بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه شهید چمران اهواز

دانشکده علوم

پایان نامه کارشناسی ارشد زیست‌شناسی

گرایش میکروبیولوژی

شماره پایان نامه:

۹۳۳۴۲۴۸

عنوان :

جداسازی و شناسایی باکتری‌های هوازی تولید کننده آنزیم تاناز از منابع محیطی

استاد راهنما:

دکتر حسین معتمدی

استاد مشاور:

دکتر محمد محمدی

نگارنده :

معصومه احمدی

۹۱۳۴۲۰۱

بهمن ماه ۱۳۹۳

تقدیم به:

خدایی که آفرید

جهان را، انسان را، عقل را، علم را، معرفت را، عشق را

تقدیم با بوسه بر دستان پدرم:

به او که نمی دانم از بزرگی اش بگویم یا مردانگی، سخاوت، سکوت، مهربانی...

و به مادرم، دریای بیکران فداکاری و عشق که وجودم برایش همه رنج بود و وجودش برایم

هم مهر

و خواهرانم همراهان همیشگی و پشتوانه های زندگیم

خداوند بزرگ را شاکرم که در این مرحله از تحصیل نیز توفیقم داد و یاری ام نمود.

از استاد محترم راهنما جناب آقای دکتر معتمدی که با صبر و تحمل و راهنمایی های ارزنده شان، مرا

در انجام این پایان نامه در تمامی مراحل، مساعدت نموده کمال سپاسگزاری و تشکر را دارم. از استاد

مشاور محترم جناب آقای دکتر محمدی که با نظرات ارزنده شان مساعدت نموده اند کمال تشکر را

دارم و از داوران محترم جناب آقای دکتر رعایایی و دکتر شفیعی از ناظر محترم که زحمت داوری و

نظارت بر پایان نامه را قبول نمودند، کمال تقدیر و تشکر را دارا می باشم.

قدردانی می کنم از کارشناس محترم آزمایشگاه میکروبیولوژی سرکار خانم تریکان که در مسیر انجام

پژوهش مرا یاری نمودند

عنوان | **فهرست مطالب** | صفحه

فصل اول: مقدمه و هدف

۱-۱-مقدمه ۲

۱-۲-هدف از اجرای تحقیق ٤

فصل دوم: مروری بر منابع

۲-۱- ترکیبات فنلی ٦

۲-۲- تانیک اسید ٦

۲-۲-۱- دسته بندی تانن‌ها ۷

۲-۲-۲- خواص فیزیکی و شیمیایی تانن‌ها ۸

۲-۲-۳- تانن‌های قابل هیدرولیز ۹

۲-۲-٤- تانن‌های غیرقابل هیدرولیز یا متراکم ۱۰

۲-۲-۵- تانن کمپلکس ۱۰

۲-۲-٦- خاصیت گسی ۱۱

۲-۲-۷- خواص تغذیه‌ای تانن‌ها ۱۱

۲-۲-۸- پراکندگی تانن‌ها ۱۳

۲-۲-۹- تانن‌های موجود در گیاهان ۱۳

۲-۲-۱۰- میزان تانن در پسماندهای کشاورزی ۱٤

۲-۳- کاربردهای اسید تانیک ۱٦

۲-۳-۱- کاربرد تانن در پزشکی ۱٦

۲-۳-۲- نقش تانن در تغذیه نشخوارکنندگان ۱۸

۲-۳-۳- اثرات مفید تانن‌ها در نشخوارکنندگان ۱۹

۲-۳-٤- مصرف در صنعت ۲۰

۲-٤- روش‌های کاهش و مهار تانن در منابع خوراکی ۲۱

۲-٤-۱- عمل آوری..... ۲۲
۲-٤-۲- تجزیه بیولوژیکی تانن..... ۲۲
۲-۵- آنزیم‌ها..... ۲۳
۲-۵-۱- کاربرد آنزیم‌ها..... ۲٤
۲-٦- آنزیم تجزیه کننده تانن..... ۲٤
۲-٦-۱- خواص آنزیم تاناز..... ۲۵
۲-٦-۲- ساختار مولکولی تاناز..... ۲٦
۲-٦-۳- انواع تاناز..... ۲۸
۲-٦-٤- مکانیسم تجزیه‌ای تاناز..... ۲۹
۲-٦-۵- مهار کنندگان آنزیم تاناز..... ۳۱
۲-٦-٦- تنوع باکتری‌های تولید کننده آنزیم تاناز..... ۳۱
۲-۷- محصولات ناشی از تجزیه تانن توسط تاناز..... ۳۲
۲-۷-۱- گالیک اسید..... ۳۲
۲-۷-۲- پیروگالول..... ۳۳
۲-۷-۳- پروپیل گالات..... ۳٤
۲-۸- منابع تولید آنزیم تاناز..... ۳٤
۲-۸-۱- کاربرد تانازدر پزشکی..... ۳۵
۲-۸-۲- کاربرد در صنایع غذایی..... ۳۵
۲-۸-۳- کاربرد تاناز برای کاهش مواد ضدتغذیه ای خوراک حیوانات..... ۳٦
۲-۸-٤- کاربرد در صنعت..... ۳٦
۲-۹- استخراج تاناز از قارچ..... ۳٦
۲-۱۰- پژوهش‌ها در زمینه تولید تاناز در ایران..... ۳۷
۲-۱۰-۱- پژوهش‌ها در زمینه تولید تاناز در سایر کشورها..... ۳۸
فصل سوم: مواد و روش کار

