تعیین فعالیت سلولازی آکتینومیست‌های گرمادوست موجود در کمپوست قارچ خوراکی به روش ارزیابی با کاغذ صافی

نفیسه تقی‌زاده[۱،*]، محمد فارسی[۱]، علی پاکدین پاریزی[۲] و سعید طریقی[۳]

[۱] مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی

[۲] ساری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری طبرستان

[۳] مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، گروه بیماریهای گیاهی

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۲/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۱/۴/۱۱

چکیده

آکتینومیست‌ها، به ویژه گونه‌های گرمادوست، به عنوان اصلی‌ترین اجزای میکروفلور کمپوست قارچ خوراکی دکمه‌ای شناخته شده‌اند. این گروه از باکتریها در تولید آنزیمهای تجزیه‌کننده و آنتی‌بیوتیکها توانایی زیادی دارند. آکتینومیست‌های گرمادوست از مراحل مختلف تهیه کمپوست با تکنیک رقیق‌سازی جداسازی شدند و کشت خالص آنها تهیه گردید. از نتایج تستهای بیوشیمیایی و تجزیه و تحلیل الگوی برشی ژن *16SrRNA* برای شناسایی جدایه‌ها استفاده شد. توانایی تجزیه سلولز در هر کدام از جدایه‌ها با استفاده از روش ارزیابی با کاغذ صافی در دما و pHهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت. حداکثر فعالیت آنزیمی برای هر کدام از جدایه‌ها بر اساس میلی‌گرم گلوکز آزاد شده از یک میلی‌لیتر عصاره ناخالص تعیین شد. بر اساس نتایج به دست آمده، دما و pH بهینه فعالیت آنزیمی برای جدایه‌های مختلف متفاوت بود. در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد جدایه ۲۳ با میانگین ۱/۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، فعال ترین ایزوله سلولازی معرفی شد. این ایزوله‌ها جهت بهینه‌سازی کمپوست قارچ به کار برده شدند.

واژه های کلیدی: آکتینومیست‌های گرمادوست، ارزیابی با کاغذ صافی، فعالیت سلولازی، کمپوست

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۳۶۳۲۵۱۷۴۸، پست الکترونیکی: na65_taghizadeh@yahoo.com

مقدمه

از گذشته‌های دور قارچها دارای ارزش دارویی و خوراکی برای بشر بوده‌اند. با عمومیت یافتن کشت و پرورش قارچ تولید جهانی آن افزایش یافته است. تولید قارچ می‌تواند مقادیر عظیمی از مواد زائد لیگنوسلولزی را به طیف گسترده‌ای از محصولات (دارویی، خوراکی و کود) تبدیل کند و همچنین از محیط زیست محافظت نماید (۱). قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید با سایر قارچهای خوراکی مورد کشت، از نظر تغذیه‌ای و درمانی تفاوت چندانی ندارد، اما آنچه که این قارچ را کاملاً متمایز از سایر قارچها ساخته است، گسترش جهانی تولید این قارچ است، به طوری که این قارچ در تمامی سوپرمارکتهای جهان فروش زیادی دارد (۵). افزایش عملکرد قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید وابستگی مستقیم با کیفیت کمپوست دارد. برای پژوهشگرانی که راجع‌به کمپوست تحقیق می‌کنند تعیین تنوع و ساختار جمعیت میکروبی درگیر در فرآیند کمپوست‌سازی بسیار مهم است. جمعیت میکروبی کمپوست نقش اساسی در تولید کمپوست با کیفیت مطلوب دارد (۱۷).

آکتینومیست‌ها به ویژه گونه‌های گرمادوست مهم ترین اجزای جمعیت میکروبی کمپوست هستند که به عنوان تجزیه‌کننده مواد سلولزی از نظر کشاورزی، بسیار حائز

Archive of SID

www.SID.ir

اهمیت می‌باشند. این باکتریها منابع مهم تولید آنتی‌بیوتیکها به شمار می‌روند(۴).

آکتینومیست‌های گرمادوست هوازی و غیر اسید فست هستند. این موجودات گرم مثبت و دارای فیلامنت‌های شاخه‌دار بوده و در دیواره سلولی آنها میکولیک اسید وجود ندارد (۱۰). این گروه بیشتر بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی از جمله تولید میسلیوم هوایی و رویشی طبقه‌بندی شده‌اند. جنسهای مختلفی در این گروه از آکتینومیست‌ها وجود دارند (۲۱).

