



دانشکده علوم پایه

پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست‌شناسی گرایش بیوشیمی

مطالعات غیرفعال شدن حرارتی و تجمع آنزیم لیزوزیم در حضور اسپرمین،

اوره، گوانیدین هیدروکلراید و نانوذرات  $\text{TiO}_2$  و  $\text{SiO}_2$

استاد راهنما:

دکتر بهزاد شارق

استادان مشاور:

دکتر حمداله مشتاقی

دکتر بهناز صفار

توسط:

اکرم هاشمیان

شهریورماه ۱۳۹۲

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات  
و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه  
متعلق به دانشگاه شهر کرد است.

## چکیده:

پروتئین‌ها در دمای بالا، متمایل به تشکیل تجمعات ناخواسته و غیرکنترل‌شده می‌باشند. تجمع پروتئینی یکی از مسائل مهم مرتبط با پروتئین‌ها در زمینه‌های بیولوژیکی و پزشکی می‌باشد. این تحقیق اثرات نانوذرات  $\text{TiO}_2$  و  $\text{SiO}_2$ ، اوره، گوانیدین-هیدروکلراید و اسپرمین را روی دوباره‌تاخوردگی و فعال‌سازی آنزیم لیزوزیم، به‌عنوان یک آنزیم کروی فشرده بررسی می‌کند. لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ، به‌عنوان مدل پروتئینی به کار گرفته شد؛ زیرا مکانیسم‌های اشتباه‌تاخوردگی و دوباره‌تاخوردگی آن‌ها به طور چشمگیر مورد بررسی قرار گرفته‌است. در حضور اسپرمین، حتی در غلظت‌های فوق‌العاده کم (mM)، این ترکیب، بعد از تیمار حرارتی در ۹۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه، هیچ رسوب یا تجمعی مشاهده نشد. درحالی‌که با افزایش ترکیب گوانیدین‌هیدروکلراید از ۰ تا ۱.۵ مولار، تجمع لیزوزیم از ۶۰ درصد به ۱۰ درصد کاهش یافت؛ اما با افزایش اوره، میزان تجمع در حدود ۶۰ درصد ثابت باقی‌ماند. در حضور نانوذرات  $\text{TiO}_2$  و  $\text{SiO}_2$  نه‌تنها تجمع مشاهده شد بلکه میزان آن نیز افزایش یافت. فعالیت باقی‌مانده آنزیم تجمع‌یافته برای اسپرمین، حدود ۵۰ درصد بود، درحالی‌که برای دیگر افزودنی‌های فوق‌کمتر از ۱۰ درصد باقی‌ماند. دمای دگرگون‌سازی حرارتی ( $T_m$ ) آنزیم تجمع‌یافته لیزوزیم در حضور اسپرمین و اوره با افزایش غلظت آن‌ها افزایش یافت. این میزان برای گوانیدین‌هیدروکلراید و نانوذرات  $\text{TiO}_2$  و  $\text{SiO}_2$  با افزایش غلظت این افزودنی‌ها کاهش یافت. حائز اهمیت است که بدانیم  $T_m$  لیزوزیم تجمع‌یافته در حضور یا عدم حضور تمامی افزودنی‌های فوق، بسیار پایین‌تر از آنزیم طبیعی است. به عبارت دیگر،  $T_m$  آنزیم طبیعی بالای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد یا ۳۷۳ کلوین می‌باشد که دلیل اصلی آن ناشی از ۴ پیوند دی‌سولفیدی موجود در ساختمان طبیعی آنزیم است.

**کلمات کلیدی:** لیزوزیم، اوره، گوانیدین‌هیدروکلراید، اسپرمین، نانوذرات  $\text{TiO}_2$  و  $\text{SiO}_2$ ، اسپکتروفوتومتری، تجمع، غیرفعال-سازی حرارتی، دوباره‌تاخوردگی

## فهرست مطالب:

عنوان	شماره صفحه
فصل اول - مقدمه.....	۱
۱-۱- پروتئین‌ها.....	۱
۲-۱- توصیف عملکرد پروتئین‌ها.....	۲
۳-۱- ساختار پروتئین‌ها.....	۲
۱-۳-۱- ساختمان اول.....	۲
۲-۳-۱- ساختمان دوم.....	۳
۳-۳-۱- ساختمان سوم.....	۳
۴-۳-۱- ساختمان چهارم.....	۴
۴-۱- پروتئین‌های تک‌زیرواحدی.....	۴
۵-۱- پروتئین‌های اولیگومریک.....	۴
۶-۱- دگرگون شدن پروتئین‌ها.....	۴
۷-۱- دگرگون‌سازی و تخریب ساختار طبیعی پروتئین‌ها.....	۵
۸-۱- روش‌های رایج دگرگون‌سازی پروتئین‌ها.....	۶
۱-۸-۱- حرارت.....	۶
۲-۸-۱- اثر pH.....	۶
۳-۸-۱- دگرگون‌سازی توسط حلال‌های آلی.....	۶
۴-۸-۱- دگرگون‌سازی توسط برخی از ترکیبات شیمیایی.....	۷
۵-۸-۱- پاک‌کننده‌ها.....	۷
۹-۱- کاربرد دگرگون‌سازی در مطالعه پروتئین‌ها.....	۸
۱۰-۱- تعریف آنزیم.....	۸
۱۱-۱- تاریخچه آنزیم.....	۸
۱۲-۱- ساختار آنزیم.....	۹
۱۳-۱- نامگذاری و طبقه‌بندی آنزیم.....	۹

