بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه حکیم سبزواری

فرم ۱۱۴ - ت

شماره :

تاریخ :

بسمه تعالی

صورتجلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد/دکتری

با تلاوت آیاتی چند ازکلام ا... مجید جلسه دفاع از پایان نامه آقای /خانم فاطمه تکتاز دانشجوی رشته بیوشیمی با عنوان جداسازی، خالص سازی و مطالعه خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم آلفا آمیلاز مقاوم به حلال آلی از سویه باکتریایی اکستریموفیل بومی جدید

در ساعت ۱۴-۱۲ مورخه ۹۲/۶/۳۱ در محل دانشکده ادبیات و علوم انسانی تشکیل گردید .

پس از استماع گزارش ارائه شده توسط دانشجو و استاد راهنما هیات داوران و حاضران سئوالاتی را مطرح و خانم فاطمه تکتاز به دفاع از موضوع پرداخت وبه سئوالات آنها پاسخ گفت .

سپس پایان نامه توسط هیات داوران مورد ارزشیابی قرار گرفت و نمره ۱۹/۷۵ برابر درجه عالی برای آن تعیین گردید .

به این ترتیب ضمن تصویب پایان نامه مزبور از این تاریخ خانم فاطمه تکتاز به عنوان کارشناس ارشد در رشته بیوشیمی شناخته می شود .

ردیف	نام و نام خانوادگی	سمت	امضا
۱	دکتر نسرین ملانیا	استاد راهنما	
۲	دکتر جعفر وطن دوست	استاد داور	
۳	دکتر سعید نظری	نماینده تحصیلات تکمیلی	

نام و نام خانوادگی وامضای مدیر گروه

رونوشت

۱- معاونت آموزشی و تحصیلات تکمیلی دانشگاه جهت اطلاع

۲- معاونت پژوهشی دانشگاه جهت اطلاع

۳- آموزش دانشکده جهت درج در پرونده دانشجو

۴- دانشجو

دانشگاه حکیم سبزواری
معاونت آموزشی و تحصیلات تکمیلی
مدیریت تحصیلات تکمیلی

سوگند نامه دانش آموختگان دانشگاه حکیم سیزواری

به نام خداوند جان و خرد کزین برتر اندیشه بر نگذرد

اینک که به خواست آفریدگار پاک ، کوشش خویش و بهره گیری از دانش استادان و سرمایه های مادی و معنوی این مرز و بوم، توشه ای از دانش و خرد گردآورده ام، در پیشگاه خداوند بزرگ سوگند یاد می کنم که در به کارگیری دانش خویش، همواره بر راه راست ودرست گام بردارم. خداوند بزرگ، شما شاهدان، دانشجویان و دیگر حاضران را به عنوان داورانی امین گواه می گیرم که ازهمه دانش و توان خود برای گسترش مرزهای دانش بهره گیرم و از هیچ کوششی برای تبدیل جهان به جایی بهتر برای زیستن، دریغ نورزم. پیمان می بندم که همواره کرامت انسانی را در نظر داشته باشم و همنوعان خود را در هر زمان و مکان تا سر حد امکان یاری دهم. سوگند می خورم که در به کارگیری دانش خویش به کاری که با راه و رسم انسانی، آیین پرهیزگاری، شرافت و اصول اخلاقی برخاسته از ادیان بزرگ الهی، به ویژه دین مبین اسلام، مباینت دارد دست نیازم. همچنین در سایه اصول جهان شمول انسانی و اسلامی، پیمان می بندم از هیچ کوششی برای آبادانی و سرافرازی میهن و هم میهنانم فروگذاری نکنم و خداوند بزرگ را به یاری طلبم تا همواره در پیشگاه او و در برابر وجدان بیدار خویش و ملت سرافراز ، بر این پیمان تا ابد استوار بمانم.

