بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه اصفهان
دانشکده علوم
گروه زیست شناسی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته ی زیست شناسی- میکروبیولوژی

جداسازی و شناسایی مخمرهای تولید کننده لیپاز

استادان راهنما:
دکتر ایرج نحوی
دکتر سید حمید زرکش اصفهانی

استاد مشاور:
مهران میراولیایی

پژوهشگر:
لادن مفاخر

اردیبهشت ماه ۱۳۸۹

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و
نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه
متعلق به دانشگاه اصفهان است.

دانشگاه اصفهان
دانشکده علوم
گروه زیست شناسی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته ی زیست شناسی- میکروبیولوژی
خانم لادن مفاخر تحت عنوان

جداسازی و شناسایی مخمرهای تولید کننده لیپاز

در تاریخ ۱۳۸۹/۲/۱۵ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه عالی به تصویب نهایی رسید.

۱- استاد راهنمای پایان نامه دکتر ایرج نحوی با مرتبه ی علمی استاد — امضا

۲- استاد راهنمای پایان نامه دکتر سید حمید زرکش اصفهانی با مرتبه ی علمی استادیار — امضا

۳- استاد مشاور پایان نامه دکتر مهران میراولیایی با مرتبه ی علمی استادیار — امضا

۴- استاد داور داخل گروه دکتر رسول روغنیان با مرتبه ی علمی استادیار — امضا

۵- استاد داور خارج از گروه دکتر بهرام نصر اصفهانی با مرتبه ی علمی استادیار — امضا

امضای مدیر گروه

۸۹/۴/۱۲

چکیده:

آنزیم لیپاز از خانواده آسیل هیدرولازها است. این آنزیم قادر به شکستن و تجزیه تری‌گلیسیریدها و تبدیل آنها به اسید چرب و گلیسرول می‌باشد. همین امر باعث شده که این آنزیم در صنایع مختلفی مانند مواد غذایی، آرایشی و بهداشتی، تجزیه زیستی، پزشکی، صنایع شیمیایی و صنایع شوینده‌ها و ... کاربرد داشته باشد.

آنزیم لیپاز را می‌توان از منابع گیاهی، جانوری و میکروارگانیسم‌ها تهیه کرد. با توجه به کاربرد وسیع این آنزیم, استفاده از منابع گیاهی و حیوانی مقرون به صرفه نبوده و از این رو استفاده از میکروارگانیسم‌ها در صدر قرار می‌گیرد. تولید آنزیم لیپاز در میکروارگانیسم‌ها از گستردگی خوبی برخوردار بوده و سه دسته مهم شامل باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها قادر به تولید آن هستند. از میان میکروارگانیسم‌ها نیز مخمرها به عنوان منبعی برای تولید لیپاز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند چرا که مخمرها اغلب بیماری زا نبوده و استفاده از آنها در صنایع مختلف مانند مواد غذایی و دارویی برای انسان مشکلی به همراه نخواهد داشت.

مطالعه بر روی مخمرهای تولید کننده لیپاز بسیار پراکنده است. از جمله مهمترین مخمرهای تولیدکننده لیپاز می‌توان *Yarrowia lipolytica* و *Candida rugosa* را نام برد. هم اکنون لیپاز *Candida rugosa* در صنعت تولید شده و به صورت تجاری موجود است. با توجه به مطالب گفته شده و اهمیت تولید لیپاز از مخمرها و اینکه تاکنون در ایران بررسی بر روی اکولوژی و پراکندگی مخمرهای تولید کننده لیپاز صورت نگرفته و در سطح جهان نیز اطلاعات اندک و پراکنده‌ای بر روی تولید لیپاز از مخمرها وجود دارد و بیشتر اطلاعات بر روی باکتری ها معطوف شده است, در این تحقیق به بررسی و جداسازی مخمرهای تولید کننده لیپاز از مناطق گوناگونی همچون تصفیه‌خانه پساب, کشتارگاه‌ها و کارخانه روغن و سایر مناطق پرداخته شده است. پس از غربالگری, بهترین مخمرهای تولید کننده لیپاز را از نظر تاثیر ترکیبات مختلف محیط کشت لیپاز که بر روی میزان تولید لیپاز موثرند مانند نوع منبع نیتروژنی و کربنی و غلظت آنها, عناصر کم مقدار, نمک‌های کلرید کلسیم و سولفات منیزیم و همچنین تولید پروتئاز به منظور بهینه‌سازی تولید لیپاز آنها مورد سنجش قرار گرفت .

از میان مخمرهای لیپولیتیک جداسازی شده بهترین مخمر لیپولیتیک که قادر به تولید لیپاز نسبتا خوبی به میزان ۱۳/۳U/ml در مقایسه با سویه استاندارد *Yarrowia lipolytica* DSM3286 که ۱۹/۴U/ml می‌باشد, جداسازی گردید که پس از مراحل بهینه سازی این سویه در محیط حاوی ۵g/l آرد سویا به عنوان منبع نیتروژنی و ۱۵g/l روغن زیتون قادر به تولید ۲۱/۳U/ml لیپاز در مقایسه با محیط کشت پایه تولید لیپاز که ۱۳/۳U/ml می‌باشد, گردید و میزان تولید لیپاز آن افزایش یافت. هم‌چنین اضافه کردن عناصر کم مقدار, نمکهای کلرید کلسیم, سولفات منیزیم و هم‌چنین مهارکننده پروتئاز (EDTA) به منظور مهار تولید آنزیم پروتئاز و افزایش تولید آنزیم لیپاز تاثیر منفی بر روی تولید لیپاز در این سویه را داشتند.

