دانشکده علوم
گروه زیست شناسی
پایان نامه کارشناسی ارشد رشته زیست فناوری (بیوتکنولوژی) - گرایش میکروبی

عنوان

جداسازی و شناسایی باکتری های مولد کیتیناز از ناحیه جنوبی دریای خزر

استادان راهنما

دکتر علی مخدومی کاخکی

دکتر رضا پورغلام

استادان مشاور

دکتر منصور مشرقی

دکتر خدیجه جامی الاحمدی

گردآورنده

زینت دهقانی جویباری

اسفند ۱۳۹۲

تاریخ :.....

شماره :.....

فرم ارزشیابی پایان نامه کارشناسی ارشد

معاونت آموزشی

مرکز سرویس تحصیلات تکمیلی

نام و نام خانوادگی دانشجو : زینت دهقانی جویباری تاریخ شروع تحصیل : ۱۳۹۰ تعداد واحد جبرانی: -- رشته و گرایش تحصیلی: زیست شناسی بیوتکنولوژی میکروبی

تاریخ دفاع: ۹۲/۱۲/۱۸ نام و نام خانوادگی اساتید راهنما : آقای دکتر علی مخدومی کاخکی و آقای دکتر رضا پورغلام

عنوان پایان نامه : جداسازی و شناسایی باکتری های مولد کیتیناز از ناحیه جنوبی دریای خزر

معیارهای ارزشیابی		حداکثر نمره	نمره کسب شده	ملاحظات
کیفیت نگارش	انسجام در تنظیم و تدوین مطالب ، حسن نگارش و رعایت دستورالعمل	۳	۳	
	کیفیت تصاویر ، اشکال و منحنی های استفاده شده			
کیفیت علمی	بررسی تاریخچه موضوع بیان پژوهش در موضوع	۱۲	۱۲	
	ابتکار و نو آوری			
	ارزش علمی و یا کاربردی			
	استفاده از منابع و مواخذ به لحاظ کمی و کیفی (به روز بودن)			
	کیفیت نظرات و پیشنهادات برای ادامه تحقیق			
کیفیت ارائه	تسلط به موضوع و توانایی در پاسخگویی به سوالات در جلسه دفاع نحوه ارائه (رعایت زمان – تفهیم موضوع ، کیفیت ترانس پرنسی و ...)	۳	۳	
مقاله	مقاله مستخرج از پایان نامه که بر اساس د ستور العمل تهیه و به تایید استاد راهنما رسیده و بهمراه پایان نامه تحویل گردیده است .	۱	۱	
اتمام به موقع	اتمام به موقع دوره و تحویل گزارشات	۱	۱	
نمره پایان نامه		۲۰	۲۰	

اعضاء هیئت داوران	نام و نام خانوادگی	مرتبه علمی	نام دانشگاه	امضاء
اساتید راهنما	آقای دکتر علی مخدومی کاخکی آقای دکتر رضا پورغلام	استادیار استادیار	دانشگاه فردوسی مشهد پژوهشکده اکولوژی دریای خزر	
استاد مشاور	آقای دکتر منصور مشرقی خانم دکتر خدیجه جامی الاحمدی	دانشیار استادیار	دانشگاه فردوسی مشهد دانشگاه علوم پزشکی مشهد	
عضو دفاع (استاد مدعو)	آقای دکتر غلامرضا هاشمی تبار	استاد	دانشگاه فردوسی مشهد	
عضو دفاع و نماینده تحصیلات تکمیلی گروه	خانم دکتر بهارشهنواز	استادیار	دانشگاه فردوسی مشهد	

جلسه دفاع در تاریخ ۹۲/۱۲/۱۸ برگزار گردید و نمره نامبرده بیست / ۲۰ حروف (بیست) می باشد که با توجه به ماده ۲۰ آئین نامه آموزشی دوره کارشناسی ارشد ناپیوسته مصوب ۷۳/۱۰/۲۵ به آن درجه عالی تعلق میگیرد.

نام و نام خانوادگی مدیر گروه زیست شناسی : دکتر فرهنگ حداد امضاء و تاریخ ۹۲/۱۲/۱۸

* سهم اعضاء هیئت داوران در ارزشیابی یکسان است . * محاسبه میانگین و اعمال یک نمره مربوط به بخش اتمام به موقع با توجه به تاریخ شروع و پایان تحصیل توسط نماینده تحصیلات تکمیلی گروه انجام می گیرد.

مقالات ارائه شده در کنگره ها :

- مقاله ای (بررسی تولید آنزیم کیتیناز توسط باکتری های بومی دریای خزر) به صورت پوستر در هفتمین کنگره ملی بیوتکنولوژی - ۱۵ تا ۱۷ تیرماه - ۱۳۹۲ - گرگان

- مقاله ای (شناسایی هومولوگ باکتری های کیتینولیتیک با پتانسیل کاربرد در تولید سوخت زیستی) به صورت پوستر در سومین کنگره بین المللی انجمن میکروبیولوژی ایران - دانشگاه کرمانشاه - اسفند ۱۳۹۲

تقدیر و تشکر

خدا را شاکرم که با لطف و عنایت بی منتش، توفیق را رفیق راهم ساخت تا بتوانم این پایان نامه را به پایان برسانم.

