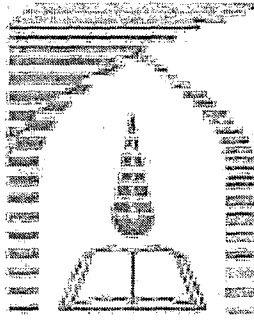




١٠٢٩١٩



دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده علوم پایه

پایان نامه دوره کارشناسی ارشد زیست شناسی ( ژنتیک )

جداسازی، توالی یابی، کلونینگ و بیان ژن گلوکز ایزومراز از

سویه بومی باکتری

نگارش

محمد رضا گل محمدی

استاد راهنما

دکتر مهدی نادری منش

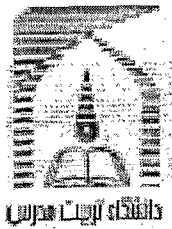
استاد مشاور

دکتر خسرو خواجه

اسفند ۸۶

۱۳۸۷ / ۰۵ / ۲۲

۱۰۲۹۸۹



بسمه تعالی

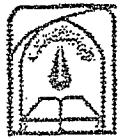
تأییدیه اعضای هیأت داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد

اعضای هیئت داوران نسخه نهایی پایان نامه آقای محمدرضا گل محمدی رشته زیست شناسی (ژنتیک) تحت عنوان: «جداسازی، توالی یابی، کلونینگ و بیان ژن گلوکز ایزومر از سویه بومی باکتری» از نظر فرم و محتوا بررسی نموده و آنرا برای اخذ درجه کارشناسی ارشد مورد تأیید قرار دادند.

امضاء	رتبه علمی	نام و نام خانوادگی	اعضای هیأت داوران
	استادیار	دکتر مهدی نادری منش	۱- استاد راهنما
	دانشیار	دکتر خسرو خواجه	۲- استاد مشاور
	استادیار	دکتر مهرداد بهمنش	۳- استاد ناظر داخلی
	استادیار	دکتر جمشید داودی	۴- استاد ناظر خارجی
	استادیار	دکتر سیدعلیرضا مصباح	۵- استاد ناظر خارجی
	دانشیار	دکتر مجید صادقی زاده	۶- نماینده تحصیلات تکمیلی

۱۳۸۷ / ۱۵ / ۲۲

۱۰۳۹۸۹



### آیین نامه چاپ پایان نامه (رساله) های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

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

ماده ۲ در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند  
«کتاب حاضر حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد / ~~مطالعه دکتری~~ نگارنده در رشته ~~تربیت مدرس~~ ~~سلسله~~ است که در سال ۸۶ در دانشکده علوم پایه دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی سرکار خانم / جناب آقای دکتر مهدی نادری مدرس، مشاوره سرکار خانم / جناب آقای دکتر حسروخواه و مشاوره سرکار خانم / جناب آقای دکتر از آن دفاع شده است.»

ماده ۳ به منظور جبران بخشی از هزینه های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴- در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ۵- دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

ماده ۶- اینجانب ~~محمد رضا گل محمدی~~ دانشجوی رشته ~~تربیت مدرس~~ ~~سلسله~~ مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی:  
تاریخ و امضاء:  
محمد رضا گل محمدی  
۸۷، ۲، ۲۵

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

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی 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 هیات علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی که با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد ذیل را رعایت نمایند:

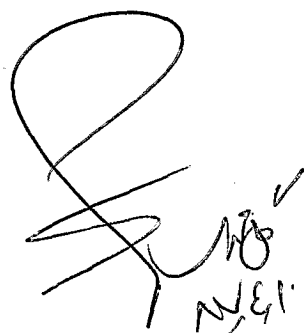
ماده ۱- حقوق مادی و معنوی پایان‌نامه‌ها / رساله‌های مصوب دانشگاه متعلق به دانشگاه است و هرگونه بهره‌برداری از آن باید با ذکر نام دانشگاه و رعایت آیین‌نامه‌ها و دستورالعمل‌های مصوب دانشگاه باشد.

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 استاد راهنما مسئول مکاتبات مقاله باشند. 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 حاصل از نتایج پایان‌نامه / رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با مجوز کتبی صادره از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه و بر اساس آئین‌نامه‌های مصوب انجام می‌شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه 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 حوزه پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این دستورالعمل در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۱۳۸۴/۴/۲۵ در شورای پژوهشی دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب لازم‌الاجرا است و هرگونه تخلف از مفاد این دستورالعمل، از طریق مراجع قانونی قابل پیگیری خواهد بود.



