

وزارت علوم، تحقیقات و فناوری

دانشگاه پیام نور

معاونت پژوهشی، مدیریت پژوهشی پیام نور استان چهارمحال و بختیاری

گزارش طرح تحقیقاتی

(مرحله نهایی)

موضوع طرح: مطالعات سینتیکی آنزیم لیزوزیم در حضور نانو ذره ZnO

مجری طرح: لیدا مومنی مربی گروه زیست شناسی دانشگاه پیام نور مرکز شهرکرد

همکار طرح: صادق فرهادیان دانشجوی دکتری بیوشیمی

بودجه طرح: ۲۸۴۰۰۰۰۰ ریال

تاریخ تصویب طرح: جلسه شورای پژوهشی: ۹۱/۱۱ زمان اجرا: ۱۲ ماه (شروع ۹۱/۱۱/۱ خاتمه ۹۲/۱۱/۱)

مراحل پیشرفت طرح:

- ۱- مرحله مطالعاتی: مطالعه کتاب ها و مقاله های مربوط به طرح
- ۲- مرحله اجرایی: تعیین چهارچوب طرح (تعداد فصول، موضوع فصول، روش آزمایشگاهی، تهیه داده ها)
- ۳- بررسی داده ها: دسته بندی داده ها و اطلاعات جمع آوری شده و تحریر فصول ۱ و ۲ و ۳
- ۴- تجزیه و تحلیل و تفسیر داده ها: نتیجه گیری از تجزیه و تحلیل داده ها و تحریر فصول ۴
- ۵- گزارش نهایی: تکمیل طرح و ارائه طرح نهایی به ناظر طرح

تشکر و قدردانی

سپاس بی کران پروردگار یکتا را که هستی مان بخشید و به طریق علم و دانش رهنمونمان شد و به همنشینی رهروان علم و دانش مفتخرمان نمود و خوشه چینی از علم و معرفت را روزیمان ساخت. در این راستا بر خود فرض می شمرم که از زحمات، تلاشها و پشتیبانی افرادی که در اجرای این طرح تحقیقاتی پژوهشی مرا یاری نمودند تقدیر و تشکر نمایم:

در ابتدا از جناب آقای دکتر شیخ الاسلامی ریاست محترم دانشگاه پیام نور و جناب آقای دکتر خسروی معاونت محترم دانشگاه بخاطر تشریک مساعی و فراهم نمودن زمینه تحقیق و پژوهش و حمایت های مادی-معنوی در اجرای این طرح سپاسگزاری می نمایم.

از جناب آقای دکتر مهدوی مدیر محترم پژوهشی دانشگاه که در تمامی مدت تحقیق و پژوهش این طرح از راهنمایی و مشاوره ایشان بهره مند شدم تقدیر و تشکر می نمایم.

همچنین از جناب آقای صادق فرهادیان که زحمت همکاری با این طرح پژوهشی به عهده ایشان بود و با صرف وقت زیاد و همت و تلاش ایشان طرح به پایان رسید کمال امتنان و سپاس را دارم.

در پایان از جناب آقای دکتر بهزاد شارق که زحمت بررسی این طرح پژوهشی به عهده ایشان بود و با صرف وقت زیاد و همت و تلاش ایشان طرح به پایان رسید کمال امتنان و سپاس را دارم.

لیدا مومنی

اسفند ۹۲

چکیده

جذب پروتئین بر روی سطوح غیر آلی ممکن است به تغییرات ساختاری و عملکردی که وابسته به ماهیت پروتئین جذب شده و خواص فیزیکوشیمیایی سطوح غیر آلی هستند منجر شود. شناسایی سطح پروتئین یک ابزار قدرتمند در فهم تعامل پروتئین- پروتئین ارائه می دهد که جنبه کلیدی بسیاری از عملکردهای پیچیده سلولی است. نانوذرات (NPS) به دلیل اندازه کوچک آنها، خواص متمایزی نسب به شکل توده همان مواد دارند در نتیجه ارائه دهنده بسیاری از پیشرفت های جدید در زمینه حسگرهای زیستی، تحقیقات زیست پزشکی و فناوری نانو زیستی هستند. جذب پروتئین در نانو ذرات و فرجام آن در ساختار و عملکرد به شدت وابسته به اندازه و شکل نانوذرات است. لیزوزیم سفیده تخم مرغ (وزن مولکولی ۱۴/۶ کیلو دالتون) یک پروتئین کوچک کروی متشکل از ۱۲۹ باقیمانده اسید آمینه با چهار پیوند دی سولفید است. اهمیت لیزوزیم متکی به استفاده از آن به عنوان یک سیستم مدل برای درک اصول اساسی ساختار پروتئین، عملکرد، دینامیک و تاشو از طریق مطالعات نظری و تجربی است. اثر نانو ذرات اکسید روی در لیزوزیم توسط UV-Vis اسپکتروفتومتری برای pH 7.25 در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد با استفاده از بافر فسفات سدیم مورد بررسی قرار گرفت. پایداری حرارتی از لیزوزیم در حضور نانو اکسید روی در محدوده درجه حرارت (۲۹۳ K - ۳۷۲) در بافر فسفات سدیم و pH 7.25 مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که پایداری حرارتی از لیزوزیم در حضور نانو ذرات اکسید روی کاهش یافته است.

کلمات کلیدی: لیزوزیم، نانو ذرات ZnO، اسپکتروفتومتری، پایداری و پروتئین.

تشکر و قدردانی	۲
چکیده	۳
تعریف مسأله	۹
فرضیه ها	۹
اهداف	۹
روش تحقیق	۱۰

فصل اول-مقدمه ۱۲

۱-۱- پروتئین ها:	۱۱
۱-۱-۱- اسیدهای آمینه:	۱۲
۱-۱-۲- انواع پروتئین:	۱۲
۱-۲-۱- پروتئین های فیبری:	۱۲
۱-۲-۲- پروتئین های کروی:	۱۲
۱-۲-۳- پروتئین های تک واحدی:	۱۲
۱-۲-۴- پروتئین های اولیگومریک:	۱۳
۱-۳-۱- ساختار پروتئین ها:	۱۳
۱-۳-۱-۱- ساختار اول:	۱۳
۱-۳-۱-۲- ساختار دوم:	۱۴
۱-۳-۱-۳- ساختار سوم:	۱۵
۱-۳-۱-۴- ساختار چهارم:	۱۶
۱-۴-۱- عوامل متعددی ساختارهای نوع سوم و چهارم را پایداری می کنند:	۱۶
۱-۵- نیروهای غیرکوالان منجر به تاخوردن پروتئین شده و در پایداری پروتئین ها شرکت می کنند:	۱۷
۱-۶-۱- خواص پروتئین ها:	۱۷
۱-۶-۱-۱- حلالیت پروتئین ها:	۱۷
۱-۶-۱-۲- تعیین pH ایزوالکتریک:	۱۸
۱-۲- آنزیم ها:	۱۸

۱۹	۱-۲-۱- آنزیم‌ها به عنوان کاهنده انرژی فعال سازی:.....
۲۰	۲-۲-۱- طبقه بندی آنزیم‌ها:
۲۱	۳-۲-۱- فعالیت آنزیم‌ها:
۲۱	۱-۳-۲-۱- چند اصطلاح در مورد فعالیت آنزیم‌ها:
۲۱	۲-۳-۲-۱- جایگاه فعال آنزیم:
۲۲	۳-۳-۲-۱- شیمی فضایی جایگاه فعال آنزیم:
۲۲	۴-۳-۲-۱- حالت گذار:
۲۳	۵-۳-۲-۱- اتصال محکم در حالت گذار:.....
۲۳	۵-۳-۲-۱- فعالیت آنزیمی تحت تأثیر pH قرار می گیرد:.....
۲۳	۶-۳-۲-۱- سنجش فعالیت آنزیم:
۲۳	۳-۱- سینتیک واکنش های آنزیمی:
۲۴	۱-۳-۱- غلظت سوپسترا بر روی سرعت واکنش آنزیمی اثر دارد:
۲۵	۲-۳-۱- سینتیک واکنش های آنزیمی تک سوپسترای:
۲۵	۱-۲-۳-۱- معادله میکائلیس-منتن:
۲۶	۲-۲-۳-۱- تغییرات بریگس-هالدن در معادله میکائلیس-منتن:
۲۷	۳-۲-۳-۱- پارامترهای کلیدی معادله میکائلیس-منتن:
۲۸	۴-۲-۳-۱- اهمیت ثابت میکائلیس (K_m):
۲۹	۳-۳-۱- روش های مختلف ترسیم داده های سینتیکی
۳۰	۱-۳-۳-۱- معادله لینویر-برک:
۳۰	۲-۳-۳-۱- معادله ادی- هافستی:
۳۱	۳-۳-۳-۱- معادله هانز-ولف:
۳۱	۴-۳-۱- مهار آنزیمی:
۳۳	۴-۱- طیف سنجی:
۳۴	۱-۴-۱- کروموفور:
۳۴	۲-۴-۱- دستگاه اندازه گیری جذب نور مرئی و ماوراء بنفش:
۳۴	۳-۴-۱- کاربردهای مهم طیف سنجی جذبی:
۳۴	۴-۴-۱- روش های طیف سنجی برای ارزیابی ساختار و عملکرد پروتئین استفاده می شوند:

۳۵	۱-۵- لیزوزیم:
۳۸	۱-۶- تصاویر سه بعدی از ساختار لیزوزیم:
۴۲	۱-۷- ساختمان لیزوزیم:
۴۶	۱-۸- انواع لیزوزیم:
۴۷	۱-۹- لیزوزیم به عنوان یک درمان احتمالی HIV:
۴۷	۱-۱۰- کریستاله کردن لیزوزیم های موجود در سفیده تخم مرغ
۴۸	۱-۱۱- مکانیسم لیزوزیم
۵۲	۱-۱۲- فناوری نانو:
۵۴	۱-۱۳- نانو تکنولوژی چیست؟
۵۵	۱-۱۴- روش های ساخت عناصر پایه
۵۵	۱-۱۵- کاربردهای فناوری نانو:
۵۶	۱-۱۶- تجهیزات:
۵۷	۱-۱۷- ترکیبات افزایش دهنده آبدوستی:

فصل دوم- مواد و روش ها ۵۸

مواد مورد نیاز: ۵۹

۵۸	تهیه محلول های مورد نیاز:
۵۸	۲-۱- تهیه بافر (تامپون) فسفات سدیم (Na_2HPO_4):
۵۸	۲-۲- تهیه محلول های نانو ذرات ZnO
۵۹	۲-۳- تهیه آنزیم لیزوزیم
۵۹	۲-۴- مطالعه پایداری حرارتی لیزوزیم در دامنه $^{\circ}\text{C}$ ۲۰-۹۰
۵۹	۲-۵- مطالعه پایداری حرارتی لیزوزیم در حضور نانو ذره ZnO و دامنه حرارتی $^{\circ}\text{C}$ ۲۰-۹۰
۵۹	۲-۶- مطالعه سینتیکی لیزوزیم در حضور نانو ذره ZnO و دامنه حرارتی $^{\circ}\text{C}$ ۳۵

فصل سوم- نتایج ۶۰

۶۰	۳-۱- واکنش لیزوزیم با نانو ذره ZnO
۶۱	۳-۲- اثر نانو ذره ZnO بر پایداری حرارتی لیزوزیم

۳-۳- بررسی نتایج مطالعه سینتیک آنزیم لیزوزیم در حضور نانو ذره ZnO در دمای 35°C ۶۳

فصل چهارم- بحث و نتیجه گیری ۶۵

منابع ۶۷

فهرست اشکال و جداول

شکل ۱-۱: پیوند پتیدی	۱۴
شکل ۲-۱: تشکیل پیوند پتیدی با روش تغلیظ	۱۴
جدول ۱-۱: طبقه بندی بین المللی آنزیمها	۲۰
شکل ۳-۱: اثر غلظت سوبسترا بر روی سرعت اولیه یک واکنش آنزیمی	۲۴
شکل ۴-۱: منحنی V_0 علیه S_0 در غلظت ثابت آنزیم در واکنش تک سوبسترای	۲۷
شکل ۵-۱: نمودار لینویر- برک	۳۰
شکل ۶-۱: مهار رقابتی	۳۲
شکل ۷-۱: مهار نارقابتی	۳۳
شکل ۸-۱: مهار غیر رقابتی	۳۳
شکل ۹-۱: ساختارهای سه بعدی لیزوزیم	۳۹
شکل ۱۰-۱: توزیع نیروی الکتروستاتیک در ساختمان لیزوزیم	۳۹
شکل ۱۱-۱: ساختار کریستال لیزوزیم	۴۰
شکل ۱۲-۱: توالی اسید آمینه ها در ساختار لیزوزیم	۴۱
جدول ۲-۱: خصوصیات تک تک اسید آمینه های لیزوزیم:	۴۲
جدول ۳-۱: مناطق هلیکس و شیت آنزیم لیزوزیم	۴۵
شکل ۱۳-۱: مکانیسم عمل لیزوزیم:	۴۹
شکل ۱۴-۱: مکانیسم شیمیایی لیزوزیم:	۵۰
شکل ۱۵-۱: جایگاه فعال لیزوزیم	۵۲

- جدول ۴-۱ ابزارها و تجهیزات مورد استفاده در فناوری نانو ۵۷
- شکل ۱-۳: تغییرات جذب ۲۸۰ نانومتر در مقابل غلظت های مختلف نانو ذره ZnO در دماهای مختلف ۶۱
- شکل ۲-۳: تغییرات انرژی آزاد گیبس لیزوزیم در مقابل دما در غلظت های مختلف نانو ذرات ZnO ۶۲
- جدول ۱-۳: تغییرات پارامتر Tm در غلظت های مختلف نانو ذره ZnO در pH 7 ۶۳
- جدول ۲-۳: تغییرات Vmax آنزیم لیزوزیم در حضور غلظت های مختلف نانو ذره ZnO در دماهای ۳۵°C و pH 7 ۶۳
- شکل ۳-۳: نمودار لینویر-برک برای آنزیم لیزوزیم در حضور غلظت های مختلف نانو ذره ZnO در دمای ۳۵°C ۶۴

تعریف مسأله

لیزوزیم *endoacetylmuramidase* (EC:3.2.1.17) برجسته ترین عضو از کلاس خیلی بزرگ گلیکوزیدازها یا گایکوهیدرولازها است که در یک دامنه وسیعی از موجودات یافت می شوند، این آنزیم شکسته شدن گروه گزیکوزیل را کاتالیز می کند. لیزوزیم در *in vivo* هیدرولیز پلی ساکارید تشکیل دهنده دیواره سلولی باکتری های گرم مثبت از قبیل استرپتوکوکوس و استافیلوکوکوس را کاتالیز می کند. لیزوزیم آنزیمی است که در همه جا وجود دارد. بر طبق استانداردهای غذایی FAO/WHO لیزوزیم بعنوان نگهدارنده در تولیدات شربت های سیب، گلابی، انگور و پنیر بکار می رود، همچنین مطالعات گسترده ای روی الحاق این ماده به مواد پکیج های غذاهای صنعتی و طبیعی غیر استریل برای جلوگیری از رشد و آلودگی میکروارگانیسم ها شده است که این به خاطر خصوصیت مهم این آنزیم که شامل مقاومت گرمایی در یک دامنه گسترده ای از دماها تقریباً تا نزدیک ۱۰۰ درجه سانتی گراد است. با توجه به اهمیت این آنزیم در صنایع غذایی و دارویی ما در این تحقیق به مطالعات ساختمانی پایداری آنزیم لیزوزیم در حضور حرارت و نانوذره ZnO خواهیم پرداخت.

فرضیه ها و سوال های مطرح شده:

- ۱- آیا حرارت های بالا آنزیم لیزوزیم را از کار می اندازد؟
- ۲- نانو ذره ZnO که در بسیاری از مواد بهداشتی آرایشی و غذایی بکار برده می شود چه تأثیری بر این آنزیم با ارزش دارد؟

اهداف طرح:

- ۱- بررسی اثر حرارت بر پایداری آنزیم لیزوزیم
- ۲- بررسی اثر حرارت بر فعالیت آنزیم لیزوزیم

۳- بررسی اثر نانو ذره ZnO بر پایداری آنزیم لیزوزیم

۴- بررسی اثر نانو ذره ZnO بر فعالیت آنزیم لیزوزیم

روش تحقیق

۱. مطالعات دگرگون سازی آنزیم لیزوزیم با استفاده از نانو ذره ZnO در ابعاد مختلف
۲. بررسی اثر نانو ذره ZnO بر پایداری ساختمانی آنزیم لیزوزیم با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV/Vis مدل فارماسیا ۴۰۰۰، نمونه آنزیمی با غلظت ۰/۱ میلی گرم در میلی لیتر، در حضور نانو ذره ZnO مورد مطالعه قرار خواهد گرفت. محلول استوک نانو ذره ZnO با غلظت ۰/۰۵ میلی گرم در میلی لیتر در pH 7 تهیه می شود و محلول نانو ذره در این pH در چندین غلظت مورد استفاده قرار خواهد گرفت.
۳. بررسی اثر نانو ذره ZnO بر فعالیت آنزیم لیزوزیم با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV/Vis مدل فارماسیا ۴۰۰۰، نمونه آنزیمی با غلظت ۰/۱ میلی گرم در میلی لیتر، در حضور نانو ذره ZnO و با استفاده از سوبسترای *Micrococcus lysodeikticus* مورد مطالعه قرار خواهد گرفت.

فصل اول

مقدمه

۱-۱- پروتئین‌ها:

پروتئین‌ها ترکیبات بیوشیمیایی متشکل از یک یا چند پلی‌پپتید هستند که به طور معمول به یک فرم کروی یا رشته‌ای تا شده و یک عملکرد زیستی را تسهیل می‌کنند. هر پلی‌پپتید یک زنجیره خطی از اسیدآمینه‌هاست که توسط باندهای پپتیدی بین گروه‌های کربوکسیل و آمینوی، اسیدآمینه‌های مجاور، به هم متصل شده‌اند. یک پروتئین به طور معمول دارای ۲۰۰-۳۰۰ اسیدآمینه است اما بعضی بسیار کوچک‌تر و برخی بسیار بزرگ‌ترند. (Levitt and chothia, 1976). تنوع پروتئین‌ها از لحاظ اندازه، شکل و فعالیت با وجود تشکیل شدن از تنها ۲۰ واحد متفاوت اسیدآمینه در کل ارگانیسم‌ها قابل توجه است. پروتئین‌ها ابزارهای مولکولی برای بیان اطلاعات ژنتیکی می‌باشند (Lodish, et al. 2000). سلول‌ها می‌توانند با اتصال همین ۲۰ اسیدآمینه با ترکیبات و توالی‌های بسیار متنوع، پروتئین‌ها را تولید نمایند که ویژگی‌ها و فعالیت‌های فوق العاده متنوعی دارند. موجودات مختلف می‌توانند با استفاده از این بلوک‌های ساختمانی محصولات بسیار متفاوتی نظیر آنزیم‌ها، هورمون‌ها، آنتی‌بادی‌ها، انتقال‌دهنده‌ها، عضله، پروتئین عدسی چشم، پر، تار عنکبوت شاخ کرگدن، پروتئین‌های شیر، آنتی بیوتیک‌ها،

سموم قارچی و تعداد زیادی از موارد دیگر با فعالیت بیولوژیک متفاوت، ایجاد نمایند که از میان این محصولات، آنزیم‌ها تنوع بیش‌تری داشته و اختصاصی‌تر می‌باشند. در واقع تمامی واکنش‌های سلولی توسط آنزیم‌ها کاتالیز می‌شوند (Lehninger, 2005).

۱-۱-۱- اسیدهای آمینه:

تمامی ۲۰ نوع اسید آمینه یافت شده در پروتئین‌ها، α -آمینواسید می‌باشند. این مولکول‌ها دارای یک گروه کربوکسیل و یک گروه آمینو متصل به یک اتم کربن (کربن α) می‌باشند. تفاوت اصلی آن‌ها در زنجیره جانبی یا گروه R آن‌ها می‌باشد که از نظر ساختار، اندازه و بار الکتریکی در اسیدهای آمینه گوناگون متفاوت بوده و بر حلالیت اسید آمینه در آب تأثیر گذار است. ۲۰ اسید آمینه موجود در ساختار پروتئین‌ها را اغلب با عنوان اسید- آمینه استاندارد یاد می‌کنند. اسیدهای آمینه شرکت کننده در ساختار پروتئین‌ها به فرم انانتیومر L خود هستند و تنها در معدودی پپتیدهای کوتاه، از جمله پپتیدهای دیواره سلولی باکتری‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های پپتیدی خاص رزیدوهای D-آمینواسید دیده شده‌است (Lodish, et al. 2000).

۱-۲-۱- انواع پروتئین:

۱-۲-۱-۱- پروتئین‌های فیبری:

این دسته از پروتئین‌ها، در آب حلالیت کمی داشته و برخی از آنها غیر محلول می‌باشند به طوری‌که قادرند نقش ساختاری ایفا کنند. از این گروه می‌توان به آلفا-کراتین و کلاژن اشاره نمود.

۱-۲-۱-۲- پروتئین‌های کروی:

این دسته از پروتئین‌ها در آب محلول بوده و امکان دارد که از محلول، کریستاله شوند و نقش عملکردی در ارگانیسم‌های زنده دارند. آنزیم‌ها، در این گروه جای دارند. همه پروتئین‌ها از واحدهای L-آمینواسید، تشکیل می‌گردند که توسط پیوندهای پپتیدی به یکدیگر متصل می‌شوند. توالی آمینواسیدی در پروتئین‌ها، ویژه است که با ساختار مواد ژنتیکی سلول تعیین می‌شود و در نتیجه هر پروتئین، خصوصیات مشخصی دارد.

۱-۲-۳- پروتئین‌های تک واحدی:

پروتئین‌هایی هستند که فقط واجد یک زنجیر پلی‌پپتیدی بوده و بنابراین به واحدهای کوچک‌تری تجزیه نمی‌گردند. تعداد کمی از آنزیم‌های منومریک شناخته شده‌اند 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.

۱-۲-۴- پروتئین‌های اولیگومریک:

این دسته از پروتئین‌ها از دو یا بیش از دو زنجیر پلی‌پپتیدی تشکیل می‌گردند و معمولاً از طریق برهمکنش‌های غیرکووالان به یکدیگر متصل می‌شوند. زنجیره‌های پلی‌پپتیدی 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 نمی‌شوند بلکه فعالیتشان از طریق مهار شدن فیدبک کنترل می‌گردد. به عنوان مثال تمام آنزیم‌های درگیر در فرایند گلیکولیز دو یا چهار زیر واحدی هستند (Tymoczko et al., 2011).

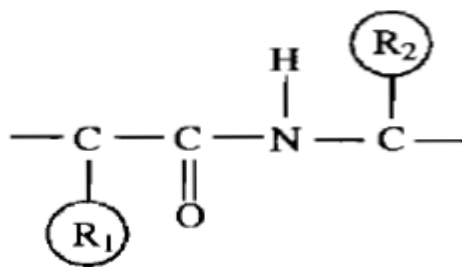
۱-۳-۱- ساختار پروتئین‌ها:

اغلب پروتئین‌ها دارای چهار ساختار می‌باشند: ساختار اول پروتئین توسط توالی آمینواسیدها در هر زنجیره پلی‌پپتیدی، تشکیل می‌گردد که می‌توان این ساختار را از طریق استفاده سیستماتیک از فرایندهای شیمیایی تعیین نمود. خصوصیات ساختمانی منظم و تکرار شونده ساختار دوم را تشکیل می‌دهد. این ساختار به فراوانی در فیبرها و پروتئین‌های ساختاری دیده می‌شود و در بخش‌هایی از پروتئین‌های عملکردی مثل آنزیم‌ها، از بین می‌رود. همه ساختارهای سه بعدی زنجیر پلی‌پپتیدی ساختار سوم، نامیده می‌شوند. پروتئین‌ها ممکن است شامل یک یا تعداد بیشتری از زنجیره‌های پلی‌پپتیدی باشند. ساختار چهارم، مربوط به پروتئین‌هایی است که بیش‌تر از یک زنجیره پلی‌پپتیدی دارند.

