Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

دانشگاه الزهرا (س)

دانشکده علوم پایه

پایان نامه

جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

رشته میکروبیولوژی

عنوان

جداسازی میکروارگانیسم های مولد لیپاز و کاربرد آنها در پیش تیمار پسابهای لبنیات در شرایط بی هوازی

اساتید راهنما

دکتر روحا کسرای کرمانشاهی

دکتر محسن نصرتی

استاد مشاور

دکتر زهرا موسوی نژاد

دانشجو

الهه مبارک قمصری

خرداد ماه ۱۳۹۰

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

چکیده:

در دو دهه اخیر راکتورهای بیهوازی به طور وسیع جهت تیمار پسابهای دارای مقادیر بالای چربی و پروتئین به کارمیروند. کاربرد یک فرآیند پیش تیمار به منظور هیدرولیز و حل چربی ها ممکن است تجزیه زیستی پسابهای چرب را بهبود داده، منجر به تسریع فرآیند وکاهش زمان گردد. تیمارهای چنین پسابهایی از منابع مختلف یک نمونه از کاربردهای جدید و امید بخش برای لیپازها میباشد.

در این پژوهش تعدادی باکتری تولید کننده لیپاز از یک نمونه پساب شرکت فرآوری روغن جداسازی شدند. شناسایی جدایه ای که بیشترین فعالیت لیپازی را نشان داد با استفاده از تعیین توالی قسمتی از ژن 16S rDNA و آزمون های بیوشیمیایی تاییدی انجام گرفت. نتایج حاصل نشان دادند که جدایه KM110 متعلق به جنس *Pseudomonas* می باشد و 98.94 درصد به گونه *Pseudomonas aeruginosa* شباهت دارد. بهینه سازی محیط کشت نشان داد که حداکثر تولید آنزیم در حضور ۲٪ روغن زیتون به عنوان منبع کربن، پپتون و فسفات آمونیم بترتیب به عنوان منابع نیتروژن آلی و معدنی، pH ۷و دمای $^{\circ}C$ ۳۰، با ۵٪ غلظت مایه تلقیح و ۱۵۰rpm، میباشد.

عصاره آنزیمی جدایه KM110 با فعالیت ۰/۳ U/ml جهت پیش تیمار آنزیمی یک نمونه پساب ساختگی لبنیات مورد استفاده قرار گرفت. پساب ساختگی لبنیات با غلظت ۱۰۰۰ mg/l چربی به مدت ۴۸ ساعت در دمای $45^{\circ}C$ با ۱۰٪ v/v عصاره آنزیمی گرماگذاری شد. هر دو پساب خام (بدون آنزیم) و تیمار شده آنزیمی به یک بیو راکتور بسته (Bach) افزوده شدند. بعد از گذشت ۱۳ روز راندمان حذف COD، ۹۰ درصد و تولید ۴۷۱۰ ml بیوگاز برای پساب هیدرولیز شده بیشتر از مقادیر مربوط به پساب خام بود (راندمان حذف COD، ۶۶ درصد و تولید ۲۳۳۰ ml بیوگاز).

