Research Paper

Synthesis and comparative study of two types of chitosan-dextran sulfate nanocapsules loaded with alpha-amylase

Kadijeh Moradi[1], Ali Taravati[1*], Fatemeh Tohidi[2]

1. Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran
2. Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

*** Corresponding author e-mail: a.taravati@umz.ac.ir**

Citation: Moradi K, Taravati A, Tohidi F. Synthesis and comparative study of two types of chitosan-dextran sulfate nanocapsules loaded with Alpha-amylase. Daneshvar Medicine 2020; 28(1):49-61.

Abstract

Background and Objective: Alpha-amylase is a hydrolytic enzyme in starch degradation and has many applications in biotechnology and various industries but, like other enzymes, sensitivity and low stability limit its use. Enzyme immobilization is the best way to increase their stability.

Materials and Methods: In this study, for the first time, the immobilization of alpha-amylase was done in nanocapsules synthesized by chitosan and dextran sulfate polymers. Another nanocapsule was made after functionalization of chitosan with carboxyl group. The immobilization efficiency and pH-sensitivity of nanocapsules synthesized with different ratio of dextran sulfate and of the nanocapsules were also investigated.

Results: The immobilization efficiency of conventional nanocapsules and functionalized chitosan nanocapsules were 70% and 80%, respectively. The encapsulation efficiency in carboxylated chitosan was always higher than that of conventional chitosan, and this trend were seen for all different ratios of dextran sulfate. Also this nanocapsule exhibited good pH-sensitive behavior. The rate of swelling and release of the enzyme were decreased at pH 1.2, 5 and 7.4 in functionalized nanocapsules, and therefore nanocapsule with higher immobilization efficiency and sustained release was obtained. Also, this nanocapsule was also successful in protecting the enzyme from environmental conditions.

Conclusion: The surface properties of chitosan improved by carboxylating and the more stable nanoparticles were produced compared with conventional chitosan. Therefore, this nanocapsule can be used for oral delivery of many drugs, especially protein molecules.

Keywords: Alpha Amylase, Dextran Sulfate, Encapsulation, Chitosan

Received: 20 Dec 2019
Last revised: 07 Apr 2020
Accepted: 21 Apr 2020

مقاله پژوهشی

ساخت و بررسی مقایسه‌ای دو نوع نانوکپسول کیتوزان- دکستران سولفات حامل آنزیم آلفا آمیلاز

نویسندگان: خدیجه مرادی[۱]، علی طراوتی[۱*]، فاطمه توحیدی[۲]

۱. دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

۲. دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

*نویسنده مسئول: علی طراوتی **Email: a.taravati@umz.ac.ir**

دریافت: ۹۸/۰۹/۲۹

آخرین اصلاح‌ها: ۹۹/۰۱/۱۹

پذیرش: ۹۹/۰۲/۰۲

چکیده

مقدمه و هدف: آلفا آمیلاز از آنزیم‌های هیدرولازی در تجزیه نشاسته است و کاربردهای وسیعی در زیست فناوری و صنایع مختلف دارد اما همانند سایر آنزیم ها حساسیت و پایداری پایین، باعث محدودیت استفاده از آن می‌شود. تثبیت آنزیم، بهترین روش برای افزایش پایداری آن‌ها است.

مواد و روش ها: در این پژوهش برای اولین بار، تثبیت آلفا آمیلاز درون نانوکپسول های ساخته شده از پلیمرهای کیتوزان و دکستران سولفات انجام شد. نانوکپسول دیگری نیز پس از عامل دار کردن کیتوزان با گروه کربوکسیل ساخته شد و بازده تثبیت و حساسیت به pH آنها در نانوکپسول‌های سنتز شده با نسبت‌های مختلف دکستران سولفات مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: بازده تثبیت آلفا آمیلاز در نانوکپسول معمولی و نانوکپسول با کیتوزان عامل دار به ترتیب برابر با ۷۰ و ۸۰ درصد بود. میزان کپسوله شدن در نانوکپسول‌های کربوکسیل‌دار همواره بیشتر از نانوکپسول‌های معمولی بوده و این روند در مورد تمام نسبت‌های مختلف دکستران سولفات مشاهده شد. به علاوه این نانوکپسول رفتار حساس به pH را به خوبی از خود نشان داد. از سوی دیگر میزان تورم و سرعت رهاسازی آنزیم در pH های ۱،۲، ۵ و ۷،٤ در نانوکپسول کربوکسیله کاهش یافت و در نتیجه نانوکپسولی پایدارتر و با سرعت رهایش آهسته‌تر به دست آمد ($p<0/001$). به علاوه این نانو کپسول در محافظت از فعالیت آنزیم در برابر شرایط محیطی نیز موفق بود.

نتیجه‌گیری: با کربوکسیله کردن، خواص سطحی کیتوزان بهبود یافت و نانوذره پایدارتری نسبت به کیتوزان معمولی حاصل شد؛ بنابراین از این نوع نانوکپسول می‌توان برای تحویل خوراکی بسیاری از داروها به خصوص مولکول‌های پروتئینی استفاده کرد.

