بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده علوم پایه

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته ی زیست شناسی گرایش بیوشیمی

مطالعات سینتیکی آنزیم کاتالاز در حضور اوره، گوانیدین هیدروکلرید، نمک‌های مس و نیکل و نانو ذرات اکسید مس و اکسید نیکل

استاد راهنما:

دکتر بهزاد شارقی

استاد مشاور:

دکتر محمدرضا محزونیه

توسط:

فتانه کامکار هفشجانی

شهریور ماه ۱۳۹۲

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات

و نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه

متعلق به دانشگاه شهرکرد است.

تقدیر و تشکر:

خداوندا از تغییر نمودها و تحول دائمی پدیده‌ها دریافتم که می‌خواهی در هر چیز خود را به من نشان دهی تا در هیچ چیز نسبت به تو نادان نباشم. (امام حسین(ع))

خداوند را صمیمانه سپاس می‌گویم، همان سپاسی که فقط برای او معنا دارد و جمله‌های پر محتوای تعظیم، خضوع و عبادت با نقطه‌ی او کامل می‌شود و باید در مقام بزرگی او حرفی نزد و فقط با نشانه‌هایی که انسان را مبهوت می‌کند، اوج شکوه و ابهت او را به ذهن آورد. او را بسیار شاکرم که بر من منت نهاد تا در مسیر علم‌آموزی قدم بردارم و در این میان مرا با آنزیم کاتالاز آشنا کرد تا با مطالعه‌ی کینتیک این آنزیم نشانه‌ای از نشانه‌های بیکران عظمتش را دریابم. هرچند مطالعه‌ی من و آنچه در قالب پایان نامه انجام دادم بسیار کوچک است اما از آن جهت که ذره‌ای از شگفتی‌های خلقت را به من شناساند برایم بسیار ارزشمند است.

" من لم یشکر المنعم من المخلوقین لم یشکر اللّه عزّ و جلّ"

بر خود لازم می‌دانم تا از آنان‌که مرا در انجام این پایان نامه یاری نمودند تشکر کنم ،

از استاد راهنمای بزرگوارم، جناب آقای دکتر بهزاد شارقی که فرصت شاگردی به من دادند و با شکیبایی زحمت راهنمایی این رساله را بر عهده گرفتند؛
از استاد مهربان، جناب آقای دکتر محزونیه که زحمت مشاوره این رساله را متقبل شدند؛
و از اساتید فرزانه و بزرگوار، جناب آقای دکتر محبی و جناب آقای دکتر امینی که زحمت داوری این رساله را متقبل شدند؛ کمال تشکر و قدردانی را دارم.

ازپدر و مادر عزیزم؛ بی‌نهایت سپاس‌گزارم.
و از همه دوستان عزیزم، متشکرم.

امیدوارم خداوند به همه‌ی آنها عنایت ویژه‌ی خود را مبذول فرماید.

هرچند کوچک اما برآمده از تمام توان من است، حاصل آنچه خالصانه تلاش نمودم تقدیم به:

حضور مقدس غایب همیشه حاضر، حضرت ولی عصر(عج)

تقدیم به:

پدر و مادرم

و تقدیم به:

همه‌ی آنهایی که باورهایم را باور داشتند و یاری‌ام نمودند

و به آنانکه در شکوفایی ایران عزیز قدم برداشته‌اند.

چکیده:

آنزیم کاتالاز یک هموپروتئین بسیار فعال است که در اکثر موجودات دارای تنفس هوازی وجود دارد. این آنزیم هیدروژن پراکساید (H_2O_2) را بدون ایجاد رادیکال‌های آزاد به آب و اکسیژن تبدیل می‌کند، بنابراین می‌تواند سلول‌ها را از اثرات سمی H_2O_2 محافظت کند. کاتالاز کبدی گاو هموتترامری با وزن ملکولی ۲۴۳ کیلو دالتون و دارای ۸۴ رزیدوی تیروزین و ۲۴ رزیدوی تریپتوفان است که هر منومر آن شامل یک گروه هم می‌باشد. در این مطالعه اثر اوره، گوانیدین هیدروکلراید، کلرید نیکل، سولفات مس، اتانول، متانول و نانوذرات اکسید مس، اکسید نیکل و اکسید تیتانیوم بر سینتیک آنزیم کاتالاز، توسط دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Vis در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH=۷ (بافر فسفات سدیم و Tris-HCl) مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج حاصل نشان دهنده‌ی نقش دگرگون کنندگی اوره و گوانیدین هیدروکلراید بر ساختار آنزیم و در نتیجه کاهش فعالیت کاتالیتیکی کاتالاز است. همچنین نتایج حاصل از مطالعات سینتیکی بیانگر عملکرد مهار-کنندگی مخلوط کلرید نیکل و سولفات مس بر فعالیت آنزیم کاتالاز است. نانوذره‌ی اکسید مس سبب افزایش جزئی فعالیت آنزیم می شود این درحالی است که نانوذره‌ی اکسید نیکل به عنوان یک فعال‌کننده‌ی قوی سبب افزایش چشم‌گیر فعالیت آنزیم شده است. از طرفی نانوذره‌ی اکسید تیتانیوم سبب کاهش فعالیت آنزیم می‌شود. مطالعات انجام شده مؤید عمل‌کرد اتانول و متانول به عنوان مهارکنندگان رقابتی برای کاتالاز می-باشد.

