بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده علوم

گروه زیست‌شناسی

پایان‌نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته زیست‌شناسی گرایش فیزیولوژی گیاهی

عنوان

بررسی تنوع ژنهای کدکننده‌ی آنزیم بتاگلوکاناز در سویه‌های بومی باسیلوس جدا شده از محصولات زراعی- باغی کشور

نگارش

شعله ده‌پهلوان

استاتیدراهنما

دکترجلیل خارا

دکترمریم هاشمی

استادمشاور

دکتر مریم موسیوند

آذرماه۱۳۹۲

حق چاپ و تکثیر مطالب این پایانامه برای دانشگاه ارومیه محفوظ است.

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول: مقدمه	
۱-۱. زیست توده گیاهی	۳
۱-۲. ساختار سلولز	۴
۱-۳. انواع سلولاز	۶
۱-۴. بتاگلوکانازها	۸
۱-۵. اهمیت مطالعه آنزیم بتاگلوکاناز	۹
۱-۶. سوبسترا	۱۰
۱-۷. فعالیت بتاگلوکانازها در گیاهان	۱۱
۱-۸. انواع بتاگلوکانازها	۱۲
۱-۹. طبقه‌بندی سلولازها	۱۴
۱-۱۰. ساختار سلولازها	۱۴
۱-۱۱. خانواده‌های گلیکوزید هیدرولازها	۱۵
۱-۱۱-۱. خانواده‌ی ۵ گلیکوزیدهیدرولاز	۱۵
۱-۱۱-۲. خانواده‌ی ۶ گلیکوزید هیدرولاز	۱۶
۱-۱۱-۳. خانواده‌ی ۸ گلیکوزید هیدرولاز	۱۶
۱-۱۱-۴. خانواده‌ی ۹ گلیکوزید هیدرولاز	۱۷
۱-۱۱-۵. خانواده‌ی ۴۵ گلیکوزید هیدرولاز	۱۸
۱-۱۲. *Bacillus*	۱۹
۱-۱۳.گونه *Bacillussubtilis*	۱۹
۱-۱۴. بررسی تنوع	۲۰
۱-۱۴-۱. تنوع ژنتیکی	۲۰
۱-۱۴-۲. روش‌های ارزیابی تنوع ژنتیکی	۲۰
۱-۱۴-۳. بیولوژی مولکولی آنزیم بتاگلوکاناز	۲۱
۱-۱۴-۳-۱. ژنهای کدکننده‌ی آنزیم بتاگلوکاناز	۲۱
۱-۱۴-۳-۲. بیانی از بتا ۱و۳-۱و۴ گلوکاناز باکتریایی	۲۲
۱-۱۴-۳-۲-۱. تنظیم بیان ژن در باسیلوس‌ها	۲۲

۱-۱۴-۳-۲-۲. بیان هترولوگ ۲۳
۱-۱۴-۴. خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم بتاگلوکاناز ۲۳
۱-۱۵. روش سطح پاسخ ۲۴
۱-۱۶. اهمیت وضرورت انجام تحقیق ۲۵
۱-۱۷. هدف از انجام پژوهش ۲۵
۱-۱۸. تعریف واژه‌ها واصطلاحات تخصصی ۲۶

فصل دوم: مواد وروش‌ها

۲-۱. غربال سویه‌های باکتریایی *Bacillussp.* جدا شده از برخی مزارع وباغات میوه بر اساس توانایی تولید آنزیم بتاگلوکاناز ۲۸
۲-۲. ردیابی مولکولی ژن کد کننده آنزیم بتاگلوکاناز در جدایه‌های منتخب ۲۹
۲-۳. استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج ۳۱
۲-۳-۱. اندازه‌گیری غلظت DNA استخراج شده ۳۳
۲-۳-۲. ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده ۳۳
۲-۴. شناسایی جدایه‌های منتخب با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی(16S rDNA) ۳۴
۲-۵. انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR) به منظور تکثیر ژن بتاگلوکاناز ۳۵
۲-۵-۱. بازیابی (ریکاوری) قطعات تکثیر شده با استفاده از کیت ۳۸
۲-۵-۲. تعیین توالی ۴۰
۲-۵-۳. آنالیز فیلوژنتیکی ۴۰
۲-۶. تولید آنزیم بتاگلوکاناز ۴۰
۲-۷. مواد مورد استفاده در اندازه‌گیری کمی فعالیت آنزیمی ۴۲
۲-۷-۱. معرف دی نیترو سالیسیلیک اسید ۴۲
۲-۷-۲. بافرهای سیترات و فسفات ۴۳
۲-۸. منحنی استاندارد گلوکز ۴۳
۲-۹. تعیین ویژگی‌های کاتالیتیکی و شرایط بهینه فعالیت آنزیم بتاگلوکانازجدایه‌های منتخب ۴۴
۲-۹-۱. روش اندازه‌گیری فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز ۴۴
۲-۹-۲. تعیین کمی فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز جدایه‌های منتخب ۴۵
۲-۱۰. تعیین شرایط بهینه فعالیت بتاگلوکاناز جدایه‌های منتخب به روش سطح پاسخ ۴۶
۲-۱۱. تائید صحت مدل‌های حاصل از بهینه‌سازی به روش سطح پاسخ ۴۷

۲-۱۲. بررسی پایداری آنزیم بتاگلوکاناز جدایه‌های منتخب در دماهای مختلف ۴۸
۲-۱۳. بررسی پایداری آنزیم بتاگلوکاناز جدایه‌های منتخب در pHهای مختلف ۴۸
۲-۱۴. بررسی تاثیر خواص مهارکنندگی و یا القاکنندگی عناصر فلزی و مواد شیمیایی بر فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز جدایه‌های منتخب ۴۸
۲-۱۵. بررسی پایداری فعالیت آنزیم در غلظت‌های متفاوت سدیم کلرید ۴۹
۲-۱۶. بررسی پایداری فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز سویه‌های منتخب در حضور اتانول ۴۹
۲-۱۷. بررسی میزان فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز جدایه‌های منتخب در غلظت‌های مختلف سوبسترای لچینن ۴۹
۲-۱۸. سنجش میزان فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز با استفاده از سوبسترای بتاگلوکان و کربوکسی‌متیل‌سلولز ۴۹

