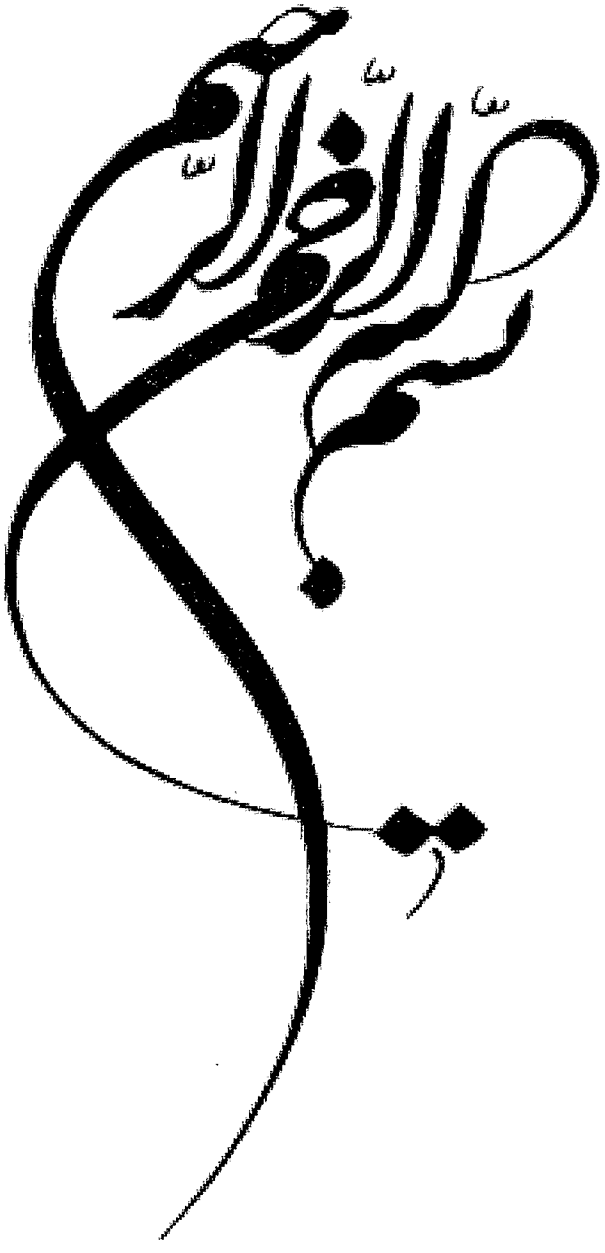


٩٥٧٩٦

# دانشگاه الزهرا

## دانشکده علوم پایه

### پایان نامه

جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

رشته میکروبیولوژی

### عنوان

بررسی خصوصیات کاتالاز هالوفراکس جدا شده از دریاچه ارومیه و تعیین نقش آن در مقاومت آرکی در مقابله با استرس اکسیداتیو

### اساتید راهنما

دکتر عزت عسگرانی و دکتر مهوش خدابنده

### استاد مشاور

دکتر مهدی حسینی مزینانی

۱۳۸۷ /۲/ ۲۵

### دانشجو

حمیرا امیرخانی

خرداد ماه ۱۳۸۷

۹۵۷۹۶

شماره
تاریخ
پیوست

بسمه تعالی

بموجب نامه شماره ۱۴۷/ص/ز مورخ ۸۷/۲/۳ جلسه دفاع از پایان نامه
خانم حمیرا مرجانی دانشجوی رشته کارشناسی ارشد بیماری‌های دانشکده علوم
شماره دانشجویی ۸۴۱۲۶۴۰۹ در روز دوشنبه مورخ ۸۷/۳/۱۳ تحت عنوان بررسی جمعیت کنه‌های خانوادگی ایکسودیده جدا شده از دام‌های استان سیستان و بلوچستان و اثرات اکسی‌آمید
در اطاق سمینار بهمنی برگزار گردید.
ابتدا خانم حمیرا مرجانی گزارشی از کار پژوهشی خود را ارائه کردند و سپس به سئوالات اعضاء حاضر در جلسه پاسخ دادند. در پایان هیات داوران رساله دانشجو را با نمره ۱۹/۷ و امتیاز عالی مورد قبول قرار دادند.
~~قرار ندادند~~

**هیات داوران :**

۱. استاد راهنما دکتر مهوش خدابنده
۲. استاد مشاور دکتر مهدی حسینی مزینانی
۳. داور خارجی دکتر محمدعلی آموزگار
۴. داور داخل دکتر سیاوش سهرابزاده

نام و نام خانوادگی مدیر گروه اصیا بهمنی عالی امضاء

نام و نام خانوادگی رئیس دانشکده امضاء

یا نماینده دانشکده در شورای تحصیلات تکمیلی دانشگاه

۸۷/۴/۹


۸۰۲۲۰۵۱-۸
۸۰۳۵۱۸۷

تقدیم به پدر و مادرم، دو عشق پاک زندگی ام

و خواهران مهربانم به پاس همه محبت هایشان

## سپاس

❖ از سرکار خانم دکتر عسگرنی، استاد گرامی که راهنمایی این پایان نامه را به عهده داشته و دل سوزانه از هیچ کوششی برای اینجانب در طول تحصیل دریغ ننموده اند تشکر می کنم .

❖ از سرکار خانم دکتر خدابنده، استاد گرامی که راهنمایی این پایان نامه را به عهده داشته و همواره از نظرات و مساعدت های سودمند ایشان بهره گرفتم قدرانی می کنم .

❖ از جناب دکتر حسینی مزینانی، استاد گرامی که با دانش خویش در تمام مراحل اجرای این پایان نامه مرا یاری نموده اند تشکر می نمایم .

❖ از داوران محترم، جناب آقای دکتر آموزگار و جناب آقای دکتر سلمانزاده که داوری این پایان نامه را بر عهده گرفته اند تشکر می کنم .

❖ از همکاران وکارشناسان محترم آزمایشگاه ، سرکار خانم دکتر صدیق، سرکار خانم دکتر تیموری، جناب آقای دکتر کارخانه ای، سرکار خانم دانش، سرکار خانم سالک، که در طی انجام این پایان نامه همواره مرا یاری کرده اند تشکر می کنم .