جنس *Streptomyces* یکی از مهم ترین آکتینومیست‌های گرمادوست است. گونه‌های این جنس توانایی تجزیه بسیاری از ماکرومولکولهای مختلف مانند ترکیبات سلولزی، نشاسته، لیپید و کیتین را دارا می‌باشند. نژادهای متفاوتی از آنها برای توانایی تجزیه سلولز مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. نژادهای *Streptomyces* مقادیر زیادی پروتئینهای خارج‌سلولی از جمله سلولاز ترشح می‌کنند (۱۳).

سلولازها کمپلکسی آنزیمی از سه گروه می باشند که بطور هم‌افزایی با یکدیگر عمل می‌کنند و می‌توانند پیوندهای گلوکوزیدی β(۱- ۴) را هیدرولیز نمایند. این آنزیم از بتا ۱و۴- اندوگلوکاناز، سلوبیوهیدرولاز و بتا گلوکوزیداز تشکیل شده است (۲۰).

در مطالعه ای که توسط جانگ و چن در سال ۲۰۰۳ انجام شد، جدایه‌ای از جنس *Streptomyces* با توانایی تولید سلولاز مقاوم به حرارت معرفی شد (۱۳). محققان دیگری نیز گونه‌های *S. lividens* ، *S.albaduncus* ،*S.reticuli* را گزارش کرده‌اند که در شرایط بهینه و استفاده از پودر سلولز به عنوان منبع کربن دارای تولید آنزیم اندوگلوکاناز قابل توجهی بودند (۶).

ترکیب جمعیت میکروبی کمپوست قارچ خوراکی در فاز دوم یکی از مهم ترین عوامل مؤثر در میزان عملکرد قارچ خوراکی است. شناسایی آکتینومیست‌های دارای قدرت تجزیه سلولز می‌تواند جهت دستورزی ترکیب کمپوست استفاده گردد و عملکرد قارچ در واحد سطح را افزایش دهد. هدف از این مطالعه بررسی تنوع این باکتریها و تعیین فعالیت سلولازی آنها به روش اندازه‌گیری سلولاز کل با سوبسترای کاغذ واتمن شماره ۱ بود. این جدایه‌ها برای تلقیح روی کمپوست قارچ خوراکی جهت بهبود کیفیت آن به کار برده شدند.

مواد و روشها

جداسازی باکتریها: نمونه‌های کمپوست مورد استفاده در این تحقیق، از مرکز تحقیقات قارچهای خوراکی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شد. نمونه‌برداری از مراحل مختلف فاز دوم کمپوست‌سازی انجام شد. نمونه‌ها توسط تکنیک رقیق‌سازی در محیط کشت کمپوست آگار غنی شده با محیط CYM (ترکیبات CYM (5X): Peptone ۱ گرم، K_2HPO_4 ۰/۲۴ گرم، $KH_2PO_4$۰/۵ گرم، Yeast Extract ۱ گرم، Dextrose ۱۰ گرم و $MgSO_47H_2O$ ۰/۵ گرم در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر) در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد تا ظاهر شدن کلنی باکتریها قرار داده شدند. کلنیهای با ظاهر گچی و خشبی به محیط جدید منتقل شده و کشتهای خالص از هر کدام از جدایه‌ها تهیه شد.

آزمونهای بیوشیمیایی: آزمونهای احیای‌نیترات، کاتالاز، هیدرولیز اوره، اسیدفست جزئی و رنگ آمیزی گرم روی جدایه‌ها انجام شد. باکتریها برای بررسی ظاهر کلنی و اندام هوایی روی محیط کشت آب-آگار کشت شدند. توانایی تولید ملانین با استفاده از محیط کشت ISP_7 [ترکیبات ISP_7: Glycerol ۱۵ گرم، L-Tyrosine ۰/۵ گرم، L-Asparagine ۱ گر م، K_2HPO_4 ۰/۵ گرم، $MgSO_47H_2O$ ۰/۰۱ گرم، Trace Element HO -LE ۱ میلی‌لیتر (ترکیبات Element HO-LE: H_3BO_3 ۲/۸۵ گرم، $MnCl_24H2O$ ۱/۸ گرم، Sodium Tartate ۱/۷۷ گرم، $FeSO_47H_2O$ ۱/۳۶ گرم، $CoCl_26H_2O$ ۰/۰۴ گرم، $CuCl_22H_2O$ ۰/۰۲۷ گرم،