به رسم ادب بر خود واجب می دانم که از استاد بزرگوارم جناب آقای دکتر مخدومی کاخکی که راهنمایی های دلسوزانه خود را هیچ گاه از بنده دریغ نکردند کمال تشکر و سپاسگذاری را داشته باشم.

از استادان محترم جناب آقای دکتر پورغلام، دکتر مشرقی و سرکار خانم دکتر جامی الاحمدی به خاطر راهنمایی و مشاوره های ارزنده نهایت تشکر را دارم.

تشکر ویژه بنده پیشکش کسانی است که اگر حمایت هایشان نبود، قطعا این پایان نامه به سرانجام نمی رسید؛ خانواده ام خصوصا پدر و مادر عزیزم که همیشه و همیشه پناه من در تمام مراحل زندگی بودند.

از استادان محترم جناب آقای دکتر آسوده، سرکار خانم دکتر حیدری و خانم مهندس پردلی به خاطر کمک های بی دریغشان کمال قدردانی را دارم.

از دوستان عزیزم در آزمایشگاه میکروبیولوژی، بیوتکنولوژی، سلولی و مولکولی، بیوشیمی و پژوهشکده زیست فناوری خصوصا خانم ها سفیدیان و خمر کمال تشکر و قدردانی را دارم.

و با تشکر خالصانه خدمت همه کسانی که به نوعی مرا در به انجام رساندن این مهم یاری نموده اند.

..... اکنون با احترام فراوان این پایان نامه را تقدیم می کنم به تنهاهستی بخش عالم

پروردگار

همچنین به محضر امام رئوفم، هشتمین آفتاب عالم تاب

و پیشکشی کوچک به پدر و مادر عزیزم

امیدوارم قادر به درک زیبایی های وجودشان باشم.

چکیده

جداسازی و شناسایی باکتری های مولد کیتیناز از ناحیه جنوبی دریای خزر

محیط های آبی حدود ٪۷۱ سطح زمین را به خود اختصاص داده اند و به عنوان منبع عظیمی از آنزیم های مفید، تاکنون ناشناخته باقی مانده اند. در این میان آنزیم کیتیناز به علت کاربردهای وسیع آن در پزشکی، بیوتکنولوژی، کشاورزی، مدیریت پسماند و حشره کش های زیستی توجهات زیادی را به خود جلب کرده است.

در این پژوهش به منظور جداسازی باکتری های مولد آنزیم کیتیناز از دریای خزر، نمونه گیری از سه عمق ۰/۵، ۱۵ و ۳۰ متر دریای خزر و از چهار منطقه بهشهر، بابلسر، تنکابن و نوشهر انجام شد. پس از تهیه رقت های مناسب و کشت نمونه ها بر روی محیط های کشت مختلف، حدود ۳۰۰ جدایه به دست آمد که تنها ۹ جدایه قادر به تشکیل هاله در محیط انتخابی حاوی کیتین کلوئیدی بودند.

با انجام تست کمی دو سویه DC و KP6 با تولید بیشتر، به منظور بهینه سازی انتخاب شدند.در بهینه سازی تک متغیر تاثیر فاکتورهای NaCl%، منابع کربن و نیتروژن مختلف، درصد کیتین، pH، مقدار تلقیح، دما و یون های فلزی مختلف، بر رشد سویه و تولید آنزیم مورد سنجش قرار گرفت. تولید سویه DC از ۰/۰۲۳ واحد آنزیمی به ۰/۰۸۴ و سویه KP6 از ۰/۰۲۸ به ۰/۱۰۶ واحد آنزیمی افزایش یافت. برای بررسی اثر برهمکنش فاکتورها بر تولید آنزیم ، چهار فاکتور NaCl، کیتین، دما و pH با روش طراحی سطح پاسخ مورد بررسی قرار گرفتند که طی آن فعالیت آنزیمی سویه DC از ۰/۰۸۴ به ۰/۲۱۵ واحد آنزیمی و سویه KP6 از ۰/۱۰۶ به ۰/۱۴۸ واحد آنزیمی افزایش یافت.

خالص سازی نسبی آنزیم با آمونیوم سولفات انجام و اثر دما، pH و یون های فلزی بر فعالیت آنزیم مورد بررسی قرار گرفت. بهینه دما و pH برای آنزیم جدا شده از سویه DC و KP6 به ترتیب شامل: ۴۰°C، ۹ و ۳۰°C، ۹ بود. در میان یون های فلزی Ca^{2+}، Mg^{2+}، Zn^{2+}، Mn^{2+}، Na^{+} و EDTA، فقط یون Na^{+} در سویه DC اثر مثبتی را بر فعالیت آنزیم نشان داد.

در پایان سویه های تولید کننده آنزیم کیتیناز، با استفاده از تکثیر و تعیین توالی ژن 16S rRNA شناسایی شدند. سویه DC بیشترین شباهت (٪۹۹/۱) را با *Pseudoalteromonas lipolitica* و سویه KP6 بیشترین شباهت را (٪۹۸/۳) با *Rheinheimera nanhaiensis* نشان دادند.

