



نانو تکنولوژی

# تولید نانوپودر از پروتئین بازیابی شده پر

زهرا پدرا مراد<sup>۱</sup>، حسین توانایی<sup>۲\*</sup>، علیرضا مرادی<sup>۳</sup>

## چکیده:

پودر کراتین پر قابلیت‌های کاربردی متنوعی در زمینه‌ی بهداشتی، کامپوزیت‌ها و سیستم‌های رهایش (تحویل) دارو را دارا می‌باشد. تحقیقات معدودی در زمینه تولید پودر کراتین پر انجام شده است. الکترواسپری نسبت به دیگر روش‌های تولید پودر، مزایایی همچون تولید ذرات کروی شکل، کوچک و یکنواخت را دارد. از این رو در این تحقیق کراتین پر به روش مناسب استخراج گردید و سپس نانو پودر کراتین پر به کمک روش الکترواسپری تهیه گردید. علاوه بر این در این تحقیق پارامترهای مؤثر بر فرایند الکترواسپری مانند غلظت محلول کراتین، ولتاژ اعمال شده، فاصله بین نازل تا جمع‌کننده و نرخ تغذیه محلول مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان داد که الکترواسپری روشی مناسب برای تولید ذرات کروی شکل و یکنواخت کراتین با میانگین اندازه ذرات زیر ۶۰ نانومتر می‌باشد.

## مقدمه

منظور تهیه پودر، الیاف ریز پر را به کمک تیغه‌های چرخشی برش دادند سپس با استفاده از یک وسیله مکانیکی پودر نهایی حاصل شد. اندازه ذرات تولید شده با این روش حدود ۰/۵ تا ۱۲ میکرومتر گزارش شده است. فوجی و همکارانش پس از استخراج کراتین پر، پودر کراتین پر را با استفاده از سونیکاتور تولید نمودند و پودری با اندازه ذرات حدود ۰/۵ تا ۲/۵ میکرومتر تولید کردند. توسیک و ادامیک پس از استخراج کراتین، پودر پر با اندازه ذرات حدود ۲/۶ میکرومتر را با استفاده از روش خشک کردن اسپری تولید نمودند [۱۰، ۷، ۱۱].

بررسی‌های متون نشان می‌دهند تاکنون با هیچ روشی نانو ذره این پروتئین تولید نشده است. از آنجایی که فرایند الکترواسپری نسبت به روش‌های دیگر تولید پودر مزایای زیادی دارد در این پروژه سعی بر آن است ابتدا پروتئین پر بازیابی شده و در نهایت رفتار این پروتئین به منظور تولید نانو پودر کراتین در الکترواسپری بررسی گردد.

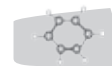
## روش تحقیق

### مواد و تجهیزات

دستگاه الکترواسپری، میکروسکوپ الکترونی روبشی، میکروسکوپ نوری، دستگاه سانتریفیوژ، دستگاه خشک‌کننده انجمادی خلأ، اتانول، مراکتواتانول، سدیم دودسیل سولفات، اوره، هیدروکسی متیل آمینو متان، اتیلن دی‌آمین تتراسنتیک اسید، استیک اسید یددار، تری‌فلئورو استیک اسید، (تمامی مواد شیمیایی استفاده شده از شرکت مرک آلمان خریداری شد) پر مرغ، غشاء سلولزی لوله‌ای (MWCO)

