بسم الله الرحمن الرحیم

دانشکده علوم پایه

پایان نامه دوره کارشناسی ارشد زیست شناسی (بیوشیمی)

عنوان:

جداسازی، خالص سازی و مطالعه سنتیکی آلفا آمیلاز باکتری مزوفیل بومی مقاوم به پرتو گاما

نگارش:

مریم قنبری صفری

استاد راهنما:

دکتر خسرو خواجه

استاد مشاور:

دکتر حسین نادری منش

شهریور ۱۳۸۷

زندگی آتشگهی دیرینه پا برجاست

گر بیفروزیش

رقص شعله اش زهر کران پیداست

ورنه خاموش است

و خاموشی گناه ماست

تقدیم به همه کسانی که دوستشان دارم وبه همه آنان که از یاد برده ام...

تقدیم به یگانه تکیه گاه زندگی، پدرم.
تقدیم به دریای محبت و عشق، مادرم.
و تقدیم به خانواده ام.

آنان که هستی خویش را سرمایه وجودم کردند.
طاق محبتشان بر فراز خانه ام جاودانه باد...

حمدو سپاس بی پایان خداوندی را که به قلم سوگند یاد می کند. خداوند بلند مرتبه ای که داناست و نعمت اشتیاق به دانستن را به بندگانش ارزانی می دارد. خدای بزرگ را شاکرم که توان طی مرحله ای دیکر از دوران تحصیل زندگی ام را به من عطا فرمود.

هرچند که زبان و قلم از بیان تشکر شاگرد از استاد قاصر است، اما بر خود لازم می دانم که از استاد راهنمای ارجمندم جناب آقای دکتر خواجه سپاسگذاری نمایم. دقت نظر و ایده های ایشان روشنگر راه این پژوهش بوده و راهنمایی های دلسوزانه ایشان بسیار فراتر از یک استاد راهنما بوده است.

از جناب آقای دکتر حسین نادری منش به واسطه مشاوره پایان نامه، از جناب آقای دکتر سید عباس شجاع الساداتی و جناب آقای دکتر سامان حسینخانی که زحمت داوری پایان نامه را بر عهده داشتند.

و از دوستان عزیزم در آزمایشگاه های بیوشیمی، بیوفیزیک و ژنتیک کمال تشکر و امتنان را دارم.

و همچنین از سرکار خانم زرندی مسئول محترم آزمایشگاه بیوشیمی تشکر می نمایم.

در پایان از تنها سرمایه جاودان زندگی، خانواده عزیزم، که همواره در تمام مراحل زندگی، پشتیبان و حامی ام بوده اند، بی نهایت سپاسگذارم.

چکیده:

آمیلازها (Endo-1,4-alphaglucohydrolase, EC 3.2.1.1) قادرند پیوندهای گلیکوزیدی ۴-۱ ، α موجود در بخش درونی آمیلوز، آمیلوپکتین و سایر کربوهیدراتهای وابسته را هیدرولیز کنند. آلفا-آمیلازها از مهم ترین آنزیم های صنعتی بوده و کاربردهای فراوانی دارند. سویه های مختلف از نمونه های جمع آوری شده از ناحیه ای در رامسر که تشعشع رادیواکتیو بالایی دارد، جدا شد. یکی از آنها به نام *Bacillus* sp. WHO مقاوم به پرتو گاما بوده و قادر به تولید آلفا – آمیلاز خارج سلولی است. ژن آلفا – آمیلاز این سویه جدا شده، در وکتورpTZ57R/T کلون و تعیین ترادف گردید. سپس این ژن در وکتور بیانی (pET21a)، مجددا کلون شد و به سوش BL21 انتقال یافت. پس از بیان ژن، پروتئین نوترکیب تولید شده تحت شرایط احیایی با استفاده از ستون Ni-NTA آگاروز تخلیص شد. ژن آلفا آمیلاز حاوی ۱۵۶۳ نوکلئوتید بوده و ۵۲۰ اسید آمینه را کد می کند. توالی این ژن با ترادف سایر آمیلازهای میکروبی از جمله *Bacillus megaterium* ، *Bacillus* sp. WS06 و *Bacillus* sp. CS10 (به ترتیب ۹۵٪، ۹۵٪ و ۹۶٪) شباهت بالایی دارد. چهار ناحیه حفاظت شده در آمیلازها (نواحی I, II, III, IV) در این توالی آمینو اسیدی دیده می شود و وزن مولکولی آنزیم نوترکیب با استفاده از SDS-PAGE حدود ۶۴ کیلو دالتون تخمین زده شد. این آنزیم مثل سایر آمیلازها وابسته به کلسیم است و دما و pH بهینه برای فعالیت آن به ترتیب 50^{oC} و ۷ می باشد.

