بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه پیام نور

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

عنوان پایان نامه:

تعیین میزان پروتئین و اسید های آمینه پروتئین میکروبی حاصل از ضایعات لیگنو سلولزی

نگارش:

ژاله خنیفر

استاد راهنما اول:

دکتر علیرضا احمدی

استاد راهنما دوم:

دکترهدایت الله قورچیان

استاد مشاور:

دکتررضا حاجی حسینی

کارشناسی ارشد رشته بیوشیمی

خرداد ۸۸

جمهوری اسلامی ایران
وزارت علوم تحقیقات و فناوری

دانشگاه پیام نور
دانشگاه پیام نور استان تهران

تاریخ .....
شماره .....
پیوست .....

((صورتجلسه دفاع از پایان‌نامه کارشناسي ارشد))

جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسي ارشد خانم ژاله خنیفر رشته زیست شناسي(بیوشیمي)**تحت عنوان:**

"تعیین میزان پروتئین واسیدهاي آمینه پروتئین میکربي حاصل ازضایعات لیگنوسلولزي"

با حضور اساتید نامبرده ذیل در روز **شنبه** مورخه ۸۸/۳/۲ ساعت۱۳/۳۰-۱۵/۳۰در محل ساختمان تحصیلات تکمیلي برگزار شد و پس از بررسي پایان‌نامه مذکور با نمره به عدد ۱۹/۶ به حروف نوزده و شش دهم و با درجه عالی مورد قبول واقع شد/ نشد.

اعضاي هیات داوران :

نام و نام خانوادگی	هیات داوران	مرتبه علمی	امضاء
۱-استادراهنماي اول:آقاي دکترعلیرضااحمدي			
۲-استادراهنماي همکار:آقاي دکترهدایت اله قورچیان			
۲- استاد مشاور:آقاي دکتررضاحاجي حسیني			
۳-استاد داورداخلي:آقاي دکترحبیب اله ناظم			
۴-استادداورخارجي:آقاي دکتربهزادلامع راد			
۵-نماینده محترم گروه:دکترحاجي حسیني			

تهران،خیابان انقلاب،
خیابان استاد نجات اللهی،
نبش خیابان سپند،
پلاک ۲۳۳
تلفن: ۸۸۸۰۱۰۹۰
دورنگار: ۸۸۹۰۳۱۵۸
پست الکترونیکی:
info@Tehran.pnu.ac.ir
نشانی الکترونیکی:
http://www.Tehran.pnu.ac.ir

بارالها

تو رامی ستایم که شایسته ستایشی

تو را می پرستم که شایسته پرستشی

یاریم کن تا درپیشگاهت همواره سرفراز باشم

تقدیم به پدر ومادر بزرگوارم

آنان که سرو راست قامت بوستان زندگیم هستند

ومرا غرق در دریای عشق،پاکی وصفای خویش نموده اند.

تقدیم به همسرم

او که روشنی نگاهش باران رحمت را به کلبهٔ قلبم هدیه کرد

و هم او که وجود پر مهرش برایم مأوایی در برابر فرداهای پیش رو است.

تقدیم به گل های زیبای زندگیم

سپهر و سروش،آنان که شیرین ترین لحظات در خنده هایشان شکل می گیرد

و پاکترین نگاه در چشمان زیبایشان طلوع می کند.

من لم یشکرالمخلوق ، لم یشکرالخالق

مراتب سپاس وقدردانی خویش را به محضر اساتید ارجمند وبزرگوارانی که در به ثمر رسیدن این پژوهش سهم بسزایی داشته اند ابراز می دارم.

- **جناب آقای دکترعلیرضا احمدی که به مدد دانش ومساعدت های ایشان این پژوهش تنظیم گردید.**
- **جناب آقای دکترهدایت الله قورچیان که شاگردی محضر ایشان همواره از افتخارات من است وبه یاری ایشان این پروژه انجام شد.**
- **جناب آقای دکتررضا حاجی حسینی که مشاوره این تحقیق را به عهده گرفته و همواره مرا تشویق نموده اند.**
- **جناب آقای دکتربهزاد لامع راد که همواره مرا از حمایت وراهنمایی هایشان بهره مند ساخته اند.**

وباتشکر وسپاس از مسؤلین محترم آزمایشگاه دانشگاه پیام نورمرکز تهران،مؤسسه تحقیقات بیوفیزیک و بیوشیمی دانشگاه تهران،دانشگاه الزهرا ودانشگاه تربیت مدرس وتمام عزیزانی که مرا در انجام این پروژه یاری نموده اند.

