دانشگاه پیام نور

دانشکده کشاورزی

گروه بیوتکنولوژی

عنوان پایان نامه:

جداسازی و شناسایی یک باکتری گرمادوست تولید کننده آنزیم آمیلاز و مطالعه بر روی ویژگیهای بیوشیمیایی آنزیم تولید شده

نگارش:

اعظم صفری

استاد راهنما:

دکتر حسین شهبانی ظهیری

استاد راهنمای همکار:

دکتر غلامرضا بخشی خانیکی

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد

در رشته بیوتکنولوژی کشاورزی

آبان 88

صمیمانه ترین خوشه های محبت درخت اقاقیای عشق را به پدر، مادر و خواهران و برادران عزیزم تقدیم می کنم که پرچین های ساده و بی آلایش باغ سبز خانه را آذین بستند و سبد دستانم را پر از گلبرگهای محبت ساختند.

خداوندا:

آنچه که امروز دارم هدیه توست که بر بنده خاکیت ارزانی داشته ای و خود می دانی ناتوان تر از آنم که شکر تو را گویم، اما باز می گویم خداوندا سپاسگزارم.

و زمان می ایستند وقتی که بخواهیم بر دستان پر مهر مادری بوسه زنیم که مهربانیش توشه راهم بوده و یا از صفای نگاه پدری بگویم که حضورش پشتوانه گامهایم است و یا از یاری استادی قدر دانی کنم که راهنمای راهم بوده، پس به احترام مهربانی مادرم، صفای حضور پدرم و همراهی و هم اندیشی استاد ارجمندم جناب آقای دکتر شهبانی با واژه ارادت و امتنان، سپاس بی دریغ خود را ابراز می کنم و برایشان شادمانی، موفقیت و سر بلندی را آرزو دارم. از استاد بزرگوار جناب آقای دکتر بخشی به خاطر راهنمایی های ارزنده شان متشکرم.

همچنین از پرسنل و دانشجویان محترم و دوستان عزیزم در آزمایشگاه ژنتیک مولکولی پژوهشگاه ملی ژنتیک و زیست فن آوری بخصوص خانمها شکوریان، شوریان، معصومی، ترک زبان، منصف، ابوالحسنی، حسینی، امجد به خاطر کمکهای بی دریغشان در طول این دوره کمال تشکر را دارم.

از دوستان و هم اتاقی های عزیزم در دانشگاه پردیس کشاورزی خانمها:

دکتر اسدی، دکتر بلواسی، دکتر حسینی، دکتر پرویز، دکتر دستوری، دکتر رضوان نژاد، دکتر ناظوری، دکتر زینلی که طی این مدت 2 سال همراه و یاور و مشوقم بودند نهایت سپاسگزاری را دارم.

لحظه هایتان سرشار از شبنم عشق و کوچه باغ دلهایتان جای پای بهار، یاد خداوند باد.

در امتداد جاده خوبیها، صادقانه ترین دعا ها نثارتان باد.

چکیده:

آنزیم آمیلاز در حال حاضر حدود 25% از بازار مصرف جهان را تشکیل میدهد. این آنـزیم در صـنایع مختلف از جمله دارویی، نساجی و نانوایی کاربرد دارد. باکتری های گرمادوسـت قادرنـد در دماهـای بالارشد و فعالیت کنند. برخی از این باکتریها قادر به تولید آنزیم آمیلاز با فعالیت و پایداری در دمای بالا می باشند که در صنایع از اهمیت بالایی برخوردار می باشد. در این مطالعـه بـاکتری گرمادوسـت تولید کننده آنزیم آمیلاز ار خاکهای اطراف تهران جدا گردید. کشت این بـاکتری در محـیط شـامل1% نشاســـــته، ٪0/1 K2HPO4 ،0/25 Na2HPO4 ،0/2 (NH4)2SO4،0/1 NaCl، Mg So4 0/057H2O، 0/05 CaCl2 و0/2 Tripton صورت گرفت و میـزان تولیـد آنـزیم در دمـا و pH هـای متفاوت بررسی گردید. بیشترین میزان تولید آنزیم توسط باکتری 150u\ml در دمای 48º C و pH 9 اتفاق افتاد. به منظور شناسایی این باکتری، با استفاده از آغازگرهای پیش برنده و معکوس، ژن 16s rDNA ریبوزومی این باکتری تکثیر و تعیین توالی شد. نتایج بیانگر بیشترین شباهت این بـاکتری بـا باکتری ***Bacillus licheniformis*** بودند. با بررسی فعالیت و پایداری آنزیم در دامنـه دمـایی 40تـا80 درجه سانتیگراد بهینه فعالیت آنزیم در دمای 40 درجه سانتیگراد بدست آمد. همچنین این آنزیم بعلت حفظ فعالیت خود به میزان 78% در دمایC 80º، واجد ارزش زیادی در صنایع از جمله صنعت قنـد سازی می باشد. همچنین به منظور انتقال ژن آمیلاز به ***E.coli*** از وکتور pTrc99A استفاده گردیـدو پس از انتقال، بیان آن در ***E.coli*** مورد تایید قرار گرفت.

