١٩٣٤

۸۷/۱/۱۰۷۷۵۹
۸۸/۱/۲۵

دانشگاه رازی

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

در رشته زیست‌شناسی گرایش بیوشیمی

با عنوان:

خالص سازی و تعیین خصوصیات آنزیم آلفا–آمیلاز از باکتری *Bacillus* sp. GHA1

اساتید راهنما:

دکتر سیروس قبادی

دکتر خسرو خواجه

استاد مشاور:

آقای بیژن نعمانپور

۱۳۸۸ /۱/ ۲۱

توسط:

عادل احمدی

مهرماه ۱۳۸۷

۱۰۹۳۳۴

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و
نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه
متعلق به دانشگاه رازی است.

دانشگاه رازی
دانشکده علوم
گروه بیولوژی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد زیست شناسی بیوشیمی

عادل احمدی

تحت عنوان:

خالص سازی و تعیین خصوصیات آنزیم آلفا–آمیلاز از باکتری *Bacillus* Sp. GHA1

در تاریخ ۱۳۸۷/۷/۸ توسط هیات داوران زیر بررسی و با درجه عالی... به تصویب نهایی رسیده است.

۱- استاد راهنما	دکتر سیروس قبادی	با مرتبه علمی استادیار	امضاء
۲- استاد راهنما	دکتر خسرو خواجه	با مرتبه علمی دانشیار	امضاء
۳- استاد داور خارجی	دکتر رضا خدارحمی	با مرتبه علمی استادیار	امضاء
۴- استاد داور داخلی	دکتر محمدحسین میرمومنی	با مرتبه علمی استادیار	امضاء

چکیده:

آلفا-آمیلاز (اندو ۱-۴، α-D-گلوکان گلوکوهیدرولاز، EC 3.2.1.1) یک آنزیم خارج سلولی است که پیوندهای ۱-۴، α-D-گلیکوزیدی بین واحدهای گلوکز در زنجیره خطی آمیلوز را به صورت تصادفی هیدرولیز می‌کند. آلفا-آمیلاز از مهمترین آنزیم‌های صنعتی به شمار رفته و در بیوتکنولوژی امروزی نقش مهمی ایفا می‌کند. اگرچه آلفا-آمیلاز از منابع گیاهی، جانوری و میکروبی بدست می‌آید، اما در صنعت بیشترین تقاضا برای آنزیم‌های میکروبی وجود دارد. در میان باکتری‌ها، آنزیم‌های مربوط به جنس باسیلوس مهمترین منبع این آنزیم به حساب می‌آیند و معمولاً برای تولید آن مورد استفاده قرار می‌گیرند. تعداد زیادی از آلفا-آمیلازها با تفاوت در وزن مولکولی، دما و pH بهینه برای فعالیت گزارش شده‌اند. آلفا-آمیلازهایی‌که از خصوصیات مطلوبی مانند پایداری حرارتی، عدم وابستگی به یون‌های فلزی، فعالیت در طیف وسیعی از pH و غیره برخوردارند، می‌توانند در صنایع مربوطه مورد استفاده قرار گیرند. از اینرو جستجو برای یافتن میکروارگانیسم‌های جدید و جدا کردن و خالص کردن آلفا-آمیلازهای جدید از آن‌ها در سراسر دنیا افزایش یافته است. در این مطالعه چشمه‌های آب معدنی واقع در استان‌های ایلام و کرمانشاه در غرب ایران، به منظور یافتن باکتری‌های جدید تولید کننده آلفا-آمیلاز مورد بررسی قرار گرفتند و باکتری *Bacillus* sp. GHA1 (ثبت شده در بانک جهانی ژن با شماره دسترسی EU109536)، که از چشمه تنگ حمام در کرمانشاه جدا شده بود، برای تولید آلفا-آمیلاز انتخاب گردید. بیشترین میزان تولید آلفا-آمیلاز توسط این سویه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد، pH=۶/۵ و بعد از ۷۲ ساعت کشت در محیط تولید صورت می‌گیرد. برای تخلیص این آنزیم، ابتدا محیط کشت با استفاده از نمک سولفات آمونیوم ۸۵٪ تیمار شد. رسوب حاصله پس از حل شدن در بافر مناسب و دیالیز کردن از ستون کروماتوگرافی تعویض آنیونی DEAE- سفارز و سپس ستون آب‌گریزی فنیل- سفارز عبور داده شد. در طی فرآیند تخلیص، فعالیت ویژه آنزیم از ۱/۸ U/mg در محیط کشت، بعد از دو مرحله کروماتوگرافی، به ۲۵۲ U/mg افزایش یافت. با استفاده از SDS-PAGE وزن مولکولی این آنزیم ۶۶ کیلودالتون تخمین زده شد. این آنزیم در محدوده وسیعی از pH (۸-۵/۵) به صورت بهینه فعال است و ۹۰٪ فعالیت خود را در pH=۴ حفظ می کند. دمای بهینه برای فعالیت این آنزیم ۵۷ درجه سانتی‌گراد است. افزودن غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی مولار کلسیم به ترتیب سبب افزایش فعالیت آنزیم به میزان ۳ و ۷ ٪ می‌شود. همچنین پایداری حرارتی آنزیم در حضور کلسیم ۱۰ میلی‌مولار و در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، تنها ۶ ٪ بهبود می‌یابد. پایداری حرارتی این آنزیم به حضور EDTA حساس است. این ویژگی نشان دهنده نیاز آنزیم به یون کلسیم برای حفظ پایداری حرارتی و فعالیت بیولوژیکی خود می‌باشد. فعالیت و پایداری این آنزیم در محدوده وسیع pH یک خصوصیت مهم بوده و نیاز به فرآیند هزینه بر و وقت‌گیر تعدیل pH در استفاده‌های آتی این آنزیم در صنعت را حذف می‌کند. همچنین فعالیت و پایداری این آنزیم وابستگی کمی به یون کلسیم دارد که افزودن آن مشکلاتی را در برخی فرآیندها بوجود می‌آورد. از اینرو، این آنزیم با داشتن چنین خصوصیاتی می‌تواند در برخی صنایع به ویژه صنایع غذایی و پاک کننده‌ها کاربرد داشته باشد.