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول کلیات	
۱-۱مقدمه	۲
۱-۱-۱ اهمیت تحقیق	۳
۱-۲ کاربرد های بیوتکنولوژی در صنایع غذایی	٤
۱-۳ توده میکروبی و پروتئین تک یاخته به عنوان غذا	٥
۱-۳-۱ تاریخچه	٥
۱-۳-۲ خصوصیات پروتئین میکروبی	٦
۱-۳-۳ میکرو ارگانیسم های مورد استفاده در تولیدSCP	٨
۱-۳-۳-۱ باکتری ها	٨
۱-۳-۳-۲ مخمرها	٩
۱-۳-۳-۳ قارچ ها	٩
۱-۳-۳-٤ جلبک ها	۱۰
۱-۳-۴ تولید SCP از متان	۱۰

۱-۳-٤-۱ فواید استفاده از متان ۱۱

۱-۳-٤-۲ معایب استفاده از متان ۱۱

۱-۳-٤-۳ میکرو ارگانیسم های بکار رفته در متان ۱۱

۱-۳-۵ تولید SCP از متانول ۱۲

۱-۳-۵-۱ کیفیت وایمن بودن SCP تولید شده از متانول ۱۳

۱-۳-۶ تولیدSCP از هیدروکربن های نفتی ۱٤

۱-۳-۷ تولید SCP از اتانول ۱۵

۱-۳-۸ تولید SCP از ضایعات لیگنو سلولزی ۱۵

۱-۴ ضایعات لیگنو سلولزی ۱٦

۱-۵ کاه و خصوصیات آن ۱۷

۱-۵-۱ کربوهیدرات های ساختمانی ۱۸

۱-۵-۱-۱ سلولز ۱۸

۱-۵-۱-۲ همی سلولز ۱۸

۱-۵-۱-۳ لیگنین ۱۸

۱-۵-۲ لیگنین و قابلیت هضم ۲۱

۱-۶ روشهای غنی سازی کاه غلات ۲۳

۱-٦-۱ تیمار فیزیکی ۲۳

۱-٦-۱-۱ تیمار حرارتی ۲۳

۱-٦-۱-۲ تیمار مکانیکی ۲٤

۱-٦-۱-۳ تیمار با پرتو افکنی ۲۵

۱-٦-۲ تیمار های شیمیایی ۲٦

۱-٦-۲-۱تیمار شیمیایی با اوره ۲٦

۱-٦-۲-۲ تیمار شیمیایی با سود ۲۷

۱-٦-۲-۳ تیمار شیمیایی با اسید ها ۲۸

۱-٦-۲-٤ سایر تیمار های شیمیایی ۲۹

۱-٦-۳ تیمار های بیولوژیکی ۲۹

۱-٦-۳-۱ قارچ های تجزیه کننده مواد لیگنو سلولزی ۳۰

۱-٦-۳-۱-۱ قارچ های پوسیدگی سفید ۳۱

۱-٦-۳-۱-۲ قارچ های پوسیدگی قهوه ای ۳۱

۱-٦-۳-۱-۳ قارچ های پوسیدگی نرم ۳۱

۱-۷ قارچ های پلوروتوس ۳۲

۱-۷-۱ شرایط پرورش قارچ پلوروتوس ۳۲

۱-۷-۲ خصوصیات قارچ پلوروتوس ۳۳

۱-۷-۳ تاکسونومی قارچ پلوروتوس ۳۳

۱-۷-٤ گونه های مشهور پلوروتوس ۳٤

۱-۷-٤-۱ پلوروتوس استرایتوس ۳٤

۱-۷-٤-۲ پلوروتوس فلوریدا ۳٤

۱-۷-٤-۳ پلوروتوس ساجر کاجو ۳٥

۱-۷-٤-٤ پلوروتوس ایرنجی ۳٥

۱-۷-٤-٥ گونه های دیگر پلوروتوس به اختصار ۳٥

۱-۷-٥-۱ ارزش غذایی و خواص دارویی ۳٦

۱-۸ مکانیسم های تجزیه شیمیایی توسط قارچ ها ۳۷

۱-۸-۱ تجزیه آنزیمی سلولز ۳۷

۱-۸-۲ تجزیه آنزیمی همی سلولز ۳۹

۱-۸-۳ تجزیه آنزیمی لیگنین ۳۹

۱-۸-۳-۱ آنزیم لیگنین پراکسیداز ٤۲

۱-۸-۳-۲ آنزیم منگنز پراکسیداز ٤۲

۱-۸-۳-۳ آنزیم لاکیز ٤۲