Archive of SID

www.SID.ir

$Na_2MoO_42H_2O$ ۰/۰۲۵ گرم، $ZnCl_2$ ۰/۰۲ گرم در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) و Agar ۱۵ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر] و تولید رنگیزه در هر کدام از جدایه‌ها با استفاده از محیط کشت ISP_5 [ترکیبات ISP_5: Glycerol ۱۰ گرم، L-Asparagine ۱ گرم، K_2HPO_4 ۱ گرم، Trace Salt Soulation ۱ میلی‌لیتر (ترکیبات Trace Salt Soulation : $FeSO_47H_2O$ ۱ گرم، $MnCl_24H_2O$ ۱/۰ گرم و $ZnSO_47H_2O$ ۰/۱ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) و Agar ۱۵ گرم در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر] مورد بررسی قرار گرفت (۱۸).

شناسایی مولکولی: پس از استخراج DNA از جدایه‌های آکتینومیست، با استفاده از پرایمرهای عمومی ژن *16SrRNA*، *fD1* (توالی پرایمر رفت *fD1*: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') و *rP2* (توالی پرایمر برگشت *rP2*: 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') (۲۲) واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام گردید. چرخه حرارتی PCR به صورت مرحله دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۶ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه، دناتوراسیون در دمای ۹۶ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه در بقیه چرخه‌ها، مرحله اتصال در دمای ۵۶ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله طویل‌شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه انجام گرفت. مرحله آخر طویل شدن به مدت ۵ دقیقه انجام شد. این برنامه در ۳۰ چرخه تکرار گردید. به منظور شناسایی و تعیین تنوع جدایه‌های آکتینومیستها، الگوی برشی ژن *16SrRNA* برای هر کدام از جدایه‌ها پس از هضم با آنزیمهای *Sal*I ,*Hin*dIII ,*Pst*I ,*Kpn*I ,*Mbo*I ,*Vsp*I ,*Pae*I, با استفاده از نرم افزار TotalLabTL120 تهیه شد. الگوهای برشی به دست آمده برای هر جدایه با الگوهای به دست آمده از هضم توالیهای معتبر آکتینومیست‌های ثبت شده در پایگاه اطلاعاتی NCBI که در محیط این‌سیلیکو هضم شده بود مقایسه شد. با استفاده از این نتایج آکتینومیست‌های جداسازی شده شناسایی شدند.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی: از محیط کشت تولید آنزیم سلولاز با ترکیب ((Carboxymethylcellulose)CMC ۱ درصد، Yeast extract ۰/۵ درصد، K_2HPO_4 ۰/۰۵درصد، NaCl ۰/۰۲درصد، $MgSO_47H_2O$، ۰/۰۲درصد، NH_4NO_3 ۰/۱درصد و $FeCl_3$ ۰/۰۰۲درصد) برای تعیین فعالیت آنزیمی جدایه‌ها استفاده شد. باکتریها در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت در این محیط کشت قرار داده شدند. در تراکم نوری یکسان (OD_{600nm}=1)، محیط کشتها پس از عبور از کاغذ صافی، در ۶۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. عصاره حاصل پس از عبور از فیلتر میلی پور (۰/۲۲ میکرومتر) به عنوان منبع آنزیم استفاده گردید. مقدار پروتئین در عصاره آنزیمی ناخالص با روش برادفورد اندازه‌گیری شد (۷). از عصاره‌های آنزیمی به دست آمده از رشد هر جدایه برای توانایی هیدرولیز سوبسترای، فیلتر کاغذی ۶×۱ سانتی‌متری (واتمن شماره ۱) مورد استفاده قرار گرفت. مخلوط سوبسترا با یک میلی‌لیتر عصاره آنزیمی و یک میلی‌لیتر بافر فسفات ۹-۶/۵ pH : به مدت ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه در حمام آب گرم با دماهای ۴۵ تا ۶۵ درجه سانتی گراد نگهداری شد. مقدار قند احیاء کننده آزاد شده با استفاده از روش DNS (Dinitrosalicylic acid) (۱۶) اندازه‌گیری شد. فعالیت‌های آنزیمی به صورت واحد در میلی‌لیتر عصاره ناخالص آنزیمی گزارش شد (۱۱).

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از آزمونهای بیوشیمیایی باکتریهای آکتینومیست جدا شده در جدول ۱ آورده شده است. این نتایج منطبق بر خصوصیات آکتینومیست‌ها بود.

