فرم مشخصات پایان‌نامه

نام و نام خانوادگی : آزاده سجادیان

رشته تحصیلی : میکروبیولوژی

استاد راهنما : دکتر جمشید فولادی

استاد مشاور : دکتر محمدرضا صعودی

تاریخ دفاع : ۸ مهر ۱۳۸۷

عنوان پایان نامه : غربالگری میکروارگانیسم های ترموفیل برای دستیابی به یک سوش باکتریایی تولید کننده α آمیلاز مقاوم حرارتی

Name: Azadeh Sajjadian

Field of study: Microbiology

Thesis adviser: Dr. Jamshid Fooladi

Thesis title: Screening of thermostable α- amylase producing bacterium among thermophilic and hyperthermophilic bacteria population

دانشگاه الزهراء (س)

دانشکده علوم پایه

پایان‌نامه

جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

رشته میکروبیولوژی

عنوان:

غربالگری میکروارگانیسم های ترموفیل برای دستیابی به یک سوش باکتریایی تولید کننده α آمیلاز مقاوم حرارتی

استاد راهنما:

دکتر جمشید فولادي

استاد مشاور:

دکتر محمدرضا صعودي

دانشجو:

آزاده سجادیان

مهرماه ۱۳۸۷

چکیده

نمونه‌های جدا شده از حوضچه‌های آبگرم محلات، مشکین‌شهر و لاریجان برای غربالگری بیوکاتالیزور مناسب واکنش هیدرولیز نشاسته، بر روی محیط نشاسته آگار در درجه حرارت C ° ۶۵ بمدت ۲۴ ساعت کشت داده شده وبا اضافه کردن معرف ید و تشخیص بیشترین هاله ایجاد شده، سویه ایزوله شده از حوضچه آبگرم مشکین شهر، بعنوان سویه برتر انتخاب شد.

با انجام تستهای بیوشیمیایی، نتایج زیر بدست آمد :

از نظر مورفولوژی کلنی، باکتری مورد نظر دارای کلنی‌های گرد با حالت موکوئیدی است. باسیل گرم مثبت، متحرک و دارای توانایی تولید اسپور می‌باشد. بی هوازی اختیاری بوده و کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی است. توانایی احیائ نیترات به نیتریت را دارد. اوره آز و سیترات مثبت، اندول و SH_2 آن منفی است. توانایی تخمیر قندهای گلوکز، گزیلوز، لاکتوز و آرابینوز را دارد. و قادر به استفاده از قند مانیتول نیست. بیشترین کدورت در محیط‌های دارای pH۶/۵-۵/۵ و دماهای بین°C ۵۰-۸۰ دیده شد. همچنین این باکتری قادر به تحمل میزان نمک ۱و۲٪ می‌باشد.

با بررسی بهینه سازی شرایط محیط کشت، مشخص شد که مناسب ترین دما و pH برای تولید آنزیم α-آمیلاز مقاوم حرارتی توسط سویه مورد نظر در حضور ۱٪ نشاسته محلول در محیط کشت ، C ° ۷۰ و pH ۶ ،می باشد و بهمین ترتیب بیشترین فعالیت کاتالیزوری ویژه آنزیم در حضور ۱٪ نشاسته محلول در محیط کشت ،در درجه حرارت C ° ۷۰ ،و pH ۶ ، می‌باشد.

با اضافه کردن Ca^{2+} ۱۰ mM , ۱٪ پپتون، و۰/۵٪ عصاره مخمر ،به محیط کشت پایه افزایشی هم در مقدار توده سلولی و هم در تولید آنزیم مشاهده شد.

همچنین مشخص شد که با افزودن غلظت یونهای Fe^{3+} وCu^{2+} فعالیت آنزیم مورد نظر کاهش پیدا می‌کند و بمدت ۴۵ دقیقه در درجه حرارت °C ۱۰۰ تغییر قابل ملاحظه ای در فعالیت انزیم مو.رد نظر ایجاد نمی‌شود.

با انجام الکتروفورز در حضور سدیم دو دسیل سولفات تک باند با وزن مولکولی تقریبیKD ۵۶مشاهده شدکه با مقایسه با باندهای حاصل از فعالیت آنزیم در ژل سنجش آنزیم شده، مطابقت داشت.

Screening of thermostable α- amylase producing bacterium among thermophilic and hyperthermophilic bacteria population.

Screening is a routine procedure for isolation of microorganisms which are able to produce special metabolites.

Purified thermostable α-amylase from bacterial resources, is widely used in different industries.

Bacterial Isolates from three hot-spring sources in Larijan (67$^{\circ C}$,pH 6.5), Mahallat (46$^{\circ C}$, pH 7), and Meshkinshahr (82$^{\circ C}$, pH 6), were cultivated in screening starch agar plates, and incubated at 65$^{\circ C}$ for 24 hours. Thereafter, the plates were stained with Gram's iodine solution , and It was observed that colonies of isolated bacterial strain from Meshkinshahr hot-spring has the largest haloforming zone.