۸۷/۶/۱

## تقدیم به:

همسر عزیز و یگانه فرزند دل‌بندم که مشوق همیشگی من بوده  
اند.

## تقدیر و تشکر:

بدین وسیله از زحمات و الطاف و محبت های جناب آقای دکتر مهدی نادری منش استاد محترم راهنما که اینجانب را در انجام این پایان نامه هدایت فرمودند صمیمانه تشکر و قدردانی می نمایم . همچنین از ارشادات و راهنماییهای صمیمانه جناب آقای دکتر خسرو خواجه استاد محترم مشاور این پایان نامه که بیش از یک استاد مشاور زحمت کشیده اند کمال تشکر و امتنان را دارم . بر خود لازم می دانم از زحمات کلیه اساتید محترمی که در دوره تحصیل از محضرشان کسب علم و دانش نموده ام ، خالصانه تشکر و برای همه آنها آرزوی سلامت و سعادت دارم .

از استادان بزرگوار جناب آقای دکتر مهرداد بهمنش ، جناب آقای دکتر سید علیرضا مصباح و جناب آقای دکتر جمشید داودی که زحمت داوری این پایان نامه را به عهده گرفته اند ، صمیمانه تشکر و قدردانی می کنم .

از همکاری رئیس محترم بخش زیست شناسی استاد بزرگوار جناب آقای دکتر مجید صادقی زاده و مدیر محترم گروه ژنتیک جناب آقای دکتر سید جواد مولی که نقش به سزایی در این دوره تحصیلی من داشته اند تشکر و قدردانی می کنم

و همچنین از همکاری کارشناس محترم گروه سرکار خانم دیداری تشکر و قدردانی می کنم .

در پایان از حمایت ها و کمک های خانواده ام و همچنین خانواده همسرم که در دوره تحصیل و انجام این پایان نامه ، حامی من بوده اند بسیار سپاسگذارم و بدین وسیله از آن هاصمیمانه تشکر می کنم .

## چکیده

د-گلوکز/ زیلوز ایزومراز (د- زیلوزکتول ایزومراز، EC 5.3.1.5) که عموماً آنرا گلوکز ایزومراز می نامند. این آنزیم یکی از با ارزشترین آنزیمهای صنعتی می باشد. گلوکز ایزومراز یک آنزیم درون سلولی می باشد که در میکروارگانیسمهای زیادی یافت می شود. این آنزیم بطور برگشت پذیر گلوکز و زیلوز را به ایزومرهایشان فروکتوز و زیلوز تبدیل می کند. اهمیت تجاری این آنزیم در تبدیل گلوکز به فروکتوز در رابطه با تولید شیره ذرت با غلظت بالای فروکتوز (HFCS) می باشد که در صنایعی از جمله شیرینی پزی، کنسرو سازی و نوشابه سازی کاربرد فراوانی دارد. ارزش تجاری این ماده (HFCS) در سال بیش از ۱۰ میلیارد دلار می باشد.

در این پایان نامه باکتری جدا شده بومی ایران که این آنزیم را تولید می کند از کارخانه نیشکر اهواز جدا گردیده است. سپس با استفاده از پرایمرهای یونیورسال توالی 16S rDNA این باکتری تکثیر گردید و رابطه فیلوژنی باکتری با باکتری کلبسیلا پنومونیه مشخص گردید و این سویه را بدلیل قرابت نزدیک با باکتری کلبسیلا پنومونیه آنرا کلبسیلا پنومونیه TM100 نامگذاری نمودیم. برای بدست آوردن ژن گلوکز ایزومراز با استفاده از توالی ژن گلوکز ایزومراز باکتری کلبسیلا پنومونیه برای آن پرایمر طراحی گردید و سپس ژن گلوکز ایزومراز این باکتری به کمک تکنیک PCR تکثیر شده و در مرحله بعد در باکتری E.coli DH5α کلون و تعیین توالی شده و مشخص گردید این ژن دارای ۱۳۲۲ نوکلوتید و پروتینی بطول ۴۴۰ اسید آمینه با وزن مولکولی ۴۹ کیلو دالتون می باشد. سپس با انتقال این ژن در وکتور بیانی pET 32a و کلون نمودن در باکتری E.coli BL21 جهت بدست آوردن پروتئین آنزیم گلوکز ایزومراز و سپس خالص نمودن آن با ستون نیکل - سفارز انجام گرفت

