بسم الله الرحمن الرحيم

عنوان | **فهرست مطالب** | صفحه

فصل اول: مقدمه و هدف

۱-۱-مقدمه ۲

۱-۲-هدف از اجرای تحقیق ۴

فصل دوم: مروری بر منابع

۲-۱-آنزیم‌ها ۶

۲-۱-۱-ساختمان آنزیم‌ها ۶

۲-۱-۲-طبقه‌بندی آنزیم‌ها ۷

۲-۲-اهمیت فسفر ۸

۲-۳-فیتیک اسید ۹

۲-۳-۱-خصوصیات فیتات ۱۳

۲-۳-۲-مکانیسم هیدرولیز فیتات ۱۴

۲-۳-۳-کاربردهای فیتیک اسید ۱۵

۲-۴-فیتیک اسید در سبوس برنج ۱۷

۲-۵-آنزیم فیتاز ۱۷

۲-۵-۱-ساختارهای کریستالی فیتاز ۲۳

۲-۵-۲-منابع فیتاز ۲۴

۲-۵-۲-۱-فیتاز گیاهی..... ۲۴

۲-۵-۲-۲-فیتاز میکروبی..... ۲۵

۲-۵-۲-۳-فیتاز موکوسی مشتق شده از روده کوچک..... ۲۵

۲-۵-۲-۴-فیتاز میکروفلور روده..... ۲۵

۲-۵-۳-دسته‌بندی فیتازها..... ۲۶

۲-۵-۴-کاربرد آنزیم فیتاز..... ۲۸

۲-۶-پایدارسازی باکتری‌ها یا قارچ‌های مولد فیتاز و آنزیم‌های آن‌ها..... ۳۰

۲-۷-بهینه‌سازی..... ۳۱

۲-۸-مروری بر مطالعات دیگران..... ۳۲

فصل سوم: مواد و روش کار

۳-۱-مواد و وسایل..... ۳۶

۳-۱-۱-مواد مصرفی..... ۳۶

۳-۱-۲-وسایل و تجهیزات..... ۳۹

۳-۲-تهیه محیط کشت‌های مورد استفاده و سوبسترا..... ۴۰

۳-۲-۱-تهیه و تعیین کیفیت فیتیک اسید..... ۴۰

۳-۲-۱-۱-جداسازی و خالص‌سازی فیتیک اسید از سبوس گندم..... ۴۰

۳-۲-۱-۲-جداسازی و خالص‌سازی فیتیک اسید از سبوس برنج..... ۴۱

۳-۲-۱-۳-تعیین کمی خلوص فیتیک اسید ۴۱
۳-۲-۱-۴-تشخیص کیفی فیتیک اسید تهیه شده با FTIR ۴۲
۳-۲-۲-محیط کشت‌های مورد استفاده ۴۲
۳-۲-۲-۱-محیط کشت غنی‌سازی باکتری‌های تولیدکننده فیتاز ۴۲
۳-۲-۲-۲-محیط کشت مورد استفاده برای غربالگری باکتری‌های تولیدکننده فیتاز ۴۲
۳-۲-۳-روش تهیه رنگ‌ها، بافرها، معرف‌ها و محلول‌های مورد استفاده ۴۳
۳-۲-۳-۱-روش تهیه محلول سوبسترا ۴۳
۳-۲-۳-۲-روش تهیه بافر مورد استفاده در سنجش آنزیمی ۴۳
۳-۲-۳-۳-روش تهیه معرف رنگی مولیبدات ۴۴
۳-۲-۳-۴-محلول آمونیوم مولیبدات ۴۴
۳-۲-۳-۵-محلول آمونیوم وانادات ۴۴
۳-۲-۳-۶-نحوه آماده‌سازی محلول برادفورد ۴۴
۳-۲-۳-۷-تهیه رنگ کریستال ویوله ۴۴
۳-۲-۳-۸-تهیه محلول رنگی سافرانین ۴۵
۳-۲-۳-۹-تهیه محلول لوگل ۴۵
۳-۲-۳-۱۰-تهیه بافر TAE(5X) ۴۵
۳-۲-۳-۱۱-تهیه ژل آگارز یک درصد ۴۵

