مقاله علمی پژوهشی
مجله دوفصل نامه
مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۱۲، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۴۰۲
صفحه ۶۷-۵۹

https://dorl.net/dor/20.1001.1.25885073.1402.12.1.7.1

DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.7.1

Research Article
Genetic Engineering and Biosafety Journal 2023
Volume 12, Number 1, Pages: 59-67

http://gebsj.ir/

https://ecc.isc.ac/showJournal/23064

بررسی اثر نانوذره نقره بر فعالیت آنزیم گلیسرول دهیدروژناز با روش سطح پاسخ

Investigating the effect of silver nanoparticles on the activity of glycerol dehydrogenase by response surface methodology

فوزیه مقدمی*[۱]، فاطمه حاج مرادی[۱]، مهدی کلانتری[۲]
Foozieh Moghadami[1]*, Fatemeh Hajmoradi[1], Mahdi Kalantari[2]

۱- استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
۲- استادیار گروه آمار، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
1. Assistant Professor, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran
2. Assistant Professor, Department of Statistics, Payame Noor University, Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: *Corresponding Author, Email fmoghadami@pnu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۲۵ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۳/۵)

چکیده

استفاده گسترده از نانوذره نقره سبب شده است که آنها به سهولت در دسترس باکتری‌ها قرار گیرند. تعامل بین نانوذره نقره و پروتئین‌ها هنوز به طور کامل شناخته نشده است. در این پژوهش، اثر نانوذره نقره بر گلیسرول دهیدروژناز که در زنجیره تنفسی *گلوکونوباکتر* قرار دارد مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی این تاثیر و همچنین برهمکنش‌های عوامل pH و دما، از روش سطح پاسخ و یک طرح مرکب مرکزی استفاده شد. فعالیت آنزیم از طریق روش رنگ سنجی سنجش شد. نتایج نشان داد که افزایش غلظت نانوذره نقره تا ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر سبب کاهش فعالیت آنزیم گلیسرول دهیدروژناز شد. در حضور مقادیر بالاتر از این غلظت، اثر مهار کنندگی نانوذره کاهش یافت. دما تا ۳۵ درجه سلسیوس و pH تا ۷، اثر افزایشی بر فعالیت آنزیم داشتند و پس از آن تاثیر عکس داشتند. هر سه پارامتر دما، pH و غلظت نانوذره مستقل از یکدیگر بر فعالیت آنزیم گلیسرول دهیدروژناز تاثیرگذار بودند. از نتایج این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت که نانوذره نقره سبب کاهش فعالیت آنزیم گلیسرول دهیدروژناز می‌شوند که نهایتا می‌تواند سبب کاهش فعالیت زنجیره تنفسی و تولید انرژی در باکتری *گلوکونوباکتر* شود. از نتایج این پژوهش می‌توان در کنترل هدفمند فعالیت آنزیم گلیسرول دهیدروژناز جهت تولید دی‌هیدروکسی استن استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی

دما،
pH،
گلوکونوباکتر،
زنجیره تنفسی،
کوانزیم Q_{10}

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-28]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.7.1]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 12, Number 1, 2023

Abstract
The widely used silver nanoparticles made them readily accessible to the bacteria. The interactions between silver nanoparticles and proteins are still not fully understood. In this research, the effect of silver nanoparticles on glycerol dehydrogenase which is located in the respiratory chain of the *Gluconobacter* was investigated. Response Surface Methodology and a central composite design were used to evaluate the activity of enzyme and the interactions of pH and temperatures. Enzyme activity was evaluated by colorimetric method. The results showed that increasing the concentration of silver nanoparticles up to 50 mg/L decreased the activity of glycerol dehydrogenase enzyme. The inhibitory effect of nanoparticles decreased beyond this concentration. The glycerol dehydrogenase activity increased 35ºC and pH 7, but the activity decreased thereafter. The parameters of temperature, pH and nanoparticles concentration influenced the activity of glycerol dehydrogenase enzyme independently. It could be concluded that silver nanoparticles decrease the activity of glycerol dehydrogenase, which can ultimately decrease the activity of the respiratory chain and subsequently energy production in *Gluconobacter*. The results of this research can be used in the targeted control of glycerol dehydrogenase activity to produce dihydroxyacetone.