نام و نام خانوادگی دانشجو فاطمه تکتاز

تاییدیه‌ی صحت و اصالت نتایج

بسمه تعالی

اینجانب فاطمه تکتاز به شماره دانشجویی ۹۰۱۳۸۳۱۰۴۵ رشته بیوشیمی
مقطع تحصیلی کارشناسی ارشد

تایید می نمایم که کلیه نتایج این پایان نامه حاصل کار اینجانب و بدون هرگونه دخل و تصرف و موارد نسخه برداری شده از آثار دیگران را با ذکر کامل مشخصات منبع ذکر کرده ام در صورت اثبات خلاف مندرجات فوق به تشخیص دانشگاه مطابق با ضوابط و مقررات حاکم (قانون حمایت از حقوق مولفان و مصنفان . قانون ترجمه و تکثیر کتب و نشریات و آثار صوتی ضوابط و مقررات آموزشی پژوهشی و انضباطی ...) با اینجانب رفتار خواهد شد . و حق هر گونه اعتراض در خصوص احقاق حقوق مکتسب و تشخیص و تعیین تخلف و مجازات را از خویش سلب می نمایم . در ضمن مسئولیت هر گونه پاسخگویی به اشخاص اعم از حقیقی و حقوقی و مراجع ذی صلاح (اعم از اداری و قضایی) به عهده اینجانب خواهد بود و دانشگاه هیچ گونه مسئولیتی در این خصوص نخواهد داشت .

نام و نام خانوادگی : فاطمه تکتاز

تاریخ و امضاء:۱۳۹۲/۷/۱۰

مجوز بهره برداری از پایان نامه

بهره برداری از این پایان نامه در چهار چوب مقررات کتابخانه و با توجه به محدودیتی که توسط استاد راهنما به شرح زیر تعیین می شود بلامانع است :

بهره برداری از این پایان نامه با اخذ مجوز از استاد راهنما بلامانع است.

استاد راهنما:دکتر نسرین ملانیا

تاریخ:۱۳۹۲/۷/۱۰

امضا

دانشگاه حکیم سبزواری

دانشکده علوم پایه

پایان‌نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست‌شناسی گرایش بیوشیمی

جداسازی، خالص‌سازی و مطالعه خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم آلفاآمیلاز مقاوم به حلال آلی از سویه باکتریایی اکستریموفیل بومی جدید

استاد راهنما:

دکتر نسرین ملانیا

نگارش:

فاطمه تکتاز

شهریور ۱۳۹۲

باتقدیم به پیشگاه بانوی بانوان دو عالم حضرت فاطمه الزهرا (س).

منت خدای را، عز و جل، که طاعتش موجب قربت است، و به شکر اندرش مزید نعمت.
به یاری پروردگار و لطف بزرگانی که یادشان همواره در خاطرم جاودان است، فصلی دیگر از دفتر زندگی ام را نگاشتم؛ به این امید که تلاش هایم مورد قبول ذات خطاپوش حق تعالی قرار گیرد.
تهیه و نگارش این مجموعه را مرهون زحمات استاد بزرگوارم سرکار خانم دکتر نسرین ملانیا میدانم که در تمام مراحل انجام این پایان نامه همواره به من اعتماد کرد ه و با صبر و دقت بسیار مرا از راهنمایی های ارزشمند خویش بهره مند ساختند.
سپاس فراوان تقدیم به تنها سرمایه جاودان زندگیم، خانواده عزیزم که همواره مایه دلگرمی و آرامش خاطرم هستند.
وهمچنین با تشکر از دوستان عزیزم که افتخار آشنایی و دوستی با آنان مایه مباهات من است، باشد که همواره شاد و نیک فرجام باشند.

فرم چکیده‌ی پایان‌نامه‌ی دوره‌ی تحصیلات تکمیلی

مدیریت تحصیلات تکمیلی

نام خانوادگی دانشجو: تکتاز	**نام:** فاطمه	**ش دانشجویی:** ۹۰۱۳۸۳۱۰۴۵
استاد راهنما: دکتر نسرین ملانیا		**استاد مشاور:**

دانشکده: علوم	**رشته:** زیست شناسی	**گرایش:** بیوشیمی
مقطع: کارشناسی ارشد	**تاریخ دفاع:** ۱۳۹۲/۶/۳۱	**تعداد صفحات:** ۹۵

عنوان پایان‌نامه: جداسازی، خالص سازی و مطالعه خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم آلفا آمیلاز مقاوم به حلال آلی از سویه باکتریایی اکستریموفیل بومی جدید