۳-۱-مواد و وسایل..... ٤٢
۳-۱-۱-مواد مصرفی..... ٤٢
۳-۱-۲-وسایل و تجهیزات..... ٤٥
۳-۲- محیط کشت‌های مورد استفاده..... ٤٦
۳-۲-۱- محیط کشت مورد استفاده برای غربال‌گری باکتری‌های تولید کننده تاناز..... ٤٦
۳-۳- روش تهیه رنگ‌ها، بافرها، معرف‌ها و محلول‌های مورد استفاده..... ٤٧
۳-۳-۱- محلول سوبسترای گالیک اسید جهت رسم منحنی استاندارد..... ٤٧
۳-۳-۲- بافر سیترات ۰/۰۵ مولار با pH۵ ..... ٤٧
۳-۳-۳- تهیه محلول ۰/۰۵ مولار KOH..... ٤٨
۳-۳-٤- تهیه معرف رنگی رودانین..... ٤٨
۳-۳-۵- نحوه آماده‌سازی محلول برادفورد..... ٤٨
۳-۳-٦- تهیه رنگ کریستال ویوله..... ٤٨
۳-۳-۷- تهیه محلول رنگی سافرانین..... ٤٨
۳-۳-۸- تهیه محلول لوگل..... ٤٩
۳-۳-۹- تهیه بافر TAE (5x)..... ٤٩
۳-۳-۱۰- تهیه ژل آگارز یک درصد..... ٤٩
۳-۳-۱۱- تهیه بافر استات سدیم- استیک اسید..... ٤٩
۳-۳-۱۲- تهیه بافر Tris-HCl..... ۵۰
۳-۳-۱۳- تهیه بافر گلیسین- NaOH..... ۵۰
۳-۳-۱٤- تهیه‌ی محلول و بافرهای الکتروفورز SDS-PAGE..... ۵۱
۳-۳-۱٤-۱- آکریلامید ۳۰ درصد..... ۵۱
۳-۳-۱٤-۲- محلول‌های تریس..... ۵۱
۳-۳-۱٤-۳- محلول ۱۰ درصد SDS..... ۵۱
۳-۳-۱٤-٤- بافر حرکت کننده..... ۵۱

۳-۳-۱٤-۵- بافر نمونه..... ۵۲
۳-۳-۱٤-٦- محلول رنگ کوماسی..... ۵۲
۳-۳-۱٤-۷- محلول رنگ‌بر..... ۵۲
۳-۳-٤- روش کار..... ۵۲
۳-٤-۱- نمونه‌گیری..... ۵۳
۳-٤-۲- غنی‌سازی باکتری‌های مولد تاناز..... ۵۵
۳-٤-۳- غربال‌گری باکتری‌های مولد تاناز..... ۵۵
۳-٤-٤- تشخیص باکتری‌های تولیدکننده تاناز..... ۵۵
۳-٤-۵- بررسی میزان تولید آنزیم و تعیین بهترین جدایه..... ۵۵
۳-٤-۵-۱- روش سنجش آنزیم تاناز..... ۵۵
۳-٤-۵-۲- رسم منحنی استاندارد با گالیک اسید..... ۵۷
۳-٤-۵-۳- محاسبه فعالیت آنزیم..... ۵۷
۳-۵- بهینه‌سازی..... ۵۸
۳-۵-۱- بهینه‌سازی شرایط رشد باکتری..... ۵۸
۳-۵-۲- بهینه‌سازی تولید آنزیم توسط جدایه‌های برتر..... ۵۸
۳-۵-۲-۱- آماده‌سازی مایه تلقیح..... ۵۹
۳-۵-۲-۲- اثر گرماگذاری جدایه‌های برتر بر میزان تولید آنزیم تاناز..... ۵۹
۳-۵-۲-۳- تأثیر pH محیط کشت بر میزان تولید آنزیم تاناز..... ۵۹
۳-۵-۲-٤- تأثیر منابع مختلف نیتروژن بر تولید آنزیم..... ٦۰
۳-۵-۲-۵- اثر سوبستراهای مختلف کشاورزی بر میزان تولید آنزیم..... ٦۰
۳-۵-۳- تعیین شرایط بهینه‌ی فعالیت آنزیم تاناز..... ٦۰
۳-۵-۳-۱- بررسی دمای بهینه فعالیت آنزیم تاناز..... ٦۱
۳-۵-۳-۲- بررسی pH بهینه برای فعالیت آنزیم تاناز..... ٦۱
۳-۵-۳-۳- بررسی مقاومت آنزیم تاناز نسبت به پروتئازها..... ٦۱

