



دانشگاه الزهراء (س)

دانشکده علوم پایه

پایان نامه

جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

رشته زیست شناسی \_ گرایش میکروبیولوژی

عنوان

دسته بندی آنزیم های کاتابولیک ترشحي مخمرهای جدا شده از شالیزارهای

برنج

اساتید راهنما

دکتر محمدرضا صعودی

دکتر سیاوش سلمانزاده اهرابی

دانشجو

لیلا امینی

اسفند 1390

۱۰۰

دانشگاه الزهراء (س)

دانشکده علوم پایه

پایان نامه

جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

رشته زیست شناسی \_ گرایش میکروبیولوژی

عنوان

دسته بندی آنزیم های کاتابولیک ترشحي مخمرهای جدا شده از شالیزارهای

برنج

اساتید راهنما

دکتر محمدرضا صعودی

دکتر سیاوش سلیمانزاده اهرابی

دانشجو

لیلا امینی

اسفند 1390

صور تجلسه دفاع

کلیه دستاوردهای این تحقیق

متعلق به

دانشگاه الزهرا (س) است.

تقدیم به ساحت پر نور و مقدس

حضرت علی ابن موسی الرضا (ع)

با سپاس از سه وجود مقدس:

آنان که ناتوان شدند تا ما به توانایی برسیم ...

موهایشان سپید شد تا ما روسفید شویم ...

و عاشقانه سوختند تا گرمابخش وجود ما و روشنگر راهمان باشند ...

## پدرم

### مادرم

### استادم

سپاسگزار کسانی هستم که سرآغاز تولد من بودند، پدر و مادر عزیز و دلسوزم که آرامش روحی و آسایش فکری فراهم نمودند تا با حمایت های همه جانبه در محیطی مطلوب مراتب تحصیلی و نیز پایان نامه ام را به نحو احسن به اتمام برسانم.

به مصداق " لم یشکر المخلوق لم یشکر الخالق " بسی شایسته است از استاد ارجمند جناب آقای دکتر صعودی که همواره راهنما و راه گشای من در اتمام و اكمال پایان نامه بوده اند و سالهاست به شاگردی ایشان مفتخرم، تقدیر و تشکر نمایم.

از استاد گرامی جناب آقای دکتر سلمانزاده بابت راهنمایی های کارساز و سازنده شان در طول پایان نامه سپاسگزارم.

از اساتید محترم داور جناب آقای دکتر فولادی و جناب آقای دکتر جلالی که زحمت داوری این پایان نامه را تقبل نمودند تشکر و قدردانی می نمایم.

از مسئولیت محترم آزمایشگاه ملی، سرکار خانم یوسفی به واسطه کمک ها و همکاری های بی دریغشان در طول پایان نامه سپاسگزارم.

## چکیده

بررسی تنوع و جمعیت میکروبی اکوسیستم های بومی و بررسی توانایی های خاص میکروارگانیسم های این نواحی در حفظ ذخایر میکروبی و غربالگری جدایه های جدید بومی برای کاربرد در صنایع مختلف بسیار مفید می باشد.

آب و خاک شالیزارهای برنج به دلیل ایجاد شرایط کم اکسیژن و هوایی، زیستگاه های میکروسکوپی متعددی را برای یک جامعه بزرگ از اعضای میکروبی فراهم می آورد که فعالانه به تولید آنزیم های کاتابولیک می پردازند. این پژوهش بر مخمرهای ساکن این زیستگاه میکروبی تمرکز یافته است.

مجموعه 46 جدایه مورد بررسی، در طی دو مرحله نمونه برداری و پس از غنی سازی در محیط مایع YPG براث و کشت بر روی محیط YPG آگار دارای آنتی بیوتیک جدا شدند. حضور آنزیم های آمیلاز، پروتئاز، استراز، فیتاز و لاکاز از طریق بررسی تولید هاله بر روی محیط جامد واجد سوبسترای آنزیم و ترشحاتی بودن آن ها با استفاده از روش چاهک پلیت انجام شد.