کلیدواژه‌ها: باسیلوس، آلفا-آمیلاز، حلال های آلی، تعیین ویژگی

چکیده

آلفاآمیلازها از مهمترین و با اهمیت‌ترین آنزیم‌ها به شمار می‌آیند و اهمیت فراوانی در بیوتکنولوژی امروزی ایفا می‌کنند. اگر چه منابع مختلفی قادر به تولید آلفا-آمیلاز می‌باشند عموما آنزیم‌های مشتق شده از منابع میکروبی به ویژه منابع باکتریایی و از جنس باسیلوس از جنبه‌های کاربردی و صنعتی دارای ارزش می‌باشند و بیشتر مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته‌اند. استفاده از آنزیم‌ها در حلال‌های آلی به علت کاهش مقدار آب، محصولات جانبی ناخواسته را کاهش داده و از طرف دیگر تعادل ترمودینامیکی را در جهت سنتز فراورده پیش می‌برد و به این ترتیب راندمان عمل آنزیم را بالا می‌برد. بنابراین دست‌یابی به آمیلاز مقاوم به حلال آلی برای صنعت یک ضرورت است. در این تحقیق ابتدا سویه‌های باکتری از مناطق صنعتی عسلویه جداسازی و نسبت به تولید آنزیم تجزیه کننده نشاسته غربالگری شدند. در این مطالعه سویه باکتریای مقاوم به حلال آلی توانایی تولید آلفاآمیلاز خارج سلولی را دارا بود. در ادامه با استفاده از آنالیز 16S rDNA این سویه با نام ASM1 در پایگاه NCBI ثبت گردید و با رسم درخت فیلوژنتیکی جایگاه این سویه در مقایسه با سایر باسیلوس‌های شناخته شده تعیین شد. مطالعات تعیین توالی نشانگر شباهت بالای سویه با سویه *Bacillu Methylotrophicus* بود. با استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی و بکار بردن ستون Q-sepharose آلفاآمیلاز حاصل از *Bacillus Methylotrophicus* خالص و سپس تعیین خصوصیت گردید. فعالیت آنزیمی به کمک روش برنفلد و در حضور بافر تریس Mm ۲۰ تعیین شد. این آنزیم برای فعالیت به کلسیم نیاز ندارد. دما و pH بهینه این آنزیم به ترتیب ۵۵درجه سانتی گراد و۷/٤ بود. الکتروفورز با SDS-PAGE باندی را با وزن مولکولی٦٥ کیلو دالتون نشان داد. آنزیم نشاسته مایع را با Km و Vmax به ترتیب mM٤ وμmol/min ٦ تجزیه می‌نمود. فعالیت این آنزیم در حضور درصدهای مختلف حلال‌های آلی ازجمله بوتانل، متانل، پروپانل، کلروفرم و سورفکتا نت‌های غیر یونی توئین ۸۰ و توئین۲۰ بررسی شد. آنزیم در حضور٤٥٪ از بوتانل، متانل و پروپانل بطور میانگین تا ۳۰٪ از فعالیت خود را کاملا حفظ کرده و در حضور٦۰٪ از توئین ۸۰ ، توئین۲۰ و کلروفرم این درصد از فعالیت در آنزیم باقی ماند. این آنزیم در حضور ۲۰٪ از مایعات یونی 1-butyl-3-methylimidazolium ([Bmim]) و 1-ethyl-3-methylimidazolium ([Emim]) نیز تا ۷۰٪ از فعالیت خود را حفظ کرد. پایداری آنزیم در حضور ۱۰٪ از بوتانل، پروپانل، متانل، کلرفرم، توئین۲۰ وتوئین۸۰ به مدت ۹٦ ساعت انکوباسیون بررسی شد. فعالیت باقی مانده آنزیم به مدت ۵۰ ساعت تا بیش از ۱۰٪ در حضور همه انواع ترکیبات نامبرده مشاهده شد و نیمه عمر آنزیم تعیین گردید. ساختار آنزیم خالص در حالت کنترل و در حضور ۳۰٪ از حلال آلی بوتانل توسط تکنیک فلوروسانس مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت. الگوی غیر فعال شدن حرارتی برگشت ناپذیر در حضور کلسیم ، EDTA و حلال بوتانل بررسی گردید. این آنزیم در حضور یونهای Cr,Mg,Mo,Mn,Al,Li,Na,K ،سورفکتانت آنیونیSDS، شلاته کننده EDTA و ترکیب شیمیایی مرکاپتواتانل دچار کاهش فعالیت گردید، در حضور یون Ba فعالیت خود را ۱۰۰٪ حفظ کرد و در حضور Fe,Cu دچار افزایش فعالیت گردید. دناتوراسیون شیمیایی آنزیم در حضور اوره Mm ٦ مورد مطالعه قرار گرفت، همچنین فعالیت آلفاآمیلاز در حضور مهار کننده آکاربز اندازه‌گیری شد.

