دانشکده علوم پایه

گروه زیست شناسی

(گرایش بیوشیمی)

کلونینگ و بیان ژن آنزیم مالتوژنیک آمیلاز از یک سویه ترموفیل *ژئوباسیلوس* و تعیین خواص بیوشیمیایی و ساختاری آن

از :

سمیرا نصرالهی کلویر

اساتید راهنما :

دکتر رضا حسن ساجدی

دکتر مجید تقدیر

اساتید مشاور :

دکتر سید محسن اصغری

مهندس مهدی رسا

مرداد 1390

چکیده

کلونینگ و بیان ژن آنزیم مالتوژنیک آمیلاز از یک سویه ترموفیل *ژئوباسیلوس* و تعیین خواص بیوشیمیایی و ساختاری آن

سمیرا نصرالهی

مالتوژنیک آمیلازها یک گروه از آنزیم های هیدرولیز کننده سیکلودکسترین ها و متعلق به خانواده آلفا-آمیلازها (خانواده 13 گلیکوزیل هیدرولازها) می باشند. این آنزیم برخلاف سایر آلفا-آمیلازها داخل سلولی است و همچنین فعالیت هیدرولازی و ترانس گلیکوزیلاسیون را از خود نشان می دهد. اخیرا توجه به استفاده از این آنزیم در صنعت بخصوص در صنایع نانوایی، شیرینی پزی و همچنین پزشکی و نیز طراحی داروها چشمگیر بوده است. با توجه به اینکه مالتوژنیک آمیلازها از نظر کاربردی و تحقیقاتی بسیار با اهمیت هستند و تاکنون از سویه های بومی ایران گزارش نشده اند، در این تحقیق ژن آنزیم مالتوژنیک آمیلاز از یک سویه جدید *ژئوباسیلوس* ترموفیل جدا و در حامل pET28a کلون شد. پروتئین با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی تخلیص و سپس خصوصیات بیوشیمیایی و ساختاری آنزیم مورد بررسی قرار گرفت. اثر دما و pH های مختلف بر روی فعالیت مالتوژنیک آمیلاز نوترکیب، فعالیت بهینه را در°C 65 نشان داد که نسبت به مالتوژنیک آمیلازهای جداشده ای که تاکنون تعیین خصوصیت شده اند بالاتر می باشد و pH اپتیمم برای فعالیت آنزیم 6 بدست آمد. اثر غلظت های متفاوت یون های فلزی مشخص کرد که فعالیت کاتالیتیک آنزیم در حضور یون های Li^+ و K^+ افزایش، اما در حضور سایر یون های بکار رفته کاهش یافته و یا مهار می شود. همچنین K^+ و Ca^{2+} به ترتیب موجب افزایش و کاهش پایداری حرارتی آنزیم شده و اثر ناپایدارکنندگی کلسیم و پایدارکنندگی پتاسیم به ترتیب آنتالپیک (کاهش $\Delta H^{\#}$) و آنتروپیک (کاهش $\Delta S^{\#}$) تعیین شد. با بررسی اثر سوبستراهای مختلف (α، β، γ –سیکلودکسترین، آمیلوز، آمیلوپکتین و گلیکوژن) بر روی فعالیت آنزیم مشخص شد که سه سوبسترای سیکلودکسترین (α-, β-, γ-CD) نسبت به سوبستراهای پلیمری (آمیلوپکتین، آمیلوز، گلیکوژن و نشاسته) سوبستراهای بسیار مطلوب تری برای آنزیم می باشند و این می تواند به علت ممانعت فضایی بیشتر سوبستراهای پلیمری باشد. پارامترهای سینیتیکی و ترمودینامیکی محاسبه شده برای سوبستراهای مختلف نیز این موضوع را تأیید می کنند. در مورد سه سوبسترای سیکلودکسترینی، علیرغم اینکه K_m آنزیم در حضور α-CD، نسبت به β-, γ-CD افزایش یافته، اما ویژگی سوبسترایی (k_{cat}/K_m) آنزیم از α-CD به γ-CD به ترتیب افزایش یافته است زیرا k_{cat} آنزیم در حضور این سوبستراها به ترتیب افزایش قابل ملاحظه ای را نشان می دهد. بررسی ترمودینامیک واکنش فعال سازی نشان می دهد که این افزایش فعالیت (کاهش $\Delta G^{\#}$) در سوبستراهای فوق آنتروپیک (افزایش $\Delta S^{\#}$) می باشد. اتصال سوبستراهای α-, β-CD از نظر میانکنش هایی که با رزیدوی های جایگاه فعال دارند با روش شبیه سازی میانکنش آنزیم-سوبسترا مورد بررسی قرار گرفت که نشان می دهد سطح در دسترس رزیدوی های جایگاه فعال و کاتالیتیک در حضور α-CD در آنزیم به مراتب بیشتر از β-CD است که می تواند نشان دهنده میانکنش های بیشتر در حالت گذار آنزیم- سوبسترا برای α-CD باشد. این نتیجه، $\Delta H^{\#}$ بیشتر حالت گذار واکنش فعال سازی و افزایش K_m آنزیم در حضور α-CD در مقایسه با α-CD را به خوبی تایید می کند.