پس از بهینه سازی تولید لیپاز این سویه مخمری جداسازی شده, با استفاده از دو روش بیوشیمیایی و مولکولی سویه مخمری مورد شناسایی قرار گرفت. پس از شناسایی با هر دو روش مشخص شد که این سویه *Candida galli* است که برای اولین بار در ایران جداسازی گردیده است.

کلمات کلیدی: لیپاز, مخمرهای لیپولیتیک, جداسازی, بهینه‌سازی, شناسایی

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه

۱-۱- تعریف آنزیم ۱

۱-۲- تعیین فعالیت کاتالیتکی آنزیم ۱

۱- ۳- طبقه‌بندی آنزیم‌ها ۲

۱-۴- بیوتکنولوژی و تولید آنزیم ۲

۱-۵- آنزیم‌های تولید شده در سطح صنعتی ۳

۱-۶- آنزیم لیپاز ۳

۱-۷- انواع واکنش‌های لیپاز ۴

۱-۸- ایزوآنزیم‌های لیپاز ۷

۱-۹- مزیت استفاده از لیپاز در صنعت ۷

۱-۱۰- منابع تولیدکننده لیپاز ۸

۱-۱۱- مزیت تولید لیپاز میکروبی ۸

۱-۱۲- میکروارگانیسم‌های تولید کننده آنزیم لیپاز ۹

۱-۱۲-۱- مخمرهای تولید کننده لیپاز ۹

۱-۱۲-۱-۲- جنس *Candida* ۱۱

۱-۱۲-۱-۲-۱- *Candida rugosa* ۱۱

۱-۱۲-۱-۲-۲- *Yarrowia lipolytica* ۱۲

۱-۱۲-۲- جداسازی مخمرهای تولید کننده لیپاز ۱۴

۱-۱۳- تاریخچه تولید آنزیم لیپاز توسط مخمرها ۱۴

۱-۱۴- ساختمان سه بعدی آنزیم لیپاز ۱۵

۱-۱۵- مکانیسم عمل آنزیم لیپاز ۱۷

۱-۱۶- مکانیسم تنظیم بیان ژن لیپاز ۱۷
۱-۱۷- عوامل موثر بر روی تولید آنزیم لیپاز ۱۸
۱-۱۸- خالص‌سازی آنزیم لیپاز ۱۹
۱-۱۹- تثبیت آنزیم لیپاز ۱۹

عنوان **صفحه**

أ

۱-۲۰- روش‌های سنجش لیپاز ۲۰
۱-۲۰ -۱- روش‌های سنجش کیفی لیپاز ۲۰
۱-۲۰-۱-۱- روش تغییرات ظاهری سوبسترا ۲۰
۱-۳۰-۱-۲- روش استفاده از رنگ ۲۰
۱-۲۰-۱-۳- روش استفاده از رنگ‌های فلورسنتی ۲۱
۱-۲۰-۲- روش‌های سنجش کمّی لیپازها ۲۱
۱-۲۰-۲-۱- روش تیتراسیون ۲۲
۱-۲۰-۲-۲- روش رنگ سنجی ۲۲
۱-۲۰-۲-۲-۱- واکنش صابونی شدن ۲۲
۱-۲۰-۲-۲-۲- روش رنگ سنجی توسط رودامین 6G ۲۳
۱-۲۰-۲-۲-۳- سنجش لیپاز با سوبستراهای سنتزی ۲۳
۱-۲۰-۲-۲-۴- سایر سوبستراهای سنتزی جدید لیپاز ۲۳
۱-۲۰-۲-۲-۵- سنجش لیپاز با سوبستراهای فلورسنت ۲۴
۱-۲۰-۲-۲-۶- روش کدورت سنجی ۲۴
۱-۲۰-۲-۲-۷- روش کروماتوگرافی ۲۴
۱-۲۰-۲-۲-۷-۱- روش کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا ۲۵
۱-۲۰-۲-۲-۷-۲- روش کروماتوگرافی گازی ۲۵
۱-۲۰-۲-۲-۸- روش سنجش کشش سطحی ۲۶
۱-۲۰-۲-۲-۹- روش سنجش با کیت تجاری ۲۶
۱-۲۰-۲-۲-۱۰- سنجش به روش ایمونواسی ۲۶
۱-۲۱- کاربرد آنزیم لیپاز ۲۷
۱-۲۱-۱- صنایع شوینده ۲۷
۱-۲۱-۲- کاربرد در صنایع غذایی ۲۷

۱-۲۱-۳- کاربرد در صنعت شکلات سازی..... ۲۸
۱-۲۱-۴- کاربرد در صنایع لبنی..... ۱
۱-۲۱-۵- تولید اسیدهای چرب غیر اشباع..... ۲۹
۱-۲۱-۶- کاربرد در صنعت کاغذ سازی..... ۲۹