کلمات کلیدی: کیتین، کیتیناز، دریای خزر، بهینه سازی رشد و تولید آنزیم ، خالص سازی آنزیم

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه

۱-۱ مقدمه ۱
۱-۲ بیوتکنولوژی دریا ۲
۱-۳ کاربردهای بیوتکنولوژیک میکروارگانیسم های دریا ۲
۱-۳-۱ آنزیم های هیدرولازی ۲
۱-۳-۱-۱ پروتئاز ۳
۱-۳-۱-۲ لیپاز ۳
۱-۳-۱-۳ آمیلاز ۴
۱-۳-۱-۴ آگاراز ۴
۱-۳-۱-۵ کارازیناز ۴
۱-۳-۱-۶ سلولاز ۵
۱-۳-۲ کاربرد پزشکی ۵
۱-۳-۲-۱ جلبک ها ۶
۱-۳-۲-۲ اسفنج ها ۶
۱-۳-۲-۳ قارچ ها ۶
۱-۳-۲-۴ باکتری ها ۷
۱-۳-۲-۴-۱ ترکیبات ضد باکتریایی ۷
۱-۳-۲-۴-۲ ترکیبات ضد ویروسی ۷
۱-۳-۲-۴-۳ ترکیبات ضد سرطان ۸
۱-۳-۲-۴-۴ رنگدانه ها ۹
۱-۳-۳ بیوفولینگ ۱۰
۱-۳-۴ حذف زیستی ۱۱
۱-۳-۵ تولید سوخت های زیستی ۱۲
۱-۴ دریای خزر ۱۳
۱-۴-۱ تاریخچه ۱۳
۱-۴-۲ زمین شناسی ۱۳
۱-۴-۳ موقعیت جغرافیایی و آب و هوایی ۱۴
۱-۴-۴ ترکیبات شیمیایی دریای خزر ۱۴
۱-۴-۵ تنوع میکروبی دریای خزر ۱۵
۱-۵ کیتین ۱۵
۱-۶ کیتیناز ۱۶

۱-۶-۱ انواع آنزیم کیتیناز ۱۷
۱-۶-۱-۱ تقسیم بندی براساس نوع پیوند شکسته شده ۱۷
۱-۶-۱-۲ تقسیم بندی براساس توالی اسیدهای آمینه ۱۸
۱-۶-۲ کاربردهای کیتیناز ۱۹
۱-۶-۳ کیتینازهای باکتری های دریایی ۱۹
۱-۷ پیشینه تحقیق ۲۰
۱-۸ اهداف پژوهش ۲۲

فصل دوم: مواد و روش ها

۲-۱ نمونه برداری ۲۴
۲-۲ جداسازی باکتری ها ۲۴
۲-۲-۱ محیط های کشت ۲۴
۲-۲-۲ شرایط کشت ۲۵
۲-۳ کیتین کلوئیدی ۲۶
۱-۳-۱ مراحل استخراج کیتین از پوسته میگو ۲۶
۱-۳-۲ تهیه کیتین کلوئیدی ۲۷
۲-۴ غربالگری اولیه باکتری های تولید کننده آنزیم کیتیناز ۲۸
۲-۵ غربالگری ثانویه باکتری های تولید کننده آنزیم کیتیناز ۲۸
۲-۵-۱ رسم منحنی رشد ۲۹
۲-۵-۲ سنجش کمی تولید کیتیناز ۲۹
۲-۵-۱-۱ تهیه معرف Schale ۲۹
۲-۵-۱-۲ رسم منحنی استاندارد GlcNAc طبق روش Schale ۲۹
۲-۵-۱-۳ تعیین میزان فعالیت آنزیم با روش Schale ۳۰
۲-۵-۱-۴ تهیه معرف دی نیتروسالیسیلیک اسید ۳۰
۲-۵-۱-۵ رسم منحنی استاندارد GlcNAc طبق روش DNSA ۳۱
۲-۵-۱-۶ تعیین میزان فعالیت آنزیم با روش DNSA ۳۱
۲-۶ بررسی عوامل مختلف بر رشد سویه و تولید آنزیم ۳۲
۲-۶-۱ بهینه سازی با روش تک متغیره ۳۳
۲-۶-۱-۱ اثر درصد های مختلف NaCl ۳۳
۲-۶-۱-۲ اثر منابع مختلف کربن ۳۳
۲-۶-۱-۳ اثر منابع مختلف نیتروژن ۳۳
۲-۶-۱-۴ اثر درصد های مختلف کیتین ۳۴
۲-۶-۱-۵ اثر pH ۳۴
۲-۶-۱-۶ اثر میزان تلقیح ۳۴
۲-۶-۱-۷ اثر دما ۳۵

