بسم الله الرحمن الرحیم

دانشکده علوم زیستی

بسمه تعالی

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

آقای خانم **مهسا رحیم زاده** دانشجوی مقطع **دکتری** رشته **بیوشیمی** رساله واحدی خود را با عنوان : **" مطالعه پایداری حرارتی آنزیم آلفا آمیلاز حاصل از باسیلوس KR8104 با استفاده از موتاسیون هدفمند "** در تاریخ **۹۰/۱۰/۲۵** ساعت **۱۰** در اتاق **۵۰۰۹** ارائه کردند.

اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده است و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می‌کنند.

| اعضای هیأت داوران | نام و نام خانوادگی | رتبهٔ علمی | امضاء |
|---|---|---|---|
| ۱- استاد راهنمای اول | آقای دکتر منوچهر میرشاهی | دانشیار | |
| ۲-استاد راهنمای دوم | آقای دکتر خسرو خواجه | دانشیار | |
| ۳-استاد مشاور | آقای دکتر محمود خیاطیان | استادیار | |
| ۴- استاد ناظر داخلی | آقای دکتر رضا حسن ساجدی | استادیار | |
| ۵- استاد ناظر داخلی | آقای دکتر سامان حسینخانی | دانشیار | |
| ۶- استاد ناظر خارجی | آقای دکتر سید امید رعنایی سیادت | دانشیار | |
| ۷- استاد ناظر خارجی | آقای دکتر ابوالفضل گلستانی | دانشیار | |
| ۸- نماینده تحصیلات تکمیلی | آقای دکتر رضا حسن ساجدی | استادیار | |

## آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

**مقدمه:** با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجو مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب، نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین نامه های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب....**مهسا رحیم زاده**.....دانشجوی رشته....**بیوشیمی**..... ورودی سال تحصیلی.....**۱۳۸۶**..... مقطع .....**دکتری**..... دانشکده ..**علوم زیستی**..... متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آئین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آئین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هر گونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله بر اساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هر گونه اعتراض را از خود سلب نمودم»

امضا:.....

تاریخ: ۱۳۹۰/۱۰/۲۷.

**آیین نامه چاپ پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس**

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیتهای علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه،دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲: در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه) عبارت ذیل را چاپ کند:

«کتاب حاضر، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد/ رساله دکتری نگارنده در رشته **بیوشیمی** است که در سال **۱۳۹۰** در دانشکده **علوم زیستی** دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی سرکار خانم/جناب آقای **دکتر میرشاهی و دکتر خواجه** ، مشاوره سرکار خانم/جناب آقای دکتر خیاطیان و مشاوره سرکار خانم/جناب آقای دکتر از آن دفاع شده است.»

ماده ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت‌چاپ) را به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر درمعرض فروش قرار دهد.

ماده ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت‌مدرس، تأدیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶: اینجانب **مهسا رحیم زاده** دانشجوی رشته **بیوشیمی** مقطع **دکتری** تعهد فوق وضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی: **مهسا رحیم زاده**

تاریخ و امضا: ۹۰/۱۰/۲۷

**دانشکده :علوم زیستی**

**رساله دکتری**

**رشته: بیوشیمی**

عنوان رساله

# بررسی پایداری حرارتی آنزیم آلفا آمیلاز حاصل از باسیلوس KR۸۱۰۴ با استفاده از موتاسیون هدفمند

نام دانشجو:

**مهسا رحیم زاده**

اساتید راهنما:

**دکتر منوچهر میرشاهی**

**دکتر خسرو خواجه**

استاد مشاور:

**دکتر محمود خیاطیان**

دی ۱۳۹۰

**تقدیم به دریای معرفت، پدرم**

**تقدیم به پشتوانه دلسوز زندگی، مادرم**

**تقدیم به همسر صبور و مهربانم**

**و به همه کسانی که عطش دانستن در وجودشان موج می زند و به آنان که رنج دانستن را بر رنج زیستن می افزایند تا سر افراز زندگی کنند.**

