بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه پیام نور استان تهران
مرکز تهران شرق

غربالگری و جداسازی پروتئاز باکتریایی گرمادوست بعنوان مکمل تغذیه دام و طیور

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد
در رشته بیوتکنولوژی گرایش کشاورزی

نگارش :
مصطفی امیری بهرامی

استاد راهنما :
دکتر ارسطو بدویی دلفارد

استاد مشاور :
دکتر محمدعلی ابراهیمی

زمستان ۱۳۹۱

شماره: .....

تاریخ: .....

پیوست: .....

جمهوری اسلامی ایران
وزارت علوم تحقیقات و فناوری

مرکز تهران شرق

دانشگاه پیام نور
دانشگاه پیام نور استان تهران
اللهم عجل لولیک الفرج و العافیة و النصر

صورتجلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد

جلسه دفاع ازپایان نامه کارشناسی ارشد آقای مصطفی امیری بهرامی

دانشجوی مهندسی بیوتکنولوژی کشاورزی به شماره دانشجویی

۸۹۰۰۶۶۵۷۹

تحت عنوان:

"غربالگری و شناسایی تعیین خصوصیات پروتئاز باکتریایی گرمادوست برای استفاده به عنوان مکمل غذایی دام و طیور "

جلسه دفاع با حضور داوران نامبرده ذیل در روز چهارشنبه مورخ: ۹۱/۱۱/۱۱ ساعت: ۱۵-۱۴

در محل مرکز تهران شرق برگزار شد. پس از بررسی پایان‌نامه مذکور با نمره به عدد .....۱۹.....

به حروف .....نوزده..... و با درجه ارزشیابی.....عالی.....مورد قبول واقع شد☑ نشد☐

هیات داوران	نام و نام خانوادگی	مرتبه دانشگاهی	دانشگاه/ موسسه	امضاء
استاد راهنما	دکتر ارسطو بدوی دلفارد	استادیار	دانشگاه باهنر کرمان	
استاد مشاور	دکتر محمدعلی ابراهیمی	استادیار	پیام نور	
استاد داور	دکتر غلامرضا بخشی خانیکی	استاد	پیام نور	
نماینده گروه/ نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر غلامرضا بخشی خانیکی	استاد	پیام نور	

تهران ، خیابان کریمخان زند ،خیابان استاد نجات الهی ، خیابان شهید فلاح پور ، پلاک ۲۷ مرکز تهران شرق

تلفن : ۸۸۹۱۳۴۷۵

دورنگار: ۸۸۹۴۸۹۸۴

Tshargh.Tpnu.ac.ir

Tshargh@Tpnu.ac.ir

گواهی اصالت، نشر و حقوق مادی و معنوی اثر

اینجانب **مصطفی امیری بهرامی** دانشجوی ورودی سال **۱۳۸۹** مقطع کارشناسی ارشد رشته **بیوتکنولوژی** گرایش **کشاورزی** گواهی می نمایم چنان‌چه در پایان نامه خود از فکر، ایده و نوشته دیگری بهره گرفته‌ام با نقل‌قول مستقیم یا غیرمستقیم منبع و ماخذ آن را نیز در جای مناسب ذکر کرده ام .بدیهی است مسئولیت تمامی مطالبی که نقل‌قول دیگران نباشد بر عهده خویش می‌دانم و جوابگوی آن خواهم بود.

دانشجو تأیید می‌نماید که مطالب مندرج دراین پایان نامه (یا رساله) نتیجه تحقیقات خودش می باشد و در صورت استفاده از نتایج دیگران مرجع آن را ذکر نموده است.

نام و نام خانوادگی دانشجو: **مصطفی امیری بهرامی**

تاریخ و امضاء : ۱۳۹۱/۱۱/۱۱

اینجانب **مصطفی امیری بهرامی** دانشجوی ورودی سال **۱۳۸۹** مقطع کارشناسی ارشد رشته **بیوتکنولوژی** گرایش **کشاورزی** گواهی می‌نمایم چنانچه براساس مطالب پایان‌نامه خود اقدام به انتشار مقاله، کتاب، و .... نمایم ضمن مطلع نمودن استاد راهنما، با نظر ایشان نسبت به نشر مقاله،

کتاب، و ... و به صورت مشترک و با ذکر نام استاد راهنما مبادرت نمایم.