واژه های کلیدی: نانوذره، آلفا آمیلاز، دکستران سولفات، کپسول دار کردن، کیتوزان

مقدمه

آنزیم‌ها که کاتالیزورهای کارآمد و موثر در واکنش‌های بیوشیمیایی هستند به دلیل خواصی مانند انتخاب گری، فعالیت بالا، کاهش تعداد مراحل واکنش و کاهش مقادیر مورد نیاز از حلال‌های خطرناکی که لزوماً در صنعت استفاده می‌شوند بسیار مورد توجه هستند و کاربردهای وسیعی در صنایع مختلف دارند (۱). آنزیم آلفا آمیلاز، یک اندوهیدرولاز بسیار مهم است که هیدرولیز شیمیایی روی نشاسته انجام می‌دهد و در پزشکی و صنایع مختلفی مانند صنایع غذایی، تخمیر، نساجی، کاغذ، شوینده‌ها و بیوتکنولوژی کاربرد فراوان دارد (۲). این آنزیم دارای ۳ دمین به نام A، B و C می‌باشد (۳). جایگاه فعال این آنزیم در یک شکاف در فاصله بین دمین‌های A و B قرار دارد که شامل سه آمینواسید Asp231، Glu261 و Asp326 است که برای فعالیت کاتالیتیک ضروری است (٤). آلفا آمیلاز که هیدرولیز پیوندهای گلیکوزیدی α ۱→٤ را در نشاسته و کربوهیدرات‌های مشابه کاتالیز می‌کند در فرآیندهای صنعتی مانند مایع‌سازی نشاسته، شویندگی، حذف رنگ و پردازش خوراک استفاده شده است اما بیشترین حجم آن در صنعت نشاسته برای تولید اتانل و شربت‌های دارای فروکتوز بالا فروخته می‌شود (۵). آلفا آمیلاز در زمینه‌های مرتبط با بیوتکنولوژی نیز مانند حذف آلاینده‌های محیطی و زباله‌های حاوی نشاسته، تولید مواد بیوشیمیایی به کمک محصولات حاصل از تجزیه نشاسته (مانند مالتوز، مخلوط الیگوساکاریدها، دکسترین منشعب با وزن مولکولی بالا و بیوالکل‌ها)، تجزیه نشاسته در آب آلوده و تصفیه آن نیز استفاده می‌شود (۷،٦). آنزیم آلفا آمیلاز می‌تواند در بیماری پانکراتیک که پیامد آن عدم ترشح کافی این آنزیم می‌باشد برای درمان جایگزین مورد استفاده قرار گیرد. آمیلازهای قارچی از قارچ Aspergillus (بیشتر در گونه‌های A. niger، A. awamori و A. usamii) تولید می‌شود. آلفا آمیلاز و دیگر آنزیم‌های گوارشی نیاز به ذخیره در سرمای ۲ تا ۸ درجه یا نگهداری در دمای ۸ تا ۲۵ درجه سانتیگراد دارند و با این حال نیمه عمر آن بیش از یک سال نیست. تثبیت آلفا آمیلاز می‌تواند پایداری آن را بدون استفاده از روش‌های پیچیده بهبود دهد. آنزیم‌های تثبیت شده معمولاً در دمای بالا پایدار هستند و ممکن است در دمای اتاق با نیمه عمر بالا ذخیره شوند (۸). pH بهینه برای فعالیت آلفا آمیلاز، ۵ می‌باشد (۹). اغلب آنزیم‌ها نسبتاً ناپایدارند و تولید و جداسازی آنها نیز بسیار گران است و همچنین بازیابی آنزیم‌های فعال بعد از استفاده در واکنش‌ها، تکنولوژی بسیار دشواری است. امروزه آنزیم‌های تثبیت شده مورد توجه بسیار برای هدف‌های خاص پزشکی و صنعتی قرار دارد (۱۰). آنزیم‌های تثبیت شده انجام فرآیندهای صنعتی را تا حد زیادی بهبود می‌دهند در نتیجه موجب افزایش بهره‌وری و کارایی اقتصادی می‌شوند (۱۱). استفاده از آنزیم‌های تثبیت شده در بیوتکنولوژی امتیازاتی دارد اول اینکه یک سری از آنزیم‌ها می‌توانند چندین بار یا به طور مکرر استفاده شود. دوم، آنزیم‌های تثبیت شده معمولاً پایدارتر از آنزیم‌های آزاد هستند و سوم، واکنش می‌تواند به وسیله حذف آنزیم از محلول واکنش کنترل شود و امتیاز دیگر، جداسازی آسان آنزیم از محصول و جلوگیری از آلودگی آن است. در طی چند دهه گذشته، مطالعات بیوشیمیایی و بیوفیزیکی با هدف افزایش پایداری و فعالیت آنزیم‌ها در طی روند تثبیت انجام شده است (۱۲). با وجودی که مهندسی ژنتیک ابزاری قدرتمند برای بهبود کارایی آنزیم است اما تثبیت آنزیم تنها تکنیکی است که به طور همزمان خواصی مانند پایداری، انتخاب گری و فعالیت آنزیم‌ها را بهبود می بخشد. مهم‌ترین مزیت تثبیت، بهبود پایداری بیومولکول‌ها در شرایط مختلف واکنش و بالا بردن قابلیت استفاده مجدد بیومولکول‌ها در طول چرخه زیستی است. تثبیت انواع ترکیبات مانند سلول‌ها، آنزیم‌ها و مولکول‌ها با استفاده از نانو مواد گسترش یافت و در صنایع مختلفی از جمله صنایع غذایی، دارویی، پزشکی، تصفیه آب و کشاورزی استفاده می‌شود (۱۳).

تثبیت بیومولکول‌ها و از جمله آنها پروتئین‌ها به دلیل کاربردهای زیستی و پزشکی به طور گسترده‌ای انجام شد که آنزیم‌ها، آنتی‌بادی‌ها و مولکول‌های چسبنده سطح سلول مثال‌هایی از پروتئین‌ها هستند (١٤). نانو ذرات سطح وسیعی برای باند شدن آنزیم‌ها ایجاد می‌کنند که باعث بارگیری بیشتر آنزیم توسط نانوذره و نیز برخورد بیشتر جایگاه فعال آنزیم‌ها با سوبسترا و در نتیجه افزایش بازده تثبیت می‌شود (١٥). پلی‌ساکاریدها که از پلیمرهای طبیعی اند و برای کپسوله کردن به کار می روند رفتار هوشمندانه‌ای نسبت به محرک‌های محیطی نشان می‌دهند و می‌توانند با تغییر در ساختار و عمل به تغییرات محیطی پاسخ دهند (١٦). حضور گروه‌های عاملی متنوع در ساختار پلی‌ساکاریدها، امکان اصلاح آن‌ها را فراهم می‌کند که باعث کاربردهای وسیع و جذاب می‌شود. دکستران و کیتوزان از جمله پلی‌ساکاریدهایی هستند که به ترتیب از منابع میکروبی و جانوری به دست می‌آیند (١٧). پلی آنیون دکستران سولفات، مشتقی از دکستران است که در نتیجه سولفاته شدن دکستران حاصل می‌شود. این پلیمر قابل حل در آب و زیست تجزیه‌پذیر است و کاربردهای متنوع و فراوانی در پزشکی، زیست‌شناسی مولکولی و صنایع مختلف از جمله دارویی، شیمی و صنایع غذایی دارد (١٨). دکستران زنجیره‌ای از زیر واحدهای گلوکز است که با پیوندهای (١→٦) α به هم وصل شده است دکستران به دلیل دارا بودن گروه‌های هیدروکسیل می‌تواند با مولکول‌های هیدروفوبیک مختلف مانند حلقه‌های آروماتیک، آلیفاتیک یا هیدروکربن‌ها متصل شود و انواع مشتقات دکستران به دست آید (١٩). پلی‌ساکارید دکستران سولفات، یک پلی آنیون است که با کاتیون‌ها یا پلی کاتیون‌ها اتصال برقرار می‌کند. بی خطر بودن و کاربردهای موثر دکستران سولفات برای هیبرید شدن، خواص ضد ویروسی، حفظ رطوبت، خواص ضد التهابی، ضد پیری، برقراری اتصال با آنزیم‌ها و سلول‌ها و پایدارسازی پروتئین‌ها گزارش شده است (٢٠). کیتوزان، پلی‌ساکاریدی شامل واحدهای N-acetyl-D-glucosamin با پیوند (١→٤) β و پلی الکترولیت خطی دارای بار مثبت است که با داستیلاسیون کیتین به دست می‌آید و به عنوان یک ماده غیر سمی، زیست تخریب‌پذیر و زیست سازگار شناخته شده است و دارای گروه‌های آمین و هیدروکسیل می‌باشد. وجود گروه‌های آمین و هیدروکسیل در ساختار کیتوزان، زمینه را برای ایجاد مشتقات متنوع فراهم می‌کند. کیتوزان تنها پلی‌ساکارید طبیعی دارای ویژگی کاتیونی است که با بارهای منفی در دیگر پلیمرها واکنش می‌دهد و با ایجاد پل‌های یونی بین زنجیره‌های پلیمری، نانو ذرات پلی‌کمپلکس را می‌سازد (٢١). از نانوذره ترکیبی کیتوزان-دکستران سولفات که با فرآیند ژله‌ای شدن یونی و از ترکیب پلیمرهای کیتوزان و دکستران سولفات به دست می‌آید برای کنترل خواصی مانند اندازه و پراکندگی ذرات استفاده می‌شود (٢٢). ژله‌ای شدن یونی بر اساس بر هم کنش الکترواستاتیک گروه‌های آمین کیتوزان و گروه‌های با بار منفی در پلی‌آنیون‌های دیگر است (٢٣). آنزیم آلفا آمیلاز می‌تواند در بیماری پانکراتیک که پیامد آن عدم ترشح کافی این آنزیم می‌باشد به عنوان دارو مورد استفاده قرار گیرد (٨). پلی‌ساکاریدها ترکیبات بی خطر، امن، غیر سمی، آبدوست و زیست تجزیه پذیرند. همچنین منابع فراوانی از آنها در طبیعت وجود داشته و با قیمت پایین تهیه می‌شوند. بیشتر پلی‌ساکاریدها گروه‌های هیدروفیل، هیدروکسیل، کربوکسیل و گروه‌های آمین دارند که می‌توانند با بافت‌های زیستی مانند اپیتلیال و غشای مخاطی پیوندهای غیر کووالانسی تشکیل داده که باعث چسبندگی زیستی آن‌ها می‌شود (٢٢).