نتایج تجزیه و تحلیل مولکولی: براساس نتایج به دست آمده از هضم این‌سیلیکوی توالیهای ژن *16SrRNA* با

Archive of SID

www.SID.ir

استفاده از آنزیمهای برشی، آنزیم *Mbo*I به عنوان آنزیم کلیدی در شناسایی آکتینومیست‌های جداسازی شده انتخاب شد (۹). با استفاده از الگوی برشی به دست آمده از این آنزیم (شکل ۱) جدایه‌ها را می‌توان به سه گروه متمایز دسته‌بندی کرد (جدول ۲).

جدول۱- مشخصات جدایه‌ها همراه با نتایج تستهای بیوشیمیایی آنها

شماره جدایه‌ها	محل جمع‌آوری (کمپوست)	رنگ اسپور	آزمون گرم	آزمون اسیدفست	آزمون کاتالاز	آزمون اوره‌آز	آزمون احیای نیترات	ISP5	ISP7
۱	فاز ۲	سفید	+	−	+	+	+	+	+
۲	فاز ۲	سفید	+	−	+	−	+	+	+
۳	فاز ۲	سفید	+	−	+	+	+	+	+
۴	فاز ۲	خاکستری	+	−	+	−	+	+	+
۵	فاز ۲	سفید	+	−	−	+	+	+	+
۶	فاز ۲	سفید	+	−	+	+	+	+	+
۷	فاز ۲	خاکستری	+	+	+	+	−	+	−
۸	فاز ۲	سفید	+	−	+	+	+	+	+
۹	فاز ۲	سفید	+	−	+	+	+	+	+
۱۰	فاز ۲	سفید	+	+	+	−	+	+	+
۱۱	فاز ۲	خاکستری	+	−	+	+	+	+	+
۱۲	فاز ۲	سفید	+	−+	+	−	+	+	−
۱۳	فاز ۲	سفید	+	+	+	+	+	+	−
۱۴	فاز ۲	خاکستری	+	−	+	+	+	+	+
۱۵	فاز ۲	سفید	+	+	+	+	−	+	−
۱۶	فاز ۲	سفید	+	−	+	+	−	+	+
۱۷	فاز ۲	خاکستری	+	−	+	+	+	+	−
۱۸	فاز ۲	سفید	+	−	+	+	−	−	+
۱۹	فاز ۲	سفید	+	−	+	+	+	+	−
۲۰	فاز ۲	سفید	+	−	+	+	+	+	+
۲۱	فاز ۲	خاکستری	+	−	+	+	−	+	−
۲۲	فاز ۲	سفید	+	+	+	−	+	+	+
۲۳	فاز ۲	سفید	+	−	+	−	+	+	+
۲۴	فاز ۲	زرد	+	+	+	−	+	+	+

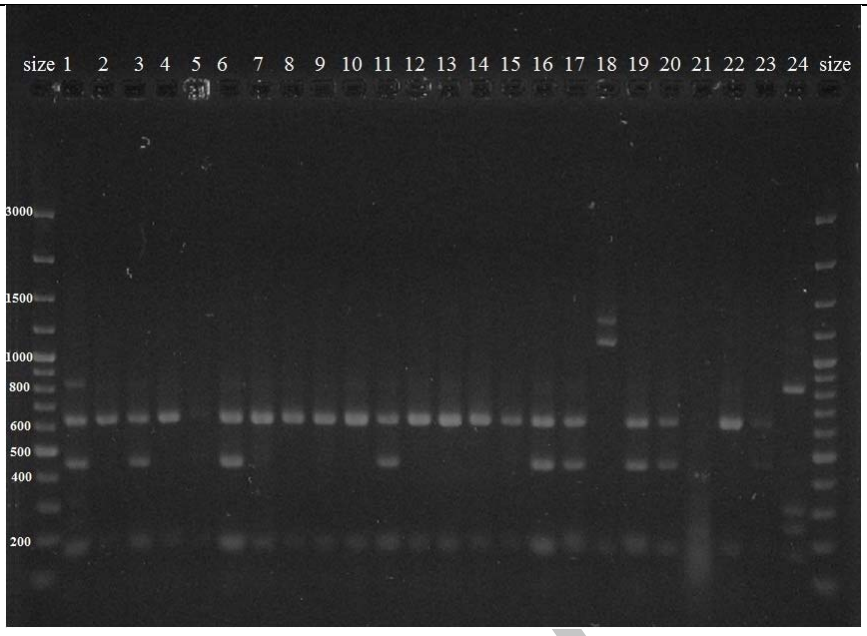
جدول۲- تقسیم‌بندی باکتریها به سه گروه اصلی براساس الگوی برشی آنزیم *Mbo*I

