SID

فیلم های آموزشی

عضویت در خبرنامه

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

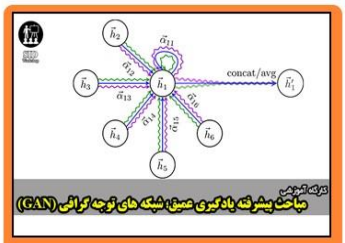
کارگاه های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی

سرویس های ویژه

کارگاه های آموزشی مرکز اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی

کارگاه آنلاین آشنایی با پایگاه های اطلاعات علمی بین المللی و ترفند های جستجو



مباحث پیشرفته یادگیری عمیق؛ شبکه های توجه گرافی (Graph Attention Networks)

کارگاه آنلاین مقاله نویسی IEEE و ISI ویژه فنی و مهندسی

Archive of SID

غربالگری پروتئاز باکتریایی گرما دوست از چشمه های آب گرم استان کرمان

مصطفی امیری بهرامی[۱]، ارسطو بدویی دلفارد[*۲]، محمد علی ابراهیمی[۳]، علی ریاحی مدوار[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور تهران

[*] ۲- عضو هیئت علمی گروه زیست شناسی دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان

۳- عضو هیئت علمی گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور تهران

۴- عضو هیئت علمی گروه بیوتکنولوژی مرکز بین المللی علوم، تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی

چکیده

پروتئازها مهمترین و پرمصرف ترین آنزیم های صنعتی هستندکه در صنایع شوینده، غذایی، دارویی و موارد متعدد دیگر کاربرد دارند. در این تحقیق از چشمه آب گرم با دمای ۶۲ نمونه برداری شد و باکتری های مولد پروتئاز روی محیط اختصاصی (SKM)جدا سازی شدند. آنزیم خارج سلولی بهترین گونه باکتریایی در حضور سوبسترای کازیین تحت مطالعات آنزیمی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در گستره دمایی۱۰۰-۲۰ فعالیت پروتئازی وجود دارد که بیشترین آن در دمای 70°C گزارش می شود. پایداریی دمایی نیز در دماهای ۵۰، ۶۰ و ۷۰ درجه به مدت ۳ ساعت انکوباسیون نشان داد که این آنزیم در دمای ۵۰ درجه ۹۵درصد فعالیت آنزیمی خود را حفظ می کند.

کلمات کلیدی: پروتئاز گرمادوست، غربال گری، ، فعالیت آنزیمی، پایداری آنزیمی

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

موجودات زنده به لحاظ دارا بودن کاتالیزورهای زیستی که اصطلاحاً آنزیم نامیده می شوند قادر به کسب انرژی از محیط و مصرف سریع آن می باشند و برای عمل آنها مقدار جزئی از آن ها مورد نیاز است. منابع تولید آنزیم ها بسیار متنوع است از جمله گیاهان، جانوران و کلیه میکرو ارگانیسم ها. از این بین آنزیم های میکروبی بیشترین کاربرد صنعتی را دارند. زیرا تولید آنها ارزان تر بوده و دستکاری ژنتیکی آنها راحت تر می باشد. از جمله میکروبهایی که قابل تجاری شدن دارند، می توان به باکتری های Bacillus و Pseudomonas اشاره کرد.

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

پروتئاز ها پیوندهای پپتیدی بین واحدهای سازنده پلیمرها و آلودگی های پروتئینی را هیدرولیز کرده و حذف این ترکیبات را با سرعت بالایی انجام می دهند. از بین تمامی پروتئاز ها آنزیم های خانواده پروتئاز قلیایی بعنوان آنزیم های کارا در صنعت شوینده ها شناخته شده اند که علاوه بر افزایش قدرت پاک کنندگی دارای فواید زیست محیطی با کاهش مصرف انرژی با زمان شستشوی کوتاهتر و در دمای کمتر و کاهش میزان مصرف آب می باشند.

مواد و روش ها

۱- غربلگری باکتری مولد پروتئاز:

از چشمه آب گرم ۶۲ درجه نمونه برداری شد و در آزمایشگاه روی محیط اختصاصی (SKM) کشت داده شدند. باکتری که بیشترین هاله را پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون نشان می داد بعنوان سوش بهینه انتخاب گردید.

۲- تولید آنزیم:

محیط پیش کشت (preculture medium) شامل:

Nutrient broth 8: meat extrct 10: soyameal 17: peptone 10; tryptone 10;

www.SID.ir

Archive of SID

محیط کشت تولید Yeast (pH=6.8). NaCl: 5 extraet 17: tryptone NaCl 5.

بین زمان های ۵۴-۴۶ ساعت پس از تلقیح محیط تولید بوسیله محیط پیش کشت، محیط کشت حاوی باکتری آمونیوم سولفات به محلول رویی در حال هم زده شدن اضافه شد تا به ۸۵٪ درجه اشباع برسد. سپس به مدت ۴ ساعت در دمای ۴°C قرار گرفت و بعد از سپری شدن این زمان در دمای ۴°C در ۱۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شده و رسوب حاصل در حداقل حجم بافر ۲۰mM فسفات pH ۶/۸ حل شد محلول پروتئینی غلیظ شده حاوی فعالیت پروتئازی، حداقل دوبار در دمای ۴°C درحضور این بافر دیالیز شد.

