

تغییر مورفولوژی بسترهای سیلیکایی مزومتخلخل اس بی ای - ۱۵ میله‌ای به بشقابی با استفاده از عنصر زیرکونیوم

مریم فردوسی باویل علیائی^۱، محمد پازوکی^{۱*}، فریدون علیخانی حساری^۱، محمود کاظم زاد آسیابی^۱
^۱پژوهشگاه مواد و انرژی، کرج، ایران.

تاریخ ثبت اولیه: ۱۳۹۴/۰۱/۲۶، تاریخ دریافت نسخه اصلاح شده: ۱۳۹۴/۰۷/۲۸، تاریخ پذیرش قطعی: ۱۳۹۴/۰۸/۰۴

چکیده لپازها در زمینه‌های گسترده‌ای از علم زیست فن‌آوری به ویژه لبنیاتی، شوینده‌ها، مواد دارویی (ایبوپروفن، ناپروکسن)، مواد شیمیایی، کشاورزی (آفت کش‌ها، حشره کش‌ها) و شیمی روغن (هیدرولیز چربی و روغن) کاربرد دارند. به منظور افزایش نیمه عمر آنزیم و استفاده مکرر از آن، در این تحقیق تثبیت لپاز بر روی پایه مزومتخلخل سیلیکایی SBA-15 (Santa Barbara Amorphous-15)، صورت پذیرفته و اثر کاهش طول کانال‌های تخلخل در میزان جذب لپاز مورد بررسی قرار گرفته است. با توجه به نفوذ کند آنزیم لپاز، علاوه بر افزایش قطر تخلخل‌ها و بالا بردن سطح ویژه، کاهش طول کانال‌ها نیز از پارامترهای موثر در افزایش میزان جذب آنزیم در داخل تخلخل‌های SBA-15 می‌باشد. در این تحقیق برای اولین بار اثر کاهش طول کانال‌های SBA-15 بر روی میزان جذب فیزیکی آنزیم لپاز مورد بررسی قرار گرفت. به منظور ساخت SBA-15 از کوپلیمر سه بلوکی P123 (Triblock Copolymer Pluronic P-123)، به عنوان هدایت کننده ساختار و ترا اتیل اورتوسیلیکات به عنوان منبع سیلیکایی در محیط اسیدی استفاده شد. ترا متیل بنزن برای افزایش قطر تخلخل‌ها مورد استفاده قرار گرفت. با تنظیم زمان پیش هیدرولیز به مدت ۳۰ دقیقه، بهترین اندازه تخلخل با حفظ نظم ساختاری به دست آمد. به منظور کاهش طول کانال‌ها از یون زیرکونیوم چهار ظرفیتی به صورت ترکیب کلرید زیرکونیل هشت آبه استفاده شد. به کمک روش‌های پراش پرتوایکس کم دامنه، منحنی جذب و واجذب نیتروژن، تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی و عبوری، طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه و آنالیز حرارتی اثر زمان پیش هیدرولیز و یون زیرکونیوم مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از اصلاحات انجام شده در روش سنتز معمول ژائو، سطح ویژه ۷۸۲ مترمربع بر گرم و توزیع اندازه تخلخل در حدود ۱۰ نانومتر برای نمونه‌های مزومتخلخل سیلیکایی SBA-15 به دست آمد. کاهش طول کانال‌های مزومتخلخل از حدود ۸۰۰ نانومتر به کمتر از ۱۰۰ نانومتر نیز از دستاوردهای این تحقیق بوده است. میزان جذب آنزیم لپاز در بایوکاتالیست اصلاح شده از ۴۷۳ میلی گرم بر گرم مزومتخلخل به ۷۸۳ میلی گرم بر گرم رسید.

کلمات کلیدی: بسترهای سیلیکایی مزومتخلخل، SBA-15 بشقابی، پری هیدرولیز، تثبیت، لپاز.

Tuning the Morphology of SBA-15 Silica Materials from Rodlike to Platelet in the Presence of Zirconium

Maryam Ferdousi Bavi Aliayi¹, Mohammad Pazouki^{1*}, Fereydon Alikhani Hesari¹, Mahmood Kazemzad Asiabi¹

¹Materials and Energy Research Center, Karaj, Iran.

Abstract Lipases find great use in a broad number of biotechnology fields, especially dairy, detergents, drugs (ibuprofen, naproxen), chemicals, agriculture (pesticides, insecticides) and oil chemistry (the hydrolysis of fats and oils). In order to increase the half-life of the enzyme and repeated use of it, in this study the immobilization of lipase on the mesoporous silica SBA-15 has been investigated. For the first time, the effect of shortening rod channels on the adsorption capacity of porcine pancreatic lipase (PPL) has been studied. Due to the slowly diffusion of large lipase molecules, in addition to increase surface area by expanding the pore diameter, shortening of mesochannels can be considered as an effective parameter on the adsorption properties. Triblock copolymer Pluronic P123 and tetraethyl orthosilicate (TEOS) were used as structure directing agent and silica source in acidic media respectively. Tetramethylbenzidine (TMB) was used as a swelling agent for expanding pore diameter up to 10 nm. The well-ordered 2D hexagonal pore structure was obtained after prehydrolyzing silica for about 30 minutes. Shortening of rod mesochannels from 800nm to 100nm was also maintained in the presence of small amount of ZrOCl₂.8H₂O. Structural analysis by low angle XRD, nitrogen adsorption, scanning electron microscopy (SEM), high resolution transmission electron microscopy (TEM) and Fourier transform infrared spectroscopy confirmed tuning effect of Zr in SBA-15 materials. The amount of lipases adsorbed on the mesoporous SBA-15 was determined by thermal gravimetric analysis. By optimizing synthesis parameters, the uptake capacity of PPL into the mesoporous silica was remarkably increased from 473.2 mg/g to 783.9 mg/g.