۱-۳-۱-۱- ساختار اول:

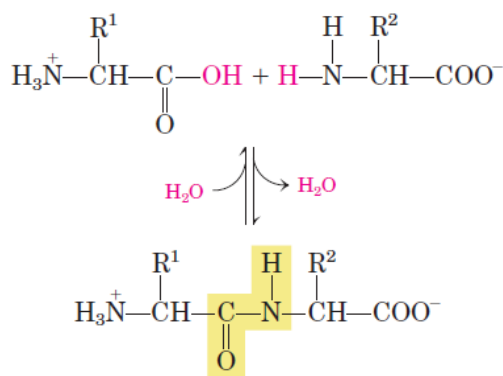
آرایش فضایی اتم‌های موجود در یک پروتئین را صورت‌بندی^۱ می‌گویند. توالی آمینواسیدهای موجود در یک زنجیره پلی‌پپتیدی، ساختار اول پروتئین نام دارد. با استفاده از ساختار اول، نه‌تنها شکل نهایی پروتئین ایجاد می‌شود بلکه ویژگی‌های فیزیکی و در نهایت عملکرد بیولوژیکی پروتئین تشخیص داده می‌شود. در واقع پروتئین‌ها از حدود ۲۰ آمینواسید تشکیل شده‌اند که با استفاده از پیوند آمیدی یا پپتیدی به هم متصل می‌شوند (شکل ۱-۱).

^۱.conformation



شکل ۱-۱: پیوند پپتیدی

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



شکل ۱-۲: تشکیل پیوند پپتیدی با روش تغلیظ

هرچند هیدرولیز یک پیوند پپتیدی، یک واکنش انرژی‌زا است، به‌خاطر انرژی فعال‌سازی بالای آن، به آهستگی صورت می‌گیرد، لذا پیوندهای پپتیدی موجود در پروتئین‌ها کاملاً پایدارند (Dougherty 2000; Mayo 2000).

۱-۳-۲- ساختار دوم:

شکل سه بعدی یک زنجیره پلی‌پپتیدی را ساختار دوم گویند. ساختار دوم شامل چند نوع می‌باشد:

۱) **مارپیچ آلفا:** مارپیچ آلفایکی از ساختمان‌های دوم معمول پروتئینی است. این ساختار با استفاده از پیوندهای هیدروژنی درون‌زنجیره‌ای که بین هیدروژن آمیدیک 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 به‌صورت صفحه سازمان‌دهی می‌شوند. در این صورت‌بندی، اسکلت پلی‌پپتیدی به شکل یک ساختمان زیگزاگی، به‌جای مارپیچی، امتداد یافته، وجود دارد. این زنجیره‌های زیگزاگی می‌توانند به‌طور پهلوی به پهلوی 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 ناهم‌سود (بترتیب دارای جهت‌های آمینو به کربوکسیل یکسان و مخالف) باشند. این ساختمان‌ها قدری مشابه هستند، هرچند صورت‌بندی موازی همسو، دوره تکراری کوتاه‌تر ($6/5 \text{ \AA}$)، در مقابل $7 \text{ \AA}$ برای موازی ناهم‌سو) و الگوی متفاوت پیوندهای هیدروژنی را دارند (Berman 1999; Ponting and Russell 2002).

۳) **ترن‌ها:** این ساختارهای ثانویه U- شکل و فشرده، از ۳ یا ۴ رزیدو تشکیل شده که پایداری آن‌ها به علت وجود پیوند هیدروژنی میان رزیدوهای دو انتهای آن‌هاست. ترن‌ها بر سطح پروتئین‌ها قرار می‌گیرند و با ایجاد خم تند، جهت زنجیر پلی‌پپتیدی را به سمت درون آن تغییر می‌دهند. اسیدآمینه‌های گلیسین و پرولین بیش‌تر در این ساختار دیده شده‌اند، زیرا عدم وجود زنجیره جانبی بزرگ در گلیسین و وجود خمیدگی ذاتی در پرولین این دو اسیدآمینه را برای اشغال رزیدوهای دوم و سوم در ترن‌ها مناسب گردانیده است. هم‌چنین، یک پلی‌پپتید، می‌تواند خم‌های بلندتری به نام حلقه^۳ تشکیل دهد که نسبت به ترن‌ها راحت‌تر و با محدودیت کم‌تری تشکیل می‌شوند (Lodish, et al. 2000).

۱-۱-۳-۳- ساختار سوم:

آرایش سه بعدی کلی تمامی اتم‌های موجود در یک پروتئین را ساختمان سوم پروتئین گویند. پروتئین‌های کروی به خاطر این‌که تاخوردگی^۴ داخلی (ساختار سوم)، کروی دارد، به این اسم نام‌گذاری شده‌اند. این

^۲.turn

^۳.loop

^۴.Folding

پروتئین‌های کروی محلول در آب هستند، محلول‌های کلوئیدی تشکیل می‌دهند و در شکل جامد، 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 در حالی که آمینواسیدهای قطبی در قسمت خارجی پروتئین قرار دارند. وجود پیوندهای دی‌سولفیدی در ساختار پروتئین، که از طریق اکسیداسیون دو آمینواسید سیستئین ایجاد می‌شوند، باعث پایداری بیشتر زنجیره پلی‌پپتید تاخورد می‌شود (Ringia, Garrett et al. 2004).

۱-۳-۴- ساختار چهارم:

بسیاری از پروتئین‌های کروی، از زیرواحدهای متعددی ساخته شده‌اند که ساختار چهارم، مربوط به این نوع از پروتئین‌ها است. به یک پروتئین چند زیرواحدی، مولتیمِر نیز گفته می‌شود. پروتئین‌های مولتیمری می‌توانند از دو تا صدها زیرواحد تشکیل شده باشند (Daggett and Fersht 2003).

۱-۴- عوامل متعددی ساختارهای نوع سوم و چهارم را پایداری می‌کنند:

ترتیب‌های رده بالاتر ساختار پروتئینی به طور عمده توسط برهم‌کنش‌های غیرکوالانسی پایداری می‌شوند. مهم‌ترین آن‌ها برهم‌کنش‌های آب‌گریز هستند که زنجیره‌های جانبی آمینواسیدی را که دارای بیش‌ترین خاصیت آب‌گریزی هستند به درون قسمت داخلی پروتئین می‌رانند بدین ترتیب آن‌ها را از آب دور می‌کنند. سایر برهم‌کنش‌هایی که به ساختار پروتئینی پایداری می‌بخشند شامل پیوندهای هیدروژنی و پل‌های نمکی بین کربوکسیلات‌های مربوط به اسیدآسپارتیک و گلوتامیک و زنجیره‌های جانبی با بار مخالف، مربوط به رزیدوهای پروتونه لیزیل، آرژینیل و هیستیدیل می‌باشند. هر چند این برهم‌کنش‌ها به خودی خود نسبت به یک پیوند کوالانسی با قدرت $80-120 \text{ Kcal/mol}$ ، ضعیف هستند ولی در مجموع به علت تعداد زیاد، درجه بالایی از پایداری به آرایش فضایی پروتئینی فعال از نظر زیست‌شناختی اعطا می‌کنند (Dill K. A. et al., 1995).

برخی پروتئین‌ها حاوی پیوندهای دی‌سولفیدی کوالانسی هستند که گروه‌های سولفیدریل مربوط به رزیدوهای سیستئین را به هم متصل می‌کنند. تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی مستلزم اکسیداسیون گروه‌های سولفیدریل مربوط به سیستئین بوده و نیازمند اکسیژن است. پیوندهای دی‌سولفیدی درون پلی‌پپتیدی باعث پایداری بیش‌تر آرایش فضایی خمیده مربوط به یک پپتید می‌شود، در حالی که پیوندهای دی‌سولفیدی بین پلی‌پپتیدی ساختار نوع چهارم پروتئین‌های اولیگومریک خاص را پایداری می‌کنند (Dill K. A. et al., 1995).

۱-۱-۵- نیروهای غیرکووالان منجر به تاخوردن پروتئین شده و در پایداری پروتئین‌ها شرکت

می‌کنند:

نیروهای غیرکووالان باعث می‌شوند که یک پلی‌پپتید، تاخورده و آرایش طبیعی ویژه خود را به دست آورده و سپس ساختار طبیعی در برابر دگرگون شدن پایدار می‌شود. نیروهای غیرکووالان، نیروهای اتصالی ضعیفی با قدرت $1-7 \text{ Kcal mol}^{-1}$ ($4-29 \text{ KJ mol}^{-1}$) هستند. این نیروها ممکن است با قدرت اتصال پیوند کووالان مقایسه شوند، که حداقل قدرت پیوندی آن معادل 50 Kcal mol^{-1} است. اگرچه این نیروها به تنهایی خیلی ضعیف هستند تعداد زیادی از نیروهای غیرکووالان، انرژی زیادی برای تاخوردن پروتئین فراهم می‌کنند (Devlin, 2011).

۱-۱-۶- خواص پروتئین‌ها:

۱-۶-۱-۱- حلالیت پروتئین‌ها:

حلالیت پروتئین‌ها بر حسب نوع مولکول مورد نظر خیلی متغیر است و از طرف دیگر، غلظت الکترولیت‌ها و تأثیر pH دو شاخص اصلی بشمار می‌روند (Branden C. and Tooze J, 1991).

تأثیر pH

در حالت کلی حلالیت پروتئین در pH ایزوالکتریک به حداقل خود می‌رسد (Branden C. and Tooze J, 1991). در pHهای بسیار بالا، ساختار سوم از بین می‌رود و یک ساختار بی‌نظم‌تر تشکیل می‌شود به این فرآیند، دناتوراسیون^۵ می‌گویند. از آنجایی که ساختار سوم یک پروتئین حلقوی فعال، توسط گروه‌های هیدروفوبیکی که درون مولکول قرار گرفته‌اند مشخص می‌شود، با از بین رفتن ساختار سوم، این گروه‌های هیدروفوب در تماس با حلال آلی قرار می‌گیرند (به سطح می‌آیند) و در نتیجه حلالیت پروتئین کاهش می‌یابد (Palmer 2001).

تأثیر نیروی یونی

پروتئین‌ها فقط در یک نیروی یونی مشخصی محلول هستند. در این زمینه نمک‌ها از نظر میزان بار و غلظت نقش مهمی دارند. معادله نیروی یونی به شرح زیر است:

⁵.Denaturation

$$\mu = 1/2 \sum C \times Z^2$$

C : غلظت هر یک از یون‌ها بر حسب مولاریته

Z : ظرفیت هر یک از یون‌ها

تأثیر دما

افزایش دما عاملی است که باعث تغییر ماهیت پروتئین‌ها گشته و در اکثر مواقع موجب رسوب کردن آن‌ها می‌شود. در آنزیم‌ها 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).

تأثیر حلال آلی

پروتئین‌ها در حلال آلی حل نمی‌شوند و از این خاصیت در جدا کردن آن‌ها استفاده می‌شود. برخی از پروتئین‌ها در درصدهای بالای حلال آلی به صورت محلول باقی می‌مانند (Mattos C. and Ringe D, 2001).

۱-۶-۲- تعیین pH ایزوالکتریک:

اگر پروتئین‌ها را در محلول تامپون‌دار و در یک میدان الکتریکی مداوم قرار دهیم بر حسب بار خود به طرف آند یا کاتد حرکت می‌کنند ولی در نقطه ایزوالکتریک خود هیچ حرکتی ندارند. نقطه ایزوالکتریک را به‌طور تجربی به وسیله الکتروفورز یا الکتروفوکالیزاسیون تعیین می‌نمایند (Branden C. and Tooze J, 1991).

pH ایزوالکتریک یک پروتئین، pH ای است که در آن بار الکتریکی خالص برابر با صفر است، یا می‌توان گفت pH ای که در آن ویژگی‌های اسیدی و بازی با هم در تعادل‌اند.

۱-۲- آنزیم‌ها:

آنزیم‌ها پروتئین‌های تخصص‌یافته‌ای هستند که واکنش‌های زیستی را کاتالیز می‌کنند. تقریباً هر واکنشی که در سلول اتفاق می‌افتد نیاز به فعالیت یک آنزیم دارد زیرا اکثر واکنش‌ها نمی‌توانند تحت شرایط فیزیولوژیک سلول (نظیر pH، دما و محیط یونی) رخ دهند. آنزیم‌ها کاتالیزورهای کارایی هستند. آن‌ها نه تنها سرعت تبدیل سوبسترا به محصول را افزایش می‌دهند، بلکه یک ساختار اختصاصی را در حضور ساختارهای مشابه برای تولید یک محصول خاص تشخیص می‌دهند. کاتالیزورها از طریق کاهش انرژی فعال سازی، سرعت واکنش-های شیمیایی ممکن را افزایش می‌دهند. در حقیقت علت این که آنزیم‌ها در شرایطی که کاتالیزورهای غیرزیستی

در عمل بی تأثیراند به خوبی نقش خود را ایفا می‌کنند، این است که از طرفی سرعت واکنش‌های شیمیایی را به شدت افزایش می‌دهند و از طرفی بسیار اختصاصی عمل می‌کنند. سرعت یک واکنش در حضور آنزیم به طور معمول، 10^6 تا 10^{12} برابر سرعت آن در حضور کاتالیزور و در شرایط طبیعی می‌باشد. اکثر آنزیم‌ها درون سلول‌ها قرار دارند، اما برخی نیز ترشح شده و در خون، فضای درون لوله گوارشی، یا فضاهای خارج سلولی دیگر عمل می‌کنند. برخی آنزیم‌های میکروبی نیز از سلول ترشح شده و در خارج از سلول فعال‌اند (Lodish, et al. 2000).

بعضی از آنزیم‌ها برای فعالیت، علاوه بر ریشه‌های آمینواسید خود نیاز به گروه‌های شیمیایی دیگری ندارند. درحالی‌که سایر آنزیم‌ها نیاز به جزء شیمیایی دیگری بنام کوفاکتور دارند که ممکن است یک یا چند یون معدنی نظیر Fe^{2+} ، Mg^{2+} ، Mn^{2+} و Zn^{2+} یا یک مولکول آلی یا فلزی-آلی پیچیده بنام کوآنزیم باشد. برخی آنزیم‌ها برای فعالیت هم به کوآنزیم و هم به یک یا چند یون فلزی نیاز دارند. یک کوآنزیم و یا یون فلزی که به‌طور محکم و یا حتی کووالان به پروتئین آنزیم متصل شده است را گروه پروستتیک گویند. یک آنزیم دارای فعالیت کاتالیتیک به همراه کوآنزیم و یا یون‌های فلزی متصل به آن را هولوآنزیم گویند. قسمت پروتئینی چنین آنزیمی را آپوآنزیم یا آپوپروتئین می‌نامند. پروتئین و کوفاکتور هر دو ممکن است بطور مستقیم در فرآیندهای کاتالیتیکی درگیر باشند (Palmer 2001).

۱-۲-۱- آنزیم‌ها به عنوان کاهنده انرژی فعال سازی:

قبل از این که یک مولکول واکنش دهنده (سوبسترا یا S)، بتواند به یک مولکول محصول (P) تبدیل شود بایستی از یک حداقل انرژی معین به انرژی بالاتر حالت واسطه‌ای "(S-P)" صعود کند. تفاوت انرژی واکنش-دهنده‌ها و حالت واسطه را انرژی فعال‌سازی یا E_a می‌گویند. در حالت واسطه که نیمه راه واکنش است، پیوندهای S به اندازه کافی منحرف می‌شوند تا تبدیل آن‌ها به P امکان‌پذیر شود. سرعت واکنش تبدیل سوبسترا به محصول ($S \rightarrow P$) بستگی به مولکول‌های S دارد که در واحد زمان به حالت واسطه می‌رسند. دو راه برای افزایش سرعت وجود دارد: (۱) افزایش دما، (۲) کاهش انرژی فعال سازی. سلول‌های زنده به طور معمول در دماهای پائین قرار دارند. در دماهای حیات تعداد واکنش‌های متابولیسمی که بدون دخالت آنزیم‌ها، دارای سرعت کافی برای بقا و رشد سلولی باشند، کم است. در درون سلول‌های زنده، واکنش‌های شیمیایی حیات، در حضور آنزیم‌ها به عنوان کاهنده انرژی فعال سازی انجام می‌گیرند. آنزیم‌ها اثری بر روی ΔG یا K_{eq} (ثابت تعادل) واکنش ندارند. آن‌ها سرعت واکنش را در رسیدن به حالت تعادل زیاد می‌کنند. آنزیم‌ها نه تنها سرعت واکنش را زیاد می‌کنند، بلکه آن‌ها را در جهت محصول دهی جفت می‌کنند (Boyer P. D. and Krebs E. G. 1986).

۱-۲-۲- طبقه بندی آنزیم‌ها:

بسیاری از آنزیم‌ها با افزودن پسوند "-از" به نام سوبسترا خود یا کلمه یا عبارتی که فعالیت آن‌ها را نشان می‌دهد، نام گذاری می‌گردند. گاهی یک آنزیم دارای دو یا چند نام بوده و یا دو آنزیم مختلف نام یکسانی دارند. به خاطر این ابهامات و تعداد بالای آنزیم‌های تازه کشف شده، از یک سیستم بین المللی برای نام گذاری و طبقه بندی آنزیم‌ها استفاده می‌گردد. در این سیستم، آنزیم‌ها به شش کلاس اصلی تقسیم می‌شوند که هر کدام بر اساس نوع واکنشی که انجام می‌دهند دارای زیر کلاس‌هایی هستند. (جدول ۱-۱) هر کدام از این آنزیم‌ها توسط چهار عدد مربوط به طبقه بندی و یک نام سیستماتیک مشخص کننده نوع واکنش کاتالیز شونده، مشخص می‌گردند (Lehninger, 2005).

جدول ۱-۱: طبقه بندی بین المللی آنزیم‌ها

عدد	کلاس	نوع واکنش کاتالیزی
۱	اکسیدوردوکتازها	انتقال الکترون‌ها (یون‌های هیدرید یا اتم‌های H)
۲	ترانسفرازها	واکنش‌های انتقال گروه
۳	هیدرولازها	واکنش‌های هیدرولیز (انتقال گروه‌های عامل به آب)
۴	لیازها	افزودن گروه‌ها به پیوندهای دو گانه یا ایجاد پیوند دو گانه با برداشت گروه‌ها
۵	ایزومرازها	انتقال گروه‌ها در داخل مولکول‌ها جهت ایجاد اشکال ایزومری
۶	لیگازها	تشکیل پیوندهای C-C، C-S، C-O، C-N در طیواکنش‌های کندانساسیون و همراه با تجزیه ATP

۱-۲-۳-فعالیت آنزیم‌ها:

۱-۲-۳-۱-چند اصطلاح در مورد فعالیت آنزیم‌ها:

۱) واحد بین المللی^۶: میزان آنزیمی است که در مدت یک دقیقه، یک میکرومول (μmol) از سوبسترا را به محصول تبدیل می‌کند.

۲) کاتال: یک کاتال مقداری از آنزیم است که در مدت یک ثانیه، یک مول از سوبسترا را به محصول تبدیل می‌کند.

۳) فعالیت ویژه^۷: فعالیت ویژه یک آنزیم، تعداد واحدهای آنزیمی موجود در هر میلی‌گرم از کل پروتئین می‌باشد.

۴) عدد نو سازی^۸: معادل تعداد مولکول‌های سوبسترای است که در یک زمان خاص توسط یک مولکول آنزیم، در زمان اشباع بودن آنزیم از سوبسترا به محصول تبدیل می‌گردد (Ringia, Garrett et al. 2004).

۱-۲-۳-۲-جایگاه فعال آنزیم:

جایگاه فعال هر آنزیم در مقایسه با اندازه کلی مولکول پروتئین، از نظر اندازه کوچک است. اکثر باقی‌مانده‌های آمینواسید آنزیم در تماس مستقیم با سوبسترا قرار ندارند. فاصله وزاویه بین باقیمانده‌های کاتالیتیک یک آنزیم و سوبسترا، باید صحیح باشد تا کاتالیز بتواند انجام شود. اکثر اسیدآمینوهای موجود در ساختار پروتئین نقش یک داربست^۹ بزرگ را دارند که ترتیب مناسب گروه‌های عملکردی سوبستراها را سبب می‌شوند (Hopfer and Devlin 2002).

^۶.International Unit

^۷.Specific activity

^۸.Turnover number

^۹. Scaffold

۱-۲-۳-۳-شیمی فضایی جایگاه فعال آنزیم:

برای شرح چگونگی اتصال آنزیم به سوبسترا، آگسون^{۱۰} گفت که باید حداقل سه نقطه متفاوت برای اتصال بین آنزیم و سوبسترا وجود داشته باشد. در این فرضیه دو جایگاه، بعنوان جایگاه‌های اتصال^{۱۱} هستند و یک جایگاه، به عنوان جایگاه کاتالیتیکی^{۱۲} می‌باشد. این منطقه از آنزیم که شامل جایگاه‌های کاتالیتیکی و اتصال هستند را جایگاه فعال یا مرکز فعال^{۱۳} آنزیم گویند. جایگاه فعال فقط قسمت کوچکی از آنزیم را تشکیل می‌دهد و چون این جایگاه باید به راحتی در دسترس سوبسترا قرار گیرد، معمولاً در سطح یا نزدیک سطح می‌باشد. در بعضی موارد، مطالعه تابش اشعه x نشان داده که شکافی در آنزیم وجود دارد و کل سوبسترا یا قسمتی از سوبسترا می‌تواند در این شکاف تثبیت شود. معمولاً اتصال بین سوبسترا و آنزیم ضعیف و از نوع غیر کووالان است (Palmer 2001)

۱-۲-۳-۴-حالت گذار:

فرضیه‌ای که چگونگی وقوع یک واکنش شیمیایی را بیان می‌کند براساس مدل حالت گذار می‌باشد. مفهوم پایه‌ای این مدل این است که مواد آغازگر واکنش (سوبسترا) و محصولات هرکدام ویژگی‌های ساختاری و شیمیایی خاصی دارند. حالت گذار ساختاری است که در آن پیوندها متحمل تغییراتی می‌شوند به‌طوری که نه شبیه مواد آغازگر و نه شبیه محصولات باشد. در واقع حالت گذار وضعیتی است که پیوندها در حال تشکیل بوده و هندسه آن‌ها در حال تغییر است. برای رسیدن به حالت گذار، انرژی مورد نیاز است و سرعت انجام واکنش به‌طور معکوس با انرژی مورد نیاز برای رسیدن به حالت گذار متناسب است. حالت گذار ماهیتی دارد که قابل مشاهده یا جداسازی نیست. یک کاتالیزور به سادگی با کاهش انرژی حالت گذار (ΔE)، سرعت تشکیل حالت گذار از سوبسترا را افزایش می‌دهد. آنزیم‌ها از طریق کاهش انرژی فعال‌سازی، باعث پایداری حالت گذار و در نتیجه افزایش سرعت واکنش می‌شوند. این مورد از طریق میان‌کنش باقی‌مانده اسیدآمین‌های آنزیم با مولکول در حالت گذار انجام می‌پذیرد (Hopfer and Devlin 2002).

¹⁰.Ogston

¹¹.Binding sites

¹².Catalytic sites

¹³.Active centre

۱-۲-۳-۵- اتصال محکم در حالت گذار:

یک آنزیم به‌طور محکمی به حالت گذار متصل می‌شود ولی به سوبسترا و محصول نهایی این‌گونه اتصال نمی‌یابد. اگر آنزیم به‌طور محکم به سوبسترا متصل شود، انرژی زیادی برای رسیدن به حالت گذار نیاز خواهد بود. به‌طور مشابهی آنزیم نمی‌تواند به‌طور محکم به محصول نهایی متصل شود چون در این صورت جدا شدن محصول از آنزیم، خیلی سخت خواهد شد. آنزیم نیاز دارد که محصول را رها کند تا بتواند مجدداً با مولکول دیگری از سوبسترا میان‌کنش بدهد (Hopfer and Devlin 2002).

۱-۲-۳-۵- فعالیت آنزیمی تحت تأثیر pH قرار می‌گیرد:

آنزیم‌ها دارای یک pH (یا دامنه pH) مطلوب می‌باشند که در آن حداکثر فعالیت را نشان می‌دهند و در pH بالاتر یا پایین‌تر از آن، فعالیت آن‌ها کاهش می‌یابد. زنجیره‌های جانبی اسیدهای آمینه موجود در جایگاه فعال ممکن است به صورت اسیدها یا بازهای ضعیف عمل کنند که این عمل آن‌ها بستگی به حفظ آن‌ها در یک حالت یونیزاسیون خاص دارد؛ به‌علاوه زنجیره‌های جانبی، سایر اسیدآمینه‌های موجود در محل‌های دیگر ساختمان پروتئین نیز در واکنش‌های متقابلی شرکت می‌نمایند که برای ایجاد و حفظ ساختمان پروتئین مفید هستند (Lehninger, 2005).