Keywords: Temperature, pH, *Gluconobacter*, Respiratory chain, Coenzyme Q_{10}

مقدمه

گلیسرول دهیدروژناز، که جزیی از خانواده بزرگ اکسیدوردوکتازهاست، یک آنزیم پلی‌ال دهیدروژناز است که می‌تواند طیف وسیعی از پلی‌ال‌ها یا قندالکل‌ها نظیر آرابیتول، سوربیتول، مانیتول، اریتریتول و ریبیتول را به عنوان سوبسترا پذیرفته و سبب اکسیداسیون آنها به کتوزهای مربوطه شود (Adachi *et al.* 2016). البته این آنزیم می‌تواند گلوکونات را نیز اکسید کرده و ۵-کتوگلوکونات تولید کند. به همین دلیل گاهی اوقات سوربیتول دهیدروژناز و یا گلوکونات ۵-دهیدروژناز نیز نامیده می‌شود (Matsushita *et al.* 2003). آنزیم گلیسرول دهیدروژناز مرحله اول اکسیداسیون گلیسرول را کاتالیز می‌کند و مسئول استفاده از گلیسرول در میکروارگانیسم‌های مختلف است (Wang *et al.* 2014). این آنزیم، گلیسرول را به دی هیدروکسی استن، اکسید می‌کند که در صنایع دارویی و آرایشی بسیار مورد توجه می‌باشد (Ciriminna *et al.* 2018). آنزیم گلیسرول دهیدروژناز، از نظر گروه پروستتیک، به دو نوع تقسیم می‌شود. یک نوع وابسته به NADH که به صورت محلول در سیتوپلاسم می‌باشد و نوع دیگر وابسته به پیرولوکوئینون کینون یا PQQ که مستقر در غشا باکتری‌هاست. نوع دوم در باکتری‌های تولید کننده اسید استیک از جمله جنس *گلوکونوباکتر* یافت می‌شود. آنزیم گلیسرول دهیدروژناز وابسته به PQQ درون غشای پری پلاسمی باکتری *گلوکونوباکتر* قرار دارد که از یک سر با فضای پری-پلاسمی و از سر دیگر با سیتوپلاسم در ارتباط است (Adachi *et al.* 2016). *گلوکونوباکتر*ها، یک جنس از باکتری‌های تولید کننده اسیداستیک هستند که دارای چندین نوع زنجیره تنفسی می‌باشند مانند زنجیره تنفسی سوربیتول، اتانول و گلوکز. این زنجیره‌های تنفسی انرژی بیولوژیکی مورد نیاز این میکروارگانیسم‌ها را تامین می‌کنند (Silva *et al.* 2022). هر زنجیره تنفسی، حاوی دهیدروژنازهای متصل به غشاء و کوانزیم Q10 می‌باشد. از اینرو فعالیت این دهیدروژنازها می‌تواند ارتباط تنگاتنگی با افزایش یا کاهش تولید کوانزیم Q_{10} داشته باشد (Bringer *et al.* 2016).

نانوذرات، ذرات کوچکی هستند (۱ تا ۱۰۰ نانومتر) که به راحتی می‌توانند وارد سلول‌ها و اندامک‌ها شوند. به دلیل ویژگی‌های خاص زیستی و شیمیایی، امروزه نانوذره کاربردهای بیوتکنولوژیک، صنعتی و نانودارویی بسیاری دارند (Saleh *et al.* 2021; Porzani *et al.* 2020). مطالعات نشان داده است که نانوذره نقره دارای خواص ضد میکروبی قابل توجهی هستند (Calderon *et al.* 2017). فرضیه‌های مختلفی برای توجیه خواص ضد باکتریایی نانوذره نقره مطرح می‌باشد؛ از جمله آزاد شدن یون‌های نقره در فضای خارج سلولی و به دنبال آن جذب سلولی و

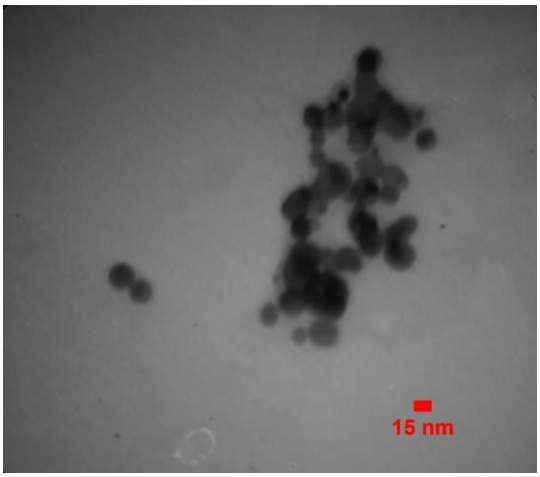
[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-28]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.7.1]

زنجیره‌ای از واکنش‌های درون سلولی و برهمکنش‌های مستقیم نانوذره نقره با غشای سلولی. در واقع اثر بر پروتئین‌ها و آنزیم‌ها، گرادیان پروتون، نفوذپذیری غشاء، جذب سلولی که باعث تولید گونه‌های فعال اکسیژن و آزادسازی داخل سلولی یون‌های نقره برای جلوگیری از تکثیر دی‌ان‌ای و سنتز ATP از جمله مواردی هستند که مطرح شده‌اند (Saleh *et al.* 2021; Hajipour *et al.* 2012; Calderon *et al.* 2017).

ما در پژوهش قبلی، تاثیر نانوذره نقره بر تولید کوانزیم Q_{10} توسط باکتری *Gluconobacter japonicus* FM10 را مورد بررسی قرار دادیم و نتایج مشخص کرد که افزودن نانوذره به محیط کشت باکتری، سبب افزایش تولید کوانزیم Q_{10} شد (Moghadami *et al.* 2020). در این پژوهش، برای پاسخ به این سوال که آیا نانوذره نقره با تاثیر مستقیم بر آنزیم گلیسرول دهیدروژناز، یکی از آنزیم‌های زنجیره تنفسی سبب افزایش کوانزیم Q_{10} می‌شود، اثر نانوذره نقره بر آنزیم گلیسرول دهیدروژناز را مورد بررسی قرار دادیم. جهت مطالعه بهتر، تاثیر غلظت‌های مختلف نانوذره نقره در pH و دماهای مختلف با کمک روش سطح پاسخ بر آنزیم گلیسرول دهیدروژناز مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی: نانوذره نقره (AgNPs) با ابعاد ۲۰ نانومتر (شکل ۱) از شرکت US Research Nanomaterials Co. (آمریکا) خریداری شد.



شکل ۱- تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری از نانوذره نقره

Fig 1. Transmission Electron micrograph of silver nanoparticles

سایر مواد شیمیایی نیز از شرکت‌های Merck و Sigma-Aldrich تهیه شدند.