سپاس و ستایش ایزد بی همتا را که خوان الطاف بیکرانش بر پهنای هستی گشوده شده است و موهبت او باعث شد که بتوانم این تحقیق را به پایان برسانم.

در اینجا بر خود واجب می دانم از زحمات تمامی کسانیکه در این راه مرا یاری نمودند تشکر و قدردانی کنم. مخصوصاً از استاد گرانقدر و دانشمندم **جناب آقای دکتر قبادی** که در تمام مراحل کار تحیقاتی همواره با سعهٔ صدر مرا راهنمایی نمودند کمال تشکر و قدر دانی را دارم. همچنین از زحمات استاد اندیشمندم **جناب آقای دکتر خواجه** که همیشه با نصایح فصیح خود در طول این مدت مشوق و راهنمای من بودند کمال تشکر و قدر دانی را دارم. از زحمات **جناب آقای مهندس بیژن نعمانپور** استاد مشاور ، **جناب آقای دکتر میرمومنی** و **جناب آقای دکتر خدارحمی** داوران این پایان نامه سپاسگزارم. از راهنمایی‌های اساتید گرانقدر **جناب آقای دکتر مصطفایی** و **جناب آقای دکتر مهدیونی** سپاسگزارم. همچنین از زحمات مدیر گروه محترم زیست‌شناسی **سرکار خانم دکتر آزادبخت**، منشی محترم گروه، **خانم مختاری** و کار کنان آن آقایان **چغا کبودی، فرامرزی، موقوفه ای** صمیمانه سپاسگزارم.

ازآقای **ارسطو بدویی** از دانشجویان دوره دکتری بیوشیمی دانشگاه تربیت مدرس که در انجام این تحقیق به بنده یاری رساندند و از دوستان عزیزم آقایان: **روان، دانشور، یوسفی، فیضی، منصوری، عزتی، قاری قرآن، روکی، عباسی، خوش انجام، اورعی، سی سخت نژاد، سندگل، پیمان، کوهی** و خانمها: **امیری، پدیدار، مهرابی، عباسی، شریفی، علیزاده، ارویسی، عسکری و قلاسی** سپاسگزارم.

همچنین از کلیه اقوام بویژه **خانواده‌های خود و همسرم** که در طی این دوره خود را شریک مشکلاتم کردند و در راه یاری رساندن به بنده زحمت‌های فراوانی کشیدند کمال تشکر و قدردانی را دارم.

تقدیم به:

پدر و مادر عزیز و همسر مهربان

و

دختر نازنینم

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول: مقدمه	۱
۱-۱ تولید انرژی در موجودات زنده	۲
۱-۲ نشاسته	۲
۱-۳ استفاده‌های صنعتی نشاسته	۴
۱-۳-۱ تولید اتانول	۴
۱-۳-۲ شیرین کننده‌ها و شربت‌ها	۵
۱-۳-۳ تولید استون و بوتانول	۵
۱-۳-۴ تولید اسیدلاکتیک	۶
۱-۳-۵ بیومس میکروبی	۶
۱-۴ آنزیم‌های موثر بر نشاسته	۶
۱-۴-۱ اندوآمیلازها	۷
۱-۴-۲ اگزوآمیلازها	۷
۱-۴-۳ آنزیم‌های شاخه‌شکن	۸
۱-۴-۴ ترانسفرازها	۸
۱-۵ طبقه‌بندی آنزیم‌هایی که فعالیت آلفا-آمیلازی نشان می‌دهند	۹
۱-۶ خانواده آلفا آمیلازها	۱۲
۱-۷ طبقه‌بندی گلیکوزیل هیدرولازها؛ موقعیت آلفا-آمیلاز	۱۳
۱-۸ خانواده آلفا-آمیلازها	۱۴
۱-۸-۱ ناحیه کاتالیتیک خانواده آلفا-آمیلازها	۱۴
۱-۸-۲ نواحی ساختاری در آنزیم‌های خانواده آلفا-آمیلاز	۱۵
۱-۸-۳ توالی‌های حفاظت شده در آنزیم های خانواده آلفا آمیلاز	۱۷
۱-۹ آلفا-آمیلاز	۱۹
۱-۱۰ منابع آلفا-آمیلاز؛ خصوصیات فیزیکوشیمیایی	۲۰
۱-۱۱ کاربرد صنعتی آلفا-آمیلاز	۲۱
۱-۱۱-۱ صنایع پاک‌کننده	۲۱
۱-۱۱-۲ صنعت نشاسته	۲۲
۱-۱۱-۳ صنایع نانوایی	۲۵
۱-۱۱-۴ کاربردهای دیگر	۲۵
۱-۱۲ هدف از تحقیق	۲۶
فصل دوم: مواد و روش‌ها	۲۸
۲-۱ فهرست دستگاه‌های مورد استفاده	۲۹
۲-۲ فهرست مواد مورد استفاده	۲۹
۲-۳ میکروارگانیسم‌ها و محیط‌های کشت مورد استفاده	۳۱