The strain was a Gram-positive bacillus, and facultative anaerobic., with polar spores. The strain possessed the ability to hydrolyse starch. Catalase was positive. Indole was not formed, and Nitrates were reduced to nitrites. The final pH after growth in nutrient broth was about 6. The strain grew in nutrient broth at 37°C to 80°C with an optimum at 70°C for 24 h. and is able to tolerate 1-2% concentration of NaCl . From these results, the strain was identified as *Bacillus* sp by the criteria of Bergey's Manual of Systematic Bacteriology

Optimization of the culture condition for α-amylase biosynthesis by the organism, showed : The maximum enzyme production was in the presence of soluble starch (١%), tempreture 70 °C and pH value 6 respectively.

Whereas the optimal pH and temperature for activity in the presence of soluble starch (١%), were 6and 70$^{\circ C}$ respectively. The addition of (10 mM) calcium and peptone (١%) to the mineral medium, shortened the lag period and improve the growth and α-amylase synthesis. The additions of glucose (1%) to the culture diminish greatly the syntheses and activity of α-amylase.

Further more, the enzyme extract retained 100% activity when incubated for 45minutes at 100$^{\circ C}$.

فهـــرست مطالب

عنوان صفحه

فصل اول: مروری بر پیشینه پژوهش

۱-۱- تعریف ۱

فصل دوم: مقـــدمه

۲-۱- میکروارگانیسم‌های اکستریموفیل ۴

۲-۲- مقاومت مولکولی در برابر حرارت ۶

- مقاومت غشاء ۷

۲-۳- پایداری آنزیم‌های ترموفیلیک ۸

۲-۴- تولید بیوکاتالیست و بیومولکول‌ها از اکستریموفیل‌ها ۱۱

۲-۵- پتانسیل صنعتی آنزیم‌ها و متابولیت‌های آرکی‌ها ۱۲

- کاربرد بیوتکنولوژیکی بیومس آرکی‌ها ۱۲
- متابولیت‌های آرکی‌ها برای مصارف بیوتکنولوژیکی ۱۴
- آنزیم‌های آرکی‌ها : منابع مورد توجه در کاربردهای بیوتکنولوژی ۱۴

۲-۶- خصوصیات آنزیم‌های جدا شده از باکتری‌های ترموفیل ۱۵

۲-۷- مصارف صنعتی آنزیم‌های ترموفیل ۱۵

۲-۸- غربال‌سازی ۱۶

۲-۹- بهینه‌سازی تولید ۱۸

۲-۱۰- تکامل نژاد ۱۹

۲-۱۱- ساختمان سه بعدی آنزیم α آمیلاز ۲۱

۲-۱۲- ژنتیک ۲۳

۲-۱۳- پیش ساز α آمیلاز ۲۳

۲-۱۴- کاربرد α آمیلاز ۲۴

۲-۱۵- پایداری و نگهداری آنزیم تولید شده ۲۷

فهـــرست مطالب

عنوان صفحه

۲- ۱۶- میکروارگانیسم‌های تولید کننده α آمیلاز ۲۸

فصل سوم: مـواد و روش‌ها

۳-۱- مواد و دستگاههای مورد استفاده ۳۱

۳-۲- محیط کشتهای مورد استفاده ۳۲

۳-۳- نمونه گیری، جداسازی وغربالگری ۳۳

۳-۴- آزمایشات بیوشیمیایی و میکروبیولوژیک مورد استفاده ۳۴

۳-۵- سنجش آنزیمی ۴۲

۳-۶- بهینه سازی محیط کشت برای تولید آنزیم ۴۳

الف- بررسی ارتباط تولید آنزیم با رشد باکتری ۴۳

ب- بهینه سازی pH ۴۳

ج- بهینه سازی دما ۴۳

د- بررسی اثر هوادهی محیط کشت ۴۴

ه- بهینه سازی روش تلقیح ۴۴

و- بررسی اثر منبع کربن ۴۴

۳-۷- بررسی فعالیت آنزیم ۴۵

الف- pH ۴۵

ب- دما ۴۵

ج- بررسی پایداری حرارتی آنزیم ۴۵

د- تاثیر یونهای فلزی بر روی فعالیت آنزیم ۴۵

۳-۸- تخلیص عصاره سلولی باکتری ۴۶

۳-۹- تغلیظ عصاره سلولی با آمونیوم سولفات ۴۷

الف- فرآیند دیالیز پروتئین‌ها ۴۸

فهـــرست مطالب

عنوان **صفحه**

۳-۱۰- الکتروفورز پروتئین‌ها و آنزیم‌ها ۵۱
الف- الکتروفورز پروتئین‌ها به روش SDS- PAGE در سیستم بافری ناپیوسته ۵۱
ب- روش تهیه محلول‌ها و بافرهای لازم در سیستم ناپیوستهSDS- PAGE ۵۲
ج- روش تهیه ژل SDS-PAGE ۵۵
د- آماده‌سازی عصاره پروتئینی و تزریق در ژل‌های SDS-PAGE ۵۶
ه- تثبیت ژل‌های پروتئینی ۵۷
و- رنگ‌آمیزی پروتئین‌ها در ژل ۵۷
ز- رنگ‌بری ژل‌های پروتئینی ۵۸
ح- رنگ آمیزی برای فعالیت آنزیم ۵۸
ط- مارکر استفاده شده ۵۸

