جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

۷ و ۸ اسفند ماه ۱۳۹۲
رشت– دانشگاه گیلان
بیستمین کنفرانس هسته‌ای ایران
Nuclear society of Iran
20th Iranian Nuclear Conference
26-27 February , 2014
University of Guilan Rasht - Iran

ارتقای فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز در قارچ *Trichoderma harzianum* با استفاده از اشعه گاما

فرنگیس، امیرلو*[۱]، سمیرا، شهبازی[۲]؛ حامد، عسکری[۲]

۱. دانشگاه زنجان، دانشکده کشاورزی

۲. سازمان انرژی اتمی، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، پژوهشکده تحقیقات کشاورزی، پزشکی و صنعتی

چکیده

در تحقیق حاضر، اثر پرتو گاما در فعالیت اندوگلوکانازی قارچ Trichoderma harzianum *مورد مطالعه قرار گرفته است. به منظور القای موتاسیون در ژنوم قارچ تریکودرما، سوسپانسیون اسپور آماده شده از کشت‌های هفت روزه قارچ تریکودرما با دستگاه گاماسل با چشمه کبالت ۶۰ تحت پرتوتابی در ددز اپتیمم قرار گرفت. سپس فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز با استفاده از سوبسترای کربوکسی متیل سلولز، در جدایه وحشی قارچ و موتانت‌های آن اندازه‌گیری شد. به طور کلی نتایج به دست آمده نشان داد که کاربرد پرتو گاما در تغییر فعالیت سلولازی تریکودرما مؤثر بوده و بنابراین می‌تواند به عنوان ابزاری کارآمد در برنامه اصلاح سویه‌های میکروبی به کار گرفته شود.*

کلید واژگان: سلولز، اندوگلوکاناز، پرتو گاما، *Trichoderma harzianum*

مقدمه

امروزه آنزیم‌های میکروبی در بسیاری از کاربردهای صنعتی مورد استفاده قرار می‌گیرند و تقاضا برای آنزیم‌های پایدارتر و فعالتر به سرعت در حال افزایش است (۱). آنزیم‌های سلولازی عضوی از خانواده گلیکوزید هیدرولازها بوده و عمل هیدرولیز پیوندهای β-۱و۴ گلیکوزیدی را در سلولز که به عنوان فراوانترین و تجدید-پذیرترین پلیمر طبیعی شناخته می‌شود، به عهده دارند. آنزیم‌های سلولازی توسط تمام گیاهان، بسیاری از قارچ‌ها، برخی از باکتری‌ها و تعداد کمی از حیوانات تولید می‌شوند (۲) اما قارچ‌های رشته‌ای و به ویژه قارچ تریکودرما به علت ظرفیت زیاد تولید پروتئین خارج سلولی منابع ترجیحی برای تولید صنعتی سلولاز به شمار می‌روند (۳). سلولازها گستره وسیعی از کاربرد در فناوری زیستی از جمله داروسازی، صنایع غذایی، صنایع پالپ و کاغذ، نساجی، شوینده، نانوایی و تغذیه دام و طیور دارند و از لحاظ تبدیل سلولز به فرآورده‌های مفیدی همچون سوخت زیستی اتانول، پروتئین‌های تک یاخته[۱] و ترکیبات شیمیایی نظیر اسیدهای آلی، گلیسرول، پلیمرهای پلاستیکی و محصولات ارزشمند دیگر به خوبی شناخته شده‌اند (۴). آنزیم‌های سلولازی به صورت کمپلکسی از سه گروه آنزیمی متشکل از اندو ۱ و ۴ گلوکاناز، اگزوگلوکاناز و بتا ۱ و ۴ گلوکوزیداز می‌باشند که به طور تعاونی با یکدیگر پیوندهای β-۱ و ۴ گلیکوزیدی را در سلولز هیدرولیز می کنند (۵). اندوگلوکانازها که به نام کربوکسی متیل سلولازها نیز معروفند، به طور تصادفی پیوندهای β- گلیکوزیدی درون مولکولی را در زنجیره سلولزی می‌شکنند و منجر به کاهش سریع در درجه پلیمریزاسیون آن می‌شوند. اندازه‌گیری فعالیت