۳-۲-۳-۱۲-بافر استات سدیم- استیک اسید ۴۶
۳-۲-۳-۱۳-بافر Tris-HCl ۴۶
۳-۲-۳-۱۴-بافر گلیسین-NaOH ۴۶
۳-۲-۳-۱۵-دستور تهیه‌ی محلول و بافرهای الکتروفورز SDS-PAGE ۴۶
۳-۲-۳-۱۵-۱-آکریلامید ۳۰ درصد ۴۶
۳-۲-۳-۱۵-۲-محلول‌های تریس ۴۷
۳-۲-۳-۱۵-۳-محلول ۱۰ درصد SDS ۴۷
۳-۲-۳-۱۵-۴-بافر حرکت کننده ۴۷
۳-۲-۳-۱۵-۵-بافر نمونه ۴۷
۳-۲-۳-۱۵-۶-محلول رنگ کوماسی ۴۸
۳-۲-۳-۱۵-۷-محلول رنگ‌بر ۴۸
۳-۲-۳-۱۵-۸-تهیه ژل جداکننده SDS-PAGE ۴۸
۳-۲-۳-۱۵-۹-تهیه ژل متراکم‌کننده SDS-PAGE ۴۹
۳-۳-روش کار ۵۰
۳-۳-۱-نمونه‌گیری ۵۰
۳-۳-۲-غنی‌سازی باکتری‌های مولد فیتاز ۵۲
۳-۳-۳-غربالگری باکتری‌های مولد فیتاز ۵۲

۳-۳-۴-تشخیص باکتری‌های تولیدکننده فیتاز ۵۳
۳-۳-۵-روش تشخیص کیفی باکتری‌های تجزیه‌کننده فیتات ۵۳
۳-۳-۶-بررسی میزان تولید آنزیم و تعیین بهترین جدایه ۵۳
۳-۳-۶-۱-روش سنجش آنزیم فیتاز ۵۳
۳-۳-۶-۲-رسم منحنی استاندارد با KH_2PO_4 ..... ۵۴
۳-۳-۶-۳-محاسبه فعالیت آنزیم ۵۵
۳-۴-بهینه‌سازی ۵۵
۳-۴-۱-۱-بهینه‌سازی شرایط رشد باکتری ۵۵
۳-۴-۲-بهینه‌سازی تولید آنزیم توسط جدایه‌های برتر ۵۶
۳-۴-۲-۱-آماده‌سازی مایه تلقیح ۵۶
۳-۴-۲-۲-اثر گرماگذاری جدایه‌های برتر بر میزان تولید آنزیم فیتاز ۵۶
۳-۴-۲-۳-تأثیر pH محیط کشت بر میزان تولید آنزیم فیتاز ۵۷
۳-۴-۲-۴-تأثیر غلظت فیتیک اسید بر تولید آنزیم ۵۷
۳-۴-۲-۵-اثر سوبستراهای مختلف کشاورزی بر میزان تولید آنزیم ۵۷
۳-۴-۳-تعیین شرایط بهینه‌ی فعالیت آنزیم فیتاز ۵۷
۳-۴-۳-۱-بررسی دمای بهینه فعالیت آنزیم فیتاز ۵۸
۳-۴-۳-۲-بررسی pH بهینه برای فعالیت آنزیم فیتاز ۵۸

۳-۴-۳-۳-بررسی مقاومت آنزیم فیتاز نسبت به پروتئازها..... ۵۸
۳-۵-تعیین میزان پروتئین تولید شده توسط جدایه‌های منتخب..... ۵۹
۳-۵-۱-تعیین غلظت پروتئین..... ۵۹
۳-۶-خالص‌سازی نسبی آنزیم فیتاز..... ۵۹
۳-۷-تعیین وزن مولکولی آنزیم فیتاز با استفاده از SDS-PAGE..... ۶۰
۳-۷-۱-تهیه ژل پلی آکریلامید..... ۶۰
۳-۷-۲-آماده‌سازی نمونه‌ها..... ۶۱
۳-۷-۳-آماده‌سازی تانک الکتروفورز و بارگذاری نمونه‌ها..... ۶۱
۳-۷-۴-رنگ‌آمیزی پروتئین‌های الکتروفورز شده با آبی کوماسی..... ۶۲
۳-۸-نگهداری جدایه‌ها..... ۶۲
۳-۸-۱-نگهداری کوتاه مدت جدایه‌ها..... ۶۲
۳-۸-۲-نگهداری بلندمدت جدایه‌ها..... ۶۳
۳-۹-شناسایی جدایه‌های باکتری..... ۶۳
۳-۹-۱-شناسایی مولکولی..... ۶۳
۳-۹-۱-۱-استخراج DNA از باکتری با استفاده از کیت شرکت سیناژن..... ۶۳
۳-۹-۱-۲-بررسی کیفیت ژنوم استخراج شده..... ۶۴
۳-۹-۱-۳-انتخاب پرایمرها..... ۶۴

