تاثیر عصاره جلبک سبز *Spirogyra* sp. بر میزان ترشح آنزیم پکتیناز و سطح بیان ژن *PgaA* در قارچ *Aspergillus niger*

امیر مسعود حیدری نژاد[۱]، ناصر پنجه که[۱]، سید کاظم صباغ[۲]*، محمد سالاری[۱] و محمدرضا سرافراز اردکانی[۲]

[۱] **زابل، دانشگاه زابل، دانشکده کشاورزی، گروه گیاهپزشکی**

[۲] **یزد، دانشگاه یزد، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی**

تاریخ دریافت: ۹۷/۷/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۲۵

چکیده

قارچ *Aspergillus niger* میکروارگانیسمی است که آنزیم های گروه پکتیناز را در سطوح بالایی تولید می کند. در این قارچ ژن های *PgaA* خانواده شماره ۲۸ گلیکوزید هیدروزلازها که آنزیم های پلی گالاکتوروناز ترشح می کنند را کد می کنند. جلبک های سبز و جلبک های سبز-آبی با داشتن ترکیبات پکتینی، سلولزی و همی سلولزی زایلان، آرابینوزایلان و غیره در ساختار خود می توانند به عنوان پیش ماده برای تولید آنزیم های سلولاز، زایلاناز و پکتیناز در قارچ ها عمل نمایند. در این پژوهش تاثیر غلظت های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره جلبک سبز *Spirogyra* sp. بر میزان ترشح آنزیم پکتیناز و همچنین سطح بیان ژن *PgaA* در بازه های زمانی چهار و هشت روز پس از افزودن عصاره جلبک به محیط کشت، با استفاده ازتکنیک Quantitative Real-time PCR ارزیابی گردید. بیشترین میزان ترشح آنزیم در روز هشتم پس از اضافه کردن عصاره جلبک با غلظت ۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر به محیط کشت مشاهده شد (۴/۲۸ واحد بر میلی لیتر). آنالیز بیان ژن *PgaA* نشان داد که بیشترین میزان سطح بیان ژن مربوط به بازه زمانی ۴ روز بعد از افزودن عصاره جلبک به محیط کشت با غلظت ۱۰۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر بوده است. با توجه به تاثیر مثبت ترکیبات جلبک اسپیرژوژیر بر میزان بیان ژن رمز کننده آنزیم های پکتیناز و افزایش ترشح آنزیم، چنین نتیجه گیری می شود که ریزجلبک ها می توانند منابع بسیار مناسبی جهت تولید آنزیم از قارچ های مستعد باشند و در صنایع بیوتکنولوژی مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: اسپیروژیر، آنزیم پلی گالاکتوروناز، بیان ژن، تکنیک Real-time PCR، جلبک سبز.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۵۳۱۲۳۲۲۵۷ پست الکترونیکی: sksabbagh@yazd.ac.ir

مقدمه

آنزیم پکتیناز یک آنزیم پکتولیتیکی است که ماده پکتین را که یک سوبسترای پلی ساکاریدی تشکیل دهنده دیواره سلول گیاهان است می شکند. پکتینازها از مهمترین گروه های آنزیمی هستند که به طور گسترده ای در باکتری ها و قارچ ها توزیع شده و سه گروه مهم آن ها شامل پلی گالاکتورونازها (PG)، پکتین استرازها (PE) و پکتین لیازها (PL) می باشند (۱). یکی از اولین موارد استفاده از آنزیم پکتیناز (جدا شده از قارچ ها) در صنایع غذایی، مربوط به شفاف سازی و بالا بردن کیفیت آبمیوه ها می باشد (۲). آنزیم های تجاری پکتین لیازی در صنعت آبمیوه از تقاضای بالایی برخوردار هستند. پکتیناز کاربردهای بسیار زیادی در صنایع استخراج آبمیوه، استخراج روغن، تیمار کردن ضایعات آبی، غذای دام، خالص سازی ویروس های گیاهی استفاده در صنعت کاغذ سازی، تخمیر چای و قهوه و نرم کردن فیبر های گیاهی دارد (۲). قارچ *Aspergillus niger* یکی از میکروارگانیسم هایی است که