کلمات کلیدی: ژن آلفا آمیلاز، مقاوم به پرتو گاما، سویه باسیلوس WHO، مطالعات سنتیکی.

فهرست مطالب:

۱-۱ آنزیم ها ۱

۱-۲ غربالگری آنزیم ها و اهمیت آن ۳

۱-۳ منابع آنزیمی ۵

۱-۳-۱ میکروارگانیزم ها به عنوان عمده ترین منابع آنزیمی ۵
۱-۳-۲ موقعیت تاکسونومیک تولید کننده های شناخته شده آنزیمی ۶
۱-۳-۳ میکروارگانیسم هایGRAS ۶

۱-۴ کلکسیونهای میکروبی به عنوان منابع میکروارگانیسم ها ۷

۱-۵ غربالگری فعالیت های آنزیمی و خصوصیات آنزیمی جدید ۷

۱-۶ محیطهای بحرانی به عنوان منبعی از EXTREMOPHILE ها ۸

۱-۷ آمیلازها ۱۰

۱-۸ نشاسته ۱۰

۱-۸-۱ استفاده های صنعتی نشاسته ۱۱
۱-۸-۱-۱ تولید اتانول ۱۲
۱-۸-۱-۲ شیرین کننده ها و شربتها ۱۲
۱-۸-۱-۳ اسید لاکتیک ۱۳
۱-۸-۱-۴ بیومس میکروبی ۱۳

۱-۹ آنزیمهای تبدیل کننده نشاسته ۱۳

۱-۹-۱ اندوآمیلازها ۱۳
۱-۹-۲ اگزوآمیلازها ۱۴
۱-۹-۳ آنزیم های شاخه شکن ۱۵
۱-۹-۴ ترانسفرازها ۱۵

۱-۱۰ طبقه بندی آنزیم هایی که فعالیت آلفا-آمیلازی نشان می دهند ۱۶

۱-۱۱ طبقه بندی گلیکوزیل هیدرولاز ها؛ موقعیت آلفا-آمیلاز ۱۸

۱-۱۲ رابطه آلفا-آمیلازهای خانواده GH13 باGH57 ..... ۱۸

۱-۱۳ ساختار مولکولی آلفا-آمیلازها ۱۹

۱-۱۳-۱ دمین های آلفا-آمیلاز ۱۹
۱-۱۳-۲ جایگاه فعال آلفا آمیلازها ۲۱

۱-۱۳-۳ یون کلسیم ۲۱
۱-۱۴ توالی آمینو اسیدی و نواحی حفظ شده آلفا آمیلازها ۲۲
۱-۱۵ اهمیت فنون DNA نوترکیب ۲۳
۱-۱۵-۱ انتخاب میزبان بیان ژن ۲۳
۱-۱۵-۲ راهبردهای نسخه برداری (انتخاب حاملین بیان ژن) ۲۴
۱-۱۵-۲-۱ Replicon ۲۴
۱-۱۵-۲-۲ مارکر مقاوم به آنتی بیوتیک ۲۵
۱-۱۵-۲-۳ پروموتر (تنظیم نسخه برداری) ۲۵
۱-۱۵-۳ سیستم بیان pET ۲۶
۱-۱۶ استراتژی خالص سازی محصول نوترکیب ۲۸
۱-۱۶-۱ سیستم های تمایلی: ۲۸
۱-۱۷ اهداف این تحقیق ۳۰
۲-۱ باکتریهای مورد استفاده در پژوهش ۳۳
۲-۱-۱ سویه های E. COLI ۳۳
۲-۱-۲ سویه های گرمادوست ۳۴
۲-۲ پلاسمیدهای مورد استفاده در پژوهش ۳۴
۲-۲-۱ پلاسمید PTZ57R ۳۴
۲-۲-۲ پلاسمید PET-21A(+) ۳۶
۲-۳ محیط کشت ۳۸
۲-۳-۱ محیط کشت LBمایع ۳۸
۲-۳-۲ محیط کشت LB جامد ۳۸
۲-۳-۳ محیط کشت جامد مناسب برای کشت باکتریهای گرمادوست ۳۹
۲-۴ محلول ها و بافرها ۴۰
۲-۴-۱ طرز تهیه بافر TE ۴۱
۲-۴-۲ طرز تهیه TBE 10X ۴۱
۲-۴-۳ طرز تهیه ژل آگارز (۱٪) ۴۱
۲-۴-۴ محلول لیزوزیم ۴۱
۲-۴-۵ بافرهای استخراج DNA ژنومی ۴۲
۲-۴-۶ محلولها و رنگهای مورد نیاز برای انجام SDS-PAGE ۴۲
۲-۴-۷ بافرهای خالصسازی پروتئین با استفاده از ستون نیکل- سفارز ۴۴