فهرست مطالب

فصل اول :

1-طبقه بندی باکتری *Bacillus licheniformis* 1

1-1-مشخصات خانواده ی *Bacillaceae*..... 1

1-2- جنس *Bacillus*..... 1

1-3 باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس :..... 2

1-4- ساختار ژنومی باکتری 3

2-آنزیمها:..... 3

2-1- معرفی آنزیمهای هیدرولیز کننده نشاسته..... 4

2-1-1- معرفی نشاسته..... 4

2-1-2- خانواده آنزیمی α- آمیلاز..... 6

2-1-3- کاربرد α- آمیلازها در صنعت..... 7

الف) کاربرد α- آمیلاز در مایع سازی [1] :..... 9

ب) کاربرد α- آمیلازها در تکنولوژی تولید شربتهای شیرین کننده..... 9

2-1-4- کاربرد α- آمیلازها در صنایع نساجی..... 11

2-1-5- کاربرد آلفا آمیلاز در صنایع کاغذسازی..... 11

2-1-6- کاربرد آلفا آمیلازها در صنایع شوینده..... 12

2-1-7- کاربرد آلفا- آمیلازها در صنایع غذایی..... 12

الف) ساخت دکسترین های شاخه ای با وزن مولکولی بالا..... 12

ج)ساخت ترکیبات الیگوساکارید..... 12

2-2- شیمی آلفا آمیلاز 13

2-3- منابع تولید کننده آلفا-آمیلاز..... 13

[1] liquefaction

2-4- ساختمان مولکولی آنزیمهای آلفا-آمیلاز.....15
2-5-جزییات ساختاری آنزیم α-آمیلاز مربوط به باکتری ***B.licheniformis*** (BLA).....15
2-6-پایداری و پایدار سازی آنزیمها 16
2-6-1 تعریف پایداری 16
2-6-2-دو نوع پایداری 17
2-6-3- مکانیسم های غیرفعال شدن پروتئین 17
2-6-3-1 بازشدن، تشکیل ساختارهای به هم ریخته و تجمع 17
2-6-3-2- مکانیسم های کووالان 18
2-6-3-2-1- دآمیده شدن 18
2-6-3-2-2- هیدرولیز پیوندهای پپتیدی 18
2-6-3-2-3- شکسته شدن پلهای دی سولفیدی 18
2-6-3-2-4- اکسیداسیون 18
2-6-3-2-5- سایر واکنش ها 19
2-6-4- مکانیسم های پایداری حرارتی در پروتئین ها 19
2-6-4-1- ترکیب اسیدهای آمینه 19
2-6-4-2- پلهای دی سولفیدی 20
2-6-4-3- برهم کنش های هیدروفوب 20
2-6-4-4- پیوند هیدروژنی 20
2-6-4-5- پلهای نمکی 20
2-6-4-6- اثر پرولین 20
2-6-4-7- دوقطبی مارپیچ آلفا 21
2-6-4-8- اتصال به فلز 21