سطح بالایی از آنزیم های گروه پکتیناز را تولید می کند (۳). با کشت قارچ ها در محیط کشت مناسب و اضافه کردن مواد حاوی پکتین به محیط، تولید این آنزیم ها القاء می شود. سپس با انجام فیلتراسیون این آنزیم ها را جداسازی می کنند (۴). خانواده گلیکوزید هیدرولازها گروه گسترده ای از آنزیم ها هستند که پیوند گلیکوزیدی بین دو یا تعداد بیشتری از کربوهیدرات ها را تجزیه می کنند (۵). قارچ *Aspergillus niger* قادر خواهد بود در محیط های محرک، با افزایش بیان ژن Alkaline Protease **(*APga*)** منجر به تولید و افزایش آنزیم پلی گالاکتوروناز (EC 3.2.1.15) از خانواده شماره ۲۸ گلیکوزید هیدروزلازها شود (۶). بهینه سازی شرایط تخمیر و ترکیب مواد غذایی محیط کشت قارچ *Aspergillus oryzae* نشان داده است که ترکیباتی نظیر سویا، قند، اوره، آب و سولفات منیزیوم در دمای ۳۳ درجه سانتی گراد، رطوبت ۶۷٪ و اسیدیته ۵/۹ قادر به تحریک قارچ در افزایش میزان آنزیم های سلولاز و پکتیناز شده است (۷). استفاده از تفاله انگور در تحریک قارچ *Aspergillus awamori* در تولید آنزیم های زایلاز و پلی گالاکتوناز نشان داده است که محیط جامد و اندازه ذرات در مراحل تخمیر و تولید آنزیم خللی ایجاد نمی کند (۸). جلبک های سبز (Chlorophyta) و جلبک های سبز-آبی (Cyanophyta) با داشتن ترکیبات پکتینی، سلولزی و همی سلولزی زایلان، آرابینوزایلان و غیره در ساختار خود می توانند محرک های خوبی به عنوان پیش ماده برای تحریک بیان ژن رمز کننده و تولید آنزیم های سلولاز، زایلاناز و پکتیناز در قارچ ها باشند (۹). جلبک سبز رشته *Spirogyra sp.* (*Zygnematophyceae*) دارای ریسه های سبز رنگ، غیر منشعب و مرکب از ردیفی از سلول های دارای ۱ تا ۱۶ کلروپلاست مارپیچی می باشند که به صورت آزاد و شناور در روی سطح آب های شیرین رشد می کنند (۱۰). مطالعات ثابت کرده است که استفاده از زیست توده جلبک *Spirogyra* و قارچ *Aspergillus niger* بعنوان جاذب زیستی (Biosorption) در جذب رنگ های باقی مانده در پسآب های نساجی موثر است (۱۱). دیواره سلولی این جلبک دو لایه است که لایه بیرون پکتینی و لایه درونی غنی از ترکیبات سلولزی می باشد پکتین در خارجی ترین لایه دیواره سلولی حل می شود و به ریسه ها حالت لغزنده و لزج می دهد (۱۲). با توجه به وضعیت ساختاری دیواره این جلبک و پتانسیل بالای قارچ *Aspergillus niger* در تولید آنزیم پکتیناز، .در این تحقیق اثر عصاره آبی جلبک اسپیروژیر بر روی برخی از خصوصیات بیوشیمیایی و مولکولی قارچ *Aspergillus niger* در سطح بیان ژن*PgaA* با روش بیان ژن در زمان واقعی و میزان تغییرات در تولید آنزیم پکتیناز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

انتخاب و شناسایی قارچ: جدایه مورد مطالعه از مجموعه قارچی گروه گیاهپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شد. شناسایی قارچ مورد نظر به کمک مشاهده های میکروسکوپی و مطالعه ویژگی های ریخت شناسی اندامی نظیر هاگ، هاگ بر، انشعابات اولیه و ثانویه هاگبرها انجام شد (شکل ۲). همچنین بمنظور شناسایی مولکولی قارچ، استخراج DNA کل از توده میسلیومی ۵ روزه قارچ در محیط کشت PDB به روش CTAB انجام شد (۱۴). از جفت آغازگر رفت و برگشت ITS1-ITS4 (جدول ۱) مربوط به ناحیه بین ژنی DNA ریبوزومی برای تایید مولکولی جدایه قارچ با روش واکنش زنجیره پلیمراز استفاده گردید. پس از بهینه سازی باند حاصل از تکثیر قطعه هدف بر روی ژل آگارز ۱ درصد، نمونه جهت تعیین توالی به شرکت Bioneer کره ارسال شد.

