

## بررسی خصوصیات آنزیم پراکسیداز و تهیه نانوذره پروتئینی از آن با روش محاسباتی و آزمایشگاهی

شیمیا فولادبند<sup>۱</sup>، پریناز قدم<sup>۲\*</sup>، محبوبه ضرابی<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۴/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۹/۱۶

### چکیده

ساختارهای نانوپروتئینی می‌توانند توسط توانایی ذاتی خودتجمعی مولکول‌ها تشکیل شوند که این توانایی می‌تواند به وسیله حدواسط‌ها اصلاح گردد. در میان عوامل خودتجمعی ذاتی پروتئین‌ها، هیدروفوبیسیته مهمترین عامل است. مولکول‌های حدواسطی مانند گلوآرالدهید می‌تواند باعث تجمع پروتئینی و تشکیل نانوذره گردند. در این پژوهش از نرم افزار Aggrescan 3D برای بررسی پروتئین‌هایی که خاصیت خودتجمعی دارند استفاده شد و به این ترتیب آنزیم پراکسیداز با توانایی خودتجمعی انتخاب گردید و با استفاده از گلوآرالدهید این آنزیم به نانوانزیم تبدیل شد. آنالیزهای FESM و DLS نشان دادند که اندازه متوسط نانوانزیم ۵۰۰ نانومتر می‌باشد فعالیت نانوانزیم نسبت به فعالیت آنزیم مونومر در دمای بهینه ۲۰ درجه سلسیوس و pH بهینه ۷ کاهش یافته است. با استفاده از همولوژی مدلینگ ساختار PDB دو آنزیم پراکسیداز به دست آمد و با داکینگ، اتصال گلوآرالدهید به این دو بررسی شد. با استفاده از نرم افزار LigPlot مشاهده شد آمینو اسیدها با پیوند هیدروژنی به گلوآرالدهید متصل شده اند و برای بررسی کاهش فعالیت نانو آنزیم، اتصالات جایگاه فعال با سرور COACH بررسی گردید و مشاهده شد که گلوآرالدهید به آمینو اسیدهای جایگاه فعال نانو آنزیم متصل شده است. شبیه سازی دینامیک مولکولی نشان داد که آنزیم مونومر و نانو آنزیم در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و زمان ۵ نانوثانیه پایدار هستند.

**واژه‌های کلیدی:** ابزارهای زیست محاسباتی، تجمع پذیری، نانوانزیم پراکسیداز.

### مقدمه

نانوفناوری توانایی ساخت، طراحی و دستکاری ساختار در ابعاد یک تا ۵۰۰ نانومتر است ولی معمولاً نانوذرات زیستی کمتر از ۱۰۰ نانومتر می‌باشند (Klaessig et al., 2011). در نانوفناوری با استفاده از پروتئین‌هایی که خاصیت خودتجمع‌پذیری

۱- کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء (س)، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء (س)، تهران، ایران

\* (نویسنده مسئول: pghadam@alzahra.ac.ir)

۳- استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء (س)، تهران، ایران

دارند، نانوپروتئین‌ها ساخته می‌شوند. خودتجمعی ساختارهای پروتئینی توسط عوامل محیطی مانند pH، دما، قدرت یونی و نوع حلال تحت تاثیر قرار می‌گیرد، بنابراین برای تجمع پذیری پروتئین‌ها باید برهمکنش‌های پروتئین- پروتئین را مورد بررسی قرار داد (Luo et al., 2016).

در خودتجمعی پروتئین‌ها چندین پیوند ضعیف غیرکووالانسی مانند یونی، واندروالسی، هیدروژنی، هیدروفوبی و  $\pi$ -stacking دخالت دارند (Amdursky et al., 2010) که هیدروفوبیسته نقش مهمی در این مورد بازی می‌کند (Yan et al., 2010). از جمله ویژگی‌های دیگری که باعث تجمع پذیری پروتئین‌ها می‌شود، ساختارهای متقارن پروتئین‌ها و وجود پپتیدها می‌باشند (Luo et al., 2016). خودتجمعی پروتئین‌های مونومریک، الیگومرهایی با دمین‌های متقارن مانند خطی، دی‌هیدرال حلقوی، مکعبی و غیره ایجاد می‌کند و نظم هندسی خاص بین محورهای تقارن دو پروتئین الیگومریک، امکان خودتجمعی پروتئین‌ها را فراهم می‌کند. ساختارهای ثانوی مانند آلفا هلیکس و صفحات بتا (Feverati et al., 2012) و موتیف‌های آمیلوئیدی و coiled coil (Selkoe, 2003) نیز می‌توانند سبب تجمع پروتئین‌ها شوند.

تجمع پذیری پروتئین‌ها به کمک واسطه‌هایی مانند آپتامرهای DNA یا RNA (Liu et al., 2005) نیز صورت می‌گیرد. کئوردیناسیون فلزی و میانکنش‌های الکترواستاتیک (Luo et al., 2016) و استفاده از اتصال دهنده عرضی گلوآرآلدئید (Jahanshahi & Babaei., 2008) می‌توانند به تجمع پذیری پروتئین‌ها کمک کنند.

امروزه ابزارهای زیست‌محاسباتی مانند AGGRESCAN، PASTA، PAGE و AGGRESCAN 3D.

در پیش‌گویی خودتجمعی پروتئین‌ها استفاده می‌شود.

از تجمع پروتئین‌ها در حسگرهای زیستی (Qi et al., 2004)، طراحی بیوکاتالیزورها (Ma et al., 2015) و زیست پزشکی و درمان استفاده می‌شود (Luo et al., 2016).

با استفاده از روش‌های مختلفی از جمله حلال زدایی (desolvation) (Marty et al., 1978)، جداسازی فاز ته نشین شده (Coacervation-phase separation) (Elzoghby., 2013)، امولسیون (Emulsion) (Scheffel et al., 1972)، میسل معکوس (Reverse phase microemulsion) (Elzoghby., 2013)، پوشش دهی لایه به لایه ((Layer-by-Layer(LBL) (Borges & Mano., 2014)، خودسامانی (self-assembly) (Elzoghby., 2013) و نانو اسپری (Cal & Salahub., 2010, Patel et al., 2009) (nano spray) می‌توان نانو ذره سنتز کرد.

در این مقاله برای انتخاب پروتئین مناسب برای تولید نانوذره از بین ابزارهای زیست محاسباتی، AGRESCAN 3D که بر اساس هیدروفوبیسته کار می‌کند، انتخاب گردید. سپس پروتئین‌هایی که دارای توانایی خودتجمعی بودند، مشخص شدند. در این نرم افزار امتیاز خودتجمعی پروتئین‌هایی مانند S-layer و آمیلوئیدها بالای یک به دست آمد که پروتئین‌هایی با امتیاز بالای یک، خودتجمعی مناسبی دارند. پس از بررسی‌ها از آنزیم پراکسیداز استفاده شد و این آنزیم با اتصالات عرضی

گلو تار آلدهید (Liu et al., 2005) به نانوانزیم تبدیل شد؛ سپس با استفاده از ابزارهای آزمایشگاهی و زیست محاسباتی خصوصیات بیوشیمیایی و فعالیت آنزیم و نانو آنزیم مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش ها

### مطالعات محاسباتی آنزیم

**بررسی تجمع پذیری پروتئین:** با استفاده از سرور AGGRESCAN تمایل تجمع پذیری هر آمینو اسید تعیین و خروجی به صورت امتیاز برای هر یک از پروتئین ها بر اساس هیدروفوبیسته آن ها تعریف می شود. مجموعه ای از پروتئین ها که در مقالات دارای توانایی تجمع پذیری هستند، با استفاده از این سرور بررسی شدند. در نهایت آنزیم پراکسیداز به عنوان پروتئین مورد نظر انتخاب گردید.

**جست و جو ساختار سوم آنزیم پراکسیداز:** با توجه به اینکه آنزیم پراکسیداز به صورت خالص خریداری شد و اطلاعاتی درباره وزن مولکولی دقیق و pI آنزیم در دسترس نبود، بنابراین با استفاده از وزن مولکولی آنزیم که حدودا در سایت سیگما ۳۰ کیلو دالتون گزارش شده بود، دو ایزوآنزیم این آنزیم با کدهای (الف Uniprot P59121) با وزن مولکولی ۳۳/۷ کیلو دالتون و (ب) P80679 با وزن مولکولی ۳۱/۹ کیلو دالتون و pI ۴/۷ (اسیدی) انتخاب شدند، که هر دو این کدها متعلق به گیاه *Armoracia rusticana* می باشند. با توجه به این که برای انجام مطالعات محاسباتی کد PDB آنزیم مورد نیاز است و این دو آنزیم فاقد کد PDB بودند، برای هر دو، با استفاده از روش همولوژی مدلینگ و نرم افزار مدلر (Modeller) مدل سازی انجام شد.

در آزمایشگاه از گلو تار آلدهید به عنوان اتصال دهنده عرضی برای اتصال مولکول های آنزیم و سنتز نانوذره استفاده شد. با استفاده از نرم افزار اتوداک (Auto Dock) داکینگ بین مدل های پروتئینی ساخته شده و گلو تار آلدهید انجام گردید و با کمک برنامه لیگ پلات (LigPlot) آمینو اسیدهای متصل به گلو تار آلدهید برای هر یک از مدل های ساخته شده، مشاهده گردید. **پیش گویی آمینو اسیدهای جایگاه فعال مدل های ساخته شده:** به کمک سرور کوچ (COACH) آمینو اسیدهای احتمالی در جایگاه فعال مدل های ساخته شده پیش گویی شد.