[۱]- Single cell proteins

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

اندوگلوکاناز با استفاده از سوبسترای کربوکسی متیل سلولز، سنجش CMCase نام می‌گیرد (۶). از آنجا که به طور معمول مقدار آنزیم تولیدی سویه‌های وحشی کم است، برنامه بهبود سویه‌ها با فرض افزایش عملکرد آنزیم‌ها و کاهش هزینه تولید آنها انجام می‌گیرد (۷). تاکنون روش‌های متعددی همچون استفاده از موتاسیون-های شیمیایی، پرتو فرابنفش و نیز ترکیب عوامل جهش‌زا برای دست‌یابی به سویه‌های با توان بیش‌تولید آنزیم به کار رفته است (۳). پرتو گاما نیز به عنوان ابزار القای تغییرات ژنتیکی به طور موفقی در بسیاری از مطالعات به کار گرفته شده است. استفاده از پرتوهای یونیزه کننده نظیر گاما در مقایسه با عوامل جهش‌زای شیمیایی مزایای بسیاری دارد. این پرتوها به سرعت در بافتها نفوذ نموده و بسته به نرخ دز به کار رفته، ترکیبات متعددی حاصل می‌کنند (۸). بر اساس گزارشات، اثرات جهش‌زایی پرتو گاما از مواد شیمیایی نظیر اتیل متان سولفونات بیشتر است. پرتو گاما از امواج الکترومغناطیسی با طول موج بسیار کوتاه است که طول موج آن از ۱ تا ۰/۰۱ آنگستروم تغییر می‌کند ولی در مقابل فرکانس آن بسیار بالاست. جرم آن در مقیاس اتمی صفر، سرعت آن برابر سرعت نور و فاقد بار الکتریکی می‌باشد. انرژی اشعه گاما از ۱۰ کیلو الکترون ولت تا ۱۰ مگا الکترون ولت متغیر است. پرتوتابی با اشعه گاما سبب تغییر ساختمان شیمیایی مولکول‌های ماده وراثتی (DNA) می‌شود که نتیجه آن جهش ژن یا شکستن کروموزوم و ترتیب مجدد بازهای آلی خواهد بود (۹). پژوهش حاضر در جهت کاربرد صلح آمیز فناوری هسته‌ای، با هدف ایجاد تنوع در ذخیره ژنتیکی قارچ تریکودرمای بومی و دستیابی به ژنوتیپ‌های جدید با توان فعالیت اندوگلوکانازی بیشتر با استفاده از القای موتاسیون با پرتو گاما در گونه قارچی *T. harzianum* انجام گرفته است.

روش کار

میکروارگانیسم

سوسپانسیون نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از اطراف ریشه در مزارع کشت محصولات مختلف به محیط کشت PDA[۱] انتقال داده شد. کلنی‌های حاصل پس از تهیه تک اسپور (به منظور خالص‌سازی)، با استفاده از کلید شناسایی قارچ‌های ناقص و بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی و اونتوژنز کنیدیوم‌ها شناسایی و جدایه-های متعلق به گونه *T. harzianum* جهت اجرای تحقیق انتخاب گردید.

تعیین دز اپتیمم و پرتوتابی نمونه‌ها

ابتدا سوسپانسیون اسپوری از کشت‌های هفت روزه قارچ تریکودرما، تهیه و غلظت آن با استفاده از لام هموسایتومتر در(spore/ml) $۱۰^{۷}$ تنظیم گردید. **به** منظور تعیین دز مناسب، عملیات پرتوتابی سوسپانسیون اسپور در نه دامنه دز ۰– ۵۰– ۱۵۰– ۲۰۰– ۲۵۰– ۳۰۰– ۳۵۰– ۴۰۰ و ۴۵۰ گری (هریک سه تکرار) در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از دستگاه گاماسل با چشمه کبالت ۶۰، اکتیویته ۲۵۰۰ کوری و نرخ دز ۰/۲۳