در میان 11 جدایه مولد آنزیم، 100% جدایه ها آنزیم استراز تولید می کردند که هیچ یک ترشحاتی نبود. 18% جدایه ها آنزیم آمیلاز تولید می کردند که نیمی از آن ها ترشحاتی بود و 18% جدایه ها مولد آنزیم پروتئاز ترشحاتی بودند. تولید آنزیم فیتاز در هیچ یک از جدایه ها مشاهده نشد و آنزیم لاکاز که توسط 9% جدایه ها تولید می شد غیر ترشحاتی بود. در میان جدایه های مولد آنزیم، 36% بازیدیومیست و 64% آسکومیست بودند که تنوع آنزیمی نیز در بازیدیومیست ها بیش تر از آسکومیست ها بود. دو جدایه SA006 و SA044 که بیشترین تنوع آنزیمی را داشتند، از نظر حضور آنزیم های بیشتر و ترشحاتی و القایی بودن آن ها نیز بررسی شدند. شناسایی بیوشیمیایی، مورفولوژیک و ژنتیکی دو جدایه نیز به دقت انجام شد. دو جدایه



SA006 و SA044 به ترتیب به گونه های *Pseudozyma antarctica* و *Pseudozyma*  
*aphidis* شبیه بودند.

## فهرست مطالب

صفحه	عنوان
1	فصل اول: مقدمه
2	1-1 آنزیم های میکروبی
2	1-1-1 سویه های مولد آنزیم های تجاری
2	2-1 اهمیت قارچ ها در اکوسیستم
3	1-2-1 آنزیم های خارج سلولی قارچ ها
4	2-2-1 پتانسیل آنزیمی قارچ ها
4	3-1 مخمرها و تولید آنزیم
4	1-3-1 تنوع و اکوفیزیولوژی مخمرها در زیستگاه های مختلف
5	2-3-1 اهمیت صنعتی مخمرها
6	3-3-1 آنزیم های مخمرها
7	1-3-3-1 آمیلاز
7	1-1-3-3-1 انواع آمیلازها
8	2-1-3-3-1 کاربرد آمیلازها در صنعت
9	3-1-3-3-1 آمیلاز در مخمرها
9	2-3-3-1 لیپاز
10	1-2-3-3-1 کاربرد لیپاز در صنعت
10	2-2-3-3-1 لیپاز در مخمرها
11	3-3-3-1 پروتئاز
11	1-3-3-3-1 انواع پروتئازها
11	2-3-3-3-1 کاربرد پروتئازها در صنعت
12	3-3-3-3-1 پروتئاز در مخمرها
13	4-3-3-1 فیتاز
13	1-4-3-3-1 انواع فیتازها
14	2-4-3-3-1 کاربرد فیتازها در صنعت
15	3-4-3-3-1 فیتاز در مخمرها
15	5-3-3-1 لاکاز
17	1-5-3-3-1 کاربرد لاکاز در صنعت
18	2-5-3-3-1 لاکاز در مخمرها
19	6-3-3-1 اکسیدوردوکتازها
19	1-6-3-3-1 اکسیدوردوکتاز در مخمرها