۳-۹-۱-۴-واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۶۵
۳-۹-۱-۵-ترکیبات مخلوط و برنامه دمایی تنظیم شده برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز..... ۶۵
۳-۹-۱-۶-تهیه ژل آگارز و انجام الکتروفورز ۶۷
۳-۹-۱-۷-تعیین توالی ژنوم 16S rRNA..... ۶۷
۳-۹-۱-۸-ثبت توالی‌های ژنومی در بانک ژنی..... ۶۷
۳-۹-۲-شناسایی فنوتیپی ۶۷
۳-۹-۲-۱-مورفولوژی..... ۶۷
۳-۹-۲-۲-تست‌های بیوشیمیایی..... ۶۸

فصل چهارم: نتایج

۴-۱-استحصال فیتیک اسید از سبوس گندم..... ۷۰
۴-۱-۱-تست FTIR..... ۷۰
۴-۱-۲-تعیین خلوص فیتیک اسید به دست آمده ۷۲
۴-۲-جداسازی و شناسایی باکتری‌ها..... ۷۳
۴-۳-تولید آنزیم در محیط کشت مایع و تعیین بهترین جدایه‌ها..... ۷۵
۴-۴-رسم منحنی رشد سویه‌های phas32، Rsh21 و fish12 در محیط PSM broth برای تعیین دمای بهینه رشد..... ۷۷
۴-۴-۱-رسم منحنی رشد جدایه phas32 در ۳ دمای ۳۰، ۳۷ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد ۷۷
۴-۴-۲-رسم منحنی رشد جدایه Rsh21 در دماهای ۳۰، ۳۷ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد..... ۷۷

۴-۴-۳-رسم منحنی رشد جدایه fish12 در دماهای ۳۰، ۳۷ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد..... ۷۸

۴-۵-رسم منحنی رشد سویه‌های phas32، Rsh21 و fish12 در محیط PSM broth برای تعیین بهترین pH بهینه رشد..... ۷۹

۴-۵-۱-رسم منحنی رشد جدایه phas32 در سه pH اسیدی، خنثی و بازی..... ۷۹

۴-۵-۲-رسم منحنی رشد جدایه Rsh21 در سه pH اسیدی، خنثی و بازی..... ۸۰

۴-۵-۳-رسم منحنی رشد جدایه fish12 در سه pH اسیدی، خنثی و بازی..... ۸۱

۴-۶-تعیین واحد آنزیم..... ۸۱

۴-۷-تأثیر دماهای مختلف بر تولید آنزیم فیتاز از سه جدایه phas32، Rsh21 و fish12..... ۸۲

۴-۷-۱-بررسی میزان تولید آنزیم از جدایه phas32 در ۳ دمای ۳۰، ۳۷ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد.. ۸۲

۴-۷-۲-بررسی میزان تولید آنزیم از جدایه Rsh21 در ۳ دمای ۳۰، ۳۷ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد ... ۸۳

۴-۷-۳-بررسی میزان تولید آنزیم از جدایه fish12 در ۳ دمای ۳۰، ۳۷ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد.... ۸۴

۴-۸-تأثیر pHهای مختلف بر تولید آنزیم فیتاز از سه جدایه phas32، Rsh21و fish12..... ۸۴

۴-۸-۱-بررسی میزان تولید آنزیم از جدایه phas32 در سه pH اسیدی، خنثی و بازی..... ۸۴

