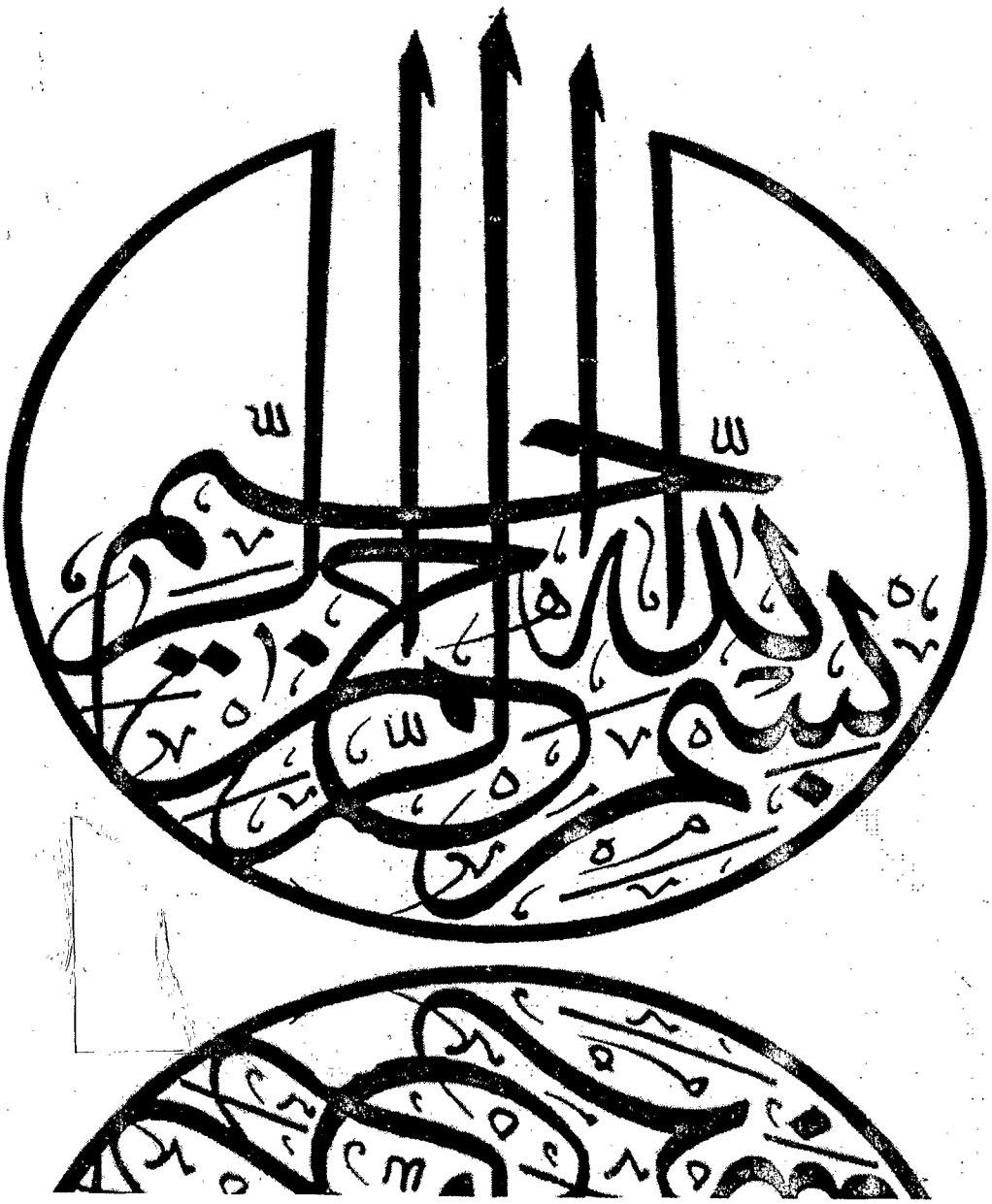
١٢٥٩٧٦



دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

دانشکده علوم زراعی

گروه زراعت و اصلاح نباتات

عنوان پایان نامه :

ارزیابی فعالیت سلولازی در چند جدایه قارچ خاکزی

جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

در رشته بیوتکنولوژی

اساتید راهنما

دکترغلامعلی رنجبر

دکتر محمد علی تاجیک قنبری

استاد مشاور

دکتر احمد اصغر زاده

نگارش

ابو الفضل لطفی

اسفند ۱۳۸۷

مرکز اطلاعات مدارک علمی ایران
تقدیم مدارک

۱۳۸۸/۵/۱۲

۱۲۵۹۷۶

تشکر و قدر دانی

در این مجال بر خود واجب می دانم که از تمامی عزیزانی که اینجانب را در انجام و به اتمام رساندن این تحقیق یاری نمودند کمال تشکر و سپاسگذاری را داشته باشم.

از:

- آقای دکترغلامعلی رنجبر و آقای دکتر محمد علی تاجیک قنبری اساتید راهنمای اینجانب، به پاس همه تلاش های دلسوزانه و حمایت های علمی و اخلاقی این عزیزان.
- آقای دکتر احمد اصغرزاده، استاد مشاور بنده، به خاطر زحمات بی شائبه و بی منت ایشان.
- اساتید محترم داوری آقایان دکتر پیردشتی، دکتر مهدیان و دکتر بهمنیار به دلیل کمک ایشان در جهت بالا بردن کیفیت این پایان نامه.
- اساتید محترم هیئت علمی دانشکده علوم زراعی به پاس مجالی که در محضرشان علم آموختم.
- پدر، مادر، برادران و خواهرم که گل های زیبای زندگیم هستند.
- دوستان و هم اتاقی‌های عزیزم مهندس محمد حسن ملکی، مهدی عارف راد و احسان خسروی نیا، میعاد کیاء و یعقوب صفدری و محمود عضدی به پاس همه کمک ها ، مهربانی‌ها و به یاد خاطرات خوبی که با این عزیزان در صفحه زندگیم رقم خورد.
- آقای مهندس ، پیغام زاده خانم‌ها مهندس زنگی ، مومنی، صمدی و علمداری دوستان و بهترین همکلاسی‌های دوران تحصیلم.