❖ از تمام اساتید و دوستان عزیزم در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری خصوصاً سرکار خانم دکتر رضوی که در طی انجام این پایان نامه همواره به من لطف داشته اند تشکر می نمایم .

سویه مورد مطالعه در این پژوهش یک آرکی اکستریم هالوفیل جدا شده از دریاچه ارومیه است که بر طبق نتایج مطالعات میکروسکوپی، مورفولوژیکی و بیوشیمیایی هالوفرکس بوده و به دلیل مشخص نبودن گونه‌ی آن ا *Haloferax IRU1* نامیده شده است.

آرکی های اکستریموفیل امروزه کاربردهای فراوانی در بیوتکنولوژی دارا می باشند . مطالعه آرکی های اکستریموفیل، موانع و مشکلاتی را به همراه دارد. یک محدودیت عمده در تولید صنعتی آنزیم ها و متابولیت های آرکیایی، تولید کم فراورده به علت تولید کم بیومس در نتیجه ی میزان پایین رشد است. بهینه سازی محیط کشت و شرایط رشد یک نکته کلیدی در بهره برداری صنعتی اکستریموفیل ها در جهت افزایش تولید بیومس است. دربخشی از این پژوهش ، با به کارگیری روش تاگوچی وبررسی عواملی مثل درجه حرارت، ترکیب محیط کشت، درصد کلرید سدیم ، pH ، شرایط بهینه رشد این آرکی مشخص گردید . با توجه به جدول آرایه های متعامدتاگوچی در ۵ عامل و ۴ سطح ۱۶آزمایش طراحی شد .. میزان گرم وزن خشک سلول / لیتر . ساعت در آزمایشات با یکدیگر مقایسه شده و با استفاده از برنامه کامپیوتریQualitek-4 تجزیه وتحلیل شد . نتایج نشان داد که در بین عوامل ، درجه حرارت بیشترین اثر را دارد. بین دو عامل ترکیب محیط کشت ودرجه حرارت ارتباط متقابل وجود ندارد . (سهم این عامل کمتر از ۵ درصد است ). دمای ۴۷ درجه سانتیگراد , pH 7 ، محیط B ، غلظت Nacl ۲۰ درصد به عنوان شرایط بهینه انتخاب شد ومیزان رشد مورد انتظار در این شرایط توسط نرم افزار و به صورت تئوری ۰/۰۱۷۵ گرم بر لیتر وزن خشک باکتری تعیین شد . میزان رشد در شرایط آزمایشگاهی ۰/۰۲۳ و نزدیک به مقدار پیش بینی شده بود.

این سویه در برابر پرتوهای یون ساز و پراکسید هیدروژن مقاومت بالایی را نشان می دهد. پراکسید هیدروژن یکی از محصولات تابش پرتوهای یون ساز و کاتالاز آنزیم دفاعی اصلی برای سم زدایی پراکسید هیدروژن می باشد. بر این اساس آنزیم کاتالاز به عنوان آنزیم آنتی اکسیدان مؤثر برای مقاومت این سویه مورد مطالعه قرار گرفته است.

به این منظور ابتدا بهترین روش را برای سنجش آنزیمی کاتالاز بررسی شد و از روش اسپکتروفتومتری ۲۴۰ نانومتر که بر اساس میزان مصرف هیدروژن پراکسید می باشد به عنوان بهترین روش استفاده شد . سپس آنزیم کاتالاز را حتی الامکان خالص شد تا ادامه آزمایشات با دقت بیشتری امکان پذیر باشد . سلول ها پس از کشت در شرایط مناسب توسط روش استفاده همزمان از آب مقطر، سونیکاسیون و انجماد–ذوب شکسته شده و عصاره سلولی با روش مناسب تغلیظ گردید. نمونه پروتئینی تحت کروماتوگرافی sephadexG-200 و sephacryl S-300 قرار داده و پس از کروماتوگرافی فرکشن ها به منظور بررسی وجود کاتالاز با تکنیک های SDS - PAGE و Western blotting مورد ردیابی قرار گرفت . برای تهیه آنتی بادی ضد کاتالاز از تزریق کاتالاز کبد گاو به خرگوش استفاده شد . کارایی فرایند تخلیص با ژل سفادکس ۴/۲ و با ژل سفاکریل ۳/۷ به دست آمد .

در بخش دیگری از این تحقیق سویه مورد مطالعه به لحاظ نقش کاتالاز در ایجاد مقاومت نسبت به پراکسید هیدروژن مورد مطالعه قرار گرفت. برای بررسی نقش کاتالاز در مقاومت این سویه در برابر پراکسید هیدروژن، با بالا بردن غلظت پراکسید هیدروژن اگزوژن، میزان استرس اکسیداتیو افزایش داده شد. نتایج نشان داد با افزایش غلظت پراکسیدهیدروژن در محیط، میزان بیان و فعالیت آنزیم کاتالاز تا غلظت ۲۰ میلی مولار پراکسید هیدروژن افزایش یافته و در غلظت های بیشتر پراکسید هیدروژن، بیان و فعالیت آنزیم کاهش می یابد. بیشترین بیان آنزیم کاتالاز مربوط به غلظت ۲۰ میلی مولار ( ۱۲ ٪ ) می باشد و نسبت به نمونه های کنترل که تیمار نشده اند ( ۷/۵ ٪ ) افزایش نشان می دهد. نتایج نشان می دهند که آنزیم کاتالاز نقش مهمی در مقاومت این سویه در برابر پراکسید هیدروژن دارد.

توانایی موجودات زنده برای مقاومت بیشتر در برابر استرس بعد از این که در معرض مقادیر کمتر استرس قرار می گیرند، پاسخ سازگاری نامیده می شود. پیش تیمار سلول ها با مقادیر ۳ ، ۰/۳ و ۰/۰۳ میلی مولار پراکسید هیدروژن در زمان های ۰/۵ ، ۱ ، ۴ و ۱۶ ساعت ، سلول ها را در برابر اثرات کشنده هیدروژن پراکسید مقاوم تر می کند . نتایج نشان دهنده پاسخ سازگاری این سویه در برابر هیدروژن پراکسید است.