۴- بررسی فعالیت پروتئازی:

فعالیت پروتئازی با استفاده از سوبسترای کازیین به عنوان سوبسترای طبیعی، مورد مطالعه قرار گرفت. هیدرولیز کازیین توسط محلول آنزیمی با اندازه گیری جذب در ۲۸۰ نانومتر به روش نقطه پایان اندازه گیری شد. محلول واکنش (500µl) شامل ۲۵۰ میکرولیتر بافر تریس۵۰ میلی مولار با pH 8، ۲۰۰ میکرولیتر محلول کازیین ۲ درصد بود و ۵۰ میکرولیتر محلول انزیمی بود. این محلول به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه انکوبه گردید. سپس ۵۰۰ میکرولیتر محلول ۱۰ درصد TCA تکثیر یافته را به مدت ۴°C در ۵۰۰۰g سانتریفوژ کرده و به محلول رویی که به ظرف دیگری منتقل شده بود، محلول PMSF (حل شده در متانل) اضافه شد طوری که غلظت نهایی آن در محیط ۱mM باشد. افزوده گردید و در دور ۱۲۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده شد. جذب محلول رویی در طول موج ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری گردید. در تمامی واکنش ها از محلول شاهد استفاده گردید که قبل از افزودن آنزیم محلول TCA اضافه می شد.

۵- بررسی فعالیت آنزیمی در دمای مختلف

فعالیت آنزیمی طبق روش استاندارد انجام شد با این تفاوت که در هر با از یک دمای انکوباسیون متفاوت (20-90) استفاده گردید.

۶- بررسی پایداری آنزیمی

آنزیم ها را در دماهای ۵۰، ۶۰ و ۷۰ انکوبه شده و در زمان های ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰ و ۱۸۰ پس از انکوباسیون نمونه برداری صورت گرفت و در یخ قرار داده شدند. سپس میزان فعالیت آنزیمی باقی مانده اندازه گیری شد.

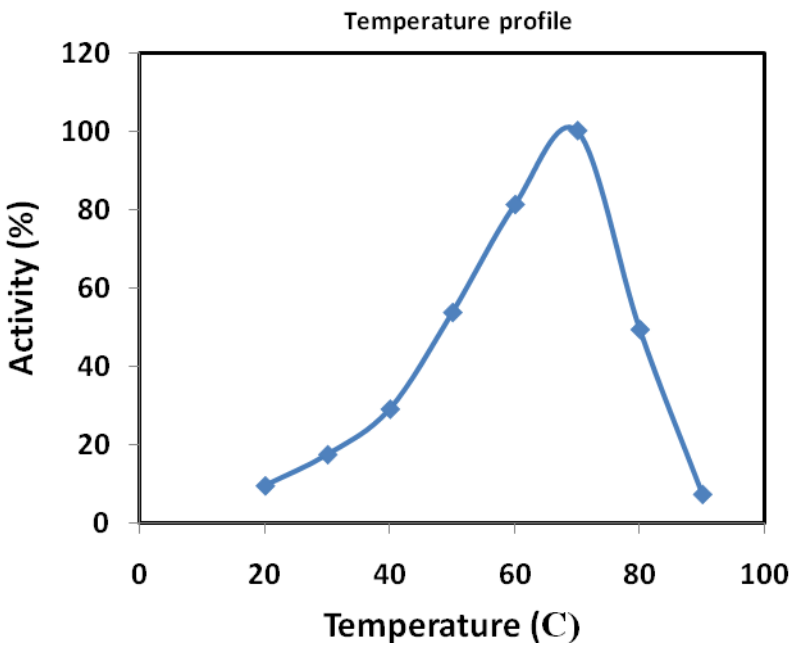
www.SID.ir

Archive of SID

نتایج و بحث

۱- بررسی فعالیت آنزیمی در دماهای مختلف

میزان فعالیت آنزیمی در دمای ۲۰ تا۱۰۰ اندازه گیری شد که در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان می دهد که این آنزیم در گستره دمایی ۲۰ تا ۹۰ درجه سانتی گراد فعال می باشد و بیشترین فعالیت در دمای ۷۰-۶۰ درجه سانتیگراد می باشد که این فعالیت به زیستگاه طبیعی باکتری که در دمای ۶۲ است نزدیک می باشد. این ویژگی قابلیت استفاده از این آنزیم گرمادوست را در صنعت نشان می دهد.



