بسم الله الرحمن الرحیم

وزارت علوم، تحقیقات و فناوری

پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

گروه صنعت و محیط زیست

رساله جهت دریافت دکترای **تخصصی ژنتیک مولکولی**

جدا سازی باکتریهای بومی تولید کننده آنزیم کلسترول اکسیداز و انجام مطالعات ژنتیکی بر روی آنها

نگارش

حامد اسمعیل لشکریان

اساتید راهنما

دکتر جمشید راهب

دکتر حسین شهبانی ظهیری

اساتید مشاور:

دکتر مجید صادقی زاده

دکتر بیژن بمبئی

شهریور ماه ۱۳۸۹

حق استفاده از مفاد پایان نامه برای پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری محفوظ است

تقدیم به :

پدرم و مادر فرهیخته ام، دو موهبت الهی که برای موفقیت من از همه تعلقات دنیوی چشم پوشی نمودند.

به همسر مهربانم ،که در تمام لحظات دوران این مقطع صادقانه یاریم نمود.

به خواهران ارجمندم، که با دلگرمی مرا به ادامه راه تشویق نمودند.

به پسر دلبندم، که در تمام این مدت تفریح، آسایش وراحتی را از او دریغ نمودم.

چکیده:

هدف از این پـژوهش جداسـازی میکروارگانیـسمهای بـومی مولـد کلـسترول اکـسیداز، غربـالگری میکروبهای جداسازی شده بر اساس میزان تولید آنزیم و فعالیت آنزیمی و انجام مطالعات ژنتیکی می باشد. به منظور دستیابی به سویه بومی مولد آنزیم کلسترول اکسیداز (Cho) ، نمونه های خـاک، آب، پسآب کارخانجات چرم و پوست، صابون سازی فرآورده های لبنی جمع آوری گردیـد. نمونـه هـای گرفته شده در محیط کشت غربالگری که تنها منبع کربن آن کلسترول می باشد،کشت داده شد. سـپس جهت انجام آنالیز فیلوژنیک، بخشی از تـوالی ژن 16S rRNA بوسـیله روش PCR و بـا اسـتفاده از پرایمرهای استاندارد ازدیاد گردید. در مرحله بعد، آزمایش سنجش فعالیت آنزیمی متـصل بـه غـشا و خارج سلولی بر روی باکتری فوق انجام گردید و فعالیت آنزیمی کلسترول اکسیداز سویه جداسـازی شده سنجیده شد و تاثیر شرایط متفاوت دمـایی و pH و نیـز غلظتهـای مختلـف از سوبـسترا مـورد بررسی قرار گرفت. در آخر ژن مربوطه با روش PCR جداسازی، در وکتور بیـانی *pET23a* کلـون و در میزبان *E.Coli BL21 plyss* بیان گردید.

در این مطالعه میکروارگانیسم بومی مولد کلسترول اکسیداز با قابلیت ترشح آنزیم خارج سلولی جـدا گردید. این باکتری بواسطه خصوصیات مورفولوژیکی،بیوشیمیایی و روشهای تائیدی مولکـولی جـزء گونه *Rhodococcus* با قابلیت ترشح خارج سلولی و متصل به غشا طبقه بندی گردید. این آنـزیم در محدوده وسیع از pH و دما فعال بوده، دما و pH بهینه آن به ترتیب $35^{\circ}C$ و ۷/۵ می باشد.

کلید واژه: کلسترول اکسیداز،رودوکوکوس،جداسازی،شناسایی.