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه

۱.۱. بیوتکنولوژی ۱

۱.۲. معرفی لیپازها ۳

۱.۳ لیپازهای میکروبی و انواع باکتری های مولد آن ۴

۱.۴ ویژگی های ساختمانی لیپازها ۵

۱.۵. پیشینه تاریخی ۹

۱.۶ واکنش های کاتالیز شونده توسط لیپاز ۱۰

۱.۷. لیپازها در صنعت ۱۱

۱.۷.۱ به کارگیری آنزیم های قلیادوست و مقاوم به دما ۱۳

۱.۷.۲ مزایای استفاده از لیپازهای باکتریایی در صنعت ۱۴

۱.۸. کاربردهای لیپازها ۱۴

۱.۸.۱ لیپازها در تصفیه فاضلاب و مواد زائد ۱۶

۱.۹. هاضم بیهوازی ۱۸

فصل دوم: مواد وروشها

۲.۱ وسایل و دستگاه های به کار رفته در این تحقیق ۲۳

۲.۲ مواد شیمیایی به کار رفته در این تحقیق ۲۴

۲.۳ محیط کشت های به کار رفته در این تحقیق ۲۵

۲.۴ ترکیبات محیط کشت های مورد استفاده ۲۶

۲.۴.۱ ترکیبات محیط های جداسازی ۲۶

۲.۴.۲ ترکیبات محیط های تولید ۲۷

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

۲-۵ روش تهیه محیط کشت های مورد استفاده ۲۸
۲-۵-۱ محیط تری بوتیرین آگار ۲۸
۲-۵-۲ محیط جداسازی حاوی روغن زیتون ۲۸
۲-۵-۳ محیط ردامین B روغن زیتون ۲۹
۲-۵-۴ محیط تری بوتیرین مایع ۳۰
۲-۵-۵ محیط تولید حاوی روغن زیتون ۳۰
۲-۶ محیط پیش کشت ۳۰
۲-۷ محیط تولید ۳۱
۲-۸ نمونه گیری ۳۱
۲-۹ غنی سازی میکروارگانیسمها ۳۱
۲-۱۰ روش انتخاب میکروارگانیسم تولید کننده لیپاز ۳۲
۲-۱۱ روش کشت در محیط تولید ۳۲
۲-۱۲ تهیه مایع رویی حاوی آنزیم از کشت میکروبی ۳۳
۲-۱۳ سنجش فعالیت کمی آنزیم به روش اسپکتروفوتومتری ۳۳
۲-۱۴ محیط کشت ذخیره ۳۴
۲-۱۵ نحوه تهیه بافرهای مورد استفاده در این تحقیق ۳۴
۲-۱۵-۱ روش تهیه بافر Tris-HCl (pH: ۸-۹) ۳۴
۲-۱۵-۲ روش تهیه بافر Glysin-NaOH (pH: ۱۰-۱۱) ۳۵
۲-۱۵-۳ روش تهیه بافر سیترات- فسفات (pH: ۳-۷) ۳۵
۲-۱۶ نرم افزارها و برنامه های مورد استفاده ۳۶
۲-۱۷ شناسایی ژنتیکی جدایه برتر ۳۶

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

۲ ۱۷ ۱ استخراج DNA به روش ست بافر ۳۶
۲ ۱۷ ۲ استخراج DNA به روش فنل کلروفرم ۳۷
۲ ۱۷ ۳ روش استفاده از کیت DNA Extraction ۳۸
۲ ۱۷ ۴ روش نگهداری DNA ۴۱
۲ ۱۷ ۵ واکنش زنجیره ای پلیمراز یا PCR (Polymerase Chain Reaction) ۴۲
۲ ۱۸ آزمون های تاییدی براساس خصوصیات ریخت شناسی و بیوشیمیایی ۴۴
۲ ۱۸ ۱ آزمون های کاتالاز، اکسیداز و رنگ آمیزی گرم ۴۴
۲ ۱۸ ۲ کشت بر روی محیط شیب دار TSI آگار ۴۴
۲ ۱۸ ۳ آزمون SIM ۴۴
۲ ۱۸ ۴ آزمایش P. agar برای تشخیص رنگدانه ۴۵
۲ ۱۸ ۵ آزمایش Methyl Red Vogas Proskaure (MR VP) ۴۵
۲ ۱۸ ۶ رشد در دمای ۴۲°C ۴۵
۲ ۱۸ ۷ آزمون اکسیداتیو فرمانتاتیو (OF) ۴۶
۲ ۱۸ ۸ آزمون رشد در محیط King B برای تشخیص پیگمان پیوردین ۴۶
۲ ۱۸ ۹ آزمون سیترات ۴۷
۲ ۱۹ بهینه کردن شرایط تولید لیپاز توسط جدایه منتخب ۴۷
۲ ۱۹ ۱ بررسی اثر منابع مختلف کربنی بر روی تولید لیپاز ۴۷
۲ ۱۹ ۲ بررسی منابع مختلف نیتروژنی بر روی تولید لیپاز ۴۷
۲ ۱۹ ۳ تاثیر دور شیکر بر روی تولید لیپاز ۴۷
۲ ۱۹ ۴ بررسی غلظت مایه تلقیح بر روی تولید لیپاز ۴۸
۲ ۱۹ ۵ بررسی تاثیر pH محیط تولید روی تولید بر لیپاز ... ۴۸