نام و نام خانوادگی دانشجو: **مصطفی امیری بهرامی**

تاریخ و امضاء: ۱۳۹۱/۱۱/۱۱

(کلیه حقوق مادی مترتب از نتایج مطالعات ، آزمایشات و نو آوری ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه متعلق به دانشگاه پیام نور می باشد.)

تقدیم

تقدیم به **مهربان ترین پدر**

و تقدیم به **صبور ترین مادر**

آنانکه توانشان رفت تا به توان برسم و مویشان سپید گشت تا رویم سپید بماند، آنانکه راستی قامتم در شکستگی قامتشان بقا یافته.

به پاس قدردانی از قلبی آکنده از معرفت که محیطی سرشار از سلامت و امنیت و آرامش و آسایش برای من فراهم آورده است

همدلی که با واژه ی نجیب تلاش؛ آشنایی دارد و تلاش راستین را می شناسد و مرا در راه رسیدن به اهداف عالی یاری می رساند؛

همو که حس تعهد و مسئولیت را در زندگی مان تلالویی خدایی داده است؛

از **همسر گرانقدرم** تقدیر به عمل می آورم.

همچنین از **فرزندان دلبندم** تشکر می نمایم که صبورانه و صادقانه من را همراهی نموده است تا بتوانم در کمال آرامش و آسایش به تهیه و تنظیم پایان نامه بپردازم.

تقدیر و تشکر

حمد و سپاس خدایی را انسان را آفرید و به او قدرت تفکر و تعلق بخشید، تا در سایه الطاف بی کرانش همواره به کسب و تحصیل علم بپردازم بر خود واجب می دانم که از زحمات دلسوزانه و بی دریغ تمامی دست اندرکاران دانشگاه پیام نور مرکز تهران شرق و اساتید محترم این واحد دانشگاهی و تمامی عزیزانی که به نحوی در طول دوران تحصیل راهنمای اینجانب بوده اند به خصوص اساتید گرانقدر **جناب آقای دکتر ارسطو بدویی دلفارد و جناب آقای دکتر محمد علی ابراهیمی** تقدیر و تشکر به عمل می آورم و توفیق روزافزون تک تک عزیزان را از درگاه خداوند منان خواستارم

چکیده

پروتئازها پرمصرف ترین آنزیم های صنعتی می باشند که حدود ٦٠ درصد از فروش بازار جهانی آنزیم را به خود اختصاص داده و دارای کاربردهای متنوعی در صنایع غذایی، دارویی، شوینده ها و موارد دیگر می باشند. در این تحقیق از چشمه آب گرم نمونه برداری شد و باکتری های مولد پروتئاز روی محیط اختصاصی(SKM) کشت داده شد و غرباگری گردید. در حضور سوبسترای کازیین نیز تحت مطالعات آنزیمی قرار گرفت. نتایج حاصل از تطبیق و درخت فیلوژنتیکی نشان دادند که گونه فوق به گونه *Bacillus niacini* نزدیک می باشد. مطالعات آنزیمی نشان داد که این آنزیم در گستره دمایی۹۰-۲۰ درجه سانتی گراد فعالیت پروتئازی دارد که بیشترین آن در دمای °C ٦٠ گزارش می شود. بیشترین فعالیت پروتئازی نیز در محدوده pH های ۸-۹ و بیشترین پایداری در pH۹ گزارش می شود. نتایج خاطر نشان می سازد که فعالیت پروتئازی در حضور حلال های آلی متانول، تولوئن و DMF بیش از نمونه کنترل فاقد حلال است. در حضور سایر حلال ها نیز میزان فعالیت آنزیمی باقی مانده بیش از ٦٠ درصد می باشد. قابلیت های گرما دوست بودن، فعالیت در pH های قلیایی و پایداری در حضور حلال های آلی این پروتئاز اهمیت قابل توجهی برای استفاده در صنایع مختلف را داراست.

