Archive of SID

جداسازی مخمرها از شالیزارهای برنج و بررسی کیفی آنزیمهای کاتابولیک برون ریز در دو مخمر از جنس *Pseudozyma*

لیلا امینی، محمدرضا صعودی* و شقایق نصر

تهران، دانشگاه الزهرا، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، آزمایشگاه ملی میکروبیولوژی صنعتی

تاریخ دریافت: ۹۲/۱/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۰/۹

چکیده

شالیزارهای برنج به دلیل ایجاد همزمان شرایط کم اکسیژن و هوازی و گوناگونی سوبسترا، زیستگاهها و مراتب اکولوژیک متنوع و متعددی را برای میکروارگانیسم های مولد آنزیم از جمله باکتریها، مخمرها و قارچهای ریسه دار فراهم می‌آورد. در این پژوهش، مجموعه ای از ۴۶ جدایه مخمر، طی نمونه برداری از شالیزار و پس از غنی سازی و کشت در محیط YPG آگار حاوی آنتی بیوتیک جدا شدند. اغلب جدایه ها مولد آنزیمهای استراز و نوکلئاز بودند. دو جدایه SA006 و SA044 از نظر حضور آنزیمهای مختلف و همچنین برون ریز بودن برخی از آنها به روش چاهک پلیت مورد بررسی قرار گرفتند. تولید آنزیمهای ترشحی آمیلاز، پروتئاز، نوکلئاز و لیپاز در یک یا هر دو سویه نشان داده شد ولی توانایی تولید آنزیمهای کراتیناز، سلولاز، فیتاز، زایلاناز، کیتیناز و پکتیناز در هیچ یک از دو سویه دیده نشد. دو جدایه SA006 و SA044 به ترتیب به گونه های *Pseudozyma antarctica* و *Pseudozyma aphidis* تعلق داشتند.

واژه های کلیدی: آنزیمهای ترشحی، آنزیمهای کاتابولیک، بازیدیومایکوتا، سودوزیما، شالیزار، مخمر

*نویسنده مسئول، تلفن: (۲۷۳۳)۸۸۰۴۴۰۵۱-۰۲۱ پست الکترونیکی: soudimr@gmail.com

مقدمه

مخمرها میکروارگانیسم های همه جایی هستند و بخشی از فلور میکروبی اغلب اکوسیستمهای طبیعی را تشکیل می دهند. این میکروارگانیسم ها در انواع محیطها مانند خاک، دریاچه های فقیر، تالاب ها، رودخانه ها و یخرودها یافت می شوند (۹). مخمرها ساکنین طبیعی سطح گیاهان می باشند، با حیوانات در ارتباط هستند و در برخی زیستگاههای ساخته دست بشر مانند انواع غذاها نیز حضور دارند. خصوصیات فیزیکوشیمیایی محیط زیست مانند دما، pH، فشار هوا، میزان اشعه ماوراء بنفش، میزان شوری، فلور گیاهی و جانوری منطقه به عنوان عوامل اکولوژیکی داخلی و خارجی بر روی مخمرها تأثیر دارند و تنوع، فعالیت متابولیکی، ترشح انواع آنزیمها و رشد و بقای مخمر را تحت تأثیر قرار می دهند (۴). وسیع ترین مطالعات انجام شده به گونه های مخمری مهم در صنعت تهیه شراب مربوط می شود در حالی که از نظر تولید آنزیم مطالعات کمتری بر روی مخمرهای دارای منشاء زیست محیطی انجام شده است (۷ و ۳۳). البته در سالهای اخیر مطالعات وسیعی بر روی مخمرهای جدا شده از محیطهای مختلف انجام شده است که هدف آن جداسازی سویه های مولد آنزیم بوده است. به طور کلی مخمرها به علت داشتن ویژگیهایی مانند نگهداری و کشت آسان، نیازهای محیطی و غذایی ساده تر نسبت به باکتریها (جز در موارد خاص)، رسیدن به تراکم بالای سلولی با هزینه کم و در محیط کشت ساده، قابلیت انجام فرآیندهای سلولی پس از ترجمه و فقدان اندوتوکسین و DNA ویروسی، اهمیت فراوانی در صنعت دارند (۱۴ و ۱۶). ایران دارای زیستگاههایی مانند

www.SID.ir

Archive of SID

دریاچه های شور، قلل مرتفع در نواحی کوهستانی، غارها، یخچالها و یخرودها، کویرها، شوره زارها، دریاچه های نمک و رادیواکتیو و خاکهای کشاورزی و رویشگاههای طبیعی گیاهان بومی منحصر به ایران است. بررسی تنوع و جمعیت میکروبی اکوسیستمهای بومی و اکوسیستمهای انسان – ساخت و به دنبال آن بررسی تواناییهای خاص میکروارگانیسم های این نواحی در حفظ ذخایر میکروبی و معرفی سویه های جدید بومی با تواناییهای خاص برای کاربرد در صنایع مختلف بسیار مفید است. در این میان شالیزارهای برنج به علت غنی بودن خاک زراعی و رطوبت بالای زمین، حضور انواع جانوران کوچک، گیاهان علفی، جلبکها و انواع میکروارگانیسم ها محیطی غنی و مغذی به شمار می‌رود و به همین علت در این پروژه اکوسیستم بومی شالیزار های برنج به منظور غربالگری جدایه های مخمر مولد آنزیمهای ترشحی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روشها

نمونه برداری: نمونه برداری در دو مرحله از برخی شالیزارهای مسیر شهرستانهای بابل، بابلسر، آمل و فریدونکنار انجام شد. نمونه ها از آب و خاک خزانه ها ی دستی جمع آوری شد و در فلاسک حاوی یخ در کمتر از ۲۴ ساعت به آزمایشگاه منتقل شد.

کشت نمونه های آب: مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه آب بر روی محیط YPG آگار حاوی ۲۵۰mg/l آنتی بیوتیک کلرامفنیکل کشت داده شد. پلیتها به مدت حداقل۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرماگذاری گردید.