شماره جدایه	الگوی برشی با آنزیم *Mbo*I
۱،۲،۳،۴،۵،۶،۷،۸،۹،۱۰،۱۱،۱۲،۱۳،۱۴،۱۵،۱۶،۱۷،۱۹،۲۰،۲۱،۲۲،۲۳	بزرگترین قطعه DNA <۷۵۰ جفت باز (گروه ۱)
۲۴	دو قطعه مشخص که با هم <۹۸۰ جفت باز (گروه ۲)

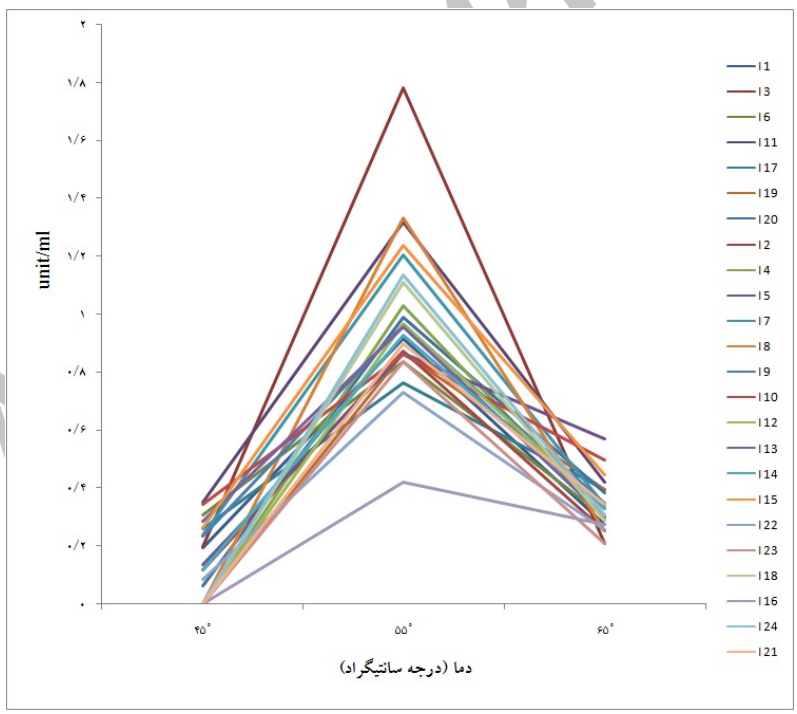
Archive of SID

www.SID.ir

۱۸ بزرگترین قطعه DNA برابر با ۹۸۰ تا ۱۳۵۰ جفت باز (گروه ۳)



شکل۱- الگوی برشی جدایه‌ها بر اساس ژن *16SrRNA*، توسط آنزیم برشی *MboI*



شکل۲- نمودار تغییرات فعالیت سلولازی جدایه‌ها بر اساس تغییرات دما در روشFPU در دماهای ۶۵-۴۵ درجه سانتی گراد

www.SID.ir

گروه اول که براساس الگوی برشی آنزیم *MboI* طبقه‌بندی شده بودند، توسط الگوی برشی حاصله از آنزیمهای *Asn*I، *Kpn*I و *Sph*I شناسایی شدند. تمام جدایه‌های این گروه به جنس *Streptomyces* تعلق داشتند. بر این اساس جنس *Streptomyces*، جنس غالب در میان آکتینومیست‌های گرمادوست جدا شده بود. در گزارشات سایر محققین نیز این جنس به عنوان جنس غالب معرفی شده است (۶و۸). در گروه دوم بر اساس الگوی برشی آنزیم *Mbo*I تنها یک جدایه وجود داشت که با استفاده از الگوهای برشی آنزیمهای *Asn*I, *Pst*I, *Hin*dIII و *Sph*I شناسایی شد. این جدایه در جنس *Thermomonospora* قرار گرفت. برای شناسایی تک جدایه گروه سوم در الگوی برشی آنزیم *Mbo*I، از آنزیمهای *Asn*I، *Sph*I، *Kpn*I، *Hind*III، *Sal*I و *Psp*14061 استفاده شد. بر اساس الگوی برشی این آنزیمها، جدایه گروه سوم در جنس *Saccharomonospora* قرار گرفت. علت استفاده از الگوی برشی آنزیمهای برشی جهت طبقه‌بندی جدایه‌ها این بود که آنزیمهای برشی در دسترس‌ترند. به علاوه در هر آزمایشگاهی می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند در حالی که توالی‌یابی محصول PCR نیاز به امکانات بیشتر و صرف هزینه و وقت بیشتر دارد. بعلاوه در این تحقیق هدف پیدا نمودن جدایه‌های فعال جهت بهبود کیفیت کمپوست بود که با استفاده از نتایج حاصله محقق شد.