کلمات کلیدی: پروتئاز، حلال آلی، گرما دوست، غربالگری

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۱. مقدمه..... ۱

۱-۱)غربالگری..... ۲

۱-۱-۱)غربالگری اولیه..... ۳

۱-۱-۲) غربالگری ثانویه ۳

۱-۱-۳) مثال های غربال سازی : ٤

۱-۲) غربالگری آنزیم ها و اهمیت آن: ٤

۱-۳) میکروارگانیسمهای قلیا دوست:..... ٦

۱-٤) آنزیم ها :..... ۷

۱-٤-۱) ویژگی آنزیم ها..... ۸

۱-٤-۲) استفاده از آنزیم ها در تغذیه دام و طیور: ۹

۱-٤-۳) کاربرد آنزیمها در صنایع غذایی دام و طیور ۱۱

۱-٤-۳-۱) تکمیل فعالیت های گوارشی اندوژن ۱۱

۱-٤-۳-۲) حذف عوامل ضد تغذیه ای :..... ۱۱

۱-٤-۳-۳) انواع آنزیم های تغذیه ایی:..... ۱۲

۱-۵) پروتئازها: ۱۲

۱-۵-۱) پروتئازهای قلیایی سرین ۱٤

۱-۵-۲) جداسازی و غربال کردن: ۱۵

۱-۵-۳) غنی سازی و انتخاب: ۱۵
۱-۵-٤) جداسازی و خالص سازی: ۱٦
۱-۵-٤-۱) غلظت ۱٦
۱-۵-٤-۲) رسوب دهی ۱۷
۱-۵-٤-۳) کروماتوگرافی تبادل یونی (IEC) ۱۸
۱-۵-٤-٤) سیستمهای دو مرحلهای آبی ۱۸
۱-۵-۵) تثبیت ۱۸
۱-۵-٦) مهندسی حلال و آنزیم ۱۹
۱-۵-۷) تولید پروتئازهای قلیایی: ۱۹
۱-۵-۷-۱) بهبود بخشیدن به تولید ۲۰
۱-۵-۷-۲) بهینه سازی محیط تخمیر ۲۰
۱-۵-۷-۳) منبع نیتروژنی ۲۰
۱-۵-۷-٤) منبع کربن ۲۱
۱-۵-۷-۵) یون فلزی ۲۱
۱-۵-۷-٦) pH ۲۱
۱-۵-۸) خصوصیات پروتئاز های قلیایی ۲۲
۱-۵-۸-۱) pH ۲۲
۱-۵-۸-۲) دما ۲۲
۱-۵-۸-۳) فعالیت بیشتر با یونهای فلزی ۲۲

۱-۵-۹) کاربرد صنعتی پروتئاز های قلیایی ۲۳
۱-۵-۹-۱) افزودنی های مواد شوینده : ۲۳
۱-۵-۹-۲) صنعت چرم سازی ۲٤
۱-۵-۹-۳) کاربرد پزشکی ۲٤
۱-۵-۸-٤) غذا و صنایع غذایی ۲۵
۱-۵-۹-۵) صنایع شیمیایی ۲٦
۱-۵-۹-٦) ترمیم و بازیافت فلزی(نقره) ۲٦
۱-۵-۹-۷) کاربرد زبالهای ۲٦
۱-۵-۱۰) کشف پروتئازهای جدید ۲۷
۱-٦) هدف ۲۸
۲) مواد و روش ها ۳۲
۲-۱)نمونه برداری ۳۲
۲-۲)مواد شیمیایی ۳۲
۲-۳)دستگاههای مورد استفاده ۳۳
۲-٤) محیط های کشت ۳٤
۲-٤-۱)محیط مایع (آب)غنی شده با سیکلوهگزان و تولوئن ۳٤
۲-٤-۲)محیط جامد معمولی ۳۵
۲-٤-۳)محیط جامد اختصاصی ۳۵
۲-٤-٤)محیط پیش تولید ۳۵