**بررسی محاسبات شبیه سازی دینامیک مولکولی:** شبیه سازی با استفاده از نرم افزار گرومکس (Gromacs) برای آنزیم پراکسیداز در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و به مدت ۵ نانوثانیه صورت گرفت. نمودارهای RMSF، RMSD، شعاع ژیراسیون و انرژی پتانسیل برای مدل های ساخته شده پروتئینی و کمپلکس پروتئین و گلو تار آلدهید مورد بررسی قرار گرفتند.

## مطالعات آزمایشگاهی آنزیم

**سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز:** برای سنجش فعالیت آنزیم، محلول پتاسیم فسفات مونوبازیک ۱ مولار، محلول پتاسیم فسفات دی‌بازیک ۱ مولار (بافر پتاسیم فسفات ۶ pH و دمای ۲۰ درجه سلسیوس)، محلول هیدروژن پراکسید ۰/۵ درصد (v/v) و محلول پیروگالول ۵ درصد (w/v) و محلول پراکسیداز ۰/۶ U/ml در بافر پتاسیم فسفات (بلافاصله قبل از استفاده) (Sigma-Aldrich) تهیه شد.

برای سنجش فعالیت آنزیم ۱/۰۵ میلی لیتر آب دیونیزه، ۰/۲۰۵ میلی لیتر بافر پتاسیم فسفات، ۰/۰۸ میلی لیتر محلول هیدروژن پراکسید و ۰/۱۶ میلی لیتر پیروگالول به آرامی مخلوط شد و در دمای ۲۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه نگه داشته شدند. سپس ۰/۰۰۵ میلی لیتر محلول پراکسیداز در همان دما اضافه و به آرامی پیپتاژ شد و افزایش جذب برای ۳ دقیقه با فواصل ۳۰ ثانیه در طول موج ۴۲۰ نانومتر خوانده شد. تعریف فعالیت آنزیم پراکسیداز عبارت است از: یک واحداز پراکسیداز باعث ایجاد ۱ میلی گرم پرپروگالین (Purpurogallin) از پیروگالول (Pyrogallol) در مدت زمان ۲۰ ثانیه در ۶ pH در دمای ۲۰ درجه سلسیوس می‌شود که تغییر جذب در مدت زمان ۲۰ ثانیه باید ۰/۱۸ تا ۰/۳۴ باشد (Lenga 1988).

**بررسی عملکرد دمایی آنزیم پراکسیداز:** برای بررسی اثر دما بر عملکرد آنزیم پراکسیداز در هر یک از دماهای ۱۵، ۲۵، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ درجه سلسیوس محلول سنجش آنزیمی به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت و سپس آنزیم به محلول سنجش در هر یک از این دماها اضافه شد.

**بررسی عملکرد آنزیم در دمای ۸۰ درجه سلسیوس:** به منظور بررسی پایداری فعالیت آنزیم پراکسیداز، آنزیم به مدت ۳۰ دقیقه، ۱، ۱/۵ و ۲ ساعت در دمای ۸۰ درجه سلسیوس قرار گرفت و سپس فعالیت آن سنجیده شد.

**بررسی عملکرد آنزیم در pH های مختلف:** عملکرد آنزیم پس از ۳۰ دقیقه قرارگیری در دمای بهینه ۲۰ درجه سلسیوس و pH های ۲، ۴، ۶ و ۸ که با استفاده از بافر بریتون-رابینسون تهیه شده بود، مورد بررسی قرار گرفت. برای تهیه این بافر از بوریک اسید (۱ مولار)، فسفریک اسید (۱ مولار) و استیک اسید (۱ مولار) استفاده شد که هر کدام به غلظت نهایی (۰/۰۴ مولار) رسیدند.

**سنتز نانوآنزیم پراکسیداز:** برای سنتز نانوذره پروتئینی ابتدا با استفاده از NaOH ۰/۱ مولار، pH آب دیونیزه ۷/۵ یا ۸ تنظیم شد، سپس ۰/۰۰۱ گرم از آنزیم برداشته و در ۰/۵ میلی لیتر آب دیونیزه با pH ۷/۵ یا ۸ حل گردید، سپس ۲ میلی لیتر اتانول توسط پمپ پرستالتیک با سرعت ۰/۲۵ ml/min، به محلول اضافه گردید. به محلول در حال همزدن و در دمای اتاق ۰/۲۳۵ میکرولیتر گلو تار آلدهید ۸ درصد اضافه گردید و به مدت ۲۴ ساعت در حمام یخ قرار داده شد. بعد از گذشت ۲۴

ساعت ۰/۰۵ گرم از L-Cys به محلول اضافه و محلول برای ۴ ساعت در یخچال هم‌زده شد. سپس محلول برای ۱۰ دقیقه با ۱۳۰۰۰ سانتیفریژ گردید و بعد از دو بار شست و شو فعالیت نانو آنزیم ایجاد شده سنجیده شد (Liu et al., 2005).

**ارزیابی دمای بهینه نانو آنزیم پراکسیداز:** برای سنجش فعالیت آنزیم، محلول های مورد نیاز برای سنجش فعالیت آنزیمی پراکسیداز ۱۰ دقیقه در دمای بهینه ۲۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند. در اینجا محلول سنجش بدون نانو آنزیم ۱۰ دقیقه در دماهای ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۴۰ درجه سلسیوس قرار داده شد و سپس نانو آنزیم اضافه گردید و سنجش فعالیت نانو آنزیم با سه بار تکرار انجام شد.

**ارزیابی pH بهینه نانو آنزیم پراکسیداز:** با استفاده از بافر بریتون-رابینسون pH های ۲، ۴، ۶ و ۸ تنظیم و بعد از اضافه کردن آنزیم، نمونه ها به حجم رسانده شدند و سنجش فعالیت آنزیمی در دمای بهینه ۳۰ درجه سلسیوس با ۳ بار تکرار انجام شد.

**بررسی پایداری فعالیت دمایی نانو ذره پراکسیداز:** برای بررسی عملکرد دمایی، نانو آنزیم به مدت ۳۰ دقیقه در دماهای ۱۵، ۲۵، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ درجه سلسیوس قرار داده شد، سپس سنجش فعالیت آنزیمی مورد بررسی قرار گرفت.

**بررسی عملکرد نانو آنزیم پراکسیداز در pH های مختلف:** برای بررسی عملکرد نانو آنزیم پراکسیداز در pH های مختلف از بافر بریتون-رابینسون استفاده شد. به مدت ۳۰ دقیقه نانو آنزیم در دمای بهینه ۳۰ درجه سانتی گراد pH های ۲، ۴، ۶ و ۸ قرار گرفت و سپس سنجش فعالیت آنزیمی انجام شد.

## نتایج و بحث

برای بررسی تجمع پروتئین‌ها از سرور AGGRESCAN 3D استفاده شد. امتیاز تجمع‌پذیری پروتئین های نمونه در مقاله (Luo et al., 2016) در جدول ۱ مشاهده می‌شود.

جدول ۱: امتیاز بندی تجمع پذیری بر اساس هیدروفوبیسیته پروتئین های نمونه در مقاله (Luo et al., 2016)

توسط سرور Aggrescan 3D		
Protein	PDB code	Score of hydrophobicity
Amyloid	2MXU	2.76
$\beta$ -clamp	2POL	1.42
Trp RNA-binding attenuation protein	1QAW	1.27
Bacteriophage tail	4JPP	1.99
$\alpha$ -hemolysin pore complex	7AHL	3.05
Ferritin	1BFR	0.81
S-layer	4UID	1.23

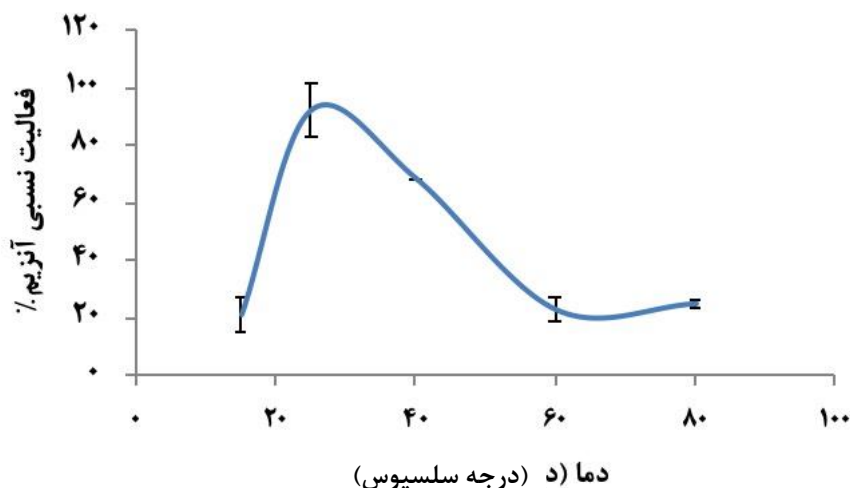
هم چنین با استفاده از این سرور امتیاز تجمع پذیری آنزیم Horseradish peroxidase ۱/۳۳ به دست آمد.

### بررسی ویژگی های بیوشیمیایی قبل و بعد از نانو ذره شدن آنزیم پراکسیداز

عملکرد دمایی آنزیم پراکسیداز: بعد از قرار گرفتن آنزیم در دماهای ۱۵، ۲۵، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ درجه سلسیوس به

مدت ۳۰ دقیقه نتایج حاصل از فعالیت آنزیم با ۳ بار تکرار در شکل ۱ قابل مشاهده است. در این نمودار فعالیت آنزیم در لحظه

صفر بدون تیمار دمایی ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد.