کشت نمونه های خاک: معادل ۱۰ گرم از نمونه های خاک در ۹۰ میلی لیتر محلول رینگر سوسپانسیون شد و پس از گرماگذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد، مقدار ۱۰۰µl برداشته و بر روی محیط YPG آگار با غلظت ۲۵۰mg/l کلرامفنیکل کشت داده شد (۲۱). پلیتها به مدت حداقل۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرماگذاری گردید. به منظور غنی سازی بیشتر نمونه های خاک، ۱۰ میلی لیتر از سوسپانسیون خاک تهیه شده در محلول رینگر به محیط YPG براث افزوده و پس از دو ساعت همزنی در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد ، به هر فلاسک، آنتی بیوتیک کلرامفنیکل با غلظت نهایی ۲۵۰mg/l افزوده شد. فلاسکها ۴ ساعت دیگر نیز در همان دما و دور اولیه همزنی شد. پس از این مدت، از هر فلاسک در نرمال سالین (محلول کلرید سدیم ۹ گرم در لیتر) تا رقت 10^{-3} تهیه شد و بر روی محیط YPG آگار دارای کلرامفنیکل کشت و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. پس از این مدت، پلیتها از نظر حضور مخمرها بررسی گردید.

نگهداری جدایه های مخمری: کشت خالص مخمرهای جدا شده در این پژوهش هر ۳۰ روز به محیط غنی تازه (YPG آگار) انتقال داده شد. علاوه بر این، برای نگهداری طولانی مدت جدایه ها از محلول آبی گلیسرول ۱۰ درصد (۱۱ و ۱۵) برای نگهداری در فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد و همچنین آب مقطر برای نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی گراد استفاده شد (۲۸).

بررسی کیفی حضور آنزیمها در دو جدایه مخمری SA006 و SA044: بدین منظور از کشت تازه مخمرهای ذکر شده بر روی محیطهای جامد واجد سوبسترای آنزیمی به صورت نقطه ای کشت داده شد. آنزیمهای بررسی شده به شرح زیر است:

آنزیم پروتئاز: از محیط جامد واجد شیر بدون چربی (Skim milk) برای بررسی تولید آنزیم پروتئاز استفاده شد (۵). پلیتها به مدت ۲ تا ۵ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. مشاهده هاله شفاف در اطراف کلنی نشان دهنده حضور آنزیم پروتئاز است.

آنزیم آمیلاز: از محیط جامد واجد نشاسته برای بررسی تولید آنزیم آمیلاز استفاده شد (۱۹). پلیتها به مدت ۲ تا ۵ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. پس از

www.SID.ir

Archive of SID

این مدت سطح پلیت با معرف لوگل پوشانده شد. مشاهده هاله شفاف در زمینه بنفش رنگ پلیت نشان دهنده وجود آنزیم آمیلاز است.

آنزیم استراز: از محیط جامد واجد توین ۸۰ (Tween 80)برای بررسی تولید آنزیم استراز استفاده شد (۸). پلیتها به مدت ۲ تا ۵ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. پس از این مدت مشاهده رسوب در اطراف کلنی نشان دهنده حضور آنزیم استراز است.

آنزیم لاکاز: **الف- با استفاده از سوبسترای تانیک اسید**: از محیط جامد واجد تانیک اسید برای بررسی تولید آنزیم لاکاز استفاده شد (۲۴). پلیتها به مدت ۲ تا ۵ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. پس از این مدت مشاهده هاله قهوه ای رنگ در زیر و اطراف کلنی نشان دهنده حضور آنزیم لاکاز است.

ب- با استفاده از سوبسترای گوایکول: از محیط جامد واجد گوایکول برای بررسی تولید آنزیم لاکاز استفاده شد (۲۴). پلیتها به مدت ۲ تا ۵ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. پس از این مدت، مشاهده رنگ قرمز تا قهوه ای در اطراف و زیر کلنی نشان دهنده حضور آنزیم لاکاز است.

با استفاده از سوبسترای رنگی کریستال ویوله: از محیط جامد واجد کریستال ویوله برای بررسی تولید آنزیم لاکاز استفاده شد (۱). پلیتها به مدت ۲ تا ۵ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. پس از این مدت، مشاهده هاله شفاف در اطراف کلنی نشان دهنده حضور آنزیم لاکاز و تجزیه رنگ است.

آنزیم فیتاز: از محیط جامد واجد سدیم فیتات برای بررسی تولید آنزیم فیتاز استفاده شد (۱۹). پلیتها به مدت ۲ تا ۵ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. پس از این مدت، از رنگ آمیزی افتراقی با محلول آبی ۲ درصد (w/v) کلرید کبالت، محلول آبی مولیبدات آمونیوم ۶/۲۵ درصد (w/v) و محلول آبی وانادات آمونیوم ۰/۴۲ درصد (w/v) استفاده شد (۲). مشاهده هاله شفاف در اطراف کلنی نشان دهنده حضور آنزیم فیتاز است.

آنزیم لیپاز: از محیط واجد سوبسترای چربی کره برای بررسی تولید آنزیم لیپاز استفاده شد (استاندارد شماره ۴۷۷۹ مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران). پلیتها به مدت ۳ تا ۵ روز در ۳۰ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. پس از این مدت مشاهده رنگ آبی و یا فیروزه ای کلنی نشان دهنده حضور آنزیم لیپاز است.

آنزیم کراتیناز: از محیط واجد سوبسترای کراتین برای بررسی تولید آنزیم کراتیناز استفاده شد (۱۷). پلیتها به مدت ۶ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. پس از این مدت مشاهده هاله شفاف در اطراف کلنی نشان دهنده حضور آنزیم کراتیناز است.

آنزیم DNase: از محیط دارای DNA برای بررسی تولید آنزیم نوکلئاز استفاده شد (۲۰). پلیتها به مدت ۳ تا ۵ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. پس از این مدت سطح پلیت با محلول ۱ نرمال هیدروکلریک اسید به مدت ۲۰ دقیقه پوشانده شد. پس از ۲۰ دقیقه، مشاهده هاله شفاف در زمینه کدر پلیت نشان دهنده حضور آنزیم DNase است.