۱-۲-۳-۶- سنجش فعالیت آنزیم:

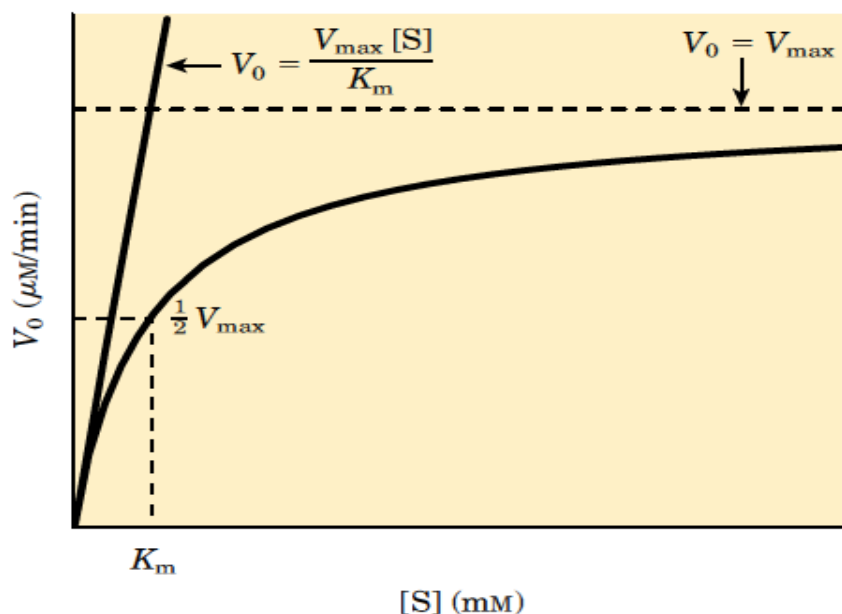
در واکنش آنزیمی طی واکنش خود آنزیم مصرف نمی‌شود لذا از تغییرات غلظت سوبسترا یا محصول برای سنجش فعالیت آنزیم استفاده می‌شود برای مطالعه فعالیت آنزیم‌ها روش‌های مختلفی وجود دارد از جمله: طیف‌سنجی، رادیومتری و استفاده از لیزر.

۱-۳- سینتیک واکنش‌های آنزیمی:

سینتیک علم مطالعه سرعت واکنش و عوامل مؤثر بر آن می‌باشد و ارتباطی با ماهیت شیمیایی تغییرات صورت گرفته ندارد. تمامی کارهای سینتیکی بر اساس قانون اثر جرم گولد برگ و واگ که در سال ۱۸۶۷ ارائه شده، استوار است این قانون بیان می‌کند که سرعت هر واکنش شیمیایی متناسب با حاصل ضرب غلظت (فعالیت) هر یک از واکنش‌گرها می‌باشد. برای مقاصد علمی به جای فعالیت از غلظت استفاده می‌شود، هرچند که این دو عامل با هم متفاوت‌اند ولی در محلول‌های بسیار رقیق تقریباً با یکدیگر برابر می‌شوند.

۱-۳-۱- غلظت سوبسترا بر روی سرعت واکنش آنزیمی اثر دارد:

یک عامل کلیدی مؤثر بر روی سرعت واکنش کاتالیز شده توسط یک آنزیم خالص در محیط آزمایشگاه، غلظت، [S]، می‌باشد. هر چند تغییرات [S] در طی دوره واکنش با تبدیل سوبسترا به محصول مطالعه اثرات غلظت سوبسترا را پیچیده می‌کند. یک روش ساده‌شده در آزمایشات کینتیکی، اندازه‌گیری سرعت ابتدایی، V_0 ، در زمانی می‌باشد که [S] عموماً بیش‌تر از غلظت آنزیم، [E]، است. حال اگر زمان بعد از شروع یک واکنش، به اندازه کافی کوچک باشد، تغییرات [S] ناچیز بوده و می‌توان آن را ثابت در نظر گرفت.



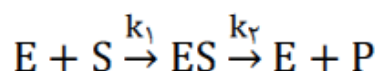
شکل ۱-۳: اثر غلظت سوبسترا بر روی سرعت اولیه یک واکنش آنزیمی.

اثر [S] متفاوت بر روی V_0 در غلظت ثابت آنزیم، در شکل بالا نشان داده شده‌است. در غلظت نسبتاً پائین سوبسترا، V_0 تقریباً به طور خطی با افزایش [S] افزایش می‌یابد. در غلظت‌های بالاتر سوبسترا، V_0 در پاسخ به افزایش [S]، کمتر و کمتر افزایش می‌یابد و بالأخره به نقطه‌ای می‌رسیم که بعد از آن افزایش V_0 در پاسخ به افزایش [S] دیگر مشاهده نمی‌گردد. این ناحیه کفه مانند V_0 نزدیک به سرعت حداکثر، V_{max} ، می‌باشد (Lehninger, 2005).

در نمودارهای سرعت اولیه علیه غلظت اولیه سوبسترا در غلظت ثابت آنزیم در واکنش‌های کاتالیز شده تک سوبسترای، در غلظت‌های پائین سوبسترا واکنش درجه اول و در غلظت‌های بالا درجه صفر دارد. چنین منحنی دارای معادله عمومی زیر می‌باشد:

$$V = \frac{a[S]}{[S] + b}$$

a و b ثابت هستند. ثابت a حد اکثر سرعت واکنش (V_{max}) است و b مقدار $[S_0]$ را هنگامی که $V_0 = V_{max}/2$ باشد نشان می‌دهد. آنزیم و سوبسترا به یکدیگر متصل شده و کمپلکس آنزیم-سوبسترا را تشکیل می‌دهند و این کمپلکس هم، به آنزیم و محصول شکسته می‌شود.



سرعت کلی واکنش به مقدار آنزیم در دسترس و سرعت شکستن کمپلکس آنزیم-سوبسترا محدود می‌شود. اگر آنزیم از سوبسترا اشباع باشد، آنزیم آزادی وجود ندارد و تمام آنزیم‌ها به صورت کمپلکس آنزیم-سوبسترا درآمده است (Cornish-Bowden A, 1979) بنابراین:

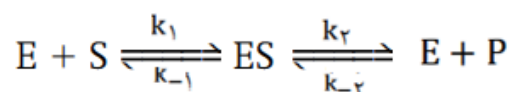
$$V_{max} = k_2[ES]$$

۱-۳-۲- سینتیک واکنش‌های آنزیمی تک سوبسترای:

۱-۳-۲-۱- معادله میکائیلیس-منتن:

ارائه مدل‌های سینتیکی برای تشریح معادله $V_0 = V_{max}[S_0]/[S_0] + b$ توسط هنری در سال ۱۹۰۲ و میکائیلیس و منتن در سال ۱۹۱۳ صورت گرفت و بعد توسط بریگس و هالدين گسترش یافت. این واکنش توسط دو ثابت مشخص می‌شود: ثابت میکائیلیس-منتن (K_m) و ثابت کاتالیتیکی که به‌طور غیر مستقیم به دست می‌آید (K_{cat}). اگر چه معادله میکائیلیس-منتن از یک واکنش ساده، تک سوبسترای و برگشت ناپذیر مشتق می‌شود، اما برای بیش‌تر واکنش‌های پیچیده نیز معتبر باقی می‌ماند (Cornish-Bowden A, 1979).

ساده‌ترین معادله عمومی این واکنش‌ها به صورت زیر است:



چنانچه بررسی به زمان ابتدایی محدود شود غلظت محصول ناچیز است و سرعت واکنش برگشتی قابل صرف نظر کردن است. فرض میکائیلیس و منتن این بود که تعادل بین S،E و ES فوراً برقرار می‌شود و شکستن ES به محصول بسیار کندتر از آن است که این تعادل را برهم زند. طبق این معادلات و با فرض حالت تعادل و به دست آوردن مقدار [ES] می‌توان معادله زیر را برای سرعت اولیه نوشت:

$$V. = k_2 \frac{[E.][S]}{K_s + [S]}$$

چنانچه غلظت سوبسترا بسیار بیش‌تر از آنزیم باشد، کل آنزیم به صورت کمپلکس [ES] درخواهد آمد و در این حالت سرعت آنزیم حداکثر است پس به جای $k_2[E_0]$ می‌توان $k_2[ES]$ و یا V_{max} را نوشت. اگر بپذیریم غلظت اولیه سوبسترا $[S_0]$ بسیار بیش‌تر از غلظت اولیه آنزیم است در زمان کوتاه اولیه، مانند این است که $[S]$ تغییر نکرده و همان $[S_0]$ است و غلظت کمپلکس ES تغییر مهمی نمی‌کند (Cornish-Bowden A, 1979).

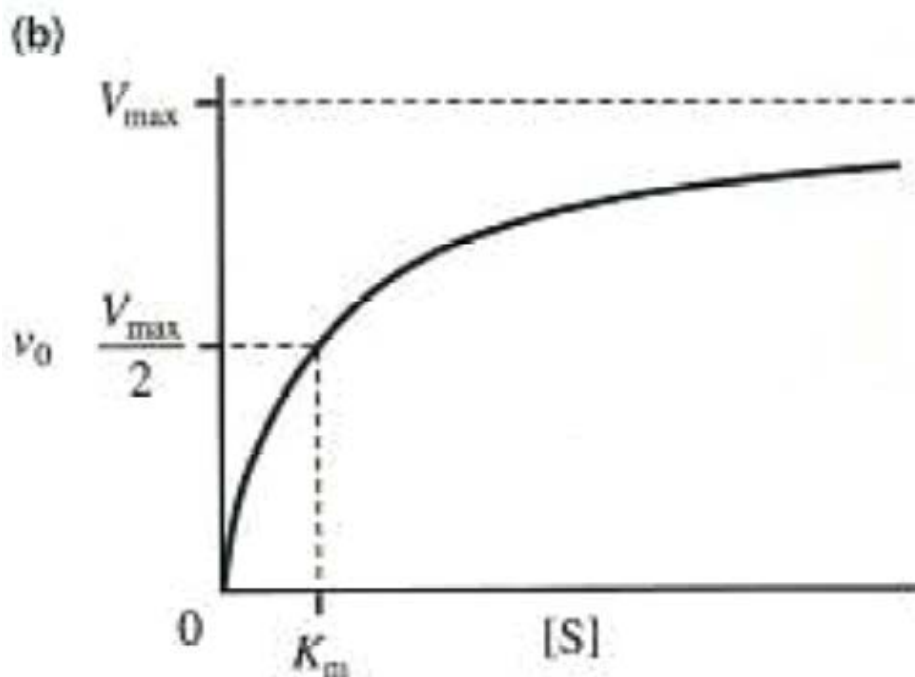
$$V. = \frac{V_{max}[S.]}{K_m + [S.]}$$

۱-۳-۲- تغییرات بریگس-هالدن در معادله میکائیلیس-منتن:

فرضیه میکائیلیس-منتن برای بسیاری از آنزیم‌ها مورد قبول نیست چرا که سرعت تولید محصول این آنزیم‌ها به اندازه‌ای سریع است که تعادل را بر هم می‌زند. در نتیجه آنزیم، سوبسترا و کمپلکس آنزیم-سوبسترا در تعادل نخواهند بود و چنانچه غلظت سوبسترا خیلی بیش‌تر از غلظت آنزیم باشد آن‌گاه با گذشت زمانی کوتاه بعد از مخلوط کردن آنزیم و سوبسترا حالت پایا ایجاد خواهد شد که در آن غلظت کمپلکس آنزیم-سوبسترا با گذشت زمان ثابت می‌ماند. حالت پایا پس از چند میلی ثانیه از شروع واکنش آغاز شده و تا چند دقیقه بعد از این که غلظت محصول به حد قابل توجهی برسد ادامه دارد.

این معادله که در زیر آورده شده است مشابه معادله میکائیلیس-منتن می‌باشد ولی تعریف ثابت K_m با K_s تفاوت هایی دارد. این معادله به افتخار محققین قبلی، معادله میکائیلیس-منتن نام گرفت (Cornish-Bowden A, 1979).

$$V. = \frac{V_{\max}[S.]}{K_m + [S.]}$$



شکل ۴-۱: منحنی V_0 علیه S_0 در غلظت ثابت آنزیم در واکنش تک سوپسترایبی

۱-۳-۲-۳- پارامترهای کلیدی معادله میکائیلیس-منتن:

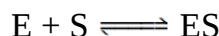
K_{cat} : این پارامتر به عنوان عدد میزان گردش آنزیم شناخته می‌شود و مقدار تولید بیشینه محصول تحت وضعیت اشباع سوپسترا در هر واحد زمان و به ازای هر واحد آنزیم را بیان می‌کند. مقادیر بزرگ تر K_{cat} نشان دهنده رخداد سریع‌تر وقایع کاتالیتیک است (Cleland W. W, 1967).

K_m : که به نام ثابت میکائیلیس نامیده می‌شود. با در نظر گرفتن یک pH، دما و وضعیت اکسید و احیای پایدار، K_m برای یک آنزیم ثابت است و پارامتری است که قدرت اتصال این آنزیم به سوپسترای خود را نشان می‌دهد. معادله میکائیلیس-منتن فرض می‌کند که K_{cat} در مقایسه با K_1 و K_{-1} بسیار کم است (Cleland W. W, 1967).

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

$$K_s = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

بدیهی است در صورتی که $K_1 \gg K_2$ باشد آن گاه می توان گفت K_m و K_s برابرند. به عبارت دیگر وقتی تمایل به تفکیک ES بیش از پیشرفت واکنش باشد، چنین شرطی حاصل می شود و واکنش به صورت زیر در نظر گرفته می شود (Cleland W. W, 1967).



و در نتیجه:

$$K_m = K_s = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

بازده آنزیمی: نسبت K_{cat}/K_m به عنوان بازده کاتالیتیک تعریف می شود و می تواند به عنوان مقدار اختصاصیت سوستر را در نظر گرفته شود. وقتی K_{cat} بسیار بیش تر از K_{-1} باشد، فرآیند کاتالیز به شدت سریع است و بازده آنزیم وابسته به توانایی آن در اتصال به سوستر می باشد. بر اساس قوانین انتشار، بالاترین حد برای این نسبت ها، همان گونه که توسط فراوانی برخوردهای بین آنزیم و سوستر تعیین می شود، بین 10^9 - 10^8 است (Cleland W. W, 1967).

V_{max} : حداکثر سرعتی است که آنزیم به دست می آورد. این اندازه گیری به صورت نظری است زیرا در زمان داده شده، تمام مولکول های آنزیمی را که به طور محکم به سوسترهایشان متصل شده اند به دست خواهد آورد. V_{max} در غلظت های بالای سوستر به دست می آید اما به آن نمی رسد (Cleland W. W, 1967).

۱-۳-۲-۴- اهمیت ثابت میکائیلیس (K_m):

شناسایی مقدار عددی K_m یک آنزیم به دلایل مختلفی اهمیت دارد:

۱. K_m مقدار تقریبی سوستر را در داخل سلول می دهد. احتمال این که این مقدار به میزان قابل ملاحظه - ای بزرگ تر یا کوچک تر از K_m باشد، کم است. چنان چه در داخل سلول $[S] \gg K_m$ باشد، V باید خیلی حساس به تغییرات غلظت باشد، ولی بیش تر پتانسیل کاتالیزوری آنزیم وقتی که $V_{max} \gg V$ باشد، از کار می افتد. همچنین، از

نظر فیزیولوژی $[S] \gg K_m$ نمی‌باشد، چون V نمی‌تواند به مقدار V_{max} برسد. اختلاف بین V در $K_m[S] =$ و در $[S] = 10^2 K_m$ ، تنها دو برابر است. همچنین، در $[S] \gg K_m$ ، V نسبت به تغییرات کوچک $[S]$ ، غیر حساس می‌شود.

۲. چون K_m برای هر آنزیم مقدار ثابتی است، مقادیر عددی K_m وسیله‌ای برای مقایسه آنزیم‌های ارگانسیم‌های متفاوت، یا بافت‌های متفاوت یک ارگانسیم و یا مراحل مختلف پیشرفت یک بافت می‌باشد. به این طریق، می‌توان تعیین کرد که آیا آنزیم A، همان آنزیم B، است یا آنزیم متفاوتی است که واکنش یکسانی را کاتالیز می‌کند.

۳. تغییر ناشی از وجود لیگاند در مقدار مؤثر K_m ، روشی برای تنظیم فعالیت یک آنزیم است. چنانچه K_m تعیین شده در لوله آزمایش (غیر فیزیولوژیک) بزرگ به نظر برسد، آن‌گاه باید در مورد مهار کننده‌ها یا فعال کننده‌هایی تحقیق کنیم که در شرایط لوله آزمایش، نقش در افزایش یا کاهش مقدار مؤثر K_m دارند. با اندازه گیری اثرات ترکیبات مختلف روی مقدار K_m ، می‌توان مهارکننده‌های مهم فیزیولوژی را مشخص کرد.

۴. با داشتن K_m ، می‌توان شرایط آزمایش را طوری به وجود آورد که $[S] \gg K_m$ باشد و بنابراین V_{max} را تعیین نمود. V_{max} میزانی از $[E]$ می‌باشد.

۵. K_m مناسب بودن نسبی سوبستراهای مختلف یک آنزیم بخصوص را مشخص می‌کند. سوبسترای که کم‌ترین مقدار K_m را دارد، بیش‌ترین تمایل ظاهری را برای آنزیم دارد. بهترین سوبسترا آن است که بیش‌ترین مقدار V_{max}/K_m را داشته باشد.

۶. معکوس $K_m (1/K_m)$ می‌تواند میزانی از تمایل آنزیم باشد. گاهی تمایل آنزیم به صورت زیر تعریف می‌شود:

$$\text{تمایل} = \frac{1}{K_s}$$

واضح است که هر چه مقدار K_s کوچک‌تر باشد، تمایل به تفکیک ES به $E + S$ کم‌تر می‌باشد. مقدار K_m یک آنزیم می‌تواند میزانی از K_s آن آنزیم باشد و حتی تحت شرایطی، این دو با هم برابر می‌شوند. لذا معکوس K_m می‌تواند به عنوان میزانی از تمایل آنزیم قلمداد شود. به بیان دیگر، هر چه K_m برای یک آنزیم کوچک‌تر باشد، شتاب عمل آنزیم روی سوبسترا بیش‌تر است (Cleland W. W, 1967).

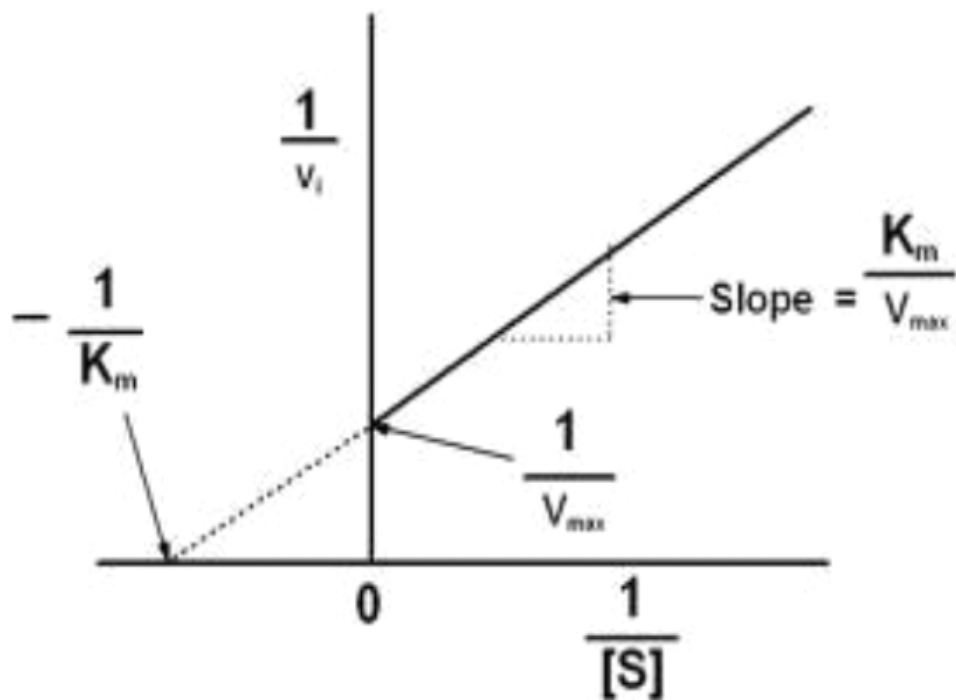
۱-۳-۳-۳-۳-۳-۳: روش‌های مختلف ترسیم داده‌های سینتیکی:

تعیین مقدار V_{max} و K_m از نمودارهای هذلولی شکل به دست می‌آید. از این رو از روش‌های مختلف زیر، برای تعیین ثابت‌های سینتیکی آنزیم استفاده می‌شود (Metzler D. E, 2003).

۱-۳-۳-۳-۳-۳-۳: معادله لینیور-برک:

لینیور و برک در سال ۱۹۳۴ با معکوس کردن معادله میکائلیس-منتن معادله خود را ارائه کردند (Metzler D. E, 2003).

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{MAX}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{MAX}}$$



شکل ۱-۵: نمودار لینیور-برک

۱-۳-۳-۳-۳-۳-۳: معادله ادی-هافستی:

چنانچه طرفین معادله لینیور-برک در $V_{max} \cdot V$ ضرب شود، به معادله ادی-هافستی می‌رسیم:

$$V. = -K_m \frac{V.}{[S.]} + V_{max}$$

همان‌طور از معادله پیداست اگر V_0 علیه $V_0/[S_0]$ رسم شود، خطی راست با شیب $-K_m$ ، عرض از مبدأ V_{max} و طول از مبدأ V_{max}/K_m به دست می‌آید (Metzler D. E, 2003).

۱-۳-۳- معادله هانز-ولف:

چنان‌چه طرفین معادله لینویور-برک در $[S_0]$ ضرب شود، این معادله به دست می‌آید:

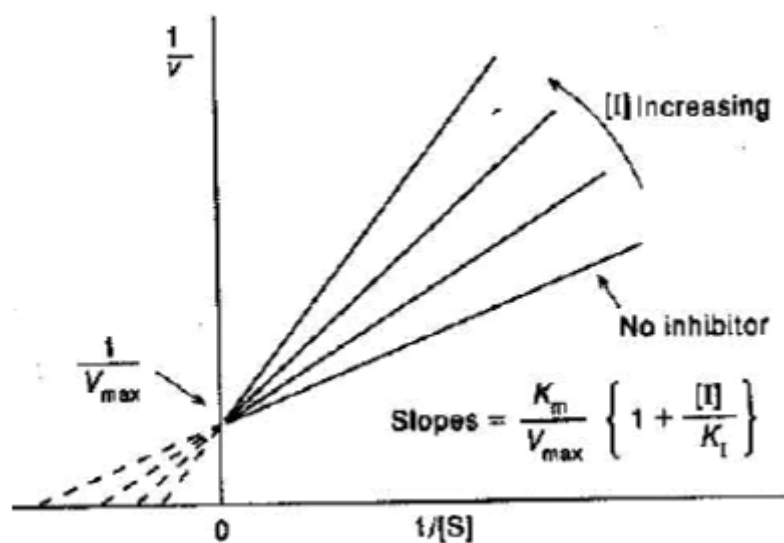
$$\frac{[S.]}{V.} = \frac{1}{V_{max}} [S.] + \frac{K_m}{V_{max}}$$

بدین ترتیب مجهول‌های مورد نظر از روی شیب خط، عرض از مبدأ و طول از مبدأ به دست می‌آیند. برای کارهای معمولی که بالاترین دقت لازم نیست، روش لینویور-برک انتخاب می‌شود و در اغلب مقالات آنزیمی از این روش استفاده می‌شود (Metzler D. E, 2003).