۲-۳-۱ میکروارگانیسم ۳۱
۲-۳-۲ محیط‌های کشت میکروبی ۳۱
۲-۴ جداسازی باکتری‌ها ۳۲
۲-۵ انتخاب ایزوله تولیدکننده بیشترین مقدار آلفا-آمیلاز ۳۳
۲-۶ شناسایی باکتری‌ها ۳۳
۲-۷ تولید آنزیم و بهینه‌سازی شرایط محیط کشت ۳۴
۲-۷-۱ زمان بهینه برداشت ۳۴
۲-۷-۲ بهینه‌سازی pH ۳۵
۲-۷-۳ بهینه‌سازی دما ۳۵
۲-۸ تخلیص آنزیم ۳۵
۲-۸-۱ مقدمات تخلیص آنزیم آلفا-آمیلاز ۳۷
۲-۸-۱-۱ بدست آوردن درصد اشباع بهینه نمک سولفات آمونیوم برای رسوب اولیه ۳۷
۲-۸-۱-۲ بدست آوردن موقعیت باند آلفا آمیلاز بر روی ژل الکتروفورز ۳۷
۲-۸-۱-۳ انتخاب pH مناسب برای شروع کار ۳۹
۲-۹ مراحل تخلیص آنزیم آلفا-آمیلاز ۴۰
۲-۹-۱ مرحله اول: تخلیص بوسیله کروماتوگرافی تبادل آنیونی DEAE- سفارز ۴۰
۲-۹-۱-۱ آماده کردن رزین ۴۰
۲-۹-۱-۲ آماده کردن نمونه ۴۱
۲-۹-۱-۳ انتقال نمونه به ستون ۴۲
۲-۹-۱-۴ جدا کردن پروتئین‌های متصل شده به ستون ۴۲
۲-۹-۲ مرحله دوم: تخلیص بوسیله کروماتوگرافی آب‌گریزی فنیل- سفارز ۴۲
۲-۹-۲-۱ آماده کردن رزین ۴۲
۲-۹-۲-۲ آماده کردن نمونه ۴۳
۲-۹-۲-۳ انتقال نمونه به ستون ۴۳
۲-۹-۲-۴ جدا کردن پروتئین‌های متصل شده به ستون ۴۳
۲-۱۰ سنجش فعالیت آنزیمی ۴۴
۲-۱۰-۱ محلول‌ها ۴۴
۲-۱۰-۲ تهیه استاندارد مالتوز ۴۴
۲-۱۰-۳ تعیین فعالیت نمونه ۴۵
۲-۱۰-۴ واحد آنزیمی ۴۵
۲-۱۱ تعیین غلظت پروتئین ۴۶
۲-۱۱-۱ مواد و محلول‌ها ۴۶
۲-۱۱-۱-۱ معرف برادفورد ۴۶
۲-۱۱-۱-۲ استاندارد پروتئینی ۴۶
۲-۱۱-۱-۳ ظروف مورد استفاده ۴۷
۲-۱۱-۱-۴ محلول Working buffer ۴۷

۲-۱۱-۲ روش کار ۴۷
۲-۱۲ روش‌های الکتروفورز پروتئین‌ها ۴۹
۲-۱۲-۱ الکتروفورز به روش SDS-PAGE ۴۹
۲-۱۲-۱-۱ محلول‌های مورد نیاز برای SDS-PAGE ۵۰
۲-۱۲-۱-۱-۱ محلول ذخیره آکریل‌آمید / بیس‌آکریل‌آمید (۳۰/۸ درصد) ۵۰
۲-۱۲-۱-۱-۲ بافر ژل پایین ۵۰
۲-۱۲-۱-۱-۳ بافر ژل بالا ۵۰
۲-۱۲-۱-۱-۴ بافر الکترود ۵۰
۲-۱۲-۱-۱-۵ بافر نمونه ۵۱
۲-۱۲-۱-۱-۶ پرسولفات آمونیوم (۱۰٪) ۵۱
۲-۱۲-۱-۱-۷ TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine) (۱۰٪) ۵۱
۲-۱۲-۱-۱-۸ استانداردهای وزن مولکولی ۵۱
۲-۱۲-۱-۲ تهیه ژل صفحه‌ای ۵۲
۲-۱۲-۱-۳ رنگ آمیزی پروتئین ها با کوماسی برلیان آبی R-۲۵۰ ..... ۵۳
۲-۱۲-۱-۳-۱ محلولهای مورد نیاز ۵۳
۲-۱۲-۱-۳-۱-۱ محلول رنگ‌آمیزی کوماسی برلیان آبی R-۲۵۰ ..... ۵۳
۲-۱۲-۱-۳-۱-۲ محلول رنگ‌بر ۵۳
۲-۱۲-۱-۳-۱-۳ محلول نگهداری (اسید استیک ۷٪) ۵۳
۲-۱۲-۱-۳-۱-۴ نحوهٔ رنگ‌آمیزی با کوماسی برلیان آبی R-۲۵۰ ..... ۵۴
۲-۱۲-۲ الکتروفورز به روش PAGE ۵۴
۲-۱۲-۲-۱ محلول‌های مورد نیاز برای PAGE ۵۴
۲-۱۲-۲-۱-۱ محلول ذخیره آکریل‌آمید/ بیس‌آکریل‌آمید (۳۰/۸ ٪) ۵۴
۲-۱۲-۲-۱-۲ بافر ژل پایین ۵۵
۲-۱۲-۲-۱-۳ بافر ژل بالا ۵۵
۲-۱۲-۲-۱-۴ بافر الکترود ۵۵
۲-۱۲-۲-۱-۵ بافر نمونه (۵X) ۵۵
۲-۱۲-۲-۱-۶ محلول پرسولفات آمونیوم ۱۰ ٪ ۵۵
۲-۱۲-۲-۱-۷ TEMED ۱۰٪ ۵۵
۲-۱۲-۲-۲ تهیه ژل ۵۶
۲-۱۳ بررسی فعالیت و پایداری آنزیم خالص شده ۵۶
۲-۱۳-۱ اثر pH بر فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز ۵۶
۲-۱۳-۲ اثر دما بر فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز ۵۶
۲-۱۳-۳ اثر کلسیم و EDTA بر فعالیت آنزیم ۵۶
۲-۱۳-۴ بررسی پایداری حرارتی آنزیم ۵۷
۲-۱۳-۵ اثر کلسیم و EDTA بر فعالیت آنزیم ۵۷
۲-۱۳-۶ اثر pH بر پایداری سینتیکی آنزیم ۵۷