آنزیم سلولاز: از محیط واجد سوبسترای کربوکسی متیل سلولز برای بررسی تولید آنزیم سلولاز استفاده شد (۸). پلیتها به مدت ۳ تا ۵ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. پس از این مدت سطح پلیت با معرف قرمز کنگو به مدت ۱۰ دقیقه پوشانده و پس از آن توسط ۱ مولار کلرید سدیم شسته شد (۳۶). مشاهده هاله شفاف در اطراف کلنی نشان دهنده حضور آنزیم سلولاز است.

آنزیم زایلاناز: از محیط واجد سوبسترای زایلان برای بررسی تولید آنزیم زایلاناز استفاده شد (۳۲). پلیتها به مدت ۷ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرماگذاری

www.SID.ir

Archive of SID

شد. پس از این مدت سطح پلیت با معرف قرمز کنگو به مدت ۱۰ دقیقه پوشانده و پس از آن توسط ۱ مولار کلرید سدیم شسته شد (۳۶). مشاهده هاله شفاف در اطراف کلنی نشان دهنده حضور آنزیم زایلاناز است.

آنزیم کیتیناز: از محیط واجد سوبسترای کیتین بررسی تولید آنزیم کیتیناز استفاده شد (۸). پلیتها به مدت ۳ تا ۵ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. پس از این مدت مشاهده هاله شفاف در اطراف کلنی نشان دهنده حضور آنزیم کیتیناز است.

آنزیم لسیتیناز: از محیط واجد سوبسترای زرده تخم مرغ برای بررسی تولید آنزیم لیپاز استفاده شد (۳۰). پلیتها به مدت ۷ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. پس از این مدت مشاهده هاله رسوب سفید رنگ در اطراف کلنی نشان دهنده حضور آنزیم لسیتیناز است.

آنزیم پکتیناز: از محیط واجد سوبسترای پکتین برای بررسی تولید آنزیم پکتیناز استفاده شد (۲۹). پلیتها به مدت ۵ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. پس از این مدت به هر پلیت محلول آبی معرف قرمز روتنیوم ۰/۰۵ درصد (w/v) به مدت یک ساعت اضافه شد. سپس برای ۳۰ دقیقه با آب مقطر رنگ بری انجام گرفت. محیط کشت دارای هاله شفاف (تجزیه پکتین) بیانگر تولید پکتیناز و محیط دارای حلقه قرمز رنگ نشانه تولید پکتین استراز در عدم وجود پکتیناز است (۱۰ و۲۷).

شناسایی دو جدایه دارای بیشترین تنوع آنزیمی: الف- شناسایی بیوشیمیایی: آزمونهای دی آزونیوم آبی، هیدرولیز اوره، تخمیر قندها، بررسی تولید ریسه، جذب منابع کربن، جذب منابع نیتروژن، مقاومت به سیکلوهگزیمید ۰/۰۱ و ۰/۱ درصد، تولید نشاسته خارج سلولی، تولید اسید از گلوکز، تحمل استیک اسید ۱ درصد، رشد در حضور غلظتهای ۱، ۳، ۵، ۱۰ و ۱۵ درصد کلرید سدیم، رشد در غلظت ۵۰ و ۶۰ درصد گلوکز، رشد در دماهای ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۳۵ و ۳۷ درجه سانتی گراد و رشد در pH های اولیه ۲،۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۴ برای شناسایی بیوشیمیایی دو جدایه برتر SA006 و SA044 بر اساس Kurtzman and Fell 1998 و Barnett et al. 2000 انجام شد (۳ و ۲۵).

ب- شناسایی مولکولی: استخراج DNA دو جدایه برتر SA006 و SA044 توسط روش فنل کلروفرم انجام شد (۳۸). تکثیر انتهای '5 زیرواحد بزرگ ریبوزومی بر اساس روش Kurtzman and Robnett 1997 با استفاده از دو پرایمر NL1 و NL4 صورت گرفت. قطعات تکثیر شده توسط الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲ درصد (w/v) در غلظت ۰/۵ درصد از بافر TBE(5X) و رنگ‌آمیزی اتیدیوم برماید مرئی شد. bp plusDNA Ladder 50 به عنوان نشانگر وزن مولکولی مورد استفاده قرار گرفت.

ج- بررسی میکروسکوپی و ماکروسکوپی: برای بررسی ماکروسکوپی کلنی مخمرهای SA006 و SA044 و تعیین ویژگیهای کلنی، از کشت تازه مخمر بر روی محیط YPG آگار به صورت تک کلنی کشت داده شد و پس از ۳ روز گرماگذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد، ظاهر کلنی از نظر برجستگی، قوام، رنگ و حاشیه توسط استریومیکروسکوپ بررسی شد (۳).

برای بررسی شکل میکروسکوپی نیز از جدایه های SA006 و SA044 بر روی محیط YPG آگار، کشت بر روی لام تهیه شد و به مدت ۳ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. پس از این مدت، لاملها توسط رنگ آمیزی لاکتوفنل بلو از نظر شکل سلولها، نحوه جوانه زنی و تولید ریسه بررسی شد.

بررسی ترشحی بودن آنزیمهای دو جدایه برتر با استفاده از روش چاهک پلیت: برای بررسی خارج سلولی بودن آنزیمهای پروتئاز، استراز، DNase، لیپاز و آمیلاز دو جدایه برتر از روش چاهک پلیت استفاده شد (۱۳).

نتایج

www.SID.ir

Archive of SID

دو جدایه SA006 و SA044 به ترتیب از شالیزارهای روستاهای رضاکلا و زرگرمحله در محدوده طول و عرض جغرافیایی '052°35.567 -'052°38.130 و -'36°31.213 '36°36.716 و به ترتیب از نمونه های آب خزانه و خاک شالیزار جدا شدند. برای جداسازی جدایه SA006 از روش کشت مستقیم نمونه بر روی محیط YPG آگار حاوی ۲۵۰mg/l کلرامفنیکل استفاده شد و جداسازی جدایه SA044 از طریق غنی سازی نمونه خاک در محیط YPG براث و سپس کشت بر روی محیط YPG آگار حاوی ۲۵۰mg/l کلرامفنیکل انجام شد.

