آیین نامه چاپ پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیتهای علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه،دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اطلاع دهد.
ماده ۲: در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه) عبارت ذیل را چاپ کند:

«کتاب حاضر، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد/ رساله دکتری نگارنده **ارسطو بدویی دلفارد** در رشته **بیوشیمی** است که در سال **۱۳۸۹** در دانشکده **علوم زیستی** دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی جناب آقای **دکترخسرو خواجه**، مشاوره جناب آقای **دکتر بیژن رنجبر** از آن دفاع شده است.»

ماده ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت‌چاپ) را به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر درمعرض فروش قرار دهد.
به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت‌مدرس، تأدیه کند. ماده ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را خسارت مذکور را از ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، نگارنده برای فروش، تامین نماید. معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده

ماده ۶: اینجانب **ارسطو بدویی دلفارد** دانشجوی رشته **بیوشیمی** مقطع **دکتری** تعهد فوق وضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی:

تاریخ و امضا:

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجو مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب، نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین نامه های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب **ارسطوبدویی دلفارد** دانشجوی رشته **بیوشیمی** ورودی سال تحصیلی**۱۳۸۴** مقطع **دکتری** دانشکده **علوم زیستی** متعهد می شوم کلِیه نکات مندرج در آئین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آئین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هر گونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله بر اساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هر گونه اعتراض را از خود سلب نمودم»

امضا:.....

تاریخ:.....

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم زیستی

رساله برای دریافت درجه دکتری

رشته بیوشیمی

افزایش کارایی متالوپروتئاز وابسته به روی (SVP) در حضور حلال های آلی با استفاده از روش جهش زایی هدفمند

نگارنده
ارسطو بدویی دلفارد

استاد راهنما
دکتر خسرو خواجه

استاد مشاور
دکتر بیژن رنجبر

اردیبهشت۸۹

تقدیم به

پدر و مادر دلسوز و فداکارم

و

همسر مهربان و عزیزم

تشکر و قدردانی

با نهایت سپاس از درگاه پروردگاری که هرچه دارم از اوست، پروردگار پاک و منزهی که داناست و نعمت آموختن و یادگرفتن را به بندگانش ارزانی داشت. خدای بزرگ را سپاسگزارم که آرامشی به من عطا فرمود تا بتوانم در راه او گامی دیگر بردارم و توفیق اتمام مرحله علمی دیگری را داشته باشم. بر خود لازم می‌دانم مراتب امتنان و قدردانی خویش را تقدیم سرورانی نمایم که ارائه اثر حاضر مرهون مساعدت های بی شائبه آنان می باشد:

- استاد گرانقدر جناب آقای دکتر خسرو خواجه که زحمت راهنمایی این پایان نامه را بر عهده داشتند و در این راه با صبر و حوصله اینجانب را راهنمایی نمودند.
- استاد بزرگوار جناب آقای دکتر بیژن رنجبر که مشاورت پایان نامه اینجانب را بر عهده داشتند.
- از اساتید محترم آقایان دکتر موسوی موحدی، دکتر قائمی، دکتر حسینخانی و دکتر صادقی زاده که داوری این پایان نامه را بر عهده داشتند.
- از تمامی اساتید و دوستانی که هرکدام به نحوی طی انجام این تحقیق به بنده کمک کردند، به ویژه آقای دکتر محمد پاژنگ، آقای خلیفه و خانم دکتر مرضیه قلاسی، تشکر می‌نمایم.
- در پایان از خانواده عزیزم که در تمام مراحل زندگی، مشوق و همراه واقعی اینجانب بوده اند و نیز از همسر مهربانم که با صبر و فداکاری خود و تحمل سختی های زیاد، موفقیت های پی در پی اینجانب را باعث شدند، بی نهایت سپاسگزارم.