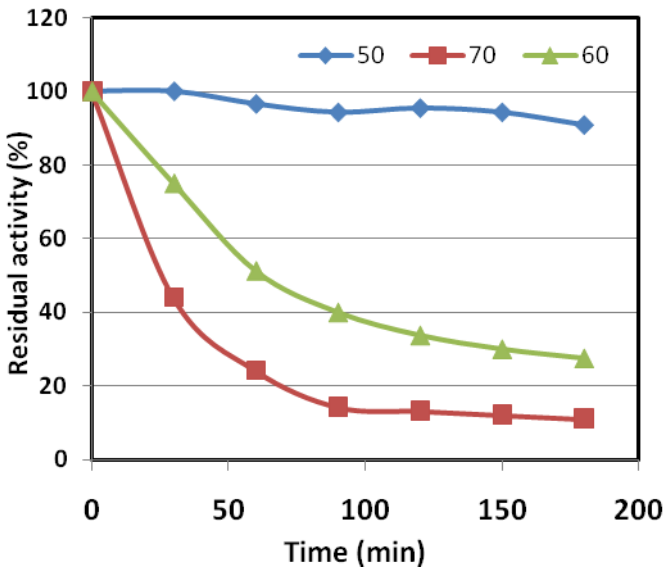
شکل ۱، میزان فعالیت آنزیمی را در زمان های مختلف نشان می دهد، نتایج خاطر نشان می سازد که این آنزیم بیشترین فعالیت را در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد نشان می دهد.

۲- بررسی پایداری دمایی

میزان فعالیت آنزیمی باقی مانده پس از انکوباسیون در دماهای ۵۰، ۶۰ و ۷۰ درجه سانتی گراد اندازه گیری شد. نتایج در شکل ۲ نشان می دهد که این آنزیم پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در ۷۰ درجه سانتی گراد و ۶۰ دقیقه انکوباسیون در ۶۰ درجه سانتی گراد، ۵۰ درصد فعالیت اولیه خود را از دست می دهد. علاوه بر این این آنزیم قادر است پس از ۳ ساعت انکوباسیون در ۵۰ درجه سانتی گراد فعالیت آنزیمی خود را به میزان ۹۵ درصد حفظ کند.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۲، پایداری دمایی آنزیم را در زمان های متفاوت انکوباسیون در دماهای ۵۰، ۶۰ و ۷۰ درجه سانتی گراد نشان می دهد. این نتایج خاطر نشان می سازند که این آنزیم بیش از ۹۵ درصد فعالیت خود را پس از ۳ ساعت انکوباسیون در ۵۰ درجه سانتی گراد حفظ می کند.

References

1.Karbalaei-Heidari HR, Ziaee AA, Schaller J, Amoozegar MA. Purification and characterization of an extracellular haloalkaline protease produced by the moderately halophilic bacterium, Salinivibrio sp. strain AF-2004. Enzyme Microb Technol 2007;40: 266-72.

2. Ram Karan, S.P. Singh, Sanjay Kapoor and S.K. Khare, A novel organic solvent tolerant protease from a newly isolated Geomicrobium sp. EMB2 (MTCC 10310): production optimization by response surface methodology, New Biotechnology, 2011, 28, (2): 117-1125

3. Kunal Shah, Kalpana Mody, Jitendra Keshri, Bhavanath Jha, Purification and characterization of a solvent, detergent and oxidizing agent tolerant protease from Bacillus cereus isolated from the Gulf of Khambhat, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2010: 67, 85–91.

4. Moradian, F, Khajeh, Kh, Naderi-manesh, H, Ahmadvand, R, Sajedi, R H. and Sadeghizade M. Thiol-Dependent Serine Alkaline Proteases From Bacillus sp. HR-08 and KR-8102: Isolation, Production, and Characterization, Applied Biochemistry and Biotechnology, 2006, 134, 77-87.

www.SID.ir

Archive of SID

چکیده انگلیسی:

Screening of thermostable bacterial protease for Hot springs in Kerman

Mostafa Amiri-Bahrami[1], Arastoo Badoei-Dalfard[*2, 4], Mohammad Ali Ebrahimi[3], Ali Riahi-Madvar[4]

1- Student of agriculture biotechnology, payam-noor Tehran, Tehran, Iran
2- Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran
3- Department of agricultural biotechnology, payam-noor Tehran, Tehran, Iran
4- International center for science and high technology and environmental science, Mahan, Iran

Abstract

Proteases are the important and high-consuming industrial enzymes which has application in detergent, food and so on. In this study sample were picked up from hot spring which has 62C and protease producing bacteria screened on SKM media. Extra cellular enzyme from the best bacteria characterized in the presence of casein. Results show that protease activity in the 20-100 C, which has maximum activity in 70 C. Thermal stability in the 50, 60 and 70 C for 3h show that this enzyme has at least 95% of it,s activity in this condition.

Key words: Thermo-stable protease, screening, enzyme activity, enzyme stability

www.SID.ir

SID

فیلم های آموزشی

عضویت در خبرنامه

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

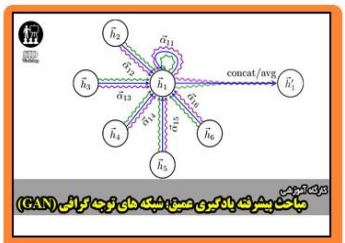
کارگاه های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی

سرویس های ویژه

کارگاه های آموزشی مرکز اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی

کارگاه آنلاین آشنایی با پایگاه های اطلاعات علمی بین المللی و ترفند های جستجو



مباحث پیشرفته یادگیری عمیق؛ شبکه های توجه گرافی (Graph Attention Networks)

کارگاه آنلاین مقاله نویسی IEEE و ISI ویژه فنی و مهندسی