دانشکده علوم پایه

گروه زیست شناسی

گرایش بیوشیمی

استخراج و تعیین خصوصیات یک آلفا آمیلاز ترموفیل از جنس باسیلوس

از:

سمیه قلندری

استاد راهنما:

دکتر محمودرضا آقامعالی

اساتید مشاور:

دکتر محسن اصغری

مهندس مهدی رسا

شهریور ۹۲

راز و رمز پویای علم و کشف معانی بدیع و تجلی جلوه های شهودی معرفت کیمیایی است که آسمان علم به برکت سیما و سیره ی نورانی نبی مکرم صلی الله علیه و آله و سلم، انسان در بند خاک را به معراج حضور می خواند

و چه خرم علمی که از چشمه ی معارف سیراب شود و چه زیبا دانشی که قبای پرنیانش به عطر و بوی گلستان محمدی معطر شود و چه معماری باشکوهی، بنایی که سنگ هویت و فرهنگ آن ریشه در مدینه النبی بیابد

و امروز کاخ آباد علم به سروش معنوی و مفهوم پیام او بیش از پیش محتاج راهنمایانی است که علاوه بر حفظ آبادانی آن در راه اعتلای آن به فرزندان خویش محبت نمایند

سپاس خدای را که سخنوران در ستودن او بمانند، شمارندگان شمردن نعمت های او ندانند، و کوشندگان حق او را گزاردن نتوانند و واژگان در برابر عظمتش حیرانند. و در این حیرانی تنها این واژگان بر زبانم جاری می شود:

خداوندا به ما توفیق تلاش در شکست، صبر در نومیدی، رفتن بی همراه، جهاد بی سلاح، کار بی پاداش، فداکاری در سکوت، دین بی دنیا، مذهب بی عوام، عظمت بی نام، خدمت بی نان، ایمان بی ریا، خوبی بی نمود، گستاخی بی خامی، مناعت بی غرور، عشق بی هوس، تنهایی در انبوه جمعیت و دوست داشتن بی آنکه دوستت بدارند، را عنایت فرما.

از استاد ارجمندم جناب آقای دکتر آقامعالی که با ابزار علم، تجربه، اخلاق و تواضع مرا در انجام این پایان نامه یاری نمودند سپاسگزارم. از مشاورین محترم، جناب آقای دکتر اصغری و جناب آقای مهندس رسا که انجام این پایان نامه مرهون تلاش و زحمات فراوان ایشان می باشد، کمال تشکر و قدردانی را دارم. از سرکار خانم پروفسور سریری و جناب اقای دکتر غفوری در سمت اساتید ممتحن کمال سپاسگزاری را دارم. از خانم ابراهیمی دانشجوی بزرگوار دوره دکتری به خاطر راهنمایهای بی دریغشان بی نهایت سپاسگزارم. از دوستان عزیزم در گروه بیوشیمی و تمام کسانی که در انجام این پایان نامه سهمی داشتند تشکر می نمایم. از خانواده ام به پاس زحمات و محبت های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی کند صمیمانه تشکر میکنم.

برای همگان از خداوند موفقیت و بهروزی را مسئلت می نمایم

ماحصل آموخته هایم راتقدیم می کنم به آنان که مهر آسمانی شان آرام بخش آلام زمینی ام است

به استوارترین تکیه گاهم، دستان پرمهر پدرم

به سبزترین نگاه زندگیم، چشمان سبز مادرم

که هرچه آموختم در مکتب عشق شما آموختم وهرچه بکوشم قطره ای از دریای بی کران مهربانیتان راسپاس نتوانم بگویم.