۲-٤-٥) محیط تولید: ٣٦
۲-٥)بافرهای مورد استفاده: ٣٦
۲-٥-١) بافر TEB ٣٦
۲-٥-٢) بافر کسیه دیالیز: ٣٧
۲-٥-٣) بافر تعویض کیسه دیالیز (بافر فسفات) ٣٧
۲-٦)غربالگری باکتری مولد پروتئاز: ٣٧
۲-٧) شناسایی سویه ٣٨
۲-٨)تولید آنزیم ٣٩
۲-٩) جداسازی انزیمها از باکتریها: ٤٠
۲-١٠) رسوبدهی با امونیوم سولفات: ٤٠
۲-١١) نحوه انجام دیالیز: ٤٠
۲-**١٢**)خالص سازی جزئی: ٤١
۲-**١٣**)الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید ٤١
۲-**١٤**)زایمو گرام پروتئازها: ٤٢
۲-**١٥**) بررسی فعالیت پروتئازی: ٤٢
۲-**١٥**-١) روشهای اندازهگیری پروتئاز: ٤٢
۲-**١٥**-١-١)روش سنتیک: ٤٣
۲-**١٥**-١-٢) نقطه پایان ٤٣

۲-۱۶) تعیین زمان و **از** بهینه برای تولید آنزیم..... ٤٤
۲-۱۷) تعیین خصوصیات پروتئازها با استفاده از پارامترهای سنتیتکی..... ٤٥
۲-۱۷-۱) بررسی فعالیت آنزیمی در دمای مختلف..... ٤٥
۲-۱۷-۲) بررسی پایداری دمای آنزیم..... ٤٥
۲-۱۷-۳) اثر pH های مختلف روی فعالیت آنزیم..... ٤٦
۲-۱۷-٤)اثر پایداری آنزیمی در**از** های مختلف..... ٤٦
۲-۱۷-٥)بررسی حلالهای آلی روی فعالیت آنزیمی در دمایی اتاق..... ٤٧
۲-۱۷-۶)بررسی پایداری آنزیمی در حضور حلال آلی..... ٤٧
۲-۱۷-۷) بررسی یون های فلزی روی فعالیت آنزیمی..... ٤٧
۲-۱۷-۸)اثر یونها به روی پایداری آنزیم..... ٤٨
۲-۱۷-۹) اثر غلظت مختلف NaCl روی فعالیت آنزیم:..... ٤٨
۲-۱۷-۱۰)اثر شویندهها روی فعالیت آنزیم:..... ٤٩
۳ . نتایج و بحث..... ٥١
۳-۱. نمونه برداری..... ٥١
۳-۲) غربالگری باکتریهای مولد پروتئاز..... ٥٢
۳-۳) جداسازی پروتئاز..... ٥٣
۳-٤) شرایط بهینه تولید آنزیم..... ٥٣
۳-٤-۱) اثر زمانهای مختلف بر تولید آنزیم..... ٥٣

۳-٤-۲)اثر pH روی تولید آنزیم ٥٤
۳-٥)خالص سازی مختصر پروتئین ٥٥
۳-٦) ژل الکتروفورز SDS-PADGE و زیموگرام ٥٧
۳-۷) تعیین خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم پروتئاز ٥٨
۳-۷-۱) بررسی فعالیت آنزیمی در دماهای مختلف ٥٨
۳-۷-٤) بررسی پایداری دمایی ٥٩
۳-۷-۳) اثر pH روی فعالیت پروتئاز ٦٢
۳-۷-٤) بررسی پایداری آنزیم در **از** های مختلف ٦٢
۳-۷-٥) بررسی فعالیت آنزیمی در حضور حلالهای آلی ٦٣
۳-۷-٦) بررسی پایداری آنزیمی در حضور حلال آلی ٦٤
۳-۷-۷) اثر یون های فلزی روی فعالیت پروتئاز ٦٥
۳-۷-۸) اثر یون های فلزی بر روی پایداری پروتئاز ٦٧
۳-۷-۹) اثر غلظتهای مختلف NaCl بر فعالیت پروتئازی ٦٨
۳-۷-۱۰) اثر شویندهها روی فعالیت آنزیمی ٦٨
۳-۸) تعیین گونه میکروارگانیسم با استفاده16S rDNA ۷۰
منابع : ۷۲