واژه های کلیدی: مالتوژنیک آمیلاز، پایداری حرارتی، *ژئوباسیلوس*.

عنوان	صفحه
چکیده فارسی	د
چکیده انگلیسی	ذ
فصل اول: مقدمه و تئوری	
1-1 اکسترموفیل ها	2
1-1-1 دما	2
1-1-1-1 سایکروفیل ها	3
1-1-1-2 ترموفیل ها و هایپرترموفیل ها	4
1-1-1-2-1 تاکسونومی ترموفیل ها	4
1-1-1-2-1-1 جنس *ژئوباسیلوس*	6
1-2 ترموزایم ها	7
1-2-1 چه عواملی ترموزایم ها را پایدار می سازد؟	7
1-3 آنزیم های مؤثر بر کربوهیدرات ها (CAZy)	9
1-3-1 فواید طبقه بندی CAZy	10
1-3-2 محدودیت طبقه بندی (IUBMB)	11
1-3-3 تعریف ها و اصطلاحات در CAZy	11
1-4 طبقه بندی گلیکوزیل هیدرولازها	12
1-4-1. مکانیسم ملکولی گلیکوزیل هیدرولازها	15
1-4-2 ساختار سه بعدی و سازمان دمینی آلفا-آمیلازها	16
1-4-2-1 دمین A	16
1-4-2-2 دمین B	17
1-4-2-3 دمین C	17
1-4-3 پیش ماده گلیکوزیل هیدرولازها	19
1-5 آنزیم های موثر بر سیکلودکسترین	22
1-5-1 سیکلومالتودکستریناز	24
1-5-2 نئوپلولاناز	25
1-5-3 مالتوژنیک آمیلاز	27
1-5-4 ساختار اول و دوم	29
1-5-5 ساختار کلی	30
1-5-6 کاربرد صنعتی مالتوژنیک آمیلاز	35
1-6 در این تحقیق	35

فصل دوم: مواد و روش ها

2-1 دستگاه ها 38
2-2 مواد شیمیایی 38
2-3 کیت ها 39
2-4 طراحی پرایمر برای ژن مالتوژنیک آمیلاز 39
2-5 کلونینگ ژن مالتوژنیک آمیلاز در میزبان پروکاریوتی 39
2-5-1 واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) جهت تکثیر ژن مالتوژنیک آمیلاز 40
2-5-2 الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز 41
2-5-3 استخراج محصولاتPCRاز ژل آگارز 41
2-5-4 هضم ژن مالتوژنیک آمیلاز و ناقلpET28a 41
2-5-5 اضافه کردن آلکالین فسفاتاز به pET28a 42
2-5-6 جاگذاری ژن درون حامل (Ligation) 43
2-5-7 انتقال ناقل نوترکیب به میزبان بیانی 43
2-6 بیان پروتئین 45
2-7 تهیه محتوای سلولی از باکتری ها 45
2-8 سدیم دودسیل سولفات- پلی اکریلامید ژل الکتروفورز (SDS-PAGE) 45
2-9 تخلیص پروتئین نوترکیب 46
2-10 سنجش غلظت پروتئین 46
2-11 تعیین فعالیت مالتوژنیک آمیلاز 47
2-12 اثر pH بر فعالیت مالتوژنیک آمیلاز 47
2-13 اثر یونهای فلزی و EDTA بر فعالیت مالتوژنیک آمیلاز 48
2-14 اثر دما بر فعالیت مالتوژنیک آمیلاز 48
2-15 بررسی غیرفعال شدن حرارتی برگشت ناپذیر 48
2-15-1 محاسبه کمی پایداری حرارتی بصورت میزان فعالیت باقیمانده $t_{1/2}$ 48
2-15-2 محاسبه ثابت غیر فعالسازی ($k_{inactivation}$) 48
2-16 بررسی فعالیت آنزیم روی سوبستراهای مختلف 49
2-16-1 تعیین پارامترهای سینتیکی 49
2-17 محاسبات ترمودینامیکی 49
2-18 مدل سازی ملکولی 50
2-18-1 پیشگویی ساختار آنزیم در حضور و عدم حضور سوبسترا 50
2-18-1-1 تعیین پارامترهای پایداری و مقایسه آن با الگو 51