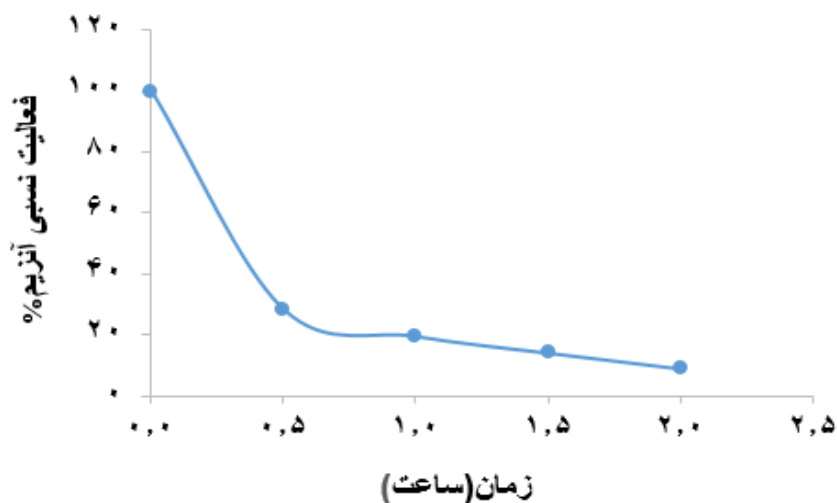


شکل ۱: بررسی پایداری فعالیت آنزیم در دماهای مختلف پس از مدت زمان ۳۰ دقیقه

عملکرد آنزیم پراکسیداز در دمای ۸۰ درجه سلسیوس: بعد از قرار گرفتن آنزیم به مدت ۳۰ دقیقه، ۱، ۱/۵ و ۲

ساعت در دمای ۸۰ درجه سلسیوس، فعالیت باقی مانده آنزیم سنجش شد (شکل ۲). فعالیت آنزیم در لحظه صفر و بدون تیمار

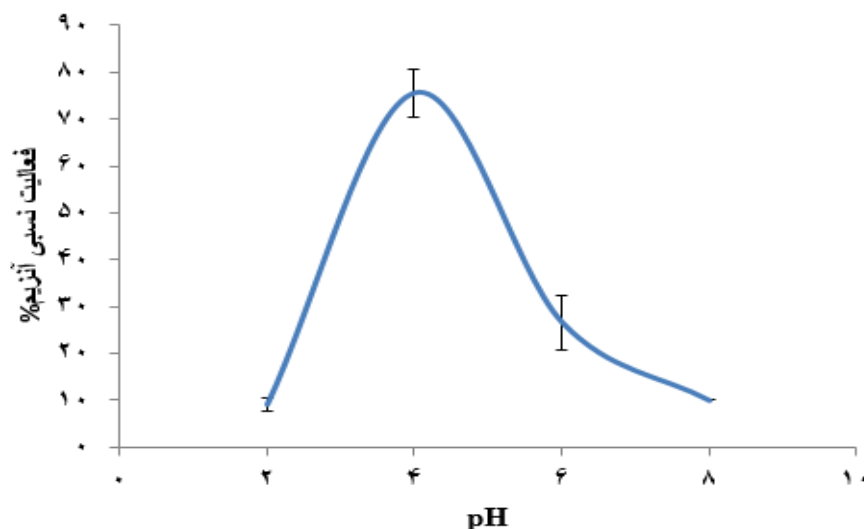
دمایی ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد.



شکل ۲: فعالیت باقی مانده آنزیم پراکسیداز در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد طی ۲ ساعت

بررسی عملکرد آنزیم در pH های مختلف: بعد از قرار گرفتن آنزیم در pH های ۲، ۴، ۶ و ۸ به مدت

۳۰ دقیقه، فعالیت باقی مانده آنزیم سنجیده شد. فعالیت آنزیم در pH ۶ در لحظه صفر ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد (شکل ۳).

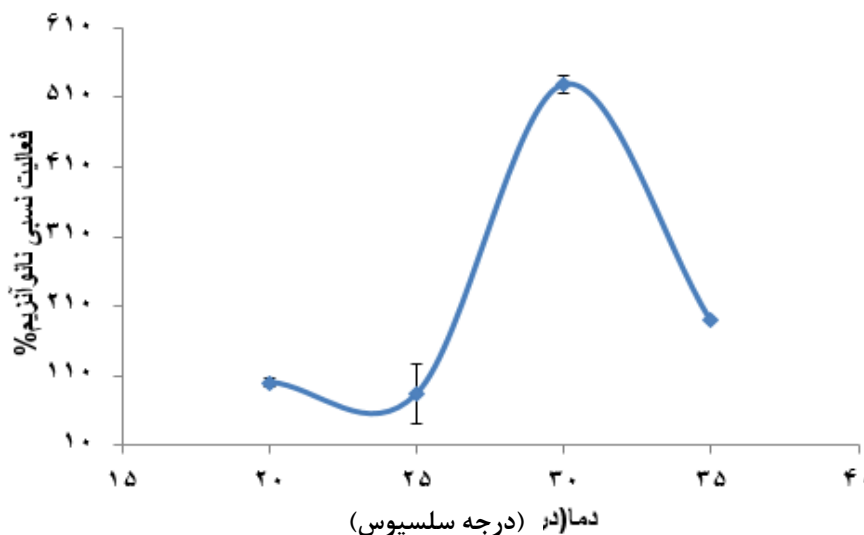


شکل ۳: بررسی پایداری فعالیت آنزیم پس از ۳۰ دقیقه قرارگیری در pH های مختلف

ارزیابی دمای بهینه نانوانزیم پراکسیداز: بعد از قرار گرفتن محلول سنجش فعالیت آنزیم به مدت ۱۰ دقیقه در

دماهای ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درجه سلسیوس فعالیت آنزیم سنجیده شد. فعالیت آنزیم در لحظه صفر و هنگامی که محلول سنجش

فعالیت آنزیم در دمای ۲۰ درجه سلسیوس قرار گرفت ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد (شکل ۴).

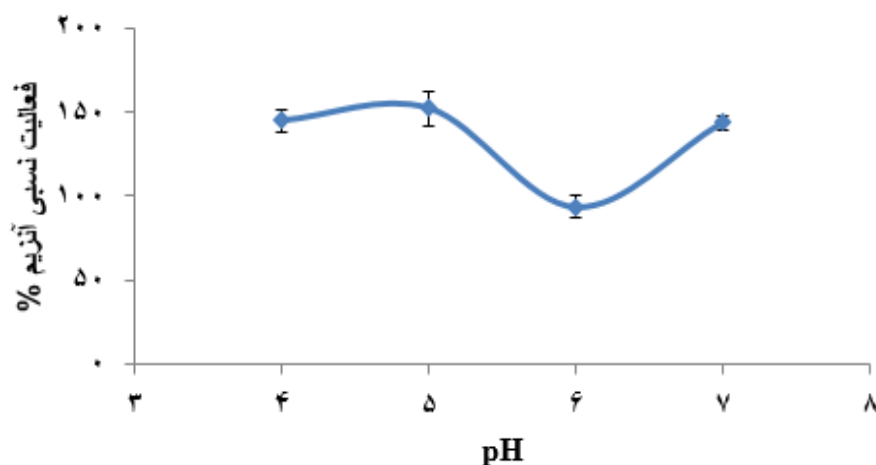


شکل ۴: بررسی دمای بهینه فعالیت نانوانزیم پراکسیداز

ارزیابی pH بهینه نانوانزیم پراکسیداز: pH بهینه فعالیت نانوانزیم پراکسیداز با استفاده از مقادیر مختلف pH بافر

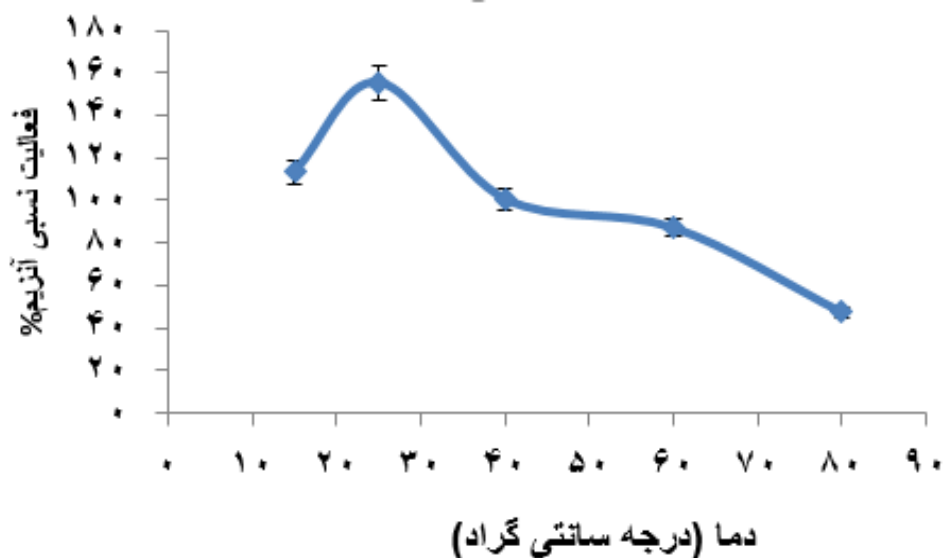
بریتون-رابینسون به جای بافر سنجش با pH ۶ که در روند معمول سنجش آنزیم به کار می رود، تعیین شد. فعالیت نانوانزیم

در بافر pH ۶، ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد (شکل ۵).