Keywords: Mesoporous silica materials, SBA-15, Platelet, Prehydrolysis, Immobilization, Lipase.

۱- مقدمه

سیلیکایی برای جذب بایومولکول بیش از ۱/۵ برابر اندازه قطر متوسط آنزیم یا پروتئین می‌باشد [۸] اما نفوذ مولکولی در طول کانال‌ها و وجود تخلخل‌های بسته از جمله مشکلات اصلی جذب بایومولکول‌ها می‌باشد [۹]. امکان سنتز بسترهای سیلیکایی SBA-15 با طول کانال‌های زیرمیکرون با افزودن کمک مواد فعال سطحی و کمک حلال‌ها به محلول سنتز میسر شده است [۱، ۱۰].

هان و ینگ [۱۱] مزومتخلخل‌های سیلیکایی خالص را با طول ۳۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر با استفاده از کوپلیمرهای سه بلوکی (Triblock copolymer) و مواد فعال سطحی (Surfactants) کاتیونی در حضور فلوروکربن‌ها در محیط اسیدی سنتز کردند. آن‌ها با اضافه کردن فلورید آمونیوم و استفاده از کمک حلال‌هایی با زنجیره‌های بلند آلکانی نظیر هپتان، اکتان و دکان بسترهای سیلیکایی با طول کانال کمتر از میکرون را سنتز کردند. تجمع ذرات سیلیکایی مزومتخلخل توسط مواد فعال سطحی فلوروکربنی مانع از تجمع خوشه‌های سیلیکایی شده، در نتیجه رشد کانال‌ها متوقف می‌گردد. در این روش اضافه کردن گروه‌های عاملی بر روی بستر سیلیکایی به منظور افزایش قدرت جذب بستر در یک مرحله امکان‌پذیر نمی‌باشد و زنجیره فلوروکربنی در پیوند گروه عاملی با بستر سیلیکایی اختلال ایجاد می‌کند.

استفاده از نمک‌های معدنی نیز از جمله روش‌های گزارش شده برای کاهش طول کانال‌ها است. این ترکیبات به دلیل طبیعت آب دوست خود، به محض انحلال در محیط آبی، مولکول‌های آب را به سمت خود جذب و در نتیجه آب را از اطراف مایسل‌های (Micelles) سنتز دور کرده و اصطلاحاً محلول را آب‌زدایی (Dehydration) می‌کنند. در نتیجه این امر، غلظت مایسل‌ها به صورت موضعی بالا رفته و سریع‌تر به غلظت بحرانی می‌رسند. افزایش سرعت جوانه‌زنی مایسل، باعث می‌شود که رشد مایسل‌ها محدود شود [۱۲].

یو و همکارانش [۱۳] از پیشروان استفاده کننده از نمک‌های معدنی برای کاهش طول کانال‌های SBA-15 هستند. آن‌ها ویژگی‌های جذب SBA-15 بشقابی را برای آنزیم سیتوکروم مورد بررسی قرار دادند و توانستند میزان جذب سیتوکروم در مزومتخلخل را از ۰/۴ میلی‌مول بر گرم به ۱/۱ میلی‌مول بر گرم افزایش دهند.

بسترهای مزومتخلخل سیلیکایی SBA-15، به دلیل برخورداری از اندازه تخلخل نسبتاً بزرگ، سطح ویژه بالا، پایداری حرارتی و شیمیایی مناسب و گروه‌های سیلانول آزاد در سطح در مقایسه با سایر مزومتخلخل‌های سیلیکایی، کاندیدای مناسبی به عنوان پایه بایوکاتالیست‌ها محسوب می‌شوند. با توجه به این‌که ابعاد بایومولکول‌هایی نظیر آنزیم‌ها عموماً بزرگ هستند در نتیجه مشکل اصلی در استفاده از این بسترها، نفوذ کند آنزیم‌ها به داخل تخلخل‌ها می‌باشد. افزایش قطر تخلخل‌ها، همراه با کاهش همزمان طول کانال‌ها دو عامل تأثیر گذار جهت افزایش میزان جذب بایومولکول‌ها به داخل بسترهای مزومتخلخل SBA-15 است [۱].

SBA-15 با ساختار تخلخل‌های استوانه‌ای دوبعدی با تقارن ساختاری p6mm نسبت به سایر مزومتخلخل‌ها نظیر MCM-41 به طور گسترده‌تری مورد مطالعه قرار گرفته که علت این امر وجود تخلخل‌های بزرگتر و پایداری هیدروترمال بالاتر است [۲]. ابعاد تخلخل‌های SBA-15 به صورت عمده و به روش‌های معمول سنتز، در حدود ۵ الی ۶ نانومتر و طول کانال‌ها متجاوز از چند صد میکرومتر می‌باشد [۳].

با توجه به قطر بالای تخلخل‌های SBA-15 و وجود سیلانول‌های (Silanol) آزاد این بستر سیلیکایی نسبت به سایر مزومتخلخل‌های سیلیکایی قابلیت بیشتری برای جذب بایومولکول‌ها از خود نشان داده است. اما به دلیل بزرگ بودن بایومولکول‌هایی نظیر پروتئین‌ها و آنزیم‌ها، دغدغه اصلی محققین افزایش قطر تخلخل‌ها به منظور نفوذ سریع‌تر مولکول‌های آلی به داخل تخلخل‌ها می‌باشد. در سال‌های اخیر تحقیقات وسیعی جهت افزایش قطر تخلخل‌های SBA-15 صورت گرفته است. از جمله این بررسی‌ها می‌توان به مطالعات ژائو [۴]، هافمن و فروبا [۵] و هارتمان [۶] اشاره کرد.