ارسطو بدویی دلفارد
اردیبهشت ۸۹

چکیده

حلال های آلی با کندن مولکول های آب از سطح پروتئین باعث تخریب نیروهای غیر کووالان و کاهش فعالیت و پایداری آنزیم می شوند. این آنزیم از یک باکتری هالوفیل ایرانی که از دریاچه نمک جداسازی شده است، بدست آمده است. بر اساس نتایج تکامل جهت دار و کریستالوگرافی در حضور حلال های آلی، جهش یافته های A195E و G203D برای افزایش قطبیت در نزدیکی جایگاه فعال طراحی شدند تا به حفظ لایه آب پوشی در این منطقه در برابر حلال های آلی DMF، متانول، ایزوپروپانول و پروپانول کمک کنند. A268P نیز برای پایدار سازی لوپ اطراف جایگاه فعال طراحی شد. جهش یافته A195E/A268P نیز برای بررسی این دو راهکار با هم طراحی گردید. نتایج نشان دادند که مقدار C_{50} (غلظتی از حلال آلی که در آن غلظت مقدار فعالیت آنزیمی به نصف کاهش یافته باشد) جهش یافته A195E به میزان ۵ و ۶ درصد در حضور حلال آلی DMF و متانول افزایش می یابد در حالی که در حضور ایزوپروپانول و پروپانول به میزان ۳ درصد افزایش می یابد. شیب غیر فعال شدن دمایی برایA195E حدود ($\times 10^{-3}$ min^{-1}) ۶۰ و ۱۳۰در حضور DMF و پروپانول گزارش می شود، در حالی که شیب غیر فعال شدن در همین شرایط حدود($\times 10^{-3}$ min^{-1}) ۹۰ و ۱۹۰ می باشد. جهش یافته های A268P و A195E/A268P شیب غیر فعال شدن دمایی آنزیم را به میزان قابل توجهی کاهش می دهند. از طرف دیگر کرامبین به عنوان پایدارترین پروتئین شناخته شده در حلال های آلی و PST-01 نیز به عنوان کاراترین پروتئاز در حلال های آلی مطرح هستند. آنالیز آماری رزیدوهای سطحی کرامبین ما را به این نکته رهنمون ساخت که تعداد رزیدوهای هیدروفوب در بیرونی ترین سطح این پروتئین بیشتر از رزیدوهای قطبی و بار دار است. با توجه به این یافته ها، رزیدوهای قطبی و باردار بیرونی ترین لایه پروتئین SVP با رزیدوهای هیدروفوب تر جایگزین شدند. برای تعیین نوع جایگزینی نیز از رزیدوهای هیدروفوب لایه های بیرونی این دو پروتئین مقاوم و کارا در حضور حلال های آلی (کرامبین و PST-01) استفاده شد. نتایج نشان دادند که حضور رزیدوی هیدروفوب در سطح پروتئین می تواند فعالیت، پایداری و کارایی کاتالیتیک آنزیم را در حضور حلال آلی افزایش دهد. در مقایسه با SVP، جهش یافته های N248G، S134Y و Y23V، k_{cat} و کارایی کاتالیتیک آنزیم را به میزان قابل توجهی افزایش داده و سرعت غیر فعال شدن دمایی آنزیم را نیز کاهش داده اند. این در حالی است که مطالعات ساختاری نشان می دهد این جهش یافته ها تغییرات ساختاری ایجاد نمی کنند. این نتایج آشکار می سازد که با افزایش هیدروفوبیسیته سطحی کارایی کاتالیتیک آنزیم با قدرت هیدروفوبیسیته حلال رابطه مستقیم دارد.