2-18-2 شبیه سازی میانکنش آنزیم-سوبسترا 51

فصل سوم: نتایج

3-1 طراحی پرایمر و واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) جهت تکثیر ژن مالتوژنیک آمیلاز 53

3-2 کلونینگ ژن مالتوژنیک آمیلاز 54

3-3 مراحل تأیید کلونینگ 56

3-3-1 انتخاب کلون های حاوی وکتور و ژن (Colony-PCR) 56

3-3-2 تأیید کلونینگ با استفاده از برش یگانه پلاسمید نوترکیب 57

3-4 بیان پروتئین نوترکیب 57

3-5 تخلیص پروتئین نوترکیب 58

3-6 مطالعات فعالیت و پایداری 59

3-6-1 تاثیر pH روی فعالیت مالتوژنیک آمیلاز 59

3-6-2 اثر یون‌های فلزی و EDTA روی فعالیت آنزیم 59

3-6-3 اثر درجه حرارت روی فعالیت مالتوژنیک آمیلاز 61

3-6-4 پایداری حرارتی آنزیم 61

3-6-4-1 بررسی غیرفعال شدن حرارتی برگشت ناپذیر آنزیم در دماهای مختلف 61

3-6-4-2 نمودار آرنیوس و ترمودینامیک فرایند غیرفعال شدن حرارتی برگشت ناپذیر 62

3-6-5 بررسی فعالیت آنزیم مالتوژنیک آمیلاز در حضور سوبستراهای مختلف 65

3-6-5-1 تعیین پارامترهای سینتیکی آنزیم (تعیین خصوصیات کاتالیتیک) 65

3-6-5-2 تعیین انرژی فعال سازی آنزیم در حضور سوبستراهای مختلف 68

3-7 مدلینگ مقایسه ای 69

3-7-1 مقایسه سطوح در دسترس و تعداد پیوندهای هیدروژنی و پل های نمکی در آنزیم *Geobacillus* sp. Gh6 و ThMA به روش تئوری 71

3-7-2 شبیه سازی میانکنش آنزیم-سوبسترا 71

فصل چهارم: بحث

4-1 کلونینگ ژن مالتوژنیک آمیلاز *Geobacillus* sp. Gh6 در وکتور بیانی و بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب 75

4-2 بررسی ویژگی های آنزیمی مالتوژنیک آمیلاز حاصل از *Geobacillus* sp. Gh6 76

4-3 مطالعات تئوری 81

4-4 پیشنهادات 82

منابع 84

فهرست شکل ها

عنوان صفحه

شکل 1-1 (T. D. Brock) *Sulfolobus* هایپرترموفیلی است که از چشمه های آب گرم اسیدی با محدوده دمایی از 60 تا 95°C و pH بین 1 تا 5 شناسایی شده است. 5

شکل 1-2 طبقه بندی آنزیم های موثر برکربوهیدراتها (CAZy). آنزیم ها و پروتئین های موجود در این سرور بر اساس توالی به چهار گروه تقسیم می شوند (i) GH، گلیکوزیل هیدرولازها (ii) GT، گلیکوزیل ترانسفرازها (iii) PL، پلی ساکارید لیازها و (iv) CE، کربوهیدرات استرازها. 10