اندازه‌گیری فعالیت سلولازی: سلولازهای پروکاریوتی حداکثر فعالیت را در دماهای متفاوت نشان می‌دهند (۱۲)، بنابراین برای تعیین دمای بهینه فعالیت سلولازی جدایه‌ها دماهای ۶۵-۴۵ درجه سانتی گراد مورد بررسی قرار گرفت. شکل۲، نمودار تغییرات فعالیت سلولازی عصاره ناخالص جدایه‌ها را در دماهای مختلف نشان می‌دهد.

تغییرات دما سبب تغییر در فعالیت سلولازی عصاره آنزیمی جدایه‌ها شد. فعالیت سلولازی از ۴۵ درجه سانتی گراد شروع به افزایش نموده است و در ۵۵ درجه سانتی گراد به حداکثر خود رسیده اما روند فعالیت سلولازی بعد از این دما کاهشی شده است (α=۰/۰۵). بنابراین در بین دماهای بررسی شده دمای ۵۵ درجه سانتی گراد با بیشترین میانگین فعالیت سلولازی در تمام جدایه‌ها، بهترین دمای تولید سلولاز برای این جدایه‌ها است. که البته محققین قبلی نیز این دما را به عنوان دمای بهینه گزارش نموده بودند (۱۵و۱۹).

نکته قابل توجه در بین جدایه‌ها مورد بررسی این بود که در هر دما جدایه‌های متفاوتی حداکثر فعالیت را از خود نشان می‌دادند. بنابراین جدایه‌های فعال در هر دما نیز مهم هستند.

جدایه‌های فعال سلولازی در دمای کمپوست: جدایه‌ها مورد بررسی از کمپوست جدا شدند و هدف نهایی آنها نیز برای بهینه‌سازی کمپوست است، بنابراین از مهم‌ترین دماهای مورد نظر دمای ۴۵ درجه سانتی گراد که دمای کمپوست محسوب می‌شود، است. به منظور بررسی فعالیت آنزیمی تمام جدایه‌ها در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد تحت شرایط یکسان در تماس با کاغذ واتمن به عنوان سوبسترا قرار گرفتند تا تفاوت فعالیت آنزیمی آنها در این دما تعیین شود و تغییرات فعالیت آنزیمی‌شان تعیین شود.

در روش سنجش آنزیمی به روش FPU در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد ، جدایه ۲۳ با ۱/۱۰ واحد در میلی‌لیتر آنزیم بیشترین فعالیت آنزیمی را داشت. بعد از این جدایه جدایه‌های ۱۲ ،۱۸ و ۲۴ به ترتیب با ۱/۰۱، ۱/۰۰ و ۰/۹۷ واحد در میلی‌لیتر فعالیت آنزیمی، بیشترین مقادیر را نشان دادند و بیشترین اختلاف را با سایر جدایه‌ها داشتند (α=۰/۰۵).

جدایه‌های فعال سلولازی در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد: دمای ۵۵ درجه سانتی گراد بیشترین میانگین فعالیت آنزیمی را در بین جدایه‌ها نشان داد و به عنوان بهترین دما جهت فعالیت سلولازی بالا در همه جدایه‌ها معرفی شد.

Archive of SID

www.SID.ir

در این دما جدایه ۳ با ۱/۱۸ واحد در میلی‌لیتر آنزیم بیشترین فعالیت آنزیمی را داشت و بعد از این جدایه، جدایه‌های ۸ ،۱۱ و ۱۵ بترتیب با ۰/۸۸، ۰/۸۷ و ۰/۸۲ واحد در میلی‌لیتر فعالیت آنزیمی، بیشترین مقادیر را نشان دادند و بیشترین اختلاف را با سایر جدایه‌ها داشتند (α=۰/۰۵).

از جدایه‌های فعال در هر دما استفاده‌های خاصی می‌شود. جدایه‌های فعال در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد و ۵۵ درجه سانتی گراد برای بهینه‌سازی شرایط کمپوست مفیدند. چرا که محدوده دمایی کمپوست ۵۵-۴۵ درجه سانتی گراد است. بنابراین جدایه‌ها فعال این دماها برای بهینه سازی کیفیت کمپوست مهم و ضروری به شمار می‌روند.