۳-٦- تعیین میزان پروتئین تولید شده توسط جدایه‌های منتخب..... ٦٢
۳-٦-۱- تعیین غلظت پروتئین..... ٦٢
۳-۷- خالص‌سازی نسبی آنزیم تاناز..... ٦٢
۳-۸- تعیین وزن مولکولی آنزیم تاناز با استفاده از SDS-PAGE..... ٦٣
۳-۸-۱-تهیه ژل جداکننده SDS-PAGE ٦٣
۳-۸-۲- تهیه ژل متراکم‌کننده SDS-PAGE ٦٤
۳-۸-۳- تهیه ژل پلی آکریلامید..... ٦٤
۳-۸-٤- آماده‌سازی نمونه‌ها..... ٦٥
۳-۸-٥- آماده‌سازی تانک الکتروفورز و بارگذاری..... ٦٥
۳-۸-٦- رنگ‌آمیزی پروتئین‌های الکتروفورز شده با آبی کوماسی..... ٦٦
۳-۹- نگهداری جدایه‌ها..... ٦٦
۳-۹-۱- نگهداری کوتاه مدت جدایه‌ها..... ٦٨
۳-۹-۲- نگهداری بلند مدت جدایه‌ها..... ٦٧
۳-۱۰- شناسایی جدایه‌های باکتری..... ٦٧
۳-۱۰-۱- شناسایی مولکولی..... ٦٧
۳-۱۰-۱-۱- استخراج DNA از باکتری با روش دستی..... ٦٧
۳-۱۰-۱-۲- بررسی کیفیت ژنوم استخراج شده..... ٦٨
۳-۱۰-۱-۳- انتخاب پرایمرها..... ٦٨
۳-۱۰-۱-٤- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز..... ٦٨
۳-۱۰-۱-٥- ترکیبات مخلوط و برنامه دمایی تنظیم‌شده برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز..... ٦٩
۳-۱۰-۱-٦- تهیه ژل آگارز و انجام الکتروفورز..... ۷۰
۳-۱۰-۱-۷- تعیین توالی ژنوم 16S rRNA..... ۷۱
۳-۱۰-۲- شناسایی فنوتیپی..... ۷۱
۳-۱۰-۲-۱- مورفولوژی..... ۷۱

۳-۱۰-۲-۲- تست‌های بیوشیمیایی ۷۱

فصل چهارم: نتایج

٤-١- جداسازی و شناسایی باکتری‌ها ۷۳
٤-٢- تولید آنزیم در محیط کشت مایع و تعیین بهترین جدایه‌ها ۷۵
٤-٣- رسم منحنی رشد جدایه‌های RG، RP، RF برای تعیین دمای بهینه رشد ۷۸
٤-٤- رسم منحنی رشد جدایه‌ی RG، RP، RF برای تعیین pH بهینه رشد ۸۰
٤-٥- تعیین واحد آنزیم ۸۲
٤-٦- تأثیر دماهای مختلف بر تولید آنزیم تاناز از سه جدایه RG، RP و RF ۸۲
٤-٧- تأثیر مقادیر مختلف pH بر تولید آنزیم تاناز توسط سه جدایه RG، RF و RP ۸٤
٤-٨- تأثیر منابع مختلف نیتروژن بر تولید آنزیم تاناز توسط سه جدایه RG، RP و RF ۸٦
٤-٩- تأثیر سوبستراهای مختلف کشاورزی بر تولید آنزیم تاناز ۸۸
٤-١٠- تأثیر دماهای مختلف بر فعالیت آنزیم حاصل از جدایه‌های RF، RP و RG ۹۰
٤-١١- تأثیر pH بر فعالیت آنزیم و به دست آوردن pH بهینه عملکرد آنزیم ۹۲
٤-١٢- بررسی مقاومت آنزیم تاناز RG، RP و RF نسبت به پروتئازها ۹٤
٤-١٣- تعیین وزن مولکولی آنزیم تاناز ۹۵
٤-١٤- تعیین غلظت پروتئین ۹٦
٤-١٥- شناسایی باکتری‌های مولد تاناز ۹۷
٤-١٥-١- شناسایی براساس تست بیوشیمیایی ۹۷
٤-١٥-٢- شناسایی فیلوژنتیکی سویه‌های RP، RF، RG ۹۸
٤-١٥-٢-١- بررسی کیفیت ژنوم تخلیص شده ۹۸
٤-١٥-٢-٢- نتایج الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و تعیین توالی ۹۹
٤-١٥-٣- شناسایی ۱۷ جدایه‌ی تولیدکننده تاناز دیگر براساس تست‌های بیوشیمیایی ۱۰۲