کلمات کلیدی: کاتالاز، اوره، گوانیدین هیدروکلراید، کلرید نیکل، سولفات مس، اتانول، متانول، نانوذرات اکسید مس، اکسید نیکل و اکسید تیتانیوم، اسپکتروفتومتر

فهرست مطالب

عنوان شماره صفحه

فصل اول-مقدمه ۱

۱-۱-پروتئین‌ها: ۱

۱-۲-حلالیت پروتئین‌ها: ۲

۱-۳-ساختار پروتئین ها: ۳

۱-۳-۱-ساختار اول: ۳

۱-۳-۲-ساختار دوم: ۴

۱-۳-۳-ساختار سوم: ۴

۱-۳-۴-ساختار چهارم: ۵

۱-۴-پروتئین‌های تک واحدی: ۵

۱-۵-پروتئین‌های اولیگومریک: ۵

۱-۶-دگرگون شدن پروتئین‌ها: ۶

۱-۶-۱-دگرگون سازی توسط اوره و گوانیدین هیدروکلراید: ۶

۱-۶-۲-اطلاعات بدست آمده از دگرگون سازی پروتئین‌ها: ۶

۱-۷-آنزیم‌ها: ۶

۱-۸-کوفاکتورها: ۷

۱-۹-طبقه‌بندی آنزیم‌ها: ۷

۱-۱۰-مکانیسم عمل آنزیم‌ها: ۸

۱-۱۰-۱-آنزیم‌ها کاتالیزورهایی کارآمد و اختصاصی هستند: ۸

۱-۱۰-۲-کاتالیز در جایگاه فعال رخ می‌دهد: ۸

۱-۱۰-۳-مکانیسم‌های کاتالیز: ۹

۱-۱۱-بررسی ترمودینامیک آنزیم‌ها: ۱۰

۱-۱۱-۱-اتصال آنزیم به سوبسترا: ۱۰

۱-۱۱-۲-حالت گذار: ۱۰

۱-۱۱-۳-اتصال محکم در حالت گذار: ۱۱

۱-۱۲-سینتیک آنزیم‌ها: ۱۲

۱-۱۲-۱-سرعت تشکیل محصول: ۱۲

۱-۱۲-۲-سرعت مصرف سوبسترا: ۱۲

۱-۱۲-۳-واکنش‌های برگشت‌پذیر: ۱۳
۱-۱۲-۴-درجه واکنش: ۱۴
۱-۱۲-۵-استفاده از سرعت آغازی: ۱۵
۱-۱۲-۶-سینتیک آنزیمی واکنش های تک سوبسترایی: ۱۶
۱-۱۲-۷-معادله میکائیلیس-منتون: ۱۷
۱-۱۲-۸-مفهوم K_m: ۱۸
۱-۱۲-۹-عدد برگشت پذیری(k_{cat}): ۱۸
۱-۱۲-۱۰-تغییر معادله میکائیلیس-منتون(نمودارمعکوس دو طرفه): ۱۹
۱-۱۳-مهارکننده‌ها: ۲۰
۱-۱۳-۱-مهار کننده‌های برگشت‌پذیر: ۲۰
۱-۱۳-۲-سایر مهارکننده‌ها: ۲۳
۱-۱۴-روش اندازه‌گیری جذب: ۲۳
۱-۱۴-۱-جذب: ۲۳
۱-۱۴-۲-مقدار جذب: ۲۳
۱-۱۴-۳-رابطه جذب با غلظت: ۲۴
۱-۱۴-۴-دستگاه اسپکتروفتومتر: ۲۴
۱-۱۵- آنتی اکسیدان‌ها: ۲۵
۱-۱۶- آنزیم کاتالاز: ۲۶
۱-۱۶-۱- ویژگی‌های آنزیم کاتالاز: ۲۶
۱-۱۶-۲- مکانیسم عمل کاتالاز: ۲۷
۱-۱۷- فناوری نانو: ۲۷
۱-۱۷-۱-مفهوم مقیاس نانو: ۲۷
۱-۱۷-۲-تعریف فناوری نانو: ۲۸
۱-۱۷-۳-ویژگی‌های مواد نانو ساختاری: ۲۸
۱-۱۷-۴-کاربردهای فناوری نانو در پزشکی: ۲۸
۱-۱۸هدف از انجام مطالعه: ۲۹

فصل دوم-مواد و روش‌ها: ۳۰
۲-۱-مواد مورد نیاز: ۳۰

۲-۲-تهیه‌ی محلول های مورد نیاز: ۳۱
۲-۲-۱-تهیه‌ی تامپون فسفات سدیم (NaH_2PO_4): ۳۱
۲-۲-۲-تهیه‌ی تامپون Tris-HCl: ۳۱
۲-۲-۳-تهیه‌ی محلول کلرید نیکل ($NiCl_2$): ۳۱
۲-۲-۴-تهیه‌ی محلول سولفات مس ($CuSO_4$): ۳۱
۲-۲-۵-تهیه‌ی محلول اوره: ۳۱
۲-۲-۶-تهیه‌ی محلول گوانیدین هیدروکلراید (GdmCl): ۳۱
۲-۲-۷-تهیه‌ی محلول هیدروژن پروکساید (H_2O_2): ۳۱
۲-۲-۸-تهیه‌ی محلول هایTiO_2، NiO و CuO: ۳۲
۲-۳مطالعه سینتیک آنزیم کاتالاز در حضور مواد مختلف: ۳۲
۲-۳-۱-مطالعه سینتیک آنزیم کاتالاز در حضور اوره در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH=۷: ۳۲
۲-۳-۲-مطالعه سینتیک آنزیم کاتالاز در حضور گوانیدین هیدروکلراید در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد ۳۲
۲-۳-۳-مطالعه سینتیک آنزیم کاتالاز در حضور کلرید نیکل در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH=۷: ۳۲
۲-۳-۴-مطالعه سینتیک آنزیم کاتالاز در حضور سولفات مس در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH=۷: ۳۳
۲-۳-۵-مطالعه سینتیک آنزیم کاتالاز در حضور نانوذره‌ی اکسید مس در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH=۷: ۳۳
۲-۳-۶-مطالعه سینتیک آنزیم کاتالاز در حضور نانوذره‌ی اکسید نیکل در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH=۷: ۳۳
۲-۳-۷-مطالعه سینتیک آنزیم کاتالاز در حضور نانوذره‌ی اکسید تیتانیوم در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH=۷: ۳۳
۲-۳-۸-مطالعه سینتیک آنزیم کاتالاز در حضور اتانول در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH=۷: ۳۴
۲-۳-۹-مطالعه سینتیک آنزیم کاتالاز در حضور متانول در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH=۷: ۳۴
۲-۴-مطالعه اسپکتروفتومتری آنزیم کاتالاز در حضور مواد مختلف: ۳۴
۲-۴-۱-مطالعه اسپکتروفتومتری آنزیم کاتالاز در حضور اوره در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH=۷: ۳۴
۲-۴-۲-مطالعه اسپکتروفتومتری آنزیم کاتالاز در حضور گوانیدین هیدروکلراید در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH=۷: ۳۴
۲-۴-۳-مطالعه اسپکتروفتومتری آنزیم کاتالاز در حضور کلرید نیکل در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH=۷: ۳۵
۲-۴-۴-مطالعه اسپکتروفتومتری آنزیم کاتالاز در حضور نانوذره‌ی اکسید نیکل در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH=۷: ۳۵