برای تعیین نقش کاتالاز در این پاسخ، نمونه هایی که به مدت ۱۶ ساعت با دوزهای ۳، ۰/۳، ۰/۰۳ میلی مولار پراکسیدهیدروژن پیش تیمار شده اند، و نمونه کنترل ( نمونه ای که شرایط نمونه های دیگر را داشته ولی با پراکسید هیدروژن پیش تیمار نشده است ) روی ژل ۱۳ درصد SDS - PAGE الکتروفورز شد. با افزایش غلظت پیش تیمار میزان بیان کاتالاز در نمونه های مورد آزمایش افزایش می یابد .

بیان آنزیم کاتالاز در مراحل مختلف رشد مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که در اواسط فاز لگاریتمی این سویه بیشترین میزان بیان آنزیم کاتالاز و در فاز سکون بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز را نشان می دهد .

برای تعیین گونه سویه مورد مطالعه بررسی فیلوژنتیکی بر اساس بررسی توالی نوکلئوتیدی ژن 16s rRNA صورت گرفت. اما به علت بالا بودن درصد نوکلئوتیدهایی که نوع آن ها در توالی تعیین نشده، این توالی قابل آنالیز نمی باشد و بنابراین با توجه به سکانس 16s rRNA نمی توان نظر قطعی در مورد گونه این سویه ارائه نمود که این بخش مطالعه در ادامه پروژه پیگیری خواهد شد.

## فصل اول : مقدمه


۱ – ۱ اهمیت مطالعه بیوتکنولوژیکی آرکی های اکستریموفیل ۲
۱ – ۲ استرس اکسیداتیو و آسیب سلولی ۳
۱ – ۳ حفاظت سلول در برابر عوامل استرس اکسیداتیو ۵
۱ – ۴ آنزیم ها ۷
۱ – ۴ – ۱ اختصاصی بودن آنزیم ها ۹
۱ – ۴ – ۲ فعالیت آنزیم ۹
۱ – ۴ – ۳ سنجش فعالیت آنزیم ها ۱۰
۱ – ۴ – ۴ اکسیدو ردوکتازها – آنزیم های آنتی اکسیدان ۱۱
۱ – ۴ – ۴ – ۱ سوپراکسید دیسموتاز ۱۱
۱ – ۴ – ۴ – ۲ پراکسیداز ها ۱۳
۱ – ۴ – ۴ – ۳ کاتالازها ۱۴
۱ – ۴ – ۴ – ۳–۱ سنجش فعالیت آنزیمی کاتالاز ۱۷
۱ – ۵ پاسخ سازگاری به استرس ۱۸
۱ – ۶ بررسی فیلوژنتیکی یک سویه ۲۱
۱ – ۶ – ۱ واکنش زنجیره پلی‌مراز، PCR ۲۲
۱ – ۷ تکامل سلولی ۲۳
۱ – ۸ تاریخچه کشف آرکی ها ۲۴
۱ – ۸ – ۱ آرکی ها ۲۵
۱ – ۸ – ۲ طبقه بندی آرکی ها ۲۵
۱ – ۸ – ۳ ویژگی های ساختمانی، عملکردی و فیزیولوژیکی ۲۶
۱ – ۹ اکستریموفیل ها ۲۸
۱ – ۱۰ راسته هالوباکتریال، اکستریم هالوفیل ها ۳۰
۱ – ۱۱ سازگاری با اسمز در آرکی ها ی اکستریم هالوفیل ۳۱
۱ – ۱۲ خاستگاه باکتری های نمک دوست ۳۲
۱ – ۱۳ جنس هالوفراکس ۳۲
۱ – ۱۴ محدودیت های موجود در مطالعه آرکی های اکستریموفیل ۳۳
۱ – ۱۵ روش تاگوچی ۳۳
۱ – ۱۶ خالص سازی پروتئین ۳۶
هدف از پژوهش ۳۷


## فصل دوم : مواد و روش ها


۲ – ۱ مواد و بافرها و میکروارگانیسم مورد استفاده ۴۱

۱ – ۱ – ۲ میکرو ارگانیسم مورد استفاده ٤١
۲ – ۱ – ۲ محیط های کشت مورد استفاده ٤١
۳ – ۱ – ۲ مواد و بافرهای مورد استفاده ٤٤
۱ – ۳ – ۱ – ۲ مواد و بافرهای مورد استفاده در مراحل تخلیص پروتئین ٤٤
۲ – ۳ – ۱ – ۲ مواد و بافرهای مورد استفاده در SDS – PAGE ٤٥
۳ – ۳ – ۱ – ۲ مواد و بافرهای مورد استفاده در Western blotting $ dot blotting ٤٨
۴ – ۳ – ۱ – ۲ مواد و بافرهای مورد استفاده در سنجش آنزیمی کاتالاز ٥٠
۱ – ۴ – ۳ – ۱ – ۲ مواد و بافرهای مورد استفاده در روش اسپکتروفتومتری ۲۴۰ nm ٥٠
۲ – ۴ – ۳ – ۱ – ۲ مواد و بافرهای مورد استفاده در روش استفاده از پرمنگنات پتاسیم ٥١
۳– ۴ – ۳ – ۱ – ۲ مواد و بافرهای مورد استفاده در روش استفاده از دی کرومات پتاسیم ٥١
۴– ۴ – ۳ – ۱ – ۲ مواد و بافرهای مورد استفاده در روش استفاده از آنتی بادی ٥٢
۵– ۴ – ۳ – ۱ – ۲ مواد و بافرهای مورد استفاده در روش استفاده از hrp ٥٢
۵– ۳ – ۱ – ۲ مواد و بافرهای مورد استفاده در الکتروفورز DNA ٥٣
۴ – ۱ – ۲ کیت های مورد استفاده ٥٤
۵ – ۱ – ۲ مواد مورد استفاده در PCR ٥٤
۲ – ۲ ابزارها و دستگاه های مورد استفاده ٥٦
۳ – ۲ روش ها ٥٧
۱ – ۳ – ۲روش های مورد استفاده در بهینه سازی شرایط رشد میکروارگانیسم ٥٧
۱ – ۱ – ۳ – ۲ روش طراحی آزمایش ٥٧
۲ – ۳ – ۱ – ۲ روش تعیین ارتباط وزن خشک سلول و مقدار جذب سلولی در۶۰۰ نانومتر ٦١
۲ – ۳ – ۲ روش های مورد استفاده در خالص سازی آنزیم کاتالاز از این سویه ٦١
۱ – ۲ – ۳ – ۲ تعیین روش مناسب جهت لیز کردن سلول ها ٦١
۲ – ۲ – ۳ – ۲ روش حذف DNA از عصاره سلولی ٦٣
۳ – ۲ – ۳ – ۲ روش رسوب دهی با پلی اتیلن گلیکول PEG ٦٤
۴ – ۲ – ۳ – ۲ روش دیالیز و تغلیظ محلول پروتئینی ٦٤
۵ – ۲ – ۳ – ۲ روش آماده سازی ستون ژل فیلتراسیون ٦٦
۶ – ۲ – ۳ – ۲ روش کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون و تهیه کروماتوگرام ٦٧
۳ – ۳ – ۲ روش های مورد استفاده در ردیابی پروتئین خالص شده ٦٧
۱ – ۳ – ۳ – ۲ الکتروفورز پروتئین SDS- PAGE ٦٧
۲ – ۳ – ۳ – ۲ روش بلاتینگ پروتئین ها ٧٠
۱ – ۲ – ۳ – ۳ – ۲ Western Blotting ٧٠
۲ – ۲ – ۳ – ۳ – ۲ روش تهیه آنتی بادی ضد کاتالاز ٧٢
۳ – ۲ – ۳ – ۲ – ۳ روش ردیابی تولید آنتی بادی در بدن خرگوش و تعیین تیتر آن ٧٢