هر ساله بیش از ۴ میلیون تن پر در جهان تولید می‌شود [۱] که به عنوان ضایعات برای صنعت مرغداری محسوب می‌شود. پر بسیار ارزان می‌باشد و منبع غنی پروتئین به حساب می‌آید. پر مرغ از ویژگی‌هایی مثل دانسیته نسبتاً کم، خواص حرارتی خوب، ایزولاسیون صوتی، تراکم‌پذیری و برگشت‌پذیری برخوردار است [۳]. پر با وزن مخصوص حدود ۰/۸ گرم بر سانتی‌متر مکعب [۳] دارای استحکام ۳ گرم بر دنیر می‌باشد [۴]. در حال حاضر کاربرد الیاف پر بیشتر در تقویت کامپوزیت، منسوجات بی‌بافت، فیلتر، تهیه کاغذ [۵]، روکش و عایق کاری می‌باشد [۶]. با توجه به خواصی مانند زیست‌سازگاری و زیست‌تخریب‌پذیری بودن کراتین پر، اخیراً! استخراج کراتین پر مورد توجه بسیاری از محققان قرار گرفته است. کراتین پر بازیافتی می‌تواند در لوازم آرایشی، پوشش‌های تخریب‌پذیر، کشت سلول و فیلم‌های بسته‌بندی مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرد [۷، ۸]. در این راستا پودر کراتین قابلیت‌های کاربردی متنوعی در زمینه بهداشتی، کامپوزیت‌ها و سیستم‌های رهایش (تحویل) دارو را دارا می‌باشد. تکنیک‌هایی شامل آسیاب گلوله‌ای، آسیاب چرخشی، سونیکاتور و خشک کردن اسپری برای تولید پودر کراتین ارائه شده است. این روش‌ها دارای محدودیت‌هایی مثل عدم امکان کاهش اندازه ذرات به اندازه دلخواه، محدوده وسیع اندازه ذرات تولیدی و تولید ذرات نامنظم و غیرکروی می‌باشد. الکترواسپری نسبت به دیگر روش‌های تولید پودر مزایایی همچون تولید ذرات کروی شکل، کوچک و یکنواخت را دارد [۹].

مطالعات اندکی در زمینه تولید پودر از کراتین پر وجود دارد. ليو و همکارانش به



شركت Spectrum، (6-8000Da)، آمريكا).

به منظور بررسی تغییر ساختار احتمالی کراتین پر، در طی مراحل مختلف تولید پودر، طیف‌سنجی مادون قرمز (FTIR با نام تجاری BOMEN، کانادا) و اشعه ایکس (XRD ساخت شرکت فیلیپس، هلند) مورد استفاده قرار گرفتند.

### نتایج و بحث

اثر غلظت محلول پلیمری، سه غلظت ۰/۲، ۰/۶ و ۱ درصد وزنی - حجمی، به منظور بررسی اثر غلظت بر اندازه، شکل و یکنواختی ذرات پودر کراتین مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت محلول الکترواسپری در دیگر شرایط ثابت، اندازه ذرات تولیدی و انحراف معیار افزایش می‌یابد. کوچکتر شدن ذرات نانو پودر کراتین الکترواسپری شده در غلظتهای پایین‌تر را می‌توان به درگیری کمتر بین زنجیرهای پلیمری و متعاقب آن آسانتر شکسته شدن جت به ریز قطرات ربط داد. در این تحقیق نانوپودر کراتین یکنواخت، کروی با اندازه ذرات در محدوده ۵۰-۱۵۰ نانومتر بدست آمد که کمترین اندازه مربوط به غلظت ۰/۲ درصد وزنی - حجمی می‌باشد (اندازه ذرات با نرم‌افزار Measurement اندازه‌گیری شد). اثر ولتاژ به منظور بررسی نقش ولتاژ بر اندازه و یکنواختی پودر تولید شده، از ولتاژهای ۱۰، ۱۵، ۱۸ و ۲۰ کیلوولت استفاده شد. نتایج حاصل از تصاویر SEM نشان داد که با افزایش ولتاژ از ۱۰ به ۱۸ کیلوولت میانگین و توزیع اندازه ذرات کاهش و با افزایش بیشتر ولتاژ تا ۲۰ کیلوولت میانگین و توزیع اندازه ذرات افزایش می‌یابد. برای توجیه این پدیده می‌توان گفت که احتمالاً نوع جت در ولتاژ ۱۰ کیلوولت از نوع ماریپیچی یا نوسانی و در ولتاژ ۱۵ و ۱۸ کیلوولت از نوع مخروطی پایدار می‌باشد و احتمالاً نوع جت در ولتاژ ۲۰ کیلوولت از نوع مخروطی ناپایدار است [۱۷].