عنوان	صفحه
چکیده فارسی	س
چکیده انگلیسی	ش
فصل اول : مقدمه	۱
۱-۱ اکسترموفیل ها	۲
۱-۱-۱میکروارگانیسم های باروفیل	۲
۱-۱-۲ میکروارگانیسم های اسیدوفیل و آلکالوفیل	2
۱-۱-۳ دما	۳
۱-۱-۳-۱ سایکروفیل ها	۳
۱-۱-۳-۱-۱ معماری ساختارآنزیم های سایکروفیل	۴
۱-۱-۳-۲ ترموفیل ها و هایپرترموفیل ها	۵
۱-۱-۳-۳ تاکسونومی ترموفیل ها	۵
۱-۱-۳-۳-۱ جنس *ژئوباسیلوس*	۶
۱-۲ ترموزایم ها	۷
۱-۲-۱ کاربرد ترموزایم ها	۷
۱. کاربرد در بیولوژی مولکولی	۸
۲.کاربرد در پردازش نشاسته	۸
۱-۳ آنزیم های موثر بر کربوهیدراتها (CAZy)	۹
۱-۳-۱ فواید طبقه بندی CAZy	۱۳
۱-۳-۲ تعریف ها و اصطلاحات در CAZy	۱۳
۱-۴ طبقه بندی گلیکوزیل هیدرولازها	۱۴
۱-۴-۱ مکانیسم مولکولی گلیکوزیل هیدرولازها	۱۷

۱-۴- ۲ پیش ماده گلیکوزیل هیدرولازها ۱۸

۱-۴-۳ گلیکوزیل هیدرولازها ۱۹

۱-۴- ۴ خانواده α–آمیلاز ۲۱

۱-۴-۴-۱ سازمان یابی دومین ها ۲۳

۱-۴-۴- ۲ مکانیسم کاتالیتیک آنزیم α-آمیلاز ۲۴

۱-۴-۴-۳ نواحی سکانس حفظ شده در خانواده α-آمیلاز ۲۵

۱-۵ ساختار ۲۶

۱-۵ -۱کاربرد α-آمیلاز در صنعت و بیوتکنولوژی ۲۷

۱-۶ دراین تحقیق ۲۷

فصل دوم : مواد و روش ها ۲۸

۲-۱ تجهیزات مورد استفاده ۲۹

۲-۲ مواد شیمیایی مورد استفاده ۲۹

۲-۳ فیلترها و کیت‌های مورد استفاده ۲۹

۲-۴ میکروارگانیسم مورد استفاده ۲۹

۲-۵ محیط کشت نگهداری باکتری ۲۹

۲-۶ شناسایی باکتری ۳۰

۲-۶-۱ محیط های کشت برای شناسایی باکتری.*Geobacillus sp* ۳۰

۲-۶-۲ تست های شناسایی.*Geobacillus sp* ۳۱

۲-۶-۲-۱ تست های میکروبی وتست های بیوشیمیایی ۳۱

۲-۶-۲-۲ آنالیز سکانس ژنی 16S rDNA ۳۱

۲-۶-۲-۲-۱ استخراج DNA ژنومی ۳۱

۲-۶-۲-۲-۲ پرایمرها و انجام واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) برای 16S rDNA ۳۲

۲-۷ تولید آنزیم ۳۲
۲-۷-۱ تعیین فعالیت α-آمیلاز ۳۳
۲-۸ خالص سازی جزئـی آنزیم ۳۴
۲- ۹ بررسی پایداری آنزیم در حضور یون های فلزی ۳۵
۲-۱۰ بررسی پایداری آنزیم در حضور دترجنت‌ها ۳۵
۲-۱۱ بررسی پایداری آنزیم در حضور نمک ۳۵
۲-۱۲ بررسی غیر فعال سازی حرارتی برگشت ناپذیر (Irreversible thermoinactivation) ۳۶
۲-۱۳ محاسبه کمی پایداری حرارتی در حضور کلسیم ۳۶