سپاسگزارم.

- تقدیم به:

آنانی که علم و ایمان را چراغ های همیشه درخشان هدایت بشر می دانند و در راه اعتلای علم و تهذیب از جان خود نیز دریغ ندارند.

محکم‌ترین پناهگاه و

مهربان‌ترین حامی

پدر،

ستاره همیشه دنباله‌دار

آسمان زندگیم

مادر

و

قلب‌های مهربان برادران و خواهرم

ارزیابی فعالیت سلولازی در چند جدایه قارچ خاکزی

چکیده

آنزیم‌ها (کاتالیزورهای بیولوژیک) در مصارف بیوتکنولوژیک متعدد مانند کشاورزی ، صنایع غذایی ،تصفیه پساب‌ها و موارد دیگر کاربردهای گوناگونی دارند. آنزیم سلولاز از جمله آنزیم‌های مهم صنعتی می‌باشد که در کشاورزی برای تجزیه ضایعات لیگنوسلولزی، در صنایع غذایی برای کاهش سلولز مواد اولیه غذایی در صنایع کاغذسازی برای نرم کردن چوب و در مصارف مختلف دیگر کاربرد دارد. در تحقیق انجام شده در این پایان‌نامه ، فعالیت سلولازی تعدادی از جدایه های قارچ های خاکزی شامل جنسهای *Fusarium* ، *Mucor* ، *Absidia* ، *Rhizomucor* ، *Rhizopus* ، *Trichoderma* ، *Cuninghamella* ، *Botrytis* ، *Aspergillus* و *Penicillium* مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور از دو محیط کشت اختصاصی کاه گندم و کربوکسی متیل سلولز(CMC) برای تولید آنزیم سلولاز استفاده شد. چهار روز پس از تلقیح قارچ ها در محیط کشت به کمک معرف‌ها میزان قندهای احیا شونده حاصل از تجزیه سلولز و پروتئین های ترشحی قارچ مورد سنجش قرار گرفتند. نمونه گیری هر سه روز یک بار و به مدت یک ماه انجام شد و نتایج حاصل با نرم افزار SAS تجزیه و تحلیل شد. نتایج نشان داد که از بین تمامی ایزوله های مورد بررسی در محیط کاه گندم بیشترین میزان تولید قند احیا شونده مربوط به ایزوله های *Trichoderma harzianum* ، *Aspergillus terreus* ، *Penicillium digitatum* و بیشترین میزان تولید پروتئین های ترشحی مربوط به ایزوله های *Trichoderma longibrachiatum* و *Fusarium oxysporum* می باشد. همچنین در محیط کربوکسی متیل سلولز(CMC) بیشترین میزان تولید قند احیا شونده مربوط به ایزوله های *Trichoderma harzianum*، *Aspergillus terreus* ، *Penicillium digitatum* و *Fusarium solani* و بیشترین میزان تولید پروتئین های ترشحی مربوط به ایزوله های*Trichoderma longibrachiatum* و *Aspergillus terreus* می باشد. در بخش دیگر تحقیق ، تأثیرpH روی فعالیت سلولازی ایزوله های برتر مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین تولید قندهای احیا شونده و تولید پروتئین های ترشحی درpH های ۵ و ۶ در هر دو محیط کاه گندم و کربوکسی متیل سلولز(CMC) مشاهده شد. در ادامه مطالعات ، آنزیم‌های سلولاز مترشحه توسط ایزوله های برتر درمحیط ، با استفاده از غلظت هشتاد درصد نمک سولفات آمونیوم و دیالیز کردن تغلیظ شدند. پروتئین های حاصل از تغلیظ محیط کشت برای بررسی pH و دمای بهینه فعالیت آنزیم و همچنین بررسی خصوصیات الکتروفورتیک آنزیم های سلولاز، مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج بررسی pH و دمای بهینه فعالیت آنزیم های استخراجی از ایزوله های برتر نشان داد که در اکثر این آنزیم ها بیشترین فعالیت مربوط به pH های ۴ تا ۵ و دماهای ۳۵ تا ۵۰ درجه سانتیگراد می باشد. همچنین وزن مولکولی سلولاز های تولیدی در ایزوله *Trichoderma longibrachiatum*، ۳۵ و ۵۰ کیلودالتون، در ایزوله *Trichoderma harzianum*، ۴۰و ۵۰ کیلودالتون، در ایزوله *Aspergillus terreus*، ۲۸ و ۶۶ کیلودالتون، در ایزوله *Penicillium digitatum*، ۴۵و ۶۰ کیلودالتون، در ایزوله *Fusarium oxysporum*، ۲۵ و۶۶ کیلودالتون و در ایزوله *Fusarium solani*، ۵۰ کیلودالتون مشاهده شد.

کلمات کلیدی : آنزیم، سلولاز، کربوکسی متیل سلولز، قند های احیا شونده، پروتئین های ترشحی، خصوصیات الکتروفورتیک.