با بالا بردن دمای هیدروترمال و افزایش زمان واکنش، اندازه تخلخل‌های ۰ تا ۸۰۰ نانومتر هم برای نمونه‌های SBA-15 گزارش شده است. با استفاده از مواد حجم دهنده ساختار نظیر مزیتیلن (MES: Mesytilene) و تترامیل بنزن (TMB: Tetramethylbenzen) قطر تخلخل‌ها به ۲۰ نانومتر هم رسیده است [۷]. حداقل اندازه تخلخل بستر

۲-۲- سنتز SBA-15 بشقابی

مطابق روش اصلاح شده چن و همکاران [۱۵]، بستر سیلیکایی SBA-15 میله‌ای به بشقابی تبدیل شد. در این روش ۰/۱۶ گرم زیرکونیل کلراید هشت آب (با خلوص ۹۹/۹ درصد از شرکت Aldrich)، و یک گرم Pluronic P123 به ۴۰ گرم اسید کلریدریک ۲ مولار اضافه گردید. دمای محلول در ۳۵ درجه سانتیگراد ثابت و محلول به مدت ۶ ساعت در این شرایط همزده شد. ۲/۱ گرم از TEOS به محلول اضافه و بعد از گذشت زمان‌های ۳۰ و ۶۰ دقیقه، ۱ گرم TMB هم به محلول اضافه گردید. سایر مراحل مانند سنتز SBA-15 میله‌ای تکرار شد [۱۶].

۲-۳- آزمون‌ها

پراش پرتو ایکس کم دامنه با استفاده از پراش نگار PANalytical با قدرت ۴۰ کیلوولت و جریان ۴۰ میلی آمپر توسط (آنگستروم $K\alpha=1/54$ ، Cu) جذب و واجذب گاز نیتروژن در ۷۷ درجه کلین توسط دستگاه Belsorp و آماده سازی نمونه به مدت ۱۰ ساعت در دمای ۴۲۳ درجه کلین در حلال، به منظور بررسی کمی ویژگی‌های فیزیکی پودر SBA-15 مورد استفاده قرار گرفت. سطح ویژه نمونه‌ها توسط آزمون BET تعیین شد. به منظور تایید تغییر مورفولوژی از شکل میله‌ای به بشقابی از تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (Field Emission SEM) مدل Mira 3-XMU استفاده گردید. میکروسکوپ عبوری مدل CMF200FEG با قدرت ۲۰۰ کیلوولت به منظور بررسی نظم ساختاری به کار گرفته شد. به منظور آماده‌سازی نمونه‌های TEM، سوسپانسیون حاوی ۲ گرم پودر در ۲۰ میلی لیتر اتانول به مدت ۳ ثانیه اولتراسونیک (ultrasonic) گردید و یک قطره از محلول حاصل بر روی گرید (gird) مسی با پوشش کربنی نشانده شد. بررسی چگونگی اثر یون زیرکونیوم بر روی SBA-15 به کمک آزمون FTIR در محدوده طول موج ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ بر سانتی‌متر و با اندازه گام ۲ بر سانتی‌متر انجام پذیرفت و آنالیز حرارتی TGA در محدوده دمایی ۰ تا ۴۰۰ درجه سانتی‌گراد به منظور اندازه‌گیری میزان جذب لیپاز در داخل تخلخل‌های SBA-15 مورد تحلیل و بررسی قرار گرفت.

در این تحقیق اثر افزودن نمک زیرکونیوم به محلول سنتز و تشکیل SBA-15 بشقابی و همچنین اثر آن بر مورفولوژی و جذب آنزیم لیپاز بر روی تخلخل‌های بستر سیلیکایی SBA-15-Zr مورد ارزیابی قرار خواهد گرفت. تاکنون تحقیقی مبنی بر جذب آنزیم لیپاز در داخل بستر سیلیکایی SBA-15-Zr گزارش نشده است. با توجه به اهمیت آنزیم لیپاز به عنوان بایوکاتالیست هیدرولیز تری گلیسریدها به اسیدهای چرب، تثبیت لیپاز از جمله موضوعات مهم در این حوزه می‌باشد که تاکنون راهکار مناسبی برای آن گزارش نشده است.

۲- روش تحقیق

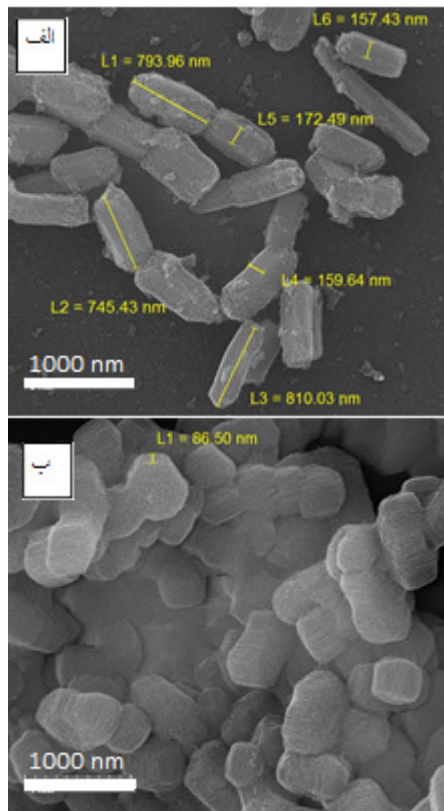
۲-۱- سنتز SBA-15 میله‌ای

مزومتخلخل سیلیکایی SBA-15 با مورفولوژی میله‌ای به قطر تخلخل ۶ نانومتر مطابق با روش مرسوم ژائو تهیه شد [۱۴]. کاپلیمر سه بلوکی Pluronic P123 (با خلوص ۹۹/۹ درصد از شرکت Aldrich) و تترا اتیل اورتوسیلیکات (TEOS با خلوص ۹۹/۹ درصد از شرکت Merck) به ترتیب به عنوان ماده نظم دهنده ساختار و منبع سیلیکایی مورد استفاده قرار گرفتند.

