بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده مهندسی شیمی

ارزیابی فعالیت آنزیمهای کالوس آرنبیا آکروما برای تبدیلهای شیمیایی

مرجان قیامی حور

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد

در رشته

مهندسی شیمی- بیوتکنولوژی

اردیبهشت ماه ۱۳۸۴

دوش وقت سحر از غصه نجاتم دادند — وندر آن ظلمت شب آب حیاتم دادند

بیخود از شعشعه پرتو ذاتم کردند — باده از جام تجلّی صفاتم دادند

چه مبارک سحری بُّود و چه فرخُنده شبی — آن شب قدر که این تازه براتم دادند

من اگر کامروا گشتم و خوشدل چه عجب — مستحق بودم و اینها بزکاتم دادند

هاتف آنروز بمن مژده این دولت داد — که بر آن جور و جفا صبر و ثباتم دادند

بعد از این روی من و آینه وصف جمال — که در آنجا خبر از جلوه ذاتم دادند

اینهمه شهد و شکر کز سخنم میریزد — اجر صبریست کز آن شاخ نباتم دادند

کیمیایی است عجب بندگی پیر مُّغان — خاک او گشتم و چندین درجاتم دادند

"حافظ"

تقدیم به:

پدر و مادر گرامی، عزیز و بزرگوارم

که همواره مشوق من در تمامی مراحل زندگیم بوده اند وتمامی سرمایه زندگانیشان، عمر گرانمایه خویش را به پای صعود من بر قلل موفقیت نثار کردند.

همسر مهربان و صبورم

که پشتوانه و دلگرم کننده من در این مسیر پر پیچ و خم بوده است.

چکیده مطالب

یکی از اهداف مهم بیوتکنولوژی گیاهی، تهیه مواد بیولوژیک ارزشمند از منابع گیاهی تحت شرایط "*in–vitro*" می باشد. در این تحقیق غنای آنزیمی کالوس به دست آمده از ریشه گیاه آرنبیا آکروما نسبت به آنزیم های پراکسیداز و فنیل آلانین آمونیا لیاز مورد بررسی قرار گرفته است. جهت بررسی های آنزیمی کالوس سفید گیاه در محیط LS و کالوس قرمز گیاه در محیط وایت هر ۲۱ روز واکشت می شدند. جهت بررسی آنزیم پراکسیداز پروتئین کالوس سفید در دو مرحله ۴۵٪ و ۸۰٪ رسوب داده شد و جهت بررسی آنزیم PAL از دو مرحله رسوب دهی ۴۵٪ و ۷۵٪ کالوس قرمز استفاده گردید. جهت عیار سنجی فعالیت آنزیم PAL از دو روش اسپکتروفتومتری و کروماتوگرافی TLC استفاده شد که در روش اسپکتروفتومتری تولید محصول سینامیک اسید در اثر واکنش آنزیمی PAL بر روی سوبسترا فنیل آلانین پیگیری شد ولی در این روش فعالیت آنزیمی مشاهده نگردید. در روش کروماتوگرافی TLC نیز هدف پیگیری تولید سینامیک اسید بود که در این روش نیز به دلیل عدم فعالیت آنزیمی تولید سینامیک اسید مشاهده نشد.

جهت بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز، رسوب ۸۰٪ کالوس سفید دارای فعالیت پراکسیدازی خوبی بود که جهت فرآیند تخلیص انتخاب شد و دو مرحله تخلیص بر روی آن صورت گرفت. مرحله اول تخلیص، کروماتوگرافی تعویض آنیونی به کمک ژل DE-52 بود. پروتئین ها از روی این ژل توسط محلول های کلرید سدیم با غلظت های mM ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ شسته شدند. با استفاده از تست پراکسیداز بر روی تمام نمونه های جمع آوری شده از کروماتوگرافی و نیز ژل الکترو فورز نمونه ها، تشخیص داده شد که نمونه mM ۲۰ از میزان پروتئین و آنزیم پراکسیداز خوبی نسبت به سایر نمونه ها برخوردار است. این نمونه به کمک روش خشک کردن در انجماد به صورت جامد تغلیظ گردید. جهت حصول خلوص بیشتر آنزیم در این مرحله از کروماتوگرافی ژلی به کمک ژل سفادکس G-50 استفاده شد. نمونه حاصل از این مرحله تغلیظ گردیده و پارامترهای سینتیکی آنزیم پراکسیداز گیاه آرنبیا آکروما به این ترتیب به مقدار $K_m = ۱/۷۴\times۱۰^{-۴}$M و $V_{max} = ۱/۱۹\times۱۰^{-۶}$ $M.min^{-1}$ نسبت به سوبسترا پراکسید هیدروژن در حضور فنل و ۴-آمینو آنتی پرین تعیین گشتند.