عنوان **صفحه**

۱-۲۱-۷- کاربرد در پزشکی..... ۳۰
۱-۲۱-۸- کاربرد آنزیم لیپاز به عنوان بیوسنسور..... ۳۰
۱-۲۱-۹- کاربرد آنزیم لیپاز در تصفیه پساب..... ۳۱
۱-۲۱-۱۰- کاربرد آنزیم لیپاز در تصفیه زیستی..... ۳۲
۱-۲۱-۱۱- کاربرد در صنایع چرم سازی..... ۳۲
۱-۲۱-۱۲- کاربرد در صنایع داروسازی..... ۳۳
۱-۲۲- اهداف تحقیق..... ۳۵

فصل دوم: مواد و روشها

۲-۱- مواد و وسایل مورد نیاز..... ۳۶
۲-۱-۱- مواد..... ۳۶
۲-۱-۲- وسایل..... ۳۸
۲-۲- روش تهیه‌ی برخی از محیطهای کشت مورد استفاده..... ۴۰
۲-۲-۱- محیط کشت گلوکز کلرامفنیکل آگار..... ۴۰
۲-۲-۲- محیط کشت‌های مورد استفاده به منظور غربالگری مخمرهای لیپاز مثبت..... ۴۰
۲-۲-۲-۱- محیط کشت جامد..... ۴۰
۲-۲-۲-۱-۱- محیط کشت تری‌بوتیرین..... ۴۰
۲-۲-۲-۱-۲- محیط کشت رودامین B..... ۴۰
۲-۲-۲-۲- محیط کشت مایع به منظور غربالگری مخمرهای تولید کننده لیپاز از محیط..... ۴۱
۲-۲-۳- محیط کشت تولید لیپاز..... ۴۱
۲-۲-۴- محیط‌های کشت مورد استفاده به منظور شناسایی مخمرها..... ۴۲
۲-۲-۴-۱- محیط کشت یست نیتروژن (YNB) عاری از کربن..... ۴۲
۲-۲-۴-۲- - محیط کشت شناسایی جذب قندها در مخمرها..... ۴۳

۲-۲-۴-۳- محیط شناسایی تست‌های تخمیری هیدرات کربن ۴۳
۲-۲-۵- محیط کشت خالص‌سازی و نگهداری مخمرها ۴۳
۲-۳- جداسازی مخمرهای تولیدکننده لیپاز ۴۴
۲-۳-۱- منابع جداسازی مخمرهای تولید کننده لیپاز ۴۴

عنوان **صفحه**

ت

۲-۳-۲- نحوه نمونه‌گیری از مناطق , تولید کننده لیپاز ۴۴
۲-۳-۲-۱- نمونه‌گیری از کارخانه ناز گل اصفهان ۴۴
۲-۳-۲-۲- نمونه‌گیری از پساب تصفیه خانه جنوب اصفهان و اهواز ۴۴
۲-۳-۲-۳- نمونه‌گیری از کشتارگاه اهواز ۴۵
۲-۳-۲-۴- نمونه‌گیری از آب خلیج فارس آلوده به نفت ۴۵
۲-۳-۲-۵- نمونه‌گیری از سایر مناطق ۴۵
۲-۳-۳- روش نمونه‌گیری و کشت ۴۵
۲-۴- خالص‌سازی مخمرهای جداسازی شده ۴۶
۲-۵- نگهداری مخمرهای جداسازی شده و خالص‌سازی شده ۴۶
۲-۶- غربالگری مخمرهای جداسازی شده ۴۷
۲-۷- محیط کشت تولید لیپاز ۴۷
۲-۸- روش تلقیح ۴۸
۲-۹- روش نمونه‌برداری ۴۸
۲-۱۰- اندازه‌گیری وزن خشک ۴۸
۲-۱۱- اندازه‌گیری و سنجش فعالیت آنزیم لیپاز ۴۸
۲-۱۱-۱- اندازه‌گیری به روش اسپکتروفتومتری ۴۸
۲-۱۱-۱-۱- طرز تهیه بافر فسفات ۴۹
۲-۱۱-۱-۲- آماده‌سازی سوبسترای پارانیتروفنل ۴۹
۲-۱۱-۱-۳- روش کار ۴۹
۲-۱۱-۱-۴- تهیه منحنی استاندارد برحسب غلظت‌های مختلف پارانیتروفنل ۵۰
۲-۱۱-۲- سنجش فعالیت آنزیم توسط روش تیتراسیون ۵۱
۲-۱۱-۲-۱- سوبسترا ۵۲
۲-۱۱-۲-۱-۱- طرز تهیه سوبسترا ۵۲

۲-۱۱-۲-۲- بافر فسفات ۵۲
۲-۱۱-۲-۳- معرف فنل فتالئین ۵۳
۲-۱۱-۲-۴- محلول بازدارنده ۵۳
۲-۱۱-۲-۵- هیدروکسید سدیم ۵۳