باکتری و محیط‌های کشت: باکتری استفاده شده در این پژوهش، *Gluconobacter japonicus* FM10 بود که در پژوهش‌های قبلی آن را جداسازی و شناسایی کرده بودیم. این سویه بر روی محیط GYC (Glucose Yeast extract Calcium Carbonate) شامل گلوکز ۵۰ گرم بر لیتر، عصاره مخمر ۱۰ گرم بر لیتر، کربنات کلسیم ۳۰ گرم بر لیتر و آگار ۲۵ گرم بر لیتر کشت شد. برای استفاده های بعدی به مدت ۲-۳ ماه در دمای یخچال نگهداری شد (Moghadami *et al.* 2019). محیط پیش کشت، حاوی ۲۰ گرم بر لیتر سوربیتول، ۳ گرم بر لیتر عصاره مخمر و ۳ گرم بر لیتر پپتون بود و محیط کشت تولید، حاوی ۱۱۰ گرم بر لیتر سوربیتول، ۲۵ گرم بر لیتر عصاره مخمر، ۳۵ گرم بر لیتر پپتون، ۰/۵ گرم بر لیترKH_2PO_4 و ۰/۵۵ گرم بر لیتر $MgSO_4$ بود. همه آزمایش‌ها در فلاسک‌های ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت انجام شد. پس از تلقیح، فلاسک‌ها به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد با سرعت rpm ۱۸۰ در انکوباتور نگهداری شدند (Moghadami *et al.* 2021).

آماده سازی عصاره سلولی: جهت تهیه بیومس، محتوای فلاسک‌ها در ۱۲۰۰۰rpm به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس سلولها در بافر پتاسیم فسفات M ۰/۰۱ با pH=٦ سوسپانسیون شدند. جهت تهیه عصاره سلولی از دستگاه سونیکاتور استفاده شد. سونیکاسیون در ٤ مرحله انجام گرفت. هر مرحله شامل ۱۰ دقیقه سونیکاسیون با فواصل ۵ دقیقه استراحت انجام گرفت. توان استفاده شده در این بررسی ۱۰۰ وات بود. بعد از اتمام مراحل فوق سلولهای شکسته نشده توسط سانتریفوژ در ۸۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه جدا شدند. مایع رویی شامل عصاره سلولی بود (Ameyama *et al.* 1985).

سنجش فعالیت آنزیم: به منظور اندازه گیری فعالیت گلیسرول دهیدروژناز، آنزیم موجود درعصاره سلولی در معرض گلیسرول به عنوان سوبسترا قرار گرفت. مواد زیر به داخل لوله‌های آزمایش افزوده شدند: بافر MacIlvaine ۰/۵ میلی لیتر، عصاره سلولی حاوی آنزیم ۰/۱ میلی لیتر، گلیسرول ۰/۲میلی لیتر و ۱۰۰-x

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-28]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.7.1]

triton (٪۱۰) ۰/۱ میلی لیتر. جهت تهیه شاهد نیز، عصاره سلولی حرارت داده شده (آنزیم غیر فعال) استفاده شد. برای شروع واکنش، ۰/۱ میلی لیتر پتاسیم فری سیانید (Potassium ferricyanide) به لوله‌ها افزوده شده و لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه دردمای آزمایشگاه نگهداری شدند. در انتها برای اتمام واکنش، ۰/۱ میلی لیتر معرف سولفات فریک دوپانول (۵ گرم $Fe_2(So_4)_3.nH_2o$ و ۳ گرم سدیم دودسیل سولفات، ۹۵ میلی لیتر اسید فسفریک ٪۸۵ و آب مقطر تا حجم یک لیتر) به لوله افزوده شد. پس از گذشت ۲۰ دقیقه، ۳/۵ میلی لیتر آب به لوله‌ها افزوده شد و میزان جذب محلول حاصل در طول موج ٦٦٠ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد (Ameyama *et al.* 1985).

اثر نانوذره نقره بر فعالیت گلیسرول دهیدروژناز در دما و pHهای مختلف: جهت بررسی تاثیر نانوذره نقره بر فعالیت آنزیم گلیسرول دهیدروژناز، فعالیت آنزیم در دماها و pHهای مختلف در حضور غلظت‌های مختلف نانوذره نقره سنجش شدند. مقادیر استفاده شده در جدول ۱ و ۲ دیده می‌شود. به طور کلی ۲۰ آزمایش مختلف با نسبت‌های مختلفی از هر سه پارامتر انجام شد. جهت تنظیم pHهای مختلف نیز از بافر MacIlvaine با pHهای مختلف طبق جدول استفاده شد.

آنالیز آماری: به منظور بررسی تاثیر نانوذره نقره بر فعالیت آنزیم گلیسرول دهیدروژناز در pH و دماهای مختلف و همچنین بررسی تداخل عواملغلظت نانوذره، pH و دما با یکدیگر و با آنزیم، از روش سطح پاسخ با طرح مرکب مرکزی شامل سه عامل استفاده شد. این عوامل که به عنوان متغیرهای مستقل در نظر گرفته شدند، عبارتند از غلظت نانوذره نقره (AgNPs)، pH و دما (Temperature). فعالیت آنزیم گلیسرول دهیدروژناز (GLDH) نیز به عنوان متغیر پاسخ در نظر گرفته شد. کلیه تحلیل‌های آماری مربوط به RSM از جمله پیاده‌سازی طرح مرکب مرکزی و تحلیل واریانس (ANOVA) با استفاده از نرم افزار Minitab ویرایش 20.4 انجام شد. در جدول ۱، سطوح مختلف متغیرهای مستقل در طرح مرکب مرکزی نشان داده شده‌اند. جدول ۲ نیز، داده‌های مربوط به ۲۰ آزمایش انجام شده به کمک طرح مرکب مرکزی که برای تحلیل‌های آماری به کار برده شده را نشان می‌دهد. لازم به ذکر است که کلیه آزمون‌های آماری مربوط به ANOVA و ضرایب رگرسیونی در سطح ٪۵ انجام شد.