۱-۳-۴- مهار آنزیمی:

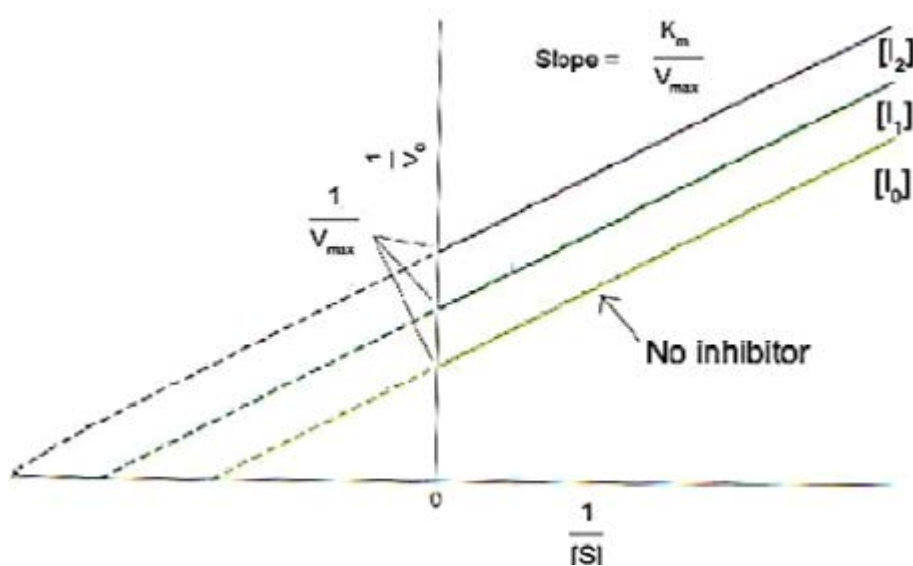
هر ماده‌ای که باعث کند شدن سرعت یک واکنش آنزیمی شود، تحت عنوان مهارکننده آنزیمی شناخته می‌شود. مهارشوندگی آنزیمی یکی از یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های سلولی است و بررسی مکانیسم عمل مهارشوندگی، از نظر شناسایی ویژگی‌های آنزیمی دارای اهمیت فراوان می‌باشد. هم‌چنین ساختمان فیزیکی شیمیایی جایگاه فعال و مکانیسم سینتیکی واکنش ممکن است به این طریق مشخص شود. مطالعات مهارشوندگی آنزیمی می‌تواند در انواع زمینه‌های دارویی، آنتی بیوتیک‌ها، مواد نگهدارنده، سموم و آفات گیاهی مورد استفاده قرار گیرد. مهار می‌تواند برگشت پذیر یا برگشت‌ناپذیر باشد. مهار برگشت‌ناپذیر تقریباً همیشه شامل اتصال یک ماده سمی است که آنزیم را به طور دائمی ناتوان می‌سازد. مهار برگشت پذیر شامل اتصال غیرکوالانسی یک مهار کننده به آنزیم است که در نتیجه باعث یک کاهش موقتی در فعالیت آنزیم می‌شود. سه نوع مکانیسم مهار وجود دارد:

(۱) مهار رقابتی^{۱۴} که ، با افزایش غلظت این مهارکننده ، V_{max} ثابت و K_m افزایش می یابد.



شکل ۱-۶: مهار رقابتی

(۲) مهار نارقابتی^{۱۵} که طی آن با افزایش غلظت مهارکننده نارقابتی، V_{max} و K_m هر دو کاهش می یابند.



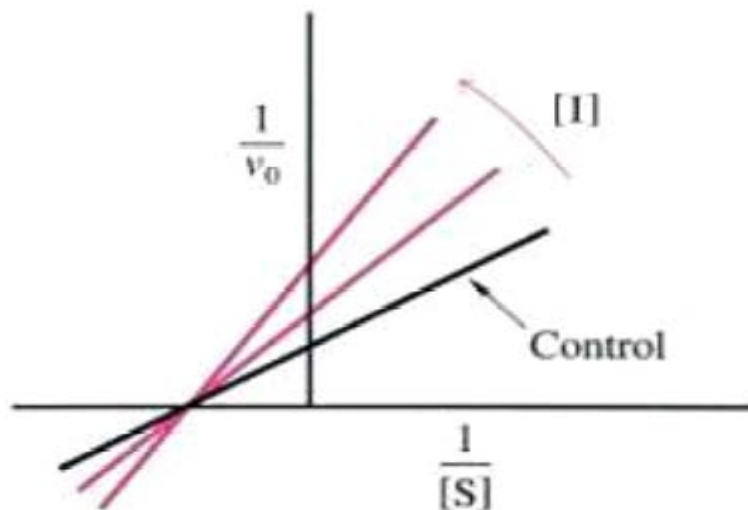
¹⁴ Competitive

¹⁵ Uncompetitive

شکل ۱-۷: مهار نارقابتی

۳) مهار غیررقابتی^{۱۶}، که با افزایش غلظت این نوع مهار کننده K_m ثابت و V_{max} کاهش می‌یابد.

البته در حقیقت نوع مهار پیچیده است و واکنش‌های معمول شامل مکانیسم‌های مخلوط یا جزئی از این سه مکانیسم هستند (Cleland W. W, 1967).



شکل ۱-۸: مهار غیر رقابتی

۱-۴- طیف سنجی:

برای مطالعه ساختار ماکرومولکول‌های حیاتی، روش‌های متفاوتی به کار می‌رود که البته هیچ یک به تنهایی شناخت کاملی از آن در اختیار ما قرار نخواهد داد. به کارگیری روش‌های مختلف می‌تواند توصیف نسبتاً صحیحی از ساختار ماکرومولکول ارائه دهد. روش‌های طیف سنجی از مهم‌ترین روش‌های مطالعه ساختار ماکرومولکول‌هاست. به عنوان مثال می‌توان به روش فلورسانس، رزونانس مغناطیسی و رزونانس مغناطیسی هسته (NMR) اشاره نمود. روش‌هایی مثل طیف سنجی مادون قرمز (IR)، دو رنگ نمایی حلقوی (CD) و رامان برای تعیین ساختار دوم نظیر مقدار مارپیچ‌ها در یک پروتئین یا اسید نوکلئیک به کار می‌روند (Freifelder, 1986).

¹⁶Noncompetitive

۱-۴-۱- کروموفور:

کروموفور یک مولکول یا بخشی از یک مولکول است که از طریق جذب فوتون تحریک می‌شود. کروموفورهای مختلف قادر به جذب پرتو با طول موج معینی هستند و در طول موج معینی بیش‌ترین جذب را دارند که این مقدار با λ_{max} نشان داده می‌شود. انرژی تحریک به طور معمول از طریق برخورد مولکول تحریک شده با مولکول دیگر به گرما تبدیل شده و یا این که به صورت فوتون طی فلئورسانس نشر می‌یابد. در پروتئین‌ها کروموفورها شامل اسیدآمینه‌های تریپتوفان، تیروزین و فنیل‌آلانین می‌باشد. در مورد تریپتوفان مقدار λ_{max} نسبت به دو اسیدآمینه دیگر بیش‌تر است، بنابراین فلورسانس تریپتوفان متداول است. به‌طور کلی فلئوفور مناسب دارای حلقه آروماتیک به شدت سخت می‌باشد (Zuby, 1998).

۱-۴-۲- دستگاه اندازه گیری جذب نور مرئی و ماوراء بنفش:

اندازه‌گیری جذب نمونه مورد نظر به وسیله دستگاه طیف سنجی جذبی انجام می‌شود. طیف سنج‌ها گرچه طرح‌های مختلفی دارند ولی همگی شامل یک منبع نور، یک تک رنگ کننده (برای انتخاب طول موج)، یک جا نمونه‌ای شفاف به نام سل و یک تشخیص دهنده نور می‌باشند. عمل این دستگاه به این صورت است که نور با یک طول موج خاص، به محفظه شاهد که می‌تواند یک حلال باشد تابیده و میزان نور عبوری آن سنجیده و جذب آن تعیین می‌شود. سپس همان نور به نمونه تابیده و جذب آن معین می‌شود. با کم نمودن جذب شاهد از نمونه مقدار جذب ماده به دست می‌آید. این عمل در برخی از دستگاه‌ها به صورت خودکار انجام می‌گیرد. در برخی از دستگاه‌ها جذب در طول موج‌های مختلف سنجش و طیف جذبی حاصل می‌شود (Freifelder, 1986).

۱-۴-۳- کاربردهای مهم طیف سنجی جذبی:

از کاربردهای مهم این روش می‌توان به تعیین غلظت مجهول ماکرومولکول، بررسی اتصال لیگاند به ماکرومولکول، شناسایی ماکرومولکول، پیشرفت واکنش، مطالعات سینتیکی و مطالعات دگرگون سازی پروتئین‌ها اشاره کرد (Zuby, 1998).

۱-۴-۴- روش‌های طیف سنجی برای ارزیابی ساختار و عملکرد پروتئین استفاده می‌شوند:

زنجیره‌های جانبی تیروزین، فنیل‌آلانین و تریپتوفان و همچنین پیوندهای پپتیدی، امواج فرابنفش (UV) را جذب می‌کنند. کارایی جذب هر ناحیه کروموفور به ضریب خاموشی مولی (ϵ) آن بستگی دارد. جذب در ناحیه بین ۲۶۰ nm تا ۳۰۰ nm عمدتاً ناشی از زنجیره‌های جانبی آروماتیک است. هنگامی که که زنجیره‌های جانبی

تیروزین در pH های بالا یونیزه می‌شوند (pK'_a گروه آن حدوداً برابر ۱۰ است)، جذب به طول موج‌های بالاتر شیف‌ت پیدا کرده و جذب مولی افزایش می‌یابد. پیوندهای پپتیدی در ناحیه دور (far-UV) (۲۳۰-۱۸۰ nm) جذب دارند. یک پیوند پپتیدی در آرایش فضای های α -هلیکس، با الکترون‌های پیوند های پپتیدی بالا و پایین خود به منظور تشکیل یک سیستم تهییجی میان‌کنش می‌دهد که در چنین سیستمی الکترون‌ها در یک جایگاه مشخص قرار ندارند. نتیجه، جابجایی بیشینه جذب برای هر پیوند پپتیدی مجزا در یک طول موج پایین‌تر یا بالاتر خواهد بود. طیف سنجی UV در مورد ساختارهای دوم و سوم یک پروتئین اطلاعاتی به ما می‌دهد. هم زمان با دگرگون شدن یک پروتئین، به خاطر تخریب سیستم تهییجی، در ویژگی‌های جذبی پیوند پپتیدی تفاوت‌هایی ایجاد می‌شود. به علاوه، جذب بیشینه یک ناحیه کروموفر آروماتیک، در یک محیط آبی نسبت به یک محیط غیر قطبی، در طول موج‌های پایین‌تری اتفاق می‌افتد (Bashford C. L and harris D. A, 1987).

۱-۵- لیزوزیم

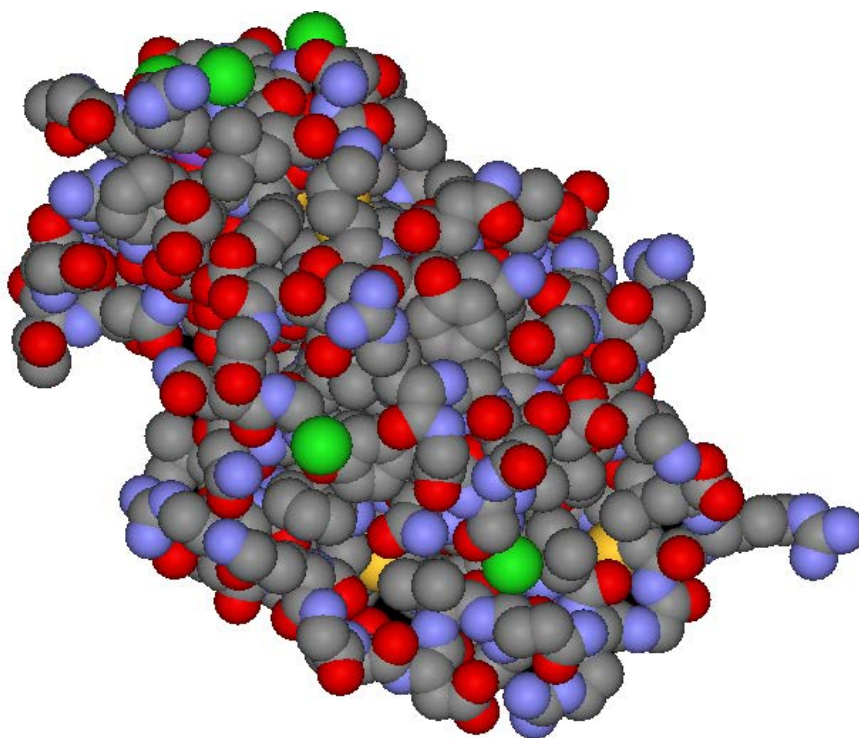
لیزوزیم (C.A.S.: 12650-88-3) و EC 3.2.1.17 پروتئینی است با ۱۲۹ ریشه اسید آمینه که در دسته هیدرولاز ها طبقه بندی می شود و هیدرولیز پیوند بتا ۴۱ بین ریشه های ان استیل مورامیک اسید و ان استیل دی گلوکوز آمین در پپتیدوگلیکان ها و هم چنین ریشه های ان استیل دی گلوکوز آمین را در chitodextrins را کاتالیز می کند. وزن ملکولی تقریبی این آنزیم ۱۴/۷ کیلودالتون است. اسامی دیگر این آنزیم 1,4-N-acetylmuramidase, L-7001, N,O-diacetylmuramidase, PR1-Lysozyme, Globulin G1, Globulin G, Lysozyme g, Mucopolysaccharide N-acetylmuramoylhydrolase , Muramidase, Mucopolysaccharide glucohydrolase هستند. لیزوزیم در ترشحات موکوسی از قبیل اشک و بزاق وجود دارد. این آنزیم در غلظت های بالا حدود ۳٪ از کل پروتئین سفیده تخم مرغ را شامل می شود. این آنزیم فقط بر باکتری های گرم مثبت عمل کرده و دیواره آنها را لیز می کند و باکتری های گرم منفی و مخمر ها نسبت به آن کاملاً مقاوم هستند. از لحاظ تاریخی لیزوزیم در سال ۱۹۲۲ توسط الکساندر فلمینگ کشف شد. این آنزیم تصادفاً در آزمایشگاه شخصی الکساندر فلمینگ کشف شد. ترشحات مربوط به سیستم تنفسی از طریق بینی در پتری دیش حاوی محیط کشت باکتری افتاده بود و باکتری ها بعد از مدتی لیز شده بودند. این حادثه به طور دقیق بررسی شد و آنزیم اصلی عمل کننده به عنوان لیزوزیم شناسایی شد. در سال ۱۹۶۵ ساختمان لیزوزیم به وسیله آنالیز های اشعه X توسط آقای دیوید چیلتون فلیپس با قدرت تفکیک ۲ آنگستروم شناسایی شد. برای سالیان طولانی لیزوزیم بهترین موضوع برای آنالیز های اشعه X بود که این بخاطر خصوصیات بی نظیر این آنزیم است اولین خصوصیت بی نظیر این آنزیم خالص سازی راحت آن از سفیده تخم مرغ است. دومین خصوصیت آن کریستاله شدن آن است که این موضوع در دیگر پروتئین ها کم تر دیده می شود. لیزوزیم ها اندو استیل مورامیداز

هستند که EC 3.2.1.17 دارند و در طیف گسترده ای از ارگانسیم ها یافت می شوند (Menendez-Arias *et al.*, 1985; Torrens, 2001; Powroznik *et al.*, 2004). این آنزیم در همه جا موجود است، چندین نوع لیزوزیم در بخش های مختلف از سلسه حیوانات توزیع شده اند. لیزوزیم به نظر برای زندگی حیوانات در محیط هایی با باکتری های عفونی کننده فرصت طلب مهم است (Ponkham *et al.*, 2010). به طور کلی ساختمان لیزوزیم به دو دمین که شامل: دومین آلفا هلیکس شامل ریشه های ۱-۳۹ و ۸۹-۱۲۹ و یک دومین ورقه ای بتا شامل ریشه های ۴۰-۸۸ تقسیم بندی می شود (Refaei *et al.*, 2003; Bordbar *et al.*, 2007). لیزوزیم شامل ۵ منطقه آنتی ژنیک شناخته شده است. منطقه ۱: مناطق N- (ریشه های ۱-۱۲) و C- (ریشه های ۱۲۳-۱۲۹) ترمینال که توسط Cys6-Cys127 به همدیگر متصل می شوند. منطقه ۲: این منطقه شامل ریشه های ۲۹-۳۷ و ۱۰۹-۱۲۳ می باشد که توسط Cys30-Cys115 با هم کراس لینک شده اند. منطقه ۳: یک ناحیه β شیت آنتی پارالل که شامل ریشه های ۳۸-۵۴ است که پل دی سولفیدی در این منطقه دیده نمی شود. منطقه ۴: اولین منطقه حاوی لوپ (به نام لوپ I) شامل ریشه های ۶۴-۸۲ می باشد که توسط Cys64-Cys80 کراس لینک می شوند. منطقه ۵: دومین ناحیه حاوی لوپ (به نام لوپ II) شامل ریشه ای ۷۶-۹۶ است که توسط Cys76-Cys94 به هم متصل شده اند (Kondo *et al.*, 1982; van den Berg *et al.*, 1999). لیزوزیم به طور فراوان در بدن انسان وجود دارد در بخش هایی مانند اشک، بزاق، پوست، latex humors، کبد، روده و بافت های لمفاتیک وجود دارد. این آنزیم به طور فوق العاده ای در سفیده تخم مرغ دارای غلظت بسیار بالایی است. این آنزیم جریان چرخش خون را بهبود می بخشد و باعث افزایش توانایی سیستم ایمنی در انسان می شود (Chen *et al.*, 2009). لیزوزیم یک آنزیم نسبتاً کوچک مونومریک کروی مهمی است که به عنوان نگهدارنده به موادی مثل شیر گاو، پنیر، سالادهای آماده و نوشیدنی های مختلف اضافه می شود. هم چنین از لیزوزیم به عنوان یک سیستم مدل برای مطالعه و رفتار آنزیم ها و پروتئین ها استفاده می شود (Ueda *et al.*, 2001; Arica and Bayramoglu, 2005; Zhao and Yang, 2008). اضافه شدن لیزوزیم به پنیر مانع رشد میکروارگانسیم *Clostridium tyrobutyricum* می شود و هم چنین اضافه شدن آن به شراب ها مانع تخمیر مالولاکتیک می شود (Kerkaert and De Meulenaer, 2007; Dembczynski *et al.*, 2010). برخی از انواع لیزوزیم با سوبسترا های گسترده تر مورد شناسایی قرار گرفته اند به عنوان مثال گلیکوزیداز (EC 3.2.1.14) و chitosanases با (EC 3.2.1.132) توانایی هیدرولیز پیوند بین ریشه های ان استیل گلوکوز آمین در کیتین و مولکول chitosan را به ترتیب دارند. مورامیداز های باکتریایی یک نقش مهمی در متابولیسم دیواره در طی مراحل رشد سلولی و تقسیم شدن دارند. ولی در مهره داران این نقش حفاظتی است (Petrovskii *et al.*, 2009). این آنزیم ۱۸ اسید آمینه کاتیونی (بار مثبت) دارد. ۶ اسید آمینه لیزین که یکی از آنها در N-ترمینال قرار گرفته است و همچنین ۱۱ اسید آمینه آرژنین و یک هیستیدین را دارا است. از طرفی این آنزیم دارای ۱۲ اسید

آمینه آنیونیک (بار منفی) است که شامل ۲ اسید گلوتامیک، ۹ اسید آسپارتیک و یک لوسین در C-ترمینال خود است. این ساختار کروی فشرده دارای پنج هلیکس آلفا و سه رشته ناهمسو بتا شیت و مقدار زیادی رندوم کوئل و بتا ترن می باشد. بیشتر پیوند های دی سولفید در منطقه آلفا هلیکس قرار دارند و بنابراین با تغییر در پیوند های دی سولفید، آلفا هلیکس ها تغییر می کنند و فعالیت آنزیم تغییر می کند (Wu and Narsimhan, 2008). مطالعات اشعه X نشان می دهند که این آنزیم سخت و پایدار است. در دامنه pH فیزیولوژیک، لیزوزیم هیچ گونه تغییر ساختاری را تا ۷۷ درجه سانتی گراد نشان نمی دهد و از طرفی در دمای فیزیولوژیکی این آنزیم هیچ گونه تغییری را از pH های ۱۱/۳ تا ۱/۲ نشان نمی دهد. این پایداری بالای لیزوزیم منسوب به ۴ پیوند دی سولفیدی و هم چنین پیوند های هیدروژنی و واکنش های هیدروفوبیک بین اسید آمینه های این آنزیم است (Ruso et al., 2004; al., 2003). یکی از جایگاه هایی که در بدن انسان لیزوزیم تولید می شود غدد اشکی (lacrimal gland) هستند البته مکانیسم تولید لیزوزیم هنوز ناشناخته است. در غدد اشکی انسان لیزوزیم چه در حالت التهاب و چه در حالت غیر التهاب فعال است (Saleh and Ibrahimi, 1995). همه ۶ ملکول لیزین آنزیم لیزوزیم در سطح آنزیم قرار گرفته اند و بنابراین انتخابی مناسب برای تغییر شکل و یا جانشینی است (Ong et al., 2009). این آنزیم دارای ۶ اسید آمینه تریپتوفان و ۳ تیروزین است که آن را جهت فعالیت های اسپکتروفوتو و فلوریمتری مناسب می سازد (Yue et al., 2008). این آنزیم در محلول های آبی با pH=6/5 دارای بار خالص +۸ است (Sahu et al., 2005). هسته داخلی لیزوزیم آب گریز است ولی در سطح آنزیم ریشه های آب گریز و یونی توزیع شده اند. این آنزیم در pH های پایین به صورت مونومر است ولی در pH های بالا (>4/5) تمایل دارد که به حالت اولیگومر باشد. مطالعات اخیر نشان داده اند که دیمیریزاسیون وابسته به pH شامل دپروتونه شدن Glu-35 در جایگاه فعال آنزیم (Glu-35 یک pK_a غیر معمول بالا ۶/۳ دارد). زیرا pH=4/5 دیمیریزاسیونی رخ نمی دهد به خاطر این که کربوکسیلیک اسید Glu-35 به حالت پروتونه باقی می ماند. تراکم لیزوزیم نتیجه ای از یک واکنش جالب بین کربوکسیلیک اسید Glu-35 و یک نیتروژن پروتونه روی زنجیره جانبی Trp-62 از یک مولکول لیزوزیم مجاور است. این منجر به تجمعات سر به دم لیزوزیم ها می شود (Grigsby et al., 2000). برآورد می شود که لیزوزیم بار مثبت خالص +۱۶، +۱۰، +۸ و +۶ را در pH های ۳/۳، ۵، ۷ و ۹ به ترتیب داشته باشد (Pirzadeh et al., 2006). شواهدی وجود دارد که لیزوزیم در pH های بالا به حالت گلبول های گداخته (MG) وجود دارد. در pH های بالای ۱۲/۷۵ لیزوزیم به حالت گلبول های گداخته (MG) مانند یک واسطه وجود دارد. لیزوزیم های موجود در سفیده تخم مرغ متعلق به گروه پروتئین های کلاس $\alpha + \beta$ است (Williams et al., 1997; Hameed et al., 2007). به خاطر پایداری حرارتی نسبتا بالا این آنزیم تبدیل به موضوعی جذاب برای صنایع غذایی بویژه برای استفاده در موادی که فرایند پاستوریزاسیون روی آن ها انجام می شود شده است (Makki and Durance, 1996).

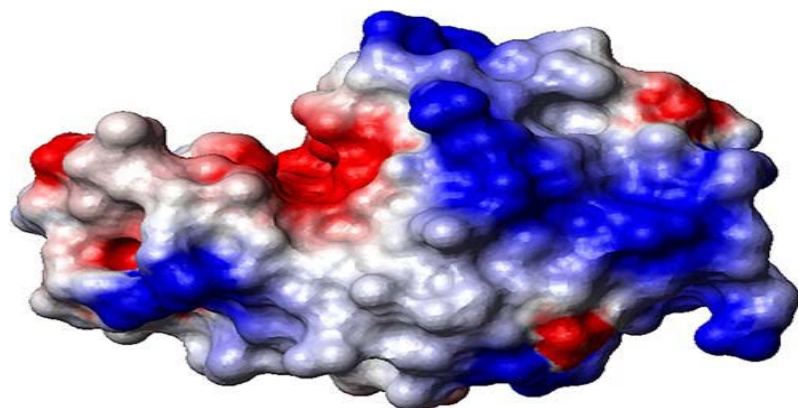
۶-۱- تصاویر سه بعدی از ساختار لیوزیم

در شکل ۹-۱ ساختار سه بعدی لیوزیم دیده می شود. همه شکل های این بخش توسط نرم افزار WebLab Viewer pro5 تهیه شده اند. همه ملکول های آب از ساختار ها حذف شده اند تا تصویر واضح تری از آنزیم دیده شود. هم چنین زاویه دید تمامی تصاویر به منظور مقایسه ای بهتر با هم مشابه هستند.