- ۱۴-۱- جایگاه فعال آنزیم..... ۱۱
- ۱۵-۱- عملکرد و سینتیک آنزیم..... ۱۳
- ۱۶-۱- واحد فعالیت آنزیم..... ۱۶
- ۱۷-۱- اثر دما و pH روی فعالیت آنزیم..... ۱۶
- ۱۸-۱- مقدمه‌ای بر طیف‌سنجی جذبی ماوراءبنفش..... ۱۷
- ۱۹-۱- دستگاه طیف‌سنجی ماوراءبنفش و مرئی..... ۱۷
- ۲۰-۱- عوامل تاثیرگذار بر خصوصیات جذبی یک کروموفور..... ۱۸
- ۲۱-۱- کاربردهای طیف‌سنجی جذبی مرئی و ماوراءبنفش..... ۱۸
- ۲۱-۱-۱- تعیین غلظت مواد..... ۱۸
- ۲۱-۱-۲- سنجش واکنش‌های بیوشیمیایی..... ۱۹
- ۲۱-۱-۳- تعیین هویت مواد..... ۱۹
- ۲۲-۱- معرفی آنزیم لیزوزیم..... ۱۹
- ۲۳-۱- تاریخچه لیزوزیم..... ۱۹
- ۲۳-۱-۱- استخراج و کریستاله کردن لیزوزیم موجود در سفیده تخم‌مرغ..... ۲۰
- ۲۴-۱- محل حضور آنزیم لیزوزیم..... ۲۰
- ۲۵-۱- انواع لیزوزیم..... ۲۰
- ۲۶-۱- ساختمان لیزوزیم..... ۲۱
- ۲۷-۱- مکانیسم عمل لیزوزیم..... ۲۴
- ۲۸-۱- نانو تکنولوژی..... ۲۶
- ۲۹-۱- تاریخچه نانو تکنولوژی..... ۲۷
- ۳۰-۱- زمینه‌های کاربردی..... ۲۸
- ۳۰-۱-۱- کاربرد در صنایع غذایی..... ۲۸
- ۳۰-۱-۲- نانو تکنولوژی در پزشکی..... ۲۸
- ۳۰-۱-۳- نانو تکنولوژی و الکترونیک..... ۲۸
- ۳۰-۱-۴- کاربردهای دیگر..... ۲۹

- ۳۱-۱- تفاوت اصلی فناوری نانو با فناوری های دیگر..... ۲۹
- ۳۲-۱- نانومواد و طبقه بندی آنها..... ۲۹
- ۳۳-۱- محلول های نانوذرات  $\text{TiO}_2$  و  $\text{SiO}_2$ ..... ۳۰
- ۳۴-۱- ترکیبات افزودنی استفاده شده..... ۳۰
- ۳۴-۱-۱- اوره..... ۳۰
- ۳۴-۱-۲- گوانیدین هیدروکلراید..... ۳۱
- ۳۴-۱-۳- اسپریمین..... ۳۱
- ۳۵-۱- هدف از انجام مطالعه..... ۳۱
- فصل دوم- مواد و روش ها..... ۳۲**
- ۱-۲- تهیه محلول های مورد نیاز..... ۳۲
- ۱-۲-۱- تهیه بافر (تامپون) فسفات سدیم..... ۳۲
- ۱-۲-۲- تهیه محلول های اوره و گوانیدین هیدروکلراید..... ۳۲
- ۱-۲-۳- تهیه محلول اسپریمین..... ۳۳
- ۱-۲-۴- تهیه محلول های نانوذرات  $\text{TiO}_2$  و  $\text{SiO}_2$ ..... ۳۳
- ۱-۲-۵- تهیه محلول باکتری میکروکوکوس لیزودیکتیکوس..... ۳۳
- ۲-۲- مطالعه میزان تجمع آنزیم لیزوزیم پس از تیمار حرارتی در حضور مواد مختلف..... ۳۳
- ۲-۲-۱- مطالعه میزان تجمع آنزیم لیزوزیم پس از تیمار حرارتی در حضور اوره در pH خنثی..... ۳۳
- ۲-۲-۲- مطالعه میزان تجمع آنزیم لیزوزیم پس از تیمار حرارتی در حضور گوانیدین هیدروکلراید در pH خنثی..... ۳۳
- ۲-۲-۳- مطالعه میزان تجمع آنزیم لیزوزیم پس از تیمار حرارتی در حضور اسپریمین در pH خنثی..... ۳۴
- ۲-۲-۴- مطالعه میزان تجمع آنزیم لیزوزیم پس از تیمار حرارتی در حضور نانوذره  $\text{TiO}_2$  در pH خنثی..... ۳۴
- ۲-۲-۵- مطالعه میزان تجمع آنزیم لیزوزیم پس از تیمار حرارتی در حضور نانوذره  $\text{SiO}_2$  در pH خنثی..... ۳۴
- ۳-۲- مطالعه پایداری حرارتی آنزیم تجمع یافته لیزوزیم پس از تیمار حرارتی در حضور مواد مختلف..... ۳۵
- ۱-۳-۲- مطالعه پایداری حرارتی آنزیم تجمع یافته لیزوزیم پس از تیمار حرارتی در حضور اوره در دامنه حرارتی ۲۹۳ تا ۳۷۳ درجه کلونین..... ۳۵

- ۲-۳-۲- مطالعه پایداری حرارتی آنزیم تجمع یافته لیزوزیم پس از تیمار حرارتی در حضور گوانیدین هیدروکلراید در دامنه حرارتی ۲۹۳ تا ۳۷۳ درجه کلون ..... ۳۵
- ۳-۳-۲- مطالعه پایداری حرارتی آنزیم تجمع یافته لیزوزیم پس از تیمار حرارتی در حضور اسپرمین در دامنه حرارتی ۲۹۳ تا ۳۷۳ درجه کلون ..... ۳۵
- ۴-۳-۲- مطالعه پایداری حرارتی آنزیم تجمع یافته لیزوزیم پس از تیمار حرارتی در حضور نانوذره  $TiO_2$  در دامنه حرارتی ۲۹۳ تا ۳۷۳ درجه کلون ..... ۳۵
- ۵-۳-۲- مطالعه پایداری حرارتی آنزیم تجمع یافته لیزوزیم پس از تیمار حرارتی در حضور نانوذره  $SiO_2$  در دامنه حرارتی ۲۹۳ تا ۳۷۳ درجه کلون ..... ۳۶
- ۴-۲- مطالعه فعالیت باقی مانده آنزیم تجمع یافته لیزوزیم پس از تیمار حرارتی در حضور مواد مختلف ..... ۳۶
- ۱-۴-۲- مطالعه فعالیت باقی مانده آنزیم تجمع یافته لیزوزیم پس از تیمار حرارتی در حضور اوره در دمای ۳۵ درجه سانتی-گراد و  $pH=7$  ..... ۳۶
- ۲-۴-۲- مطالعه فعالیت باقی مانده آنزیم تجمع یافته لیزوزیم پس از تیمار حرارتی در حضور گوانیدین هیدروکلراید در دمای ۳۵ درجه سانتی-گراد و  $pH=7$  ..... ۳۶
- ۳-۴-۲- مطالعه فعالیت باقی مانده آنزیم تجمع یافته لیزوزیم پس از تیمار حرارتی در حضور اسپرمین در دمای ۳۵ درجه سانتی-گراد و  $pH=7$  ..... ۳۷
- ۴-۴-۲- مطالعه فعالیت باقی مانده آنزیم تجمع یافته لیزوزیم پس از تیمار حرارتی در حضور نانوذره  $TiO_2$  در دمای ۳۵ درجه سانتی-گراد و  $pH=7$  ..... ۳۷
- ۵-۴-۲- مطالعه فعالیت باقی مانده آنزیم تجمع یافته لیزوزیم پس از تیمار حرارتی در حضور نانوذره  $SiO_2$  در دمای ۳۵ درجه سانتی-گراد و  $pH=7$  ..... ۳۷