جدول ۱- سطوح مختلف متغیرهای مستقل در طرح مرکب مرکزی

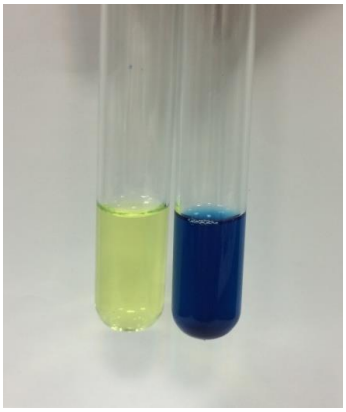
Table 1. Levels of independent variables used for designing of the central composition design

Parameters	Levels				
	-1.68179	-1	0	1	1.68179
AgNPs (mg/L)	0	20	50	80	100.45
pH	3.64	5	7	9	10.36
Temperature (C)	26.59	30	35	40	43.41

نتایج و بحث

سنجش فعالیت آنزیم گلیسرول دهیدروژناز:

در روش سنجش آنزیم در عصاره سلولی در صورت مثبت بودن واکنش، با ایجاد غلظت‌های مختلفی از رنگ آبی، فعالیت آنزیم گلیسرول دهیدروژناز سنجیده شد. شکل ۲ نشان دهنده یک واکنش مثبت (آبی) و یک واکنش منفی (زرد) است. فعالیت آنزیم گلیسرول دهیدروژناز بر اساس U/L به دست آمد که در جدول ۲ دیده می‌شود.



شکل ۲- یک واکنش مثبت (آبی) و یک واکنش منفی (زرد)

Fig 2. The positive enzymatic reaction (Prussian blue) and the negative enzymatic reaction (yellow)

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-28]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.7.1]

جدول ۲- مقادیر متغیرهای مستقل و پاسخ در طرح مرکب مرکزی

Table 2. independent variables and central composite design responses

Run	AgNPs (mg/L)	pH	Temperature (C)	GLDH (U/L)
1	50	7	35	14
2	20	9	30	22
3	20	5	30	19
4	20	9	40	24.5
5	80	9	40	1.5
6	50	7	43.41	11.5
7	80	5	40	42
8	100.45	7	35	0.2
9	0	7	35	39
10	50	3.64	35	5.5
11	80	9	30	1.4
12	20	5	40	22.5
13	50	7	35	15
14	50	7	26.59	7.5
15	50	7	35	14.5
16	80	5	30	1.2
17	50	7	35	15.5
18	50	7	35	14
19	50	10.36	35	13.5
20	50	7	35	14.5

اثر نانوذره نقره بر فعالیت گلیسرول دهیدروژناز در دما و pHهای مختلف:

جهت بررسی تاثیر نانوذره نقره بر فعالیت آنزیم گلیسرول دهیدروژناز در pH و دماهای مختلف، از روش آماری سطح پاسخ استفاده شد. پس از انجام ۲۰ آزمایش، میزان فعالیت آنزیم گلیسرول دهیدروژناز بر اساس U/L به دست آمد. مدل رگرسیونی به کار رفته در RSM به صورت زیر است:

$$Y = b_0 + \sum b_i X_i + \sum b_{ii} X_i^2 + \sum_i \sum_j b_{ij} X_i X_j$$

وقتی که Y متغیر پاسخ بوده و X_iها متغیرهای مستقل یا همان عوامل هستند. b_0 جمله ثابت بوده و b_iها نشان دهنده ضرایب اثرات خطی هستند. در مدل فوق b_{ii}ها و b_{ij}ها به ترتیب نشان دهنده ضرایب اثرات توان دوم و ضرایب اثرات متقابل هستند.

به منظور بررسی تاثیر نانوذره نقره بر فعالیت آنزیم گلیسرول دهیدروژناز در pH و دماهای مختلف با استفاده از روش سطح پاسخ، مدل رگرسیونی به دست آمد که در آن، AgNPs ، pH، Temperature و GLDH به ترتیب نشان دهنده غلظت نانوذره نقره، سطح pH، دما و میزان فعالیت آنزیم گلیسرول دهیدروژناز است. طبق معادله به دست آمده هر سه عامل غلظت نانوذره نقره، سطح pH، دما بر میزان فعالیت آنزیم گلیسرول دهیدروژناز موثر می‌باشند:

Temperature + ۰/۹۹۸ pH +۱/۳۲۹ + AgNPs ۱۰/۷۷۵ – ۱٤/٦۱٦GLDH =
(Temperature)^{2}۲/۰۰۸ – ۲ (pH)۲/۰۰۸ – ۲ (AgNPs)۱/٥٦۳

جدول ۳، نتایج مربوط به ANOVA مدل رگرسیونی نشان می‌دهد. با مقایسه آخرین ستون این جدول (P-Value) با سطح معنی داری ۰/۰۵ می‌توان نتیجه گرفت که همه اثرات خطی و مربعی متغیرهای مستقل از نظر آماری معنی‌دار هستند (P-value<0.05). به عبارت دیگر، هر سه عامل غلظت نانوذره نقره، pH و دما بر میزان فعالیت آنزیم گلیسرول دهیدروژناز تاثیرگذار هستند. لازم به ذکر است که مقدار ضریب تعیین تعدیل یافته مدل رگرسیونی برابر با ۹۷/٦۹ درصد است و نشان دهنده قدرت بالای آن در مدل سازی و برازش داده‌هاست.