2-6-4-9- سایر موارد 21
2-6-5- پایدارسازی پروتئین 21
2-6-5-1- دستکاری پروتئین 22
2-6-5-2- اثر حلال های آلی 22
2-7- برخی خصوصیات فیزیکوشیمیایی α-آمیلازهای میکروبی 22
2-7-1- PH مطلوب 22
2-7-2- دمای مطلوب 22
2-7-3- وزن مولکولی 23
2-7-4- اتصال کلسیم، سدیم و کلر 23
2-8- عوامل موثر در پایداری حرارتی BLA 23
2-9- شناسایی و تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن کد کننده آنزیم BLA 26
3- تاریخچه تولید آلفا-آمیلازهای نوترکیب.....26
4-استفاده از میزبان *E.coli* در تولید پروتئین های نوترکیب.....27
5- سیستم مولکولی میزبان 28
5-1 حامل بیان ژن در *E.coli* 28
هدف پایان نامه 28

فصل دوم :
مواد و روشها :

●مواد مورد استفاده :

1- پلاسمید.....29
2- آغازگرهای PCR :.....29
3- نشانگرها (MARKERS) 29

4- آنزیمها.....29
5- آنتی بیوتیک.....30
6- کیت های آزمایشگاهی: 30
6-1-کیت استخراج **DNA** ژنومی تهیه شده از شرکت روشه.....30
6-2-کیت استخراج پلاسمید از شرکت متابیون 30
6-3- کیت **PCR purification** از شرکت کیاژن 30
6-4- کیت **Gel Extraction** از شرکت کیاژن.....30
7-دستگاههای مورد استفاده 30
7-1-اسپکترو فوتومتر :.....30
7-2-ترازو 31
7-3- **pH** متر :.....31
7-4- سانتریفیوژ: 31
7-5-میکروفیوژ :.....31
7-6-دستگاه **PCR** :.....31
7-7- دستگاه الکترفورز ژل آگارز(افقی) و **SDS_PAGE** (الکتروفورز عمودی).....32
7-8- انکوباتور:.....32
7-9- ورتکس :.....32
7-10-ماکرو ویو :.....32
7-11- بن ماری و دستگاه سرد کننده و صفحه ی گرم کننده 33
7-12-اتو کلاو 33
7-13-دستگاه استیرر و مگنت : 33
8- **IPTG** :.....33

9-محیط های کشت میکروبی :.....33
9-1-محیط کشت LB مایع.....33
9-2-محیط کشت LB جامد.....33
9-3- محیط کشت برای انتخاب و جداسازی باکتری: 34
9-4- محیط اختصاصی برای تولید آنزیم :.....34
9-5-محیط برای بهینه سازی تولید آنزیم باpH متفاوت: 34
9-6-محیط برای بهینه سازی تولید آنزیم با منابع تیتروژنی متفاوت:.....34
10-سلولهای باکتریایی:.....34
11- مواد لازم جهت سنجش فعالیت آنزیمی **((DNS) Di-Nitrosalicylic acid)** 34
11-1 محلولها و بافرهای لازم جهت سنجش آنزیمی با استفاده از **Di-Nitrosalicylic acid (DNS)**
11-1-1- محلولهای لازم جهت تهیه منحنی استاندارد گلوکز.....34
11-1-2- محلولها و بافرهای لازم جهت بررسی تولید آنزیم در دما و pH های مختلف 35
11-1-3- محلولها و بافرهای لازم جهت بررسی فعالیت آنزیم در pH های مختلف 36
11-1-4- محلولهای لازم جهت بررسی اثر یونها بر فعالیت آنزیم.....37
11-1-5- محلولهای لازم جهت بررسی مانعت کننده ها بر فعالیت آنزیم 37
12- محلولهای لازم جهت تغلیظ پروتئین های محیط کشت.....37
12-1- روش تغلیظ با اتانول 37
12-2- روش رسوب دهی با آمونیوم سولفات.....37
12-3- روش رسوب دهی با TCA 37
13- محلولهای لازم جهت سنجش کمی پروتئین به روش لوری 38
14- محلولها و بافرهای لازم جهت تهیه و رنگ آمیزی ژل **SDS-PAGE** 38
15- محلولها و بافرهای لازم جهت کلونینگ:.....40