۴-۸-۲-بررسی میزان تولید آنزیم از جدایه Rsh21 در سه pH اسیدی، خنثی و بازی..... ۸۵

۴-۸-۳-بررسی میزان تولید آنزیم از جدایه fish12 در سه pH اسیدی، خنثی و بازی ۸۶

۴-۹-تأثیر غلظت‌های مختلف فیتیک اسید بر تولید آنزیم فیتاز از سه جدایه phas32، Rsh21 و fish12..... ۸۷

۴-۹-۱-تأثیر غلظت‌های مختلف فیتیک اسید بر تولید آنزیم فیتاز از جدایه phas32..... ۸۷

۴-۹-۲-تأثیر غلظت‌های مختلف فیتیک اسید بر تولید آنزیم فیتاز از جدایه Rsh21..... ۸۷

۴-۹-۳-تأثیر غلظت‌های مختلف فیتیک اسید بر تولید آنزیم فیتاز از جدایه fish12..... ۸۸

۴-۱۰-تأثیر سوبستراهای مختلف کشاورزی بر تولید آنزیم فیتاز توسط سه جدایه phas32، Rsh21 و fish12..... ۸۹

۴-۱۰-۱-تأثیر سوبستراهای مختلف کشاورزی بر تولید آنزیم فیتاز توسط جدایه phas32..... ۸۹

۴-۱۰-۲-تأثیر سوبستراهای مختلف کشاورزی بر تولید آنزیم فیتاز توسط جدایه Rsh21..... ۹۰

۴-۱۰-۳-تأثیر سوبستراهای مختلف کشاورزی بر تولید آنزیم فیتاز توسط جدایه fish12..... ۹۰

۴-۱۱-تأثیر درجه حرارت بر فعالیت آنزیم و به دست آوردن دمای بهینه عملکرد آنزیم..... ۹۱

۴-۱۱-۱-تأثیر درجه حرارت بر فعالیت آنزیم حاصل از جدایه phas32..... ۹۱

۴-۱۱-۲-تأثیر درجه حرارت بر فعالیت آنزیم حاصل از جدایه Rsh21..... ۹۲

۴-۱۱-۳-تأثیر درجه حرارت بر فعالیت آنزیم حاصل از جدایه fish12..... ۹۳

۴-۱۲-تأثیر pH بر فعالیت آنزیم و به دست آوردن pH بهینه عملکرد آنزیم..... ۹۳

۴-۱۲-۱-تأثیر pH بر فعالیت آنزیم حاصل از جدایه phas32..... ۹۳

۴-۱۲-۲-تأثیر pH بر فعالیت آنزیم حاصل از جدایه Rsh21..... ۹۴

۴-۱۲-۳-تأثیر pH بر فعالیت آنزیم حاصل از جدایه fish12..... ۹۵

۴-۱۳-بررسی مقاومت آنزیم فیتاز phas32، fish12 و Rsh21 نسبت به پروتئازها..... ۹۵

۴-۱۳-۱-بررسی مقاومت آنزیم فیتاز phas32 نسبت به پروتئازها..... ۹۵

۴-۱۳-۲-بررسی مقاومت آنزیم فیتاز Rsh21 نسبت به پروتئازها..... ۹۶

۴-۱۳-۳-بررسی مقاومت آنزیم فیتاز fish12 نسبت به پروتئازها ۹۷

۴-۱۴-تعیین وزن مولکولی آنزیم فیتاز..... ۹۷

۴-۱۵-شناسایی باکتری‌های مولد فیتاز..... ۹۸

۴-۱۵-۱-شناسایی براساس تست بیوشیمیایی ۹۸

۴-۱۵-۲-شناسایی فیلوژنتیکی سویه‌های phas32، Rsh21 و fish12..... ۹۹

۴-۱۵-۲-۱-بررسی کیفیت ژنوم تخلیص شده..... ۹۹

۴-۱۵-۲-۲-نتایج الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و تعیین توالی..... ۱۰۰

۴-۱۵-۳-شناسایی ۲۰ جدایه‌ی تولیدکننده فیتاز دیگر براساس تست‌های بیوشیمیایی..... ۱۰۸