فهرست مطالب

صفحه

عنوان

فصل اول- مقدمه ۱
۱-۱- مقدمه ۲
۱-۲- آنزیم ها ۲
۱-۳- طبقه بندی آنزیم ها ۳
۱-۴- ضرورت بررسی آنزیم‌ها ۴
۱-۵- اهداف تحقیق ۴

فصل دوم- بررسی منابع ۶
۲-۱- سلولز ۷
۲-۱-۱- تاریخچه سلولز ۷
۲-۱-۲- ساختمان شیمیایی سلولز ۷
۲-۱-۳- فرمهای سلولز و شناسایی آنها ۹
۲-۱-۴- کربوکسی متیل سلولز (CMC) ۱۰
۲-۱-۵- هیدرولیز سلولز ۱۰
۲-۱-۵-۱- هیدرولیز اسیدی سلولز ۱۰
۲-۱-۵-۲- هیدرولیز آنزیمی سلولز ۱۰
۲-۲- سلولاز ها ۱۱
۲-۲-۱- مکانیزم عمل آنزیم های سلولاز ۱۱
۲-۲-۲- کاربرد سلولازها ۱۲
۲-۲-۳- موجودات تجزیه کننده سلولز ۱۳
۲-۲-۴- تولید آنزیم سلولاز در قارچ ها ۱۳
۲-۲-۵- مکانیسم عمل آنزیم های سلولاز قارچی ۱۶
۲-۲-۶- خالص سازی سلولاز ها از قارچهای مختلف ۱۸

فصل سوم- مواد و روش ها ۲۷
۳-۱- کشت قارچ ها ۲۸
۳-۲- طرز تهیه محیط کشت های اختصاصی آنزیم سلولاز ۲۸
۳-۲-۱- محیط کشت کربوکسی متیل سلولز(CMC) ۲۸
۳-۲-۲- محیط کشت کاه گندم ۲۹
۳-۳- تلقیح و شرایط انکوباسیون محیط های کشت ۲۹
۳-۴- تعیین غلظت کلی قند های احیا شونده به روش مس-آرسنات مولیبدات (قندسنجی) ۲۹
۳-۴-۱- تهیه محلولهای معرف قند ۲۹
۳-۴-۱-۱- محلول I ۲۹

۳-۴-۱-۲- محلول II ۳۰
۳-۴-۱-۳- محلول III ۳۰
۳-۴-۱-۴- محلول IV ۳۰
۳-۴-۱-۵- محلول V ۳۰
۳-۴-۱-۶- محلول آرسنات مولیبدات ۳۰
۳-۴-۲- منحنی استاندارد قندسنجی ۳۱
۳-۵- تعیین غلظت کلی پروتئین های احیا کننده به روش برادفورد ۳۱
۳-۵-۱- منحنی استاندارد پروتئین سنجی ۳۱
۳-۶- تعیین pH بهینه برای تولید سلولاز در ایزوله های برتر ۳۲
۳-۷- نحوه تغلیظ آنزیم های سلولولیتیک ۳۲
۳-۷-۱- رسوب با سولفات آمونیوم ۳۲
۳-۷-۲- رسوب با استون ۳۲
۳-۷-۳- آماده سازی و نگهداری کیسه دیالیز ۳۳
۳-۸- الکتروفورز پروتئین ها در ژل اکریلامید ۳۳
۳-۹- رنگ آمیزی ژل با کوماسی بلو R-250 ..... ۳۳
۳-۱۰- تست تأیید آنزیم ۳۴
۳-۱۱- تعیین pH بهینه برای فعالیت سلولازهای استخراج شده از ایزوله های برتر ۳۴
۳-۱۲- تعیین دمای بهینه برای فعالیت سلولازهای استخراج شده از ایزوله های برتر ۳۴
۳-۱۳- مدل آمار ۳۵
۳-۱۴- آنالیز آماری داده‌ها ۳۵

فصل چهارم- نتایج ۳۶
۴-۱- قند سنجی ۳۷
۴-۱-۱- تجزیه واریانس داده‌های قند سنجی در محیط کشت کربوکسی متیل سلولز (CMC) و کاه گندم ۳۷
۴-۱-۲- مقایسه میانگین داده های قند سنجی ایزوله های مختلف ۳۷
۴-۱-۳- مقایسه میانگین داده های قند سنجی در محیط کشت های مختلف ۳۸
۴-۱-۴- مقایسه میانگین داده های قند سنجی بین ایزوله ها مختلف و محیط کشت کربوکسی متیل سلولز (CMC) و کاه گندم ۳۸
۴-۱-۵- نوسان میزان قندهای احیا شونده تولید شده توسط ایزوله های برتر در دوره های مختلف نمونه برداری در محیط کشت کربوکسی متیل سلولز (CMC) و کاه گندم ۳۸
۴-۲- پروتئین سنجی ۳۹
۴-۲-۱- تجزیه واریانس داده‌های پروتئین سنجی در محیط کشت کربوکسی متیل سلولز (CMC) و کاه گندم ۳۹