نمونه گیری و شناسایی جلبک *Spirogyra*. نمونه جلبک سبز رشته ای از آب چشمه های شیرین شهر طبس جمع آوری شد و در محیط کشت مایع Bold's Basal MediumBBM, Merck) کشت، خالص سازی و نگهداری شد. با استفاده از مطالعات میکروسکوپی و بررسی

خصوصیات کلروپلاستی (کلروپلاست نواری و مارپیچی) نمونه جلبک مورد بررسی *Spirogyra* sp. تشخیص داده شد (شکل ۲).

تهیه عصاره جلبکی: به منظور تهیه عصاره جلبک ، نمونه جلبک سبز بر اساس روش شوچنکو و همکاران (۱۵) در محیط غنی غذایی مایع BBM و روی شیکر در شرایط دمایی و تناوب نوری مناسب کشت داده شد و پس از رشد، نمونه ها از محیط کشت تخلیص و در آون خشک شدند. مقدار ۵۰ گرم از بافت خشک جلبک جهت استخراج عصاره آبی بوسیله دستگاه سوکسله مورد استفاده قرار گرفت (۱۶). پس از پایان عصاره گیری، مقدار ۱/. گرم از عصاره استحصال شده جلبک در ۱۰۰ میلی لیتر آب حل شده و از رقیق سازی عصاره پایه جلبکی با غلظت ۱۰۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر تهیه و تا زمان استفاده در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

طراحی آغازگر در ناحیه ژن *PgaA*: به منظور طراحی آغازگر مناسب در ناحیه ژن هدف توالی های مربوط به رونوشت ژن *PgaA* کد کننده آنزیم های اندوپلی گالاکتوروناز از گونه *A. niger* از وبگاه NCBI دریافت شد. هم ردیفی توالی ها و انتخاب نواحی محافظت شده با ساخت توالی مورد توافق (Consensus sequence) به کمک نرم افزار Bioedit صورت گرفت. درنهایت طراحی آغازگر مناسب در نواحی بین دو اگزون (Exon-exon junction) (دارای یک ناحیه اینترونی به طول ۵۳ جفت باز) در رونوشت ژن *PgaA*، به کمک نرم افزارهای بیوانفورماتیکی Oligo7 (۱۷)، Primer premier 5 (۱۸) و وبگاه آنلاین Primer 3 انجام شد.

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه

نام آغازگر	توالی رفت	توالی برگشت	طول محصول PCR	دمای اتصال آغازگر
*PgaA**	TGCCAAGCCTTTGTTCTG	TCCATCCCACTCCTCGTAC	**۳۲۲-***۲۶۹	۵۸
ITS1-4	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	TCCTCCGCTTATTGATATGC	۶۰۰	۵۶
Actin	GGTCTGGAGAGCGGTGGTAT	GAAGAAGGAGCAAGAGCAGT	۱۷۰	۵۹