فصل چهارم : نتـــایج

۴-۱- خصوصیات سویه باکتریایی غربالگری شده ۵۹
۴-۲- بهینه سازی محیط کشت برای تولید آنزیم ۶۲
۴-۲-۱- تولید آنزیم در زابطه با منحنی رشد باکتری ۶۲
۴-۲-۲- اضافه کردن 10mM Ca^{2+}، و ۱٪ پپتون به محیط کشت پایه C ۶۳
۴-۲-۳- اضافه کردن ۱٪ گلوکز به محیط کشت پایه C ۶۴
۴-۲-۴- تأثیر pH برروی تولید آنزیم ۶۵
۴-۲-۵- تأثیر دما برروی تولید آنزیم ۶۶
۴-۲-۶- تأثیر منبع کربن بر روی تولید آنزیم ۶۷
۴-۲-۷- تأثیر افزودن منابع کربن ساده برروی رشد و تولیدآنزیم ۶۸
۴-۲-۸- بررسی اثر هوادهی ۶۹
۴-۲-۹- بهینه سازی روش تلقیح ۶۹

فهـــرست مطالب

عنوان صفحه

۴-۳- بررسی فعالیت آنزیم ۷۰

۴-۳-۱- تاثیر pH برای فعالیت آنزیم ۷۰

۴-۳-۲- تاثیر دما برای فعالیت آنزیم ۷۱

۴-۳-۳- پایداری حرارتی آنزیم در دماها و زمان‌های مختلف ۷۲

۴-۳-۴- تاثیر یون‌های فلزی بر روی فعالیت آنزیم ۷۴

۴-۳-۵- تعیین غلظت پروتئین کل سیتوپلاسمی با روش برادفورد ۷۵

۴-۳-۶- اکتروفورز به روش SDS-PAGE ۷۷

فصل پنجم : بحث و نتیجه‌گیری

۵-۱- کلیات ۷۹

۵-۲- سنجش آنزیمی ۸۰

۵-۳- بهینه‌سازی ۸۱

۵-۳-۱- بهینه سازی pH تولید ۸۱

۵-۳-۲- بهینه‌سازی دمای تولید ۸۲

۵-۳-۳- بهینه‌سازی منبع پروتئین ۸۲

۵-۳-۴- بهینه‌سازی منبع کربن ۸۴

۵-۳-۵- بررسی اثر هوادهی سیستم ۸۶

۵-۳-۶- بهینه‌سازی متد تلقیح ۸۷

۵-۳-۷- بررسی ارتباط منحنی رشد با تولید آنزیم ۸۸

۵-۴- بررسی فعالیت آنزیم ۸۹

۵-۴-۱- تاثیر pH مناسب برای فعالیت آنزیم ۸۹

۵-۴-۲- بهینه سازی دمای مناسب برای فعالیت آنزیم ۹۰

۵-۴-۳- پایداری حرارتی آنزیم ۹۰

فهـــرست مطالب

عنوان **صفحه**

۵-۴-۴- تأثیر نمک‌های معدنی و یون‌های فلزی ۹۱

۵-۵- تخلیص آنزیم ۹۳

۵-۵-۱- میزان پروتیین کل سلول و مقایسه مقدار α- آمیلاز تولید شده با آن ۹۳

۵-۵-۲- الکتروفورز ۹۳

منابع ۹۴

۱-۱- تعریف

میکروبیولوژی صنعتی علمی است در رابطه با استفاده صنعتی از پتانسیل متابولیسمی میکروارگانیسمها و همچنین اجزائی از آنها (نظیر آنزیمها) با هدف سنتز و تولید محصولات مختلف و تجزیه و تبدیل مواد. (۴۶،۱۷)

میکروبیولوژی صنعتی امروزه سهم به سزائی در برطرف کردن نیازهای مادی، بهداشت و سلامت انسان و در عین حال در حفظ محیط زیست دارد.

آنچه در مبحث میکروبیولوژی صنعتی مورد بحث و توجه قرار می‌گیرد عبارتند از :

- زمینه‌های کاربردی میکروبیولوژی صنعتی و محصولات بیوتکنولوژی:

امروزه میکروارگانیسمهای زیادی هستند که پروسه‌های متابولیسمی آنها بطور کامل شناخته شده و در مقیاس صنعتی مورد بهره برداری قرار گرفته اند.