## چکیده

آلفا- آمیلازها در صنایع مختلف نظیر صنایع غذایی، شوینده ها، نساجی و... کاربرد دارند. برای استفاده کارآمد از آلفا- آمیلازها این آنزیم ها باید در دماهای بالا پایدار بوده و فعالیت خود را حفظ کنند. یکی از دلایل غیر فعال شدن حرارتی برگشت ناپذیر آنزیم ها، ایجاد تغییرات کووالان نظیر دآمیداسیون اسید آمینه های آسپارژین و گلوتامین می باشد. اسیدهای آمینه آسپارژین در دماهای بالا ممکن است دستخوش تغییر شیمیایی نظیر جدا شدن گروه آمین شده و به این دلیل این فرایند یکی از عوامل مهم تاثیر گذار در میزان پایداری حرارتی پروتئین در نظر گرفته می شود. در این مطالعه آلفا- آمیلاز جدا شده از سویه ایرانی باسیلوس KR8104 که BKA نامیده می شود مورد بررسی قرار گرفت. BKA یک آنزیم مزوفیل بوده که با وجود داشتن سه یون کلسیم در ساختار خود، بصورت غیر وابسته به کلسیم عمل می کند. این ویژگی یک قابلیت ممتاز آنزیم برای استفاده های صنعتی است. از آنجا که میل ذاتی آسپارژین به دآمیداسیون ۱۰ برابر بیشتر از گلوتامین می باشد آسپارژین ها جهت انتخاب موتاسیون مورد بررسی قرار گرفتند. انتخاب اسیدهای آمینه آسپارژین به منظور ایجاد جهش با تمرکز بر ساختار کریستالی پروتئین انجام شد. با توجه به ساختار سه بعدی پروتئین ۶ اسید آمینه آسپارژین که انتظار می رفت بطور بالقوه قابلیت دآمیده شدن داشته باشند انتخاب شده و بوسیله موتاسیون هدفمند به اسیدهای آمینه دارای بار مثبت، بار منفی و قطبی بدون بار تغییر یافتند. به این ترتیب ۱۶ جهش یافته مختلف ایجاد شده و میزان پایداری حرارتی هر کدام پس از انکوبه کردن در دمای بالا مورد بررسی قرار گرفت. در مقایسه با آنزیم وحشی ۴ آنزیم جهش یافته توانستند پایداری پروتئین را در دمای بالا افزایش دهند. بیشترین پایداری در مورد جایگزینی N112D مشاهده گردید که سبب افزایش نیمه عمر پروتئین به میزان ۵ برابر در دمای $^{\circ}C$ ۷۰ شده بود. همچنین جایگزینی های N112E، N129D و N312S نیز توانستند پایداری پروتئین را به طور قابل توجهی افزایش دهند. در مرحله بعد به منظور افزایش بیشتر پایداری پروتئین، آنزیم های حاوی جهش های چندگانه ساخته شدند. ۵ جهش یافته حاوی ۲ جهش و یک موتانت که همزمان ۳ جهش را حمل می کرد ساخته شده و پایداری حرارتی آنها مورد بررسی قرار گرفت. موتانت دارای دو جهش N112D/ N129D بیشترین میزان پایداری را داشته و نیمه عمر این آنزیم در مقایسه با آنزیم وحشی حدود ۹ برابر افزایش یافت. علاوه بر نیمه عمر پروتئین ها دیگر پارامترهای مرتبط با پایداری نظیر T50 و Tm نیز اندازه گیری شدند. نتایج نشان دادند که جایگزینی های انجام شده اثرات مطلوبی در بهبود پایداری حرارتی آنزیم BKA ایجاد کرده اند.