۲-۵ مراحل انجام پژوهش ۴۵
۲-۵-۱ تهیه سویه های گرمادوست ۴۵
۲-۵-۲ تکثیر ژن آلفا آمیلاز مربوط به سویه WHO ۴۶
۲-۵-۲-۱ ویژگی‌های پرایمر ۴۶
۲-۵-۲-۲ طراحی پرایمر ۴۶
۲-۵-۳ تکثیر ژن آلفا آمیلاز جهت استفاده در فرایند T/A کلونینگ ۴۷
۲-۵-۴ کلون کردن در T/A VECTOR ۴۸
۲-۵-۴-۱ انجام واکنش الحاق محصول PCR با پلاسمید pTZ57R ۵۰
۲-۵-۴-۲ ترانسفورماسیون محصول الحاق به باکتری اشریشیا کولی (DH5α) ۵۰
۲-۵-۴-۳ انتخاب کلون ۵۲
۲-۵-۴-۴ تایید کلونیهای سفید نوترکیب صحیح ۵۳
۲-۵-۵ تعیین توالی ژن آلفا آمیلاز مربوط به سویه WHO ۵۳
۲-۵-۵-۱ تخلیص پلاسمید نوترکیب با استفاده از کیت اختصاصی جهت تعیین توالی ۵۳
۲-۵-۶ بررسی توالی حاصل از تعیین توالی و تایید آن ۵۴
۲-۵-۷ کلونینگ ژن آلفا آمیلاز در ناقل بیانی PET-21A(+) ۵۴
۲-۵-۷-۱ تکثیر ژن آلفا آمیلاز به وسیله PCR با پرایمرهای جدید ۵۵
۲-۵-۷-۲ هضم محصول PCR و ناقل pET-21a (+) ۵۶
۲-۵-۷-۳ انجام الحاق ۵۸
۲-۵-۷-۴ انتقال ناقل نوترکیب به میزبان ۵۸
۲-۵-۷-۴-۱ تهیه باکتری مستعد ۵۹
۲-۵-۷-۴-۲ انجام الکتروپوریشن ۵۹
۲-۵-۷-۵ انتخاب کلونیهای نوترکیب ۶۱
۲-۵-۷-۶ تخلیص pET-21a نوترکیب با استفاده از کیت اختصاصی جهت تعیین توالی ۶۱
۲-۵-۸ بیان ژن آلفا آمیلاز و تایید آن توسط SDS-PAGE ۶۱
۲-۵-۸-۱ انتقال پلاسمید pET-21a (+) نوترکیب به باکتری اشریشیا کولی BL21 (DE3) ۶۱
۲-۵-۸-۲ فرایند بیان ۶۲
۲-۵-۸-۳ استخراج پروتئین از باکتری ۶۳
۲-۵-۸-۴ الکتروفورز پروتئینها به روش SDS-PAGE ۶۳
۲-۵-۹ تخلیص پروتئین ۶۴
۲-۵-۱۰ آنالیز زیموگرام ۶۵
۲-۵-۱۱ مطالعات اولیه آنزیم شناسی ۶۶
۲-۵-۱۱-۱ تعیین فعالیت آنزیمی ۶۶
۲-۵-۱۱-۲ روش Bernfeld ۶۶
۲-۵-۱۱-۳ روش سنجش فعالیت آنزیمی ۶۶
۲-۵-۱۱-۴ واحد آنزیمی ۶۷
۲-۵-۱۱-۵ اثر دما ۶۷

