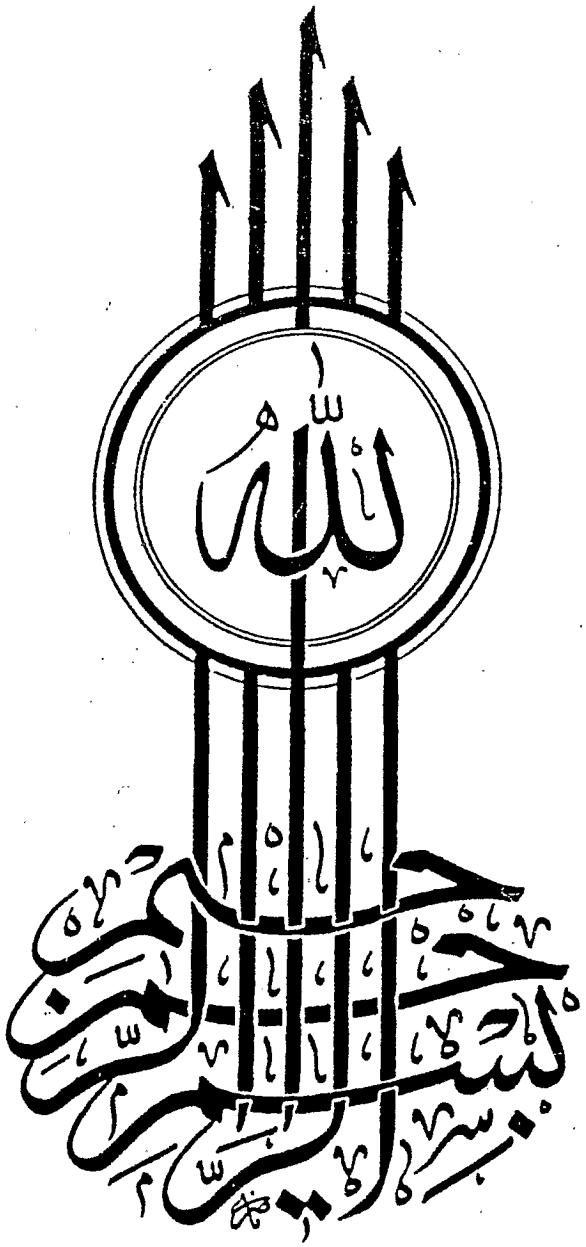

١٠٢٩٢٤

دانشگاه پیام نور – کتابخانه مرکزی
بخش نشریات
QD
۴۲۵
۸۴/۱۴۴۱

دانشگاه پیام نور

دانشکده: علوم پایه

گروه: زیست شناسی(بیوشیمی)

عنوان پایان نامه (رساله)

تعیین و بررسی خصوصیات بیوشیمیایی آلفا آمیلاز و پولولاناز باکتری Bacillus-sp-GSH

پایان نامه (یا رساله):
برای دریافت درجه کارشناسی ارشد (یا دکتری)
در رشته بیوشیمی

۱۳۸۷/۲/۱۱

مولف
مریم اخوان سپهی

استاد راهنما
آقای دکتر ناصرقائمی
آقای دکتر رضاحاج حسینی

ماه و سال انتشار

۱۳۸۴/۱۱

۱۰۲۹۲۲

دانشگاه پیام نور

دانشکده: علوم پایه

گروه: زیست شناسی

عنوان پایان نامه (رساله)

تعیین و بررسی خصوصیات بیوشیمیایی آلفا آمیلاز و پولولاناز باکتری Bacillus-sp-GSH

پایان نامه (یا رساله) :

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد (یا دکتری)

در رشته بیوشیمی

مولف

مریم اخوان سپهی

استاد راهنما

آقای دکتر ناصرقائمی

آقای دکتر رضاحاج حسینی

ماه و سال انتشار

۱۳۸۴/۱۱

دانشگاه پیام نور

تصویب نامه

پایان نامه تحت عنوان

تهیه و تعیین مشخصات (بیوشیمیایی) آنزیمهای آمیلازی و پلولانازی حاصل از سویه های جدیداً جداشده باسیلوس spp

تاریخ دفاع :84/11/12 نمره : ۱۹/- تام درجه ارزشیابی : عالی

اعضای هیات داوران :

نام و نام خانوادگی	هیات داوران	مرتبه علمی	امضاء
1- آقای دکتر قائمی	استاد راهنما		
2- آقای دکترحاج حسینی	استاد راهنمای همکار		
3- آقای دکتر لامع راد	استادداور خارجی		
4- خانم دکتر منفرد	استادداور داخلی		
5- آقای دکتر مقدسی نماینده گروه			

تقدیم به

تقدیم به پدرم که تمام وجودم از اوست
تقدیم به مادرم که تمام امید زندگی ام است
تقدیم به دو برادرم محسن و عباس که همیشه همفکر و همراه من هستند
تقدیم به خواهرم فاطمه که همواره مشوق من در زندگی بوده است

اکنون که درسایه لطف ایزد متعال، مراحل عملی، تألیف و نگارش این رساله به پایان رسیده است، لازم می دانم از تمامی عزیزانی که اینجانب را در راه پیشبرد اهداف پایان نامه یاری نموده‌اند، صمیمانه قدردانی و تشکر کنم.