فصل پنجم: بحث و نتیجه‌گیری

۵-۱-بحث..... ۱۱۲

۵-۲-نتیجه‌گیری نهایی ۱۲۱

پیشنهادات..... ۱۲۳

منابع..... ۱۲۴

عنوان | **فهرست جداول** | صفحه

جدول ۲-۱- شش گروه اصلی آنزیم‌ها ۸

جدول ۲-۲-مهمترین گونه‌های قارچ و مخمر تولیدکننده فیتاز ۱۸

جدول ۲-۳-مهمترین باکتری‌های تولیدکننده فیتاز ۱۸

جدول ۲-۴-طبقه‌بندی فیتازها طبق روش Oh و همکاران ۲۸

جدول ۳-۱-مواد استفاده شده در این تحقیق ۳۶

جدول ۳-۲-وسایل و تجهیزات استفاده شده ۳۹

جدول ۳-۳-محتویات محیط کشت مورد استفاده برای غربالگری باکتری‌های تولیدکننده فیتاز ۴۳

جدول ۳-۴-مواد لازم جهت تهیه‌ی بافر نمونه ۴۸

جدول ۳-۵-مواد لازم جهت ساخت ژل جداکننده SDS-PAGE ۱۰ درصد ۴۹

جدول ۳-۶-مواد لازم جهت ساخت ژل متراکم کننده SDS-PAGE ۱۰ درصد ۴۹

جدول ۳-۷-محل‌های مورد استفاده برای نمونه‌گیری ۵۱

جدول ۳-۸-تهیه استانداردهای پروتئینی به منظور تعیین غلظت نمونه‌های مجهول ۵۹

جدول ۳-۹-پرایمرهای انتخاب شده جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۶۵

جدول ۳-۱۰-اجزا و مقادیر مطلوب در مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای سه جدایه ۶۶

جدول ۳-۱۱-برنامه دمایی تنظیم شده برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۶۶

جدول ۴-۱-طیف‌های مربوط به فیتیک اسید ۷۱

جدول ۴-۲-نتیجه مقایسه سنجش آنزیمی کمی ۲۳ جدایه‌ی برتر ۷۶

جدول ۴-۳-نتایج ویژگی‌های مورفولوژیکی و تست‌های بیوشیمیایی سویه‌های تولیدکننده فیتاز. ۹۹

جدول ۴-۴-نتایج ویژگی‌های مورفولوژیکی و تست‌های بیوشیمیایی سویه‌های تولیدکننده فیتاز ۱۰۹

جدول ۴-۵-نتایج ویژگی‌های مورفولوژیکی و تست‌های بیوشیمیایی سویه‌های تولیدکننده فیتاز ۱۱۰

عنوان | **فهرست شکل‌ها** | صفحه

شکل ۲-۱-ساختار فیتیک اسید..... ۱۱

شکل ۲-۲-اتصال فیتیک اسید با کاتیون‌های دوظرفیتی دارای شعاع یونی کوچک و بزرگ..... ۱۳