شکل ۵: بررسی pH بهینه فعالیت نانوانزیم پراکسیداز

بررسی پایداری دمایی فعالیت نانوانزیم پراکسیداز: برای بررسی پایداری دمایی، دماهای ۱۵، ۲۵، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ درجه سلسیوس انتخاب شدند. بعد از اینکه نانوانزیم به مدت ۳۰ دقیقه در هریک از این دماها قرار گرفت، نتایج حاصل از فعالیت نانوانزیم با سه بار تکرار در شکل ۶ قابل مشاهده است. فعالیت نانوانزیم در لحظه صفر در دمای ۳۰ درجه سانتی سلسیوس و pH ۷ بدون تیمار دمایی ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد.

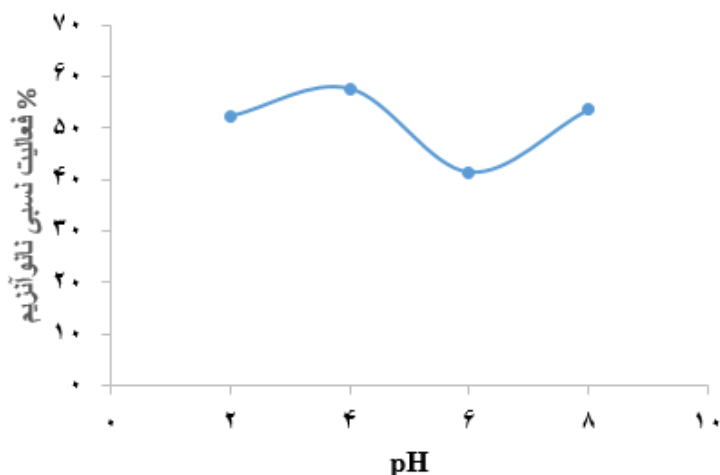


شکل ۶: پایداری دمایی نانوانزیم پراکسیداز پس از قرار گیری در دماهای مختلف به مدت ۳۰ دقیقه



**بررسی پایداری pH فعالیت نانوانزیم پراکسیداز:** با استفاده از بافر بریتون-رابینسون نانوانزیم در pH های ۲، ۴،

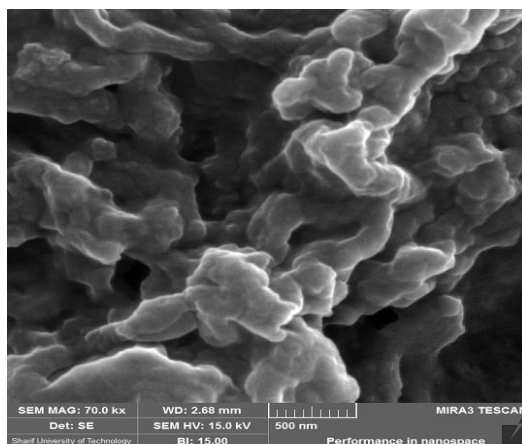
۶ و ۸ به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. با استفاده از همین بافر، در pH ۷ فعالیت نانوانزیم در لحظه صفر محاسبه و ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد (شکل ۷).



شکل ۷: بررسی پایداری فعالیت نانوانزیم در pH های مختلف در مدت زمان ۳۰ دقیقه

**آنالیز نانو ساختار پراکسیداز با استفاده از FESEM (Field Emission Scanning Electron Microscope):**

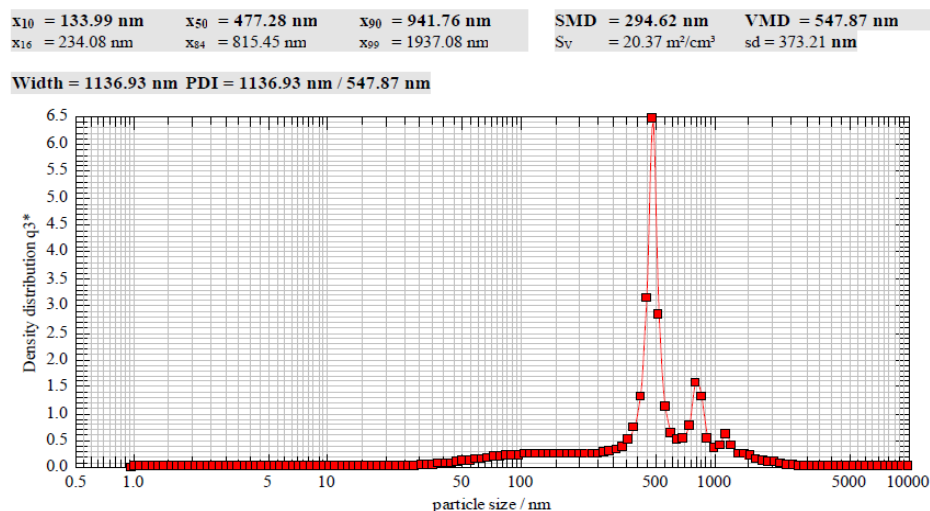
با بررسی هایی که توسط میکروسکوپ الکترونی FESEM انجام گردید، مشاهده شد که این نانوذرات می توانند اندازه ای در حدود ۵۰۰ نانومتر داشته باشند (شکل ۸).



شکل ۸: نتایج حاصل از FESEM نانوانزیم پراکسیداز

**آنالیز نانوانزیم پراکسیداز با استفاده از DLS (Dynamic Light Scattering):** مقدار ۵۰ درصد نانوذرات اندازه

ی زیر ۴۷۷/۲۸ نانومتر دارند و دو پیک نشان دهنده پراکندگی اندازه نانوذرات می باشد (شکل ۹).

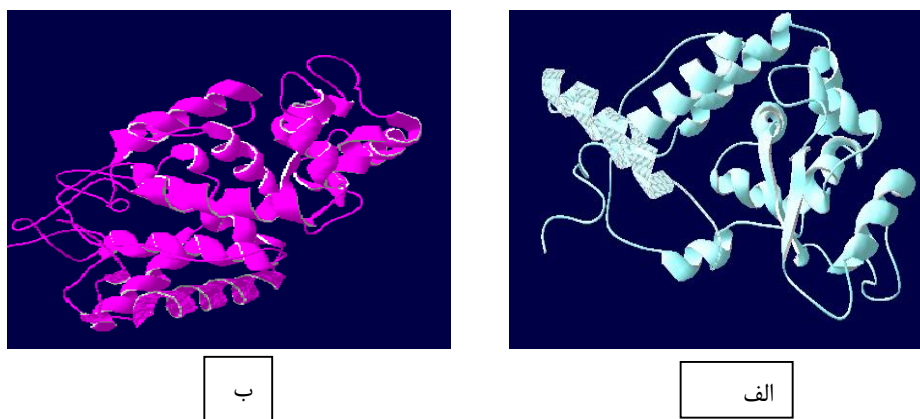


شکل ۹: نتایج حاصل از DLS نانوذرات پرآکسیداز

بررسی بعضی از خصوصیات آنزیم و نانوذرات آنزیم با استفاده از ابزارهای محاسباتی

مدل سازی آنزیم با استفاده از همولوژی مدلینگ: مدل سازی پروتئین ها با استفاده از برنامه مدلر ۹-۱۹ انجام

شد که ساختار سوم آنزیم پس از بهینه سازی و کمینه سازی انرژی به صورت شکل ۱۰ قابل مشاهده است.



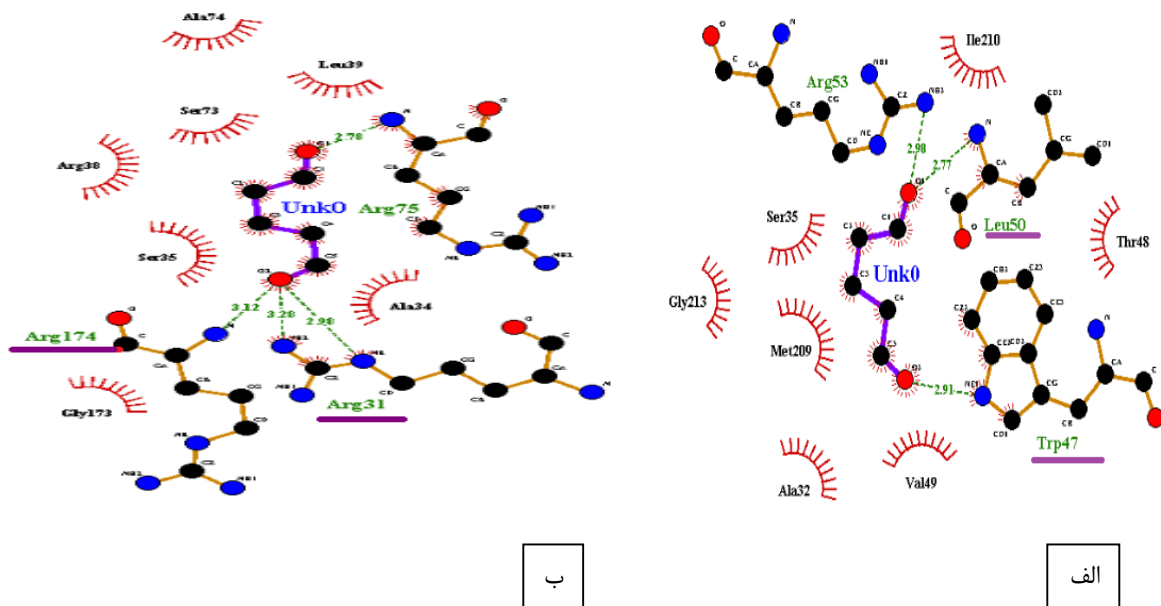
شکل ۱۰: الف) کد Uniprot P80679 ایزوآنزیم پرآکسیداز و ب) کد Uniprot P59121 ایزوآنزیم پرآکسیداز مدل سازی شده

بر اساس شباهت با الگو به وسیله برنامه مدلر ۹-۱۹ مشاهده شده در برنامه Swiss-PDB Viewer 4.1.0PDB

نتایج داکینگ آنزیم پرآکسیداز و پپتید سنتزی با گلو تار آلدهید: از بین ساختارهای ایجاد شده با استفاده از

برنامه اتوداک و نرم افزار LigPlot رزیدوهایی که درگیر پیوند هیدروژنی و هیدروفوبی با آنزیم پرآکسیداز هستند، مشخص

شدند (شکل ۱۱).