۴-۲-۲- مقایسه میانگین داده های پروتئین سنجی در ایزوله های مختلف ۳۹
۴-۲-۳- مقایسه میانگین داده های پروتئین سنجی در محیط کربوکسی متیل سلولز (CMC) و کاه گندم ۳۹
۴-۲-۴- مقایسه میانگین داده های پروتئین سنجی بین ایزوله ها مختلف و محیط کشت کربوکسی متیل سلولز (CMC) و کاه گندم ۴۰
۴-۲-۵- نوسان میزان پروتئین های ترشحی تولید شده توسط ایزوله های برتر در دوره های مختلف نمونه برداری در محیط کشت کربوکسی متیل سلولز (CMC) و کاه گندم ۴۰
۴-۳- تعیین pH بهینه برای تولید سلولاز در ایزوله های برتر ۴۷
۴-۴- تعیین pH بهینه برای فعالیت سلولازی آنزیم های استخراجی از ایزوله های برتر ۵۱
۴-۵- تعیین دمای بهینه برای فعالیت سلولازی آنزیم های استخراجی از ایزوله های برتر ۵۴
۴-۶- نتایج الکتروفورز و تست تایید آنزیم در ایزوله های برتر ۵۸

فصل پنجم- بحث ۶۴
۵-۱- مقایسه جدایه ها بر اساس نتایج قند سنجی ۶۵
۵-۲- مقایسه جدایه ها بر اساس نتایج پروتئین سنجی ۶۶
۵-۳- مقایسه محیط های کشت بر اساس نتایج قندسنجی و پروتئین سنجی ۶۸
۵-۴- بررسی نوسان میزان پروتئین های تام محیط در روز های مختلف در ایزوله های برتر ۶۹
۵-۵- بررسی نوسان میزان قندهای احیاشونده محیط در روزهای مختلف در ایزوله‌های برتر ۷۰
۵-۶- بررسی pH بهینه برای تولید آنزیم ۷۰
۵-۷- بررسی pH بهینه برای فعالیت آنزیم ۷۱
۵-۸- بررسی دمای بهینه برای فعالیت آنزیم ۷۲
۵-۹- خصوصیات الکتروفورتیک سلولازهای آنزیم های حاصل از ایزوله های برتر ۷۳
۵-۹-۱-*Trichoderma longibrachiatum* ۷۳
۵-۹-۲-*Trichoderma harzianum* ۷۴
۵-۹-۳-*Aspergillus terreus* ۷۴
۵-۹-۴-*Penicillium digitatum* ۷۵
۵-۹-۵-*Fusarium oxysporium* و *Fusarium solani* ۷۵
۵-۱۰ نتیجه گیری ۷۶
۵-۱۱ پیشنهادات ۷۷
منابع ۷۸
چکیده انگلیسی ۸۷

فهرست اشکال

صفحه

عنوان

فصل دوم- بررسی منابع

شکل ۲-۱ ساختار مولکولی سلولز ۷

شکل ۲-۲ ساختار بلوری سلولز..... ۸

شکل ۲-۳ زیر واحد های سلولز..... ۹

شکل ۲-۴ سه گروه آنزیم سلولاز و نحوه فعالیت آنها..... ۱۲

فصل چهارم- نتایج

شکل ۴-۱ مقایسه میانگین داده های قند سنجی در اثرات متقابل بین ایزوله ها و محیط کشت های مختلف کاه گندم و کربوکسی متیل سلولز (CMC) ۴۳

شکل ۴-۲ مقایسه میانگین داده های پروتئین سنجی در اثرات متقابل بین ایزوله ها و محیط کشت های مختلف کاه گندم و کربوکسی متیل سلولز (CMC)..... ۴۴

شکل ۴-۳ نوسان میزان پروتئین های تام آزاد شده ایزوله های برتر در محیط کربوکسی متیل سلولز (CMC) در روز های مختلف پس از تلقیح..... ۴۵

شکل ۴-۴ نوسان میزان پروتئین های تام آزاد شده ایزوله های برتر در محیط کاه گندم در روز های مختلف پس از تلقیح..... ۴۵

شکل ۴-۵ نوسان میزان قند های احیا شونده آزاد شده توسط ایزوله های برتر در محیط کربوکسی متیل سلولز (CMC) در روز های مختلف پس از تلقیح..... ۴۶

شکل ۴-۶ نوسان میزان قند های احیا شونده آزاد شده توسط ایزوله های برتر در محیط کاه گندم در روز های مختلف پس از تلقیح..... ۴۶

شکل ۴-۷ میزان قند های احیا شونده آزاد شده در pH های مختلف توسط جدایه *Aspergillus terreus* در محیط کاه گندم و کربوکسی متیل سلولز (CMC)..... ۴۷

شکل ۴-۸ میزان قند های احیا شونده آزاد شده در pH های مختلف توسط جدایه *Trichoderma harzianum* در محیط کاه گندم و کربوکسی متیل سلولز (CMC)..... ۴۸

شکل ۴-۹ میزان قند های احیا شونده آزاد شده در pH های مختلف توسط جدایه *Fusarium Solani* در محیط کاه گندم و کربوکسی متیل سلولز (CMC)..... ۴۸

شکل ۴-۱۰ میزان قند های احیا شونده آزاد شده در pH های مختلف در جدایه های *Penicillium digitatum* در محیط کاه گندم و کربوکسی متیل سلولز (CMC)..... ۴۹

شکل ۴-۱۱ میزان پروتئین های تام آزاد شده در pH های مختلف توسط جدایه *Trichoderma longibrachiatum* در محیط کاه گندم و کربوکسی متیل سلولز (CMC)..... ۴۹

شکل ۴-۱۲ میزان پروتئین های تام آزاد شده در pH های مختلف توسط جدایه *Aspergillus terreus* در محیط کاه گندم و کربوکسی متیل سلولز (CMC)..... ۵۰

