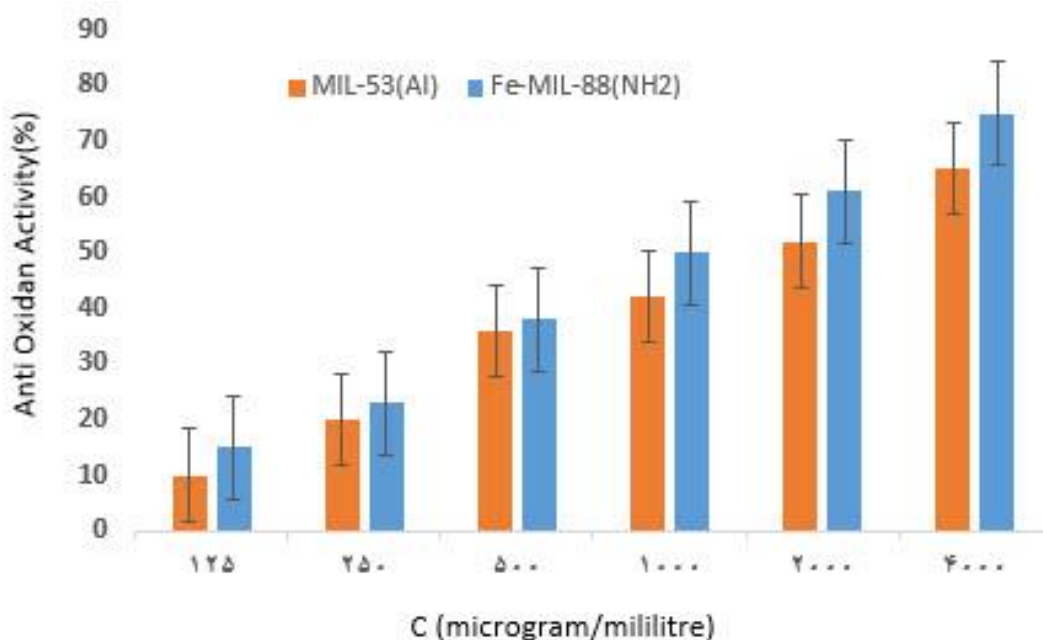
ردیف	ترکیب	سودوموناس آئروژینوزا			
		MIC	MBC	MIC	MBC
1	Fe-MIL- 88(NH ₂)	150	150	500	500
2	MIL-53(Al)	150	200	150	500
3	Tetracycline	256	500	31.25	60
4	Kanamycin	190	500	1000	-

آئروژینوزا در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین و کانامایسین

برای بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی ترکیبات به‌طور گسترده از دو روش DPPH (رادیکال ۲،۲-دی-فنیل-۱-پیکریل‌هیدرازیل) و ABTS (رادیکال ۲،۲-آزینویس (۳-اتیل‌بنزوتیازولین-سولفونات) که روش‌هایی سریع، ساده و ارزان قیمت هستند، استفاده می‌شود. به‌طور کلی خاصیت آنتی‌اکسیدانی به این معناست که یک ترکیب می‌تواند رادیکال‌های آزاد موجود در محیط را به دام انداخته و باعث کاهش در نوار جذب در ناحیه ۵۱۸ و ۷۳۴ نانومتر به ترتیب برای DPPH و ABTS شود؛ بنابراین فعالیت آنتی‌اکسیدان باعث کاهش سریع جذب می‌شود. در این بررسی روش DPPH که اکثراً در صنایع غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد، به‌کاررفته شد. DPPH یک رادیکال پایدار است که محلول متانولی آن بنفش‌رنگ است و بیشترین جذب نوری را در ۵۱۲ تا ۵۲۰ نانومتر از خود نشان می‌دهد. پایه و اساس این روش بدین گونه است که رادیکال DPPH به‌عنوان پذیرنده الکترون از یک مولکول اهداکننده مانند آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند در نتیجه آن DPPH به DPPH₂ تبدیل می‌شود. در این حالت رنگ بنفش محیط به رنگ زرد تبدیل شده و جذب در ۵۱۸ نانومتر کاهش می‌یابد. از روی

کاهش شدت جذب توسط روش طیفسنجی می‌توان به خاصیت آنتی‌اکسیدانی ترکیب پی برد [۱۴۲].

فعالیت آنتی‌اکسیدانی $\text{Fe-MIL-88}(\text{NH}_2)$ و $\text{MIL-53}(\text{Al})$ در غلظت‌های ۱۲۵-۴۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در ۵۱۸ نانومتر بررسی شد. ترکیبات $\text{Fe-MIL-88}(\text{NH}_2)$ و $\text{MIL-53}(\text{Al})$ به ترتیب در غلظت‌های ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر خاصیت آنتی‌اکسیدانی نسبتاً خوبی نشان دادند (شکل (۳-۳۶)).



شکل (۳-۳۶): نمودار بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی $\text{Fe-MIL-88}(\text{NH}_2)$ و $\text{MIL-53}(\text{Al})$

سمیت ترکیبات سنتز شده بر روی سلول‌های سرطانی HeLa، MDA-MB-468 و K562 که به ترتیب سلول‌های سرطان سینه و سلول‌های سرطانی خون هستند، با روش رنگ سنجی، با استفاده از رنگ تترازولیوم با نام شیمیایی 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium bromide که اختصاراً MTT نامیده می‌شود، در مقایسه با گروه‌های کنترل بررسی شد.

این روش بر فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز در میتوکندری سلول‌های زنده استوار است که طی آن محلول زرد رنگ MTT تحت تأثیر این آنزیم به کریستال‌های نامحلول فورمازان بنفش‌رنگ تبدیل می‌شود، جذب این کریستال‌ها بعد از حل کردن در DMSO با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر گزارش می‌شود. به‌طور خلاصه ۱۸۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی (2×10^4 سلول در هر میلی‌لیتر) در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید، سپس ۲۰ میکرولیتر غلظت‌های مختلف تهیه‌شده از ترکیبات به چاهک‌های حاوی سلول اضافه شد. دوکسوروبیسین با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. برای کنترل منفی از محیط کشت حاوی یک در صد DMSO استفاده گردید. میکروپلیت‌های حاوی سلول و ترکیبات به مدت ۴۸ ساعت در شرایط یکسان انکوبه شدند. سپس ۲۰ میکرولیتر محلول MTT (5 mg/ml) به هر چاهک اضافه گردید و به مدت ۳ ساعت دیگر انکوبه شد. آنگاه ۱۵۰ میکرولیتر DMSO جایگزین محیط کشت رویی سلول‌های انکوبه شده با MTT شد و برای حل کردن کریستال‌های فورمازان به‌آرامی پیپتاژ گردید. جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه الیزا ریدر (Awareness) سنجیده شد. درصد بقاء سلولی در گروه کنترل منفی ۱۰۰ منظور و درصد بقاء سلول‌هایی که تحت تأثیر غلظتی خاص از ترکیبات قرار گرفته‌اند با تقسیم جذب چاهک‌های تیمار شده به جذب کنترل منفی ضربدر ۱۰۰ محاسبه گردید. غلظتی از ترکیبات مورد آزمایش که درصد حیات سلولی را به نصف تقلیل دهد، به‌عنوان IC_{50} در نظر گرفته شد. [۱۴۳].