فصل سوم : نتایج وتجزیه وتحلیل

۳-۱. غربال سویه‌های باکتریایی *Bacillus sp.* حاصل از برخی مزارع و باغ‌های میوه بر اساس توانایی تولید آنزیم بتاگلوکاناز ۵۱
۳-۲. استخراج DNA ۵۱
۳-۳. شناسایی مولکولی جدایه‌ها با استفاده ژن ۱۶srDNA ۵۲
۳-۴. تکثیر ژن اندو بتاگلوکاناز با استفاده از آغازگرهای Bs cel upو Bgls in ,Cell 73 ۵۳
۳-۵. آنالیز فیلوژنتیکی ۵۵
۳-۶. تولید آنزیم بتاگلوکاناز توسط سویه‌های منتخب ۵۷
۳-۷. تعیین دامنه آزمایشی برای طراحی آزمایش‌ها ۵۸
۳-۸. تعیین ویژگی‌های آنزیم بتاگلوکاناز سویه‌های منتخب ۵۹
۳-۸-۱. تعیین ویژگی‌های آنزیم بتاگلوکاناز سویه‌های منتخب به روش سطح پاسخ ۵۹
۳-۸-۲. تعیین دما، pH و غلظت سوبسترای بهینه فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* S7e ۶۰
۳-۸-۲-۱. بررسی پایداری فعالیت آنزیمی بتاگلوکانازهای سویه S7e در pHهای متفاوت ۶۶
۳-۸-۲-۲. بررسی پایداری فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* S7e در دماهای مختلف ۶۶
۳-۸-۲-۳. بررسی تاثیر سدیم کلرید (NaCl) بر فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* S7e ۶۷
۳-۸-۲-۴. بررسی تاثیر اتانول بر فعالیت آنزیم‌های بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* S7e ۶۸
۳-۸-۲-۵. بررسی تاثیر محرک‌ها و مهارکننده‌ها بر فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* S7e ۶۸
۳-۸-۳. تعیین دما، pH وغلظت سوبسترای بهینه فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* T37a ۷۰
۳-۸-۳-۱. بررسی پایداری فعالیت آنزیمی بتاگلوکانازهای سویه T37a در pHهای متفاوت ۷۵

۳-۸-۴. تعیین دما، pH و غلظت سوبسترای بهینه فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis*K36p88 ۷۶
۳-۸-۴-۱. بررسی پایداری فعالیت آنزیمی بتاگلوکانازهای سویه K36p88 درpHهای متفاوت ۸۰
۳-۸-۵. تعیین دما، pH وغلظت سوبسترای بهینه فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis*H14h ۸۱
۳-۸-۵-۱. بررسی پایداری فعالیت آنزیمی بتاگلوکانازهای سویه H14h در pHهای متفاوت ۸۶
۳-۸-۵-۲. بررسی پایداری فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* H14h در دماهای مختلف ۸۷
۳-۸-۵-۳. بررسی تاثیر سدیم کلرید (NaCl) بر فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* H14h ۸۸
۳-۸-۵-۴. بررسی تاثیر اتانول بر فعالیت آنزیم‌های بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* H14h ۸۸
۳-۸-۵-۵. بررسی تاثیر محرک‌ها و مهارکننده‌ها بر فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* H14h ۸۹
۳-۸-۶. تعیین دما، pH وغلظت سوبسترای بهینه فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis*B5d ۹۱
۳-۸-۶-۱. بررسی پایداری فعالیت آنزیمی بتاگلوکانازهای B5d در pHهای متفاوت ۹۵
۳-۸-۶-۲. بررسی پایداری فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* B5d در دماهای مختلف ۹۶
۳-۸-۶-۳. بررسی تاثیر سدیم کلرید (NaCl) بر فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* B5d ۹۷
۳-۸-۶-۴. بررسی تاثیر اتانول بر فعالیت آنزیم‌های بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* B5d ۹۷
۳-۸-۶-۵. بررسی تاثیر محرک‌ها و مهارکننده‌ها بر فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* B5d ۹۸
۳-۸-۷. تعیین دما، pH و غلظت سوبسترای بهینه فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* D3d ۱۰۰
۳-۸-۷-۱. بررسی پایداری فعالیت آنزیمی بتاگلوکانازهای سویه D3d در pHهای متفاوت ۱۰۴
۳-۸-۸. تعیین دما، pH وغلظت سوبسترای بهینه فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* H14d ۱۰۵
۳-۸-۸-۱. بررسی پایداری فعالیت آنزیمی بتاگلوکانازهای سویه H14d در pHهای متفاوت ۱۰۹
۳-۸-۹. تعیین دما، pH و غلظت سوبسترای بهینه فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* K2b ۱۱۰
۳-۸-۹-۱. بررسی پایداری فعالیت آنزیمی بتاگلوکانازهای سویه K2b در pHهای متفاوت ۱۱۵
۳-۸-۹-۲. بررسی پایداری فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* K2b در دماهای مختلف ۱۱۵
۳-۸-۹-۳. بررسی تاثیر سدیم کلرید (NaCl) بر فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* K2b ۱۱۶
۳-۸-۹-۴. بررسی تاثیر اتانول بر فعالیت آنزیم‌های بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* K2b ۱۱۷
۳-۸-۹-۵. بررسی تاثیر محرک‌ها و مهارکننده‌ها بر فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* K2b ۱۱۷
۳-۹. بررسی میزان فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز جدایه‌های منتخب *Bacillus subtilis* در سوبستراهای لچینن و بتاگلوکان و کربوکسی‌متیل‌سلولز ۱۱۹
۳-۱۰. سنجش آنزیم با سوبسترای لچینن در غلظت‌های مختلف ۱۲۰