فصل سوم : نتایج ۳۷
۳-۱ جداسازی باکتری ۳۸
۳-۲ شناسایی باکتری ۳۸
۳-۲-۱ تست های میکروبی برای شناسایی باکتری ۳۹
۳-۲-۲ تست های بیوشیمیایی شناسایی باکتری ۴۳
۳-۲-۳ شناسایی باکتری با استفاده از ۱۶ S rDNA ۴۳
۳-۳ تولید و تعیین خصوصیات آنزیم α-آمیلاز ۴۴
۳-۳-۱ تاثیر pH بر فعالیت α-آمیلاز ۴۴
۳-۳-۲ تاثیر درجه حرارت بر فعالیت α-آمیلاز ۴۴
۳-۳-۳ بررسی پایداری آنزیم در حضور یون های فلزی ۴۵
۳-۳-۴ بررسی پایداری آنزیم در حضور دترجنت‌ها ۴۶
۳- ۳-۵ بررسی غیر فعال سازی حرارتی برگشت ناپذیر ۴۸

۳-۳-۶ بررسی پایداری آنزیم در حضور نمک ۵۰

فصل چهارم : بحث ۵۱

۴-۱ شناسایی گونه *Geobacillus stearothermophilus* ۵۳

۴-۱-۱ تست های میکروبی و بیوشیمیایی باکتری ۵۳

۴-۲ بررسی خصوصیات آلفا-آمیلاز ۵۴

۴-۲-۱ بررسی اثر دما بر فعالیت آلفا-آمیلاز ۵۴

۴-۲-۲ بررسی اثر pH بر فعالیت آلفا-آمیلاز ۵۴

۴-۲-۳ بررسی پایداری حرارتی آلفا-آمیلاز ۵۴

۴-۲-۴ بررسی پایداری آنزیم در حضور دترجنت ۵۵

۴-۳ سایر مطالعات دررابطه با آلفا-آمیلازاز *Geobacillus stearothermophilus* ۵۶

۴-۳-۱ مکانیسم های مسئول پایداری پروتئین در دماهای بالا ۵۸

منابع ۶۰

فهرست شکل ها صفحه

شکل ۱- ۱ سیستم طبقه بندی موثر بر کربوهیدراتها CAZy ۱۰

شکل ۱-۲ طبقه بندی خانواده گلیکوزیل هیدرولازها بر اساس CAZy ۱۲

شکل ۱-۳ طبقه بندی گلیکوزیل هیدرولازها در سیستم CAZy ۱۲

شکل ۱-۴ طبقه بندی گلیکوزیل هیدرولازها در CAZy ۱۳

شکل ۱-۵ ویژگی گلیکوزیل هیدرولازهای خانواده ۱۳ ۱۵

شکل ۱-۶ ساختار ۸barrel (β /α) در clan GH-H ۱۶

شکل ۱-۷ مقایسه گلیکوزیل هیدرولازهای ۱۳ و ۷۷ ۱۶

شکل ۱-۸ ساختار پلولان ۱۹

شکل ۱-۹ مکانیسم حفظ در آلفا-آمیلاز ۲۰

شکل ۱-۱۰ سازمان یابی دومین ها در آلفا- آمیلاز ۲۳

شکل ۱-۱۱ رشته های β حفظ شده در دومین TIM barrel ۲۴

شکل ۱-۱۲ مناطق سکانس حفظ شده در آنزیم های خانواده آلفا-آمیلاز ۲۶

شکل ۳-۱ رنگ آمیزی گرم در باکتری ۳۸

شکل ۳-۲ رنگ آمیزی اسپور ۳۹

شکل۳-۳ تست سیمون سیترات ۳۹

شکل ۳-۴ تست TSI ۴۰

شکل ۳-۵ تست SIM ۴۱

شکل ۳-۶ تست MR-VP ۴۲

شکل ۳-۷ تست مالو نات ۴۲

شکل ۳-۸ تصویر باند 16s rDNA ۴۳

شکل ۳-۹ اثرpH بر فعالیت آلفا-آمیلاز ۴۴

شکل۳-۱۰ بررسی اثر دما بر فعالیت α-آمیلاز و تعیین دمای بهینه فعالیت آنزیم در حضور غلظت‌های۰ (قرمز)، ۱۰ (آبی) و ۲ (سبز) میلی‌مولار کلسیم ۴۵