**کلید واژه ها**: آلفا- آمیلاز، پایدراری حرارتی، دآمیداسیون، جهش زایی هدفمند

## فهرست مطالب

**عنوان** **صفحه**

**فهرست جدول ها ..... ز**

**فهرست شکلها ..... ح**

**فصل اول: مقدمه ..... ۱**

۱-۱ نشاسته ..... ۲

۱-۱-۲ استفاده های صنعتی نشاسته ..... ۳

۱-۱-۳ تولید بوتانول ..... ۴

۱-۱-۴ شیرین کننده ها و شربت ها ..... ۴

۱-۱-۵ اسید لاکتیک ..... ۴

۱-۱-۶ بیومس میکروبی ..... ۴

۱-۱-۷ تولید استون و بوتانول ..... ۵

۱-۲ آنزیم های مؤثر بر نشاسته ..... ۵

۱-۲-۱ اندو آمیلازها ..... ۶

۱-۲-۲ اگزو آمیلازها ..... ۶

۱-۲-۳ آنزیم های شاخه شکن ..... ۷

۱-۲-۴ ترانسفرازها ..... ۸

۱-۳ خانواده آلفا- آمیلازها ..... ۱۰

۱-۳-۱ رابطه آلفا- آمیلازهای خانواده GH13 با GH57 ..... ۱۲

۱-۴ ساختار مولکولی آلفا- آمیلازها ..... ۱۳

۱-۴-۱ دمینهای آلفا- آمیلاز ..... ۱۳

۱-۴-۱-۱ دمین A ..... ۱۳
۱-۴-۱-۲ دمین B ..... ۱۴
۱-۴-۱-۳ دمین C ..... ۱۴
۱-۵ جایگاه فعال آلفا- آمیلازها ..... ۱۴
۱-۶ یون کلسیم ..... ۱۵
۱-۷ مکانیسم عمل آلفا- آمیلازها ..... ۱۵
۱-۸ میکروارگانیسم ها به عنوان عمده ترین منابع آنزیمی ..... ۱۶
۱-۹ کاربردهای صنعتی آلفا- آمیلازها ..... ۱۶
۱-۹-۱ شوینده ها ..... ۱۷
۱-۹-۲ صنعت نشاسته ..... ۱۷
۱-۹-۳ صنعت نان ..... ۱۸
۱-۹-۴ صنعت نساجی ..... ۱۹
۱-۹-۵ کاتالیزورهای زیستی مقاوم به حرارت ..... ۱۹
۱-۱۰ پایداری پروتئین ها ..... ۲۰
۱-۱۰-۱ عوامل مؤثر در غیرفعال شدن برگشت ناپذیر پروتئین ها ..... ۲۲
۱-۱۰-۲ دستکاری پروتئین ها به منظور بهبود پایداری ..... ۲۶
۱-۱۰-۲-۱ افزایش پایداری از طریق مهار واسرشتگی برگشت پذیر..... ۲۶
۱-۱۰-۲-۲ پایدارسازی از طریق کاهش غیرفعال شدن برگشت ناپذیر.... ۲۸
۱-۱۰-۳ مهندسی پایداری آلفا- آمیلازها ..... ۲۹
۱-۱۱ هدف از انجام این تحقیق ..... ۳۰
**فصل دوم: مواد و روش ها** ..... **۳۲**
۲-۱ مواد شیمیایی ..... ۳۳

۲-۲ میکروارگانیسم ها و محیطهای کشت مورد استفاده ..... ۳۳
۲-۲-۱ میکروارگانیسم ها و پلاسمیدها ..... ۳۳
۲-۲-۲ محیط های کشت میکروبی (gr/lit) ..... ۳۴
۲-۳ ایجاد سویه های موتانت از ژن آنزیم BKA ..... ۳۴
۲-۳-۱ پرایمرهای جهش ..... ۳۵
۲-۳-۲ جهش زایی هدفدار با استفاده از روش overlap PCR ..... ۳۶
۲-۳-۲-۱ PCR به منظور ایجاد ژن های جهش یافته ..... ۳۶
۲-۳-۲-۲ کلون کردن ژن های بدست آمده به درون وکتور pET28a ....۳۸
۲-۳-۳ جهش زایی هدفدار با روش QuikChange ..... ۴۳
۲-۳-۳-۱ واکنش PCR ..... ۴۴
۲-۳-۳-۲ هضم مخلوط واکنش PCR با DpnI ..... ۴۴
۲-۳-۳-۳ انتقال محصول هضم آنزیمی به میزبان XL1- blue ..... ۴۵
۲-۳-۴ تعیین توالی ..... ۴۵
۲-۴ بیان ژن آلفا- آمیلاز نوع وحشی و انواع جهش یافته ..... ۴۶
۲-۴-۱ ترانسفورماسیون پلاسمید pET28a نوترکیب به درون باکتری BL-21 ...۴۶
۲-۴-۲ القاء باکتری و بیان پروتئین های نوترکیب ..... ۴۷
۲-۴-۳ بررسی بیان پروتئین های نوترکیب با استفاده از روش الکتروفورز ..... ۴۸
۲-۴-۳-۱ الکتروفورز پروتئین ها به روش SDS-PAGE ..... ۴۸
۲-۵ تخلیص پروتئین های نوترکیب ..... ۵۰
۲-۵-۱ بافرهای مورد نیاز تخلیص پروتئین نوترکیب ..... ۵۰
۲-۵-۲ روش تخلیص پروتئین نوترکیب ..... ۵۰
۲-۵-۳ آماده سازی پروتئین جهت مطالعات آنزیمی ..... ۵۱