جدول ۳- جدول ANOVA برای مدل رگرسیونی

Table 3. Regression analysis by ANOVA

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	6	1783.47	297.24	135.11	0.000
Linear	3	1623.32	541.11	245.95	0.000
AgNPs	1	1585.59	1585.59	720.71	0.000
pH	1	24.13	24.13	10.97	0.006
Temperature	1	13.6	13.6	6.18	0.027
Square	3	160.15	53.38	24.26	0.000
$(AgNPs)^2$	1	35.19	35.19	15.99	0.002
$(pH)^2$	1	58.12	58.12	26.42	0.000
$(Temperature)^2$	1	58.12	58.12	26.42	0.000
Error	13	28.6	2.2		
Lack-of-Fit	8	26.89	3.36	9.84	0.011
Pure Error	5	1.71	0.34		
Total	19	1812.07			

جدول ٤ مقدار برآورد ضرایب مدل رگرسیونی را به همراه T-Value و P-Value نشان می‌دهد . مقادیر P-Value این جدول

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-28]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.7.1]

نیز تایید کرد که همه ضرایب مدل رگرسیونی از نظر آماری معنی-دار هستند (P-value<0.05). این موضوع در شکل ۳ به وضوح قابل رویت است. شکل ۳، نمودار پراکنش میزان فعالیت آنزیم گلیسرول دهیدروژناز در مقابل غلظت نانوذره نقره، دما و pH به همراه منحنی مربوط به مدل رگرسیونی را نشان می‌دهد.

جدول ٤- برآورد ضرایب رگرسیونی

Table 4. Estimation of regression coefficients

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value
Constant	14.616	0.605	24.16	0.000
AgNPs	-10.775	0.401	-26.85	0.000
pH	1.329	0.401	3.31	0.006
Temperature	0.998	0.401	2.49	0.027
$(AgNPs)^2$	1.563	0.391	4	0.002
$(pH)^2$	-2.008	0.391	-5.14	0.000
$(Temperature)^2$	-2.008	0.391	-5.14	0.000

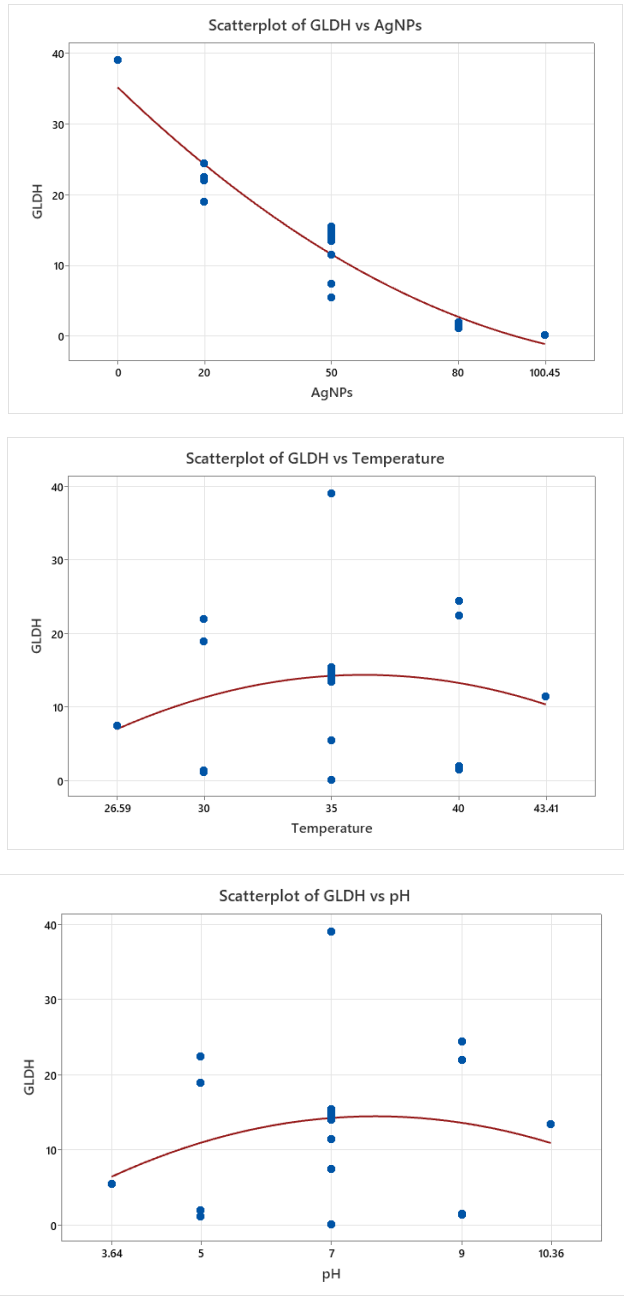
در پژوهش قبلی تاثیر نانوذره نقره را بر تولید کوانزیم Q10 در باکتری *Gluconobacter japonicus* FM10 مورد بررسی قرار دادیم. نتایج نشان داد که افزودن نانوذره نقره به محیط کشت، سبب افزایش تولید کوانزیم Q10 می‌شود(Moghadami *et al.* 2020). ولی مشخص نیست که آیا نانوذره با تاثیر بر آنزیم‌های دخیل در زنجیره تنفسی مانند گلیسرول دهیدروژناز سبب افزایش تولید می‌شود یا خیر؟ از اینرو در این پژوهش، اثر نانوذره نقره بر آنزیم گلیسرول دهیدروژناز مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج پژوهش حاضر مشخص کرد که هر سه پارامتر دما، pH و غلظت نانوذره نقره بر فعالیت آنزیم گلیسرول دهیدروژناز موثر بودند. افزایش غلظت نانوذره نقره سبب کاهش فعالیت آنزیم گلیسرول دهیدروژناز شد. اما تاثیر آن خطی نبود. در واقع آنطور که از مدل رگرسیونی مشخص است با افزایش غلظت نانوذره نقره، میزان فعالیت آنزیم گلیسرول دهیدروژناز کاهش می‌یابد؛ ولی شدت این کاهش ثابت نبوده و به تدریج کم می‌شود. یعنی غلظت نانوذره تا ۵۰ میلی گرم بر لیتر، تاثیرگذاری قابل توجهی بر مهار آنزیم دارد ولی بعد از این غلظت، اثر مهارکنندگی نانوذره کاهش می‌یابد. با توجه به ضرایب به دست آمده در معادله رگرسیونی، از میان عوامل مورد بررسی، تاثیر غلظت نانوذره بر فعالیت آنزیم، بیش از عوامل دیگر بود (ضریب غلظت نانوذره ۱۰/۷۷۵-). پس از آن pH با ضریب ۱/۳۲۹+ قرار داشت که تاثیر آن اندکی بیش از دما با ضریب ۰/۹۹۸+ بود.