جهت بهبود روش عیار سنجی آنزیم پراکسیداز روشی نوین نیز در این تحقیق ارائه شده است. این روش مصرف ترکیب فنلی رنگی به نام پارا-کلروفنیل-آزو-فنل را بطور مستقیم در حضور پراکسید هیدروژن مورد سنجش قرار می دهد. پارامترهای سینتیکی این روش نسبت به سوبسترا نامبرده شده محاسبه گردیده است. مقادیر K_m و V_{max} این واکنش به ترتیب M ۱۰$^{-۴}$ × ۲/۸۰ و $M \cdot min^{-1}$ ۱۰$^{-۶}$ × ۳۶/۲۳ می باشند.

و در آخر پروتئین کل کالوس و پروتئین رسوبات ۴۵٪ و ۸۰٪ کالوس سفید به دو روش برادفورد و وزنی محاسبه شدند.

سپاسگزاری

در ابتدا لازم می دانم ضمن تشکر و قدردانی از زحمات جناب آقای دکتر کمال الدین حق بین استاد راهنمای اینجانب در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن آوری و جناب آقای دکتر سعید مقصودی استاد راهنمای اینجانب در دانشگاه علم و صنعت ایران، برای ایشان و خانواده های محترمشان سلامتی و موفقیت در تمامی مراحل زندگی، از خداوند متعال مسئلت نمایم.

از اساتید گرامی سرکار خانم دکتر فرشته نعیم پور و جناب آقای دکتر خسرو خواجه جهت راهنمائی ها و امکاناتی که در اختیار اینجانب قرار دادند، سرکار خانم دکتر ایران عالم زاده به جهت قبول دعوت داوری پایان نامه، کلیه اساتید و خدمتگزاران در دانشگاه علم و صنعت ایران و پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن آوری و کلیه دوستان و همکارانم تشکر نموده، سلامتی و موفقیت ایشان را در تمامی ابعاد زندگی از ایزد یکتا خواستارم.

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
مقدمه	۱۴
فصل اول (بررسی منابع)	۱۶-۴۳
۱-۱. اهمیت بیوتکنولوژی گیاهی	۱۷
۱-۲. تاریخچه بکارگیری کشت آزمایشگاهی سلولهای گیاهی	۱۸
۱-۳. تبدیل زیستی (بیوترانسفورماسیون)	۱۹
۱-۴. مشکلات بکارگیری سلولهای گیاهی	۲۰
۱-۵. گیاه آرنبیا آکروما	۲۱
۱-۶. آنزیم چیست	۲۲
۱-۷. تاریخچه آنزیمها	۲۳
۱-۸. روش تولید مدرن آنزیمها توسط میکرو ارگانیسمها	۲۴
۱-۹. طبقه بندی آنزیمها	۲۵
۱-۱۰. خصوصیات آنزیمها	۲۵
۱-۱۰-۱. آنزیمهای تسریع کننده واکنش	۲۶
۱-۱۰-۲. عملکرد اختصاصی آنزیمها	۲۶
۱-۱۰-۳. عملکرد آنزیم تحت شرایط متعادل	۲۷
۱-۱۰-۴. کنترل آسان آنزیمها	۲۷
۱-۱۰-۵. آنزیمها جایگزینی مناسب برای مواد شیمیایی خطرناک	۲۸
۱-۱۰-۶. قابلیت تجزیه پذیری زیستی آنزیمها	۲۸
۱-۱۱. کاربردهای صنعتی آنزیمها	۲۸
۱-۱۲. آنزیم پراکسیداز	۳۱
۱-۱۲-۱. پراکسیدازهای درون سلولی	۳۲
۱-۱۲-۲. پراکسیدازهای ترشح شده قارچی	۳۲
۱-۱۲-۳. پراکسیدازهای گیاهی	۳۳
۱-۱۳. آنزیم پراکسیداز تربچه کوهی (HRP)	۳۴
۱-۱۳-۱. معرفی آنزیم	۳۴
۱-۱۳-۲. ساختار آنزیم پراکسیداز تربچه کوهی	۳۵
۱-۱۴. مطالعات انجام شده بر روی آنزیم پراکسیداز	۳۶
۱-۱۵. مکانیسم عمل آنزیم پراکسیداز	۳۷
۱-۱۶. آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL)	۳۸
۱-۱۷. ناحیه فعال آنزیم PAL	۴۱
۱-۱۸. پارامترهای سینتیکی آنزیم PAL	۴۱
۱-۱۹. شیکونین	۴۲