فصل چهارم : بحث و نتیجه‌گیری

بحث و نتیجه‌گیری ۱۲۲

فصل پنجم: فهرست منابع و مآخذ

فهرست منابع و مآخذ ۱۳۱

فصل ششم: پیوستها

پیوستها ۱۴۲

فهرست شکل‌ها

شکل۱-۱. شمائی از زیست توده لینگوسلولز ۳

شکل ۱-۲. ساختار رشته‌های سلولز ۵

شکل ۱-۳. نمایش شماتیکی از بتا گلوکان ۱۰

شکل۱-۴. هیدرولیز آنزیمی دیواره سلولی گیاهان (۱و۳)(۱و۴)بتا دی گلوکان‌ها ۱۱

شکل ۱-۵. ساختار سلولاز در حال تجزیه زنجیره سلولز ۱۵

شکل۱-۶. انواع تاخوردگی دمن کاتالیتیکی در خانوادهای مختلف گلیکوزید هیدرولازها ۱۸

شکل۳-۱. نمونه نتیجه مثبت آزمون کیفی تولید آنزیم بتاگلوکاناز توسط جدایه باکتریایی که به صورت هاله شفاف مشاهده می‌شود. ۵۱

شکل ۳-۲. نتیجه استخراج DNA ۵۲

شکل ۳-۳. تکثیر ژن بتاگلوکاناز توسط PCR ۵۳

شکل ۳-۴. تکثیر ژن بتاگلوکاناز توسط PCR ۵۴

شکل ۳-۵. تکثیر ژن بتاگلوکاناز توسط PCR ۵۴

شکل۳-۶. درخت فیلوژنی ۵۷

شکل۳-۷. منحنی استاندارد گلوکز ۵۷

شکل۳-۸. مقایسه فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز سویه‌های باکتریایی غربال شده از فیلوسفر و ریزوسفر محصولات زراعی در pH۴/۶ و دماهای مختلف ۵۸

شکل۳-۹. مقایسه فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز سویه‌های باکتریایی غربال شده از فیلوسفر محصولات باغی در pH۴/۶ و دماهای مختلف ۵۸

شکل۳-۱۰. نمودار سه‌بعدی اثر متقابل تغییرات pH و دما بر فعالیت بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* S7e در نقطه مرکزی غلظت سوبسترا ۶۲

شکل ۳-۱۱. نمودار سه‌بعدی اثر متقابل تغییرات pH و غلظت سوبسترا بر فعالیت بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* S7e در نقطه مرکزی دما ۶۳

شکل۳-۱۲. نمودار سه‌بعدی اثر متقابل تغییرات دما و غلظت سوبسترا بر فعالیت بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* S7e در نقطه مرکزی pH ۶۳

شکل۳-۱۳. نمودار قیاس همبستگی داده‌های تجربی و پیش‌بینی شده *Bacillus subtilis* S7e ۶۴

شکل ۳-۱۴. نمودار توزیع باقیمانده مقادیر پیش‌بینی شده *Bacillus subtilis*S7e ۶۵

شکل۳-۱۵. نمودار تاثیر pHهای مختلف بر پایداری فعالیت آنزیمی*Bacillus subtilis* S7e ۶۶

شکل۳-۱۶. نمودار بررسی پایداری آنزیم‌های بتاگلوکاناز *Bacillussubtilis*S7e در دماهای مختلف ۶۷
شکل ۳-۱۷. نمودار تاثیر غلظت مختلف سدیم کلرید بر فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز *Bacillussubtilis* s7e ۶۸
شکل ۳-۱۸. نمودار تاثیر محرک‌ها و مهارکننده‌ها بر فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* S7e ۶۹
شکل۳-۱۹. نمودار سه‌بعدی اثر متقابل pH و دما بر فعالیت بتاگلوکاناز*Bacillus subtilis*T37a در نقطه مرکزی غلظت سوبسترا ۷۱
شکل۳-۲۰. نمودار سه‌بعدی اثر متقابل pH و غلظت سوبسترا بر فعالیت بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* T37aدر نقطه مرکزی دما ۷۲
شکل۳-۲۱. نمودار سه‌بعدی اثر متقابل دما و غلظت سوبسترا بر فعالیت بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* T37a در نقطه مرکزیpH ۷۳
شکل۳-۲۲. نمودار قیاس همبستگی داده‌های تجربی و پیش‌بینی شده *Bacillus subtilis*T37a ۷۴
شکل۳-۲۳. نمودار توزیع باقیمانده مقادیر پیش‌بینی شده *Bacillus subtilis*T37a ۷۴
شکل۳-۲۴. نمودار تاثیر pHهای مختلف بر پایداری فعالیت آنزیمی *Bacillus subtilis* T37a ۷۵
شکل ۳-۲۵. نمودار سه‌بعدی اثر متقابل pH و دما بر فعالیت بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* K36p88 در نقطه مرکزی غلظت سوبسترا ۷۷
شکل۳-۲۶. نمودار سه‌بعدی اثر متقابل pH وغلظت سوبسترا بر فعالیت بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* K36p88 در نقطه مرکزی دما ۷۷
شکل۳-۲۷. نمودار سه‌بعدی اثر متقابل دما و غلظت سوبسترا بر فعالیت بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* K36p88 در نقطه مرکزی pH ۷۸
شکل۳-۲۸. نمودار قیاس همبستگی داده‌های تجربی و پیش‌بینی شده *Bacillus subtilis*K36p88 ۷۹
شکل۳-۲۹. نمودار توزیع باقیمانده مقادیر پیش‌بینی شده *Bacillus subtilis*K36p88 ۷۹
شکل۳-۳۰. نمودار تاثیر pHهای مختلف بر پایداری فعالیت آنزیمی*Bacillus subtilis* K36p88 ۸۱
شکل۳-۳۱. نمودار سه‌بعدی اثر متقابل pH و دما بر فعالیت بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* H14h در نقطه مرکزی غلظت سوبسترا ۸۲
شکل۳-۳۲. نمودار سه‌بعدی اثر متقابل pH و غلظت سوبسترا بر فعالیت بتاگلوکاناز*Bacillus subtilis* H14h در نقطه مرکزی دما ۸۳
شکل۳-۳۳. نمودار سه‌بعدی اثر متقابل دما و غلظت سوبسترا بر فعالیت بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* H14h در نقطه مرکزی pH ۸۴