کلمات کلیدی: حلال آلی، متالوپروتئاز وابسته به روی، فعالیت، پایداری

فهرست

فصل اول: مقدمه

۱-۱ مقدمه..... ۲

۱-۲ اهمیت استفاده از آنزیم ها در حلال های آلی..... ۳

۱-۳ پارامترهای طبقه بندی حلال های آلی..... ۴

۱-۳-۱) Log P..... ۴

۱-۳-۲ Denaturation capacity (DC)..... ۵

۱-۴ سیستم های حلالی..... ۶

۱-۵ مشکلات استفاده از آنزیم ها در حلال های آلی..... ۷

۱-۵-۱ کاهش فعالیت آنزیم ها در حلال های آلی..... ۷

۱-۵-۱-۱ دلایل کاهش فعالیت آنزیم ها در حلال های آلی خالص..... ۷

۱-۵-۱-۲ دلایل کاهش فعالیت آنزیم ها در حلال های آبی– آلی..... ۸

۱-۵-۱-۳ تأثیر آب روی فعالیت آنزیم در حلال های آلی خالص..... ۹

۱-۶ پایداری آنزیم ها..... ۱۰

۱-۶-۱ پایداری پروتئین ها..... ۱۰

۱-۶-۱-۱ پایداری ترمودینامیکی..... ۱۰

۱-۶-۱-۲ پایداری سینتیکی..... ۱۱

۱-۶-۲ پایداری آنزیم ها در حلال های آلی- آبی..... ۱۲

۱-۶-۲-۱ مکانیسم واسرشتگی پروتئین ها در حلال های آلی..... ۱۲

۱-۶-۲-۲ مراحل واسرشتگی پروتئین ها در حلال های آلی..... ۱۳

۱-۶-۲-۳ بررسی پایداری پروتئین در درصدهای مختلف از حلال آلی..... ۱۴

۱-۶-۳ پایداری پروتئین ها در حلال های آلی خالص..... ۱۵

۱-۶-۴ مکانیسم آبپوشی پروتئین ها(Protein hydration)..... ۱۷

۱-۶-۴-۱ آبپوشی ترجیحی و مکانیسم های ایجاد کننده آن..... ۱۸

۱-۷ روش های پایدار سازی پروتئین ها در حلال های آلی..... ۲۰

۱-۷-۱ تغییرات شیمیایی در ساختار پروتئین..... ۲۰

۱-۷-۲ تغییرات فیزیکی..... ۲۰

۱-۷-۳ تثبیت..... ۲۱

۱-۷-۴ استفاده از افزودنی ها..... ۲۱
۱-۷-۵ مهندسی پروتئین ۲۱
۱-۷-۵ -1 استراتژی طراحی هدفمند..... ۲۳
۱-۸ مروری بر مطالعات انجام شده برای افزایش کارایی آنزیم ها در حلال های آلی..... ۲۴
۱-۹ آنزیم های خانواده ترمولیزین..... ۲۶
۱-۹-۱ مکانیسم عمل آنزیم های خانواده ترمولیزین..... ۲۷
۱-۹-۲ ناحیه hinge و اهمیت آن در فعالیت آنزیم های خانواده ترمولیزین..... ۲۸
۱-۱۰ هدف از رساله ۳۱

فصل دوم: مواد و روش ها

۲-۱ مواد شیمیایی..... ۳۲
۲-۲ میکروارگانیسم ها و محیط های کشت..... ۳۲
۲-۲-۱ میکروارگانیسم ها و پلاسمیدها..... ۳۲
۲-۲-۲ محیط های کشت میکروبی (gr/lit)..... ۳۲
۲-۲-۲-۱ محیط های کشت مورد نیاز برای رشد باکتری..... ۳۲
۲-۲-۳ ذخیره سازی طولانی مدت باکتری ها..... ۳۳
۲-۳ دستورزی ملکولDNA..... ۳۵
۲-۳-۱ جهش زایی هدفدار..... ۳۵
۲-۳-۱-۱ اصول روش Quick-change..... ۳۵
۲-۳-۱-۲ طراحی پرایمر..... ۳۶
۲-۳-۱-۳ واکنش PCR..... ۳۹
۲-۳-۱-۴ هضم مخلوط واکنش PCR با DpnI..... ۴۰
۲-۳-۱-۵ انتقال محصول هضم آنزیمی به میزبان XL1-blue..... ۴۰
۲-۳-۱-۶ تأیید ایجاد جهش مورد نظر در پلاسمید..... ۴۳
۲-۳-۱-۷ تعیین ترادف..... ۴۳
۲-۳-۲ روش انجام الکتروفورزDNA بر روی ژل آگارز ۴۳
۲-۴ بیان ژن پروتئاز نوع وحشی و انواع جهش یافته های ایجاد شده..... ۴۶
۲-۴-۱ انتقال پلاسمید pQE-80L نوترکیب به باکتری اشریشیا کولی (BL21 (DE3 ..... ۴۶
۲-۴-۲ فرآیند بیان..... ۴۶