22	فصل دوم: مواد و روش ها
23	1-2 ابزار و وسایل
24	2-2 مواد و محیط‌های کشت آماده
26	3-2 نمونه برداری
26	4-2 تعیین میزان رطوبت نمونه های خاک
27	5-2 تعیین میزان pH نمونه های خاک
27	6-2 کشت نمونه های آب
28	7-2 کشت نمونه های خاک و گل
28	1-7-2 کشت مستقیم نمونه های خاک و گل
28	2-7-2 غنی سازی نمونه های خاک و گل
29	8-2 بررسی کیفی وجود آنزیم ها در جدایه های مخمری
29	1-8-2 بررسی کیفی وجود آنزیم پروتئاز
29	2-8-2 بررسی کیفی وجود آنزیم آمیلاز
30	3-8-2 بررسی کیفی وجود آنزیم استراز
30	4-8-2 بررسی کیفی وجود آنزیم لاکاز
30	1-4-8-2 بررسی وجود آنزیم با استفاده از سوپسترای تانیک اسید
31	2-4-8-2 بررسی وجود آنزیم با استفاده از سوپسترای گوایکول
31	3-4-8-2 بررسی وجود آنزیم با استفاده از سوپسترای رنگی کریستال ویوله
31	5-8-2 بررسی کیفی وجود آنزیم فیتاز
32	9-2 بررسی خارج سلولی بودن آنزیم ها با روش چاهک- پلیت
33	10-2 شناسایی 11 جدایه مخمر مولد آنزیم با آزمون های بیوشیمیایی کلیدی
33	1-10-2 آزمون دی آزونیم آبی (DBB)
34	2-10-2 آزمون هیدرولیز اوره
34	3-10-2 آزمون تولید ریشه
35	4-10-2 آزمون تخمیر قندها
35	5-10-2 آزمون تولید آسکوسپور
35	11-2 نگه داری جدایه های مولد آنزیم در گلیسرول 10% در دمای 4°C و -70°C
36	12-2 بررسی کیفی وجود آنزیم های بیشتر در دو جدایه SA044 و SA006
36	1-12-2 بررسی کیفی وجود آنزیم لیپاز
37	2-12-2 بررسی کیفی وجود آنزیم کراتیناز
38	3-12-2 بررسی کیفی وجود آنزیم DNase
38	4-12-2 بررسی کیفی وجود آنزیم سلولاز
38	5-12-2 بررسی کیفی وجود آنزیم زایلاناز

39	6-12-2 بررسی کیفی حضور آنزیم کیتیناز
39	7-12-2 بررسی کیفی وجود آنزیم لسیتیناز
40	8-12-2 بررسی کیفی وجود آنزیم پکتیناز
40	9-12-2 بررسی وجود آنزیم های ردوکتاز
40	1-9-12-2 بررسی کیفی وجود آنزیم های سلنیت و سلنات ردوکتاز
41	2-9-12-2 بررسی کیفی وجود آنزیم تلوریت ردوکتاز
42	13-2 بررسی القایی و یا دائمی بودن آنزیم های خارج سلولی جدایه های برتر با روش چاهک پلیت
42	14-2 شناسایی فراتر ویژگی های بیوشیمیایی جدایه های برتر SA006 و SA044
42	1-14-2 آزمون جذب منابع کربن مختلف
43	2-14-2 آزمون جذب منابع نیتروژن مختلف
44	3-14-2 آزمون شکست آربوتین
44	4-14-2 آزمون مقاومت به سیکلوهگزیمید 0/01 و 0/1 درصد
44	5-14-2 آزمون تولید نشاسته خارج سلولی
45	6-14-2 آزمون تولید اسید از گلوکز
45	7-14-2 آزمون تحمل استیک اسید 1%
45	8-14-2 بررسی رشد دو جدایه برتر در غلظت های مختلف نمک
46	9-14-2 بررسی رشد دو جدایه برتر در غلظت های مختلف قند
46	10-14-2 بررسی رشد دو جدایه برتر در دماهای مختلف
46	11-14-2 بررسی رشد دو جدایه برتر در pH های اولیه مختلف
47	15-2 شناسایی ژنتیکی جدایه های برتر SA006 و SA044
47	1-15-2 استخراج DNA
48	2-15-2 شناسایی با استفاده از پرایمرهای عمومی
49	16-2 بررسی مورفولوژیک و میکروسکوپی دو جدایه برتر و بررسی جدایه SA006 با میکروسکوپ الکترونی نگاره
51	<b>فصل سوم: نتایج</b>
52	1-3 نمونه برداری
55	2-3 میزان رطوبت و pH نمونه های خاک مرحله اول و دوم نمونه برداری
55	3-3 جداسازی مخمر از نمونه های آب، خاک و گل
58	4-3 نتایج بررسی کیفی حضور آنزیم های استراز، پروتئاز، فیتاز، لاکاز و آمیلاز
62	5-3 نتایج بررسی خارج سلولی بودن آنزیم های استراز، پروتئاز، آمیلاز و لاکاز در 11 جدایه مولد آنزیم
64	6-3 نتایج شناسایی جدایه های مولد آنزیم با استفاده از آزمون های بیوشیمیایی کلیدی