شکل ۳-۳۴. نمودار قیاس همبستگی داده‌های تجربی و پیش‌بینی شده *Bacillus subtilis*H14h ۸۴
شکل ۳-۳۵. نمودار توزیع باقیمانده مقادیر پیش‌بینی شده *Bacillus subtilis*H14h ۸۵
شکل۳-۳۶. نمودار تاثیر pHهای مختلف بر پایداری فعالیت آنزیمی *Bacillus subtilis* H14h ۸۶
شکل۳-۳۷. نمودار بررسی پایداری آنزیم‌های بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* H14h در دماهای مختلف ۸۷
شکل ۳-۳۸. نمودار تاثیر غلظت‌های مختلف سدیم کلرید بر فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* H14h ۸۸
شکل۳-۳۹. تاثیر محرک‌ها و مهارکننده‌ها بر فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* H14h ۹۰
شکل۳-۴۰. نمودار سه‌بعدی اثر متقابل دما و pH بر فعالیت بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* B5d در نقطه مرکزی غلظت سوبسترا ۹۲
شکل۳-۴۱. نمودار سه‌بعدی اثر متقابل pH و غلظت سوبسترا بر فعالیت بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* B5d در نقطه مرکزی دما ۹۲
شکل۳-۴۲. نمودار سه‌بعدی اثر متقابل دما و غلظت سوبسترا بر فعالیت بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* B5d در نقطه مرکزی pH ۹۳
شکل۳-۴۳. نمودار قیاس همبستگی داده‌های تجربی و پیش‌بینی شده *Bacillus subtilis* B5d ۹۴
شکل۳-۴۴. نمودار توزیع باقیمانده مقادیر پیش‌بینی شده *Bacillus subtilis* B5d ۹۴
شکل۳-۴۵. نمودار تاثیر pHهای مختلف بر پایداری فعالیت آنزیمی *Bacillus subtilis* B5d ۹۵
شکل ۳-۴۶. نمودار پایداری آنزیم‌های بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* B5d در دماهای مختلف ۹۶
شکل۳-۴۷. نمودار تاثیر غلظت‌های مختلف سدیم کلرید بر فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز *Bacillussubtilis* B5d ۹۷
شکل ۳-۴۸. نمودار تاثیر محرک‌ها و مهارکننده‌ها بر فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* B5d ۹۹
شکل۳-۴۹. نمودار سه‌بعدی اثر متقابل دما و pH بر فعالیت بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* D3d در نقطه مرکزی غلظت سوبسترا ۱۰۱
شکل۳-۵۰. نمودار سه‌بعدی اثر متقابل pH وغلظت سوبسترا بر فعالیت بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* D3d در نقطه مرکزی دما ۱۰۱
شکل۳-۵۱. نمودار سه‌بعدی اثر متقابل دما و غلظت سوبسترا بر فعالیت بتاگلوکاناز*Bacillus subtilis* D3d در نقطه مرکزی pH ۱۰۲
شکل۳-۵۲. نمودار قیاس همبستگی داده‌های تجربی و پیش‌بینی شده *Bacillus subtilis* D3d ۱۰۳
شکل۳-۵۳. نمودار توزیع باقیمانده مقادیر پیش‌بینی شده *Bacillus subtilis* D3d ۱۰۳
شکل ۳-۵۴. نمودار تاثیر pHهای مختلف بر پایداری فعالیت آنزیمی *Bacillus subtilis* D3d ۱۰۴
شکل۳-۵۵. نمودار سه‌بعدی اثر متقابل دما و pH بر فعالیت بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* H14d در نقطه ۱۰۶

مرکزی غلظت سوبسترا
شکل۳-۵۶. نمودار سه‌بعدی اثر متقابل pH و غلظت سوبسترا بر فعالیت بتاگلوکوناز *Bacillus subtilis* H14d در نقطه مرکزی دما ۱۰۶
شکل۳-۵۷. نمودار سه‌بعدی اثر متقابل دما و غلظت سوبسترا برفعالیت بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* H14d در نقطه مرکزی pH ۱۰۷
شکل۳-۵۸. نمودار قیاس همبستگی داده‌های تجربی و پیش‌بینی شده *Bacillus subtilis* H14d ۱۰۸
شکل۳-۵۹. نمودار توزیع باقیمانده مقادیر پیش‌بینی شده *Bacillus subtilis* H14d ۱۰۸
شکل۳-۶۰. نمودار تاثیر pHهای مختلف بر پایداری فعالیت آنزیمی *Bacillus subtilis* H14d ۱۰۹
شکل۳-۶۱. نمودار سه‌بعدی اثر متقابل دما و pH بر فعالیت بتاگلوکاناز*Bacillus subtilis* K2b در نقطه مرکزی غلظت سوبسترا ۱۱۱
شکل ۳-۶۲. نمودار سه‌بعدی اثر متقابلpH و غلظت سوبسترا بر فعالیت بتاگلوکوناز *Bacillus subtilis* K2b در نقطه مرکزی دما ۱۱۲
شکل۳-۶۳. نمودار سه‌بعدی اثر متقابل دما و غلظت سوبسترا بر فعالیت بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* K2b در نقطه مرکزی pH ۱۱۲
شکل۳-۶۴. نمودار قیاس همبستگی داده‌های تجربی و پیش‌بینی شده *Bacillus subtilis* K2b ۱۱۳
شکل۳-۶۵. نمودار توزیع باقیمانده مقادیر پیش‌بینی شده *Bacillus subtilis* K2b ۱۱۴
شکل۳-۶۶. نمودار تاثیر pHهای مختلف بر پایداری فعالیت آنزیمی*Bacillus subtilis* K2b ۱۱۵
شکل۳-۶۷. نمودار بررسی پایداری آنزیم‌های بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* K2bدر دماهای مختلف ۱۱۶
شکل۳-۶۸. نمودار تاثیر غلظت‌های مختلف سدیم کلرید بر فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز*Bacillussubtilis* K2b ۱۱۷
شکل۳-۶۹. نمودار تاثیر محرک‌ها و مهارکننده‌ها بر فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* K2b ۱۱۸
شکل۳-۷۰. نمودار بررسی میزان فعالیت آنزیم جدایه‌های *Bacillus subtilis* درسوبستراهای لچینن و بتاگلوکان ۱۲۰
شکل۳-۷۱. نمودار بررسی میزان فعالیت آنزیم جدایه‌های *Bacillussubtilis* در غلظت‌های مختلف سوبسترای لچینن ۱۲۱