۲-۵-۱۱-۶/اثرpH ۶۸
۲-۵-۱۱-۷ بررسی غیر فعال شدن حرارتی برگشت ناپذیر ۶۸
۲-۵-۱۱-۸ تعیین عوامل سینتیکی ۶۸
۳-۱ جداسازی و شناسایی باکتری ها ۷۰
۳-۲ تعیین گونه باکتری ۷۱
۳-۳ استخراج DNA ژنومی از سویه WHO ۷۲
۳-۴ تعیین توالی ژن کد کننده آلفا آمیلاز ۷۳
۳-۵- کلونینگ DNA تکثیر شده در پلاسمید PTZ57R/T ۷۴
۳-۶ تعیین توالی ژن آلفا آمیلاز کلون شده ۷۵
۳-۷ کلونینگ ژن آلفا آمیلاز در سویه بیانی ۸۰
۳-۸ بیان ژن آلفا آمیلاز کلون شده سویه WHO ۸۲
۳-۹ تعیین ویژگی های آنزیم ۸۵
۳-۹-۱ اثر درجه حرارت روی فعالیت آنزیم ۸۵
۳-۹-۲ اثر PH روی فعالیت آنزیم ۸۶
۳-۹-۳ بررسی غیر فعال شدن حرارتی برگشت ناپذیر ۸۷
۳-۹-۴ بررسی خصوصیات کاتالیتیک ۸۸
۴-۱ جداسازی سویه تولید کننده آلفا آمیلاز ۹۰
۴-۲ تعیین هویت مولکولی و ترسیم فیلوگرام ۹۲
۴-۳ تکثیر و کلون کردن ژن آلفا آمیلاز ۹۲
۴-۳-۱ تکثیر ژن آلفا آمیلاز ۹۲
۴-۳-۲ کلون کردن و تعیین توالی ژن آلفا آمیلاز ۹۳
۴-۴ بیان و خالص سازی آنزیم آلفا آمیلاز ۹۵
۴-۵ بررسی توالی نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی آلفا آمیلاز ۹۶
۴-۶ تعیین ویژگی های آنزیم آلفا آمیلاز ۱۰۰
۴-۷ پیشنهادها ۱۰۲
منابع ۱۰۳

فصل اول

مقدمه

۱-۱ آنزیم ها

موجودات زنده به لحاظ دارا بودن کاتالیزور های زیستی که اصطلاحا آنزیم نامیده می شوند، قادر به کسب انرژی از محیط و مصرف سریع آن می باشند. آنزیم ها قادر به تسریع واکنش شیمیایی بوده ولیکن در تعادل نهایی شرکت نمی کنند و همچنین به منظور تغییر و تبدیل مقادیر زیادی از مولکولها، مقدار بسیار جزئی از آنزیم مورد نیاز می باشد. برخلاف کاتالیزورهای معدنی، آنزیم ها دامنه عمل بسیار ظریفی دارا بوده و در مقایسه، دامنه بسیار محدودی از مواد را کاتالیز می کنند ویا اینکه در بعضی موارد تنها یک واکنش را کاتالیز می کنند. آنزیم ها بنا به تعریف در شرایط خاصی که در برگیرنده pH، درجه حرارت، غلظت سوبسترا، و کوفاکتور خاصی بوده عمل می کنند.

آنزیم ها بر حسب نوع واکنشی که انجام می دهند به ۶ گروه اصلی تقسیم بندی شده اند که به شرح زیر می باشند.

۱. اکسیدوردوکتازها
۲. ترانسفرازها
۳. هیدرولازها
۴. لیازها
۵. ایزومرازها
۶. لیگازها

۱-۲ غربالگری[1] آنزیم ها و اهمیت آن

اگر واکنشی از لحاظ ترمودینامیکی انجام پذیر باشد احتمال وجود حداقل یک آنزیم در طبیعت برای کاتالیز کردن آن واکنش وجود دارد (۱). فرایند تکامل، فشاری را اعمال می کند که منجر به تولید مولکول هایی با فعالیت های بیوکاتالیزی سازش یافته با سوبسترا، پایداری مولکولی، فرایند های داخل سلولی مؤثر و سازگاری برای انتقال آنزیم ها ی خارج سلولی به خارج از سلول می شود. با غربالگری ارگانیسم ها به منظور فعالیت های بیوکاتالیزی مختلف، قادریم محصولات تولید شده توسط آنها را که نسبت به وظایف خود در خلال فرایند تکامل، سازش یافته اند به دست آوریم.بنابراین غربالگری از جنبه های مختلف یک سرمایه گذاری مناسب محسوب می شود (۲). غربالگری بیوکاتالیست های جدید با اهداف دانشگاهی و علوم پایه و یا اهداف کاربردی-صنعتی صورت می گیرد (۳).