شکل ۱۱: مشاهده آمینو اسیدهای درگیر در برهم کنش گلوکارآلدهید و آنزیم پراکسیداز مدل سازی شده (الف) کد P80679 و (ب) کد P59121

پیش گویی آمینو اسیدهای جایگاه فعال مدل های ساخته شده: برنامه کوچ که جایگاه فعال را پیش گویی می کند، با روش TM-SITE و S-SITE جایگاه فعال را پیش گویی می کند. در جدول ۲ و ۳ به ترتیب احتمال آمینو اسیدهایی که ممکن است در جایگاه فعال آنزیم با کد P59121 و P80679 باشد، مشخص شده است.

جدول ۲: پیش گویی جایگاه فعال P59121 توسط سرور کوچ

Rank	C-score	Ligname	Predicted binding site residue
1	0.81	HEM	31,34,35,38,41,73,139,140,141,148,152,163,166,169,170,172,173,174,175
2	0.64	BHO	38,41,42,68,69,139,141,179
3	0.63	FER	38,69,73,139,140,142,179
4	0.62	CA	171,222,225,228,230
5	0.59	ACT	38,41,42,139

C-score: ضریب اطمینان برای پیش گویی ساختار PDB است. این ضریب بین ۰-۱ است و هر چه عدد به ۱ نزدیک تر باشد نشان دهنده پیش گویی دقیق تر است.

PDB HIT: نشان دهنده کد پروتئین الگو می باشد.

Ligname: نام لیگاند

Predicted binding site residues: پیش گویی جایگاه اتصالی لیگاند به آمینو اسیدها

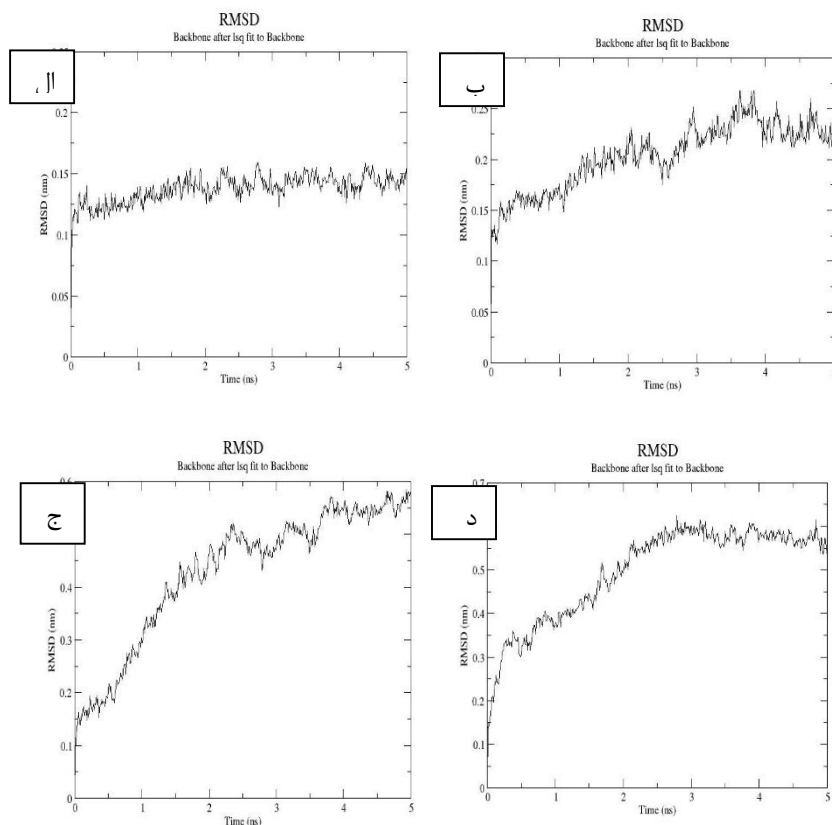
جدول ۳: پیش گویی جایگاه فعال P80679 توسط سرور کوچ.

Rank	C-score	Ligname	Predicted binding site residues
1	0.97	HEM	34,35,37,38,41,139,140,141,148,152,166,167,169,170,172,173,174,175
2	0.21	BHO	38,41,42,68,69,139,140,141,179
3	0.12	26D	170,172,173,174,175,221,143,244,247
4	0.10	CA	171,22,225,228,230
5	0.07	CA	43,46,47,48,50,52

نتایج محاسبات شبیه سازی دینامیک مولکولی: با روش شبیه سازی دینامیک مولکولی و نرم افزار گرومکس در

مدت زمان ۵ نانوثانیه و دمای ۳۰ درجه سلسیوس مدل های ساخته شده آنزیم پراکسیداز و کمپلکس مدل های ساخته شده با

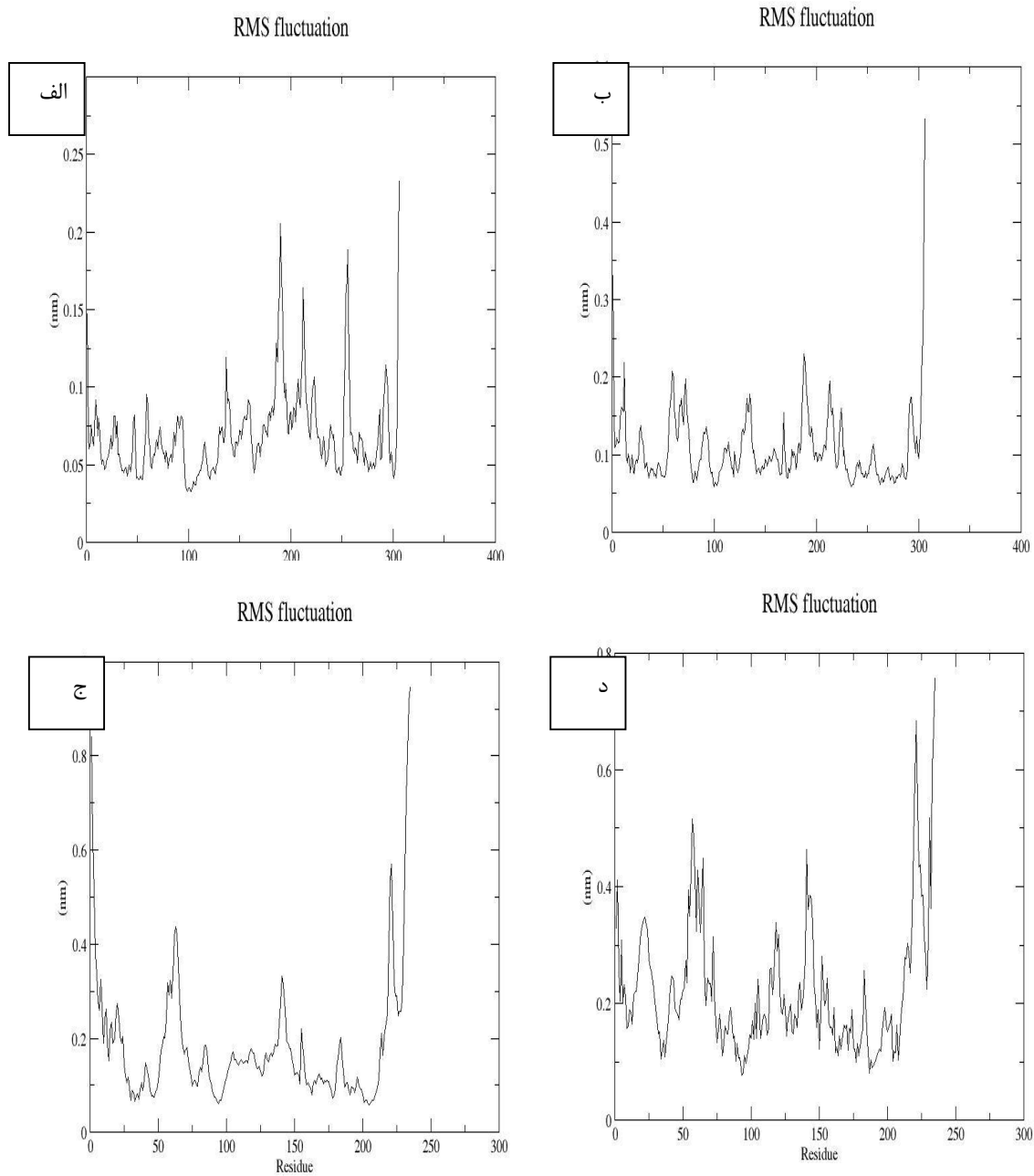
گلوآرالدهید بررسی شدند (اشکال ۱۲ تا ۱۵) که نشان دهنده شد آنزیم و نانواآنزیم در این مدت زمان پایدارند.