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

۲ ۱۹ ۶ بررسی تاثیر دما روی تولید بو لیپاز ۴۸
۲ ۲۰ سنجش فعالیت آنزیم بعد از بهینه کردن فاکتورهای موثر در تولید لیپاز ۴۸
۲ ۲۱ بررسی ویژگیهای مهم آنزیم: ۴۹
۲ ۲۱ ۱ بررسی تاثیر pH های مختلف روی فعالیت آنزیم ۴۹
۲ ۲۱ ۲ بررسی تاثیر pH های مختلف روی پایداری آنزیم .. ۵۰
۲ ۲۱ ۳ بررسی تاثیر دماهای مختلف روی فعالیت آنزیم ۵۰
۲ ۲۱ ۴ بررسی تاثیر دماهای مختلف روی پایداری آنزیم ۵۰
۲ ۲۱ ۵ بررسی تاثیر نمک های مختلف روی فعالیت آنزیم .. ۵۰
۲ ۲۱ ۶ بررسی تاثیر تعدادی دترجنت روی فعالیت آنزیم ... ۵۱
۲ ۲۲ روش تهیه پساب ساختگی لبنی ۵۱
۲ ۲۳ مرحله هیدرولیز آنزیمی ۵۱
۲.۴ هاضم بیهوازی ۵۱
۲ ۲۵ روش اندازه گیری COD به روش کالیمتری ۵۳

فصل سوم: نتایج

۳ ۱ جداسازی و غربال گری باکتری ها ۵۶
۳ ۱ ۱ غربال گری در محیط های تیری بوتیرین آگار و محیط حاوی روغن زیتون ۵۶
۳ ۱ ۲ غربال گری در محیط رودامین B روغن زیتون ۵۶
۳ ۲ سنجش میزان فعالیت لیپازی در محیط های مایع ۵۷
۳ ۳ بررسی نتایج شناسایی باکتری به روش ژنتیکی ۵۷
۳ ۱ ۱ شناسایی جدایه KM110 به کمک تعیین توالی 16S rDNA ۵۷

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

۳ ۲ ۳ بررسی شباهت توالی نوکلوتیدی ژن ۱۶S rDNA جدایه KM110 با سویه های ثبت شده دو بلنک ژنی ۶۰
۳ ۳ ۳ درخت فیلوژنتیک مربوط به جدایه KM110 ..... ۶۲
۳ ۴ آزمون های تاییدی بیوشیمیایی ۶۴
۳ ۵ بهینه کردن شرایط محیط کشت برای تولید آنزیم ۶۵
۳ ۵ ۱ بررسی منابع مختلف کربنی بر روی رشد و تشکیل آنزیم لیپاز ۶۵
۳ ۵ ۲ بررسی اثر مقادیر مختلف روغن زیتون روی رشد و تشکیل آنزیم لیپاز ۶۵
۳ ۵ ۳ بررسی منابع مختلف نیتروژنی بر روی رشد و تشکیل آنزیم لیپاز ۶۶
۳ ۵ ۴ بررسی اثر pH محیط کشت روی رشد و تشکیل آنزیم لیپاز ۶۸
۳ ۵ ۵ بررسی میزان مایه تلقیح بر روی رشد و تشکیل آنزیم لیپاز ۷۰
۳ ۵ ۶ تاثیر دور شیکر بر روی رشد و تشکیل آنزیم لیپاز ۷۰
۳ ۵ ۷ بررسی اثر دماهای مختلف روی رشد و تشکیل آنزیم لیپاز ۷۱
۳ ۵ ۸ مقایسه میزان فعالیت آنزیم در محیط تولید قبل و بعد از بهینه سازی ۷۳
۳ ۶ بررسی برخی ویژگیهای مهم لیپاز ۷۴
۳ ۶ ۱ بررسی اثر دماهای مختلف روی فعالیت و پایداری آنزیم لیپاز ۷۴
۳ ۶ ۲ بررسی اثر pH های مختلف روی فعالیت و پایداری آنزیم لیپاز ۷۵
۳ ۶ ۳ بررسی میزان فعالیت آنزیم در حضور نمک های مختلف ۷۷
۳ ۶ ۴ بررسی میزان فعالیت آنزیم در حضور دترجنت های مختلف ۷۸
۳ ۷ نتایج هیدرولیز آنزیمی پسابه لبنی ساختگی ۷۸
۳ ۸ نتایج هضم بیهوازی ۸۰