فهرست مطالب

فصل اول : مقدمه

۱-۱ آنزیم ۳

۱-۲ نامگذاری و طبقه‌بندی آنزیمها ٤

۱-۳ اهمیت آنزیمها و نحوهٔ عملکرد آنها ٦

۱-٤ عوامل موثر بر فعالیت آنزیمها ۷

۱-۵ تعیین فعالیت آنزیمها ۸

۱-٦ تعیین پارامترهای کینتیکی آنزیم ۸

۱-۷ منابع آنزیمی ۱۱

۱-۸ جداسازی آنزیم‌ها ۱۱

۱-۸-۱ روش آنزیمی ۱۲

۱-۸-۲ روش فیزیکی ۱۲

۱-۸-۳ روشهای شیمیایی ۱۳

۱-۹ آنزیم کلسترول اکسیداز ۱۳

۱-۱۰ ساختمان آنزیم ۱۵

۱-۱۱ واکنش انجام شده و مکانیسم آن ۱۷

۱-۱۲ مهارکننده‌های آنزیمی ۱۷

۱-۱۳ کاربردهای آنزیم ۱۷

۱-۱٤ ویژگیهای آنزیمی کلسترول اکسیداز ۱۸

۱-۱۵ روشهای سنجش فعالیت آنزیم کلسترول اکسیداز ۱۹

۱-۱۵-۱ تعیین فعالیت براساس ٤-کلستن-۳-اُن ۱۹

۱-۱۵-۲ تعیین فعالیت براساس H_2O_2 تولیدی ۱۹

۱-۱۵-۳ تعیین فعالیت آنزیم براساس O_2 مصرفی ۲۰

۱-۱٦ ویژگی سوبسترای آنزیم کلسترول اکسیداز ۲۰

۱-۱۷ آنزیم‌های کلسترول اکسیداز نوترکیب ۲۱

۱-۱۸ اهمیت موضوع تحقیق ۲۳

فصل دوم: مواد و روشها

۲-۱ مواد ۲۵

۲-۱-۱ باکتریها ۲۵

۲-۱-۲ مواد شیمیایی و کیتها ۲۵

۲-۱-۳ نرم‌افزارها ۲۸

۲-۱-٤ دستگاه‌ها ۲۸
۲-۲ روشها ۲۸
۲-۲-۱ جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه جهت کشت میکروبی ۲۸
۲-۲-۲ کشت نمونه‌ها جهت بدست آوردن باکتری ۲۹
۲-۲-۳ تعیین هویت میکروب‌های جدا شده ۳۰
۲-۲-٤ تأئید فعالیت کلسترول اکسیدازی باکتری ۳۲
۲-۲-۵ سنجش فعالیت آنزیمی ۳۳
۲-۲-٦ سنجش فعالیت آنزیم کلسترول اکسیداز ۳٤
۲-۲-۷ تعیین دمای بهینه فعالیت آنزیم کلسترول اکسیداز خارج سلولی ۳۵
۲-۲-۸ تعیین pH بهینه فعالیت کلسترول اکسیداز ۳۵
۲-۲-۹ رسم منحنی استاندارد غلظت سوبسترا ۳۵
۲-۲-۱۰ استخراج DNA ژنومی باکتری ۳۵
۲-۲-۱۱ طراحی پرایمر برای تکثیر ژن کلسترول اکسیداز ۳٦
۲-۲-۱۲ تکثیر ژن کلسترول اکسیداز ۳۷
۲-۲-۱۳ خالص‌سازی محصولات PCR ۳۷
۲-۲-۱٤ کلون کردن ژن Cho در وکتورکلونینگ ۳۸
۲-۲-۱۵ ترانسفورمیشن ۳۹
۲-۲-۱٦ تهیه سلول مستعد ۳۹
۲-۲-۱۷ مراحل انتقال DNA ٤۰
۲-۲-۱۸ تأئید کلونینگ ٤۰
۲-۲-۱۹ کلونینگ ژن کلسترول اکسیداز در وکتور بیانی *pET23a* ٤۱
۲-۲-۲۰ انتقال پلاسمید نوترکیب به میزبان *E. Coli DH$_5\alpha$* ٤۳
۲-۲-۲۱ انتخاب کلونهای مثبت ٤۳
۲-۲-۲۲ تأثیر حضور پلاسمید نوترکیب در کلونیهای مقاوم ٤۳
۲-۲-۲۳ ترانسفورماسیون میزبان بیانی با پلاسمید حاوی ژن کلسترول اکسیداز ٤۵
۲-۲-۲٤ انتخاب و تأئید کلونیهای مثبت ٤۵
۲-۲-۲۵ بیان ژن کلسترول اکسیداز ٤۵
۲-۲-۲٦ بررسی بیان ژن کلسترول اکسیداز ٤٦
۲-۲-۲٦-۱ بررسی حضور پروتئین نوترکیب با روش SDS-PAGE ٤٦
۲-۲-۲٦-۲ تعیین غلظت مناسب القا کننده جهت بیان بهتر آنزیم نوترکیب ٤٦
۲-۲-۲۷ خالص سازی آنزیم نوترکیب ٤۸
۲-۲-۲۸ تعیین فعالیت آنزیم کلسترول اکسیداز نوترکیب ٤۸
۲-۲-۲۸-۱ تعیین دمای بهینه فعالیت کلسترول اکسیداز نوترکیب ۵۰
۲-۲-۲۸-۲ تعیین پایداری دمایی آنزیم کلسترول اکسیداز سویه بومی و نوترکیب ۵۰

۲-۲-۲۸-۳ تعیین pH بهینه فعالیت کلسترول اکسیداز نوترکیب ۵۰
۲-۲-۲۸-٤ تعیین پایداری آنزیم کلسترول اکسیداز سویه بومی و نوترکیب درpH های متفاوت ۵۰
۲-۲-۲۸-۵ رسم نمودار معادلات میکائیلیس-منتون جهت آنزیم سویه بومی و نو ترکیب ٤۹