۲-۵-۴ تعیین غلظت پروتئین ..... ۵۱
۲-۵-۴-۱ روش برادفورد ..... ۵۱
۲-۶ مطالعات آنزیم شناسی BKA ..... ۵۲
۲-۶-۱ تعیین فعالیت آنزیمی ..... ۵۲
۲-۶-۱-۱ تهیه معرف رنگی DNS ..... ۵۲
۲-۶-۱-۲ سنجش فعالیت آنزیمی با روش Miller ..... ۵۲
۲-۶-۱-۳ واحد آنزیمی ..... ۵۳
۲-۶-۲ مطالعات دورنگ نمایی دورانی (Circular Dichroism) و فلوئورسانس.....۵۳
۲-۶-۳ مطالعات حرارتی آنزیم بوسیله CD ..... ۵۳
۲-۶-۴ مطالعات فلوئورسانس ذاتی ..... ۵۴
۲-۶-۵ تعیین دمای بهینه ..... ۵۴
۲-۶-۶ تعیین پارامترهای سینتیکی سویه های وحشی و جهش یافته ..... ۵۴
۲-۶-۷ بررسی غیر فعال شدن حرارتی برگشت ناپذیر ..... ۵۴
۲-۶-۸ محاسبه انرژی آزاد غیرفعال شدن ..... ۵۵
۲-۷ اندازه گیری میزان دامیداسیون در سویه های وحشی و جهش یافته .....۵۵
**فصل سوم: نتایج** ..... **۵۶**
۳-۱ انتخاب جهش در آلفا- آمیلاز BKA ..... ۵۷
۳-۱-۱ ایجاد جهش در آلفا- آمیلاز BKA ..... ۶۲
۳-۱-۲ تعیین توالی سویه های وحشی و جهش یافته ..... ۶۶
۳-۱-۳ بیان و خالص سازی پروتئین سویه های وحشی و جهش یافته ..... ۶۷
۳-۱-۴ مطالعه نیمه عمر آنزیم های وحشی و جهش یافته ..... ۶۸
۳-۱-۵ اندازه گیری دمای بهینه فعالیت و $T_{50}$ آنزیم های وحشی و جهش یافت... ۷۱

۳-۱-۶ مطالعات ساختاری سویه های وحشی و جهش یافته ..... ۷۳
۳-۱-۶-۱ مطالعات دورنگ نمایی دورانی ..... ۷۳
۳-۱-۶-۲ مطالعات فلوئورسانس ..... ۷۴
۳-۱-۷ تعیین پارامترهای سینتیکی آنزیم های جهش یافته و وحشی ..... ۷۵
۳-۲ ترکیب جهش های پایدار کننده و ایجاد سویه های حامل دو و سه جهش ..... ۷۸
۳-۲-۱ ایجاد سویه های حامل ۲ و ۳ جهش (Double and Tripple mutants)..... ۷۹
۳-۲-۲ تعیین توالی سویه های وحشی و جهش یافته ..... ۷۹
۳-۲-۳ بیان و خالص سازی پروتئین سویه های حامل ۲ و ۳ جهش ..... ۸۰
۳-۲-۴ مطالعه نیمه عمر آنزیم های وحشی و جهش یافته ..... ۸۱
۳-۲-۵ مطالعات دو رنگ نمایی دورانی سویه های وحشی و جهش یافته ..... ۸۲
۳-۲-۶ مطالعه اثر دما با استفاده از دورنگ نمایی دورانی ..... ۸۴
۳-۲-۷ اندازه گیری دمای بهینه فعالیت و T50 آنزیم های وحشی و جهش یافته.....۸۶
۳-۲-۸ تعیین پارامترهای سینتیکی آنزیم های دارای ۲ و ۳ جهش و وحشی ..... ۸۸
۳-۳ اندازه گیری میزان دامیداسیون سویه های وحشی و جهش یافته ..... ۹۰
**فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری .....۹۲**
۴-۱ ایجاد جهش به منظور بهبود پایداری حرارتی آنزیم BKA ..... ۹۳
۴-۲ اثرات جایگزینی های انجام شده در پروتئین BKA ..... ۹۴
۴-۲-۱ اثر جایگزینی های آسپارژین ۱۱۹ بر پایداری حرارتی آنزیم ..... ۹۴
۴-۲-۲ اثر جهش های آسپارژین ۱۱۲ .....۹۶
۴-۲-۳ جایگزینی های آسپارژین ۱۲۹ ..... ۹۸
۴-۲-۴ اثرات جایگزینی های آسپارژین ۳۱۲ بر پایداری حرارتی آنزیم BKA .....۱۰۰
۴-۲-۵ بررسی اثرات ترکیبی جهش های منفرد در سویه های حاوی دو یا سه جهش...۱۰۲