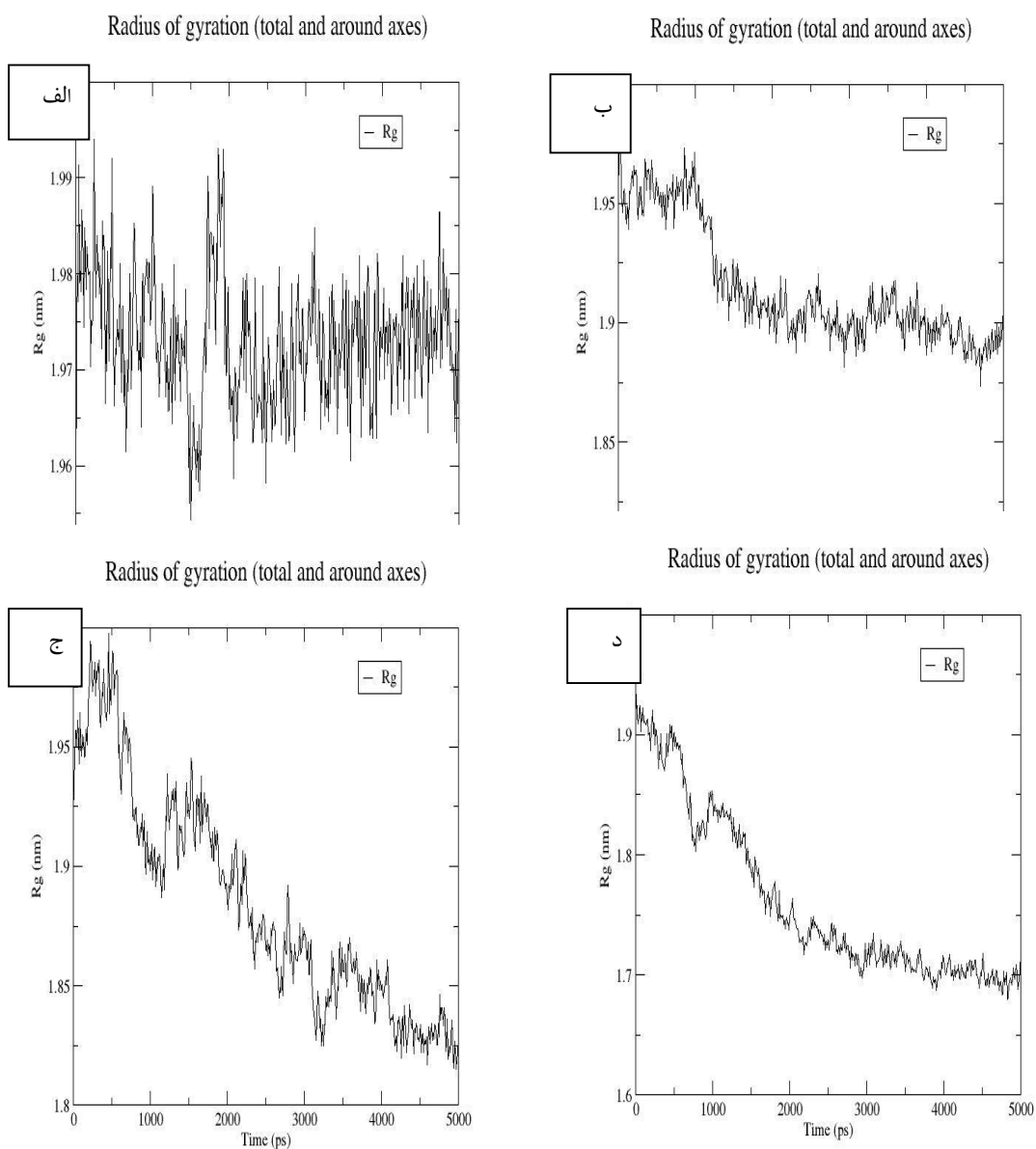
شکل ۱۲: نمودار RMSD مربوط به شبیه سازی در مدت زمان ۵ نانوثانیه و دمای ۳۰ درجه سلسیوس برای ایزوآنزیم

پراکسیداز. شکل الف: مربوط به کد P59121. شکل ب: مربوط به کد P59121 با گلوآرالدهید. شکل ج: مربوط به کد P80679.

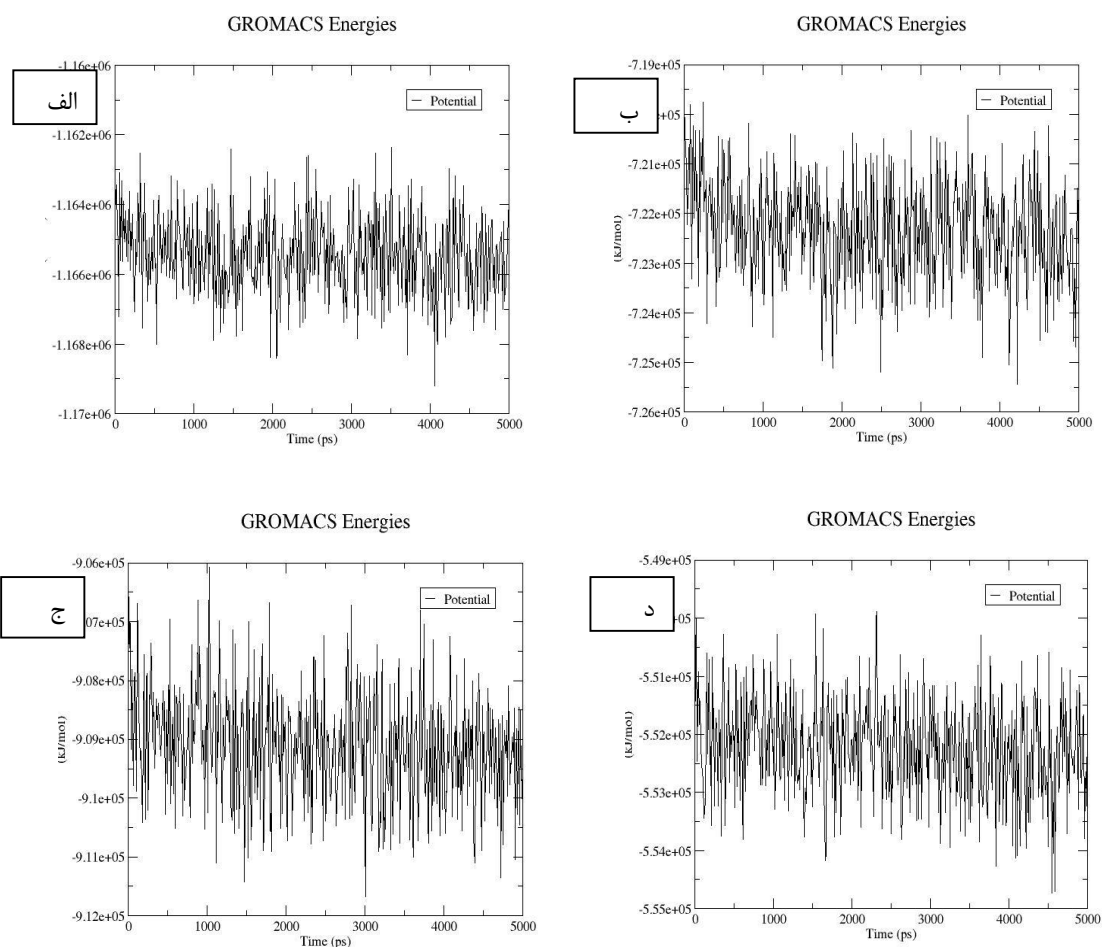
شکل د: مربوط به کد P80679 با گلوآرالدهید



شکل ۱۳: نمودار RMSF مربوط به شبیه سازی در مدت زمان ۵ نانوثانیه و دمای ۳۰ درجه سلسیوس برای ایزوآنزیم پراکسیداز. الف: مربوط به کد P59121. ب: مربوط به کد P59121 با گلوکار آلدهید. ج: مربوط به کد P80679. شکل د: مربوط به کد P80679 با گلوکار آلدهید



شکل ۱۴: نمودار  $R_g$  مربوط به شبیه سازی در مدت زمان ۵ نانوثانیه و دمای ۳۰ درجه سلسیوس برای ایزوآنزیم پراکسیداز. الف: مربوط به کد P59121. ب: مربوط به کد P59121 با گلوآرآلدهید. ج: مربوط به کد P80679. د: مربوط به کد P80679 با گلوآرآلدهید



شکل ۱۵: نمودار انرژی پتانسیل مربوط به شبیه سازی در مدت زمان ۵ نانوثانیه و دمای ۳۰ درجه سلسیوس برای ایزوآنزیم پراکسیداز. الف: مربوط به کد P59121. ب: مربوط به کد P59121 با گلو تار آلدهید. ج: مربوط به کد P80679. د: مربوط به کد P80679 با گلو تار آلدهید

تجمعات پروتئینی کاربرد گسترده ای در حسگرهای زیستی (Qi *et al.*, 2004)، در طراحی بیوکاتالیزورهای حیاتی

(Ma *et al.*, 2016) و در تشخیص زیست پزشکی و درمان (Sripriyalakshmi *et al.*, 2014) دارند.