۲-۶-۱-۸ اثر یون های فلزی ۳۵
۲-۶-۲ بهینه سازی با روش چند متغیره ۳۵
۲-۷ بررسی میزان رشد سویه و تولید آنزیم با استفاده از کیتین میگو ۳۶
۲-۸ بررسی رابطه رشد سویه و تولید آنزیم در شرایط بهینه ۳۶
۲-۹ بررسی فعالیت آنزیم ۳۷
۲-۹-۱ خالص سازی جزئی آنزیم ۳۷
۲-۹-۲ اثر دما بر فعالیت آنزیم ۳۷
۲-۹-۳ اثر pH بر فعالیت آنزیم ۳۷
۲-۹-۴ اثر یون های فلزی بر فعالیت آنزیم ۳۸
۲-۹-۵ اندازگیری مقدار پروتئین ۳۸
۲-۹-۶ الکتروفورز SDS-PAGE ۳۸
۲-۹-۶-۱ مراحل ریختن و بارگذاری ژل ۳۹
۲-۹-۶-۲ مراحل رنگ کردن و رنگ بری ژل ۴۰
۲-۱۰ بررسی آماری داده ها ۴۱
۲-۱۱ شناسایی سویه ها ۴۱
۲-۱۱-۱ استخراج DNA از باکتری ۴۱
۲-۱۱-۲ واکنش زنجیره ای پلیمراز ۴۲
۲-۱۱-۳ تعیین توالی و ثبت سویه ها ۴۴
۲-۱۱-۴ بررسی ارتباط تکاملی میان سویه ها ۴۴

فصل سوم: نتایج

۳-۱ موقعیت جغرافیایی و ویژگی های شیمیایی مناطق نمونه برداری ۴۵
۳-۲ جداسازی باکتری ها ۴۶
۳-۳ غربالگری اولیه باکتری های تولید کننده آنزیم کیتیناز ۴۷
۳-۴ سنجش کمی تولید کیتیناز ۴۸
۳-۵ رسم منحنی رشد ۵۱
۳-۶ بهینه سازی با روش تک متغیره ۵۲
۳-۶-۱ اثر درصد های مختلف NaCl بر رشد سویه و تولید آنزیم ۵۲
۳-۶-۲ اثر منابع مختلف کربن بر رشد سویه و تولید آنزیم ۵۳
۳-۶-۳ اثر منابع مختلف نیتروژن بر رشد سویه و تولید آنزیم ۵۴
۳-۶-۴ اثر درصد های مختلف کیتین بر رشد سویه و تولید آنزیم ۵۶
۳-۶-۵ اثر pH بر رشد سویه و تولید آنزیم ۵۷
۳-۶-۶ اثر میزان تلقیح بر رشد سویه و تولید آنزیم ۵۸
۳-۶-۷ اثر دما بر رشد سویه و تولید آنزیم ۶۰
۳-۶-۸ اثر یون های فلزی بر رشد سویه و تولید آنزیم ۶۱

۳-۷ بهینه سازی با روش Box-Bhenken ۶۷
۳-۸ بررسی میزان رشد و تولید آنزیمی بر روی کیتین میگو ۷۹
۳-۹ بررسی رابطه رشد سویه و تولید آنزیم کیتیناز در شرایط بهینه ۸۰
۳-۱۰ بررسی فعالیت آنزیم ۸۱
۳-۱۰-۱ بررسی اثر دما بر فعالیت آنزیم ۸۳
۳-۱۰-۲ بررسی اثر pH بر فعالیت آنزیم ۸۴
۳-۱۰-۳ بررسی اثر یون های فلزی بر فعالیت آنزیم ۸۵
۳-۱۱ شناسایی مولکولی سویه های منتخب ۸۶
۳-۱۱ شناسایی سویه های منتخب و بررسی ارتباط تکاملی آنها..... ۸۷
فصل چهارم: بحث
۴-۱ مقدمه ۹۰
۴-۲ جداسازی میکروارگانیسم ها از دریای خزر ۹۰
۴-۳ بهینه سازی با روش تک متغیره ۹۱
۴-۴ بهینه سازی با روش Box-Bhenken و مقایسه آن با روش تک متغیره ۹۲
۴-۵ بررسی رابطه رشد سویه و تولید آنزیم ۹۴
۴-۶ بررسی فعالیت آنزیم ۹۴
۴-۶ نتیجه گیری ۹۵
۴-۷ پیشنهادات ۹۵
منابع ۹۷
چکیده انگلیسی ۱۰۴

فهرست جدول ها

جدول ۱-۱ تقسیم بندی کیتیناز براساس توالی اسید های آمینه ۱۸
جدول ۲-۱ مواد مورد نیاز برای معرف DNSA ۲۹
جدول ۲-۲ سطوح و کد انتخابی برای طراحی آزمایش Box-Bhenken ۳۵
جدول ۲-۳ ترکیب معرف بردفورد جهت سنجش غلظت پروتئین ۳۸
جدول ۲-۴ مواد سازنده ژل SDS-PAGE ۳۹
جدول ۲-۵ محلول های بافری مورد نیاز برای ژل SDS-PAGE ۳۹
جدول ۲-۶ توالی پرایمرهای به کار برده شده ۴۲
جدول ۲-۷ مقدار مواد مورد نیاز برای انجام PCR ۴۳
جدول ۲-۸ برنامه دمایی و مراحل واکنش PCR ۴۳
جدول ۳-۱ ویژگی های فیزیکو- شیمیایی مناطق نمونه برداری ۴۶
جدول ۳-۲ خصوصیات بیوشیمیایی سویه ها ۴۷
جدول ۳-۳ نتایج حاصل از بهینه سازی با روش تک متغیره ۶۶
جدول ۳-۴ مقدار فعالیت به دست آمده برای سویه DC با روش Box-Bhenken ۶۷
جدول ۳-۵ مقدار فعالیت به دست آمده برای سویه KP6 با روش Box-Bhenken ۶۸
جدول ۳-۶ مقدار P-Value و F به دست آمده برای سویه های DC و KP6 ..... ۶۹
جدول ۳-۷ مقایسه فعالیت آنزیم خام و نیمه خالص شده در سویه های منتخب..... ۸۱
جدول۳-۸ میزان شباهت سویه های منتخب با نزدیک ترین گونه ثبت شده در پایگاه EzTaxon ۸۸