کلید واژه: گلوکز ایزومراز، جداسازی، تعیین توالی - کلونینگ - HFCS - کلبسیلا پنومونیه



## فهرست

- ۱ فصل اول.....
- ۱-۱ مقدمه..... ۲
- ۲-۱ روش مطالعه آنزیمی در میکروارگانیسم ها..... ۳
- ۳-۱ تولید آنزیم در صنعت..... ۴
- ۴-۱ نوع میکروارگانیسم..... ۵
- ۱-۴-۱ میکروارگانیسمها به عنوان مهمترین منابع آنزیمی..... ۶
- ۲-۴-۱ میکروارگانیسمهای GRAS..... ۷
- ۵-۱ غربالگری آنزیمها واهمیت آنها..... ۷
- ۱-۵-۱ غربالگری فعالیتهای آنزیمی و خصوصیات آنزیمی جدید..... ۸
- ۲-۵-۱ غربالگری براساس محیط های کشت غنی سازی شده..... ۹
- ۳-۵-۱ آشکارسازی فعالیت و غربالگری بر اساس آن ..... ۹
- ۶-۱ آنزیم گلوکز ایزومراز..... ۱۰
- ۱-۶-۱ دیدگاه تاریخی..... ۱۰
- ۲-۶-۱ میکروارگانیسم های تولید کننده آنزیم گلوکز ایزومراز..... ۱۱
- ۳-۶-۱ ژن های مولد آنزیم گلوکز ایزومراز..... ۱۱
- ۴-۶-۱ مشخصات آنزیم گلوکز ایزومراز..... ۱۲
- ۵-۶-۱ نوع اسید آمینه موجود در پلی پپتید..... ۱۶
- ۶-۶-۱ یون های فلزی و مکان اتصال دو فلز..... ۱۷
- ۷-۶-۱ خواص آنزیم گلوکز ایزومراز..... ۱۸
- ۸-۶-۱ فرآیند ایزومریزاسیون..... ۲۲
- ۹-۶-۱ مکانیزم ایزومریزاسیون..... ۲۲
- ۱۰-۶-۱ بررسی تاثیر دما بر روی فرآیند ایزومریزاسیون..... ۲۳
- ۱۱-۶-۱ بررسی تاثیر pH بر روی فرآیند ایزومریزاسیون..... ۲۴
- ۱۲-۶-۱ گلوکز ایزومراز حاصل از گونه های دیگر..... ۲۵
- ۷-۱ فروکتوز..... ۲۶
- ۱-۷-۱ روش آنزیمی تولید فروکتوز..... ۲۷
- ۲-۷-۱ نقش فروکتوز در سلامتی..... ۲۷
- ۳-۷-۱ جنبه های اقتصادی تولید فروکتوز..... ۲۸
- ۴-۷-۱ تولید فروکتوز از نشاسته ذرت با استفاده از آنزیم گلوکز ایزومراز..... ۲۹
- ۸-۱ بازدارنده های آنزیم گلوکز ایزومراز..... ۳۱
- ۹-۱ مواد شیمیایی تخریب کننده ساختمان آنزیم گلوکز ایزومراز..... ۳۱