۳ – ۳ – ۲ – ۲ روش های تعیین محتوای پروتئین ۷۳
۴ – ۳ – ۲ روش های سنجش آنزیمی کاتالاز ۷۶
۱ –۴ – ۳ – ۲ روش اسپکتروفتومتری ۲۴۰ نانومتر ۷۶
۱ – ۴ – ۳ – ۲ روش سنجش آنزیمی کاتالاز با استفاده از پرمنگنات پتاسیم ۷۷
۴– ۴ – ۳ – ۲ روش سنجش آنزیمی کاتالاز با دی کرومات پتاسیم ۷۸
۵– ۴ – ۳ – ۲ روش سنجش آنزیمی کاتالاز با استفاده از آنتی بادی ۸۰
۶– ۴ – ۳ – ۲ روش سنجش کیفی آنزیم کاتالاز با آنزیم hrp ۸۱
۵ – ۳ – ۲ روش های مورد استفاده در مطالعه پاسخ های سازگاری در این سویه ۸۲
۱ – ۵ –۳ – ۲ روش آماده سازی نمونه برای تیمار با پراکسید هیدروژن ۸۲
۲ – ۵ –۳ – ۲ روش تیمار با پراکسید هیدروژن ۸۲
۳ – ۵ –۳ – ۲ روش ترسیم منحنی بقا و تعیین دوز کشنده پراکسید هیدروژن ۸۳
۴ – ۵ –۳ – ۲ روش تعیین MIC ( حداقل غلضت مهاری ) پراکسید هیدروژن ۸۳
۵ – ۵ –۳ – ۲ روش بررسی پاسخ سازگاری در برابر پر اکسید هیدروژن ۸٤
۶ – ۵ –۳ – ۲ روش بررسی نقش کاتالاز در پاسخ سازگاری ۸۵
۶ –۳ – ۲ روش بررسی اثر هیدوژن پراکسید در بیان آنزیم کاتالاز ۸٦
۷ –۳ – ۲ روش بررسی بیان کاتالاز در مراحل مختلف رشد ۸۷
۸ –۳ – ۲ روش بررسی فیلوژنتیکی سویه ۸۸
۱– ۸ – ۳ – ۲ روش استخراج DNA ژنومی ۸۸
۲ – ۸ – ۳ – ۲ روش الکتروفورز DNA ۸۹
۳ – ۸ – ۳ – ۲ روش واکنش زنجیره پلیمراز PCR. ۹۰
۴ – ۸ – ۳ – ۲ روش استخراج DNA از ژل ۹۱
۵– ۸ – ۳ – ۲ توالی یابی محصولPCR خالص شده از روی ژل و آنالیز آن ۹۲


**فصل سوم : نتایج**


۱ – ۳ نتایج مربوط به بهینه سازی شرایط رشد میکروارگانیسم ۹٤
۲ – ۳ نتایج ردیابی تولید آنتی بادی در بدن خرگوش ۱۰٤
۳ – ۳ تعیین تیتر آنتی بادی تهیه شده ۱۰۵
۴ – ۳ نتایج مربوط به خالص سازی آنزیم کاتالاز ۱۰٦
۱ – ۴ – ۳ نتایج بررسی روش مناسب برای لیز کردن سلول ها ۱۰٦
۲ – ۴ – ۳ نتایج حاصل از تخلیص آنزیم کاتالاز با روش های کروماتوگرافی ۱۰۹
۵ – ۳ نتایج روش های مختلف سنجش آنزیمی کاتالاز ۱۱٤
۱ – ۵ – ۳ روش سنجش اسپکتروفتومتری ۲۴۰ نانومتر ۱۱٤
۲ – ۵ – ۳ روش سنجش آنزیمی کاتالاز با پرمنگنات پتاسیم ۱۱۵