فصل پنجم: بحث و نتیجه‌گیری

٥-١-بحث ۱۰٦

۵-۲-نتیجه‌گیری نهایی ۱۱۷
پیشنهادات ۱۱۸
منابع ۱۲۰

عنوان | **فهرست جداول** | صفحه

جدول ۲-۱- غلظت ترکیبات فنلی تفاله دانه انار..... ۱۶

جدول ۲-۲- شش گروه اصلی آنزیم‌ها..... ۲۳

جدول ۲-۳- مقایسه شرایط مطلوب تولید آنزیم تاناز در چند گونه قارچی..... ۲۸

جدول ۲-٤- تعدادی از میکروارگانیسم‌های مولد تاناز شامل باکتری‌ها و قارچ..... ۳۲

جدول ۳-۱- مواد استفاده شده در این تحقیق..... ٤۲

جدول ۳-۲- وسایل و تجهیزات استفاده شده..... ٤٥

جدول ۳-۳- محیط کشت‌های مورد استفاده..... ٤٦

جدول ۳-٤- محتویات محیط کشت مورد استفاده برای غربالگری باکتری‌های تولیدکننده تاناز.. ٤۷

جدول ۳-٥- مقادیر مورد نیاز برای تهیه بافر گلیسین-NaOH ٥۰

جدول ۳-٦- مواد لازم جهت تهیه‌ی بافر نمونه..... ٥۲

جدول ۳-۷- محل‌های مورد استفاده برای نمونه‌گیری..... ٥٤

جدول ۳-۸- تهیه استانداردهای پروتئینی به منظور تعیین غلظت نمونه‌های مجهول..... ٦۲

جدول ۳-۹- مواد لازم جهت ساخت ژل جداکننده SDS-PAGE ۱۰ درصد..... ٦۳

جدول ۳-۱۰- مواد لازم جهت ساخت ژل متراکم کننده SDS-PAGE ۱۰ درصد..... ٦٤

جدول ۳-۱۱- پرایمرهای انتخاب شده جهت انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز..... ٦۸

جدول ۳-۱۲- اجزا و مقادیر مطلوب در مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای سه جدایه ٦۹

جدول ۳-۱۳- برنامه دمایی تنظیم شده برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز..... ۷۰

جدول ٤-۱- باکتری‌های جداشده..... ۷٥

جدول ٤-۲- نتیجه مقایسه کمّی سنجش آنزیمی ۲۰ جدایه برتر..... ۷۷

جدول ٤-۳- نتایج ویژگی‌های مورفولوژیکی و تست‌های بیوشیمیایی جدایه‌های برتر..... ۹۸

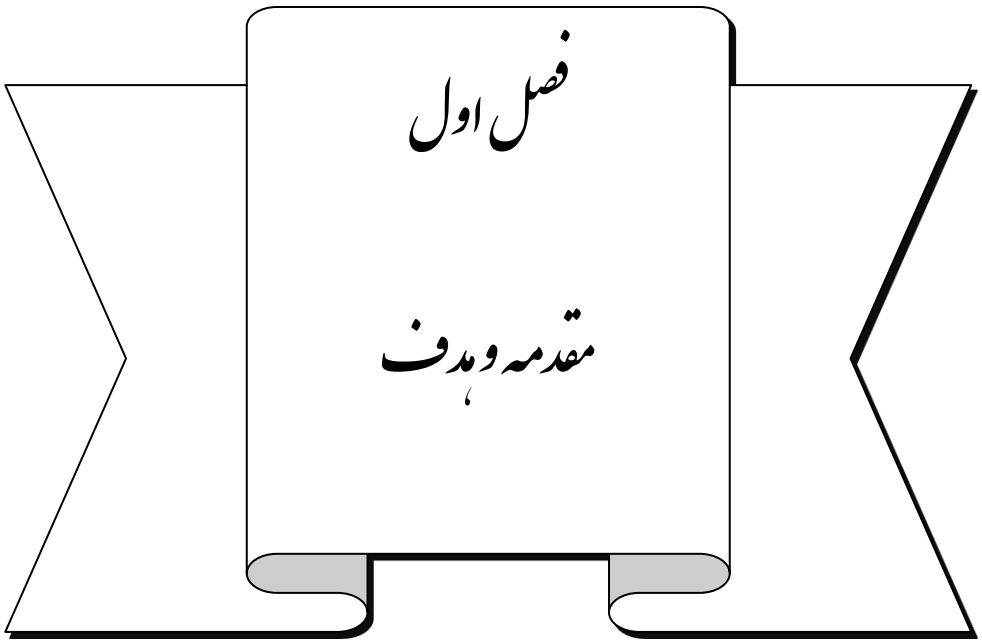
جدول ٤-٤- نتایج ویژگی‌های مورفولوژیکی و تست‌های بیوشیمیایی..... ۱۰۳