فهرست جدول‌ها

جدول ۲-۱. سویه‌های استفاده شده در بررسی تنوع ژنی ۲۹

جدول۲-۲. مقادیر مورد نیاز از محلول‌ها و بافرهای موجود در کیت جهت استخراج DNA ۳۱

جدول ۲-۳. (E.L.B)Enzymatic Lysis Buffer ۳۱

جدول ۲-۴. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در تکثیر 16S rDNA ۳۴

جدول ۲-۵. شرایط دمایی و زمانی چرخه‌های مختلف دستگاه ترموسایکلر برای آغازگرهایpA ۳۵

جدول۲-۶. مشخصات آغازگرها ۳۶

جدول۲-۷. مواد لازم برای تکثیر DNA در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر ۳۶

جدول۲-۸. شرایط دمایی و زمانی چرخه‌های مختلف دستگاه ترموسایکلر برای آغازگرهای CelL73(beta) ۳۷

جدول ۲-۹. شرایط دمایی و زمانی چرخه‌های مختلف دستگاه ترموسایکلر برای آغازگرهایBs cel up ۳۷

جدول ۲-۱۰. شرایط دمایی و زمانی چرخه‌های مختلف دستگاه ترموسایکلر برای آغازگرهایBgls in ۳۸

جدول ۲-۱۱. کد و منبع جداسازی جدایه‌های منتخب ۴۱

جدول ۲-۱۲. فرمول محیط کشتNBY ۴۱

جدول ۲-۱۳. فرمول محیط کشت تولید آنزیم ۴۲

جدول ۲-۱۴. فرمول بافر فسفات با pHهای موردنظر ۴۳

جدول ۲-۱۵. فرمول بافر سیترات با pHهای موردنظر ۴۳

جدول ۲-۱۶. فرمول بافر Tris-glycin با PHهای موردنظر ۴۳

جدول۲-۱۷. کد و منبع جداسازی سی جدایه‌ی مورد بررسی در سنجش کمی بتاگلوکاناز ۴۵

جدول ۲-۱۸. دامنه و سطوح متغیرهای آزمایشی در طرح مرکب مرکزی ۴۶

جدول ۲-۱۹. طرح آزمایشی مرکب مرکزی سه متغیره برای بهینه‌سازی شرایط کاتالیتیکی جدایه‌های منتخب به روش RSM ۴۷

جدول ۳-۱. بتاگلوکانازهای مورد بررسی بر اساس آنالیز Blast ۵۲

جدول ۳-۲. طبقه بندی بتاگلوکانازهای مورد بررسی بر اساس آنالیز Blast ۵۶

جدول ۳-۳. تیمارهای مورد بررسی در طرح مرکب مرکزی و میزان فعالیت بتاگلوکانازی سویه‌های S7e,T37a,K36p88,H14h ۵۹

جدول ۳-۴. تیمارهای مورد بررسی در طرح مرکب مرکزی و میزان فعالیت بتاگلوکانازی سویه‌هایB5d,D3d,H14d,K2b ۶۰

جدول ۳-۵. آنالیز واریانس (ANOVA) سطح پاسخ مدل درجه دوم برای فعالیت آنزیم‌های بتاگلوکاناز ۶۱

سویه S7e

جدول ۳-۶. تعیین صحت مدل آنزیم بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis*S7e ۶۵

جدول ۳-۷. تاثیر اتانول بر فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز *Bacillussubtilis* S7e ۶۸

جدول ۳-۸. تاثیر محرک‌ها و مهارکننده‌ها بر فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* S7e ۶۹

جدول ۳-۹. آنالیز واریانس (ANOVA) سطح پاسخ مدل درجه دوم برای فعالیت آنزیم‌های بتاگلوکاناز سویه T37a ۷۱

جدول ۳-۱۰. تعیین صحت مدل آنزیم بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis*T37a ۷۵

جدول ۳-۱۱. آنالیز واریانس (ANOVA) سطح پاسخ مدل درجه دوم برای فعالیت آنزیم‌های بتاگلوکاناز سویه K36p88 ۷۶

جدول ۳-۱۲. تعیین صحت مدل آنزیم بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis*K36p88 ۸۰

جدول۳-۱۳. آنالیز واریانس (ANOVA) سطح پاسخ مدل درجه دوم برای فعالیت آنزیم‌های بتاگلوکاناز سویه H14h ۸۲

جدول۳-۱۴. تعیین صحت مدل آنزیم بتاگلوکاناز سویه *Bacillus subtilis*H14h ۸۶

جدول۳-۱۵. تاثیر اتانول بر فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز *Bacillussubtilis* H14h ۸۸

جدول۳-۱۶. تاثیر محرک‌ها و مهارکننده‌ها بر فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis*H14h ۸۹

جدول۳-۱۷. آنالیز واریانس (ANOVA) سطح پاسخ مدل درجه دوم برای فعالیت آنزیم‌های بتاگلوکاناز سویه B5d ۹۱

جدول۳-۱۸. تعیین صحت مدل آنزیم بتاگلوکاناز سویه *Bacillus subtilis* B5d ۹۵

جدول۳-۱۹. تاثیر اتانول بر فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز *Bacillussubtilis* B5d ۹۷