عنوان	صفحه
فصل دوم (مواد و روشهای تحقیق)	۴۴-۱۱۶
۲-۱. مواد	۴۵
۲-۱-۱. مواد شیمیایی	۴۶
۲-۱-۲. ترکیبات محیط کشت	۴۷
۲-۲. تجهیزات	۴۹
۲-۳. روشهای تحقیق	۵۱
۲-۳-۱. کشت کالوس	۵۲
۲-۳-۲. استخراج پروتئین بافتهای گیاهی	۵۹
۲-۳-۳. کلیات تخلیص پروتئینها	۶۳
۲-۳-۴. سنجش فعالیت آنزیم	۶۷
۲-۳-۵. الکتروفورز	۶۸
۲-۳-۶. محلولها	۷۱
۲-۳-۶-۱. محلولهای بافری	۷۱
۲-۳-۶-۲. محلولهای الکتروفورز	۷۲
۲-۳-۶-۳. محلولهای رنگ آمیزی ژل پلی آکریل آماید	۷۳
۲-۳-۶-۴. محلولهای سنجش آنزیمی	۷۵
۲-۳-۶-۵. محلولهای شست و شوی ستون کروماتوگرافی تعویض یونی	۷۶
۲-۳-۶-۶. محلول رنگ برادفورد	۷۶
۲-۳-۷. روشها و دستورالعملها	۷۷
۲-۳-۷-۱. آماده سازی ها	۷۷
۲-۳-۷-۲. جداسازی و تخلیص پروتئین	۷۸
۲-۳-۷-۳. کروماتوگرافی	۸۲
۲-۳-۷-۴. تغلیظ نمونه	۸۶
۲-۳-۷-۵. شناسایی کیفی وکمی پروتئین	۸۹
۲-۳-۷-۶. کشت کالوس	۹۱
۲-۳-۷-۷. استخراج عصاره آنزیمی	۹۳
۲-۳-۷-۸. حذف نمک با استفاده از دیالیز	۹۵
۲-۳-۷-۹. بررسی وجود آنزیم PAL	۹۶
۲-۳-۷-۱۰. بررسی وجود آنزیم پراکسیداز	۱۰۱
۲-۳-۷-۱۱. کروماتوگرافی تعویض آنیون بوسیله ژل DE-52	۱۰۲
۲-۳-۷-۱۲. تغلیظ نمونه	۱۰۳
۲-۳-۷-۱۳. روش الکتروفورز	۱۰۴
۲-۳-۷-۱۴. کروماتوگرافی بر اساس اختلاف جرم مولکولی بر روی ژل سفادکس G-50	۱۰۸
۲-۳-۷-۱۵. تغلیظ مجدد	۱۰۹
۲-۳-۷-۱۶. بررسی میزان آنزیم پراکسیداز در نمونه های حاصل از ستون سفادکس	۱۰۹

عنوان	صفحه
۲-۳-۷-۱۷. تعیین پارامترهای سینتیکی آنزیم پراکسیداز	۱۱۰
۲-۳-۷-۱۸. بررسی سینتیکی آنزیم استاندارد با سوبسترای پارا-کلروفنیل-آزو- فنل	۱۱۱
۲-۳-۷-۱۹. بررسی تفاوت دو روش سنجش آنزیمی پراکسیداز با فنل و پارا-کلروفنیل-آزو- فنل	۱۱۲
۲-۳-۷-۲۰. محاسبه ضریب خاموشی پارا-کلروفنیل-آزو- فنل	۱۱۲
۲-۳-۷-۲۱. سنجش پروتئین	۱۱۳
۲-۳-۷-۲۲. سنجش پروتئین با روش نوین ارائه شده در تحقیق	۱۱۴
۲-۳-۷-۲۳. محاسبه وزن خشک کالوس نسبت به وزن تر کالوس	۱۱۶
فصل سوم (نتایج)	۱۱۷-۱۳۸
۳-۱. کشت کالوس	۱۱۸
۳-۲. بررسی اختلاف جرم کالوس تر و کالوس خشک	۱۱۸
۳-۳. استخراج و تخلیص	۱۱۹
۳-۴. الکتروفورز پروتئین ها	۱۲۰
۳-۵. تعیین فعالیت آنزیمی	۱۲۱
۳-۵-۱. تعیین فعالیت آنزیم PAL	۱۲۱
۳-۵-۱-۱. روش اسپکتروفتومتری	۱۲۱
۳-۵-۱-۲. روش TLC	۱۲۵
۳-۵-۲. بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز	۱۲۶
۳-۵-۲-۱. کروماتوگرافی تعویض آنیون بوسیله ژل DE-52	۱۲۸
۳-۵-۲-۲. الکتروفورز نمونه های حاصل از ستون کروماتوگرافی DE-52	۱۳۱
۳-۵-۲-۳. تخلیص بر اساس اختلاف جرم مولکولی بر روی ژل سفادکس G-50	۱۳۲
۳-۶. تعیین پارامترهای سینتیکی آنزیم پراکسیداز آرنبیا اکروما برای پراکسید هیدروژن	۱۳۳
۳-۷. ابداع روش حساستر جهت عیار سنجی مستقیم پراکسیداز	۱۳۵
۳-۸. بررسی تفاوت دو روش عیار سنجی آنزیم پراکسیداز	۱۳۶
۳-۹. محاسبه ضریب خاموشی (ε) پارا-کلروفنیل-آزو-فنل	۱۳۸
فصل چهارم (بحث و پیشنهادات)	۱۳۹-۱۵۰
۴-۱. کشت کالوس	۱۴۰
۴-۲. بررسی اختلاف جرم کالوس تر و کالوس خشک	۱۴۰
۴-۳. استخراج و تخلیص	۱۴۱
۴-۴. الکتروفورز پروتئینها	۱۴۱
۴-۵. تعیین فعالیت آنزیمی	۱۴۱
۴-۵-۱. تعیین فعالیت آنزیمی PAL	۱۴۱
۴-۵-۱-۱. روش اسپکتروفتومتری	۱۴۲
۴-۵-۱-۲. پیگیری فعالیت PAL بروش کروماتوگرافی لایه نازک	۱۴۴
۴-۵-۲. بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز	۱۴۵