### فصل سوم- نتایج ..... ۳۸

- ۱-۳- بررسی نتایج میزان تجمع آنزیم لیزوزیم پس از تیمار حرارتی در حضور مواد مختلف ..... ۳۸
- ۱-۱-۳- بررسی نتایج میزان تجمع آنزیم لیزوزیم پس از تیمار حرارتی در حضور اوره در  $pH$  خنثی ..... ۳۸
- ۲-۱-۳- بررسی نتایج میزان تجمع آنزیم لیزوزیم پس از تیمار حرارتی در حضور گوانیدین هیدروکلراید در  $pH$  خنثی ۳۹
- ۳-۱-۳- بررسی نتایج میزان تجمع آنزیم لیزوزیم پس از تیمار حرارتی در حضور اسپرمین در  $pH$  خنثی ..... ۴۰
- ۴-۱-۳- بررسی نتایج میزان تجمع آنزیم لیزوزیم پس از تیمار حرارتی در حضور نانوذره  $TiO_2$  در  $pH$  خنثی ..... ۴۱
- ۵-۱-۳- بررسی نتایج میزان تجمع آنزیم لیزوزیم پس از تیمار حرارتی در حضور نانوذره  $SiO_2$  در  $pH$  خنثی ..... ۴۱

- ۳-۲- مطالعه نتایج پایداری حرارتی آنزیم تجمع یافته لیزوزیم در حضور مواد مختلف..... ۴۲
- ۳-۲-۱- مطالعه نتایج پایداری حرارتی آنزیم تجمع یافته لیزوزیم در دامنه حرارتی ۲۹۳ تا ۳۷۳ درجه کلوین..... ۴۲
- ۳-۲-۲- مطالعه نتایج پایداری حرارتی آنزیم تجمع یافته لیزوزیم در حضور اوره در دامنه حرارتی ۲۹۳ تا ۳۷۳ درجه کلوین ..... ۴۳
- ۳-۲-۳- مطالعه نتایج پایداری حرارتی آنزیم تجمع یافته لیزوزیم در حضور گوانیدین هیدروکلراید در دامنه حرارتی ۲۹۳ تا ۳۷۳ درجه کلوین..... ۴۴
- ۳-۲-۴- مطالعه نتایج پایداری حرارتی آنزیم تجمع یافته لیزوزیم در حضور اسپرمین در دامنه حرارتی ۲۹۳ تا ۳۷۳ درجه کلوین..... ۴۶
- ۳-۲-۵- مطالعه نتایج پایداری حرارتی آنزیم تجمع یافته لیزوزیم در حضور نانوذره  $TiO_2$  در دامنه حرارتی ۲۹۳ تا ۳۷۳ درجه کلوین..... ۴۷
- ۳-۲-۶- مطالعه نتایج پایداری حرارتی آنزیم تجمع یافته لیزوزیم در حضور نانوذره  $SiO_2$  در دامنه حرارتی ۲۹۳ تا ۳۷۳ درجه کلوین..... ۴۹
- ۳-۳- مطالعه نتایج فعالیت باقی مانده آنزیم تجمع یافته لیزوزیم پس از تیمار حرارتی در حضور محلول های مختلف در  $pH=7$  ..... ۵۱
- ۳-۳-۱- مطالعه نتایج فعالیت باقی مانده آنزیم تجمع یافته لیزوزیم پس از تیمار حرارتی در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد و  $pH=7$  ..... ۵۱
- ۳-۳-۲- مطالعه نتایج فعالیت باقی مانده آنزیم تجمع یافته لیزوزیم پس از تیمار حرارتی در حضور اوره در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد و  $pH=7$  ..... ۵۲
- ۳-۳-۳- مطالعه نتایج فعالیت باقی مانده آنزیم تجمع یافته لیزوزیم پس از تیمار حرارتی در حضور گوانیدین هیدروکلراید در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد و  $pH=7$  ..... ۵۳
- ۳-۳-۴- مطالعه نتایج فعالیت باقی مانده آنزیم تجمع یافته لیزوزیم پس از تیمار حرارتی در حضور اسپرمین در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد و  $pH=7$  ..... ۵۴
- ۳-۳-۵- مطالعه نتایج فعالیت باقی مانده آنزیم تجمع یافته لیزوزیم پس از تیمار حرارتی در حضور نانوذره  $TiO_2$  در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد و  $pH=7$  ..... ۵۵
- ۳-۳-۶- مطالعه نتایج فعالیت باقی مانده آنزیم تجمع یافته لیزوزیم پس از تیمار حرارتی در حضور نانوذره  $SiO_2$  در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد و  $pH=7$  ..... ۵۶
- ۵۸ ..... فصل چهارم- بحث و نتیجه گیری
- ۶۵ ..... منابع



## فهرست شکل‌ها:

عنوان	شماره صفحه
شکل ۱-۱- پیوند پپتیدی.....	۳
شکل ۱-۲- سطوح ساختمانی در پروتئین‌ها.....	۴
شکل ۱-۳- دگرگون شدن و تجمع پروتئین‌ها.....	۵
شکل ۱-۴- دگرگون شدن ساختار پروتئین.....	۵
شکل ۱-۵- دگرگون‌سازی توسط اسید و باز.....	۶
شکل ۱-۶- دگرگون‌سازی توسط حلال‌های آلی.....	۷
شکل ۱-۷- دگرگون‌سازی توسط اوره و گوانیدین هیدروکلراید.....	۷
شکل ۱-۸- جایگاه فعال آنزیم.....	۱۱
شکل ۱-۹- دیاگرام اتصال سه نقطه‌ای بین آنزیم و سوبسترا.....	۱۱
شکل ۱-۱۰- فرضیه قفل و کلید فیشر.....	۱۲
شکل ۱-۱۱- فرضیه قالب القایی کوشلند.....	۱۲
شکل ۱-۱۲- نمودار تغییرات سطح انرژی به ازای تبدیل سوبسترا به محصول در گذر از مرحله حدواسط.....	۱۳
شکل ۱-۱۳- وابستگی سرعت اولیه به غلظت سوبسترا.....	۱۵
شکل ۱-۱۴- نمودار عکس سرعت اولیه در مقابل عکس غلظت سوبسترا.....	۱۵
شکل ۱-۱۵- تغییرات فعالیت آنزیم با pH و دما.....	۱۷
شکل ۱-۱۶- شماتیکی از دستگاه اسپکتروفتومتر.....	۱۸
شکل ۱-۱۷- ساختار لیزوزیم به همراه سوبسترا.....	۲۱
شکل ۱-۱۸- ساختمان سه‌بعدی آنزیم لیزوزیم.....	۲۲
شکل ۱-۱۹- توالی آمینواسیدها و ۴ پیوند دی‌سولفیدی موجود در ساختار لیزوزیم.....	۲۳
شکل ۱-۲۰- توزیع نیروی الکتروستاتیک در لیزوزیم.....	۲۳
شکل ۱-۲۱- ریشه‌های قندی متناوب موجود در پپتیدوگلیکان دیواره سلولی باکتری.....	۲۴
شکل ۱-۲۲- واکنشی که لیزوزیم کاتالیز می‌کند.....	۲۵
شکل ۱-۲۳- دو نوع مکانیسم عمل آنزیم لیزوزیم.....	۲۶