از جناب آقای دکتر قائمی، استاد ارزشمند و فرزانه که با کشاده روئی راهنمائی مرا پذیرفته و در تمام جهات بی دریغ راهنمای راه من بودند تا به نحو مطلوب زحمات و مساعی این جناب به مرحله عمل برسد، نهایت سپاسگزاری را دارم.

از جناب آقای دکتر حاج حسینی، که علی‌رغم مشغله کاری فراوان، راهنمایی این رساله را تقبل نمودند و صمیمانه سپاسگزاری می‌کنم.

از جناب آقای دکتر لامع راد به جهت داوری دراین رساله، صمیمانه قدردانی‌می‌کنم.

از سرکار خانم دکتر منفرد به جهت داوری، راهنمایی کمال تشکر را دارم.

از جناب آقای دکتر قاضی هیات علمی محترم گروه فارماکولوژی دانشگاه تهران که ضمن حق استادی برگردن اینجانب، مشوق بزرگ اینجانب برای ادامه تحصیل بوده اند، تشکر و قدردانی می نمایم.

از سرکار خانم ها حمیدی و سیدین که همانند یک خواهر دلسوز از هرگونه کمک برای این جانب دریغ ننموده اند تشکر و قدر دانی می شود.

از سرکار خانم عسگری که در امور تایپ و تنظیم پایان نامه ، مرا یاری نموده اند، تشکر فراوان دارم.

فهرست

عنوان صفحه

چکیده..... ۱
۱-۱ آنزیمها چیست؟..... ۲
۱-۲ خصوصیات کلی آنزیمها..... ۳
۱-۲-۱ سرعت واکنشهای آنزیمی ۳
۱-۲-۱-۱عوامل عمده تسریع واکنشها توسط آنزیمها..... ۳
۱-۲-۱-۲ عوامل موثر بر سرعت واکنش آنزیمی..... ۴
۱-۲-۱-۲-۱ اثر pH بر سرعت واکنشهای آنزیم..... ۴
۱-۲-۱-۲-۲ اثر دما بر واکنشهای آنزیمی..... ۵
۱-۲-۲ شرایط واکنشهای آنزیمی ملایم تر است..... ۵
۱-۲-۳ آنزیم ها نسبت به واکنش هایی که کاتالیز می کنند ویژگی بیشتری دارند..... ۵
۱-۲-۴ آنزیم ها قابلیت تنظیم دارند..... ۵
۱-۲-۵آنزیم ها تنها باعث تغییر در سرعت واکنش می شوند و بر روی تعادل واکنش اثری ندارند..... ۶
۱-۲-۶آنزیم ها با تسهیل تشکیل حالت گذار سرعت واکنش ها را افزایش می دهند..... ۶
۱-۳نامگذاری و طبقه بندی آنزیم ها..... ۶
۱-۴اولین مرحله در کاتالیز آنزیمی تشکیل کمپلکس آنزیم- سوبسترا است..... ۸
۱-۴-۱ ویژگی فوق العاده آنزیم ها نسبت به سوبسترا..... ۸
۱-۴-۲جایگاه فعال آنزیم چیست؟..... ۸
۱-۴-۳محل انتقال در جایگاه فعال..... ۱۰
۱-۵ساختار پروتئینی آنزیمها..... ۱۱
۱-۵-۱ساختار اول..... ۱۱
۱-۵-۲ساختار دوم..... ۱۲
۱-۵-۳ساختار سوم..... ۱۲
۱-۵-۴ساختار چهارم..... ۱۳
۱-۶ منابع آنزیمها..... ۱۳
۱-۷مکان آنزیم..... ۱۴
۱-۸آنزیم های میکروبی..... ۱۴

۱-۹تخلیص..... ۱۶
۱-۹-۱جداسازی آنزیم..... ۱۶
۱-۹-۲تخلیص آنزیمها..... ۱۸
۱-۹-۲-۱ جز به جز کردن..... ۱۹
۱-۱۰ کاربرد آنزیمها درصنعت..... ۲۰
۱-۱۱ آنزیمهای آمیلولیتیک..... ۲۱
۱-۱۱-۱دسته بندی انواع آنزیم های آمیکولیتیک..... ۲۱
۱-۱۱-۲ ساختار مولکولی آلفا آمیلاز:..... ۲۳
۱-۱۱-۲-۱ دومین های آلفا آمیلاز:..... ۲۳
۱-۱۱-۲-۲ جایگاه فعال آلفا آمیلازها:..... ۲۴
۱-۱۱-۲-۳ یون کلسیم:..... ۲۴
۱-۱۱-۳ وزن مولکولی آلفا آمیلازها:..... ۲۵
۱-۱۱-۴ مکانیسم مولکولی فعالیت آنزیمی آلفا آمیلاز:..... ۲۵
۱-۱۱-۵ توالی آمینواسیدی و نواحی حفظ شده α آمیلازها:..... ۲۶
۱-۱۲-۱ تولید آلفا آمیلاز در موجودات مختلف:..... ۲۸
۱-۱۲-۲ تولید آلفا آمیلازهای مقاوم به دما..... ۳۰
۱-۱۲-۳ تولیدآلفا آمیلازهای مقاوم به قلیا..... ۳۰
۱-۱۳ پایداری قلیایی آلفا آمیلازها:..... ۳۱
۱-۱۴ استفاده از آلفا آمیلازها در صنعت:..... ۳۱
۱-۱۴-۱ صنایع تولید گلوکز و فروکتوز از نشاسته:..... ۳۲
۱-۱۴-۲ صنایع پخت نان:..... ۳۳
۱-۱۴-۳ تولید سیکلودکسترین/ سیکلو آمیلاز:..... ۳۳
۱-۱۴-۴ صنایع نساجی:..... ۳۴
۵-۱۴-۵ صنایع کاغذ سازی:..... ۳۴
۱-۱۴-۶ صنایع شوینده:..... ۳۵
۱-۱۵ پولولان..... ۳۵
۱-۱۵-۱ انواع اتصالات پولولان..... ۳۵
۱-۱۵-۲ خصوصیات پولولان..... ۳۶
۱-۱۵-۳ کاربرد پولولان..... ۳۶
۱-۱۵-۴ انواع آنزیمهای پولولیتیک..... ۳۶
۱-۱۵-۵ نقش پولولاناز در شکستن نشاسته..... ۳۸
۱-۱۵-۶ نقش پولولاناز در شوینده ها..... ۴۰
۲-۱ مواد ۴۱