شکل ۳-۱۱ اثر SDS برفعالیت آلفا-آمیلاز ۴۶

شکل ۳-۱۲ اثر Triton X100 بر فعالیت آلفا-آمیلاز ۴۷

شکل۳-۱۳ اثر اوره بر فعالیت آلفا-آمیلاز ۴۷

شکل ۳-۱۴ غیر فعال سازی آنزیم در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد. (Δ) در حضور کلسیم، (□) در عدم جضور کلسیم ۴۸

شکل ۳-۱۵ غیر فعال سازی آنزیم در دمای ۶۰ درحه سانتی گراد. (Δ)در حضور کلسیم ، (□) در عدم حضور کلسیم ۴۹

شکل ۳-۱۶ غیر فعال سازی آنزیم در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد. (Δ) در حضور کلسیم، (□) درعدم حضور کلسیم ۴۹

شکل ۳-۱۷ اثر NaCl بر فعالیت آلفا-آمیلاز ۵۰

فهرست جدول صفحه

جدول ۱-۱ اعضای خانواده آلفا- آمیلاز ۲۲

جدول ۱-۲ آنزیم های خانواده آلفا-آمیلاز، عدد EC مربو طه، و سازمان یابی دومین آنها ۲۵

جدول ۳-۱ تست ها ی کاتالاز، ژلاتیناز، اوره آز در باکتری *Geobacillus sp.* ۴۳

جدول ۳-۲ درصد فعالیت باقیمانده آلفا-آمیلاز در دماهای مختلف ۴۸

جدول ۳-۳ اثر یونهای فلزی مختلف در پایداری آنزیم ۴۵

جدول ۳-۴ سنجش فعالیت آلفا-آمیلاز در حضور SDS, Urea, Triton X100 ۴۸

جدول ۳-۵ نیمه عمر غیر فعال سازی آنزیم در دماهای ۵۰، ۶۰، ۷۰ $^{\circ}C$ ۵۰

چکیده فارسی:

استخراج و تعیین خصوصیات یک آلفا آمیلاز ترموفیل از جنس باسیلوس

سمیه قلندری

آنزیم های آمیلولیتیک از مهم ترین آنزیم ها در صنعت و بیو تکنولوژی به شمار می آیند. و امروزه جداسازی این آنزیم ها از میکروارگا نیسم های ترموفیل بسیار مورد توجه قرار گرفته است. در این تحقیق تولید آلفا-آمیلاز از یک سویه *Geobacillus* مورد بررسی قرار گرفته است . تست های میکروبی و بیو شیمیایی برای شناسایی این سویه انجام شد . البته می توان به منظور تعیین دقیق گونه از آنالیز سکا نس ژن 16 s rDNA استفاده کرد. این سویه از *Geobacillus* یک باکتری ترموفیل است که از چشمه های آب گرم جداسازی شده است و آن آلفا-آمیلاز پایدار حرارتی تولید می کند ، آلفا-آمیلاز این باکتری خارج سلولی با فعالیت endo می باشد و سوسترای ترجیحی آن نشاسته است. به منظور ا فزایش تولید آلفا-آمیلاز توسط باکتری از نشا سته ۱٪ و لاکتوز ۳٪ به عنوان منبع کربن در محیط کشت استفاده می شود . در بررسی خصوصیات بیوشیمیایی α-آمیلاز ،پس از تغلیظ این آنزیم از محیط کشت، ا ثر دما و pH بر فعالیت آمیلولیتیک آنزیم و نیز پایداری آنزیم بررسی می شود.

نتایج نشان می دهد که فعالیت بهینه و حد اکثر این آنزیم در دمای ۶۰ و ۷۰ درجه سا نتی گراد می باشد . محدوده pH فعا لیت آنزیم ۸-۶ است . آنزیم پایداری حرارتی نسبتا کمی دارد .