فصل چهارم: بحث

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

۴ ۱ ضرورت پژوهش در زمینه پیش تیمار آنزیمی پساب های حاوی مقادیر بالای چربی. ۸۳
۴ ۲ نمونه گیری و غربال سازی باکتری های تولید کننده لیپاز. ۸۶
۴ ۳ سنجش فعالیت آنزیم به روش اسپکتروفتومتری. ۸۷
۴ ۴ بررسی تاثیر فاکتورهای مهم محیط تولید روی میزان رشد وتشکیل لیپاز. ۸۸
۴.۴.۱ اثر منابع کربنی ۸۸
۴.۴.۲ اثر منابع نیتروژنی ۸۹
۴.۴.۳ اثر فاکتور pH ۹۱
۴.۴.۴ اثر دما ۹۱
۴.۴.۵ اثر غلظت مایه تلقیح ۹۱
۴.۴.۶ اثر دور شیکر ۹۲
۴ ۵ بررسی ویژگیهای مهم آنزیم ۹۴
۴ ۵ ۱ اثر pH روی فعالیت و پایداری آنزیم. ۹۴
۴ ۵ ۲ اثر دما روی فعالیت و پایداری آنزیم. ۹۵
۴ ۵ ۳ پایداری آنزیمی در حضور یونهای معدنی مختلف. ۹۶
۴ ۵ ۴ پایداری آنزیمی در حضور دترجنت های مختلف ۹۶
۴ ۶ تاثیر پیش تیمار آنزیمی روی عملکرد هاضم بیهوازی ۹۷
۴ ۷ بررسی شناسایی سویه KM110. ۹۷
پیشنهادات ۹۹

فصل پنجم: پیوست

۵ ۱ جدول اختصارات و واحدها ۱۰۰
۵ ۲ تعیین توالی پرایمر (Forward). ۱۰۱

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

۵ ۳ تعیین توالی (پرایمر Reverse) ۱۰۴

۵ ۴ توالی تکثیر شده توسط هر یک از پرایمرها بعد از ادغام شدن ۱۰۹

منابع ۱۱۰

چکیده انگلیسی

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

فصل اول

مقدمه

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

۱-۱ بیوتکنولوژی

علم بیوتکنولوژی تحت عنوان بکارگیری ارگانیسم ها یا فرایندهای زیستی در صنایع تولیدی و خدماتی تعریف می شود. در این قلمرو از دانش، علوم مختلف به همراه میکروبیولوژی صنعتی، صنایع کاملا نوینی خواهند آفرید که انرژی فسیلی اندکی لازم دارند و اقتصاد جهانی را به ویژه در سده بعدی تغییر خواهند داد.

بیوتکنولوژی را حاصل از دو عامل اساسی و به صورت همراه می بایست تعریف کرد: یکی از عوامل، بدست آوردن یک کاتالیزور مناسب برای یک فرایند خاص و عامل دوم، ایجاد شرایط و امکاناتی برای به کار گرفتن کاتالیزور بیولوژیکی است. در حال حاضر مناسب ترین و ثابت ترین کاتالیزورهای بیولوژیک در فرایندهای میکروبیولوژی صنعتی را میکروارگانیسم ها به خصوص باکتری ها، مخمرها و قارچ های رشته ای تشکیل می دهند. میکروارگانیسم های مورد استفاده معمولا از طبیعت جدا می شوند و توسط روش های مختلفی از نظر ژنتیکی تغییر یافته و با قدرت تولید بالا در صنعت مورد استفاده قرار می گیرند.

در حقیقت، توجه انسانها به یافتن منابع جدید غذایی و نگرانی از عدم جایگزین شدن منابع موجود در جهان و افزایش روز افزون جمعیت سبب پیدایش این علم گردید. از جمله عوامل گسترش و شناخت بیشتر این علم نیز پیشرفت در زمینه تکنولوژی آنزیم ها و کاربرد آنهاست. گونه های مختلفی از میکرو ارگانیسم ها آنزیم تولید می کنند. از نقطه نظر اقتصادی و صنعتی، چون میکرو ارگانیسم ها در شرایط فرآیند شده، سریع تر رشد می کنند و به علت استفاده آنها از مواد طبیعی ارزان قیمت که قابل استفاده برای غذای انسان و دام نیست، به عنوان یکی از منابع تولید آنزیم ها مورد توجه قرار گرفته اند (**فرازمند** علی (۱۳۷۱)، معظمی نسرین(۱۳۶۹).