جدول۳-۲۰. تاثیر محرک‌ها و مهارکننده‌ها بر فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis*B5d ۹۸

جدول۳-۲۱. آنالیز واریانس (ANOVA) سطح پاسخ مدل درجه دوم برای فعالیت آنزیم‌های بتاگلوکاناز سویه D3d ۱۰۰

جدول۳-۲۲. تعیین صحت مدل آنزیم بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* D3d ۱۰۴

جدول۳-۲۳. آنالیز واریانس (ANOVA) سطح پاسخ مدل درجه دوم برای فعالیت آنزیم‌های بتاگلوکاناز سویه H14d ۱۰۵

جدول۳-۲۴. تعیین صحت مدل آنزیم بتاگلوکاناز سویه *Bacillus subtilis* H14d ۱۰۹

جدول۳-۲۵. آنالیز واریانس (ANOVA) سطح پاسخ مدل درجه دوم برای فعالیت آنزیم‌های بتاگلوکاناز سویه K2b ۱۱۰

جدول۳-۲۶. تعیین صحت مدل آنزیم بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis* K2b ۱۱۴

جدول۳-۲۷. تاثیر اتانول بر فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز*Bacillussubtilis* K2b ۱۱۷

جدول۳-۲۸. تاثیر محرک‌ها و مهارکننده‌ها بر فعالیت آنزیم بتاگلوکاناز *Bacillus subtilis*K2b ۱۱۸

جدول ۶-۱. فهرست تجهیزات مورد استفاده ۱۴۳
جدول ۶-۲. مواد شیمیایی مورد استفاده ۱۴۴
جدول ۶-۳. کیت‌های مورد استفاده در بخش مولکولی ۱۴۴
جدول ۶-۴. محیط کشت های مورد استفاده ۱۴۴
جدول ۶-۵. نرم‌افزارهای مورد استفاده ۱۴۵
جدول ۶-۶. جدول مربوط به واحدها ۱۴۵
جدول ۶-۷. جدول مربوط به اختصارات ۱۴۶

چکیده:

بتاگلوکانازها از اعضای خانواده گلیکوزید هیدرولازها بوده که هیدرولیز پیوندهای گلیکوزیدی بتا ۱و ۴ را در بتاگلوکان‌ها کاتالیز می‌کنند. این گروه از آنزیم‌ها براساس شباهت توالی‌های اسید آمینه نواحی کاتالیتکی خود در ۱۵ خانواده از ۸۶ خانواده گلیکوزید هیدرولازها گروه‌بندی شده‌اند. در این پژوهش هدف، تعیین توالی ژن‌های کد کننده آنزیم بتاگلوکاناز و طبقه‌بندی سویه‌های مورد بررسی بر اساس نوع خانواده آنزیمی و تعیین شرایط بهینه کاتالیتیکی آنزیم‌های تولیدی به روش سطح پاسخ بود. در این بررسی ۲۷ سویه از *Bacillus subtilis* جدا شده از باغات و مزارع کشور بر اساس توانایی تولید آنزیم بتاگلوکاناز، غربال شده و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، ژن آنزیم بتاگلوکاناز تکثیر، تعیین توالی و در پایگاه اطلاعاتیNCBI ثبت شد. آنالیز توالی‌های به دست آمده و رسم درخت فیلوژنی با استفاده از نرم‌افزار vector NTI وMega.4 انجام شد. مقایسه توالی آمینواسیدی ژن‌های اندوبتا ۱و۴ گلوکاناز در جدایه‌های مورد بررسی نشان داد که تمام جدایه‌ها دارای ژن‌های مذکور بوده و به ترتیب در خانواده‌های گلیکوزید هیدرولازهای ۵ و۱۶ قرار می‌گیرند. همچنین جدایه‌های مورد مطالعه خانواده ۵ گلیکوزید هیدرولازها براساس تنوع در توالی آمینواسیدی ژن اندو بتا۱و۴ گلوکاناز در ۱۱ گروه طبقه‌بندی شدند. همچنین فعالیت آنزیمی، آنزیم‌های تولید شده توسط ۳۰ سویه که فعالیت آنزیمی بهتری داشتند را در ۳ تیمار دمایی ۵۵،۳۰ و۷۰ درجه سانتی‌گراد و در pH ۴/۶ مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصله ۸ سویه S7e ، T37a ، K2b ، K36p88، H14h ، H14d ، D3d و B5d با توجه به دامنه فعالیت آنزیمی و تنوع گیاه میزبان، برای تعیین شرایط بهینه فعالیت بتاگلوکانازی به روش سطح پاسخ و با طرح مرکب مرکزی و با متغیرهای دما، pH و غلظت سوبسترا مورد مطالعه قرار گرفتند. با توجه به نتایج حاصل سویه‌هایS7e ، T37a، K36p88 ، H14h ، H14d ، D3d و B5d در pH اسیدی و نزدیک به خنثی و رنج دمای ۳۵-۶۵ درجه سانتی‌گراد اپتیمم فعالیت را داشتند.سویه K2b برخلاف سویه‌های فوق در pH قلیایی نیز فعالیت قابل قبولی را داشت. بیشترین اثر فعال کننده و بازدارنده فعالیت آنزیمی به ترتیب مربوط به منگنز و جیوه در غلظت ۱۰ میلی‌مولار بود. بتاگلوکانازهای سویه‌های مورد بررسی در غلظت‌های مختلف سدیم کلرید کاهش شدید فعالیت آنزیمی را داشتند و حضور اتانول ۵ درصد تأثیری زیادی بر فعالیت آنزیم‌ها نداشت.