جدول ٤-٥- نتایج ویژگی‌های مورفولوژیکی و تست‌های بیوشیمیایی سویه‌های تولیدکننده تاناز ۱۰٤

چکیده

نام خانوادگی : احمدی	**نام:** معصومه	**شماره دانشجویی:** ۹۱۳٤۲۰۱
عنوان پایان نامه : جداسازی و شناسایی باکتری‌های هوازی تولیدکننده آنزیم تاناز از منابع محیطی		
استاد راهنما: دکتر حسین معتمدی		
استاد مشاور: دکتر محمد محمدی		
درجه تحصیلی: کارشناسی ارشد	**رشته:** زیست شناسی	**گرایش:** میکروبیولوژی
دانشگاه : شهید چمران اهواز	**دانشکده:** علوم	**گروه** : زیست شناسی
تاریخ فارغ التحصیلی : **۹۳/۱۱/۵**		**تعداد صفحه: ۱۲۶**
کلید واژه ها : تانن، تاناز، بهینه‌سازی		

تانن، گروهی از پلی فنل‌های طبیعی و محلول در آب است که به پروتئین‌ها متصل و موجب غیرقابل هضم شدن آن‌ها می‌گردد. تانن‌آسیل-هیدرولاز(EC.3.1.1.20) آنزیم کلیدی هیدرولیز تانن است که پیوندهای استری را در تانن قابل هیدرولیز می‌شکند. هدف از این تحقیق جداسازی باکتری‌های تولیدکننده تاناز از منابع محیطی می‌باشد. برای این منظور نمونه‌هایی از مزرعه گندم، خاک برگ، مدفوع گاو، گوسفند، بقایای در حال فساد خرما، برگ‌های در حال فساد اکالیپتوس، ریزوسفر درختان خرما، درخت سرو، اقاقیا، پسماند چای دفن شده در خاک و پسماند زیتون جمع آوری شد. بعد از مرحله غنی سازی و کشت در محیط اختصاصی دارای تانن و انجام سنجش آنزیمی، منحنی رشد جدایه-های منتخب در مقادیر مختلف دما و pH رسم شد. همچنین اثر فاکتورهای pH، دما، منبع نیتروژن و سوبستراهای مختلف کشاورزی بر تولید آنزیم توسط آن‌ها بررسی شد. پایداری آنزیم‌های تولید شده در دما، pH و پروتئازهای مختلف و واحد آنزیمی آن‌ها نیز محاسبه شد. این جدایه-ها با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی و تعیین سکانس ژن 16S rRNA تعیین هویت شدند. در نتیجه این تحقیق، ٤٣ باکتری جداسازی شد که بعد از انجام سنجش آنزیمی، ۲۰ جدایه توانایی تولید تاناز را داشتند. از این ۲۰ جدایه، ۳ جدایه برتر انتخاب شدند. سه جدایه که بیشترین میزان تولید را داشتند متعلق به گونه‌های *Klebsiella pneumoniae*، *Enterobacter cloaca*، *Pseudomonas solanaceanum* تشخیص داده شدند. شرایط بهینه برای تولید تاناز توسط جدایه *Klebsiella pneumoniae* strain RG عبارت بودند از: دمای تولید ۳۰ درجه سانتی‌گراد، pH ۵/۵ ، منبع نیتروژن بهینه آمونیوم سولفات و بهترین تولید در حضور سوبسترای دانه بلوط آسیاب شده در مدت زمان ٤٨ ساعت. و توسط جدایه‌ی *P.solanaceanum* strain RP عبارت بودند از : دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، pH ۷ ، منبع نیتروژن بهینه آمونیوم سولفات، بهترین تولید در حضور سوبسترای دانه بلوط در مدت زمان ٤٨ ساعت و توسط جدایه‌ی*E. cloacae* strain RF : دمای تولید ۳۷ درجه سانتی‌گراد، pH ۵/۵ ، منبع نیتروژن بهینه، نیترات سدیم و بهترین تولید در حضور سوبسترای پوست انار. آنزیم تاناز *K. pneumoniae* در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و pH ۵/۵ بهترین فعالیت را دارد و واحد آنزیمی تاناز و محتوای پروتئینی باکتری آن به ترتیب U/ml ٤٥ و ۰/۲۲۳mg/ml بود. آنزیم تاناز *P.solanaceanum* در دمای ٦٥ درجه سانتی‌گراد و pH ۵/۵ بهترین فعالیت را دارد و واحد آنزیم تاناز و محتوای پروتئینی باکتری *P. solanaceanum* آن به ترتیب U/ml ۳۵ و ۰/۰۸۵mg/ml بود. آنزیم تاناز*E. cloacae* در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و pH ۷ بهترین فعالیت را دارد و واحد آنزیمی تاناز و محتوای پروتئینی باکتری آن به ترتیب U/ml ٤۲/۳ و mg/ml ۰/۲۳۳ بود. براساس نتایج بدست آمده می‌توان بیان کرد که باکتری‌های جداسازی شده قابلیت مناسبی جهت تولید تاناز دارند از این جدایه‌ها می‌توان به عنوان ابزار قوی زیست پالایی پسماندهای حاوی تانن و حذف تانن از غذای دام استفاده کرد.