فصل سوم :نتایج

۳-۱ جداسازی باکتری از نمونه‌های کشت شده ۵۱
۳-۲ تعیین هویت میکروبهای جدا شده ۵۲
۳-۳ آزمایشهای بیوشیمیایی تعیین هویت باکتری ۵۳
۳-٤ تعیین هویت مولکولی باکتری ۵۳
۳-۵ تأیید فعالیت کلسترول اکسیدازی باکتری گونهٔ *Rhodococcus sp. strain 501* ۵۵
۳-٦ سنجش فعالیت آنزیمی ٦۰
۳-٦-۱ سنجش دمای بهینهٔ فعالیت آنزیم کلسترول اکسیداز خارج سلولی ٦۰
۳-٦-۲ سنجش pH بهینهٔ فعالیت آنزیم ۵۸
۳-۷ تکثیر ژن کلسترول اکسیداز ۵۹
۳-۸ کلونینگ ژن کلسترول اکسیداز (Cho) ٦۳
۳-۹ کلونینگ ژن کلسترول اکسیداز در وکتور بیانی *pET23a* ٦۲
۳-۱۰ بررسی بیان ژن کلسترول اکسیداز ۷۰
۳-۱۱ خالص سازی آنزیم نوترکیب ۷۱
۳-۱۲ دمای بهینه فعالیت آنزیم نوترکیب ٦۷
۳-۱۳ مقایسهٔ فعالیت کلسترول اکسیداز نوترکیب با آنزیم سویهٔ وحشی در دما های مختلف ٦۸
۳-۱٤ pH بهینه فعالیت آنزیم نوترکیب ٦۹
۳-۱۵ مقایسهٔ فعالیت کلسترول اکسیداز نوترکیب با آنزیم سویهٔ وحشی در pH های مختلف ۷۰
۳-۱٦ پایداری دمایی آنزیم کلسترول اکسیداز سویه بومی ۷۰
۳-۱۷ پایداری دمایی آنزیم کلسترول اکسیداز سویه نوترکیب ۷۱
۳-۱۸ پایداری pH آنزیم کلسترول اکسیداز سویه بومی ۷۲
۳-۱۹ پایداری pH آنزیم کلسترول اکسیداز سویه نو ترکیب ۷۳
۳-۲۰ محاسبه معیار های کینتیکی آنزیم کلسترول اکسیداز ۷٤
۳-۲۱ آنالیز بیوانفورماتیک ژن کلسترول اکسیداز(Cho 501) ۸۱
۳-۲۱-۱ یافتن توالیهای نوکلئوتیدی در بانک ژنی ۸۱
۳-۲۱-۲ یافتن بخش محافظت شده توالی ژن کلسترول اکسیداز بدست آمده(Conserve domain) ۸۱
۳-۲۱-۳ تعیین ساختار دوم کلسترول اکسیداز با استفاده از روش PHD ۷۹
۳-۲۱-٤ مدل سازی با استفاده از CPH Model جهت پیشگویی ساختمان سوم پروتئین ۸۱
۳-۲۱-۵ رسم درختواره فیلوژنیک آنزیم کلسترول اکسیداز باکتری *Rhodococcus sp. 501* ۸۱

فصل چهارم: بحث

٤-١ بحث ٩٠
فهرست ومنابع ٩٨
ضمیمه ١٠٨
چکیده انگلیسی ١٤٩

فهرست جدول‌ها

جدول ۱-۱- نوع و عمل آنزیم ها..... ۵
جدول۳-۱- محلها و نمونه های اخذ شده جهت آماده سازی و کشت میکروبی..... ۵۱
جدول ۳-۲- نتایج آزمایشهای بیوشیمیایی تعیین هویت باکتری های جدا شده از نمونه خاک..... ۵۳

فهرست نمودارها و شکل‌ها

شکل ۱-۱- نمودار رابطه میکاییلس – منتون..... ۹
شکل ۲-۱- منحنی معادله لینوربرگ آنزیم کلسترول اکسیداز..... ۱۰
شکل ۳-۱- مکانسیم عمل آنزیم کلسترول اکسیداز(۱۱)..... ۱٤
شکل ۱-۲- تولید مادهٔ رنگی درحضور H_2O_2 و ٤-آمینوآنتی‌پیرین..... ۲۰
شکل ۱-۳- مکانیسم عمل آنزیم کلسترول اکسیداز..... ۲۱
شکل ۳-۱- کلنی های موکوئیدی رشدیافته بر روی محیط آگارخون دار ۵۲
شکل ۳-۲- تصویر باکتری گرم مثبت رشد یافته بر روی محیط کشت مینرال که حاوی کلسترول به عنوان تنها منبع کربن میباشد. باکتریها به صورت کوکوباسیلهای گرم مثبت چسبیده به هم دیده می‌شوند..... ۵۲
شکل ۳-۳- الکتروفورز محصول PCR (16s rRNA) باکتریهای بدست آمده با پرایمر های استاندارد.۱و۲ :سویه های جدا سازی شده ۵۰۱ و ۵۰۲ ،۳ :مارکر 100bp ٥٤
شکل ۳-٤- قهوهای شدن محیط کشت توسط باکتریهای Rhodococcus sp.501,502 مولد آنزیم کلسترول اکسیداز..... ۵۵
شکل ۳-۵- قرمز شدن محیط کشت در اثر واکنش آنزیم کلسترول اکسیداز باکتری Rhodococcus sp.501,502 با معرف رنگزای HRP ٥٦
نمودار ۳-۱- فعالیت آنزیم خارج سلولی کلسترول اکسیداز سویه های جدا شده..... ۵۷
نمودار ۳-۲- فعالیت خارج سلولی و متصل به غشاء آنزیم کلسترول اکسیداز باکتری Rhodococcus sp.501.. ۵۷
نمودار ۳-۳- سنجش فعالیت آنزیمی باکتری Rhodococcus sp.501 در دماهای مختلف ۵۸
نمودار ۳-٤- سنجش فعالیت آنزیمی باکتری Rhodococcus sp.501در pH مختلف..... ۵۸
شکل ۳-٦- ۱- قطعه حاصل از PCR بر روی ژل الکتروفورز ، نمایانگر قطعه ای بطول 1600 bp، ۲- 100bp DNA Ladder plus..... ۵۹
شکل ۳-۷- تخلیص قطعه و وکتور هضم شده جهت انجام عمل اتصال. ۱- وکتورpSTV28 ۲- مارکر 1Kb ۳- قطعه (Cho501)..... ٦۰
شکل۳-۸- محصولات برش وکتور و قطعه جهت تایید کلونینگ، از راست به چپ قطعه ژن کلسترول اکسیداز، مارکر1Kb، وکتور بریده شدهpSTV28 فاقد قطعه(به عنوان کنترل منفی) وکلون (pSTV28+Cho 501) ٦۱
شکل ۳-۹- الکتروفورز محصولات PCR حاصل از کلونینگ (pET23a + Cho501) با استفاده از پرایمر های ژنCho F,R ، به همراه محصولات هضم با آنزیمهای محدود الاثر. ۲، ٤و ۷: محصول PCR ژن کلسترول اکسیداز ۸: مارکر 1Kb ladder plus .۹: pET23a فاقد قطعه به عنوان کنترل منفی. ۱۰، ۱۱، ۱۳و ۱٤: محصولات هضم (وکتور و قطعه) ۱۲: وکتور pET23a هضم شده..... ٦۳
شکل ۳-۱۰- توالی نوکلئوتیدی ژن کلسترول اکسیداز باکتری بومیRhodococcus sp.501 ..... ٦٤
شکل ۳-۱۱- ژل SDS-PAGE آنزیم نوترکیب کلسترول اکسیداز..... ٦٦
شکل ۳-۱۲- ژل SDS-PAGE آنزیم نوترکیب کلسترول اکسیدازخالص شده..... ٦۷