۲-۴-۲-۱ القاء باکتری و بیان پروتئین نوترکیب..... ۴۶
۲-۵ تخلیص پروتئاز وحشی و انواع جهش یافته ها.....۴۷
۲-۵-۱ مواد و روشهای استفاده شده در تخلیص پروتئاز.....۴۷
۲-۵-۱-۱ رزین مورد استفاده در تخلیص آنزیم..... ۴۷
۲-۵-۱-۲ بافرهای لازم جهت دیالیز و تخلیص محلول آنزیمی.....۴۸
۲-۵-۲ تغلیظ با استفاده از آمیکون.....۴۸
۲-۵-۳ روش استفاده از رزین Q-Sepharose (HP) و تهیه ستون.....۴۷
۲-۵-۴ سنجش پروتئین.....۴۹
۲-۵-۵ بررسی میزان خلوص پروتئین نوترکیب با استفاده از روش الکتروفورز.....۴۹
۲-۵-۵-۱ الکتروفورز پروتئین ها به روش SDS-PAGE.....۴۹
۲-۶ آماده سازی پروتئین برای مطالعات آنزیمی..... ۵۲
۲- ۷ سنجش فعالیت آنزیمی.....۵۲
۲-۷-۱ سنجش فعالیت با سوبسترای سنتزی.....۵۲
۲-۷-۲ سنجش فعالیت با سوبسترای کازئین.....۵۲
۲-۷-۳ منحنی استاندارد ۵۲
۲-۸ مطالعات سینتیک آنزیمی.....۵۴
۲-۸-۱ محاسبه پارامترهای سینتیکی آنزیم در عدم حضور حلال های آلی..... ۵۴
۲-۸-۲ محاسبه پارامترهای کینتیکی آنزیم در حضور حلال های آلی.....۵۴
۲-۹ محاسبه تغییر ایجاد شده در انرژی پایدارسازی حالت گذار($\Delta\Delta G^{\ddagger}$) توسط جهش یافته ها.....۵۴
۲-۱۰ بررسی تغییرات فعالیت آنزیمی در حضور غلظت های مختلف حلال های آلی.....۵۵
۲-۱۱ بررسی غیر فعال شدن حرارتی برگشت ناپذیر.....۵۵
۲--۱۱-۱در عدم حضور حلال های آلی.....۵۵
۲-۱۱-۲ در حضور حلال های آلی..... ۵۶
۲-۱۲ بررسی پایداری آنزیم در حضور حلال های آلی در دمای اطاق..... ۵۶
۲-۱۳ مطالعات ساختاری.....۵۷
۲-۱۳-۱ مطالعه ساختاری بوسیله دورنگ نمایی دورانی در عدم حضور حلال آلی..... ۵۸
۲-۱۳-۲ بررسی ساختاری توسط دورنگ دورانی در حضور حلال های آلی.....۵۸
۲-۱۳-۳ بررسی فلورسانس ذاتی در عدم حضور حلال آلی.....۵۸
۲-۱۳-۴ بررسی فلورسانس ذاتی در حضور حلال های آلی.....۵۹