واژه های کلیدی : آلفا-آمیلاز، پایداری حرارتی ، ژئوباسیلوس

Abstract:

Production and characterization of alpha-amylase from *Geobacillus sp*.

Amylolytic enzymes are among the most important enzymes in industry and biotechnology and at present isolation of these enzyme from thermophilic bacteria is of central importance In order to identify this bacteria .microbial and biochemical test were carried out on these thermophilic strain. This strain of Geobacillus is a thermophilic bacteria , have been isolated from hot spring.It produces a thermostable alpha-amylase.α-amylase of this bacteria is extracellur and endo-acting.The preferred substrate of this enzyme is starch instead of pullulan. In order to increase of alpha amylase by this bacteria,starch 1% and lactose 3% were used as a carbon scource.To investigate the biochemical characteristics, of alpha amylase after concentration of the enzyme from the culture , effects of temperature and pH on amylolytic activity and thermal stability were evaluated. Thr result showed that the alpha amylase exhibited optimal and maximal activities at 60 ˚C and 70 ˚C.and maximal activity of the α-amylase in range of pH(6-8).this enzyme do not have unusual thermostability.

Key Word: alpha amylase, thermostability, Geobacillus

فصل اول

مقدمه و تئوری

۱-۱ اکسترموفیل ها

میکروارگانیسم ها توانایی های متفاوتی جهت سازگاری با استرس های مختلف محیطی دارند و توانسته اند آنها را از محیط های اکستریم متعددی روی زمین جداسازی کنند. محیط اکستریم، 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 اکسترموفیل می خوانند[۲و۱]. میکروارگانیسم های اکسترموفیل به زندگـی در فشـار بالای اعماق دریا، pH های بالا و پاییـــن (۳-۰ pH یا ۱۲-۱۰ pH)، غلظت های بسیار بالای نمک (۳۰٪-۵)، 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[۴و۳]. اکسترموفیل ها منابع آنزیمی (Extremozymes) با پایداری زیاد می باشند و کاربرد این آنزیم ها به عنوان بیوکاتالیست ها توجه زیادی را در صنعت به خود جلب کرده است. با کشف اکسترموفیل ها، بویژه آنهایی که ساکن محیط های با دمای بالا هستند (thermophile)، تلاش برای شناسایی محیط های اکستریم دیگری که زندگی در آنها جریان دارد، افزایش یافته است[۵] .

۱-۱-۱ میکروارگانیسم های باروفیل

اولین جداسازی از باکتریهای باروفیل بوسیله Yayanos و همکارانش در سال ۱۹۷۹ انجام شد. سپس باروفیل های متفاوتی شناسایی شدند. فشار بهینه برای رشد این گونه های باروفیل حدود (MPa) ۵۰ مگا پاسکال در دمای $^{\circ}C$ ۱۰ می باشد. قابل توجه است که گونه هایی از اعماق ۶۰۰۰ متری جدا شده است که قادر به رشد در دمای $^{\circ}C$ ۱۰ در فشار اتمسفریک MPa ۰/۱ نمی باشند[۱]. مکانیسمی که بوسیله آن باکتریهای دریایی به فشار بالا سازگار شده اند به طور کامل شناسایی نشده است، اما بیان ژنهایی تنظیم شونده از طریق فشار و ارتباط آن با باروفیلی و تحمل فشار به تدریج اثبات شده است. عقیده بر این است که ژنهای تنظیم شونده با فشار به سازش باکتریهایی که در معرض تغییرات عمودی بزرگ در ستون آب هستند کمک می کند. اما این ژنهـا در باکتری هایی که در معـرض فشـار نیستند نیز دیـده می شوند. در میان باکتری های باروفیل، گـونه *Moritella yayanosii* جدا شده از اعماق Mariana trench قادر است در فشار بین ۶۰ تا ۱۰۰ (MPa) مگا پاسکال با فشار بهینه ۷۰ (MPa) مگا پاسکال رشد کند[۵].