شکل ۱-۲۴- نانوذره  $\text{TiO}_2$  ..... ۳۰

شکل ۱-۲۵- نانوذره  $\text{SiO}_2$  ..... ۳۰

شکل ۱-۲۶- ساختار شیمیایی اوره ..... ۳۰

شکل ۱-۲۷- ساختار شیمیایی گوانیدین هیدروکلراید ..... ۳۱

شکل ۱-۲۸- ساختار شیمیایی اسپرمین ..... ۳۱

## فهرست نمودارها:

عنوان	شماره صفحه
نمودار ۱-۳- میزان تجمع آنزیم لیزوزیم پس از تیمار حرارتی در حضور غلظت‌های مختلف اوره.....	۳۹
نمودار ۲-۳- میزان تجمع آنزیم لیزوزیم پس از تیمار حرارتی در حضور غلظت‌های مختلف گوانیدین هیدروکلراید.....	۳۹
نمودار ۳-۳- مقایسه میزان تجمع آنزیم لیزوزیم پس از تیمار حرارتی در حضور غلظت‌های مختلف اوره و گوانیدین-هیدروکلراید.....	۴۰
نمودار ۴-۳- میزان تجمع آنزیم لیزوزیم پس از تیمار حرارتی در حضور غلظت‌های مختلف اسپرمین.....	۴۰
نمودار ۵-۳- میزان تجمع آنزیم لیزوزیم پس از تیمار حرارتی در حضور غلظت‌های مختلف نانوذره $TiO_2$ .....	۴۱
نمودار ۶-۳- میزان تجمع آنزیم لیزوزیم پس از تیمار حرارتی در حضور غلظت‌های مختلف نانوذره $SiO_2$ .....	۴۲
نمودار ۷-۳- تغییرات کسر دگرگون سازی آنزیم تجمع یافته لیزوزیم علیه دما در غلظت‌های مختلف اوره در $pH=7$ و دامنه حرارتی ۲۹۳ تا ۳۷۳ درجه کلوین.....	۴۳
نمودار ۸-۳- تغییرات $\Delta G^\circ$ آنزیم تجمع یافته لیزوزیم علیه دما در غلظت‌های مختلف اوره در $pH=7$ و دامنه حرارتی ۲۹۳ تا ۳۷۳ درجه کلوین.....	۴۴
نمودار ۹-۳- تغییرات کسر دگرگون سازی آنزیم تجمع یافته لیزوزیم علیه دما در غلظت‌های مختلف گوانیدین هیدروکلراید در $pH=7$ و دامنه حرارتی ۲۹۳ تا ۳۷۳ درجه کلوین.....	۴۵
نمودار ۱۰-۳- تغییرات $\Delta G^\circ$ آنزیم تجمع یافته لیزوزیم علیه دما در غلظت‌های مختلف گوانیدین هیدروکلراید در $pH=7$ و دامنه حرارتی ۲۹۳ تا ۳۷۳ درجه کلوین.....	۴۵
نمودار ۱۱-۳- تغییرات کسر دگرگون سازی آنزیم تجمع یافته لیزوزیم علیه دما در غلظت‌های مختلف اسپرمین در $pH=7$ و دامنه حرارتی ۲۹۳ تا ۳۷۳ درجه کلوین.....	۴۶
نمودار ۱۲-۳- تغییرات $\Delta G^\circ$ آنزیم تجمع یافته لیزوزیم علیه دما در غلظت‌های مختلف اسپرمین در $pH=7$ و دامنه حرارتی ۲۹۳ تا ۳۷۳ درجه کلوین.....	۴۷
نمودار ۱۳-۳- تغییرات کسر دگرگون سازی آنزیم تجمع یافته لیزوزیم علیه دما در غلظت‌های مختلف نانوذره $TiO_2$ در $pH=7$ و دامنه حرارتی ۲۹۳ تا ۳۷۳ درجه کلوین.....	۴۸
نمودار ۱۴-۳- تغییرات $\Delta G^\circ$ آنزیم تجمع یافته لیزوزیم علیه دما در غلظت‌های مختلف نانوذره $TiO_2$ در $pH=7$ و دامنه حرارتی ۲۹۳ تا ۳۷۳ درجه کلوین.....	۴۸
نمودار ۱۵-۳- تغییرات کسر دگرگون سازی آنزیم تجمع یافته لیزوزیم علیه دما در غلظت‌های مختلف نانوذره $SiO_2$ در $pH=7$ و دامنه حرارتی ۲۹۳ تا ۳۷۳ درجه کلوین.....	۴۹
نمودار ۱۶-۳- تغییرات $\Delta G^\circ$ آنزیم تجمع یافته لیزوزیم علیه دما در غلظت‌های مختلف نانوذره $SiO_2$ در $pH=7$ و دامنه حرارتی ۲۹۳ تا ۳۷۳ درجه کلوین.....	۵۰