فصل سوم: نتایج

۳-۱ مدل سازی مولکولی و طراحی جهش ها..... ۶۱
۳-۱-۱ پایدارسازی لوپ سطحی در ناحیه اتصال سوبسترا و دور از جایگاه فعال..... ۶۴
۳-۱-۲ انطباق پذیری سطح پروتئین با حلال..... ۶۶
۳-۲ خالص سازی آنزیم SVP و جهش یافته ها..... ۶۹
۳-۳ مطالعات سینتیکی در عدم حضور حلال آلی..... ۷۰
۳-۴ بررسی ساختاری توسط دو رنگ نمایی دورانی (CD) و فلورسانس ذاتی..... ۷۱
۳-۵ بررسی فعالیت آنزیم SVP و جهش یافته ها در حضورحلال های آلی..... ۷۲
۳-۶ بررسی پایداری آنزیم SVP و جهش یافته ها در حضور حلال های آلی..... ۷۴
۳-۷ بررسی پایداری حرارتی برگشت ناپذیر SVP و جهش یافته ها در حضور حلال های آلی..... ۷۵
۳-۸ افزایش کارایی در حضور حلال های آلی با استفاده از راهکار دوم..... ۷۶
۳-۸-۱ بررسی ساختارSVP و جهش یافته ها در حلال های آلی توسط دو رنگ نمایی دورانی..... ۷۷
۳-۸-۲ بررسی ساختاریSVP و جهش یافته ها در حضور حلال های آلی توسط فلورسانس ذاتی..... ۷۸
۳-۸-۳ بررسی پایداری حرارتی برگشت ناپذیر آنزیم SVP و جهش یافته ها..... ۷۹
۳-۸-۴ بررسی فعالیت آنزیم SVP و جهش یافته ها در حضورحلال های آلی..... ۸۱
۳-۸-۵ بررسی پایداری آنزیم SVP و جهش یافته ها در حضور حلال های آلی..... ۸۵
۳-۸-۶ بررسی پایداری حرارتی برگشت ناپذیر SVP و جهش یافته ها در حلال های آلی..... ۸۶
۳-۸-۷ مطالعات سینتیکی در عدم حضور حلال آلی..... ۸۹
۳-۸-۸ مطالعات سینتیکی در حضور حلال های آلی با سوبسترای سنتزی (FAGLA)..... ۹۱
۳-۸-۹ مطالعات سینتیکی در حضور حلال های آلی با سوبسترای کازئین..... ۹۴

فصل چهارم: بحث..... ۹۷
۴-۱ بررسی علت کاهش فعالیت آنزیمی در حضور حلال های آلی..... ۹۸
۴-۲ مقایسه فعالیت آنزیم ترمولیزین و SVP در حضور حلال های آلی..... ۹۹
۴-۳ بررسی تاثیر جهش یافته ها ی ایجاد شده با استفاده از راهکار اول..... ۱۰۰
۴-۴ بررسی تاثیر جهش یافته ی پایدار کننده لوپ سطحی در اطراف ناحیه اتصال سوبسترا..... ۱۰۱
۴-۵ بررسی تاثیر جهش یافته ها ی ایجاد شده با استفاده از راهکار دوم..... ۱۰۲
۴-۵-۱ بررسی تاثیر جهش یافته ها در عدم حضور حلال های آلی..... ۱۰۳
۴-۵-۲ بررسی تاثیر جهش یافته ها در حضور حلال های آلی..... ۱۰۴

۴-۵-۲-۱ میزان تغییرات C_{50} جهش یافته ها نسبت به نمونه وحشی.....۱۰۴
۴-۵-۳ غیر فعال شدن حرارتی برگشت ناپذیر SVP نسبت به جهش یافته ها.....۱۰۵
۴-۵-۴ بررسی تاثیر جهش یافته ها روی کارایی کاتالیتیک آنزیم.....۱۰۶
۴-۵-۵ تاثیر جهش یافته ها در انرژی پایدارسازی حالت گذار($\Delta\Delta G^{\ddagger}$).....۱۱۰

پیشنهادات..... ۱۱۲
فصل پنجم: منابع..... ۱۱۳

فصل اول

مقدمه

۱-۱ مقدمه:

آنزیم ها سرعت کاتالیتیک بالایی دارند و به طور انتخابی عمل می کنند. این ویژگی در بیوتکنولوژی سنتزی اهمیت فوق العاده ایی دارد، ولی مشکل عمده استفاده از آنزیم ها در محیط آبی تولید محصولات جانبی ناخواسته ایی است که از خلوص محصول مورد نظر می کاهند. در حالی که در صنعت به ویژه صنایع داروسازی، خلوص بالای محصولات مورد نیاز است. بر این اساس استفاده از آنزیم ها در محیط حلال آلی به علت کاهش مقدار آب، محصولات جانبی ناخواسته را کاهش داده و از طرف دیگر تعادل ترمودینامیکی در جهت سنتز فراورده پیش می رود و بدینوسیله راندمان عمل آنزیم بالا می رود. پروتئازها مهمترین و پرمصرف ترین آنزیم های صنعتی هستند، به طوریکه ۶۰ درصد از بازار جهانی آنزیم های صنعتی به این گروه اختصاص دارد. موارد کاربرد این آنزیم ها بسیار گسترده و شامل صنایع شوینده، صنایع غذایی، صنایع دارویی و موارد متعدد دیگر می باشد. از جمله کاربردهای آن می توان به تولید آسپارتام[1] (آسپارتیل-فنیل آلانین-۱- متیل استر) به عنوان یک شیرین کننده مصنوعی اشاره کرد که دی پپتیدی است که از دو اسید آمینه آسپارتیک اسید و فنیل آلانین ساخته می شود که در نوشیدنی های رژیمی استفاده می شود. این ترکیب حدود ۱۸۰ بار شیرین تر از شکر است و حدود ۴ kcal/gr انرژی تولید می کند. استفاده از آنزیم در محیط آبی واکنش را به سمت هیدرولیز پیش می برد، در صورت کاهش مقدار آب واکنش در جهت عکس هیدرولیز پیش می رود. پس دست یابی به پروتئاز مقاوم به حلال آلی برای صنعت یک ضرورت است. از طرفی حلال های آلی با جدا کردن مولکول های آب پروتئین باعث تخریب ساختار سه بعدی و دناتوره شدن پروتئین می شوند و استفاده از آنها در محیط حلال آلی همواره با این چالش بزرگ همراه است (۱- ۴).

[1] Aspartame

۱-۲ اهمیت استفاده از آنزیم ها در حلال های آلی:

آنزیم ها در شیمی سنتزی به علت عملکرد انتخابی و سرعت بالای کاتالیز از جایگاه ویژه ایی برخوردار هستند. در شیمی سنتزی برای بالابردن قدرت انتخابگری، آنزیم ها را در حضور حلال های آلی استفاده می کنند. به ویژه اینکه انتخابگری در سنتز ترکیبات دارویی، حدواسط های کایرال، پلیمرهای مخصوص و سایر ترکیبات زیستی اهمیت فوق العاده ایی دارد. حلال های آلی می توانند ساختار دوم و سوم و چهارم را تغییر داده و به داخل جایگاه فعال آنزیم نفوذ کرده و تعادل شیمیایی و ساختاری مطلوب آنزیم را تغییر دهند. این پدیده باعث انتخابگری بالا و کاتالیز کارآمد و تغییر در فعالیت ترمودینامیکی آنزیم، سوبسترا و محصول نسبت به حلال آلی می شود. بررسی میانکنش های پروتئین با حلال های آلی اطلاعات کامل تری را راجع به ساختار پروتئین در اختیار قرار می دهد که به MSCS[1] معروف است و مطالعه حلال ها بر روی ساختار پروتئین در کریستال می پردازد و در آخر نقشه ای از میانکنش ها بین پروتئین و حلال آلی بدست می آید که کاربردهای زیادی همچون طراحی مهارکننده برای پروتئین های مورد نظر دارد (۵-۸).