اثر فاصله نازل - جمع‌کننده، به منظور بررسی اثر فاصله نازل تا جمع‌کننده بر اندازه

### آماده‌سازی پر و بازیابی پروتئین پر

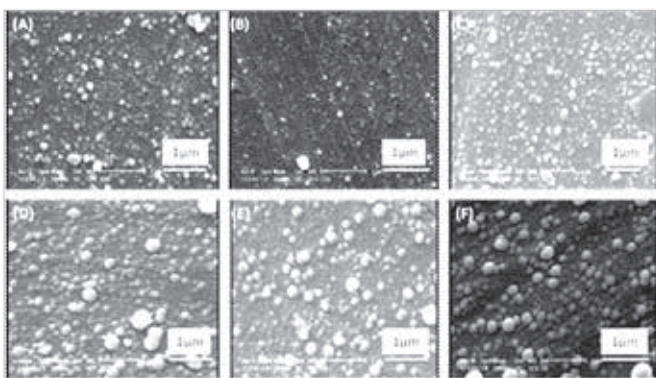
ابتدا پر مرغ در درجنت و آب جوش قرار گرفته و متعاقباً آبکشی شد سپس به مدت ۱ ساعت در اتانول شسته و در نهایت خشک و خرد گردید [۱۲]. به منظور حل کردن کراتین پر از شرایط بهینه ارائه شده توسط پیتر و همکارانش (۷۵۰ میلی‌لیتر محلول آبی، ۸ مول اوره، ۳ میلی‌مول اتیلن‌دی‌آمین‌تترا استیک اسید (EDTA)، ۱۲۵ میلی‌مول مرکاپتواتانول، ۲۰۰ میلی‌مول هیدروکسی متیل آمینومتان) استفاده گردید. در این فرآیند از مرکاپتواتانول به منظور شکستن پیوندهای سیستینی و از اوره به منظور شکستن پیوندهای هیدروژنی استفاده گردید. همچنین از هیدروکسی متیل آمینو متان برای ثابت نگه داشتن pH استفاده شد. [۱۳] از آنجائیکه در فرایند حل شدن، امکان تجمع ذرات حل‌شونده وجود دارد و در طول مرحله دیالیز به دلیل جداسازی حلال، پیوندهای سیستینی ممکن است اکسید شوند، بنابراین به منظور داشتن محلول پایدار و جلوگیری از تجمع از سدیم دودسیل سولفات (۰/۱۹۴ مول) در محلول استفاده گردید [۱۴]. جهت حل کردن ۳۰ گرم پر خرد شده به حلال اضافه شد و به مدت ۲ ساعت زیر اتمسفر نیتروژن (به منظور جلوگیری از اکسیداسیون سیستین) در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد حل گردید. سپس به منظور جدا کردن قسمت‌های حل نشده از فیلتراسیون خالص استفاده گردید.