منابع تولید کننده آنزیم ها بسیار متعدد هستند. اما میکرو ارگانیسم ها بنا به دلایلی که به آنها اشاره خواهد شد مهم ترین و عمده ترین منبع تولید کننده آنزیم ها هستند که مد نظر می باشند. غربالگری و انتخاب فرایند های اولیه در تحقیقات و به دست آوردن یک محصول آنزیمی می باشند. جستجو به منظور یافتن یک ژن کد کننده ویژه برای آنزیم هدف، اصولا دارای اهمیت است. در گذشته این فرایند

[1] Screening

منحصرا شامل غربالگری میکروارگانیسم های زنده بود. اما با بکار گیری روش های پیشرفته زیست شناسی مولکولی، غربالگری بدون نیاز به کشت ارگانیسم ها قابل انجام می باشد (۵،۴). البته هر روشی دارای محدودیت هایی می باشد و ترکیبی از فنون غربالگری ترکیبی[۲] اغلب بسیار موفقیت آمیز است (۶). برای شروع فرایند جستجو و کشف، تنوع عظیم میکروارگانیسم ها در طبیعت بهترین مژدگانی است (۷). تنوع متابولیکی به وجود آمده در ۸۵٪ از تاریخ زمین که حیات محدود به میکرو ارگانیسم ها بود واقعا شگفت انگیز است. میکروارگانیزم ها در زیستگاهای خود در همه niche های اکولوژیک و compost ها تقریبا به همه سوبستراها اختصاصی شده اند. آنزیم ها طی بیش از ۴ بیلیون سال تکامل پدیدار شدند و به منظور انجام فرایند های سلولی کاملا سازش یافته اند. با این حال نیاز است که بسیاری از آنزیم ها در محیطی که نسبت به شرایط فیزیولوژیکی و طبیعی بسیار متفاوت می باشد به کار گرفته شوند و حتی ممکن است در معرض ترکیبات شیمیایی شناخته شده ای قرار گیرند که باعث تخریب و دناتوره شدن آنزیم ها و کاهش یا از دست رفتن فعالیت آنها می گردند. معمولا غربالگری آنزیم ها و راهبردهای انتخاب بر اساس دانش ما از کاربرد و شرایط فیزیکوشیمیایی می باشد که تحت آنها آنزیم ها مورد استفاده قرار می گیرند. بنابراین مرحله اولیه و اساسی در فرایند غربالگری، انتخاب با مد نظر قرار دادن کارایی آنزیم تحت شرایط مورد استفاده می باشد. پیش نیاز دیگر برای یک برنامه غربالگری موفق دسترسی به یک خزانه ژنی غنی می باشد (۶). در غربالگری، جمع آوری نمونه ها از منابع طبیعی می تواند بدون هیچ تمایزی صورت گیرند (مثل نمونه های خاک) یا شرایط اکولوژیک در این بررسی مورد توجه قرار گیرد و یک جستجوی هدفدار از یک زیستگاه خاص و ویژه که احتمال یافتن یک فعالیت آنزیمی یا یک خصوصیت آنزیمی ویژه در آن وجود دارد انجام شود (مثل جستجو در شرایط بحرانی). در صورتیکه منابع مورد جستجو و کاوش قبلا کمتر مورد بررسی قرار گرفته باشند و یا جدیدا کشف شده باشند، احتمال دستیابی به تنوع بیشتر ژنومی و استخراج میکروبهای جدید بسیار

[2] Combinational screening

افزایش می یابد. در کنار موارد فوق راهکارهایی که بر اساس تاکسونومی می باشد و شامل بررسی سیستماتیک از ارگانیزم های شناخته شده است نیز می تواند موفقیت آمیز باشد. امروزه غربالگری با فنون جدید نظیر مهندسی پروتئین و تکامل جهت دار، دستیابی به فعالیت های جدید، خصوصیات جدید و بهبود بیوکاتالیست ها از جنبه های مختلف، همچنین پی بردن به سازوکارهای دخیل در آنها شتاب بیشتری گرفته است (۶،۸،۹).