امضای استاد راهنما

فهرست مطالب

فصل اول مقدمه ۱

۱-۱ غربالگری آنزیمها و اهمیت آنها ۲

۱-۱-۱میکرو ارگانیسمها به عنوان مهمترین منابع آنزیمی ۳

۱-۱-۲میکرو ارگانیسمهای GRAS..... ۳

۱-۱-۳ غربالگری فعالیتهای آنزیمی و خصوصیات آنزیمی جدید ٤

۱-۲ اهمیت استفاده از آنزیم‌ها در حلال‌های آلی ۵

۱-۲-۱ پارامترهای طبقه بندی حلال‌های آلی ۶

۱-۲-۱-۱ Log P حلال ۶

۱-۲-۱-۲ (DC) Denaturation capacity ۷

۱-۲-۲ سیستم‌های حلالی ۸

۱-۲-۳ مشکلات استفاده از آنزیم‌ها در حلال های آلی ۹

۱-۲-۳-۱ دلایل کاهش فعالیت آنزیم‌ها در حلال‌های آلی خالص..... ۹

۱-۲-۳-۲ دلایل کاهش فعالیت آنزیم‌ها در حلال‌های آبی‌آلی ۱۰

۱-۲-۳-۳ تأثیر آب روی فعالیت آنزیم در حلال های آلی خالص ۱۱

۱-۲-۴ پایداری آنزیم‌ها در حلال‌ها ۱۲

۱-۲-۴-۱ پایداری پروتئین‌ها ۱۲

۱-۲-۴-۲ پایداری ترمودینامیکی ۱۲

۱-۲-۴-۳ پایداری سینتیکی ۱۳

۱-۲-۴-۴ پایداری آنزیم‌ها در حلال‌های آلی‌آبی ۱۳

۱-۲-۵ مکانیسم واسرشتگی پروتئین‌ها در حلال‌های آلی ۱۴
۱ -۲-۵-۱ مراحل واسرشتگی پروتئین‌ها در حلال‌های آلی ۱۴
۱-۲-۶ بررسی پایداری پروتئین در درصدهای مختلف از حلال آلی ۱۶
۱-۲-۶-۱ پایداری پروتئین ها در حلال‌های آلی خالص ۱۶
۱-۲-۷ روش های پایدار سازی پروتئین‌ها در حلال های آلی ۱۸
۱-۲-۷-۱ تغییرات شیمیایی در ساختار پروتئین ۱۸
۱-۲-۷-۲ تغییرات فیزیکی ۱۸
۱-۲-۷-۳ تثبیت ۱۹
۱-۲-۷-۴ استفاده از افزودنی‌ها ۱۹
۱-۳ مایعات یونی (Ionic Liquids) ۲۰
۱-۳-۱ ساختار مایعات یونی ۲۱
۱-۳-۲ مزایا و ویژگی‌های مایعات یونی ۲۱
۱-۴ آنزیمهای مؤثر بر نشاسته ۲۲
۱-۴-۱ آندوآمیلازها ۲۳
۱-۴-۲ اگزوآمیلازها ۲۳
۱-۴-۳ آنزیمهای شاخه شکن ۲۳
۱-۴-۴ ترانسفرازها ۲۴
۱-۵ خانواده آلفاآمیلازها ۲۵
۱-۶ منابع آلفاآمیلازی و خصوصیات فیزیکوشیمیایی ۲۶
۱-۷ کاربردهای صنعتی آلفاآمیلازها ۲۷
۱-۷-۱ صنعت تولید گلوکز و فروکتوز ۲۸
۱-۷-۲ صنعت نان ۲۹
۱-۷-۳ صنعت نساجی ۲۹
۱-۷-۴ صنعت شویندگی ۳۰