عنوان **صفحه**

۲-۱۱-۲-۵-۱- روش استاندارد کردن ۵۳
۲-۱۱-۲-۵-۱-۱- تهیه غلظت هیدروکسید سدیم مورد نیاز ۵۳
۲-۱۱-۲-۵-۱-۲-KHP ۵۳
۲-۱۱-۲-۵-۱-۳- محلول فنل فتالئین ۵۴
۲-۱۱-۲-۵-۲- روش کار ۵۴
۲-۱۱-۲-۵-۳- روش سنجش فعالیت آنزیم لیپاز به روش تیتراسیون ۵۵
۲-۱۲- بهینه‌سازی تولید لیپاز ۵۶
۲-۱۲-۱- اثر منابع کربنی ۵۶
۲-۱۲-۱-۱- انواع منابع کربنی ۵۶
۲-۱۲-۱-۲- غلظت‌های مختلف منبع کربنی ۵۶
۲-۱۲-۲- انواع منابع نیتروژنی ۵۶
۲-۱۲-۲-۱- بررسی انواع منابع نیتروژنی مختلف ۵۷
۲-۱۲-۲-۲- بررسی غلظت‌های مختلف منبع نیتروژنی ۵۷
۲-۱۲-۳- اثر غلظت‌های مختلف عناصر کم مقدار در تولید آنزیم لیپاز ۵۷
۲-۱۲-۴- بهینه‌سازی غلظت بافرینگ محیط کشت تولید لیپاز ۵۸
۲-۱۲-۵- بهینه‌سازی غلظت کلرید کلسیم ۵۸
۲-۱۲-۶- بهینه‌سازی غلظت منیزیم ۵۸
۲-۱۳-۷- سنجش فعالیت پروتئاز ۵۸
۲-۱۳-۷-۱- سنجش کیفی آنزیم پروتئاز ۵۸
۲-۱۳-۷-۲- سنجش کمّی پروتئاز ۵۹
۲-۱۳-۷-۲-۱- روش کار ۵۹
۲-۱۳-۷-۲-۲- تهیه منحنی استاندارد شدت دانسیته نوری برحسب مقدار L -تیروزین ۶۰
۲-۱۳-۷-۳- مهارآنزیم پروتئاز ۶۲

۲-۱۴- شناسایی مخمرهای تولید کننده لیپاز ۶۳
۲-۱۴-۱- شناسایی مخمر براساس تست‌های بیوشیمیایی ۶۳
۲-۱۴-۲- شناسایی مخمرها به روش مولکولی ۶۵
۲-۱۴-۲-۱- استخراج DNA ۶۵

۲-۱۴-۲-۱-۱- روش کار ۶۵
۲-۱۴-۲-۱-۲- بافر لیزکننده ۶۷
۲-۱۴-۲-۱-۳- بافر TE ۶۸
۲-۱۴-۲-۱-۴- فنل-کلروفورم-ایزو آمیل الکل ۶۸
۲-۱۴-۲-۲- روش کار انجام PCR ۶۸
۲-۱۴-۲-۳- الکتروفورز ۶۹
۲-۱۴-۲-۳-۲- روش کار الکتروفورز ۶۹
۲-۱۵- بررسی روش‌های آماری و رسم نمودار ۷۱

فصل سوم: نتایج و مشاهدات

۳-۱- نمونه‌گیری و جداسازی مخمرهای لیپاز مثبت ۷۲
۳-۱-۱- نمونه‌گیری از کارخانه ناز گل اصفهان ۷۲
۳-۱-۲- نمونه‌گیری از پساب تصفیه خانه جنوب اصفهان و اهواز ۷۳
۳-۱-۳- نمونه‌گیری از کشتارگاه اهواز ۷۳
۳-۱-۴- نمونه‌گیری از آب خلیج فارس آلوده به نفت ۷۳
۳-۱-۵- نمونه‌گیری از سایر مناطق ۷۳
۳-۲- غربالگری مخمرهای لیپاز مثبت ۷۳
۳-۳- سنجش کمّی بهترین مخمرهای لیپاز مثبت غربالگری شده ۷۷
۳-۴- بهینه‌سازی تولید آنزیم لیپاز ۷۹
۳-۴-۱- بهینه‌سازی منبع نیتروژنی برای تولید آنزیم لیپاز ۷۹
۳-۴-۱-۱- بررسی فعالیت لیپاز در محیط‌های حاوی منابع نیتروژنی مختلف به روش اسپکتروفتومتر ۸۰
۳-۴-۱-۲- بررسی میزان وزن خشک سلولی تولید شده در محیط‌های حاوی انواع منابع نیتروژنی ۸۴
۳-۴-۲- بررسی تولید لیپاز در منابع کربنی مختلف ۸۷

۳-۴-۲-۱- بررسی میزان تولید آنزیم لیپاز به روش اسپکتروفتومتری..... ۸۷
۳-۴-۲-۲- بررسی تولید وزن خشک سلولی در منابع کربنی مختلف..... ۸۹
۳-۴-۳- بررسی تاثیر عناصر کم مقدار بر روی تولید آنزیم لیپاز ۹۱
۳-۴-۳-۱- بررسی تولید لیپاز در محیط حاوی عناصر کم مقدار ۹۲