فهرست شکل ها

شکل ۱-۱ ساختار شیمیایی Bryostatines ۸
شکل ۱-۲ ساختار شیمیایی Prodigiosin ۹
شکل ۱-۳ ساختار شیمیایی Violacein ۱۰
شکل ۱-۴ ساختار کیتین ۱۵
شکل ۱-۵ تقسیم بندی کیتیناز براساس نوع پیوند شکسته شده ۱۷
شکل ۱-۶ نقش باکتری های کیتینولیتیک در چرخه کربن و نیتروژن ۲۰
شکل ۲-۱ ابزارهای نمونه برداری از آب و رسوب ۲۳
شکل ۳-۱ موقعیت جغرافیایی دریای خزر و مناطق نمونه برداری ۴۵
شکل ۳-۲ تعداد جدایه های اولیه ۴۶
شکل ۳-۳ بررسی کیفی سویه ها با تشکیل هاله ۴۸
شکل ۳-۴ نمودار استاندارد GlcNAc با روش Schale ۴۹
شکل ۳-۵ نمودار استاندارد GlcNAc با روش Miller..... ۴۹
شکل ۳-۶ اندازه گیری فعالیت آنزیمی ۹ سویه اولیه ۵۰
شکل ۳-۷ منحنی رشد سویه DC ۵۱
شکل ۳-۸ منحنی رشد سویه KP6 ..... ۵۱
شکل ۳-۹ تاثیر درصد NaCl بر رشد سویه DC و تولید آنزیم ۵۲
شکل ۳-۱۰ تاثیر درصد NaCl بر رشد سویه KP6 و تولید آنزیم ۵۳
شکل ۳-۱۱ تاثیر منابع مختلف کربن بر رشد سویه DC و تولید آنزیم ۵۴
شکل ۳-۱۲ تاثیر منابع مختلف کربن بر رشد سویه KP6 و تولید آنزیم ۵۴
شکل ۳-۱۳ تاثیر منابع مختلف نیتروژن بر رشد سویه DC و تولید آنزیم ۵۵
شکل ۳-۱۴ تاثیر منابع مختلف نیتروژن بر رشد سویه KP6 و تولید آنزیم ۵۵
شکل ۳-۱۵ تاثیر درصد کیتین بر رشد سویه DC و تولید آنزیم ۵۶
شکل ۳-۱۶ تاثیر درصد کیتین بر رشد سویه KP6 و تولید آنزیم ۵۶
شکل ۳-۱۷ تاثیر pH بر رشد سویه DC و تولید آنزیم ۵۷
شکل ۳-۱۸ تاثیر pH بر رشد سویه KP6 و تولید آنزیم ۵۸
شکل ۳-۱۹ تاثیر درصد تلقیح بر رشد سویه DC و تولید آنزیم ۵۹
شکل ۳-۲۰ تاثیر درصد تلقیح بر رشد سویه KP6 و تولید آنزیم ۵۹
شکل ۳-۲۱ تاثیر دما بر رشد سویه DC و تولید آنزیم ۶۰
شکل۳-۲۲ تاثیر دما بر رشد سویه KP6 و تولید آنزیم ۶۰