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

آنزیم ها ترکیباتی هستند که به طور وسیع و گسترده در صنایع مختلف مورد استفاده قرار می گیرند و بهره برداری از مواد خام را بهبود می بخشند. اگر چه بیشتر آنزیم های مفید از منابع گیاهی و حیوانی استخراج شده اند اما افزایش تولید آنزیم ها با منشا گیاهی و حیوانی جهت تامین تقاضای بازار امکان پذیر نمی باشد. به دلایل اقتصادی انتظار می رود بیشتر پیشرفت های آینده متکی به آنزیم های با منشا میکروبی باشد.

آنزیم های میکروبی نسبت به آنزیم های گیاهی و حیوانی مفیدتر می باشند بعلت:

- تنوع زیاد فعالیتهای کاتالیتیکی سودمند
- امکان بازدهی بالا
- آسان بودن دستکاری ژنتیکی
- تولید منظم به علت نبود نوسانات فصلی
- رشد سریع میکروارگانیسم ها در محیط کشت های ارزان قیمت.

علاوه بر اینها، آنزیم های میکروبی پایدارترند و تولیدشان نیز آسان تر است.

تنها ۲ درصد از میکروارگانیسم های دنیا به عنوان منابع تولید کننده آنزیم بررسی شده اند. به طور کلی سلول های میکروبی را به آسانی می توان بکار گرفت زیرا غربال کردن میکروارگانیسم هایی که تولید کننده محصول مورد نظر می باشند آسانتر بوده، نیازهای غذایی میکروارگانیسم ها ساده تر بوده و زمان نسل کوتاهی دارند. از طرفی بوسیله دستکاریهای محیطی و ژنتیکی می توان میزان تولید را در سلولهای میکروبی افزایش داد.

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

در واقع آنزیم ها به عنوان کاتالیزورهای طبیعی مطرح می باشند. امروزه بیشتر آنزیم ها (و احتمالا همه آنها در آینده) بوسیله تخمیر مواد زیستی تولید می شوند. چربی ها بخش بزرگی از بیومس زمین را تشکیل می دهند و آنزیم های لیپولیتیک نیز نقش مهمی را در تغییر و تبدیل این ترکیبات نامحلول در آب بازی می کنند. آنزیم های لیپولیتیک در شکستن و بنابر این تحرک لیپید ها در میان سلول های موجودات و انتقال چربی ها از موجودی به موجود دیگر نقش ایفا می کنند. میکروارگانیسم ها عوامل امولسیفایر یا بیوسورفاکتانت تولید می کنند تا به حل شدن چربی ها کمک کند. چندین هزار آنزیم با دارا بودن اختصاصیت سوبسترا شناخته شده اند، با این حال آنزیم های کمی به شکل خالص جداسازی شده و کریستاله شده اند و در مورد ساختمان و عمل آنها دانسته های کمی وجود دارد. ظهور و روش مهندسی پروتئین، کاربرد آنزیم ها را در صنعت با اهمیت نمود، مثلا استفاده از پروتئاز و لیپاز در شوینده، آمیلاز و گلوکز ایزومراز در فرآوری نشاسته و ... (Cheetham, et al., 1995).

۱ ۲ معرفی لیپازها:

لیپازها (تیری اسیل هیدرولاز E.C.۳.۱.۳.۱) باعث هیدرولیز اسیل گلیسرول های بلند زنجیره می شوند. درکل باعث هیدرولیز دامنه وسیعی از استرهای اسید چرب با وزن ملکولی کم یا زیاد، استرهای تیول، آمیدها، استرهای پلی ال/ پلی اسید و ... می شوند. علاوه بر این در شرایط محیطی مناسب قادر به کاتالیز واکنش عکس یعنی سنتز می باشند (Lorenzo,et al., 2000). با توجه به اینکه آنها از کربوکسیل استرازها (E.C.۳.۱.۱.۱) که قادر به هیدرولیز استرهای کوتاه زنجیره می باشند و روی سوبستراهای محلول در مایع اثر می کنند متفاوتند لذا به لیپازها به عنوان آنزیم هایی می توان اشاره نمود که استرها را فقط در سطوح میان آب چربی در محیط های هتروژن

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

هیدرولیز می کنند. در واقع لیپازها در فاصله ایجاد شده توسط سوبسترای لیپیدی آب گریز در یک محیط آبی آب دوست عمل می کنند. در نتیجه زمانی که سوبسترای لیپیدی تبدیل به امولسیون شود فعالیت لیپازی افزایش می یابد از این رو سینتیک یک واکنش لیپازی از مدل کلاسیک میکائیلس منتن پیروی نمی کند و لذا فعالیت لیپازی با استفاده از عوامل امولسیفایر و روشهایی افزایش دهنده اندازه میسل های امولسیون، افزایش می یابد(Sharma, et al, 2001).