۱-۷-۵ تولید استون و بوتانول ۳۰
۱-۸ پایداری آلفاآمیلازها ۳۰
۱-۹ ساختار سه بعدی آلفاآمیلاز ۳۲
۱-۹-۱ اتصال یونهای کلسیم، سدیم و کلر ۳۲
۱-۹-۲ ساختار جایگاه فعال ۳۴
۱-۱۰ ساز و کار کاتالیتیک آلفاآمیلازها ۳۴
۱-۱۱ مهار کننده‌های آنزیم آلفاآمیلاز ۳۶
۱-۱۲ هدف از تحقیق ۳۷
فصل دوم مواد و روشها ۳۷
۲-۱ مواد شیمیایی ۳۹
۲-۲میکروارگانیسم و محیط‌های کشت مورد استفاده ۳۹
۲-۲-۱ میکرو رگانیسم ۳۹
۲-۲-۲ محیط‌های کشت میکروبی ۴۰
۲-۳ تولید آنزیم ۴۰
۲-۴ تخلیص آلفاآمیلاز ۴۱
۲-۵ تعیین فعالیت آنزیمی ۴۲
۲-۶ تعیین غلظت پروتئین ۴۴
۲-۷ مطالعات اولیه آنزیم شناسی ۴۵
۲-۷-۱اثر دما ۴۵
۲-۷-۲ اثر pH ۴۵
۲-۷-۳ تعیین عوامل سینتیکی ۴۵
۲-۷-۴ بررسی تغییرات فعالیت آنزیمی ذر حضور غلظت‌های مختلف حلال‌های آلی و سورفاکتانت‌های غیریونی..... ۴۶
۲-۷-۵ بررسی غیر فعال شدن حرارتی برگشت‌ناپذیر ۴۶
۲-۷-۵-۱ عدم حضور حلال‌های آلی ۴۶

۲-۷-۵-۲ در حضور کلسیم وEDTA ۴۷
۲-۷-۵-۳ در حضور حلال آلی ۴۷
۲-۷-۶ بررسی پایداری آنزیم در حضور حلال‌های آلی ۴۷
۲-۷-۷ بررسی اثر مهاری آکاربوز بر فعالیت آنزیم ۴۸
۲-۷-۸ اثر یونهای فلزی، EDTA و عوامل شیمیایی روی فعالیت آلفاآمیلاز ۴۸
۲-۷-۹ بررسی دناتوراسیون شیمیایی آنزیم تحت تاثیر اوره ۴۸
۲-۸ مطالعات ساختاری ۵۰
۲-۸-۱ بررسی فلورسانس ذاتی در عدم حضور حلال آلی ۵۰
۲-۸-۲ بررسی فلورسانس ذاتی در حضور حلال آلی ۵۱
۲-۹ تعیین توالی ژنS rDNA ۱۶ ..... ۵۱
۲-۹-۱ استخراج DNA ژنومی ۵۱
۲-۹-۲ طراحی پرایمر و انجام PCR ۵۲
۲-۹-۳ رسم درخت فیلوژنتیک ۵۳
۲-۱۰ روشهای الکتروفورزی ۵۳
۲-۱۰-۱ روش انجام SDS-PAGE ۵۴
۲-۱۰-۲ آنالیز زیموگرام ۵۵
۲-۱۰-۳ الکتروفوزر ژل آگارز ۵۶
۲-۱۰-۴ روش کار ۵۶
فصل سوم نتایج ۵۷
۳-۱ جداسازی و شناسایی باکتری ۵۸
۳-۲ تعیین گونه سویه با استفاده از آنالیز ۱۶ S rDNA ۵۸
۳-۳ تولید آنزیم وبهینه نمودن شرایط آن ۶۰
۳-۴ خالص سازی وتعیین وزن مولکولی آلفاآمیلاز ۶۱
۳-۵ مطالعات اولیه آنزیم شناسی ۶۳