شکل ۴-۱۳ میزان پروتئین های تام آزاد شده در محیط در pH های مختلف در جدایه *Fusarium oxysporum* در محیط کاه گندم و کربوکسی متیل سلولز (CMC)..... ۵۰

شکل ۴-۱۴ تاثیر pH روی فعالیت سلولازهای استخراجی از دو محیط کاه گندم و کربوکسی ۵۱

متیل سلولز (CMC) تولید شده توسط جدایه *Trichoderma longibrachiatum* .....
شکل ۴-۱۵ تاثیر pH روی فعالیت سلولازهای استخراجی از دو محیط کاه گندم و کربوکسی
متیل سلولز (CMC) تولید شده توسط جدایه *Trichoderma harzianum* ۵۲
شکل ۴-۱۶ تاثیر pH روی فعالیت سلولازهای استخراجی از دو محیط کاه گندم و کربوکسی
متیل سلولز (CMC) تولید شده توسط جدایه *Aspergillus terreus* ۵۲
شکل ۴-۱۷ تاثیر pH روی فعالیت سلولازهای استخراجی از دو محیط کاه گندم و کربوکسی
متیل سلولز (CMC) تولید شده توسط جدایه *Penicillium digitatum* ۵۳
شکل ۴-۱۸ تاثیر pH روی فعالیت آنزیم های استخراجی از *Fusarium Solani* در محیط
کربوکسی متیل سلولز (CMC)..... ۵۳
شکل ۴-۱۹ تاثیر pH روی فعالیت آنزیم های استخراجی از *Fusarium oxysporum* در
محیط کاه گندم..... ۵۴
شکل ۴-۲۰ تاثیر دما روی فعالیت آنزیم های استخراجی از دو محیط کاه گندم و کربوکسی
متیل سلولز (CMC) تولید شده توسط جدایه *Trichoderma longibrachiatum* ۵۵
شکل ۴-۲۱ تاثیر دما روی فعالیت آنزیم های استخراجی از دو محیط کاه گندم و کربوکسی
متیل سلولز (CMC) تولید شده توسط جدایه *Trichoderma harzianum* ۵۵
شکل ۴-۲۲ تاثیر دما روی فعالیت آنزیم های استخراجی از دو محیط کاه گندم و کربوکسی
متیل سلولز (CMC) تولید شده توسط جدایه *Aspergillus terreus* ۵۶
شکل ۴-۲۳ تاثیر دما روی فعالیت آنزیم های استخراجی از دو محیط کاه گندم و کربوکسی
متیل سلولز (CMC) تولید شده توسط جدایه *Penicillium digitatum* ۵۶
شکل ۴-۲۴ تاثیر دما روی فعالیت آنزیم های استخراجی *Fusarium Solani* از محیط
کربوکسی متیل سلولز (CMC) ۵۷
شکل ۴-۲۵ تاثیر دما روی فعالیت آنزیم‌های استخراجی *Fusarium oxysporum* از محیط کاه
گندم..... ۵۷
شکل ۴-۲۶ نقوش باندهای الکتروفورزی محصول استخراج پروتئین از ایزوله
Trichoderma longibrachiatum در محیط کشت کاه گندم و کربوکسی متیل سلولز(CMC)..... ۵۹
شکل ۴-۲۷ نقوش باندهای الکتروفورزی محصول استخراج پروتئین از ایزوله
Trichoderma harzianum در محیط کشت کاه گندم و کربوکسی متیل سلولز(CMC)..... ۶۰
شکل ۴-۲۸ نقوش باندهای الکتروفورزی محصول استخراج پروتئین از ایزوله
Aspergillus terreus در محیط کشت کاه گندم و کربوکسی متیل سلولز(CMC)..... ۶۱
شکل ۴-۲۹ نقوش باندهای الکتروفورزی محصول استخراج پروتئین از ایزوله
Penicillium digitatum در محیط کشت کاه گندم و کربوکسی متیل سلولز(CMC)..... ۶۲
شکل ۴-۳۰ نقوش باندهای الکتروفورزی محصول استخراج پروتئین از ایزوله
Fusarium oxysporum در محیط کشت کاه گندم و ایزوله *Fusarium solani* در محیط
کربوکسی متیل سلولز(CMC)..... ۶۳

فهرست جداول

صفحه

عنوان

فصل اول- مقدمه
جدول ۱-۱ مقایسه خصوصیات آنزیم‌های برون سلولی و درون سلولی..... ۳

فصل چهارم- نتایج
جدول ۴-۱ نتایج تجزیه واریانس داده‌های قند سنجی و پروتئین سنجی در محیط کشت کربوکسی متیل سلولز (CMC) و کاه گندم ۴۱
جدول ۴-۲ مقایسه میانگین داده های قند سنجی و پروتئین سنجی در محیط کشت های کربوکسی متیل سلولز (CMC) و کاه گندم ۴۱
جدول ۴-۳ مقایسه میانگین داده های قند سنجی و پروتئین سنجی در ایزوله های مختلف ۴۲