۱-۳ منابع آنزیمی

۱-۳-۱ میکروارگانیزم ها به عنوان عمده ترین منابع آنزیمی

منابع تولید آنزیمها بسیار متنوع است. میکروارگانیزم ها به عنوان عمده ترین و مهمترین منبع تولید آنزیمها محسوب می گردند. در صنعت منابع جانوری و گیاهی به ترتیب تنها ٪۸ و ٪۳ از کل آنزیمها را شامل می شوند و سایر آنزیم های مورد استفاده منشأ میکروبی دارند (۱۰). بنابه دلایل زیر میکروارگانیسم ها به عنوان منابع آنزیمی نسبت به گیاهان و جانوران ترجیح داده می شوند:۱- برای تولید عموما ارزانند، ۲- آنزیمهای موجود در آنها بیشتر قابل پیش بینی و کنترل هستند، ۳- بافتهای گیاهی و جانوری مواد مضر بیشتری دارند (مانند ترکیبات فنلی در گیاهان، مهارکننده های داخل سلولی و پروتئازها)، ۴- نسبت به گیاهان و جانوران راحت تر می توان میکروب ها را از نظر ژنتیکی دستکاری نمود، ۵- میکروارگانیزم ها را می توان در مقادیر بالا و در یک مدت زمان نسبتا کم از طریق روشهای تخمیر کشت داد. ۶- پروتئین های میکروبی اغلب نسبت به همتاهای جانوری و گیاهی خود پایدارترند (۱و۳).

با پیدایش تکنولوژی DNA نوترکیب و نیازهای جدید، میکروارگانیسم ها به عنوان منابع آنزیمی حتی اهمیت بیشتری یافته اند. جستجو و یافتن بیوکاتالیست ها، هم با اهداف آکادمیک و هم با جنبه ها و اهداف کاربردی صورت می گیرد. در هر دوحالت میکروارگانیسم ها ارجحیت دارند. این امر اگر با اهداف آکادمیک صورت گیرد محقق اغلب از دامنه وسیعی از منابع، انتخاب را انجام می دهد. این میکرو ارگانیسمها متعلق به هر سه حوزه Eukaryotes , Bacteria , Archaea می باشند.

۱-۳-۲ موقعیت تاکسونومیک تولید کننده های شناخته شده آنزیمی

جالب است که اغلب آنزیمهای میکروبی قابل تجاری شدن در تعداد معدودی از جنس های قارچی و باکتریایی یافت می شوند و در نقاط خاصی از موقعیت های تاکسونومیک تجمع یافته اند. شناخته شده ترین آنها عمدتا متعلق به گونه های باکتریایی Bacillus و Pseudomonas و قارچهای Ascomycete شامل جنس های Tricoderma, Fusarium ,Aspergillus هستند. بعلاوه گونه های متعلق به Rhizomucor, Mucor, Homicola تولید کننده برخی از آنزیم های صنعتی می باشند.

تولید کننده های عمده قارچی متعلق به یک pHylum (Ascomycota) و دو گونه باکتریایی تولید کننده آنزیمهای تجاری متعلق به دو pHylum بسیار متفاوت و دور از هم می باشند (۱۱،۱۳،۲).

۱-۳-۳ میکروارگانیسم های GRAS

اغلب پروتئین ها و آنزیمهای صنعتی مهم توسط تعداد معدودی از ارگانیسم ها که جزء GRAS (generally recognized as safe) دسته بندی می گردند، تولید می شوند. میکروارگانیسمهای GRAS شامل باکتری هایی نظیر *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* به علاوه سایر گونه های متعلق به bacilli, lactobacilli و streptomyces می باشند.

قارچ های GRAS شامل اعضـای گونـه هـای جـنس Aspergillus, Penicillum, Mucor وRhizopus هستند. مخمرها نظیر *Saccharomyces cerevisae* نیز GRAS می باشـند. میکروبهـای GRAS غیـر بیماریزا و غیر سمی می باشندو نباید آنتی بیوتیک تولید نمایند (۳،۱۴،۱۵).