۴-۳ نتیجه گیری ..... ۱۰۴
منابع ..... ۱۰۶
پیشنهادات ..... ۱۱۱

## فهرست جدول ها

**عنوان** **صفحه**

جدول ۲-۱ خصوصیات انواع سویه ها و پلاسمیدهای مورد استفاده در این پژوهش .....۳۴

جدول ۲-۲ توالی پرایمرهای جهش. تنها توالی پیشروی پرایمرهای حامل جهش نشان داده شده اند. زیر کدون های جایگزین شده خط کشیده شده است .....۳۶

جدول ۲-۳ برنامه و ترکیب مواد بکار رفته در PCR .....۳۷

جدول ۲-۴ برنامه و ترکیب مواد بکار رفته در PCR .....۳۸

جدول ۲-۵ تهیه استانداردهای پروتئینی جهت تعیین غلظت نمونه های مجهول .....۵۱

جدول ۳-۱ اطلاعات ساختاری مربوط به اسیدهای آمینه آسپارژین .....۵۹

جدول ۳-۲ جایگزینی های انجام شده در آنزیم BKA بوسیله موتاسیون هدفمند .....۶۲

جدول ۳-۳ ثابت های سینتیکی و پارامترهای پایداری حرارتی سویه های وحشی و جهش یافته.....۷۷

جدول ۳-۴ سویه های مختلف از آنزیم BKA .....۷۸

جدول ۳-۵ ثابت های سینتیکی و پارامترهای مرتبط با پایداری پروتئین های وحشی و حاوی ۲ و ۳ موتاسیون .....۸۸

## فهرست شکل ها

**عنوان** **صفحه**


شکل ۱-۱ شمایی از نحوه ساخته شدن نشاسته .....۵

شکل ۱-۲ آنزیم های مختلفی که در تجزیه نشاسته نقش دارند .....۶

شکل ۱-۳ توالی حفاظت شده در آلفا- آمیلازها .....۱۱

شکل ۱-۴ ساختار آلفا آمیلاز BLA. دمین های A، B و C با رنگ های قرمز، آبی و سبز مشخص شده اند .....۱۳

شکل ۱-۵ مکانیسم جایگزینی دوگانه آلفا- آمیلازها و ایجاد حدواسط کووالان .....۱۵

شکل ۱-۶ مراحل صنعت نشاسته که در حال حاضر (سمت چپ شکل) انجام می شود و تلاش برای رسیدن به مراحل سمت راست شکل می باشد. .....۱۸

شکل۱-۷ مکانیسم شکستن پیوند پپتیدی در مجاورت آسپاراژین .....۲۳

شکل ۱-۸ دآمیداسیون بر اساس مکانیسم اسید- باز عمومی .....۲۵

شکل ۱-۹ دآمیداسیون آسپارژین با مکانیسم جابجایی β- آسپارتیل .....۲۵

شکل ۲-۱ مراحل ایجاد جهش با روش Overlap PCR .....۳۷

شکل ۲-۲ نقشه وکتور بیانی pET-28a و ناحیه کلونینگ/ بیان در آن .....۳۹

شکل ۲-۳ شمای کلی از تکنیک جهش زایی هدفمند با روش QuikChange .....۴۵

شکل ۳-۱ ساختار BKA. کره موجود در ساختار نشان دهنده یون کلسیم است که در دمین B قرار دارد .....۵۸