فاکتور مهم دیگر در فعالیت آنزیمی pH است. چرا که اگر در یک واکنش آنزیمی تمام عوامل فراهم باشند. اما pH نامناسب باشد، هیچ واکنشی صورت نمی‌گیرد. بنابراین به منظور تعیین pH بهینه برای جدایه‌های مورد بررسی محدوده pH=۵/۷-۹ در نظر گرفته شد. جدول ۳ تغییرات فعالیت سلولازی را در این pHها نشان می‌دهد.

جدول ۳ – تغییرات فعالیت سلولازی بر اساس تغییرات pH در روش FPU

pH	میانگین فعالیت سلولازی(unit/ml)
۵/۷	۰/۴۸
۶	۰/۵
۶/۵	۰/۷

با افزایش pH تا ۶/۵ میزان فعالیت آنزیمی در تمام جدایه ها افزایش معنی‌داری نشان داده است، اما بعد از ۶/۵ فعالیت آنزیمی کاهش یافته تا جایی که در pH = ۹ به صفر رسیده است، که علت آن را می‌توان در قلیایی شدن محیط جستجو نمود (α=۰/۰۵). در نتیجه pH در نقطه۶/۵ با بیشترین فعالیت آنزیمی در تمام جدایه‌ها به عنوان بهترین pH در محدوده بررسی شده، معرفی شده است.

pH معرفی شده مشابه کار سایر محققین بود که روی آکتینومیست‌ها کار می‌کردند به طور مثال جردیت و همکارانش در ۲۰۰۸ در محدوده pH مورد بررسی‌شان، ۷-۶=pH را برای *Streptomyces* Sp. (J2) مناسب دانستند (۱۴). همچنین جانگ و چن که برای *Streptomyces* T3-1، pH بهینه را ۶ معرفی نمودند (۱۳).

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که بررسی جمعیت میکروبی کمپوست گام مؤثری در جهت بهبود کیفیت آن می‌باشد. با توجه به تعیین تعدادی جدایه فعال و شرایط مساعد فعالیتشان، می‌توان شرایطی فراهم نمود که سلولز کمپوست به خوبی تجزیه شده و در استفاده قارچ خوراکی قرار گیرد.

کاربردهای دیگر سلولاز در صنایع نساجی برای سنگ‌شویی نمودن پارچه های جین می‌باشد. به علاوه افزودن سلولاز به پودرهای شوینده سبب جدا شدن ریزرشته های الیاف پنبه می‌شود که به طور قابل توجهی نرمی و شفافیت منسوجات پنبه‌ای را افزایش می‌دهد. در آزمایشگاههای تحقیقاتی از سلولاز جهت هضم دیواره سلولی گیاهان در تولید پروتوپلاست و مطالعات الحاق پروتوپلاست‌ها استفاده می‌شود. همچنین این آنزیم در صنایع تولیدی خوراک دام و طیور استفاده می‌گردد. سلولازها به همراه پکتینازها در شفاف‌سازی آب و عصاره میوه‌جات، هیدرولیز موسیلاژ حین استخراج قهوه، در صنایع تبدیلی و تسریع استخراج رنگهای طبیعی از پوست میوه جات و مواد گیاهی، تولید سرکه و تیمار مواد زاید مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱و۲).

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

۱. پاکدین، ع.، ۱۳۸۶. شناسایی وبهینه‌سازی میکروفلور کمپوست قارچ خوراکی دکمه‌ای. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، ۸۰ ص.

۲. رجب خانی، ز.، زمانی، م.، مطلبی، م.، عنصری، ح.، ۱۳۸۸. بهینه سازی آنزیم بتا ۱و ۴ اندوگلوکاناز (سلولاز) قارچ *Aspergillus niger* (R4) و همسانه سازی ژن B*egl*. مجله زیست شناسی ایران، جلد ۲۲،شماره ۴، ص۶۹۰-۶۸۲.

۳. زهری، ص.، زمانی، م.، مطلبی، م.، بابایی، ع.، ۱۳۸۴. کلون کردن، تعیین توالی و مطالعه خصوصیات ژن و cDNA بتا ۱ و۴ اندوگلوکوناز ا قارچ *Trichoderma reesei*. مجله زیست‌شناسی ایران، جلد ۱۸، شماره ۲، ص۱۴۰-۱۲۹.