* Designed in this study- ** For DNA- *** For mRNA

القای ترشح و سنجش آنزیم پکتیناز: به منظور سنجش میزان ترشح آنزیم پکتیناز، محیط کشت مایع حاوی $(NH_4)_2SO_4$، KH_2PO_4، K_2HPO_4 (۶ گرم) و $MgSO_4$ (۱ گرم) در حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر تهیه و سپس در ظروف شیشه ای به میزان ۵۰ میلی لیتر تقسیم شد. عصاره جلبکی ۱ درصد به عنوان پیش ماده و منبع کربن به محیط اضافه و نمونه های قارچی کشت و در انکوباتور شیکردار (80 rpm) به مدت ۸ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. بعد از طی گذشت بازه های زمان های ۴ و ۸ روز پس از کشت قارچ در محیط القاء کننده حاوی عصاره جلبک، محیط کشت بوسیله فیلتر میکروپور صاف و تخلیص گردید. از مایع آبی به عنوان عصاره آنزیمی در سنجش فعالیت آنزیمی و از هیف قارچی برای استخراج RNA استفاده گردید. سنجش آنزیم پکتیناز به روش کلوریمتریک میلر و معرف دی نیتروسالیسیلیک اسید حاوی۲۰ میلی لیتر NaOH ۲ مولار، ۱ گرم پودر نیتروسالیسیلیک اسید (DNS)، ۳۰ گرم سدیم پتاسیم تارتارات در ۱۰۰ میلی لیتر انجام شد. مقدار ۳۰ میکرولیتر نمونه عصاره آنزیمی در ۳ میلی لیتر بافر سدیم استات (pH: 6) رقیق شد و پس از ۱۰ دقیقه نگهداری در دمای ۴۰ درجه ساتیگراد، ۱ میلی لیتر معرف DNS به نمونه ها اضافه و ۵ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتی گراد قرار داده

شدند. سپس جذب نوری محلول واکنش با استفاده از دستگاه طیف سنج نوری (AnalytikaJena, Germany) در طول‌موج ۵۴۰ نانومتر اندازه گیری شد. آزمون محاسبه سطوح آنزیمی در سه تکرار انجام شد. هر واحد فعالیت پکتیناز به عنوان مقدار آنزیمی که ۱ ماکرومول گلوکوز در هر دقیقه آزاد می کند، تعیین می شود.

استخراج RNA، ساخت cDNA و بررسی سطح بیان ژن *PgaA* : استخراج RNA از توده های قارچی حاصل برای تهیه عصاره آنزیمی با استفاده از بافر RNX-Plus (۱۹) و Triozol مطابق با روش سیمس و همکاران انجام شد (۲۰). به منظور حذف آلودگی‌های احتمالی RNA بوسیله DNA از کیت (Fermentase)RNase-free استفاده گردید. از آنزیم DNaseI (SinaClon, Iran) برای حذف مولکولهایDNA باقیماده در محلول استفاده گردید.

سنتز cDNA با استفاده از کیت تجاری AccuPowerRCycleScript RT PreMix (dN6) kit انجام شد. به منظور بررسی سطح بیان و میزان تغییرات ژن *PgaA* در تیمارهای بکار رفته، از تکنیک آنالیز بیان ژن در زمان واقعی (Quantitative Real-time) PCR با استفاده از دستگاه Applied Biosystems® StepOnePlus™ Real-Time PCR استفاده شد (۲۱). اجزای واکنش شامل ۵۰ نانوگرم cDNA، ۰/۵ میکرولیتر از آغازگرهای رفت و برگشت، ۷/۵ میکرولیتر RealQ Plus 2x Master Mix بود که با آب مقطر دوبار تقطیر حجم نهایی محلول واکنش به ۱۵ میکرولیتر تنظیم گردید. از توالی آغازگر ژن بتا اکتین (Beta-Actin) به عنوان ژن مرجع استفاده شد (جدول ۱).

آنالیز داده‌ها: پس از اتمام تکثیر DNA مکمل و ترسیم منحنی ذوب نمونه (Melting curve analysis) توسط نرم افزار، آنالیز نتایج حاصل از واکنش Real Time- PCR با استفاده از فرمول $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ محاسبه شد (۲۲). تغییرات Ct (Cycle threshold; Ct) هر نمونه در هر بازه زمانی با نمونه کنترل و ژن مرجع طبق فرمول زیر به دست آمد.

$$\Delta Ct_{target} = Ct_{control} - Ct_{treatment}$$

$$\Delta C_{reference} = Ct_{control} - Ct_{treatment}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{reference} - \Delta Ct_{target}$$

$$Ratio = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

ترسیم نمودارها با استفاده از نرم افزارGraphpad Prism 7 و تحلیل آماری داده‌ها به وسیله نرم افزار IBM SPSS Statistics 22 انجام شد.