۲-۱۳-۷ تعیین پارامترهای سینتیکی آنزیم ۵۸
۲-۱۳-۸ سنجش فعالیت آنزیم با استفاده از سوبسترای EPS. ۵۸
۲-۱۴ تعیین گونه باکتری با استفاده از توالی 16s rDNA ۵۹
۲-۱۴-۱ استخراج DNA ژنوم باکتری ۶۰
۲-۱۴-۲ طراحی پرایمر ۶۱
۲-۱۴-۳ انجام PCR ۶۱
۲-۱۴-۴ الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۶۲
۲-۱۴-۴-۱ محلول‌ها و بافرهای مورد نیاز ۶۲
۲-۱۴-۴-۱-۱ بافر TBE (10X Tris borate EDTA buffer) ۶۲
۲-۱۴-۴-۱-۲ محلول اتیدیوم بروماید ۶۲
۲-۱۴-۴-۲ روش کار ۶۳
۲-۱۴-۵ مراحل تعیین گونه باکتری ۶۳
فصل سوم: نتایج و بحث ۶۴
۳-۱ نمونه‌برداری از چشمه‌ها ۶۵
۳-۲ کشت نمونه‌ها ۶۶
۳-۲-۱ جداسازی ایزوله‌ها ۶۶
۳-۲-۲ غربال کردن ایزوله‌های تولید کننده آمیلاز ۶۶
۳-۳ تشخیص جنس باکتری ۶۸
۳-۴ آنالیز ژن 16s rRNA ۶۹
۳-۴-۱ استخراج ژن 16s rRNA و تکثیر آن ۷۰
۳-۴-۲ رسم درخت فیلوژنی ۷۰
۳-۵ بهینه‌سازی شرایط برای رشد باکتری ۷۲
۳-۵-۱ زمان بهینه برداشت ۷۲
۳-۵-۲ بدست آوردن pH بهینه برای تولید آمیلاز ۷۳
۳-۵-۳ بدست آوردن دمای بهینه برای تولید آنزیم ۷۴
۳-۶ مقدمات تخلیص ۷۶
۳-۶-۱ بهینه نمودن درصد اشباع نمک سولفات آمونیوم ۷۷
۳-۶-۲ مشخص کردن باند آلفا-آمیلاز روی ژل الکتروفورز ۷۹
۳-۶-۳ انتخاب pH مناسب برای شروع کروماتوگرافی ۸۰
۳-۷ تخلیص آنزیم آلفا-آمیلاز ۸۱
۳-۷-۱ کروماتوگرافی تعویض آنیونی با ستون DEAE- سفادکس ۸۱
۳-۷-۲ کروماتوگرافی با استفاده از ستون DEAE- سفارز و شیب ۰ تا ۰/۵ مولار NaCl ۸۲
۳-۷-۳ اولین کروماتوگرافی آب‌گریزی فنیل- سفارز ۸۵
۳-۷-۴ کروماتوگرافی DEAE- سفارز به همراه شیب ۰/۳-۰ مولار NaCl ۸۸
۳-۷-۵ دومین کروماتوگرافی آب‌گریزی فنیل- سفارز ۹۰
۳-۸ تعیین خصوصیات آنزیم آلفا-آمیلاز ۹۴

۳-۸-۱ دمای بهینه برای فعالیت آلفا-آمیلاز ۹۵
۳-۸-۲ تاثیر pH روی فعالیت آمیلاز ۹۶
۳-۸-۳ تاثیر کلسیم و EDTA روی فعالیت آنزیم ۹۸
۳-۸-۴ بررسی پایداری سینتیکی آلفا-آمیلاز ۹۹
۳-۸-۵ تعیین خصوصیات کاتالیتیک ۱۰۰
۳-۸-۶ فعالیت آنزیم روی سوبسترای EPS..... ۱۰۲
۳-۸-۷ تعیین وزن مولکولی..... ۱۰۳
فصل چهارم: منابع ۱۰۶