۲-۴-۵-مطالعه اسپکتروفتومتری آنزیم کاتالاز در حضور نانوذره‌ی اکسید مس در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH=۷: ۳۵
۲-۴-۶-مطالعه اسپکتروفتومتری آنزیم کاتالاز در حضور نانوذره‌ی اکسید تیتانیوم در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH=۷: ۳۵
۲-۴-۷-مطالعه اسپکتروفتومتری آنزیم کاتالاز در حضور اتانول در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH=۷: ۳۵
۲-۴-۸-مطالعه اسپکتروفتومتری آنزیم کاتالاز در حضور متانول در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH=۷: ۳۶

فصل سوم-نتایج: ۳۷
۳-۱-بررسی نتایج مطالعه سینتیک آنزیم کاتالاز در حضور محلول‌های مختلف: ۳۷
۳-۱-۱-بررسی نتایج مطالعه سینتیک آنزیم کاتالاز در حضور اوره در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH=۷: ..۳۷
۳-۱-۲-بررسی نتایج مطالعه سینتیک آنزیم کاتالاز در حضور گوانیدین هیدروکلراید در دمای ۲۵ درجه سانتی-گراد و pH=۷: ۳۸
۳-۱-۳-بررسی نتایج مطالعه سینتیک آنزیم کاتالاز در حضور کلرید نیکل در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH=۷: ۳۹
۳-۱-۴-بررسی نتایج مطالعه سینتیک آنزیم کاتالاز در حضور سولفات مس در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH=۷: ۴۰
۳-۱-۵-بررسی نتایج مطالعه سینتیک آنزیم کاتالاز در حضور نانو ذره اکسید مس(CuO) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH=۷: ۴۱
۳-۱-۶-بررسی نتایج مطالعه سینتیک آنزیم کاتالاز در حضور نانو ذره اکسید نیکل (NiO) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH=۷: ۴۲
۳-۱-۷-بررسی نتایج مطالعه سینتیک آنزیم کاتالاز در حضور نانوذره‌ی اکسید تیتانیوم (TiO_2) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH=۷: ۴۳
۳-۱-۸-بررسی نتایج مطالعه سینتیک آنزیم کاتالاز در حضور اتانول در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH=۷: ۴۴
۳-۱-۹-بررسی نتایج مطالعه سینتیک آنزیم کاتالاز در حضور متانول در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH=۷ ۴۵
۳-۲-۱-بررسی نتایج مطالعه اسپکتروفتومتری آنزیم کاتالاز در حضور اوره در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH=۷: ۴۶
۳-۲-۲-بررسی نتایج مطالعه اسپکتروفتومتری آنزیم کاتالاز در حضور گوانیدین هیدروکلراید در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH=۷: ۴۸
۳-۲-۳-بررسی نتایج مطالعه اسپکتروفتومتری آنزیم کاتالاز در حضور کلرید نیکل در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH=۷: ۴۹
۳-۲-۴-بررسی نتایج مطالعه اسپکتروفتومتری آنزیم کاتالاز در حضور نانوذره‌ی اکسید مس در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH=۷: ۵۰

۳-۲-۵-بررسی نتایج مطالعه اسپکتروفتومتری آنزیم کاتالاز در حضور نانوذره‌ی اکسیدنیکل در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH=۷: ۵۱
۳-۲-۶-بررسی نتایج مطالعه اسپکتروفتومتری آنزیم کاتالاز در حضور نانو ذره‌ی اکسید تیتانیوم(TiO_2)در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH=۷: ۵۲
۳-۲-۷-بررسی نتایج مطالعه اسپکتروفتومتری آنزیم کاتالاز در حضور اتانول در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH=۷: ۵۳
۳-۲-۸-بررسی نتایج مطالعه اسپکتروفتومتری آنزیم کاتالاز در حضور متانول در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH=۷: ۵۴

فصل چهارم-بحث و نتیجه‌گیری: ۵۶
۴-۱-اثر اوره و گوانیدین هیدروکلراید بر فعالیت سینتیکی و کانفورماسیون آنزیم کاتالاز: ۵۷
۴-۲-اثر نانوذره‌ی TiO_2 بر فعالیت سینتیکی و کانفورماسیون آنزیم کاتالاز: ۵۸
۴-۳-اثر نانوذره‌ی NiO_2 بر فعالیت سینتیکی و کانفورماسیون آنزیم کاتالاز: ۶۱
۴-۴-اثر نانوذره‌یCuO بر فعالیت سینتیکی و کانفورماسیون آنزیم کاتالاز: ۶۱
۴-۵-اثر کلرید نیکل و سولفات مس بر فعالیت سینتیکی و کانفورماسیون آنزیم کاتالاز: ۶۲
۴-۶-اثر حلال‌های آلی، اتانول و متانول، بر فعالیت سینتیکی و کانفورماسیون آنزیم کاتالاز: ۶۳