۳۱	.....	۱-۹-۱	اوره
۳۲	.....	۲-۹-۱	گوانیدین هیدروکلراید
۳۲	.....	۳-۹-۱	سدیم دودسیل سولفات
۳۳	.....	۱۰-۱	هدف از انجام این پروژه تحقیقاتی
۳۴	.....		فصل دوم
۳۵	.....	۱-۲	باکتریهای مورد استفاده در پژوهش
۳۵	.....	۱-۱-۲	سویه های <i>E. coli</i>
۳۶	.....	۲-۱-۲	سویه ایزوله شده
۳۶	.....	۲-۲	پلاسمیدهای مورد استفاده در پژوهش
۳۶	.....	۱-۲-۲	پلاسمید pTZ57R
۳۸	.....	۲-۲-۲	پلاسمید pET32a
۳۹	.....	۳-۲	محیط کشت
۳۹	.....	۱-۳-۲	محیط کشت LB مایع
۴۰	.....	۲-۳-۲	محیط کشت LB جامد
۴۰	.....	۳-۳-۲	محیط کشت 2XYT
۴۰	.....	۴-۳-۲	محیط کشت جامد مناسب برای کشت باکتری ایزوله شده
۴۱	.....	۴-۲	محلولها و بافرها
۴۱	.....	۱-۴-۲	تهیه محلول ۱ مولار تریس
۴۱	.....	۲-۴-۲	تهیه محلول اتیدیوم بروماید ۱٪
۴۱	.....	۳-۴-۲	تهیه محلول اسید کلریدریک ۱ مولار
۴۲	.....	۴-۴-۲	تهیه اتانل ۷۰٪
۴۲	.....	۵-۴-۲	تهیه TE
۴۲	.....	۶-۴-۲	تهیه loading buffer
۴۲	.....	۷-۴-۲	تهیه TBE 10X
۴۳	.....	۸-۴-۲	تهیه ژل آگارز ۱٪
۴۳	.....	۹-۴-۲	محلولهای مورد نیاز برای غربالگری آنزیم گلوکز ایزومراز
۴۳	.....	۱۰-۴-۲	بافرهای استخراج DNA ژنومی
۴۴	.....	۱۱-۴-۲	محلول لیزوزیم
۴۴	.....	۱۲-۴-۲	طرز تهیه محلول RNase A
۴۴	.....	۱۳-۴-۲	تهیه محلولهای مورد نیاز در کلونینگ
۴۴	.....	۱-۱۳-۴-۲	کلرید کلسیم ۱۰۰ میلی مولار
۴۵	.....	۲-۱۳-۴-۲	محلول غلیظ آنتی بیوتیک آمپی سیلین
۴۵	.....	۳-۱۳-۴-۲	محلول غلیظ IPTG

- ۴۵.....X-Gal محلول غلیظ ۴-۱۳-۴-۲
- ۴۵.....SDS-PAGE محلول و رنگهای مورد نیاز برای ۱۴-۴-۲
- ۴۷.....محلولهای مورد نیاز برای تعیین فعالیت آنزیم گلوکز ایزومراز ۱۵-۴-۲
- ۴۸.....۵-۲ مراحل انجام پژوهش به صورت گام به گام.....
- ۴۸.....۱-۵-۲ غربالگری باکتری تولید کننده آنزیم گلوکز ایزومراز.....
- ۴۹.....۲-۵-۲ تعیین هویت سویه دارای آنزیم گلوکز ایزومراز.....
- ۴۹.....۱-۲-۵-۲ استخراج DNA ژنومی از سویه ایزوله شده.....
- ۵۱.....۲-۲-۵-۲ تکثیر بخشی از توالی 16S rRNA.....
- ۵۳.....۳-۲-۵-۲ تعیین توالی محصول PCR ژن 16S rRNA.....
- ۵۳.....۴-۲-۵-۲ آنالیز توالی حاصل از 16S rRNA.....
- ۵۳.....۵-۲-۵-۲ ترسیم درخت فیلوژنیک.....
- ۵۴.....۳-۵-۲ تکثیر ژن گلوکز ایزومراز سویه ایزوله شده.....
- ۵۴.....۱-۳-۵-۲ توالی کامل ژن گلوکز ایزومراز سویه ایزوله شده.....
- ۵۴.....۲-۳-۵-۲ تکثیر ژن گلوکز ایزومراز جهت استفاده در فرآیند T/A.....
- ۵۵.....۳-۳-۵-۲ کلون کردن در وکتور T/A.....
- ۵۶.....۴-۳-۵-۲ واکنش الحاق محصول PCR با پلاسمید pTZ57R.....
- ۵۷.....۵-۳-۵-۲ ترانسفورماسیون محصول الحاق به باکتری DH5 $\alpha$ .....
- ۵۹.....۶-۳-۵-۲ انتخاب کلون.....
- ۵۹.....۷-۳-۵-۲ تایید کلونیهای سفید نو ترکیب.....
- ۶۰.....۴-۵-۲ تعیین توالی ژن گلوکز ایزومراز سویه ایزوله شده.....
- ۶۰.....۱-۴-۵-۲ تخلیص پلاسمید.....
- ۶۰.....۵-۵-۲ بررسی توالی حاصل از تعیین توالی.....
- ۶۱.....۶-۵-۲ کلونینگ ژن گلوکز ایزومراز در وکتور pET32a.....
- ۶۱.....۱-۶-۵-۲ تکثیر ژن گلوکز ایزومراز با پرایمرهای جدید.....
- ۶۱.....۲-۶-۵-۲ هضم محصول PCR و وکتور.....
- ۶۳.....۳-۶-۵-۲ الحاق.....
- ۶۳.....۴-۶-۵-۲ ترانسفورماسیون محصول الحاق.....
- ۶۴.....۵-۶-۵-۲ انتخاب کلونیهای نو ترکیب.....
- ۶۴.....۷-۵-۲ بیان ژن گلوکز ایزومراز.....
- ۶۴.....۱-۷-۵-۲ انتقال پلاسمید نو ترکیب به باکتری BL21.....
- ۶۴.....۲-۷-۵-۲ فرآیند بیان.....
- ۶۵.....۳-۷-۵-۲ استخراج پروتئین از باکتری.....