در روش معمول سنتز، ۱ گرم P123 در ۴۰ گرم محلول ۲ نرمال اسید کلریدریک حل شد. مخلوط به مدت ۶ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد همزده و محلول کاملاً یکنواخت و شفاف حاصل گردید. در نهایت، منبع سیلیکا یعنی TEOS به مقدار ۱/۲ گرم به صورت قطره قطره به محلول اضافه و محلول با شدت زیادی همزده شد. پس از این مرحله محلول به مدت ۲۴ ساعت در همان دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد همزده شد. بعد از این مرحله محتویات محلول سنتز به راکتور هیدروترومال با پوشش تفلونی منتقل و با فرآیند هیدروترومال در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت حرارت دید. محلول سنتز با استفاده از کاغذ صافی فیلتر شد و بعد از دوبار شستشو با آب دوبار یونیزه، در خشک‌کن در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد تا وزن ثابت خشک گردید. فاز پلیمری پودر سنتز شده به وسیله کلسیناسیون در دمای ۵۰۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۲ ساعت حذف گردید.

به دلیل کاهش طول کانالها، ذرات پودر از حالت میله‌ای به بشقابی تغییر مورفولوژی داده، در نتیجه به دلیل کاهش طول میله‌ها و تشکیل مورفولوژی بشقابی، پودرها از مقطع دایره‌ای خود روی صفحه قرار گرفته‌اند. این تصاویر خود گواهی است بر کاهش طول کانالها که در راستای میله‌ها تشکیل شده‌اند. با توجه به تصاویر به دست آمده طول کانالها از حدود ۸۰۰ نانومتر به کمتر از ۱۰۰ نانومتر کاهش یافته است.

شکل (۳) نیز تصاویر TEM از نمونه‌های خالص و حاوی زیرکونیوم را نشان می‌دهد. با توجه به مشاهدات عینی می‌توان دریافت که فاصله صفحات منظم در نمونه حاوی یون زیرکونیوم بیشتر می‌باشد که این فاصله بیشتر مربوط به تخلخل‌هایی با ابعاد بزرگتر است. نتایج حاصل از آزمون BET که به منظور بررسی کمی موضوع در جدول (۱) آورده شده قطر تخلخل‌های نمونه حاوی زیرکونیوم را ۸/۰۹ نانومتر نشان می‌دهد که نسبت به نمونه خالص با قطر ۶/۱۸، فاصله صفحات مزومتخلخل افزایش چشمگیری داشته و تاییدی بر نتایج TEM می‌باشد. عملکردی که می‌توان برای تغییر مورفولوژی از میله‌ای به بشقابی در حضور یون زیرکونیوم احتمال داد، کاهش غلظت مایسل بحرانی P123 می‌باشد.



شکل ۲. تغییر مورفولوژی بسترهای سیلیکایی مزومتخلخل از حالت (الف) SBA-15 میله‌ای به (ب) SBA-15-Zr بشقابی.

۴-۲- جذب لیپاز پانکراس خوک در داخل تخلخل‌های

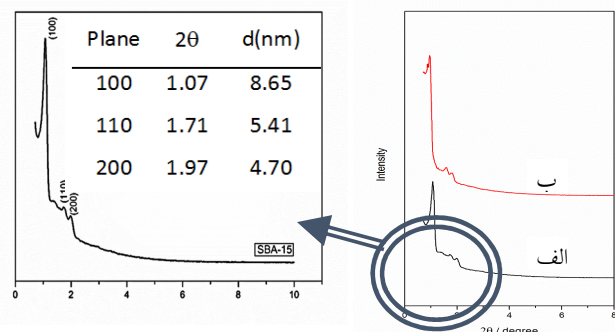
SBA-15

به منظور جذب لیپاز در داخل حفرات نمونه‌های SBA-15 سنتز شده، مقادیر مساوی از لیپاز با پودر SBA-15 در ۲۰ میلی‌لیتر بافر فسفات در pH خنثی اضافه گردید. با توجه به اندازه بزرگ مولکول لیپاز و جذب آهسته آن در داخل حفرات SBA-15، زمان اختلاط در حدود ۱۲ ساعت در نظر گرفته شد. بعد از مدت زمان مذکور، محلول سوسپانسیون در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و چرخش ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید تا پودر سفید از باقیمانده محلول جدا شود. پودر سفید به دست آمده توسط محلول بافر شستشو و به مدت یک شبانه روز در دمای محیط خشک شد. با استفاده از آنالیز حرارتی در محدوده دمایی ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ درجه سانتی‌گراد و با آهنگ گرمایش ۱۰ درجه بر دقیقه، میزان آنزیم جذب شده در داخل حفرات نمونه‌های سیلیکایی اندازه‌گیری گردید.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- اثر زیرکونیوم

نتایج حاصل پرتو پراش ایکس کم دامنه در شکل (۱) مشاهده می‌شود. همان طور که از تصویر پیداست، اضافه کردن زیرکونیوم با نسبت مولی $Zr/Si = 0/05$ نظم ساختاری SBA-15 را تغییر نداده است. وجود سه پیک (۱۰۰)، (۱۱۰) و (۲۰۰) تاییدی بر وجود تقارن هگزاگونال P6mm می‌باشد. شکل ۱-ب نیز پیک‌های مشابهی را نشان می‌دهد که مشخصه وجود نظم ساختاری است [۱۷].