فهرست شکل‌ها و جدول‌ها

شکل ۱-۱. نحوه سازمان‌بندی نشاسته سیب‌زمینی..... ۴
شکل ۱-۲. نمایش شماتیک فعالیت آنزیم‌های موثر بر نشاسته..... ۹
شکل ۱-۳. نمایش شماتیک ارتباط آنزیم‌های متعلق به خانواده آلفا-آمیلاز بر اساس نوع واکنش..... ۱۱
شکل ۱-۴. مقایسه آنزیم‌های خانواده ۱۳، ۷۷و ۷۰ ..... ۱۵
شکل ۱-۵. نمای شماتیک بشکه $(\alpha/\beta)_8$ در آنزیم‌های خانواده آلفا-آمیلاز ۱۶
شکل ۱-۶. مکانیسم عمل آنزیم‌های خانواده آلفا-آمیلاز ونقش باقیمانده‌های ضروری اسید آسپارتیک واسیدگلوتامیک..... ۱۸
شکل ۱-۷. خلاصه‌ای از مراحل مختلف تبدیل صنعتی نشاسته به کمک آنزیم‌ها..... ۲۴
شکل ۳-۱. هاله روشن اطراف ایزوله B ۶۷
شکل ۳-۲. سنجش میزان تولید آلفا-آمیلاز برای ایزوله‌ها به روش برنفیلد..... ۶۸
شکل ۳-۳. توالی ژن 16s rRNA مربوط به باکتری *Bacillus* sp. GHA1 ..... ۶۹
شکل ۳-۴. الکتروفورز از محصول PCR ژن 16s rRNA مربوط به باکتری مورد مطالعه..... ۷۰
شکل ۳-۵. درخت فیلوژنتیکی..... ۷۱
شکل ۳-۶. تولید آمیلاز در طول رشد در محیط کشت ۷۳
شکل ۳-۷. اثر pH محیط بر تولید آلفا-آمیلاز ۷۴
شکل ۳-۸. اثر دمای محیط بر تولید آلفا-آمیلاز ۷۶
شکل ۳-۹. الکتروفورز از محیط کشت رسوب داده شده بوسیله درصدهای مختلف نمک سولفات آمونیوم:..... ۷۸
شکل ۳-۱۰. زیموگرام آلفا-آمیلاز..... ۸۰
شکل ۳-۱۱. کروماتوگرام مربوط به کروماتوگرافی تعویض آنیونی DEAE- سفارز..... ۸۳
شکل ۳-۱۲. ژل الکتروفورز مربوط به فراکشن‌های جمع‌آوری شده پس از کروماتوگرافی تعویض آنیونی و شیب نمک ۰/۵-۰:..... ۸۵
شکل ۳-۱۳. کروماتوگرام مربوط به کروماتوگرافی فنیل- سفارز نمونه رد شده از ستون DEAE – سفارز..... ۸۶

شکل ۳-۱۴. الکتروفورز از فراکشن‌های اولین قله بعد از اتمام شیب غلظت سولفات آمونیوم در کروماتوگرافی آب‌گریزی. ۸۷
شکل ۳-۱۵. کروماتوگرام مربوط به کروماتوگرافی DEAE- سفارز و شیب نمک ۰-۰/۳ مولار..... ۸۹
شکل ۳-۱۶. الکتروفورز از قله‌های ۲ و ۳ بعد از کروماتوگرافی تعویض آنیونی DEAE- سفارز و شیب نمک ۰/۳-۰ مولار NaCl..... ۹۰
شکل ۳-۱۷. کروماتوگرام مربوط به دومین کروماتوگرافی فنیل- سفارز..... ۹۱
شکل ۳-۱۸. الکتروفورز از اولین قله بعد از کروماتوگرافی فنیل- سفارز..... ۹۲
شکل ۳-۱۹. الکترفورز از مراحل مختلف خالص‌سازی آنزیم آلفا-آمیلاز حاصل از باکتری *Bacillus* sp. GHA1..... ۹۳
شکل ۳-۲۰. اثر دما روی فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز حاصل از باکتری *Bacillus* sp. GHA1 ..... ۹۵
شکل ۳-۲۱. تاثیر pH روی فعالیت آلفا-آمیلاز حاصل از *Bacillus* sp. GHA1 ..... ۹۷
شکل ۳-۲۲. تاثیر pH روی پایداری سینتیکی آنزیم حاصل از *Bacillus* sp. GHA1 ..... ۹۹
شکل ۳-۲۳. بررسی پایداری حرارتی آلفا-آمیلاز استخراج شده از باکتری *Bacillus* sp. GHA1 در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و بعد از ۳۰ دقیقه انکوباسیون..... ۱۰۰
شکل ۳-۲۴. نمودار (a) مزبوط به منحنی میکاییلیس- منتن فعالیت آمیلازی در غلظت‌های مختلف نشاسته و نمودار (b) منحنی لاین ویور- برک برای بدست آوردن پارامترهای سینتیکی را نشان می‌دهد . ۱۰۱
شکل ۳-۲۵. نمودار فعالیت آلفا-آمیلاز حاصل از باکتری Bacillus Sp. GHA1 روی سوبسترای EPS... ۱۰۳
جدول ۱-۱. چهار قطعه بسیار حفاظت شده در توالی آنزیم‌های خانواده آلفا-آمیلاز..... ۱۷
جدول۱-۲. فعالیت جهش یافته‌های آلفا-آمیلاز باسیلوسی که در باقیمانده‌های کاتالیتیک آن‌ها جهش رخ داده‌است ۱۹
جدول ۲-۱. تهیه استانداردهای پروتئینی به منظور رسم منحنی استاندارد ۴۸
جدول ۲-۲. تعیین غلظت نمونه‌های مجهول ۴۹
جدول ۲-۳. استانداردهای وزن مولکولی ۵۲
.جدول ۲-۴. تهیه مخلوط واکنش با استفاده از رقت‌های مختلف سوبسترای EPS... ..... ۵۹
جدول ۲-۵. غلظت و حجم‌های بهینه شده واکنش‌گرهای PCR ژن 16s rRNA درحجم نهایی ۱۵۰ میکرولیتر ۶۱
جدول ۳-۱. اثر درصدهای مختلف نمک سولفات آمونیوم بر روند خالص سازی آنزیم آلفا-آمیلاز با استفاده از ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت با فعالیت ۱/۱ U/ml ۷۷
جدول ۳-۲. مراحل تخلیص آنزیم آلفا-آمیلاز مربوط به باکتری *Bacillus* sp. GHA1 ..... ۹۴
جدول ۳-۳. مقایسه وزن مولکولی و پارامترهای سینتیکی آلفا-آمیلاز حاصل از *Bacillus* sp. GHA1 با آلفا-آمیلازهای جدا شده از برخی گونه‌های باسیلوس..... ۱۰۲