منابع ۶۴

فهرست شکل‌ها

شکل شماره صفحه

شکل۱-۱: پیوند پپتیدی ۳
شکل۱-۲: تشکیل پیوند پپتیدی ۳
شکل ۱-۳: منحنی انرژی برای واکنش های کاتالیز شده در برابر واکنش‌های کاتالیز نشده ۱۱
شکل ۱-۴: نمودار سرعت آغازی در مقابل غلظت اولیه سوبسترا ۱۶
شکل۱-۵: نمودار میکائیلیس-منتون ۱۸
شکل۱-۶: نمودار معکوس دو طرفه لینویر-برک ۲۰
شکل۱-۷: مهار کننده رقابتی ۲۱
شکل۱-۸: مهارکننده نارقابتی ۲۲
شکل۱-۹: مهارکننده غیر رقابتی ۲۲
شکل۱-۱۰: شماتیکی از دستگاه اسپکتروفتومتر ۲۵
نمودار ۳-۱: اثر غلظت‌های مختلف اوره بر سینتیک آنزیم کاتالاز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH=۷ ..... ۳۸
نمودار ۳-۲: اثر غلظت‌های مختلف گوانیدین هیدروکلراید بر سینتیک آنزیم کاتالاز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد .. ۳۹
نمودار ۳-۳: اثرغلظت‌های مختلف کلرید نیکل بر سینتیک آنزیم کاتالاز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد ۴۰
نمودار ۳-۴: اثر غلظت‌های مختلف سولفات مس بر سینتیک آنزیم کاتالاز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد ۴۱
نمودار ۳-۵: اثر غلظت‌های مختلف نانوذره‌ی اکسید مس بر سینتیک آنزیم کاتالاز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد ... ۴۲
نمودار ۳-۶: اثر غلظت‌های مختلف نانوذره ی اکسید نیکل بر سینتیک آنزیم کاتالاز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد .. ۴۳
نمودار ۳-۷: اثرغلظت‌های مختلف نانوذره ی اکسید تیتانیوم بر سینتیک آنزیم کاتالاز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH=۷ ..... ۴۴
نمودار ۳-۸: اثرغلظت‌های مختلف اتانول بر سینتیک آنزیم کاتالاز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد ۴۵
نمودار ۳-۹: اثرغلظت‌های مختلف متانول بر سینتیک آنزیم کاتالاز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد ۴۶
نمودار ۳-۱۰: تغییرات جذب آنزیم کاتالاز در حضور اوره در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH=۷ ..... ۴۷
نمودار ۳-۱۱: تغییرات جذب آنزیم کاتالاز علیه غلظت اوره در طول موج ۲۸۰ نانومتر ۴۷
نمودار ۳-۱۲: تغییرات جذب آنزیم کاتالاز در حضور گوانیدین هیدروکلراید در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH=۷ ۴۸
نمودار ۳-۱۳: تغییرات جذب آنزیم کاتالاز علیه غلظت گوانیدین هیدروکلراید در طول موج ۲۸۰ نانومتر ۴۹
نمودار ۳-۱۴: تغییرات جذب آنزیم کاتالاز علیه غلظت کلرید نیکل در طول موج ۲۸۰ نانومتر ۵۰
نمودار ۳-۱۵: تغییرات جذب آنزیم کاتالاز علیه غلظت نانوذره‌ی اکسید مس در طول موج ۲۸۰ نانومتر ۵۱
نمودار ۳-۱۶: تغییرات جذب آنزیم کاتالاز علیه غلظت نانوذره‌ی اکسید نیکل در طول موج ۲۸۰ نانومتر ۵۲
نمودار ۳-۱۷: تغییرات جذب آنزیم کاتالاز علیه غلظت نانوذره‌ی اکسید تیتانیوم در طول موج ۲۸۰ نانومتر ۵۳
نمودار ۳-۱۸: تغییرات جذب آنزیم کاتالاز علیه غلظت اتانول در طول موج ۲۸۰ نانومتر ۵۴
نمودار ۳-۱۹: تغییرات جذب آنزیم کاتالاز علیه غلظت متانول در طول موج ۲۸۰ نانومتر ۵۵
شکل ۴-۱تصویر میکروسکوپ الکترونی از نانوذرات TiO_2 ..... ۶۰

فهرست جدول‌ها

جدول شماره صفحه

جدول۲-۱: مواد مورد نیاز..... ۳۰
جدول ۳-۱: تغییرات V_{max} و K_m آنزیم کاتالاز در غلظت‌های مختلف اوره در pH=۷و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد .۳۸
جدول ۳-۲: تغییرات V_{max} و K_m آنزیم کاتالاز در غلظت‌های مختلف گوانیدین هیدروکلراید در pH=۷و دمای ۲۵درجه سانتی‌گراد ۳۹
جدول ۳-۳: تغییرات V_{max} و K_m آنزیم کاتالاز در غلظت‌های مختلف کلرید نیکل در pH=۷ و دمای ۲۵ درجه سانتی-گراد ۴۰
جدول ۳-۴: تغییرات V_{max} و K_m آنزیم کاتالاز در غلظت‌های مختلف سولفات مس در pH=۷ و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد ۴۱
جدول ۳-۵: تغییرات V_{max} آنزیم کاتالاز در غلظت‌های مختلف نانوذره‌ی اکسید مس در pH=۷ و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد ۴۲
جدول ۳-۶: تغییرات V_{max} آنزیم کاتالاز در غلظت‌های مختلف نانوذره‌ی اکسید نیکل در pH=۷ و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد ۴۳
جدول ۳-۷: تغییرات V_{max} آنزیم کاتالاز در غلظت های‌مختلف نانوذره‌ی اکسید تیتانیوم در pH=۷ و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد ۴۴
جدول ۳-۸: تغییرات V_{max} و K_m آنزیم کاتالاز در غلظت‌های مختلف اتانول در pH=۷ و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد ۴۵
جدول ۳-۹: تغییرات V_{max} و K_m آنزیم کاتالاز در غلظت‌های مختلف متانول در pH=۷ و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد ۴۶