نمودار ۳-۵- فعالیت آنزیم کلسترول اکسیداز نوترکیب در دماهای مختلف..... ٦٨
نمودار ۳-۵- مقایسه فعالیت آنزیم سویه وحشی و نوترکیب در دماهای مختلف..... ٦٩
نمودار ۳-٦- فعالیت آنزیم کلسترول اکسیداز نوترکیب در pHهای مختلف..... ٦٩
نمودار ۳-۷- مقایسه فعالیت آنزیمی سویه وحشی و نوترکیب در pH های مختلف..... ۷۰
نمودار ۳-۸- پایداری دمایی آنزیم کلسترول اکسیداز سویه بومی..... ۷۱
نمودار ۳-۹- پایداری دمایی آنزیم کلسترول اکسیداز سویه نوترکیب..... ۷۱
نمودار ۳-۱۰- مقایسه پایداری دمایی آنزیم کلسترول اکسیداز سویه وحشی و نوترکیب..... ۷۲
نمودار۳-۱۱- pH آنزیم کلسترول اکسیداز سویه بومی..... ۷۲
نمودار ۳-۱۲- pH آنزیم کلسترول اکسیداز سویه نو ترکیب..... ۷۳
نمودار ۳-۱۳- پایداری pH آنزیم کلسترول اکسیداز سویه وحشی و نوترکیب..... ۷۳
نمودار ۳-١٤- منحنی میکائیلیس- منتون مربوط به آنزیم کلسترول اکسیداز سویه بومی..... ٧٤
نمودار ۳-۱۵- منحنی میکائیلیس-منتون مربوط به آنزیم کلسترول اکسیداز سویه نوترکیب..... ٧٤
نمودار ۳-١٦- منحنی لینوور – برگ آنزیم کلسترول اکسیداز سویه وحشی. Km آنزیم نو ترکیب ۲۸ میکرو مولار تعیین شد..... ۷۵
نمودار ۳-۱۷- منحنی لینوور – برگ آنزیم کلسترول اکسیداز سویه نو ترکیب.Km آنزیم نو ترکیب ۳۰ میکرو مولار تعیین شد..... ۷۵
شکل ۳-۱۲- توالی محافظت شده ژن کلسترول اکسیداز..... ۷۸
شکل ۳-۱۳- پیشگوئی ساختار سوم آنزیم کلسترول اکسیداز..... ۸۱
شکل ۳-١٤- درخت فیلوژنیک آنزیم کلسترول اکسیداز سویه بومی جدا شده به همراه سایر باکتریهای مولد آنزیم کلسترول اکسیداز دارای قرابت..... ۸۲

فصل اول

مقـــــدمه

پیشگفتار

علم بیوتکنولوژی عبارتست از بهره‌برداری صنعتی از انواع مختلف میکروارگانیسم‌ها برای تولید مواد مورد نیاز در صنایع کشاورزی، داروسازی، پزشکی، نظامی و غیره. سابقهٔ این علم به حدود ۱۸۰۰ سال قبل از میلاد مسیح برمی‌گردد. درزمانی که مردم برای ور آمدن خمیرنان یا تهیهٔ شراب از مخمرها استفاده می‌کردند. کلمهٔ بیوتکنولوژی اولین بار بعد از جنگ جهانی اول توسط یک مهندس مجارستانی بنام کارل ارکی استفاده شد. کشف ساختمان DNA نیز به تبع آن به عنوان مادهٔ وراثتی اصلی موجودات زنده توسط واتسون و کریگ، خود زمینه‌ای برای پیشبرد بیشتر این علم نوین شد (٤،٥،٧).