۲-۱-۱ میکروارگانیسم های مورد استفاده..... ۴۱
۲-۱-۲ محیط های کشت برای تولید آنزیم ها ۴۱
۲-۱-۲-۱محیط کشت برای تولید آلفا آمیلاز..... ۴۱
۲-۱-۲-۲ محیط کشت برای تولید آنزیم پولولاناز ۴۲
۲-۱-۳ مواد لازم جهت سنجش آنزیمی با استفاده Dinitrosalicylic acid DNS..... ۴۲
۲-۱-۴ محلولها و بافرهای لازم جهت تعیینpH اپتیمم..... ۴۳
۲-۱-۵ منابع کربن استفاده شده..... ۴۴
۲-۱-۶ مواد و وسایل مرحله تغلیظ..... ۴۴
۲-۱-۷ وسایل ۴۵
۲-۲-۸ کشت باکتری Basillus sp-GSH..... ۴۶
۲-۲-۲ تغلیظ آنزیمهای آمیلاز و پولولاناز خارج سلولی موجود در محیط کشت باکتری به روش رسوب دهی با آمونیوم سولفات..... ۴۶
۲-۲-۳ روش دیالیز..... ۴۷
۲-۲-۴ روشهای مربوط به سنجش آنزیمی..... ۴۸
۲-۲-۴-۱ روش تهیه معرف DNS دی نیترو سالیسیلیک اسید..... ۴۸
۲-۲-۴-۱ روش استفاده از معرفDNS..... ۴۸
۲-۲-۵تهیه محلول سوبستراها..... ۴۹
۲-۲-۵-۱ محلول سوبسترای نشاسته..... ۴۹
۲-۲-۵-۳ محلول سوبسترای پولولان..... ۴۹
۲-۲-۶ اندازه گیری میزان فعالیت آنزیمها..... ۴۹
۲-۲-۶-۱ رسم منحنی استاندارد گلوکز..... ۴۹
۲-۲-۶-۲ اندازه گیری میزان فعالیت آلفاآمیلاز..... ۴۹
۲-۲-۶-۳ اندازه گیری میزان فعالیت پولولاناز..... ۵۰
۲-۲-۷ بررسی ویژگیهای کینتیکی آنزیم آلفاآمیلاز..... ۵۰
۲-۲-۷-۱ بررسی میزان فعالیت آنزیم در طول زمان..... ۵۰
۲-۲-۷-۲ بررسی میزان فعالیت آنزیم در دماهای مختلف:..... ۵۰
۲-۲-۷-۳ بررسی میزان فعالیت آنزیم در pHهای مختلف: ۵۰
۲-۲-۷-۴ بررسی پایداری آنزیم در طول زمان نگهداری در دمای^{0}C ۴..... ۵۱
۲-۲-۷-۵ بررسی پایداری حرارتی..... ۵۱
۲-۲-۷-۶ بررسی اثر منابع مختلف کربن بر میزان فعالیت آنزیم:..... ۵۱
۲-۲-۷-۷ بررسی اثر EDTA بر میزان فعالیت آنزیم ۵۱
۲-۲-۷-۸ بررسی اثر Ca^{+2} بر میزان فعالیت آنزیم ۵۱
۲-۲-۸ بررسی ویژگیهای کینتیکی آنزیم پولولاناز..... ۵۲