65	7-3 نتایج بررسی فراتر وجود آنزیم ها در دو جدایه SA006 و SA044 و ترشحاتی بودن آنزیم های لیپاز و DNase
68	8-3 نتایج بررسی القایی و یا دائمی بودن آنزیم های آمیلاز، پروتئاز، DNase و لیپاز در دو جدایه SA006 و SA044
69	9-3 شناسایی دو جدایه SA006 و SA044
69	1-9-3 نتایج شناسایی بیوشیمیایی بیشتر دو جدایه SA006 و SA044
70	2-9-3 نتیجه شناسایی ژنتیکی دو جدایه SA006 و SA044
72	3-9-3 نتایج بررسی ماکروسکوپی و میکروسکوپی دو جدایه SA006 و SA044
74	4-9-3 بررسی دقیق جدایه SA006 توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره
76	<b>فصل چهارم: بحث</b>
77	1-4 بحث
91	2-4 پیشنهادات
93	<b>فصل پنجم: منابع</b>
106	<b>فصل ششم: پیوست</b>
107	1-6 توالی جدایه های برتر

## فهرست جداول

صفحه	عنوان
3	جدول (1-1): برخی آنزیم های تجاری و برخی میکروارگانیسم های مولد آن ها
8	جدول (2-1): انواع آمیلازها و نحوه عملکرد آن ها
12	جدول (3-1): انواع گروه بندی آنزیم های پروتئاز
13	جدول (4-1): انواع گروه بندی آنزیم فیتاز
14	ادامه جدول (4-1): انواع گروه بندی آنزیم فیتاز
19	جدول (5-1): برخی از آنزیم های اکسیدوردوکتاز و موارد کاربرد آن ها
23	جدول (1-2): ابزار مورد استفاده در پژوهش
24	جدول (2-2): مواد و محیط های کشت مورد استفاده در پژوهش
25	ادامه جدول (2-2): مواد و محیط های کشت مورد استفاده در پژوهش
48	جدول (3-2): مشخصات پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی ژنتیکی
48	جدول (4-2): ترکیب مخلوط واکنش برای PCR
54	جدول (1-3): برخی پارامترهای نمونه های خاک و آب و ویژگی های ایستگاه های نمونه برداری شده مرحله اول (1389/2/17)
54	جدول (2-3): برخی پارامترهای نمونه های خاک و ویژگی های ایستگاه های نمونه برداری شده مرحله دوم (1389/7/8)
56	جدول (3-3): مجموع مخمرهای جدا شده از مراحل کشت و غنی سازی نمونه های آب و خاک مرحله اول و خاک مرحله دوم نمونه برداری
60	جدول (4-3): نام جدایه های مولد آنزیم های استراز، آمیلاز، پروتئاز و لاکاز
64	جدول (5-3): نتیجه آزمون های بیوشیمیایی کلیدی جدایه های مولد آنزیم
66	جدول (6-3): نتایج کیفی حضور آنزیم های بیشتر و ترشگی بودن آنزیم های لیپاز و DNase در دو جدایه برتر SA044 و SA006
69	جدول (7-3): نتایج آزمون های بیوشیمیایی بیشتر دو جدایه SA006، SA044 و مقایسه با گونه های تیپیک آن ها
70	ادامه جدول (7-3): نتایج آزمون های بیوشیمیایی بیشتر دو جدایه SA006 و SA044 و مقایسه با گونه های تیپیک آن ها
71	جدول (8-3): میزان شباهت جدایه های برتر با مخمرهای ثبت شده در بانک ژنی بر اساس ترادف 600 نوکلئوتیدی قطعه D1/D2 26S rDNA
73	جدول (9-3): بررسی ویژگی های مورفولوژیک کلنی جدایه های SA006 و SA044