15-1- محلولهای لازم جهت الکتروفورز ژل آگارز:.....40
15-2- مواد و محلولهای لازم جهت **PCR** 41
15-3 بافرهای مخصوص آنزیم های برشگر محدود کننده **(Restriction Endonuclease)** 41
15-4- محلولهای لازم جهت انتقال پلاسمید به سلول میزبان باکتریایی و تهیه سلول مستعد.....41
15-4-1- بافر **ESB** 41
15-4-2- محلول لازم جهت انتقال پلاسمید به سلول میزبان.....42
15-4-3- محلول لازم جهت القای سلول میزبان.....42
• روشها.....43
1-روشهای تهیه محیط کشت 43
1-1-روش تهیه محیط **LB**[2] :.....43
1-2- روش تهیه محیط برای انتخاب و جداسازی باکتری تولید کننده ی آنزیم.....43
1-3-روش تهیه محیط کشت اختصاصی برای تولید آنزیم: 44
2-روشهای جداسازی سویه مولد آنزیم.....44
3-روشهای کشت باکتریایی.....44
3-1کشت اختصاصی سویه مولد آنزیم.....44
3-2- روش کشت ***E. coli*** میزبان.....45
3-3- ذخیره سازی طولانی مدت باکتریها.....45
4- بهینه سازی محیط و شرایط کشت.....45
4-1- روش بررسی تولید آنزیم در دماهای مختلف.....45
4-2- روش بررسی تولید آنزیم در **pH** های مختلف.....46
4-3- روش بررسی تولید آنزیم در حضور منابع نیتروژنی مختلف 46

[2] LB or Luria-Bertani

5- روش تغلیظ نسبی پروتئین (آنزیم آمیلاز).....46
5-1- روش رسوب دهی با اتانول.....46
5-2- روش رسوب دهی با آمونیوم سولفات.....47
5-3- روش رسوب دهی با **TCA**(تری کلرو استیک اسید).....47
6- روشهای بررسی فعالیت و پایداری آنزیم در شرایط مختلف.....47
6-1- روش بررسی فعالیت و پایداری آنزیم در دماهای متفاوت.....47
6-2- روش بررسی فعالیت و پایداری آنزیم در **pH** های متفاوت.....47
6-3- روش بررسی فعالیت آنزیم در حضور یونهای مختلف.....48
6-4- روش بررسی فعالیت آنزیم در حضور عوامل اکسید کننده.....48
7- روشهای مربوط به سنجش فعالیت آنزیمی.....48
7-1 روش استفاده از معرف **DNS**.....48
7-2- روش تهیه معرف **DNS** و کشیدن منحنی استاندارد.....49
7-2-1- روش تهیه معرف **DNS**:.....49
7-2-1-روش تهیه منحنی استاندارد 49
7-3- روش استفاده از معرف لوگول برروی محیط کشت باکتری.....49
8- روش سنجش کمی پروتئین به روش لوری [3].....50
9- **SDS_PAGE** الکتروفورز محلولهای پروتئینی:.....50
10-روشهای مربوط به کلونینگ.....52
10-1 استخراج **DNA** ژنومی با استفاده از کیت **Roche**.....52
10-2-تعیین غلظت محلول DNA و بررسی میزان خلوص آن 52
10-3-تکنیک **PCR**.....53

[3] Modified lowry

10-4-روش استخراج **DNA** پلاسمیدی 53
10-4-1--روش آماده سازی محلولها.....53
10-4-2-روش کار 54
10-5- الکتروفورز ژل آگارز.....55
10-5-1- روش تهیه ی بافر 55
10-5-2-تهیه ی ژل آگارز: 56
10-5-3- طریقه ی ریختن نمونه در چاهک ژل 56
10-5-4--تنظیم ولتاژ و شدت جریان 57
10-5-5-رنگ آمیزی و تشخیص DNA بر روی ژل.....57
10-6- هضم DNA با آنزیمهای Restriction Endonuclease.....57
10-7- خالص سازی ژن از روی ژل آگارز.....59
10-7-1-آماده سازی محلولها.....60
10-7-2-روش کار.....60
10-8- اتصال قطعه DNA به درون پلاسمیدتوسط آنزیم T4 DNA ligase.....61
10-9- آماده سازی سلول میزبان جهت انتقال پلاسمید به آن 61
10-9-1- تهیه ی بافر **ESB** 62
10-9-2-روش کار.....62
10-10- انتقال پلاسمید یا ژن خارجی به سلول مستعد.....64
10-10-1-روش کار.....64
10-11- انتخاب کلونی های در یافت کننده ی پلاسمیدنوترکیب.....65
10-12-روش تایید وجود ژن خارجی درون پلاسمید مورد نظر.....66
10-13- روش القای سلول میزبان.....66