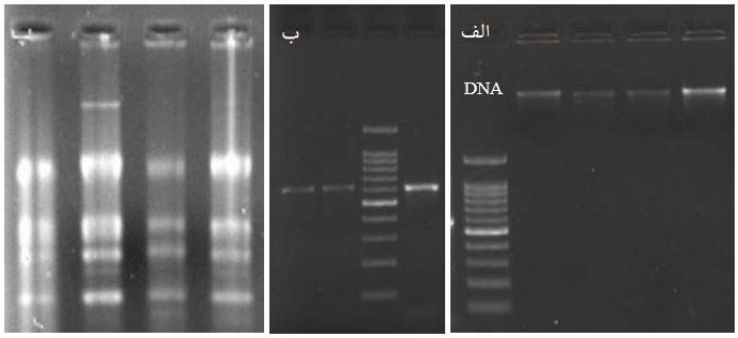
نتایج

جهت شناسایی قارچ *A. niger* ابتدا DNA ژنومی قارچ با استفاده از کیت مربوطه استخراج شد. کیفیت استخراج با استفاده از ردیابی باند حاصل بر روی ژل آگارز ۱ درصد با عکس برداری توسط دستگاه Gel Doc تایید شد (شکل ۱- الف). ناحیه بین ژنی رمز کننده RNA ریبوزومی جهت شناسایی مولکولی قارچ آسپرژیلوس نیجر استفاده گردید. مشاهده باند حاصل از قطعه تکثیری در واکنش زنجیره ای پلیمراز روی ژل آگارز ۱ درصد، نشان از تکثیر صحیح و عاری از خطای قطعه مورد نظر می باشد (شکل ۱- ب). پس از دریافت نتایج حاصل از تعیین توالی، خروجی حاصل از بلاست آرایش نوکلئوتیدی دریافتی، شباهت ۱۰۰درصدی را به قارچ *A. niger* نشان داد. توالی بین ژنی مطالعه شده در بانک ژن (National Center for Biotechnology Information-NCBI) ثبت شده است (MH635417).

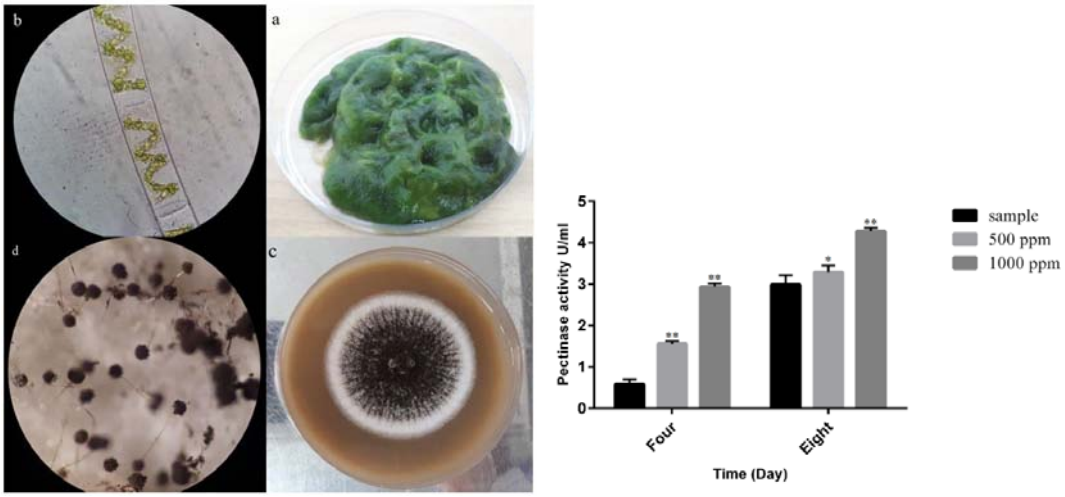
نتایج آزمون طیف سنجی به منظور مطالعه بیوشیمیایی میزان تغییرات آنزیم پکتیناز در اثر کاربرد عصاره جلبک با غلظت‌های مختلف در دو بازه زمانی نشان داد که بیشترین سطح ترشح آنزیمی در محیط کشت مایع در تیمار ۱۰۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر از عصاره جلبک در بازه زمانی هشت روز بعد از القا به وسیله عصاره جلبک به میزان ۴/۲۸ واحد بر میلی لیتر می باشد که در مقایسه با نمونه شاهد به میزان ۳ واحد بر میلی لیتر در سطح یک درصد تفاوت معنی داری داشت. همچنین ترشح آنزیم پکتیناز در