## فهرست تصاویر

صفحه	عنوان
53	شکل (1-3): خزانه شالیزار ایستگاه شماره 7 (روستای علی آباد) در نمونه برداری مرحله اول 1389/2/17
53	شکل (2-3): زمین زه کشی شده ایستگاه شماره 7 (روستای علی آباد) پس از برداشت محصول در نمونه برداری مرحله دوم 1389/7/8
53	شکل (3-3): مسیر GPS نمونه برداری
60	شکل (4-3): محیط بررسی آنزیم آمیلاز
60	شکل (5-3): محیط های بررسی آنزیم لاکاز
60	شکل (6-3): محیط بررسی آنزیم استراز
60	شکل (7-3): محیط بررسی آنزیم پروتئاز
61	شکل (8-3): درصد فراوانی آنزیم های استراز، پروتئاز، آمیلاز، لاکاز و فیتاز در 46 جدایه مخمر
61	شکل (9-3): درصد فراوانی آنزیم های استراز، پروتئاز، آمیلاز و لاکاز در 4 جدایه بازیدیومیست و 7 جدایه آسکومیست مولد آنزیم
62	شکل (10-3): چاهک پلیت آنزیم استراز
62	شکل (11-3): چاهک پلیت آنزیم لاکاز بر روی محیط تانیک اسید
63	شکل (12-3): چاهک پلیت آنزیم پروتئاز
63	شکل (13-3): چاهک پلیت آنزیم آمیلاز
63	شکل (14-3): درصد ترشحاتی بودن آنزیم های لاکاز، پروتئاز، آمیلاز و استراز در 11 جدایه مولد آنزیم های ذکر شده
67	شکل (15-3): پلیت بررسی آنزیم لیپاز
67	شکل (16-3): پلیت بررسی آنزیم لسیتیناز
67	شکل (17-3): محیط های حاوی سلنیت سدیم
67	شکل (18-3): پلیت حاوی 2mM تلوریت پتاسیم
67	شکل (19-3): چاهک پلیت آنزیم DNase
67	شکل (20-3): چاهک پلیت آنزیم لیپاز
68	شکل (21-3): درصد دائمی بودن ترشح آنزیم های آمیلاز، پروتئاز، لیپاز و DNase در دو جدایه SA006 و SA044
71	شکل (22-3): تصویر ژل الکتروفورز قطعات حاصل از PCR
72	شکل (23-3): درخت ژنتیکی رابطه بین دو جدایه SA006 و SA044 با دیگر سویه های <i>Pseudozyma spp.</i>
73	شکل (24-3): کلنی 72 ساعته جدایه SA044 بر روی محیط YPG آگار

- 73 شکل (3-25): کلنی 72 ساعته جدایه SA006 بر روی محیط YPG آگار
- 74 شکل (3-26): تصویر میکروسکوپی جدایه SA044 - تصویر میکروسکوپی گونه تیپیک *Pseudozyma rugulosa*
- 74 شکل (3-27): تصویر میکروسکوپی جدایه SA006 - تصویر میکروسکوپی گونه تیپیک *Pseudozyma antarctica*
- 75 شکل (3-28): تصویر جوانه زنی قطبی جدایه SA006 تثبیت شده با گلوآرالدهید
- 75 شکل (3-29): آرایش به هم ریخته سلول های جدایه SA006 تثبیت شده با گلوآرالدهید
- 75 شکل (3-30): آرایش بلاستوکنیدی جدایه SA006 در نمونه تثبیت نشده



### جدول اختصارات

عبارت كامل	مخفف عبارت
Yeast-peptone-glucose	YPG
Diazonium blue B	DBB
Corn meal agar	CMA
Malt-yeast-peptone-glucose	MYPG
Sabouraud dextrose agar	SDA
Yeast nitrogen base	YNB
Yeast carbon base	YCB
Yeast extract malt extract broth	YMB

# فصل اول:

## مقدمه

## 1-1 آنزیم های میکروبی

آنزیم ها بیوکاتالیست هایی هستند که توسط سلول های زنده برای تشدید واکنش های بیوشیمیایی تولید می شوند. هر سلول مقادیر متفاوتی از انواع آنزیم ها و متابولیت ها را تولید می کند که این مقدار در میان گونه ها و حتی جدایه های یک گونه متفاوت است (Underkofler et al. 1957).