۶۶	۴-۷-۵-۲ الکتروفورز پروتئینها به روش SDS-PAGE
۶۶	۶-۲ تعیین فعالیت آنزیم گلوکز ایزومراز سویه ایزوله شده
۶۶	۱-۶-۲ استخراج آنزیم از داخل سوش
۶۷	۲-۶-۲ دستگاه اولتراسونیک
۶۷	۳-۶-۲ روش سنجش فعالیت آنزیم گلوکز ایزومراز
۶۹	۴-۶-۲ روش تعیین غلظت فروکتوز
۶۹	۵-۶-۲ دستگاه اسپکتروفومتر
۶۹	۷-۲ بیوانفورماتیک
۷۰	۱-۷-۲ شناسایی توالی مشابه با آنزیم ایزوله شده
۷۰	۲-۷-۲ بررسی توالی اسید آمینه ای گلوکز ایزومراز توسط Motif scan
۷۰	۳-۷-۲ شبیه سازی سه بعدی ساختار آنزیم گلوکز ایزومراز
۷۲	فصل سوم
۷۳	۱-۳ استخراج DNA ژنومی از سویه ایزوله شده
۷۴	۲-۳ تکثیر بخشی از توالی 16S rDNA
۷۵	۳-۳ ترسیم درخت فیلوژنی
۷۶	۴-۳ تکثیر ژن گلوکز ایزومراز سویه ایزوله شده
۷۷	۵-۳ کلونینگ
۷۷	۶-۳ تعیین توالی ژن گلوکز ایزومراز کلون شده
۷۹	۷-۳ تکثیر و کلون کردن ژن گلوکز ایزومراز در سویه بیانی
۸۱	۸-۳ بیان ژن گلوکز ایزومراز ایزوله شده
۸۳	۹-۳ تعیین خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم گلوکز ایزومراز ایزوله شده
۸۵	۱۰-۳ بیوانفورماتیک
۸۵	۱-۱۰-۳ بررسی توالی ژن گلوکز ایزومراز کلون شده
۸۶	۲-۱۰-۳ شبیه سازی نرم افزاری ساختار سه بعدی پروتئین
۸۸	فصل چهارم
۸۹	۱-۴ ایزولاسیون
۹۰	۲-۴ تعیین هویت مولکولی و تریپسین فیلوگرام سویه ایزوله شده
۹۱	۳-۴ تکثیر و کلون کردن ژن گلوکز ایزومراز
۹۱	۱-۳-۴ تکثیر ژن گلوکز ایزومراز
۹۲	۲-۳-۴ کلون کردن و تعیین توالی ژن گلوکز ایزومراز
۹۴	۴-۴ بیان وخالص سازی پروتئین ایزوله شده
۹۶	۵-۴ تعیین خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم ایزوله شده

- ۶-۴ بیوانفورماتیک..... ۹۶
- ۱-۶-۴ بررسی توالی ، مطالعات ساختاری و فعالیت بالقوه گلوکز ایزومراز جدید..... ۹۶
- ۷-۴ پیشنهادات..... ۹۷
- مراجع..... ۹۸

# فصل اول

مقدمه

## ۱-۱ مقدمه

آنزیم‌ها از محصولات عمده در فرآیندهای بیولوژی به حساب می‌آیند. آنها در چند دهه اخیر در صنایع به عنوان مناسبترین ماده در تغییر و تبدیل ترکیبات در صنایع مورد استفاده قرار گرفته‌اند و نقش بیولوژیکی آنها در بهبود کیفیت محصولات تولیدی در صنایع غذایی، دارویی و بهداشتی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. آنزیم‌ها در واقع کاتالیزورهای زیست‌شناختی با ماهیت پروتئینی هستند و توسط موجودات زنده، حیوانات، گیاهان و میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند [۱].