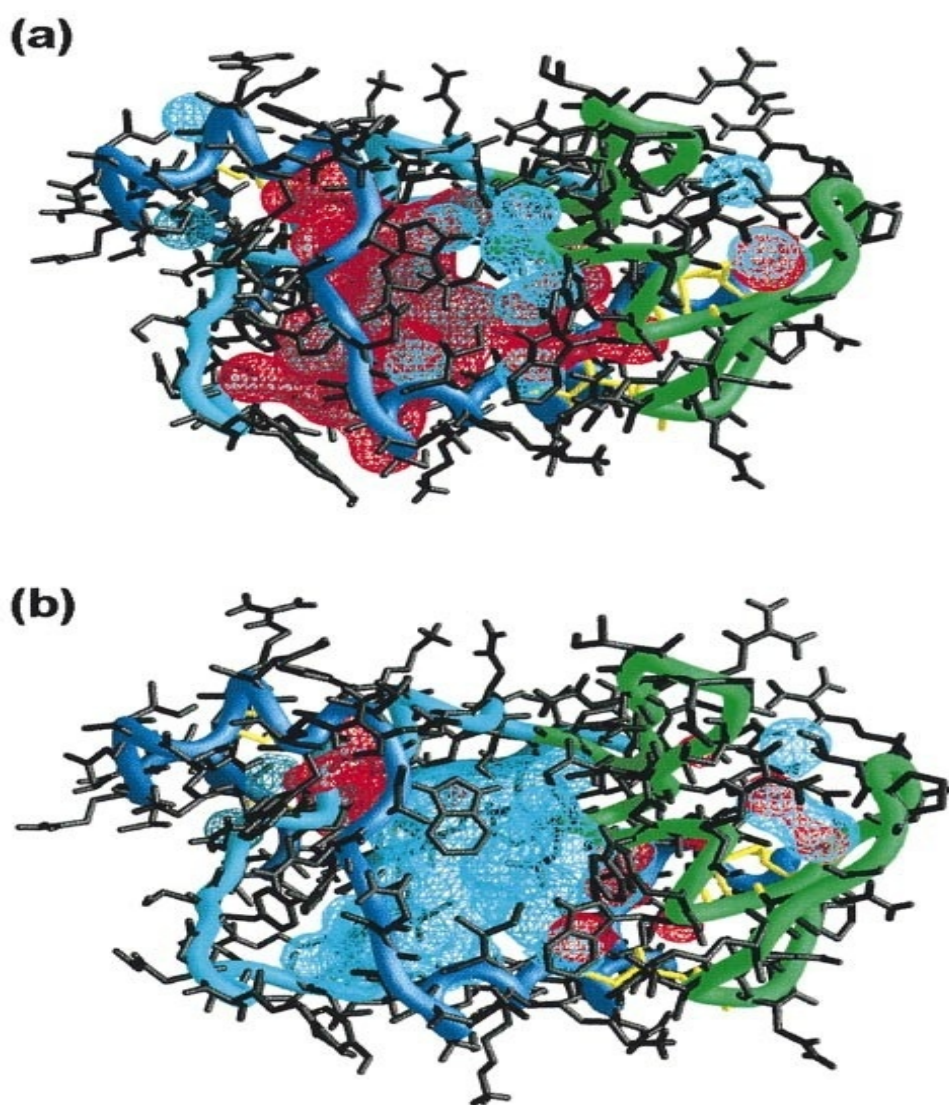


شکل ۹-۱: ساختارهای سه بعدی لیوزیم

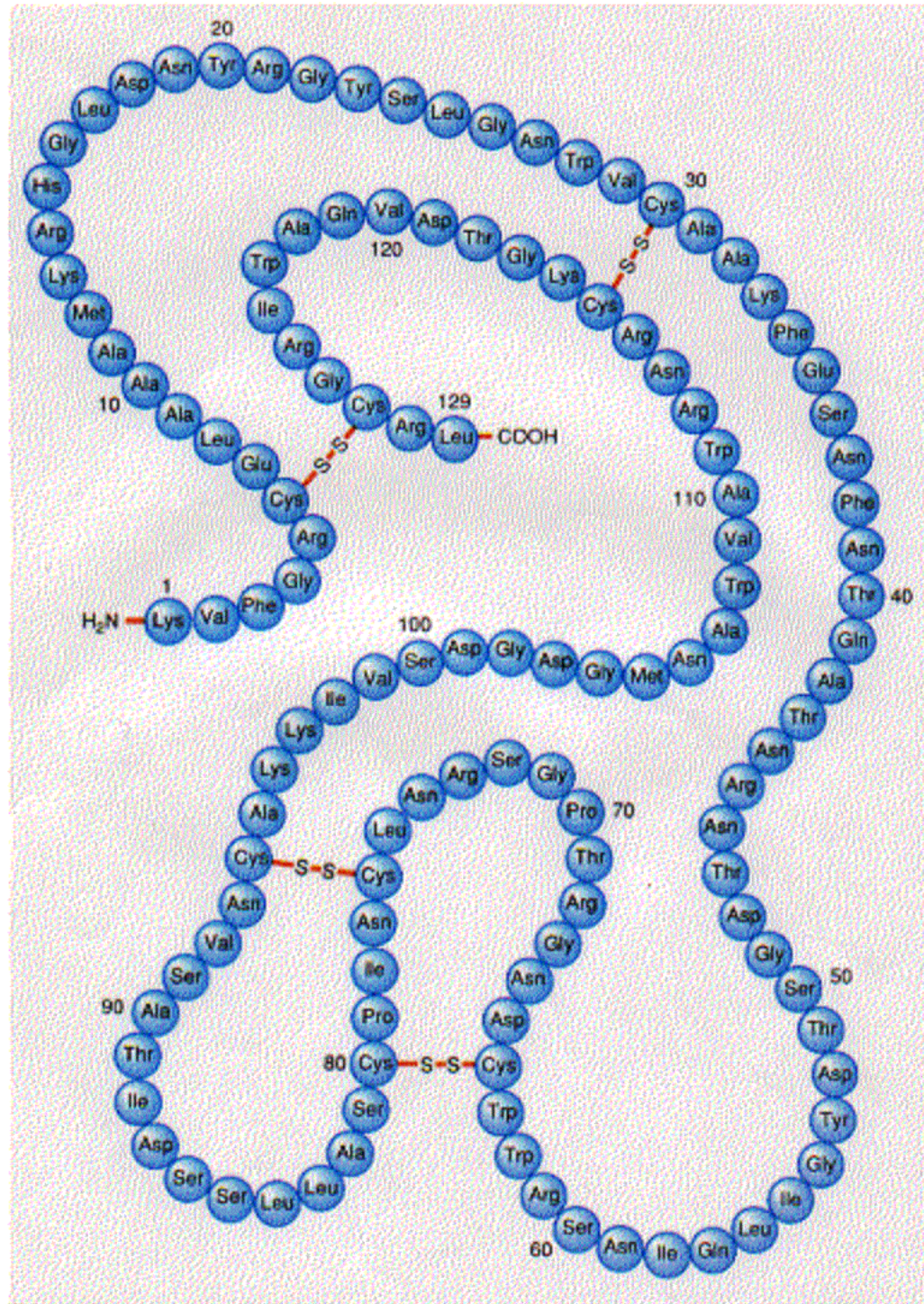
در شکل ۱۰-۱ سطح واندروالس اتم های ساختمان لیوزیم دیده می شود. $-0.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ برای قرمز و $+0.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ برای آبی (Ermakova, 2005).



شکل ۱-۱۰: توزیع نیروی الکترواستاتیک در ساختمان لیزوزیم
در شکل ۱-۱۱ ساختار کریستال لیزوزیم وجود دارد (Williams *et al.*, 1997).



شکل ۱-۱۱: ساختار کریستال لیزوزیم



شکل ۱-۲: توالی اسید آمینه ها در ساختار لیزوزیم

۷-۱- ساختمان لیزوزیم

توالی اسید آمینه های لیزوزیم Gallus gallus شامل اسید آمینه های زیر است (Johnson, 1965):

1 kvfgrcelaa amkrhglidny rgyslgnwvc aakfesnfnt qatnrntdgs tdygilqins
61 rwwcndgrtp gsrnlcnipc sallssdita svncakkivs dgngmnawva wrnrckgt dv
121 qawirgcr l

در شکل ۱-۲ توالی اسید آمینه های لیزوزیم دیده می شود.

در جدول ۱-۲ خصوصیات تک تک اسید آمینه های لیزوزیم آورده شده است این دو جدول توسط نرم افزار WebLab Viewer pro5 تهیه شده است.

جدول ۱-۲: خصوصیات تک تک اسید آمینه های لیزوزیم

ID	Name	Parent	type	1-letter	1-letter&ID	3-letter	Hydropobicity	Ribbon size	Secondary
1	LYS1	A	Lysine	K	K1	Lys	-3.9	0.75	Coil
2	VAL2	A	Valine	V	V2	Val	4.2	0.75	Coil
3	PHE3	A	Phenylalanine	F	F3	Phe	2.8	0.75	Coil
4	GLY4	A	Glycine	G	G4	Gly	-0.4	0.75	Coil
5	ARG5	A	Arginine	R	R5	Arg	-4.5	1.3	Helix
6	CYS6	A	Cysteine	C	C6	Cys	2.5	1.3	Helix
7	GLU7	A	GlutamicAcid	E	E7	Glu	-3.5	1.3	Helix
8	LEU8	A	Leucine	L	L8	Leu	3.8	1.3	Helix
9	ALA9	A	Alanine	A	A9	Ala	1.8	1.3	Helix
10	ALA10	A	Alanine	A	A10	Ala	1.8	1.3	Helix
11	ALA11	A	Alanine	A	A11	Ala	1.8	1.3	Helix
12	MET12	A	Methionine	M	M12	Met	1.9	1.3	Helix
13	LYS13	A	Lysine	K	K13	Lys	-3.9	1.3	Helix
14	ARG14	A	Arginine	R	R14	Arg	-4.5	1.3	Helix
15	HIS15	A	Histidine	H	H15	His	-3.2	0.22	Turn
16	GLY16	A	Glycine	G	G16	Gly	-0.4	0.22	Turn
17	LEU17	A	Leucine	L	L17	Leu	3.8	0.75	Coil
18	ASP18	A	AsparticAcid	D	D18	Asp	-3.5	0.22	Turn
19	ASN19	A	Asparagine	N	N19	Asn	-3.5	0.22	Turn
20	TYR20	A	Tyrosine	Y	Y20	Tyr	-1.3	1.3	Helix
21	ARG21	A	Arginine	R	R21	Arg	-4.5	1.3	Helix
22	GLY22	A	Glycine	G	G22	Gly	-0.4	1.3	Helix
23	TYR23	A	Tyrosine	Y	Y23	Tyr	-1.3	0.75	Coil

ID	Name	Parent	type	1-letter	1-letter&ID	3-letter	Hydropobicity	Ribbon size	Secondary
24	SER24	A	Serine	S	S24	Ser	-0.8	0.75	Coil
25	LEU25	A	Leucine	L	L25	Leu	3.8	1.3	Helix
26	GLY26	A	Glycine	G	G26	Gly	-0.4	1.3	Helix
27	ASN27	A	Asparagine	N	N27	Asn	-3.5	1.3	Helix
28	TRP28	A	Tryptophan	W	W28	Trp	-0.9	1.3	Helix
29	VAL29	A	Valine	V	V29	Val	4.2	1.3	Helix
30	CYS30	A	Cysteine	C	C30	Cys	2.5	1.3	Helix
31	ALA31	A	Alanine	A	A31	Ala	1.8	1.3	Helix
32	ALA32	A	Alanine	A	A32	Ala	1.8	1.3	Helix
33	LYS33	A	Lysine	K	K33	Lys	-3.9	1.3	Helix
34	PHE34	A	Phenylalanine	F	F34	Phe	2.8	1.3	Helix
35	GLU35	A	GlutamicAcid	E	E35	Glu	-3.5	1.3	Helix
36	SER36	A	Serine	S	S36	Ser	-0.8	1.3	Helix
37	ASN37	A	Asparagine	N	N37	Asn	-3.5	0.22	Turn
38	PHE38	A	Phenylalanine	F	F38	Phe	2.8	0.22	Turn
39	ASN39	A	Asparagine	N	N39	Asn	-3.5	0.75	Coil
40	THR40	A	Threonine	T	T40	Thr	-0.7	0.22	Turn
41	GLN41	A	Glutamine	Q	Q41	Gln	-3.5	0.22	Turn
42	ALA42	A	Alanine	A	A42	Ala	1.8	0.75	Coil
43	THR43	A	Threonine	T	T43	Thr	-0.7	1.3	Sheet
44	ASN44	A	Asparagine	N	N44	Asn	-3.5	1.3	Sheet
45	ARG45	A	Arginine	R	R45	Arg	-4.5	1.3	Sheet
46	ASN46	A	Asparagine	N	N46	Asn	-3.5	0.75	Coil
47	THR47	A	Threonine	T	T47	Thr	-0.7	0.22	Turn
48	ASP48	A	AsparticAcid	D	D48	Asp	-3.5	0.22	Turn
49	GLY49	A	Glycine	G	G49	Gly	-0.4	0.75	Coil
50	SER50	A	Serine	S	S50	Ser	-0.8	0.75	Coil
51	THR51	A	Threonine	T	T51	Thr	-0.7	1.3	Sheet
52	ASP52	A	AsparticAcid	D	D52	Asp	-3.5	1.3	Sheet
53	TYR53	A	Tyrosine	Y	Y53	Tyr	-1.3	1.3	Sheet
54	GLY54	A	Glycine	G	G54	Gly	-0.4	0.22	Turn
55	ILE55	A	Isoleucine	I	I55	Ile	4.5	0.22	Turn
56	LEU56	A	Leucine	L	L56	Leu	3.8	0.22	Turn
57	GLN57	A	Glutamine	Q	Q57	Gln	-3.5	0.22	Turn
58	ILE58	A	Isoleucine	I	I58	Ile	4.5	1.3	Sheet
59	ASN59	A	Asparagine	N	N59	Asn	-3.5	1.3	Sheet
60	SER60	A	Serine	S	S60	Ser	-0.8	0.22	Turn
61	ARG61	A	Arginine	R	R61	Arg	-4.5	0.22	Turn
62	TRP62	A	Tryptophan	W	W62	Trp	-0.9	0.22	Turn
63	TRP63	A	Tryptophan	W	W63	Trp	-0.9	0.22	Turn

ID	Name	Parent	type	1-letter	1-letter&ID	3-letter	Hydropobicity	Ribbon size	Secondary
64	CYS64	A	Cysteine	C	C64	Cys	2.5	0.75	Coil
65	ASN65	A	Asparagine	N	N65	Asn	-3.5	0.75	Coil
66	ASP66	A	AsparticAcid	D	D66	Asp	-3.5	0.75	Coil
67	GLY67	A	Glycine	G	G67	Gly	-0.4	0.75	Coil
68	ARG68	A	Arginine	R	R68	Arg	-4.5	0.75	Coil
69	THR69	A	Threonine	T	T69	Thr	-0.7	0.75	Coil
70	PRO70	A	Proline	P	P70	Pro	-1.6	0.22	Turn
71	GLY71	A	Glycine	G	G71	Gly	-0.4	0.22	Turn
72	SER72	A	Serine	S	S72	Ser	-0.8	0.75	Coil
73	ARG73	A	Arginine	R	R73	Arg	-4.5	0.75	Coil
74	ASN74	A	Asparagine	N	N74	Asn	-3.5	0.75	Coil
75	LEU75	A	Leucine	L	L75	Leu	3.8	0.22	Turn
76	CYS76	A	Cysteine	C	C76	Cys	2.5	0.22	Turn
77	ASN77	A	Asparagine	N	N77	Asn	-3.5	0.75	Coil
78	ILE78	A	Isoleucine	I	I78	Ile	4.5	0.75	Coil
79	PRO79	A	Proline	P	P79	Pro	-1.6	0.75	Coil
80	CYS80	A	Cysteine	C	C80	Cys	2.5	1.3	Helix
81	SER81	A	Serine	S	S81	Ser	-0.8	1.3	Helix
82	ALA82	A	Alanine	A	A82	Ala	1.8	1.3	Helix
83	LEU83	A	Leucine	L	L83	Leu	3.8	1.3	Helix
84	LEU84	A	Leucine	L	L84	Leu	3.8	1.3	Helix
85	SER85	A	Serine	S	S85	Ser	-0.8	0.75	Coil
86	SER86	A	Serine	S	S86	Ser	-0.8	0.75	Coil
87	ASP87	A	AsparticAcid	D	D87	Asp	-3.5	0.75	Coil
88	ILE88	A	Isoleucine	I	I88	Ile	4.5	0.22	Turn
89	THR89	A	Threonine	T	T89	Thr	-0.7	1.3	Helix
90	ALA90	A	Alanine	A	A90	Ala	1.8	1.3	Helix
91	SER91	A	Serine	S	S91	Ser	-0.8	1.3	Helix
92	VAL92	A	Valine	V	V92	Val	4.2	1.3	Helix
93	ASN93	A	Asparagine	N	N93	Asn	-3.5	1.3	Helix
94	CYS94	A	Cysteine	C	C94	Cys	2.5	1.3	Helix
95	ALA95	A	Alanine	A	A95	Ala	1.8	1.3	Helix
96	LYS96	A	Lysine	K	K96	Lys	-3.9	1.3	Helix
97	LYS97	A	Lysine	K	K97	Lys	-3.9	1.3	Helix
98	ILE98	A	Isoleucine	I	I98	Ile	4.5	1.3	Helix
99	VAL99	A	Valine	V	V99	Val	4.2	1.3	Helix
100	SER100	A	Serine	S	S100	Ser	-0.8	0.22	Turn
101	ASP101	A	AsparticAcid	D	D101	Asp	-3.5	0.75	Coil
102	GLY102	A	Glycine	G	G102	Gly	-0.4	0.75	Coil
103	ASN103	A	Asparagine	N	N103	Asn	-3.5	0.75	Coil

ID	Name	Parent	type	1-letter	1-letter&ID	3-letter	Hydropobicity	Ribbon size	Secondary
104	GLY104	A	Glycine	G	G104	Gly	-0.4	1.3	Helix
105	MET105	A	Methionine	M	M105	Met	1.9	1.3	Helix
106	ASN106	A	Asparagine	N	N106	Asn	-3.5	1.3	Helix
107	ALA107	A	Alanine	A	A107	Ala	1.8	1.3	Helix
108	TRP108	A	Tryptophan	W	W108	Trp	-0.9	0.75	Coil
109	VAL109	A	Valine	V	V109	Val	4.2	1.3	Helix
110	ALA110	A	Alanine	A	A110	Ala	1.8	1.3	Helix
111	TRP111	A	Tryptophan	W	W111	Trp	-0.9	1.3	Helix
112	ARG112	A	Arginine	R	R112	Arg	-4.5	1.3	Helix
113	ASN113	A	Asparagine	N	N113	Asn	-3.5	1.3	Helix
114	ARG114	A	Arginine	R	R114	Arg	-4.5	1.3	Helix
115	CYS115	A	Cysteine	C	C115	Cys	2.5	0.22	Turn
116	LYS116	A	Lysine	K	K116	Lys	-3.9	0.22	Turn
117	GLY117	A	Glycine	G	G117	Gly	-0.4	0.22	Turn
118	THR118	A	Threonine	T	T118	Thr	-0.7	0.75	Coil
119	ASP119	A	AsparticAcid	D	D119	Asp	-3.5	0.75	Coil
120	VAL120	A	Valine	V	V120	Val	4.2	1.3	Helix
121	GLN121	A	Glutamine	Q	Q121	Gln	-3.5	1.3	Helix
122	ALA122	A	Alanine	A	A122	Ala	1.8	1.3	Helix
123	TRP123	A	Tryptophan	W	W123	Trp	-0.9	1.3	Helix
124	ILE124	A	Isoleucine	I	I124	Ile	4.5	1.3	Helix
125	ARG125	A	Arginine	R	R125	Arg	-4.5	0.22	Turn
126	GLY126	A	Glycine	G	G126	Gly	-0.4	0.22	Turn
127	CYS127	A	Cysteine	C	C127	Cys	2.5	0.75	Coil
128	ARG128	A	Arginine	R	R128	Arg	-4.5	0.75	Coil
129	LEU129	A	Leucine	L	L129	Leu	3.8	0.75	Coil

مناطق هلیکس و شیت آنزیم لیزوزیم در جدول ۱-۳ مشخص شده اند (۲۰۰۱, □□□□□□□□):

جدول ۱-۳: مناطق هلیکس و شیت آنزیم لیزوزیم

Structure	Region	Type	Residue	Number	Percentage
هلیکس	A	A	۵-۱۵	۱۱	۸/۵
	B	A	۲۴-۳۴	۱۱	۸/۵
	C	3.0 ₁₀	۸۰-۸۵	۶	۵
	D	A	۸۸-۹۶	9	۷
کل هلیکس ها				۳۷	۲۹
صفحات	E	ناموازی	۴۱-۵۴	۱۴	۱۱
کل هلیکس ها + صفحات				۵۱	۴۰

هلیکس A و B توسط یک لوپ شامل ریشه های ۱۶-۲۳ به هم متصل می شوند.

۸-۱- انواع لیزوزیم

این آنزیم در سه نوع: جوجه ای، غازی و باکتری خوار طبقه بندی شده است. انواع دیگری از لیزوزیم هم در گیاهان، باکتری ها دیده شده است. در مجموع لیزوزیم نوع جوجه ای در یک دامنه وسیعی از ماهی ها تا پستانداران و هم چنین در حشرات وجود دارد (Yan et al., 2008; Ponkham et al., 2010). ساختمان اولیه لیزوزیم سفیده تخم مرغ یک منبع معمول برای مطالعات توالی در مورد این گروه از پروتئین ها است (Menendez-Arias et al., 1985). دو لیزوزیمی که در پرندگان دیده می شوند دارای فعالیت مشابه موکوپپتید ان استیل موراموئیدرولاز هستند. ولی دارای وزن ملکولی مشابه و یا فعالیت ایمونولوژیکی مشابهی نیستند (Simpson and Morgan, 1983). لیزوزیم های نوع جوجه ای توسط توانایی لیز دیواره سلولی *Micrococcus luteus*، پایداری گرمایی و pH اسیدی، وزن ملکولی پایین و داشتن pI بالا که باعث ناپایداری شان در این pH ها می شود شناسایی می شوند (Menendez-Arias et al., 1985). خاصیت لیز کنندگی آنزیم لیزوزیم نسبت به باکتری ها این آنزیم را نسبت به استفاده آن در صنایع داروسازی و غذایی مفید می سازد. هم چنین لیزوزیم در درمان بیماری بواسیر مفید است. هم چنین به عنوان یک ماده اضافه شونده به شیر گاو استفاده می شود تا که آن را بیش تر شبیه به شیر انسان بکند. اخیرا خانواده جدیدی از لیزوزیم ها به نام لیزوزیم شناسایی شده است که متعلق به بی مهره ها است. این نوع از لیزوزیم از لحاظ ساختار اول درمقایسه با سایر لیزوزیم ها تفاوت بسیاری دارد به عنوان مثال تفاوت در تعداد ریشه های سیستمین و نبودن دومین اسید آمینه که در فعالیت کاتالیتیک آنزیم نقش دارد (آسپارتیک اسید) (Thammasirirak et al., 2006; Siritapetawee et al., 2009). به خاطر محتوای بالای اسید آمینه های His, Arg, Lys, Gln, Asn، لیزوزیم نقطه ایزوالکتریک بالایی دارد ($pH_{iso} = 11$). بار خالص لیزوزیم در $pH=7$ مثبت است. لیزوزیم فعالیت های بیولوژیکی بسیاری دارد که شامل فعالیت های ضد میکروبی و فعالیت ضد التهابی، ضد ویروسی، immune modulatory، ضد آلرژی و تومور است. به همین خاطر به طور فراوان در صنایع دارویی و غذایی استفاده می شود. تحقیقات نشان می دهند که اثرات ضد میکروبی لیزوزیم بر علیه باکتری های گرم منفی با اتصال کووالان به پالمتیک اسید افزایش می یابد. فعالیت لیتیک لیزوزیم بر علیه باکتری *Micrococcus lysodeikticus* با افزایش بیش از دو تعداد اتصالات ریشه های پالمیتوئیل برای هر مولکول کمی کاهش می یابد (Behbehani et al., 2009).