با وجود تمام پژوهش‌های انجام شده در تثبیت آلفا آمیلاز لزوم استفاده از یک بستر طبیعی و بی ضرر با درصد تثبیت بالا، حفظ فعالیت آنزیم، پایدار و حساس به pH محیطی که علاوه بر استفاده در صنایع، در شرایط in vivo برای درمان بیماری پانکراتیک نیز به کار رود موجب شد تا روشی دیگر برای تثبیت آلفا آمیلاز انتخاب شود. در این

پژوهش برای تهیه نانوکپسول‌ها از پلی‌ساکاریدهای کیتوزان و دکستران سولفات استفاده شد که جزء مواد طبیعی هستند.

مواد و روش‌ها

کیتوزان با وزن ملکولی متوسط، پودر دکستران سولفات با وزن ملکولی ۵۰۰ kd، اسید استیک گلایسیال با درجه خلوص ۹۹٫۸٪ و وزن ملکولی ۶۰٫۰۵ g/mol، آب مقطر دیونیزه، آنزیم آلفا آمیلاز، آلفا کتوگلوتارات، سدیم بورهیدرات، دی‌اتیل‌اتر. جهت سنجش کمی فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز، از معرف دی نیتروسالیسیلیک اسید و برای سنجش برادفورد از محلول برادفورد استفاده شد. کلیه مواد آزمایشگاهی مورد استفاده، از برندهای معتبر مواد آزمایشگاهی شامل کمپانی‌های مرک و سیگما تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. سانتریفیوژ یخچال‌دار (Sigma مدل 3K30)، ترموبلاک (Termo fisher مدل Bath S200-Compact Dry 240 V)، اسپکتروفتومتر Spectrum; SP2100 um (Epoch مدل Biotek)، همزن مغناطیسی (Heidolph مدل Hei-standard)، ترازوی دیجیتال (A&D(۰٫۰۰۰۱g) (Axis مدل ALN)، pH متر (Adwa مدل AD 1030)، شیکر (Behsan مدل HLB 501)، سمپلر (Brand مدل Transferpette) تجهیزات مورد استفاده در این پژوهش می‌باشند.

تثبیت آنزیم با روش کپسوله کردن: بدین منظور مقدار ۰٫۰۱g از پودر آنزیم آلفا آمیلاز به دقت وزن شد و با حل کردن در ۴۰۰ µl بافر فسفات pH=۷، محلول ذخیره آنزیم تهیه شد. محلول‌های ۰٫۱، ۰٫۰۹، ۰٫۰۸ و ۰٫۰۷ درصد از دکستران سولفات و ۰٫۱٪ کیتوزان آماده شد. به میزان ۳/۵ml از هر یک از محلول‌های ۰٫۱، ۰/۰۹، ۰٫۰۸ و ۰٫۰۷ درصد دکستران سولفات برداشته و قطره قطره به ۵ml محلول کیتوزان در حال استیر با دور ۲۵۰rpm در مدت ۳۰ دقیقه اضافه شد تا در نتیجه‌ی ژله‌ای شدن یونی، محلولی یکنواخت و شیری رنگ حاوی نانوذره ترکیبی کیتوزان-دکستران سولفات حاصل شود. سپس محلول حاصل با دور ۱۵۰۰۰ rpm و دمای ٤ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد تا محلول رویی از رسوب جدا شود.

برای تهیه نانوذره ترکیبی کیتوزان-دکستران حاوی آنزیم، همانند فوق عمل کرده با این تفاوت که به محلول دکستران سولفات آنزیم آلفا آمیلاز نیز با غلظت‌های مشخص اضافه شد. رسوب حاصل پس از سانتریفوژ در ۱ml بافر استات pH=۵ کاملاً حل و رسوب و محلول رویی برای سنجش‌های برادفورد و آمیلاز استفاده شد.

کربوکسیله کردن کیتوزان و ساخت نانوکپسول عامل دار کربوکسیله کردن کیتوزان و ساخت نانوکپسول عامل دار: برای کربوکسیله کردن کیتوزان، ۰٫۰۳۵g کیتوزان در ۱۰ ml اسید استیک ۱٪ حل و سپس ۰٫۰۷۲ g آلفا کتوگلوتارات به آن اضافه شد و با استفاده از M NaoH ۰٫۵، pH آن روی ۵ تنظیم شد. ترکیب حاصل به مدت ٤ ساعت در آون ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت و سپس ۰٫۰۲g سدیم بورهیدرید به آن اضافه شد و با استفاده از اسید هیدروکلریک ۱ مولار، pH آن به ۷- ٦٫۵ رسید و به مدت ۲٤ ساعت استیر ملایم انجام شد. سپس شستشو با استفاده از ۲۰ml اتانول ۹۵٪ و به دنبال آن ۳ بار با اتانل ۹۸٪ و در نهایت با دی اتیل اتر انجام شد. پس از ساخت کیتوزان کربوکسیله از آن نیز برای ساخت نانوذره طبق روش ذکر شده در بالا استفاده شد.

