جداسازی باکتریهای بومی تولید کننده آنزیم کلسترول اکسیداز از خاک، آب ، پساب کارخانه های چرم و پوست ، صابون سازی و فراورده های لبنی

حامد اسمعیل لشکریان [۱] ،کیانا شاه زمانی [۲]، جمشید راهب [۳]

۱- استادیار،گروه بیوشیمی و ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران.

۲- استادیار،گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران.

۳- دانشیار، گروه باکتوویروس، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران.

یافته / دوره پانزدهم / شماره ۱ / بهار ۹۲ / مسلسل ۵۵

چکیده

دریافت مقاله: ۹۱/۹/۳۰ ، پذیرش مقاله: ۹۱/۱۲/۱۱

مقدمه: کلسترول اکسیداز آنزیمی است که اکسیداسیون کلسترول را همراه با احیای اکسیژن مولکولی به پراکسیدهیدروژن انجام می دهد . این آنزیم توسط برخی میکروارگانیسم های بیماریزا و غیر بیماریزا تولید می شود و ازمهمترین آنزیم های تجاری دنیاست که کاربردهای وسیعی در صنایع مختلف پیدا کرده است. هدف از این مطالعه جداسازی باکتریهای بومی مولد کلسترول اکسیداز و تعیین هویت آنها با استفاده از روشهای میکروبی، بیوشیمیایی و ژنتیکی می باشد.

مواد و روش‌ها: تعداد ۱۸۷ نمونه از پساب کارخانه چرم وپوست و صابون سازی ، خاک ، لبنیات و آب های راکد جمع آوری گردید. پس از کشت نمونه ها، باکتریهای رشد یافته با تست های میکروبی و بیوشیمیایی تعیین هویت گردید. برای تایید فعالیت کلنی های مولد آنزیم کلسترول اکسیداز، روشهای رنگ سنجی و قهوه ای نمودن محیط کشت استفاده شد. از تکنیک **PCR 16s rRNA** برای تایید قطعی سویه های بدست آمده استفاده شد.

یافته‌ها: از ۱۸۷ نمونه ،تنها ۲ باکتری از خاک جداسازی گردید و نتایج نشان داد که متعلق به گونه رودوکوکوس می باشند . همچنین در آزمایش قهوه ای نمودن و رنگ سنجی، فعالیت کلسترول اکسیدازی هر دو باکتری تایید شد. هویت مولکولی سویه های مزبور با تعیین توالی ژن **16s rRNA** تایید شد.

بحث و نتیجه‌گیری: در این مطالعه، باکتریهای بومی مولد کلسترول اکسیداز جدا گردید. این دو باکتری بواسطه خصوصیات مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و روشهای تائید مولکولی جزء گونه ***Rhodococcus*** طبقه بندی گردید.

واژه‌های کلیدی: کلسترول اکسیداز، رودوکوکوس ، جداسازی.

آدرس مکاتبه: خرم آباد، پردیس کمالوند دانشگاه علوم پزشکی لرستان، دانشکده پزشکی گروه بیوشیمی و ژنتیک

پست الکترونیک: hamedesmaiili@gmail.com

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-08]

مقدمه

آنزیم کلسترول اکسیداز[1] آنزیمی است که اکسیداسیون کلسترول را همراه با احیای اکسیژن مولکولی به پراکسیدهیدروژن انجام می‌دهد (۱،۲). آنزیم کلسترول اکسیداز توسط دو دسته باکتری تولید می‌شود، الف:باکتری‌های غیربیماریزا که کلسترول را بعنوان منبع کربن استفاده می‌کنند و ب: باکتریهای بیماریزا که برای آلوده کردن ماکروفاژهای میزبان به کلسترول اکسیداز نیاز دارد و با تبدیل کلسترول به-cholest 4-en-3-one قادر به تغییر ساختار فیزیکی غشای لیپیدی هستند . هر دو دسته باکتری (بیماریزا و غیر بیماریزا) در حضور کلسترول قادر به تولید کلسترول اکسیداز می باشند (۳).

این آنزیم در میکروارگانیسم‌های تولیدکننده به شکل‌های داخل سلولی، خارج سلولی و یا متصل به غشا یافت می‌شود. بعضی سویه های مولد این آنزیم تنها یک شکل و بعضی هر دو شکل داخل سلولی و خارج سلولی کلسترول اکسیداز را تولید می کنن(۵،۴). بعنوان مثال باکتری‌های نوکاردیوفورم[2]، نوکاردیا[3] و رودوکوکوس[4] اغلب نوع متصل به غشا را تولید می نمایند البته برخی از سویه های رودوکوکوس توانایی تولید شکل خارج سلولی آنزیم را نیز دارند(۷،۶).