۱-۸-۳-٤ آنزیم های تولید کننده آب اکسیژنه مانند گلی اکسال اکسیداز ٤٤

۱-۹ کشت تخمیر حالت جامد ٤٥

۱-۹-۱ مراحل اصلی سیستم SSF ٤٦

۱-۹-۲ مزایای سیستم SSF نسبت به SF ٤٦

۱-۹-۳ معایب سیستم SSF نسبت به SF ٤٧

۱-۹-٤ عوامل مؤثر در سیستم کشت تخمیر حالت جامد ٤٧

۱-۹-٤-۱ انتخاب قارچ ایده آل ٤٧

۱-۹-٤-۲ رطوبت ٤٨

۱-۹-٤-۳ اندازه ذرات سوبسترا ٤٨

۱-۹-٤-٤ درجه حرارت محیط کشت تخمیر حالت جامد ٤٨

۱-۹-٤-٥اسیدیته ٤٩

۱-۹-٤-٦ تهویه در سیستم محیط کشت تخمیر حالت جامد ٤٩

۱-۱۰ پژوهش های انجام شده در رابطه با تجزیه لیگنین توسط قارچ های پلوروتوس ٥١

۱-۱۱ استفاده از مخلوط سوبسترا توأم با قارچ در مرحله اولیه رشد ٥٣

۱-۱۲ پروتئین واسید های آمینه ٥٥

۱-۱۲-۱ نقش اسید های آمینه در بدن انسان وحیوانات ٥٩

۱-۱۲-۲ تأثیر پروتئینها و اسیدهای آمینه بر رشد دام و طیور ٦٢

۱-۱۲-۳ تأثیر میزان پروتئین در تغذیه اولیه و پاسخهای سیستم ایمنی در طیور ٦٣

۱-۱۳روش های تعیین غلظت پروتئین ٦٧

۱-۱۳-۱ روش های جذبی ٦٧

۱-۱۳-۲ روش های رنگ سنجی ٦٩
۱-۱۳-۲-۱ روش لوری ٦٩
۱-۱۳-۲-۲ روش برادفورد ٦٩
۱-۱۳-۲-۳ روش BCA ۷۰
۱-۱۳-۳ نکات مهم در استفاده از طیف سنج نوری ۷۱
۱-۱٤ آنالیز اسید های آمینه ۷۲
۱-۱٤-۱ آماده سازی مواد ونمونه ۷۳
۱-۱٤-۲ تخلیص نمونه ۷۵
۱-۱٤-۳ تغلیظ نمونه ۷۵
۱-۱٤-٤ هیدرولیز ۷٦
۱-۱٤-٤-۱ هیدرولیز اسیدی ۷٦
۱-۱٤-٤-۲ نکات قابل توجه در هیدرولیز اسیدی ۷۸
۱-۱٤-٤-۲ هیدرولیز قلیایی ۷۹
۱-۱٤-۵ مشتق سازی ۸۰
۱-۱٤-۵-۱ مشتق سازی پیش ستونی ۸۰
۱-۱٤-۵-۲ کروماتوگرافی مایع با فاز معکوس ۸۳
۱-۱٤-۵-۳ مشتق سازی پس ستونی ۸٤

۱-۱٤-٥-٤ مشتق سازی با اورتوفتالدهاید ۸٥
۱-۱٤-٥-٥ کروماتو گرافی تعویض یونی ۸٦
۱-۱٥ تحلیل داده ها و محاسبات و کاربرد های آن ۸۷
۱-۱٥-۱ محاسبه مقدار اسید های آمینه در نمونه ۸۹
۱-۱٦ اهداف تحقیق ۸۹
فصل دوم روش های انجام کار ۹۰
۲-۱طرز تهیه سوسپانسیون اسپور ۹۱
۲-۲ روش آماده سازی مایه تلقیح ۹۲
۲-۳ روش آماده سازی کاه گندم ۹۲
۲-٤ طرز تهیه بستر کشت تخمیر حالت جامد ۹۲
۲-٥ طریقه استخراج پروتئین میکروبی ۹۳
۲-٦ تعیین میزان پروتئین به روش براد فورد ۹٥
۲-٦-۱ روش ترسیم منحنی استاندارد برادفورد ۹٥
۲-۷ مراحل انجام آنالیز اسید های آمینه ۹٦
۲-۷-۱ هیدرولیز اسیدی ۹٦
۲-۷-۲ دستگاه آنالیز اسید آمینه amino nova مدل A-200 ۹٦