مطالعات بسیاری بر روی عوامل موثر بر آنزیمها (Azimi *et al.* 2018) به ویژه اثر نانوذره بر فعالیت آنزیم‌ها انجام گرفته است (Porzani *et al.* 2021; Wu *et al.* 2009; Mahmudi *et al.* 2016). برخی از مطالعات نشان داده است که استفاده از نانوذره برای تثبیت دهیدروژنازها باعث افزایش عملکرد آنها می‌شود (Liao *et al.* 2001; Li *et al.* 2008; Alam *et al.* 2015). در حالیکه برخی دیگر عموماً مشخص کرده‌اند که عمل ضدمیکروبی نانوذره نقره از طریق مهار آنزیم‌های حیاتی مانند دهیدروژنازها انجام می‌شود (Calzolai *et al.* 2010; Cha *et al.* 2015). به عنوان مثال، لی و همکاران گزارش کردند که فعالیت دهیدروژنازهای زنجیره تنفسی در اشریشیاکلی توسط نانوذره نقره به روشی وابسته به دوز مهار می‌شود (Barbalinardo *et al.* 2018). همچنین، فعالیت‌های اگزونزیم خاک، به ویژه برای دهیدروژنازها، تحت تأثیر نانوذره نقره پوشش داده شده با سیترات قرار گرفت (Li *et al.* 2018). بالنده و همکاران اثر نانوذره نقره بر فعالیت آنزیم دهیدروژناز را بررسی کردند. نتایج نشان داد که نانوذره نقره در غلظت کمتر از ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، سبب افزایش فعالیت دهیدروژناز شد ولی در مقادیر بالاتر از این غلظت، اثر معکوس داشت و مهار فعالیت دهیدروژناز را در پی داشت (Balandeh *et al.* 2022). در بررسی که بر روی تاثیر نانوذره نقره بر آنزیم لوسیفراز کرم شب تاب انجام دادند، مشخص شد که نانوذره نقره سبب مهار آنزیم لوسیفراز می‌شود که می‌تواند به تعامل نقره با گروه تیول این آنزیم بستگی داشته باشد (Kakinen *et al.* 2013). مطالعه دیگری نشان داد که ۰,۱ میلی گرم بر لیتر از نانوذره نقره سبب مهار فعالیت آنزیم گلیسرالدئید-۳-فسفات دهیدروژناز می‌شود. وجود گروه تیول در محل فعال آنزیم، عامل اصلی مؤثر بر تأثیر عنصر نقره بر فعالیت آنزیم عنوان شد (Jiang *et al.* 2015).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-28]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.7.1]



شکل ۳- نمودار پراکنش فعالیت آنزیم گلیسرول دهیدروژناز در مقابل غلظت نانوذره نقره، دما و pH به همراه منحنی رگرسیون

Fig 3. Scatterplot of GLDH activity against silver nanoparticles concentration, temperature and pH along with regression curve

بنابراین می‌توان گفت آنزیم هایی که یک گروه تیول در محل فعال خود دارند می‌توانند نسبت به سایر آنزیم‌ها در مقابل نقره حساس تر باشند (Srivastava *et al.* 2012; Cha *et al.* 2015). با جستجو در سایت PDB (Protein Data Bank) اطلاعاتی در باره وجود یا عدم وجود گروه تیول در محل اکتیوسایت آنزیم گلیسرول دهیدروژناز وابسته به PQQ به دست نیامد که بتوان از آن جهت توجیه اثر نانوذره نقره بر آنزیم گلیسرول دهیدروژنازاستفاده کرد.

مشخص شده است که اثر یک نانوذره بر یک آنزیم، بستگی به نوع آنزیم و نیز اندازه، شکل و نوع نانوذره دارد (Cabaleiro-Lago *et al.* 2020). بررسی‌ها نشان داده است که ذرات کوچکتر از ۲۰ نانومتر تاثیرگذاری بیشتری در تعامل با آنزیم‌ها دارند (Batista *et al.* 2015; Patra *et al.* 2022). اندازه ذرات نانوذره نقره مورد استفاده در این پژوهش نیز ۲۰ نانومتر بود که می‌تواند نشانگر تاثیرگذاری بیشتر نانوذره بر آنزیم باشد.

نتایج حاصل از مدل رگرسیونی و منحنی‌های پراکنش نشان داد که دما و pH تاثیر مستقیمی بر فعالیت آنزیم گلیسرول دهیدروژناز دارند به طوریکه با افزایش آنها، میزان فعالیت آنزیم گلیسرول دهیدروژناز افزایش می‌یابد؛ ولی این افزایش دائمی نبوده و اگر pH بیشتر از ۷ و دما، بالاتر از ۳۵ درجه سانتیگراد باشد، میزان فعالیت آنزیم گلیسرول دهیدروژناز به تدریج کم می‌شود. بررسی اثر نانوذره بر فعالیت آنزیم‌ها در شرایط مختلف محیطی نشان داده است که پارامترهای محیطی می‌توانند با ایجاد تداخل، بر پاسخ آنزیم‌ها در برابر اثر نانوذره تاثیر بگذارند (Nel *et al.* 2009; Xia *et al.* 2011). به طور مثال بررسی اثر نانوذره پلی استایرن با اندازه‌های مختلف در pHهای مختلف بر آنزیم کربونیک انهیدراز انسانی نشان داد که pH و اندازه نانوذره بر تاثیر یکدیگر بر فعالیت آنزیم موثر بودند (Assarsson *et al.* 2016). این در حالیست که در این پژوهش، هر سه پارامتر دما، pH و غلظت نانوذره مستقل از یکدیگر بر فعالیت آنزیم گلیسرول دهیدروژناز تاثیرگذار بودند.

