

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران

پردیس بین الملل، دانشکده داروسازی

پایان نامه:

جهت دریافت درجه دکتری عمومی داروسازی

عنوان:

بهینه‌سازی شرایط تولید آنزیم لکاز در یک سویه باکتریایی هالوفیل جدا شده از خاک ایران

اساتید راهنما:

جناب آقای دکتر محمدعلی فرامرزی

جناب آقای دکتر محمدرضا خوشایند

استاد مشاور:

سرکار خانم دکتر شهلا رضایی

نگارش:

نسرین جعفری

سال تحصیلی 96-1395

خلاصه فارسی

آنزیم های مشتق از موجودات سختی دوست اهمیت زیادی را در توسعه مؤثر پروسه هایی که در شرایط دشوار صنعتی بویژه برای بازیافت مواد زائد طبیعی و تولید فرآورده های با ارزش از آنها انجام می شوند، بدست آورده اند. بهینه سازی تولید یک لکاز خارج سلولی از باکتری نمک دوست *کروموهالوباکتر سالکسیژنز* برای لیگنین زدایی از پوست بادام درختی با استفاده از روش های یک متغیر در یک زمان و رویه- پاسخ منجر به افزایش 80 برابری در تولید آن شد. از میان 10 جزء تشکیل دهنده محیط کشت، چهار ترکیب اوره، سولفات مس، سولفات روی و گلوکز بیشترین تأثیر را بر تولید آنزیم داشتند. آنزیم در مقابل pH های 5 تا 10 و دماهای 25 تا 65 درجه سانتی گراد بسیار مقاوم نشان داد. تست های پایداری نشان دادند که آنزیم در مقابل طیف وسیعی از حلال های آلی قطبی و غیر قطبی پایدار است و تنها در مقابل غلظت 90٪ استون و پروپانول، 30٪ کاهش فعالیت داشت. همچنین آنزیم از میان مهارکننده های تست شده مشابه تنها به کوچیک اسید و DTT حساسیت نشان داد. آنزیم در مقابل همه یونهای فلزی مقاوم و حتی افزایش فعالیت داشت و بیشترین پایداری را در مقابل کلرید سدیم از خود نشان داد. این آنزیم همچنین ویژگی خوبی نسبت به طیف گسترده ای از سوبستراهای فنولی و غیر فنولی از خود نشان داد. لکاز مذکور بدون کمک مدیاتور، به میزان 27٪ و در شرایط خاص تعریف شده برای آزمایش لیگنین زدایی از ضایعات پوسته بادام درختی، به میزان 58٪ عدد کاپا را کاهش داد. بدلیل پتانسیل بالای آنزیم در لیگنین زدایی بویژه در شرایط دشوار، لکاز حاصل از *کروموهالوباکتر سالکسیژنز* می تواند جایگزین مناسبی برای روش های شیمیایی استخراج فیبرهای سلولز از پسماندهای طبیعی لیگنوسولزی یا حذف لیگنین از ضایعات حاوی لیگنین و یا مشتقات آن باشد.

کلمات کلیدی: لکاز، هالوفیل، *کروموهالوباکتر سالکسیژنز*، بهینه سازی تولید، کاهش لیگنین

Abstract

Extremozymes have gained importance for their ability to efficiently develop the processes in rigorous industrial conditions with incidence in the recycling of especially robust natural wastes during the production of value-added products. The production of an extracellular laccase from the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens* aided for the bio-delignification of almond shell was optimized using response surface methodology followed by one-factor-at-a-time, resulting in an 80-fold increase in the enzyme yield. Out of 10 different medium components, CuSO₄, ZnSO₄, glucose, and urea were shown to have the greatest effects on the laccase production. The crude laccase was surprisingly stable against the various solvents, salts, chemicals, pH ranges, and temperatures, and it exhibited a high catalytic efficiency to a wide range of phenolic and non-phenolic substrates. Laccase reduced the kappa number of the lignin of almond shell by approximately 27% without the aid of a mediator, and the delignification efficiency strengthened by up to 58% reduction in kappa number in the used harsh conditions. Due to the high potential of the enzyme in delignification, specifically under extreme conditions, laccase from *C. salexigens* can be considered as an ideal alternative for chemical treatment methods in cellulose fibers extraction of lignocellulosic bio-wastes or delignification of the lignin and lignin-derived industrial wastes.

Keywords: Laccase, Halophile, Optimization, *Chromohalobacter salexigens*, Almond shell, Delignification



Tehran University of Medical Sciences
International Campus
School of pharmacy

Thesis submitted for the award of pharmacy degree

**Optimization of laccase enzyme
production in a bacterial strain isolated
from Iranian territory halophiles**

Supervisors:

Dr. Mohammad Ali Faramarzi
Dr. Mohammad Reza Khoshayand

Advisors:

Dr. Shahla Rezaei

By:

Nasrin Jafari

February 2017