### خالص‌سازی

محلول کراتین درون غشای سلولزی ریخته شد و دو سر غشاء با استفاده از نخ بسته شد. سپس غشاء درون ظرف حاوی آب مقطر قرار گرفت. با توجه به اختلاف پتانسیل شیمیایی موجود بین محلول کراتین و آب مقطر، جریانی از درون به بیرون غشاء ایجاد می‌شود. بنابراین امکان خروج مولکول‌های مرکاپتواتانول، اوره، سدیم دودسیل سولفات، هیدروکسی متیل آمینو متان و مولکول‌های کراتین با وزن مولکولی کمتر از ۶۰۰۰ به خارج از غشاء فراهم می‌گردد. عملیات دیالیز به مدت ۷۲ ساعت ادامه یافت. اصلاح شیمیایی کراتین پر: با خارج شدن حلال از غشاء، امکان واکنش پیوندهای سیستینی آزاد کراتین با اکسیژن هوا شکل می‌گیرد. به منظور جلوگیری از این واکنش از استیک اسید یددار استفاده شد (استیک اسید یددار با گروه‌های آزاد سیستین واکنش می‌دهد). بدین منظور ۳۰ میلی‌مول استیک اسید یددار و ۸ مول اوره به محلول کراتین خالص اضافه گردید. محلول به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط با همزن مغناطیسی همزده شد [۱۵-۱۳]. به منظور خروج مولکول‌های اوره و استیک اسید یددار از غشاء، خالص‌سازی کراتین اصلاح شده، مشابه مرحله اول خالص‌سازی، به مدت ۴۸ ساعت انجام شد. بدین ترتیب محلول خالص و شفاف کراتین اصلاح شده بدست آمد [۱۶، ۱۴]. بعد از دیالیز محلول سانتریفیوژ شده و در نهایت با کمک دستگاه خشک‌کننده انجمادی خالص، خشک گردید، بدین ترتیب کراتین خالص به صورت اسفنج به دست آمد.

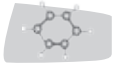
### الکترواسپری محلول کراتین

محلول‌های پلیمری از طریق حل کردن اسفنج کراتین پر در تری‌فلئورو استیک اسید به مدت ۴۸ ساعت در دمای محیط تهیه شدند. در ادامه محلول پلیمری درون سرنگ متصل به نازل ریخته شد. نازل به قطب مثبت و صفحه جمع‌کننده به قطب منفی متصل گردید. سرنگ حاوی محلول بر روی پمپ سوار شد و الکترواسپری انجام شد. به منظور تولید نانو ذرات یکنواخت پارامترهای مختلف شامل غلظت محلول پلیمری، ولتاژ، فاصله نازل - جمع‌کننده و نرخ تغذیه محلول مورد بررسی قرار گرفتند.



شکل ۱. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از نانو پودرهای کراتین پر الکترواسپری شده

- A: غلظت کراتین ۰/۲٪، ولتاژ ۱۰ کیلوولت، فاصله نوک سوزن - جمع‌کننده ۱۵ سانتی‌متر و نرخ تغذیه ۰/۴۷ میلی‌لیتر بر ساعت
- B: غلظت کراتین ۰/۲٪، ولتاژ ۱۵ کیلوولت، فاصله نوک سوزن - جمع‌کننده ۲۵ سانتی‌متر و نرخ تغذیه ۰/۴۷ میلی‌لیتر بر ساعت
- C: غلظت کراتین ۰/۶٪، ولتاژ ۱۵ کیلوولت، فاصله نوک سوزن - جمع‌کننده ۲۵ سانتی‌متر و نرخ تغذیه ۰/۴۷ میلی‌لیتر بر ساعت
- D: غلظت کراتین ۱ درصد، ولتاژ ۱۵ کیلوولت، فاصله نوک سوزن - جمع‌کننده ۱۵ سانتی‌متر و نرخ تغذیه ۰/۴۷ میلی‌لیتر بر ساعت
- E: غلظت کراتین ۱ درصد، ولتاژ ۲۰ کیلوولت، فاصله نوک سوزن - جمع‌کننده ۱۵ سانتی‌متر و نرخ تغذیه ۰/۴۷ میلی‌لیتر بر ساعت
- F: غلظت کراتین ۱ درصد، ولتاژ ۱۵ کیلوولت، فاصله نوک سوزن - جمع‌کننده ۱۵ سانتی‌متر و نرخ تغذیه ۰/۹۴ میلی‌لیتر بر ساعت



حلال) بهتر صورت می‌گیرد. اثر نرخ تغذیه محلول، به منظور بررسی تأثیر نرخ تغذیه بر اندازه و میانگین اندازه ذرات تولید شده از دو نرخ تغذیه ۰/۰۴۷ و ۰/۰۹۴ میلی‌لیتر بر ساعت در ولتاژ و غلظت‌های مختلف استفاده گردید. نتایج نشان داد که افزایش نرخ تغذیه باعث افزایش میانگین اندازه ذرات تولیدی شده است. دلیل این پدیده را می‌توان افزایش حجم محلول پلیمری در نوک نازل در شرایطی که نرخ تغذیه (در دیگر شرایط ثابت) افزایش یابد، دانست. نمونه‌هایی از نانو پودر تولید شده در این تحقیق در شکل (۱) آورده شده است.