شکل ۳-۲۳ تاثیر یون Ca^{2+} بر رشد سویه DC و تولید آنزیم ۶۱
شکل ۳-۲۴ تاثیر یون Ca^{2+} بر رشد سویه KP6 و تولید آنزیم..... ۶۲
شکل ۳-۲۵ تاثیر یون Mg^{2+} بر رشد سویه DC و تولید آنزیم ۶۲
شکل ۳-۲۶ تاثیر یون Mg^{2+} بر رشد سویه KP6 و تولید آنزیم ۶۳
شکل ۳-۲۷ تاثیر یون Zn^{2+} بر رشد سویه DC و تولید آنزیم ۶۳
شکل ۳-۲۸ تاثیر یون Zn^{2+} بر رشد سویه KP6 و تولید آنزیم ۶۴
شکل ۳-۲۹ تاثیر یون Cu^{2+} بر رشد سویه DC و تولید آنزیم ۶۴
شکل ۳-۳۰ تاثیر یون Cu^{2+} بر رشد سویه KP6 و تولید آنزیم ۶۵
شکل ۳-۳۱ تاثیر یون Mn^{2+} بر رشد سویه DC و تولید آنزیم ۶۵
شکل۳-۳۲ تاثیر یون Mn^{2+} بر رشد سویه KP6 و تولید آنزیم ۶۶
شکل ۳-۳۳ تاثیر برهمکنش دو فاکتور دما و pH بر فعالیت آنزیم در سویه DC ۷۱
شکل ۳-۳۴ تاثیر برهمکنش دو فاکتور دما و pH بر فعالیت آنزیم در سویه KP6 ..... ۷۱
شکل ۳-۳۵ تاثیر بر همکنش دو فاکتور دما و کیتین بر فعالیت آنزیم در سویه DC ۷۲
شکل ۳-۳۶ تاثیر بر همکنش دو فاکتور دما و درصد کیتین بر فعالیت آنزیم در سویه KP6 ..... ۷۲
شکل ۳-۳۷ تاثیر برهمکنش دو فاکتور pH و درصد کیتین بر فعالیت آنزیم در سویه DC ۷۳
شکل ۳-۳۸ تاثیر برهمکنش دو فاکتور pH و درصد کیتین بر فعالیت آنزیم در سویه KP6 ..... ۷۳
شکل ۳-۳۹ تاثیر بر همکنش دو فاکتور دما و درصد NaCl بر فعالیت آنزیم در سویه DC ۷۴
شکل ۳-۴۰ تاثیر برهمکنش دو فاکتور دما و درصد NaCl بر فعالیت آنزیم در سویه KP6 ..... ۷۴
شکل ۳-۴۱ تاثیر برهمکنش دو فاکتور pH و درصد NaCl بر فعالیت آنزیم در سویه DC ۷۵
شکل ۳-۴۲ تاثیر بر همکنش دو فاکتور pH و درصد NaCl بر فعالیت آنزیم در سویه KP6 ..... ۷۵
شکل ۳-۴۳ تاثیر بر همکنش دو فاکتور درصد کیتین و NaCl بر فعالیت آنزیم در سویه DC ۷۶
شکل ۳-۴۴ تاثیر بر همکنش دو فاکتور درصد کیتین و NaCl بر فعالیت آنزیم درسویه KP6 ..... ۷۶
شکل ۳-۴۵ نمودار بهینه سازی پیش بینی شده توسط نرم افزار برای سویه DC ۷۷
شکل ۳-۴۶ نمودار بهینه سازی پیش بینی شده توسط نرم افزار برای سویه KP6..... ۷۸
شکل ۳-۴۷ بررسی رابطه رشد و تولید آنزیم توسط سویه DC ۷۹
شکل ۳-۴۸ بررسی رابطه رشد و تولید آنزیم توسط سویه KP6 ..... ۷۹
شکل ۳-۴۹ بررسی رابطه رشد و تولید آنزیم بر کیتین میگو توسط سویه DC ۸۰
شکل ۳-۵۰ بررسی رابطه رشد و تولید آنزیم بر کیتین میگو توسط سویه KP6 ..... ۸۰
شکل ۳-۵۱ نمودار بردفورد ۸۱
شکل ۳-۵۲ ژل SDS-PAGE ۸۲
شکل ۳-۵۳ اثر دما بر فعالیت آنزیم DC ۸۳

شکل ۳-۵۴ اثر دما بر فعالیت آنزیم KP6 ..... ۸۳
شکل ۳-۵۵ اثر pH بر فعالیت آنزیم DC ۸۴
شکل ۳-۵۶ اثر pH بر فعالیت آنزیم KP6 ..... ۸۴
شکل ۳-۵۷ اثر یون های فلزی بر فعالیت آنزیم DC ۸۵
شکل ۳-۵۸ اثر یون های فلزی بر فعالیت آنزیم KP6 ..... ۸۵
شکل ۳-۵۹ ژل استخراج DNA ژنومی سویه های منتخب ۸۶
شکل ۳-۶۰ ژل 16S rRNA تکثیر شده در سویه های منتخب ۸۷
شکل ۳-۶۱ بررسی رابطه تکاملی سویه های منتخب با سویه های به دست آمده از پایگاه اطلاعاتی EzTaxon و NCBI
با الگوریتم Neighbour-joining..... ۸۹

فصل اول

کلیات

۱-۱ مقدمه

اقیانوس ها با ۳۶۱ میلیون کیلومتر مربع خط ساحلی و ذخیره آبی ۱۳۷ میلیون کیلومتر مکعب (٪۹۷ آب کره) به عنوان بزرگترین اکوسیستم در زمین در نظر گرفته شده‌اند. متوسط عمق آن ۳۷۰۰ متر و عمیق‌ترین نقطه آن حدود ۱۱۰۰۰ متر در اقیانوس آرام غربی به نام گودال ماریانا می‌باشد. قلمرو دریایی حدود ٪۷۱ سطح زمین را به خود اختصاص داده‌است و از میلیون‌ها سال پیش، به عنوان منشا زندگی در زمین درنظر گرفته شده است و شامل اشکال مختلف زندگی به ویژه اشکال میکروسکوپی می‌باشد (Surajit *et al*. 2006). اکوسیستم دریایی، یکی از غنی ترین محیط ها از نظر تنوع پروکاریوتی است به طوری که فراوانی آن‌ها $۳/۵ \times ۱۰^{۳۵}$ باکتری در سطوح آبی اقیانوس ها برآورد شده است. این باکتری‌ها نقش مهمی در حیات میکروارگانیسم های دیگر دارند (Souza *et al*. 2011).