نتایج بررسی حضور آنزیمهای مورد بررسی و ترشحی بودن برخی از آنزیمهای موجود با استفاده از روش چاهک پلیت، در جدول ۱ ذکر شده است. همان طور که مشاهده می شود جدایه SA006 نسبت به جدایه SA044 تنوع آنزیمی بیشتری دارد. آنزیمهای پروتئاز و نوکلئاز دو جدایه و آنزیمهای لیپاز و آمیلاز جدایه SA006 ترشحی است. اغلب مخمرهای مورد بررسی مولد آنزیمهای استراز و نوکلئاز بودند.

جدول ۱- نتایج بررسی حضور آنزیمها و خارج سلولی بودن آنها در دو جدایه SA006 و SA044

	لیپاز	کراتیناز	آمیلاز	پروتئاز	نوکلئاز	سلولاز	استراز	لاکاز	فیتاز	زایلاناز	کیتیناز	لیستیناز	پکتیناز
SA006	S+	–	S+	S+	S+	–	+	+	–	–	–	+	–
SA044	–	–	+	S+	S+	–	+	–	–	–	–	+	–
*نسبت درصد سویه های مولد آنزیم	nd	nd	٪۴	٪۴	٪۲۳	nd	٪۲۳	٪۲	٪۰	nd	nd	nd	nd

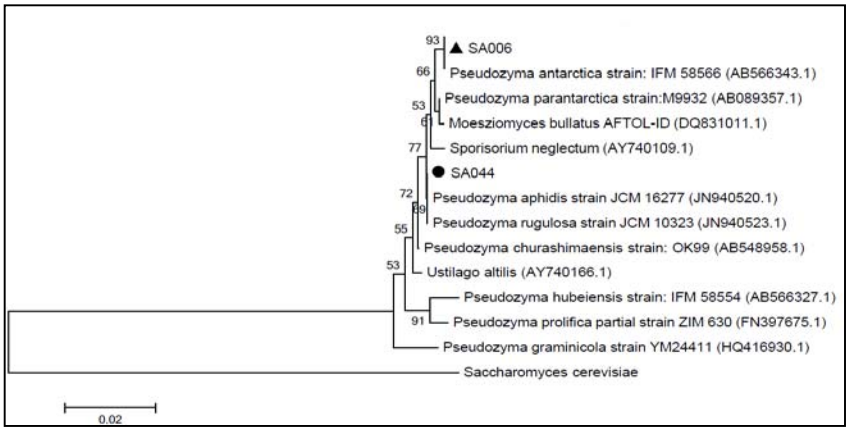
*از کل ۴۶ سویه غربال شده S: آنزیمهای برون ریز nd: بررسی نشده است

پس از تکثیر قطعه D1/D2 از ۲۶S rDNA زیر واحد بزرگ ریبوزوم در واکنش PCR(polymerase chain reaction) با استفاده از پرایمر پیش رو NL-1 و پرایمر پس رو NL-4 قطعه‌ای به طول حدود ۶۰۰ جفت باز از DNA جدایه های SA006 و SA044 به دست آمد. توالیهای به دست آمده پس از ویرایش توسط نرم افزار Bioedit، برای مقایسه با توالیهای DNA ریبوزومی سایر مخمرها در بانک ژنتیکی NCBI و CBS، BLASTN شدند. برای همردیف سازی چندتایی (Multiple sequence alignment) این توالیها، نرم افزار Clustal W و برای ترسیم درخت فیلوژنتیکی نرم افزار MEGA 5 مورد استفاده قرار گرفت. درخت فیلوژنی حاصل در شکل ۱ نشان داده شده است.

نتایج بررسی فیلوژنی تشابه ۱۰۰ درصد توالی جدایه SA006 را به گونه شاخص *Pseudozyma antarctica* تأیید می کند. توالی جدایه SA044 به دو گونه شاخص *Pseudozyma rugulosa* و *Pseudozyma aphidis* ۱۰۰ درصد شباهت دارد. جدایه های برتر SA006 ***P**seudozyma antarctica* و SA044 *Pseudozyma aphidis* به ترتیب با شماره دسترسی mb-nlim201036 و mb-nlim201034 در بانک میکروبی آزمایشگاه ملی میکروبیولوژی صنعتی و با شماره دسترسی IBRC30003 و IBRC30002 در بانک میکروبی مرکز ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران ثبت شدند.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۱- درخت فیلوژنتیکی رابطه بین دوجدایه SA006 و SA044 با دیگر سویه‌های *Pseudozyma* .Spp بر اساس ترادف D1/D2 با استفاده از نرم افزار MEGA5 با روش Neighbour-joining برای ۶۴۱ باز را نشان می‌دهد. میزان Bootstrap (1000 replication) به صورت درصد در گره هر شاخه آورده شده است. نشانه ▲ جدایه SA006 را نشان می دهد که بیشترین قرابت را با گونه *Pseudozyma antarctica* دارد و نشانه ■ جدایه SA044 را با بیشترین قرابت به *Pseudozyma aphidis* و *Pseudozyma rugulosa* مشخص می کند.

آزمون بیوشیمیایی جذب منابع مختلف کربن جدایه های برتر SA006 و SA044 در جدول ۲ مشخص شده و تستهای بیوشیمیایی فراتر در جدول ۳ ارائه شده است. هر جدایه با گونه شاخص خود (که درصد تشابه ژنتیکی بیشتری با آن دارد) مقایسه شده است. جدایه SA006 از نظر ژنتیکی شباهت بسیار نزدیکی با گونه *Pseudozyma antarctica* (۳) دارد و جدایه SA044 نیز به گونه های *Pseudozyma aphidis* و *Pseudozyma rugulosa* (۳) بسیار شبیه است. جدایه های SA006 و SA044 جز در برخی موارد جذب منابع کربن و رشد در حضور گلوکز ۵۰ درصد و ۶۰ درصد به گونه های شاخص خود شباهت نزدیکی دارند.