۳-۵-۱ اثر pH بر فعالیت آنزیم ۶۳
۳-۵-۲ اثر دما بر فعالیت آنزیم آلفاآمیلازی ۶۳
۳-۵-۳ SDS-PAGE و زیمو گرام ۶۴
۳-۵-۴ تعیین پارامترهای سینیتیکی ۶۵
۳-۵-۵ بررسی تغییرات فعالیت آنزیمی در حضور غلظت‌های مختلف حلال‌ها و سورفاکتانت‌ها ۶۶
۳-۵-۶ بررسی تغییرات فعالیت آنزیمی در حضور مایعات یونی (Ionic Liquids) ۶۷
۳-۵-۷ بررسی پایداری آنزیم در حضور حلال‌های آلی و سورفاکتانت‌های غیر یونی ۶۸
۳-۵-۸ بررسی غیر فعال شدن حرارتی برگشت ناپذیر (Irreversible thermo inactivation) ۶۹
۳-۵-۸-۱ در حضور کلسیم و EDTA ۶۹
۳-۵-۸-۲ در حضور حلال آلی بوتانل ۷۰
۳-۵-۹ اثر مهاری آکاربوز بر فعالیت آنزیم ۷۱
۳-۵-۱۰ بررسی فعالیت آنزیم در حضور یونهای فلزی ۷۲
۳-۵-۱۱ بررسی دناتوراسیون شیمیایی آنزیم در حضور اوره ۷۳
۳-۶ بررسی ساختاری آنزیم توسط فلورسانس ذاتی در حضور و عدم حضور حلال آلی ۷۵
فصل چهارم بحث و نتیجه‌گیری ۷۷
۴-۱ کلیات ۷۸
۴-۲ آلفاآمیلاز حاصل از ASM ۷۹
۴-۳ وزن مولکولی در آلفاآمیلازها ۸۳
۴-۴ بررسی علت کاهش فعالیت آنزیمی در حضور حلال‌های آلی ۸٤
۴-۵ بررسی علت کاهش فعالیت آنزیمی در حضور مایعات یونی ۸۷
منابع ۸۹

فهرست شکل ها

شکل۱-۱) سه نوع سیستم حلال: a)سیستم دو فازی، b)سیستم میسل معکوس، c) آنزیم در حالت جامد.....۸

شکل ۱-۲) مراحل واسرشته شدن پروتئین در حلال‌های آلی(۲۸).....۱۵

شکل ۱-۳) فعالیت آنزیمهای مؤثر بر نشاسته. شکل های توخالی نشان دهنده انتهای احیایی است است.....۲۴

شکل ۱-۴). تکنولوژی نشاسته و محصولات انتهایی متنوع آن.....۲۹

شکل ۱- ۵). ساختار سه بعدی دومین A (TIM barrel)، راست) Acid-amylase چپ)Taka-amylase ۳۱

شکل۱- ۶) طرح دمین‌ها در CGTase.....۳۲

شکل ۱-۷). الف) هندسه جایگاه‌های سه‌تایی فلزی ب) جایگاه سوم کلسیم.....۳۳

شکل ۱-۸) طرح شماتیکی از آرایش زیر جایگاه‌ها.....۳۴

شکل ۱-۹) ساز و کار کاتالتیک آنزیمهای خانواده آلفاآمیلاز.....۳۵

شکل۱-۱۰) الف) ساختار شیمیایی آکاربوز ب) میانکنش بین آکاربر و آنزیم آمیلاز باکتریایی.....۳۶

شکل ۳-۱). آشکارسازی فعالیت آمیلازی روی پلیت.....۵۹

شکل ۳-۲) الف) DNA ژنومی ب) محصولPCR ژن 16S rDNA.....۶۰

شکل ۳-۳). درخت فیلوژنتیکی رسم شده با استفاده از نرم افزار phylodrow.....۶۰

شکل۳-۴). منحنی تولید آنزیم در pH=6.8 و دمای °C ۳۷.....۶۱

شکل ۳-۵). اثر pH محیط روی تولید آمیلاز در دمای دمای °C ۳۷.....۶۲

شکل ۳-۶)SDS-PAGE آلفا آمیلاز خالص شده.....۶۳

شکل **۳- ۷)**. کروماتوگرام مراحل خالص سازی آلفا-آمیلاز سویه ASM.....۶۳

شکل ۳-۸) اثر pH بر فعالیت آلفا آمیلاز.....۶۴

شکل ۳-۹) اثر دما بر فعالیت آنزیم.....۶۵

شکل ۳-۱۰) الف)SDS-PAGE آنزیم آلفاآمیلاز ب) زیموگرام حاصل ازفعالیت آنزیم بر روی ژل.....۶۵

شکل ۳-۱۱). منحنی Michaelis-Menten از فعالیت آلفاآمیلازی.....۶۶

شکل ۳-۱۲). نمودار تغییرات فعالیت آنزیم در حضور حلال ها و سورفاکتانت‌های مختلف.....۶۷