شکل ۳-۱-جداسازی فیتیک اسید..... ۴۱

شکل ۳-۲-نمونه‌گیری از ریزوسفر مزرعه..... ۵۲

شکل۴-۱-فیتیک اسید استخراج شده از الف)سبوس برنج ب)سبوس گندم..... ۷۰

شکل ۴-۲-تصویر ماکروسکوپی تجزیه فیتیک اسید..... ۷۵

شکل ۴-۳-الکتروفورز SDS-PAGE ۹۸

شکل ۴-۴-کیفیت استخراج DNA..... ۱۰۰

شکل ۴-۵-الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز..... ۱۰۱

شکل ۴-۶-نتیجه Blast جدایه Rsh21 ..... ۱۰۲

شکل ۴-۷-نتیجه Blast جدایه phas32 ..... ۱۰۲

شکل ۴-۸-نتیجه Blast جدایه fish12 ..... ۱۰۳

شکل ۴-۹-درخت فیلوژنتیکی سویه *Raoultella terrigena* strain Rsh21..... ۱۰۴

شکل ۴-۱۰-درخت فیلوژنتیکی سویه *Klebsiella oxytoca* strain fish12..... ۱۰۵

شکل ۴-۱۱-درخت فیلوژنتیکی سویه *Citrobacter farmeri* strain phas32..... ۱۰۶

شکل ۴-۱۲-توالی 16S rRNA جدایه *Citrobacter farmeri* strain phas32..... ۱۰۷

شکل ۴-۱۳-بخشی از توالی 16S rRNA جدایه *Klebsiella oxytoca* strain fish12.....۱۰۷

شکل ۴-۱۴-توالی 16S rRNA جدایه *Raoultella terrigena* strain Rsh21.....۱۰۸

عنوان | **فهرست نمودارها** | صفحه

نمودار ۴-۱-نتیجه FTIR فیتیک اسید استخراجی از سبوس گندم ۷۱

نمودار ۴-۲-نتیجه FTIR فیتیک اسید خالص ۷۲

نمودار ۴-۳-منحنی استاندارد فیتیک اسید ۷۲

نمودار ۴-۴-منحنی رشد جدایه phas32 در دماهای مختلف ۷۷

نمودار ۴-۵-منحنی رشد جدایه Rsh21 در دماهای مختلف ۷۸

نمودار ۴-۶-منحنی رشد جدایه fish12 در دماهای مختلف ۷۹

نمودار ۴-۷-منحنی رشد جدایه phas32 در pHهای مختلف ۸۰

نمودار ۴-۸-منحنی رشد جدایه Rsh21 در pHهای مختلف ۸۰

نمودار ۴-۹-منحنی رشد جدایه fish12 در pHهای مختلف ۸۱

نمودار ۴-۱۰-منحنی استانداردفسفات ۸۲

نمودار ۴-۱۱-میزان تولید آنزیم توسط جدایه phas32 در دماهای مختلف ۸۳

نمودار ۴-۱۲-میزان تولید آنزیم توسط جدایه Rsh21 در دماهای مختلف ۸۳

نمودار ۴-۱۳-میزان تولید آنزیم توسط جدایه fish12 در دماهای مختلف ۸۴

نمودار ۴-۱۴-تولید آنزیم فیتاز توسط جدایه phas32 در pHهای مختلف ۸۵

نمودار ۴-۱۵-میزان تولید آنزیم فیتاز توسط جدایه Rsh21 در pHهای مختلف ۸۶

نمودار ۴-۱۶-میزان تولید آنزیم فیتاز توسط جدایه fish12 در pHهای مختلف ۸۶

نمودار ۴-۱۷-میزان تولید آنزیم توسط جدایه phas32 در غلظت‌های مختلف فیتیک اسید ۸۷

نمودار ۴-۱۸-میزان تولید آنزیم فیتاز توسط جدایه Rsh21 در غلظت‌های مختلف فیتیک اسید ... ۸۸

نمودار ۴-۱۹-میزان تولید آنزیم فیتاز توسط جدایه fish12 در غلظت‌های مختلف فیتیک اسید.... ۸۸

نمودار ۴-۲۰-میزان تولید آنزیم توسط جدایه phas32 در محیط دارای سوبسترای کشاورزی..... ۸۹

نمودار ۴-۲۱-میزان تولید آنزیم توسط جدایه Rsh21 در محیط دارای سوبسترای کشاورزی..... ۹۰

نمودار ۴-۲۲-میزان تولید آنزیم توسط جدایه fish12 در محیط دارای سوبسترای کشاورزی ۹۱

نمودار ۴-۲۳-تأثیر درجه حرارت بر فعالیت آنزیم حاصل از جدایه phas32..... ۹۲

نمودار ۴-۲۴-تأثیر درجه حرارت بر فعالیت آنزیم حاصل از جدایه Rsh21..... ۹۲

نمودار ۴-۲۵-تأثیر درجه حرارت بر فعالیت آنزیم حاصل از جدایه fish12..... ۹۳

نمودار ۴-۲۶-تأثیر pHهای اسیدی، خنثی و بازی بر فعالیت آنزیم حاصل از phas32..... ۹۴

نمودار ۴-۲۷-تأثیر pHهای اسیدی، خنثی و بازی بر فعالیت آنزیم حاصل از Rsh21..... ۹۴

نمودار ۴-۲۸-تأثیر pHهای اسیدی، خنثی و بازی بر فعالیت آنزیم حاصل از fish12..... ۹۵