۴. عبدی صوفیانی، ص.، دهناد ع.، ۱۳۸۸. آکتینومیست‌ها و ویژگی‌های ضد میکروبی آنها. آموزش زیست شناسی، دوره‌ی بیست وسوم، شماره ۲، ص۵۰-۴۷.

۵. فارسی، م.، پوریان‌فر، ح.، ۱۳۹۰. پرورش و اصلاح قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. ۲۷۵ ص.

6. Aboul-Enein, A., Abou elalla, F., Serour, E., Hussien, T., 2010. Purification and characterization of novel thermoactive cellulase thermophilic actinomycetes isolated from sample of Egypt. International Journal of Academic Research, 2: 81-86.

7. Bradford, M. M., 1976**.** A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254.

8. Chellapandi, P., Himanshu, M.J., 2008. Production of endoglucanase by the native strain of *Streptomyces* isolated in submerged fermentation. Brazilian Journal of Microbiology, 39: 122-127.

9. Cook, A.E., Meyers, P.R., 2003. Rapid identification of filamentous actinomycetes to the genus level using genus-specific *16SrRNA* gene restriction fragment patterns. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53: 1907-1915.

10. Forbes, B.A., Sahm, D.F., Weissfeld, A.S., 2002. Bailey and Scott's diagnostic microbiology. 11th ed, Mosby Publications.

11. Ghose, T.K., 1987. Measurment of cellulase activity. Applied chemistry, 59:257-268.

12. Heck, J.X., Hertz, P.F., Ayub, M.A.Z., 2002. Cellulase and xylanase production by isolated Amazon *Bacillus* strains using soya been industrial residue based solid-state cultivation. Brazilian Journal Microbiology, 33: 213-218.

13. Jang, H.D., Chen, K.S., 2003. Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces transformant* T3-1. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 19: 263-268.

14. Jaradat, Z., Dawagreh, A., Ababneh, Q., Saadoun, I., 2008. Influence of Culture Conditions on Cellulase Production by *Streptomyces* Sp. (Strain J2). Jordan Journal of Biological Sciences, 1(4): 141-146

15. McCarthy A J., 1987. Lignocellulose degrading actinomycetes. FEMS Microbiology, 46: 145-163.

16. Miller, G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, 31:426-428.

17. Rebollido, R., Martine, J., Aguilerai, Y., Melchori, K., Koerner, I., Steegmann, R., 2008. Microbial population during composting process of organic fraction of municipal solid waste. Applied and Environmental Research, 6:61-67.

18. Schaad, N. W., 1988. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. APS press, USA.

19. Schrempf, H., Walter, S., 1995. The cellulolytic system of *Streptomyces retyiculi*. International Journal Macromolecules, 15: 353-355.

20. Schulein, M., 2000. Protein engineering of cellulose. Biochemical et Biophysical Acta, 239-252

21. Seong, C.N., Choi, J.H., Baik, K.S., 2001. An improvment selective isolation of rare actinomycetes from forest soil. Journal of Microbiology, 39:17-23.

22. Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology, 173: 697-703.

Archive of SID

www.SID.ir

Determination cellulase activity of mushroom compost thermophilic actinomycetes by filter paper assay

Taghizadeh N.[1*], Farsi M.[1], Pakdin Parizi A.[2] and Tarighi S.[3]

[1] **Biotechnology Dept., Collage of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I.R. of IRan**
[2] **Tabarestan Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, University of Agricultural Science and Natural Resourses, Sari, I.R. of Iran**
[3] **Plant Protection Dept., College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I.R. of IRan**

Abstract

One of the most important substrate for producing of the edible white button mushrooms is compost. *Thermophilic actinomycetes* are one of the most important microflora in composting. So these actinomycetes were isolated from different steps in composting process by dilution technique. The isolates were incubated at 40°C. The chalky colonies were selected and transformed to new solid media to prepare pure culture of each isolate. Bacterial isolates were identified based on biochemical tests and amplified *16SrRNA* restriction analysis technique. Ability of the isolates to break down cellulose, was assessed by using Filter paper in different temperature and pH. Maximum enzyme activity for each isolate were measured based on milligrams of glucose released from one milliliters extract. The isolates with high cellulase activity were screened for determination of the optimum pH and temperature. Isolate 23 had 1/10 mg/ml enzyme activity and it demonstrated a higher cellulase activity at 45°C. These isolates was applied for improvement quality compost.

Keywords: cellulase activity, compost, Filter paper assay, *Thermophilic actinomycetes*

Archive of SID

www.SID.ir