۱-۱-۲ میکروارگانیسم های اسیدوفیل و آلکالوفیل

میکروارگانیسم ها در محیط هایی با pH های ۱۱-۱ شناسایی شده اند، اما اکثر ارگانیسم ها قادر به رشد در pH های ۸-۴ با pH بهینه ۷ می باشند[۱] . محیط های اسیدی و بازی به طور گسترده در خاکهای سرتاسر جهان توزیع شده است و

محیط های طبیعی با pH اسیدی ۳ تا ۴ نسبتاً فراوان هستند، این مناطق شامل چشمه های آب گرم، خاک ها، دریاچه ها و محیط های معده ای-روده ای می باشد. به طور طبیعی محیط های آلکالین حاوی مقادیر زیادی از کربنات سدیم و سایر نمک ها است که بعضی از میکروارگانیسم های پروکاریوتیک و یوکاریوتیک قادر به تحمل این محیط ها می باشند. pH درون سلولی این ارگانیسم ها نزدیک به خنثی می باشد، اما واضح است که آنزیم های خارج سلولی می بایست در این شرایط اکستریم پایدار و فعال باشند. اخیراً گزارش شده است که تغییرات در pH محیطی روی بیان ژن در ارگانیسم ها اثر می گذارد و سنتز پروتئین های جدید می تواند وسیله ای برای حفظ و نگهداری هموستاز درون سلولی باشد[۳].

اگر *Salmonella typhimurium* در شرایط اسیدی قرار گیرد (pH ۳/۳)، پاسخ تحمل اسید از طریق تولید پروتئین های ویژه ای که تصور می شود مکانیسم دفاع اختصاصی در مقابل اسید باشد، صورت می گیرد. سیستم پاسخ ژنتیکی *E. coli* نیز آن را قادر به تحمل تغییرات pH محیطی می کند [۶] . .

۱-۱-۳ دما

یک گونه به ندرت می تواند متابولیسم خود را کمی پایین تر از $^{\circ}C$ ۱۰ حفظ کند. با اینحال، می توان زندگی را در دمای اکستریم، زیر ۵۰- تا بالای $^{\circ}C$ ۱۱۰، حفظ کرد. میکروارگانیسم ها بر اساس دمایی که در آن رشد می کنند به سه دسته بزرگ تقسیم شده اند. مزوفیل ها که در دماهای نرمال زندگی می کنند، ترموفیل ها که نسبت به دماهای بالا و سایکروفیل ها 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 [۸ و ۷].

۱-۱-۳-۱ 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 ولی نامساوی با 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، 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[۱۱-۹].

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 [۱۲].

۱-۱-۳-۱-۱ معماری ساختارآنزیم های سایکروفیل

خصوصیات بی نظیر آنزیم های سازگار با سرما، همچون فعالیت ویژه بالا در دماهای پایین، می توانند در فرایندهای بیوتکنولوژی متعددی مفید باشند. در نتیجه، این پدیده باعث جلب توجه فراوان به سمت ارگانیسم های سایکروفیل و شناسایی ساختارهای اولیه آنزیم های زیادی شد. ساختار کریستالی تعدادی از آنزیم های سازگار به سرما همچون α-آمیلاز، تریوز فسفات ایزومراز، سیترات سنتاز، مالات دهیدروژناز و... تعیین شده است. این ساختارهای سه بعدی نگرش های جدیدی جهت درک سازگاری مولکولی این آنزیم ها را فراهم کرده است [۱۲].