عنوان	صفحه
۴-۶. تعیین پارامترهای سینتیکی آنزیم پراکسیداز	۱۴۶
۴-۷. بررسی تفاوت دو روش عیارسنجی آنزیم پراکسیداز	۱۴۸
۴-۸. محاسبه اکتیویته آنزیم موجود در کالوس	۱۴۹
فهرست جدولها	
جدول ۱-۱. آنزیمهای متداول در صنعت	۳۰
جدول ۱-۲. گروه بندی پراکسیدازها	۳۴
جدول ۱-۳. خصوصیات آنزیم PAL حاصل از منابع مختلف	۴۱
جدول ۲-۱. مواد شیمیایی مورد استفاده در تحقیق	۴۶
جدول ۲-۲. مواد به کار گرفته شده در محیط کشت کالوس گیاه	۴۸
جدول ۲-۳. تجهیزات به کار گرفته شده در طی تحقیق	۵۰
جدول ۲-۴. عناصر ماکرو مواد معدنی مورد نیاز در محیط کشت	۵۳
جدول ۲-۵. عناصر میکرو مواد معدنی مورد نیاز در محیط کشت	۵۴
جدول ۲-۶. نوع و مقادیر مواد آلی مورد نیاز در محیطهای کشت سلولهای گیاهی	۵۵
جدول ۲-۷. مقادیر آهن در محیطهای کشت مختلف	۵۸
جدول ۲-۸. مقادیر مصرفی هورمونها بنابر غلظتهای مورد نیاز	۵۹
جدول ۲-۹. تعدتدی از رسوب دهنده های پروتئینی	۸۲
جدول ۲-۱۰. حلالهای انتخابی جهت TLC	۱۰۰
جدول ۲-۱۱. درصدهای مختلف آکریل آماید	۱۰۵
جدول ۲-۱۲. مراحل رنگ آمیزی ژل به روش نیترات نقره	۱۰۸
جدول ۲-۱۳. مقادیر مورد استفاده در بررسی سینتیکی آنزیم پراکسیداز	۱۱۰
جدول ۲-۱۴. مقادیر مورد استفاده در بررسی سینتیکی آنزیم پراکسیداز استاندارد	۱۱۱
جدول ۲-۱۵. مقادیر استفاده شده در آزمایش بررسی تفاوت دو روش سینتیکی	۱۱۲
جدول ۳-۱. تفاوت وزن تر و خشک کالوس	۱۱۸
جدول ۳-۲. نتایج تعیین میزان پروتئین کالوس گیاه آرنبیا آکروما	۱۱۹
جدول ۳-۳. سیستم حلالی انتخابی جهت TLC	۱۲۵
جدول ۳-۴. سرعت واکنش آنزیمی نمونه های حاصل از ستون کروماتوگرافی DE-52	۱۳۱
جدول ۳-۵. مقادیر مورد استفاده در بررسی سینتیکی آنزیم پراکسیداز	۱۳۳
جدول ۴-۱. فاصله نقاط بیشینه مواد سنتز شده	۱۴۴
فهرست شکلها	
شکل ۱-۱. آرنبیا آکرومای ایران	۲۱
شکل ۱-۲. ریشه گیاه تربچه کوهی	۳۵
شکل ۱-۳. گیاه تربچه کوهی	۳۵
شکل ۱-۴. مسیر بیوسنتز شیکونین	۴۳
شکل ۲-۱. ساختمان هورمونهای 2،4-D، IAA و کاینتین مورد استفاده	۵۶
شکل ۲-۲. ساختمان شیمیایی دی اتیل آمینو اتیل سلولز	۸۵