- نمودار ۳-۱۷- فعالیت باقی مانده آنزیم تجمع یافته لیزوزیم در عدم حضور افزودنی در  $\text{pH}=7$  ..... ۵۱
- نمودار ۳-۱۸- فعالیت باقی مانده آنزیم تجمع یافته لیزوزیم در حضور اوره در  $\text{pH}=7$  ..... ۵۲
- نمودار ۳-۱۹- فعالیت باقی مانده آنزیم تجمع یافته لیزوزیم در حضور گوانیدین هیدروکلراید در  $\text{pH}=7$  ..... ۵۳
- نمودار ۳-۲۰- فعالیت باقی مانده آنزیم تجمع یافته لیزوزیم در حضور اسپرمین در  $\text{pH}=7$  ..... ۵۴
- نمودار ۳-۲۱- فعالیت باقی مانده آنزیم تجمع یافته لیزوزیم در حضور سه افزودنی اوره، گوانیدین هیدروکلراید و اسپرمین در  $\text{pH}=7$  ..... ۵۵
- نمودار ۳-۲۲- فعالیت باقی مانده آنزیم تجمع یافته لیزوزیم در حضور نانوذره  $\text{TiO}_2$  در  $\text{pH}=7$  ..... ۵۵
- نمودار ۳-۲۳- فعالیت باقی مانده آنزیم تجمع یافته لیزوزیم در حضور نانوذره  $\text{SiO}_2$  در  $\text{pH}=7$  ..... ۵۶
- نمودار ۳-۲۴- فعالیت باقی مانده آنزیم تجمع یافته لیزوزیم در حضور سه افزودنی  $\text{SiO}_2$ ،  $\text{TiO}_2$  و اسپرمین ..... ۵۷

## فهرست جدول‌ها:

عنوان	شماره صفحه
جدول ۱-۱- طبقه‌بندی آنزیم‌ها.....	۱۰
جدول ۱-۳- تغییرات $T_m$ ، $\Delta S_m^\circ$ و $\Delta H_m^\circ$ آنزیم تجمع‌یافته لیزوزیم در غلظت‌های مختلف اوره در $pH=7$ و دامنه حرارتی ۲۹۳ تا ۳۷۳ درجه کلوین.....	۴۴
جدول ۲-۳- تغییرات $T_m$ ، $\Delta S_m^\circ$ و $\Delta H_m^\circ$ آنزیم لیزوزیم در غلظت‌های مختلف گوانیدین‌هیدروکلراید در $pH=7$ و دامنه حرارتی ۲۹۳ تا ۳۷۳ درجه کلوین.....	۴۶
جدول ۳-۳- تغییرات $T_m$ ، $\Delta S_m^\circ$ و $\Delta H_m^\circ$ آنزیم لیزوزیم در غلظت‌های مختلف اسپرمین در $pH=7$ و دامنه حرارتی ۲۹۳ تا ۳۷۳ درجه کلوین.....	۴۷
جدول ۴-۳- تغییرات $T_m$ ، $\Delta S_m^\circ$ و $\Delta H_m^\circ$ آنزیم لیزوزیم در غلظت‌های مختلف نانوذره $TiO_2$ در $pH=7$ و دامنه حرارتی ۲۹۳ تا ۳۷۳ درجه کلوین.....	۴۹
جدول ۵-۳- تغییرات $T_m$ ، $\Delta S_m^\circ$ و $\Delta H_m^\circ$ آنزیم لیزوزیم در غلظت‌های مختلف نانوذره $SiO_2$ در $pH=7$ و دامنه حرارتی ۲۹۳ تا ۳۷۳ درجه کلوین.....	۵۰
جدول ۶-۳- تغییرات $V_{max}$ آنزیم تجمع‌یافته لیزوزیم در غلظت‌های مختلف اوره در $pH=7$ و دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد.....	۵۲
جدول ۷-۳- تغییرات $V_{max}$ آنزیم تجمع‌یافته لیزوزیم در غلظت‌های مختلف گوانیدین‌هیدروکلراید در $pH=7$ و دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد.....	۵۳
جدول ۸-۳- تغییرات $V_{max}$ آنزیم تجمع‌یافته لیزوزیم در غلظت‌های مختلف اسپرمین در $pH=7$ و دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد.....	۵۴
جدول ۹-۳- تغییرات $V_{max}$ آنزیم تجمع‌یافته لیزوزیم در غلظت‌های مختلف نانوذره $TiO_2$ در $pH=7$ و دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد.....	۵۶
جدول ۱۰-۳- تغییرات $V_{max}$ آنزیم تجمع‌یافته لیزوزیم در غلظت‌های مختلف نانوذره $SiO_2$ در $pH=7$ و دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد.....	۵۷

## فصل اول

### ۱- مقدمه

#### ۱-۱- پروتئین‌ها:

پروتئین‌ها، بیوپلیمرهای حاوی آمینواسیدها، بعد از آب، بیشترین جزء سلولی را تشکیل می‌دهند. بعضی از پروتئین‌ها دارای فعالیت کاتالیتیک بوده و به عنوان آنزیم عمل می‌کنند؛ سایر پروتئین‌ها به عنوان عناصر ساختمانی، گیرنده‌های پیام یا ترانسپورتهایی عمل می‌نمایند که مواد خاصی را به داخل یا خارج سلول انتقال می‌دهند. دو کلاس عمومی پروتئین‌ها شامل پروتئین‌های فیبری و کروی وجود دارد. پروتئین‌های فیبری که اساساً جهت اعمال ساختمانی می‌باشند، دارای عناصر ساده تکراری ساختمان دوم بوده و مدل‌هایی برای مطالعات اولیه پروتئین‌ها بوده‌اند. پروتئین‌های کروی دارای ساختمان‌های سوم پیچیده‌تری هستند که اغلب دارای چندین نوع ساختمان دوم در یک زنجیر پلی‌پپتیدی می‌باشند (Whisstock and Lesk, 2003). ساختمان سه بعدی پروتئین‌ها را می‌توان با استفاده از مواد یا شرایطی که واکنش‌های متقابل ضعیف را مختل می‌نمایند؛ طی فرایندی به نام دگرگون‌سازی یا دناتوراسیون<sup>۱</sup> از بین برد. دگرگون‌سازی سبب از بین رفتن فعالیت پروتئین شده که ارتباط بین ساختمان و فعالیت را نشان می‌دهد. برخی از پروتئین‌های دگرگون‌شده می‌توانند به صورت خود به خودی به پروتئین دارای فعالیت بیولوژیک بازیابی<sup>۲</sup> گردند که نشان‌دهنده نقش توالی آمینواسیدها در تعیین ساختمان سوم پروتئین است (Nelson and Cox, 2005).

---

<sup>۱</sup> Denaturation

<sup>۲</sup> Renaturation

## ۱-۲- توصیف عملکرد پروتئین‌ها

پروتئین‌ها مولکول‌های پویایی هستند که اعمال آن‌ها به طور ثابتی بستگی به واکنش‌های متقابل آن‌ها با سایر مولکول‌ها داشته و این واکنش‌های متقابل به روش‌های مختلف مهم فیزیولوژیکی، تحت تأثیر تغییرات جزئی یا گاهی برجسته پیکربندی<sup>۳</sup> پروتئینی قرار می‌گیرند.