شکل ۳-۱۳) فعالیت آنزیم در حضور مایعات یونی [(Emim) (cl)] و [(Bmim) (cl)] ۶۸

شکل ۳-۱۴). الف) نمودار فعالیت باقی مانده آنزیم در حضور حلال آلی ب) نمودار ثابت سرعت فعالیت باقی مانده آنزیم.....۷۰

شکل ۳-۱۵) الف) غیر فعال شدن حرارتی برگشت‌ناپذیر. ب) نمودار ثابت سرعت غیرفعال شدن آنزیم.....۷۱

شکل ۳-۱۶) الف) غیرفعال شدن حرارتی برگشت‌ناپذیر در حضور حلال ب) نمودار ثابت سرعت غیرفعال شدن آنزیم.....۷۲

شکل ۳-۱۷) تغییرات فعالیت آنزیم در حضور غلظت‌های مختلف آکاربوز.....۷۳

شکل ۳- ۱۸) اثر یونهای فلزی وEDTA روی فعالیت آلفا آمیلاز.....۷۴

شکل ۳-۱۹) اثر EDTA و عوامل شیمیایی بر فعالیت آنزیم.....۷۴

شکل ۳-۲۰). الف) نمودار فعالیت باقی مانده آنزیم در غلظت‌های مختلف اوره ب) نمودار ثابت سرعت دناتوره شدن آنزیم.....۷۵

شکل ۳ـ۲۱) بررسی ساختاری آلفا آمیلاز توسط تغییرات فلورسانس.....۷۸

شکل ۴-۱) وضعیت ساختاری پروتیین‌ها در محلول‌های آبی و غیر آبی.....۸۸

فهرست جداول

جدول۱-۱) رابطه مقدار حلالیت حلال آلی با log P حلال ۷

جدول۱-۲) مزایا و معایب سیستم‌های مونوفازی و دو فازی..... ۹

جدول ۲-۱) تهیه استانداردهای پروتئینی برای تعیین غلظت نمونه‌های مجهول..... ۴۴

جدول۳-۱) فعالیت باقی مانده آنزیمی در حضور درصدهای مختلف حلال‌های آلی و سورفاکتانت..... ۶۷

جدول۳-۲) ثابت سرعت و نیمه عمر دناتوراسیون شیمیایی در غلظت‌های مختلف اوره ۷۵

فصل اول

مقدمه

۱-۱غربالگری آنزیمها و اهمیت آنها

اگر یک واکنش از لحاظ ترمودینامیکی انجام‌پذیر باشد. به احتمال قوی حداقل یک آنزیم برای کاتالیز آن واکنش می‌توان پیدا کرد. در طی فرایند تکامل و در اثر فشار اعمال شده در آن مولکول‌هایی با پایداری مولکولی، به کمک فعالیت‌های بیوکاتالیزی سازش یافته با سوبسترا و فرایندهای مؤثر داخل سلولی، ساز و کاری برای انتقال آنزیمهای خارج سلولی به محل مناسب خود، در خود ایجاد کرده اند. با انجام غربالگری ارگانیسمها از منابع اکولوژیک مختلف موجود در یک کشور که از نظر ترکیبات آلی، معدنی، pH، درجه حرارت، وجود کاتیون و آنیون با هم تفاوت دارند، می‌توان محصولاتی را بدست آورد که در خلال تکامل سازش یافته‌اند. پس غربالگری موجودات جدید به منظور اهداف آکادمیک و علوم پایه و یا به دلایل کاربردی وصنعتی صورت می گیرد(۱).

تنوع میکروارگانیسمها در طبیعت، جستجو و کشف را آسان کرده است. ۸۵٪ از حیات زمین مربوط به میکرو-ارگانیسمها می‌باشد که تنوع متابولیکی در آن شایان ذکر است. در صنعت، بسیاری از آنزیمها در محیطی که نسبت به شرایط فیزیولوژیکی و طبیعی بسیار تفاوت دارد استفاده می شوند وحتی ممکن است در معرض یک‌سری از ترکیبات شیمیایی قرار گیرند که منجر به کاهش یا از دست دادن فعالیت وتخریب ساختار آنزیم هم بشود. معمولا غربالگری آنزیمها و راهبردهای انتخاب، بر اساس دانش ما از کاربرد و شرایط فیزیکوشیمیایی می باشد. مرحله اولیه و اساسی در فرآیند غربالگری، انتخاب کارایی آنزیم تحت شرایط مورد استفاده می‌باشد. گام بعد برای حصول یک غربالگری موفق دسترسی به یک خزانه ژنی غنی است(۲). همواره یک جستجوی هدفمند برای یافتن فعالیت آنزیمی ویژه وجود خواهد داشت. با استفاده از منابعی که جدیداً کشف شده است و بر روی آنها تحقیقات صورت نگرفته می‌توان میکروبهای جدیدی را پیدا نمود. در ضمن با استفاده از فنون مولکولی و از