فصل اول

مقدمه

۱-۱ تولید انرژی در موجودات زنده

مسیر گلیکولیز و چرخه اسید سیتریک فرآیند های مهم و عمده تولید انرژی از گلوکز در سلول می‌باشند. این مسیرها در بین ارگانیسم‌های مختلف تنوع فراوانی را نشان می‌دهند. وجود این مسیرها در بین موجودات مختلف نشان می‌دهد که گلوکز یک منبع مهم و اصلی انرژی می‌باشد. گلوکز در طبیعت به مقدار فراوان، عمدتا در حالت پلی‌مری یافت می‌شود و موجوداتی که قادر به هضم پلی‌مرهای گلوکزی هستند مقادیر فراوانی از گلوکز را در اختیار دارند. تنوع فراوانی که در آنزیم‌های هیدرولیز کننده پلی‌مرهای گلوکزی یافت می‌شود نشان از اهمیت این پلی‌مرها در حیات است. از بین پلی‌مرهای گلوکزی، نشاسته فراهم کننده عمده گلوکز مصرفی موجودات زنده می‌باشد زیرا اکثر موجودات قادر به هضم سلولز، به عنوان فراوانترین ماده آلی در طبیعت، نمی‌باشند. بنابراین آنزیم‌های تجزیه کننده نشاسته[1] از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده و می‌توان انتظار داشت که گستردگی زیادی در بین تمامی رده‌های حیات داشته باشند. در هنگام تجزیه کامل نشاسته به گلوکز توسط این آنزیم‌ها، آلفا آمیلازها با تبدیل نشاسته به دکسترین‌های کوچک‌تر، موجب حلالیت نشاسته می‌گردند و به همین دلیل دارای اهمیت ویژه‌ای هستند (Nielsen, *et al.*, 2000).

۱-۲ نشاسته

نشاسته در طی فرآیند فتوسنتز در پلاستیدهای برگ به عنوان یک ترکیب ذخیره‌ای برای تنفس، در خلال تاریکی ساخته می‌شود. نشاسته همچنین در آمیلوپلاست‌های موجود در دانه‌ها و ریشه به عنوان یک منبع ذخیره‌ای طولانی مدت، ساخته می‌شود. درآمیلوپلاست‌ها مقادیر عظیم نشاسته به صورت دانه‌های نامحلول در آب تجمع می یابد و شکل و قطر این دانه‌ها به نوع گیاه بستگی دارد.

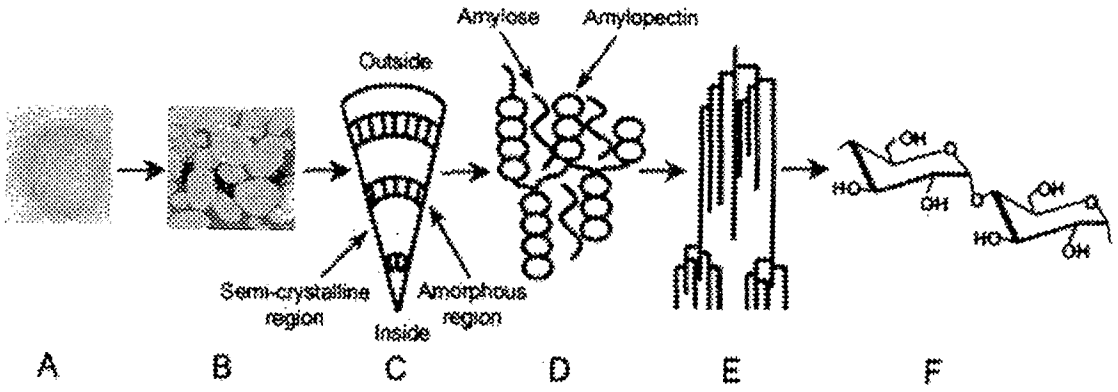
1. Starch hydrolyzing enzymes

نشاسته، پلی‌مری از واحدهای گلوکز بوده که از طریق اکسیژن روی کربن شماره ۱، بهم متصل هستند. این اتصال پیوند گلیکوزیدی نامیده می‌شود. این پیوند در pH های پایین هیدرولیز می‌شود. در انتهای زنجیره پلی‌مری، یک گروه آلدهیدی پنهان وجود دارد. این گروه، انتهای احیاکننده نامیده می‌شود. دو نوع پلی‌مر گلوکزی آمیلوز و آمیلوپکتین در نشاسته وجود دارد. آمیلوز پلی‌مری متشکل از ۱۰۰۰ تا ۶۰۰۰ واحد گلوکز با پیوندهای آلفا ۱و۴ می‌باشد. تعداد واحدهای گلوکز با درجه پلی‌مریزاسیون[1] (DP) نشان داده می‌شود که به منشاء نشاسته بستگی دارد. آمیلوز مربوط به سیب‌زمینی دارای مقدار DP برابر با ۶۰۰۰-۱۰۰۰ بوده در حالی‌که آمیلوز غلات و ذرت، DP بین ۲۰۰ و ۱۲۰۰ دارد. میانگین محتوی آمیلوز در نشاسته‌ها بین ۰ تا ۷۵ درصد می‌باشد، اما رقم تیپیک آن ۲۰ تا ۲۵ درصد است. آمیلوپکتین شامل زنجیره‌های خطی کوتاه با اتصالات آلفا ۱و۴ بوده که از ۱۰ تا ۶۰ واحد گلوکز و زنجیره‌های جانبی با اتصال آلفا ۱و۶ ، با ۱۵ تا ۴۵ واحد گلوکز می باشد به طوری‌که میانگین نقاط شاخه در آن ۵ درصد است (Buleon, *et al.*, 1998).