فصل اول

مقدمه

۱-۱ پروتئین‌ها:

پروتئین‌ها ماکرومولکول هایی با وزن مولکولی حداقل چند هزار دالتون می‌باشند . این بیومولکول‌ها به فراوانی در انواع موجودات زنده یافت می‌شوند و بیش از نصف وزن خشک سلول‌ها را تشکیل می دهند. پروتئین‌ها در دو نوع مجزا به نام‌های پروتئین‌های حلقوی و رشته‌ای وجود دارند. پروتئین‌های رشته‌ای غیر قابل حل در آب هستند و از نظر فیزیکی سخت و محکم می‌باشند. این ویژگی‌ها باعث می شوند که این پروتئین‌ها نقش ساختاری مهمی را دارا باشند. مثلاً آلفاکراتین موجود در مو، ناخن و پر و کلاژن موجود در پوست، استخوان و تاندون، از پروتئین‌های رشته‌ای تشکیل شده‌اند. برخلاف پروتئین‌های رشته‌ای، پروتئین‌های کروی قابل حل در آب می‌باشند و نقش عمل‌کردی در انواع موجودات زنده دارند(Palmer, 2001).

همه پروتئین‌ها شامل واحدهای آمینواسید می‌باشند که این آمینواسیدها به هم متصل می‌شوند. توالی آمینواسیدها در یک پروتئین، خاص است که توسط ساختار ماده ژنتیکی سلول مشخص می‌شود و ویژگی‌های بی‌همتایی را به پروتئین می‌دهد. تعدادی از پروتئین‌ها فقط از آمینواسید ساخته شده‌اند که به این نوع پروتئین‌ها، پروتئین‌های ساده گویند. تعدادی دیگر که پروتئین‌های مزدوج نام دارند، غیر از آمینواسید از مواد دیگر که به یک واحد آمینواسید یا بیشتر متصل شده‌اند، نیز تشکیل شده است(Palmer, 2001).

۱-۲ حلالیت پروتئین‌ها:

بیشتر پروتئین‌ها در آب محلول هستند. حلالیت در حلال‌های آبی با تشکیل اتصالات ضعیف از جمله پیوند هیدروژنی بین مولکول‌های جسم حل‌شونده و آب، افزایش می‌یابد. اتصالات الکتریکی بین مولکول‌های جسم حل‌شونده نیز بر روی حلالیت تأثیر می‌گذارد. به طور کلی حلالیت یک پروتئین کروی در یک محلول تحت تأثیر چهار فاکتور اصلی است:

۱) غلظت نمک: افزودن مقدار کمی نمک خنثی به یک محلول، باعث افزایش حلالیت پروتئین می‌شود. یون-های اضافه شده باعث ایجاد تغییرات کم در یونیزاسیون زنجیره‌های جانبی آمینواسید می‌شوند و همچنین در ایجاد اتصالات بین مولکول‌های پروتئین تداخل ایجاد می‌کنند و به این طریق باعث افزایش اتصالات بین جسم حل‌شونده و حلال می‌شوند. به این پدیده، Salting-in گویند که فقط به قدرت یونی محلول نمکی بستگی دارد($۱/۲\Sigma[A]Z_A^2$= قدرت یونی). بنابراین قدرت یونی از حاصل ضرب غلظت هر یون در مربع بار آن یون بدست می‌آید سپس این حاصل ضرب‌ها را با هم جمع کرده و بر ۲ تقسیم می‌کنیم) بنابراین یون‌های دو ظرفیتی نسبت به یون‌های تک ظرفیتی اثر بیش‌تری بر روی حلالیت دارند. اگر غلظت نمک خیلی زیاد شود، اتصالات بین یون‌های اضافه‌شده با آب باعث کاهش اتصال آب-پروتئین می‌شود و در نتیجه حلالیت پروتئین کم شده و پروتئین رسوب می‌کند، به این پدیده salting-out گویند.

۲) pH: پروتئین‌ها در pH ایزوالکتریک رسوب می‌کنند در این pH تعداد بار های مثبت و منفی با هم برابر است و این بار ها یکدیگر را جذب می‌کنند و در نتیجه پروتئین نمی تواند به اندازه ی کافی با آب پیوند هیدروژنی برقرار کند بنابراین رسوب می‌کند.

۳) حلال آلی: در یک حلال آلی قابل حل در آب که ثابت دی‌الکتریکش پایین‌تر از آب است مثل اتانول، نیروهای جاذبه بین گروه‌های با بار مخالف در مولکول‌های پروتئین افزایش می‌یابد و بنابراین تماس این مولکول‌ها با آب کاهش یافته در نتیجه حلالیت پروتئین کم می‌شود.

۴) دما: حلالیت پروتئین حلقوی با افزایش دما در محدوده ۴۰ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد افزایش می‌یابد. در دمای بالای این محدوده، ساختار سوم از بین می‌رود و پروتئین دناتوره می‌شود در نتیجه حلالیت پروتئین کاهش پیدا می‌کند.

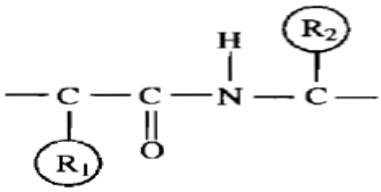
درآنزیم‌ها وقتی دما زیاد می‌شود فعالیت نیز تغییر می‌کند: تا محدوده خاصی از دما با افزایش دما میزان واکنش افزایش می‌یابد و با افزایش بیشتر دما، آنزیم دناتوره شده و فعالیت کاتالیتیکی آن کم می‌شود(Palmer, 2001).