بسیاری از آنزیم‌ها از میکروارگانیسم‌ها استخراج می‌شوند و در صنعت نیز کاملاً متداول و مفید هستند. از جمله این آنزیم‌ها که در مقیاس وسیع تولید می‌شوند، پروتئاز باکتریایی است که در پودر پاک‌کننده، در ساخت پنیر، ترد کردن گوشت، پخت نان، حذف تیرگی آبجو و هضم غذایی استفاده می‌شوند و از آنزیم گلوکز اکسیداز برای نگهداری مواد غذایی و گلوکوناز در صنعت آبجو سازی استفاده می‌گردد.

آنزیم های حاصل از میکروارگانیسم ها به دو دسته برون سلولی و درون سلولی تقسیم می گردند. آنزیمهای برون سلولی توسط میکروارگانیسم تولید و به بیرون ترشح می شوند. جدا سازی چنین آنزیمهای معمولا نسبتا ساده است، در صورتیکه یک سری آنزیم ها مثل گلوکز ایزومراز و گلوکز اکسیداز به صورت درون سلولی تولید می شوند. استخراج آنزیم از درون سلول و از بین بردن آلودگیهایی همانند مواد سلولی، پروتئینهای نا خواسته موجود در سلول برای استفاده در مقیاس بزرگتر برای تولید آنزیم مشکل است.

## ۱-۲ روش مطالعه آنزیمی در میکروارگانیسم ها

طرق مختلفی برای مطالعه آنزیم های میکروارگانیسمها معمول می باشد که بطور خلاصه عبارتند از:

(۱) مطالعه خواص بیوشیمیایی آنها مثل خواص پروتئولیتیک و گلوکیدولیتیک و لیپولیتیک.

از روی قدرت احیاء کنندگی یا تاثیر این موجودات بر روی مواد فوق می توان بوجود و

فعالیت آنزیم های مربوطه پی برد

(۲) مطالعه آنزیم ها در سوسپانسیون باکتری ها : پایه و اساس این روش بر جلوگیری از تولید

مثل و مطالعه اعمال حیاتی آنها به حالت عادی استوار می باشد.

(۳) جدا کردن آنزیم های اختصاصی میکروارگان ها : این عمل در مورد آنزیم های خارج سلولی

به سهولت امکانپذیر می باشد و کفایت سلولهای باکتریها را از محیط کشت بوسیله صاف

کردن ( در صورتیکه آنزیم جذب مواد صافی نشود ) و یا بوسیله سانتریفیوژ جدا سازی کرد. در

حالت اخیر آنزیم ها یا بصورت رسوب و یا به حالت مواج در سطح بدست می آیند و یا با استفاده

از خاصیت جذب آنزیمی اکسید آلومینیوم طبیعی یا یک ماده کلوئیدی یا فسفات کلسیم می

توان آنها را از محیط کشت جدا ساخت. اما مطالعه در مورد آنزیم های درون سلولی بعلت تغییر

احتمالی دستگاه آنزیمی در مقابل شرایط عمل و همچنین بعلت وجود دیواره سلولی که مانع از

آزاد شدن آنها می گردد خالی از اشکال نمی باشد [۱].



در بعضی موارد میکرو ارگانسیم های شسته شده را که برای این منظور آماده شده اند به حالت طبیعی خشک می نمایند و یا اینکه مدتی تحت تاثیر بعضی از مواد مثل استن و تولوئن قرار می دهند و سپس برای بدست آوردن آنزیم، آنها را در یک محلول تامپون وارد می کنند. اما بهترین روش برای بدست آوردن آنزیم های درون سلولی خرد کردن آنهاست که برای انجام این عمل از وسایل مختلف مثل هاون های مخصوص و امواج صوتی (60 - 50 cy/ Sec) و یا امواج ماوراء صوت و همچنین از تغییر دادن آنی فشار و یا قرار دادن آنها در دماهای زیر صفر و حرارت دادن بلافاصله آنها استفاده می شود.