۲-۷-۳ معرفی دستگاه A-200 و اجزاء آن ۹۹

۲-۷-٤ خلاصه ای از مراحل کار دستگاه A-200 ۱۰۳

۲-۷-۵ آنالیز اسید های آمینه پروتئین میکروبی ۱۰۵

فصل سوم نتایج **۱۰۷**

۳-۱ نتایج حاصل از تعیین میزان پروتئین در پروتئین میکروبی ۱۰۸

۳-۲ نتایج حاصل از آنالیز اسید های آمینه پروتئین میکروبی ۱۱۱

فصل چهارم بحث و نتیجه گیری ۱۲۳

٤-۱ بحث ۱۲٤

٤-۱-۱ پروتئین حاصل از پروتئین میکروبی و بررسی کمی و کیفی آن ۱۲٤

٤-۱-۲ اسید های آمینه پروتئین میکروبی و بررسی کمی و کیفی آن ۱۲۷

٤-۲نتیجه گیری ۱۳٦

٤-۳ پیشنهادات ۱۳۷

پیوست ۱۳۸

فهرست منابع ۱٤۰

چکیده (انگلیسی) ۱٤۸

فهرست جداول، شکل ها و نمودارها

شکل ها:

۱-۱جزئیات ساختمانی دیواره سلولی کاه ۱۷

۱-۲ مونومرهای فنیل پروپان در ساختمان لیگنین ۱۹

۱-۳ پیوندهای عمده بین دیمرهای لیگنین ۱۹

۱-٤ مسیر بیوسنتز لیگنین ۲۰

۱-۵ نمایشی از مدل پیشنهادی فنجال و واگز ۱۹۸۸- ارتباط بین سلولز – همی سلولز و لیگنین در دیواره سلولی ۲۲

۱-٦ نمونه ای ازقارچ پلوروتوس ۳۲

۱-۷الف ساختمان مولکولی سلولز و محل اثر آنزیم ها برروی آن ۳۸

۱-۷ب ساختمان شیمیایی همی سلولز و محل اثر آنزیمهای هید رولیتیک بر روی آنها ٤۰

۱-۸ برخی ترکیبات حاصل از تجزیه لیگنین ٤۱

۱-۹ ساختمان لیگنین (الف) روش تجزیه حلقه آروماتیک در خلال تجزیه لیگنین (ب) ٤٣

۱-۱۰ ساختمان شیمیایی کماسی بلو G-250 ۷۰

۱-۱۱ ساختمان شیمیایی BCA ۷۱

۱-۱۲ اکسیداسیون سیستئین به سیستئیک اسید ۷۷

۱-۱۳ مشتق سازی اسید آمینه با فنیل ایزو تیوسیانات ۸۱

۱-۱٤ واکنش های جانبی فنیل ایزوتیو سیانات ۸۲

۱-۱۵ واکنش (ا پی ای) با اسید های آمینه نوع اول ۸۵

۱-۱٦ تغییر بار الکتریکی اسید اسپارتیک در مقابل P ۸۷

۲-۱ دستگاه آنالیزر اسیدهای آمینه و اجزاء آن ۹۸

۲-۳ شماتیکی از مراحل انجام کار آنالایزر A-200 ۱۰۰

۲-٤ نمایشی از اجزا درونی دستگاه آنالایزر A-200 Amino nova ۱۰۱

۲-۵ الگوی طرح آنالایزر A-200 ۱۰٤

۳-۱ منحنی استاندارد به روش برادفورد ۱۰۹

۳-۲ کروماتوگرام آنالیز اسیدهای آمینه استاندارد ۱۱۲

۳-۳ کروماتوگرام آنالیز اسیدهای آمینه نمونه(A) ۱۱۳

۳-٤ کروماتوگرام آنالیز اسیدهای آمینه نمونه(B) ۱۱٤

۳-۵ کروماتوگرام آنالیز اسیدهای آمینه نمونه(C) ۱۱۵

۳-٦ مقایسه نسبت اسیدهای آمینه ضروری وغیر ضروری ۱۲۲

جداول ونمودارها:

۱-۱ تأثیر تیمارهای اولیه فیزیکی، حرارتی تشعشعی بر هیدرولیز آنزیمی مواد لیگنوسلولزی ۲٦