به طور کلی از جمله مزیت های استفاده از آنزیم ها در حضور حلال های آلی می توان به موارد زیر اشاره کرد:

۱- افزایش حلالیت سوبستراهای غیرقطبی

۲- تغییر جهت تعادل ترمودینامیکی به سمت سنتز به جای هیدرولیز

۳- محدود شدن واکنش های جانبی وابسته به آب

۴- تغییر در سوبسترا و انتخابگری کایرالیته[2] مورد نیاز در صنایع شیمیایی و دارویی

۵- به علت نامحلول بودن آنزیم ها در حلال های آلی اغلب به تخلیص نیازی نیست

[1] Multiple Solvent Crystal Structure
[2] Enantioselectivity

۶- آنزیم ها را با فیلتراسیون ساده می توان دوباره بدست آورد

۷- جدا کردن محصول از حلال های با فشار تبخیر بالا و دمای جوش پائین

۸- افزایش پایداری دمایی

۹- حذف آلودگی میکروبی

۱۰- آنزیم ها را می توان به طور مستقیم در فرایند شیمیایی بعدی یا جدیدی مورد استفاده قرار داد.

۱-۳ پارامترهای طبقه بندی حلال های آلی

طبقه بندی حلال های آلی براساس پارامترهای مختلف شیمی- فیزیکی همچون پلاریته حلال، Log P حلال و ثابت دی الکتریک حلال صورت می گیرد.

۱-۳-۱ Log P:

مقدار حلالیت یک حلال در n- اکتانول نسبت به حلالیت آن در آب می باشد.

$$\text{Log P} = \text{Log}\frac{[Material]_{n-octanol}}{[Material]_{H_2O}} \qquad (۱-۱)$$

با افزایش Log P آبگریزی[1] حلال بالا می رود و با کاهش آن آبدوستی[2] افزایش می یابد. با توجه به اینکه حلال های غیر قابل امتزاج با آب آبگریز هستند و حلال های قابل امتزاج با آب، آبدوست هستند، بنابراین

[1] Hydrophobicity
[2] Hydrophilicity

دیده می شود که قابل امتزاج بودن و یا غیر قابل امتزاج بودن یک حلال می تواند توسط Log P تعیین گردد.

جدول ۱-۱) رابطه مقدار حلالیت حلال آلی با Log P حلال

Log P	Solubility in water (20ºC) (Wt %)
Log P<2	>0.4
2< Log P<4	0.04-0.4
Log P>4	<0.04

۱-۳-۲ Denaturation capacity (DC):

این پارامتر توسط Khmelnitsky و همکاران ارائه گردید (۹). این گروه با مطالعه حلال های آلی مختلف و با انتخاب یک حلال به عنوان حلالی که اثری روی واسرشته شدن پروتئین ندارد که به آن DC صفر دادند (فورمامید) و حلالی که بیشترین قدرت واسرشته کنندگی را داشت (تتراهیدرفوران) که به آن DC صد را دادند، بقیه حلال ها را نسبت به آن سنجیدند.

$$DC_x = \frac{\log(\frac{W_{50}}{c^n{}_{50}})_{x,calc} - \log(\frac{W_{50}}{c^n{}_{50}})_{FA,calc}}{\log(\frac{W_{50}}{c^n{}_{50}})_{THF,calc} - \log(\frac{W_{50}}{c^n{}_{50}})_{FA,calc}} x100 \qquad (۲-۱)$$

W_{50} مقدار آبی است که در هنگام ۵۰٪ واسرشتگی پروتئین در محیط موجود می باشد و c_{50} مقدار غلظتی از حلال را نشان می دهد که باعث ۵۰٪ واسرشتگی پروتئین می گردد. $n = \frac{d}{b}$ که این نسبت نشان می دهد که چه مقدار آب بوسیله یک مولکول حلال آلی از سطح پروتئین جابجا شده است. FA هم مخفف فورمامید

بعنوان حلالی که کمترین اثر واسرشته کننده را دارد و THF هم مخفف تتراهیدروفوران است. هر چقدر DC یک حلال بیشتر باشد قدرت دناتوره کنندگی آن بیشتر می گردد.