۳ – ۵ – ۳ روش سنجش آنزیمی کاتالاز با دی کرومات پتاسیم ۱۱۷
۴ – ۵ – ۳ سنجش آنزیمی کاتالاز با استفاده از آنتی بادی ۱۱۹
۵ – ۵ – ۳ سنجش کیفی آنزیم کاتالاز با آنزیم hrp ۱۲۰
۶ – ۳ نتایج مربوط به بررسی اثر پراکسید هیدروژن در بیان آنزیم کاتالاز ۱۲۱
۷ – ۳ نتایج مربوط به بررسی پاسخ سازگاری ۱۲۵
۱ – ۷ – ۳ نتایج مربوط به ترسیم منحنی بقا ۱۲۵
۲ – ۷ – ۳ نتایج مربوط به تعیین MIC (حداقل غلظت مهاری ) ۱۲۷
۳ – ۷ – ۳ بررسی پاسخ سازگاری در برابر پر اکسید هیدروژن ۱۲۸
۴ – ۷ – ۳ بررسی نقش کاتالاز درمکانیسم پاسخ سازگاری ۱۳۵
۸ – ۳ بررسی بیان کاتالاز در مراحل مختلف رشد ۱۳۹
۹ – ۳ نتایج مربوط به بررسی فیلوژنتیکی سویه ۱۴۲
۱ – ۹ – ۳ نتیجه استخراج DNA ژنومی با کیت ۱۴۲
۲ – ۹ – ۳ نتیجه PCR ۱۴۳
۳ – ۹ – ۳ نتیجه توالی یابی محصولPCR خالص شده از روی ژل و آنالیز آن ۱۴۴
فصل چهارم : بحث و پیشنهادات ۱۴۸
**فصل پنجم : پیوست** ۱۶۱
**فهرست منابع** ۱۷۴

# فصل اول

# مقدمه

# مقدمه

## ۱ – ۱ اهمیت مطالعه بیوتکنولوژیکی آرکی های اکستریموفیل[1]

مدت زمانی است که پژوهشگران سراسر دنیا به پژوهش درباره آرکی ها به دلیل خصوصیات ویژه و خاص آن ها توجه نشان داده اند. از جمله این خصوصیات می توان به قابلیت رشد این باکتری ها در شرایط بسیار سخت مانند درجه حرارت های بالا، غلظت بالای نمک و شرایط مطلقاً بی هوازی اشاره کرد ( ۱۰۹ ).

در سال های اخیر اکستریموفیل های مختلفی شناخته شده اند که گسترش مطالعه و جستجوی آن ها به دو علت اساسی است : ۱– با شناسایی گستره شرایطی که این میکرو ارگانیسم ها می توانند وجود داشته باشند، مطالعه برای شناسایی زیستگاه های مختلف گسترش یافته و تاکنون زیستگاه های زیادی کشف شده است، ۲ – امروزه مشخص شده است ارگانیسم هایی که با شرایط حاد سازگار شده اند توانایی بالایی را برای کاربرد در بیو تکنولوژی و صنعت دارند ( ۱۱۰ ).

به دلیل شباهت های زیادی که بین آرکی ها و یوکاریوت ها وجود دارد، این میکروارگانیسم ها به عنوان ارگانیسم های مدل برای مطالعات ژنتیکی (نظیر ترمیم DNA یا بیان ژن و. . . ) دریوکاریوت های پیشرفته نظیر انسان به کار می روند ( ۱۰۹ ).

همچنین، از آن جایی که هالوفیل ها[2]در محیط هایی که اغلب میکروارگانیسم ها محدودیت رشد دارند زنده می مانند و امروزه هم در نتیجه دخالت بشر (آبیاری و استفاده نادرست از آب شیرین ) محیط های هایپرسالین[3] رو به افزایش است، بنابراین هالوفیل ها منابع عمده ای برای پاکسازی زیستی[4] در آب های هایپرسالین آلوده می باشند ( ۳۶ ).

محصولات تولید شده به وسیله این گروه از باکتری ها در مقابل شرایط بسیار سخت محیطی پایداری نشان می دهند. برای مثال آنزیم ها و پروتئین های به دست آمده از باکتری های نمک دوست دردرصدهای بالای نمک

---

[1] - extremophile archaea 2 – halophile 3 – hypersaline 4 - bioremedation

پایدار و فعال می باشند و آنزیم ها و پروتئین های به دست آمده از باکتری های گرمادوست در درجه حرارت های بالای ۵۰ تا ۱۱۰ درجه فعالیت دارند ( ۸۵ ).

استفاده از آنزیم ها یا میکرو ارگانیسم ها به عنوان کاتالیزور زیستی[1] برای تشکیل محصولات مختلف در حال گسترش است. از آنجایی که شرایط فرایندهای صنعتی تولید این منابع دشوار است، استفاده از کاتالیزورهای زیستی که بتوانند این شرایط را تحمل کنند مفید می باشد. اگر چه تهیه آنزیم از موجوداتی که در شرایط معمولی رشد می کنند ساده تر است، اما به علت عدم پایداری در دما و pH و غلظت یونی، کاربرد این آنزیم ها دارای محدودیت هایی می باشد و کاربرد اکستریموفیل ها به عنوان مخزن مهمی برای اکستریموزیم[2]ها ارزشمند گردیده است( ۵۸ ).

استفاده از کاتالیزورهای زیستی اکستریموفیل‌ها و اکستریموزیم ها به سرعت به عنوان یک شاخه مهم در بیوتکنولوژی صنعتی مورد توجه قرار گرفته است ( ۶۷ ).

یکی از بخش های با اهمیت مطالعه آرکی های اکستریموفیل، بررسی مکانیسم های سلولی و مولکولی مقاومت آن ها در برابر استرس و شناسایی خصوصیات آنزیم های محافظت کننده شامل آنزیم های ترمیم کننده DNAو آنزیم های آنتی اکسیدان[3] می باشد ( ۴۱ ). این آنزیم ها کاربردهای فراوانی در صنعت و پزشکی داشته و مطالعه و شناسایی ساختار بیوشیمیایی و مولکولی آن ها که عامل پایداری در این شرایط سخت است، از اهمیت زیادی بر خوردار می باشد.

## ۲ – ۱ استرس اکسیداتیو[4] و آسیب سلولی

توانایی موجودات زنده برای استفاده از اکسیژن مولکولی که آنها را قادر می سازد، با استفاده از مواد غذایی انرژی بیشتری را نسبت به آن دسته از موجودات که به اکسیژن مولکولی حساس هستند، به دست آورند، یک امتیاز تکاملی به حساب می آید ( ۵۵ ). علی رغم این امتیاز، اکسیژن مولکولی با تولید گونه های فعال اکسیژن

1 – biocatalysor 2 – extremozyme 3 – antioxidane 4 – oxidative stress

می تواند برای موجودات زنده مخاطره آمیز باشد. گونه های فعال اکسیژن شامل رادیکال های سوپراکسید[1] ، رادیکال های هیدرروکسیل[2]، اکسیژن نوزادی و پراکسید هیدروژن[3] و موارد دیگر می باشد ( ۹۹).