روشهای مزبور بر حسب قدرت، مقاومت دیواره و همچنین آنزیم های مختلف بکار برده میشود و در حالات اختصاصی می توان از عوامل تجزیه کننده دیواره، مثل آنزیم لیزوزیم (در بعضی باکتریها بخصوص میکروکوکوس لیزودیکتیکوس) استفاده نمود. در این عمل دیواره خرد شده و پس مانده میکروارگانسیم مزبور را توسط سانتریفیوژ نمودن جداسازی نموده و قسمت آبکی آنرا در آب سترون قرار می دهند و با ریختن مقداری از آن بر روی محلولهای تامپونی که با pH های مختلف تهیه شده اند وجود آنزیم های حاصل از سلولها را بررسی می نمایند و در صورت لزوم برای تقویت عمل آنها از کوفاکتورهایی مثل کوآنزیم ATP استفاده می شود [1].

### ۳-۱ تولید آنزیم در صنعت

نام آنزیم که (منظور خمیر مایه یا خمیر ترش) تا سال ۱۸۷۸ که توسط Kuhne به دست آمده به عنوان یک لغت علمی بکار نمی رفت. تاثیرات آنزیم ها بعنوان عوامل شیمیایی، فیزیکی و تغییرات عملکرد در غذا مشاهده شده و در چند قرن اخیر در تولید محصولات مثل پنیر، گوشت، آبجو، شراب و یک سری کالاهای پختنی مورد استفاده قرار گرفته است. تولید آنزیم از طریق میکروبی بسیار سریع است زیرا رشد میکروارگانسیمها بصورت تقسیم دوتایی و در زمان کوتاهی انجام می گیرد. همچنین تولید آنزیم در اوسط قرن بیستم در فرمانتور غوطه ور

گسترش یافت بخصوص تولید آمیلو گلوکوزیداز در سال ۱۹۶۰ و همین روش برای سایر میکروارگانیسم ها و تولید آنزیم های تجاری بکار گرفته شد [۱].

مرحله اول در تولید آنزیم شامل انتخاب منبع آنزیمی توسط جداسازی از گیاهان ، حیوانات و میکروب ها ( باکتریها و قارچ ها و ..... ) در یک موقعیت مناسب اکولوژی، از محدوده زیستگاه طبیعی تا زیستگاههایی مثل آتشفشانها، مناطق سرد قطب شمال، مناطق شرجی، در اعماق دریاها و دریاچه های نمک دار و .... می باشد. انتخاب گونه از محیط ویژه برای هر آنزیم شدیداً به شرایط مطرح در تولید آنزیم در صنعت بستگی دارد. مثلاً مناطقی مثل دریاچه های داری سود و بی کربنات و محیطهای گرم و داغ و احتمالاً منابع میکرو ارگانیسمهای سرد و قطب شمال ( سرما دوست ) برای کاربردهای صنعتی در دماهای پایین مناسب هستند. پس از اینکه این نمونه ها از محیطهای مذکور جداسازی شدند، خالص سازی شده و بالاخره بهترین انتخاب جدا سازی می شوند [۱].

#### ۱-۴ نوع میکرو ارگانیسم

میکروارگانیسم های مورد استفاده ممکن است به دو دسته نوع وحشی و نوع تغییر یافته ژنتیکی ( باز ترکیب ) تقسیم شوند. که در نوع اول آنزیم از منبع اولیه میکروبی تهیه و آنزیم نوع وحشی تولید می شود. و نوع دوم میکروب ژنتیکی ( GMO ) که ژن تولید آنزیم از منبع اولیه انتقال یافته و در ژنوم میکروارگانیسم دیگر نسخه برداری می شود. معمولاً میکروارگانیسم ها می بایست از دسته ایمن، غیر سمی و غیر بیماریزا و بدون تولید آنتی بیوتیک باشند. زیرا این آنزیم ها در مواد غذایی بکار می روند. بهر حال جدا سازی آنزیم از میکروارگانیسم بستگی به کاربرد آن دارد. بخصوص در مواردی که آنزیم در مورد تشخیص بیماری و درمانی بکار می رود این امر مهمتر بنظر می رسد تا آنزیم هائیکه فقط در صنعت بکار می روند مثل لیپاز، سلولاز، آمیلاز و پروتئاز. روش های مورد استفاده از جمله سانتریفیوژ کردن، هموزن کردن ( شکست سلولی در مواردی که آنزیم درون سلولی است ) ، فیلتراسیون و اولترا فیلتراسیون برای