سنجش آمیلاز

به میزان ۱۰ میکرو لیتر از نمونه مورد نظر (آنزیم آزاد و تثبیت شده) در ویال جداگانه ریخته و به هر یک ۵۰ µl نشاسته اضافه شد. در ویال مربوط به بلانک نمونه ۱۰ µl بافر فسفات pH=۷ و ۵۰ µl محلول نشاسته اضافه شد. تمام ویال‌ها در بن ماری به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۵ °C قرار گرفت. سپس ۱۰۰ µl محلول DNS به هر یک اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در آب ۱۰۰ °C قرار گرفت. ۱ml آب مقطر به تمام ویال‌ها اضافه کرده، ۳۰۰ میکرو لیتر از آن

برداشته و در پلیت ۹۶ خانه ریخته و جذب آنها در طول موج ۵۴۶nm خوانده شد. برای محاسبه فعالیت آنزیم، غلظت‌های مختلف مالتوز به عنوان استاندارد تهیه و ۱۰ میکرو لیتر از آن طبق مراحل فوق مورد استفاده قرار گرفت. نمودار استاندارد آمیلاز بر اساس غلظت‌های مختلف مالتوز رسم شد و از معادله رگرسیون حاصل برای محاسبه غلظت مالتوز آزاد شده در سنجش آمیلاز مورد استفاده قرار گرفت.

سنجش فعالیت و درصد تثبیت: رسوب حاصل از سانتریفیوژ نانو ذرات حاصل از نسبت‌های مختلف دکستران سولفات با کیتوزان معمولی و کیتوزان عامل دار، در ۱ml بافر استات pH=۵ حل و در یخچال نگهداری شد. رسوب به مدت چند ماه در یخچال نگهداری شد و پس از سانتریفیوژ نمونه‌های مربوطه، سنجش آمیلاز روی رسوب حاصل از سانتریفیوژ انجام شد. فعالیت آنزیم با استفاده از فرمول زیر تعیین گردید.

$$\text{فعالیت} = \frac{\text{حجم محلول} \times \text{غلظت مالتوز}}{\text{حجم نمونه} \times \text{زمان تیمار}} \times 100$$

با مقایسه فعالیت آنزیم در محلول اولیه با رسوب نهایی، درصد تثبیت با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید.

$$\text{درصد تثبیت} = \frac{\text{غلظت محلول رویی} - \text{غلظت کل آنزیم}}{\text{غلظت کل آنزیم}} \times 100$$

اندازه گیری تورم

برای اندازه‌گیری میزان تورم، رسوب نانوذره در آون در دمای ۵۰ °c کاملاً خشک شد. سپس وزن و برای سنجش میزان تورم در سه pH مختلف مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور، مقدار ۱۵ml از یکی از بافرهای KCl-HCl با pH=۱٫۲، بافراستات با pH=۵ و بافر تریس HCl با pH=۷٫٤ اضافه و طی زمان‌های مشخص رسوب از بافر خارج و وزن آن اندازه‌گیری شد. سپس رسوب در همان بافر قبلی قرار گرفت و با اضافه کردن مجدد بافر، حجم ۱۵ ml ثابت نگه شد. برای تعیین درصد تورم از فرمول زیر استفاده شد.

$$\text{درصد تورم} = \frac{\text{وزن رسوب اولیه} - \text{وزن رسوب پس از تورم}}{\text{وزن رسوب اولیه}} \times 100$$

اندازه گیری میزان رهایش آنزیم: برای اندازه گیری میزان رهایش آنزیم، رسوب حاصل با freeze-dry خشک شد. به میزان ۰٫۰۲ g رسوب خشک را در سه ویال جداگانه ریخته و به هر یک ۲ ml از یکی از بافرهای KCl-HCl با pH =۱٫۲، بافراستات با pH=۵ و بافر تریس HCl با pH=۷٫٤ اضافه شد و روی شیکر با دور ۱۰۰rpm قرار گرفت. هر بار طبق زمان‌های مشخص مقدار ۵۰ میکرو لیتر از محلول رویی را برداشته و بعد از سانتریفیوژ، ۱۰ میکرو لیتر از محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ در سنجش آمیلاز و ۲۰ میکرو لیتر برای سنجش برادفورد مورد استفاده قرار گرفت. برای ثابت ماندن حجم بافر، مجدداً از همان بافر به آن اضافه شد.

طیف‌سنجی

Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

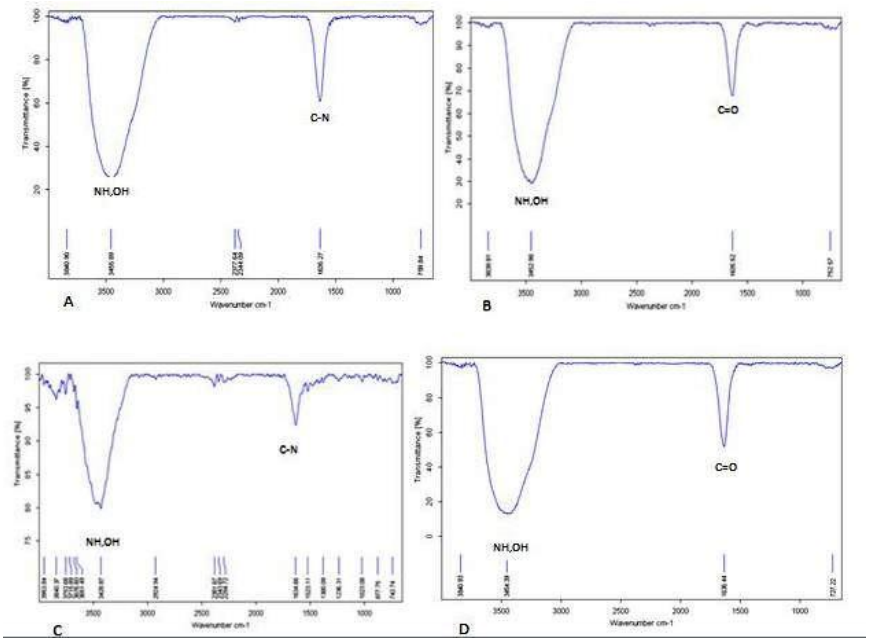
پس از سانتریفیوژ نانو ذرات ساخته شده با کیتوزان معمولی و عامل دار، از رسوب حاصل برای انجام آنالیز FTIR استفاده گردید. از مقایسه نمودارهای حاصل برای تائید عامل دار شدن کیتوزان و همچنین کپسوله شدن آنزیم استفاده شد.