فهرست اشکال

شکل ۱) چشمه آب گرم گور ۵۱

شکل ۲) ایجاد هاله شفاف توسط باکتری Bacillus sp. DAF-01 در محیط SKM..... ۵۲

شکل ۳) بهینه سازی زمان تولید پروتئاز باکتریایی *Bacillus* sp. D ٥٤

شکل ٤) کروماتوگرام حاصل از خالص سازی با ستون تعویض یونی Q-shepharose..... ٥٦

شکل٥) ژل الکتروفورز و زیموگرام عصاره پروتئینی ٥٧

شکل ٦) میزان فعالیت آنزیمی در دما های مختلف ٥٨

شکل٧) پایداری دمایی آنزیم را در زمان های متفاوت انکوباسیون ٦٠

شکل ٨) فعالیت پروتئازی *Bacillus* sp. DAF-01 در حضور pH های مختلف..... ٦١

شکل ۹) پایداری پروتئاز *Bacillus* sp. DAF-01 در حضور pH های مختلف..... ٦٣

شکل ۱۰) پایداری آنزیم در حلال الی مختلف را نشان می دهد. ٦٤

شکل١١) نمایانگر فعالیت آنزیم در حلال الی مختلف را نشان می دهد ٦٥

شکل١٢) اثر یون های فلزی روی فعالیت پروتئازی..... ٦٦

شکل١٣) اثر یون های مختلف روی پایداری پروتئاز ٦٧

شکل١٤) اثر غلظتهای مختلف NaClروی فعالیت پروتئازی..... ٦٨

شکل١٥) اثر شوینده های تجاری فاقد آنزیم روی فعالیت پروتئازی ٦٩

شکل ١٦) محصول PCR ژن 16S rDNA..... ۷۰

شکل ۱۷) درخت فیلوژنی باکتری مولد پروتئاز باکتریایی ۷۱

۱. مقدمه

آنزیم ها، پروتئین ها یی هستند که در واکنشهای شیمیایی به عنوان کاتالیزور عمل می کنند و موجب سرعت بخشیدن به این واکنشها می شوند. آنزیم ها توسط طیف وسیعی از موجودات زنده نظیر جانوران، گیاهان، قارچها و میکرو ارگانیسم ها از قبیل باکتریها ، مخمرها و کپک ها تولید می شوند(49). از این میان پروتئازها[1] که از خانواده هیدرولازها[2] هستند به انواع مختلفی نظیر (اگزوپپتیدازها[3]، اندوپپتیدازها[4]) طبقه بندی می شوند.

پروتئازها یکی از مهمترین انواع آنزیم های صنعتی را شامل می شوند که حدود ۶۵-۶۰ درصد از فروش بازار جهانی آنزیم را به خود اختصاص داده و دارای کاربردهای متنوعی در صنایع غذایی، دارویی، شوینده ها ، چرمئ سازی، نساجی و موارد دیگر می باشند. از میان منابع مختلف تولید پروتئاز، باکتریها به دلیل بازده بالای تولید، دسترسی آسان و دست ورزی[5] راحت تر ژنتیکی از اهمیت خاصی برخوردار می باشند. از مهمترین میکروارگانیسم های باکتریایی می توان به باکتریهای گرما دوست اشاره کرد (35).

باکتری های گرما دوست میکروارگانیسم هایی هستند که رشد بهینه آنها در دمای بالاتر از ۴۵ درجه سانتی گراد می باشد. با توجه به ساختار پروتئین های این نوع باکتری ها که در دمای بالا ساختارشان کاملا" حفظ می شود توجه خاصی به خصوص در صنایع غذایی و شوینده ها را به خود جلب کرده اند.

---

[1] protease
[2] Hydrolases
[3] Exo protease
[4] Endo protease
[5] Genetic Eengineering

این میکرو ارگانیسم ها از محیط های مختلفی مثل نواحی آتشفشانی، خاک های مناطق گرمسیری و خاک جنگل، چشمه های آب گرم جداسازی شده اند(87).

امروزه صنعت پرورش دام و سایر علوم وابسته به طور عمده ای به این باور رسیده است که آنزیم ها، افزودنیهای غذایی با ارزشی هستند. آنزیم هایی در این تحقیق بررسی شده‌اند از پروتئازهای خارج سلولی بوده به دلیل اینکه در صنعت دام و طیور به طور مستقیم به غذا اضافه می شوند، نقش مکملی را برای هضم طبیعی آنزیم های درون ریز دارند. آنزیم های خارجی فعالیت خود را روی مواد غذایی خام موجود در اندام گوارشی انجام می دهند. افزودن آنزیم های خارجی به غذای حیوانات بیانگر افزایش سیستم های هضم آنزیمی پرندگان می باشد. البته این نوع آنزیم ها باید به دما و pH، وجود یونها مقاوم باشند(۵و٦). بر این اساس، آنزیم مورد مطالعه تحت مطالعات بیوشیمیایی قرار می گیرد .