شکل ۳-۲ جایگاه اسید آمینه های انتخاب شده در ساختار BKA .....۶۰

شکل ۳-۳ Asn 148 که در اطراف آن هیستیدین، تریپتوفان و تیروزین قرار دارند .....۶۱

شکل ۳-۴ محصول PCR اول در روش Overlap ..... ۶۳
شکل ۳-۵ محصول PCR پس از اتصال دو قطعه و ایجاد ژن کامل ..... ۶۴
شکل ۳-۶ هضم پلاسمید کلونی های بدست آمده با دو آنزیم محدود کننده ..... ۶۵
شکل ۳-۷ ژل آگارز محصولات Colony PCR سویه های جهش یافته ..... ۶۵
شکل ۳-۸ ژل الکتروفورز محصول PCR با روش QuikChange ..... ۶۶
شکل ۳-۹ مقایسه توالی سویه وحشی (W) و سویه جهش یافته ای که سه موتاسیون را حمل می کند ..... ۶۷
شکل ۳-۱۰ SDS-PAGE آنزیم های وحشی و جهش یافته ..... ۶۸
شکل ۳-۱۱ پایداری حرارتی جهش یافته ها در مقایسه با آنزیم وحشی در دمای ۷۰ °C ..... ۷۱
شکل ۳-۱۲ منحنی $T_{50}$ مربوط به سویه های مختلف ..... ۷۲
شکل ۳-۱۳ نمودار دمای بهینه فعالیت سویه های وحشی و جهش یافته ..... ۷۲
شکل ۳-۱۴ آنالیز ساختار دوم در سویه های وحشی و جهش یافته بوسیله طیف CD ..... ۷۴
شکل ۳-۱۵ آنالیز ساختار دوم سویه های وحشی و جهش یافته با طیف فلوئورسانس ..... ۷۵
شکل ۳-۱۶: معادلات لاینویور- برگ نمونه های وحشی و جهش یافته ..... ۷۷
شکل ۳-۱۷ ژل الکتروفورز محصول PCR با روش QuikChange ..... ۸۰
شکل ۳-۱۸ SDS-PAGE سویه های وحشی و حاوی ۲ و ۳ جهش ..... ۸۱
شکل ۳-۱۹ پایداری حرارتی جهش یافته ها در مقایسه با آنزیم وحشی در دمای ۷۰ °C ..... ۸۲
شکل ۳-۲۰ طیف CD سویه های وحشی و جهش یافته ..... ۸۴
شکل ۳-۲۱ اندازه گیری $T_m$ با استفاده از CD ..... ۸۵
شکل ۳-۲۲ مطالعه واسرشته شدن برگشت ناپذیر آنزیم در اثر دما بوسیله CD ..... ۸۶
شکل ۳-۲۳ منحنی $T_{50}$ مربوط به سویه های وحشی و جهش یافته ..... ۸۷
شکل ۳-۲۴ نمودار دمای بهینه فعالیت سویه های وحشی و جهش یافته ..... ۸۷