شکل 1-3 طبقه بندی گلیکوزیل هیدرولازها در CAZy 13

شکل 1-4 خانواده 13 گلیکوزیل هیدرولازها در CAZy 14

شکل 1-5 مکانیسم Inverting در گلیکوزیل هیدرولازها 15

شکل 1-6 مکانیسم Retaining در گلیکوزیل هیدرولازها 16

شکل 1-7 ساختار سه بعدی آلفا آمیلاز *Aspergillus oryzae* 17

شکل 1-8 مدل ریبون CGTase، دمین های A، B، C، D وE مشخص است 18

شکل 1-9 ساختار آمیلوز و آمیلوپکتین 20

شکل 1-10 ساختار α-، β- و γ- سیکلودکسترین 21

شکل 1-11 ساختار پلولان 22

شکل 1-12 ساختار CDase 25

شکل 1-13 ساختار نئوپلولاناز 26

شکل 1-14 شمای کلی از محصول حاصل از فعالیت ThMAروی آکارباز 27

شکل 1-15 تطبیق توالی آمینو اسیدی و ساختار دوم آنزیم های تجزیه کننده CD/Pullulan 32

شکل 1-16 ساختار ریبون ThMA 33

شکل 1-17 تصویری از ارجحیت سوبسترایی ThMA دایمر 34

شکل 1-18 فضای اضافی اتصال قند در جایگاه فعال ThMA 34

شکل 3-1 الکتروفورز محصول PCR با پرایمرهای طراحی شده برای ژن مالتوژنیک آمیلاز روی ژل آگارز 1% 54

شکل 3-2 آنالیز استخراج پلاسمید روی ژل آگارز 55

شکل 3-3 آنالیز محصول هضم دوگانه آنزیمی توسط *Hind* III و *Sac* I 55

شکل 3-4 آنالیز محصولات Colony-PCR با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز بمنظور غربال کلونهای حاوی پلاسمید نوترکیب 56

شکل 3-5 آنالیز استخراج پلاسمید حاوی ژن مالتوژنیک آمیلاز 57

شکل 3-6 آنالیز محصول هضم پلاسمید نوترکیب بیانی حاوی مالتوژنیک آمیلاز 57

شکل 3-7 مراحل بیان ژن مالتوژنیک آمیلاز در سویه BL21 در دمای 30 درجه سانتیگراد 58

شکل 3-8 آنالیز پروتئین نوترکیب خالص شده روی ژل پلی اکریل آمید 58
شکل 3-9 اثر pH روی فعالیت مالتوژنیک آمیلاز بدست آمده از *Geobacillus* sp. Gh6 59
شکل 3-10 اثر حرارت روی فعالیت مالتوژنیک آمیلاز بدست آمده از سویه *Geobacillus* sp. Gh6 61
شکل 3-11 غیرفعال شدن حرارتی برگشت ناپذیر آنزیم در دماهای مختلف در حضور و عدم حضور 10 میلی مولار $CaCl_2$ و KCl 63
شکل 3-12 منحنی آرنیوس واکنش دناتوراسیون حرارتی با استفاده از سرعت غیرفعال شدن (k_{inact}) آنزیم در دماهای مختلف برای آنزیم در حضور و عدم حضور 10 میلی مولار $CaCl_2$ و KCl 64
شکل 3-13 فعالیت آنزیم مالتوژنیک آمیلاز در حضور سوبستراهای مختلف 65
شکل 3-14 منحنی استاندارد مالتوز 66
شکل 3-15 منحنی مکائیلیس-منتون فعالیت مالتوژنیک آمیلاز در غلظت‌های مختلف برای سوبستراهای مختلف 66
شکل 3-16 منحنی لاین ویور-برک بدست آمده از سوبستراهای مختلف برای به‌دست آوردن پارامترهای سینتیکی 67
شکل 3-17 منحنی آرنیوس واکنش فعال سازی آنزیم در دماهای 50-30 درجه سانتیگراد در حضور α-، β- و γ-سیکلودکسترین 68
شکل 3-18 A، ساختار سه بعدی دایمر ThMA (در حضور سوبسترای β-CD) که به عنوان الگو مورد استفاده قرار گرفت. B، مدل سه بعدی نهایی ساخته شده توسط نرم افزار MODELLER برای دایمر مالتوژنیک آمیلاز Geobacillus sp. Gh6. C، ساختار سه بعدی دایمر مالتوژنیک آمیلاز Thermus sp. IM6501 (در عدم حضور سوبسترا) که به عنوان الگو مورد استفاده قرار گرفت و D، مدل سه بعدی نهایی ساخته شده توسط نرم افزار MODELLER برای دایمر مالتوژنیک آمیلاز Geobacillus sp. Gh6 ساختارها توسط نرم افزار Chimera نمایش داده شده است. 70