نمودار ۴-۲۹-اثر پروتئازها بر فعالیت آنزیم حاصل از phas32..... ۹۶

نمودار ۴-۳۰-اثر پروتئازها بر فعالیت آنزیم فیتاز حاصل از جدایه Rsh21..... ۹۶

نمودار ۴-۳۱-اثر پروتئازها بر فعالیت آنزیم فیتاز حاصل از جدایه fish12..... ۹۷

چکیده

نام خانوادگی : ابراهیمیان	**نام:** مریم	**شماره دانشجویی:** ۹۰۳۴۲۱۰
عنوان پایان نامه : جداسازی و شناسایی باکتری‌های تولیدکننده فیتاز از منابع محیطی		
استاد راهنما: دکتر حسین معتمدی		
استاد مشاور: دکتر محمد شفیعی		
درجه تحصیلی: کارشناسی ارشد	**رشته:** زیست شناسی	**گرایش:** میکروبیولوژی
دانشگاه : شهید چمران اهواز	**دانشکده:** علوم	**گروه :** زیست شناسی
تاریخ فارغ التحصیلی : ۹۲/۱۱/۱۳		**تعداد صفحه:** ۱۳۴

کلید واژه ها : فیتیک اسید، فیتاز، بهینه‌سازی

فیتیک اسید (میواینوزیتول ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶-هگزاکیس دی‌هیدروژن فسفات) بیشترین فرم ذخیره‌ای فسفر در دانه‌ها و گرده‌ها می-باشد. دو سوم فسفر موجود در دانه غلات، حبوبات و دانه‌های روغنی به فرم فیتات است، اما تک‌معده‌ای‌ها مثل خوک، ماکیان و انسان به علت فقدان آنزیم‌های هیدرولیزکننده فیتات، دسترسی کمی به این ماده دارند. فیتاز (میواینوزیتول هگزاکیس فسفات فسفوهیدرولاز) فیتیک اسید را هیدرولیز می‌کند و به میواینوزیتول و اسید فسفریک تبدیل می‌کند. هدف از تحقیق حاضر، جداسازی باکتری‌های مولد فیتاز از منابع محیطی است. برای این منظور نمونه‌هایی از مزارع ذرت، گندم، جو، خیار، برنج، لوبیا، آفتابگردان، شبدر، مدفوع گاو و گوسفند، مدفوع کبوتر، مرغداری، دستگاه گوارش ماهی کپور و بستر پرورش کپور ماهیان جمع‌آوری شد. در این پژوهش فیتیک اسید از سبوس گندم تهیه شد. بعد از انجام مرحله غنی‌سازی و کشت در محیط اختصاصی دارای فیتیک اسید، ۷۰ باکتری دارای هاله جداسازی شد که بعد از کشت آن‌ها در محیط اختصاصی مایع و انجام سنجش آنزیمی، ۲۳ جدایه توانایی تولید فیتاز را داشتند. از این ۲۳ جدایه، ۳ جدایه برتر انتخاب شدند. منحنی رشد سه جدایه در مقادیر مختلف دما و pH رسم شد. همچنین اثر فاکتورهای pH، دما، غلظت فیتیک اسید و سوبستراهای مختلف کشاورزی بر تولید آنزیم توسط سه جدایه بررسی شد. پایداری آنزیم‌های تولید شده در دما، pH و پروتئازهای مختلف و واحد آنزیمی آن‌ها نیز محاسبه شد. این جدایه‌ها با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی و تعیین سکانس ژن 16S rRNA تعیین هویت شدند. در نتیجه این تحقیق، سه جدایه که بیشترین میزان تولید را داشتند متعلق به گونه‌های *Raoultella terrigena*، *Klebsiella oxytoca* و *Citrobacter farmeri* تشخیص داده شدند. شرایط بهینه برای تولید فیتاز توسط جدایه *Raoultella terrigena* عبارت بودند از: دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، pH ۷ و غلظت ۰/۱۵ درصد فیتیک اسید و زمان انکوباسیون ۴۸ ساعت و این شرایط برای جدایه *Klebsiella oxytoca* عبارت بودند از: دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد، pH ۷ و غلظت ۰/۲۵ درصد فیتیک اسید و زمان انکوباسیون ۴۸ ساعت و این شرایط برای جدایه *Citrobacter farmeri* عبارت بودند از: دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، pH ۷ و غلظت ۰/۲۵ درصد فیتیک اسید در زمان انکوباسیون ۴۸ ساعت. آنزیم فیتاز *Raoultella terrigena* در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و pH ۵/۵ بهترین فعالیت را داشت و واحد آنزیمی فیتاز و محتوای پروتئینی باکتری آن به ترتیب ۲۵U/ml و ۰/۱۱۷mg/ml بود. آنزیم فیتاز *Klebsiella oxytoca* در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و pH ۸/۵ بهترین فعالیت را داشت و واحد آنزیمی فیتاز و محتوای پروتئینی باکتری آن به ترتیب ۲۷/۵U/ml و ۰/۰۹۵mg/ml بود. آنزیم فیتاز *Citrobacter farmeri* در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد و pH ۸/۵ بهترین فعالیت را داشت و واحد آنزیمی فیتاز و محتوای پروتئینی باکتری آن به ترتیب ۳۱U/ml و ۰/۱۰۳mg/ml بود. براساس نتایج بدست آمده می‌توان ادعا کرد که باکتری‌های جداسازی شده قابلیت بالایی جهت تولید فیتاز دارند و می‌توان از آن‌ها جهت اهداف تولید صنعتی یا افزودن به خوراک طیور و آبزیان استفاده کرد.