شکل ۱. طرح پراش اشعه ایکس (الف) SBA-15 و (ب) SBA-15-Zr.

تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نیز اثر اضافه کردن یون زیرکونیوم را به وضوح نشان می‌دهد. در شکل ۲-الف نحوه قرار گرفتن ذرات پودر در راستای طولی میله‌ها به دلیل وجود مورفولوژی میله‌ای می‌باشد. اما در شکل ۲-ب

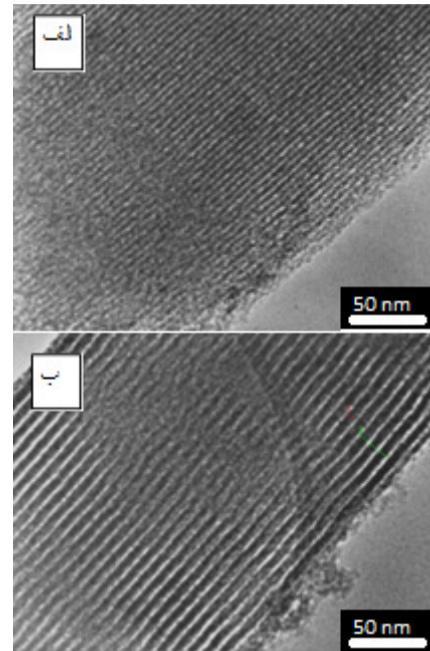
می‌کند و در نتیجه یون زیرکونیوم باعث افزایش قطر تخلخل‌ها نیز می‌شود.

جدول ۱. نتایج حاصل از منحنی‌های ایزوترم جذب و واجذب گاز نیتروژن مربوط به نمونه‌های SBA-15 خالص، SBA-15-Zr حاوی زیرکونیوم بدون TMB، SBA-15-Zr-TMB-30 در حضور TMB با زمان پیش هیدرولیز ۳۰ دقیقه و SBA-15-Zr-TMB-60 در حضور TMB با زمان پیش هیدرولیز ۶۰ دقیقه.

W* (nm)	PSD* (nm)	V _{Total} * (cm ³ /g)	S _{BET} * (m ² /g)	a ₀ * (nm)	ماده مزومتخلخل
۳/۳	۶/۱۸	۰/۸۳۵	۵۵۵/۳۸	۹/۴۸	SBA-15
۲/۵۸	۸/۰۹	۱/۱۶۴	۷۶۷/۳۱	۱۰/۶۷	SBA-15-Zr
۲/۱۲	۹/۲۲	۱/۳۶۵	۷۸۲/۵۳	۱۱/۳۴	SBA-15-Zr-TMB-30
۲/۷۸	۸/۰۶	۱/۲۵۶	۷۸۶/۸۰	۱۰/۸۴	SBA-15-Zr-TMB-60

a_0 : پارامتر شبکه: $\sqrt{3}d_{111}$
 S_{BET} : سطح ویژه
 PSD: توزیع اندازه تخلخل‌ها (قطر)
 W : ضخامت دیواره تخلخل
 V_{total} : حجم کل

نتایج BET تصدیقی بر صحت این تئوری است [۱۸]. شکل (۴)، نتایج حاصل از FTIR نمونه SBA-15 خالص و SBA-15-Zr را نشان می‌دهد. پیک‌های مربوط به طول موج‌های مشابه در طول موج‌های ۳۴۱۸، ۱۶۲۹، ۱۰۸۷، ۸۰۵ و ۴۷۰ برسانتی‌متر مشاهده می‌شوند. طول باند وسیع مشاهده شده در طول موج ۳۴۱۸ بر سانتی‌متر، مربوط به پیوند هیدروژنی مولکول‌های آب با یکدیگر و نیز مربوط به پیوند هیدروژنی گروه‌های Si-OH می‌باشد [۱۹]. پیک جذب نیز در محدوده ۱۶۳۰ بر سانتی‌متر نیز به دلیل ارتعاش خمشی پیوند O-H در گروه‌های هیدروکسیل است [۲۰]. پیک اصلی مشاهده شده در ۱۰۸۷ برسانتی‌متر به همراه یک شانه کوچک در محدوده ۱۲۲۰ برسانتی‌متر بیانگر ارتعاشات کششی غیرمتقارن پل‌های Si-O-Si می‌باشند [۲۱].



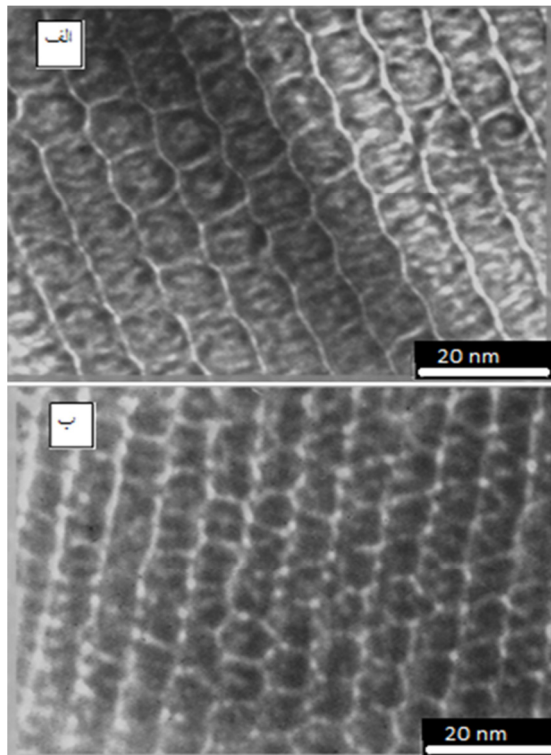
شکل ۳. تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) بسترهای سیلیکایی مزومتخلخل الف) SBA-15 و ب) SBA-15-Zr.