10-14- مقایسه سویه های **Bl21, DH5α, Top 10** در تولید آنزیم بوسیله باکتری ***E.coli***: 67

فصل سوم

نتایج: 68

3-1- کشت باکتری و جداسازی سویه مورد نظر :.....68

3-2- استخراج **DNA** از سویه بومی و تکثیر ژن **16s rDNA** با تکنیک **PCR** : 71

3-3- شناسایی سویه جداشده با استفاده از نرم افزار **Blast**.....73

3-4- تهیه درختچه فیلوژنتیکی باکتری بومی 73

3-5- نتایج مربوط به منحنی استاندارد گلوکز:.....75

3-6- نتایج مربوط به بررسی تولید آنزیم در دماهای متفاوت :.....76

3-7- نتایج مربوط به بررسی تولید آنزیم در **pH**های متفاوت :.....78

3-8- نتایج مربوط به بررسی تولید آنزیم در حضور منابع نیتروژنی متفاوت 80

3-9- نتایج مربوط به بررسی تولید آنزیم در غلظتهای مختلف نشاسته 83

3-10-نتایج مربوط به فعالیت و پایداری آنزیم در دماهای متفاوت:.....85

3-11- نتایج مربوط به فعالیت و پایداری آنزیم در **pH**های مختلف 88

3-12-نتایج مربوط به تاثیر یونها بر روی فعالیت آنزیم:.....89

3-13-نتایج مربوط به اثر اکسید کننده ها بر فعالیت آنزیم:.....90

3-14-نتایج مربوط به سنجش کمی پروتئین.....91

3-14-1-منحنی استاندارد **BSA** 91

3-15-نتایج مربوط به تغلیظ پروتئین های محیط کشت:.....92

3-16-نتایج مربوط به تکنیک **SDS-PAGE** الکتروفورز محلولهای پروتئینی:.....93

3-17- نتایج مربوط به کلونینگ.....94

3-17-1-استخراج **DNA** از سویه ی مورد نظر.....94
3-17-2-تکثیر ژن آمیلاز با استفاده از تکنیک **PCR** :.....95
3-17-3-تهیه ی پلاسمید **pTrc99A** :.....98
3-17-4- انجام مرحله ی هضم آنزیمی بر روی ژن و وکتور 99
3-17-5- آماده سازی ژن و وکتور برای ساخت پلاسمید **(pTamyl)**.....101
3-17-6-فعالیت آمیلازی کلون ساخته شده بر روی محیط کشت جامد حاوی نشاسته.....103
3-17-7 -نتایج مربوط به مقایسه اثر سه میزبان اشر شیا کلی در تولید آنزیم نوترکیب:.....103
3-17-8- نتایج مربوط به **SDS-PAGE** محلول پروتنینی نوترکیب و سنجش کمی پروتئین نوترکیب 105

فصل چهارم

بحث:.....107
4-1- بررسی تولید آنزیم توسط باکتری و مطالعه برروی فعالیت و پایداری آنزیم در شرایط مختلف:
4-2-مرحله ی جداسازی ژن α-آمیلاز از باکتری ***Baciillus sp.SH1*** و بیان ژن کلون شده و تولید پروتئین نوترکیب 109
4-3- پیشنهادات 111
منابع:.....112