نتایج این پژوهش نشان داد که نانوذره نقره می‌توانند سبب کاهش فعالیت آنزیم گلیسرول دهیدروژناز شوند که نهایتا می‌تواند سبب کاهش فعالیت زنجیره تنفسی و تولید انرژی در باکتری *گلوکونوباکتر* شود. اگرچه تعامل بین پروتئین‌ها و نانوذره نقره به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است، ولی برای درک بهتر تاثیر نانوذره بر آنزیم گلیسرول دهیدروژناز وابسته به PQQ نیاز به مطالعات بیشتری می‌باشد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-28]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.7.1]

منابع

Adachi, O., Moonmangmee, D., Toyama, H., Yamada, M., & Shinagawa, E. (2003). New development in oxidative fermentation. Applied Microbiology Biotechnology, 60(6), 643-653. **doi: 10.1007/s00253-002-1155-9**

Adachi, O., & Yakushi, T. (2016). Membrane-bound dehydrogenases of acetic acid bacteria. In K. Matsushita, H. Toyama, N. Tonouchi, & A. Okamoto-Kainuma (Eds.), Acetic Acid Bacteria (pp. 273-294). Springer. **doi:10.1007/978-4-431-55933-7_13**

Alam, F., Laskar, A. A., Zubair, M., Baig, U., & Younus, H. (2015). Immobilization of yeast alcohol dehydrogenase on polyaniline coated silver nanoparticles formed by green synthesis. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 119, 78-84. **doi:10.1016/j.molcatb.2015.06.004**

Ameyama, M., Shinagawa, E., Matsushita, K., & Adachi, O. (1985). Solubilization, purification and properties of membrane-bound glycerol dehydrogenase from Gluconobacter industrius. Agriculture Biologcal Chemistry, 49(4), 1001-1010. **doi:10.1271/bbb1961.49.1001**

Assarsson, A., Nasir, I., Lundqvist, M., & Cabaleiro-Lago, C. (2016). Kinetic and thermodynamic study of the interactions between human carbonic anhydrase variants and polystyrene nanoparticles of different size. Rsc Advances, 6(44), 35868–35874. **doi:10.1039/C6RA06175C**

Azimi, S., Rahmani, S., & Majidianii, S. (2018). Inhibition of the boll worm, Helicoverpa armigera amyloeletic activity by seed protein extracts of Prosopis farcta and Cicer arietinum. Genetic Engineering and Biosafety Journal, 6(2), 333-341. **DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.2.4.8**

Balandeh, S., Lakzian, A., & Javadmanesh, A. (2022). Effects of Silver Nanoparticles on Soil Microbial Activity and Bacterial Populations in a Calcareous Soil Using qPCR. Journal of Water and Soil, 35(6), 843-859. **doi:10.22067/JSW.2021.67908.1004**

Barbalinardo, M., Caicci, F., Cavallini, M., & Gentili, D. (2018). Protein Corona Mediated Uptake and Cytotoxicity of Silver Nanoparticles in Mouse Embryonic Fibroblast. Small, 14(31), e1801219. **doi: 10.1002/smll.201801219**

Batista, C.A., Larson R.G., & Kotov N.A.(2015). Nonadditivity of nanoparticle interactions. Science ,350(6257),1242477. **doi: 10.1126/science.1242477**

Cabaleiro-Lago, C., & Lundqvist, M. (2020). The Effect of Nanoparticles on the Structure and Enzymatic Activity of Human Carbonic Anhydrase I and II. Molecules, 25(19), 4405. **doi:10.3390/molecules25194405**

Calderon-Jiménez, B., Johnson, M.E., Montoro Bustos, A.R., Murphy, K.E., Winchester, M.R., & Vega Baudrit, J.R. (2017). Silver Nanoparticles: Technological Advances, Societal Impacts, and Metrological Challenges. Frontiers in Chemistry, 5, 6. **doi:10.3389/fchem.2017.00006**

Calzolai, L., Franchini, F., Gilliland, D., & Rossi, F. (2010). Protein–nanoparticle interaction: identification of the ubiquitin–gold nanoparticle interaction site. Nano Letters, 10(8), 3101-5. **doi:10.1021/nl101746v**

Cha, S.H., Hong, J., McGuffie, M., Yeom, B., VanEpps, J.S., & Kotov, N.A. (2015). Shape-Dependent Biomimetic Inhibition of Enzyme by Nanoparticles and Their Antibacterial Activity. ACS Nano, 9(9), 9097–9105. **doi:10.1021/acsnano.5b03247**

Ciriminna, R., Fidalgo, A., Ilharco, L.M., & Pagliaro, M. (2018). Dihydroxyacetone: An Updated Insight into an Important Bioproduct. ChemistryOpen, 7(3), 233-236. **doi:10.1002/open.201700201**

Hajipour, M.J., Fromm, K.M., Ashkarran, A.A., Jimenez de Aberasturi, D., de Larramendi, I.R., Rojo, T., Serpooshan V., Parak W.J., & Mahmoudi M.(2012). Antibacterial properties of nanoparticles. Trends in Biotechnology ,30(10),499-511. **doi:10.1016/j.tibtech.2012.06.004**

Jiang X., Miclaus T., Wang L., Foldbjerg R., Sutherland D.S., Autrup H., Chen C., & Beer C.(2015). Fast intracellular dissolution and persistent cellular uptake of silver nanoparticles in CHO-K1 cells: Implication for cytotoxicity.Nanotoxicology ,9(2),181–189. **doi:10.3109/17435390.2014.907457**