درصد سلول‌های زنده یا میزان بقای سلولی، بر اساس رابطه زیر محاسبه می‌گردد (معادله ۳-۲)

$$100 * \text{جذب متوسط نمونه‌های کنترل} / \text{جذب متوسط نمونه‌های تیمار شده} = \text{درصد سلول‌های}$$

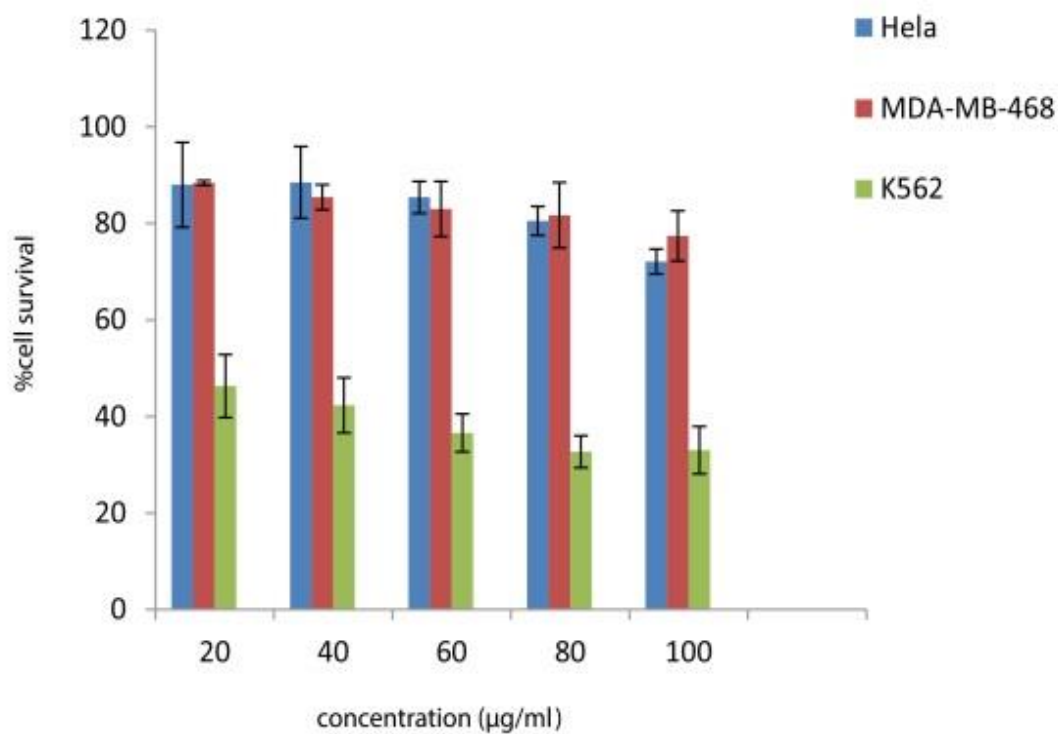
زنده

در این آزمون تعیین پارامترهای مؤثر بر نتیجه به‌دست‌آمده مهم و اساسی است. این پارامترها

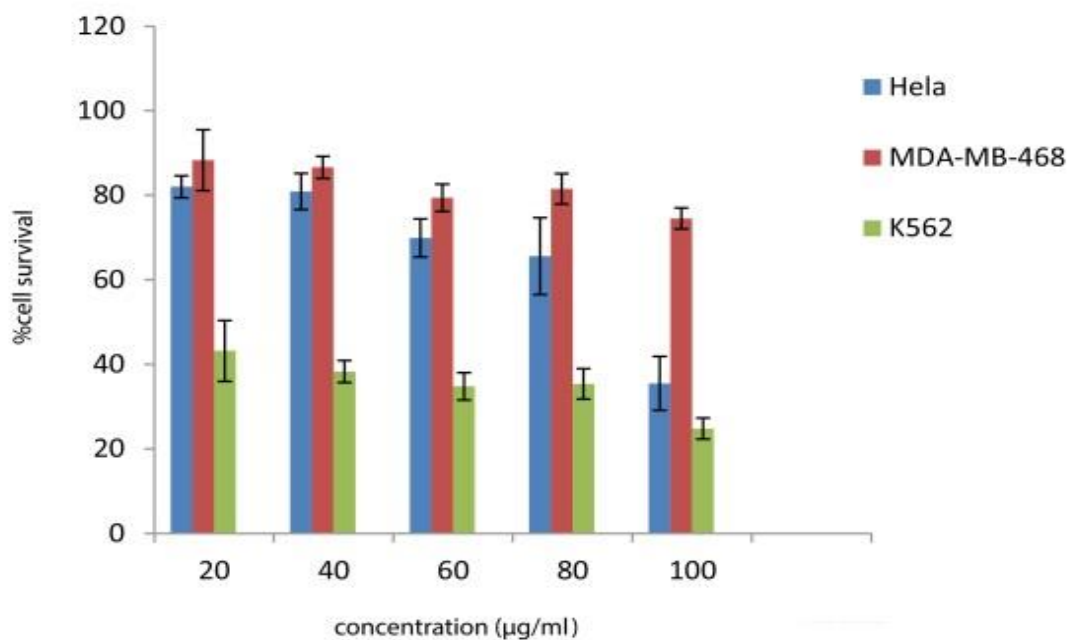
عبارت‌اند از:

- رده سلولی: سالم یا سرطانی
- تعداد سلول‌های کاشته شده در هر خانه از ظرف
- زمان تیمار: در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت.
- روش آماده‌سازی نمونه و استریل کردن آن

شکل‌های ۳-۳۷ و ۳-۳۸ نشان می‌دهند ترکیبات سنتز شده دارای سمیت متفاوتی بر روی هر ۳ رده سلولی موردنظر بودند. در رده سلولی K562 (رده سلول‌های سرطانی خون) در محدوده غلظت-های مورد بررسی (۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) هر دو ترکیب سنتزی به‌شدت سمی بودند، در حالی که هر دو بر روی رده سلولی HeLa (رده سلول سرطانی سینه) دارای اثری متوسط و بر روی رده سلولی MDA-MB-468 (رده سلول سرطان سینه) کمترین اثر را نشان دادند. این تفاوت می‌تواند به دلیل پاسخ متفاوت رده‌های سلولی به ترکیبات مختلف باشد که توسط محققین دیگر قبلاً بیان شده است. [۱۴۴].