۱-۴ کلکسیونهای میکروبی[3] به عنوان منابع میکروارگانیسم ها

میکروارگانیسمها را می توان از طریق غربالگری یا کلکسیون سویه ها به دست آورد. این کلکسیون ها در بسیاری از آزمایشگاه های مرتبط با تکنولوژی آنزیمی جمع آوری و تهیه شده اند. به علاوه در بسیاری از کشورها کلکسیون های ملی زیر نظر دولت ایجاد شده اند. تقریبا ۵۰۰ کلکسیون میکروبی در سراسر دنیا وجود دارد. این کلکسیون ها سرویس هایی را در اختیار ساز مانهای صنعتی و یا آکادمیک قرار می دهند. سویه ها عموما به صورت freez-dried نگهداری می شوند و در کنار آن C-DNA یا DNA ژنومی نیز در برخی موارد موجود می باشد (۱۰، ۱۴).

۱-۵ غربالگری فعالیت های آنزیمی و خصوصیات آنزیمی جدید

به منظور به دست آوردن فعالیت آنزیمی جدید، روش ها ی متعددی وجود دارد (۱۰).

- غربالگری به منظور یافتن فعالیت های آنزیمی جدید در محیط های مختلف.
- یافتن فعالیت های غیر معمول و جدید از آنزیمهای موجود.
- تغییر در محیط واکنش با تغییر شرایط واکنش یا با استفاده از برخی افزودنیها.
- به کار گیری فنون مهندسی پروتئین وDirected evolution
- ترکیب کاتالیز شیمیایی با کاتالیز آنزیمی.

---

[3] Culture collection

با وجود تکنولوژی DNA نوترکیب و روشهای مبتنی بر مهندسی ژنتیک، چرا جستجوی میکروارگانیسم های جدید یا فعالیت آنزیمی جدید هنوز هم بسیار حائز اهمیت می باشد؟

میکروارگانیسم ها یک راه حل عملی را برای بهبود فعالیت های آنزیمی پیش رو قرا می دهند. در حال حاضر، عقیده بر این است که برای تولید محصول مورد نظر یک میکروارگانیسم یا کاتالیست آنزیمی مشتق شده از یک میکرو ارگانیسم را می توان از طبیعت بدست آورد. اگر چه میکروارگانیسم ها با چشم غیر مسلح دیده نمی شوند اما بیوسفر را تحت سلطه خود دارند. به عنوان مثال تخمین زده می شود که یک گرم خاک می تواند بالغ بر ۴۰۰۰ گونه باکتریایی مختلف داشته باشد (۱۶). در حال حاضر تخمین ها برای تعداد کل گونه های میکروبی روی زمین بین یک میلیون تا یکصد میلیون می باشد اما تنها حدود ۵۰۰۰ گونه میکروبی در منابع علمی آورده شده است (۱۷). از طرف دیگر روشهای مهندسی ژنتیک با وجود تمام پیشرفت هایش با چالش هایی روبروست: ۱- تاخوردگی ناصحیح پروتئین، ۲- عدم گلیکوزیلاسیون پروتئین های یوکاریوتی در باکتری ها، ۳- حذف نشدن متیونین انتهای آمین (۱۰). گرچه مهندسی ژنتیک قادر به ایجاد آنزیمهای جدید یا بهبود یافته می باشد، طراحی ژنهای جدید که توانایی های جدیدی کد می نمایند و طراحی، شناخت و بهبود خصوصیات آنزیمی از جنبه های فعالیت و پایداری بسیار مشکل می باشد زیرا اطلاعات در دسترس و دانش ما در ارتباط با اساس مولکولی آنها ناچیز است. بنابراین یافتن منابع جدید و غربالگری ارگانیسم ها به منظور جداسازی بیوکاتالیستهای جدید بسیار مهم بوده وبه عنوان یک روش اصلی در یافتن آنزیمهای جدید باقی مانده است(۱۸،۱۹). افزایش اطلاعات توالی ناشی از ژن های جدید مربوط به ارگانیسمهای طبیعی جدا شده و مقایسه آنزیمهای همولوگ که الگوی تاخورگی و عمل مشابه دارند اما در خواص و خصوصیاتشان تفاوت وجود دارد، به ما اجازه می دهد تا از اساس مولکولی و آمینواسید های درگیر در هر خصوصیت اطلاع یافته، دانش ما را از این جنبه افزایش می دهد (۱۰).