فصل اول

مقدمه

۱-۱- مقدمه

پلی ساکارید ها پلیمرهای کربوهیدراتی شامل دها ،صدها ویا هزاران واحد منوساکارید می باشد. اغلب پلی ساکارید های معمولی حاوی گلوکز به عنوان واحد منوساکاریدی ساختارشان می باشند. پلی ساکارید ها به وسیله گیاهان، جانوران و انسان سنتز شده و دارای دو وظیفه مهم هستند: برخی پلی ساکاریدها به منظور ذخیره انرژی شیمیایی به کار می روند و برخی دیگر دارای وظیفه ساختمانی هستند. دیواره سلولی گیاهان متشکل از ترکیبات پلی ساکاریدی هستند که بیش از ۹۰٪ دیواره سلولی را می سازند و به سه گروه سلولز، همی سلولز و پکتین تقسیم می شوند (۵۶). سلولز مهمترین پلی ساکارید دیواره سلولی و یکی از فراوان ترین هیدروکربن های موجود در طبیعت است که حدود ۴۰٪ از کل توده زنده گیاهی را تشکیل می دهد. سلولز از یک پلیمر خطی β-۱و۴ پیوسته شده با باقیمانده های D- گلوکز تشکیل شده است. نقش اصلی پلیمر سلولز ، تأمین استحکام دیواره سلولی گیاه می باشد (۸۸). بسیاری از موجودات قادر به هضم سلولز نیستند و آن را بدون تغییر دفع می‌کنند اما برخی جانوران مثل نشخوارکننده ها و موریانه ها می‌توانند سلولز را به کمک میکروارگانیسم هایی که در دستگاه گوارش آنها زندگی می‌کنند، هضم کنند. این میکروارگانیسمها با آزادکردن آنزیم هایی به هضم سلولز کمک می‌کنند.

۱-۲- آنزیم ها

آنزیم ها پروتئین هایی در نقش کاتالیزور هستند که کمترین میزان انرژی مورد نیاز برای انجام یک واکنش را بدون اینکه استفاده شوند فراهم می‌کنند. آنزیم ها در نیمه دوم قرن ۱۹ کشف شده و پس از آن در فرایندهای صنعتی متعدد بکار گرفته شده اند. با پیشرفت هایی در زمینه بیوتکنولوژی در طی ۳ دهه گذشته در زمینه ژنتیک و مهندسی پروتئین، آنزیم ها جایگاه خود را در بسیاری از فرایندهای صنعتی جدید پیدا کرده اند. آنزیم های میکروبی بطور روزمره در بسیاری بخشهای صنعتی اقتصادی مرتبط با عوامل محیطی استفاده می شوند(۱۷).

سابقه استفاده از فرآیندهای مرتبط با آنزیم ها به تمدنهای قدیمی برمی‌گردد. بشر از قدیم متوجه نقش بعضی موجودات در فرآوری برخی مواد غذایی بوده که البته امروز مشخص گردیده آنزیم-های مترشحه آنها در تبدیل کیفیت و تولید محصول جدید نقش داشته اند. افزایش دانش انسان و پیشرفت های بدست آمده در کنار آن، امکان جداسازی و استفاده از آنزیمها در غیاب ارگانیسم منبع یا مولد را فراهم کرده است تا جاییکه برخی از آنها به کالا های تجارتی گران‌قیمتی تبدیل شده‌اند. غالب آنزیم‌های صنعتی منشأ میکروارگانیسمی و به ویژه قارچی دارند (۳۱).

۱-۳- طبقه بندی آنزیم ها

آنزیم‌ها بر اساس اینکه در کجا توسط میکروارگانیسم‌ها ترشح شوند به دو گروه برون سلولی[۱] و درون سلولی[۲]، تقسیم می شوند. کوپر (۱۹۸۳) بیان کرد که آنزیم ها معمولاً برون سلولی بوده، وزن مولکولی پایینی داشته، بسیار مقاوم بوده و ممکن است در چندین شکل با عملکرد مشابه[۳] تولید شده باشند و در اندازه، مقاومت و توانایی تجزیه دیواره سلولی، و تنظیم و وظیفه با هم اختلاف دارند.

آنزیم های برون سلولی که در محیط بیرون از سلول ها قرار دارند و ترشح می شوند، غالباً محلول در آب[۴] هستند، بنابراین می‌توان آنها را به آسانی و سرعت ازمحیط کشت استخراج و خالص‌سازی کرد. برخی خصوصیات آنزیم‌های برون سلولی و درون سلولی در جدول زیر نشان داده‌شده‌است:

جدول ۱-۱: مقایسه خصوصیات آنزیم‌های برون سلولی و درون سلولی.

آنزیم های برون سلولی	آنزیم های درون سلولی
به راحتی جداسازی می شوند	بسیار سخت جداسازی می شوند
جهت استخراج احتیاجی به له کردن سلول ها نیست و به مقدار زیادی در محیط اطراف سلول‌ها ترشح می شود	تک‌تک سلول ها باید شکسته شوند تا آنزیم ها از آنها رهاسازی شوند
اغلب ترشح اختصاصی است، یا به همراه مقدار کمی از سایر آنزیم ها	مجبور هستیم سلول ها را از سلول های نخاله و سایر آنزیم ها و مواد شیمیایی دیگر جدا سازی نماییم
بسیار مقاوم	غالباً مقاوم
خالص سازی و جداسازی آن آسان و ارزان است	خالص سازی و جداسازی آن سخت و گران است

۱- *Extracellular*

۲- *Intracellular*

۳- *Isozyme*

۴- *Hydrolytic*

۱-۴- ضرورت بررسی آنزیم‌ها:

با وجود توسعه جهانی صنعت تولید و تهیه آنزیم، این صنعت درکشور ما هنوز رونق نیافته است و همچنان آنزیمهای پر مصرف مورد استفاده درصنایع غذایی، نساجی، پاک کننده ها و داروسازی از طریق واردات تامین می شود. علت اصلی این عقب ماندگی نبود تحقیق و اطلاعات داخلی کافی است. نکته قابل توجه دیگر اینکه غالب اطلاعات کلیدی و بویژه جدایه‌هایی که تولید مقادیر بالایی آنزیم می‌کنند، به هیچ عنوان در اختیار مصرف‌کنندگان یا مشتریان تجارتی قرار نمی گیرد و در تمام دنیا به عنوان منابع سری و محرمانه از آنها حفاظت می شود. تنها راه خروج از این وضع بدست آوردن دانش و منابع تولید بومی و داخلی است. دراین تحقیق تلاش خواهد شد اطلاعات پایه و زیربنایی مورد نیاز، تولید و در اختیار سایر محققین قرار گیرد.