تولید محصولات غذائی و آشامیدنی با فرآیندهای بیوتکنولوژی؛ تولید اسید آمینه ها، اسیدهای چرب، پلی ساکاریدهای برون سلولی، آنزیمها، ویتامینها، طعم دهنده‌ها و دیگر فرآورده‌های بیولوژیک، تولیدات حاصل از تخمیر شامل : اتانول، اسیدهای آلی، بوتانول، و استن، بیوسورفاکتانتها، تولیدات حاصل از جسم باکتری شامل : واکسنها، حشره کش ها، و پروتئینهای سلولی، آنتی بیوتیک ها، استروئیدها ؛و تولیدات حاصل از اکسیداسیون مانند استخراج مس، طلا و. ..؛ محصولات بیولوژیک برای صنایع پزشکی، کشاورزی و تأمین مواد معدنی در خاک توسط قارچها از جمله این موارد هستند. (۴۶،۴)

- بررسی روشهای کشت میکروارگانیسمهای تولید کننده
- بررسی فرآیندهای تخمیری(Fermentation) و دیگر روشهای تولیدی در حیطه بیوتکنولوژی
- بررسی متدها و فرآیندهایی برای تثبیت بیوکاتالیزورها

- بررسی روشهای افزایش راندمان، بهینه کردن راندمان و فعالیت میکروارگانیسها از طریق تغییرات در ماده ژنتیکی میکروارگانیسمها با کمک مواد القاء کننده موتاسیون، غربال سازی (Sscreening) نمونه‌ها و متابولیتهای میکروبی (۴)

یکی از بخش‌های مهم میکروبیولوژی صنعتی، ارائه روشهایی برای بدست آوردن متابولیتهای جدید میکروبی می‌باشد. که در این رابطه چند روش عمده وجود دارد :

- غربال سازی (Screening) برای متابولیتهای جدید یا میکروارگانیسمهای تازه.
- اصلاح شیمیایی متابولیتهای میکروبی شناخته شده
- Biotransformation یا Bioconversion که عبارت است از دگرگونیهای شیمیایی یک یا چند مرحله‌ای با کمک بیوکاتالیزورها. یک بیوکاتالیزور می‌تواند میکروارگانیسم کامل یاآنزیمی تخلیص شده از آن باشد.
- آمیزش پروتوپلاست بین گونه ای که وسیله ای برای الحاق اطلاعات ژنتیکی حاصل از نژادهای تولیدکننده دارای خویشاوندی می‌باشند.
- Gene Cloning که با کمک آن می‌توان ژنها را بین نژادهای غیر خویشاوندی که تولید کننده ترکیبات شناخته شده هستند انتقال داد. (۴،۷۲)

بدلیل اهمیت و کاربرد فراوان آمیلازها در صنایع مختلف، محققین همواره بدنبال یافتن میکروارگانیسمهای جدید تولید کننده α- آمیلاز بوده اند و حتی امروزه میکروارگانیسمهایی از محیطهای ویژه جداسازی شده اند که آنزیم تولید شده توسط آنها دارای شرایط فعالیت بسیار جالبی می‌باشد.

در ایران نیز تاکنون کارهای زیادی برروی این آنزیم و کاربردهای آن انجام شده است. از جمله پایان نامه کارشناسی ارشد رضا شریف آبادی در سال ۱۳۷۵ از دانشگاه تربیت مدرس با موضوع تولید α-آمیلازترموفیل توسط باسیلوس لیکنی *فورمیس Bacillus.licheniformis* و خالص سازی آن. (۴)

تثبیت باسیلوس لیکنی فورمیس *Bacillus.licheniformis* در ریزدانه‌های ژلی آلژینات توسط مصطفی آقایی اقدم در سال ۱۳۷۵ از IBB دانشگاه تهران(۷۷) ؛ و مقایسه α-آمیلاز ترموفیل با مزوفیل توسط خسرو خواجه در سال ۱۳۷۵ از IBB دانشگاه تهران. (۳) همچنین جداسازی سویه برتر در تولید α-آمیلاز مقاوم حرارتی توسط خانم مهشید عبدالعظیمی در سال ۱۳۷۸ از دانشگاه الزهرا(۲)

۲-۱- میکروارگانیسم‌های اکستریموفیل

میکروارگانیسم‌های اکستریموفیل با زندگی در نیچ‌های اکولوژیکی نظیر حرارت‌های خاص (۱۵-۲ °c- و یا ۱۱۰°c-۶۰)، غلظت‌های یونی بالا (بین ۵-۲ NaCl M) و یا pH (۴> و ۹<) سازگار شده‌اند. از طریق مقایسه توالی‌های ژنومی 16SrRNA ثابت شده که اکثریت اکستریموفیل‌ها، اعضاء گروه آرکی باکترها هستند. با وجودیکه تعدادی از آنها درگروه باکتری‌های معمولی قرار می‌گیرند. اکستریموفیل‌ها به عنوان منبعی از آنزیم‌ها با مقاومت‌های ویژه (که تحت عنوان اکستریموزیم Extremozyme از آنها نام برده می‌شود) و کاربرد آنها بعنوان بیوکاتالیست مورد توجه قرار گرفته‌اند چرا که آنها تحت شرایطی مقاومت نشان داده و فعال هستند که قبلاً به عنوان شرایط نامساعد زیستی از آن یاد می‌شد. به علاوه، روشن شده است که تعدادی از اکستریموفیل‌ها به ویژه اعضاء آرکی باکترها، راهکارهای متابولیکی ویژه‌ای دارند و بنابر این ممکن است از آنها به عنوان منبعی از آنزیم‌ها با فعالیت‌ها و کاربردهای خاص استفاده کرد. در جدول 1، جنس‌هایی از آرکی باکتریها و فنو تیپ آنها مشخص شده است. (۵۸)

جدول ۲-۱ : جنسهایی از آرکی‌ها و فنوتیپ آنها

Extremophiles and their environments.