جدول۲- توانایی جذب منابع کربن در دو جدایه SA006، SA044 و مقایسه با گونه های شاخص آنها

نام جدایه و گونه تیپیک آن	جذب منابع کربن																								
	گلوکز	گالاکتوز	رافینوز	مالتوز	سلوبیوز	ملی بیوز	سوکروز	لاکتوز	تره هالوز	ملزیتوز	نشاسته	اینولین	ال-آرابینوز	د-آرابینوز	رامنوز	ریبوز	مانیتول	اتانول	اینوزیتول	گلوکزآمین	سوکسینات	گلوکونات	سیترات	ریبیتول	متانول
SA006	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pseudozymaantarctica	+	+	+	+	v	+	+	+	+	+	+	−	+	+	d	d	d	+	+	+	+	d	+	−	−
SA044	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pseudozymaaphidis	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−
Pseudozymarugulosa	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−

d: مثبت تاخیری پس از ۷ روز گرماگذاری

v: متغیر

www.SID.ir

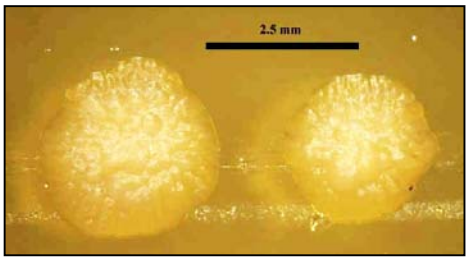
Archive of SID

جدول ۳- نتایج آزمونهای بیوشیمیایی فراتر در دو جدایه SA044،SA006 و مقایسه با گونه های شاخص آنها

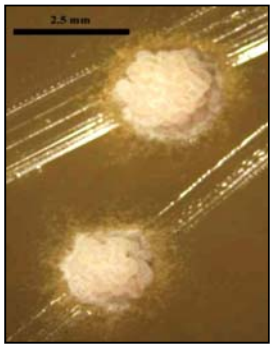
نام جدایه و گونه تیپیک آن	جذب منابع نیتروژن			رشد در حضور NaCl			رشد در pH های اولیه محیط رشد								رشد در دماهای مختلف					مقاومت به سیکلوهگزیمید ۰/۰۱٪	مقاومت به سیکلوهگزیمید ۱٪	مقاومت به استیک اسید ۱٪	رشد در حضور گلوکز ۵۰٪	رشد در حضور گلوکز ۶۰٪	تولید نشاسته خارج سلولی
	نیترات	نیتریت	آل-لیزین	۵٪	۱۰٪	۱۵٪	۲	۴	۶	۸	۱۰	۱۲	۱۴	۱۵C°	۲۰C°	۳۰C°	۳۵C°	۳۷C°							
SA006	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	−	−	−	−	+	−	−
Pseudozymaantarctica	+	+	+	+	+	−	n	N	n	n	n	n	n	n	n	+	v	−	−	−	−	−	−	−
SA044	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	−	−	−	−	+	−	−
Pseudozymaaphidis	+	+	+	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	−	−	n	−	−	−
Pseudozymarugulosa	+	+	+	n	n	−	n	n	n	n	n	n	n	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−

n: نتیجه مشخص نیست و بررسی نشده است

به منظور بررسی ریخت شناسی، پس از کشت دو جدایه بر روی محیط YPG آگار و گرماگذاری آن، کلنی جدایه های SA006 و SA044 (شکل ۲و ۳) از نظر برجستگی، قوام، رنگ، حاشیه و قطر کلنی توسط استریومیکروسکوپ بررسی شد. کلنیهای جدایه SA006، چرمی، صورتی رنگ، محدب و دارای کناره های نامنظم و قطر آن ۲/۵mm بود. کلنیهای جدایه SA044، غشایی، کرم تا زرد رنگ، برآمده و دارای کناره های نامنظم و قطر آن ۲/۵mm بود.



شکل ۲- کلنی ۷۲ ساعته جدایه SA044 بر روی محیط YPG آگار



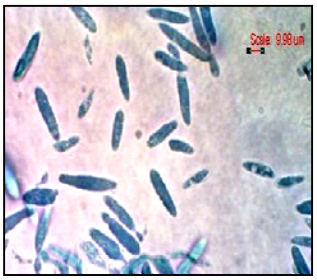
شکل ۳- کلنی ۷۲ ساعته جدایه SA006 بر روی محیط YPG آگار

برای بررسی شکل میکروسکوپی نیز از جدایه های SA006 و SA044 بر روی محیط YPG آگار، کشت بر روی لام تهیه شد و پس از گرماگذاری، لاملها توسط رنگ آمیزی لاکتوفنل بلو بررسی شد. SA044 دارای سلولهای درشت و پلی مورفیک از بیضی کوتاه تا میله ای، دارای ذخیره دانه های چربی و مولد ریسه حقیقی و کاذب است. جوانه زنی به صورت قطبی انجام می شود و سلولها فاقد تولید مثل جنسی هستند. SA006 دارای سلولهای میله ای با ذخیره دانه های چربی و ریسه حقیقی و کاذب است و در اغلب موارد بلاستوکنیدی تشکیل می دهد. جوانه زنی

www.SID.ir

Archive of SID

به صورت یک قطبی انجام می شود و سلولها فاقد تولید مثل جنسی هستند. تصاویر میکروسکوپی دو جدایه SA006 و SA044 در شکل ۴ نشان داده شده است.



