بسم الله الرحمن الرحيم

((کلیه ی دستاوردهای این پایان نامه متعلق به دانشگاه الزهرا می باشد.))

دانشگاه الزهرا (س)

دانشکده علوم پایه

پایان نامه

جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

رشته بیوتکنولوژی

عنوان

# تولید و تخلیص جزیی آنزیم کاتالاز از باکتری بومی Kocuria ASB 107 مقاوم به پرتوهای یونیزان

استاد راهنما

دکتر عزت عسگرانی

دکتر زهرا موسوی نژاد


دانشجو

الهام سادات سیدجوادجواهری


اسفند ۹۱

## تقدیم به:

دو فرشته ی پاک و آسمانیم

پدرو مادر عزیزم

خواهر گلم آرزو

تکیه گاه و مایه ی آرامشم

همسر نازنینم

و

امید زندگیم

دختر دلبندم  هانیه

تقدیر و تشکر:

- با سپاس فراوان از استاد بزرگوارم سرکار خانم دکتر عسگرانی که همواره راهنمای علمی و معنوی اینجانب بودند.
- از سرکار خانم دکتر موسوی نژاد، که هیچگاه تجربیات علمی ارزنده ی خود را از من دریغ نداشتند کمال سپاسگزاری را دارم.
- از کارشناسان دلسوز آزمایشگاه سرکار خانم یوسفی و سرکار خانم اردکانی و همچنین دو نازنین مهربان خانم و آقای فخرایی تشکر می کنم.
- از مسئولین عزیز آموزش سرکار خانم شایسته و سرکار خانم گرجیان به پاس همه ی محبت ها و همدلیشان کمال تشکر را دارم.
- در پایان از همه دوستان بسیار عزیزم که همیشه همراه و همدل من بودند تشکر می نمایم و برای همگی آنها آرزوی موفقیت دارم.

چکیده:

انواع اکسیژن فعال به ویژه $H_2O_2$ غالبا طی فرایند های متابولیکی درون سلولی ، به ویژه تنفس هوازی و یا تحت تاثیر عوامل محیطی در داخل سلول ایجاد می شوند و یا ممکن است در محیط اطراف سلول حضور داشته باشند.. از طرف دیگر ، $H_2O_2$ به عنوان ماده ی سفید کننده و یا از بین برنده ی میکروارگانیسم ها در صنایع غذایی، نساجی، بهداشتی و... استفاده ی گسترده ای دارد ؛ اما به سبب اثر سمی آن بر روی محیط زیست و سلامت انسان، لازم است که در فرایندهای نهایی صنعتی حذف شود. کاتالاز ( $H_2O_2$- $H_2O_2$ Oxidoreductase EC:1-11-1-6) آنزیمی متداول است که در بیشتر سلول های جانوری، گیاهی و بسیاری از میکروب ها یافت می شود. این آنزیم قادر است $H_2O_2$ را با به آب و اکسیژن مولکولی تبدیل می کند و به سبب پایداری قابل توجه در برابرتنش های محیطی و سهولت انبار داری، گزینه ی مناسبی برای استفاده در صنعت می باشد.