۱ ۳ لیپازهای میکروبی و انواع باکتری های مولد آن:

لیپازها توسط بسیاری از میکرو ارگانیسم ها و یوکاریوتهای عالی تولید می شوند اما بیشتر لیپازهای مفید از نظر تجاری، منشا میکروبی دارند. میکرو ارگانیسم های مولد لیپاز شامل باکتری ها، قارچ ها، مخمرها و اکتینومسیت ها می باشند. قارچها میان میکرو ارگانیسم ها با ارزش ترند زیرا آنزیم های تولید شده به وسیله اکثر آنها خارج سلولی بوده و به راحتی توسط فیلتراسیون یا سانتریفوژ مایع محیط کشت قابل جداسازی از میسلیوم ها می باشند. در واقع قارچ ها، تولید کننده های موثر لیپازند و با بهینه سازی شرایط رشد از قبیل بهینه کردن ترکیبات محیط کشت، دما و مدت زمان رشد، راندمان تولید آنزیم در آنها افزایش می یابد. از جمله مهم ترین قارچ های تولید کننده لیپاز می توان به آسپرژیلوس ها، موکور، ریزوپوس، پنی سیلوم و ژئوتریکوم و مخمرهای تولید کننده مثل کاندیدا اشاره نمود(Sharma, et al, 2001).

لیپازهای باکتریایی نیز به طور وسیعی در طبیعت وجود دارند و در دهه های اخیر بسیار اهمیت پیدا کرده اند لیپازهای باکتریایی نیز اکثرا خارج سلولی اند و شبیه دیگر آنزیم های مهم صنعتی میتوانند بوسیله روش تخمیر غوطه ور(SF) و یا تخمیر در حالت جامد(SSF[1]) تولید شوند. اگرچه

1 Solid state fermentation

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

فرآیند SF در صنعت بیوتکنولوژی غالب شده است، اخیرا فرآیندهای SSF نیز مورد ارزیابی قرار گرفته اند.تمایل به سمت SSF به این دلیل است که بقایای ارزان قیمت صنایع کشاورزی میتوانند به عنوان مواد خام استفاده شوند. هم برای رشد سلولی و هم تولید لیپاز، استفاده از تیری گلیسریدها به عنوان منبع کربن کافی است. اگرچه چندین لیپاز تجاری متنوع از منابع مختلف و با اختصاصیت متفاوت در دسترس میباشند، کاربرد صنعتی این آنزیم ها بستگی به کاهش قیمت تولید در طی انتخاب سویه های مولد دارد، و نیز بیان به میزان زیاد در میزبان های مناسب، توسعه و بهینه نمودن فرآیندهای تخمیری و آگاهی بیشتر در مورد مکانیسمهای فیزیولوژیکی که باعث پاسخ میکروبی به تغییرات درشرایط محیطی میشود.

از جمله مهم ترین سوش های باکتریایی مولد لیپاز نیز می توان به *Bacillus*، *Pseudomonas* و *Burkholderia* اشاره نمود. لیپازهای باکتریایی به علت خواص فیزیکی و فیزیولوژیکی که دارند دارای اهمیت زیادی می باشند. به طور کلی لیپازهای باکتریایی در مقایسه با لیپازهای گیاهی و حیوانی مقاوم تر بوده و دارای خواص منحصر به فرد می باشند اما نسبت به لیپازهای گیاهی و حیوانی و قارچی کمتر مطالعه شده اند. با این حال، به این علت که باکتری ها اغلب دارای pH بهینه خنثی یا قلیایی بوده و اغلب مقاوم به دما می باشند، اطلاعات در مورد آنزیم های لیپولیتیک باکتریایی به سرعت در حال افزایش است (Arpigny, et al., 1999).

۱ ۴ ویژگی های ساختمانی لیپازها:

در سالهای اخیر دانش ما درباره ساختمان لیپازها و استرازها به طور قابل توجه افزایش یافته است و این بواسطه آشکار شدن بسیاری از توالی های ژنی و ساختمان های کریستالی آنزیم ها بوده است. تلاش های زیادی نیز جهت مشخص کردن توالی موتیف های حفاظت شده در آنزیم های

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

لیپولیتیک که از دامنه وسیعی از ارگانیسم ها منشا یافته اند شامل مهره داران پست و عالی، بی مهرگان، قارچ ها و باکتری ها و ارتباط دادن آنها به عناصر ساختمان سه بعدی آنزیم که در تشخیص سوبسترا و کاتالیز نقش دارند و بنابر این برای عمل آنزیم ضروریند انجام شده است.