شکل ۴- از راست به چپ: تصویر میکروسکوپی جدایه SA044 – تصویر میکروسکوپی جدایه SA006

بحث

قارچها موجوداتی همه جایی هستند و به جهت عمق و گستره فعالیت اکولوژیک جزء مهم ترین میکروارگانیسم های یوکاریوتی محسوب می شوند (۳۱). قارچها در طول سالیان متمادی به عنوان منبع مهم آنزیمهای صنعتی مورد استفاده قرار گرفته اند و امروزه نیز نیمی از این آنزیمها از قارچها به دست می آید. خارج سلولی بودن آنزیمهای قارچی و سهولت استخراج برخی از آنها از مایع کشت (۳۵)، انعطاف و تنوع فیزیولوژیک قارچها، کارآیی سیستمهای آنزیمی و در اغلب موارد ایمن بودن (GRAS)، از عوامل مهم صنعتی شدن آنزیمهای قارچی است (۱۸). شاید این گفته اغلب درباره کپکها صادق باشد ولی اکنون به تدریج مخمرها نیز به دلایل مختلف در کانون توجه قرار گرفته اند. امروزه مخمرها (که جزء قارچهای تک سلولی هستند) از نظر حجم تولید و جنبه های اقتصادی، در محصولات بیوتکنولوژیک از سایر میکروارگانیسم های صنعتی پیشی گرفته اند (۲۶). از جمله دلایل اهمیت مخمرها در تولید این محصولات می توان به نگهداری و کشت آسان و غیر ویسکوز، نیازهای محیطی و غذایی ساده، تراکم سلولی بالا در محیط تولید با هزینه کم، قابلیت انجام فرآیندهای پس از ترجمه، فقدان اندوتوکسین دیواره و DNA ویروسی اشاره نمود (۱۴ و ۱۶). در سالهای اخیر مطالعات وسیعی بر روی مخمرهای جدا شده از محیطهای مختلف انجام شده است. دراین میان به گونه های محیطی کمتر توجه شده است (۷)، در حالی که بررسی گونه های محیطی می تواند علاوه بر حفظ ذخایر میکروبی به غربالگری جدایه های بومی دارای توانایی تولید انواع متابولیتهای مختلف و جدید (نه در غذا، بلکه) به منظور کاربرد در صنایع مختلف بیانجامد. گونه های محیطی نسبت به گونه های غذایی و گونه های دارای منشاء حیوانی و انسانی تنوع و تواناییهای بیشتری دارند زیرا برهمکنشها و شرایط محیطی به مراتب پیچیده تر، سخت تر و متغیرتر از محیط تقریباً تعریف شده غذا و بدن می باشد. محیطهای طبیعی تغییرات زیادی را از نظر متغیرهای دما، pH، میزان شوری، فقر مواد غذایی، خشکی، تغییرات انسانی و ورود ترکیبات سخت تجزیه متحمل می شوند. بدیهی است که بررسی این گونه نواحی می تواند در غربالگری میکروارگانیسم هایی با تواناییها و ویژگیهای جالب و خاص مفید باشد. حتی با وجود مطالعات اخیر بر روی پتانسیل محیطهای افراطی و غیر متعارف به عنوان منبع تنوع زیستی برای جداسازی میکروارگانیسم های مفید (۶)، تا کنون هیچ بررسی بر روی شالیزارهای برنج و تنوع میکروبی و پتانسیل میکروارگانیسم های آن انجام نگرفته است. شالیزارهای برنج به علت غنی بودن خاک زراعی، رطوبت بالای زمین، تغییرات شرایط زمین در مراحل مختلف کاشت برنج، استفاده از بذرهای مختلف و کودهای متفاوت، حضور انواع حیوانات کوچک و گیاهان علفی

www.SID.ir

Archive of SID

مختلف می‌تواند محیطی مناسب و متفاوت برای غربالگری جدایه های مخمری مولد آنزیمهای ترشحی باشد.

در این بررسی از محیطهای جامد واجد سوبسترای آنزیمی به منظور غربالگری جدایه های مولد آنزیم استفاده شد. استفاده از محیط جامد برای غربالگری اولیه و سریع جدایه های قارچی اولین بار توسط Hankin و Anagnostakis در سال ۱۹۷۵ ارائه شد. از سوی دیگر کشت در محیط جامد به دلیل شباهت به شرایط زیستگاه طبیعی میکروارگانیسم روشی موثر برای غربالگری جدایه های مولد آنزیم و متابولیتها معرفی شده است (۲۲).

دو جدایه بازیدیومیست این بررسی (جدایه های SA006 و SA044) توانایی بیشتری در تولید آنزیمها داشتند چه از نظر تنوع و چه از نظر میزان تولید (بر اساس بررسی ظاهری قطر هاله به کلنی در مدت زمان معین گرماگذاری). این دو جدایه قابلیت تولید آنزیمهای استراز، پروتئاز، آمیلاز، DNase، لسیتیناز، لاکاز و لیپاز را داشتند و ترشحی بودن آنزیمهای آمیلاز، پروتئاز، لیپاز و DNase دست کم در مورد جدایه SA006 و آنزیمهای پروتئاز و DNase در جدایه SA044 نشان داده شد.

پس از شناسایی ژنتیکی جدایه‌ها مشخص شد که دو جدایه SA006 و SA044 متعلق به جنس *Pseudozyma* هستند. بیشترین شباهت برای جدایه SA006 با شماره دسترسی JQ650240 به ترتیب ۱۰۰ درصد به *Pseudozyma antarctica* و ۹۹/۳ درصد به *Pseudozyma parantarctica* بود. همچنین این جدایه در درخت فیلوژنتیکی و آزمونهای بیوشیمیایی و مورفولوژیک قرابت نزدیک تری را با جدایه *Pseudozyma antarctica* نشان داد. جدایه SA044 با شماره دسترسی JQ650239 به ترتیب دارای ۱۰۰ درصد شباهت به *Pseudozyma aphidis*، *Pseudozyma rugulosa* و ۹۹/۳ درصد به *Pseudozyma antarctica* بود. این جدایه در درخت فیلوژنتیکی و آزمونهای بیوشیمیایی قرابت مشابهی را با *Pseudozyma aphidis* و *Pseudozym arugulosa* نشان داد و براساس آزمونهای مورفولوژیک قرابت نزدیکتری را با جدایه *Pseudozyma rugulosa* داشت. جهت تشخیص دقیق‌تر سویه‌ها، بررسی ITS و سایر ژنهای حفاظت شده لازم به نظر می‌رسد.