۱-۳ ساختار پروتئین‌ها:

اغلب پروتئین‌ها دارای چهار ساختار می‌باشند:

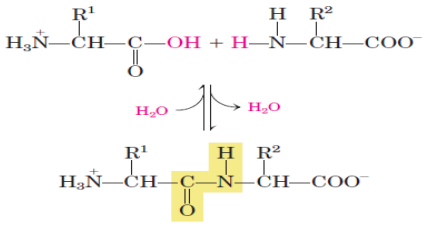
۱-۳-۱ ساختار اول:

آرایش فضایی اتم‌های موجود در یک پروتئین را صورتبندی[1] می‌گویند. ترتیب قرار گرفتن پی در پی اسید-های آمینه در یک زنجیره پلی پپتیدی را ساختمان اول یک زنجیره پلی پپتیدی می نامند، بنابر این پیوند-های پپتیدی پایه‌های ساختمان اول می‌باشند. در واقع پروتئین‌ها از اسیدهای آمینه ای تشکیل شده‌اند که با استفاده از پیوندهای پپتیدی به هم متصل می‌شوند(شکل ۱-۱).



شکل۱-۱:پیوند پپتیدی

این پیوند با برداشت عناصر یک مولکول آب(دهیدراتاسیون) از گروه‌آلفا-کربوکسیل یک آمینواسید و آلفا-آمینوی آمینواسید دیگر ایجاد می‌گردد(شکل ۱-۲). در یک پپتید، ریشه آمینواسید موجود در انتهای دارای گروه آلفا-آمینوی آزاد را ریشه انتهای آمینو(یا انتهایN) و ریشه موجود در انتهای دیگر دارای یک گروه کربوکسیل آزاد را ریشه انتهای کربوکسیل(یا انتهایC) گویند.



شکل۱-۲:تشکیل پیوند پپتیدی

[1]Conformation

هرچند هیدرولیز یک پیوند پپتیدی، یک واکنش انرژی‌زا است، بخاطر انرژی فعال سازی بالای آن، به آهستگی صورت می‌گیرد، لذا پیوندهای پپتیدی موجود در پروتئین‌ها کاملا پایدارند(Dougherty, 2000; Mayo, 2000).

۱-۳-۲ ساختار دوم:

منظور از ساختمان دوم، نظم‌های محلی است که زنجیره ی پلی پپتیدی در برخی از مناطق به دنبال قرار گرفتن اسیدهای آمینه ی خاصی به وجود می آیند. دو دسته از عمومی ترین ساختمان های دوم عبارتند از:

۱)مارپیچ آلفا: این ساختار با استفاده از پیوندهای هیدروژنی درون‌زنجیره‌ای که بین هیدروژن آمیدی یک پیوند پپتیدی و اکسیژن گروه کربوکسیل پیوند پپتیدی دیگر ایجاد می‌شوند، پایدار می‌گردد.

۲)صورتبندی بتا: ساختار دوم دیگر، صورتبندی بتا است که در آن زنجیره‌های پپتیدی بصورت صفحه سازماندهی می‌شوند. در این صورتبندی، اسکلت پلی‌پپتیدی به شکل یک ساختمان زیگزاگی، بجای مارپیچی، امتدادیافته وجود دارد. این زنجیره‌های زیگزاگی می‌توانند بطور پهلو به پهلو در کنار یکدیگر قرار گرفته و ایجاد ساختمانی مشابه یک‌سری چین نمایند. در این آرایش که صفحه بتا نامیده می‌شود، پیوندهای هیدروژنی بین قطعات مجاور زنجیره پلی‌پپتیدی برقرار می‌گردد. زنجیره‌های پلی‌پپتیدی مجاور در یک صفحه بتا می‌تواند بصورت موازی هم‌سو یا موازی ناهم‌سو(به ترتیب دارای جهت‌های آمینو به کربوکسیل یکسان و مخالف) باشند. در ساختمان بسیاری از پروتئین‌ها مناطقی به صورت صفحه چین دار بتا موازی و نا موازی وجود دارد.

۳)پیچ بتا: در پروتئین‌های کروی که ساختمان متراکم تا شده‌ای دارند، حدود یک‌سوم ریشه‌های اسیدآمینه در ساختمان پیچ‌ها و قوس‌ها قرار دارند که در آن‌ها جهت زنجیرها عوض می‌شود. این‌ها عناصر ارتباطی هستند که بخش‌های متوالی مارپیچ آلفا و صورتبندی بتا را به یکدیگر متصل می‌کنند. پیچ‌های بتا دو انتهای دو قطعه مجاور یک صفحه بتا موازی ناهمسو را به یکدیگر متصل می‌کنند. این ساختمان یک پیچ 180° است که درآن چهار ریشه آمینواسید وجود دارد و اکسیژن کربونیل ریشه آمینواسید اول با هیدروژن گروه آمینوی آمینواسید چهارم ایجاد یک پیوند هیدروژنی می‌کند. پیچ‌های بتا اغلب در نزدیکی سطح یک پروتئین دیده می‌شوند که در آنجا گروه‌های پپتیدی دو ریشه آمینواسید میانی می‌توانند با آب ایجاد پیوند هیدروژنی کنند(Berman 1999; Ponting and Russell, 2002).

۱-۳-۳ ساختار سوم:

ساختمان سوم پروتئین ها در واقع شکل فضایی پروتئین است که تابعی از pH، قدرت یونی و نوع حلال می-باشد این ساختمان در اثر نیروهای آبگریز، الکترو استاتیک و هیدروژنی بین زنجیره های جانبی اسیدهای آمینه از یک سو و از سوی دیگر میان‌کنش اسیدهای آمینه سطحی پروتئین با حلال و نیز تشکیل اتصالات دی سولفیدی در نواحی مختلف پروتئین ایجاد می‌شود. وجود پیوندهای دی‌سولفیدی در ساختار پروتئین، که از طریق اکسیداسیون دو آمینواسید سیستئین ایجاد می‌شوند، باعث پایداری بیشتر زنجیره پلی‌پپتید تاخورده

می‌شود. پروتئین‌های کروی بخاطر اینکه تاخوردگی[2] داخلی شان(ساختار سومشان) ساختار کروی دارد، به این اسم نام‌گذاری شده‌اند. این پروتئین‌های کروی محلول در آب هستند، محلول‌های کلوئیدی تشکیل می-دهند و در شکل جامدشان، ساختار کریستالی ایجاد می‌کنند. این دسته از پروتئین‌ها شامل پروتئین‌های عملکردی، آنزیم‌ها، ایمنوگلوبولین‌ها، پروتئین‌های انتخابی، پروتئین‌های تنظیمی و غیره می‌باشند. در ساختار یک پروتئین کروی، آمینواسیدهای هیدروفوبیک و غیرقطبی در قسمت داخلی مولکول و دور از آب قرار گرفته‌اند درحالیکه آمینواسیدهای قطبی در قسمت خارجی پروتئین قراردارند. (Ringia, Garrett et al., 2004).