### 1-1-1 سویه های مولد آنزیم های تجاری

آنزیم های تجاری شامل آمیلازها، سلولازها، لیگنوسلولازها، پکتینازها، پروتئازها، لپازها، فیتازها، پنی سیلین آسیلازها و غیره است. آنزیم های صنعتی در مقایسه با آنزیم هایی که در موارد درمانی و یا تشخیصی استفاده می شوند، در مقادیر بالا تولید می شوند (Walsh 2002). میکروارگانیسم های مولد این آنزیم ها با روش های غنی سازی جدایه های مطلوب و سنجش تقریبی میزان تولید آنزیم غربال می شوند (ملک زاده و سعودی، 1385).

از آنزیم های تجاری در انواع صنایع تهیه شراب، تخمیر، تولید پنیر، نانواپی، فرآوری نشاسته، تولید شیرین کننده ها و تغییر طعم، ساختار و شکل غذا استفاده می شود (Walsh 2002). برخی از آنزیم های صنعتی مهم به همراه برخی میکروارگانیسم های مولد آن ها در جدول 1-1 ذکر شده است.

### 1-2 اهمیت قارچ ها در اکوسیستم

قارچ ها موجوداتی همه جایی هستند که تقریباً در هر محیطی یافت می شوند. این موجودات به دلیل نقش حیاتی در اکوسیستم و تاثیر بر روی فعالیت های انسان جزو مهم ترین موجودات محسوب می شوند. قارچ های خشکی جزو تجزیه کنندگان اصلی و تامین کنندگان مواد اولیه هوموس<sup>1</sup> هستند (Mueller and Schmit 2007).

---

<sup>1</sup> Humus

جدول (1-1): برخی آنزیم های تجاری و برخی میکروارگانیسم های مولد آن ها  
(Walsh 2002; Kurtzman et al. 2011; ملک زاده و صعودی، 1385)

نام آنزیم	نام میکروارگانیسم مولد آنزیم
گلوکوآمیلاز	<i>Rhizopus spp., Aspergillus niger</i>
پولولاناز	<i>Aerobacter aerogenes, Klebsiella spp. Bacillus spp.</i>
گلوکز ایزومراز	<i>Streptomyces spp., Bacillus coagulans Bacillus stearothermophilus</i>
بتا گالاکتوزیداز	<i>Aspergillus spp., Saccharomyces spp. Streptomyces spp., Bacillus coagulans</i>
اینورتاز	<i>Saccharomyces serevisiae</i>
سلولاز و همی سلولاز	<i>Trichoderma spp., Aspergillus niger Sporotrichum cellulophilum, Actinomyces spp.</i>
پکتیناز	<i>Fusarium spp., Aspergillus niger Aspergillus oryzae</i>
پروتئاز	<i>Aspergillus oryzae, Streptomyces spp. Bacillus subtilis, Bacillus amyloliquefaciens</i>
لیپاز	<i>Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Mucor spp., Pseudozyma antarctica, Yarrowia lipolytica</i>
فیتاز	<i>Aspergillus niger, Aspergillus fumigates, Schwanniomyces occidentalis</i>
لاکتاز	<i>Aspergillus niger, Aspergillus oryzae Saccharomyces lactis, Kluyveromyces marxianus, kluyveromyces lactis</i>
آلفا آمیلاز	<i>Bacillus amyloliquefaciens Bacillus licheniformis, Bacillus subtilis, Aspergillus oryzae</i>
بتا آمیلاز	<i>Bacillus circulans, Bacillus polymyxa</i>

### 1-2-1 آنزیم های خارج سلولی قارچ ها

آنزیم های خارج سلولی قارچ های ساپروفیت و یا پاتوژن برای غلبه بر مقاومت میزبان، استفاده و تجزیه مواد آلی و معدنی در محیط زیست (Chang et al. 1992; Hankin and Anagnostakis. 1975) و تبدیل مواد نامطلوب و یا سخت تجزیه<sup>2</sup> به ترکیباتی کم خطرتر و قابل تحمل تر (Gopinath et al. 2005) ضروری است. قارچ ها به طور گسترده و در طول سالیان متمادی به عنوان منبع مهم آنزیم های صنعتی

<sup>2</sup> Recalcitrant