عنوان	صفحه
شکل ۳-۱. رسوبات ۴۵٪ و ۸۰٪ کالوس سفید	۱۲۰
شکل ۳-۲. رسوبات ۴۵٪ و ۸۰٪ کالوس سفید در برابر پراکسیداز استاندارد	۱۲۷
شکل ۳-۳. نمونه های حاصل از ستون DE-52	۱۳۱
فهرست نمودارها	
نمودار ۲-۱. مقایسه تکنیکهای مختلف جداسازی پروتئین	۶۷
نمودار ۲-۲. تاثیر قدرت یونی بر حلالیت پروتئین در نقطه ایزو الکتریک	۸۰
نمودار ۳-۱. نمودار استاندارد سنجش پروتئین به روش وزنی	۱۱۹
نمودار ۳-۲. طیف فنیل آلانین در بافر فسفات پتاسیم M ۰/۰۱ با pH=۷	۱۲۲
نمودار ۳-۳. طیف سینامیک اسید در بافر فسفات پتاسیم M ۰/۰۱ با pH=۷	۱۲۲
نمودار ۳-۴. طیف فنیل آلانین با عصاره آنزیمی کالوس قرمز در لحظه صفر	۱۲۳
نمودار ۳-۵. طیف فنیل آلانین با عصاره آنزیمی کالوس قرمز ۱ ساعت بعد	۱۲۳
نمودار ۳-۶. طیف فنیل آلانین با عصاره آنزیمی کالوس سفید در لحظه صفر	۱۲۴
نمودار ۳-۷. طیف فنیل آلانین با عصاره آنزیمی کالوس سفید ۱ ساعت بعد	۱۲۴
نمودار ۳-۸. سرعت واکنش آنزیم پراکسیداز در رسوب ۴۵٪ در حالت پایدار	۱۲۶
نمودار ۳-۹. سرعت واکنش آنزیم پراکسیداز در رسوب ۸۰٪ در حالت پایدار	۱۲۷
نمودار ۳-۱۰. جذب ۲۸۰ nm نمونه های جمع شده از ستون DE-52	۱۲۸
نمودار ۳-۱۱. تست پراکسیداز نمونه ۲۰ mM	۱۲۹
نمودار ۳-۱۲. تست پراکسیداز نمونه ۴۰ mM	۱۲۹
نمودار ۳-۱۳. تست پراکسیداز نمونه ۶۰ mM	۱۲۹
نمودار ۳-۱۴. تست پراکسیداز نمونه ۸۰ mM	۱۳۰
نمودار ۳-۱۵. تست پراکسیداز نمونه ۱۰۰ mM	۱۳۰
نمودار ۳-۱۶. تست پراکسیداز نمونه ۱۲۰ mM	۱۳۰
نمودار ۳-۱۷. تست پراکسیداز نمونه ۱۵۰ mM	۱۳۱
نمودار ۳-۱۸. جذب ۲۸۰ nm نمونه های جمع شده از ستون سفادکس G-50	۱۳۲
نمودار ۳-۱۹. میکائیلیس-منتن	۱۳۴
نمودار ۳-۲۰. خط ویور-برک	۱۳۴
نمودار ۳-۲۱. میکائیلیس-منتن با پاراکلروفنل	۱۳۵
نمودار ۳-۲۲. ویور-برک با پارا-کلروفنیل-آزو-فنل	۱۳۶
نمودار ۳-۲۳. واکنش آنزیم پراکسیداز با فنل	۱۳۷
نمودار ۳-۲۴. واکنش آنزیم پراکسیداز با پارا-کلروفنیل-آزو-فنل	۱۳۷
نمودار ۳-۲۵. نمودار استاندارد محاسبه ضریب خاموشی	۱۳۸
نمودار ۴-۱. طیف فنیل آلانین با عصاره آنزیمی کالوس قرمز ۱ ساعت بعد	۱۴۲
نمودار ۴-۲. طیف فنیل آلانین با عصاره آنزیمی کالوس سفید در لحظه صفر	۱۴۲
نمودار ۴-۳. طیف فنیل آلانین با عصاره آنزیمی کالوس سفید ۱ ساعت بعد	۱۴۳
فهرست پیوستها	۱۵۱-۱۵۹

عنوان	صفحه
پیوست I. جدول درصد اشباع سولفات آمونیم	۱۵۲
پیوست II. متابولیسم نیتروژن	۱۵۳
پیوست III. متابولیسم فنیل آلانین	۱۵۴
پیوست IV. متابولیسم تایروزین	۱۵۵
پیوست V. بیوسنتز آلکالوئید	۱۵۶
پیوست VI. مسیر سنتز لیگنین ها و فنیل پروپانوئیدها	۱۵۷
پیوست VII. شمای کلی بیوسنتز شیکونین	۱۵۸
پیوست VIII. مخفف های موجود درجدول ۱-۳	۱۵۹
منابع	۱۶۰-۱۶۷
خلاصه انگلیسی	۱۶۸

مقدمه

گیاهان منابع آنزیمی خوبی محسوب می گردند. آنزیم های گیاهی، در برخی موارد در تولید ترکیباتی شرکت می کنند که این ترکیبات در هیچ موجود زنده دیگری تولید نمی شوند بدین جهت نه تنها ترکیبات تولید شده توسط این آنزیم ها از اهمیت ویژه ای برخوردار است بلکه خود آنزیم ها بسیار مهم و با ارزش محسوب می شوند. امروزه گیاهان منبع اصلی و عمده آنزیم های صنعتی بسیاری به شمار می روندکه جهت استفاده از این آنزیم ها و به کارگیری آنها در جنبه های مختلف علمی، صنعتی و پزشکی باید این آنزیم ها و مسیر های بیوسنتزی که این آنزیم ها در آنها فعالیت دارند شناخته شود.

از جمله آنزیم های صنعتی مهمی که در واکنش های اکسیداسیونی کاربرد دارد پراکسیداز حاصل از گیاه تربچه کوهی (HRP) می باشد.