روز چهارم پس ازکشت در تیمار ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره جلبکی به میزان ۲/۹۴ واحد بود که نسبت به نمونه شاهد به میزان ۰/۶ واحد در سطح یک درصد تفاوت معنی دار داشت. ترشح آنزیم پکتیناز توسط قارچ *A. niger* در محیط کشت حاوی عصاره ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از عصاره جلبک *Spirogyra* sp. در روز چهارم به میزان ۱/۵۶ واحد بر میلی لیتر، با نمونه شاهد در سطح یک درصد و روز هشتم به میزان ۳/۲۹ واحد بر میلی لیتر با نمونه شاهد فقط در سطح پنج درصد تفاوت معنی دار داشت. (شکل ۳).

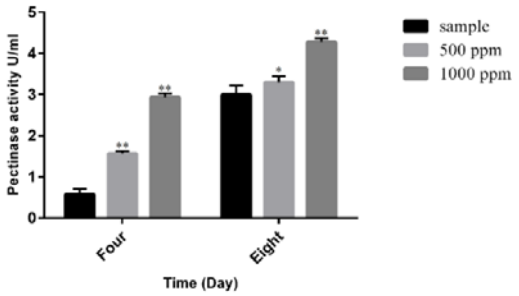
پس از بررسی کیفیت RNA استخراج شده توسط ژل آگارز ۱ درصد (شکل ۱- پ) و ساخت DNA مکمل، واکنش زنجیره پلیمراز در زمان واقعی انجام شد. نتایج بررسی تغییرات بیان رونوشت شاهد در روز چهارم پس از کشت در نمونه کشت شده حاوی عصاره با غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیترجلبک سبز *Spirogyra* بوده است.



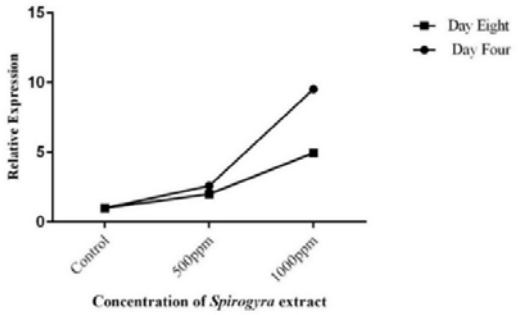
شکل ۱- نتایج بررسی کیفیت قطعات استحراج و تکثیر شده روی ژل آگارز ۱ درصد. (الف) باند حاصل از قطعات DNA ژنومی قارچ *A. niger* (ب). باند حاصل از تکثیر ناحیه بین ژنی rDNA (ITS1-ITS4) در محدود نزدیک به ۶۰۰ جفت باز (پ). بررسی کیفیت RNA استخراجی از نمونه های قارچی. وجود چهار قطعه باند از نواحی rRNA نشان از کیفیت مناسب استخراج RNA دارد.



شکل ۲- (a) تصویر ماکروسکوپی توده رشته ای جلبک *Spirogyra* sp. (b). تصویر درشت نمایی شده میکروسکوپ نوری از ریسه جلبک *Spirogyra* همراه با کلروپلاست مارپیچی (c). تصویر ماکروسکوپی از هیف و اسپورهای قارچ *A. niger* روی محیط کشت PDA. (d). تصویر درشت نمایی شده میکروسکوپ نوری قارچ *A. niger*



شکل ۳- میزان فعالیت آنزیم پکتیازی قارچ *A. niger* در روز های چهارم و هشتم در محیط کشت حاوی دو غلظت مختلف عصاره جلبک سبز *Spirogyra* sp. (*) معنی دار در سطح پنج درصد. (**) معنی دار در سطح یک درصد.