کلمات کلیدی: بتاگلوکاناز، باسیلوس سابتیلیس، شرایط اپتیمم، روش سطح پاسخ، طرح مرکب مرکزی

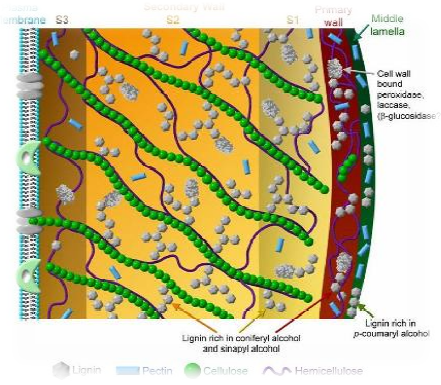
فصل اول

مقدمه

۱-۱. زیست توده گیاهی

لیگنوسلولز

سلول‌های گیاهان بر خلاف دیگر سلول‌ها دارای دیواره‌ای می‌باشند که به دلیل ساختار ویژه‌اش به گیاه استحکام می‌بخشد. دیواره‌ی سلولی از ترکیباتی به نام لیگنوسلولز[۱] ساخته شده است. همانطور که از نام این ترکیبات پیداست، لیگنین[۲] و سلولز[۳] دو بخش عمده‌ی لیگنوسلولزها را تشکیل می‌دهند. لیگنوسلولز به طور عمده شامل سلولز، همی‌سلولز و لیگنین است که این سه ترکیب به نسبت‌های ۵۰:۲۵:۲۵ در آن حضور دارند. البته در زیست توده‌های گوناگون، نسبتِ این مواد متفاوت است، اما در کل این سه ماده نزدیک به ۹۰٪ وزن خشکِ لیگنوسلولز را می‌سازند (Dehkhoda, 2008). به طور ساده، لیگنوسلولز مانند شبکه‌ای است که در آن پلیمرِ سلولز در غلافی از همی‌سلولز و لیگنین پیچیده شده است. لایه‌های همی‌سلولز و لیگنین، سلولز را از هجوم سلولازها در امان نگاه می‌دارند (شکل ۱-۱). وجود پیوندهای فراوان میان زنجیرهای سلولزی نیز بر دشواریِ تجزیه‌ی سلولز به قندهای ساده می‌افزاید. با این همه، به کارگیریِ آنزیم‌های تجزیه کننده‌ی سلولز (سلولازها[۴]) و نیز به کارگیری برخی روش‌های فیزیکی و شیمیایی، موجب می‌شود که سلولز و همی‌سلولز به قندهای ساده و قابل تخمیر یعنی گلوکز (حاصل تجزیه‌ی سلولز) و گزیلوز (حاصل تجزیه‌ی سلولز) شوند (Carpita, 1993).



شکل ۱-۱. شمائی از زیست توده لیگنوسلولز

[1] Lignocellulose
[2] Lignin
[3] Cellulose
[4] Cellulases

۱-۲. ساختار سلولز

سلولز، همی‌سلولز و لیگنین بخش‌های اصلی دیواره سلولی گیاهان هستند. به طوریکه سلولز ۴۰٪، همی‌سلولز ۳۳٪ و لیگنین ۲۳٪ از وزن خشک گیاه را تشکیل می‌دهند (Kelmm *et al*., 2005). سلولز فراوانترین و در دسترس‌ترین کربوهیدرات گیاهی است که میزان تقریبی سنتز سالیانه آن ۴×۱۰^{۱۰} تن در سال می‌باشد (Kelmm *et al*., 2005).

سلولز یک سوم وزن درخت‌ها، علف‌ها، نی و کاه را شامل می‌شود. هرچند سلولز تولید شده در گیاهان عالی فتوسنتتیک و جلبک‌ها مانند گونه‌های *Cladophora* در چرخه کربن از بیشترین اهمیت برخوردارند؛ اما موجودات غیرفتوسنتزی مثل باکتری *Acetobacter xylinum* ، حیواناتی مانند بی‌مهرگان دریایی، قارچ‌ها، کپک‌های لعابی و آمیب‌ها نیز از تولیدکنندگان سلولز محسوب می‌شوند (Zhang and Lynd, 2005 ; Irwin *et al*., 2000).

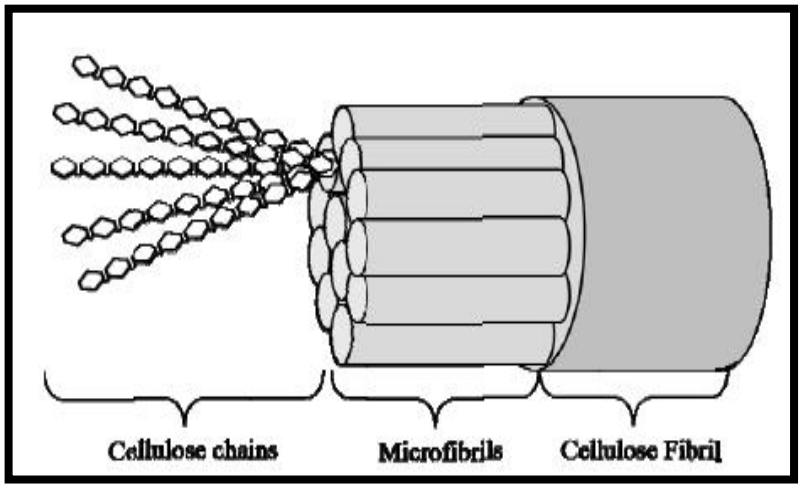
سلولز در قارچ‌ها و جلبک‌ها به تنهایی وجود دارد اما در گروه گیاهان عالی در ترکیب لیگنوسلولز همراه مواد دیگری از قبیل لیگنین می‌باشد که نسبت به سلولز کمتر تحت تأثیر تجزیه بیولوژیکی قرار می‌گیرند. ۱۰تا ۱۵ درصد از لیگنوسلولز از لیگنین و ۳۰-۲۵٪ آن از همی‌سلولز و مابقی از سلولز تشکیل شده است (Kumar *et al*., 2008).

لیگنین موجب محافظت از سلولز در برابر حملات میکروبی می‌شود. سؤال‌های اساسی در ارتباط با مکانیزم تجزیه لیگنوسلولز وجود دارد. موانعی که در این زمینه وجود دارند عوامل متعددی مانند پیچیدگی سوبسترا و تعداد زیاد آنزیم‌های مؤثر می‌باشند (Kinghorn and Turner, 1992).