این ترکیبات به طور طبیعی در سلول ایجادمی شود و باقی ماندن و تجمع آن ها می تواند به سلول آسیب رسانده و منجر به استرس اکسیداتیو شود (۵۲). علاوه بر عوامل درون سلولی، عوامل خارجی نظیر پرتوهای یون ساز و فرا بنفش و همچنین برخی از ترکیبات شیمیایی نیز می توانند در تولید این عوامل فعال اکسیژن نقش داشته باشند ( ۶۱ ).

تمام بیومولکول های درون سلولی نظیر لیپیدها، پروتئین ها و DNA و RNA می توانند هدف این عوامل قرار گیرند. لیپیدها اهداف عمده استرس اکسیداتیو می باشند ( ۲۵ ). رادیکال های آزاد می توانند به طور مستقیم به لپیدهای غشایی حمله کرده و پراکسیداسیون[4] لیپیدها را شروع کنند. پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی سیالیت غشا را تغییر داده و پروتئین های غشایی را تخریب می کند. حاصل پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی، ترکیباتی از قبیل آلدئیدها[5] است. این ترکیبات بسیار واکنش گر هستند و می توانند به سایر بیومولکول ها نظیر پروتئین ها آسیب برسانند ( ۵ ).

برخلاف رادیکال های آزاد، آلدئید ها طول عمر و قدرت انتشار بیشتری داشته و از محل تولید خود به مناطقی که فواصل زیادی از مبدا دارند، انتشار می یابند. در میان آلدئیدهای حاصل از پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی، مالون دی آلدئید[6] بیشتر از سایرین تولید می شود ( ۱۰۰ ).

هدف دیگر گونه های فعال اکسیژن، DNA می باشد. این ترکیبات به قندها و بازهای آلی DNA حمله می کنند و سبب ایجاد شکستهای دو رشته ای شده و همچنین با ایجاد کراس لینک[7] با سایر مولکول ها همانند سازی را متوقف می کنند ( ۸۱ و ۱۳۴ ). این ترکیبات همچنین به واسطه اکسیداسیون گروه سولفیدریل[8] ، احیا پیوندهای دی سولفیدی، تغییر شکل گروههای پروستاتیک[9] ، اندرکنش پروتئین – پروتئین[10] ، به پروتئین های

---

1 – superoxide 2 – hydroxyl 3 – hydrogen peroxide 4 – peroxidation
5 – aldehyde 6 - malon dealdehyde 7 - cross- link 8 – sulphidryle
9 – prostatic 10 - protein – protein intraction

داخل سلول آسیب می رسانند. کلیه این تغییرات اعم از کاهش عملکرد غشاء ها و پروتئین ها و توقف همانند سازی DNA به سلول آسیب می رساند ( ۲۴ ).

## ۳ – ۱ حفاظت سلول در برابر عوامل استرس اکسیداتیو

سلول ها راهکارهایی برای حفظ خود در برابر این عوامل آسیب رسان دارند. افزایش این گونه های فعال اکسیژن در سلول، در انسان سبب ایجاد بیماری هایی نظیر دیابت ملیتوس وابسته به انسولین[۱]، بیماری های قلبی – عروقی و بیماری های عصبی مانند آلزایمر[۲] می شوند (۶۵ و ۱۱۳). سلول های هوازی برای حفظ خود در برابر از عوامل آنزیمی یا غیر آنزیمی استفاده می کنند که این ترکیبات را تجزیه و از تجمع آن ها جلوگیری می نماید. این سلول ها همچنین دارای مکانیسم هایی هستند که آسیب های ایجاد شده را به شکل کارآمدی ترمیم کنند ( ۲۰ و ۳۳ ).

مطالعه آرکی هایپر ترموفیل *Pyrococcus furiosus* که مقاومت بالایی به پرتوها و توان بالایی را برای ترمیم شکست های دو رشته ای DNA ( القا شده با پرتوتابی ) نشان می دهد، تعدادی از ژن های مسئول ترمیم DNA را مشخص کرده است. این ژن ها همولوژی کمی با ژن های ترمیمی باکتریایی داشته و بیشتر به ژن های مسئول ترمیم در یوکاریوت ها شباهت دارند ( ۴۱ ). تا کنون تعدادی از اجزای این سیستم ترمیمی نظیر هلیکازها[۳] و نوکلئازهای[۴] آن، شناسایی شده است ( ۱۳۳ ).

عوامل آنتی اکسیدان غیر آنزیمی از قبیل آسکوربیک اسید[۵]، توکوفرول[۶] و کاروتن[۷] ها می توانند این عوامل استرس اکسیداتیو را کاهش دهند. این ترکیبات به میزان فراوان در میوه ها و سبزیجات وجود دارند. علاوه بر این ها، آرکی ها و باکتری ها نیز واجد پیگمان های مشابهی می باشند ( ۵۵ ).

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز[۸] که در همه ارگانیسم های هوازی از جمله در هالوفیل ها وجود دارد، می تواند با ترکیب دو رادیکال سوپراکسید، پراکسید هیدروژن به همراه یک مولکول اکسیژن تولید کند. پراکسید هیدروژن تولید شده نیز توسط کاتالاز پاکسازی می شود. این آنزیم آب اکسیژنه را به آب و اکسیژن تبدیل می کند ( ۱۸ ).

---

1 – insulin- dependent deiabete mellitus 2 – alzymer 3 – helycase 4 – nuclease
5 – ascorbic acid 6 – tokoferol 7 – carotene 8 – superoxide dismutase

پراکسیدازها نیز واکنش آنالوگی را کاتالیز می کنند که در آن یک آلکیل پراکسید[1] توسط یک احیا کننده به آب و یک مولکول الکل احیا می شود( ۱۱۷ ).

در مورد آرکی ها که در شرایط بسیار سخت و استرس زا قادر به زندگی می باشند، مکانیسم های زیادی برای دفاع در مقابل این عوامل استرس زا وجود دارد.