عنوان ح **صفحه**

۳-۴-۳-۲- بررسی تولید وزن خشک سلولی در محیط حاوی عناصر کم مقدار ۹۳
۳-۴-۴-بررسی غلظت‌های مختلف منابع نیتروژنی بهینه شده ۹۳
۳-۴-۵- بررسی غلظت‌های مختلف روغن زیتون..... ۹۷
۳-۴-۶- بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف بافر بر روی تولید لیپاز ۹۸
۳-۴-۷- بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف کلرید کلسیم بر روی تولید لیپاز ۱۰۲
۳-۴-۸- بررسی غلظت‌های مختلف سولفات منیزیم بر روی میزان تولید لیپاز..... ۱۰۳
۳-۴-۹- بررسی میزان تولید آنزیم پروتئاز..... ۱۰۵
۳-۴-۹-۱- بررسی میزان تولید آنزیم پروتئاز به صورت کیفی ۱۰۵
۳-۴-۹-۲- بررسی کمّی تولید پروتئاز..... ۱۰۶
۳-۴-۱۰- مهار تولید آنزیم پروتئاز توسط EDTA..... ۱۰۸
۳-۵ - بررسی بهینه‌سازی تولید لیپاز با روش تیتراسیون..... ۱۰۹
۳-۶- رسم نمودار رشد سویه ۲۰۳ ..... ۱۱۰
۳-۷- شناسایی مخمر ۱۱۱
۳-۷-۱- شناسایی براساس خصوصیات مورفولوژیکی و میکروسکوپی..... ۱۱۱
۳-۷-۲- شناسایی مخمرها براساس خصوصیات بیوشیمیایی..... ۱۱۲
۳-۷-۳- شناسایی مولکولی مخمر..... ۱۱۳

فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری

۴-۲- جداسازی مخمرهای تولید کننده لیپاز ۱۱۶
۴-۲- غربالگری کیفی سویه‌های مخمری جداسازی گردیده..... ۱۱۷
۴-۳- تاثیر منابع نیتروژنی بر روی تولید لیپاز و وزن خشک سلولی..... ۱۱۸
۴-۴- تاثیر غلظت‌های مختلف منابع نیتروژنی بر روی تولید لیپاز..... ۱۲۴
۴-۵- تاثیر منابع کربنی مختلف بر روی تولید لیپاز..... ۱۲۶

۴-۶- تاثیر غلظت‌های مختلف روغن زیتون بر روی تولید لیپاز و وزن خشک سلولی ۱۳۰
۴-۷- بررسی تاثیر عناصر کم مقدار بر روی تولید وزن خشک سلولی و لیپاز ۱۳۲
۴-۸- بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف بافری بر روی تولید لیپاز ۱۳۳
۴-۹- بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف کلرید کلسیم بر روی تولید لیپاز ۱۳۵

عنوان **صفحه**

۴-۱۰- بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف لیپاز ۱۳۶
۴-۱۱- مهار تولید آنزیم پروتئاز ۱۳۷
۴-۱۲- نمودار رشد ۱۳۹
۴-۱۳- شناسایی مخمر ۱۳۹
۴-۱۴- نتیجه گیری کلی ۱۴۰
۴-۱۵- پیشنهادات ۱۴۱
پیوست ۱ ..... ۱۴۲
منابع و مآخذ ۱۴۵

فهرست جدول ها

عنوان **صفحه**

جدول (۱-۱)مثال‌هایی از استفاده انواع لیپاز در سنتز ترکیبات دارای یک انانتیومر خاص..... ۵

جدول (۱-۲) انواع مخمرهای تولید کننده لیپاز..... ۱۰

جدول(۱-۳)لیست لیپازهای صنعتی در حال تولید از مخمرها..... ۱۵

جدول (۲-۱)ترکیبات محیط کشت مایع غربالگری به منظور جداسازی مخمرهای لیپاز مثبت..... ۴۱

جدول (۲-۲) ترکیبات محیط کشت تولید لیپاز..... ۴۱

جدول (۲-۳)ترکیبات محیط YNB..... ۴۲

جدول (۲-۴)غلظت‌های مختلف عناصر کم مقدار استفاده شده..... ۵۷

جدول (۲-۵)مواد و مقادیر مورد استفاده در PCR..... ۶۸

جدول (۲-۶)مشخصات پرایمر..... ۷۱

جدول (۳-۱)بررسی بهترین سویه‌های لیپاز مثبت بر روی دو محیط غربالگری تری بوتیرین و رودامین.... ۷۵

جدول (۳-۲)روند تغییرات pH در دو سویه ۲۰۳ و DSM3286 در ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون ۹۹

جدول (۳-۳) بررسی اثر افزودن غلظت‌های مختلف بافر بر روی میزان تنظیم pH..... ۱۰۱

جدول (۳-۴)تاثیر غلظت‌های مختلف منبع کربنی بر روی تولید پروتئاز در دو سویه ۲۰۳ و DSM3286 ..... ۱۰۶

جدول (۳-۵.) بررسی میزان پروتئاز تولید شده در غلظت‌های مختلف بافر فسفات ۱۰۷

جدول (۳-۶)تست‌های بیوشیمیایی انجام شده به منظور شناسایی مخمر لیپاز مثبت جدا گردیده..... ۱۱۳