پراکسیداز یک متالوآنزیم است که در مجاورت پراکسید هیدروژن مولکولهای متفاوتی را اکسید می کند [۱]. به همین دلیل این آنزیم کاربریهای صنعتی و پزشکی متفاوتی پیدا کرده است. از جمله صنایع کاغذ و چوب، صنایع آرایشی و صنایع نساجی را می توان نام برد [۴-۲]. تحقیقات دهه اخیر نیز نشان داده است که این آنزیم در تجزیه طبیعی لیگنین و تهیه سلولز مناسب میتواند نقش داشته باشد [۶-۵] و این نتایج به اهمیت صنعتی این آنزیم افزوده است. در حال حاضر یک منبع شناخته شده برای تهیه پراکسیداز ریشه تربچه کوهی(Horseradish) می باشد [۷]. پراکسیداز تربچه کوهی (HRP) یک آنزیم اکسیدوردوکتاز می باشد که کوانزیم هم (Heam) برای عملکرد آن ضروری است.

از این آنزیم حدودا ۳۰ ایزوزیم در ریشه تربچه گیاهی شناخته شده اما یک ایزوزیم موسوم به پراکسیداز C اهمیت بیشتری داشته است [۸]. این آنزیم یک پلی پپتید یک زنجیره ایی گلیکوزه با ۳۰۸ اسید آمینه می باشد. در ساختمان این آنزیم ۴ پیوند دی سولفیدی وجود دارد و ظاهرا ۲ یون Ca^{+2} نیز در پایداری ساختمان آن اهمیت ویژه ایی دارند [۹]. HRP در حدود ۴۶ KD با نقطه ایزوالکتریک ۷/۲ می باشد و pH مناسب برای عملکرد آن ۷ می باشد [۱۰]. برای نقش فیزیولوژیک پراکسیداز در سلولهای گیاهی و حیوانی شواهد بسیار زیادی جمع اوری شده است اما

شرکت کنترل شده در فرآیندهای اکسایش و احیاء سلولی به طور عام منسوب به این آنزیم است و از این رو مقدار این آنزیم در سلولهای گیاهی بعضاً تا ۳۰٪ پروتئین کل آنها نیز می رسد[۱۰].

از جمله سایر آنزیم های دیگر گیاه آرنبیا آکروما آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز می باشد . آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز یا PAL (EC. ۴. ۳. ۱. ۵) یکی از مهمترین آنزیمهایی است که در ساخت متابولیسمهای ثانویه گیاهی نقش کلیدی را ایفا می کند. این آنزیم اولین مرحله ساخت اکثر متابولیتهای ثانویه گیاهی را تسریع می کند. واکنشی که توسط PAL تسریع می شود دی آمیناسیون [۱] L-فنیل آلانین[۲] جهت تولید ترانس سینامیک اسید[۳] و آمونیاک می باشد. سینامیک اسید پیش ساز گروه عظیمی از فنیل پروپانوئیدها مثل لیگنین ها[۴]، فلاونوئیدها[۵] و کومارین ها[۶] و ترکیبات فنلی دیگر در گیاه می باشد. لیگنین ها ترکیب اصلی دیواره بافتهای واکوئل هستند و فلاونوئیدها به عنوان رنگدانه و تعیین کننده رنگ گلها و گاهی محافظ گیاه در برابر نورUV در اندامهای هوازی می باشند. پس از جراحت دیدن ویا حمله میکروبی قرار گرفتن گیاه، مواد لیگنین مانندی در برخی نواحی گیاه تولید می شودکه گیاه را از این حمله حفاظت می نماید فنیل پروپانوئیدها از عوامل تلقیح، تولید و رشد گرده ها در گیاهان به شمار می روند [۱۲و۱۱].

با توجه به گرایش بیوتکنولوژی برای استفاده از آنزیم درفرآیندهای متفاوت صنعتی به جای معرفهای شیمیایی، لازم است تا منابع غنی از آنزیم ها شناخته شده و رفتارهای کاتالیتیکی آنها بمنظور استفاده در فرآیندهای مختلف شناخته شود. از این رو این تحقیق به مطالعه آنزیم های پراکسیداز و فنیل آلانین آمونیا لیاز موجود در کالوس Ae اختصاص داده شده است.

[1] Deamination
[2] L-phenylalanine
[3] Trans-cinnamic acid
[4] Lignins
[5] Flavonids
[6] Coumarins

فصل اول

بررسی منابع

۱-۱. اهمیت بیوتکنولوژی گیاهی

گیاهان عالی فرآورده های ثانویه زیادی تولید می کنند که معمولا نقش اساسی در حیات آنها ندارد اما از نظر اکولوژیکی می توانند تاثیراتی مانند جذب حشراتی که به گرده افشانی کمک می کنند یا دفاع شیمیایی در مقابل میکروارگانیسمها، حشرات یا موجودات عالی تر داشته باشند[۱۳]. بسیاری از این فرآورده های طبیعی می توانند منبعی برای تولید محصولات صنعتی مانند مواد شیمیایی، دارویی و کشاورزی باشند[۱۴]. امروزه تقاضا برای فرآورده های ثانویه گیاهی بخصوص در صنایع غذایی و دارویی رو به افزایش است. تولید انبوه این مواد به روشهای مرسوم بیوتکنولوژی می تواند مشکلات کاشت، داشت و برداشت طبیعی این گیاهان و همچنین خطر انقراض آنها را برطرف سازد. به کارگیری این روشها نیاز بشر را به صنایع پرهزینه و آلوده کننده شیمیایی نیز کاهش می دهد.