۹-۱- لیزوزیم به عنوان یک درمان احتمالی HIV

معمولا داروی موثری بر علیه HIV (Human Immunodeficiency Virus) وجود ندارد، علت این عفونت رتروویروس است که در بدن انسان منجر به بروز سندروم AIDS و یا (Acquired Immunodeficiency Syndrome) می شود. شخص مبتلا دارای سیستم ایمنی تخریب شده ای است و نسبت به شناسایی هر عفونت و ارگانیزی در بدن واکنشی نشان نمی دهد بنابراین معمولا این عفونت ها خیلی خطر ناک هستند. از این گذشته هیچ نوع واکسنی برای این ویروس وجود ندارد. در حال حاضر این عفونت را می توان در وضعیت پاندمیک در نظر گرفت که بیش از ۶٪ از مردم جهان در گیر آن هستند. تلاش های علمی برای متوقف کردن این ویروس یا با شکست مواجه شده است و یا این که خیلی پرهزینه است و بنابراین غیر موثر است. ولی موضوعی که خیلی جلب توجه کرده است وجود یک مکانیسم طبیعی در ارگانیزم انسان برای متوقف کردن این ویروس است. نشان داده شده است که در طی ماه های اول بارداری انتقال HIV-1 از مادر به جنین غیر محتمل و نادر است. دلیل این امر حضور غلظت بالایی از گونادوتروپین جفتی یا (hCG) است. این هورمون برای بارداری خیلی مهم است. فقط زیر واحد بتا پروتئین hCG در غلظت حدود ۱۰۰-۱۰ نانو گرم بر میلی لیتر بر علیه HIV موثر است. پروتئین hCG شامل ۲۳۷ اسید آمینه است با وزن ۳۶/۷ کیلو دالتون. این پروتئین یک گلیکوپروتئین شامل ۲ زنجیره اصلی است. زیر واحد آلفا شامل ۹۲ اسید آمینه شامل ۴ رشته بتا و یک آلفا هلیکس کوتاه است. زیر واحد بتا شامل ۱۴۵ اسید آمینه است که از ۴ رشته بتا تشکیل شده است. آنالیز توالی نشان می دهد که ۱۵ اسید آمینه از N- ترمینال هسته بتا وارد ادرار زنان باردار می شود این قطعه به عنوان لیزوزیم ادراری انسانی و یا لیزوزیم موجود در شیر انسان شناسایی شده است. به علاوه آزمایش ضد-HIV- نشان داده است که هسته بتا اولیه می تواند به سه بخش اصلی تقسیم شود. لیزوزوم با فعالیت ضد-HIV و قطعه خالص هسته بتا از hCG بدون فعالیت ضد-HIV است. مقایسه فعالیت لیزوزیم ادراری انسانی با لیزوزوم های موجود در سفیده تخم مرغ نشان داده است که دارای فعالیت مشابهی نسبت به این ویروس هستند. با این وجود هنوز جزییات این مکانیسم مشخص نیست (Tsuchiya et al., 2004).

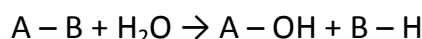
۱۰-۱- کریستاله کردن لیزوزیم های موجود در سفیده تخم مرغ

روش های متعددی برای کریستاله کردن لیزوزوم های موجود در سفیده تخم مرغ وجود دارد. به منظور جلوگیری از آلودگی قارچی و باکتریایی در حین کار بهتر است که W/V ۰/۰۲٪ سدیم آزید به تمامی محلول های مورد استفاده اضافه شود. دو تکنیک اصلی در فرایند کریستاله کردن وجود دارد که در مورد اکثر پروتئین ها قابل استفاده است. این دو روش شامل hanging drop و sitting drop هستند. تفاوت این دو روش فقط در

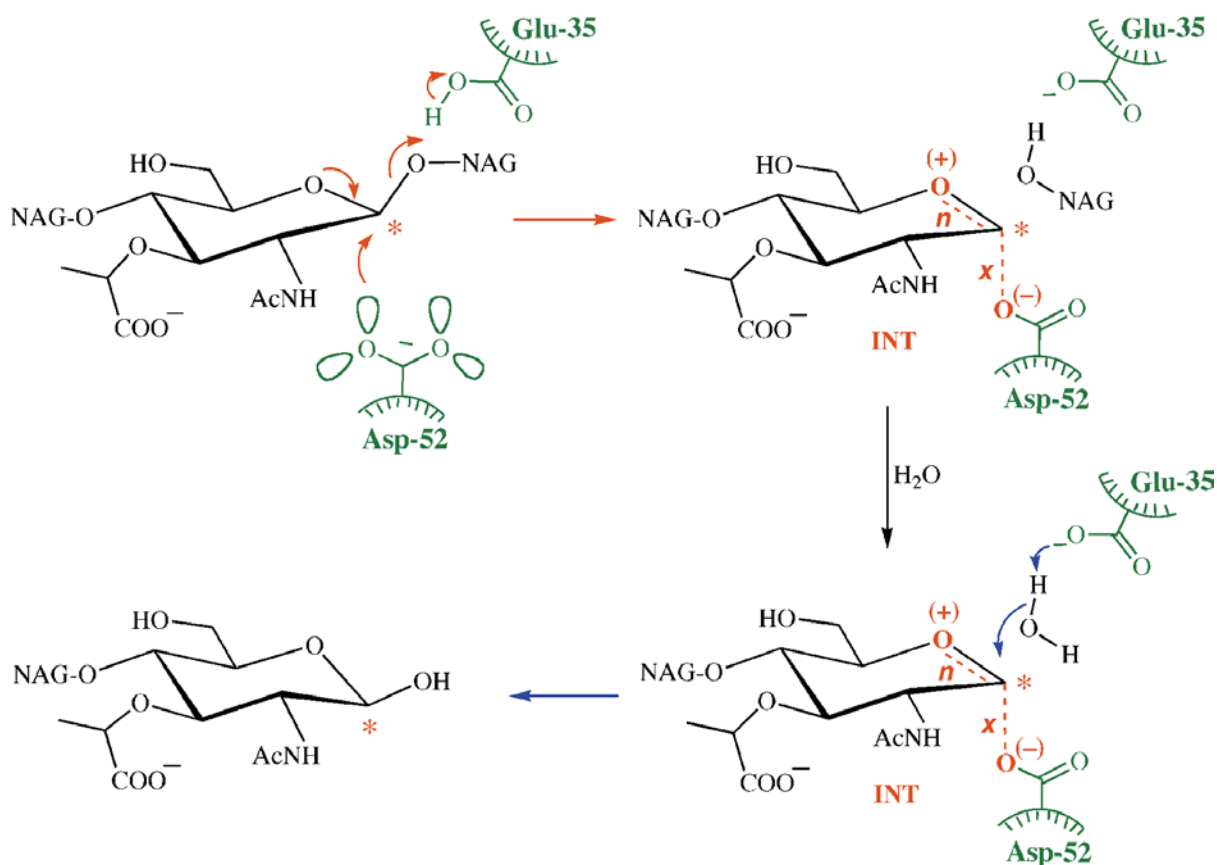
حجمی از پروتئین که برای رشد کریستال ها استفاده می شود است. برای روش hanging drop میانگین حجم حدود ۱-۵ میکرولیتر است ولی برای روش sitting drop ۱۰-۲۰ میکرولیتر است.

۱۱-۱- مکانیسم لیزوزیم

لیزوزیم متعلق به گروه آنزیمی هیدرولاز ها (EC:3,-,-) است. هیدرولاز ها هیدرولیز یا شکافت هیدرولیتیک پیوند های شیمیایی را توسط واکنش های زیر کاتالیز می کنند.

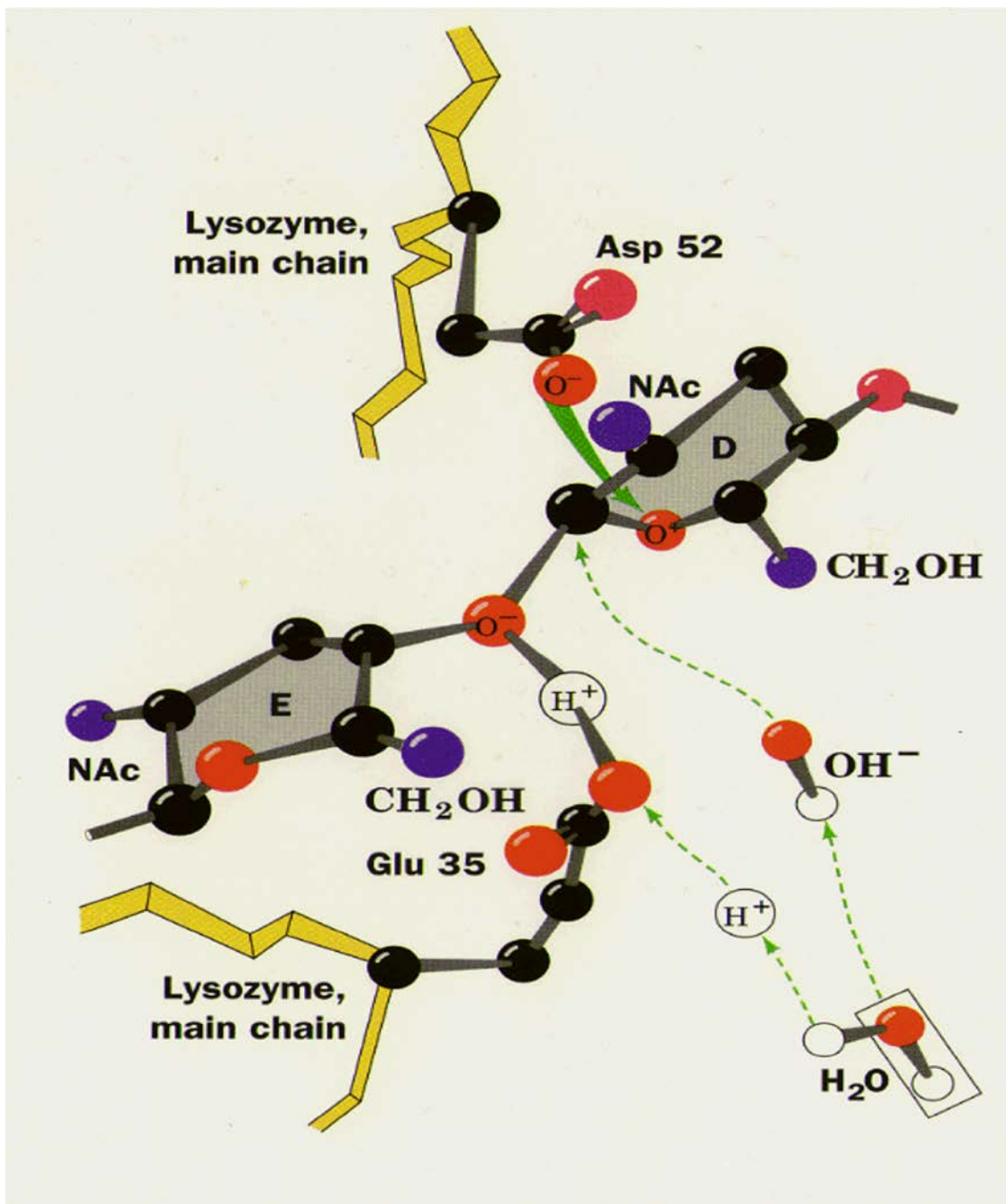


این کلاس از آنزیم ها معمولا به طور طبیعی از پیوند هیدرولیز شده و سپس توسط ماهیت شیمیایی سوپسترا و در نهایت توسط آنزیم دسته بندی می شوند. از این رو نام سیستماتیک برای هیدرولاز ها همواره شامل hydrolase می شود که پیشنهاد دهنده این است که از سوپسترا به علاوه پسوند -ase تشکیل شده است. درون کلاس هیدرولازها لیزوزیم متعلق به خانواده گلیکوزیداز با (EC 3.2.-.-) است. واکنش لیزوزیم شامل هیدرولیز پیوند بتا گلیکوزیدیک (1-4) بین ریشه های ان استیل گلوکوز آمین قندی (NAG) و ان استیل مورامیک اسید قندی (NAM) است. و بنابراین به عنوان گلیکوزیداز طبقه بندی می شود به عنوان مثال آنزیم های هیدرولیز کننده O- and S-glycosyl با (EC 3.2.1.-) همراه با عدد ۱۷ در این گروه قرار می گیرند. واکنش لیزوزیم شامل هیدرولیز پیوند بتا گلیکوزیدیک (1-4) بین ریشه های ان استیل گلوکوز آمین قندی (NAG) و ان استیل مورامیک اسید قندی (NAM) است که در شکل دور آن دایره کشیده شده است. این واکنش در جایگاه فعال یا active site لیزوزیم که یک شکاف عمیق و بزرگ است صورت می گیرد (residues Glu35 and Asp52 for chicken egg white Lysozyme enzyme). این شکاف از ویژگی های بالای جایگاه فعال لیزوزیم است و می تواند فقط ۶ حلقه قند از زنجیره پلی ساکاریدی به آن متصل شود و به زیر واحد های دی ساکاریدی و تترا ساکاریدی هیدرولیز شوند. دو مکانیسم برای عمل لیزوزیم پیشنهاد شده است: (۱) جانشین سازی دوتایی که در ان گروه کربوکسیلات از Asp 52 در مرحله اول به عنوان یک نوکلئوفیل عمل می کند تا واسطه آنزیم های گلیکوزیلی را در هماهنگ با واکنش نوع S_N2 بسازد. لازم است تا وارونگی configuration رخ دهد و سپس خودش توسط آب در مرحله دوم جایگزین گردد. دومین وارونگی configuration اولیه را برمی گرداند. (۲) مکانیسم دوم یک فرایند تجزیه کننده از نوع S_N1 است.



شکل ۱-۳: مکانیسم عمل لیزوزیم

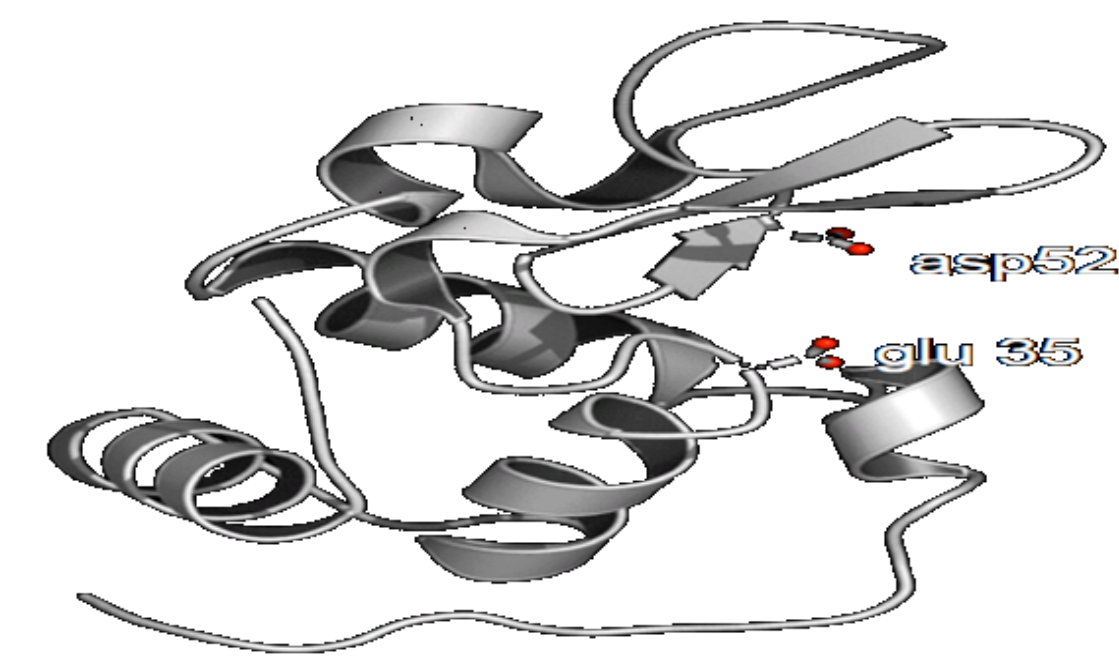
گروه 4-OH از یک ریشه ان استیل گلوکوزآمین (NAG) توسط گروه COOH اسید آمینه Glu 35 پروتونه می شود و بنابراین از ریشه قند جدا می شود. X و N نشان دهنده exo and endo هستند. و به طور حقیقی فقط یکی از آن ها در آن واحد در هر کدام از واسطه ها حضور خواهد داشت. X مربوط به مکانیسم اول است و N مربوط به مکانیسم دوم می شود (Strynadka and James, 1991; Kirby, 2001).



شکل ۱-۱۴: مکانیسم شیمیایی لیزوزیم

مکانیسم شیمیایی لیزوزیم: (ریشه Asp 52 نشان داده شده برای لیزوزیم موجود در سفیده تخم مرغ معادل Asp 53 در آنزیم انسانی است). این آنزیم از مکانیسم فیلپس پیروی می کند. شکستن پیوند گلیکوزیدی بین

حلقه های D و E سوبسترا از طریق پروتوناسیون اتم پل اکسیژنی توسط Glu 35 انجام می شود. در نتیجه یون اکسونیوم حلقه D توسط مجاورت گروه کربوکسیلات Asp 52 پایدار می شود و آنزیم شکسته شدن حلقه D را القاء می کند. در ادامه حلقه E آزاد می شود، OH^- که با یون اکسونیوم ترکیب می شود و H^+ که باعث پروتونه شدن مجدد ریشه Glu 35 از آب می شود. حالت انتقال یون اکسونیوم حلقه D در واکنش لیزوزیم توسط رزونانس پایدار می شود. به این منظور نیاز است که اتم های C1 و C2 و اتم O5 در یک صفحه باشند (بخش سایه خورده). و حلقه هگزوز در حالت آرایش فضایی half-chair در نظر گرفته شود (Voet, 1995). شکل های ۱-۱۳ و ۱-۱۴ شمایی از مکانیسم شیمیایی لیزوزیم هستند. شکل ۱-۱۵ نشان دهنده اکتیو سایت آنزیم است.



شکل ۱-۱۵: جایگاه فعال لیزوزیم

۱-۱۲- فناوری نانو:

فناوری نانو واژه‌ای است کلی که به تمام فناوری‌های پیشرفته در عرصه کار بامقیاس نانو اطلاق می‌شود. معمولاً منظور از مقیاس نانو ابعادی در حدود ۱ nm تا ۱۰۰ nm است (۱ نانو متر یک میلیاردیم متر است). نانو تکنولوژی عبارت است از مطالعه، طراحی، تولید و کاربرد هر ماده، ابزار و مجموعه‌ای در مقیاس نانومتر که منجر به تولید مواد، ابزار و ساختارهایی با حداقل یک خصوصیت ویژه گردد (Cao, 2004). تعریف فناوری نانو از منابع مختلف

یک نانومتر یک هزارم میکرون است و اگر بخواهیم احساس فیزیکی نسبت به آن داشته باشیم می‌توان گفت که یک نانومتر ۸۰۰۰۰ / قطر موی انسان است. اما این تعریف مقیاس نانو، نمی‌تواند مقایسه درستی باشد چرا که ضخامت موی انسان با توجه خصوصیات فردی هرانسان از چند ده میکرومتر تا چند صد میکرو متر متغیر است. بنابراین نیاز به یک استاندارد برای بیان مفهوم مقیاس نانو وجود دارد. با ایجاد ارتباط میان اندازه اتم‌ها و مقیاس نانو می‌توان یک نانومتر را راحت‌تر تصور کرد. یک نانومتر برابر قطر ۱۰ اتم هیدروژن و یا ۵ اتم سیلیسیم است. درک این موضوع برای افراد معمولی نیز راحت‌تر است. علی‌رغم اینکه درک اندازه یک اتم برای افراد غیرعلمی ساده

نیست، با این حال اندازه دقیق اتم برای فهماندن این مقیاس زیاد اهمیت ندارد. چیزی که با این تشابه مشخص می‌شود، این است که نانو فناوری عبارت است از:

فناوری نانو فناوری است که بر پایه دست کاری تک‌تک اتم ها و مولکول ها استوار است بدین منظور که به توان ساختاری پیچیده را با خصوصیات اتمی تولید کرد. تعریف فناوری نانو: توسعه و استفاده از ادوات و قطعاتی که اندازه آنها تنها چند نانومتر است. تحقیق بر روی قطعات و ادوات بسیار کوچک که خواص شان به خواص الکترونیکی این قطعات وابسته است و خواص الکتریکی آن ها احتمالاً متأثر از حرکت تعداد معدودی الکترون در طی عملکرد قطعه می‌باشد. این ادوات، سریع‌تر از ادوات بزرگ تر عمل می‌کنند. مسأله قابل توجه این است که می‌توان چنین ساختارهای در ابعاد مولکولی را به کمک انتخاب مناسب مراحل واکنش‌های شیمیایی تولید کرد. هم چنین می‌توان چنین ساختارهایی را از طریق دست کاری اتم ها روی سطح به وسیله میکروسکوپ‌های نیروی اتمی به دست آورد. شاخه‌ای از علوم که هدف نهایی آن کنترل بر روی تک‌تک اتم ها و مولکول ها است تا بتوان به کمک آن تراشه‌های کامپیوتری و سایر ادواتی تولید کرد که هزاران بار کوچک تر از ادوات فعلی باشند که فناوری امروز امکان ساخت آن ها را برای ما فراهم آورده است. در فناوری فعلی تولید مدارات نیمه هادی از روش لیتوگرافی برای ایجاد طرح مدار بر روی مواد نیمه هادی استفاده می‌شود. پیشرفت شگرفی که در لیتوگرافی طی ۲ دهه اخیر رخ داده است به ما این امکان را می‌دهد که با بهره‌گیری از دستگاه های جدید بتوانیم مداراتی کوچک تر از ۱ میکرون (۱۰۰۰ نانومتر) را تولید کنیم. البته باید توجه داشت که این مدارات هنوز از میلیون ها اتم تشکیل شده‌اند. بیش تر دانشمندان بر این باور هستند که لیتوگرافی به مرز های محدودکننده فیزیکی خود نزدیک شده است. بنابر این برای کوچک تر کردن اندازه نیمه هادی ها می‌بایست از فناوری‌های جدیدی که می‌توانند تک‌تک اتم ها را سازماندهی کنند، استفاده کرد و طبعاً چنین فناوری جزء محدوده فناوری نانو محسوب می‌شود. اگر چه تحقیق در زمینه فناوری نانو به زمانی باز می‌گردد که ریچارد پی فاینمن طی سخنرانی کلاسیک خود در سال ۱۹۵۹ به این فناوری اشاره کرد اما عبارت فناوری نانو اولین بار توسط کی‌اریک درکسلر در سال ۱۹۸۶ در کتابی از وی با عنوان موتورهای آفرینش بسط داده شد. در مقالات و نوشته های عمومی واژه فناوری نانو گاهی به هر فرآیند کوچک تر از اندازه‌های میکرون اطلاق می‌گردد که می‌تواند فرآیند لیتوگرافی را نیز شامل شود. به خاطر همین بسیاری از دانشمندان هنگامی که می‌خواهند درباره فناوری نانو به معنی واقعی و علمی کلمه صحبت کنند از آن به عنوان فناوری نانومولکولی یاد می‌کنند که به معنی فناوری نانو در ابعاد مولکولی می‌باشد. فناوری نانو که گاه به آن فناوری ساخت مولکولی نیز گفته می‌شود، شاخه‌ای از مهندسی است که با طراحی و ساخت مدارات الکترونیکی و ادوات مکانیکی بسیار کوچک (در ابعاد مولکولی) سر و کار دارد. پژوهشگاه فناوری نانو انگلستان تعریف فناوری نانو را بدین گونه بیان می‌کند: قلمروی از علم و فناوری که به ابعاد و تلورانس‌های

۰/۱ تا ۱۰۰ نانو متر می‌پردازد در جایی که این ابعاد و یا تلورانس‌ها بتوانند نقش مهمی در خواص قطعه ایفاء کنند. بحث فناوری نانو اغلب مشابه بحث سیستم‌های میکرو مکانیکی - الکترونیکی می‌باشد (MEMS). در واقع فناوری نانو زیر مجموعه MEMS است و MEMS به فناوری‌های بزرگ‌تر از ابعاد مولکولی (ابعاد نانو) نیز می‌پردازد.

۱-۱۳- نانو تکنولوژی چیست؟

در حالی که تعاریف زیادی برای فناوری نانو وجود دارد، NNI تعریفی را برای فناوری نانو ارائه می‌دهد که در برگیرنده هر سه تعریف ذیل باشد.

۱. توسعه فناوری و تحقیقات در سطوح اتمی، مولکولی و یا ماکرو مولکولی در مقیاس اندازه ای ۱ تا ۱۰۰ نانومتر.
۲. خلق و استفاده از ساختارها و سیستم‌هایی که به خاطر اندازه کوچک یا حد میانه آن‌ها، خواص و عملکرد نوینی دارند
۳. توانایی کنترل یا دست کاری در سطوح اتمی.