آنالیز آماری

پس از جمع آوری داده‌ها تجزیه و تحلیل آنها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ انجام شد. جهت بررسی تفاوت میانگین تثبیت آنزیم در نانو ذرات سنتز شده با نسبت‌های مختلف دکستران سولفات از روش آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) و آزمون مقایسه میانگین توکی استفاده شد. برای بررسی تفاوت میانگین تثبیت آنزیم در نانو ذرات معمولی و عامل دار از روش t-تست استفاده شد.

نتایج

:شکل‌های ۱A الی ۱D نتایج FTIR یا طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه مربوط به نانو ذرات دارای کیتوزان معمولی و کیتوزان عامل دار در هر دو حالت بدون آنزیم و حامل آنزیم را نشان می‌دهد. وجود پیک در طول موج حدود ۱۶۳۷nm، نشان دهنده وجود گروه کربوکسیل در نانوذره حاصل از کیتوزان عامل دار است. در هر دو حالت نانو ذرات (بدون آنزیم یا حامل آنزیم)، میزان نور عبوری از نانو ذرات کیتوزان عامل دار-دکستران سولفات کمتر از نانو ذرات کیتوزان معمولی-دکستران سولفات می‌باشد (شکل ۱B و ۱D).



شکل ۱: طیف FTIR نانو ذرات کیتوزان معمولی-دکستران سولفات بدون آنزیم (A)، کیتوزان عامل دار-دکستران سولفات بدون آنزیم (B)، کیتوزان معمولی-دکستران سولفات دارای آنزیم (C) و کیتوزان عامل دار-دکستران سولفات دارای آنزیم (D)

سنجش فعالیت و درصد تثبیت

بر اساس نتایج سنجش آمیلاز و برادفورد نانو ذرات، غلظت آنزیم، فعالیت اولیه و نهایی رسوب و درصدهای تثبیت محاسبه شد و در جدولهای ۱ و ۲ آمد. این نتایج، تفاوت در فعالیت نانو ذرات حاصل از نسبت‌های حجمی متفاوت دکستران سولفات و همچنین تفاوت در فعالیت آنزیم کپسوله شده با کیتوزان معمولی و عامل دار را ثابت می‌کند ($p< ۰/۰۰۱$). میزان فعالیت آنزیم کپسوله شده در نانو ذرات حاصل از نسبت ۰/۱٪ دکستران سولفات بیشتر از نسبت‌های دیگر حجمی بود و همچنین نانو ذرات کیتوزان عامل دار- دکستران سولفات، درصد کپسوله شدن و فعالیت بیشتری نسبت به نانو ذرات کیتوزان معمولی- دکستران سولفات نشان دادند ($p< ۰/۰۰۱$) اما در نسبت ۰/۱٪ افزایش درصد کپسوله شدن در نانوذره کیتوزان عامل دار- دکستران سولفات در مقایسه با نانوذره کیتوزان معمولی- دکستران سولفات معنی‌داری نبود (جداول۱،۲).

جدول ۱: درصد تثبیت و فعالیت آنزیم تثبیت شده با کیتوزان معمولی- دکستران سولفات

نسبت دکستران سولفات	نانوذره کیتوزان معمولی- دکستران سولفات				
	غلظت آنزیم در محلول رویی(µg)	**غلظت رسوب(µg)**	**درصد تثبیت**	**فعالیت اولیه رسوب (U/ml)**	**فعالیت نهایی رسوب(U/ml)**
٪۰٫۱	۵۵٫۷۶	۱۴۱٫۰۱۴	٪۷۷٫۳	۳۰٫۹۶	۱۷٫۵۲
٪۰٫۰۹	۱۲۱٫۳۶	۱۲۲٫۲۷	٪۵۰٫۶۲	۲۶٫۸۸	۱۴٫۸۳
٪۰٫۰۸	۱۷۲٫۹۰	۱۱۳٫۴۵	٪۲۹٫۶۵	۲۱٫۶	۱۲٫۸۲
٪۰٫۰۷	۲۳۸٫۵۱	۹۵٫۸۱	٪۳	۱۸٫۸۶	۱۰٫۷۸

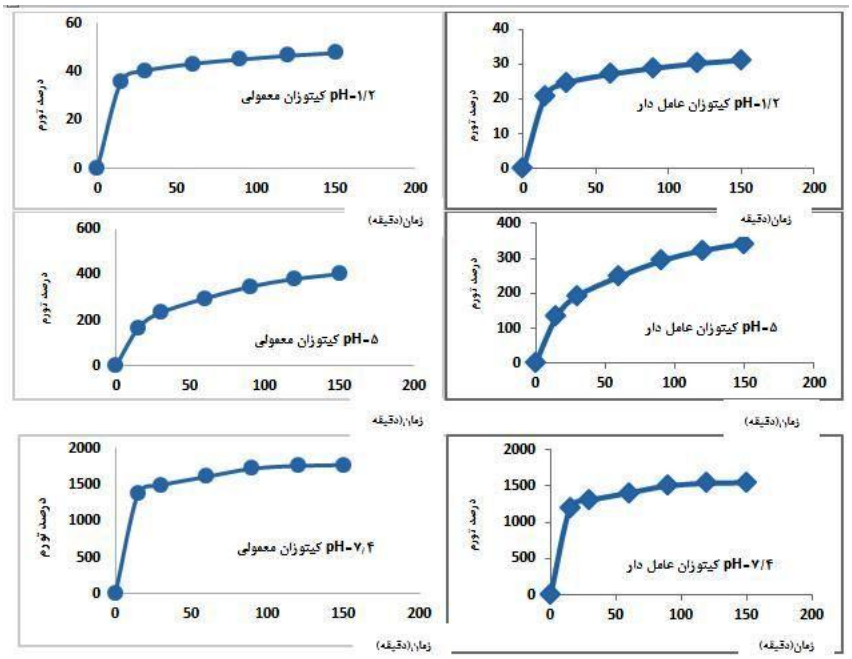
حجم آنزیم آلفا آمیلاز مورد استفاده برای کپسوله شدن در هر یک از انواع نانو ذرات برابر با ۷۵ میکرو لیتر از محلول ذخیره می‌باشد. با افزایش نسبت دکستران سولفات میزان تثبیت آنزیم روند افزایشی نشان می‌دهد.