شکل ۴- تغییرات بیان ژن رمز کننده آنزیم پلی گالاکتوروناز در قارچ *Aspergillus niger* در محیط کشت حاوی دو غلظت متفاوت عصاره جلبکی *Spirogyra* sp. در بازه های زمانی ۴ و ۸ روز پس از کشت نسبت به نمونه شاهد

ژن رمز کننده آنزیم پلی گالاکتوروناز (*PgaA*) با استفاده روش بیان ژن در زمان واقعی نشان داد که افزایش بیان این ژن ۱۰/۱۴۲ برابر بیشتر از نمونه شاهد در محیط کشت پایه بود (جدول ۲). همچنین در روز چهارم افزایش بیان ژن هدف در نمونه حاوی عصاره جلبکی با غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر نسبت به نمونه شاهد ۲/۲۹۵ برابر افزایش یافته است. بررسی نتایج بیان نسبی ژن هدف در روز هشتم پس از کشت نیز نشان داد که در نمونه قارچی حاوی عصاره۵۰۰ میکروگرم در میلی لیترو ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره جلبکی، سطح رونوشت این ژن به ترتیب به میزان ۲/۰۱۲ و ۴/۹۵۷ برابر بیشتراز نمونه شاهد بوده است (جدول ۲). بطور کلی میزان تغییرات بیان ژن *PgaA* در روز چهارم نسبت به روز هشتم پس از کشت به میزان قابل توجهی بیشتر بوده است (شکل ۴). مقایسه نتایج حاصل از سنجش سطح آنزیمی گروه پکتیاز و تغییرات بیان ژن رمز کننده آنزیم پلی گالاکتوروناز ارتباط و همبستگی نزدیکی را با هم نشان داد. در روز چهارم پس از کشت نمونه های تیمار شده با پیش ماده عصاره جلبکی در هر دو غلظت، نسبت به نمونه شاهد افزایش معناداری نشان داد (شکل ۳).

بحث

جلبکها منشا سرشاری از هیدروکربن‌ها و مواد ژلاتینی بوده که در صنایع مختلف نظیر پزشکی، داروسازی و کشاورزی حائز اهمیت بوده و استفاده از ریز جلبک‌ها در مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی در حال افزایش می باشد. استفاده از جلبکها به عنوان عوامل مفید در تولید سوخت های زیستی نظیر گاز هیدروژن (۲۵)، و تولید انواع الکل‌ها و بیودیزل‌ها (۲۵، ۷،۱) مورد آزمایش و تایید قرارگرفته است.گونه های متعلق به جنس *Aspergillus* توانایی هیدرولیز ترکیبات سلولزی و پکتینی را از مواد اولیه سازنده آن‌ها از طریق ترشح آنزیم‌های مختلف دارا می باشند. استفاده از مواد محرک قارچ نظیر تفاله های انواع میوه ها در ترشح آنزیم‌هایی مانند سلولاز، پکتیناز و همی سلولاز نشان داده است که با بهینه سازی شرایط رشدی قارچ مقادیر قابل توجهی از آنزیم‌های یاد شده تولید می گردد (۳۶). با توجه به مطالعات کتابشناسی انجام شده اطلاعات کافی در ارتباط با نقش جلبک ها به عنوان منابع سرشاری از هیدرات‌های کربن در تحریک قارچ‌ها به تولید آنزیم های یاد شده وجود ندارد. با توجه به غنای موجود در ترکیبات تشکیل دهنده عصاره شامل، هیدروکربن‌ها، اسیدهای آمینه و پروتئین‌ها، ترکیبات ترپنوئیدی و عناصر ماکرو و میکرو، عصاره جلبک‌ها می تواند به عنوان یک ماده محرک بر رشد قارچ و بالطبع آن تولید آنزیم‌های مورد نیاز قارچ جهت هیدرولیز این ترکیبات فراهم آورد (۵). مطالعات