عناصر پایه در فناوری نانو تفاوت اصلی فناوری نانو با فناوری‌های دیگر در مقیاس مواد و ساختارهایی است که در این فناوری مورد استفاده قرار می‌گیرند. البته تنها کوچک بودن اندازه مد نظر نیست؛ بلکه زمانی که اندازه مواد در این مقیاس قرار می‌گیرد، خصوصیات ذاتی آن‌ها از جمله رنگ، استحکام، مقاومت خوردگی و ... تغییر می‌یابد. در حقیقت اگر بخواهیم تفاوت این فناوری را با فناوری‌های دیگر به صورت قابل ارزیابی بیان نماییم، می‌توانیم وجود "عناصر پایه" را به عنوان یک معیار ذکر کنیم. عناصر پایه در حقیقت همان عناصر نانومقیاسی هستند که خواص آن‌ها در حالت نانومقیاس با خواص‌شان در مقیاس بزرگ‌تر فرق می‌کند. اولین و مهم‌ترین عنصر پایه، نانوذره است. منظور از نانوذره، همان گونه که از نام آن مشخص است، ذراتی با ابعاد نانومتری در هر سه بعد است. نانوذرات می‌توانند از مواد مختلفی تشکیل شوند، مانند نانوذرات فلزی، سرامیکی، ... دومین عنصر پایه، نانوکپسول است. همان طوری که از اسم آن مشخص است، کپسول‌های هستند که قطر نانومتری دارند و می‌توان مواد مورد نظر را درون آن‌ها قرار داد و کپسوله کرد. سال‌هاست که نانوکپسول‌ها در طبیعت تولید می‌شوند؛ مولکول‌های موسوم به فسفولیپیدها که یک سر آن‌ها آب‌گریز و سر دیگر آن‌ها آب‌دوست است، وقتی در محیط آبی قرار می‌گیرند، خود به خود کپسول‌هایی را تشکیل می‌دهند که قسمت‌های آب‌گریز مولکول در درون آن‌ها واقع می‌شود و از تماس با آب محافظت می‌شود. حالت برعکس نیز قابل تصور است. عنصر پایه بعدی نانولوله کربنی است. این عنصر پایه در سال ۱۹۹۱ در شرکت NEC کشف شدند و در حقیقت لوله‌هایی از گرافیت می‌باشند. اگر صفحات گرافیت را پیچیده و به شکل لوله در بیاوریم، به نانولوله‌های کربنی می‌رسیم. این نانولوله‌ها

دارای اشکال و اندازه های مختلفی هستند و می توانند تک دیواره یا چند دیواره باشند. این لوله ها خواص بسیار جالبی دارند که منجر به ایجاد کاربرد های جالب توجهی از آن ها می شود.

۱-۱۴- روش های ساخت عناصر پایه

به طور کلی عناصر پایه با دو رویکرد «بالا به پایین» و «پایین به بالا» قابل ساخت می باشند. در رویکرد بالا به پایین برای تولید محصول، یک ماده توده ای را شکل دهی و اصلاح می کنند. در حقیقت در این روش، یک ماده بزرگ را برمی داریم و با کاهش ابعاد و شکل دهی آن، به یک محصول با ابعاد نانو می رسیم. به عبارت دیگر، اگر اندازه یک ماده توده ای را به طور متناوب کاهش دهیم تا به یک ماده با ابعاد نانومتری برسیم، از رویکرد بالا به پایین استفاده کرده ایم. این کار اغلب و نه همیشه شامل حذف بعضی از مواد به شکل ضایعات است، مثل ماشین کاری یک بخش فلزی از یک موتور یا نانو ساختاری کردن فلزات به طریق تغییر شکل دهی (که شامل ضایعات نیست). رویکرد پایین به بالا درست عکس رویکرد بالا به پایین می باشد. در این رویکرد، محصول از طریق کنار هم قراردادن مواد ساده تر به وجود می آید، مانند ساخت یک موتور از قطعات آن. در حقیقت کاری که در اینجا انجام می شود، کنار هم قرار دادن اتم ها و مولکول ها (که ابعاد کوچک تر از مقیاس نانو دارند) برای ساخت یک محصول نانومتری است. تصور کنید که قادریم اتم ها و مولکول ها را به طور واقعی ببینیم و آن ها را به طور دلخواه کنار هم قرار دهیم تا شکل مورد نظر حاصل شود. معمولاً روش های پایین به بالا ضایعاتی ندارند؛ هر چند الزاماً این مسأله صادق نیست. هر کدام از این رویکرد های ساخت عناصر پایه، روش های مختلفی را شامل می شوند.

۱-۱۵- کاربردهای فناوری نانو

در حقیقت کاربرد فناوری نانو از کاربرد عناصر پایه نشأت می گیرد. هر کدام از این عناصر پایه، ویژگی های خاصی دارند که استفاده از آن ها در زمینه های مختلف، موجب ایجاد خواص جالبی می گردد. مثلاً از جمله کاربردهای نانوذرات می توان به دارو رسانی هدفمند و ساده، بانداژهای بی نیاز از تجدید، شناسایی زود هنگام و بی ضرر سلول های سرطانی، و تجزیه آلاینده های محیط زیست اشاره کرد. همچنین نانو لوله های کربنی دارای کاربردهای متنوعی می باشند که موارد زیر را می توان ذکر کرد:

۱. تصویر برداری زیستی دقیق
۲. حسگرهای شیمیایی و زیستی قابل اطمینان و دارای عمر طولانی
۳. شناسایی و جداسازی کاملاً اختصاصی DNA
۴. ژن درمانی که از طریق انتقال ژن به درون سلول توسط نانولوله ها صورت می پذیرد.
۵. از بین بردن باکتری ها

از دیگر کاربردهای نانومواد می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

- **محصولات آرایشی و کرم‌های ضدآفتاب:** نانوذرات دی اکسید تیتانیوم و اکسید روی در کرم‌های ضدآفتاب مورد استفاده قرار می‌گیرند، این نانو ذرات باعث می‌شوند تا این کرم‌ها علاوه بر جذب و برگرداندن اشعه ماوراء بنفش شفاف باشند (Bulte, 2008).
- **کامپوزیت‌ها:** کامپوزیت‌ها موادی اند که در آن‌ها دو یا چند ماده مجزا برای بهبود خواص یکدیگر مخلوط می‌شوند و در نهایت خواص کامپوزیت بهتر از تک تک ترکیبات است. یکی از کاربردهای نانو مواد ساخت کامپوزیت هاست (Huang et al., 2003).
- **سفال‌ها:** ساخت کامپوزیت‌هایی متشکل از پلاستیک و نانو ذراتی از رس، از کاربردهای دیگر نانو مواد است. این نوع کامپوزیت‌ها در ساخت مواد سازه‌ای و قطعات مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند (Huang et al., 2003).
- **پوشش‌ها و سطوح:** نانومواد در ساخت پوشش‌های فوق نازک که ضخامتی در حد نانومتر دارند و همچنین ساخت پوشش‌های مقاوم و ضد خش مورد استفاده قرار می‌گیرند.
- **ساخت پارچه‌های مدرن:** که در عین ضد آب و ضد لک بودن قابلیت عبوردهی هوا را دارند.
- **تجهیزات برش:** نانو کریستالین‌هایی مانند کربید تنگستن و کربید تیتانیوم که در برابر سایش بسیار سخت و مقاوم هستند، در ساخت تجهیزات و ابزار برش کاربرد دارند (Cao, 2004).

۱۶-۱-تجهیزات

پیشرفت‌های سریع اخیر در فناوری نانو مربوط به توانایی‌های کسب شده برای اندازه‌گیری و کنترل ساختارهای منفرد در مقیاس نانو است. آشنایی با ابزارها و تجهیزات مورد استفاده در این زمینه می‌تواند در درک این فناوری مفید واقع شود (anonymous, 2010; council, 2010). در جدول ۱-۴ تجهیزات مورد استفاده در فناوری نانو قرار دارد.

Microscopy Electron Transmission	میکروسکوپ الکترونی عبوری
Microscopy Electron Scanning	میکروسکوپ الکترونی روبشی
Spectroscopy Electron Auger	اسپکتروسکوپی الکترون اوزه
Microscope Electron Scanning Environmental	میکروسکوپ الکترونی روبشی محیطی
Spectroscopy Mass Ion Secondary	طیف سنجی جرمی یون ثانویه

Diffraction Ray-X	پراش اشعه X-
Chromatography Liquid Performance High	کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا
Spectroscopy Mass	طیف سنجی جرمی
Spectroscopy Raman	طیف سنجی رامان
Chromatography Gas	کروماتوگرافی گازی
Spectroscopy IR	طیف سنج زیر قرمز
Resonance Magneto Nuclear	رزونانس مغناطیس هسته
Microscope Force Atomic	میکروسکوپ نیروی اتمی
Beam Ion Focused	باریکه یونی متمرکز
Microscopy Tunneling Scanning	میکروسکوپ روبشی تونلی
Spectroscopy Inferred Transform Fourier	طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز
Analysis Chemical Spectroscopy for Electron	طیف نگاری الکترونی برای آنالیز شیمیایی
Spectrometry Backscattering Rutherford	پراکندگی بازگشتی رادرفورد
Microscopy Optical Near-field Scanning	میکروسکوپی نوری میدان نزدیک روبشی

جدول ۱-۴: ابزار ها و تجهیزات مورد استفاده در فناوری نانو

۱۷-۱- ترکیبات افزایش دهنده آب دوستی^{۱۷}

مولکول‌های آبی کوچک در محلول‌های آبی می‌توانند اثرات عمیقی بر ساختار، عملکرد و پایداری پروتئین‌ها داشته باشند. استفاده از این محلول‌ها برای پایدار سازی و دگرگون سازی پروتئین‌ها رایج است. از جمله عوامل افزایش دهنده آب دوستی می‌توان به اوره، تیواوره، گوانیدین هیدروکلراید و لیتیم پرکلراید اشاره کرد. این ترکیبات نیروهای درون مولکولی شبکه مولکول‌های آب را کاهش می‌دهند. این امر باعث می‌شود که پروتئین‌ها آسان‌تر در آب حل شوند. همچنین با نیروهای پایدار کننده درون مولکولی غیر کوالان مثل نیروهای آب‌گریز، هیدروژنی و واندروالس تداخل می‌کنند.

¹⁷.Chaotropic

فصل دوم

مواد و روش‌ها:

تهیه محلول‌های مورد نیاز:

۲-۱- تهیه تامپون‌های مورد نیاز

جهت تهیه تامپون، سدیم فسفات از شرکت سیگما خریداری شد. تامپون فسفات سدیم ۰/۱ مولار با $pH=7/25$ به این صورت عمل شد که ۳۵/۸۱۴ گرم از فسفات سدیم در ۹۰۰ سی سی آب مقطر دو بار تقطیر حل گردید و به وسیله pH متر و با افزودن اسید کلریدریک ۳۷ درصد pH تامپون را به ۷/۲۵ رسانده و با اضافه نمودن آب مقطر دو بار تقطیر، به حجم ۱۰۰۰ سی سی رسانده شد. سپس در یخچال نگهداری گردید.

۲-۲- تهیه محلول‌های نانوذرات ZnO

برای تهیه نانوذرات در غلظت‌های مختلف لازم است که در ابتدا مقدار مورد نیاز از آن‌ها دقیقاً وزن شود و سپس توسط آب دو بار تقطیر به حجم مورد نظر برسد و سپس عمل سونیکیشن روی آن‌ها انجام گیرد. سونیکیشن برای سه بار متوالی هر کدام ۱۰ دقیقه انجام شد. اندازه نانو ذره ZnO ۲۱ نانومتر است.

۲-۳- تهیه آنزیم لیزوزیم

لیزوزیم سفیده تخم مرغ به صورت پودر خشک از شرکت سیگما خریداری شد. آنزیم با غلظت ۰/۱ mg/ml در آب دوبار تقطیر تهیه گردید و در دمای زیر ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. محلول های بافر با pH های مختلف برای تنظیم اسیدیته محلول ها تهیه گردید. یک محلول الکترولیت (M NaCl ۱/۵) برای تنظیم کشش یونی محلول آماده شد.

۲-۴- مطالعه پایداری حرارتی لیزوزیم در دامنه حرارتی ۲۰-۹۰°C

جهت انجام این آزمایش از دستگاه اسپکتروفتومتر UV/VIS شیمیدازو مدل Pharmacia-4000 استفاده گردید. این دستگاه مجهز به سیستم کنترل الکترونیکی دما می باشد که سرعت اسکن دما یک درجه سانتی گراد در هر دقیقه می باشد نمونه لیزوزیم با غلظت ۰/۱ میلی گرم در میلی لیتر تهیه گردید. بررسی اثر دما بر لیزوزیم در pH ۷/۲۵ مورد مطالعه قرار گرفت. تمامی آزمایشات انجام شده در طی این پایان نامه حداقل سه بار تکرار شده اند و بنابراین تکرار پذیر هستند.

۲-۵- مطالعه پایداری حرارتی لیزوزیم در حضور نانوذره ZnO و دامنه حرارتی ۲۰-۹۰°C

به منظور انجام این آزمایش از دستگاه اسپکتروفتومتر UV/VIS شیمادزو مدل فارماسیا ۴۰۰۰ استفاده شد. نمونه لیزوزیم با غلظت ۰/۱ میلی گرم در میلی لیتر در تامپون فسفات ۰/۱ مولار با pH=7 در حضور نانو ذره ZnO مورد آزمایش قرار گرفت. محلول استوک نانوذره ZnO با غلظت ۰/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر در pH ۷/۲۵ تهیه گردید. محلول نانوذره ZnO با غلظت های مشخصی بر حسب میلی گرم بر لیتر مورد استفاده قرار گرفت و اثر آنها بر پایداری حرارتی آنزیم بررسی شد. به منظور مطالعه اسپکتروفتومتری لیزوزیم سفیده تخم مرغ در حضور نانو ذره ZnO در دماهای مختلف از دستگاه اسپکتروفتومتری UV/VIS شیمادزو مدل فارماسیا ۴۰۰۰ استفاده شد. نمونه لیزوزیم با غلظت ۰/۱ میلی گرم در میلی لیتر در تامپون فسفات ۰/۱ مولار با pH=7 در حضور نانو ذره ZnO مورد آزمایش قرار گرفت.

۲-۵- مطالعه سینتیک لیزوزیم در حضور نانوذره ZnO و دامنه حرارتی ۳۵°C

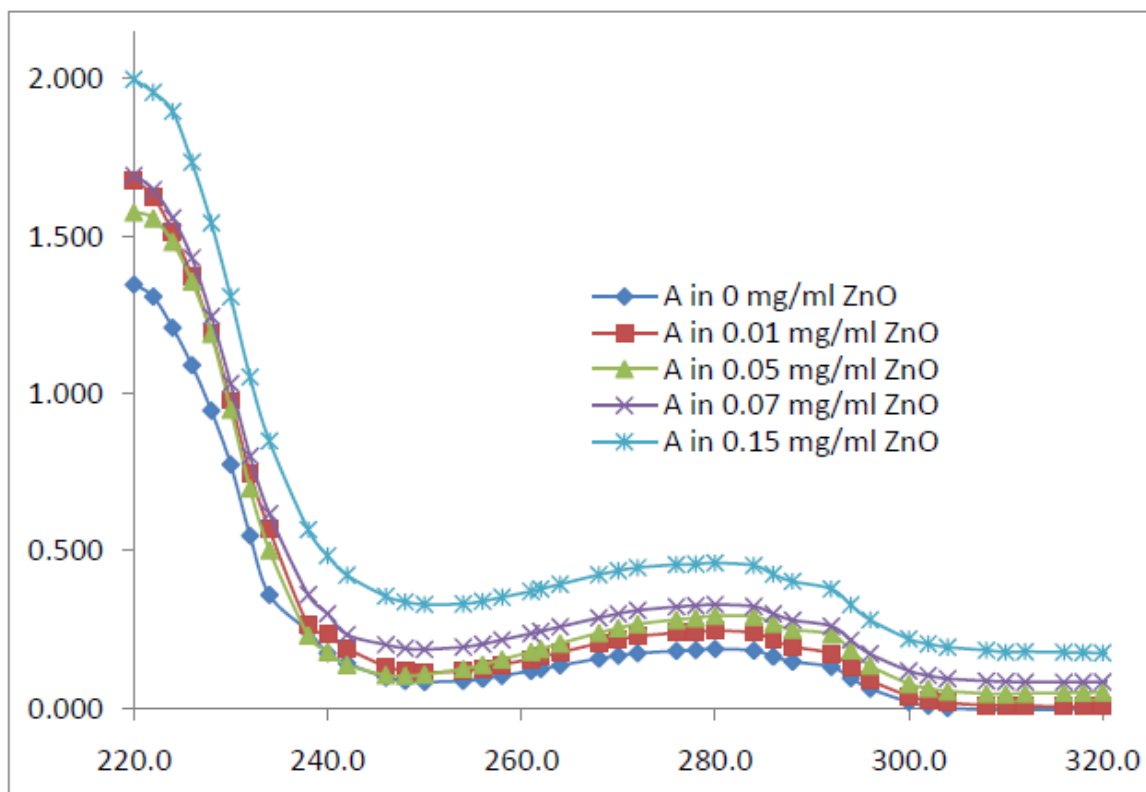
در مطالعات سینتیک لیزوزیم سفیده تخم مرغ در حضور نانوذره ZnO در دمای ۳۵ درجه از دستگاه اسپکتروفتومتری UV/VIS شیمادزو مدل فارماسیا ۴۰۰۰ استفاده شد. نمونه لیزوزیم با غلظت ۰/۱ میلی گرم در میلی لیتر در تامپون فسفات ۰/۱ مولار با pH=7 در حضور نانو ذره ZnO مورد آزمایش قرار گرفت. سوپسترای مورد استفاده باکتری گرم مثبت *Micrococcus lysodeikticus* بود که محلول غلیظ آن با غلظت ۲۰ میلی مولار در آب مقطر دوبار تقطیر تهیه شد. طول موج منتخب ۴۵۰ نانومتر مخصوص پیگیری تخریب دیواره باکتری است. بعد از جمع آوری اطلاعات نمودارهای میکائیلیس منتن و لینیور-برک رسم شده و با بدست آوردن طول از مبدأ (Km) و عرض از مبدأ (Vmax) نمودار لینیور-برک، پارامترهای سینتیک محاسبه شد.

فصل سوم:

نتایج:

۳-۱- واکنش لیزوزیم با نانوذره ZnO

جذب نوری لیزوزیم- نانوذره ZnO در شکل ۳-۱ نشان داده شده است. جذب (A) مایع با افزایش غلظت نانو ذره ZnO از mg/L بدون هیچ گونه تغییری در طول موج قله ۲۸۰ نانومتر، افزایش پیدا می کند.



شکل ۳-۱ تغییرات جذب ۲۸۰ نانومتر در مقابل غلظت های مختلف نانو ذره ZnO در دماهای مختلف

این مشاهدات بدلیل تشکیل کمپلکس حالت پایه (Lysosyme....ZnO) می باشد. این محتمل است که کمپلکس Lysosyme....ZnO ضریب جذب مولی بیشتری از لیزوزیم جذب نشده بر سطوح نانو ذره داشته باشد ولی کماکان حداکثر جذب در همان ناحیه ۲۸۰ نانومتر می باشد. نتایج بدست آمده از مطالعات نشان می دهد که یک اینتراکشن بین نانو ذره ZnO و لیزوزیم از طریق تشکیل کمپلکس حالت پایه وجود دارد. لیزوزیم دارای ۱۸ ریشه بازی می باشد بنابراین بار مثبت زیادی را در محیط خنثی (نقطه ایزوالکتریک pH 11) حمل می کند. در ابتدا با مخلوط شدن سوسپانسیون نانو ذره ZnO و لیزوزیم جذب لیزوزیم توسط اینتراکشن الکتروستاتیک صورت می گیرد. هنگامیکه فاصله بین نانو ذره ZnO و لیزوزیم به اندازه کافی کوتاه شد پیوند هیدروژنی بین ZnO و زنجیره های قطبی آمینو اسیدها تشکیل می شود. در حضور نانو ذره ZnO جذب لیزوزیم به شدت افزایش می یابد بدون هیچ تغییر در طول موج قله ۲۸۰ نانومتر.

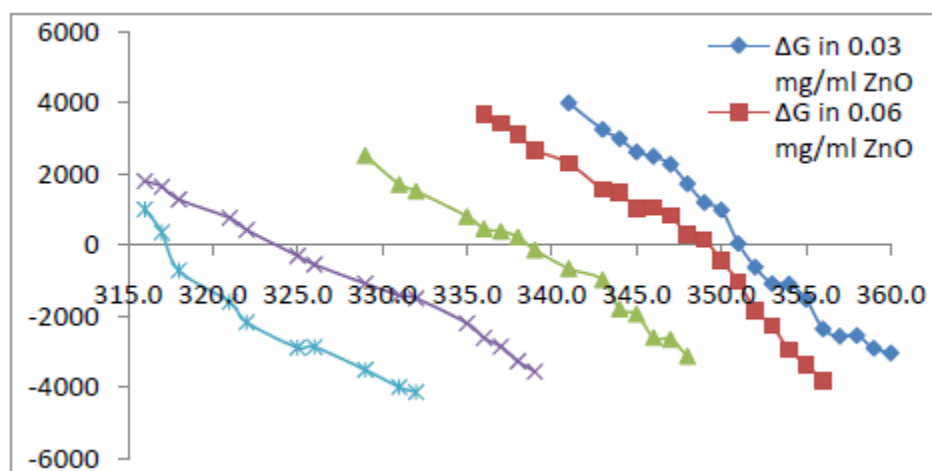
۳-۲- اثر نانو ذره ZnO بر پایداری حرارتی لیزوزیم

T_m یک شاخص پایداری گرمایی پروتئین است و T_m بالاتر نشان دهنده پایداری بیشتر پروتئین است. دگرگون سازی پروتئین یک روش کلیدی در ترمودینامیک و آنالیز جایگاه اتصال است که می تواند درک ما را از ارتباط ساختار و

عملکرد پروتئین افزایش دهد. پایداری حرارتی آنزیم لیزوزیم با محاسبه تغییرات انرژی آزاد گیبس و T_m آنزیم محاسبه می شود. با محاسبه کسر دناتوراسیون (F_d) و قرار دادن آن در رابطه زیر تغییرات انرژی آزاد گیبس به دست می آید:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln[F_d/(1-F_d)] = -RT \ln [A_N - A_{obs}] / (A_{obs} - A_D)$$

در این رابطه A_N و A_D مقادیر جذب در حالت طبیعی و دگرگون شده هستند و A_{obs} جذب مشاهده شده می باشد. T_m یا دمای ذوب پروتئین جایی است که ΔG° برابر با صفر است. ما همچنین با استفاده از شیب خط منحنی ΔG° توانستیم ΔS_m° را بدست آورده و با قرار دادن آن در رابطه $\Delta H_m^\circ = T_m \Delta S_m^\circ$ مقدار ΔH_m° را نیز بدست آوریم. با توجه به مطالب فوق مطالعات پایداری حرارتی در حضور نانو ذره ZnO انجام شد. بر اساس مقادیر T_m ، ΔS_m° و ΔH_m° در جدول ۱-۳ محاسبه شده اند. لیزوزیم به طور طبیعی پایداری بسیار بالایی دارد و چنانچه مشاهده می شود با افزایش غلظت نانو ذرات ZnO باعث کاهش T_m می شود. شکل ۲-۳ نشانگر تغییرات کسر دناتوراسیون و ΔG° در برابر دما می باشند.



شکل ۲-۳ تغییرات انرژی آزاد گیبس لیزوزیم در مقابل دما در غلظت های مختلف نانو ذرات ZnO

T_m لیزوزیم در غلظت های مختلف نانوذره در جدول ۱-۳ شان داده شده اند. بر طبق آنچه در جدول شماره ۱-۳ نشان داده شده است افزایش غلظت نانو ذره باعث کاهش دمای T_m می گردد.