فصل اول
مقدمه و هدف

۱-۱-مقدمه

تانن، گروهی از پلی‌فنل‌های طبیعی محلول در آب است که در برگ‌ها، میوه‌ها، دانه‌ها، چوب و پوست درختان به فراوانی وجود دارد. این ترکیب دومین گروه فراوان از فنل‌ها بعد از لیگنین و چهارمین ترکیب فراوان گیاهی بعد از سلولز، همی سلولز و لیگنین است (۲۲). تانن به عنوان یک متابولیت ثانویه‌ی گیاهی در نظر گرفته می‌شود چون نقش مستقیمی در متابولیسم گیاهی ندارد و به طور کلی به دو گروه عمده تقسیم می‌شود: تانن متراکم[۱] و تانن قابل هیدرولیز[۲] (۵۲،٦٦). در تقسیم بندی دقیق‌تر، تانن در چهار گروه دسته بندی می شود: گالوتانن[۳]، الاجیتانن[٤]، تانن متراکم[٥] و تانن کمپلکس[٦] (۳٦). وجود گروه‌های زیاد فنلی آن‌ها را قادر می‌سازد کمپلکس‌های محکمی بویژه با پروتئین‌ها و مقادیر کمتری با دیگر ماکرومولکول‌ها مانند نشاسته، سلولز و پکتین تشکیل دهند (۲۲،۲۸). تانن به پروتئین‌ها متصل می‌شود و موجب کاهش دسترسی تجزیه کنندگان زیستی به آن‌ها و در نتیجه موجب غیرقابل هضم شدن آن‌ها می‌گردد (۵۰). تانن اثرات سمی روی حیوانات دارد و رشد میکروارگانیسم‌های مختلفی را مهار می‌کند و بخصوص نوع سخت تجزیه‌ی آن در برابر حمله‌ی میکروبی مقاومت می‌کند (۲۲،۲۸). به همین دلیل تانن میزان تجزیه‌ی موادآلی خاک را با مهار آنزیم‌های میکروارگانسیم‌های تجزیه کننده به تأخیر می‌اندازد (۳۱). تانن با رسوب پروتئین‌ها موجب تلخی وتیرگی آب میوه در طول ذخیره سازی نیز می‌شود (۲۲).

تانن آسیل هیدرولاز[۷] (EC.3.1.1.20) که تاناز[۸] نامیده می‌شود به طور عمده توسط قارچ-ها تولید می‌شود اما مخمرها، باکتری‌ها وگیاهان نیز آن را تولید می‌کنند (۸۰). تاناز از چهار جفت و دو نوع زیر واحد تشکیل شده است که با پیوند دی سولفیدی به هم متصل شده‌اند و یک هترواکتامر ۳۰۰ کیلو دالتونی را تشکیل می‌دهند (۳٦). این آنزیم، آنزیم کلیدی هیدرولیز تانن است

[1] Condensed tannins
[2] Hydrolyzable tannins
[3] Gallotannin
[4] Ellagitannin
[5] Condensed tannins
[6] Complex tannins
[7] tannin acyl hydrolase
[8] Tannase