اعمال بسیاری از پروتئین‌ها مستلزم اتصال قابل برگشت سایر مولکول‌ها به پروتئین‌ها می‌باشد. مولکولی که به طور برگشت‌پذیر به یک پروتئین اتصال می‌یابد را لیگاند نامند. یک لیگاند بر محلی روی پروتئین به نام جایگاه اتصالی متصل می‌گردد که از نظر اندازه، شکل، بار و ویژگی آب‌گریزی یا آب‌دوستی مکمل لیگاند می‌باشد. تطابق ساختمانی که بین پروتئین و لیگاند رخ می‌دهد را انطباق القا شده<sup>۴</sup> گویند. در یک پروتئین چند زیر واحدی، اتصال یک لیگاند به یک زیر واحد ممکن است روی اتصال لیگاند به سایر زیر-واحدها اثر داشته باشد. اتصال لیگاند قابل تنظیم است که این تنظیم وسیله واکنش‌های متقابل اختصاصی با یک یا چند لیگاند دیگر صورت می‌گیرد (Baker and Sali, 2001, Nelson and Cox, 2005).

## ۱-۳- ساختار پروتئین‌ها

پروتئین‌ها دارای ساختمان بی‌همتای سه بعدی هستند که انعکاسی از فعالیت آن‌ها می‌باشد. ساختمان پروتئین‌ها توسط واکنش‌های متقابل ضعیف پایدار می‌گردد. واکنش‌های متقابل آب‌گریز بیشترین نقش را در پایداری شکل کروی اکثر پروتئین‌های محلول دارد. پیوندهای هیدروژنی و واکنش‌های متقابل یونی در ساختمان اختصاصی به حد مطلوب می‌رسند که بیشترین پایداری ترمودینامیکی را دارد (Levy and Onuchic, 2004). اغلب پروتئین‌ها دارای چهار ساختمان هستند:

### ۱-۳-۱- ساختمان اول:

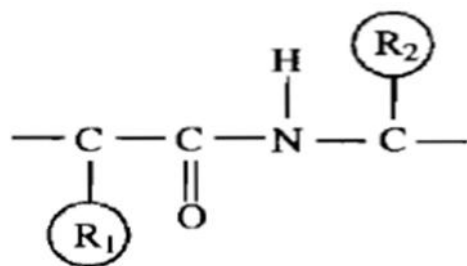
همان طور که اشاره شد پروتئین‌ها پلی‌مرهای بدون انشعاب حاصل از آمینواسیدهای مختلف هستند. ساختمان آن‌ها ممکن است واجد بیش از یک زنجیره اسید آمینه‌ای و یا حاوی پیوندهای عرضی درون و بین زنجیره‌ای باشد. ساختمان اول پروتئین‌ها بر مبنای پیوندهای پپتیدی استوار است و چگونگی پیوندهای کووالانسی یک پروتئین را کاملاً توجیه می‌کند. پیوند پپتیدی دارای خصوصیت یک پیوند دوگانه نسبی است که کل گروه پپتیدی را در یک پیکربندی<sup>۵</sup> صفحه‌ای سخت قرار می‌دهد. ساختمان دقیق پیوند پپتیدی در دهه ۱۹۳۰ توسط پائولینگ<sup>۶</sup> و همکارانش بوسیله اشعه x تعیین شد (Devline, 2006).

<sup>۳</sup> Conformation

<sup>۴</sup> Induced fit

<sup>۵</sup> Configuration

<sup>۶</sup> Linus Pauling



شکل ۱-۱: پیوند پپتیدی

هیدرولیز پیوند پپتیدی با از دست رفتن یک مولکول آب و به صورت یک واکنش انرژی زا است که به خاطر انرژی فعالسازی بالای آن به آهستگی صورت می‌گیرد؛ بنابراین پیوندهای پپتیدی موجود در پروتئین‌ها کاملاً پایدار می‌باشند (Baker and Sali, 2001, Leninger et al., 1993).

### ۱-۳-۲- ساختمان دوم

اصطلاح ساختار دوم پروتئین‌ها معرف آرایش فضایی محلی و منظم چارچوب زنجیر پلی‌پپتیدی است، بدون آن که بنای فضایی زنجیرهای جانبی اسیدهای آمینه آن در نظر گرفته شود. این نوع ساختار در نتیجه ایجاد پیوندهای هیدروژنی بین عوامل مختلف زنجیر در یک رشته و یا بین چند رشته پایدار می‌شود و شامل مارپیچ‌ها<sup>۷</sup>، ساختمان‌های بتا<sup>۸</sup> و پیچه‌ها<sup>۹</sup> است. بنابراین بحث ساختمان دوم بیشتر در مورد الگوهای ناشدن منظم مشترک اسکلت پلی‌پپتیدی است (Leninger et al., 1993).

### ۱-۳-۳- ساختمان سوم

ساختار سوم به ساختمان کامل سه بعدی پروتئین اطلاق می‌شود و دربرگیرنده ساختمان‌های اول و دوم آن است. به عبارت دیگر آرایش سه بعدی پروتئین و چگونگی خم‌شدن و تاخوردگی<sup>۱۰</sup> رشته پلی‌پپتیدی و ارتباط فضایی بین ساختمان‌های دوم و سایر اجزاء تشکیل دهنده آن، توسط ساختمان سوم مشخص می‌شوند. فعالیت بیولوژیک پروتئین‌ها، فقط در صورت داشتن ساختمان سوم بروز پیدا می‌کند (Whisstock and Lesk, 2003).

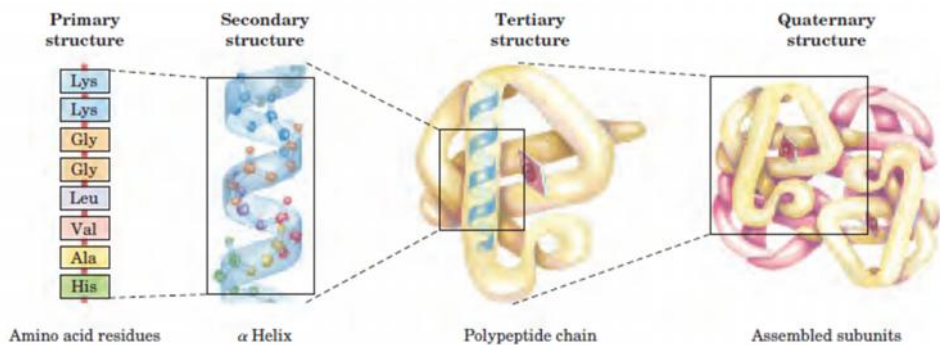
نیروهای ضعیف شامل برهمکنش‌های آب‌گریز دروازه اول، همچنین برهمکنش‌های الکتروستاتیک یا یونی، نیروهای واندروالسی و پیوندهای هیدروژنی در زمره مهمترین نیروهای پایدارسازنده ساختار سوم پروتئین‌ها هستند (Murray et al., 1996).