اولین محصولی که به طریق صنعتی با بکارگیری میکروارگانیسم‌ها تولید شد، آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین بود که فلمینگ آنرا در سال ۱۹۲۸ از قارچ پنی‌سیلیوم گرفت و توانست جان هزاران نفر را با آن نجات دهد. در سال ۱۹۷۸ محققین دانشگاه‌های کالیفرنیا، استنفورد و هاروارد توانستند با شناخت ژن مولد انسولین انسانی، انتقال آن به باکتری *E.Coli* این میکروارگانیسم را قادر به تولید انسولینی بکنند که دقیقاً مشابه نوع انسانی بود و معایب انواع حیوانی را نداشت. چیزی که امروزه در علم بیوتکنولوژی مورد بحث می‌باشد، مسالهٔ کلون کردن ژنها و تولید پروتئین های نوترکیب از میکروارگانیسم‌ها بعنوان ساده ترین راه حل جهت تولید مواد مورد نیاز خودمان میباشد.

کانون توجه زیست فناوری پزشکی در حال حاضر تولید پروتئینهای انسانی نظیر انواع اینترفرونها، فاکتورهای انعقادی، آنزیمها، هورمونها، واکسن‌ها و بسیاری از داروهای پروتئینی دیگر است که تهیهٔ آنها به روشهای معمول بسیار دشوار و هزینه بر می‌باشد. مهمترین مزیت محصولات بیوتکنولوژی نسبت به محصولات دیگر عبارتست از:

۱. مشابهت دقیق با نوع انسانی ۲. ایمنی بسیار بالا و قابل اطمینان از لحاظ آلودگی‌های عفونی ۳. فراوان بودن و گوناگونی منابع تولید ٤. سهولت روشهای تولید و اقتصادی بودن آنها. (۲)

دو شرط اساسی برای حیات وجود دارد. ابتدا موجود زنده باید بتواند واکنش‌های شیمیایی را به

طور کارآمد و انتخابی کاتالیز نماید. سپس باید موجود زنده بتواند خود را همانندسازی نماید. برای مثال اکثر موجودات ساکارز را مصرف می کنند. تبدیل ساکارز به H_2O , CO_2در حضور اکسیژن یک فرآیند بسیار انرژی زا بوده و انرژی را که آزاد می سازد میتواند صرف اعمال حیاتی گردد.اگر یک تکه قند سالها نگهداشته شودممکن است تغییری ننماید، حال آنکه اگر این تکه قند توسط انسان یا جانوران مصرف شود، انرژی خود را ظرف مدت کوتاهی آزاد مینماید.تفاوت واکنشهای بالا در کاتالیز است. بدون کاتالیزور واکنشهای ضروری برای حفظ حیات در مقیاس زمانی مفید قابل انجام نمیباشد(۱). کاتالیزور واکنشها در محیطهای زنده ، آنزیمها میباشند. آنزیمها دارای قدرت کاتالیزوری فوق العاده ای هستند و واکنشهای شیمیایی را بمیزان زیادی سرعت میبخشند. اغلب آنها در محلولهای آبی و تحت شرایط ملایم درجه حرارت و pH عمل میکنند. مطالعه آنزیمها دارای اهمیت عملی زیادی است. در برخی بیماریها نظیر ناهنجاری های ارثی ممکن است کمبود یا عدم وجود یک یا چند آنزیم وجود داشته باشد. در بیماریهای دیگر ممکن است افزایش یا کاهش فعالیت یک آنزیم رخ داده باشد. اندازه گیری فعالیت آنزیم در سرم یا نمونه بافتی در تشخیص برخی بیماریها دارای اهمیت است. بسیاری از داروها اثر خود را از طریق اثر بر عملکرد یک آنزیم اعمال می نمایند. همچنین آنزیمها ابزار عملی مهمی در صنایع غذایی، شیمیایی، کشاورزی، پزشکی و ... می‌باشند(۳۲).

۱-۱ آنزیم

کلمهٔ آنزیم از لغت یونانی EN به معنای در و ZYME به معنای مخمر می‌باشد. مطالعهٔ آنزیمها از اوایل قرن نوزدهم در جریان توجه به فرآیند تخمیر پا به عرصهٔ وجود نهاد.

کلمهٔ آنزیم از این زمان و به منظور تأکید بر وجود عاملی در مخمر که فرآیند تخمیر را انجام می‌دهد اقتباس گردید. ترکیب شیمیایی آنزیمها تا سال ۱۹۲٦ به درستی شناخته نشده بود تا اینکه، آنزیم اوره‌آز که واکنش تبدیل اوره به آمونیاک و دی‌اکسید کربن را کاتالیز می‌کند به شکل متبلور بدست آمد و ثابت شد که ماهیت آن پروتئینی است. از آن زمان به بعد مطالعات آنزیم شناسی مشخص نمود که اغلب آنزیمها از جنس پروتئین هستند(٥٤).