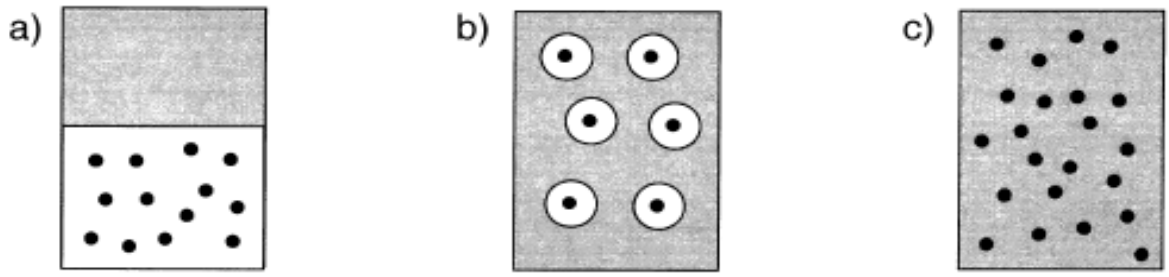
۱-۴ سیستم های حلالی:

سه نوع سیستم حلالی در شکل ۱-۱ نشان داده شده است (۵).

a) سیستم دو فازی: آنزیم ها و ترکیبات هیدروفیل در فاز آبی (جایی که واکنش اتفاق می افتد) هستند در حالی که ترکیبات هیدروفوب اکثرا در فاز آلی قرار می گیرند.

b) سیستم میسل معکوس[1]: مولکول های آنزیم در میسل های معکوس، هیدراته شکل گرفته توسط سورفاکتانت[2] ها احاطه شده اند. این میسل ها درون فاز پیوسته ایی از یک حلال آلی هیدروفوب قرار دارند.

c) آنزیم در حالت جامد (به عنوان مثال لیوفیلیزه یا چسپیده به یک سطح) در یک حلال آلی و در حضور مقدار آب مورد نیاز برای کاتالیز غوطه ور می شود.



شکل۱-۱) سه نوع سیستم حلالی

[1] Reverse missle
[2] Surfactant

جدول ۱-۲) مزایا و معایب سیستم های مونوفازی و دوفازی

سیستم	مزایا	معایب
تک فازی	چون سیستم همگن است محدودیت انتشار سوبسترایی وجود ندارد.	به علت تماس مستقیم آنزیم با حلال دناتوراسیون اتفاق می افتد.
دو فازی	**۱-** اگر محصول آنزیمی قابل حل در حلال آلی باشد از محیط واکنش آنزیمی خارج خواهد شد **۲-** چون تماس مستقیم بین آنزیم وحلال وجود ندارد پس دناتوراسیون اتفاق نمی افتد.	۱- چون سیستم نا همگن است پس محدودیت انتشار سوبسترایی وجود دارد ۲- در حد فاصل دو فاز دناتوراسیون آنزیمی رخ می دهد.

۱-۵ مشکلات استفاده از آنزیم ها در حلال های آلی

۱-۵-۱ کاهش فعالیت آنزیم ها در حلال های آلی

۱-۵-۱-۱ دلایل کاهش فعالیت آنزیم ها در حلال های آلی خالص (۱۰):

۱- فاکتور انتشاری آنزیم و سوبسترا

۳- قابل دسترس بودن آنزیم در حالت لیوفیلیزه و یا CLEC[1] در داخل حلال آلی که به صورت سوسپانسیون است و در این دو حالت جایگاه فعال مولکول آنزیم می تواند توسط مولکول های آنزیم دیگر بلوکه شود و در نتیجه از فعالیت آنزیم کاسته می شود (۱۱).

[1] Cross- Linked Enzyme Crystal