[۱]- Potato dextrose agar

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

گری در ثانیه مستقر در مرکز تحقیقات کشاورزی، صنعتی و پزشکی هسته‌ای کرج انجام شد. بعد از تعیین محدوده مناسب پرتوتابی، سوسپانسیون اسپوری با غلظت (spore/ml) 10^{7} از کشت های هفت روزه قارچ تریکودرما بر روی محیط کشت PDA تهیه شد و تحت پرتوتابی در دز اپتیمم قرار گرفت.

شرایط کشت و تولید آنزیم

پس از گذشت یک هفته از کشت جدایه‌های قارچ تریکودرما بر روی محیط (MYGA[1]) شامل عصاره مالت (۵ g/l)، عصاره مخمر (۲/۵ g/l)، گلوکز (۱۰ g/l) و آگار (۱۵ g/l)، با اضافه کردن محلول سیلین استریل (۹ g/l NaCl) اسپورها از سطح پلیت جمع‌آوری و تراکم اسپورها در (10^{7} spore/ml) تنظیم شد. یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور تهیه شده به ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مندلز با pH=۴/۸ (۱۰) که شامل ۱۰ g/l گلوکز به عنوان منبع کربنی بود، اضافه گردید. محیط‌های کشت، سپس به مدت ۲۴ ساعت در شیکر انکوباتور (دمای °C ۲۸ و ۱۸۰ دور در دقیقه) قرار گرفت و پس از رشد کامل میسلیوم به مدت ۷ دقیقه، سانتریفیوژ (۴۵۰۰ rpm) و مایع فوقانی آنها دور ریخته شد. بعد از شستشوی توده میسلیوم با محلول سیلین، تلقیح محیط کشت تخمیری تریکودرما[2] (محیط کشت تولید آنزیم) شامل عناصر معدنی مندلز (۱۰) و ۵ گرم در لیتر (PASC[3]) به عنوان القا کننده تولید آنزیم با میسلیوم انجام و محیط‌های کشت در همان شرایط قبل گرمخانه‌گذاری گردید. پس از گذشت ۴۸ ساعت، محیط‌های کشت به مدت ۷ دقیقه سانتریفیوژ (۴۵۰۰ rpm) شد و مایع فوقانی به منظور اندازه‌گیری غلظت پروتئین و فعالیت آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت.

اندازه‌گیری غلظت پروتئین خارج سلولی و سنجش آنزیمی

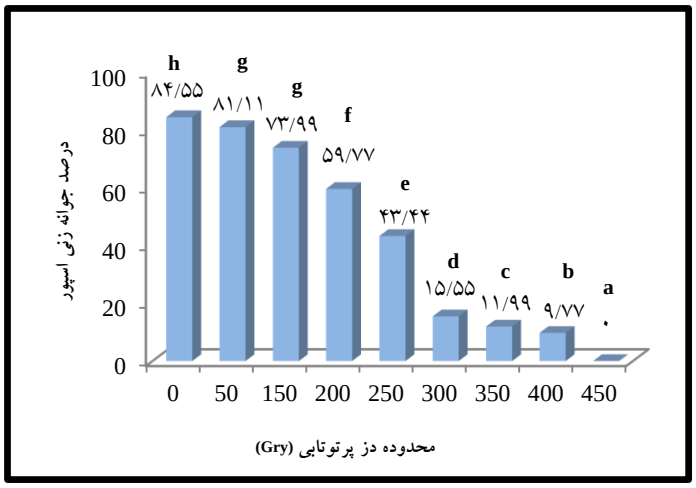
پروتئین محلول ($mg.ml^{-1}$) در مایع فوقانی محیط تولید آنزیم به روش بردفورد (۱۱) و با استفاده از بوین سرم آلبومین به عنوان استاندارد تعیین گردید. فعالیت آنزیم سلولاز با استفاده از متد (DNS[4]) و گلوکز به عنوان استاندارد (۱۲) اندازه‌گیری و فعالیت آنزیمی ویژه بر اساس واحد Units/mg گزارش شد. فعالیت آنزیمی ویژه به صورت مقدار فعالیت آنزیم براساس واحد Units/ml (که در آن هر Unit مقدار آنزیمی است که یک میکرومول گلوکز را در دقیقه از سوبسترای سلولزی آزاد کند) به مقدار کل پروتئین موجود در محیط (mg/ml) تعریف می‌شود. کلیه آزمایشات در سه تکرار صورت گرفته و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۱ انجام شده است.