۱-۱)غربالگری[1]

غربالگری شامل روش های اختصاصی است که بتوان از بین یک جمعیت بزرگتر میکرو ارگانیسم‌هایی خاصی را شناسایی وجدا سازی کرد. با غربالگری ارگانیسم ها به منظور فعالیت های بیوکاتالیزی مختلف، قادریم محصولات تولید شده توسط آنها را که نسبت به وظایف خود در خلال فرایند تکامل سازش یافته اند به دست آوریم. بنابراین غربالگری از جنبه های مختلف یک سرمایه گذاری محسوب می‌گردد(35).

[1]Screening

از ویژگی های غربالگری میکروبی می توان به رشد سریع پس از تلقیح به داخل ظروف کشت، تولید محصول در زمان کوتاه، تکثیر آسان میکروبها و قابلیت نگهداری برای زمانهای طولانی را نام برد. هچنین در این روش از قابلیت های مانند امکان رشد بر روی یک منبع غذایی کربن، نیز استفاده می شود (۵۹و۸۷). درادامه روش های غربالگری مورد بررسی قرار گرفته است.

۱-۱-۱)غربالگری اولیه[1]

غربالگری اولیه شامل شناسایی درصد کمی از میکروبهای مورد نظر از بین تعداد زیادی از میکرو ارگانیسم ها می باشد که در این روش از کشت مایع و جامد استفاده می شود.

کشت مایع: یکی از دلایلی که از این کشت استفاده می شود آن است که شرایط آن شبیه به شرایط تولیدات صنعتی می باشد.

کشت جامد: استفاده از محیط کشت جامد نیاز به فضای کم آزمایشگاهی دارد و همچنین امکان انجام همزمان تعداد زیادی آزمایش را نیز دارد(87).

۱-۱-۲) غربالگری ثانویه [2]

از اهداف مهم غربالگری ثانویه می توان به ارزیابی کمی در خصوص قابلیت های میکروبهای جدا شده در غربال سازی اولیه و همچنین جدا کردن میکروبهایی که در یک فرایند تخمیر صنعتی اقتصادی می توانند مفید واقع شوند، اشاره کرد. از اطلاعاتی در این روش بدست می آید می توان به اطلاعات کمی و

[1] Primary screening
[2] Secondary screening

کیفی، طبقه بندی میکروبی های جدا شده، شرایط بهینه برای رشد میکروب ها، توسعه روش های جداسازی برای محصول میکروبی، پایداری ژنتیکی و پایداری شیمیای اشاره کرد(25,87).

۱-۱-۳) مثال های غربال سازی :

۱- جداسازی میکروب های مولد یک آنزیم از جمله آنزیم های:

پروتئاز، شناسایی آن توسط محلول سازی پروتئین کازئین در نواحی شفاف شده مشخص می گردد.

آمیلاز[1]، تشخیص این آنزیم به وسیله هیدرولیز نشاسته در آگار توسط نواحی شفاف بعد از رنگ آمیزی با ید مشخص گردد.

۲-غربالگری برای تولید ترکیبات بازدارنده بر روی فعالیت آنزیمی که از کاربرد آن می توان به کشف داروهایی جدید با کاربرد در مصارف بالینی و کشاورزی مانند ترکیبات بازدارنده آنزیم های لاکتاماز[2] نام برد.این آنزیم ها در ساخت آنتی بیوتیکها موثر در برابر میکروب های بیماری زای مقاوم به آنتی بیوتیک های قدیمی استفاده می شوند (59).

۱-۲) غربالگری آنزیم ها و اهمیت آن:

اگر یک واکنش از لحاظ ترمودینامیکی انجام پذیر باشد احتمالا" حداقل یک آنزیم در طبیعت برای آن وجود دارد که قادر است آن واکنش را کاتالیزور نماید(49). فرایند تکامل، فشاری را اعمال می نماید که منجر به تولید مولکول هایی با فعالیت های بیوکاتالیزری سازش یافته با سوبسترا[3]، پایداری

[1] Amylase
[2] Lactamase
[3] Substrate

مولکول، فرایندهای داخل سلولی موثر و مکانیسمی برای انتقال آنزیم های خارج سلولی به خارج از سلول می گردد(35).