۲-۲-۸-۱ بررسی میزان فعالیت آنزیم در طول زمان :..... ۵۲
۲-۲-۸-۲ بررسی میزان فعالیت آنزیم در دماهای مختلف : ۵۲
۲-۲-۸-۳ بررسی میزان فعالیت آنزیم در pH های مختلف: ۵۲
۲-۲-۸-۴ بررسی پایداری آنزیم در طول زمان نگهداری در دمای ^{0}C ۴ ..... ۵۲
۳-۱ کشت باکتری *Bacillus Sp-GSH*..... ۵۳
۳-۲ آماده سازی نمونه آنزیمی..... ۵۳
۳-۳ بررسی ویژگیهای کینتیکی آنزیم آلفا آمیلاز..... ۵۳
۳-۳-۱ بررسی میزان فعالیت آنزیم طول زمان:..... ۵۳
۳-۳-۲ بررسی میزان فعالیت آنزیم در دماهای مختلف:..... ۵۳
۳-۳-۳ بررسی میزان فعالیت آنزیم در pHهای مختلف..... ۵۴
۳-۳-۴ بررسی پایداری فعالیت آنزیم در طول زمان نگهداری در دمای ^{0}C ۴..... ۵۴
۳-۳-۵ بررسی پایداری حرارتی آنزیم..... ۵۴
۳-۳-۶ بررسی اثر منابع مختلف کربن بر میزان فعالیت آنزیم ۵۴
۳-۳-۷ بررسی اثر EDTA برمیزان فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز ۵۴
۳-۳-۸بررسی اثر Ca^{+2} بر میزان فعالیت آنزیم..... ۵۵
۳-۴ بررسی ویژگیهای کنتیکی آنزیم پولولاناز..... ۵۵
۳-۴-۱ بررسی میزان فعالیت آنزیم در طول زمان:..... ۵۵
۳-۴-۲ بررسی میزان فعالیت آنزیم در دماهای مختلف ۵۵
۳-۴-۳ بررسی میزان فعالیت آنزیم در pH های مختلف..... ۵۵
۳-۴-۴ بررسی پایداری فعالیت آنزیم پولولاناز در طول زمان نگهداری در دمای ^{0}C ۴..... ۵۵
بحث: ۶۳
منابع: ۶۷

فهرست جداول

عنوان صفحه

جدول ۱-۱: طبقه بندی اصلی آنزیم ها..... ۷
جدول ۱-۲ :ترکیبات کمکی همراه در بافرهای استخراج..... ۱۸
جدول ۱-۳ : آنزیمهای خانواده آلفا آمیلاز که بر روی سوبستراهای حاوی گلوکز عمل می کنند ۲۲
جدول ۱-۴: میکروارگانیسم های تولید کننده آمیلازهای مختلف..... ۲۹
جدول ۱-۵ : کاربردهای مختلف آنزیم های خانواده آلفا آمیلاز در صنعت..... ۳۲
جدول ۲-۱ : مربوطه به مقدار سولفات آمونیوم ۴۷

فهرست اشکال

عنوان صفحه

شکل ۱-۱: برهم کنش فرضی سه نقطه ای بین آنزیم و سوبسترا..... ۹
شکل ۱-۲: انواع آنزیمهای آمیلولیتیک ۲۱
شکل ۱-۳: سازمان دهی دومینها در آلفا آمیلازها..... ۲۵
شکل۱-۴ : مکانیسم مولکولی فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز..... ۲۶
شکل ۱-۵: توالی آمینو اسیدی چهار ناحیه حفظ شده در آلفا آمیلازهای باکتریایی..... ۲۸
شکل ۱-۶: نمای کلی تبدیل نشاسته به شربت گلوکز، فروکتوز، سیکلودکسترین و مالتودکسترین در صنایع غذایی..... ۳۴
شکل ۲-۱: اسپکتروفتومتر CECIL..... ۴۵
شکل ۲-۲: سانتریفوژ ۴۶
شکل ۲-۳: کیسه دیالیز..... ۴۸
منحنی۳-۱: منحنی استاندارد گلوکز..... ۵۶
منحنی۳-۲ بررسی میزان فعالیت آلفا آمیلاز در طول زمان..... ۵۶
منحنی۳-۳ بررسی میزان فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در دماهای مختلف..... ۵۷
منحنی۳-۴ بررسی میزان فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در pH مختلف..... ۵۷
منحنی۳-۵ بررسی پایداری آنزیم آلفا آمیلاز..... ۵۸
منحنی۳-۶ بررسی پایداری حرارتی آنزیم آلفا آمیلاز..... ۵۸
منحنی۳-۷ بررسی اثر منابع مختلف کربن بر میزان فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز..... ۵۹
منحنی۳-۸ بررسی اثر غلظت های متفاوت مالتوز بر میزان فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز..... ۵۹
منحنی۳-۹ بررسی اثر غلظت های EDTA بر میزان فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز ۶۰
منحنی۳-۱۰ بررسی میزان فعالیت آنزیم پولولاناز در طول زمان..... ۶۱
منحنی۳-۱۱ بررسی میزان فعالیت آنزیم پولولاناز در دماهای مختلف..... ۶۱
منحنی۳-۱۲ بررسی میزان فعالیت آنزیم پولولاناز درpH مختلف..... ۶۲
منحنی۳-۱۳ بررسی پایداری فعالیت آنزیم پولولاناز در طول زمان نگهداری در دمای ^{0}C ۴...۶۲

چکیده:

استفاده از آمیلازها در صنایع متفاوت : غذایی، دارویی، نساجی ، شوینده ها مورد توجه قرار گرفته است. باسیلها مانند باسیلوس سوبتیلیس، لیکینوفرمیس باسیلوس استئارترموفیلوس برای تولید آلفا آمیلاز در دمای خارج سلولی مور استفاده قرار گرفته است. دراین تحقیق از یک سویه بومی جدا شده باسیلوس Sp-GSH برای تولید آلفا آمیلاز مقاوم به حرارت و فعال در pH های اسیدی و قلیایی و پولولاناز فعال در محیط اسیدی استفاده شد. محیط کشت برای تولید آنزیمهای فوق تهیه گردید. سویه فوق در محیط کشت حاوی(TSB ۱/۵ درصد ، soyabean ۰/۵ درصد،starch ۰/۵ درصد،NaCl ۰/۵ درصد،Na_2Co_3 ۰/۵ درصد، $CaCl_2$ ۰/۵درصد) در pH ۹/۵ و دمای ^0C ۳۷ بعد از ۴۸ ساعت تولید اپتیمم آلفا آمیلاز و در همان محیط بدون$CaCl_2$ با pH =۵ و دمای ^0C ۳۷ بعد از ۴۸ ساعت تولید اپتیمم پولولاناز را دارد. سلولها به وسیله سانتریفوژ جدا می شوند. سولفات آمونیوم ۸۰٪ اضافه می گردد. سپس به خاطر خروج سولفات آمونیوم دیالیز می شود. فعالیت آلفا آمیلازی با استفاده از محلول نشاسته ۱٪ در pH=۷ و در دمای ^0C ۷۰ به مدت ۱۲ دقیقه انجام می پذیرد. فعالیت پولولانازی با استفاده از محلول پولولاناز در pH=۵ و در دمای ^0C ۶۰ به مدت ۳۰ دقیقه انجام می پذیرد.

قندهای احیا کنند ه حاصل از فعالیت آنزیمها با استفاده از مصرف اندازه گیری می شود. آلفا آمیلاز در دمای ^0C ۸۰ و pH بین ۵ تا ۹ اپتیمم فعالیت را دارد، در pH =۱۰ نیز حتی ۵۰٪ از فعالیت آنزیم مشاهده می شود. و پولولاناز در pH ۵ تا ۶ و دمای^0C ۶۰ اپتیمم فعالیت را دارد اثر چهار منبع مختلف کربن(نشاسته ، نشاسته هیدرولیز شده ، گلوکز، مالتوز) بر فعالیت آلفا آمیلاز بررسی شد که مالتوز بیشترین اثر را بر میزان تولید آمیلاز می دهد و در غلظتهای مختلف مالتوز مالتوز ۴٪ بیشترین اثر را بر تولید آنزیم دارد و اثر دو منبع کربن نشاسته ومالتوز بر پولولاناز بررسی شد که مالتوز اثر بیشتری برمیزان تولید پولولاناز داشت مطالعه پایداری آنزیم در برابر دما نشان می دهد آنزیم خالص در دمای ^0C ۸۰ ، ۸۰٪ فعالیت و زمان ۱۰۰ دقیقه ودر دمای ^0C ۹۰ ،۱۰٪ از فعالیت را در زمان ۴۰ دقیقه حفظ می کند. فعالیت آمیلازی به طور جزئی توسط EDTA مهارمی گردد و $CaCl_2$ تاثیر چندانی بر فعالیت آمیلازی ندارد.

مقدمه

(۱-۱) آنزیمها چیست؟

موجودات زنده به واسطه وقوع انواع گوناگون واکنش های بیوشیمیایی توانایی ادامه حیات را کسب نموده اند. تقریبا تمامی این واکنش ها به وسیله گروهی از مواد حیاتی موسوم به آنزیمها انجام می شوند. آنزیمها کاتالیزورهای زیستی هستند. آنزیمولوژی دانش مطالعه آنزیمها است و قدمتی برابر با اولین روزهای ظهور دانش بیوشیمی دارد. این علم از اوایل قرن نوزدهم در جریان توجه به فرایندهای تخمیری و هضم پا به عرصه وجود نهاد. در آغاز با مشاهده انجام نشدن واکنشهای بیوشیمیایی در آزمایشگاه لوئی پاستور و سایر دانشمندان تصور نمودند که سیستم های زنده تحت تاثیر نیروی حیاتی هستند که به آنها اجازه عدول از قوانین طبیعی حاکم بر مواد بی جان را می دهد. برخی محققین از جمله Justs von leibig پیشنهاد نمودند که فرایندهای حیاتی تحت تاثیر موادی شیمیایی که در ابتدا فرمانت خوانده می شدند انجام می شوند. در واقع کلمه آنزیم از لغت یونانی en به معنای در و zyme به معنای مخمر در سال ۱۸۷۸ و به منظور تاکید بر وجود عاملی در مخمر، غیر از خود مخمر که فرایند تخمیر را انجام می داد اقتباس گردید. بعدها Edward Buchner نشان داد که شیره عاری از سلولهای مخمر می تواند سنتز اتانل از گلوکز را انجام دهد.(7)