تکامل میکروارگانیسم‌ها را وادار می کند تا سیستم های آنزیمی گوناگونی برای سازگاری با محیط های پیچیده تولید کنند. بنابراین آنزیم های میکروارگانیسم های دریایی می توانند به عنوان بیوکاتالیست های جدید با ویژگی‌های فوق‌العاده درنظر گرفته شوند. آنزیم ها می‌توانند از گیاهان، جانوران و میکروارگانیسم ها جداسازی شوند اما در این میان میکروارگانیسم ها به علت تنوع بیوشیمیایی وسیع، امکان کشت انبوه، آسانی دستکاری ژنتیکی و پایداری بیشتر نسبت به مشتقات گیاهی و جانوری، بر دیگر موجودات زنده برتری دارند (Chen *et al*. 2010).

در مقایسه با محیط های خاکی، محیط های دریایی شامل میکروارگانیسم هایی با ساختار ژنتیکی و محیط زندگی بی نظیر می باشند. پیچیدگی محیط های دریایی شامل شوری بالا، فشار بالا، دمای پایین و موقعیت های نوری خاص تفاوت چشمگیری را بین ترکیبات تولید شده توسط میکروارگانیسم های دریایی و خاکی ایجاد نموده است (Trincone 2011).

۱-۲ بیوتکنولوژی دریا

پیشرفت ها در قرن اخیر باعث ایجاد شاخه ای در بیوتکنولوژی به نام بیوتکنولوژی دریایی[1] یا بیوتکنولوژی آبی[2] شده است. تعریفی که برای این تکنولوژی ارائه شده شامل: کشف توانایی ارگانیسم های دریایی در سطح سلولی و مولکولی برای حل مشکلات موجود، یا تولید محصولات جدید، می باشد. در حقیقت بخش اعظمی از موجودات دریایی (به خصوص میکروارگانیسم ها) هنوز ناشناخته باقی مانده اند که به تدریج در حال شناسایی می‌باشند و این در حالی است که هزاران ترکیب شیمیایی منحصر به فرد تنها از تعداد کمی از این موجودات به دست آمده است.

از آنجایی که با استفاده از تکنیک‌های مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی می‌توان نسبت به تولید محصولات صنعتی ،پزشکی ،کشاورزی و ... با کیفیت و کمیت بهتر و قیمت ارزانتر اقدام نمود، و از طرفی دریاها از پتانسیل زیادی در این زمینه برخوردار می‌باشند، استفاده از روش های بیوتکنولوژی می‌تواند نیازهای زیادی را برطرف نماید. با کمک بیوتکنولوژی می‌توان از موجودات دریایی مانند جلبک ها، باکتری ها، اسفنج ها، ماهی‌ها و مرجان ها به طور مستقیم و یا غیر مستقیم استفاده نمود.

۱-۳ کاربردهای بیوتکنولوژیک میکروارگانیسم های دریا

۱-۳-۱ آنزیم های هیدرولازی

باکتری‌های دریایی منبع با ارزشی برای تولید مواد شیمیایی و آنزیم‌های مختلف می‌باشند. از آنجایی که باکتری‌های دریایی در میزان نسبتا بالایی از نمک زندگی می‌کنند آنزیم هایی از آن ها استخراج شده است که کاربرد صنعتی دارند. با ظهور بیوتکنولوژی، مهندسی آنزیم و معرفی تکنولوژی های نوظهور دیگر، فهم کافی برای به‌کارگیری کارآمد تنوع زیستی میکروارگانیسم های دریایی در جهت تولید آنزیم های جدید به وجود آمده است. میکروارگانیسم های دریایی به عنوان منبعی برای آنزیم های جدید

1- Maeine Biotechnology
2- Blue Biotechnology

توجهات زیادی را به خود جلب کرده اند، زیرا آنزیم های میکروبی نسبت به مشتقات گیاهی و جانوری پایدارتر و فعال تر هستند (Zhang *et al*. 2010).

۱-۳-۱-۱ پروتئاز

پروتئازها بیش از ٪۶۰ آنزیم های مورد استفاده در صنعت را به خود اختصاص داده اند. از این آنزیم ها در صنعت دترجنت، صنعت چرم و برای کاربردهای دارویی مانند داروهای گوارشی و ضد التهاب استفاده می شود. پروتئازهای تولید شده در برخی از این باکتری ها در شوینده ها و پاک کننده‌ها بکار می‌روند. به عنوان مثال گونه‌های جنس *Vibrio* ، پروتئازهای خارج سلولی تولید می‌کنند که این خصوصیت را دارا می‌باشد. *Vibrio alginolyticus*، ۶ نوع پروتئاز ایجاد می‌کند که یکی از آن ها به شوینده ها مقاوم می‌باشد. همچنین از این باکتری آنزیم کولاژناز تولید شده که مصرف صنعتی و تجاری زیادی داشته و برای جداسازی سلول ها از یکدیگر در مطالعات کشت سلولی بکار می‌رود.