۱-۳-۴ ساختار چهارم:

بیشتر پروتئین‌ها از پیوند زنجیره های پلی پپتیدی مشابه یا متفاوت ساخته شده‌اند که ساختار چهارم، مربوط به این نوع از پروتئین‌ها است. به یک پروتئین چند زیرواحدی، مولتی‌مر نیز گفته می‌شود. پروتئین-های مولتیمری می‌توانند از دو تا صدها زیرواحد تشکیل شده باشند(Daggett and Fersht, 2003).

۱-۴ پروتئین های تک واحدی:

پروتئین‌هایی هستند که فقط واجد یک زنجیر پلی پپتیدی بوده و بنابراین به واحدهای کوچکتری تجزیه نمی گردند. تعداد کمی از آنزیم‌های منومریک شناخته شده اند و همه آن‌ها واکنش‌های هیدرولیتیک را کاتالیز می‌کنند. به طور کلی این پروتئین‌ها دارای ۱۰۰ تا ۷۰۰ اسید آمینه بوده و وزن مولکولی آن‌ها ۳۵۰۰۰-۱۳۰۰۰ دالتون است. یکی از انواع این آنزیم‌ها ، کربوکسی پپتیداز A که همراه یک یون فلزی است. هر چند بیشتر این آنزیم‌ها بدون کمک هر نوع کوفاکتوری عمل می‌کنند. پروتئازها نیز در این گروه جای دارند (Tymoczko et al., 2011).

۱-۵ پروتئین‌های اولیگومریک :

این دسته از پروتئین‌ها از دو یا بیش از دو زنجیر پلی پپتیدی تشکیل می گردند و معمولا از طریق اندرکنش-های غیر کووالان به یکدیگر متصل می‌شوند . زنجیره‌های پلی پپتیدی تشکیل دهنده زیر واحد نام داشته که ممکن است مشابه یکدیگر یا متفاوت باشند. پروتئین‌های دایمریک از دو زیر واحد و انواع تریمریک از سه زیر واحد تشکیل می‌شوند. معمولاً جرم مولکولی آن‌ها از ۳۵۰۰۰ – ۱۵۰۰۰ دالتون بیشتر است. اکثر آنزیم‌های شناخته شده از دسته الیگومریک هستند. این دسته از آنزیم‌ها به صورت پیش آنزیم‌های غیر فعال سنتز نمی-شوند بلکه فعالیتشان از طریق مهار شدن پس نورد کنترل می‌گردد. به عنوان مثال تمام آنزیم‌های درگیر در فرایند گلیکولیز دو یا چهار زیر واحدی هستند (Tymoczko et al., 2011) .

[2] Folding

۱-۶ دگرگون شدن پروتئین‌ها:

پروتئین‌ها توسط عوامل مختلف به راحتی ساختمان سوم و چهارم خود را از دست می دهند. برای از بین بردن ساختمان دوم شرایط شدید تری لازم است.رایج ترین روشهای دگرگون شدن عبارت از : حرارت دادن، افزودن یک دگرگون کننده شیمیایی مانند اوره یا گوانیدین هیدروکلراید(GdHCl)، تغییر pHبه حالت اسیدی یا قلیایی و اعمال در فشار بالا است. بسیاری از پروتئین‌ها به ویژه انواع کوچک آن‌ها ، به طور برگشت‌پذیر واسرشته گشته به طوری‌که این پروتئین به طور خود به خودی ساختار طبیعی خود را هنگامی‌که به شرایط مناسب جهت ایجاد چین خوردن بر می گردند، باز می‌یابند. بسیاری از پروتئین‌های بزرگتر به طور برگشت ناپذیر، دگرگون می‌گردند، که این پروتئین‌ها اغلب متراکم شده و پس از این‌که عامل دگرگون کننده برداشته شد و یا محلول گرم، سرد گردید رسوب می‌کنند. حتی پروتئین‌های کوچکی که به سرعت به حالت طبیعی بر می‌گردند، تمایل دارند که در غلظت‌های بالای حالت‌های دگرگون شده خود، رسوب دهند (Devlin and Harwood, 2002)

۱-۶-۱ دگرگون سازی توسط اوره و گوانین هیدروکلراید:

اوره و گوانین هیدروکلراید از دگرگون کننده‌های قوی هستند که بیش از سایر دگرگون کننده‌ها استفاده می‌گردند. این دو ترکیب باعث می‌شوند که آب حلال بهتری برای اسید آمینه های غیر قطبی شود. به عبارت دیگر این ترکیبات بر هم‌کنش آب گریز را تضعیف می‌کنند . ساختارهای اوره و گوانیدین هیدروکلراید نشان می‌دهند که این ترکیبات می‌توانند به عنوان دهنده یا گیرنده پروتون در تشکیل اتصالات هیدروژنی با پروتئین نقش داشته باشند . حضور اتم‌های هیدروژن روی اتم ازت که دارای قابلیت تشکیل اتصالات هیدروژنی هستند نقش مهمی را در عمل دگرگون کردن پروتئین‌ها ایفا می‌کنند(Ahmad and McPhie, 1978).