طریق بررسی کرنومترهای مولکولی (مثل تعیین توالی 16s rRNA) میتوان به مطالعه سیستماتیک باکتری پرداخت و رابطه تکاملی آن را بدست آورد.

۱-۱-۱میکرو ارگانیسم‌ها به عنوان مهمترین منابع آنزیمی

در صنعت منابع گیاهی و جانوری برای تولید آنزیم به ترتیب مقادیر ۸٪ و٤٪ از کل آنزیمها را شامل می‌شوند و سایر آنزیمهای استفاده شده منشأ میکروبی دارند(۳). عموماً منابع میکروبی را به دلیل برخی از مزایا ترجیح می‌دهند که عبارتند از:

- برای تولید ارزان هستند.
- کنترل و پیش بینی آنزیمهای آنها، نسبت به انواع گیاهی و جانوری بیشتر می‌باشند.
- مواد مضری که ممکن است فعالیت آنزیم را کاهش دهد یا تخریب کند در گیاهان و جانوران بیشتر است.
- دستکاری ژنتیکی در میکروارگانیسمها راحت‌تر است.
- میکرو ارگانیسمها از طریق تخمیر در زمان کم و مقادیر فراوان کشت داده می‌شوند.
- پایداری پروتئین‌های میکروبی نسبت به همتاهای گیاهی وجانوری خود بیشتر است(۱). میکروارگانیسم‌ها متعلق به سه حوزه Bacteria ، Archea وEukaryotes هستند.

۱-۱-۲میکروارگانیس‌های GARS[1]

این میکروارگانیسمها غیر بیماری‌زا و غیر سمی هستند. اغلب پروتئین‌ها و آنزیم‌ها از میکروارگانیسمهای GRAS تولید می‌شوند. اینها شامل باکتری‌هایی نظیر *Bacillus amyloliquefaciens* ، *Bacillus subtilis* ، *Geobacillus stearotermophilus* به علاوه سایر گونه‌های متعلق به *Bacilli* ،

[1] generally recognized as safe

Lactobacilli و *Streptomyces* می‌باشد. قارچهای GRAS هم شامل گونه‌های جنس *Penicillum Aspergillus* ، *Mucor* و *Rhizopus* هستند. مخمرهایی مثل *Saccharomyces serevisae* هم جزء اینها می‌باشند(۱, ٤, ٥).

۱-۱-۳غربالگری[۲] فعالیتهای آنزیمی و خصوصیات آنزیمی جدید

روشهای متعددی برای بدست آوردن فعالیت آنزیمی جدید وجود دارد(۳):

- غربالگری به منظور یافتن فعالیت آنزیمی جدید در محیط‌های مختلف.
- یافتن فعالیت‌های جدید از آنزیمهای موجود.
- تغییر در محیط‌های واکنش به کمک تغییر شرایط یا استفاده از افزودنی‌ها.
- به کارگیری تکنیک‌های مهندسی پروتئین.
- ایجاد پروتئینهای هیبرید با استفاده از روش Domain swapping .
- ترکیب کاتالیز شیمیایی با کاتالیز آنزیمی.

اگر چه مهندسی ژنتیک قادر به بهبود آنزیم‌های موجود می‌باشد ، طراحی ژن‌های جدید که توانایی-های جدیدی کد می نمایند و طراحی ، شناخت و بهبود خصوصیات آنزیمی از جنبه‌های فعالیت و پایداری بسیار مشکل می‌باشد زیرا اطلاعات در دسترسی ما در ارتباط با اساس مولکولی آنها نا چیز است. بنابراین یافتن منابع جدید و غربالگری ارگانیسم ها به منظور جداسازی بیوکاتالیست‌های جدید بسیار مهم بوده و به عنوان یک روش اصلی در یافتن آنزیم‌های جدید و خصوصیات جدید آنزیمی باقی مانده است(٦, ٧).

[2] screening