فهرست جدول ها

عنوان	صفحه
جدول 1-1 اعضای خانواده آلفا-آمیلاز (Clan GH-H)	14
جدول 1-2 آنزیم های خانواده آلفا-آمیلاز، عدد EC مربوطه و سازمان یابی دمین آنها	19
جدول 1-3 خصوصیات CDase، MAase و NPase از منابع مختلف	29
جدول 2-1 توالی پرایمرهای مورد استفاده در PCR برای مالتوژنیک آمیلاز	39
جدول 2-2 مراحل مختلف تکثیر ژن مالتوژنیک آمیلاز در PCR	40
جدول 2-3 تهیۀ استانداردهای پروتئینی به منظور تعیین غلظت نمونه‌های مجهول	46
جدول 3-1 اثر یون‌های فلزی و EDTA روی فعالیت مالتوژنیک آمیلاز، نمک‌های کلرید یون‌های فلزی مورد استفاده قرار گرفته‌اند	60
جدول 3-2 پارامترهای ترمودینامیکی غیرفعال شدن حرارتی آنزیم	64
جدول 3-3 پارامترهای سنیتیکی و ترمودینامیکی آنزیم در حضور سوبستراهای مختلف	68
جدول 3-4 مقایسه برخی فاکتورهای پایداری (سطح دردسترس، پیوند هیدروژنی و پل نمکی) برای مدل و الگو	71

فصل اول

مقدمه و تئوری

فصل دوم

مواد و روشها

فصل سوم

نتایج

فصل چهارم

بحث

منابع

پیوست

فصل اول: مقدمه

1-1 اکسترموفیل ها[1]

میکروارگانیسم ها توانایی های متفاوتی جهت سازگاری با استرس های مختلف محیطی دارند و توانسته اند آنها را از محیط های بحرانی[2] متعددی روی زمین جداسازی کنند. محیط بحرانی، محیط خارج از گستره ای است که انسان و سایر یوکاریوتها نمی توانند در آن زنده بمانند. ارگانیسم هایی را که در این محیط ها زندگـی می کنند را اکسترموفیل می خوانند. میکروارگانیسم های اکسترموفیل به زندگـی در فشـار بالای اعماق دریا، pH های بالا و پاییـــن (pH 0-3 یا pH 10-12)، غلظت های بسیار بالای نمک (5-30%)، دماهای پایین در نواحی قطبی سرد و یا دماهای بالا در چشمه های آتشفشانی وفق یافته اند. اکثریت اکسترموفیل ها اعضای آرکئا، یکی از سه قلمرو اصلی فیلوژنیک می باشند اما اکسترموفیل هایی از قلمرو باکتریایی نیز شناسایی شده است. اکسترموفیل ها حاوی آنزیم هایی با پایداری بالا می باشند[3] و کاربرد این آنزیم ها به عنوان بیوکاتالیست توجه زیادی را در صنعت به خود جلب کرده است. با کشف اکسترموفیل ها، بویژه آنهایی که ساکن محیط هایی با دمای بالا هستند[4]، تلاش برای شناسایی محیط های بحرانی دیگری که زندگی در آنها جریان دارد، افزایش یافته است (5-1).

1-1-1 دما

یک گونه به ندرت می تواند متابولیسم خود را کمی پایین تر از $10\ ^{\circ}C$ حفظ کند. با این حال، می توان زندگی را در دمای بحرانی، زیر 50- تا بالای $110\ ^{\circ}C$، حفظ کرد. میکروارگانیسم ها بر اساس دمایی که در آن رشد می کنند به سه دسته بزرگ

1. Extremophile
2. Extreme
3. Extremozymes
4. thermophile

تقسیم شده اند. مزوفیل ها[1] که در دماهای نرمال زندگی می کنند، ترموفیل ها[2] که نسبت به دماهای بالا و سایکروفیل ها[3] نسبت به دماهای پایین سازگار شده اند. بعضی از این میکروارگانیسم ها نه تنها به دماهای اکستریم سازگار شده اند بلکه می توانند در شرایط اسیدی، غلظت بالای نمک، pH بالا و ... نیز زندگی کنند. این سوال پیش می آید، که چگونه ماکرومولکولهای این میکروارگانیسم ها در چنین شرایطی پایدار باقی می مانند (7 و 6).