یکی از مهم ترین عواملی که می تواند در مقاومت آن ها نقش داشته باشد، پیگمان ۲های کارتینوئیدی[3] به ویژه باکتریوروبرین[4] است. این پیگمان‌هاا آنتی اکسیدان های قوی هستند که می توانند پرتوهای فرابنفش را به میزان زیادی جذب کنند. علاوه بر این پیگمان ها عوامل دیگری نیز در مقاومت آن ها نقش دارند ( ۱۰۷ و ۱۰۸ ). پژوهش ها نشان می دهد که غلظت های بالای درون سلولی کلرید پتاسیم می تواند از شکست های تک رشته ای و دو رشته ای DNA جلوگیری کند. همچنین می تواند با تبدیل فرم B - DNA به Z – DNA مولکول DNA را از عوامل آسیب رسان حفظ کند (۱۱۱و۱۱۲ ).

سیستم ها ی آنزیمی ویژه در این موجودات، با تولید میزان های بالای آنزیم های آنتی اکسیدان و ترمیمی یا با تولید آنزیم هایی با فعالیت بالا، از عوامل دیگر ایجاد مقاومت در این موجودات می باشند ( ۹ ).

در این پژوهش به منظور شناخت عوامل پاک کننده رادیکال های آزاد، از پراکسید هیدروژن به عنوان عامل استرس زا و از کاتالاز به عنوان عامل محافظت کننده استفاده شده است. ( سویه مورد مطالعه مقاومت بالایی را به پرتوهای فرا بنفش و یون ساز و پراکسید هیدروژن، از خود نشان داده است. ) هدف از انجام این پژوهش، بررسی یکی از مکانیسم های ایجاد مقاومت در برابر عوامل آسیب رسان به DNA در هالوفراکس جدا شده از دریاچه ارومیه در ایران است. به این منظور از پراکسید هیدروژن عنوان عامل ایجاد استرس اکسیداتیو استفاده شد و به بررسی نقش کاتالاز در مقاومت سویه مورد مطالعه برای خنثی نمودن رادیکال های آزاد حاصله از پراکسید هیدروژن پرداخته شد.

---

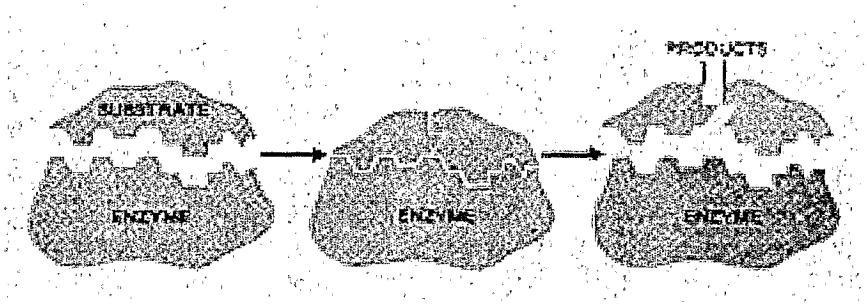
1 – alkylperoxide  2 – pigman
3 – caretenoid  4 – bacterioruberin

## ۴ – ۱ آنزیم ها

آنزیم ها بیوکاتالیزورهای اختصاصی هستند که با کاهش انرژی فعال کنندگی، بدون اثر بر روی ثابت تعادل، سرعت واکنش های بیوشیمیایی را افزایش می دهند. برخی از آنزیم ها جهت فعال شدن نیاز به کوفاکتور [1] دارند. کوفاکتور می تواند فلز یا یک ترکیب غیر پروتئینی باشد. اگر این ترکیب غیر پروتئینی از ویتامین مشتق شده باشد، کوآنزیم [2] نامیده می شود ( ۴۶ ). اگر اتصال کوفاکتور به آنزیم محکم باشد، در این صورت به این کوفاکتور بخش پروستاتیک گفته می شود. یک واکنش آنزیمی را می توان به شکل زیر نشان داد :

$$E + S <===> ES^* <===> E + P$$

به طوری که رابطه بالا نشان می دهد آنزیم در واکنش دخالت دارد. ولی در پایان بدون کم و کاست باقی می ماند. از این جهت مقدار کم آنزیم می تواند مقادیر زیادی از سوبسترا[3] را در مدت زمان بسیار کوتاهی به محصول تبدیل کند ( ۴۵ ). شکل ۱– ۱ به طور شماتیک یک واکنش آنزیمی را نشان می دهد.




شکل ۱–۱ : شکل شماتیک از یک واکنش آنزیمی

آنزیم یک واکنش غیر ممکن را ممکن نمی سازد، بلکه فقط سرعت واکنش را افزایش می دهد. آنزیم ها به طور اختصاصی عمل می کنند، لیکن میزان اختصاصی بودن آن ها متفاوت است. برخی فقط یک سوبسترا دارند، ولی

1 – cofactor 2 – coenzyme 3 – substrate

برخی چندین سوبسترا دارند. سرعت واکنش را می توان با روش های مختلف افزایش داد. کاتالیزور یا آنزیم نه جنبش مولکولی را افزایش می دهد و نه شانس برخورد را بالا می برد. بلکه با کاهش انرژی فعال کنندگی، سبب می شود مولکول هایی با کمترین انرژی از سد انرژی عبور کرده و به محصول تبدیل شوند. این عمل با تشکیل کمپلکس آنزیم – سوبسترا که بالاترین انرژی را دارد امکان پذیر می شود ( ۴۵ ).

در طبقه بندی سیستماتیک آنزیم ها را به ۶ گروه اصلی طبقه بندی می کنند : ( ۴۶)

۱- اکسیدوردوکتازها[1]

آنزیم هایی هستند که واکنش های اکسایشی و احیایی را کاتالیز می کنند.

۲ – هیدرولازها[2]

آنزیم هایی هستند مانند استرازها، پروتئازها و. . . که واکنش های هیدرولیز را کاتالیز می کنند.

۳ - ترا نسفرازها[3]

آنزیم هایی هستند که انتقال یک عامل شیمیایی را از یک سوبسترا به سوبسترا دیگر به عهده دارند

۴- ایزومرازها[4]

این آنزیم ها سبب تبدیل ایزومرهای نوری، هندسی و ساختمانی به یکدیگر می شوند.