Phenotype	Environment	Typical genera
Thermophilic	55–80°C	*Methanobacterium, Thermoplasma, Thermus*,* some *Bacillus** species
Hyperthermophilic	80–113°C	*Aquifex*, Archaeoglobus, Hydrogenobacter*, Methanothermus. Pyrococcus. Pyrodictium, Pyrolobus, Sulfolobus, Themococcus, Thermoproteus, Thermotoga**
Psychrophilic	-2 to 20°C	*Alteromonas*, Psychrobacter**
Halophilic	2–5M NaCl	*Haloarcula, Halobacterium, Haloferax, Halorubrum*
Acidophilic	pH<4	*Acidianus, Desulfurolobus, Sulfolobus, Thiobacillus**
Alkaliphilic	pH>9	*Natronobacterium, Natronococcus,* some *Bacillus** species

*Genera of the domain Bacteria; all others are Archaea.

اکثر ترموفیل‌ها و اکستریم ترموفیل‌ها، اعضاء شاخه آرکی‌ها هستند و این گروه عموماً در حرارت‌های بالای ۸۰°C رشد می‌کنند. در حالی که ترموفیل‌های عضو شاخه یوباکترها در حرارت‌های بین ۷۰-۶۰ °C رشد می‌کنند. محیط‌هایی که اکستریم ترموفیل‌ها در آن زندگی

می‌کنند برای انجام فتوسنتز بسیار داغ می‌باشد. بنابر این تعجبی ندارد که بسیاری از آنها از متابولیسم‌هایی استفاده می‌کنند که ترکیبات سولفوره در آنها نقش دارد. (۵۸)

ترموفیل‌ها بر اساس نیاز حرارتی‌شان به ۲ گروه اجباری و اختیاری تقسیم می‌شوند.

❖ ترموفیل‌های اجباری (اکستریم ترموفیل‌ها) به درجه حرارت‌های بالا برای رشد نیاز دارند.

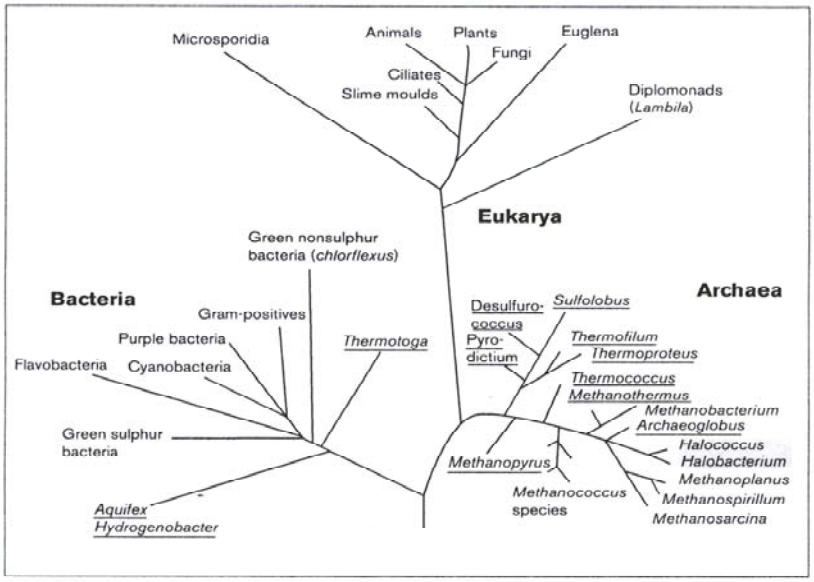
❖ ترموفیل‌های اختیاری (معتدل) هم در درجه حرارت‌های بالا و هم در درجه حرارت‌های زیر $۵۰^{\circ}C$ به خوبی رشد می‌کنند.

هایپرترموفیل‌ها مشخصه اکستریم ترموفیل‌ها هستند که در بالای $۸۰^{\circ}C$ رشد می‌کنند. (۶۲)

به خاطر مقاومت حرارتی بالای این میکروارگانیسم‌ها، آنزیم‌های آنها در بسیاری از کاربردهای تجاری و صنعتی استفاده می‌شود. (۶۱)

بعلاوهٔ آنزیم‌ها، مطالعه پروتئین‌های ترموفیل‌ها، دیدگاه مهمی در مکانیسم Folding پروتئین بشمار می‌آید. چرا که این پروتئین‌ها بایستی نسبت به حرارتی که سبب دناتوره شدن پروتئین‌های معمولی می‌شود مقاومت نشان دهند. (۶۱)

شکل ۲- ۱، محل قرارگیری گونه‌های ترموفیل و هایپرترموفیل را در درخت فیلوژنی جهانی نشان می‌دهد.



شکل ۲-۱ : قرارگیری گونه‌های ترموفیل و هایپرترموفیل در درخت فیلوژنی جهانی

۲-۲- مقاومت مولکولی در برابر حرارت :

یک ارگانیسم برای رشد در درجه حرارت‌های بالا، نیازمند آن است که تمام اجزاء سلولیش نظیر پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و لیپیدها نسبت به حرارت مقاوم باشند.