1-1-1-1 سایکروفیل ها

محیط های سرد، فراوانترین نقاط روی سیاره ما می باشند و ارگانیسم های مختلفی، از قبیل باکتری ها، مخمرها، جلبک های تک سلولی و قارچ ها از این محیط ها جدا سازی شده اند. این ارگانیسم های سازگار به سرما به عنوان اکسترموفیل در نظر گرفته می شوند و با توجه به اینکه در این ارگانیسم ها هیچ سیستم تنظیم دمایی وجود ندارد، دمای درونی آنها نزدیک به دمای محیط حفظ می شود. علیرغم اثر منفی دماهای پایین روی واکنش های شیمیایی، این ارگانیسم ها تولید مثل، رشد و حرکاتی مشابه با گونه های نزدیک ساکن در محیط های معتدل نشان می دهند. مشاهده شده که سنتز ترکیبات ضد یخ[4]، گلیکوپروتئین ها و پپتیدها می تواند باعث کاهش بیشتر نقطه انجماد مایع بدن از طریق مکانیسم Noncolligative شوند و سنتز Cryoprotectant ها نیز از انجماد آنها جلوگیری می کند. بنابراین آنها سازگاریهای متفاوتی را به صورت تغییرات ساختاری به طور مثال در سطح غشا، پروتئین ها و آنزیم ها نشان می دهند که آنها را قادر به جبران اثرات زیان آور دماهای پایین کرده است (10-8).

آنزیم ها قادر به کاتالیز تمام واکنش های بیوشیمیایی مورد نیاز ارگانیسم ها می باشند که آنها را با شرایط مختلف زندگی سازگار می کنند و از اهداف اصلی برای سازگاری ارگانیسم ها با محیط های سرد می باشند. آنزیم های سایکروفیل فعالیت ویژه بالایی در دماهای پایین و متوسط از خود نشان می دهند و به آسانی با اندک افزایش دما غیرفعال می شوند و از نظر کاربردی در طیف وسیعی از صنایع مفیدند (11).

1 . Mesophile
2 . Thermophile
3 . Psychrophile
4 . Antifreeze protein

2-1-1-1 ترموفیل ها و هایپرترموفیل ها

ترموفیل ها گروهی از میکروارگانیسم ها هستند که در دماهای بین 45-80°C و هایپرترموفیل ها در دماهای نزدیک به دمای بخار (بالاتر از 80°C) رشد می کنند. گونه های ترموفیل اغلب از گونه های باکتریایی و گونه های هایپرترموفیل از گونه های آرکئا می باشند. این ارگانیسم ها از انواع محیط های گرم دریایی و خشکی، شامل محیط های طبیعی و ساخته بشر جدا سازی شده اند. آنزیم های این ارگانیسم ها (یا آنزیم های هایپرترموفیل) خصوصیات ساختاری-عملکردی بی نظیری را در پایداری دمایی بالا و فعالیت در دماهای بالاتر از 70 °C نشان می دهند. بعضی از این آنزیم ها در دماهای بالاتر از 110 °C فعال هستند. از نظر خصوصیات پایداری دمایی، آنزیم های ترموفیل، بین آنزیم های مزوفیل و هایپرترموفیل قرار می گیرد (13، 12 و 6). آنزیم های ترموفیل و هایپرترموفیل اغلب زیر دمـای 40 °C فعالیتی ندارند. ترموفیل ها، به طور کلی مشابه همتاهای مزوفیل خود می باشند: کربوهیدراتهای مشابهی تخمیر می کنند، منابع نیتروژنی مشابهی استفاده می کنند، مسیرهای اکسیداتیو مشابهی دارند و می توانند به شکل گونه های هوازی، غیرهوازی یا هوازی اجباری، اتوتروف و هتروتروف زندگی کنند. تئوری های اخیر و شواهد موجود نشان می دهند که هایپرترموفیل ها اولین شکل حیات روی سطح زمین بوده اند. بنابراین آنزیم های هایپرترموفیل می توانند به عنوان سیستم های مدل برای بیولوژی و شیمی- فیزیک به منظور درک تکامل آنزیم ها، مکانیسم های مولکولی پایداری حرارتی پروتئین ها و محدودیت بالای دمایی برای عملکرد آنزیم ها مورد استفاده قرار گیرند. این اطلاعات می تواند منجر به گسترش استراتژی های جدید مهندسی پروتئین شود و بعلاوه چنین آنزیم هایی کاربرد های وسیعی در بیوتکنولوژی دارند (15 و 14).