آنزیمهای تولید شده توسط قارچها می تواند خارج سلولی و یا متصل به دیواره باشد. به طور کلی قارچها از طریق تجزیه ترکیبات آلی انرژی خود را به دست می آورند و تغذیه آنها به تولید آنزیمهای تجزیه کننده وابسته است (۱۲). بیشتر کپکها و برخی مخمرها قادرند آنزیمهایی ترشح کنند و ترکیبات خارج سلولی را تجزیه و جذب کنند اما به دلیل اندازه بزرگ مولکولهای آنزیم و کوچک بودن منافذ دیواره سلولی قارچ، امکان ترشح از طریق انتشار وجود ندارد. در این موجودات، آنزیمها توسط وزیکولهای دستگاه گلژی به محل رشد سلول (انتهای ریسه کپک و محل جوانه زنی مخمر) منتقل می شوند و به همراه سایر وزیکولهای حاوی مواد سنتز دیواره به سمت محل رشد می روند. در برخی موارد این وزیکولها به سطح سلول منتقل و ترشح می شوند در صورتی که در بیشتر موارد متصل به دیواره باقی می مانند مانند آنزیم گلوکزاکسیداز کپک *A.niger* که متصل به دیواره است (۱۲ و ۲۳). این پدیده اولین بار در آنزیم سلولاز کلون شده در مخمر *S.cerevisiae* دیده شد که آنزیم از محل جوانه زنی مخمر به بیرون ترشح می شد (۱۲). علاوه بر این، پلی ساکاریدها و سایر ماکرومولکولها مانند پروتئین و لیپید جزو سوبستراهای رایج مخمرها نیستند و تنها گونه های محدودی از مخمرها آنزیمهای هیدرولیتیک خارج سلولی تولید می کنند (۳۴). با توجه به موارد ذکر شده تعداد محدودی از مخمرها قادرند آنزیمهای ترشحی تولید کنند اما در این بررسی آنزیمهای آمیلاز و لیپاز جدایه SA006 و پروتئاز و DNase جدایه های SA006 و SA044 با استفاده از روش چاهک پلیت برون ریز گزارش شد. در بیشتر مطالعات برای بررسی ترشحی بودن آنزیم از روشهای

www.SID.ir

Archive of SID

سنجش آنزیمی در صاف شده کشت استفاده می شود. روش چاهک پلیت یک روش ساده و ارزان برای تعیین ترشحی بودن آنزیمهاست که اولین بار توسط Dingle و همکارانش در سال ۱۹۵۳ ارائه شد (۱۳). یکی از مشکلات این روش این است که در صورت عدم مشاهده هاله در اطراف چاهک نمی توان به طور قطعی غیر ترشحی بودن آنزیم را گزارش کرد. این امکان وجود دارد که آنزیم متصل به دیواره باشد و یا به مقدار کمی تولید شده باشد که در این موارد استفاده از کیسه دیالیز برای تغلیظ آنزیم مشاهده هاله را آسان تر می کند. به همین علت آنزیمهای استراز و لاکاز که با این روش جواب ندادند احتمالاً و نه به طور قطعی غیر ترشحی گزارش شدند. با توجه به این که هاله آنزیمی در محیط رشد مخمر و در اطراف سلولهای رشد یافته دیده می شد می توان این طور گفت که احتمالاً آنزیمهای استراز و لاکاز جدایه ها متصل به دیواره هستند. مخمرها به طور طبیعی مقادیر کمی پروتئین ترشح می کنند و تنها مثالهای معدودی از ترشح پروتئینهای ذاتی در آنها وجود دارد در حالی که در این بررسی دو جدایه SA006 و SA044 توانایی بالایی در تولید و ترشح انواع آنزیمها داشتند (۳۷). البته تولید پروتئینهای ترشحی در مخمرها با کارآیی بالا در سویه های دستکاری ژنتیکی شده به اثبات رسیده است اما سویه های وحشی مانند جدایه های SA006 و SA044 با قابلیت ترشح پروتئین ذاتی از این لحاظ و به عنوان کاندید برای تولید آنزیم بسیار با ارزش می باشند.

منابع

1. Abedin, R. M. A. 2008. Decolorization and biodegradation of crystal violet and malachite green by Fusariumsolani (Martius) saccardo. A comparative study on biosorption of dyes by the dead fungal biomass. American- Eurasian Journal of Botany; 1(2): 17- 31.
2. Bae, H. D. and et al. 1999. A novel staining method for detecting phytase activity. Journal of Microbiological methods; 39: 17- 22.
3. Barnett, J. A. and et al. 2000. Yeasts: characteristics and identification. Cambridge University Press.
4. Brandaon, L. R. and et al. 2010. Yeasts from an oligotrophic lake in Patagonia (Argentina): diversity, distribution and synthesis of photoprotective compounds and extracellular enzymes. FEMS MicrobiolEcol; 76: 1- 13.
5. Brizzio, S. and et al. 2007. Extracellular enzymatic activities of basidiomycetous yeasts isolated from glacial and subglacial waters of Northwest Patagonia (Argentina). Can J Microbiol; 53: 519- 525.
6. Bull, A. T. and et al. 1992. Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. Annu Rev Microbiol. 46: 219- 252.
7. Burden, D. W. and Eveleight, D. E. 1990. Yeast technology. Springer-Verlag.
8. Buzzini, P. and Martini, A. 2002. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. Journal of Applied Microbiology; 93: 1020- 1025.
9. Chen, Y. S. and et al. 2009. Isolation of marine yeasts from coastal waters of northeastern Taiwan. AquatBiol; 8: 55- 60.
10. Cotty, P. J. and et al. 1990. Variation in polygalacturonase production among *Aspergillusflavus* isolates. Appl Environ Microbiol; 12 (56): 3885-3887.
11. Crespo, M. J. and et al. 2000. Evaluation of different preservation and storage methods for *malassezia* spp. Journal of Clinical Microbiology; 38(10): 3872- 3875.
12. Deacon, J. W. 1997. Modern mycology. Blackwell Science.
13. Dingle, J. and et al. 1953. The enzymic degradation of pectin and other polysaccharides. II- application of the cup-plate assay to the estimation of enzymes. J Sci Food Agric; 4: 149- 155.
14. Dominguez, A. and et al. 1998. Nonconventional yeasts as hosts for heterologous protein production. InternatlMicrobiol; 1: 131- 142.
15. Doneva, T. U. and Donev, T. 2002. Influence of the freezing rate on the survival of strains *Saccharomyces cerevisiae* after cryogenic preservation. Journal of Culture Collections; 3: 78- 83.
16. Evans, I. H. 1996. Methods in molecular biology: yeast protocols. Humana Press.
17. Ghahfarokhi, M. S. and et al. 2003. Inhibitory effects of aqueous onion and garlic extracts on growth and keratinase activity in *trichophytonmentagrophytes*. Iranian Biomedical Journal; 7(3): 113- 118.