جدول ۲. درصد تثبیت و فعالیت آنزیم تثبیت شده با کیتوزان عامل دار- دکستران سولفات

نسبت دکستران سولفات	نانوذره کیتوزان عامل دار- دکستران سولفات				
	غلظت آنزیم در محلول رویی(µg)	**غلظت رسوب(µg)**	**درصد تثبیت**	**فعالیت اولیه رسوب(U/ml)**	**فعالیت نهایی رسوب(U/ml)**
٪۰٫۱	۵۱٫۰۷	۱۶۰٫۸۵	٪۷۹٫۲۲	۳۴٫۳۲	۲۸٫۳۲
٪۰٫۰۹	۷۹٫۱۹	۱۳۵٫۵۰	٪۶۷٫۷۸	۲۹٫۰۴	۲۲٫۹۲
٪۰/۰۸	۱۲۶٫۰۵	۱۲۸٫۸۸	٪۴۸٫۷۱	۲۶/۸۸	۲۱٫۵۸
٪۰٫۰۷	۱۷۲/۹۰	۱۰۹٫۰۴	٪۲۹٫۶۵	۲۲٫۹۲	۱۷٫۵۲

حجم آنزیم آلفا آمیلاز مورد استفاده برای کپسوله شدن در هر یک از انواع نانو ذرات برابر با ۷۵ میکرو لیتر از محلول ذخیره می‌باشد. با افزایش نسبت دکستران سولفات میزان تثبیت آنزیم روند افزایشی نشان می‌دهد.

مقایسه تورم نانو ذرات حاصل از کیتوزان معمولی و عامل دار در pH های مختلف: نتایج حاصل ازمیزان تورم نانو ذرات طی زمان در سه pH مختلف در شکل ۲ نشان داده شد. این نتایج نشان دهنده تورم بیشتر نانو ذرات در pH=۷٫٤ نسبت به pH=۵ و pH=۱٫۲ است (p< ۰/۰۰۱). همچنین همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده است نانو ذرات حاصل از کیتوزان عامل دار نسبت به کیتوزان معمولی تورم کمتری در هر سه pH نشان دادند (شکل ۲).

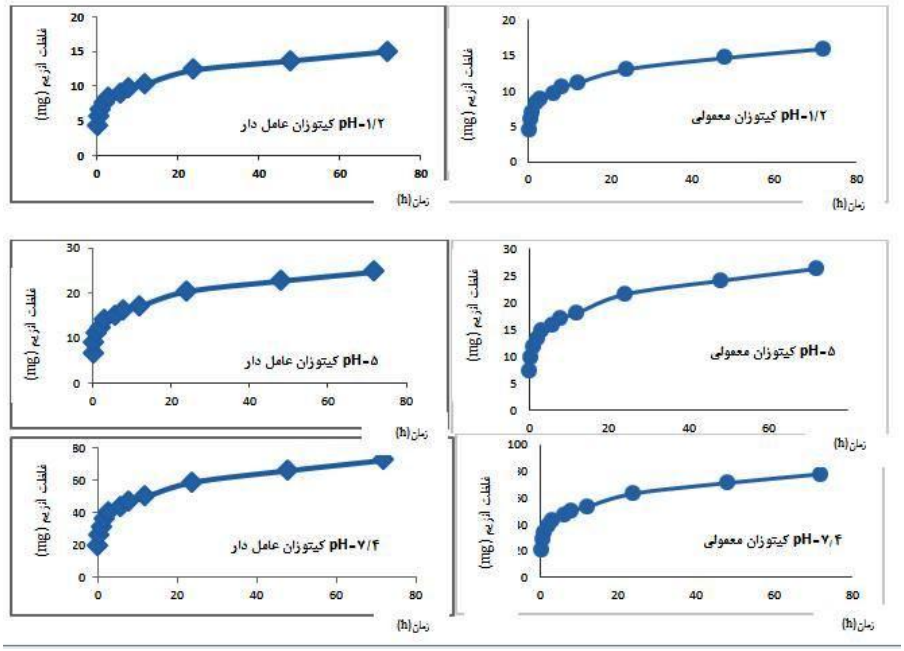


شکل ۲. نمودارهای تورم نانو ذرات حاصل از کیتوزان معمولی و کیتوزان عامل دار در **pH** های مختلف

مقایسه رهایش آنزیم از دو نوع نانوذره حاصل از کیتوزان معمولی و کیتوزان عامل دار در pH های مختلف:

با سنجش برادفورد، غلظت آنزیم آزاد شده از نانو ذرات تعیین گردید و نمودارهای رهایش آنزیم از نانو ذرات طی زمان در سه pH مختلف رسم و در شکل ۳ نشان داده شد.

این نتایج نشان دهنده رهایش بیشتر آنزیم از نانو ذرات در pH= ۷/٤ نسبت به pH=۵ و همچنین pH=۱/۲ است. به علاوه نانو ذرات حاصل از کیتوزان عامل دار نسبت به کیتوزان معمولی رهایش کمتری در هر سه pH نشان دادند (شکل ۳).



شکل ۳. نمودارهای رهایش آنزیم از نانو ذرات حاصل از کیتوزان معمولی و کیتوزان عامل دار در **pH** های مختلف