شکل (۳-۳۷): نمودار سمیت Fe-MIL-88(NH₂) بر روی ۳ رده سلولی مورد آزمایش



شکل (۳-۳۸): نمودار سمیت MIL-53(Al) بر روی ۳ رده سلولی مورد آزمایش

در نهایت IC_{50} ترکیبات سنتز شده با استفاده از نمودار به صورت تقریبی برآورد گردید که این نتایج در جدول (۳-۵) آمده است.

جدول (۳-۵): IC_{50} تقریبی ترکیبات Fe-MIL-88(NH₂) و MIL-53(Al) بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر روی رده های سلولی HeLa، MDA-MB-468 و K562

ترکیبات	HeLa	MDA-MB-468	K562
Fe-MIL-88(NH ₂)	>۱۰۰	>۱۰۰	<۲۰
MIL-53(Al)	#۹۰	>۱۰۰	<۲۰

۳-۱۶ نتیجه گیری

با توجه به نتایج بدست آمده حاصل از تثبیت آنزیم بر روی سه بستر مذکور در دو بخش قبل می-توان گفت فرایند تثبیت آنزیم بر روی هر سه بستر معرفی شده با بازدهی بالا انجام شده است. اگرچه با نظر به نتایج کیفی و کمی و دلایلی که ذکر شد، تثبیت کووالانسی آنزیم بر روی بستر متصل شده با ترفتالدهید و همچنین Fe-MIL-88(NH₂) از بازدهی بیشتری نسبت به MIL-53(Al) برخوردار است.

به طور کلی و با توجه به مطالعات قبلی انجام شده در مورد تثبیت آنزیمها، فرایند تثبیت آنزیم بر روی بسترهای متصل شده با لینکرهای فعالی همچون اسید و دی آلدئیدها معمولا با موفقیت انجام می پذیرد. در بیشتر موارد گزارش شده از تثبیت کووالانسی آنزیم از دی آلدئید گلو تارالدهید استفاده شده است که پیوند آن با آمین بستر و آنزیم ناپایدار است. از این رو استفاده از ترفتالدهید ک گونه

آروماتیک گلوآرالدهید است، بعنوان لینکر استفاده شد. تثبیت آنزیم لوسیفرز بر روی بستر جدید Fe-MIL-88(NH₂)-terephthaldehyde سبب بهبود قابل ملاحظه (بیش از ۵۰ درصد) پارامترهای پایداری لوسیفرز شده است که این امر می‌تواند این آنزیم را به یک بیوسنسور قویتر و کاربردی‌تر در مصارف مختلف تبدیل کند. افزایش پایداری حرارتی لوسیفرز در اثر تثبیت، همچنین می‌تواند به بالا بردن کارایی این آنزیم در فرایندهای بیولوژیکی بسیار کمک کند. از طرفی، افزایش مقاومت در برابر تغییرات pH محیط نیز می‌تواند آنزیم لوسیفرز را به یک بیوسنسور سلولی با کارایی بالا تبدیل کند. مطالعات بیولوژیکی مربوط به Fe-MIL-88(NH₂) و MIL-53(Al) نشان دادند که این ترکیبات خاصیت آنتی باکتریال، آنتی اکسیدانی و ضد سمیت قابل توجه و تقریباً هم سطحی دارند و می‌توانند در فرایندهای ذکر شده به طور گسترده مورد استفاده قرار بگیرند.

به طور کلی تثبیت کووالانسی آنزیم اگرچه پرهزینه‌تر و زمانبرتر از تثبیت جذب سطحی است، ولی برای استفاده آنزیم در فرایندهای متنوع شیمیایی و بیولوژیکی پر بازده‌تر و به صرفه‌تر است. اما از آنجا که تثبیت جذب سطحی نیز سبب پایداری نسبی آنزیم لوسیفرز می‌شود، از هر کدام از این روش‌ها بر حسب نوع استفاده و کاربرد آنزیم می‌توان استفاده کرد.

۳-۱۷ پیشنهادات و آینده‌نگری

لوسیفرز به‌عنوان یک بیوسنسور با عملکرد بالا در زمینه‌های پزشکی و بیولوژیکی کاملاً شناخته شده است. از آنجا که بر طبق نتایج مندرج در این پژوهش فرایند تثبیت اثر مثبتی بر روی پایداری و بهبود خواص و ویژگی‌های این آنزیم داشته است، از گونه تثبیت شده آن با بررسی و اعمال شرایط آزمایشگاهی و محیطی می‌توان به میزان بیشتری در زمینه‌های ذکر شده استفاده کرد. همچنین از بسترهای سنتز شده مذکور با توجه به قابلیت آن‌ها در تثبیت آنزیم حساسی مثل لوسیفرز، می‌توان به میزان بیشتری در تثبیت و افزایش پایداری آنزیم‌های مشابه و پرکاربرد بهره برد.

- [1] Michailidis N., Tsouknidas A., Lefebvre L. P., Hipke T. and Kanetake, N. (2014) "Production, characterization, and applications of porous materials" **Adv. Mater. Sci. Eng.**, 2014.
- [2] Altavilla C., Ciliberto E., (2016) "Inorganic nanoparticles: synthesis, applications, and perspectives", CRC Press.
- [3] Max L.G., Song Z.X., (2004) "Nanoporous materials: science and engineering", World Scientific.
- [4] Bamrungsap S., Zhao Z., Chen T., Wang L., Li C., Fu T. and Tan W. (2012) "Nanotechnology in therapeutics: a focus on nanoparticles as a drug delivery system" **Nanomedicine**, 7, 8, pp 1253-1271.
- [5] Jeon G., Yang S. Y. and Kim J. K. (2012) "Functional nanoporous membranes for drug delivery" **J. Mater. Chem.**, 22, 30, pp 14814-14834.
- [6] Lee V. (1990) "Peptide and protein drug delivery", Vol. 4, Crc Press.
- [7] Cho K., Wang X. U. Nie, S. and Shin D. M. (2008) "Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer" **Clin. Cancer Res.**, 14, 5, pp 1310-1316.
- [8] Suzuki Y., Tanihara M., Nishimura Y., Suzuki K., Kakimaru Y. and Shimizu Y. (1998) "A new drug delivery system with controlled release of antibiotic only in the presence of infection" **J. Biomed. Mater. Res.**, 42, 1, pp 112-116.
- [9] Deshpande A. A., Rhodes C. T., Shah N. H. and Malick A. W. (1996) "Controlled-release drug delivery systems for prolonged gastric residence: an overview" **Drug Dev. Ind. Pharm.**, 22, 6, pp 531-539.
- [10] Nafee N., Youssef A., El-Gowell H., Asem H. and Kandil S. (2013) "Antibiotic-free nanotherapeutics: hypericin nanoparticles thereof for improved in vitro and in vivo antimicrobial photodynamic therapy and wound healing" **Int. J. Pharm.**, 454, 1, pp 249-258.