امروزه قریب به چهار هزارآنزیم شناخته شده است که دویست آنزیم از بین آنها استفاده تجاری و صنعتی دارند(۱۷). تا سالهای دهه ۱۹۶۰ تجارت آنزیم‌های صنعتی فقط شامل چند میلیون دلار بود اما از آن زمان تا به‌حال بازار جهانی آنزیم‌های صنعتی رشد فوق العاده‌ای یافته است . همچنین موارد استفاده ازآنزیم های صنعتی نیز همزمان با دستکاری‌هایی در ساختمان آنها در تمام دنیا توسعه یافته و هم اکنون نیز در حال گسترش است (۸۷). تقاضای جهانی آنزیم‌ها توسط ۱۲ تولیدکننده بزرگ و۴۰۰ تهیه کننده کوچک برآورده می‌شود . بیش از ٪۶۰ آنزیم‌های صنعتی جهان در اروپا تولید می شوند و حداقل ٪۷۵ آنزیم‌های صنعتی هیدرولیتیک[۱] هستند که سلولازها از آن جمله هستند (۷۵).

۱-۵- اهداف تحقیق

در این تحقیق جدایه های مختلف مربوط به هفت جنس قارچی که از مناطق مختلف کشور جمع آوری شده برای فعالیت سلولازی مورد ارزیابی قرار خواهند گرفت. با انتخاب جدایه های برتر به لحاظ فعالیت سلولولیتیکی ، زمان و pH پیک ترشح آنزیم در این جدایه ها تعیین خواهد شد. سپس با

۱-*Hydrolytic*

استخراج آنزیم های ترشحی قارچ ها از محیط کشت های اختصاصی ترشح این آنزیم خصوصیاتی همچون pH بهینه آنزیم و همچنین خصوصیات الکتروفورتیکی این آنزیم ها بررسی خواهد شد.

فصل دوم

بررسی منابع

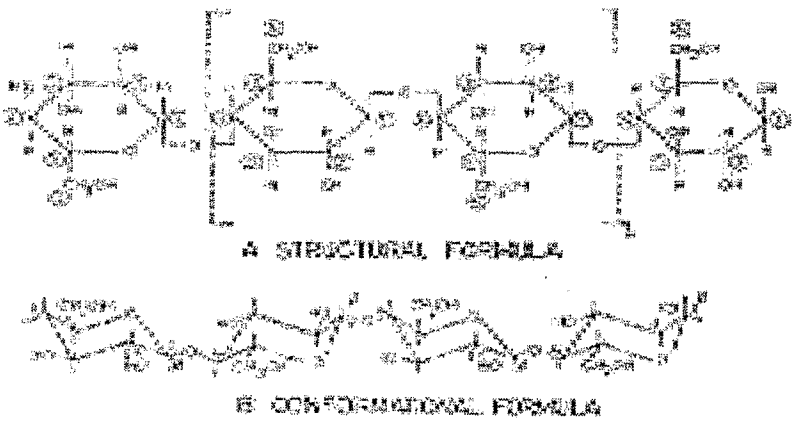
۲-۱- سلولز

۲-۱-۱- تاریخچه سلولز

سلولز در سال ۱۸۳۸ توسط آنسلمی[۱] شیمیدان فرانسوی کشف شد که آن را از مواد گیاهی جدا کرد و فرمول شیمیایی آن را تعیین نمود. سلولز برای اولین بار به طور موفقیت آمیزی برای تولید پلیمر ترموپلاستیک توسط کارخانه هیات[۲] در سال ۱۸۷۰ بکار برده شد. هرمن و استادینگر[۳] ساختار پلیمر سلولز را در سال ۱۹۲۰ تعیین کردند. این ترکیب به طور شیمیایی در سال ۱۹۹۲ (بدون بکار بردن هیچ نوع آنزیمی) به وسیله کوبایاشی و شودا[۴] سنتز شد.

۲-۱-۲- ساختار شیمیایی سلولز

سلولز یا β-۱و۴ گلوکان، پلیمر پیوند شده β-۱و۴ گلوکز می باشد (شکل ۲-۱)، که از انرژی خورشیدی و دی اکسید کربن طی فرایند فتوسنتز تولید می‌شود (۱۹).