دانه‌های نشاسته به نواحی بی‌شکل و نواحی کریستالی سازمان یافته‌اند (شکل۱-۱). در نشاسته‌های ریشه، ناحیه کریستالی تنها دارای آمیلوپکتین می باشد در حالی‌که آمیلوز در ناحیه بی شکل وجود دارد. در نشاسته‌های غلات هم آمیلوپکتین جزء اصلی ناحیه کریستالی می‌باشد. آمیلوز در نشاسته‌های غلات با لیپیدها کمپلکس داده که تشکیل ساختارهای کریستالی ضعیف داده و دانه را تقویت می‌کنند.

برای استخراج نشاسته از منابع گیاهی، مخلوط آبکی نشاسته حرارت داده می‌شود و دانه‌ها در ابتدا تا نقطه‌ای که در آن تورم برگشت ناپذیر می‌شود، متورم می‌شوند. این فرآیند ژلاتینی شدن نامیده می‌شود. در طی این فرآیند، آمیلوز از دانه نشاسته رها می شود و سبب افزایش ویسکوزیته مخلوط آبکی می‌گردد. افزایش بیشتر در حرارت منجر به افزایش تورم دانه‌ها و افزایش بیشتر ویسکوزیته می‌شود. سرانجام دانه نشاسته باز شده و یک محلول کلوئیدی حاصل می‌شود و سرد کردن محلول کلوئیدی سبب تشکیل یک ژل انعطاف پذیر می‌گردد (Van der Maarel, *et al.*, 2002).

1. Degree of polymerization



شکل ۱-۱. نحوه سازمان‌بندی نشاسته سیب‌زمینی. **A**: تکه سیب‌زمینی، **B**: تصویر میکروسکوپی الکترونی از دانه‌های نشاسته، **C**: تکه‌ای از یک دانه نشاسته که نواحی نیمه کریستالی و بی‌شکل را نشان می‌دهد، **D**: جزییات ناحیه نیمه کریستالی، **E**: سازمان‌بندی مولکول‌های آمیلوپکتین به ساختمان‌های درخت مانند و **F**: دو مولکول گلوکز که با یک اتصال آلفا ۱-۴ به همدیگر متصل هستند (**Van der Maarel, *et al.*, 2002**).

۱-۳ استفاده‌های صنعتی نشاسته

محصولات کشاورزی حاوی نشاسته بخش مهمی از رژیم غذایی انسان را تشکیل می‌دهند. علاوه بر استفاده مستقیم از قسمت‌های حاوی نشاسته گیاهی به عنوان منبع غذایی، نشاسته پس از برداشت از گیاه، به همان صورت یا پس از تغییرات شیمیایی یا آنزیمی برای تبدیل به محصولات مختلف مورد استفاده قرار می گیرد. با وجود آن‌که تعداد زیادی از گیاهان قادر به تولید نشاسته می‌باشند، تنها تعداد کمی از آن‌ها در فرآیندهای صنعتی مورد استفاده قرار می‌گیرند. منابع صنعتی نشاسته به طور عمده ذرت، سیب‌زمینی، گندم، برنج و .... هستند. حدود ۶۰ تا ۷۰ ٪ از وزن خشک ذرت، گندم و سایر محصولات کشاورزی از نشاسته تشکیل شده است (Van der Maarel, *et al.*, 2002). در ادامه برخی از مهمترین کاربردهای صنعتی نشاسته آورده شده است.

۱-۳-۱ تولید اتانول

تولید صنعتی اتانول با استفاده از ترکیبات نشاسته‌ای مختلف از ذرت، گندم، سیب‌زمینی و ... گزارش شده است. اغلب مخمرها قادر به تخمیر مستقیم نشاسته گیاهان نمی‌باشند. برای تبدیل نشاسته به اتانول ابتدا

باید نشاسته به قندهای ساده هیدرولیز گردد. این عمل با خیساندن، پختن و ژلاتینه نمودن نشاسته و سپس هضم آنزیمی آن صورت می‌گیرد (Nigam, *et al.*, 1994).

۱-۳-۲ شیرین کننده‌ها و شربت‌ها

بازار اصلی نشاسته هیدرولیز شده به منظور تبدیل آن به شربت با درصد بالای فروکتوز[1] (HFCS) می‌باشد. از این شربت به جای شربت ساکارز در غذاها و نوشیدنی‌ها می‌توان استفاده نمود. فرآیند تبدیل نشاسته به قندهای شیرین در آزمایشگاه یک شیمی‌دان روسی در حدود ۱۸۵ سال پیش آغاز شد و تا به امروز رشد و توسعه بسیار چشم‌گیری داشته است. اولین پیشرفت عمده در این فن‌آوری، که به فن‌آوری نشاسته معروف است، در سال ۱۹۴۶ زمانی‌که دیت[2] و لانگویز[3] استفاده از آنزیم‌های تجاری و در دسترس و نشاسته هیدرولیز شده در تولید شربت‌های ذرت و خصوصیات منحصر به فرد آن‌ها را اختراع کردند، حاصل شد.

کشف، جداسازی و کاربرد آنزیم‌های مختلف هیدرولیز کننده کربوهیدرات‌ها موجب توسعه و بهبود شربت‌های ذرت جدید شده است. با استفاده از ترکیبی از این آنزیم‌ها می‌توان شربت‌های بسیار متنوع که از لحاظ ترکیبات شیرین‌کننده و در نتیجه خواص آن‌ها بسیار متفاوتند تولید نمود (Van der Maarel, *et al.*, 2002 و Nigam, *et al.*, 1994).