۱-۲ نامگذاری و طبقه‌بندی آنزیمها:

آنزیمها یا با افزودن پسوند آز به نام سوبسترا (مولکولی که آنزیم بر آن اثر می‌کند) و یا بواسطه نوع فعالیتی که انجام می‌دهند، نامگذاری می‌شوند. بعنوان مثال: آنزیمی که هیدرولیز اوره را انجام می‌دهد، اوره‌آز نام دارد و نام آنزیمی که اکسیداسیون الکل به آلدئید را انجام می‌دهد، الکل دهیدروژناز می‌باشد. آنزیمهای دیگر نظیر پپسین و تریپسین نامهایی دارند که نه سوبسترا و نه واکنش را مشخص می‌نمایند. گاهی یک آنزیم دارای دو یا چند نام بوده و یا دو آنزیم مختلف نام یکسان دارند. به علت وجود اینگونه ابهامات و همچنین بدلیل افزایش تعداد آنزیمهای تازه کشف شده از یک سیستم بین‌المللی برای نامگذاری و طبقه‌بندی آنزیمها استفاده می‌گردد، (۲،۳). نام سیستماتیک مشخص کنندهٔ واکنشی است که آنزیم کاتالیز می‌کند و با افزودن پسوند از به انتهای کلمه، واکنش شیمیایی مربوط به آنزیم مشخص می‌شود و یک شمارهٔ چهار رقمی برای شناسایی دقیق آنزیم در مجلات تحقیقاتی بین‌المللی و خلاصهٔ مقالات بکار می‌رود (۱،۵). این نامگذاری توسط کمیسیون بین‌المللی آنزیم در سال ۱۹٦۱ پیشنهاد شده است. براساس این روشها آنزیمها برحسب نوع واکنشی که کاتالیز می‌کنند به شش گروه اصلی طبقه‌بندی می‌شوند (جدول ۱-۱).

جدول ۱-۱- نوع و عمل آنزیم ها

طبقه	نوع واکنش
اکسیدوردوکتازها	واکنش های اکسیداسیون و احیا
ترانسفراز ها	واکنش های انتقال گروههای عامل
هیدرولاز ها	واکنش های تجزیه سوبسترا در محیط آبی
لیاز ها	حذف گروه خاصی بدون عمل هیدرولیز
ایزومراز ها	واکنش های ایزومریزه شدن
لیگاز ها	واکنش های سنتز یا الحاق دو مولکول با صرف انرژی

هر یک از شش طبقهٔ اصلی از چند گروه و هر گروه نیز از زیر گروه‌های خاص خود تشکیل شده‌اند. هر آنزیم با این سیستم نامگذاری مشخص می‌شود. به عنوان مثال نام سیستماتیک آنزیم کاتالیز کنندهٔ واکنش ATP+D-glucose → ADP +D-glucose-6-phosphate به صورت ATP گلوکز فسفوترانسفراز می‌باشد که نشاندهندهٔ کاتالیز انتقال یک گروه فسفات از ATP به گلوکز می‌باشد. عدد کمیسیون آنزیمی این آنزیم EC 2.7.1.1 می‌باشد که عدد اول (۲) طبقهٔ آنزیم (ترانسفراز) را مشخص نموده، عدد دوم (۷) مربوط به گروه آنزیم (فسفوترانسفراز) بوده، عدد سوم (۱) یک فسفوترانسفراز با گروه هیدروکسیل به عنوان گیرنده را مشخص می‌کند و عدد چهارم CD سوبسترای آنزیم یعنی D- گلوکز به عنوان گیرندهٔ گروه فسفات را نشان می‌دهد. در مورد بسیاری از آنزیمها بیشتر از نامهای غیرسیستماتیک استفاده می‌شود که در مورد این آنزیم، هگزوکیناز می‌باشد (۱و۲) حال با توجه به توضیحات فوق بد نیست مختصری هم راجع به شش گروه طبقه‌بندی شدهٔ آنزیمی توضیح دهیم:

دستهٔ اول، گروه اکسیدوردوکتازها (Oxidoreductase): این آنزیمها کاتالیزور واکنشهای اکسایشی – کاهشی هستند. دهیدروژنازها، اکسیدازها و پراکسیدازها در این دسته قرار دارند.

دستهٔ دوم، گروه ترانسفرازها (Transferase): این آنزیمها در واکنشهایی که در آنها گروهی انتقال می‌یابد، به عنوان کاتالیزور عمل می‌نمایند. در این گروه می‌توان از کینازها (انتقال دهندهٔ فسفات) و

ترانس‌آمینازها (انتقال دهندهٔ گروه آمین) نام برد.

دستهٔ سوم، گروه هیدرولازها (Hydrolase): این آنزیمها کاتالیزور واکنشهای هیدرولیز هستند. آنزیمهای پروتئولیتیک، لیپازها و آمیلازها در این گروه قرار می‌گیرند.

دستهٔ چهارم، گروه لیازها (Lyase): این آنزیمها گروه‌های خاصی را بدون انجام عمل هیدرولیز حذف می‌کنند و تشکیل پیوند دوگانه می‌دهند. از این گروه می‌توان دکربوکسیلازها و آلدولازها را ذکر کرد.