مشخص شده که تنها تغییرات ساختاری اندکی در یک همولوگ مزوفیل برای سازگاری با دمای پایین مورد نیاز است و همه باقیمانده های کاتالیتیک جایگاه فعال آنزیم های همولوگ سازگار به دماهای مختلف، کاملاً حفاظت شده می باشند. بنابراین تغییرات مولکولی مسئول این سازگاری را می توان در نقاط دیگر پروتئین جستجو کرد. آنالیز ساختار سه بعدی الاستاز و α-آمیلاز به ترتیب از ماهیان و باکتری های قطب جنوب، پروتئاز Ca^{2+} و Zn^{2+} از *سودوموناس* سایکروفیل نشان داده است که شکاف جایگاه کاتالیتک در این آنزیم ها نسبت به همولوگهای مزوفیل خود بازتر بوده طوریکه که باعث دسترسی بهتر جایگاه فعال به سوبسترا می شود. مطمئناً، دسترسی بهتر باعث کاهش مصرف انرژی مورد نیاز برای تطبیق سوبسترا با آنزیم و آزاد شدن محصول می گردد. از دیگر خصوصیت معمول آنزیم های سایکروفیل پایداری ضعیف کونفورماسیون در آنها می باشد[۱۲].

۱-۱-۳-۲ ترموفیل ها و هایپرترموفیل ها

ترموفیل ها گروهی از میکروارگانیسم ها هستند که در دماهای بین $80^{\circ}C$-۴۵ و هایپرترموفیل ها در دماهای نزدیک به دمای بخار (بالاتر از $80^{\circ}C$) رشد می کنند. به دسته اخیر اکستریم ترموفیل نیز می گویند. 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 $70^{\circ}C$ نشان می دهند. بعضی از این آنزیم ها در دماهای بالاتر از $110^{\circ}C$ فعال هستند. از نظر خصوصیات پایداری دمایی، آنزیم های ترموفیل، بین آنزیم های مزوفیل و هایپرترموفیل قرار می گیرد. آنزیم های ترموفیل و هایپرترموفیل اغلب زیر دمـای $40^{\circ}C$ 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 [۱۴و۱۳].

۱-۱-۳-۳ 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[۱۶ و ۱۵].

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 [۱۵].

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 آرکئای 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 [۱۵].

پروکاریوتها، ارگانیسم های تک سلولی هستند که فاقد تنوع ساختاری بوده، اما دارای تنوع وسیعی در ژنتیک و فیزیولوژی می باشند. گروههای پروکاریوتی براساس خصوصیات فنوتیپی مشاهده شده همانند مورفولوژی، رنگ آمیزی گرم، حرکت و خصوصیات ساختاری و فیلوژنیکی، جمع آوری و طبقه بندی شده است. امروزه نمودارهای تاکسونومی بر اساس مقایسه آنالیز های ژنتیکی توالی نوکلئوتیدی زیر واحد کوچک RNA ریبوزومی رسم می شود [۱۷] .

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 [۱۶].

۱-۱-۳-۳-۱ 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 [۲۷و ۲۰-۲۲].

شواهد اولیه نشان داد که جنس *باسیلوس* از نظر فیلوژنیکی ناهمگون می باشد. سرانجام در سال ۱۹۹۱ در طبقه بندی *باسیلوس* ها تجدید نظر شد و این جنس به گروه های مجزای فیلوژنیکی *Alicyclobacillus*، *Brevibacillus*،

Ureibacillus ،*Gracilibacillus* ،*Virgibacillus* ،*Paenibacillus* ،*Salibacillus* ،*Aneurinibacillus* 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 ۲۰۰۱، Nazina و همکارانش جنس *Geobacillus* به معنی *باسیلوس* های خاکی یا زمینی را معرفی کردند، که در توالی ژن 16S rRNA، دارای همولوژی بین ٪۹۹/۲-۹۸/۵ می باشند [۲۹ و ۲۸] .

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[۲۹ و ۲۸].

ژئوباسیل ها، شامل باکتری های هوازی تشکیل دهنده اسپور هستند که دمای رشد آنها ۳۵-۷۸°C می باشد. تا سال ۲۰۰۹، ۲۵ 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.

Geobacillus ها، به طور قابل توجهی در صنعت به عنوان منبع آنزیم های پایدار حرارتی آمیلاز، لیپاز، پروتئاز و پلولاناز دارای اهمیت می باشند[۳۲ -۳۰].