۱-۲ تأثیر پیش تیمار شیمیایی بر روی هیدرولیز آنزیمی مواد لیگنو سلولزی ۲۷

۱-۳ فعالیت آنزیمی پلوروتوس ساجر کاجو ۵۲

۱-۴ فعالیت آنزیمی پلوروتوس استرایتوس ۵۲

۱-۵ B.A اسید های آمینه بر اساس بار، هیدروفوبیسیتی و قطبی بودن ۵۸

۱-٦ تأثیر هیدرولیز اسیدی بر روی اسید های آمینه ۸۸

۳-۱ غلظت های مورد نظر برای رسم منحنی استاندارد به روش براد فورد ۱۰۸

۳-۲ میزان پروتئین بر حسب گرم درصد گرم وزن خشک پروتئین میکروبی ۱۱۱

۳-۳ نتایج بدست آمده از کروماتوگرام آنالیز اسید های آمینه پروتئین میکروبی حاصل ۳ بار تکرار ۱۱٦

۳-٤ دیاگرام مقادیر اسید های آمینه بر حسب گرم در ۱۰۰ گرم پروتئین A ۱۱۷

۳-۵ دیاگرام مقادیر اسید های آمینه بر حسب گرم در ۱۰۰ گرم پروتئین B ۱۱۸

۳-٦ دیاگرام مقادیر اسید های آمینه بر حسب گرم در ۱۰۰ گرم پروتئین C ۱۱۹

۳-۷ دیاگرام مقادیر اسید های آمینه بر حسب گرم در ۱۰۰ گرم پروتئین میانگین ۱۲۰

۳-۸ مقادیر اسیدهای آمینه ضروری ۱۲۱

٤-١ مقایسه اسید های آمینه پروتئین میکروبی میکرو ارگانیسمها ١٢٨

٤-٢ نمودار مقایسه اسید های آمینه پروتئین میکروبی حاصل از سلولوموناس ١٢٩

٤-٣ جدول ونمودار مقایسه اسیدهای آمینه ضروری در پروتئین های میکروبی ١٣٠

٤-٤ تأثیر هیدرولیز اسیدی بر روی انواع اسید های آمینه ١٣١

٤-٥ مقایسه مقادیر اسیدهای آمینه ضروری درمواد مغذی ١٣٤

٤-٦ دیاگرام مقایسه مقادیر اسید های آمینه ضروری در مواد مغذی ١٣٥

چکیده :

افزایش فعالیت های کشاورزی هر ساله باعث انباشته شدن مقادیر زیادی ضایعات لیگنو سلولزی در جهان می شود . با توجه به فزونی جمعیت و نیاز به مواد غذایی باید تدابیر ویژه ای جهت استفاده بهینه از باقی مانده محصولات کشاورزی اندیشید . تولید پروتئین میکروبی یکی از راهکارها در این زمینه می باشد که با آن از ضایعات کم ارزش می توان غذای مطلوب و دارای پروتئین و اسید های آمینه ضروری و قابلیت هضم بالا جهت خوراک دام و طیور تهیه کرد. برای این منظور ابتدا تیمارهای فیزیکی وشیمیایی بر روی ضایعات لیگنو سلولزی انجام می شود. در این تحقیق ابتدا کاه گندم با حرارت ۱۰۰ درجه سانتی گراد و هیدروکسید سدیم ۲ درصد تیمار شد. سپس به عنوان سوبسترا در محیط کشت تخمیر حالت جامد توسط قارچ پلوروتوس فلوریدا تیمار بیولوژیکی گردید . با افزودن اوره با غلظت ۰/۳ گرم درلیتر در محیط کشت مندلز بعد از چهار هفته پروتئین میکروبی تولید شد و جهت تعیین میزان پروتئین و آنالیز اسید های آمینه از نظر کیفی و کمی مورد بررسی قرار گرفت . میزان پروتئین ٦٢/٦ % وزن خشک اندازه گیری شد. از آنالیز اسید های آمینه ٦٧/ ٦٥ % اسید های آمینه ضروری به دست آمد. لیزین با ۹/۵۵ گرم در ۱۰۰ گرم پروتئین، مطلوبترین و هیستیدین با ۱۹/۸۸ گرم در ۱۰۰ گرم پروتئین بیشترین مقدار اسید های آمینه در این پروتئین میکروبی تعیین شد.

کلید واژه : پروتئین / اسیدهای آمینه ضروری/ پروتئین میکروبی / ضایعات لیگنو سلولزی/خوراک دام وطیور/پلوروتوس فلوریدا