که پیوندهای استری را در تانن قابل هیدرولیز و استرهای گالیک اسید می‌شکند و موجب تشکیل گلوکز وگالیک اسید آزاد می‌شود (٤٦). تاناز برای تجزیه‌ی تانن موجود در جریان مواد زائد صنعتی مختلف مانند دباغی‌ها به منظور کاهش آلودگی محیطی به کار می‌رود (٦٦). کاربرد تجاری تاناز در تولید چای فوری، مشروبات الکلی و گالیک اسید است. گالیک اسید در صنعت داروسازی یک ترکیب حدواسط مهم در سنتز داروی ضد باکتریایی تری متوپریم[9] است و در صنعت غذایی نیز یک سوبسترای سنتز شیمیایی یا آنزیمی پروپیل گالات است که یک آنتی اکسیدان می‌باشد (٣٦). تاناز عامل شفاف سازی برخی شراب‌ها، آبجو، آب‌میوه و نوشیدنی‌های دارای طعم قهوه است (٨٠). غلظت بالای تانن در میوه‌هایی مانند انار، بلوبری و تمشک موجب تشکیل رسوب، تیرگی و طعم تلخ درطول ذخیره‌سازی آن‌ها می‌شود. تاناز برای خروج رسوبات غیر محلول زمانی که نوشیدنی تا دمای زیر ٤ درجه‌ی سانتی‌گراد سرد می‌شود استفاده می‌گردد. در تهیه‌ی چای سرد نیز طی فرآیندهای شیمیایی خروج رسوب‌های چای، مقادیر زیادی ترکیبات آروماتیک حذف می‌شود اما با وجود این تیمار آنزیمی امکان ایجاد چای محلول در آب سرد با مقادیر بالای ترکیبات آروماتیک و رنگ مناسب را فراهم می‌کند. غلظت تانن انواع ذرت خوشه‌ای که دارای میزان بالای تانن هستند و برای مصرف حیوانات مناسب نیستند با تیمار تانازی یا تاناز تولیدی توسط میکروارگانیسم‌ها کاهش می‌یابد (٣٦). قارچ‌ها فعالیت بهتری در تجزیه‌ی تانن دارند با این وجود یکی از مشکلات بزرگ استفاده از قارچ‌ها در صنعت کند بودن سرعت تجزیه‌ی به وسیله‌ی آن‌ها است (٤٥). بسیاری از قارچ‌ها مانند Aspergillus، Penicillium، Fusarium و Trichoderma همراه مخمرهایی مانند Candidia، Pichia و *Saccharomyces cerevisiae* به عنوان تولیدکننده تاناز گزارش شده‌اند. باکتری‌های تولید کننده‌ی تاناز شامل جنس‌های Bacillus، Staphylococcus، Klebsiella، Corynebacterium، Lactobacillus، Serratia وCitrobacter هستند(٣٦،٤٩،٦٧).