جدول ۳-۱ تغییرات پارامتر T_m در غلظت های مختلف نانو ذره ZnO در pH 7

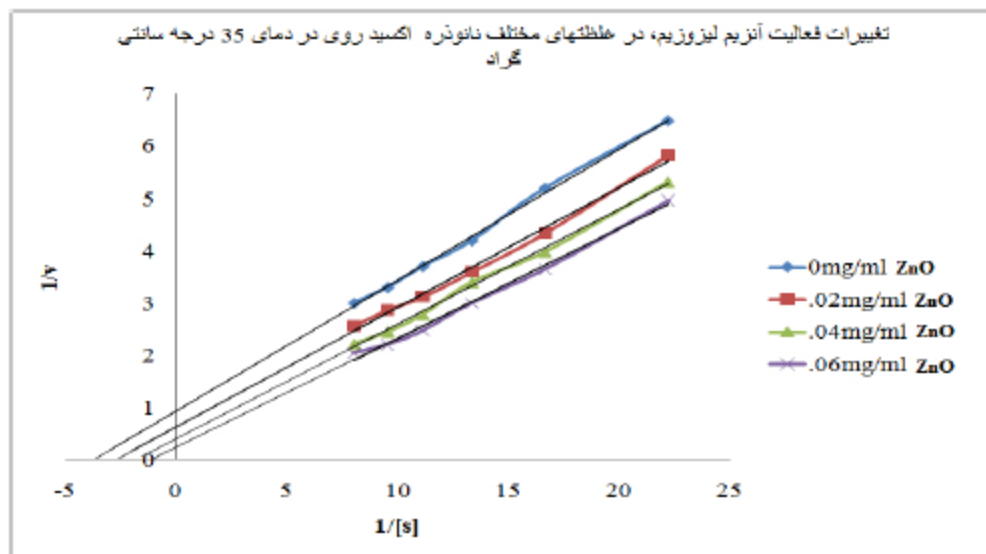
T_m (K)	غلظت های ZnO (mg/ml)
۳۵۱	۰.۰۳
۳۴۹	۰.۰۶
۳۳۸	۰.۰۹
۳۲۳	۰.۱۲
۳۱۷	۰.۱۵

۳-۳- بررسی نتایج مطالعه سینتیک آنزیم لیزوزیم در حضور نانو ذره ZnO در دمای ۳۵ درجه

در این آزمایش، اثر غلظت های مختلف نانو ذره ZnO در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد و pH=۷/۲۵ بر سینتیک آنزیم لیزوزیم بررسی شده است. نتایج این آزمایش در شکل ۳-۳ آورده شده است. همان طور که در این نمودار دیده می شود، با افزایش غلظت نانو ذره اکسید روی از ۰ تا ۰/۰۰۷ میکرو گرم بر میلی لیتر، V_{max} کاهش می یابد که این نشان می دهد نانو ذره ZnO جایگاه فعال آنزیم را طوری تغییر می دهد که مانع از قرار گرفتن سوبسترا در آن می شود. جدول ۳-۲ تغییرات V_{max} (فعالیت آنزیم) در حضور غلظت های مختلف نانو ذره ZnO در pH7 را نشان می دهد.

جدول ۳-۲ تغییرات V_{max} آنزیم لیزوزیم در حضور غلظت های مختلف نانوذره ZnO در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد و pH=7

[ZnO]mg/ml	$1/V_{max}$	V_{max}
0mg/ml	0.933	1.07
0.001mg/ml	0.633	1.57
0.003mg/ml	0.394	2.53
0.007mg/ml	0.23	4.34



شکل ۳-۳ نمودار لاینویور-برک برای آنزیم لیزوزیم در حضور غلظت های مختلف نانوذره ZnO در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد

ما در این آزمایش تأثیر نانو ذره ZnO بر فعالیت سینتیکی، پایداری گرمایی (T_m) و جذب آنزیم لیزوزیم را مورد بررسی قرار داده ایم. نتایج حاصل از مطالعات مربوط به فعالیت سینتیکی لیزوزیم در حضور نانو ذره ZnO نشان می دهد که این نانو ذره ZnO فعالیت سینتیکی (V_{max}) آنزیم لیزوزیم را کاهش می دهد. احتمالاً ZnO جایگاه فعال آنزیم را به گونه ای تغییر می دهد که مانع از اتصال سوبسترا به آن می شود بنابراین باعث کاهش فعالیت سینتیکی آنزیم لیزوزیم خواهد شد. در مطالعات اسپکتروفتومتری (جذب) آنزیم لیزوزیم در حضور نانو ذره ZnO مشاهده می شود که با افزایش غلظت این نانو ذره ZnO میزان جذب لیزوزیم در طول موج ۲۹۰ نانومتر، زیاد می شود. این افزایش جذب بخاطر ایجاد کمپلکس لیزوزیم-ZnO و بدنبال آن افزایش کدورت محلول می باشد. آزمایشات مختلف نشان داده اند که اتصال نانو ذره ZnO به لیزوزیم، تأثیری بر روی ساختار تیروزین ندارد ولی ساختار تریپتوفان را تغییر می دهد. در واقع با افزایش غلظت نانو ذره ZnO، قطبیت و هیدروفیلیسیتی محیط اطراف رزیدیو های تریپتوفان زیاد می شود و در نتیجه شدت فلورسانس کم می شود. با افزایش دما این کاهش شدت فلورسانس بیشتر می شود چون وقتی دما زیاد می شود ساختار آنزیم در حضور نانوذره ZnO نشان می دهد که در ابتدا نانوذره ZnO، T_m را نسبت به T_m لیزوزیم طبیعی کم می کند و در غلظت های بعدی نانو ذره ZnO، T_m لیزوزیم زیاد می شود.

فصل چهارم

بحث و نتیجه گیری

T_m ، یک شاخص پایداری گرمایی پروتئین است و T_m ، بالاتر نشان دهنده پایداری بیش تر پروتئین است. دگرگون سازی پروتئین یک متد کلیدی در ترمودینامیک و آنالیز جایگاه اتصال است که می تواند درک ما را از ارتباط ساختار و عملکرد پروتئین افزایش دهد. از طریق دگرگون سازی می توان اطلاعاتی در مورد ساختار، خصوصیات و عملکرد پروتئین به دست آورد.

نانو ذرات به میزان بیش تری در صنایع غذایی و صنعت استفاده می شوند که این به دلیل خصوصیات ویژه آن ها است. به عنوان مثال برخی از آن ها به کرم های ضد آفتاب اضافه می شوند تا اشعه ماوراء بنفش خورشید را جذب کنند و یا در خمیردندان ها و رنگ ها برای ایجاد رنگ سفید در آن ها به کار می رود. هم چنین برخی از آن ها در صنعت الکترونیک به کار می روند. از طرفی کاربرد های وسیعی در پزشکی و تجهیزات ورزشی و آرایشی دارند. اندازه نانو مواد ها از سلول و اندامک های سلولی کوچک تر است و ممکن است به درون سلول نفوذ کنند و باعث ایجاد خسارت به سلول شوند و یا باعث القاء پاسخ های التهابی مضر شوند. فشار اکسیداتیو ناشی از نانو متریال ها می تواند منجر به آسیب رسیدن به کربوهیدرات ها، پروتئین ها، DNA و از همه مهم تر لیپید ها بشود. مطالعات اخیر نشان داده اند که نانو مواد می توانند باعث سمیت ژنی و سمیت سلولی شوند. لیزوزیم به سطح ZnO متصل می شود و باعث خود تراکمی آن می شود. مشابه واکنش پروتئین-ملکول، واکنش لیزوزیم با ذرات ZnO می تواند اساسا به خاطر ترکیبات غیر کووالان از واکنش های الکترو استاتیک با پیوند های هیدروژنی باشد. در ابتدا جذب لیزوزیم توسط واکنش های الکترواستاتیک انجام می شود سپس لیزوزیم با سوسپانسیون ZnO مخلوط می شود. هنگامی که فاصله لیزوزیم و ZnO به اندازه کافی کوتاه شد، پیوند هیدروژنی بین زنجیره های جانبی قطبی ریشه های اسید آمینه ها در لیزوزیم و ZnO تشکیل می شود. بعد از این که لیزوزیم اضافه شد ذرات لیزوزیم-ZnO تشکیل می شوند و به حالت کلئیدی درمی آیند. این تجمعات با افزایش لیزوزیم بزرگ تر می شوند. اثر ZnO روی ساختار دوم لیزوزیم به این صورت است که میزان آلفا هلیکس را به شدت کاهش می دهد ولی بتا شیت را افزایش می دهد و پیچ-بتا را همراه با رندوم کوئل ها کاهش می دهد. با نزدیک شدن لیزوزیم به سطح ZnO هیدروژن باند هایی از نوع N-H.....O, O-H.....O تشکیل می شوند. دلیل این

تغییرات گسترده بر روی ساختمان دوم لیزوزیم این است که چون تعداد زیادی از گروه های زنجیره های قطبی به ZnO باند هستند لیزوزیم دچار پیچ خوردگی و تغییر ساختار زنجیره ها می شود که از این رو هیدورژن باند ها آلفا هلیکس های داخلی از بین می روند (Yongli *et al.*, 1999; Lundqvist *et al.*, 2004; Baun *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009). لیزوزیم آنزیمی کروی و فشرده است که ۵ آلفا هلیکس و ۳ صفحه بتا آنتی پارالل و مقدار زیادی پیچه تصادفی و ترن دارد. تاخوردگی لیزوزیم شامل دو مرحله است در تاخوردگی سریع اولیه بخش های اصلی شامل دمین آلفا و دمین بتا تشکیل می شود، مرحله تاخوردگی ثانویه کندتر است و ساختار دوم و سوم لیزوزیم طبیعی کامل می شود، علاوه بر این ۴ پیوند دی سولفیدی هم شکل می گیرند. اندازه نانو ذرات یکی از پارامتر های کلیدی است که در واکنش بین پروتئین و نانو ذرات اثر گذار است. نتایج آزمایشات نشان می دهند که اندازه نانو ذرات بخاطر میزان سهم انحنا ی سطحی بر ساختار و عملکرد پروتئین اثر می گذارد، با افزایش اندازه نانو ذرات میزان آلفا هلیکس لیزوزیم کمتر می شود و کم شدن میزان آلفا هلیکس با کم شدن میزان فعالیت آنزیم مرتبط است. این فرضیه در ribnuclease A هم دیده شده است. آنالیز دگرگون سازی اوره نشان می دهد که پایداری ترمو دینامیکی ribnuclease A با افزایش اندازه نانو ذرات کاهش می یابد (Wu *et al.*, 2009). مشاهده شدن رد شیفت (انتقال به طول موج های بالاتر) بخاطر تغییرات ساختمانی القا شده توسط واکنش هایی است که منجر به این می شوند که قطبیت اطراف ریشه تریپتوفان و هیدروفوبیستی افزایش یابد (Ding *et al.*, 2009).

1. Arica M. Y. and Bayramoglu G. 2005. Purification of lysozyme from egg white by Reactive Blue 4 and Reactive Red 120 dye-ligands immobilised composite membranes. *Process Biochemistry*, 40(3-4): 1433-1442.
2. Bashford C. L. and Harris D. A. 1987. *Spectrofluorimetry: a practical approach*. IRL press Eynsham, England.
3. Baun A., Hartmann N. B., Grieger K. and Kusk K. O. 2008. Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing. *Ecotoxicology*, 17(5): 387-395.
4. Berman, H. M. 1999. "The past and future of structure databases." *Current Opinion in Biotechnology* 10(1): 76-80.
5. Boyer P. D. and Krebs E. G. 1986. *The enzymes*. Academic Press.
6. Bordbar A. K., Hosseinzadeh R. and Norozi M. H. 2007. Interaction of a homologous series of n-alkyl trimethyl ammonium bromides with eggwhite lysozyme. *Journal of thermal analysis and calorimetry*, 87(2): 453-456.
7. Branden C. and Tooze J. 1991. *Introduction to protein structure*. Garland New York.
8. Cleland, W. W. 2001. "Enzyme Kinetics: Steady State The Michaelis-Menten Equation." *Life Sciences* 34: 1-5.
9. Bulte J. W. M. 2008. *Nanoparticles in biomedical imaging: emerging technologies and application*. Springer Verlag.
10. Cao G. 2004 *Nanostructure and nanomaterials: synthesis, properties & application*. Imperial College Pr.
11. Chen F. F., Tang Y. N., Wang S. L. and Gao H. W. 2009. Binding of brilliant red compound to lysozyme: insights into the enzyme toxicity of water-soluble aromatic chemicals. *Amino acids*, 36(3): 399-407.
12. Cornish-Bowden A. 1976. *Principles of enzyme kinetics*. Butterworths London, 1420-1760.

13. Daggett, V. and A. R. Fersht 2003. Is there a unifying mechanism for protein folding? Trends in Biochemical Sciences 28(1): 18-25.
14. Dembczynski R., Bialas W., Regulski K. and Jankowski T. 2010. Lysozyme extraction from hen egg white in an aqueous two-phase system composed of ethylene oxide-propylene oxide thermoseparating copolymer and potassium phosphate. Process Biochemistry, 45(3): 369-374.
15. Ermakova E. 2005. Lysozyme dimerization: Brownian dynamics simulation. Journal of Molecular Modeling, 12(1): 34-41
16. Devlin T. M. 2011. Textbook of Biochemistry With Clinical Correlations. John Wiley & Sons, New Jersey.
17. Dill K. A., Bromberg S., Yue K., Fiebig K. M., Yee D. P., Thomas P. D. and Chan H. S. 1995. Principles of protein folding--a perspective from simple exact models. Protein science: a publication of the Protein Society, 4(4): 561.
18. Ding F., Liu W., Liu F., Li Z. Y. and Sun Y. 2009. A study of the interaction between malachite green and lysozyme by steady-state fluorescence. Journal of Fluorescence, 19(5): 783-791.
19. Dougherty, D. A. 2000. "Unnatural amino acids as probes of protein structure and function." Current Opinion in Chemical Biology 4(6): 645-652.
20. Freifelder P. 1986. Physical Biochemistry. 2ed, Freeman W. H and Co, San Francisco. 235-354.
21. Grigsby J. J., Blanch H. W. and Prausnitz J. M. 2000. Diffusivities of lysozyme in aqueous MgCl₂ solutions from dynamic light-scattering data: effect of protein and salt concentrations. The Journal of Physical Chemistry B, 104(15): 3645-3650.
22. Hameed M., Ahmad B., Fazili K. M., Andrabi K. and Khan R. H. 2007. Different molten globule-like folding intermediates of hen egg white lysozyme induced by high pH and tertiary butanol. Journal of Biochemistry, 141(4): 58-73.
23. Hopfer, U. and T. M. Devlin (2002). "Textbook of biochemistry with clinical correlations." Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations 197: 475-503.
24. Huang Z. M., Zhang Y. Z. and Kotaki M. 2003. A review on polymer nanofibers. Composites science and technology, 63(15): 2223-2253.

25. Johnson L. N. A. P., D.C. Structure of some crystalline lysozyme-inhibitor complexes determined by X-ray analysis at 6 Angstrom resolution. (accessed :1965)
26. Kerkaert B. and De Meulenaer B. 2007. Detection of hen's egg white lysozyme in food: Comparison between a sensitive HPLC and a commercial ELISA method .
27. Kirby A. J. 2001. The lysozyme mechanism sorted-after 50 years. *nature structural biology*, 8(9): 737-738.
28. Kondo K., Fujio H. and Amano T. 1982. Chemical and immunological properties and amino acid sequences of three lysozymes from Peking-duck egg white. *Journal of Biochemistry*, 91(2): 571-580.
29. Lehninger, A. L., D. L. Nelson, *et al.* 2005. *Lehninger principles of biochemistry*, WH Freeman & Co.
30. Levitt M. and Chothia C. 1976. Structural patterns in globular proteins. *Nature*, 261(5561): 552-558.
31. Lodish H. 2000. *Molecular cell Biology*. New York. 328-350.
32. Lundqvist M., Sethson I. and Jonsson B. H. 2004. Protein adsorption onto silica nanoparticles: conformational changes depend on the particles' curvature and the protein stability. *Langmuir*, 20(24): 10639-10647.
33. Makki F. and Durance T. D. 1996. Thermal inactivation of lysozyme as influenced by pH, sucrose and sodium chloride and inactivation and preservative effect in beer. *Food research international*, 29(7): 635-645.
34. Mattos C. and Ringe D. 2001. Proteins in organic solvents. *Current opinion in structural biology*, 11(6): 761-764
35. .
36. Mayo, K. H. 2000. "Recent advances in the design and construction of synthetic peptides: for the love of basics or just for the technology of it." *Trends in Biotechnology* 18(5): 212-217.
37. Menendez-Arias L., Gavilanes J. G. and Rodriguez R. 1985. Amino acid sequence around the cysteine residues of pigeon egg-white lysozyme: comparative study with other type c lysozymes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 82(4): 639-642.

38. Metzler D. E. and Metzler C. M. 2003. Biochemistry: the chemical reaction of living cells. Academic Press.
39. Ong H. N., Arumugam B. and Tayyab S. 2009. Succinylation-induced conformational destabilization of lysozyme as studied by guanidine hydrochloride denaturation. *Journal of Biochemistry*, 146(6): 895-903.
40. Palmer, T. 2001. *Enzymes: biochemistry, biotechnology and clinical chemistry*, Horwood Publishing Limited.98-134
41. Petrovskii A. S., Deryabin D. G., Loiko N. G., Mikhailenko N. A., Kobzeva T. G., Kanaev P. A., Nikolaev Y. A., Krupyanskii Y. F., Kozlova A. N. and El'-Registan G. I. 2009. Regulation of the functional activity of lysozyme by alkylhydroxybenzenes. *Microbiology*, 78(2): 144-153.
42. Pirzadeh P., Moosavi-Movahedi A. A., Hemmateenejad B ,Ahmad F., Shamsipur M. and Saboury A. A. 2006. Chemometric studies of lysozyme upon interaction with sodium dodecyl sulfate and [beta]-cyclodextrin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 52(1): 31-38.
43. Ponkham P., Daduang S., Kitimasak W., Krittanai C ,Chokchaichamnankit D., Srisomsap C., Svasti J., Kawamura S., Araki T. and Thammasirirak S. 2010. Complete amino acid sequence of three reptile lysozymes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 151(1): 75-83.
44. Ponting, C. P. and R. R. Russell 2002."The natural history of protein domains." *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*31(1): 45-71.
45. Powroznik B ,Gharbi M., Dandrifosse G. and Peulen O. 2004. Enhancement of lysozyme stability and activity by polyamines. *Biochimie*, 86(9-10): 651-656.
46. Refaee M., Tezuka T., Akasaka K. and Williamson M. P. 2003. Pressure-dependent changes in the solution structure of hen egg-white lysozyme. *Journal of molecular biology*, 327(4): 857-865.
47. Rezaei Behbehani G., Divsalar A., Saboury A .A. and Hekmat A. 2009. A thermodynamic study on the binding of PEG-stearic acid copolymer with lysozyme. *Journal of solution chemistry*, 38(2): 219-229.
48. Ringia, E. A. T., J. B. Garrett, *et al.* 2004. Evolution of enzymatic activity in the enolase superfamily: functional studies of the promiscuous o-succinylbenzoate synthase from.

49. Ruso J. M., Gonzaez-Perez A., Prieto G. and Sarmiento F. 2004. Study of the interaction between lysozyme and sodium octanoate in aqueous solutions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 249(1-3): 45-50.
50. Ruso J. M., Gonzllez-Pérez A., Prieto G. and Sarmiento F. 2003. Study of the interactions between lysozyme and a fully-fluorinated surfactant in aqueous solution at different surfactant-protein ratios. *International journal of biological macromolecules*, 33(1-3): 67-73.
51. Sahu K., Mondal S. K., Roy D., Karmakar R. and Bhattacharyya K. 2005. Study of interaction of a cationic protein with a cationic surfactant using solvation dynamics:: Lysozyme: CTAB. *Chemical physics letters*, 413(4-6): 484-489.
52. Saleh A. M. and Ibrahimi I. M. 1995. Electrophoretic polymorphism in rabbit tear lysozyme. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 112(1): 21-30.
53. Simpson R. J. and Morgan F. J. 1983. Complete amino acid sequence of emlden goose (Anser anser) egg-white lysozyme. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 744(3): 349-351.
54. Siritapetawee J., Thammasirirak S., Robinson R. C. and Yuvaniyama J. 2009. The 1.9 Å X-Ray Structure of Egg-white Lysozyme from Taiwanese Soft-Shelled Turtle (*Trionyx Sinensis* Wiegmann) Exhibits Structural Differences from the Standard Chicken-Type Lysozyme. *Journal of Biochemistry*, 145(2): 193-201.
55. Strynadka N. C. J. and James M. N. G. 1991. Lysozyme revisited: Crystallographic evidence for distortion of an N-acetylmuramic acid residue bound in site D. *Journal of molecular biology*, 220(2): 401-424.
56. Thammasirirak S., Ponkham P., Preecharram S., Khanchanuan R., Phonyothee P., Daduang S., Srisomsap C., Araki T. and Svasti J. 2006. Purification, characterization and comparison of reptile lysozymes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 143(2): 209-217.
57. Torrens F. 2001. Calculation of partition coefficient and hydrophobic moment of the secondary structure of lysozyme. *Journal of Chromatography A*, 908(1-2): 215-221.
58. Tsuchiya Y., Morioka K., Shirai J. and Yoshida K. 2004. Establishment of a mass production system for human lysozyme as curative medicine to AIDS. abstract no. WePeA5628.

59. Tymoczko, J. L., Berg, J. M. & Stryer, L. 2011. Biochemistry: a short course, WH Freeman.
60. Zubay G. 1998. Biochemistry. Macmillan, New York. 130-205.
61. Ueda T., Nagata M. and Imoto T. 2001. Aggregation and chemical reaction in hen lysozyme caused by heating at pH 6 are depressed by osmolytes, sucrose and trehalose. *Journal of Biochemistry*, 130(4): 491-503.
62. Van Den Berg B., Chung E. W., Robinson C. V., Mateo P. L. and Dobson C. M. 1999. The oxidative refolding of hen lysozyme and its catalysis by protein disulfide isomerase. *The EMBO journal*, 18(17): 4794-4803.
63. Wang H., Wick R. L. and Xing B. 2009. Toxicity of nanoparticulate and bulk ZnO, Al₂O₃ and TiO₂ to the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Pollution*, 157(4): 1171-1177.
64. Wang J., Liu Y., Jiao F., Lao F., Li W., Gu Y., Li Y., Ge C., Zhou G. and Li B. 2008. Time-dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO₂ nanoparticles. *Toxicology*, 254(1-2): 82-90.
65. Williams M. A., Thornton J. M. and Goodfellow J. M. 1997. Modelling protein unfolding: hen egg-white lysozyme. *Protein engineering*, 10(8): 895-903.
66. Wu Z., Zhang B. and Yan B. 2009. Regulation of enzyme activity through interactions with nanoparticles. *International journal of molecular sciences*, 10(10): 4198-4209.
67. Wu X. and Narsimhan G. 2008. Effect of surface concentration on secondary and tertiary conformational changes of lysozyme adsorbed on silica nanoparticles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins & Proteomics*, 1784(11): 1694-1701.
68. Yan C., Ding B., Lan X., Guo S., Xie Y. and Wang C. 2008. The toxicity study on marine low-temperature lysozyme. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2): 604-609.
69. Yongli C., Xiufang Z., Yandao G., Nanming Z., Tingying Z. and Xinqi S. 1999. Conformational Changes of Fibrinogen Adsorption onto Hydroxyapatite and Titanium Oxide Nanoparticles. *Journal of colloid and interface science*, 214(1): 38-45.
70. Yue Q., Niu L., Li X., Shao X., Xie X. and Song Z. 2008. Study on the interaction mechanism of lysozyme and bromophenol blue by fluorescence spectroscopy. *Journal of Fluorescence*, 18(1): 11-15.

71. Zhao W. and Yang R. 2008. Comparative study of inactivation and conformational change of lysozyme induced by pulsed electric fields and heat. *European Food Research and Technology*, 228(1): 47-54.

Kinetical studies on the lysozyme stability in the presence of ZnO

Abstract:

Adsorption of proteins on inorganic surfaces may lead to structural and functional changes that are dependent on both the nature of the adsorbed proteins and the physicochemical properties of the inorganic surfaces. Protein surface recognition offers a powerful tool in understanding protein-protein interaction, which is a key aspect of many complex cellular functions. Nanoparticles (NPs), because of their small sizes, have distinct properties compared to the bulk form of the same material, thus offering many new developments in the fields of biosensors, biomedicine, and bio nanotechnology. The adsorption of protein on NPs and its consequence on the structure and function are strongly dependent on the sizes and shapes of the NPs. Chicken egg white lysozyme (molecular weight (MW) = 14.6 kDa) is a small globular protein, that consists of 129 amino acid residues with four disulfide bonds. The importance of lysozyme relies on its extensive use as a model system to understand the underlying principles of protein structure, function, dynamics, and folding through theoretical and experimental studies. The effect of ZnO nanoparticles on lysozyme was investigated by UV-Vis spectrophotometry for pH 7.25 at 25°C using sodium phosphate buffer. The thermal stability of lysozyme was studied in the presence of Nano-ZnO over the temperature range of (293-372) K in sodium phosphate buffer and pH 7.25. The obtained results indicated that thermal stability of lysozyme will be decreased in the presence of these ZnO nanoparticles.

Keywords: Lysozyme, ZnO nanoparticles, Spectrophotometry, Stability, Protein