فهرست شکلها و جداول

شکل 1-1:میزان پراکندگی باسیلوسها بر روی مواد غذایی.....2
جدول 1-1 میزان تولید آنزیمهای صنعتی در سال.....4
جدول 1-2:مقایسه آمیلوز و آمیلو پکتین 5
شکل 1-2:تاثیر آنزیمهای مختلف بر روی نشاسته 6
جدول 1-3:طبقه بندی آنزیمها بر اساس شماره EC.....7
جدول 1-4:کاربرد های مختلف آلفا آمیلاز ها 8
شکل 1-3:مراحل تولید آنزیمی شربتهای با میزان فروکتوز بالا 10
جدول 1-5 : تفاوت کاربرد آنزیم باسیلوس و آسپرژیلوس 14
شکل 1-4- ساختمان آنزیمBLA 16
جدول 2-1- ساخت رقتهای مختلف گلوکز.....35
جدول 2-2- رقتهای مختلف BSA.....38
جدول 2-3- ترکیبات سازنده ژل Resolving.....39
جدول 3-3- ترکیبات سازنده ژل Stacking 39
جدول 2-5-مشخصات آنزیم های برش دهنده.....59
جدول 2-6- مشخصات آنزیم لیگاز.....61
شکل3-1: باکتری جداسازی شده 69
شکل3-2-کشت باکتری در محیط امیلوز.....70
شکل3-3-کشت باکتری در محیط امیلوپکتین دار.....71
شکل 3-4: نمای الکتروفورز ژل آگارز ژن 16s rDNA.....73
شکل 3-5 موقعیت باکتری جداسازی شده در بین باکتری های جنس باسیلوس 74
جدول 3-1: اندازه گیری میزان جذب DNS در غلظتهای مختلف گلوکز.....75
نمودار 3-1: منحنی استاندارد گلوکز 75

نمودار 3-2: میزان تولید آنزیم دردماهای 30،37،48،55 76
نمودار 3-3 : میزان رشد باکتری در دماهای متفاوت 77
نمودار3-4 : میزان غلظت گلوکز محیط کشت در دماهای متفاوت..... 77
نمودار 3-5 :میزان تولید آنزیم در pH های مختلف 78
نمودار 3-6: میزان غلظت گلوکز محیط کشت 79
نمودار3-7: رشد باکتری در pH های مختلف..... 80
نمودار 3-8: تولید آنزیم در حضور منابع نیتروژنی متفاوت..... 81
نمودار 3-9: غلظت گلوکز در محیط کشت در حضور منابع نیتروژنی متفاوت 82
نمودار3-10: تاثیر منابع نیتروژنی مختلف بر رشد باکتری..... 83
نمودار 3-11: بررسی تولید آنزیم در غلظتهای مختلف نشاسته..... 84
نمودار 3-12:تاثیر غلظت های مختلف نشاسته بر روی رشد باکتری 84
نمودار 3-13: تاثیر غلظتهای مختلف نشاسته برمیزان گلوکز تولید شده 85
نمودار 3-14:بررسی فعالیت آنزیم در یک ساعت در دماهای متفاوت..... 86
نمودار3-15:بررسی اثردمابر پایداری آنزیم به مدت 1h..... 87
نمودار 3-16:بررسی اثردمابرپایداری آنزیم به مدت 7h..... 87
نمودار 3-17:بررسی اثرpH بر فعالیت آنزیم به مدت 1h..... 88
نمودار3-18:بررسی اثر pH بر پایداری آنزیم پس از 7h..... 89
نمودار 3-19:بررسی اثر یونها بر فعالیت آنزیمی..... 90
نمودار 3-20:بررسی اثر اکسید کننده ها بر فعالیت آنزیم..... 91
جدول 3-2: نتایج مربوط به منحنی استانداردBSA..... 92
نمودار 3-21: نمودار منحنی استاندارد BSA 92
شکل 3-6 :وزن مولکولی..... 94

شکل 3-7: نمای الکتروفورز ژل آگارز از DNA استخراج شده 95
شکل 3-8 :نمای الکتروفورز ژل آگارز ازژن آمیلاز تکثیر شده 97
شکل 3-9-نمای الکتروفورز ژل آگارز از ژن خالص سازی شده با کیت کیاژن.....97
شکل 3-10- نمای الکتروفورز ژل آگارز از وکتور pTrc99A 99
شکل 3-11 :نمای الکتروفورز ژل آگارز وکتور و ژن پس انجام عمل هضم آنزیمی و خالص سازی
شکل 3-12 :نمای الکتروفورز ژل آگارز از پلاسمید نوترکیب 101
شکل3-13-نمای الکتروفورز ژل آگارز از هضم آنزیمی پلاسمید کلون شده 102
شکل 3-14- مقایسه فعالیت آمیلازی کلون ساخته شده با استفاده از معرف لوگل.....103
نمودار3-22: مقایسه اثر سه میزبان با حضور وبدون حضور IPTG در رشد باکتری 104
نمودار 3-23 :مقایسه ی اثر سه میزبان در تولید آنزیم 105
شکل 3-15: SDS_PAGE محلول پروتئینی نوترکیب. Line1 : BLA تجاری .line 2: مارکر پروتئینی . line 3: 106
جدول 3-3: نتایج مربوط به سنجش کمی پروتئین در میزبان BL21.....106