مقاومت گرمایی آنزیم‌های هایپر ترموفیل‌های مختلف (اکستریموزیم‌ها Extremozymes) بررسی شده است و مشخص شده است که تعدادی از آنها در درجه حرارت ۱۴۰°C هم فعال باقی می‌مانند. شکل ساختمانی که سبب القاء مقاومت حرارتی در پروتئین‌ها می‌شود، هنوز بدرستی شناخته نشده است. ولی تشخیص داده شده است که پیوندهای غیرکووالان در پروتئین‌های مقاوم حرارتی، بدون شک سبب استحکام قسمت داخلی پروتئین و در نتیجه مقاومت افزاینده نسبت به Unfolding می‌شود و شکل فشرده‌ای را در پروتئین ایجاد می‌کند.(۶۰)

مقدار گلایسین کمتر از حد معمول که باعث کاهش انعطاف‌پذیری و در نتیجه ایجاد سختی بیشتر می‌شود. (۶۱)

اتصالات متقاطع یونی گسترده در سطح پروتئین، کمک می‌کند تا در حرارت‌های بالا Unfold نشود. بعلاوه تمام این فاکتورها، پروتئین‌های ویژه‌ای به نام چاپرونین توسط هایپرترموفیل‌ها سنتز می‌شوند که به پروتئین‌هایی که احتمال دناتوره شدن در اثر حرارت باالا را دارند می‌چسبند و آنها را به فرم فعال نگه می‌دارند. Thermosome شکلی از چاپرونین‌هاست که بطور وسیع در هایپرترموفیل‌ها دیده می‌شود و به آنها توانایی رشد در حرارت‌های بالای ۱۰۰°C را می‌بخشد (*P.Fumarii*).

باوجودی که چندین عامل، برای جلوگیری از ذوب DNA در هایپرترموفیل‌ها، با هم ترکیب می‌شوند، ۲ عامل، اهمیت ویژه‌ای دارند :

❖ آنزیم Reverse DNA gyrase که ایجاد سوپرکوپل مثبت از DNA حلقوی بسته می‌کند (بر خلاف DNA گیراز باکتری‌های غیر هایپرترموفیل که سوپرکویل منفی ایجاد می‌کند).

❖اشکال متفاوتی از پروتئین‌های متصل به DNA که شامل پروتئین‌های شبه هیستونی هستند.

بنا به دلایل مختلف فیزیکوشیمیایی، سوپرکویل مثبت DNA نسبت به سوپرکویل منفی، به دناتوره شدن حرارتی، مقاوم‌تر است. (۶۲، ۶۱، ۶۰)

چندین باکتری هایپرترموفیل، حاوی پروتئین‌های متصل به DNA هستند که نقش حفاظت آنرا به شکل ۲ رشته‌ای در حرارت بالا بعهده دارند. بعضی از این پروتئین‌ها از نظر ساختمانی مرتبط با هیستون‌های هستهٔ سلول‌های یوکاریوتی هستند و عملکردشان بر اساس متراکم و فشرده کردن بیشتر DNA برای تشکیل ساختار شبه نوکلئوزومی است و بقیه هیچ ارتباط ساختاری به هیستون‌ها ندارند. ولی هنگامی که به DNA متصل می‌شوند، ساختار آنرا طوری تغییر می‌دهند که بطور خاصی، درجه دناتوره شدن آن، بالا می‌رود.

به احتمال زیاد، ترکیب سوپرکویل مثبت و پروتئین‌هایی که از ذوب DNA جلوگیری می‌کنند، راه حل اصلی حفظ و باقی ماندن DNA در حرارت بالا می‌باشد. (۶۲، ۶۱)

- **مقاومت غشاء:**

حرارت روی مقاومت و پایداری غشاء هم تأثیر می‌گذارد. در موجودات زنده‌ای که در حرارت‌های معتدل بسر می‌برند، غشاء سلولی به صورت ۲ لایه لیپیدی می‌باشد : قسمت هیدروفوب (اسیدهای چرب) در داخل و قسمت هیدروفیل (گلیکو پروتئین‌ها) در سطح قرار می‌گیرد و بطور نسبی با فاز آبی تماس برقرار می‌کند.

در صورتیکه چنین غشایی در مقابل حرارت قرار گیرد، ۲ لایه از هم باز می‌شود و منجر به از بین رفتن غشاء و افزایش نفوذپذیری به سیتوپلاسم می‌شود. برای جلوگیری از این اتفاق، در حرارت بالا، هایپرترموفیل‌ها دارای غشاء ویژه‌ای هستند:

این باکتری‌ها، بجای تشکیل غشاء ۲ لایه‌ای گفته شده، قسمت‌های هیدروفوبیک را از یک لایه، بطور شیمیایی بهم متصل می‌کنند. این فرم لیپیدی تک لایه‌ای، از ذوب غشاء در حرارت بالا جلوگیری می‌کند. در لیپید های آرکی ها ، پیوندهای اتری بین گلیسرول و زنجیره های جانبی آبگریز دیده می‌شود. بعلاوه، چربی‌های آرکی‌ها فاقد اسیدهای چرب هستند و به جای آن زنجیره‌های جانبی دارند که از واحدهای تکراری هیدروکربنی به نام ایزوپرن (Isoprene) تشکیل شده اند. گلیسرول دی اتر و گلیسرول تترا اتر گروه‌های اصلی چربی‌هایی هستند که در گونه‌های آرکی‌باکترها حضور دارند. در گلیسرول تتراتر زنجیره‌های جانبی فیتانیل (Phytanyl) از هر ملکول گلیسرول به صورت کووالانت به همدیگر متصل می‌شوند و ایجاد یک غشاءتک لایه را می‌دهند.