آنالیز FTIR شکل‌های (۲)، (۳) و (۴) به ترتیب طیف مادون قرمز پر، اسفنج کراتین پر بازیابی شده و نانو پودر کراتین الکترواسپری شده را نشان می‌دهند. طول موج جذب امید یک برای آلفا هلیکس در محدوده  $1648-1648 \text{ cm}^{-1}$  و برای بتا شیت در محدوده  $1640-1620 \text{ cm}^{-1}$  قرار دارد. طول موج جذب امید دو برای ساختار راندوم و آلفا هلیکس در حدود  $1540 \text{ cm}^{-1}$  و برای ساختار بتا شیت در حدود  $1533 \text{ cm}^{-1}$  و طول موج جذب امید سه برای ساختار راندوم و آلفا هلیکس در حدود  $1325$  و  $1235 \text{ cm}^{-1}$  و برای ساختار بتا شیت در حدود  $1265 \text{ cm}^{-1}$  قرار دارد. همان‌طور که از شکل (۲) مشخص است طیف مادون قرمز پر شامل پیوندهای جذبی در طول موج‌های  $1641/11$  (ساختار بتا شیت)،  $1531/67$  (ساختار بتا شیت)،  $1235/54$  (ساختار آلفا و رندوم) می‌باشد. شکل (۳) نشان می‌دهد که طیف مادون قرمز اسفنج کراتین پر بازیابی شده شامل پیوندهای جذبی در طول موج‌های  $1654/19$  (ساختار آلفا هلیکس)،  $1536/1$  (ساختار آلفا و رندوم) و  $1235/54$  (ساختار آلفا و رندوم) می‌باشد و شکل (۴) پیوندهای جذبی نانو پودر کراتین الکترواسپری شده را در طول موج‌های  $1667/02$  (ساختار آلفا هلیکس)،  $1531/67$  (ساختار بتا شیت)،  $1203/33$  (ساختار آلفا و رندوم) نشان می‌دهد.

با مقایسه شکل‌های (۲)، (۳) و (۴) می‌توان نتیجه گرفت که ساختار کراتین در پر معمولی از اسفنج بازیابی شده و پودر الکترواسپری شده از آن، درجه تبلور بیشتری دارد. تفاوت در ساختار بتا و آلفا در کراتین پر، اسفنج و پودر کراتین الکترواسپری شده به شکسته شدن پیوندها در فرایند حل کردن مربوط می‌شود.

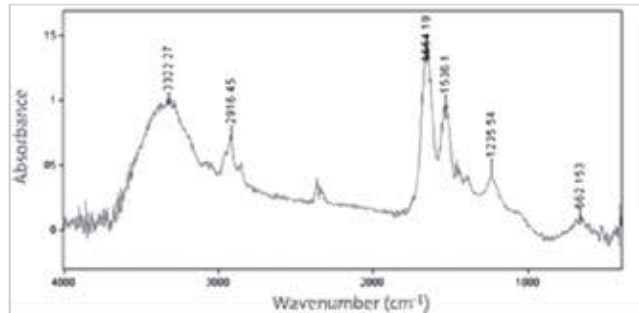
آنالیز XRD: شکل (۵) نمودارهای پراش اشعه ایکس پر، اسفنج کراتین پر بازیابی شده و نانو پودر کراتین الکترواسپری شده را نشان می‌دهد. درصد بلورینگی (به منظور تعیین درصد بلورینگی از نرم افزار آریجین استفاده گردید) کراتین پر خام، اسفنج کراتین پر بازیابی شده و نانوپودر کراتین الکترواسپری شده به ترتیب  $63/6\%$ ،  $46\%$  و  $51\%$  است. همان‌طور که مشخص است درصد بلورینگی کراتین پر بالاتر از دو نمونه دیگر است و درصد بلورینگی اسفنج کراتین پر بازیابی شده کمتر از دو نمونه دیگر است.