<sup>۷</sup> Helixes  
<sup>۸</sup>  $\beta$  structures  
<sup>۹</sup> Turnes  
<sup>۱۰</sup> Folding



### ۱-۳-۴- ساختمان چهارم

بسیاری از پروتئین‌ها به‌ویژه آن‌هایی که وزن مولکولی بیش از صد کیلو دالتون دارند، ساختمان آن‌ها از بیش از یک زیر واحد تشکیل شده‌است. این رشته‌ها با آرایش فضایی ویژه‌ای به یکدیگر ملحق شده‌اند (Branden and Tooze, 1991).



شکل ۱-۲: سطوح ساختمانی در پروتئین‌ها

بنابر آنچه در مورد ساختمان چهارم بیان شد، پروتئین‌ها از نظر تعداد زیر واحد دو نوع می‌باشند:

### ۱-۴- پروتئین‌های تک زیر واحدی

این گروه، پروتئین‌هایی هستند که قادر به تجزیه به زیر واحدهای کوچکتر نمی‌باشند. به‌طور کلی این پروتئین‌ها دارای ۱۰۰ تا ۷۰۰ اسید آمینه بوده و وزن مولکولی آن‌ها ۳۵۰۰۰-۱۳۰۰۰ دالتون است. از جمله آنزیم‌های واقع در این گروه می‌توان به کربوکسی‌پپتیداز A و پروتئاز اشاره کرد. این گروه از پروتئین‌ها واکنش‌های هیدرولیتیک را کاتالیز می‌کنند.

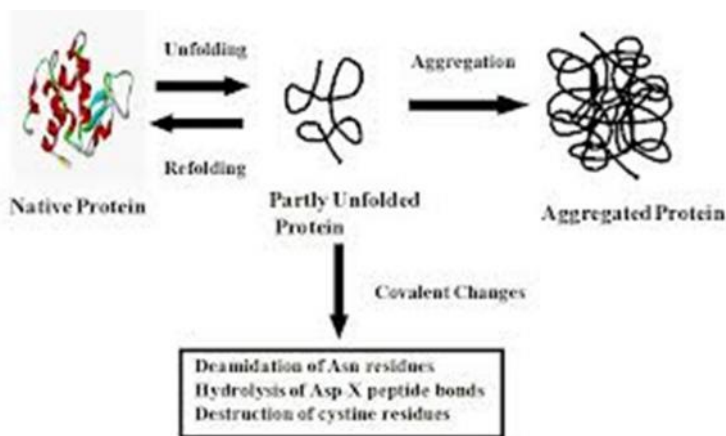
### ۱-۵- پروتئین‌های اولیگومریک

هرگاه پروتئین از دو یا بیش از دو زنجیره پلی‌پپتیدی تشکیل شده باشد، تحت عنوان اولیگومریک شناخته می‌شود و به واسطه میان‌کنش‌های غیرکووالان به هم متصل می‌شوند. معمولاً جرم مولکولی آن‌ها از ۳۵۰۰۰-۱۳۰۰۰ دالتون بیشتر است. اکثر آنزیم‌های شناخته شده از این دسته می‌باشند، از جمله آنزیم‌های درگیر در فرایند گلیکولیز، دو یا چهار زیر واحدی هستند (Leninger et al., 1993, Murray et al., 1996).

### ۱-۶- دگرگون شدن پروتئین‌ها

بسیاری از پروتئین‌ها به‌حالت برگشت‌پذیر دگرگون شده، به طوری که می‌توانند خود به خود ساختار طبیعی خود را در شرایط مناسب بازیابند. بسیاری از پروتئین‌های بزرگتر به طور برگشت‌ناپذیر دگرگون می‌گردند و پس از برداشتن عامل دگرگون‌کننده به حالت متراکم و رسوب درمی‌آیند. البته شایان توجه است که پروتئین-

های کوچک هم که به سرعت به حالت طبیعی برمی‌گردند، تمایل دارند که در غلظت‌های بالای عوامل دگرگون‌کننده، رسوب و یا در واقع تجمع دهند (Pace, 1990a).

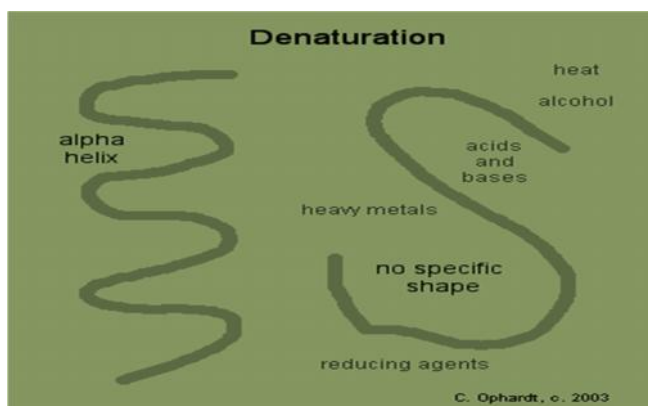


شکل ۱-۳: دگرگون شدن و تجمع پروتئین‌ها

## ۱-۷- دگرگون‌سازی و تخریب ساختار طبیعی پروتئین‌ها

دگرگون‌سازی هنگامی اتفاق می‌افتد که ساختار طبیعی دوم یا سوم و یا چهارم پروتئین تخریب شود که غالباً به واسطه تغییرات محیط فیزیکی یا شیمیایی رخ می‌دهد. رایج‌ترین عوامل دگرگون‌کننده عبارتند از: حرارت تا دماهای بالاتر از ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای اکثر پروتئین‌ها، حضور دگرگون‌کننده‌های شیمیایی مانند اوره یا گوانیدین هیدروکلراید، تغییر pH به حالت اسیدی یا بازی و فشار بالا (Powroznik et al., 2004).

از دست رفتن فعالیت همواره با دگرگون‌سازی ساختار همراه نیست، چراکه تغییرات آرایش فضایی کوچک هم می‌تواند بدون اختلال در ساختار تاخورده طبیعی پروتئین، منجر به از بین رفتن فعالیت پروتئین شود. بنابراین از دست رفتن یک پیوند هیدروژنی و یا الکتروستاتیک و یا آب‌گریز می‌تواند باعث ناپایداری ساختار تاخورده پروتئین شود (Devlin and Harwood, 2002).