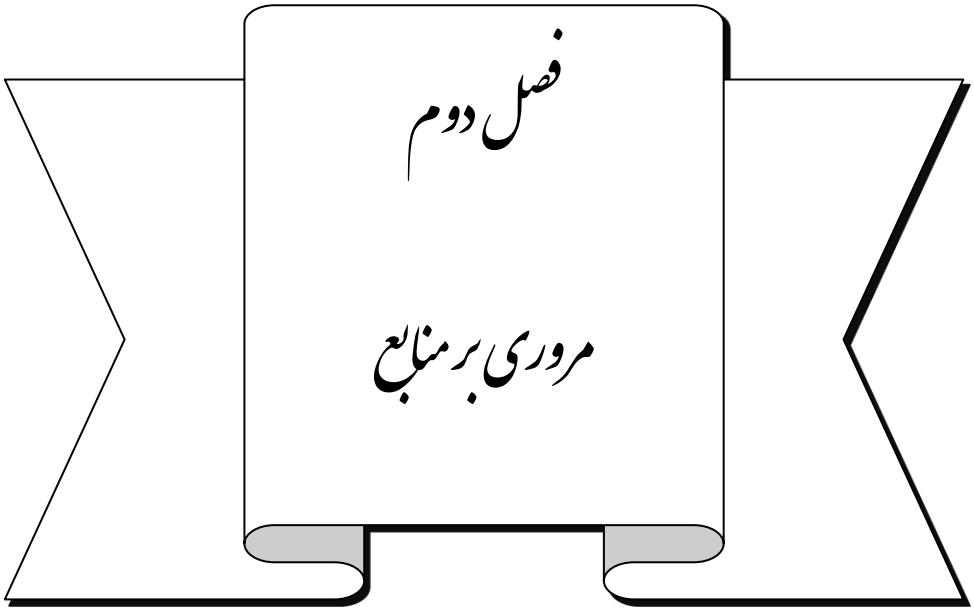
[9] thrimethoprim

۱-۲- اهداف اجرای تحقیق

الف- جداسازی باکتری‌های هوازی تولیدکننده آنزیم تاناز از منابع محیطی

ب- انتخاب بهترین جدایه تولیدکننده آنزیم تاناز

ج- بهینه‌سازی شرایط تولید آنزیم تاناز در بهترین جدایه مولد آنزیم


فصل دوم
مروری بر منابع

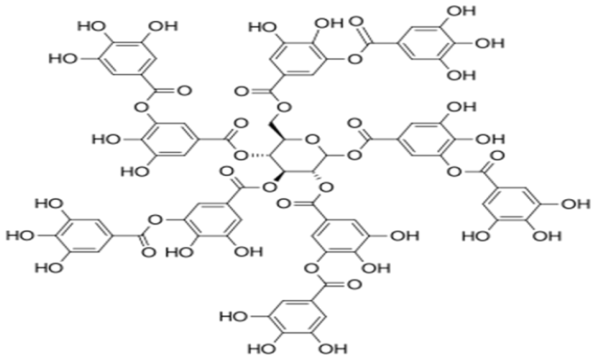
۲-۱- ترکیبات فنلی

ترکیبات فنلی گروه بزرگی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی بوده و حدود ۸۰۰ ترکیب مختلف در این گروه قرار می‌گیرد. ترکیبات فنلی مسئول برخی ویژگی‌های حسی مرتبط با کیفیت مواد غذایی گیاهی می‌باشند که از آن جمله می‌توان به تاثیر آن‌ها در ایجاد طعم تلخ و گس، رنگ تیره، بو و پایداری اکسیداتیو موادغذایی اشاره کرد. از آن‌جا که فنل‌ها مولکول‌های فعالی می‌باشند، به سرعت با سایر فنل‌ها و یا دیگر ترکیبات موجود در مواد غذایی واکنش می‌دهند و رنگدانه پلیمری ایجاد می‌کنند. تلخی و گسی نیز دو ویژگی دیگر می‌باشد که به واسطه حضور ترکیبات فنلی موجود در مواد غذایی در دهان احساس می‌شوند. تلخی و گسی توسط گیرنده‌های چشایی روی زبان به طور مستقیم احساس می‌شود اما گسی به دلیل رسوب گلیکوپروتئین‌های بزاقی توسط ترکیبات فنلی ایجاد می‌گردد (۷٤).

۲-۲- تانیک اسید

اسید تانیک[10] یک تانن قابل هیدرولیز (گالوتانن[11]) است که از آن در صنعت استفاده می‌شود و در بعضی از انواع بلوط وجود دارد. تانیک اسید فرم ویژه‌ای از تانن است که خود نوعی پلی فنل محسوب می‌شود. اسیدیته ضعیف دارد (pK_a آن تقریباً ٦ است). این اسید تعدادی گروه عاملی فنل در خود دارد و فرمول شیمیایی آن به صورت $C_{76}H_{52}O$ با وزن مولکولی ۱۷۰۱/۲۰ گرم بر مول است. تانیک اسید پلیمری از تانن است که دارای خواص ضدمیکروبی، ضدقارچی و آنتی اکسیدان است. در ساختمان تانیک اسید، گالیک اسید توسط پیوندگلیکوزیدی به گلوگز متصل شده است (٤۰).

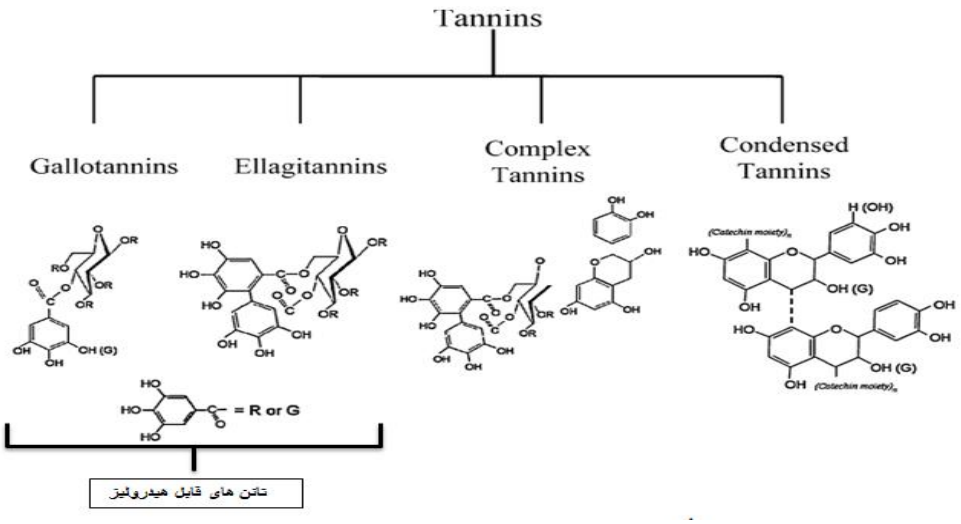
[10] Tannic acid
[11] Gallotannin



۲-۱- ساختمان تانیک اسید (۳۶).

۲-۲-۱- دسته بندی تانن‌ها

تانن‌ها به چهار گروه بزرگ تقسیم می‌شوند: گالوتانن[۱۲]، الاجیتانن[۱۳]، تانن‌های متراکم[۱۴]و تانن‌های کمپلکس[۱۵]، از نظر حلالیت گالوتانن‌ها و الاجیتان‌ها جز گروه قابل هیدرولیز قرار می‌گیرند. ساختار گروه‌های مختلف تانن در شکل۲-۲ نمایش داده شده است (۲۲).



شکل۲-۲- دسته‌بندی تانن‌ها (۲۲)

[12] Gallotannin
[13] Ellagitannin
[14] Condensed tannins
[15] Complex tannins