بحث

در بررسی نتایج FTIR که در شکل ۱ نمایش داده شده است علاوه بر وجود پیک مربوط به گروه کربوکسیل در نمودار FTIR کیتوزان عامل دار، مقایسه مقدار نور عبوری از نانو ذرات بدون آنزیم نشان دهنده موفقیت در عامل دار کردن کیتوزان می‌باشد چون با عامل دار کردن کیتوزان و افزایش غلظت گروه‌های عاملی، میزان نور عبوری نیز کاهش می یابد. همچنین غلظت و مقادیر بالاتر آنزیم را در نانو ذرات حاصل از کیتوزان عامل دار نسبت به کیتوزان معمولی ثابت می‌کند. با کپسوله کردن آنزیم آلفا آمیلاز درون نانوکپسول‌های کیتوزان معمولی- دکستران سولفات و کیتوزان عامل دار- دکستران سولفات که نتایج آن در جدول‌های ۱ و ۲ نشان داده شده مشخص شد که درصد زیادی از فعالیت آنزیم با گذشت زمان حفظ شد. در هر دو نوع نانوکپسول، بازده تثبیت و فعالیت آنزیمی با کاهش نسبت دکستران سولفات مورد استفاده و کاهش مقادیر رسوب حاصل، کاهش یافت. وجود مقادیر کافی از هر دو پلیمر برای برقراری پیوندهای کافی بین کیتوزان و دکستران سولفات و تشکیل نانوذره مناسب‌تر ضروری است. مقایسه دو نوع نانوکپسول ساخته شده نشان می‌دهد که درصد تثبیت و فعالیت کیتوزان عامل دار- دکستران سولفات بیشتر از نانوکپسول کیتوزان معمولی- دکستران سولفات بوده و این موضوع در مورد تمام نسبت‌های دکستران سولفات صدق می‌کند. در واقع با کربوکسیل‌دار کردن کیتوزان و تشکیل نانوذره کیتوزان عامل دار- دکستران سولفات، پیوندهای قویتری بین این دو پلیمر ایجاد شده و این نانوکپسول نسبت به نانوکپسول کیتوزان معمولی- دکستران سولفات اثر بیشتری در حفظ فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز دارد. مقایسه درصدهای تثبیت، فعالیت اولیه و نهایی رسوب حاصل از نسبت‌های دکستران سولفات با کیتوزان معمولی و عامل دار تفاوت زیادی در نتایج حاصل از دو نوع نانوکپسول و اثر مثبت عامل دار کردن کیتوزان بر خواص آنها را ثابت می‌کند. نکته قابل توجه این که اثر عامل دار کردن بر حفظ فعالیت آنزیم به حدی بوده که فعالیت نهایی رسوب ۰٫۰۷٪ کیتوزان عامل دار با ۰٫۱٪ کیتوزان معمولی برابری می‌کند. در هر دو نانوکپسول یاد شده فعالیت نهایی رسوب ۱۷٫۵۲U/ml می باشد. مقایسه فعالیت اولیه و نهایی این دو نانوکپسول نشان می‌دهد که فعالیت ۰٫۰۱٪ کیتوزان معمولی- دکستران سولفات و ۰٫۰۷٪ کیتوزان عامل دار- دکستران سولفات بعد از چند ماه به ترتیب به میزان ۱۳٫٤٤ U/ml و ٥٫٤U/ml کاهش یافت و این ثابت می‌کند که حتی نسبت ۰٫۰۷٪ کیتوزان عامل دار- دکستران سولفات در مقایسه با ۰٫۱٪ کیتوزان معمولی-دکستران سولفات (بهترین نانوذره حاصل از کیتوزان معمولی) بسیار موفق‌تر عمل کرده است. همچنین فعالیت نهایی نانو ذرات ۰٫۱٪، ۰٫۰۹٪ و ۰٫۰۸٪ حاصل از کیتوزان عامل دار بسیار بیشتر از نسبت ۰٫۱٪ کیتوزان معمولی- دکستران سولفات می‌باشد. مقایسه نانوذره ۰٫۰۷٪ نانوذره دارای کیتوزان عامل دار با نسبت مشابه در نانوذره کیتوزان معمولی علاوه بر تفاوت در فعالیت نهایی رسوب حاوی نانوکپسول، تفاوت بسیار در درصد تثبیت آنها را ثابت کرد. این نتایج نشان دهنده اثر بسیار قوی کربوکسیل‌دار کردن کیتوزان در برقراری پیوندهای قوی‌تر بین کیتوزان عامل دار با دکستران سولفات و در نتیجه بالا بردن درصد تثبیت و حفظ خواص و فعالیت آنزیم کپسوله شده است.

نتایج حاصل از تورم نانوکپسول‌های ساخته شده در pH=۷٫٤، pH=٥ و pH=۱٫۲ که در شکل ۲ نشان داده شد حاکی از تفاوت زیاد در میزان تورم آنها می‌باشد. دکستران سولفات دارای ۲٫۳ گروه سولفات در هر مولکول می‌باشد و کیتوزان پلی‌کاتیون ضعیف با حدود ۲ گروه آمین در هر مولکول است بنابراین پلی‌آنیون دکستران سولفات می‌تواند با پلیمر کاتیونی مثل کیتوزان پیوند تشکیل دهد (۲٤). نانوذره ترکیبی حاصل از دو پلیمر دارای بار منفی است و قرارگیری آن در محیط قلیایی با pH=۷٫٤، موجب از دست دادن پروتون و در نتیجه دافعه بین بارهای منفی دکستران

سولفات و تورم نانوکپسول می‌شود. نتیجه این تورم، تغییر در وزن نانوکپسول‌ها با گذشت زمان می‌باشد. مقایسه درصد تورم در سه pH نشان می‌دهد که با کاهش pH محیط، میزان تورم کاهش یافته و این موضوع در مورد هر دو نوع نانوکپسول صادق است.

دکستران سولفات به طور موفقیت آمیزی برای محافظت از پپتیدازها و پروتئین‌ها در برابر هیدرولیز اسید و آنزیم و رهایش آهسته آن‌ها و در نتیجه تنظیم دوز و کاهش عوارض جانبی آن‌ها استفاده شده است (۲۵). پلیمرهای حساس به pH، پلی الکترولیت‌های دارای گروه‌های اسیدی یا بازی هستند که در پاسخ به تغییرات pH، پروتون گرفته یا آزاد می‌کنند؛ بنابراین تورم پلیمر در یک pH به دلیل دافعه الکترواستاتیک گروه‌های با بارهمنام می‌باشد (۲۶). با توجه به نتایج مندرج در شکل ۲، مقایسه میزان تورم دو نوع نانوکپسول عامل دار و معمولی طی زمانهای مختلف در سه pH مختلف نشان می‌دهد که نانوکپسول عامل دار به نسبت ۰٫۸۸ میزان تورم کمتری داشته است. در واقع تورم کمتر این نانوکپسول به دلیل تشکیل پیوندهای قوی‌تر بین کیتوزان کربوکسیل‌دار و دکستران سولفات می‌باشد. این ویژگی نانوکپسول عامل دار را برای رهایش آهسته آنزیم‌ها یا سایر مواد کپسوله شونده مناسب‌تر کرده است. حضور گروه‌های آمین و هیدروکسیل در زنجیره کیتوزان، امکان تغییر پلی‌ساکاریدها، اصلاح خواص و تولید مشتقات مختلف و در نتیجه استفاده در زمینه‌های وسیع را فراهم کرده است (۲۷).

قرارگیری نانوکپسول‌های حامل آنزیم در pH=۷٫٤، pH=٥ و pH=۱٫۲ که نتایج آن در شکل ۳ آمده است تفاوت در میزان رهاسازی آنزیم از نانوکپسول و افزایش غلظت پروتئین و فعالیت آن در محلول رویی را ثابت می‌کند. همچنین با توجه به نتایج مندرج در شکل ۳، مقایسه میزان رهایش دو نوع نانوکپسول عامل دار و معمولی طی زمان‌های مختلف در سه pH مختلف نشان می‌دهد که نانوکپسول عامل دار به نسبت ۰٫۸۸ میزان رهایش کمتری داشته است ($p< ۰/۰۵$) که به دلیل عامل دار کردن کیتوزان و تشکیل پیوندهای قوی‌تر بین کیتوزان کربوکسیل‌دار و دکستران سولفات می‌باشد. تورم کمتر نانوکپسول با کیتوزان عامل دار و آزادسازی آهسته ماده کپسوله شونده به عنوان ویژگی مهم برای استفاده در درمان و پزشکی مورد توجه قرار گرفته است. تثبیت آنزیم تنها تکنیکی است که می‌تواند به طور همزمان خواصی مانند پایداری، انتخاب‌گری و فعالیت آنزیم‌ها را بهبود ببخشد (۲۸). نتیجه عامل دار کردن کیتوزان موجب افزایش بازده تثبیت، رهایش آهسته‌تر و فعالیت بیشتر است. هر چند که نتایج حاصل، موفقیت در ساخت دو نوع نانو کپسول با حفظ خواص و فعالیت آنزیم را ثابت می‌کند اما با کربوکسیلاسیون، خواص سطحی کیتوزان بهبود یافت و نانوذره‌ی مناسب‌تر نسبت به کیتوزان معمولی حاصل شد. با کربوکسیل‌دار کردن کیتوزان و ساخت نانوکپسول کیتوزان عامل دار-دکستران سولفات، نانوکپسول حساس به pH پایدارتر، با درصد تثبیت بالاتر، سرعت رهایش آهسته‌تر و مناسب‌تر برای حفظ فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز ساخته شد.