تحقیقات وسیعی برای تولید فرآورده های ثانویه گیاهی به کمک روشهای متداول در بیوتکنولوژی انجام گرفته است که تا کنون تعداد محدودی از آنها به مرحله صنعتی رسیده اند. هزینه بالای این روشها که عمدتا ناشی از رشد کند سلولهای گیاهی در شرایط *in-vitro* ، ناپایداری وکم بودن میزان محصول در این سلولها می باشد موفقیت در این زمینه را محدود ساخته است[۱۵]. برای بالا بردن مقدارمحصول دهی سلولهای گیاهی شناخت مسیرهای تولید و تنظیم ساخت فرآورده ها از اهمیت بسزایی برخوردار است. مطالعات *in-vitro* سلولهای گیاهی نه تنها منجر به شناخت خط بیوسنتزی ترکیبات مفید می گردد بلکه عوامل ارتقاء دهنده سنتز، مواد اولیه ارزان، شرایط پایدار کننده سلولها و... را مشخص می نماید[۱۳].

یک نمونه موفق تولید صنعتی متابولیتهای ثانویه گیاهی تولید رنگدانه قرمز شیکونین[1] می باشد که علاوه بر کاربردهای رنگی، کاربردهای دارویی نیز دارد. آنچه امروزه در مورد شیکونین می دانیم عمدتا مرهون نتایج پژوهشهای پروفسور مامورا تاباتا[2] استاد بخش علوم دارویی دانشگاه کیوتو ژاپن می باشد. وی تحقیقات منظمی را از ابتدای دهه ۷۰ میلادی بر روی تولید طبیعی شیکونین در

[1] Shikonin
[2] Mamura Tabata

سلولهای ریشه گیاه لیتوسپرمیوم اریتروریزون Le[1] آغاز نمود. نتایج تلاشهای او نهایتاً منجر به طرح صنعتی تولید *in-vitro* شیکونین درسال ۱۹۸۳ میلادی گشت. تهیه شیکونین در واقع اولین مثال فوق از بکارگیری سلولهای گیاهی در بیوتکنولوژی است. آنچنان که بررسی مقالات علمی نشان می دهد جدای از ژاپنی ها، کره جنوبی، چین، امریکا و اخیرا اروپا نیز تحقیقات وسیعی را برای تولید این رنگدانه از گیاه Le یا منابع گیاهی دیگری چون آرنبیا آکروما[۲] (Ae) آغاز کرده اند.

آنچه در مورد شیکونین و یا هر ترکیب طبیعی دیگر اهمیت دارد شناخت دقیق بیوسنتز آن می باشد. از آنجا به بعد می توان با بکارگیری مواد موثر[۳] و یا بازدارنده های[۴] مناسب بیوسنتز آن ترکیب را تحریک و یا متوقف کرد و یا در جهت تشکیل ترکیب دیگری هدایت نمود. اینگونه تحقیقات اگرچه در دنیای بیوتکنولوژی جدید می باشند اما نوید بخش تولید فرآورده های صنعتی متنوعی به روشهای نوین می باشد.

۱-۲. تاریخچه بکارگیری کشت آزمایشگاهی سلولهای گیاهی

تحقیقات بر روی تولید متابولیتهای گیاهی از کالوس[۵] و کشتهای تعلیقی سلولی[۶] در مقیاس وسیع از اواخر دهه ۵۰ میلادی در امریکا و کانادا شروع شد[۱۷و۱۶]. نتایج بدست آمده از کشت سلولهای توتون و موارد مشابه دیگر محرکی برای تحقیقات بیشتر جهت تولید در مقیاس صنعتی در کشورهای مختلف بود. این تحقیقات نشان داد که می توان از سلولهای گیاهی همانند تخمیر میکروبی در فرمانتورهای متنوع مواد مفید تولید نمود. بسیاری از شرکتهای صنعتی ژاپن سعی کردند از این تکنولوژی برای تولید تجاری ترکیبات مفید استفاده کنند. هم اکنون دو شرکت ژاپنی به نامهای پتروشیمی میتسویی[۷] و نیتودنکو[۸] به ترتیب در حال تولید و تهیه رنگدانه های گیاهی

[1] *Lithospermum erythrorhizon*
[2] *Arnebia euchroma*
[3] Effectors
[4] Inhibitors
[5] Callus
[6] Cell suspension culture
[7] Mitsui Petrochemical Industry Co.
[8] Nitto Denko Co.

شیکونین و توده سلولی جین سینگ[1] (درخت چسبان) در مقادیر تجاری هستند. شرکتهای دیگر هم همچون آجینوموتو[2] و نیپون شین یاکو[3] هم تلاش می کنند تا میزان تجمع آلکالوئیدها، استروئیدها و فرآورده های ثانویه دیگر را در کشتهای سلولی افزایش دهند.به نظر می رسد تعدادی از داروهای ضد سرطان نیز به زودی به تولید انبوه برسند[۱۳].