#### ۴- نتیجه‌گیری

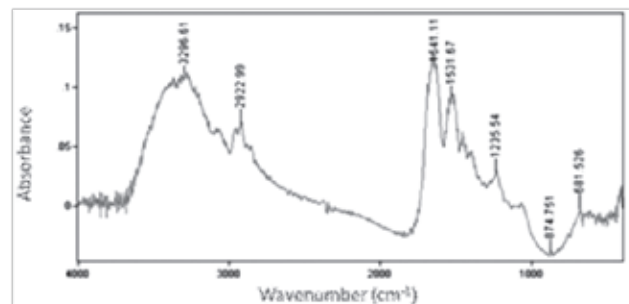
نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان داد که الکترواسپری روشی مناسب برای تولید ذرات کروی شکل و یکنواخت کراتین با میانگین اندازه ذرات زیر  $60$  نانومتر می‌باشد. همچنین نتایج حاصل از بررسی پارامترهای مؤثر در فرایند الکترواسپری نشان داد که کاهش غلظت محلول، کاهش نرخ تغذیه، افزایش فاصله نازل تا جمع‌کننده و افزایش ولتاژ از  $10$  تا  $18$  کیلوولت میانگین اندازه ذرات پودر کراتین پر را کاهش می‌دهند. افزایش ولتاژ به بیش از  $18$  کیلوولت میانگین اندازه ذرات کراتین پر را افزایش می‌دهد. نتایج پراش اشعه ایکس و طیف مادون قرمز نشان داد که درصد بلورینگی نانو پودر کراتین الکترواسپری شده از کراتین پر کمتر است.

منابع در دفتر مجله موجود است.

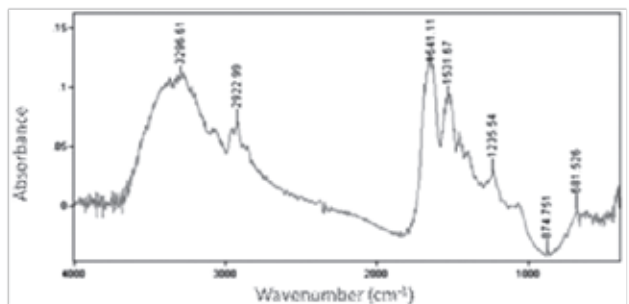
و یکنواختی ذرات دو فاصله  $15$  و  $25$  سانتی‌متر در ولتاژها و غلظت‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که با افزایش فاصله نازل - جمع‌کننده اندازه ذرات کوچکتر و یکنواختی ذرات بیشتر می‌شود. دلیل این پدیده این است که در فاصله زیاد مرحله شکافت ریز قطرات (به دلیل زمان پرواز بیشتر و در نتیجه تبخیر بیشتر



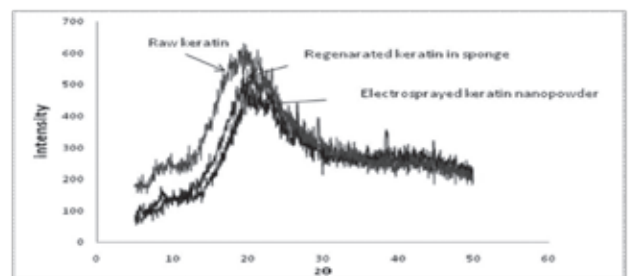
شکل ۲. نمودار طیف مادون قرمز پر



شکل ۳. نمودار طیف مادون قرمز کراتین پر بازیابی شده



شکل ۴. نمودار طیف مادون قرمز نانوپودر تولید شده از کراتین پر بازیابی شده



شکل ۵. نمودار  $2\theta$  در مقابل شدت