در حال حاضر می توان به خوبی تمایز واکنشهای آنزیمی و تخمیری را بررسی نمود واکنشهای آنزیمی نیاز مبرم به حضور موجود زنده ندارند و با استفاده از آنزیم استخراج شده می توان واکنش را هدایت نمود لیکن در واکنشهای تخمیری وجود میکروارگانیسم زنده ضروری است. آنزیمها در واقع کاتالیزورهای زیست شناختی با ماهیت پروتئینی هستند و توسط موجودات زنده حیوان و گیاه و میکروارگانیسم تولید می شوند. انجام تمامی واکنشها در سلول زنده به آنزیم خاصی نیازمند است. نقش عمده آنزیمها در موجودات زنده، کاتالیزور واکنشهای تجزیه و ترکیب است. آنزیمها موجب افزایش سرعت واکنشهای زیست شیمیایی می شوند و در معرض تغییرات فیزیکی و شیمیایی قرار می گیرند. با این وجود کاتالیز به طور مطلق در انحصار پروتئین ها نیست. کشف مولکولهای RNA واجد فعالیت کاتالیزی شاهدی بر نقش RNA به عنوان یک بیوکاتالیزور اولیه می باشد. پروتئین ها به عنوان گروهی از ماکرومولکول ها بسیاری از واکنشهای شیمیایی را به طور موثری کاتالیز می نمایند. آنها توانایی اتصال ویژه به تعداد متنوعی از مولکول ها را دارند، پروتئین ها مولکول های سوبسترا را با نیروهای مختلف بین

مولکولی به یکدیگر نزدیک می کنند تا با قرار گرفتن در جهت گیری مناسب بعضی از پیوندهای شیمیایی شکسته یا تشکیل شوند.(9)

(۱-۲) خصوصیات کلی آنزیمها

به طور کلی آنزیمها تابع همان قوانین حاکم بر رفتار سایر مواد هستند به علاوه آنزیمها در مقایسه با کاتالیزورهای شیمیایی دارای ویژگیهای اختصاصی می باشند که در اینجا به برخی از آنها اشاره می شود.

۱-۲-۱ سرعت واکنشهای آنزیمی

سرعت واکنشهایی که توسط آنزیم ها کاتالیز می شوند عموماً $۱۰^{۶}$ تا $۱۰^{۱۲}$ مرتبه بیشتر از واکنشهای معادل فاقد کاتالیزور است و حداقل چندین برابر بیش از واکنشهای مشابهی است که توسط کاتالیزورهای شیمیایی کاتالیز می شوند.

(۱-۲-۱-۱) عوامل عمده تسریع واکنشها توسط آنزیمها

تسریع واکنشها توسط آنزیمها به ۵ طریق صورت می گیرد.

آنزیم می تواند به طریقی به ماده اولیه بپیوندد که پیوند حساس به آنزیم

(الف) در مجاورت گروه کاتالیزوری در جایگاه آنزیمی مستقر شود

(ب) از نظر فضایی نسبت به گروه کاتالیزوری به شکلی قرار گیرد که حالت گذار و به آسانی تشکیل گردد.

(ج) بعضی از آنزیمها ممکن است با مولکول ماده اولیه ترکیب شوند و یک واسطه ناپایدار کووالانسی ایجاد کنند که در جهت تولید فراورده بتوانند یک واکنش را با سهولت بیشتری بپذیرند.

(د) آنزیم می تواند با گروههای عاملی که پرتون دهنده یا پرتون گیرنده نقش کاتالیز اسید و یا باز را انجام دهد.

(ه) مولکول آنزیم ممکن است باعث تنش یا تغییر شکل در پیوند حساس مولکول ماده اولیه شود و به این طریق گسستن آن پیوند را آسانتر سازد.(75)

(۱-۲-۱-۲) عوامل موثر بر سرعت واکنش آنزیمی

اصولا میل ترکیبی یک آنزیم با سوبسترا به ویژگیهای آنزیم بستگی دارد که خود این ویژگی نیز در درجه اول به آرایش مولکولی و فضایی جایگاه فعال آنزیم و سپس به ساختمان کل مولکول آنزیم وابسته است. ویژگیهایی که به ساختمان اول آنزیم بستگی دارد مثل ترتیب و نوع اسیدهای موجود در جایگاه فعال آنزیم به خصوصیات ژنتیکی موجود سازنده آنزیم بستگی داشته و غیر قابل تغییر است.

در حالی که بعضی ویژگیهای مربوط به ساختمان دوم و سوم آنزیمها (مثل شکل فضایی خاص مولکول و یا پیوند شیمیایی موثر در شکل فضایی) و یا ویژگیهایی که در نحوه و نوع اتصال آنزیم به سوبسترا نقش دارند (مثل میزان یونیزاسیون اسیدهای آمینه موجود در جایگاه فعال) تابعی از شرایط محیطی نظیر pH و حرارت و قدرت یونی و غیره است . بنابراین با بررسی چگونگی تاثیر این عوامل می توان با ایجاد مناسب ترین شرایط محیطی، سرعت واکنش آنزیمی را به حداکثر مقدار خود رساند.

(۱-۲-۱-۲-۱) اثر pH بر سرعت واکنشهای آنزیمی

اصولاً گستره pH فعالیت بیشینه یک آنزیم کوچک است و این pH بهینه به عواملی مانند مدت واکنش ،دما، طبیعت آنزیم، غلظت و نوع ماده اولیه، نوع و غلظت بافر و بالاخره قدرت یونی محیط بستگی دارد. pH بهینه یک آنزیم در شرایط مختلف تغییر می کند و لذا تثبیت این pH به شرایط خاصی نیازمند است.

pH به دو طریق می تواند بر روی واکنشهای آنزیمی موثر باشد.