هر چند این فرم غشاء از گونه‌ای به گونه دیگر متفاوت است، تنها مختص هایپرترموفیل‌ها و به عنوان پاسخی به حرارت بالاست.

با توجه به توضیحات داده شده، توانایی پاسخ به حرارت بالا در گونه های هایپرترموفیل نسبت به ارگانیسم های یوکاریوتیک و یوباکترها متفاوت است. آرکی‌هایی نظیر *Methanococus Voltae* و *Methanosarcina Mazei* با کاهش فعالیت چندین ژن و افزایش فعالیت ژن‌های مسئول در پاسخ‌های شوک‌های حرارتی به این استرس محیطی پاسخ می‌دهند. البته باید به این نکته توجه داشت که میکروارگانیسم‌های ترموفیل و اکستریم ترموفیل در محدوده دمایی بالاتر از حد مجاز برای سایر میکروارگانیسم‌ها رشد می‌کنند و حرارت بالا از جمله نیازهای رشدی آنها محسوب می‌شود. (۶۲)

۲-۳- پایداری آنزیم‌های ترموفیلیک

توانایی میکروارگانیسم‌ها برای بقاء و رشد و تکثیر فعال در دماهایی که پروتئین‌های معمولی و مخصوصاً آنزیم‌ها غیر فعال می‌شوند، موضوع جالبی برای تحقیقات در مورد مبانی

مولکولی گرمادوستی ایجاد کرده است. مطالعات مقایسه‌ای آنزیم‌های مشابه بین گونه‌های گرمادوست و غیرگرمادوست به وسیله تعدادی از محققین انجام شده است. به طور کلی عوامل متعددی برای این پایداری بیشتر پیشنهاد شده است. (۴) گرمادوست‌ها عوامل درونی دارند که باعث افزایش پایداری حرارتی می‌شود و یا برعکس غیر گرمادوست‌ها عوامل دورنی دارند که باعث کاهش پایداری حرارتی می‌شود. تلاش‌های مختلف برای انتقال خاصیت پایداری حرارتی به وسیله عصاره محیط کشت سلولی باکتری‌های گرمادوست به باکتری‌های غیرگرمادوست ناموفق بوده است. برای بعضی از آنزیم‌های گرمادوست ثابت شده است که در دمای مطلوب رشد باکتری‌های گرمادوست پایدار نیستند و به وسیله ترکیبات خاص سلول مانند غشاءها و یا کوفاکتورها پایدار می‌شوند. ولکر[1] در ۱۹۷۶ پایداری حرارتی آلکالین فسفاتاز به وسیله غشاء سلولی را نشان داد. ولکر در ۱۹۸۷ نیز نشان داد گلوتامات سنتتاز به وسیله سه عامل زیر پایدار می‌شود :

I) اتصال گلوتامات ATP و Mn^{2+}

II) تغییر در ساختمان پروتئین ناشی از افزایش تعداد اسید آمینه قطبی

III) تا خوردن آنزیم در اثر انرژی آزاد شده از اتصالات هیدروفوبی

کلسیم به عنوان عامل پایداری آنزیم‌های خارج سلولی مانند آمیلاز و پروتئاز نشان داده شده است.

بیشتر مطالعات بر روی پروتئین‌های گرمادوست، پیشنهاد می‌کنند که پایداری ساختمان پروتئین، بستگی به توالی اسیدهای آمینه و ترکیب آنها دارد. نشان داده شده است که چندین پروتئین گرمادوست و غیرگرمادوست تنها در تعداد کمی اسیدآمینه با هم اختلاف دارند. حال آنکه تفاوت آنها در ساختار دوم و سوم مولکول پروتئین از طریق افزایش باندهای هیدروژنی، پیوندهای هیدروفوب و تداخل گروه‌های یونیزه، نیز مؤثر می‌باشند. بیشتر اطلاعات نشان می‌دهند که در پروتئین‌های گرمادوست پیوندهای دی‌سولفید کمتر از مشابه‌های غیرگرمادوست وجود دارد. (۴)

1- Welker

مطالعه بر روی فرودوکسین‌های کلستریدیوم‌ها در بین گونه‌های گرمادوست و غیرگرمادوست تشابه قابل توجهی را در مورد وزن مولکولی، میزان آهن، گوگرد معدنی، سیستئین و تعداد اسیدهای آمینه نشان داد. با وجود این، پروتئین‌های گونه‌های گرمادوست پایداری حرارتی بیشتری را نشان دادند. فرودوکسین (با وزن مولکولی ۶۰۰۰ دالتون) هیچ ساختمان دوم و سوم ندارد و به همین دلیل تغییر در پایداری حرارتی آن احتمالاً ناشی از تغییر در نوع اسیدهای آمینه می‌باشد. مطالعات مقایسه‌ای توالی پروتئین‌ها نشان داد که فقط در فرودوکسین‌های گرمادوست، هیستیدین وجود دارد که جایگزین سرین و یا تیروزین شده است.