Kakinen A., Ding F., Chen P., Mortimer M., Kahru A., & Ke P.C.(2013). Interaction of firefly luciferase and silver nanoparticles and its impact on enzyme activity.Nanotechnology ,24(34),345101. **doi:10.1088/0957-4484/24/34/345101**

Li A., Lin J., Huang Z., Wang X., & Guo L.(2018). Surface-Enhanced Raman Spectroscopy on Amorphous Semiconducting Rhodium Sulfide Microbowl Substrates.Science ,21(10):1-10. **doi:10.1016/j.isci.2018.11.017**

Li, G.Y., Huang, K.L., Jiang, Y.R., Yang, D.L., & Ding, P. (2008). Preparation and characterization of Saccharomyces cerevisiae alcohol dehydrogenase immobilized on magnetic nanoparticles. International Journal of Biological Macromolecules, 42(5), 405-12. **doi:10.1016/j.ijbiomac.2008.01.005**

Liao, M.H., & Chen, D.H. (2001). Immobilization of yeast alcohol dehydrogenase on magnetic nanoparticles for improving its stability. Biotechnology Letters, 23, 1723–1727. **doi:10.1023/A:1012485221802**

Mahmoudi, M., Bertrand, N., Zope, H., & Farokhzad, O.C. (2016). Emerging understanding of the protein corona at the nano-bio interfaces. Nano Today, 11, 817–832. **doi:10.1016/j.nantod.2016.10.005**

Matsushita, K., Fujii, Y., Ano, Y., Toyama, H., Shinjoh, M., Tomiyama, N., Sugisawa, T., Hoshino, T., & Adachi O. (2003). 5-Keto-D-gluconate production is catalyzed by a quinoprotein glycerol dehydrogenase, major polyol dehydrogenase, in Gluconobacter species. Applied Environment Microbiology, 69(4), 1959–1966. **doi: 10.1128/AEM.69.4.1959-1966.2003**

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-28]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.7.1]

Moghadami, F., Hosseini, R., Fooladi, J., & Kalantari, M. (2021). Optimization of Coenzyme Q10 Production by Gluconobacter japonicus FM10 Using Response Surface Methodology. Journal of Applied Biotechnology Reports, 8(2), 172-179. **doi: 10.30491/jabr.2021.130940**

Moghadami F., Fooladi J., & Hosseini R.(2019). Introducing a thermotolerant Gluconobacter japonicus strain, potentially useful for coenzyme Q10 production.Folia Microbiologica ,64(4),471-479. **doi:10.1007/s12223-018-0666-4**

Moghadami F., & Hosseini R.(2020). Effect of iron and silver nanoparticles on coenzyme Q10 production by Gluconobacter japonicus FM10.Iranian Journal of Microbiology ,12(6),592-600. **doi:10.18502/ijm.v12i6.5034**

Nel A.E., Madler L., Velegol D., Xia T., Hoek E.M., Somasundaran P., Klaessig F., Castranova V., & Thompson M.(2009). Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface.Nature Mater ,8(7),212-220. **doi: 10.1038/nmat2442**

Patra, I., Huy, D.T.N., & Alsaikhan, F. (2022). Toxic effects on enzymatic activity, gene expression and histopathological biomarkers in organisms exposed to microplastics and nanoplastics: a review. Environmental Sciences Europe, 34, 80. **doi:10.1186/s12302-022-00652-w**

Porzani, S.J., Lorenzi, A.S., Eghtedari, M., & Nowruzi, B. (2021). Interaction of Dehydrogenase Enzymes with Nanoparticles in Industrial and Medical Applications, and the Associated Challenges: A Mini-review. Mini Reviews in Medical Chemistry, 21(11), 1351-1366. **doi:10.2174/1570193X17666201119152944**

Saleh, F., Hosseini, F., Kheirandish, F., & Yazdian, F. (2021). Evaluation of the Inhibitory Effect of Biosynthetic Zinc Oxide Nanoparticles on the Expression of Efflux Pumps Genes (AdeA, AdeC) in Clinical Strains of Acinetobacter baumannii. Genetic Engineering and Biosafety Journal, 10(1), 1-10. URL: **DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.1.4.4**

Silva, G.A.R., Oliveira, S.S.S., Lima, S.F., do Nascimento, R.P., Baptista, A.R.S., & Fiaux, S.B. (2022). The industrial versatility of Gluconobacter oxydans: current applications and future perspectives. World J Microbiol Biotechnol, 38(8), 134. **doi:10.1007/s11274-022-03310-8**

Srivastava, M., Singh, S., & Self, W.T. (2012). Exposure to silver nanoparticles inhibits selenoprotein synthesis and the activity of thioredoxin reductase. Environmental Health Perspective, 120(1), 56-61. **doi:10.1289/ehp.1103928**

Wang, Y., Tao, F., & Xu, P. (2014). Glycerol dehydrogenase plays a dual role in glycerol metabolism and 2,3-butanediol formation in Klebsiella pneumoniae. Journal of Biological Chemistry, 289(9), 6080-90. **doi:10.1074/jbc.M113.525535**

Wu, Z., Zhang, B., & Yan, B. (2009). Regulation of enzyme activity through interactions with nanoparticles. International Journal of Molecular Sciences, 10(10), 4198-4209. **doi:10.3390/ijms10104198**

Xia, X.R., Monteiro-Riviere, N.A., Mathur, S., Song, X., Xiao, L., Oldenberg, S.J., Fadeel B., & Riviere J.E.(2011). Mapping the Surface Adsorption Forces of Nanomaterials in Biological Systems.ACS Nano ,5(11),9074. **doi :10.1021/nn203303c**

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-28]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.7.1]