بنام خداوند جان و خرد

۲۵۷۳۸

۱۳۷۸ ۴۰

مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران
تقدیم مدارک

دانشگاه شهید بهشتی

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه

جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته میکروبیولوژی

موضوع:

جداسازی باکتریهای تولیدکننده پروتئاز از نمونه های محیطی و بهینه سازی تولید پروتئاز در این باکتریها

اساتید راهنما:

سرکار خانم دکتر فرشته افتخار

آقای دکتر جمشید فولادی

نگارش:

مهرزاد فقیهی

زمستان ۱۳۷۷

۳۵۲۱ /۲

۲۵۷۳۸

تقدیم به:

پدر و مادر عزیزم

و برادرانم مسعود و فرشید

تقدیم به:

دکتر مسعود محمودیان

تقدیم به:

دکتر فرشته افتخار

تقدیم به:

دکتر جمشید فولادی

تقدیم به:

دایی عزیزم

آقای منصور فقیهی نژاد

با سپاس فراوان از :

پدر و مادر عزیزم
برادرانم: مسعود و فرشید

از کلیه افرادی که من را در این پایان نامه یاری دادند تشکر می کنم:

اساتید گرامی:
خانم دکتر فرشته افتخار، آقای دکتر جمشید فولادی
آقای دکتر مسعود محمودیان
آقای دکتر ریاحی، آقای دکتر آذین، خانم دکتر مالک، آقای دکتر حسینی
آقای دکتر شکرچی، خانم دکتر غروی، آقای دکتر شعیبی، آقای دکتر شعبانی

کارشناسان محترم:
خانم پور رحیمی، خانم شیمی، خانم نریمان، خانم لندرانی، خانم مبشری، خانم عبدی

کارکنان دانشگاه شهید بهشتی و دانشگاه الزهرا:
خانم آذین، خانم سمیعی، خانم آقا بیگی، خانم سجادی، آقای رستگار، آقای بهمنی

مسئولین کتابخانه های:
دانشگاه شهید بهشتی، دانشگاه ایران، دانشگاه تهران، مرکز IBB، مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی

دوستان و یاران گرامی:
آقایان: رهبر، زارع، سلیمانی، مسدد، یعقوبی، ژاله رخ، فخار
خانمها: بت عیشو، خادم، فزونی، نوشین فقیهی نژاد

چکیده:

پروتئازهای قلیایی گروه مهمی از آنزیمهای مورد استفاده در صنعت می باشند. استفاده از این آنزیمها در صنایع تولید شوینده ها و تهیه چرم متمرکز شده است. در جستجو برای جداسازی باکتریهای تولیدکننده پروتئاز از نمونه های شیر خام، آب پنیر و خاک، ۴ باکتری قلیادوست از خاک جداسازی شده و فعالیت پروتئازی آنها مقایسه شد. فعالیت پروتئازی با استفاده از کازئین به عنوان سوبسترا اندازه گیری شد. از این چهار باکتری، یک باکتری گرم مثبت، هوازی، اسپوردار و قلیادوست که دارای بیشترین فعالیت پروتئازی بود انتخاب شده و به نام Alkalophilic *Bacillus* sp. تعیین هویت شد. شرایط بهینه برای تولید پروتئاز در این باکتری تعیین شد. بیشترین تولید پروتئاز پس از ۷۲ ساعت کشت در pH ۱۱ و دمای ۳۵ درجه سانتیگراد در محیط کشت حاوی ۱۰ گرم بر لیتر گلوکز، ۵ گرم برلیتر پپتون، ۱۰ گرم بر لیتر عصاره مخمر، ۱ گرم بر لیتر KH_2PO_4 و ۰/۲ گرم بر لیتر $MgSO_4 , 7 H_2O$ بدست آمد. pH و دمای بهینه برای فعالیت پروتئازی به ترتیب ۱۱ و ۴۵ درجه سانتیگراد اندازه گیری شد.