۱-۳-۳ تولید استون و بوتانول

این عمل از طریق فرآیند وایزمن[4] و استفاده از نشاسته به عنوان سوبسترا صورت می‌گیرد. برای انجام این فرآیند به باکتری *C. acetobutylicum* نیاز است که با فعالیت‌های آنزیمی آمیلولیتیک و ساکارولیتیک خود هیدرولیز نشاسته به مالتوز و گلوکز را امکان‌پذیر می‌سازد (Nigam, *et al.*, 1994).

1. High fructose corn syrups
2. Date
3. Langois
4. Weizmann

۱-۳-۴ تولید اسیدلاکتیک

مالتوز و دکستروز حاصل از هیدرولیز نشاسته ذرت به منظور تولید اسید لاکتیک و از طریق تخمیر در مقیاس صنعتی مورد استفاده قرار می‌گیرند. تخمیر اسید لاکتیکی مواد نشاسته ای به کمک *Lactobacillus. thermophillus* و *L. amylophillus* گزارش شده است (Nigam, *et al.*, 1994).

۱-۳-۵ بیومس[1] میکروبی

مواد و ضایعات نشاسته‌ای به عنوان یک منبع قابل بازیافت در تولید بیومس به شمار می‌آیند. گرچه بعضی از باکتری‌ها قادر به استفاده از نشاسته می‌باشند، اما در بیشتر موارد ترکیبات حاوی نشاسته ابتدا از طریق آنزیمی یا ترکیبی از آنزیم و اسید هیدرولیز شده و سپس مورد استفاده قرار می‌گیرند (Nigam, *et al.*, 1994).

۱-۴ آنزیم‌های موثر بر نشاسته[2]

شماری از آنزیم‌ها در سنتز نشاسته دخالت دارند. ساکارز با تبدیل به ADP -گلوکز که یک مولکول شروع کننده برای سنتز نشاسته می‌باشد، نقطه آغاز سنتز نشاسته به شمار می‌آید. بعدا آنزیم‌هایی مانند نشاسته سنتاز محلول و آنزیم شاخه‌ساز، مولکول‌های آمیلوز و آمیلوپکتین را سنتز می‌کنند. در باکتری‌ها مولکول هم ارز آمیلوپکتین، گلیکوژن می‌باشد که شباهت ساختاری فراوانی با آمیلوپکتین دارد و تفاوت اصلی آن در زنجیره‌های جانبی می‌باشد که در گلیکوژن آن‌ها کوتاه‌تر بوده ولی تعداد آن‌ها حدودا دو برابر می‌باشد (Van der Maarel, *et al.*, 2002).

چهار گروه آنزیمی موثر بر نشاسته وجود دارد: ۱- اندوآمیلازها ۲- اگزوآمیلازها ۳- آنزیم‌های شاخه‌شکن و ۴- ترانسفرازها.

---

1. Biomass
2. Starch converting enzymes

۱-۴-۱ اندوآمیلازها[1]

اندوآمیلازها قادر به شکستن پیوندهای گلیکوزیدی آلفا ۱و۴ موجود در قسمت داخلی زنجیر آمیلوز یا آمیلوپکتین هستند. آلفا آمیلاز (EC 3.2.1.1) یک اندوآمیلاز کاملاً شناخته شده است. محصول نهایی اثر آلفا آمیلاز، اولیگوساکاریدهای با طول متفاوت با کنفیگوراسیون آلفا و دکسترین محدود آلفا[2] می‌باشد که از اولیگوساکاریدهای شاخه‌دار تشکیل شده است (Bertoldo, *et al.*, 2001 و Van der Maarel, *et al.*, 2002).

۱-۴-۲ اگزوآمیلازها[3]

اگزوآمیلازهایی مانند بتاآمیلاز (EC 3.2.1.2) منحصرا پیوندهای گلیکوزیدی آلفا ۱و۴ را هیدرولیز می‌کنند. در حالی‌که آمیلوگلیکوزیدازها یا گلوکوآمیلاز (EC 3.2.1.3) و آلفا گلیکوزیداز (EC 3.2.1.20) هردو پیوند آلفا ۱و۴ و آلفا ۱و۶ را هیدرولیز می‌کنند. اگزو آمیلازها بر باقیمانده خارجی گلوکز آمیلوز و آمیلوپکتین اثر کرده و بنابراین یا مانند گلوکوآمیلاز و آلفا گلوکوزیداز تنها گلوکز را آزاد کرده و یا مانند بتا-آمیلاز، مالتوز و دکسترین محدود آلفا تولید می‌کنند. همچنین کنفیگوراسیون آنومری مالتوز آزاد شده را از آلفا به بتا تبدیل می‌کنند. گلوکوآمیلاز و آلفا گلوکوزیداز در ارجحیت سوبسترایی[4] خود تفاوت دارند: آلفا گلوکوزیداز بیشتر بر روی مالتواولیگوساکاریدهای کوتاه اثر کرده و گلوکز با کنفیگوراسیون آلفا را نتیجه می‌دهد. در حالی‌که گلوکوآمیلاز، پلی‌ساکاریدهای زنجیر بلند را هیدرولیز می‌کند.

از دیگر آنزیم‌های آمیلولیتیک اگزو می‌توان به سیکلودکسترین گلیکوزیل ترانسفراز (EC 3.2.1.19)، آنزیمی که دارای یک فعالیت ترانس گلیکوزیلاسیون اضافی می‌باشد، مالتوژنیک آلفا آمیلاز (گلوکان ۱و۴ آلفا گلوکان هیدرولاز EC 3.2.1.133)، آنزیمی از *Bacillus stearothermophilus* که مالتوز آزاد می‌کند، آمیلاز تشکیل دهنده مالتواولیگوساکارید نظیر آنزیم تشکیل دهنده مالتوتتروز (EC 3.2.1.60

1. Endoamylases
2. α-limit dextrin
3. Exoamylases
4. Substrate preference