مقدمه

فصل اول :

1-طبقه بندی باکتری ***Bacillus licheniformis***:

باکتری باسیلوس از سلسله ی Bacteria شاخه ی Firmicutes، رده ی Bacilli، راسته ی Bacillales، خانواده ی Bacillaceae، جنس ***Bacillus*** ،گونه ی ***licheniformis*** می باشد.
[the LabRat.com-Biotech Jobs and Research Resources,2005]

1-1-مشخصات خانواده ی ***Bacillaceae***:

این خانواده در بر گیرنده ی کلیه ی باکتری های میله ای شکل هستند که تولید اسپور می کنند. این باکتری ها به علت خصوصیات زیر از نظر صنایع غذایی حائز اهمیت می باشند.

الف)به علت ایجاد فرمهای اسپوری که در مقابل حرارت بسیار مقاوم هستندو در شرایط پاستوریزاسیون از بین نمی روند.

ب)تعداد زیادی ازگونه های مختلف این خانواده قادر به هیدرولیز شدید پروتئین هستند ضمن اینکه در بعضی موارد ایجاد متابولیتهای سمی خطرناک هم می گردد.

ج)وجود گونه هایی که در شرایط کاملا بی هوازی هم مثلا در کنسروهامی توانند رشد و تکثیر نمایند.

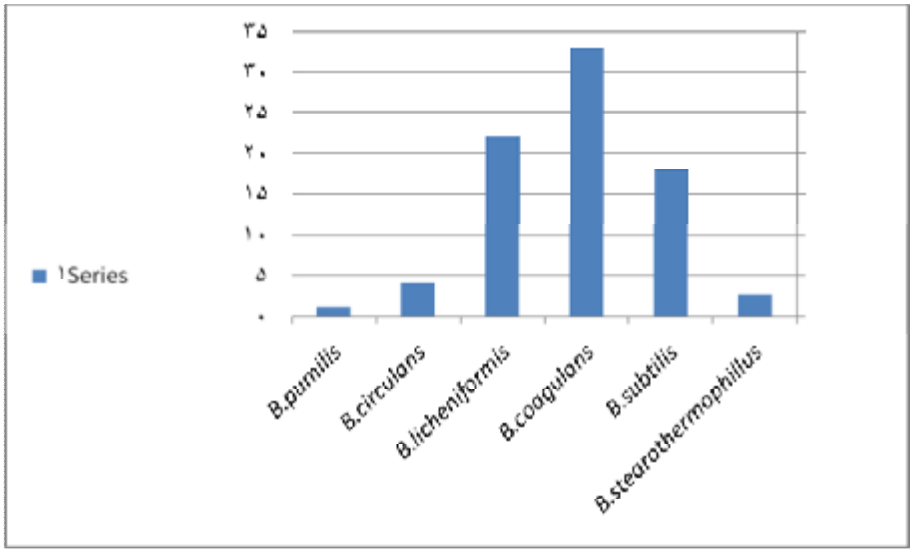
د)وجود گونه هایی که اپتی مم رشد و تکثیر آنها بالاتر از 50°c قرار دارد مهمترین جنس این خانواده جنس باسیلوس می باشد که در زیر مورد بحث قرار خواهد گرفت.[سید علی مرتضوی ،1384]

1-2- جنس ***Bacillus***:

این جنس شامل 25 گونه ی مختلف می باشد.این باکتری ها هوازی تا بی هوازی اختیاری غالبا گرم مثبت و کاتالاز مثبت هستند، غیر متحرک و یا اینکه به وسیله ی تاژکهای پیرامونی متحرکند. سلولها به شکل میله ای و بیشتر به صورت زنجیر دنبال هم قرار می گیرند. از نظر شکل ظاهری و فرمهای اسپوری این باکتری ها با سلولهای رویشی تفاوتی ندارند.اندوسپور آنها بیضوی شکل و یا گاهی کروی یا استوانه ای بوده و نسبت به شرایط خیلی سخت مقاوم هستند.این جنس شیمیو ارگانوتروف بوده و متابولیسم تخمیری (فرمنتاتیو)یا تنفسی دارند. در بعضی از گونه ها در مرکز یا در انتهای سلول در اثر تولید اسپور باد کرده و حجیم تر ازسلول رویشی به نظر می رسند. بسیاری از باسیلوسها در سطح محیط کشت ایجاد پرگنه هایی می کنند که قطر آنها از چند سانتی متر تجاوز کرده با سطحی

زبر و خشن و کمی قهوه ای رنگ دارند. در محیط های کشت مایع بعضی از باسیلوسها در حین رشد و تکثیر تولید پوسته ای در سطح محیط می نمایند. باسیلوسها از مواد قندی ایجاد اسید ولی به ندرت گاز می کنندو از تجزیه ی پروتئین ها معمولا آمونیاک حاصل می شود. این باکتری ها به طور وسیعی در طبیعت منتشر می شودو براحتی می توان آنها را از زمین جدانمود. درصد مولی G+C در DNA این جنس 62-32 می باشد.

نتایج آزمایشات انجام شده بر روی افزودنی های مورد استفاده در صنایع غذایی نشان می دهد که انواع باسیلوس (stearothermophilus, subtilis, coagulans, licheniformis, circulans,pumilis) بر روی این گونه مواد خوراکی حضور دارند. میزان پراکندگی این باکتری ها در شکل 1-1 نشان داده شده است.[سید علی مرتضوی،1384]



شکل 1-1:میزان پراکندگی باسیلوسها بر روی مواد غذایی [سید علی مرتضوی،1384]

1-3-باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس :

Bacillus licheniformis باکتری است که به طور معمول از خاک بدست می آید. اما این باکتری بر روی پر و بال پرندگان نیز یافت شده است بخصوص پرندگانی که بیشتر بر روی زمین (مثل گنجشکها)یا بر روی آب (مانند اردکها)زندگی می کنند[Snoke, 1965, 415-420]. این باکتری گرم مثبت و گرمادوست بوده و اپتیمم دمای رشد آن حدودا 50° می باشد. اما قابلیت زنده ماندن در دماهای بالاتر را نیز دارد. در محیط های نا مناسب می تواند وارد فاز اسپور زایی شده و با برگشت

محیط به حالت طبیعی این باکتری نیز می تواند دوباره به فاز رویشی بر گردد.-[veith, 2004,204-211]

1-4- ساختار ژنومی باکتری

از نظر ژنومی ***Bacillus licheniformis*** دارای یک کروموزوم حلقوی با 4/222/336 bp می باشد که شامل 4/208 ژن کد کننده ی پروتئین (به طور متوسط در اندازه ی 873 bp)، 7 rDNA، 72 ژن tRNA، 42/2%دارای GC می باشد. همچنین هیچ پلاسمیدی درون این باکتری یافت نشده است. منطقه ی وسیعی از کروموزوم ***Bacillus licheniformis*** با ***Bacillus subtilis*** شباهت دارد [Rey,.R77].2004,

2-آنزیمها:

اولین آنزیمی که به صورت صنعتی تولید شد، تاکادیاستاز آمیلاز قارچی بود که در سال 1894 به عنوان یک ماده ی دارویی برای اختلالات گوارشی در ایالات متحده یافت می شد.در سال 1915، اختراع ثبت شده Otto Roehm تحت عنوان شستشوی البسه با افزودنی های دارای آنزیم تریپسین به اطلاع عموم رسید. تا سال 1969، 80 % مواد شستشوی لباس حاوی آنزیمهای مختلف بویژه پروتئازها بود. به همراه پروتئاز ها، از آنزیمهای دیگری نظیر لیپاز، آمیلاز، پکتیناز و اکسیدو ردوکتاز ها نیز به صورت آزمایشی در صنعت تولید مواد شوینده استفاده شد. میزان تولید آنزیمهای صنعتی در سال در جدول 1-1 آورده شده است.[کروگر،ولف،1997، 335]

Enzyme	Enzyme protein	Sales, persent