۱-۶-۲ اطلاعات بدست آمده از دگرگون سازی پروتئین‌ها:

هدف اصلی از دگرگون سازی پروتئین‌ها بدست آوردن اطلاعات اضافی در مورد ساختمان، خواص و عملکرد پروتئین‌ها است. مطالعات غیر طبیعی کردن پروتئین‌ها در محلول‌های آبی انجام می‌شود و بنابراین در درک رفتار پروتئین‌ها تحت شرایط فیزیولوژیک مفید خواهد بود. بر طبق تعریف، دگرگونی فرایندی است که بدون قطع و شکستن پیوندهای پپتیدی سبب تغییرات عمده ای در بنای فضایی پروتئین می‌شود. بنای فضایی پروتئین جزئیات ساختار سه بعدی و نظم فضایی اعضای تشکیل دهنده‌ی آن بوده و مبین طول اتصالات و زوایای پیوندی است. دگرگون کردن پروتئین‌ها منجر به تغییراتی در خصوصیات ترمودینامیکی می‌گردد. فرایند دگرگون سازی پروتئین‌ها برای مطالعه‌ی نیرو های تعیین کننده ی ساختار سوم حائز اهمیت است. استفاده‌ی دیگر از دگرگون سازی مطالعه ی نیروهای موثر و نقش انواع میان‌کنش ها در جایگاه فعال آنزیم است(Fink A. L et al., 1994).

۱-۷ آنزیم‌ها:

آنزیم‌ها برجسته ترین و اختصاصی ترین پروتئین‌ها می‌باشند که دارای وزن مولکولی بین ۱۲۰۰۰تا بیش از یک میلیون می‌باشند. آن‌ها دارای قدرت کاتالیتیکی فوق العاده‌ای اند که واکنش‌های شیمیایی را به میزان

زیادی تسریع بخشیده و درpH محلول‌های آبی و تحت شرایط ملایم درجه حرارت عمل می‌نمایند. آنزیم‌ها در هر فرایند بیوشیمیایی دارای نقش مرکزی هستند. با عمل در طی توالی‌های سازمان یافته، آنزیم‌ها هزاران مرحله واکنش‌های شیمیایی را کاتالیز می‌کنند که طی آن‌ها ملکول‌های مواد غذایی تجزیه شده، انرژی شیمیایی حفظ و تغییر شکل داده شده و ماکرومولکول‌های بیولوژی از پیش سازهای ساده سنتز می‌گردند. باعمل آنزیم‌های تنظیمی، مسیرهای متابولیک هماهنگ شده و یک فعل و انفعال هماهنگ را بین بسیاری از فعالیت‌های مختلف ضروری برای حفظ حیات، ایجاد می‌نمایند.

مطالعه آنزیم‌ها دارای اهمیت عملی بی‌اندازه‌ای است. در بعضی از بیماری‌ها، بخصوص ناهنجاری‌های ژنتیکی ارثی، ممکن است کمبود و یا عدم وجود کامل یک یا چند آنزیم وجود داشته باشد. در مورد حالات دیگر بیماری، علت ممکن است افزایش فعالیت یک آنزیم باشد. اندازه گیری فعالیت آنزیم‌ها در پلاسما، گلبول های قرمز، یا نمونه‌های بافتی در تشخیص بعضی از بیماری ها دارای اهمیت است، بسیاری از دارو ها اثر خودرا از طریق انجام واکنش با آنزیم‌ها اعمال می نماید. آنزیم‌ها ابزار عملی مهمی در پزشکی و همچنین در صنعت شیمی، پردازش مواد غذایی و کشاورزی می‌باشند.

به استثناء گروه کوچکی از ملکول های RNA، تمامی آنزیم‌ها ساختمان پروتئینی دارند و فعالیت کاتالیتیکی این آنزیم‌ها بستگی به یک‌پارچگی کونفورماسیون پروتئین طبیعی آن‌ها دارد. در صورتی که ساختمان یک آنزیم دگرگون شده، به زیر واحدهای خود تجزیه گردد و یا وقتی به اسیدهای آمینه خود تجزیه گردد، به طور قطع فعالیت آن از بین می‌رود. بنابراین، ساختمآن‌های اول ، دوم، سوم و چهارم آنزیم‌های پروتئینی برای فعالیت آن‌ها ضروری می‌باشد(Lehninger, 2005).

۱-۸ کوفاکتورها:

بعضی از آنزیم‌ها برای فعالیت، علاوه بر ریشه‌های اسید آمینه‌ی خود، نیاز به گروهای شیمیایی دیگری ندارند .در حالی که سایرآنزیم‌ها نیاز به جزء شیمیایی دیگری به نام کوفاکتور دارند که ممکن است یک یا چند یون معدنی ، نظیر Fe^{2+}، Mg^{2+}، Mn^{2+} و Zn^{2+}، یا یک ملکول آلی یا فلزی –آلی پیچیده به نام کوآنزیم، باشد. بعضی از آنزیم‌ها برای فعالیت، هم به کوآنزیم و هم به یک یا چند یون فلزی نیاز دارند. یک کوآنزیم یا یون فلزی که به طور محکم و یاحتی کووالان به پروتئین آنزیم متصل شده است را گروه پروستتیک گویند. یک آنزم دارای فعالیت کاتالیتیک، به همراه کوآنزیم و یایون های فلزی متصل به آن را هولوآنزیم گویند. قسمت پروتئینی چنین آنزیمی را آکوآنزیم یا آپوپروتئین می نامند کوآنزیم‌ها به عنوان حاملین موقتی گروه‌های عامل اختصاصی عمل می‌نمایند. این ترکیبات اغلب از ویتامین های می‌باشند که خود مواد غذایی آلی مورد نیاز به مقادیر کم در رژیم غذایی هستند (Lehninger, 2005).

۱-۹ طبقه‌بندی آنزیم‌ها:

آنزیم‌ها بر اساس نوع واکنشی که انجام می‌دهند به ۶ دسته تقسیم می‌شوند:

۱-اکسیدوردوکتازها، واکنش‌ها ی اکسیداسیون و احیا را کاتالیز می‌کنند.