- [11] Catlow C. R. A., Van Speybroeck V. and van Santen R. (2017) “**Modelling and Simulation in the Science of Micro-and Meso-porous Materials**”, Elsevier.
- [12] Tiwari G., Tiwari R., Sriwastawa B., Bhati L., Pandey S., Pandey P. and Bannerjee S. K. (2012) “Drug delivery systems: An updated review” **Int. J. Pharm. Invest.**, **2**, **1**, pp 2.
- [13] Davis M. E., Chen Z. and Shin D. M. (2010) “**Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer**” In: Nanoscience And Technology: A Collection of Reviews from Nature Journals.
- [14] Uppadhyay A. K. and Dixit V. K. (1998) “Bioadhesive liposomes bearing levonorgestrel as controlled drug delivery system” **Die Pharmazie**, **53**, **6**, pp 421.
- [15] Isaeva V. I. and Kustov L. M. (2010) “The application of metal-organic frameworks in catalysis” **Pet. Chem.**, **50**, **3**, pp 167-180.
- [16] Wang L., Zheng M. and Xie Z. (2018) “Nanoscale metal–organic frameworks for drug delivery: a conventional platform with new promise” **J. Mater. Chem. B**, **6**, **5**, pp 707-717.
- [17] Kuppler R. J., Timmons D. J., Fang Q. R., Li J. R., Makal T. A., Young M. D., Yuan D., Zhao D., Zhuang W. and Zhou H. C. (2009) “Potential applications of metal-organic frameworks” **Coord. Chem. Rev.**, **253**, **23-24**, pp 3042-3066.
- [18] Zou Z., Li S., He D., He X., Wang K., Li L., Yang X. and Li H. (2017) “A versatile stimulus-responsive metal–organic framework for size/morphology tunable hollow mesoporous silica and pH-triggered drug delivery” **J. Mater. Chem. B**, **5**, **11**, pp 2126-2132.
- [19] Dhakshinamoorthy A., Asiri A. M. and Garcia H. (2017) “Tuneable nature of metal organic frameworks as heterogeneous solid catalysts for alcohol oxidation” **Chem. Commun.**, **53**, **79**, pp 10851-10869.
- [20] Lee Y. R., Kim J. and Ahn, W. S. (2013) “Synthesis of metal-organic frameworks: A mini review” **Korean J. Chem. Eng.**, **30**, **9**, pp 1667-1680.
- [21] Butova V. V. E., Soldatov M. A., Guda A. A., Lomachenko K. A. and Lamberti C. (2016) “Metal-organic frameworks: structure, properties, methods of synthesis and characterization” **Russ. Chem. Rev.**, **85**, **3**, pp 280.

- [22] Alhamami M., Doan H. and Cheng C. H. (2014) “A review on breathing behaviors of metal-organic-frameworks (MOFs) for gas adsorption” **Materials**, **7**, **4**, pp **3198-3250**.
- [23] Ma M., Bétard A., Weber I., Al-Hokbany N. S., Fischer R. A. and Metzler-Nolte N. (2013) “Iron-based metal-organic frameworks MIL-88B and NH₂-MIL-88B: high quality microwave synthesis and solvent-induced lattice “breathing”” **Cryst. Growth Des.**, **13**, **6**, pp **2286-2291**.
- [24] Schneemann A., Bon V., Schwedler I., Senkovska I., Kaskel S. and Fischer R. A. (2014) “Flexible metal-organic frameworks” **Chem. Soc. Rev.**, **43**, **16**, pp **6062-6096**.
- [25] Howarth A. J., Liu Y., Li P., Li Z., Wang T. C., Hupp J. T. and Farha O. K. (2016) “Chemical, thermal and mechanical stabilities of metal-organic frameworks” **Nat. Rev. Mater.**, **1**, **3**, pp **15018**.
- [26] Bosch M., Zhang M. and Zhou H. C. (2014) “Increasing the stability of metal-organic frameworks” **Adv. Chem.**, **2014**.
- [27] Burtch N. C., Jasuja H. and Walton K. S. (2014) “Water stability and adsorption in metal-organic frameworks” **Chem. Rev.**, **114**, **20**, pp **10575-10612**.
- [28] Ford D. C., Dubbeldam D., Snurr R. Q., Künzel V., Wehring M., Stallmach F., Kärger J. and Müller U. (2012) “Self-diffusion of chain molecules in the metal-organic framework IRMOF-1: simulation and experiment” **J. Phys. Chem. Lett.**, **3**, **7**, pp **930-933**.
- [29] Catlow C. R. A., Van Speybroeck V. and van Santen R. (2017) “**Modelling and Simulation in the Science of Micro-and Meso-porous Materials**”, Elsevier.
- [30] Stock N. and Biswas S. (2011) “Synthesis of metal-organic frameworks (MOFs): routes to various MOF topologies, morphologies, and composites” **Chem. Rev.**, **112**, **2**, pp **933-969**.
- [31] Vaid T. P., Kelley S. P. and Rogers R. D. (2017) “Structure-directing effects of ionic liquids in the ionothermal synthesis of metal-organic frameworks” **IUCrJ**, **4**, **4**, pp **380-392**.
- [32] Morris R. E. (2009) Ionothermal synthesis—ionic liquids as functional solvents in the preparation of crystalline materials. **Chem. Commun.**, **21**, pp **2990-2998**.

- [33] Klinowski J., Paz F. A. A., Silva P. and Rocha J. (2011) "Microwave-assisted synthesis of metal–organic frameworks" **Dalton Trans.**, **40**, **2**, pp **321-330**.
- [34] Park H. J., Lim D. W., Yang W. S., Oh T. R. and Suh M. P. (2011) "A Highly Porous Metal–Organic Framework: Structural Transformations of a Guest-Free MOF Depending on Activation Method and Temperature" **Chem. - Eur. J.**, **17**, **26**, pp **7251-7260**.
- [35] Peng L., Zhang J., Xue Z., Han B., Sang X., Liu C. and Yang G. (2014) "Highly mesoporous metal–organic framework assembled in a switchable solvent" **Nat. Commun.**, **5**, pp **4465**.
- [36] Zhang A., Zhang Q., Bai H., Li L. and Li J. (2014) "Polymeric nanoporous materials fabricated with supercritical CO₂ and CO₂-expanded liquids" **Chem. Soc. Rev.**, **43**, **20**, pp **6938-6953**.
- [37] Jiao L., Wang Y., Jiang H. L. and Xu Q. (2018) "Metal–organic frameworks as platforms for catalytic applications" **Adv. Mater.**, **30**, **37**, pp **1703663**.
- [38] Amidon W. J., Pfeil J. E. and Susannah G. A. L. (1999) "Modification of luciferase to be a substrate for plant aspartic proteinase" **Biochem. J.**, **343**, **2**, pp **425-433**.
- [39] Viviani V. R. (2002) "The origin, diversity, and structure function relationships of insect luciferases" **Cell. Mol. Life Sci.**, **59**, **11**, pp **1833-1850**.
- [40] McDermott F. A. (1911) "The stability of the photogenic material of the Lampyridae and its probable chemical nature" **J. Am. Chem. Soc.**, **33**, **11**, pp **1791-1797**.
- [41] Meighen E. A. (1991) "Molecular biology of bacterial bioluminescence" **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, **55**, **1**, pp **123-142**.
- [42] Baldwin T. O. (1996) "Firefly luciferase: the structure is known, but the mystery remains" **Structure**, **4**, **3**, pp **223-228**.
- [43] Prosser C. L. (1991) "**Comparative animal physiology, environmental and metabolic animal physiology**" John Wiley & Sons.
- [44] Fan F. and Wood, K. V. (2007) "Bioluminescent assays for high-throughput screening" **Assay Drug Dev. Technol.**, **5**, **1**, pp **127-136**.
- [45] Widder E. A. (2010) "Bioluminescence in the ocean: origins of biological, chemical, and ecological diversity" **Science**, **328**, **5979**, pp **704-708**.