تغلیظ سلول استخراج شده بکار می رود. همچنین پایدار کننده به ماده استخراج شده افزوده می گردد و به شکل مایع و یا بسته بندی های به شکل جامد توسط خنک کننده پاششی و استوانه ای در پوشش های حفاظ دار ذخیره می شوند. در حالت ایده آل استفاده از منبع اولیه ارگانسیم برای تولید آنزیم بهترین حالت می باشد زیرا در اصل این واکنش دارای سرعت بالا، میزان هزینه پایین است. بهر حال این روش محدودیت هایی نیز دارد: از جمله ارگانسیم اولیه اغلب فعالیت های دیگری علاوه بر تولید آنزیم دارد که ممکن است محدوده کاربرد آن را محدود سازد و بازدهی آن را در فرمانتاسیون بسیار پایین می آورد [۱].

#### ۱-۴-۱ میکرو ارگانسیمها به عنوان مهمترین منابع آنزیمی

در صنعت منابع گیاهی و جانوری برای تولید آنزیم به ترتیب مقادیر ۸٪ و ۴٪ از کل آنزیمها را شامل می شوند و سایر آنزیمهای استفاده شده منشأ میکروبی دارند [۱]. منابع میکروبی را به خاطر یکسری از عوامل ترجیح می دهند که عبارتند از:

۱. برای تولید ارزان هستند.
۲. آنزیمهای آنها قابل کنترل و پیش بینی بیشتری نسبت به انواع گیاهی و جانوری می باشند.
۳. مواد مضر که ممکن است فعالیت آنزیم را کاهش دهد یا تخریب کند در گیاهان و جانوران بیشتر است.
۴. دستکاری ژنتیکی در میکرو ارگانسیمها راحت تر است.
۵. میکرو ارگانسیمها در زمان کم و مقادیر فراوان از طریق تخمیر کشت داده می شوند.
۶. پایداری پروتئین های میکروبی نسبت به همتهای گیاهی و جانوری خود بیشتر است

## ۱-۴-۲ میکرو ارگانیسیمهای GRAS

این میکروارگانیسیمها غیربیماریزا و غیرسمی هستند. اغلب پروتئین ها و آنزیمها از میکرو ارگانیسیمهای (generally recognized as safe) GRAS تولید می شوند. اینها شامل باکتری هایی نظیر *Bacillus subtilis*، *Bacillus amyloliquefaciens*، *Geobacillus stearothermophilus*، به علاوه سایر گونه های متعلق به *Bacilli*، *Lactobacilli* و *Streptomyces* میباشد. قارچهای GRAS هم شامل گونه های جنس *Penicillium*، *Aspergillus*، *Mucor* و *Rhizopus* هستند. مخمرهایی مثل *Saccharomyces cerevisiae* هم جزء اینها می باشند [۲].

## ۱-۵ غربالگری آنزیمها و اهمیت آنها

اگر یک واکنش از لحاظ ترمو دینامیکی انجام پذیر باشد. به احتمال قوی حداقل یک آنزیم برای کاتالیز آن واکنش می توان پیدا کرد [۲]. در طی فرایند تکامل و در اثر فشار اعمال شده در آن مولکولهایی با پایداری مولکولی، فعالیت های بیوکاتالیزی سازش یافته با سوبسترا فرایندهای مؤثر داخل سلولی و مکانیسمی برای انتقال آنزیمهای خارج سلولی به محل خود ایجاد گردیده است. با انجام غربالگری ارگانیسیمها از منابع اکولوژیک مختلف موجود در یک کشور که از نظر ترکیبات آلی، معدنی، pH، درجه حرارت، وجود کاتیون، آنیون و... با هم تفاوت دارند، می توان محصولاتی را بدست آورد که در خلال تکامل سازش یافته اند. پس غربالگری ارگانیسیمهای جدید به منظور اهداف آکادمیک و علوم پایه و یا به دلایل کاربردی و صنعتی صورت می گیرد [۲]. در مسیر انجام تحقیقات، غربالگری (screening) و انتخاب (selection) جزء فرایندهای اولیه به حساب می آیند.

تنوع میکروارگانیسیمها در طبیعت جستجو و کشف را آسان کرده است [۱]. ۸۵٪ از حیات زمین مربوط به میکرو ارگانیسیمها می باشد که تنوع متابولیکی در آن شایان ذکر است. در صنعت بسیاری از آنزیمها در محیطی که نسبت به شرایط فیزیولوژیکی و طبیعی بسیار تفاوت دارد استفاده می