فصل اول

مقدمه و هدف

۱-۱-مقدمه

فیتیک اسید[1] (میواینوزیتول ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶-هگزاکیس‌دی‌هیدروژن فسفات) بیشترین فرم ذخیره‌ای فسفر در دانه‌ها و گرده‌ها می‌باشد. دوسوم فسفر موجود در دانه غلات، حبوبات و دانه‌های روغنی به فرم فیتات است، اما تک‌معده‌ای‌ها مثل خوک، ماکیان و انسان به علت فقدان آنزیم‌های هیدرولیزکننده فیتات، دسترسی کمی به این ماده دارند. فیتات از روده عبور می‌کند و از مدفوع دفع می‌شود. دفع این ماده باعث ایجاد مشکل از جمله آلودگی به فسفر و افزایش بیش از حد باکتری‌ها و قارچ‌های مصرف‌کننده در نواحی پرورش دام می‌شود. علاوه برآن، فیتات به فلزات مهم تغذیه‌ای مثل آهن، روی، منیزیم، کلسیم، پتاسیم، مس، منگنز و همچنین پروتئین‌ها و ویتامین‌ها متصل می‌شود و کمپلکس‌های نامحلولی تشکیل می‌دهد که در نتیجه قابلیت استفاده، فعالیت و هضم آن‌ها را کاهش می‌دهد. بعضی از مطالعات آزمایشگاهی نشان داده که کمپلکس-های فیتات-پروتئین کمتر مورد حمله آنزیم‌های پروتئولیتیک قرار می‌گیرند. حتی بعضی از آنزیم-ها از قبیل پپسین، آمیلوپسین و آمیلاز توسط فیتات مهار می‌شوند. همچنین فیتات ممکن است با قابلیت هضم لیپید و نشاسته تداخل ایجاد کند (۱۵،۳۸،۵۷). علت تشکیل کمپلکس با این مواد معدنی این است که فیتیک اسید دارای مقدار بالایی از فسفات است که در نتیجه باعث ایجاد بار منفی زیادی در دامنه وسیعی از pH می‌شود. بنابراین کاتیون‌های دوظرفیتی با بار مثبت را شلاته می‌کند و باعث جذب ضعیف آن‌ها در روده‌ی کوچک می‌شود. همین عامل موجب کمبود شایع کلسیم، آهن و روی در کشورهای در حال توسعه است؛ به این علت که غذای اصلی آن‌ها منشأ گیاهی دارد. غنی‌سازی مواد غذایی با فیتاز برای حیوانات تک‌معده‌ای باعث کاهش فسفات دفعی به میزان ۵۰ درصد می‌شود (۴۸).

مواد مدفوعی دارای فیتات بالا، ممکن است به نفع رشد میکروب‌ها باشد و به علت فراوانی باکتری‌ها و قارچ‌های تولیدکننده‌ی فیتاز، با آزادسازی فسفات آزاد همراه باشد. فسفات-های آزادشده ممکن است آب‌های زیرزمینی را که به آب‌های آزاد منتهی می‌شوند، آلوده کنند.

[1] Phytic acid