۱-۶ محیطهای بحرانی به عنوان منبعی از extremophile ها

Extremophile یکی از عرصه های تحقیقاتی بسیار جالب در زیست شناسی و بیوتکنولوژی می باشد. در طول تکامل، حیات حتی در محیط های بحرانی زمین نیز سازش یافته است. محیط های مختلفی به عنوان بحرانی یا خشن در نظر گرفته می شوند. اغلب آنزیم هایی که امروزه مورد استفاده قرار می گیرند از ارگانیسم های مزوفیل به دست آمده اند و علی رغم مزایای بسیار زیادشان، کاربرد آنها به دلیل پایداری کم آنها در شرایط بحرانی و خشن دمایی، pH، غلظت های نمکی و ... محدود می باشد (۱۰، ۱۸، ۲۰).

Extremophile یا ارگانیسم هایی که توانایی زندگی و بقا در شرایط بحرانی و خشن را دارند آنزیم هایی با پایداری و فعالیت بالا در شرایط بحرانی (extremozyme) تولید می کنند (به ویژه در مورد آنزیم های خارج سلولی). این آنزیم ها از نظر کاربردی و مطا لعات علمی پایه بسیار جذابند زیرا تحت شرایط بحرانی که بعضا در صنعت نیز حاکم است پایدار و فعال می باشند به علاوه بعضی از exremophile ها به ویژه آنهایی که متعلق به archaea می باشند مسیر های متابولیکی جدیدی دارند و بنابراین می توانند به عنوان منبعی از آنزیم هایی با فعالیت ها و کاربرد های جدید باشند (۲۲-۲۱).

مهندسی ژنتیک طراحی آنزیم های دستکاری شده از طریق تغییر در ترکیب آمینو اسیدی را امکانپذیر می سازد اما ایجاد آنزیمهای مقاوم به حرارات، سرما و... هنوز تجربی است زیرا دانسته های ما در مورد اساس مولکولی پایداری حرارتی[۴] پایداری در برابر سرما[۵] و ... نسبتا کم است. با مقایسه آنزیم های extremophile و آنزیم های مزوفیل همولوگ از نظر توالی، ساختار، فعالیت و پایداری می توان به بسیاری از سازوکارهایی که موجب کارایی آنها در شرایط بحرانی می شوند پی برد. از این رو جستجو و

[4] Thermostability
[5] Psychophility

جداسازی از محیط های بحرانی و آنزیمهای مربوطه بسیار حائز اهمیت بوده و نقاط شروع مناسبی برای مهندسی آنزیم ها با الهام از آن چیزی که درطبیعت اتفاق افتاده می باشند (۲۱،۱۸، ۲۳).

۱-۷ آمیلازها

مسیر گلیکولیز و چرخه اسید سیتریک فرآیندهای مهم و عمده تولید انرژی از گلوکز در سلول می باشند. این مسیر ها در بین ارگانیسم های مختلف تنوع فراوانی را نشان می دهند. اما به نظر می رسد که بسیاری از آنزیم های اصلی این مسیر در اکثریت ارگانیسم ها از جمله ارگانیسم هایی که ژنوم آنها تعیین توالی شده است حفظ شده باشد (۲۴، ۲۵). وجود این مسیر ها در بین موجودات مختلف نشان می دهد که گلوکز یک منبع مهم و اصلی انرژی می باشد. گلوکز در طبیعت به مقدار فراوان، عمدتا بصورت پلیمری یافت می شود و موجوداتی که قادر به هضم پلیمر های گلوکزی هستند مقادیر فراوانی از گلوکز را در اختیار دارند. تنوع فراوانی که در آنزیم های هیدرولیز کننده پلیمری گلوکز یافت می شود نشان از اهمیت این پلیمرها برای حیات است. از بین پلیمرهای گلوکزی، نشاسته فراهم کننده عمده گلوکز مصرفی موجودات زنده می باشد زیرا اکثر موجودات قادر به هضم سلولز، فراوانترین ماده آلی در طبیعت، نمی باشند. بنابراین آنزیم های هیدرولیز کننده نشاسته[۶] از اهمیت ویژه ای بر خوردار بوده و می توان انتظار داشت که گستردگی زیادی در بین تمامی رده های حیات داشته باشند(۲۶). ترکیب مناسبی از آنزیمهای آمیلو لیتیک، به طور کامل نشاسته را به گلوکز تجزیه می نمایند(۲۷).

[6]Starch-hydrolyzing enzyme