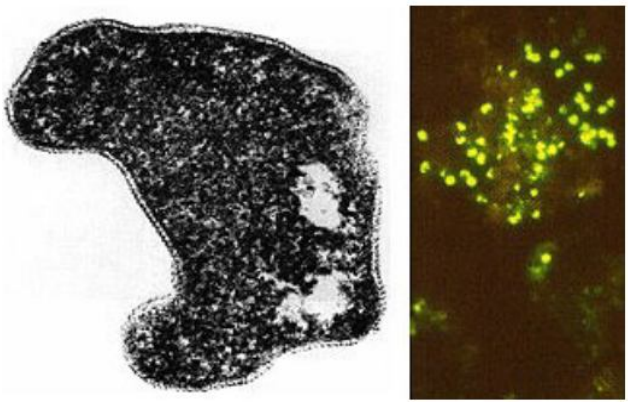
1-2-1-1-1 تاکسونومی ترموفیل ها

تکامل و تاکسونومی ترموفیل ها از موضوعاتی است که توجه زیادی را به خود جلب کرده است. ترموفیل ها و هایپرترموفیل ها از نظر تاکسونومی به خوبی شناسایی نشده اند، اما روابط تکاملی آنها مورد بررسی قرار گرفته است. به طور کلی ترموفیل ها قلمرو خاصی را به خود اختصاص نمی دهند و در سه قلمرو اصلی یوکاریوتها، آرکئا و پروکاریوتها توزیع شده اند (17 و 16).

یوکاریوتها، گروه بزرگی از موجودات هستند که از گروهای مجزای فیلوژنیکی قارچ ها، جلبک ها، جانوران، کلروفیت ها و... تشکیل شده اند. به طور کلی تعداد یوکاریوتهای ترموفیل که تاکنون شناسایی شده اند، ناچیزند که از این دسته می توان به ***Cyanidium caldrium*** از گروه جلبک ها که قادر به رشد تا دمای $57\ ^{\circ}C$ و ***Alvinella pompejana*** از گروه پلی کیت ها که حداکثر تا دمای $68\ ^{\circ}C$ رشد می کنند، اشاره کرد. تاکنون، یوکاریوت هایپرترموفیل شناسایی نشده است (16).

آرکئا شامل سه گروه مجزا فیلوژنیکی هستند: Crenarchaeota، Euryarchaeota و Korarchaeota؛ و براساس فیزیولوژی به سه دسته Methanogens، Extreme halophile و Extreme thermophile (Hyperthermophile) تقسیم می شوند.

Crenarchaeota، عمدتاً شامل پروکاریوتهای هایپرترموفیل وابسته به سولفور و Euryarchaeota حاوی متانوژن ها و هالوفیل ها می باشند. توالی ژن Korarchaeota 16S rRNA، به طور عمده از ارگانیسم های ساکن مناطق هایپرترموفیل جداسازی شده است. شکل1-1 یک آرکئای هایپرترموفیل را نشان می دهد (16).



شکل1-1 *Sulfolobus* (T. D. Brock) هایپرترموفیلی است که از چشمه های آب گرم اسیدی با محدوده دمایی از 60 تا $95^{\circ}C$ و pH بین 1 تا 5 شناسایی شده است.

پروکاریوتها، ارگانیسم های تک سلولی هستند که فاقد تنوع ساختاری بوده، اما دارای تنوع وسیعی در ژنتیک و فیزیولوژی می باشند. در قلمرو باکتریها، دو جنس ***Thermotoga*** و ***Aquifex*** دارای گونه های هایپرترموفیل و دو جنس ***Thermus*** و ***Geobacillus*** دارای گونه های ترموفیل شناخته شده می باشد (17).

1-1-2-1-1-1 جنس *ژئوباسیلوس*

Taxon: Aneurinibacillus danicus
Phylum: Firmicutes
Class: Bacilli
Order: Bacillaceae
Genus: *Geobacillus*

جنس *باسیلوس*، مجموعه متنوع و بزرگی متشکل از باکتریهای هوازی و غیرهوازی، میله ای شکل و گرم مثبت می باشد که با پیشرفت بیولوژی مولکولی، متحمل طبقه بندی های جدیدی شده است. *باسیلوس* و جنس های وابسته، شامل باکتریهای سایکروفیل، اسیدوفیل، آلکالوفیل، هالوفیل و ترموفیل هستند که قادر به رشد در منابع مختلف کربنی هستند (21-18).