- [46] Green A. A. and McElroy W. D. (1956) "Crystalline firefly luciferase" **Biochim. Biophys. Acta**, **20**, pp 170-176.
- [47] Branchini B. R., Marschner T. M. and Montemurro A. M. (1980) "A convenient affinity chromatography-based purification of firefly luciferase" **Anal. Biochem.**, **104**, **2**, pp 386-396.
- [48] Rajgopal S. and Vijayalakshmie M. (1982) "Purification of luciferase by affinity elution chromatography on Blue Dextran columns: comparison of Sepharose and silica as support matrices" **J. Chromatogr. A**, **243**, **1**, pp 164-167.
- [49] Kajiyama N., Masuda T., Tatsumi H. and Nakano E. (1992) "Purification and characterization of luciferases from fireflies, *Luciola cruciata* and *Luciola lateralis*" **Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol.**, **1120**, **2**, pp 228-232.
- [50] De Wet J. R., Wood K. V., Helinski D. R. and DeLuca, M. (1985) "Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*" **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **82**, **23**, pp 7870-7873.
- [51] De Wet J. R., Wood K. V., DeLuca M., Helinski D. R. and Subramani S. (1987) "Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells" **Mol. Cell. Biol.**, **7**, **2**, pp 725-737.
- [52] Conti E., Franks N. P. and Brick P. (1996) "Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes" **Structure**, **4**, **3**, pp 287-298.
- [53] Marques S. M. and Esteves da Silva J. C. (2009) "Firefly bioluminescence: a mechanistic approach of luciferase catalyzed reactions" **IUBMB life**, **61**, **1**, pp 6-17.
- [54] Keller G. A., Gould S., Deluca M. and Subramani S. (1987) "Firefly luciferase is targeted to peroxisomes in mammalian cells" **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **84**, **10**, pp 3264-3268.
- [55] Adamczyk M., Moore J. A. and Shreder K. (2002) "Dual analyte detection using tandem flash luminescence" **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, **12**, **3**, pp 395-398.
- [56] McElroy W. D. (1947) "The energy source for bioluminescence in an isolated system" **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, **33**, **11**, pp 342.

- [57] McElroy W. D. (1951) "Properties of the reaction utilizing adenosinetriphosphate for bioluminescence" **J. Biol. Chem.**, **191**, **2**, pp **547-557**.
- [58] McElroy W. D. and Green A. (1956) "Function of adenosine triphosphate in the activation of luciferin" **Arch. Biochem. Biophys.**, **64**, **2**, pp **257-271**.
- [59] Nelson D. L., Lehninger A. L. and Cox M. M. (2008) "**Lehninger principles of biochemistry**" Macmillan.
- [60] DeLuca M. and McElroy W. D. (1974) "Kinetics of the firefly luciferase catalyzed reactions" **Biochemistry**, **13**, **5**, pp **921-925**.
- [61] Wilson T. and Hastings J. W. (1998) "Bioluminescence" **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, **14**, **1**, pp **197-230**.
- [62] Rhodes W. C. and McElroy W. D. (1958) "The synthesis and function of luciferyl-adenylate and oxyluciferyl-adenylate" **J. Biol. Chem.**, **233**, **6**, pp **1528-1537**.
- [63] Seliger H. H. and McElroy W. D. (1962) "Chemiluminescence of firefly luciferin without enzyme" **Science**, **138**, **3541**, pp **683-685**.
- [64] Branchini B. R., Ablamsky D. M., Murtiashaw M. H., Uzasci L., Fraga H. and Southworth T. L. (2007) "Thermostable red and green light-producing firefly luciferase mutants for bioluminescent reporter applications" **Anal. Biochem.**, **361**, **2**, pp **253-262**.
- [65] Fraga H., Esteves da Silva J. C. and Fontes R. (2004) "Identification of luciferyl adenylate and luciferyl coenzyme A synthesized by firefly luciferase" **ChemBioChem**, **5**, **1**, pp **110-115**.
- [66] Seliger H. H., McElroy W. D., White E. H. and Field G. F. (1961) "Stereospecificity and firefly bioluminescence, a comparison of natural and synthetic luciferins" **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, **47**, **8**, pp **1129**.
- [67] Fraga H., Fernandes D., Novotny J., Fontes R. and Esteves da Silva J. C. (2006) "Firefly luciferase produces hydrogen peroxide as a coproduct in dehydroluciferyl adenylate formation" **ChemBioChem**, **7**, **6**, pp **929-935**.
- [68] Airth R. L., Rhodes W. C. and McElroy W. D. (1958) "The function of coenzyme A in luminescence" **Biochim. Biophys. Acta**, **27**, pp **519-532**.
- [69] Fontes R., Dukhovich A., Sillero A. and Sillero M. A. G. (1997) "Synthesis of dehydroluciferin by firefly luciferase: effect of dehydroluciferin, coenzyme A and