۱-۳-۱-۲ لیپاز

لیپاز جزء آنزیم هایی است که در همه جا موجود است و با تجزیه ی چربی و روغن باعث آزاد شدن اسید چرب، دی آسیل گلیسرول، مونوگلیسرول و گلیسرول می شود. لیپاز های میکروبی به عنوان تولیدات تجاری، استفاده در دترجنت ها، تولید کاغذ، وسایل آرایشی، طعم دهنده ی غذا، سنتز مواد آلی و کاربرد های صنعتی دیگر دخالت دارند. لیپازها بیوکاتالیست های مهمی هستند چون تحت موقعیت های معتدل، فعال هستند و در حلال های آلی بسیار پایدارند و اختصاصیت سوبسترایی بالایی را نشان می دهند.

۱-۳-۱-۳ آمیلاز

آمیلاز آنزیمی است که باعث شکسته شدن نشاسته به قندهای ساده تر مانند گلوکز، مالتوز و دکسترین می شود. این آنزیم ها به سه گروه α، β و γ تقسیم می شوند که فرم γ برخلاف دو گروه دیگر به محیط های اسیدی تمایل دارد. این آنزیم ها کاربرد صنعتی وسیعی دارند که از آن جمله می توان به تولید نوشیدنی های الکلی، شوینده ها، دترجنت ها، در صنعت نشاسته، تولید شیره قند و ... اشاره کرد.

۱-۳-۱-۴ آگاراز

آگار نوعی پلی ساکارید هتروژن است که کاربرد وسیعی در صنعت غذا دارد که از آن در مشروبات، تولید نان و غذاهای کم کالری استفاده می شود. ژاپنی ها از آگار اولیگوساکارید به عنوان مرطوب‌کننده ی افزودنی آرایشی استفاده می کنند. میکروارگانیسم های تجزیه کننده ی آگار به دو گروه تقسیم می‌شوند:

- باکتری هایی که آگار را نرم می کنند.
- باکتری هایی که آگار را ذوب می کنند.

تاکنون محققان این آنزیم را در گونه های فراوانی از جنس های: *Streptomyces, Cytophaga, Vibrio، Bacillus، Alteromonas ، Pseudoalteromonas* جدا کرده اند.

۱-۳-۱-۵ کاراژیناز

کاراژینان و کاراژینین، خانواده ای از پلی‌ساکارید های سولفاته خطی هستند که از جلبک دریایی قرمز استخراج می‌شوند. ٪۸۰ از این پلی‌ساکارید ها در صنایع غذایی و وابسته به آن استفاده می شوند و می توان به عنوان لخته کننده، پایدارکننده و امولسیون کننده استفاده شوند. علاوه بر این به طور وسیعی در صنایع دارویی و آرایشی کاربرد دارند. اولیگو ساکارید های به دست آمده از تجزیه کاراژینان تنوع وسیعی از ویژگی های فیزیولوژیکی خاص مانند فعالیت ضد ویروسی، ضد توموری، ضد کوآگولاسیون و غیره را از

خود نشان می دهند. *Pseudomonas*، *Cytophaga* و *Alteromonas* از جمله میکروارگانیسم هایی هستند که این آنزیم در آنها یافت شده است.

۱-۳-۱-۶ سلولاز

سلولز ترکیبی آلی با فرمول $(C_6H_{10}O_6)_n$ می باشد که از صد تا بیش از ده هزار واحد D-گلوکز با پیوند β1→4 تشکیل شده است. سلولز فراوان ترین پلی ساکارید در طبیعت است و حدود ٪۵۰ ماده موجود در گیاه را تشکیل می دهد. تجزیه سلولز فرآیندی است که طی آن سلولز به پلی ساکاریدهای کوچکتر به نام سلودکسترین شکسته می شود. چون مولکول های سلولز به طور قوی به هم متصل هستند فرآیند لیز آن در مقایسه با پلی ساکارید های دیگر مشکل است.

باکتری هایی که توانایی تولید این آنزیم را دارند شامل: *Cytophaga, Cellulomonas*, *Vibrio,* *Clostridium, Nocardia, Streptomyces*، *Trichoderma* می باشند. از قارچ ها می توان به *Penicillium*، *Aspergillus, Fusarium, Chaetomium, Phoma, Sporotrichum* اشاره کرد. سلولازها در پردازش کود زیستی نیز استفاده می شوند. با توسعه ی سریع صنعت جلبک دریایی، توده فاضلابی که به محیط آزاد می شود، آلودگی های زیادی را به دنبال دارند. سلولازها با تجزیه ی این آلودگی ها به قطعات کوچک باعث جذب آسان آنها به عنوان کود زیستی در گیاهان می شوند.

۱-۳-۲ کاربردهای پزشکی

تولیدات دارویی بی مهرگان دریایی، جلبک ها و باکتری ها نسبت به موجودات خشکی زی متنوع تر می‌باشند. تاکنون بیش از ۲۰۰۰ ترکیب که خواص آنتی بیوتیکی، ضد سرطانی، ضد مالاریایی و ... دارند با استفاده از بیوتکنولوژی از این موجودات به‌دست آمده است.