در این پژوهش ابزارهای زیست محاسباتی که تجمع پروتئین ها را بر اساس هیدروفوبیسته پیش گویی می کنند، بررسی شدند. بیشتر ابزارهایی که به منظور پیش گویی تجمع پذیری پروتئین استفاده می شوند، از توالی به عنوان ورودی استفاده می کنند؛ بنابراین نمی توانند ویژگی تجمع پذیری در پروتئین های کروی را بررسی کنند اما سرور Aggrescan 3D با در نظر گرفتن ساختار پروتئین، نقاطی که مستعد تجمع پذیری هستند را پیش گویی می کند و این محدودیت را ندارد (Zamberano *et al.*, 2015). با استفاده از این سرور می توان آمینو اسیدهایی که مستعد تجمع پذیری می باشند را جهش داد و حلالیت آن ها را افزایش داد. این سرور نوسانات مکانیکی ساختار پروتئین در محلول را که می تواند بر روی تمایل تجمع پذیری پروتئین اثر بگذارد، بررسی

می‌کند. A3D Dynamic Mode از روش CABS Flex و دو روش ساخت نانو مواد در نانو فناوری برای شبیه سازی سریع

پروتئین‌های کروی استفاده می‌کند (Zamberano *et al.*, 2015) <http://biocomp.chem.uw.edu.pl/A3D/>

برای بررسی و ایجاد نانوذره پروتئینی، به دلیل امکان سنجش عملکرد، پروتئینی با خصوصیت آنزیمی انتخاب شد. امتیاز تجمع پذیری آنزیم پراکسیداز با استفاده از سرور A3D ۱/۳۳ به دست آمد و به همین دلیل آنزیم پراکسیداز انتخاب شد زیرا امتیاز آنزیم پراکسیداز بالاتر از ۱ و نشان‌دهنده این است که پروتئین از نظر هیدروفوبیسته توانایی تجمع پذیری مناسب دارد.

اولین ویژگی مورد سنجش آنزیم پراکسیداز فعالیت آن بود، که جذب رنگ ایجاد شده ناشی از فعالیت آنزیم در ۴۲۰ نانومتر در مدت زمان ۳ دقیقه به فاصله هر ۳۰ ثانیه خوانده شد. در این پژوهش ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم پراکسیداز قبل و بعد از نانوذره شدن مورد بررسی قرار گرفتند؛ آنزیم پراکسیداز خالص دارای دمای بهینه ۲۰ درجه سلسیوس و pH بهینه ۶ می‌باشد. با توجه به مطالعات پیشین (دماهای ۲۰، ۲۵، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ درجه سلسیوس برای بررسی پایداری دمایی انتخاب شدند) (Koksal *et al.*, 2008). در هنگام بررسی پایداری دمایی برای فعالیت آنزیم پراکسیداز مشخص شد که آنزیم پراکسیداز پس از ۳۰ دقیقه قرارگیری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس حداکثر فعالیت را نسبت به سایر دماها دارد (شکل ۱) در صورتی که آنزیم در دماهای ۶۰ و ۸۰ درجه سلسیوس در مدت زمان ۳۰ دقیقه حدود ۲۴ درصد فعالیت دارد.

به منظور بررسی پایداری فعالیت آنزیم در دمای ۸۰ درجه سلسیوس، محلول آنزیمی در دمای ۸۰ درجه قرار داده شد و سپس در زمان های ۱، ۱/۵ و ۲ ساعت قرار گیری در این دما، هر بار از آنزیم برداشته و بر روی یخ گذاشته شد تا شرایط برای همگی با شرایط آنزیم بدون تیمار دمایی یکسان باشد. پس از بررسی فعالیت باقی مانده آنزیم در دماهای مختلف، از آنجا که مشخص شد آنزیم توانسته است پس از ۳۰ دقیقه قرار گیری در دمای ۸۰ درجه سلسیوس نزدیک به ۲۴ درصد فعالیت خود را حفظ کند، پایداری فعالیت آنزیم در دمای ۸۰ درجه سلسیوس تا ۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۲).

در این پژوهش برای بررسی پایداری فعالیت آنزیم در pHهای مختلف، از بافر بریتون-رابینسون استفاده شد که بافری طیف وسیع است و بدین صورت فقط اثر pH بررسی می شود و نوع بافر در pH های مختلف تفاوت نمی کند؛ در حالی که در روند معمولی سنجش فعالیت آنزیم از بافر پتاسیم فسفات با pH ۶ استفاده شد. با بررسی که بر روی pHهای مختلف برای فعالیت آنزیم در مدت زمان ۳۰ دقیقه انجام شد، مشخص گردید که فعالیت باقی مانده آنزیم در pH ۴ حدود ۷۵ درصد می باشد. در حالی که در pHهای ۲، ۶ و ۸ فعالیت باقی مانده آنزیم به ترتیب حدود ۹ درصد، ۲۶ درصد و ۱۰ درصد می باشد (شکل ۳).

بعد از بررسی این خصوصیت ها، آنزیم پراکسیداز با استفاده از روش Desolvation و با استفاده از گلو تار آلدهید تبدیل به نانوذره شد (Liu *et al.*, 2005) و بررسی های FESEM نشان داد؛ نانوذرات قطری حدود ۵۰۰ نانومتر دارند.



سنجش فعالیت آنزیم نانو شده مانند سنجش فعالیت آنزیم مونومر در pH ۶ و دمای ۲۰ درجه سلسیوس و در طول موج ۴۲۰ نانومتر انجام شد. جذب این آنزیم در مدت زمان ۳ دقیقه به فاصله هر ۳۰ ثانیه در این طول موج خوانده و مشاهده شد؛ نانوذره آنزیم جذب کمتری در مقایسه با آنزیم مونومر دارد در صورتیکه انتظار می رفت که آنزیم نانو شده به دلیل جایگاه‌های فعال بیشتر نسبت به آنزیم مونومر فعالیت بیش تری از خود نشان دهد. البته این کاهش جذب می تواند به دلیل تجمعات پروتئینی نیز باشد.

در این پژوهش بعد از تولید نانو ذره، دمای بهینه فعالیت آن به دست آمد. برای به دست آوردن دمای بهینه با توجه به اینکه محلول سنجش فعالیت آنزیم مونومر به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سلسیوس قرار می گیرد، برای بررسی دمای بهینه فعالیت نانوآنزیم پراکسیداز محلول سنجش فعالیت به ترتیب ۱۰ دقیقه در دماهای ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درجه سلسیوس قرار گرفت. همان طور که در شکل ۴ مشاهده می شود در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد آنزیم فعالیت نسبی بیشتری نسبت به سایر دماها دارد. بررسی فعالیت نانوآنزیم در دماهای مختلف نشان داد دمای بهینه فعالیت نانوآنزیم ۳۰ درجه سلسیوس است که این دما از دمای آنزیم های مونومر بالاتر بود. دلیل احتمالی این موضوع می تواند به دلیل تاخوردگی بیشتر ساختار نانوآنزیم نسبت به آنزیم مونومر باشد و در دمای بالاتر جایگاه فعال بیشتری از نانوآنزیم در معرض سوپسترا قرار می گیرد (Chattopadhey & Mazumdar., 2006).

با بررسی که بر روی pH های بهینه برای فعالیت آنزیم در هر یک از این بافرها انجام گرفت، مشخص شد که فعالیت آنزیم در بافر سنجش با pH ۷ بیش تر از فعالیت در همان بافر با pH ۶ است (شکل ۵). در حالی که آنزیم مونومر در pH بهینه ۶ دارای بیش ترین فعالیت بود. دلیل احتمالی این موضوع تغییر در بار سطحی آنزیم به هنگام نانو شدن می باشد.

بررسی پایداری دمایی فعالیت نانوآنزیم پراکسیداز نشان داد نانوآنزیم مانند آنزیم مونومر پس از قرار گیری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در مدت زمان ۳۰ دقیقه بیشترین فعالیت را نسبت به سایر دماها دارد (شکل ۶).

فعالیت آنزیم در لحظه صفر در دمای ۳۰ درجه سلسیوس، ۱۰۰ درصد است اما وقتی ۳۰ دقیقه در این دما می ماند فعالیت آن به ۱۶۰ درصد افزایش می یابد که این می تواند به خاطر اثر فزاینده دما در سرعت انجام واکنش باشد (Chattopadhey & Mazumdar., 2006). نانوآنزیم در دمای ۸۰ درجه سلسیوس ۴۷ درصد فعالیت خود را حفظ می کند، در صورتی که آنزیم در این دما ۲۴ درصد فعالیت خود را حفظ می کند که نشان دهنده پایدار شدن نانوآنزیم نسبت به مونومر آنزیمی می باشد. دلیل این موضوع می تواند این باشد که نانوآنزیم نسبت به آنزیم دارای تاخوردگی بیشتری است و نشان دهنده پایداری بیشتر نانوآنزیم است.

بررسی فعالیت نانو آنزیم در اسیدیته های مختلف نشان داد نانوآنزیم در pH ۴ دارای پایداری بیشتری نسبت به سایر pHها بود. مقایسه پایداری pH آنزیم نانو شده و آنزیم مونومر نشان می دهد که هر دو در محیط اسیدی پایداری بیشتری نشان دادند.

با بررسی هایی که توسط میکروسکوپ الکترونی FESEM صورت گرفت، مشاهده شد که این نانوذرات اندازه ای حدود ۵۰۰ نانومتر دارند (شکل ۸). برای بررسی قطر هیدرودینامیکی و پراکندگی نانوذرات از آنالیز DLS استفاده شد. نانوذرات دارای قطر هیدرودینامیکی ۵۴۷/۸۷ نانومتر و مقدار شاخص پراکندگی ذرات ۲/۰۷ به دست آمد که نشان دهنده پراکندگی بالای نانوذرات می باشد (شکل ۹).