نتیجه‌گیری

نانوکپسول کیتوزان عامل دار-دکستران سولفات در مقایسه با نانوکپسول کیتوزان معمولی-دکستران سولفات دارای پیوندهای قوی‌تر و در نتیجه ساختاری محکم‌تر است. به علاوه با توجه به خواصی مانند بی‌خطر بودن، زیست تجزیه‌پذیری و چسبندگی پلی‌ساکاریدها به غشای مخاطی این نانوکپسول برای جذب سلولی و استفاده در تحویل دارو بسیار مناسب‌اند.

منابع

1. Cowan DA, Fernandez-Lafuente R. Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization. Enzyme and Microbial Technology 2011; 49(4):326-46.
2. Jadhav SB, Singhal RS. Conjugation of α-amylase with dextran for enhanced stability: process details, kinetics and structural analysis. Carbohydrate Polymers 2012; 90(4):1811-7.
3. Janeček Š, Svensson B, MacGregor EA. α-Amylase: an enzyme specificity found in various families of glycoside hydrolases. Cellular and Molecular Life Sciences 2014; 71(7):1149-70.
4. Svensson B, Tovborg Jensen M, Mori H, Bak-Jensen KS, Bonsager B, Nielsen PK, Kramhoft B, Prætorius-Ibba M, Nohr J, Juge N, Greffe L. Fascinating facets of function and structure of amylolytic enzymes of glycoside hydrolase family 13. Biologia-Bratislava 2002; 57(SUP/2):5-20.
5. Konsoula Z, Liakopoulou-Kyriakides M. Co-production of α-amylase and β-galactosidase by Bacillus subtilis in complex organic substrates. Bioresource Technology 2007;98(1):150-7.
6. Karigar CS, Rao SS. Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: a review. Enzyme Research 2011.
7. Wu CH, Mulchandani A, Chen W. Versatile microbial surface-display for environmental remediation and biofuels production. Trends in Microbiology 2008; 16(4):181-8.
8. Amirbandeh M, Taheri-Kafrani A, Soozanipour A, Gaillard C. Triazine-functionalized chitosan-encapsulated superparamagnetic nanoparticles as reusable and robust nanocarrier for glucoamylase immobilization. Biochemical Engineering Journal 2017; 127:119-27.
9. Wang P, Wang P, Tian J, Yu X, Chang M, Chu X, Wu N. A new strategy to express the extracellular α-amylase from Pyrococcus furiosus in Bacillus amyloliquefaciens. Scientific Reports 2016; 6: 22229.
10. DiCosimo R, McAuliffe J, Poulose AJ, Bohlmann G. Industrial use of immobilized enzymes. Chemical Society Reviews 2013; 42(15):6437-74.
11. Nisha S, Karthick SA, Gobi N. A review on methods, application and properties of immobilized enzyme. Chemical Science Review and Letters 2012; 1(3):148-55.
12. Zhang Y, Ge J, Liu Z. Enhanced activity of immobilized or chemically modified enzymes. Acs Catalysis 2015; 5(8):4503-13.
13. Bommarius AS, Paye MF. Stabilizing biocatalysts. Chemical Society Reviews 2013; 42(15):6534-65.
14. Mahmoud DA, Helmy WA. Potential application of immobilization technology in enzyme and biomass production. Journal of Applied Sciences Research 2009; 5(12):2466-76.
15. Cipolatti EP, Valerio A, Henriques RO, Moritz DE, Ninow JL, Freire DM, Manoel EA, Fernandez-Lafuente R, de Oliveira D. Nanomaterials for biocatalyst immobilization–state of the art and future trends. RSC Advances 2016; 6(106):104675-92.
16. Kulbokaite R, Ciuta G, Netopilik M, Makuska R. N-PEGylation of

chitosan via "click chemistry" reactions. Reactive and Functional Polymers 2009; 69(10):771-8.
17. Elgadir MA, Uddin MS, Ferdosh S, Adam A, Chowdhury AJ, Sarker MZ. Impact of chitosan composites and chitosan nanoparticle composites on various drug delivery systems: A review. Journal of Food and Drug Analysis 2015; 23(4):619-29.
18. Bhavani AL, Nisha J. Dextran—the polysaccharide with versatile uses. International Journal of Pharmacy and Biological Sciences 2010;1(4):569-73.
19. Pacelli S, Paolicelli P, Casadei MA. New biodegradable dextran-based hydrogels for protein delivery: Synthesis and characterization. Carbohydrate Polymers 2015; 126:208-14.
20. Chen F, Huang G. Preparation and application of dextran and its derivatives as carriers. International Journal of Biological Macromolecules 2019.
21. Sun Y, Wan A. Preparation of nanoparticles composed of chitosan and its derivatives as delivery systems for macromolecules. Journal of Applied Polymer Science 2007; 105(2):552-61.
22. Reis CP, Ribeiro AJ, Houng S, Veiga F, Neufeld RJ. Nanoparticulate delivery system for insulin: design, characterization and in vitro/in vivo bioactivity. European Journal of Pharmaceutical Sciences 2007; 30(5):392-7.
23. Reis CP, Ribeiro AJ, Veiga F, Neufeld RJ, Damgé C. Polyelectrolyte biomaterial interactions provide nanoparticulate carrier for oral insulin delivery. Drug Delivery 2008; 15(2):127-39.
24. Anitha A, Deepagan VG, Rani VD, Menon D, Nair SV, Jayakumar R. Preparation, characterization, in vitro drug release and biological studies of curcumin loaded dextran sulphate–chitosan nanoparticles. Carbohydrate Polymers 2011; 84(3):1158-64.
25. Gombotz WR, Wee SF. Protein release from alginate matrices. Advanced Drug Delivery Reviews 2012; 64:194-205.
26. Schmaljohann D. Thermo-and pH-responsive polymers in drug delivery. Advanced Drug Delivery Reviews 2006; 58(15):1655-70.
27. Van der Merwe SM, Verhoef JC, Verheijden JH, Kotzé AF, Junginger HE. Trimethylated chitosan as polymeric absorption enhancer for improved peroral delivery of peptide drugs. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2004;58(2):225-35.
28. Zhang Y, Ge J, Liu Z. Enhanced activity of immobilized or chemically modified enzymes. ACS Catalysis 2015;5(8):4503-13.