بر اساس مطالعات انجام شده مشخص شده است که لیپازها متعلق به کلاس هیدرولازهای سرین بوده و به هیچ کوفاکتوری نیاز ندارند. جایگاه کاتالیتیکی لیپاز درون پروتئین مخفی بوده و شامل یک مجموعه سه تایی کاتالیتیکی Ser-Asp(Glu)-His می باشند و معمولا یک توالی حفاظت شده Gly-x-Ser-x-Gly اطراف جایگاه فعال سرین یافت می شود. جایگاه فعال توسط یک ساختمان α-helical درمانند پوشیده شده که به سمت بیرون حرکت می کنند و به این شکل لیپاز با سوبسترای خود در تماس قرار می گیرد (شکل ۱-۱). بررسی ساختمان سه بعدی لیپازها نشان می دهد که لیپازهای باکتریایی یک الگوی خمیدگی حفاظت شده ای را نشان می دهند که خمیدگی هیدرولازی α/β نامیده می شوندکه در مورد لیپازهای انسانی و حیوانی نیز توصیف شده است. خمیدگی هیدرولازی α/β شامل صفحات β موازی (حداقل ۵ تا در لیپاز) است که بوسیله α helix های کشیده جدا شده اند. با وجود درجات متفاوت همولوژی ترادف میان اعضای این خانواده، یک توالی پنتاپپتیدی Gly-x-Ser-x-Gly استثنائا بسیار حفاظت شده است. حفاظت شدن سرین و از بین رفتن فعالیت کاتالیتیکی بواسطه تغییرات سرین یا جایگزینی آن نشان می دهد که این آمینواسید جهت کاتالیز بسیار حیاتی است. همان طور که گفته شد مراکز فعال همه لیپازها علاوه بر سرین، شامل His ویک آمینواسید با بار منفی(Glu یا Asp) می باشند که شکل فضایی این مجموعه کاتالیتیکی ۳ تایی نیز در میان لیپازها بسیار محافظت شده است. جایگاه فعال آنزیم درون حفره هیدروفوب آنزیم قرار دارد. در وضعیت غیر فعال، جایگاه فعال بوسیله یک لوپ پپتیدی که Lid نامیده می شود پوشیده شده است. Lid قادر به چرخش روی جایگاه فعال می باشد. در این

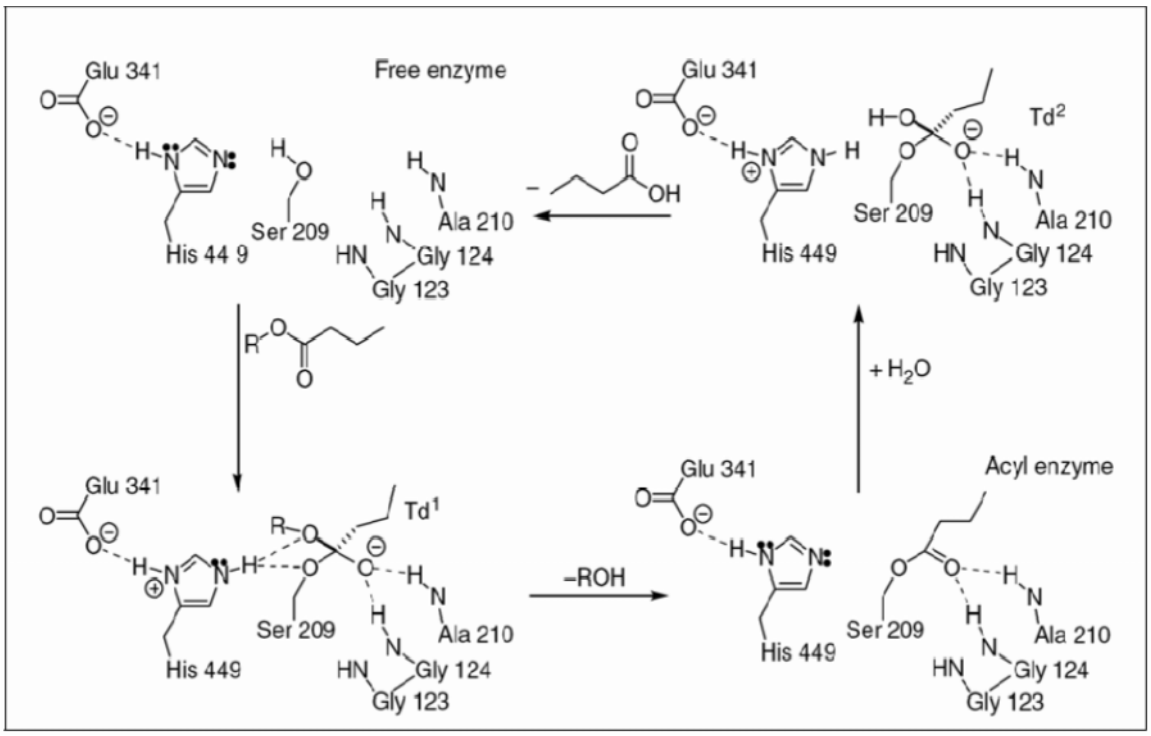
Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