سنجش فعالیت نانوآنزیم نشان داد که فعالیت آن در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد و pH ۷ کم شده است. به علت کم شدن فعالیت آنزیم بررسی های زیست محاسباتی بر روی ایزوآنزیم های پراکسیداز قبل و بعد از نانو شدن انجام گرفت. با توجه به اینکه آنزیم پراکسیداز در آزمایشگاه توسط گلوآرالدهید به نانوآنزیم تبدیل شد، در بررسی های محاسباتی، داکینگ این آنزیم با گلوآرالدهید بررسی گردید. در داکینگ به علت تغییر طول پیوند و زاویه پیوند حالت های مختلف وجود دارد که بهترین حالت برای بررسی های بعدی انتخاب شد. نتایج داکینگ مدل های پروتئینی ساخته شده در نرم افزار لیگ پلات نشان داد که در مورد کد P59121 آمینو اسید آمینو اسید های Arg 31، Arg 75 و Arg 174 در پیوند هیدروژنی با گلوآرالدهید نقش داشتند. آمینو اسید آمینو اسید های Ser 35، Ala 34، Arg 38، Ser 73 و Leu 39 در برهم کنش هیدروفوبیک دیده می شوند (شکل ۱۱. ب). در مورد کد P80679 آمینو اسید آمینو اسید های درگیر در پیوند هیدروژنی با گلوآرالدهید Arg 53، Lue 50 و Trp 47 بودند. آمینو اسید آمینو اسید های Ile 210، Thr 48، Ser 35، Gly 213، Met 209، Ala 32 و Val 49 در برهم کنش های هیدروفوبیک نقش دارند (شکل ۱۱. آ). از آنجایی که فعالیت نانو آنزیم کم شده بود با استفاده از سرور کوچ جایگاه فعال آنزیم مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که نتایج در جدول ۲ و ۳ نشان می دهد گلوآرالدهید با اتصال به این آمینو اسید آمینو اسید ها در جایگاه فعال آنزیم می تواند سبب کاهش فعالیت نانو آنزیم شود.

در این پژوهش برای انجام شبیه سازی دینامیک مولکولی دو ایزوآنزیم پراکسیداز در دمای بهینه ۳۰ درجه سلسیوس و pH ۷ بهینه و پپتید در دما و pHی که نانوذره پروتئینی سنتز شد، قرار گرفتند. محاسبات RMSD و انرژی پتانسیل به ترتیب در نمودار ۱۲ و ۱۵ نشان دهنده پایداری سیستم در طول شبیه سازی است. محاسبات RMSF (شکل ۱۳) نشان دهنده بخش های انعطاف پذیر در پروتئین در طول زمان است که نمودارها نشان می دهند در مورد آنزیم الگوی رفتاری انعطاف پذیر پروتئین در حالت تنها و در حالت کمپلکس با گلوآرالدهید شبیه به هم بوده است. محاسبات Rg (شکل ۱۴) نشان دهنده پایداری ساختار سه بعدی در طول شبیه سازی می باشد. آنزیم در حالت اتصال به گلوآرالدهید بعد از ۱ نانوثانیه کاهش محسوسی در Rg نشان

داد که گویای این موضوع است که سیستم به علت تشکیل نانوانزیم دارای تاخوردگی بیشتری شده و  $R_g$  کاهش یافته، که در طول زمان این کاهش ثابت باقی می ماند.

## نتیجه گیری

در نانوفناوری برای ساخت نانوذرات پروتئینی از ویژگی تجمع پذیری پروتئین ها استفاده می شود. عوامل ذاتی مانند میانکنش های هیدروفوب بین اتم ها، ساختارهای آمیلوئیدی و Coiled coil هم چنین استفاده از واسطه هایی مانند آپتامرها و کراس لینک ها و غیره می توانند باعث تجمع پذیری پروتئین شوند و با استفاده از ابزارهای زیست محاسباتی می توان این عوامل را بررسی کرد. در این پژوهش تجمع پروتئین ها بر اساس ویژگی آب گریزی آن ها مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور از ابزار زیست محاسباتی Aggrescan 3D استفاده شد. با استفاده از این سرور ابتدا پروتئین هایی به عنوان کنترل بررسی شدند. سپس امتیاز آنزیم پراکسیداز با این سرور بررسی شد و با امتیاز پروتئین های کنترل مقایسه گردید. آنزیم پراکسیداز دارای امتیاز قابل قبول و به عنوان کاندیدا انتخاب شد. خصوصیات بیوشیمیایی این آنزیم قبل و بعد نانو شدن مورد بررسی قرار گرفت. سپس پراکسیداز به کمک کراس لینک با گلوآرالدهید به نانوذره تبدیل شد. نتایج FESEM و DLS این قضیه را تایید کردند. آنزیم پراکسیداز دارای دمای بهینه ۲۰ درجه سانتی گراد و pH ۶ بهینه می باشد. در صورتی که نانوانزیم پراکسیداز در دمای بالاتر (۳۰ درجه سانتی گراد) و pH خنثی فعالیت می کرد. هر دو در محیط اسیدی پایدار بودند و هر دو در ۲۵ درجه سانتی گراد در مدت زمان ۳۰ دقیقه بیشترین فعالیت خود را داشتند.

با استفاده از شبیه سازی دینامیک مولکولی پایداری دو ایزوآنزیم که وزن مولکولی مشابه با پراکسیداز داشتند، در محیط *in silico* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که هم آنزیم مونومر و هم نانوانزیم در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و مدت زمان ۵ نانوثانیه نسبتا پایدار هستند ولی گلوآرالدهید با اتصال آمینو اسیدهایی در جایگاه فعال آنزیم می تواند سبب کاهش فعالیت نانو آنزیم شود که عملا نیز ثابت شد.

## منابع

- Amdursky, N., Molotskii, M., Gazit, E., & Rosenman, G. (2010). Elementary building blocks of self-assembled peptide nanotubes. *J Am Chem Soc*, 132(44), 15632–15636. <https://doi.org/10.1021/ja104373e>
- Chattopadhey, K and Mazumdar, S. (2006). Structural and conformation stability of horseradish peroxidase effect of temperature and pH. *Biochemistry*, 39(1), 263–270, <https://doi.org/10.1021/bi990729o>
- Feverati, G., Achoch, M., Zrimi, J., Vuillon, L., & Lesieur, C. (2012). Beta-strand interfaces of non-dimeric protein oligomers are characterized by scattered charged residue patterns. *PLoS ONE*, 7(4), e32558. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032558>
- Klaessig, F., Marrapese, M., & Abe, S. (2011). *Nanotechnology Standards*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7853-0>

- Liu, G., Lin, Y., Ostatná, V., & Wang, J. (2005). Enzyme nanoparticles-based electronic biosensor. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, (27), 3481–3483. <https://doi.org/10.1039/b504943a>
- Luo, Q., Hou, C., Bai, Y., Wang, R., & Liu, J. (2016). Protein Assembly: Versatile Approaches to Construct Highly Ordered Nanostructures. *Chemical Reviews*, 116(22), 13571–13632. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00228>
- Lenga, Robert E. (1988). *The Sigma-Aldrich library of chemical safety data*. [Milwaukee, Wis., USA] :Sigma-Aldrich Corp.
- Philo, J., & Arakawa, T. (2009). Mechanisms of Protein Aggregation. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10(4), 348–351. <https://doi.org/10.2174/138920109788488932>
- Qi, K., Ma, Q., Remsen, E. E., Clark, C. G., & Wooley, K. L. (2004). Determination of the bioavailability of biotin conjugated onto shell cross-linked (SCK) nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 126(21), 6599–6607. <https://doi.org/10.1021/ja039647k>
- Selkoe, D. J. (2003). Folding proteins in fatal ways. *Nature*, 426(6968), 900–904. <https://doi.org/10.1038/nature02264>
- Sripriyalakshmi S, Jose P, Ravindran A, et al. Recent trends in drug delivery system using protein nanoparticles. *Cell Biochem Biophys*. (2014); 70:17–26.
- Yan, X., Zhu, P., & Li, J. (2010). Self-assembly and application of diphenylalanine-based nanostructures. *Chemical Society Reviews*, 39(6), 1877-1890. <https://doi.org/10.1039/b915765b>
- Zambrano, R., Jamroz, M., Szczasiuk, A., Pujols, J., Kmiecik, S., & Ventura, S. (2015). AGGRESCAN3D (A3D): Server for prediction of aggregation properties of protein structures. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), W306–W313. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv359>

## Characterization and nanoparticle synthesis of peroxidase by computational and experimental methods

Sh. Fooladband<sup>1</sup>, P. Ghadam<sup>2\*</sup>, M. Zarrabi<sup>3</sup>

Received: 2019.7.17

Accepted: 2019.12.7

### Abstract

Nano protein structures can be formed by the intrinsic ability of molecular self-assembly or via intermediates which improve their assembly. Hydrophobicity is the most important factor among the other intrinsic self-assembly factors and the other intermediates such as glutaraldehyde may lead to protein-assembly and nanoparticles formation. In this study, Aggrescan 3D software was employed to investigate protein self-assembly properties. Peroxidase enzyme was selected to form protein nanoparticle, and glutaraldehyde changed it to a nano enzyme. FESEM and DLS analysis represented that the average size of nano enzyme is about 500 nanometers. Comparing biochemical properties of peroxidase enzyme before and after changing into nano, showed that the activity of nano enzyme at 20°C, pH 7 has decreased as compared to the monomeric enzyme. Based on homology, the PDB structure of two peroxidase enzyme was identified. Then, the connection between glutaraldehyde and two peroxidase enzymes was detected. Enzyme residues with hydrogen binding connections to glutaraldehyde were also detected by using LigPlot software and the residues in active side of enzyme were determined by COACH server. Glutaraldehyde is connected to residues in active site of the enzyme. Molecular dynamic Simulation was performed in the time duration of 5 nanoseconds and 30°C and it showed that monomer enzyme and nano enzyme are both stable in this time duration and temperature.

**Keywords:** Biocomputational methods, Aggregation, Nano peroxidase enzyme.

---

1- M.Sc., Department of Biotechnology, Faculty of Life Sciences, Al-Zahra University, Tehran, Iran

2- Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Life Sciences, Al-Zahra University, Tehran, Iran

\*(corresponding author: pghadam@alzahra.ac.ir)

3- Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Life Sciences, Al-Zahra University, Tehran, Iran