دستهٔ پنجم، ایزومرازها (Isomerase): این آنزیمها، کاتالیزور واکنش جابجایی داخلی برروی یک مادهٔ اولیه هستند. از این گروه می‌توان ایزومرازهای سیس–ترانس، اپی‌مرازها و راسمازها را نام برد.

دستهٔ ششم، لیگازها (Ligase): این آنزیمها با شکستن یک پیوند پیروفسفات، اتصال دو مولکول را به یکدیگر کاتالیز می‌کنند. در این واکنش‌ها ATP به عنوان دهندهٔ انرژی توسط لیگازها هیدرولیز شده و AMP و پیروفسفات ایجاد می‌گردد (۳،٦).

۱-۳ اهمیت آنزیمها و نحوهٔ عملکرد آنها:

آنزیمها پلیمرهای زیستی هستند که بعنوان کاتالیزور فرایند های دینامیک متعددی که زندگی را بگونه‌ای که میشناسیم، ممکن میسازند و عمل میکنند. همچنین بعنوان شاخص های سرعت وقوع اعمال فیزیولوژیک، نقش اساسی در سلامت و بیماری بر عهده دارند.شکسته شدن مواد غذایی برای تهیه انرژی و قطعات ساختمانی شیمیایی، گرد هم آوردن قطعات برای ایجاد پروتئینها، غشا ها و DNA که اطلاعات ژنتیکی را رمز بندی مینماید،آماده نمودن انرژی برای ایجادتحرک در سلول، همگی بوسیله اعمال دقیق و هماهنگ شده آنزیمها امکانپذیر میگردند.

محتوای انرژی مولکولها در هر مجموعهٔ مولکولی با هم متفاوت است. در طی یک واکنش مولکولهایی که انرژی بالاتری دارند، سریعتر به شکل فعال در می‌آیند. این شکل فعال حالت گذرا نامیده می‌شود.

برای رسیدن به چنین حالت گذرا تمام مولکولها باید دارای انرژی فعال‌سازی باشند. سرعت

واکنش با غلظت مولکولهای موجود درحالت گذرا متناسب است.هرچه غلظت مولکولهای در حالت گذر بیشتر باشد سرعت واکنش بیشتر است. بسیاری از آنزیمها که کاتالیزور واکنش های انتقال گروه ویا واکنشهای دیگری هستند،علاوه بر سوبسترای خود، به یک مولکول دیگر بنام کوآنزیم نیاز دارند و بدون آن غیر فعالند.کوآنزیمها مجموعه توانایی های کاتالیتیک یک آنزیم را بسیار فراتراز آنچه که گروه های عامل اسید های آمینه تشکیل دهنده توده آنزیم بتنهایی انجام میدهند،گسترش میدهند. کوآنزیم هایی که از طریق پیوند کووالانسی یا نیروهای غیر کووالانسی اتصال محکمی با یک آنزیم برقرار میکنند،گروه های پروستتیک نامیده می شوند. آنزیم هایی که به کوآنزیم احتیاج دارند، عبارتند از: آنزیم هایی که کاتالیزور واکنش های اکسیداسیون و احیا، انتقال گروه و ایزومریزاسیون هستند و نیز واکنش هایی که پیوند های کووالانسی برقرار می سازند (۲،۳،٦).

در تعداد کمی از آنزیمها، ساختار پروتئینی به تنهایی برای عملکرد آنها کافی است، در حالیکه اکثر آنزیمها احتیاج به گروه شیمیایی دیگری بنام کوفاکتور دارند که ممکن است یک یون فلزی مانند Fe^{2+} و یا یک مولکولی آلی بنام کوآنزیم(مانند FAD) باشد. کوآنزیمها به عنوان حامل موقت گروه‌های عامل اختصاصی عمل می‌کنند (۵،٦).

۱-٤ عوامل موثر بر فعالیت آنزیمها

اصولاً میل ترکیبی یک آنزیم با سوبسترا به ساختار کلی آنزیم، شکل فضایی و آرایش مولکولی آنزیم و جایگاه فعال آنزیم مربوط می‌شود. خصوصیاتی که مربوط به ساختمان اول آنزیم یعنی ترتیب و نوع اسید آمینه‌های سازندهٔ آن است، غیرقابل تغییر می‌باشد و اختصاص به همان آنزیم دارد، اما ویژگیهایی که مربوط به ساختمان دوم، سوم و چهارم آنزیم می‌باشد (مانند شکل فضایی جایگاه فعال و یا میزان یونیزاسیون اسیدهای آمینهٔ آن) تحت اثر عوامل خارجی می‌باشند که به شرح ذیل می‌باشد.

۱- اثر pH: تغییرات pH محیط واکنش آنزیم باعث تغییر در فعالیت آن می‌شود. آنزیم‌ها در یک pH مشخص دارای حداکثر فعالیت می‌باشند که به آن pH بهینه می‌گویند.

بطوریکه در بالاتر یا پایین‌تر از آن کاهش فعالیت از خود نشان می‌دهند. این تأثیرگذاری به چند

طریق انجام می‌شود:

الف- تغییرات pH بر روی ساختمان پروتئینی آنزیم مؤثر است و pHهای خیلی پائین یا بالا سبب غیرفعال شدن مولکول آنزیم و دگرگونی پیوندهای آنزیم می‌شود.