باکتری *Kocuria ASB107* جدا شده از چشمه ی رادیواکتیو آب سیاه رامسر، از جمله باکتری های مقاوم به پرتوهای یونیزان می باشد. از جمله مکانیسم های دفاعی این باکتری بومی برای مقابله با تنش های محیطی، تولید قابل ملاحظه ی آنزیم کاتالاز است. در این پژوهش، آنزیم کاتالاز از باکتری *Kocuria ASB107* به طور نسبی خالص سازی شد. به این منظور، توده ی سلولی در فاز رشدی از زندگی باکتری که بیشترین مقدار کاتالاز را تولید می نماید جمع آوری شد و پس از یک مرحله انجماد و ذوب، تحت تیمار با آنزیم لیزوزیم شکست و عصاره ی سلولی برای تخلیص آنزیم کاتالاز ، طی سه مسیر مختلف ، مورد استفاده قرار گرفت. در هر مرحله از تخلیص، مقدار پروتئین با به کارگیری روش برادفورد اندازه گیری شد و فعالیت کاتالازی نمونه ها در برابر $H_2O_2$ ( 35mM) در بافر فسفات (100mM, pH:7) در طول موج 240nm با تکنیک اسپکتروفتومتری پیگیری شد. در مسیر اول، آنزیم کاتالاز به ترتیب با استفاده از روش های رسوب دهی با سولفات آمونیوم ۴۰٪ و ۶۰٪ اشباع ، ستون کروماتوگرافی تعویض یونی DEAE-Sepharose ، ستون ژل فیلتراسیون Sephadex G-150 و سیستم جاذب هیدروکسی آپاتیت از عصاره ی خام سلولی تخلیص شد که این مسیر منجر به تخلیص ۷۱/۴ برابری آنزیم کاتالاز شد. در مسیر دوم، با جا به جایی مراحل سوم و چهارم از مسیر اول، میزان تخلیص در دو مرحله ی آخر کاهش یافت و خلوص ۳۶/۴ برابری حاصل گردید. در سومین مسیر، به ترتیب روش های رسوب دهی با سولفات آمونیوم ۴۰٪ و ۶۰٪ اشباع، ستون ژل فیلتراسیون Sephadex G-150، سیستم جاذب هیدروکسی آپاتیت و ستون کروماتوگرافی تعویض یونی DEAE-Sepharoseمورد استفاده قرار گرفت . در مسیر سوم، میزان تخلیص به ۶.۴ برابر کاهش یافت. اما در مرحله ی آخر از مسیر سوم با استفاده از ستون کروماتوگرافی تعویض یونی DEAE-Sepharose، سه گروه مختلف کاتالاز از یکدیگر جدا شدند و رفتار کینیکی آنها بررسی شد. بر اسلس نمودار میکائلیس و منحنی Lineweaver-Burk، $K_m$ کاتالاز گروه ۱ و ۲ بهترتیب (mM) ۶۰/۲ و ۱۵/۶ محاسبه شد، درحالیکه $V_{max}$ آنها بهترتیب ( mM/min) ۰/۴۲ و ۰/۲۳بدست آمد. فعالیت کاتالاز گروه ۳ بسیار کم بود. به طوریکه $V_{max}$ ظاهری آن ( mM/min)۰/۰۱۸ گردید.

به این ترتیب ، کاتالاز گروه ۱ برای تجزیه ی غلظتهای زیاد پراکسیدهیدروژن و کاتالاز گروه ۲ برای جاروب غلظتهای کمتر پراکسید هیدروژن مناسب است. درمقام مقایسه، کاتالاز گروه ۳ فعالیت بسیار کمتری دارد و برای کاربرد توصیه نمیشود

فهرست مطالب


۱-۱ کاتالاز چیست؟ ..... 12

۱-۲ تاریخچه ی کشف کاتالاز: ..... 12

۱-۳ مکانیسم عمل آنزیم کاتالاز: ..... 13

۱-۴ مطالعه ی ساختار کاتالاز با استفاده از اشعه ی X و میکروسکوپ الکترونی: ..... 15

۱-۵ بررسی خواص بیوشیمیایی کاتالازها: ..... 16

۱-۶ مهارکننده های فعالیت کاتالاز: ..... 16

۱-۷ القا کننده های فعالیت کاتالاز: ..... 18

۱-۸ آنزیم کاتالاز در طبیعت: ..... 19

۱-۹ کاتالاز در پروکاریوت ها: ..... 20

۱-۹-۱ بررسی جنبه ی ژنتیکی کاتالاز پروکاریوتی: ..... 20

۱-۹-۲ امکان تکاملی باکتری های کاتالاز مثبت در تحمل تنش های محیطی و شرایط اکسیداتیو: ..... 20

۱-۹-۲-۱ اثر مستقیم پرتوی یونیزه کننده: ..... 20

۱-۹-۲-۱ اثر غیر مستقیم پرتوی یونیزان: ..... 21

۱-۹-۲-۳ اثر پرتو بر پروتئین ها ..... 22

۱-۹-۲-۴ پاکسازی مشتقات سمی اکسیژن، به وسیله آنزیم‌های حفاظت کننده ..... 22

۱-۹-۲-۵ آنزیم کاتالاز در باکتری های مقاوم به پرتوهای یونیزان: ..... 23

۱-۱۰ کاتالاز و صنعت: ..... 24

۱-۱۰-۱ کاربرد کاتالاز در صنایع: ..... 24

۱-۱۰-۲ منابع تولید کاتالاز در صنعت: ..... 25

۱-۱۰-۳ خالص سازی آنزیم، نخستین گام برای استفاده در صنعت: ..... 26

۱-۱۱ هدف از پژوهش: ..... 28

۲-۱ مواد و بافر ها و میکروارگانیسم مورد استفاده: ..... 30

۲-۱-۱ میکروارگانیسم مورد استفاده ..... 30

۲-۱-۲ محیط های کشت مورد استفاده ..... 30

۲-۱-۳ مواد و بافرهای مورد استفاده: ..... 31

۲-۱-۳-۱ مواد و بافر مورد استفاده در لیز سلولی: ..... 31

۲-۳-۱-۲ مواد وبافر مورد استفاده در Native PAGE: ..... 31
۲-۳-۱-۳ مواد مورد استفاده در رنگ آمیزی عمومی ژل به روش (کوماسی بلو): ..... 32
۲-۳-۱-۴ مواد وبافرهای مورد استفاده در SDS PAGE (Westermeier, 2001) : ..... 33
۲-۳-۱-۵ مواد مورد استفاده در رنگ آمیزی ژل به روش نیترات نقره: ..... 35
۲-۳-۱-۶ مواد مورد استفاده در رسوب دهی آنزیم با سولفات آمونیوم: ..... 35
۲-۳-۱-۷ مواد و بافر مورد استفاده در ستون کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون: ..... 36
۲-۳-۱-۸ مواد و بافر مورد استفاده در ستون کروماتوگرافی تعویض یونی: ..... 36
۲-۳-۱-۹ مواد و بافر مورد استفاده در سیستم هیدروکسی آپاتیت: ..... 37
۲-۳-۱-۱۰ مواد و بافر مورد استفاده در تست برادفورد (Marion and Bradford, 1976 ) ..... 38
۲-۲ ابزار ها و دستگاههای: ..... 39
۲-۳روش ها: ..... 41
۲-۳-۱ کشت باکتری *Kocuria ASB107*: ..... 41
۲-۳-۲ شکست سلول ها برای آزاد سازی عصاره ی سلولی محتوی آنزیم کاتالاز: ..... 42
۲-۳-۲-۱: شکست سلول ها توسط سونیکاتور (روش فیزیکی): ..... 43
۲-۳-۲-۲: شکست سلول ها با استفاده از SET Buffer (روش شیمیایی): ..... 43
۲-۳-۲-۳: شکست سلول ها با استفاده از آنزیم لیزوزیم: ..... 43
۲-۳-۴ تعیین نوع بار کاتالاز با استفاده از ژل Native افقی: ..... 44
۲-۳-۵ روش های مورد استفاده در تخلیص کاتالاز از عصاره ی سلولی: ..... 44
۲-۳-۵-۱ رسوب دهی پروتئین ها با استفاده از روش Salting out: ..... 44
۲-۳-۵-۲ جداسازی کاتالاز با استفاده از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون: ..... 45
۲-۳-۵-۳ جداسازی کاتالاز با استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی: ..... 46
۲-۳-۵-۴ جداسازی کاتالاز با استفاده از سیستم هیدروکسی آپاتیت: ..... 47
۲-۳-۶ روش های مورد استفاده در ردیابی میزان تخلیص پروتئین: ..... 47
۲-۳-۶-۱ الکتروفورز پروتئین با SDS PAGE: ..... 47
۲-۳-۶-۲ تعیین محتوای پروتئینی نمونه ها: ..... 48
۳-۱ رسم منحنی رشد باکتری: ..... 52
۳-۲ بررسی میزان تولید کاتالاز در ساعات مختلف رشد باکتری: ..... 52

۳-۳ نتایج حاصل از بررسی روش های مختلف لیز سلولی: ..... 53
۳-۳-۱ روش اولترا سونیکاسیون و گرماگذاری سلول در SET Buffer : ..... 53
۳-۳-۲ روش آنزیمی با به کار گیری لیزوزیم: ..... 54
۳-۴ بررسی بار کلی کاتالاز بر روی ژل Native PAGE افقی: ..... 54
۳-۵ استفاده از الکتروفورز عمودی برای تخلیص جزئی آنزیم کاتالاز از عصاره ی سلولی و یافتن غلظت بهینه ی $H_2O_2$ برای بررسی فعالیت کاتالازی طی مراحل مختلف تخلیص: ..... 55
۳-۶ تخلیص به روش رسوب دهی با سولفات آمونیوم: ..... 56
۳-۷ بررسی سه مسیرمتفاوت برای تخلیص آنزیم کاتالاز: ..... 59
۳-۷-۱ مسیر اول تخلیص آنزیم کاتالاز: ..... 60
۳-۷-۱-۲ جداسازی با به کار گیری ستون تعویض یونی DEAE-Sepharose (مسیر اول و دوم): ..... 60
۳-۷-۱-۴ تخلیص آنزیم کاتالاز با استفاده از سیستم هیدروکسی آپاتیت: ..... 64
۳-۷-۲ مسیر دوم تخلیص آنزیم کاتالاز: ..... 67
۳-۷-۲-۳- تخلیص آنزیم کاتالاز با استفاده از سیستم هیدروکسی آپاتیت (مسیر دوم): ..... 67
۳-۷-۲-۴ جداسازی با به کار گیری ستون ژل فیلتراسیون Sephadex G-150 (مسیر دوم): ..... 68
۳-۷-۳ مسیر سوم تخلیص آنزیم کاتالاز: ..... 70
۳-۷-۳-۲- جداسازی با استفاده از ستون ژل فیلتراسیون Sephadex G-150 (مسیر سوم ): ..... 70
۳-۷-۳-۳- تخلیص آنزیم کاتالاز با استفاده از سیستم جاذب هیدروکسی آپاتیت (مسیر سوم): ..... 71
۳-۷-۳-۴ جداسازی با به کار گیری ستون تعویض یونی DEAE-Sepharose(مسیر سوم): ..... 72
۳-۷-۴ بررسی و مقایسه ی میزان تخلیص آنزیم کاتالاز با به کارگیری سه مسیر مذکور: ..... 79
۳-۷-۴-۱ محاسبه ی واحد فعالیت کاتالاز طی مراحل مختلف تخلیص از هر سه مسیر: ..... 79
۳-۷-۴-۲ محاسبه ی میزان پروتیین موجود در نمونه های حاصل از تخلیص: ..... 80
۳-۷-۴-۳ محاسبه ی فعالیت ویژه ی هر یک در نمونه های حاصل از تخلیص: ..... 80
۳-۷-۴-4 نمایش تخلیص حاصل از مسیر اول با استفاده از SDS PAGE و رنگ آمیزی پروتیین نقره: ..... 84
۴-۱ مراحل مختلف تخلیص آنزیم کاتالاز از باکتری *Kocuria* ASB107 ( طی مسیر اول و دوم): ..... 87
۴-۲ مراحل تخلیص آنزیم کاتالاز از باکتری *Kocuria* ASB107 ( طی مسیر سوم): ..... 88
۴-۳ پیشنهادات: ..... 90
فهرست منابع: ..... 91

فصل اول:
مقدمه

## ۱-۱ کاتالاز چیست؟

آنزیم ها غالبا پروتئین هایی هستند که سرعت واکنش های آرام را تسریع می کنند. کاتالاز [1] آنزیمی متداول است که در بیشتر سلول های جانوری، گیاهی و بسیاری از میکروب ها یافت می شود. واکنشی که این آنزیم کاتالیز می کند برای زندگی بسیاری از موجودات به ویژه ارگان هایی که در معرض اکسیژن قرار دارند ضروری است (Chelikani *et al.*, 2004 ) . کاتالاز، $H_2O_2$ [2] را که یکی از قوی ترین عوامل اکسید کننده است با سرعت بسیار زیاد (حدود چهل میلیون مولکول در هر ثانیه) به آب و اکسیژن مولکولی تبدیل می کند. علاوه بر این ، کاتالاز قادر است از $H_2O_2$ در جهت اکسیداسیون سموم شامل فنول ها، فرمیک اسید، فرمالدهید و الکل ها استفاده نماید (Goodsell DS, 2004).

## ۱-۲ تاریخچه ی کشف کاتالاز:

کاتالاز در سال ۱۸۱۸، به عنوان یک ماده توسط Louis Jacques Thenard کاشف $H_2O_2$ معرفی گردید. این دانشمند حدس می زد که $H_2O_2$ باید توسط ماده ای تفکیک شود. در سال ۱۹۰۰، Oscar Loew برای اولین بار کاتالاز را نام گذاری کرد و دریافت که این آنزیم در بسیاری از گیاهان و جانوران وجود دار د (Loew O, 1900) . در سال ۱۹۳۷ کاتالاز از کبد گاو با درصد خلوص بالا ، به عنوان اولین آنزیم محتوی آهن ، استخراج شد (Sumner and Dounce, 1937) و در سال ۱۹۳۸ وزن مولکولی آن تعیین گردید (Sumner and Gralén,1938).

در سال ۱۹۴۸، اولین کاتالاز پروکاریوتی از *Micrococcus Luteus* به دست آ مد ( Pinsent and Herbert, 1948) و در سال ۱۹۵۱ برای اولین بار مکانیسم عمل آنزیم کاتالاز توضیح داده شد (Chants, 1951). در سال ۱۹۶۹ توالی آمینو اسیدی کاتالاز کبد گاو مشخص گردید.(Schroeder *et al.*,1969 ).

[1] $H_2O_2$- $H_2O_2$ Oxidoreductase EC:1-11-1-6
[2] Hydrogen peroxide

در دهه ی ۱۹۷۰، مطالعات X.ray و NMR امکان پیشروی در زمینه ی شناخت ساختار پروتئینی و جایگاه فعال آنزیم ها را به طور عمومی فراهم آورد (Larsson *et al*.,1970, and Hershberg and chance 1975). در دهه ی ۱۹۸۰ کاتالاز کبد گاو و *Peniccillium vitale* کریستالیزه شد و ساختار سه بعدی آنها مشخص گردید (Murthy *et al.* 1981., Fita and Rossman 1985).

در دهه ی ۱۹۹۰، مهار کاتالاز توسط نیتریک اسید و ارتباط این اثر با سمیت نیتریک اسید کشف شد ( Brown 1995).

مطالعه در جهت مقایسه ی ساختار هم کاتالاز از منابع مختلف توسط Andersson و همکارانش صورت پذیرفت (Andersson *et al.*, 1995) و فرایند Unfold شدن و Fold شدن مجدد کاتالاز کبد گاو ، تحت تاثیر pHهای مختلف و غلظت های متفاوت نمک ، توسط Perajepati و همکارانش در سال ۱۹۹۸ مورد بررسی قرار گرفت (Perajepati *et al*., 1998).

۳-۱ مکانیسم عمل آنزیم کاتالاز:

کاتالاز یک آنزیم احیاکننده ی حاوی هم است ؛ که دو نوع واکنش را در سلول کاتالیز می کند. این واکنش ها شامل واکنش معمول تجزیه ی $H_2O_2$ و واکنش پراکسیداتیو می باشد که وجود هر دو واکنش برای حیات سلولی ضروری است (Boon EM *et al.,* 2007).

۱) واکنش تجزیه ی $H_2O_2$:

اگرچه هنوز مکانیسم عمل آنزیم کاتالاز در فرایند تجزیه ی $H_2O_2$ به طور کامل مشخص نیست ، اما دانشمندان معتقدند که این واکنش طی دو مرحله صورت می پذیرد:

1) $H_2O_2 + Fe(III)\text{-}E \rightarrow H_2O + O{=}Fe(IV)\text{-}E(.+)$
2) $H_2O_2 + O{=}Fe(IV)\text{-}E(.+) \rightarrow H_2O + Fe(III)\text{-}E + O_2$

در مرحله ی اول واکنش، $H_2O_2$ به جایگاه فعال آنزیم وارد شده و با اسید آمینه های Asn147 و His74 واکنش می دهد. این امر سبب ایجاد یون پروتون ( $H^+$) می گردد که به اتم اکسیژن انتقال می یابد. مختصات اتم اکسیژن آزاد به شکل مولکول آب جدید وO=Fe(IV) تغییر می کند.

درمرحله ی دوم واکنش ، O=Fe(IV) با یک $H_2O_2$ ثانویه وارد واکنش می شود و به شکل Fe III-E احیا می شود و آب و اکسیژن تولید می گردد.

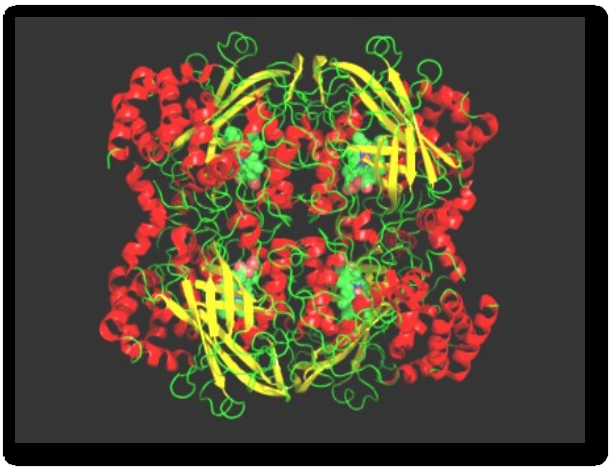
۲) واکنش پراکسیداتیو:

بر مبنای واکنش پراکسیداتیو، کاتالاز می تواند مواد سمی دیگری مانند فرمالدهید، فرمیک اسید، فنول و الکل را نیز در حضور $H_2O_2$ اکسید نماید.

$$H_2O_2 + H_2R \rightarrow 2H_2O + R$$

جزئیات این واکنش در مقایسه با واکنش تجزیه ی $H_2O_2$ هنوز مشخص نیست، اما مطالعات نشان داده در حضور لیگاند فنولی واکنش پذیری آهن مرکزی با واسطه ی اسیدآمینه ی Tyr357 در جایگاه فعال آنزیم صورت می پذیرد.

۱-۴ مطالعه ی ساختار کاتالاز با استفاده از اشعه ی X و میکروسکوپ الکترونی:



بررسی های کریستالوگرافی با اشعه ی ایکس از کاتالاز کبد گاو با قدرت تفکیک ۲/۵ آنگستروم نشان می دهد که کاتالاز ، تترامری دمبلی شکل با طول ۹۰ آنگستروم و قطری بین ۵۰ آنگستروم در مرکز تا حدود ۶۰ آنگستروم در بخش عریض تر مولکول می باشد. گروه پروستاتیک در عمق ۲۰ آنگستروم از سطح آنزیم قرار گرفته است. در میکروگراف های الکترونی، مولکول کاتالاز ترکیبی از دوبخش یکسان با ساختاری ۴ زیر واحدی است. هر زیر واحد دارای یک جایگاه فعال حاوی هم است که به صورت عمقی در آن قرار گرفته است و به واسطه ی کانال های هیدروفوبی به بیرون راه دارد (McPherson and Rich, 1973).

تا کنون مطالعات بسیاری در زمینه ی خصوصیات این آنزیم در باکتری ها، آرکی ها و تمامی سلول ها و بافت های جانوری صورت گرفته است. کاتالازها با منشا متفاوت، از نظر وزن مولکولی، تعداد زیر واحدها و گروه های پروستاتیک شباهت زیادی به یکدیگر دارند (Deisseroth and Dounce, 1970).

۱-۵ بررسی خواص بیوشیمیایی کاتالازها:

از نظر خواص بیوشیمیایی کاتالازها در دو گروه قرار دارند:

گروه اول پروتوهم هستند، تترامر بوده و وزن مولکولی آنها بین ۲۷۰-۲۲۵ کیلو دالتون می باشد. در pH ۱۰-۵ فعالیت دارند و نسبت به اتانول و کلروفرم مقاومند (نشانه ی هیدروفوب بودن) و به طور غیر قابل برگشت با آمینوتریازول مهار می شوند.

گروه دوم در pH ۶/۵-۶ بیشترین فعالیت را دارند و حساسیت بیشتری نسبت به دما و $H_2O_2$ نشان می دهند. این گروه با اتانول و کلروفرم مهار می شوند ، اما آمینوتریازول اثر مهاری بر روی آنها ندارد (Nadler *et al.*, 1986).

در مقایسه با سایر آنزیم ها، کاتالاز ها نسبت به پروتئولیز و واسرشت شدن دمایی مقاوم هستند. این پایداری در برابر پروتئولیز، یک امتیاز تکاملی برای این آنزیم محسوب می شود ؛ زیرا کاتالازها بیشتر در فاز سکون رشد باکتری که سطح پروتئازها بالا است تولید می شوند (Kirkman and Gaetani, 1984).

۱-۶ مهارکننده های فعالیت کاتالاز:

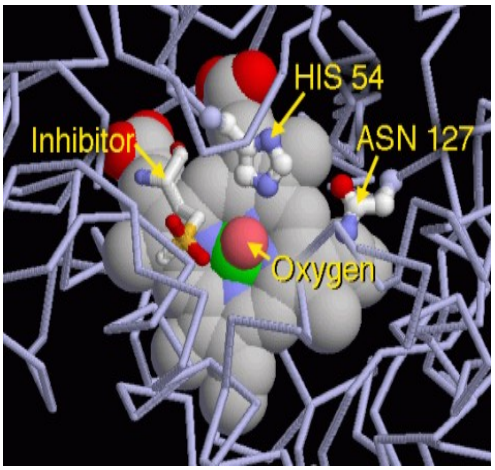
در شرایط *Invivo* دسترسی به عنصر آهن در فعالیت کاتالازی موثر است. مطالعات نشان می دهد که فعالیت کاتالازی در بیماران مبتلا به آنمی با فقر آهن، ۲۶% کمتر از بیماران با آهن نرمال است. این داده ها به روشنی به ضرورت وجود آهن کافی در رژیم غذایی، برای حفظ فعالیت طبیعی کاتالاز اشاره می کند (Balcerzak *et al.*, 1966).

کاتالاز در هر دو شرایط *Invivo* و *Invitro* تحت تاثیر ۳-آمینو ۱و۲و۴ تری یازول ( AT) غیر فعال می شود. آزمایش ها نشان داد که فعالیت مغزی موش هایی که با AT تیمار شدند و سپس در معرض دوز بالای اکسیژن قرار گرفتند کاهش یافت. اکسیژن با دوز بالا انواع اکسیژن فعال به ویژه $H_2O_2$ را در مغز ایجاد می کند. کاهش

فعالیت کاتالازی تحت تاثیر AT، سبب انباشت $H_2O_2$ در مغز می گردد که این امر باعث مسمومیت اکسیژنی در سیستم اعصاب مرکزی و ایجاد اختلال مغزی می شود( Yusa *et al*., 1987).

بر اساس پژوهش های صورت گرفته بر روی کاتالاز حاصل از عصاره ی سلولی *Ecoli* ، غلظت بالای اوزون سبب مهارفعالیت کاتالازی می گردد. به طوری که با حذف آن فعالیت کاتالازی ۵ تا ۱۰ برابر افزایش نشان می دهد ( Whiteside and Hassan, 1987).

از جمله مواد دیگری که سبب مهار فعالیت کاتالاز می گردند می توان به موارد زیر اشاره کرد:




- سیانید، آزید، هیدروکسیل آمید، مرکاپتواتانول (Switala and Loewen, 2002)
- آسکوربات به همراه $Cu^{2+}$ (Orr 1967)
- فریز کردن و Lyophilization آنزیم حاصل از عصاره ی سلولی ( Tanford and Lovrien 1962, and Deisseroth and Dounce 1967)
- غیر فعال شدن توسط نور خورشید تحت شرایط هوازی (Mitchell and Anderson 1965)
- پراکسید (Altomare *et al*. 1974)
- ترکیبات نیترو و نیتروزو (Titov *et al*. 2008)

۱-۷ القا کننده های فعالیت کاتالاز:

مطالعات نشان می دهد که در شرایط *Invivo* فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان به ویژه کاتالاز تحت تاثیر هایپر اکسی ها افزایش می یابد (Frank *et al*., 1978). این افزایش فعالیت را می توان با تیمارموجودات آزمایشگاهی توسط آنتی اکسیدانت ها و سپس قرار دادن آنها در معرض هایپر اکسی ها تشدید نمود. به طور مثال زمانی که رَت را با هر یک از مواد گلوتاتیون احیا شده، متیل فرونی زولن و ویتامین C تیمار نمودند و سپس در معرض اکسیژن ۸۰% قرار دادند، فعالیت کاتالاز در ریه و گلبول های قرمز آن ۲ برابر افزایش یافت که بی نظیر بود (Webster and Toothill, 1986). فعالیت کاتالازی در کبد حیوانات تیمار شده با توکوفرول و آسکوربیک اسید نیز که در معرض اکسیژن ۸۰% قرار گرفتند، افزایش نشان داد.

استعمال دخانیات به عنوان یکی از استرس های اکسیدانت ریوی به حساب می آید. مطالعات نشان می دهد، فعالیت کاتالازی در افراد سیگاری نسبت به افراد غیر سیگاری هم سن، ۱۱% بیشتر است (Toth *et al*., 1986).

مطالعه بر روی مخمرها نشان می دهد که مخلوط nآلکانها می توانند فعالیت کاتالاز مخمری را ۲۷ برابر افزایش دهند که به موازات آن، تعداد پراکسی زوم ها و mRNA کد کننده ی کاتالاز نیز در سلول افزایش می یابد (Yamada *et al*., 1982).

به غیر از استرس های اکسید کننده، فعالیت کاتالاز می تواند توسط عوامل دیگری نیز در سلول القا شود. به طور مثال کمبود اکسیژن (اکسیژن ۱۰%) طی مدت ۷۲-۴۸ ساعت می تواند فعالیت کاتالاز را در ریه ی رَت به میزان ۱۵۰% افزایش دهد (Frank, 1982).

گونه های مختلف در برابر کمبود اکسیژن و متعاقب ان مواجهه با دوز کشنده ای از اکسیژن ، متفاوت عمل می کنند. به طور مثال تحت چنین شرایطی، آنزیم های آنتی اکسیدان به ویژه کاتالاز در رَت القا می شود و موجود

را قادر می سازد که به حیات خود ادامه دهد؛ در حالی که انسان و موش نمی توانند عوامل آنتی اکسیدانت خود را القا کنند و می میرند.

از جمله مواد دیگری که سبب افزایش فعالیت کاتالاز می شوند، می توان از سدیم آرسنات نام برد ( Kertulis-Tartar *et al*., 2009).

۱-۸ آنزیم کاتالاز در طبیعت:

انواع اکسیژن فعال، به ویژه $H_2O_2$، غالبا طی فرایند های متابولیکی درون سلولی به ویژه تنفس هوازی سلول ها و یا تحت تاثیر عوامل محیطی مانند پرتوهای یونیزان، امواج UV، خشکی و ... در داخل سلول ایجاد می شوند و یا ممکن است در محیط اطراف سلول حضور داشته باشند ( Lushchak, 2001). این عوامل اکسیداتیو می توانند سبب ایجاد تغییرات شیمیایی در اغلب ترکیبات سلولی مانند اسیدهای نوکلئیک، پروتئین ها، لیپیدها و ... شوند. چنین تغییراتی می تواند منجر به انواع نقص های متابولیکی، فرایند پیری، جهش و نهایتا مرگ سلولی گردد (Halliwel and Gutteridge, 1999 ). بنابراین، وجود آنزیم کاتالاز برای زندگی بسیاری از موجودات، به ویژه موجودات زنده ی هوازی، امری حیاتی است.

مطالعات نشان می دهد که در طبیعت، حداقل سه گروه ژن مستقل با توالی متفاوت، مسئول کد کردن آنزیم هایی با فعالیت کاتالازی می باشند. آنزیم کاتالاز حقیقی که پروتوهمی تنها دارای فعالیت کاتالازی است؛ تقریبا در همه ی یوکاریوت ها و اکثر پروکاریوت ها یافت می شود ( Schonbauman and Chance, 1976; Loewen *et al*., 1985). اما دو گروه دیگر که شامل کاتالاز- پراکسیدازها (Loewen *et al*., 1985 ) و Mn-Catalase فاقد هِم ( Penner and Hahn, 1995) می باشند، تنها در موجودات پروکاریوتی گزارش شده اند. علاوه بر این، گزارشات متعددی در مورد کاتالازهای منحصر به فرد بدست آمده از هالوفیل ها (Brown-Peterson and Salin. 1993, 1995)، ترموفیل ها (Kagawa et al., 1999 ) و سایکروفیل ها ( Yumoto *et al*., 2000; Lorentzen *et al*., 2006) وجود دارد.

۱-۹ کاتالاز در پروکاریوت ها:

بسیاری از باکتری ها به ویژه باکتری های هوازی مانن د *Ecoli*، باسیلوس سوبتیلیس، داینوکوکوس، کوکوریا و برخی از آرکی ها، به ویژه آرکی های هایپر ترموفیل، حاوی ژن کد کننده ی آنزیم کاتالاز هستند. این امر به حدی حائز اهمیت است که تست وجود و یا عدم حضور کاتالاز به عنوان یکی از اساسی ترین سه تست تشخیص گونه ی باکتریایی مطرح است. در این تست به میزان اندکی $H_2O_2$ به بیومس باکتریایی اضافه می شود. چنانچه باکتری کاتالازمثبت باشد، حباب های اکسیژن حاصل از کاتالیز $H_2O_2$ پدیدار می شوند (Reiner, 2010).

۱-۹-۱ بررسی جنبه ی ژنتیکی کاتالاز پروکاریوتی:

بررسی درخت فیلوژنی بر مبنای توالی آنزیم کاتالاز در چندین باکتری کاتالاز مثبت، بر پایه ی 16S rDNA و دیگر معیارهای شناخته شده، نشان داد که کاتالازها، متشکل از یک هسته ی مرکزی حفظ شده هستند، اما توالی انتهای کربوکسیل و آمینوی آنها بسیار متنوع است؛ به طوری که آنها را از نظر رابطه ی فیلوژنی از یکدیگر مستقل می نماید. با مقایسه ی کلی مشاهدات حاصل از بررسی توالی کاتالازی در پروکاریوت ها و مونوفیلیک مشاهده شده در یوکاریوتها، به نظر می رسد که توالی ژنتیکی کاتالاز به طور متناوب از یوکاریوت به پروکاریوت مهاجرت کرده است (Mayfield and Duvall. 1996).

۱-۹-۲ امتیاز تکاملی باکتری های کاتالاز مثبت در تحمل تنش های محیطی و شرایط اکسیداتیو:

از جمله تنش های محیطی که سبب آسیب رسانی جدی به سلول می شوند، پرتو های یونیزان می باشند که به طور مستقیم و غیر مستقیم ترکیبات سلولی را متاثر می سازند.

۱-۹-۲-۱ اثر مستقیم پرتوی یونیزه کننده:

اثر پرتوی یونیزه کننده به مراتب از اثر UV بر روی مولکول DNA پیچیده تر است. در اثر برخورد مستقیم پرتوی یونیزه کننده به بدنه‌ی هلیکس DNA، شکست‌های تک رشته‌ای یا دو رشته‌ای ایجاد می‌شوند. شکست‌های تک رشته‌ای DNA Single Strand Breaks (SSBD) معمولاً جدی نیستند، زیرا تنها با پیوستن