شواهد اولیه نشان داد که جنس *باسیلوس* از نظر فیلوژنیکی ناهمگون[1] می باشد. سرانجام در سال 1991 در طبقه بندی *باسیلوس* ها تجدید نظر شد و این جنس به گروه های مجزای فیلوژنیکی ***Alicyclobacillus***، ***Brevibacillus***، ***Aneurinibacillus***، ***Salibacillus***، ***Paenibacillus***، ***Virgibacillus***، ***Gracilibacillus***، ***Ureibacillus*** و ***Bacillus*** طبقه بندی شد. آنالیزهای مولکولی نشان داد که اکثر باکتری های ترموفیل، متعـلق به گروه ژنتیکی دیگری می باشد. در نتیجه در سال 2001، Nazina و همکارانش جنس ***Geobacillus*** به معنی *باسیلوس* های خاکی یا زمینی را معرفی کردند، که در توالی ژن 16S rRNA، دارای همولوژی بین 98/5-99/2% می باشند (23 و 22).

باسیل های ترموفیل، شامل *ژئوباسیلوس* ها به طور گسترده ای پراکنش داشته و از نواحی ژئوترمال مختلف و قاره های مختلف جداسازی شده اند. *ژئوباسیلوس* ها، همچنین از چشمه های آب گرم اعماق دریا نیز جداسازی شده اند. حتی، *ژئو باسیلوس* هایی همـچون ***G. subterraneus*** و ***G. uzenensis*** از نواحی نفتی جداسازی شده اند (23 و 22).

ژئوباسیل ها، شامل باکتری های هوازی تشکیل دهنده اسپور هستند که دمای رشد آنها $78-35^{\circ}C$ می باشد. تا سال 2009، 25 گونه از این جنس، از جمله ***G. stearothermophilus***، ***G. thermocatenulatus***، ***G. thermoleovorans***، ***G. kaustophilus*** و ***G. thermoglucosidasius*** شناسایی شد و هر روزه به تعداد آنها افزوده می شود.

1. Hetrogenous

Geobacillus ها، به طور قابل توجهی در صنعت به عنوان منبع آنزیم های پایدار حرارتی آمیلاز، لیپاز، پروتئاز و پلولاناز دارای اهمیت می باشند (26 -24).

2-1 ترموزایم[1] ها

ترموزایم ها، آنزیم های پایدار حرارتی هستند که فعالیت اپتیمم آنها در محدوده دمایی $^{\circ}C$ 125-60 می باشد. این آنزیم ها از نظر مطالعه پایداری پروتئین، بسیار مورد توجه محققان می باشند. همچنین، در صنایع در حال توسعه و بیوتکنولوژی نیز کاربرد وسیعی دارند. شناسایی اکثر مکانیسم های پایدار کننده پروتئین ها، از طریق مطالعه پایدارسازی مدلهای مزوفیل بدست آمده است و اخیراً مقایسه آنزیم های مزوفیل و ترموزایم ها این مکانیسم ها را تأیید کرده است (12).

1-2-1 چه عواملی ترموزایم ها را پایدار می سازد؟

1. ترموزایم ها سخت تر[2] هستند

از آنجاییکه ترموزایم ها به طور اپتیمم در شرایط دناتوره کننده آنزیم های مزوفیل فعال هستند، بنابراین باید نسبت به مزوزایم ها سخت تر باشند. این سختی برای حفظ ساختار فعال کاتالیتیک آنها مورد نیاز بوده و آنها را از دناتوره شدن حفظ می کند. این سختی از طریق کاهش سرعت تعویض هیدروژن و حساسیت کمتر برای تخریب پروتئولیتیک و دناتوره شدن بوسیله دناتوره کننده های شیمیایی و گرمایی به اثبات رسیده است. اگرچه هیچ جایگزینی در باقیمانده های آمینواسیدی به تنهایی مسئول این پایداری حرارتی نمی باشد، اما مشاهده شده است که در بسیاری از آنزیم ها، این جایگزینی ها آنزیم ها را از طریق پر کردن حفره و افزایش هسته آبگریز تغییر می دهند که در مجموع باعث سختی کلی آنزیم می شود (15 و 13).

1. Thermozyme
2. Rigid