ب- تغییرات pH باعث تغییرات یونیزاسیون سوبسترا می‌شود.

ج- تغییرات pH روی میزان یونیزاسیون اسیدهای آمینهٔ جایگاه فعال آنزیم تأثیر گذاشته و تمایل سوبسترا و آنزیم را تحت تأثیر قرار می‌دهد.

۲- اثر دما: افزایش دما عموماً تا یک حد مشخصی باعث افزایش فعالیت آنزیم می‌شود، اما این افزایش تا زمانی است که مولکول آنزیم پایدار باشد. در دماهای بالاتر به دلیل اینکه ساختمان پروتئینی آنزیم دگرگون می‌شود، دیگر فعالیتی در آن دیده نمی‌شود (۵).

۳- اثر سوبسترا: با افزایش سوبسترا (در حرارت و pH ثابت) سرعت واکنش زیاد می‌شود، اما در یک نقطه با افزایش غلظت، افزایش سرعتی دیده نمی‌شود که دلیل آن نیز اشباع شدن جایگاه‌های فعال آنزیم می‌باشد (۱).

۱-۵ تعیین فعالیت آنزیمها

با توجه به شرکت مقدار اندک آنزیمها در واکنش‌های بیوشیمیایی، اندازه‌گیری مقدار آنزیمها مشکل است، ولی می‌توان فعالیت کاتالیزوری آنها را در شرایط مناسب تعیین نمود و نتیجه را براساس واحد بین‌المللی بیان کرد که عبارتست از مقدار آنزیمی که در شرایط بهینه یک میکرومول سوبسترا را به محصول تبدیل کند. اصطلاح دیگر که در ارتباط با فعالیت آنزیمها حائز اهمیت است، فعالیت ویژه می‌باشد که به صورت واحدهای آنزیمی در میلی‌گرم پروتئین تعریف می‌گردد و میزانی از خلوص آنزیم است و هنگامی که آنزیم عاری از ناخالصی است فعالیت ویژه به یک مقدار حداکثر و ثابت می‌رسد (۷).

۱-۶ تعیین پارامترهای کینتیکی آنزیم

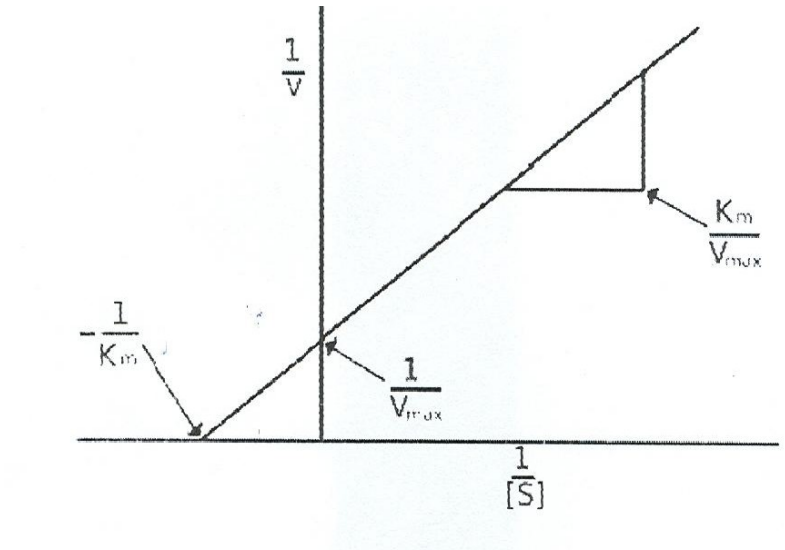
عملکرد اولیهٔ آنزیم افزایش سرعت واکنش‌های شیمیایی در محیط زنده است.

جهت شناخت عملکرد آنزیم‌ها، بررسی پارامتر کینتیکی آنها ضروری است. در بسیاری از آنزیمها سرعت کاتالیز (V_o) که عبارتست از تعداد مولهای محصول تشکیل شده در واحد زمان، با غلظت سوبسترا تغییر می‌یابد.

با افزایش غلظت سوبسترا سرعت کاتالیز به صورت خطی افزایش می‌یابد و سپس شیب آن شروع به کاهش نموده و در غلظت‌های بالای سوبسترا به مقدار حداکثر (V_m) می‌رسد (۹،۸).

مدل کینتیکی آنزیمها توسط میکائیلیس و منتون ارائه شده است و رابطه و منحنی مطابق شکل زیر نشان داده می‌شود (شکل ۱).

$$V_\circ = \frac{V_m[S]}{K_m[S]}$$



شکل ۱-۱- نمودار رابطه میکاییلس – منتون

[S] غلظت سوبستراست و K_m ضریب میکائیلیس – منتون می‌باشد که نشاندهندهٔ غلظتی از سوبستراست که نصف سرعت حداکثر را ایجاد می‌کند. از آنجائیکه با استفاده از رابطهٔ بالا تعیین V_m و K_m مشکل است، با معکوس کردن هر دو طرف رابطهٔ زیر بدست می‌آید که معادلهٔ لینوربرگ نامیده می‌شود.

$$\frac{1}{V_\circ} = \frac{K_m}{V_{max} \times [S]} + \frac{1}{V_{max}}$$