آرتروباکتر[5]، رودوکوکوس اکویی[6]، مایکوباکتریوم[7]، نوکاردیا اریتروپولیس[8] و نوکاردیا رودوکروس[9] نوع داخل سلولی و یا متصل به غشا راتولید می کنند(۸،۴). آنزیم کلسترول اکسیداز از مهمترین آنزیمهای تجاری دنیاست که کاربردهای وسیعی در صنایع مختلف پیدا کرده است. از مهمترین کاربردهای آن می‌توان به موارد ذیل اشاره نمود:

۱- سنجش میزان کلسترول: تعیین میزان کلسترول در سرم خون از اولین و مهمترین کاربردهای این آنزیم می‌باشد. امروزه روشهای آنزیمی بخاطر مزایایی که نسبت به روش شیمیایی دارند، جایگزین روش شیمیایی شده اند. روش آنزیمی اختصاصی تر، سریعتر و راحت‌تر از روش شیمیایی است و با عوامل سرمی تداخل کمتری دارد (۹،۵). همچنین در این روش بجز سنجش کلسترول آزاد سرمی درحضور آنزیم کلسترول استراز می‌توان کل کلسترول سرم را اندازه‌گیری نمود. علاوه بر تعیین کلسترول سرم از روش آنزیمی برای تعیین کلسترول مواد غذایی نیز استفاده می‌شود (۱۰).

۲- صنایع دارویی: داروهای استروئیدی بخش مهمی از داروها را تشکیل می‌دهند. در فرآیند تهیهٔ آنها از تبدیلات میکروبی و آنزیمها استفاده می‌شود. آنزیم کلسترول اکسیداز که اولین آنزیم در تجزیهٔ کلسترول است، آنزیم مهم در تهیهٔ این داروها می‌باشد (۱۱).

۳- اثر حشره‌کشی: کشف پروتئین‌های حشره‌کش جدید برای کنترل آفات و استفاده در محصولات کشاورزی از اهمیت بالایی برخوردار است، از مهمترین این پروتئین‌ها می‌توان به پروتئینهای باسیلوس ترنجنسیس[10] اشاره نمود. با انتقال ژن این پروتئینها به گیاهان اثر حشره‌کشی آنها را می‌توان به گیاهان منتقل نمود. البته واضح است که بسیاری از حشرات به پروتئینهای این باکتری حساسیت ندارند (۱۲).

با توجه به خروج سالانه مقادیر هنگفتی ارز از کشور برای خرید آنزیم کلسترول اکسیداز و نظر به کاربرد وسیع این آنزیم در صنایع، کشاورزی ، پزشکی، پروژه های تحقیقاتی علوم پایه و

1.*Cholesterol: O2Oxidoreductase, EC 1.1.3.6*
2. *Nocardioform*
3. *Nocardia*
4. *Rhodococcus*
5. *Arthrobacter*
6. *Rhodococcus equi*
7. *Mycobacterium*
8. *Nocardia erythropolis*
9. *Nocardia rhodochorous*
10. *Bacillus thurangiensis*

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-08]

آزمایشگاه های تشخیص طبی؛ جداسازی میکروب های مولد این آنزیم بسیار ضروری بنظر میرسد. هدف اصلی این مطالعه ، جدا سازی باکتری های بومی تولید کننده آنزیم کلسترول اکسیداز و تایید مولکولی سویه های بدست آمده می باشد.

مواد و روش‌ها

جمع آوری و آماده سازی نمونه جهت کشت میکروبی

تعداد ۱۸۷ نمونه شامل لبنیات (شیر، کره محلی، سرشیر)، پساب کارخانه چرم وپوست، پساب کارخانجات صابون‌سازی، خاک (باغچه، اطراف مراکز جمع آوری زباله) و آب‌های راکد از شهرهای اصفهان، اهواز، بروجرد، تبریز، تهران، خرم آباد، دزفول، مراغه، مشهد و ملایر جمع آوری گردید.

جهت جداسازی بهتر باکتری از نمونه ها، ابتدا یک گرم از نمونه های جامد یا یک میلی لیتر از نمونه های مایع در صد میلی لیتر آب مقطر به حالت سوسپانسیون در آمده و به مدت ۳۰ دقیقه روی شیکر مخلوط شد.

کشت نمونه ها جهت بدست آوردن باکتری

مقدار ۰/۱ میلی لیتر از محلول رویی، بر روی محیط کشت مینرال آگار تلقیح شد و بمدت ۷ تا ۱۲ روز در انکوباتور ۳۰ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. محیط کشت فوق حاوی کلسترول بعنوان منبع کربن بود.

بعد از اتمام مدت زمان انکوباسیون، تعدای از کلنی های رشد یافته در محیط کشت مینرال آگار حاوی عصاره مخمر تلقیح شده بمدت ۳تا ۵ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد انکوبه شد. در مرحله بعد، کلنی های کرم رنگ و موکوئیدی حاصل برای تعیین هویت میکروبی و بیوشیمیایی مورد آزمایش قرار گرفتند.

تعیین هویت میکروب های جدا شده

جهت تعیین هویت، آزمایشات مختلف اعم از: رنگ آمیزی گرم، تستهای کاتالاز، اکسیداز، حرکت، اوره، لاکتوز، گلوکز، ساکارز ، گزیلوز، رشد بر روی بلاد آگار و رشد بر روی مک کانکی آگار انجام شد.

تائید فعالیت کلسترول اکسیدازی باکتری

به منظور انتخاب کلنی های مولد کلسترول اکسیداز، از دو روش رنگ سنجی و قهوه ای نمودن محیط کشت استفاده شد. در روش رنگ سنجی یک محلول شامل ۰/۵ ٪ کلسترول ، ۱/۷۶ ٪ ۴- آمینوآنتی پیرین ، ۶٪ فنل و ۳۰۰۰ U/lit آنزیم HRP[1] (در بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ M با pH = ۷ آماده شد.سپس یک کاغذ صافی آغشته به محلول فوق، روی کلنی های رشد یافته بر روی پلیت قرار گرفته و پلیت ها بمدت یک شب در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. فعالیت کلسترول اکسیدازی کلنی های مورد آزمایش با تولید رنگ قرمز ناشی از تشکیل کوئینون امینین[2] تائید شد . سپس سویه های مولد رنگ قرمز، جمع آوری شد. در آزمایش قهوه ای نمودن محیط کشت، پلیت محیط کشت با اضافه نمودن مواد زیر شامل : کلسترول ، یک گرم تریتون ۱۰۰- X ، ۰/۱ گرم او- دیانیزیدین[3] ، ۱۰۰۰۰ واحد در لیتر آنزیم پراکسیداز در یک لیتر آگار تهیه شد. در این روش کلسترول به داخل سلولهای باکتریایی نفوذ کرده، منتشر می شود. باکتری بواسطه داشتن آنزیم کلسترول اکسیداز ، کلسترول را تجزیه نموده و پراکسید هیدروژن تولید می نماید که این ماده با معرف پراکسیداز واکنش داده، ترکیب آزو[4] شکل می‌گیرد و رنگ محیط کشت به رنگ قهوه ای در می آید(۱۳).

1. Horse Radish Peroxidase
2. Quinoneimine dye
3. O-dianisidine
4. AZO Compound

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-08]

تعیین هویت مولکولی باکتری

استخراج DNA باکتری

ابتدا باکتری در محیط LB مایع کشت داده شده و به مدت ۱۶ تا ۲۰ ساعت در دمای $37^{o}C$ و دور ۱۸۵rpm در انکوباتور شیکردار گذاشته شد. مقدار۱/۵میلی لیتر از محیط کشت حاوی باکتری رشد یافته به درون میکروتیوبها ریخته و در دور ۱۲۰۰۰rpm به مدت یک دقیقه سانتریفوژ گردید. محلول رویی تخلیه شد و از رسوب سلولی جهت استخراج DNA ژنومی از کیت استخراج DNA شرکت متابیون[1] استفاده شد.سپس DNA ژنومی باکتری در فریزر $20^{o}C$- نگهداری شد.

تکثیر ژن 16s rRNA با استفاده از تکنیک PCR

برای انجام آزمایش 16S rRNA-PCR از پرایمرهای استاندارد (1492R و 27F)استفاده شد. پرایمرهای مزبور هویت باکتریهای جداشده را تا حد گونه مشخص می‌نماید. توالی پرایمرهای مزبور عبارتند از:

Primer 27F: 5' – AGAGTTTGATCMTGGCTC-3'
Primer1492R:5'-ACGGYTACCTTGTTACGACT-3'

مخلوط واکنش برای آزمایش PCR به شرح ذیل بود:

بافر ۱۰X: ۲/۵ میکرولیتر

آب دیونیزه: ۱۱/۲۵ میکرولیتر

$MgCl_2$: ۷۵/ میکرولیتر (۱/۵ میلی مولار)

dNTP: ۵/ میکرولیتر (۲/ میلی مولار)

از هر پرایمر: ۱ میکرولیتر (۵/ میلی مولار)

Taq DNA Polymerase: ۱میکرولیتر (۲/ واحد)

DNA استخراج شده: ۳ میکرولیتر

ژن 16s rRNA در شرایط زیر و با استفاده از دستگاه گرادیانت ترموسایکلر (اپندورف) تکثیر شد.

- $95\ ^{o}C$ ۴ دقیقه
- ۳۰ چرخه:
  - $94^{o}C$ ۴۵ثانیه
  - $56\ ^{o}C$ ۴۵ ثانیه
  - $72\ ^{o}C$ ۶۰ ثانیه
- $72\ ^{o}C$ ۳ دقیقه

پس از انجام واکنش PCR، محصول برای تأئید اولیه روی ژل آگاروز ۰/۸٪ الکتروفورز شد. الکتروفورز قطعات همراه با نشانگرهای وزن مولکولی(مارکر) انجام گردید و تصویر ژل با دستگاه Gel Doc برداشته شد. در مرحله بعدی ،فراورده های حاصل از آزمایش PCR برای تعیین توالی به شرکت ژن فن آوران ارسال شد.

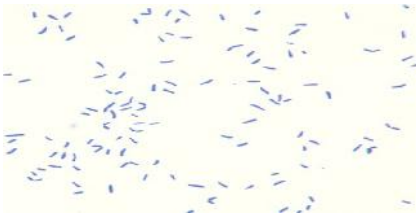
یافته‌ها

جداسازی باکتری از نمونه‌های کشت شده

از منابع خاک اطراف حوضچه های کارخانجات چرم و پوست، خاک باغچه،آب، خاک حوضچه های صابون سازی سنتی و لبنیات محلی شامل:شیر،کره وسرشیر، تعداد ۱۸۷ نمونه جمع‌آوری شد(جدول ۱). ازمیان آنها تعداد ۲ دو نمونهٔ میکروبی جداسازی گردیدکه هر دو نمونهٔ باکتری از نمونه‌های خاک جدا شد.

تعیین هویت میکروبهای جدا شده

بر روی نمونه‌های بدست آمده آزمایش رنگ‌آمیزی گرم انجام شد که در نهایت مشخص گردید که هر دو باکتری جدا شده، کوکوباسیل گرم مثبت می‌باشند(شکل ۱).



شکل ۱. تصویر باکتری گرم مثبت رشد یافته بر روی محیط کشت مینرال که حاوی کلسترول به عنوان تنها منبع کربن میباشد. باکتریها به صورت کوکوباسیل‌های گرم مثبت چسبیده به هم دیده می‌شوند.

1. Metabion

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-08]

جدول۱. محل‌ها و نمونه‌های اخذ شده جهت آماده‌سازی و کشت میکروبی

نوع نمونه محل نمونه برداری	خاک باغچه	خاک اطراف حوضچه های چرم و پوست	آبهای کشاورزی و سطحی	شیر	سر شیر	کره	پسآب صابون سازی سنتی	خاک اطراف مراکز جمع آوری زباله
اصفهان	۴	۷	–	–	–	–	۲	–
اهواز	–	–	–	۳	۲	۵	–	–
بروجرد	۳	–	–	–	–	–	۷	–
تبریز	۶	۷	۵	–	–	–	۱۰	–
تهران	۱۸	۱۲	–	–	–	–	–	۲۰
خرم آباد	۴	۵	۱۰	۳	۲	۴	–	–
دزفول	–	–	–	۴	۳	۲	–	–
مراغه	۲	–	–	۵	–	–	۸	–
مشهد	–	۸	–	–	–	–	–	–
ملایر	۵	–	–	۳	۲	–	۶	–

جدول ۲. نتایج آزمایش‌های بیوشیمیایی تعیین هویت باکتری‌های جدا شده از نمونه خاک

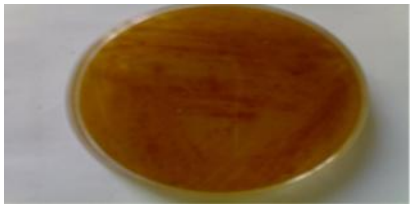
Test	Result	Test	Result
Oxidase	positive	Gram reaction	Positive
Catalase	positive		
Tween 20	positive		
Urease	Negative		
Nitrate Reduction	Negative		
Indole production	Negative		
Motility	positive		
MR	Negative		
VP	Negative		
CAMP test	positive	Growth in MacConkeymedium	NO growth
Xylose	Negative	Growth in Blood agar	Mucoid colonies formation
OF test	Negative	Haemolysis	Negative
Glucose	Negative	Starch hydrolysis	Negative
Lactose	Negative	DNase	Negative
Sucrose	Negative		

با توجه به تستهای انجام شدهٔ بیوشیمیایی جهت شناسایی و جداسازی باکتریهای گرم مثبت نتایج ذیل بدست آمد (جدول۲).

آزمایشهای بیوشیمیایی تعیین هویت باکتری

تأیید فعالیت کلسترول اکسیدازی باکتری

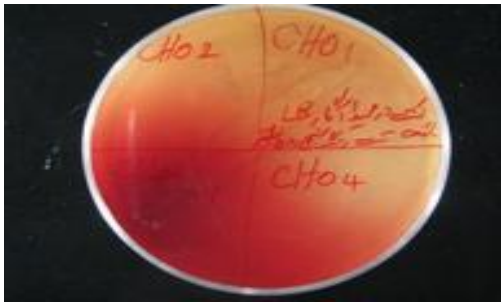
جهت تایید مصرف کلسترول محیط کشت بوسیله باکتری، در محیط کشت مینرال حاوی کلسترول به عنوان تنها منبع کربن سویه های جدا شده کشت گردید و آزمایش‌های قهوه‌ای کردن محیط کشت و رنگ آمیزی کلنی[1] انجام شد. در هر دو آزمایش نتیجه مثبت گزارش گردید که حاکی از اکسید شدن و استفاده کلسترول توسط باکتری جداشده بود. (شکل های۲و۳).



شکل۲. قهوه‌ای شدن محیط کشت توسط باکتری‌های Rhodococcus sp.501,502 مولد آنزیم کلسترول اکسیداز.

1. Colony staining Method

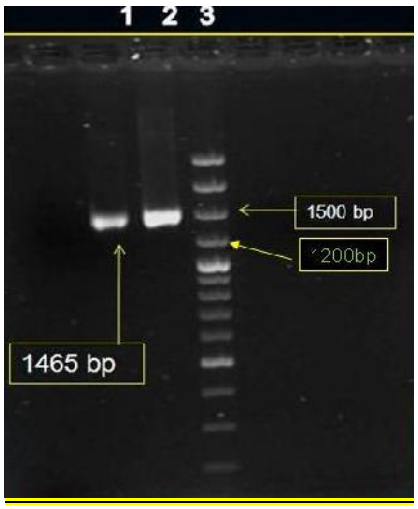
[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-08]



شکل۳. قرمز شدن محیط کشت در اثر واکنش آنزیم کلسترول اکسیداز باکتری Rhodococcus sp.501,502 با معرف رنگزای HRP .

تعیین هویت مولکولی باکتری

با استفاده از پرایمرهای استاندارد (27F و 1492R) آزمایش 16S rRNA-PCR انجام شد که پس از انجام روش تعیین توالی و آنالیز با کمک نرم افزار Blast موجود در سایت NCBI مشخص گردید که هر دو نمونه باکتری های گرم مثبت جدا شده از خاک، متعلق به گونهٔ رودوکوکوس میباشند. آنها به صورت سویه های ۵۰۱ و ۵۰۲ نامگذاری شدند(شکل ۴).



شکل۴. الکتروفورز محصول PCR (16s rRNA) باکتریهای بدست آمده با پرایمرهای استاندارد.۱و۲ :سویه های جدا سازی شده ۵۰۱ و ۵۰۲ ،۳ :مارکر 1kb .

Rhodococcus sp. 501

Taxonomy ID: 634766*Inherited blast name:* high GC Gram+

Rank: species *Genetic code:* Translation table 11 (Bacterial, Archaeal and Plant Plastid)

Lineage(full)

cellular organisms; Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteria (class); Actinobacteridae; Actinomycetales; Corynebacterineae; Nocardiaceae;*Rhodococcus*

بررسی توالی های بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار Blast n در سایت NCBI انجام پذیرفت. نتایج نشان داد که توالی فوق به میزان ۹۶٪ قرابت ژنتیکی با گونهٔ *Rhodococcus equi* دارد. لذا این نمونه ها را *Rhodococcus sp.501, 502* نامیده و توالی نوکلئوتیدی آنها با همین نام در سایت بانک ژنی[1] با شماره دسترسی *Rhodococcus sp. 501 FN 298676* و *Rhodococcus sp. 502 FN 430570* ثبت گردید.

بحث و نتیجه‌گیری

در آنزیم کلسترول اکسیداز اولین آنزیم در مسیر تجزیه کلسترول بوده و یک آنزیم بسیار باارزش در تشخیص کلینیکی و تعیین مقدار کلسترول خون می‌باشد . به لحاظ مصرف، بعد از گلوکز اکسیداز دومین آنزیم پرمصرف است (۱۴). از کاربردهای متعدد این آنزیم می‌توان به تولید پیش‌سازهای داروهای استروئیدی در صنعت داروسازی، حذف کلسترول از فرآورده‌های لبنی و آفت‌کشی اشاره نمود (۹،۱). این آنزیم بطور طبیعی توسط منابع میکروبی مختلفی تولیدو ترشح می‌شود، اما تولید آنزیم بوسیله میکروارگانیسمها به لحاظ کمّی بسیار متغیر است و با توجه به میزان مصرف بالای آنزیم و مشکلات مربوط به خالص‌سازی آن از منابع میکروبی، ژن کلسترول اکسیداز از گونه‌های متعدد میکروبی توسط محققین زیادی جداسازی

1. Gene bank (NCBI)

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-08]

و کلون گردیده است(۱۵) . هدف اصلی در این مطالعه، جداسازی باکتریهای بومی تولید کننده آنزیم کلسترول اکسیداز و انجام مطالعات ژنتیکی بر روی آنها بود.

در این تحقیق ، بعد از غربالگری نمونه های مختلف از مناطق گوناگون کشور،موفق به جداسازی و تاییدکوکوباسیل های گرم مثبت(از گونه رودوکوکوس) توسط آزمایشهای بیوشیمیایی، میکروبی و مولکولی (16srRNA) شدیم. ایهارا و همکاران نیز در سال ۱۹۸۶ توانستند سه باکتری رودوکوکوس مولد آنزیم را از خاک جدا کنند (۱۱). بطورکلی اعضای این جنس هوازی، گرم مثبت، فاقد حرکت، نوکاردیو فرم و دارای کلنی های موکوئیدی شیری رنگ نسبتا بزرگ بر سطح محیط کشت می باشند که از لحاظ مرفولوژیکی در زیر میکروسکوپ بصورت میله ای،کوکسی یا دیپلوکوک مشاهده میگردند. باکتری رودوکوکوس توانایی تولید و ترشح آنزیم کلسترول اکسیداز را دارد که بواسطه آن میتواند کلسترول موجود در محیط را اکسید نموده و بعنوان منبع کربن مورد استفاده قرار دهد . جهت تایید توانایی فعالیت کلسترول اکسیدازی باکتریهای جدا شده از خاک، تست قرمز نمودن کاغذ صافی انجام گرفت که نتیجه آن مثبت بود. این دستاورد مبتنی بر روش بکار رفته در مطالعه ی ایزوب و همکاران بود. (۱۶)

جهت اطمینان از تولید و ترشح نوع آنزیم کلسترول اکسیداز (داخل یا خارج سلولی و یا متصل به غشا) با روشهای استاندارد ساساکی و همکاران موفق به ترشح آنزیم به دو طریق داخل و خارج سلولی شدیم که با تحقیق محققین ژاپنی، ایرانی و ایتالیایی در سالهای ۲۰۰۸ و ۲۰۰۹ همخوانی داشت (۴ و ۸ و۹).

در مطالعات تعیین توالی باکتری(16SrRNA) مشخص گردید که سویهٔ مورد نظر بمیزان ٪۹۹ با رودوکوکوس اکویی مشابهت داشت. طباطبایی و همکاران نیز در سال ۲۰۰۸ میلادی موفق به جداسازی این آنزیم از سویه رودوکوکوس اکویی*PTCC1633* گردیدند (۶). به همین منظور از نمونه های مختلف جمع آوری شده، کشت ، غربالگری و انجام آزمایش 16srRNA PCR انجام گردیدکه در نهایت پس از تعیین توالی، دو باکتری رودوکوکوس به نامهای رودوکوکوس گونه ۵۰۱ و رودوکوکوس گونه ۵۰۲ جداسازی شد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی لرستان و همکاری علمی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری قدردانی می‌نمایند.

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-08]

References

1. Kumari L, Kanwar S. Cholesterol Oxidase and Its Applications. Advances in Microbiol. 2012; 2: 49-65.
2. MacLachlan J, Wotherspoon AT, Ansell RO, Brooks CJ. Cholesterol oxidase: sources, physical properties and analytical applications. J Steroid Biochem Mol Biol. 2000; 72(5):169-195.
3. Navas J, Gonzalez-Zotn B, Ladron N, Garido P, Vazquez-Boland JA. Identification and mutagenesis by allelic exchange of cho E, encoding a cholesterol oxidase from the intracellular pathogen Rhodococcus equi. J. Bacteriol. 2001; 183(16): 4796-4805.
4. Yao K, Wang FQ, Zhang HC, Wei DZ. Identification and engineering of cholesterol oxidases involved in the initial step of sterols catabolism in Mycobacterium neoaurum. Metab Eng. 2013;15:75-87.
5. Pollegioni L, Piubelli L, Molla G. Cholesterol oxidase: biotechnological applications.FEBS Journal. 2009; 276: 6857-6870.
6. Tabatabaei-Yazdi M, Tabatabaei-Yazdi Z, Ghasemian A, Zarrini G, Olyaee NH, Sepehrizadeh Z. Purification and characterization of extra-cellular cholesterol oxidase from Rhodococcus sp. PTCC 1633. Biotechnol. 2008; 7(4): 751-756.
7. Yam KC, Okamoto S, Roberts JN, Eltis LD. Adventures in Rhodococcus — from steroids to explosives. J Clin Microbiol. 2011;57:155-168.
8. Ahmad S, Roy PK, Basu SK. Cholesterol side-chain cleavage by immobilized cells of Rhodococcus equi DSM 89-133. Indian J. Exp. Biol. 1993; 31(4): 319-322.
9. Doukyu N, Characteristics and biotechnological applications of microbial cholesterol oxidases. Appl Microbiol Biotechnol. 2009; 83:825- 837.
10. Corbin DR, Grebenok RJ, Ohnmiess TE. Expression and chloroplast targeting of cholesterol oxidase in transgenic tobacco plants. Plant Physiol. 2001; 126(3): 1116-1128.
11. Aihara H, Watanabe K, Nakamura R. Characterization of production of cholesterol oxidases in three Rhodococcus strains. J. Appl. Bacteriol. 1986; 61(4): 269-274.
12. Purcell JP, Greenplate JT, Jennings MG, Ryerse JS, Pershing JC, Sims SR, Prinsen MJ, Corbin DR, Tran M, Sammons RD. Cholesterol oxidase: a potent insecticidal protein active against boll weevil larvae. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1993;196(3): 1406-1413.
13. Abele, J. Khayam-Bashi, H. 1979. Aqueous primary standard for use in measuring cholesterol by the cholesterol oxidase method. Clin. Chem., 25(1): 132-135.
14. Vrielink A, Ghisla S. Cholesterol oxidase: biochemistry and structural features. FEBS Journal. 2009; 276:6826-6843.
15. Fujishiro K, Uchida H, Shimokawa K, Nakano M, Sano F, Ohta T, Kayahara N, Aisaka K, Uwajima T. Purification and

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-08]

16. Isobe K, Shoji K, Nakanishi Y, Yokoe M, Wakao N. Purification and some properties of cholesterol oxidase stable in detergents from Proteobacterium Y-134. J Biosci Bioeng. 2003; 95:257-263.

properties of a new Brevibacterium sterolicum cholesterol oxidase produced by E. coli MM294/pnH10. FEMS Microbiol. Lett. 2002; 215(2): 243-248.

[Downloaded from yafteh.lums.ac.ir on 2026-11-08]