- nucleoside triphosphates on the luminescent reaction” **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **237**, **2**, pp 445-450.
- [70] Fraga H., Fernandes D., Fontes R. and Esteves da Silva J. C. (2005) “Coenzyme A affects firefly luciferase luminescence because it acts as a substrate and not as an allosteric effector” **The FEBS journal**, **272**, **20**, pp 5206-5216.
- [71] Fraga H., da Silva J. C. E. and Fontes R. (2004) “Chemical synthesis and firefly luciferase produced dehydroluciferyl-coenzyme A.” **Tetrahedron Lett.**, **45**, **10**, pp 2117-2120.
- [72] Nakamura M., Maki S., Amano Y., Ohkita Y., Niwa K., Hirano T., Ohmiya Y. and Niwa, H. (2005) “Firefly luciferase exhibits bimodal action depending on the luciferin chirality” **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **331**, **2**, pp 471-475.
- [73] Lembert N. (1996) “Firefly luciferase can use L-luciferin to produce light” **Biochem. J.**, **317**, **1**, pp 273-277.
- [74] McElroy W. D., DeLuca M. and Travis J. (1967) “Molecular uniformity in biological catalyses” **Science**, **157**, **3785**, pp 150-160.
- [75] Oba Y., Ojika M. and Inouye S. (2003) “Firefly luciferase is a bifunctional enzyme: ATP-dependent monooxygenase and a long chain fatty acyl-CoA synthetase” **FEBS lett.**, **540**, **1-3**, pp 251-254.
- [76] Day J. C., Tisi L. C. and Bailey M. J. (2004) “Evolution of beetle bioluminescence: the origin of beetle luciferin” **Luminescence: The journal of biological and chemical luminescence**, **19**, **1**, pp 8-20.
- [77] Ueda I. and Suzuki A. (1998) “Is there a specific receptor for anesthetics? Contrary effects of alcohols and fatty acids on phase transition and bioluminescence of firefly luciferase” **Biophys. J.**, **75**, **2**, pp 1052-1057.
- [78] Sudhaharan T. and Reddy A. R. (1999) “A bifunctional luminogenic substrate for two luminescent enzymes: firefly luciferase and horseradish peroxidase” **Anal. Biochem.**, **271**, **2**, pp 159-167.
- [79] Karp M. and Oker-Blom C. (1999) “A streptavidin–luciferase fusion protein: comparisons and applications” **Biomol. Eng.**, **16**, **1-4**, pp 101-104.
- [80] Casadei J., Powell M. J. and Kenten J. H. (1990) “Expression and secretion of aequorin as a chimeric antibody by means of a mammalian expression vector” **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **87**, **6**, pp 2047-2051.

- [81] Thoden J. B., Holden H. M., Fisher A. J., Sinclair J. F., Wesenberg G., Baldwin T. O. and Rayment I. (1997) "Structure of the β 2 homodimer of bacterial luciferase from *Vibrio harveyi*: X-ray analysis of a kinetic protein folding trap" **Protein Sci.**, **6**, **1**, pp 13-23.
- [82] Alipour B. S., Hosseinkhani S., Nikkhah M., Naderi-Manesh H., Chaichi M. J. and Osaloo S. K. (2004) "Molecular cloning, sequence analysis, and expression of a cDNA encoding the luciferase from the glow-worm, *Lampyrus turkestanicus*" **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **325**, **1**, pp 215-222.
- [83] Emamzadeh A. R., Hosseinkhani S., Sadeghizadeh M., Nikkhah M., Chaichi M. J., and Mortazavi, M. (2006) "cDNA cloning, expression and homology modeling of a luciferase from the firefly *Lampyroidea maculate*" **BMB Rep.**, **39**, **5**, pp 578-585.
- [84] Baldwin T. O. and Ziegler M. M. (1992) "The biochemistry and molecular biology of bacterial bioluminescence" **Chem. Biochem. Flavoenzymes**, **3**, pp 467-530.
- [85] Shimomura O. (1985) "Bioluminescence in the sea: photoprotein systems" In: Symposia of the Society for Experimental Biology, Vol. 39, pp 351-372.
- [86] Lawrence J. F. (1995) "Families and subfamilies of Coleoptera (with selected genera, notes, references and data on family-group name)" **Biology, phylogeny, and classification of Coleoptera**, **2**, pp 779-1006.
- [87] Wood K. V. (1995) "The chemical mechanism and evolutionary development of beetle bioluminescence" **Photochem. Photobiol.**, **62**, **4**, pp 662-673.
- [88] Roda A., Pasini P., Mirasoli M., Michelini E. and Guardigli M. (2004) "Biotechnological applications of bioluminescence and chemiluminescence" **Trends Biotechnol.**, **22**, **6**, pp 295-303.
- [89] Issad T., Boute N. and Pernet K. (2002) "A homogenous assay to monitor the activity of the insulin receptor using Bioluminescence Resonance Energy Transfer" **Biochem. Pharmacol.**, **64**, **5-6**, pp 813-817.
- [90] Germain-Desprez D., Bazinet M., Bouvier M. and Aubry M. (2003) "Oligomerization of transcriptional intermediary factor 1 regulators and interaction with ZNF74 nuclear matrix protein revealed by bioluminescence resonance energy transfer in living cells" **J. Biol. Chem.**, **278**, **25**, pp 22367-22373.

- [91] Moore K. J., Turconi S., Miles-Williams A., Djaballah H., Hurskainen P., Harrop J., Murray K.J. and Pope A. J. (1999) "A homogenous 384-well high throughput screen for novel tumor necrosis factor receptor: ligand interactions using time resolved energy transfer" **J. Biomol. Screening**, **4**, **4**, pp 205-214.
- [92] Roda A., Pasini P., Musiani M., Girotti S., Baraldini M., Carrea G. and Suozzi, A. (1996) "Chemiluminescent low-light imaging of biospecific reactions on macro-and microsamples using a videocamera-based luminograph" **Anal. Biochem.**, **68**, **7**, pp 1073-1080.
- [93] Roda A., Pasini P., Baraldini M., Musiani M., Gentilomi G. and Robert C. (1998) "Chemiluminescent imaging of enzyme-labeled probes using an optical microscope–videocamera luminograph" *Analytical biochemistry*, **257**, **1**, pp 53-62.
- [94] Blum L. J., Gautier S. M. and Coulet P. R. (1989) "Design of luminescence photobiosensors" **J. Biolumin. Chemilumin.**, **4**, **1**, pp 543-550.
- [95] Roda A., Girotti S., Grigolo B., Ghini S., Carrea G., Bovara R., Zini I. and Grimaldi R. (1991) "Microdialysis and luminescent probe: analytical and clinical aspects" **Biosens. Bioelectron.**, **6**, **1**, pp 21-29.
- [96] Liu Y. L., Zhao X. J., Yang X. X. and Li Y. F. (2013) "A nanosized metal–organic framework of Fe-MIL-88NH₂ as a novel peroxidase mimic used for colorimetric detection of glucose" **Analyst**, **138**, **16**, pp 4526-4531.
- [97] Mounfield III W. P. and Walton K. S. (2015) "Effect of synthesis solvent on the breathing behavior of MIL-53 (Al)" **J. Colloid Interface Sci.**, **447**, pp 33-39.
- [98] Wahler D. and Reymond J. L. (2001) "Novel methods for biocatalyst screening" **Curr. Opin. Chem. Biol.**, **5**, **2**, pp 152-158.
- [99] Handelsman J., Rondon M. R., Brady S. F., Clardy J. and Goodman R. M. (1998) "Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products" **Chem. Biol.**, **5**, **10**, pp R245-R249.
- [100] Baltz R. H., Demain A. L. and Davies J. E. (2010) "**Manual of industrial microbiology and biotechnology**" American Society for Microbiology Press.
- [101] Zhang T. Z., Lu Y., Li Y. G., Zhang Z., Chen W. L., Fu H. and Wang E. B. (2012) "Metal–organic frameworks constructed from three kinds of new Fe-containing secondary building units" **Inorg. Chim. Acta**, **384**, pp 219-224.

- [102] Ma M., Bétard A., Weber I., Al-Hokbany N. S., Fischer R. A. and Metzler-Nolte N. (2013) "Iron-based metal-organic frameworks MIL-88B and NH₂-MIL-88B: high quality microwave synthesis and solvent-induced lattice "breathing" **Cryst. Growth Des.**, **13**, **6**, pp 2286-2291.
- [103] Pham M. H., Vuong G. T., Vu A. T. and Do T. O. (2011) "Novel route to size-controlled Fe-MIL-88B-NH₂ metal-organic framework nanocrystals" **Langmuir**, **27**, **24**, pp 15261-15267.
- [104] Shi L., Wang T., Zhang H., Chang K., Meng X., Liu H. and Ye J. (2015) "An amine-functionalized iron (III) metal-organic framework as efficient visible-light photocatalyst for Cr (VI) reduction" **Adv. Sci.**, **2**, **3**, pp 1500006.
- [105] Liu Y. L., Zhao X. J., Yang X. X. and Li Y. F. (2013) "A nanosized metal-organic framework of Fe-MIL-88NH₂ as a novel peroxidase mimic used for colorimetric detection of glucose" **Analyst**, **138**, **16**, pp 4526-4531.
- [106] Shi L., Wang T., Zhang H., Chang K., Meng X., Liu H. and Ye J. (2015) "An amine-functionalized iron (III) metal-organic framework as efficient visible-light photocatalyst for Cr (VI) reduction" **Adv. Sci.**, **2**, **3**, pp 1500006.
- [107] Lyu F., Zhang Y., Zare R. N., Ge J. and Liu Z. (2014) "One-pot synthesis of protein-embedded metal-organic frameworks with enhanced biological activities" **Nano Lett.**, **14**, **10**, pp 5761-5765.
- [108] Gangu K. K., Maddila S., Mukkamala S. B. and Jonnalagadda S. B. (2016) "A review on contemporary Metal-Organic Framework materials" **Inorg. Chim. Acta**, **446**, pp 61-74.
- [109] Zhu Y., Jiang Z., Zhang L., Shi J. and Yang D. (2011) "Sol-Gel derived boehmite as an efficient and robust carrier for enzyme encapsulation" **Ind. Eng. Chem. Res.**, **51**, **1**, pp 255-261.
- [110] Kelly C. J., Bienkowski P. R. and Sayler G. S. (2000) "Kinetic analysis of a tod-lux bacterial reporter for toluene degradation and trichloroethylene cometabolism" **Biotechnol. Bioeng.**, **69**, **3**, pp 256-265.
- [111] Deo S. K., Lewis J. C. and Daunert S. (2000) "Bioluminescence detection of proteolytic bond cleavage by using recombinant aequorin" **Anal. Biochem.**, **281**, **1**, pp 87-94.

- [112] Wang M., Zhang X., Zhou L. and Chen Y. (2016) “Activated MIL-53 (Al) for Efficient Adsorption of Dichloromethane and Trichloromethane” **Aerosol Air Qual. Res.**, **16**, **8**, pp 2003-2010.
- [113] Rahmani E. and Rahmani M. (2017) “Al-Based MIL-53 metal organic framework (MOF) as the new catalyst for Friedel–Crafts alkylation of benzene” **Ind. Eng. Chem. Res.**, **57**, **1**, pp 169-178.
- [114] Horcajada P., Salles F., Wuttke S., Devic T., Heurtaux D., Maurin G., Vimont A., Daturi M., David O., Magnier E. and Stock N. (2011) “How linker’s modification controls swelling properties of highly flexible iron (III) dicarboxylates MIL-88” **J. Am. Chem. Soc.**, **133**, **44**, pp 17839-17847.
- [115] Obzturk B. (2001) MSc dissertation “**Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on hydrophobic and hydrophilic supports**” Izmir (Turkey): Izmir Institute of Technology.
- [116] Dandavate V., Keharia H. and Madamwar D. (2009) “Ethyl isovalerate synthesis using *Candida rugosa* lipase immobilized on silica nanoparticles prepared in nonionic reverse micelles” **Process Biochem.**, **44**, **3**, pp 349-352.
- [117] Migneault I., Dartiguenave C., Bertrand M. J. and Waldron K. C. (2004) “Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking” **Biotechniques**, **37**, **5**, pp 790-802.
- [118] Gopinath S. and Sugunan S. (2004) “Leaching studies over immobilized α -amylase. importance of the nature of enzyme attachment” **React. Kinet. Catal. Lett.**, **83**, **1**, pp 79-83.
- [119] Gouda M. D., Singh S. A., Rao A. A., Thakur M. S. and Karanth N. G. (2003) “Thermal inactivation of glucose oxidase mechanism and stabilization using additives” **J. Biol. Chem.**, **278**, **27**, pp 24324-24333.
- [120] Gu Z. G., Bürck J., Bihlmeier A., Liu J., Shekhah O., Weidler P. G., Azucena C., Wang Z., Heissler S., Gliemann H. and Klopffer W. (2014) “Oriented Circular Dichroism Analysis of Chiral Surface-Anchored Metal–Organic Frameworks Grown by Liquid-Phase Epitaxy and upon Loading with Chiral Guest Compounds” **Chem. - Eur. J.**, **20**, **32**, pp 9879-9882.

- [121] Guzik U., Hupert-Kocurek K. and Wojcieszńska D. (2014) "Immobilization as a strategy for improving enzyme properties-application to oxidoreductases" **Molecules**, **19**, **7**, pp **8995-9018**.
- [122] Amalia P., Suhartati T. and Hadi S. (2013) "Effect of Immobilization Towards Thermal Stability of α -Amylase Isolated from Locale Bacteria Isolate *Bacillus subtilis* ITBCCB148 with Calcium Alginate" **Asian J. Chem.**, **25**, **12**.
- [123] Markoglou N. and Wainer I. W. (2003) "Immobilized enzyme reactors in liquid chromatography: On-line bioreactors for use in synthesis and drug discovery" **Handb. Anal. Sep.**, **4**, pp **215-234**.
- [124] Li Z. F., Kang E. T., Neoh K. G. and Tan K. L. (1998) "Covalent immobilization of glucose oxidase on the surface of polyaniline films graft copolymerized with acrylic acid" **Biomaterials**, **19**, **1-3**, pp **45-53**.
- [125] Goldstein L., Levin Y. and Katchalski E. (1964) "A water-insoluble polyanionic derivative of trypsin. II. Effect of the polyelectrolyte carrier on the kinetic behavior of the bound trypsin" **Biochemistry**, **3**, **12**, pp **1913-1919**.
- [126] Denburg J. L., Lee R. T. and McElroy W. D. (1969) "Substrate-binding properties of firefly luciferase: I. Luciferin-binding site" **Arch. Biochem. Biophys.**, **134**, **2**, pp **381-394**.
- [127] Yousefi-Nejad M., Hosseinkhani S., Khajeh K. and Ranjbar B. (2007) "Expression, purification and immobilization of firefly luciferase on alkyl-substituted Sepharose 4B" **Enzyme Microb. Technol.**, **40**, **4**, pp **740-746**.
- [128] Marron-Brignone L., Moréllis R. M., Blum L. J. and Coulet P. R. (1996) "Behaviour of firefly luciferase associated with Langmuir-Blodgett films" **Thin Solid Films**, **284**, pp **784-788**.
- [129] Ugarova N. N., Brovko L. Y. and Beliaieva E. I. (1983) "Immobilization of luciferase from the firefly *Luciola mingrelica*: catalytic properties and thermostability of the enzyme immobilized on cellulose films" **Enzyme Microb. Technol.**, **5**, **1**, pp **60-64**.
- [130] Ribeiro A. R., Santos R. M., Rosário L. M. and Gil M. H. (1998) "Immobilization of luciferase from a firefly lantern extract on glass strips as an alternative strategy for luminescent detection of ATP" **J. Biolumin. Chemilumin.**, **13**, **6**, pp **371-378**.

- [131] Lee Y., Jablonski I. and DeLuca M. (1977) "Immobilization of firefly luciferase on glass rods: properties of the immobilized enzyme" **Anal. Biochem.**, **80**, **2**, pp **496-501**.
- [132] Ho C. H., Limberis L., Caldwell K. D. and Stewart R. J. (1998) "A metal-chelating pluronic for immobilization of histidine-tagged proteins at interfaces: immobilization of firefly luciferase on polystyrene beads" **Langmuir**, **14**, **14**, pp **3889-3894**.
- [133] Wang W., Zhao Q., Luo M., Li M., Wang D., Wang Y. and Liu, Q. (2015) "Immobilization of firefly luciferase on PVA-co-PE nanofibers membrane as biosensor for bioluminescent detection of ATP" **ACS Appl. Mater. Interfaces**, **7**, **36**, pp **20046-20052**.
- [134] Pham M. H., Vuong G. T., Vu A. T. and Do T. O. (2011) "Novel route to size-controlled Fe-MIL-88B-NH₂ metal-organic framework nanocrystals" **Langmuir**, **27**(24), pp **15261-15267**.
- [135] Liu Y. L., Zhao X. J., Yang X. X. and Li Y. F. (2013) "A nanosized metal-organic framework of Fe-MIL-88NH₂ as a novel peroxidase mimic used for colorimetric detection of glucose" **Analyst**, **138**, **16**, pp **4526-4531**.
- [136] Chen B., Xiang S. and Qian G. (2010) "Metal-organic frameworks with functional pores for recognition of small molecules" **Acc. Chem. Res.**, **43**, **8**, pp **1115-1124**.
- [137] Zhu X., Zheng H., Wei X., Lin Z., Guo L., Qiu B. and Chen, G. (2013) "Metal-organic framework (MOF): a novel sensing platform for biomolecules" **Chem. Commun.**, **49**, **13**, pp **1276-1278**.
- [138] Erhardt F. A. and Jördening H. J. (2007) "Immobilization of dextranase from *Chaetomium erraticum*" **J. Biotechnol.**, **131**, **4**, pp **440-447**.
- [139] Magner E. (2013) "Immobilisation of enzymes on mesoporous silicate materials" **Chem. Soc. Rev.**, **42**, **15**, pp **6213-6222**.
- [140] Thörn C. Gustafsson H. and Olsson L. (2011) "Immobilization of feruloyl esterases in mesoporous materials leads to improved transesterification yield" **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, **72**, **1-2**, pp **57-64**.
- [141] Salis A., Casula M. F., Bhattacharyya M. S., Pinna M., Solinas V. and Monduzzi M. (2010) "Physical and Chemical Lipase Adsorption on SBA-15:

Effect of Different Interactions on Enzyme Loading and Catalytic Performance” **ChemCatChem**, **2**, **3**, pp **322-329**.

- [142] Bian Y., Xiong N. and Zhu G. (2018) “Technology for the remediation of water pollution: A review on the fabrication of metal organic frameworks” **Processes**, **6**, **8**, pp **122**.
- [143] Van Meerloo J., Kaspers G. J. and Cloos J. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay, pp 237-245, In:”**Cancer cell culture**”, Cree I. A. Humana Press.
- [144] Castell J. V. and Gmez-Lechn M. J. (1996) “**In vitro methods in pharmaceutical research**”, Elsevier.

Abstract

Nanoparticles and porous substrates have become very important in recent decades due to their high efficiency in adsorption of various types of gases, biomolecules and proteins. This fact led us to study the efficiency of a type of metal organic frame as a bed for Luciferase enzyme. This enzyme is one of the most widely used and almost the most important type of porous nanoparticles today, which is highly applied in medicine and biotechnology, but very sensitive to environmental changes.

This study consists of three main parts: the first part, which includes enzyme stabilization on Fe-MIL-88(NH₂) and Fe-MIL-88(NH₂), coupled with Terephthalaldehyde, and the laboratory and device studies related to them, the second part consists of the enzyme stabilization on MIL-53 (Al) and its related device and laboratory studies, and the third part includes examination of applications including antibacterial, anti-oxidant, and anti-carcinogenicity properties of synthesized substrates. In summary, the results of this study indicate that binding of luciferase enzyme to both Fe-MIL-88 (NH₂) and Fe-MIL-88 (NH₂) coupled with Terephthalaldehyde is through a covalent bond and to MIL -53 (Al) is through adsorption. Studies also show that the stabilized luciferase on both metal organic frames has a higher kinetic and thermodynamic stability. Antibacterial, antioxidant, and anti-cancer properties of these compounds also indicate that both of them had a stronger antibiotic profile than Tetracycline and Kanamycin. These compounds have a significant antioxidant activity, and are cytotoxic with respect to MDA -MB-468, Hela and K562 cell lines.

Keywords: Metal organic frame work, Luciferase, Enzyme stabilization, Adsorption, Covalent bond, Antibacterial properties



Shahrood University of Technology

Ph.D thesis of Inorganic chemistry

Subject:

**An investigation of the stabilization process of some enzymes
on new prepared mineral substrates and evaluation of
improvement of properties and application of enzymes after
stabilization**

Supervisors:

Dr. Bahram Bahramian

Dr. Saman Hosseinkhani

By:

Zohreh Nowroozi-nejad

Aug 2019