علاوه بر تولید مستقیم مواد طبیعی در کشت سلولهای گیاهی ارزش دیگری نیز نهفته است. سلولهای گیاهی برای تولید مواد طبیعی از آنزیمهای مختلف استفاده می کنند که در کشت آزمایشگاهی سلولها بطبع این آنزیمها نیز تکثیر می شوند. بنابراین از این سلولها ویا عصاره های آنان بعضا می توان برای انجام واکنشهای شیمیایی استفاده نمود[4].

۱-۳. تبدیل زیستی(بیوترانسفورماسیون)

امروزه با استفاده از سلولهای گیاهی ویا عصاره های آنزیمی آنها می توان یک سوبسترای مناسب را به فرآورده های موردنظر تبدیل کرد. این روش به طور گسترده ایی در صنعت تخمیر با استفاده از میکروارگانیسمها و آنزیمهای آنان به کارگرفته شده است. به طور مثال L- آسپارتیک اسید و L-مالیک اسید به صورت تجاری توسط میکروارگانیسمها از اسید فوماریک تولید می شوند[۱۳]. همچنین استروئیدهای مختلف نیز به وسیله تبدیل زیستی میکروبی تولید می گردند.

تولید β-متیل دیجیتوکسین که داروی بیماریهای قلبی است با استفاده از سلولهای *D.lanata* به طور گسترده ایی توسط رانیهارد و آلفرمن[5] مورد مطالعه قرار گرفته است[۱۳] و میزان mg/l ۷۰۰-۶۰۰ از این ماده توسط شرکت بوئرینگرمانهایم در راکتور ۲۰۰ لیتری تولید شده است.

شرکت آللکس مراحلی را برای تولید داروی ضد سرطان گرانفیمتی به نام وین بلاستین از کاتارانتین[6] و ونیدولین توسط تبدیل زیستی بنا نهاد[۱۳] که در حال حاضر توسط شرکت میتسوئی پتروکمیکال به سمت تجاری شدن توسعه یافته است[۱۸]. همچنین تولید صنعتی

[1] Ginseng
[2] Ajinomoto
[3] Nippon Shin-yako
[4] Biotransformation
[5] Reinhard andAlfermann
[6] Catharanthine

ترکیبات وابسته به تولید وین بلاستین نیز با استفاده از آنزیمهای پراکسیداز و گلوکزاکسیداز مورد مطالعه قرارگرفته اند[۱۳].

۱-۴. مشکلات بکارگیری سلولهای گیاهی

بکارگیری سلولهای گیاهی در شرایط مصنوعی با مشکلاتی مواجه می باشد. هزینه تولید این متابولیتها همانطور که توسط برخی از محققین همچون زینک و گلداشتاین تخمین زده شده بود هنوز بالاست[۱۳] و علت آن پایین بودن قدرت تولید سلولهای گیاهی کشت شده می باشد. زینک بیان کرد که تکنیکهای کشت سلول گیاهی تنها در صورتی رایج می شود که فرآورده های گیاهی بدست آمده از این طریق با هزینه ایی برابر یا کمتر از فرآورده های تولید شده در طبیعت تولید شود. یکی از اصلی ترین کارها برای کاهش هزینه افزایش بازده تولید به ازای هر سلول است و این بدان معنی است که مقادیر زیادی از محصولات با تمام سرعت ممکن تولید شود.

واکوئل مهمترین مکان برای ذخیره فرآورده های طبیعی در سلول گیاهی می باشد و ترشح فرآورده ها به خارج از محیط سلولی در گیاهان به ندرت دیده می شود، بازده زیاد متابولیت را که در میکروارگانیسمها مشاهده می شود نمی توان در گیاهان انتظار داشت. در حال حاضر تحقیقاتی بر روی نفوذ پذیر کردن غشاء سلولهای گیاهی در حال انجام است که در این صورت فرآورده مورد نظر به راحتی به خارج سلول تراوش خواهد کرد، اگر این عمل بر تولید و تکثیر گونه گیاهی اثر نامطلوبی نداشته باشد به کم شدن هزینه های تولید کمک زیادی خواهد نمود. نیاز کم سلولهای گیاهی به هوادهی یک مزیت نسب به کشتهای میکروبی به شمار می آید.

علاوه بر مشکلات ذکر شده، مشکلات فراوانی هم در سطح بیوشیمیایی وجود دارد. که عبارتند از:

۱- بیان اندک فرآورده ها

۲- ناپایداری خطوط سلولی

سلولهای گیاهی کشت شده اغلب مقادیر کمتر و متفاوتی از متابولیتهای ثانویه نسبت به گیاه دست نخورده تولید می کنند و این ویژگیهای کمی و کیفی در طول زمان تغییر می کند. از طرفی دیگر انواعی از کشت وجود دارد که متابولیتهای بیشتری و یا متفاوتی نسبت به گیاه کامل(دست