با توجه به این‌که نمک‌های معدنی نظیر زیرکونیوم کلراید، شدیداً آب دوست بوده و هر یون زیرکونیوم، توسط ۸ مولکول آب احاطه می‌شود، در نتیجه مولکول‌های آب موجود در محلول به صورت جهت‌دار در اطراف یون‌های زیرکونیوم قرار می‌گیرند. غلظت بحرانی مایسل به دو صورت ممکن است افزایش یابد: یکی با افزایش مقدار P123، دیگری با کاهش آب. هر دو امر میزان نسبی P123 در محلول که همان غلظت P123 می‌باشد را افزایش می‌دهد. با افزایش موضعی غلظت مایسل‌ها، رسیدن به غلظت بحرانی تسریع شده، مایسل‌ها در زمان کمتری تشکیل و کل محلول را در برمی‌گیرند در نتیجه، سرعت بالای جوانه‌زنی مانع از رشد مایسل‌ها می‌شود. بنابراین سیلیکاهایی نیز که بر روی مایسل‌ها رسوب می‌کنند با تبعیت از الگوی پلیمر، از طول کمتری برخوردار می‌گردند.

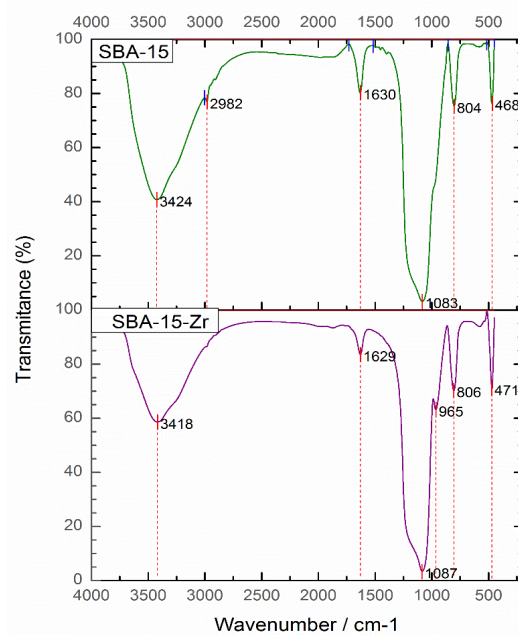
اثر دیگری که می‌توان برای یون زیرکونیوم در محلول سنتز در نظر گرفت، افزایش قطر تخلخل‌ها است. برای توجیه این امر می‌توان گفت که با کاهش مولکول‌های آب در اطراف مایسل‌ها، دم آب‌گریز (Hydrophobic tail) پلیمر (که زنجیره پلی اتیلن اکساید می‌باشد) قادر می‌گردد که آزادی عمل بیشتری پیدا کرده و با تراکم بیشتری نسب به قبل در محلول قرار گیرد. این بخش در سنتز نهایی پودر، قطر تخلخل را تعیین

۳-۲- اثر پیش هیدرولیز TEOS

با توجه به این که آنزیم لیپاز در رده آنزیم‌های با ابعاد بزرگ محسوب می‌شود [۲۳]، به همین دلیل افزایش قطر تخلخل‌ها تا حدود ۱۰ نانومتر هدف بعدی این تحقیق می‌باشد. بعد از اضافه کردن منبع سیلیکایی TEOS به محلول سنتز، به سیلیکا فرصت داده شد تا اطراف مایسل‌ها را احاطه کند و سپس TMB به محلول اضافه گردید. نتایج XRD در شکل ۵- ب نشان می‌دهد که در زمان‌های کم پیش هیدرولیز، سیلیکا هنوز چارچوب محکمی را تشکیل نداده است، در نتیجه اضافه کردن ماده حجم دهنده TMB، نظم ساختاری را به هم زده و پیکی در پرتو پراش مشاهده نمی‌شود، در حالی که در زمان‌های ۳۰ و ۶۰ دقیقه نظم ساختاری به وضوح قابل مشاهده می‌باشد. در نمونه پیش هیدرولیز شده به مدت ۶۰ دقیقه، پیک اصلی (۱۰۰) با شدت بیشتری قابل مشاهده بوده که بنا به نظر محققین می‌تواند مبتنی بر تغییر ضخامت دیواره تخلخل‌ها باشد [۲۴]. جدول (۱) نیز نشان می‌دهد با افزایش زمان پیش هیدرولیز تا ۳۰ دقیقه ضخامت دیواره کاهش می‌یابد و بعد از آن تا ۶۰ دقیقه مجدداً افزایش پیدا میکند.

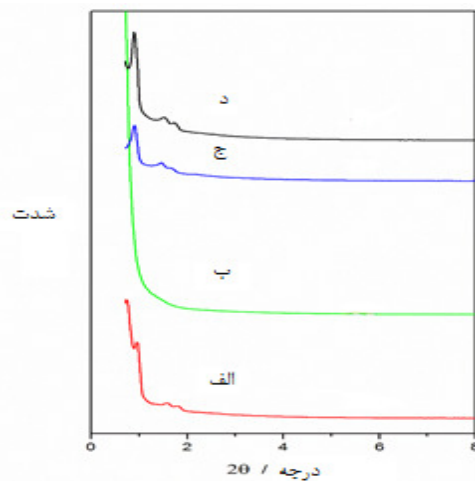


شکل ۶. تصاویر TEM بسترهای سیلیکایی مزومخلخل SBA-15-Zr با زمان‌های مختلف پیش هیدرولیز TEOS (به مدت الف) ۳۰ دقیقه (ب) ۶۰ دقیقه.