شکل ۱-۴: دگرگون شدن ساختار پروتئین

## ۸-۱- روش‌های رایج دگرگون‌سازی پروتئین‌ها

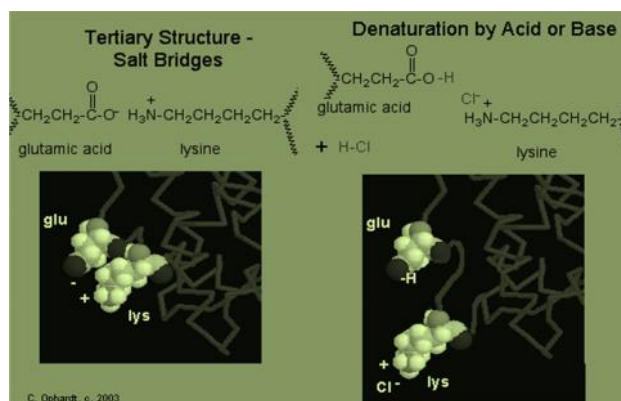
### ۸-۱-۱- حرارت

در دماهای بالا، اغلب پروتئین‌ها دگرگون می‌شوند. دماهای بالا بسته به پروتئین‌های تحت تأثیر منجر به شکسته شدن اتصالات دی‌سولفیدی و یا تعویض آن‌ها می‌شوند و یا اتصالات غیرکووالان تحت تأثیر قرار می‌گیرند. ساختمان طبیعی یک پروتئین کروی در محیط آبی نه تنها با افزایش دما از بین می‌رود، بلکه با کاهش دما یا در واقع دگرگون‌سازی سرمایی نیز تحت تأثیر قرار می‌گیرد (Hamada et al., 2009).

### ۸-۱-۲- اثر pH

از آن جایی که پروتئین‌ها دارای گروه‌های اسیدی یا بازی هستند، واجد یک بار خالص هستند که با افزایش خاصیت اسیدی یا بازی نسبت به pH ایزوالکتریک افزایش می‌یابد.

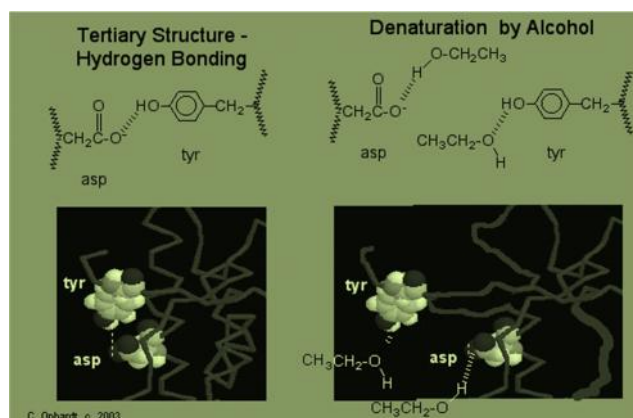
**نکته:** pH ایزوالکتریک یک پروتئین، pHی است که در آن، بار الکتریکی خالص برابر با صفر است، یا می‌توان گفت pHی که در آن ویژگی‌های اسیدی و بازی با هم در تعادل هستند (Branden and Tooze, 1991).



شکل ۱-۵: دگرگون‌سازی توسط اسید و باز

### ۸-۱-۳- دگرگون‌سازی توسط حلال‌های آلی

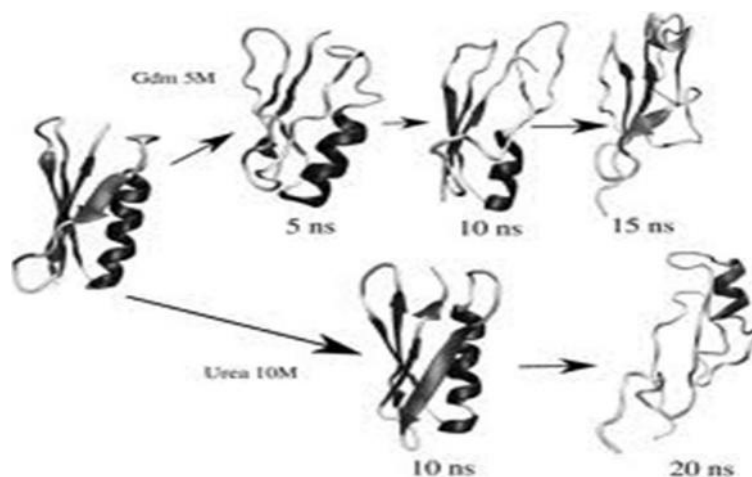
از آن جایی که ثابت دی‌الکتریک حلال‌های آلی با آب متفاوت است، بر میان‌کنش‌های الکتروستاتیک پروتئین‌ها اثر می‌گذارد. کاهش ثابت دی‌الکتریک و کاهش خاصیت قطبی حلال باعث افزایش دافعه الکتروستاتیک شده و کمک به باز شدن پروتئین‌ها می‌کند (Rubinstein and Sherman, 2004).



شکل ۱-۶: دگرگون سازی توسط حلال های آلی

### ۱-۸-۴- دگرگون سازی توسط برخی ترکیبات شیمیایی

از دگرگون کننده های قوی که بیش از سایر دگرگون کننده ها استفاده می شوند، می توان اوره و گوانیدین-هیدروکلراید را نام برد. این دو ترکیب، کمک می کنند که آب حلال بهتری برای آمینواسیدهای غیرقطبی باشد، زیرا این ترکیبات برهمکنش های آب گریز را تضعیف می کنند. ساختارهای اوره و گوانیدین هیدروکلراید نشان می دهند که این ترکیبات می توانند به عنوان دهنده یا گیرنده پروتون، در تشکیل اتصالات هیدروژنی با پروتئین نقش داشته باشند (Ahmad and McPhie, 1978).



شکل ۱-۷: دگرگون سازی توسط اوره و گوانیدین هیدروکلراید

### ۱-۸-۵- پاک کننده ها<sup>۱۱</sup>

در جنت ها یا به عبارتی پاک کننده ها مولکول های کوچک دوگانه دوست با جرم مولکولی تقریبی ۲۰۰ تا ۶۵۰ دالتون بوده که به خاطر وجود سر آب دوست و دم آب گریز خود در آب محلول می باشند. اتصال پاک کننده به

<sup>۱۱</sup> Detergents