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل (۱-۱) واکنش آنزیم لیپاز با سوبسترا ۴
شکل (۱-۲) ساختمان سه بعدی آنزیم لیپاز ۱۶
شکل (۲-۱ الف) غلظت‌های مختلف پارانیتروفنل تهیه شده ۵۱
شکل (۲-۱ ب) نمودار استاندارد رسم شده توسط نرم افزارExcel براساس غلظت‌های مختلف پارانیتروفنل ۵۱
شکل (۲-۲) منحنی استاندارد رسم شده توسط نرم افزارExcel براساس میزان‌های مختلف L-تیروزین در طول موج ۶۶۰ نانومتر ۶۱
شکل (۲-۳) منحنی استاندارد توسط نرم افزارExcel براساس میزان‌های مختلف L - تیروزین در طول موج ۲۸۰ نانومتر ۶۲
شکل (۳-۱) بررسی کیفی مخمرهای لیپاز مثبت بر روی دو محیط رودامین B و تری‌بوتیرین ۷۴
شکل (۳-۲) غربالگری کمّی بهترین سویه‌های تولید کننده لیپاز ۷۸
شکل (۳-۳) سنجش فعالیت آنزیم لیپاز تولید شده در منابع نیتروژنی مختلف در DSM3286 ..... ۸۰
شکل (۳-۴) سنجش فعالیت آنزیم لیپاز تولید شده در منابع نیتروژنی مختلف در سویه DR9 ..... ۸۰
شکل (۳-۵) سنجش فعالیت آنزیم لیپاز تولید شده در منابع نیتروژنی مختلف در سویه۲۰۳ ..... ۸۱
شکل (۳-۶) سنجش فعالیت آنزیم لیپاز تولید شده در منابع نیتروژنی مختلف در سویه۲۱۳ ..... ۸۱
شکل (۳-۷) بررسی میزان تولید لیپاز در سویه DSM3286 در محیط حاوی عصاره مخمر به دو روش اسپکتروفتومتری و تیتراسیون ۸۲
شکل (۳-۸) بررسی میزان تولید لیپاز در سویه ۲۰۳ در محیط حاوی آرد سویا به دو روش اسپکتروفتومتری و تیتراسیون ۸۳
شکل(۳-۹) بررسی میزان تولید لیپاز در سویه ۲۱۳ در محیط حاوی اوره به دو روش اسپکتروفتومتری و تیتراسیون ۸۳
شکل (۳-۱۰)تولید وزن خشک سلولی در منابع نیتروژنی درDS8M326 ..... ۸۴
شکل (۳-۱۱)تولید وزن خشک سلولی در منابع نیتروژنی در سویه DR9 ..... ۸۵
شکل(۳-۱۲)وزن خشک سلولی در منابع نیتروژنی در سویه۲۰۳ ..... ۸۵
شکل (۳-۱۳)تولید وزن خشک سلولی در منابع نیتروژنی در سویه ۲۱۳ ..... ۸۶
شکل (۳-۱۴)سنجش فعالیت آنزیم لیپاز در منابع کربنی مختلف درDSM3286 ..... ۸۷

عنوان **صفحه**

شکل (۳- ۱۵)سنجش فعالیت آنزیم لیپاز در منابع کربنی مختلف در سویه۲۰۳..... ۸۸
شکل (۳- ۱۶) سنجش فعالیت آنزیم لیپاز در منابع کربنی مختلف در سویه ۲۱۳..... ۸۸
شکل (۳-۱۷) بررسی تولید وزن خشک سلولی در منابع کربنی مختلف درDSM3286 ..... ۸۹
شکل (۳-۱۸) بررسی تولید وزن خشک سلولی در منابع کربنی مختلف در سویه ۲۰۳..... ۹۰
شکل (۳-۱۹) بررسی تولید وزن خشک سلولی در منابع کربنی مختلف در سویه ۲۱۳..... ۹۰
شکل(۳-۲۰) سنجش تولید آنزیم لیپاز در محیط‌های حاوی عناصر کم مقدار درDSM3286 ..... ۹۲
شکل (۳-۲۱) سنجش تولید آنزیم لیپاز در محیط‌های حاوی عناصر کم مقدار در سویه ۲۰۳..... ۹۲
شکل (۳-۲۲) سنجش میزان وزن خشک سلولی تولید شده در محیط کشت حاوی عناصر کم مقدار در DSM3286..... ۹۳
شکل (۳-۲۳) سنجش میزان وزن خشک سلولی تولید شده در محیط کشت حاوی عناصر کم مقدار در سویه ۲۰۳..... ۹۴
شکل (۳-۲۴) بررسی تولید آنزیم لیپاز و وزن خشک سلولی در محیط حاوی غلظت‌های مختلف عصاره مخمر در DSM3286 ..... ۹۵
شکل (۳-۲۵) بررسی تولید آنزیم لیپاز و وزن خشک سلولی در محیط حاوی غلظت‌های مختلف آرد سویا در سویه ۲۰۳..... ۹۶
شکل (۳-۲۶)بررسی تولید آنزیم لیپاز و وزن خشک سلولی در غلظت‌های مختلف روغن زیتون در DSM3286..... ۹۷
شکل(۳-۲۷) بررسی تولید آنزیم لیپاز و وزن خشک سلولی در غلظت‌های مختلف روغن زیتون در سویه ۲۰۳..... ۹۸
شکل (۳-۲۸) .روند تغییرات pH در دو سویه ۲۰۳ و DSM3286 در طول دوره انکوباسیون در غلظت‌های بهینه نیتروژنی ۹۹
شکل (۳-۲۹) بررسی اثر غلظت‌های مختلف بافر بر روی میزان تولید لیپاز و وزن خشک سلولی در DSM3286..... ۱۰۰
شکل (۳-۳۰) بررسی اثر غلظت‌های مختلف بافر بر روی میزان تولید لیپاز و وزن خشک سلولی در سویه ۲۰۳..... ۱۰۱
شکل (۳-۳۱) بررسی تاثیر غلظت های مختلف کلرید کلسیم در سویه DSM3286..... ۱۰۲
شکل (۳-۳۲) بررسی تاثیر غلظت های مختلف کلرید کلسیم در سویه ۲۰۳..... ۱۰۳