حالت جایگاه فعال و جایگاه اتصال به سوبسترا در معرض سوبسترا قرار می گیرند. زنجیره هیدروکربنی اسید چرب با هدایت انتهای متیلش وارد حفره شده و پیوندهای استری با رزیدوهای کاتالیتیک هم ردیف قرار می گیرند. در ناحیه اتصال به سوبسترا با افزایش هیدروفوبیسیته، میانکنش آنزیم و سوبسترای هیدروفوب افزایش می یابد (Jaeger, et al., 2002, 2006).

شکل ۱-۱ ساختمان 3D لیپاز *Rhizopus oryzae* :قرمز: lid ،صورتی: active site ، زرد: پیوندهای دی سولفید

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

همان طور که قبلا ذکر شد میانکنش لیپاز با سوبستراهای نامحلول از سینتیک میکائیلس منتن تبعیت نمی کند اما شامل مکانیسم ۴ مرحله ای است: (Lorenzo, et al., 2000). (شکل ۱-۲):



شکل۱-۲- ۴مرحله میانکنش میان لیپاز و سوبسترای نامحلول

۱ حمله نوکلئوفیلی اکسیژن روی سوبسترا باعث تشکیل حد واسط ترا هدرالی می شود که بوسیله His و Asp پایدار می شود.

۲ آزاد شدن الکل بواسطه تشکیل کمپلکس اسیل آنزیم

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

۳ حمله نوکلئوفیلی، حد واسط تترا هدرال دیگری را تشکیل می دهد. (آب به عنوان نوکلئوفیل در هیدرولیز عمل می کند در حالیکه الکل نقش مشابهی را در transestrification بازی می کند).

۴ شکستن اتصال آنزیم – اسیل و آزاد شدن محصول (یک اسید در هیدرولیز و یا یک استر در estrification)

معمولا لیپازها در مقابل سوبستر اهای محلول در آب فعالیت کمی را نشان می دهند. یک ویژگی مشخص لیپازها Inter facial activation می باشد به این معنی که هنگامی که آنزیم در سطح سوبسترای نامحلول در آب قرار می گیرد تغییرشکل فضایی در آنزیم رخ می دهد و باعث فعال شدن آنزیم می شود (Jaeger, et al, 2006).

۱ ۵ پیشینه تاریخی:

حضور لیپاز ها تقریبا در ۱۹۰۱ در باکتریهای *Bacillus prodigiosus*، *B.pyocyaneus*، *B.fluorescers* مشاهده شد که با مطالعات بیشتر این باکتریها به ترتیب *Serratia marsecens*، *Pseudomonas aeruginosa* ، *P.flurerescens* نام گرفتند. آنزیم های هیدرولیز کننده تیری گلیسیریدها طی ۳۰۰ سال به خوبی مطالعه شدند و توانایی این آنزیم ها جهت کاتالیز هیدرولیز و نیز سنتز استرها تقریبا ۷۰ سال قبل شناخته شد. در ۱۸۵۶، Claude *Berbnard* اولین بار لیپازی را در شیره پانکراس یافت که قطره های روغن نامحلول را هیدرولیز کرده و به محصولات محلول تبدیل می کرد. لیپازها از پانکراس حیوانی تهیه می شدند و در مصارف انسان هم به صورت خالص و هم به صورت مخلوط با دیگر هیدرولیزها بعنوان هاضم استفاده می شدند.

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional