آشنایی با پایان نامه‌ها

موضوع: بررسی سلولازهای حاصل از Cellulomonas Sp. Strain O

نگارنده: کیانا پیراسته

استاد راهنما: دکتر مجتبی طباطبایی

پایان‌نامه: جهت دریافت دکترای داروسازی

مکان: دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران

زمان: سال تحصیلی ۷۶ - ۱۳۷۵

در جهان کنونی با پیشرفت صنعت و تکنولوژی، طبیعت و منابع طبیعی چاره‌ای جز عقب نشینی ندارند. هرچه علم بشری جلوتر رفته است، تخریب منابع طبیعی با سرعت بیشتری انجام می‌گیرد.

آلودگیهای آب، هوا، خاک و رشد بی‌رویه فعالیتهای بشری از یک سو و نابودی منابع طبیعی از سوی دیگر یک دم از حرکت باز نمی‌ایستد. حاصل آن که دو جهان آدمی یعنی بیوسفری که به ارث برده و تکنوسفری که خود آفریده است، نه تنها با هم در تعادل نیستند بلکه در ستیزند و آدمی متأسفانه در این میانه قرار گرفته است.

در دهۀ اخیر، در پی مشاهدۀ پیامدهای این ستیز مخرب و در جستجوی راه‌حل‌های علمی برای آن، بشر رو به سوی تکنولوژی تمیز می‌شتابد و با الهام از طبیعت، فرآیندها بیولوژیک را به یاری طلبیده و با تکنولوژی خود پیوند داده است. حاصل این پیوند دانشی است به نام بیوتکنولوژی.

در سال ۱۹۸۱ میلادی فدراسیون اروپایی بیوتکنولوژی، علم بیوتکنولوژی را به‌صورت زیر تعریف نموده است: استفادهٔ کامل از اصول بیوشیمی، میکروبیولوژی و مهندسی شیمی جهت بهره‌برداری تکنولوژیک از تواناییهای بالقوه میکروبها و سلولهای بافتی کشت داده شده.

بیوتکنولوژی علمی است رو به توسعه، که امروزه در بسیاری از جنبه‌های زندگی بشر وارد شده است. صنایع غذایی، دارویی، نساجی، دامپروری، پزشکی و حتی نظامی و کشاورزی مدرن به نوعی با این دانش در ارتباط هستند.

در صنایع غذایی، تهیه: نان، پنیر، ماست، الکل و بسیاری مواد دیگر، در صنایع دارویی تولید بیشتر آنتی بیوتیک‌ها، آنزیم‌ها، برخی ویتامین‌ها و حتی تولید ملکول‌های حیاتی مشابه ملکول‌های حیاتی بدن به کمک بیوتکنولوژی نیازمند است.

دانش پزشکی در سال‌های آینده محدود به روش‌های فعلی نخواهد ماند. داروهایی که اکنون استفاده می‌کنیم اثرات جانبی و گاهی خطرناک زیادی بر سیستم بدن دارند و بیوتکنولوژی می‌تواند داروهایی را در اختیار ما قرار دهد که به‌طور دقیق مشابه ملکول‌های حیاتی عمل کنند تا با اثر کاملاً اختصاصی، عوارض جانبی از بین برود.

بیوتکنولوژی علم جدیدی نیست و سابقهٔ آن به تاریخ تمدن بشر باز می‌گردد. تولید الکل به روش تخمیر از قدیمی‌ترین فرآیندهای بیوتکنولوژیک است. بشر از دیرباز برای بالا بردن میزان الکل در شراب و آبجو، از این روش استفاده می‌کرد، بدون آن که از نقش میکروارگانیسم‌ها در این فرآیند آگاهی داشته باشد.

نخستین کسی که به نقش میکروارگانیسم‌ها پی برد، لویی پاستور بود. برخلاف پندار مردم آن زمان و حتی دانشمندان که فکر می‌کردند هوا باعث ترش شدن شراب و آبجو، یا به عبارتی تبدیل الکل به سرکه می‌شود، لویی پاستور دریافت که مخمرها در غیاب هوا باعث این تغییر می‌شوند و روش پاستوریزاسیون را ابداع نمود تا بتواند مانع رشد و تکثیر مخمرها و در نتیجه مانع ترش شدن شراب شود. این روش نه تنها مانع تبدیل الکل به سرکه می‌گردد بلکه از تبدیل شکر به الکل نیز جلوگیری می‌کند و نه تنها در این مورد بلکه برای حفظ مواد غذایی و جلوگیری از فساد میکروبی آن‌ها به کار می‌رود. به این ترتیب پاستور توانست خدمت بزرگی به جامعهٔ بشری کند.

با رشد روزافزون جمعیت و افزایش تقاضا برای ماده و انرژی باید در پی راههای بهینه استفاده از منابع طبیعی بود. سلولز از فراوانترین مواد طبیعی قابل تجدید می‌باشد ولی متأسفانه توسط همهٔ جانداران قابل استفاده نیست. یکی از بهترین راههای استفاده از سلولز، تجزیهٔ آن به کمک میکروارگانیسمهای سلولیتیک می‌باشد که هم باعث جلوگیری از آلودگی محیط زیست و انباشته شدن بقایای سلولزی گیاهان می‌شود و هم منبعی عظیم از غذا و انرژی برای همهٔ موجودات فراهم می‌کند. میکروارگانیسم سلولوموناس سویهٔ O که از خاک جنگلهای شمالی ایران جدا گردیده است، توان بالایی در تولید آنزیمهای سلولولیتیک اگزو و اندوگلوکاناز دارد. این آنزیم‌های خارج سلولی به جدار خارجی باکتری چسبیده‌اند که نخست باید جدا

شوند. کار آنزیمها به هم وابسته بوده و با هم سینرژیسم دارند.

آنزیمها از محیط کشت جداسازی و تغلیظ می‌شوند. آنزیم‌های تغلیظ شده، برای خالص‌سازی بر روی ستون سفاکریل S - 200 برده شد. میزان جذب نوری فراکسیونهای خارج شده از ستون، مؤید وجود دو پیک، یکی بلند و گسترده و دیگری کوچک بود. پیک اول شامل تمامی پروتئینهای آنزیم اولیه می‌باشد. بنابراین، در ادامهٔ کار برای خالص‌سازی، فراکسیونهای موجود در پیک اول (و یا آنزیم اولیه) بر روی ستون DEAE ـ سفاروز منتقل شد و ۶ پیک مشخص از ستون جدا گردیدند که آزمایش SDS - PAGE مؤید خالص بودن پیک‌های شمارهٔ ۴، ۵ و ۶ بود. پیک چهارم اندوگلوکاناز با وزن ملکولی ۶۰۲۵۶ دالتون و پیک‌های ۵ و ۶ هر دو اگزوگلوکاناز با وزنهای ملکولی ۷۰۷۹۵ و ۵۴۹۵۴ دالتون بودند. در آزمایش اندازه‌گیری pH اپتیمم برای فعالیت آنزیم بهترین pH برای اندوگلوکاناز خالص شده ۷ و برای اگزوگلوکانازها ۶/۵ ـ ۶ می‌باشد. اثر یونهای فلزی بر روی آنزیم تام بررسی شد و نشان داد که یونهای مس و آهن اثر کاهنده بر فعالیت آنزیم و کبالت و منگنز اثر افزاینده بر فعالیت آن دارند. EDTA نیز باعث افزایش اثر آنزیم می‌شوند.

بیوتکنولوژی راهی است برای استفاده از منابع ارزان، تجدید شدنی و قابل دسترسی است که در همه جا وجود دارند و می‌توان گفت که بیوتکنولوژی یکی از مهمترین راه حل‌های رفع مشکلات کنونی زیست محیطی کرهٔ ما می‌باشد. مشکلاتی چون آلودگی طبیعت، رشد روزافزون جمعیت و بالاخره افزایش تقاضا برای ماده و انرژی.

سلولز یکی از فراوان‌ترین منابع طبیعی تجدید شدنی است. منبعی ارزان و فراوان که دستیابی به آن به‌راحتی میسر است. انسان و بسیاری از موجودات دیگر نمی‌توانند به‌طور مستقیم از سلولز استفاده کنند، چون سیستم آنزیمی لازم برای تجزیه آن را ندارند. یکی از راههای استفاده از سلولز تجزیهٔ آن به کمک میکروارگانیسم‌ها است. میکروارگانیسمهایی که آنزیم سلولاز ترشح می‌کنند، سلولز را به مواد با ارزشی چون گلوکز تبدیل می‌نمایند.

در این پایان نامه به بررسی سیستم آنزیمی سویهٔ Cellulomonas, O به شمارهٔ PTCC NI 1327 پرداخته شد.

این سویه از خاک جنگلهای شمال ایران جداسازی شده است. در بررسی‌های قبلی که روی آن انجام گرفته، بهترین دما برای تولید، ۳۰ درجه سانتی‌گراد و بهترین pH، ۷ می‌باشد. همچنین ملاحظه گردیده که وقتی به محیط کشت این باکتری ۱ درصد حجمی توین ۸۰ افزوده شود، حدود ۹۰ درصد از آنزیم‌های اندوگلوکاناز و ۶۰ درصد از آنزیم‌های اگزوگلوکاناز خارج سلولی از دیوارهٔ باکتری‌ها جدا می‌گردند.

با انجام این پایان نامه مشخص شد که این باکتری آنزیمهای اندوواگزوگلوکاناز را به میزان قابل توجهی تولید و به محیط خارج سلول ترشح می‌کند ولی آنزیم بتاگلوکوزیداز خیلی کمی تولید می‌کند.

این آنزیمها برای تجزیه سلولز جامد روی یکدیگر اثر سینرژیسم دارند به‌طوری‌که آنزیم تام فعالیت بیشتری از مجموع فعالیتهای

فراکسیون‌های خالص شده نشان می‌داد.

بهترین زمان برای تولید حداکثر آنزیم و به عبارتی بهترین زمان برداشت کشت‌ها بین روز سوم و چهارم بعد از تلقیح است. در روز سوم بیشترین فعالیت انزیم اگزوگلوکاناز و در روز چهارم بیشترین فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز مشاهده می‌شود. این سویه آنزیم‌های خارج سلولی شامل اندوواگزوگلوکاناز بیشتری از سویهٔ شماره ۱ تولید می‌کند به خصوص آنزیم اگزوگلوکاناز در سویهٔ O حدود ۱۰ برابر بیشتر تولید می‌شود ولی در مقابل سویهٔ ۱ آنزیم بتاگلوکوزیداز بیشتری دارد.

برای خالص سازی آنزیم‌ها، روش کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون و کروماتوگرافی تبادل یونی به طور متوالی به‌کار رفت که از این دو روش در بیشتر کارهای خالص سازی استفاده می‌شود.

نتیجه خالص سازی با روش SDS-PAGE بررسی و وجود ۳ پروتئین آنزیمی خالص شامل دو اگزوگلوکاناز و یک اندوگلوکاناز به اثبات رسید. وزن ملکولی اندوگلوکاناز به دست آمده ۶۰۲۵۶ و دو اگزوگلوکاناز به ترتیب ۵۴۹۵۴ و ۷۰۷۹۵ دالتون تعیین شد.

گزارش‌هایی از خالص سازی آنزیم‌های سویهٔ ۱ این باکتری، نشان داده که دو اندوگلوکاناز با وزن ملکولی ۳۸۰۱۸ و ۵۲۴۸۰ دالتون خالص سازی شده است. هم چنین خالص سازی بر روی سلولازهای C.permentans دو اندوگلوکاناز حاصل ۴۰۰۰۰ و ۵۷۰۰۰ دالتونی را نشان داده است. از جمله کارهایی که در این پایان نامه انجام گرفت، مطالعه اثر عناصر کمیاب بر فعالیت آنزیم است.

نتایج و منحنی‌های مربوط همگی حاکی از این بود که وجود این عناصر تأثیر محسوسی بر میزان فعالیت آنزیم‌های سلولاز دارد. عناصری چون آهن و مس باعث کاهش قابل ملاحظه اثرات آنزیمی و در مقابل یون منگنز باعث افزایش اثر آنزیم می‌شوند. یون‌های کبالت و روی تأثیر محسوسی بر فعالیت آنزیم‌های سلولاز ندارد. اگر چه اثر افزایش دهندهٔ یون Co^{2+} در مورد آنزیمهای سلولاز سویهٔ ۱ نیز مشاهده گردیده است. همچنین فعالیت آنزیم سلولاز قارچ T. reesei هم با کبالت زیادتر می‌شود.

افزایش EDTA به محیط باعث افزایش اثر آنزیم می‌گردد که خود مؤید این است که EDTA باعث می‌گردد تا یونهای فلزی که احتمالاً در محیط وجود دارند گرفته شده و اثر کاهندهٔ آنها بر فعالیت آنزیم برداشته شود.