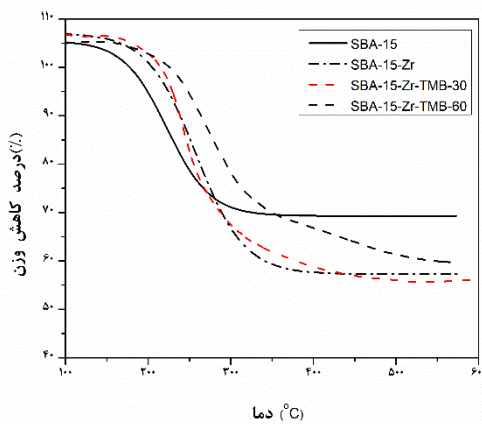
شکل ۴. مقایسه نتایج طیف‌های FTIR مربوط به بسترهای سیلیکایی مزومخلخل الف) SBA-15 و ب) SBA-15-Zr.

این دو نمودار تنها در دو طول موج با هم تفاوت دارند. یکی در طول موج ۹۶۵ بر سانتی‌متر و دیگری در طول موج ۳۴۱۸ بر سانتی‌متر. با استناد به منابع، ظهور پیک ۹۶۵ بر سانتی‌متر در نمونه حاوی زیرکونیوم مربوط به ارتعاش کششی Si-O در پیوند Si-O-Zr است [۲۲]. کاهش شدت پیک ۳۴۱۸ بر سانتی‌متر در نمونه حاوی زیرکونیوم نیز (که مربوط به پیوند هیدروژنی گروه‌های Si-OH می‌باشد) نشان می‌دهد بخشی از این پیوندهای هیدروژنی به دلیل قرار گرفتن زیرکونیوم در زنجیره پلیمری، از بین رفته است.



شکل ۵. طرح پراش اشعه ایکس بسترهای سیلیکایی مزومخلخل SBA-15-Zr که TEOS به مدت ۲۰، ۳۰ و ۶۰ دقیقه پیش از اضافه کردن TMB هیدرولیز شده است. الف) بدون TMB (ب) پیش هیدرولیز به مدت ۲۰ دقیقه، ج) ۳۰ دقیقه و د) ۶۰ دقیقه.

تخلخل فراهم می‌نماید.



شکل ۷. آنالیز توزین حرارتی مزومتخلخل پس از جذب لیپاز در الف) نمونه خالص SBA-15 (ب) SBA-15-Zr (ج) SBA-15-Zr-TMB-30 و (د) SBA-15-Zr-TMB-60.

۴- نتیجه گیری

برای افزایش جذب بسترهای سیلیکایی SBA-15 باید قطر تخلخل‌ها را افزایش داد تا با یومولکول‌ها که ابعاد بزرگتری دارند، به سهولت وارد حفرات شوند. از طرف دیگر طول کانال‌ها را هم کاهش داد تا عامل کنترل کننده نفوذ که بسته شدن دهانه تخلخل‌ها به دلیل باقی ماندن مولکول‌های آنزیم در ابتدای کانال‌ها است، تا حدی برطرف شود. به عبارت دیگر کانال‌های مزومتخلخل با طول کوتاه و قطر متناسب با یومولکول جایگزین کانال‌های با طول بلندی شوند که بخش وسیعی از آن‌ها به دلیل مسدود شدن توسط با یومولکول بلااستفاده می‌گردد. با توجه به تحقیق انجام شده، جذب فیزیکی لیپاز پانکراس خوک، در داخل تخلخل‌هایی با ابعاد ۹/۲۲ نانومتر و حاوی یون زیرکونیوم به نسبت مولی $Zr/Si = 0/05$ و زمان پیش هیدرولیز ۳۰ دقیقه بیشترین مقدار جذب را به خود اختصاص داده است. به منظور ارزیابی دقیق‌تر بایوکاتالیست SBA-15-Zr حاوی آنزیم لیپاز، فعالیت لیپاز تثبیت شده در دما و pH و زمان‌های مختلف، عمر بایوکاتالیست و میزان قابلیت استفاده مجدد آنزیم تثبیت شده نیز از پارامترهای دیگری می‌باشد که در دستور کار این تحقیق قرار گرفته است.

تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری برای نمونه‌های با زمان‌های پیش هیدرولیز ۳۰ و ۶۰ دقیقه در شکل (۶) آورده شده است. همانطور که در شکل ۶- ب مشاهده می‌شود، نظم ساختاری با افزایش زمان پیش هیدرولیز کاهش می‌یابد و با توجه به تصاویر TEM این بی‌نظمی ساختاری از لبه‌های نمونه شروع می‌شود.

جدول ۲. مقادیر لیپاز جذب شده در داخل حفرات بسترهای سیلیکایی و

بررسی اثر یون زیرکونیوم و زمان‌های پیش هیدرولیز TEOS.

ماده جاذب	درصد کاهش وزن	مقدار لیپاز جذب شده در ۱۰۰۰ میلی گرم جاذب (میلی گرم)
SBA-15	۳۳/۴۷	۵۰۲/۹۷
SBA-15-Zr	۴۱/۲۳	۷۰۱/۴۵
SBA-15-Zr-TMB-30	۴۳/۹۴	۷۸۳/۹۲
SBA-15-Zr-TMB-60	۴۰/۷۱	۶۸۶/۶۱

۳-۳- جذب لیپاز

جدول (۲) میزان لیپاز جذب شده در داخل تخلخل‌های بسترهای مختلف سیلیکایی مورد تحقیق را نشان می‌دهد. در شکل (۷) نیز منحنی آنالیز حرارتی (TG) مربوط به جذب مشاهده می‌شود. با توجه به مقادیر به دست آمده در جدول (۲)، دو عامل موثر در میزان جذب، یکی ابعاد تخلخل و دیگری طول کانال‌ها دیده می‌شود. نمونه خالص سیلیکا مقادیر کمتری از لیپاز را جذب نموده و با اضافه کردن زیرکونیوم، جذب به مقدار قابل قبولی افزایش یافته است. افزایش بیشتر قطر تخلخل تا مادامی که نظم ساختار را بر هم نزنند، روند صعودی داشته و بعد از پیش هیدرولیز به مدت ۶۰ دقیقه که نظم رو به زوال رفته، از میزان جذب نیز کاسته شده است. با توجه به تغییرات وزن نمونه‌های حاوی آنزیم مشاهده شده در آزمون آنالیز حرارتی و محاسبه میزان کاهش وزن، مقدار تقریبی لیپاز جذب شده در بستر سیلیکایی محاسبه گردید. به طور کلی افزودن زیرکونیوم به محلول سنتز میزان جذب لیپاز را افزایش داده است. در نمونه خالص بدون زیرکونیوم نسبت ماده جاذب به جذب شده کمتر از یک سوم می‌باشد. این مقدار در نمونه‌های حاوی زیرکونیوم به نسب حدود یک دوم افزایش یافته است. مقادیر جدول (۲) نشان می‌دهند که علاوه بر کاهش طول کانال‌ها، افزایش قطر تخلخل بستر سیلیکایی نیز عامل اصلی دیگری است که امکان ورود آنزیم را به داخل

مراجع

13. Chen, S.-Y. , Chen, Y.-T. , Lee, J.-J. , Cheng, S. , *Journal of Materials Chemistry* 2011, 21, 5693-5703.
14. Shio, S. , Kimura, A. , Yamaguchi, M. , Yoshida, K. , Kuroda, K., *Chemical Communications* 1998, 2461-2462.
15. Chen, S.-Y. , Lee, J.-F. , Cheng, S. , *Journal of Catalysis* **2010**, 270, 196-205.
16. Chen, S.-Y. , Tang, C.-Y. , Chuang, W.-T. , Lee, J.-J. , Tsai, Y.-L. , Chan, J. C. C. , Lin, C.-Y., Liu, Y.-C. ,Cheng, S., *Chemistry of Materials* 2008, 20, 3906-3916.
17. Zhao, D. , Feng, J. , Huo, Q. , Melosh, N. , Fredrickson, G. H. , Chmelka, B. F. , Stucky, G. D. , *Science* 1998, 279, 548-552; b) Feuston, B. P. , Higgins, J. B. , *The Journal of Physical Chemistry* 1994, 98, 4459-4462.
18. Chen, S.-Y. , Mochizuki, T. , Abe, Y. , Toba, M. , Yoshimura, Y., *Applied Catalysis B: Environmental* 2014, 148-149, 344-356.
19. Tripp, C. P. , Hair, M. L., *Langmuir* 1992, 8, 1120-1126.
20. Tian, R. , Seitz, O. , Li, M. , Hu, W. , Chabal, Y. J. , Gao, J. , *Langmuir* 2010, 26, 4563-4566.
21. Lizama, L. , Klimova, T. , *Journal of Materials Science* 2009, 44, 6617-6628.
22. Kongwudthiti, S. , Praserthdam, P. , Tanakulrungsank, W. , Inoue, M. , *Journal of Materials Processing Technology* 2003, 136, 186-189.
23. Mendes, A. A. , Oliveira, P. C. , de Castro, H. F. , *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2012, 78, 119-134.
24. Solovyov, L. A. , *Chemical Society Reviews* 2013, 42, 3708-3720.
1. Linton, P., Wennerstrom H., Alfredsson, V., "*Physical Chemistry Chemical Physics*", 2010, 12, 3852-3858.
2. Cui, X., Zin, W.-C. , Cho, W.-J. , Ha, C.-S. , *Materials Letters*, 2005, 59, 2257-2261.
3. Wang, Y., Zhang, F. , Wang, Y., Ren, J. , Li, C. , Liu, X. , Guo, Y., Guo, Y., Lu, G., *Materials Chemistry and Physics* 2009, 115, 649-655.
4. Wan, Y., Shi, Y., Zhao, D., *Chemical Communications* 2007, 897-926.
5. Hoffmann, F., Cornelius, M., Morell, J., Froba, M., *Angewandte Chemie International Edition* 2006, 45, 3216-3251.
6. Hartmann, M., *Chemistry of Materials* 2005, 17, 4577-4593.
7. Fulvio, P. F. , Pikus, S., Jaroniec, M., *Journal of Materials Chemistry* 2005, 15, 5049-5053.
8. Yokogawa, Y., Toma, T. , Saito, A., Nakamura, A. , Kishida, I. , *Bioceramics Development and Applications* 2010, 1, 1-3.
9. Sujandi, E., Prasetyanto, A. , Park, S.-E. , *Applied Catalysis A: General* 2008, 350, 244-251.
10. Do, D. M. , Jaenicke, S. , Chuah, G.-K. , *Catalysis Science & Technology* 2012, 2, 1417-1424.
11. Han, Y., Ying, J. Y. , *Angewandte Chemie International Edition* 2005, 44, 288-292.
12. Zhai, S.-R. , Park, S. S. , Park, M. , Habib Ullah, M. , Ha, C.-S. , *Microporous and Mesoporous Materials* 2008, 113, 47-55.