سلولز مولکول ویژه‌ای است که در طبیعت ساخته شده و در مرحله بیوسنتز بطور خودبخود تجمع می‌یابد. شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد همی‌سلولزهای همراه سلولز، تجمع مولکول را تنظیم می‌کنند (Lynd *et al*., 2002).

ساختار سلولز شبیه یک طناب است که از تعداد زیادی زنجیره بصورت رشته‌های کوچک تشکیل شده است که چندین ریزرشته به منظور تشکیل رشته‌های بزرگتر سلولزی با یکدیگر تجمع می‌یابند (شکل ۱-۲). واحدهای تکرارشونده در ساختار سلولز، سلوبیوزهای بدون آب‌اند که مولکول‌های گلوکز بدون آب مجاور در آن نسبت به همسایه خود ۱۸۰ درجه حول محور اصلی چرخش دارند. سلولز را اغلب با درجه پلیمریزاسیون توصیف می‌کنند که تعداد متوسط

باقیمانده‌های گلوکان در مولکول را می‌گویند و با علامت [5] (DP) نمایش می‌دهند مقدار متوسط DP در سلولز طبیعی بسته به منبع آن بین ۱۰۰۰ تا ۱۴۰۰۰ واحد گلوکز و بطور متوسط ۳۵۰۰ است (Kinghorn and Turner, 1992). زنجیره‌های سلولز توسط پیوندهای ئیدروژنی داخل و بین مولکولی محکم می‌شوند و صفحات حاصل روی یکدیگر قرار گرفته و توسط پیوندهای ضعیف واندروالس بین صفحه‌ای در کنار یکدیگر استحکام می‌یابند، سپس این لایه‌ها فشرده شده تا شبکه کریستالی را شکل دهند (Irwin *et al*., 2000).در واقع سلولز یک هوموپلیمرخطی متراکم می‌باشد که از نظر ساختاری ناهمگن است و حاوی دو ناحیه بسیار کریستالی با نظم زیاد و نواحی ساختاری بانظم کمتر (بی شکل) است (Voutilainen *et al*., 2008 ; Baldrian and Valascova, 2008).



شکل ۱-۲. ساختار رشته‌های سلولز

سلولز طبیعی ۷۰٪ کریستالیزه است.با اینکه ساختارشیمیایی آن ساده است (Baldrian and Valascova, 2008)؛ اما ویژگی‌های فیزیکی آن مانند درجه کریستالیزه بودن و وزن مولکولی آن بسیار متغیر است (Nutt, 2006).تجزیه و تحلیل پراش پرتو X از ساختار کریستالی سلولزها نشان می‌دهد (Kumar *et al*., 2008). طرح اتصال‌های داخل مولکولی، فرم بسته‌بندی و شکل پیوندهای هیدروژنی می‌تواند منجر به اشکال بسیار پیچیده‌ای شود (Nutt, 2006). طی سال‌های گذشته تعداد ساختارهای کریستالی سلولزی شناخته شده از چندین مورد به حدود ۲۳۰ عدد افزایش یافته است (Zhang and Lynd, 2005). سرعت هیدرولیز آنزیمی سلولز شدیداً تحت تأثیر درجه کریستالی آن قرار

[5]Degree of Polymerization

دارد شکل کریستالی به تجزیه میکروبی و آنزیمی بسیار مقاوم است در حالیکه سلولز بی‌شکل بسیار سریع‌تر هیدرولیز می‌شود (Kumar *et al*., 2008). سلولز بصورت خالص سفید رنگ است. در آب، اسیدها و قلیایی‌های رقیق نامحلول بوده و بهترین حلال آن محلول شوایتزر[6] است (محلول آمونیاکی سولفات مس). سلولز در محلول کلرید روی در اسید کلریدریک، اسید سولفوریک غلیظ و سود غلیظ حل می‌شود. هیدرولیز تدریجی آن بوسیله اسیدهای معدنی، تولید دی‌ساکارید سلوبیوز می‌کند. هیدرولیز نهایی آن منحصراً مولکول‌های D-گلوکز تولید می‌کند (Miyamoto, 1997).

۱-۳.انواع سلولاز

آنزیم‌های تجزیه‌کننده سلولز (سلولازها) به وسیله میکروارگانیسم‌های مختلف شامل قارچ‌ها و باکتری‌ها تولید می‌شوند. این آنزیم‌ها می‌توانند به صورت خارج سلولی، داخل سلولی یا متصل به غشا تولید شوند. هر سیستم سلولاز خود مجموعه‌ای کامل از سه آنزیم اصلی است (Jorgensen and Olsson, 2006). امروزه دسته‌بندی مجموعه آنزیم سلولاز براساس نوع فعالیت کاتالیتیک (Duan, 2010) و نوع سوبسترای اختصاصی آن‌هاست (Vries and Visser, 2001) که به شرح زیر می‌باشند:

۱- اندوگلوکاناز با اسامی دیگری چون اندو-۴،۱-بتا-دی-گلوکاناز، اندوسلولاز و کربوکسی‌متیل‌سلولاز (Maheshwari *et al*., 2000) ، که نامگذاری آخر یعنی کربوکسی‌متیل‌سلولاز بعد از استفاده از سوبسترای ساختگی کربوکسی‌متیل‌سلولز برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم، استفاده شد (Dashtban *et al*., 2009) ، چرا که این آنزیم را معمولاً با کاهش چسبناکی[7] محلول‌های کربوکسی‌متیل‌سلولز سنجش می‌کنند (Kinghorn and Turner, 1992). این آنزیم که کمتر از ۲۰٪ کل پروتئین سلولاز را تشکیل می‌دهد (Edwards *et al*., 2008) ؛ بطور تصادفی پیوندهای گلیکوزیدی بتا-۴،۱ را در داخل زنجیره سلولز می‌شکند و به دنبال آن الیگوساکاریدهایی با طول‌های متفاوت و در نتیجه انتهای آزاد تولید می‌کند (Lynd *et al*., 2002). این آنزیم

[6] Schwaitzer
[7] Viscosity