غربالگری بیوکاتالیست های جدید با اهداف اکادمیک و علوم پایه، برای اهداف کاربردی و صنعتی صورت می گیرد. معمولا" غربالگری آنزیم ها و استراتژی های انتخاب بر اساس دانش ما از کاربرد و شرایط فیزیکی و شیمیایی می باشد که تحت آن شرایط آنزیم مورد استفاده قرار می گیرد

. بنابراین مرحله اول و اساسی در فرایند غربالگری انتخاب، یا مد نظر قرار دادن کارایی آنزیم تحت شرایط مورد استفاده می باشد. پیش نیاز دیگر برای یک برنامه غربالگری موفق دسترسی به یک خزانه ژنی غنی می باشد(۵۱و۵۲).

در گذشته این فرایند منحصرا" شامل غربالگری میکرو ارگانیسم های زنده بود (غربالگری میکروبی کلاسیک) اما با به کارگیری روش های مدرن بیولوژی مولکولی غربالگری بدون نیاز به کشت ارگانیسم ها قابل انجام می باشد. البته هر روشی دارای محدودیت هایی می باشد و ترکیبی از تکنیک ها اغلب بسیار موفقیت آمیز است.

امروزه از ترکیب غربالگری با تکنیک های جدید نظیر مهندسی پروتئین، دستیابی به فعالیت های جدید، خصوصیات جدید و بهبود بیوکاتالیست ها از جنبه های مختلف و همچنین پی بردن به مکانیسم های دخیل در آنها شتاب بیشتری گرفته است(25).

۱-۳) میکروارگانیسم‌های قلیا دوست:

همه میکروارگانیسم‌ها برای رشد بهینه خود، از یک مدل توزیع نرمال از لحاظ وابستگی به pH تبعیت می‌کنند و اکثر این میکروارگانیسم‌ها در pH های خنثی، رشد و تکثیر بهتری را از خود نشان می‌دهند. هرگاه pH از سطح خنثی دور شود، تعداد میکروارگانیسم‌ها کاهش مییابد(52). میکرو ارگانیسم‌های قلیایی شامل گروهای متنوعی می باشند که در محیط‌هایی با pH بالا رشد می‌کنند. علاوه بر این آنها در دو گروه بزرگ قلیادوست[1] و الکالوتلورانت[2] (تحمل کننده‌ی محیط قلیایی) طبقه‌بندی می‌شوند. عبارت قلیادوست برای آن دسته از ارگانیسم‌ها به کار می‌رود که توانایی رشد در pH بالاتر از ۱۰را دارا می‌باشند و رشد مطلوب آنها در pH حدود ۹ صورت می‌گیرد و در pH ۷ یا کمتر از آن قادر به رشد نیستند. از سوی دیگر ارگانیسم‌های الکالوتلورانت توانایی رشد در ۱۰ را نیز دارند اما pH مناسب برای رشد مطلوب این ارگانیسم‌ها نزدیک به خنثی می‌باشد(52). الکالوفیل‌های شرایط حداکثری به دو زیر گروه اصلی الکالوفیل‌های اختیاری و اجباری تقسیم می‌شوند، الکالوفیل‌های اختیاری، رشد مطلوبی در pH ۱۰یا بالاتر را دارند و در عین حال می‌توانند در شرایط خنثی رشد داشته باشند. در حالیکه الکالوفیل‌های اجباری نمی‌توانند در شرایط خنثی رشد کنند(50).

میکروارگانیسم‌های قلیایی توزیع گسترده‌ای در طبیعت دارند و تقریباً در همه محیط‌ها بدون محدودیت الکالینی یافت می‌شوند. در صورتی که طیف وسیع آنها تحت پوشش تعداد محدودی از محیط‌های الکالینی طبیعی چون خاک‌های محتوی سود، دریاچه‌ها و صحراها قرار می‌گیرند. البته

[1] Alkalophilic
[2] Alkalotolerant