[1]- Malt yeast glucose agar
[2]- *Trichoderma* fermantation medium
[3]- phosphoric acid swollen cellulose
[4]- Dinitrosalicyclic acid

نتایج

تعیین دز اپتیمم

مقایسه درصد جوانه‌زنی اسپور پس از گذشت ۲۴ ساعت از زمان پرتوتابی قارچ تریکودرما در نه دز مختلف به منظور تعیین مناسب‌ترین محدوده جهت پرتوتابی، تیمارها را در چند گروه مختلف قرار داد. بر اساس شکل (۱) که مقایسه میانگین درصد جوانه‌زنی اسپور قارچ تریکودرما پس از پرتوتابی را نشان می‌دهد، با افزایش میزان دز جذبی، قدرت جوانه‌زنی اسپور به تدریج کاهش یافت و پرتوتابی در محدوده دز ۴۵۰ گری، جوانه‌زنی اسپور قارچ را به طور کامل متوقف نمود. معیار دز جذبی مناسب برای القای موتاسیون غیر کشنده در میکروارگانیسم‌ها ظهور تقریباً ۴۰ تا ۵۰ درصد جوانه‌زنی اسپور بعد از پرتوتابی است (۱۳). از آنجا که در محدوده دز ۲۵۰ گری حدود ۴۴ درصد از اسپورها توان جوانه‌زنی خود را حفظ نموده‌اند، این دز به عنوان دز اپتیمم به منظور القای موتاسیون در ژنوم قارچ تریکودرما انتخاب گردید.

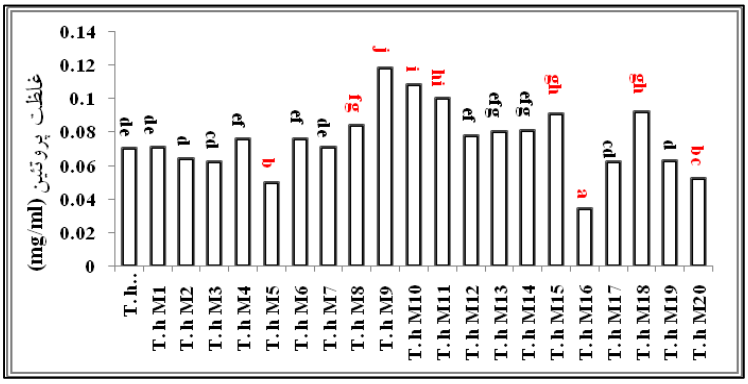


شکل ۱. مقایسه میانگین درصد جوانه‌زنی اسپور قارچ تریکودرما در نه دز مختلف
(میانگین‌های با حروف مشترک در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند).