۵ – لیگازها[5]

این آنزیم ها با هیدرولیز یک ترکیب پرانرژی که اغلب آدنوزین تری فسفات[6] است، سبب تشکیل پیوند بین دو ترکیب می شوند.

۶- لیازها[7]

این آنزیم ها سبب هیدرولیز پیوندهای فاقد آب نظیر پیوندهای پپتیدی، استری و. . . می شوند.

---

1 – oxidoreductase 2 – hydrolase 3 – transferase 4 – isomerase
5 – ligase 6 - adenosine triphosphate 7 - leyase

## ۱ – ۴ – ۱ اختصاصی بودن آنزیم ها

در سال ۱۹۳۵ برگمن[1] و همکارانش نشان دادند که دلیل عملکرد اختصاصی آنزیم ها وجود تناسب فضایی بین آنزیم و سوبسترا است و در تشکیل کمپلکس بین آنزیم و سوبسترا نیروهای هیدروفوبیک[2]، الکترواستاتیک[3] و هیدروژنی نقش دارند. در تشکیل کمپلکس آنزیم – سوبسترا بخش کوچکی از آنزیم که جایگاه فعال نامیده می شود، شرکت می کند. سطح فعال آنزیم از شیارها و پستی بلندی هایی تشکیل شده است که تقریبا فاقد آب می باشد. وجود چند گروه قطبی در این جایگاه با ایجاد بار الکتریکی، اتصال سوبسترا به آنزیم و همچنین عمل کاتالیزوری آن را امکان پذیر می سازد.

ترکیب آنزیم با سوبسترا را با تئوری های مختلفی بیان می کنند. ابتدا تئوری قفل و کلید فیشر[4] مطرح شد و بعدا تئوری مدل القایی کوشلند[5] مطرح شد که بر اساس آن، جایگاه فعال آنزیم به هنگام ترکیب با سوبسترا مکمل سوبسترا می شود و شکل فضایی مناسب را پیدا می کند ( ۴۵ ).

## ۲ – ۴ – ۱ فعالیت آنزیم

از این جهت که مقدار آنزیم در سلول ها بسیار کم می باشد، اندازه گیری آن در عصاره های سلولی با مشکل همراه است. ولی فعالیت کاتالیتیکی یک آنزیم، وسیله مناسبی برای اندازه گیری مقدار آنزیم می باشد. با اندازه گیری مقدار محصولی که تولید می شود و مقدار سوبسترایی که در واحد زمان ناپدید می شود، به شرطی که فقط غلظت آنزیم در مقدار تولید نقش داشته باشد و سایر عوامل مثل غلظت سوبسترا، pH، دما ثابت بماند، می توان مقدار کمی آنزیم را محاسبه کرد. با این روش نمی توان به سادگی تعداد مولکول های آنزیم یا مقدار آن را اندازه گیری کرد. از این جهت فعالیت آنزیم را بر حسب واحد آنزیمی[6] نشان می دهند. بر حسب تعریف یک واحد آنزیمی، مقدار آنزیمی است که در مدت زمان یک دقیقه، در شرایط مطلوب، یک میکرومول سوبسترا را به محصول تبدیل می کند. با داشتن فعالیت آنزیمی می توان مقدار نسبی یک آنزیم را در عصاره های بافتی

---

1 – bergman 2 – hydrophobic 3 – electerostatic
4 – fisher 5 – koshland 6 – enzyme unit 7 – specific aactivity

مختلف باهم مقایسه کرد. فعالیت آنزیمی را علاوه بر واحد آنزیمی می توان به صورت فعالیت ویژه [۷] آنزیم یا فعالیت مولکولی آنزیم نیز نشان داد.

فعالیت ویژه معرف فعالیت آنزیمی است که در هر میلی گرم پروتئین موجود در محلول وجود دارد. فعالیت ویژه با افزایش خلوص آنزیم افزایش می یابد. فعالیت مولکولی هر آنزیم معرف تعداد مولکول های سوبسترا است که در مدت یک دقیقه توسط یک مولکول آنزیم در شرایط اپتیمم به محصول تبدیل می شود ( ۴۶ ). هر آنزیمی در دما و pH معین بیشترین فعالیت را نشان می دهد که شرایط اپتیمم فعالیت آنزیم نامیده می شود. غلظت آنزیم و سوبسترا نیز نقش بسیار مهمی را در میزان فعالیت آنزیم دارند. در زمانی که دما و pH ثابت و مقدار زیادی سوبسترا در محیط وجود داشته باشد، سرعت واکنش بعد از طی مدت زمان کوتاهی، ارتباط مستقیم با غلظت آنزیم دارد. اگر مقدار سوبسترا به میزان مناسب نبوده و اندازه گیری سرعت واکنش بعد از مدت زمان طولانی انجام شود، سرعت واکنش به مقدار آنزیم بستگی ندارد و ثابت می ماند به گونه ای که مقدار آنزیم بتدریج زیاد می شود.

اگر غلظت آنزیم ثابت و سوبسترا متغیر باشد، افزایش غلظت سوبسترا تا حد معینی می تواند فعالیت آنزیم را با افزایش سرعت واکنش افزایش دهد. لیکن تا یک حد معینی از غلظت سوبسترا این اتفاق می افتد و به تدریج آنزیم از سوبسترا اشباع می شود و افزودن بیشتر سوبسترا هیچ اثری بر سرعت واکنش و فعالیت آنزیم ندارد( ۶۹).

### ۳ – ۴ – ۱ سنجش فعالیت آنزیم ها

بیشتر روش های سنجش فعالیت آنزیم، بر اساس میزان سوبسترایی که مصرف می شود و یا میزان محصولی که تولید می شود، انجام می گیرد. در تمام این روش ها با استفاده از اسپکتروفتومتری[۱] یا تیتریمتری[۲] و یا نشان دار کردن سوبسترا، میزان کاهش سوبسترا و یا میزان تولید محصول تعیین و متناسب با آن میزان فعالیت آنزیم سنجیده می شود ( ۴۵ ).

---

[1] - espectrophotometry 2 – titrimetry