شکل ۲-۱: ساختار مولکولی سلولز

۱- Anselme (1838)

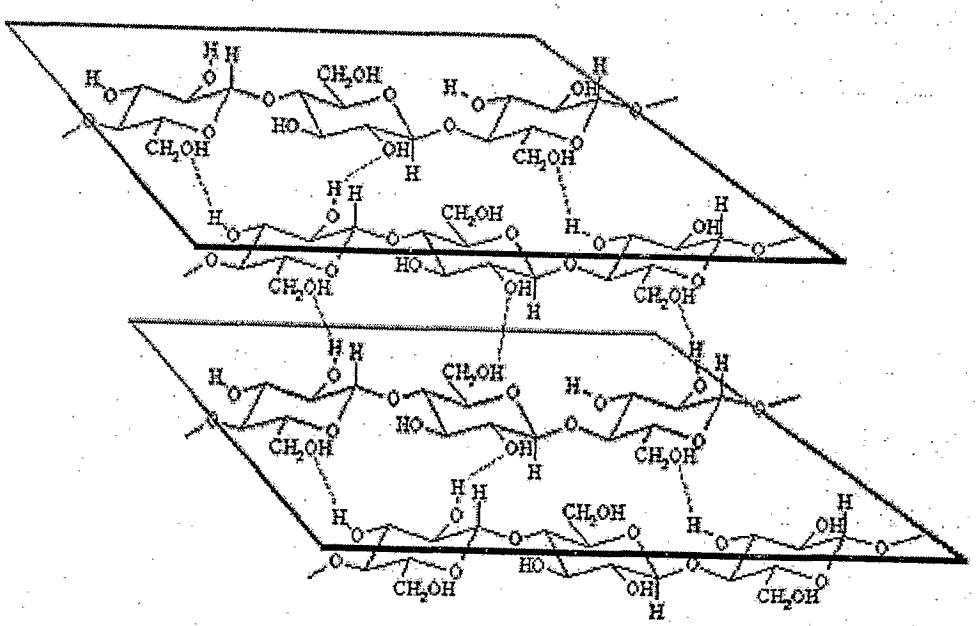
۲- Hyatt factory (1870)

۳- Hermann & Staudinger (1920)

۴- Kobayashi & shoda (1992)

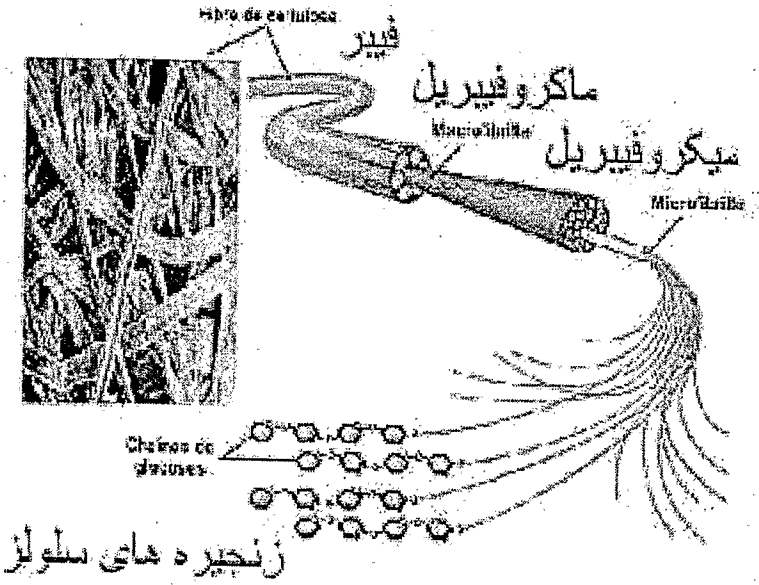
فتوسنتز جریانی است که به میزان $۱۰^{۱۰} \times ۷/۲$ تن وزن خشک سلولز تولید می‌کند (۵۱). سلولز فراوان‌ترین پلی ساکارید طبیعت و حدود ۳۳ درصد کل مواد گیاهی را تشکیل می دهد و به همراه یک همی سلولز بنام زیلان در دیواره‌های سلول‌های گیاهی به طور چسبیده به هم قرار دارند. سلولز علاوه بر سلول هالی گیاهان سبز در تعدادی از آلگها و اوومایست ها نیز وجود دارد (۱۸).

در مولکول سلولز مولکولهای β - گلوکز نسبت به یکدیگر چرخش ۱۸۰ درجه‌ای دارند. ضمن برقراری اتصال بین دو مولکول β - گلوکز از OH متصل به کربن ۴ یک مولکول و OH کربن شماره ۱ مولکول بعدی یک مولکول آب جدا می‌شود و پل اکسیژنی برقرار می‌شود. از سوی دیگر در مولکول سلولز امکان برقراری پیوندهای هیدروژنی نیز وجود دارد (شکل۲-۲). پیوستن دو مولکول β - گلوکز موجب تشکیل یک مولکول سلوبیوز می‌شود (۷).



شکل ۲- ۲ ساختمان بلوری سلولز

هر ۵ مولکول سلوبیوز با آرایش فضایی مکعبی شکل ، بلور سلولز را بوجود می‌آورند و از مجموعه بلورهای سلولز ، رشته ابتدایی یا میسل[۱] سلولز تشکیل می‌شود. مجموعه میسلها ، میکروفیبریل[۲] سلولزی را بوجود می‌آورند که قطری حدود ۲۵ نانومتر دارد.از مجموع حدود ۲۰ میکروفیبریل ، ماکروفیبریل[۳] سلولزی تشکیل می‌شود(شکل۲-۳). فیبرهای سلولزی نامحلول در آب شامل هر دو نوع پیوند هیدروژنی داخل و خارج زنجیره ای می شود (۸).



شکل ۲-۳ زیر واحد های سلولز

۲-۱-۳- فرم های سلولز و شناسایی آنها

α - سلولز: این فرم از سلولز در محلول ۱۷/۵ درصد از هیدروکسید سدیم در بیست درجه سانتیگراد حل نمی‌شود.

β - سلولز: β - سلولز در این محلول حل شده اما به محض اسیدی کردن محلول ته‌نشین می‌شود.

۱- Misel
۱- Microfibril
۲- Macrofibril