۱-۲ ترموزایم ها

ترموزایم ها، آنزیم های پایدار حرارتی هستند که فعالیت بهینه آنها در محدوده دمایی ۶۰-۱۲۵ °C 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 تایید کرده است [۱۸] .

۱-۱-۲ کاربرد ترموزایم ها

با شناسایی Taq DNA polymerase از *T. aquaticus* و کاربرد وسیع آن در تکنیک PCR، توجه همگان به سمت آنزیم های ترموفیل و هایپرترموفیل، از نظر دیدگاههای صنعتی و آکادمیک جلب شده است. تعداد رو به افزایش آنزیم های شناسایی

شده از ارگانیسم های ترموفیل و هایپرترموفیل، همراه با پیشرفت های اخیر در مهندسی پروتئین، نوید کاربرد بیشتر و رو به رشد این آنزیم ها را در صنایع مختلف می دهد [۱۵].

۱. کاربرد در بیولوژی مولکولی

کلونینگ و بیان Taq DNA polymerase در میزبان *E. coli*، در توسعه تکنولوژی PCR نقش به سزایی داشته است. DNA polymerase ترموفیلی از تعداد وسیعی از ترموفیل ها و هایپرترموفیل ها شناسایی و کلون شده است

DNA ligase ترموفیل که در اتصال اولیگونوکلئوتیدهای مجاور هم دخالت دارد، در محدوده دمایی ۴۵-۸۰°C، فعالیت بهینه را نشان می دهد. از این ویژگی می توان در واکنش زنجیره ای لیگاز (یک روش برای تکثیر DNA)، آنالیزهای موتاسیونی یا سنتز ژن استفاده کرد. در حال حاضر این آنزیم به طور تجاری در دسترس می باشد.

امروزه تعداد زیادی از پروتئازهای ترموفیل و هایپرترموفیل در بیولوژی مولکولی و پردازش های بیوشیمیایی مورد استفاده قرار می گیرد. بعضی از این پروتئین ها، بویژه پروتئین های ترموفیل که در دماهای متوسط ۲۰-۶۰°C به هضم پروتئولیتیک مقاوم هستند، به میزان اندکی در دمای بالاتر از ۷۰°C به حمله پروتئولیتیک حساس شده و دناتوره می گردند. پروتئازهایی همچون سرین پروتئاز $P_{RE}T_{AQ}$ جدا شده از *Thermus* R_t41A را می توان در مراحل فرایند خالص سازی DNA و RNA استفاده کرد. تعداد زیادی آنزیم اندونوکلئاز ترموفیل در حال حاضر تجاری شده اند که اکثر آنها از سویه های *Bacillus* و *Thermus* که به طور اپتیمم در گستره ی دمایی ۶۵°C تا ۵۰ فعال هستند، بدست آمده است [۱۷].

۲.کاربرد در پردازش نشاسته

پردازش صنعتی عمده نشاسته، شامل هیدرولیز نشاسته به محلولهای غلیظ گلوکز، مالتوز و اولیگوساکاریدها می باشد و سپس از آنها به عنوان محلول تخمیری برای تولید انواع ترکیبات استفاده می شود. پردازش نشاسته شامل دو مرحله Liqufication و Saccharification می باشد که هر دو در دمای بالا انجام می شود. در مرحله Liqufication ، گرانولهای نشاسته در دمای ۱۰۵ تا ۱۱۰°C ژلاتینه شده و به طور جزئی به وسیله آلفا-آمیلاز ترموفیل در دمای ۹۵°C و pH ۵/۸-۶/۵ به مدت ۳-۲ ساعت در اتصالات ۱،۴-α هیدرولیز می شوند. آلفا-آمیلازهای مورد استفاده از *B. Licheniformis* و *B. stearothermophilus* استخراج می شوند. در مرحله Saccharification، دما و pH به ترتیب به ۵۵-۶۰°C و ۴/۲-۵ کاهش می یابد. در این مرحله که به مدت ۲۴-۷۲ ساعت طول می کشد، نشاسته به ساکاریدهای با وزن مولکولی کم مایع