شکل ۳-۲۵: معادلات لاینویور- برگ نمونه های وحشی و جهش یافته ..... ۸۹

شکل ۳-۲۶ مقایسه میزان جداشدن گروه آمیدی در آنزیم های وحشی و جهش یافته .....۹۱

شکل ۴-۱ جایگاه Asn 119 در ساختار BKA ..... ۹۵

شکل ۴-۲ موقعیت جهش N112D در ساختار BKA ..... ۹۷

شکل ۴-۳ جایگزینی های N112E (A) و N112R (B) ..... ۹۸

شکل ۴-۴ موقعیت جایگزینی N129D ..... ۹۹

شکل ۴-۵ جایگزینی N312S. ساختار BKA بصورت Ribbon نشان داده شده است ..... ۱۰۰

شکل ۴-۶ مدل Ribbon آنزیم BKA. .....۱۰۱

شکل ۴-۷ شمایی از جایگزینی N312R در ساختار BKA .....۱۰۲

# فصل اول

# مقدمه

## مقدمه:

محصولات ایجاد شده از نشاسته بخش مهمی از رژیم غذایی انسان را تشکیل می دهند و بخش عمده غذایی که بوسیله جمعیت جهان مصرف می شود از این ترکیبات بوجود آمده اند. علاوه بر اینکه محصولات گیاهی حاوی نشاسته مستقیما به عنوان منابع غذایی استفاده می شوند، گاهی نشاسته تحت تاثیر فرایندهای شیمیایی یا آنزیمی به ترکیبات دیگری نظیر شربت گلوکز یا مشتقات مالتودکسترین تبدیل می شود. مهمترین منابع تولید نشاسته که به لحاظ صنعتی قابل استفاده هستند شامل گندم، سیب زمینی و ذرت می باشند (Kirk *et al*., 2002). نشاسته در واقع پلیمری از گلوکز است و تنوع فراوانی که در آنزیم های هیدرولیز کننده پلیمرهای گلوکزی یافت می شود نشان دهنده اهمیت این پلیمرها برای حیات است. در گیاهان انرژی نور خورشید تبدیل به انرژی شیمیایی شده و نشاسته در نتیجه این فرایند بوجود می آید. ترکیب مناسبی از آنزیم های آمیلولیتیک، به طور کامل نشاسته را به گلوکز تجزیه می نمایند (Svensson, 1994). از آنزیم های هیدرولیز کننده نشاسته، آلفا -آمیلازها از اهمیت ویژه ای برخوردارند به علت آنکه موجب حلالیت نشاسته می گردند .

### ۱-۱ نشاسته

نشاسته در نتیجه فرایند فتوسنتز در اندامکی به نام پلاستید در برگ گیاهان ساخته شده و ذخیره می گردد. همچنین نشاسته در آمیلو پلاست های موجود در دانه و ریشه گیاهان نیز ساخته شده و به عنوان یک ذخیره طولانی مدت عمل می کند. در آمیلوپلاست ها، نشاسته بصورت گرانولهای بزرگ

غیر قابل حل در آب ذخیره می گردد. شکل و قطر این گرانول ها بسته به نوع گیاه متفاوت است. در منابعی از نشاسته که به لحاظ صنعتی مورد توجه هستند، اندازه گرانولها از µm ۱۰-۲ (مثل نشاسته ذرت) تا µm ۱۰۰-۵ (نشاسته سیب زمینی) متفاوت هستند (robyte, 1998). نشاسته پلیمری از گلوکز است که در آن واحد های گلوکز از طریق اکسیژن متصل به کربن شماره ۱ و از طریق پیوند گلیکوزیدی به کربن شماره ۴ زیر واحد مجاور متصلند. در انتهای زنجیره های پلیمری یک گروه آلدهیدی انتهایی وجود دارد که به سر احیایی موسوم است. نشاسته دارای دو نوع پلیمر گلوکزی می باشد: آمیلوز و آمیلوپکتین. آمیلوز تنها دارای پیوند گلیکوزیدی ۴-۱، α می باشد و بنابراین پلیمری خطی است. آمیلو پکتین علاوه بر دارا بودن پیوندهای ۴-۱، α دارای تعداد زیادی شاخه های جانبی است. پیوند گلیکوزیدی در محل انشعاب، از نوع ۶-۱، α می باشد. به ازای هر ۱۵ تا ۴۵ واحد گلوکزی یک انشعاب وجود دارد. به طور متوسط یک مولکول آمیلوپکتین از حدود دو میلیون واحد گلوکزی تشکیل شده است و می تواند وزن مولکولی بیش از $۱۰^۸$ دالتون داشته باشد. بدین ترتیب آمیلوپکتین، بزرگترین مولکول در طبیعت به شمار می آید. نشاسته در گیاهان به صورت گرانول ذخیره می شود. آمیلوپکتین در آب محلول است در حالیکه آمیلوز و گرانولهای نشاسته در آب سرد نامحلول اند (*et al* .(Van der Maarel 2001; Bertoldo *et al*., 2002; Bertoldo *et al*., 2002

### ۱-۱-۲ استفاده های صنعتی نشاسته

کاربردهای غذایی نشاسته شامل انواع نشاسته طبیعی، تغییر یافته و هیدرولیز شده، ایزوگلوکز و مشتقات دیگر آن ها است. کاربردهای دیرینه غیر غذایی نشاسته شامل صنعت کاغذ، صنایع دارویی، مواد ساختمانی، تخمیر، کشاورزی و نساجی می باشد. علاوه بر موارد ذکر شده، نشاسته در تیمار آب، شوینده ها، چسب ها، صنعت ذغال سنگ و ریخته گری مورد استفاده قرار می گیرد (Pandey *et al*., 2000; Whistler *et al*., 1984). در ادامه بعضی از مهمترین استفاده های صنعتی نشاسته به تفصیل آورده شده است (Nigam *et al*., 1995).