www.SID.ir

Archive of SID

18. Gopinath, S. C. B. and et al. 2005. Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. Mycoscience; 46: 119-126.
19. Goud, M. J. P. and et al. 2009. Extracellular hydrolytic enzyme profiles of certain South Indian basidiomycetes. African Journal of Biotechnology; 8(3): 354- 360.
20. Hankin, L. and Anagnostakis, S. L. 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. Mycologia; 67(3): 597- 607.
21. Hellstrom, A. M. and et al. 2009. Biodiversity and phytase capacity of yeasts isolated from Tanzanian Togwa. International Journal of Food Microbiology.
22. Kaur, G. and Satyanarayana, T. 2003. Production of extracellular pectinolytic, cellulolytic and xylanolytic enzymes by thermophilicmouldSporotrichum thermophile apinis in solid state fermentation. Indian Journal of Biotechnology; 3: 552- 557.
23. Kavanagh, K. 2011. Fungi: biology and applications. Wiley Press.
24. Kiiskinen, L. L. and et al. 2004. Screening for laccase- producing microbes. Journal of Applied Microbiology; 97: 640- 646.
25. Kurtzman, C. P. and Fell, J. W. 1998. The yeast, a taxonomic study. Fourth edition. Elsevier Science B. V.
26. Kurtzman C. P. and et al. 2011. The yeast, a taxonomic study. Fifth edition. Elsevier Science B. V.
27. Leger, RJ. ST. and et al. 2000. Lack of host specialization in *Aspergillusflavus*. Appl Environ Microbiol; 1(66): 320-324.
28. M. S. U. and Lacaz, C. S. 1965. Preservation of fungi in distilled water preliminary results. Rev Inst Med Trop Sao Paulo; 7(1): 24- 26.
29. Martinez-Trujillo, A. and et al. 2009. Constitutive and inducible pectinolytic enzymes from Aspergillusflavipes FP-500 and their modulation by pH and carbon source. Braz J Microbiol; 1(40).
30. Mooter, M. V. D. and Swings, J. 1990. Numerical analysis of 295 phenotypic features of 266 xanthomonas strains strains and related strains and an improved taxonomy of the genus. International Journal of Systematic Bacteriology; 40(4): 348- 369.
31. Mueller, G. M. and Schmit, J. P. 2007. Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? BiodiversConserv; 16: 1-5.
32. Nair, S. G. and et al. 2008. Fungal xylanase production under solid state and submerged fermentation conditions. African Journal of Microbiology Research; 2: 82- 86.
33. Rosi, I. and et al. 1994. Characterization of beta-glucanase activity in yeasts of oenological origin. Journal of Applied Microbiology; 77: 519- 527.
34. Rosa, C. and Peter, G. 2006. Biodiversity and ecophisiology of yeasts. Springer-Verlag.
35. Sandhya, C. and et al. 2005. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillusoryzae* in submerged and solid- state fermentation. Process Biochemistry; 40: 2689- 2694.
36. Teather, R. M. and Wood, P. J. 1982. Use of congo red- polysaccharide interaction in enumeration and characterization of cellulohydrolytic bacteria from the bovine rumen. Applied and Environmental Microbiology; 53: 41- 46.
37. Valkonen, M. 2003. Functional studies of the secretory pathway of filamentous fungi. PhD thesis. University of Helsinki, Finland.
38. Vasdinyei, R. and Deak, T. 2003. Characterization of yeast isolates originating from Hungarian dairy products using traditional and molecular identification techniques. International Journal of Food Microbiology; 86: 123-130.

www.SID.ir

Archive of SID

Isolation of yeasts from rice farms and study of secretory enzyme profile in two species of the genus *Pseudozyma*

Amini L., Soudi M.R. and Nasr Sh.

National Laboratory of Industrial Microbiology (NLIM), Biology Dept., Faculty of Sciences, , Alzahra University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Mixed aerobic and anoxic conditions, in addition to substrate versatility, provide a wide range of microhabitats and niches for a large number of microbial species including bacterian yeasts and filamentous fungi. Among them, study of environmental yeast species, especially those producing secretory catabolic enzymes, can be of a great importance. After enrichment of water and soil samples and their cultivation on antibiotic supplemented YPG Agar, 46 isolates were obtained. Most of the isolates were capable of producing nucleases and sterases. Using cup plate method revealed that strains SA044 and SA006 were able to produce the greatest number of secretory enzymes. Production of at least one secretory amylase, protease, nuclease and lipase was recorded in one or both of these isolates. Production of secretory keratinase, cellulose, phytase, xylanase, chitinase and pectinase was not observed. Using molecular approach and phenotypic examinations, the isolates SA044 and SA006 were identified as *Pseudozyma aphidis* and *Pseudozyma antarctica* respectively.

Key words: Basidiomycota, catabolic enzymes, *Pseudozyma*, rice farm, secretory enzymes, yeast

www.SID.ir