فهرست مطالب

۱-۱- مقدمه: ۱

۱-۲- اعمال پروتئازها: ۳

۱-۲-۱- خصوصیات کلی: ۳

۱-۲-۲- بازیابی پروتئین: ۴

۱-۲-۳- اسپور سازی: ۵

۱-۲-۴- تندش اسپور: ۶

۱-۲-۵- بلوغ (Maturation) و تغییر در آنزیمها قبل از ترشح: ۷

۱-۲-۶- پروتئازهای خارج سلولی: ۸

۱-۳- کنترل فعالیت پروتئازی ۹

۱-۳-۱- پروتئازهای داخل سلولی: ۹

۱-۳-۲- پروتئازهای خارج سلولی: ۱۰

۱-۴- خصوصیات پروتئازهای میکروبی: ۱۰

۱-۴-۱- سرین پروتئازها: ۱۱

۱-۴-۲- سیستئین پروتئازها: ۱۴

۱-۴-۳- اسپارتیک پروتئازها: ۱۶

۱-۴-۴- متالوپروتئازها: ۱۷

۱-۴-۵- سرین پروتئازهای مهم: ۲۰

۱-۵- تشخیص پروتئازها: ۲۷

۱-۶- کاربرد پروتئازها: ۲۸
۱-۶-۱- کاربردهای عمومی: ۲۸
۱-۶-۲- تولید صنعتی پروتئازهای خارج سلولی: ۲۹
۱-۶-۳- کاربرد پروتئازها در شوینده ها: ۳۳
۱-۶-۴- کاربردهای دیگر پروتئازهای قلیایی: ۳۹
۱-۷- اهداف: ۴۰
۲-۱- مواد: ۴۱
۲-۱-۱- محیط های کشت: ۴۱
۲-۱-۱-۱- محیط های جداسازی: ۴۱
۲-۱-۱-۲- محیط کشت تشخیص پروتئاز: ۴۲
۲-۱-۱-۳- محیط کشت برای تولید آنزیم: ۴۳
۲-۱-۱-۴- محیط کشت با pH های مختلف: ۴۳
۲-۱-۱-۵- محیطهای کشت برای تعیین هویت باکتریها: ۴۴
۲-۱-۲- محلولها: ۴۵
۲-۱-۲-۱- محلول واکنش آنزیمی: ۴۵
۲-۱-۲-۲- محلول متوقف کننده: ۴۶
۲-۲- دستگاه ها: ۴۶
۲-۳- روش کار: ۴۶

۲-۳-۱- نمونه های شیر خام و آب پنیر: ۴۶

۲-۳-۲- نمونه های خاک: ۴۸

۲-۳-۳- نگهداری باکتریهای خالص شده: ۴۹

۲-۳-۴- اندازه گیری و مقایسه قدرت پروتئازی باکتریها: ۴۹

۲-۳-۵- منحنی استاندارد تیروزین: ۵۱

۲-۳-۶- بهینه سازی تولید پروتئاز : ۵۱

۲-۳-۷- تعیین pH و دمای بهینه برای فعالیت پروتئاز: ۵۲

۲-۳-۸- تعیین هویت باکتری: ۵۳

۳- نتایج: ۵۶

۳-۱- نمونه های شیر خام و آب پنیر: ۵۶

۳-۲- نمونه های خاک: ۶۰

۳-۳- منحنی استاندارد تیروزین برای اندازه گیری فعالیت پروتئازی: ۶۵

۳-۴- مقایسه فعالیت پروتئازی باکتریها: ۶۷

۳-۵- بهینه سازی تولید پروتئاز در باکتریL2 : ۶۸

۳-۶- تعیین pH و دمای بهینه برای فعالیت پروتئاز: ۸۶

۳-۷- تعیین هویت باکتری: ۹۰

۴- بحث: ۹۲

۵- منابع: ۹۷

مقدمه

۱-۱- مقدمه:

حدود ۲۰ سال قبل پروتئازها را به عنوان آنزیمهای تجزیه کننده ای معرفی کردند که فقط می توانند هیدرولیز کلی پروتئینها را انجام دهند. پیشرفتهای اخیر در روشهای اندازه گیری و استفاده از سوبستراهای اختصاصی مشخص کرده است که آنزیمهای هیدرولیز کننده پروتئین تغییرات انتخابی و خیلی اختصاصی را در پروتئینها با هیدرولیز محدود انجام می دهند. بعلاوه، پروتئازها نقش مهمی را در آزمایشگاه و کلینیک و همچنین در فرآیندهای صنعتی ایفاء می کنند. کشف پروتئازهای خیلی اختصاصی و جدید و صنعت بهینه سازی آنزیمها، مانند تثبیت آنزیمها و روشهای خالص سازی جدید، آنزیمهای میکروبی را در بیوتکنولوژی بیش از پیش جذاب می کند. توسعه وتغییر روشها و سیستمهای صنعتی موجود می تواند به عنوان مهمترین عامل در افزایش کاربرد صنعتی پروتئازها مطرح باشد.

پروتئازها از دهه ۱۹۶۰ به عنوان مواد افزودنی به شوینده ها مطرح شدند و استفاده تجارتی از آنها به سرعت توسعه پیدا کرد. به عنوان مهمترین آنزیمهای صنعتی، پروتئازها حدود ۶۰ درصد کل تجارت آنزیمها را شامل می شوند (جدول شماره ۱-۱) که دوسوم پروتئازهای تجارتی تولید شده منشاء میکروبی دارند. از مهمترین پروتئازهای میکروبی که به صورت تجارتی موجود می باشند، پروتئازهای قلیایی حاصل از *Bacillus licheniformis* هستند که در تولید شوینده ها استفاده می شوند، پروتئازهای حاصل از