عنوان **صفحه**

شکل ۳-۳۳. بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف سولفات منیزیم در سویه DSM3286 .....۱۰۴
شکل (۳-۳۴) بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف سولفات منیزیم در سویه ۲۰۳.....۱۰۴
شکل (۳-۳۵) بررسی کیفی تولید پروتئاز ۱۰۵
شکل (۳-۳۶) بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف EDTA بر روی تولید لیپاز و وزن خشک سلولی بر روی سویه DSM3286 .....۱۰۸
شکل (۳-۳۷) بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف EDTA بر روی تولید لیپاز, پروتئاز و وزن خشک سلولی بر روی سویه ۲۰۳.....۱۰۸
شکل (۳-۳۸) مقایسه بهینه‌سازی تولید لیپاز در محیط بهینه با روش تیتراسیون و اسپکتروفتومتر در DSM3286.....۱۰۹
شکل (۳-۳۹) مقایسه بهینه‌سازی تولید لیپاز در محیط بهینه با روش تیتراسیون و اسپکتروفتومتر در سویه ۱۱۰
شکل (۳-۴۰) منحنی رشد, مخمر ۲۰۳.....۱۱۱
شکل (۳-۴۱) تصویر کلنی ۲۰۳ و DSM3286 بر روی پلیت.....۱۱۱
شکل (۳-۴۲) تصویر کلنی دو مخمر۲۰۳ و DSM3286 در زیر میکروسکوپ.....۱۱۲
شکل (۳-۴۳) شناسایی مولکولی سویه ۲۰۳ جداسازی گردیده.....۱۱۴
شکل (۳-۴۴) نتیجه BLAST قطعه‌ی زیر واحد ریبوزومی s ۱۸ سویه ۲۰۳ در سایت NCBI.....۱۱۵

فصل اول

مقدمه:

۱-۱- تعریف آنزیم:

آنزیم‌ها, مولکولهای فعال بیولوژی با ساختمان پروتئینی هستند که توسط سلول زنده ساخته شده و عمل کاتالیز واکنش‌های بیوشیمیایی داخل و خارج سلول را به عهده دارند. آنزیم‌ها از تعداد زیادی اسیدهای آمینه ساخته شده‌اند ولی تنها تعداد معدودی از آنها در ایجاد جایگاه فعال آنزیم شرکت دارند. در واقع جایگاه فعال آنزیم شامل تعدادی اسید آمینه است که بعضی در اتصال آنزیم به سوبسترا و بعضی در انجام عمل کاتالیزوری نقش دارند. سایر اسیدهای آمینه که در خارج از جایگاه فعال آنزیم قرار دارند تنها در ایجاد ساختمان فضایی مناسب, حفظ پایداری و فعالیت آنزیم در شرایط محیطی مختلف (دماهای مختلف,pH های مختلف و...) موثر هستند (شجاع الساداتی, ۱۳۶۹).

1-۲- تعیین فعالیت کاتالیتکی آنزیم:

باتوجه به مقدار کم آنزیم‌های تولید شده توسط سلولها, اندازه‌گیری مقدار آنزیم کار مشکلی است. ولی می-توان فعالیت کاتالیتیکی یک آنزیم را در شرایط مناسب اندازه گرفت و در نتیجه آن را به صورت واحد آنزیمی بیان کرد. هر واحد آنزیم عبارتست از مقدار آنزیمی که در شرایط مطلوب اندازه‌گیری, یک میکرومول سوبسترا را در مدت زمان یک دقیقه به محصول تبدیل کند. می‌توان از فعالیت ویژه هم برای تعریف فعالیت آنزیم استفاده نمود که به صورت تعداد واحدهای آنزیمی در میلی‌گرم پروتئین بیان می‌شود و مقیاسی برای تعیین

درجه خلوص آنزیم است و هنگامی که که آنزیم کاملا خالص باشد فعالیت ویژه به میزان حداکثر و ثابت خود می‌رسد (بیوشیمی لنینجر, هارپر, شهبازی-ملک نیا).

۱-3- طبقه‌بندی آنزیم‌ها:

براساس واکنش‌های آنزیمی, انجمن بین المللی بیوشیمی IUB آنزیم‌ها را به ۶ گروه اصلی اکسیدوردوکتازها, ترانسفرازها, هیدرولازها, لیازها, ایزومرازها و لیگازها تقسیم بندی می‌کنند که هر یک بین چهار تا سیزده گروه‌اند:

۱- اکسیدوردوکتازها: واکنش‌های اکسیداسیون و احیاء را کاتالیز می‌کنند.
۲- ترانسفرازها: انتقال گروههای عاملی مثل متیل را بین دو ماده کاتالیز می‌نمایند.
۳- هیدرولازها: واکنشهای هیدرولیز را کاتالیز می نمایند.
۴- لیازها: جداشدن گروههای عاملی را با ایجاد باند دوگانه کاتالیز می‌نمایند.
۵- ایزومرازها: تبدیل ایزومرهای نوری, هندسی یا فضایی را در مولکول کاتالیز می‌نمایند.
۶- لیگازها: ایجاد پیوندهای کووالانسی بین دو مولکول را کاتالیز می‌کنند (بیوشیمی لنینجر,۱۳۸۲. بیوشیمی هارپر, ۱۳۸۴ . شهبازی ملک نیا).