۱- بر روی پایداری آنزیم

۲- بر روی اتصال آنزیم و نقش کاتالیزوری آن

A-تغییر pH بر میزان پروتونه شدن اسیدهای آمینه موجود در جایگاه فعال کمپلکس آنزیم - سوبسترا تاثیر گذارده ، باعث تغییر سرعت تبدیل این کمپلکس به محصول نهایی می گردد (تغییر Maxبا تغییر pH)

B-تغییر pH با تغییر میزان یونیزاسیون مولکول سوبسترا و جایگاه فعال آنزیم باعث تغییر میل ترکیبی آنزیم و سوبسترا می گردد (تغییر Km با تغییر pH)

C-تغییر pH (به ویژه دور شدن از حالت خنثی) با تضعیف نیروهای موثر در حفظ و پایداری شکل فضایی آنزیم، موجب افزایش سرعت تخریب آنزیم می گردد (پایداری در pHهای متفاوت)

(۱-۲-۱-۲-۲) اثر دما بر واکنشهای آنزیمی

تغییرات دما به طرق مختلف بر واکنشهای آنزیمی موثر است و این تغییرات می توانند بر بسیاری عوامل مانند پایداری آنزیم، انحلال پذیری گازها، تعادل واکنش، تمایل آنزیم به فعالساز و مهارکننده، رقابت واکنشها، یونش گروههای آنزیم، پیوند آنزیم با ماده اولیه و سرعت تجزیه کمپلکس آنزیم، ماده اولیه موثر باشند.

سرعت واکنشهای آنزیمی نیز مانند اغلب واکنشهای شیمیایی در اثر بالا رفتن درجه حرارت افزایش می یابد. انرژی حرارتی باعث افزایش انرژی جنبشی مولکولها و نیز افزایش تعداد برخورد مولکولهای آنزیم با سوبسترا می گردد ولی از سوی دیگر آنزیم ممکن است در اثر درجه حرارات های بالا تخریب گردد و ساختمان سه بعدی خود را که لازمه فعالیت آنزیمی است از دست بدهد در واقع ساختمان سه بعدی آنزیمها نتیجه پیوندهای ضعیفی است که قادرند مولکولهای آنزیمی را در وضع فضایی ثابتی نگه دارند که لازمه واکنش آنزیم با سوبسترا می باشد. بنابراین افزایش دما تا زمانی قادر است موجب افزایش فعالیت آنزیمی گردد که اجزای مختلف ساختمان سه بعدی آنزیم، دستخوش تغییرات نگردیده باشند البته عواملی مانند pH و وجود یونهای مختلف مثب از جمله یون Ca^{+2} قادرند مقاومت آنزیم را درمقابل حرارت تغییر دهند.(33)

۱-۲-۲ شرایط واکنشهای آنزیمی ملایم تر است

واکنشهای آنزیمی معمولا در شرایط نسبتاً ملایم مانند دمای نه چندان بالا، فشار اتمسفری و pH نزدیک به خنثی انجام می شوند در حالی که کاتالیزورهای قوی شیمیایی بر خلاف آنزیم ها اغلب به دما و فشار بالا و pH اسیدی و بازی قوی نیاز دارند.

۱-۲-۳ آنزیم ها نسبت به واکنش هایی که کاتالیز می کنند ویژگی بیشتری دارند

آنزیم ها در مقایسه با کاتالیزورهای شیمیایی، ویژگی فوق العاده و بالاتری نسبت به ماهیت سوبسترا (ماده واکنش دهنده و فراورده های واکنش نشان می دهند. این بدان معناست که واکنش های آنریمی به ندرت دارای فراورده های جانبی ناخواسته هستند .

۱-۲-۴ آنزیم ها قابلیت تنظیم دارند.

فعالیت کاتالیتیکی بسیاری از آنزیم ها نسبت به تغییرات غلظت موادی به جز سوبسترا حساس است. مکانیسم های این نوع فرایندهای تنظیمی شامل کنترل آلوستریکی، تغییرات کووالان در ساختار آنزیم ها و تغییر در میزان سنتز آنها می باشد.(20)

(۱-۲-۵)آنزیم ها تنها باعث تغییر در سرعت واکنش می شوند و بر روی تعادل واکنش اثری ندارند

آنریم ها کاتالیزورهای جالبی هستند ولی قادر به انجام اعمال فوق العاده و غیر ممکن نیستند آنزیم توانایی تغییر در قوانین ترمودینامیک را ندارد و در نتیجه بر تعادل واکنش شیمیایی تاثیر نمی گذارد. این ناتوانی بدان معناست که واکنش های شیمیایی را در مسیر رفت و برگشت با یک فاکتور یکسان تحت تاثیر قرار می دهد. آنزیم ها باعث تسریع در حصول تعادل می شوند ولی آن را جا به جا نمی کند. موقعیت تعادل تنها تابعی از اختلاف انرژی آزاد بین واکنشگرها و محصولات است.

(۱-۲-۶)آنزیم ها با تسهیل تشکیل حالت گذار سرعت واکنش ها را افزایش می دهند.