درفرودوکسین‌های گرمادوست باکتری کلستریدیوم ترموساکارولیتیکم *Clostridium thermosuccharolyicum* حداکثر چهار پیوند یونی تشکیل می‌شود، در حالی که در کلستریدیوم اوسیدوریکی *C. ucidurici* فقط یک پیوند یونی وجود دارد. پایداری بیشتر با تعداد افزایش یافته اسید گلوتامیک، در ارتباط است. شش عدد اسید گلوتامیک در فرودوکسین باسیلوس استئاروترموفیلوس *B. stearothermophilus* وجود دارد و ثابت شده است که اسید گلوتامیک بهترین اسید آمینه برای تشکیل α-هلیکس می‌باشد.

افزایش ۳٪ پیوند هیدروژنی برای افزایش دمای ذوب شدن زنجیرهٔ پلی‌پپتیدی (با وزن مولکولی ۳۵۰۰۰ دالتون) از ۳۵°C به ۴۰°C کافی است و تفاوت ۱۰ Kcal/mol در انرژی فعال سازی می‌تواند از طریق تعویض چند اسیدآمینه ایجاد شود. پایداری حرارتی سی برابر در دمای ۶۰°c در آنزیم تریوزفسفات ایزومراز عضلهٔ خرگوش و باسیلوس استئاروترموفیلوس را می‌توان به تفاوت انرژی فعالسازی فقط به میزان ۲/۲ Kcal/mol مربوط دانست. تفاوت‌های پایداری حرارتی فرودوکسین‌ها را می‌توان فقط ناشی از تفاوت‌های ۴/۵-۸/۵ Kcal/mol دانست.(۴)

گلیسرآلدئید ۳- فسفات دهیدروژناز عضلهٔ خرگوش بعد از ۱۰ دقیقه در ۷۰°C به میزان ۹۳٪غیرفعال می‌شود، درحالیکه آنزیم باسیلوس استئاروترموفیلوس. *B stearothermophilus*

نسبتاً پایدار است و فقط ۵٪ بعد از ۱۰ دقیقه در ۹۰°C غیرفعال می‌شود. آنزیم حاصل از ترموس آکواتیکوس Thermus aquaticus برای چندین ساعت در دمای ۹۰°C پایدار است. پایداری آنزیم باسیلوس استئاروترموفیلوس *B. stearothermophilus* با نیروهای هیدروفوبیک و پیوندهای یونی اضافی بیشتری ایجاد می‌شود. مدارک نشان می‌دهد که تغییرات کوچک و ناچیز در تعداد اسیدهای آمینه باعث ایجاد تغییرات قابل توجه در پایداری حرارتی آنزیم‌هایی می‌گردد که معمولاً تشابه ساختمانی نزدیکی را نشان می‌دهند. این جایگزین‌ها مسئول افزایش امکان ایجاد پیوندهای هیدروژنی، پیوندهای هیدروفوبی و پیوندهای یونی می‌باشند که به نظر می‌رسد در افزایش پایداری آنزیم‌های حاصل از میکروارگانیسم‌های گرمادوست ضروری هستند. (۵۸، ۵۶، ۴)

۲-۴- تولید بیوکاتالیست و بیومولکول‌ها از اکستریموفیل‌ها:

چندی است که تحقیق و بررسی بر روی گونه‌های مختلف اکستریموفیل‌ها و بالخصوص اکستریم ترموفیل‌ها بواسطه مصارف عمده صنعتی، افزایش پیدا کرده است و مشخص شده است که توانایی عمده این میکروارگانیسم‌ها برای بقا در محیط‌های ویژه (اکستریم) منحصراً بواسطه وجود آنزیم‌ها و مسیرهای ویژه بیوشیمیایی آنها می‌باشد. در حقیقت، این آنزیم‌های یک میکروارگانیسم هستند که خود را با شرایط محیطی ویژه وفق می‌دهند و این مقاوت و سازگاری، می‌تواند به عنوان اهرمی کمک کننده در پروسه‌های زیستی و بیوشیمیایی باشد. (۵۹)

مسیر کلاسیک تولید آنزیم میکروبی شامل جداسازی میکروارگانیسم از طریق کشت خالص، با تخلیص آنزیم یا از میزبان طبیعی یا بوسیله cloning و بیان ژن مربوطه، برای بدست آوردن اکستریموزیم‌ها (آنزیم‌های بدست آمده از اکستریموفیل‌ها) می‌باشد. (۵۶)

مسیر دیگر، در شرایطی استفاده می‌شود که کشت خالص، امکان‌پذیر نباشد که روش‌های این مسیر شامل :

ـ غربال‌گری ژن‌های بدست آمده از DNA محیطی