اندازه‌گیری پروتئین خارج سلولی در مایع فوقانی محیط تخمیر

غلظت پروتئین خارج سلولی در سویه‌های موتانت *T. harzianum* محدوده‌ای بین (mg/ml) ۰/۰۳۴ تا ۰/۱۱۸ داشته و غلظت پروتئین سویه‌های M۵, M۸, M۹, M۱۰, M۱۱, M۱۵, M۱۶, M۱۸ و M۲۰ اختلاف معنی‌داری با جدایه وحشی در سطح احتمال ۰/۰۵ نشان داده است (شکل ۲). بیشترین میزان پروتئین به دست آمده با (mg/ml) ۰/۱۱۸ و ۰/۱۰۸ به ترتیب مربوط به دو سویه M۹ و M۱۰ می‌باشد که در مقایسه با غلظت پروتئین جدایه وحشی این گونه (۰/۰۷۰ mg/ml) با افزایشی ۱/۷ و ۱/۵ برابری همراه بوده است. به طور کلی، نتایج

سنجش غلظت پروتئین نشان داد که پرتو گاما سبب ایجاد تغییر در تولید یا ترشح پروتئین در سویه‌های موتانت در مقایسه با جدایه وحشی شده است.



شکل ۲. مقایسه میانگین غلظت پروتئین خارج سلولی (mg/ml) در گونه *T. harzianum*

(میانگین‌های با حروف مشترک در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی

بر اساس جدول (۱) که مقایسه میانگین فعالیت CMCase در سویه‌های وحشی و موتانت *T. harzianum* را نشان می‌دهد، اختلاف معنی‌داری در فعالیت اندوگلوکانازی سویه‌های موتانت M۳, M۵, M۷, M۹,M۱۰, M۱۱, M۱۳, M۱۵, M۱۶ و M۱۸ با جدایه وحشی آنها در سطح احتمال آماری ۰/۰۱ وجود دارد. از میان سویه‌های نامبرده، فعالیت اندوگلوکانازی سویه‌های M۳, M۵, M۷ و M۱۶ در مقایسه با جدایه وحشی که فعالیتی برابر ۵۱/۷۱ U/mg دارد، افزایش و فعالیت سایر سویه‌ها کاهش یافته است. بیشترین فعالیت آنزیمی با ۸۱/۴۷ U/mg به سویه M۱۶ اختصاص دارد که فعالیت آن نسبت به سویه وحشی ۱/۶ برابر شده است. کمترین میزان CMCase با ۳۷/۸۰ U/mg نیز مربوط به سویه M۱۱ است که تفاوت معنی‌داری با CMCase سویه های M۹, M۱۰, M۱۳, M۱۵ و M۱۸ در همان سطح احتمال ندارد.

جدول ۱. مقایسه میانگین فعالیت اندوگلوکاناز (U/mg) در سویه‌های وحشی و موتانت قارچ *T. harzianum*

سویه	فعالیت ویژه (U/mg)	سویه	فعالیت ویژه (U/mg)	سویه	فعالیت ویژه (U/mg)
***T. h* control**	۵۱/۷۱ fghij	***T. h* M۷**	۵۹/۱۵ de	***T. h* M۱۴**	۴۶/۰۵ jk
***T. h* M۱**	۴۶/۷۶ ijk	***T. h* M۸**	۴۸/۱۰ hij	***T. h* M۱۵**	۳۸/۵۷ lm
***T. h* M۲**	۵۴/۸۴ efg	***T. h* M۹**	۳۸/۵۰ lm	***T. h* M۱۶**	۸۱/۴۷ a
***T. h* M۳**	۶۳/۲۳ cd	***T. h* M۱۰**	۴۲/۴۱ kl	***T. h* M۱۷**	۵۳/۸۷ efgh
***T. h* M۴**	۵۴/۲۱ efg	***T. h* M۱۱**	۳۷/۸۰ lm	***T. h* M۱۸**	۳۸/۸۰ lm
***T. h* M۵**	۷۳/۲۰ b	***T. h* M۱۲**	۴۹/۷۴ ghij	***T. h* M۱۹**	۴۸/۸۹ ij
***T. h* M۶**	۴۷/۸۹ ijk	***T. h* M۱۳**	۴۲/۲۵ kl	***T. h* M۲۰**	۵۵/۵۸ efg

(میانگین‌های با حروف مشترک در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌داری ندارند).

بحث و نتیجه‌گیری

موتاسیون تصادفی، ابزار ساده‌ای برای دستیابی به تغییرات ژنتیکی و ایجاد ژنوتیپ‌های جدید در یک ارگانیسم است. تاکنون بسیاری از تکنیک‌های موتاسیون کلاسیک جهت ارتقای تولید و فعالیت آنزیم سلولاز در سویه‌های مختلف میکروبی به کار رفته است. به طور کلی، نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان داد که امکان ایجاد تغییر در فعالیت اندوگلوکانازی تریکودرما در اثر پرتو گاما وجود دارد و ایجاد سویه‌های قارچی با توان بیش تولید آنزیم که پتانسیل کاربرد بیشتری در مصارف صنعتی را داشته باشند، توسط القای موتاسیون با اشعه گاما ممکن است. پرتو یونیزه کننده گاما با اثرات جهش‌زایی خود در گسترش ذخیره ژنتیکی قارچ تریکودرمای بومی کشور مؤثر بوده و می‌تواند به عنوان ابزاری کارآمد در برنامه‌های اصلاح سویه‌های میکروبی به منظور افزایش تولید یا فعالیت متابولیت‌های مختلف به کار گرفته شود.

مراجع

۱) Bhat. M. K, Cellulases and related enzymes in biotechnology, Biotechnology Advances,۱۸: ۳۵۵-۳۸۳, ۲۰۰۰.
۲) Wilson. D. B, Cellulases, Applied Microbiology: Industrial Cellulases, ۲۵۲-۲۵۸, ۲۰۰۹.
۳) Jun. H, Bing. Y, Keying. Z, Xuemei. D, and Daiwen. C, Strain improvement of *Trichoderma reesei* Rut C-۳۰ for increased cellulase production, Indian J Microbiol, ٤۹: ۱۸۸-۱۹۵, ۲۰۰۹.
٤) Sukumaran. R. K, Singhania. R. R, and Pandey. A, Microbial cellulose - production, applications and challenges, Journal of Scientific and Industrial Research, ٦٤: ۸۳۲-۸٤٤, ۲۰۰۵.
٥) Teeri. T. T, Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases, Trends Biotechnol, ۱٥: ۱٦۰-۱٦۷, ۱۹۹۷.
٦) Zhang. Y. H, Himmel. M. E, and Mielenz. J. R, Outlook for cellulose improvement: screening and selection strategies, Biotechnol Adv, ۲٤: ٤٥۲-٤۸۱, ۲۰۰٦.
۷) Li. X, Yang. H, Roy. B, Park. E, Jiang. L, Wang. D, and Miao. Y, Enhanced cellulose production of the *Trichoderma viride* mutated by microwave and ultraviolet, Microbiological Research, ۱٦٥: ۱۹۰-۱۹۸, ۲۰۱۰.
۸) Parker. J. A, and Darby. J. L, Particle-associated coliform in secondary effluents: shielding from ultraviolet light disinfection, Water Environ, Res, ٦۷(۷): ۱۰٦٥-۱۰۷٥, ۱۹۹٥.
۹) اهری مصطفوی. ح و صفایی. ن، کاربرد فناوری هسته‌ای در کشاورزی، نشر پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، تهران، ۱۳۸۷.
۱۰) Mandels. M, and Weber. J, Cellulase production by *Trichoderma reesei*, J. Adv. Chem. Ser, ۹٥: ۳۹۱-٤۱٤, ۱۹٦۹.
۱۱) Bradford. M. M, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding, Analytical Biochemistry, ۷: ۷۲: ۲٤۸-٥٤, ۱۹۷٦.
۱۲) Ghose. T. K, Measurement of cellulase activities, Pure Appl Chem, ٥۹: ۲٥۷-٦۸, ۱۹۸۷.
۱۳) اهری مصطفوی. ح، کاربرد فناوری هسته‌ای در مدیریت علف‌های هرز و بیماری‌های گیاهی، ۳۳۱–۳۳۵، چکیده مقالات دومین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی، ۱۹–۲۰ خرداد ماه، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای کرج، ۱۳۸۷.