حالت تعادل به اختلاف انرژی آزاد بین واکنشگرها و محصولات بستگی دارد ولی آنزیم ها فقط سرعت رسیدن به حالت تعادل را تسریع می کنند . توجیه ترمودینامیکی این افزایش سرعت چیست؟ بدین منظور ما علاوه بر ابتدا و انتهای واکنش بایستی به مسیری که واکنش صورت می گیرد نیز توجه نماییم.

در مسیر تبدیل سوبسترا (s) به محصول (p) حالت گذار $s^{\neq}$ دیده می شود که میزان انرژی آزاد آن از s و p بیشتر است. این شمشیر دو لبه نشان دهنده خصلت ترمودینامیکی حالت گذار است. حالت گذار دارای بالاترین مقدار انرژی آزاد در طول مسیر یک واکنش شیمیایی است این حالت کمترین گونه موجود در مسیر واکنش محسوب می شود به اختلاف انرژی آزاد بین حالت گذار و سوبسترا انرژی آزادگیبس فعال سازی یا به اختصار انرژی فعال سازی گفته می شود و آن را به صورت $\triangle G^{\neq}$نشان می دهیم.

$$\Delta G^{\neq} = G^{\neq}_{s} - G_{s}$$

توجه نمایید که میزان انرژی فعال سازی یا $\triangle G^{\neq}$ در مقدار $\triangle G$ واکنش تاثیری ندارد زیرا انرژی مصرف شده برای رسیدن به حالت گذار به هنگام تشکیل محصول مجدداً آزاد می شود. با توجه به مفهوم سد انرژی فعال سازی می توان به نحوه عملکرد آنزیم ها در تسریع سرعت واکنش های آنزیمی (بدون تغییر در $\triangle G$) پی برد. آنزیم ها انرژی فعال سازی را کاهش می دهند، به عبارت دیگر آنها تشکیل حالت گذار را تسهیل می کنند.

(۱-۳)نامگذاری و طبقه بندی آنزیم ها

برای نامگذاری آنزیم ها معمولا پسوند آز (ase) به سوبسترا یا نام واکنشی که آنزیم بر آن اثر می کند افزوده می شود. سوبسترا به ماده ای اطلاق می شود که آنزیم عمل کاتالیز را بر روی آن انجام

می دهد. به عنوان مثال آنزیمی که هیدرولیز اوره را انجام مـی دهـد اوره آز نـام دارد و نـام آنزیمـی کـه اکسیداسیون الکل به آلدئید مربوطه را کاتالیز می نماید الکل دهیدروژناز است با کـشف روزافـزون آنـزیم های جدید نیاز به روشی سیستماتیک برای نامگذاری آنها احساس شد. لذا به منظور حل ایـن معـضل در سال ۱۹۶۱ کمیسیون بین المللی آنزیم ها طبقه بندی و نامگـذاری سیـستماتیک آنـزیم هـا را پیـشنهاد نمود. براساس این روش، آنزیم ها بر حسب نوع واکنشی که کاتالیز می کنند. به شش گروه اصـلی طبقـه بندی شده اند.(جدول ۱-۱)

هر یک از شش طبقه اصلی از چند گروه و هر گروه نیز از زیر گروههای خاص خود (دسته) تشکیل شده اند. هر آنزیم با این اصطلاحات مشخص می شود: یک نام مصطلح یا متداول که غالبا کوتاه و درخور استفاده روزمره است، همراه با یک نام سیستماتیک که مشخص کننده واکنشی اسـت کـه آنـزیم کاتـالیز می کند و با افزودن پسوند (**آز**)به نام سوبسترا یا انتهای نام واکنش شیمیایی مربوط به آنـزیم مـشخص می شود و یک شماره دسته بندی برای شناسایی دقیق و بدون ابهام آنزیم که از چهار جزء تشکیل شده و به وسیله نقطه از هم جدا می شوند و عموماً در مجلات تحقیقاتی بین المللـی در خلاصـه مقـالات و در ضمایم به کار می رود برای مثال آنزیمی که به کربوکسی پپتید از A موسوم است نـام سیـستماتیک آن پپتیدیل –L- آمینواسید هیدرولاز با شماره دسته بنـدی EC.3.4.17.1 اسـت. EC اسـتاندارد کمیتـه آنزیمی است و اعداد به ترتیب نشان دهنده طبقه، گروه، زیرگروه، و شماره سریال ویژه قراردادی است که در آن دسته است. در متون کلاسـیک معمـولا نـام مـصطلح آنـزیم هـا را بـه کـار مـی برنـد؛ نـام هـای سیستماتیک و اعداد دسته بندی EC را می توان با رجوع به آدرس زیر در اینترنت جستجو نمود.(31)

http://www.pxpasy.ch/sport/enzyme.html

جدول ۱-۱ طبقه بندی اصلی آنزیم ها

طبقه بندی	نوع واکنش
۱-اکسید وردوکتازها	واکنش های اکسیداسیون – احیا
۲-ترانسفرازها	واکنش های انتقال گروههای عاملی
۳-هیدرولازها	واکنش های هیدرولیز کننده
۴-لیازها	واکنش های حذف گروهها با ایجاد پیوند دوگانه
۵-ایزومرازها	واکنش های ایزومریزاسیون
۶-لیگازها	واکنش های سنتز یا الحاق دو مولکول همراه با مصرف انرژی