۱-۴- بیوتکنولوژی و تولید آنزیم:

آنزیم‌ها کاتالیست‌های پروتئینی هستند که توسط سلول‌های زنده تولید می‌شوند و فعالیت متابولیکی سلول را سرعت می‌بخشند. با پیشرفت علم بیوشیمی و ساخت اختصاصات آنزیم‌ها نقش اساسی آنها مسلم شده است که بدون آنزیم حیات امکان پذیر نیست (شجاع الساداتی ۱۳۶۹). استفاده از پروسه‌هایی که توسط آنزیم‌ها کاتالیز می‌شوند به تمدن‌های باستانی برمی‌گردد. بشر بدون اینکه اطلاع دقیقی از آنزیم و نوع واکنشهای آنزیمی داشته باشد از آنزیم برای پخت نان وآماده کردن پنیر استفاده می‌کرده است. امروزه نزدیک به ۴۰۰ نوع آنزیم شناخته شده است و از این ۴۰۰ نوع, ۲۰۰ نوع آن به صورت صنعتی استفاده می‌شوند (Sharma *et al.*, 2001). از پرکاربردترین آنزیم‌ها: پروتئازها, گلوکوآمیلازها, سلولازها, لیپازها و آنزیم‌های انعقاد کننده و ... را می‌توان نام برد (شجاع الساداتی, ۱۳۶۹). بیشترین این آنزیم‌ها دارای منشاء میکروبی هستند (Sharma *et al.*, 2001).

اگر چه کاربرد آنزیم‌ها در صنعت در طی سالهای اخیر, افزایش قابل ملاحظه‌ای یافته است با این وجود از دهه ۱۹۶۰ تاکنون فروش کلی آنزیم‌ها در سال تنها در حدود چند میلیون دلار بوده است (Sharma *et al.*, 2001). مسلما می‌توان با به کار بردن روش‌های بیوتکنولوژی به منظور به دست آوردن آنزیم‌هایی با طیف اثر

کافی و مناسب, با مقاومت و پایداری بیشتر در شرایط محیطی و اقتصادی بودن تولید آنها پذیرفت که در آینده, تکنولوژی تولید و کاربرد آنزیم‌ها در اقتصاد جهانی, جایگزینی منابع طبیعی, حل مسائل محیط زیست, رفع نیازهای درمان تشخیص و ارزیابی (ایمونوآنزیمی) سهم بزرگی ایفا خواهند کرد و این صنعت رشد چشمگیری خواهد یافت (شجاع الساداتی, ۱۳۶۹).

۱-۵- آنزیم‌های تولید شده در سطح صنعتی:

تاکنون آنزیم‌هایی مانند پروتئازها, کربوهیدرازها و لیپازها به صورت صنعتی تولید شده‌اند. آنزیم‌های پروتئاز و کربوهیدرازها سالهاست که از طریق صنعتی تولید و مورد استفاده قرار می‌گیرند و سهم بزرگی از فروش جهانی را به خود اختصاص داده‌اند. درحالی که آنزیم لیپاز تاکنون کمتر از ۵٪ از سهم فروش جهانی را به خود اختصاص داده است و در رتبه سوم قرار دارد. هم اکنون بیشترین کاربرد آنزیم لیپاز در صنایع شوینده به عنوان اولین مرحله‌ی حذف و هضم رنگهای چربی است و سالیانه نزدیک به ۱۰۰۰ تن لیپاز در این صنایع مصرف
می‌شود (Vakhlu and Kour., 2006). امروزه با افزایش اطلاعات در مورد آنزیم لیپاز, کاربردهای صنعتی جدیدی به واسطه این آنزیم پدیدار شده است. بنابراین انتظار می‌رود که در اواخر دهه ۲۰ فروش جهانی این آنزیم رشد چشمگیری یافته و باعث افزایش تقاضای تولید این آنزیم از منابع جدیدی که شامل میکروارگانیسم‌ها است گردد (Thomson *et al*., 1999).

۱-۶- آنزیم لیپاز:

لیپیدها از جمله ترکیبات مهم در جهان محسوب می‌شوند که تنها توسط لیپازها تجزیه می شوند (Beisson *et al*., 2000). لیپازها (تری گلیسرول هیدرولاز۳ .۱ .۱ .۳ EC) یک گروه از آنزیم‌ها هستند که کاتالیز کننده هیدرولیز تری‌گلیسرول‌ها به دی‌گلیسرول‌ها, اسیدهای چرب و گلیسرول می‌باشند (Thomson *et al*., 1999) شکل ۱-۱.

لیپاز به صورت مرحله به مرحله باعث تجزیه تری‌گلیسیریدها به اسید چرب و گلیسرول می‌شوند (Beisson *et al*., 2000). این آنزیم‌ها در شرایط کم آب، قادر به کاتالیز کردن واکنش‌های برگشتی نیز می‌باشند. لیپازها براساس چگونگی واکنششان با مولکول تری‌گلیسرول به دو دسته تقسیم می شوند:

۱- لیپازهای اختصاصی: این لیپازها نسبت به موقعیت خاصی در تری‌آسیل‌گلیسرول‌ها حمله می‌کنند. به این آنزیم‌ها اصطلاحا" 3-specific lipase و sn-1 گفته می‌شود.