پیشین تاثیر نوع منبع کربنی و محرک های طبیعی پکتین نظیر سبوس گندم، میوه سیب، توت فرنگی و پرتقال و در میزان ترشح آنزیم های قارچی اثبات کرده است (۲۳، ۲۴). همچنین بهینه سازی شرایط رشدی قارچ *Aspergillus giganteus* برای بهره وری هر بیشتر در تولید حداکثری آنزیم نشان داده است که در اسیدیته ۴/۵ و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد بیشترین مقدار تولید آنزیم بعد از ۵ روز به ثبت رسید (۲۶). در این مطالعه با تنظیم چنین شرایطی به ویژه شرایط دمایی میزان بیان آنزیم و همچنین تاثیر عصاره در ایجاد تغییرات ژنتیکی در سطح بیان ژن در سطح قابل قبولی افزایش یافت. اثر غلظت به همراه دما بر میزان تولید آنزیم توسط دو گونه *A. flavipes* FP-500 و *A. terreus* FP-370 نشان داد که افزایش میزان غلظت منبع کربن قابل دسترس برای قارچ در اقزایش تولید آنزیم نقش مستقیم و اثر معنی داری دارد (۲۲) که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. آنالیز بیان ژن *PgaA* در دو بازه زمانی با دو غلظت متفاوت عصاره نیز نشان از ارتباط مستقیم بین غلظت و زمان تاثیر و افزایش بیان ژن دارد بطوریکه در نمونه هایی که دو غلظت مختلف پیش ماده اضافه شده اند، نسبت به نمونه کنترل افزایش داشت. با افزایش میزان دو برابری غلظت عصاره از ۵۰۰ به ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر، سطح رونوشت ژن رمز کننده آنزیم پلی گالاکتوروزناز در روز هشتم تقریبا بین ۲–۵ برابر افزایش داشت (جدول ۲).

جدول۲– محاسبه ct میانگین هر نمونه و مقایسه نسبی میانگین بیان ژن *PgaA* نسبت به نمونه شاهد

Genes	Sample	Mean C(t)	Expression
*PgaA**	Control+Day 4	32.158	1
PgaA	500PPM+Day 4	31.19	2.595
PgaA	1000PPM+Day 4	29.906	10.142
PgaA	Control+Day 8	29.674	1
PgaA	500PPM+Day 8	28.566	2.012
PgaA	1000PPM+Day 8	26.856	4.957

*Target Gene

کاهش روند افزایش بیان ژن با افزایش غلظت در بازه زمانی ۸ روز پس کشت نشان از تاثیر اولیه عصاره در تحریک قارچ به تولید آنزیم دارد و احتمال اینکه بعد از گذشت زمان ترکیب عصاره اثر سمیت بر روی قارچ داشته باشند زیاد می باشد. با بررسی میزان بیان این ژن در بازه های زمانی بیشتر می توان این مورد را اثبات نمود ولی در این تحقیق هدف تعیین اثر پذیری قارچ از عصاره جلبک با استفاده از نشانگر مولکولی بود که به تائید رسید. مطالعه کلوزت و همکاران (۲۰۰۴) با تلقیح عصاره جلبک سبز *Ulva sp.* به گیاه یونجه به عنوان القاگر و مشاهده نتایج آزمون نوردرن بلات نشان داد، پاسخ های دفاعی گیاه باعث افزایش بیان ژن *PR10* بدون بروز پاسخ نکروتیک در گیاه شده است (۲۸). افزایش میزان مقاومت گیاه به بیماری می‌تواند نتیجه تحریک قارچ به تولید آنزیم پکتیناز باشد که باعث خودکشی قارچ در گیاه و در نتیجه مقاومت گیاه در اثر کاهش جمعیت بیمارگر می شود. کاربرد این ترکیبات با اثر تحریک به سلولاز در قارچ‌های بیمارگر می تواند منجر به افزایش بیماری در گیاه شود زیرا توانایی قارچ را در هیدرولیز دیواره سلولزی گیاه بیشتر می نماید.

در مطالعه حاضر نتایج سنجش آنزیمی در محیط کشت قارچ پس از هشت روز نیز نشان داد که سطح پایه ترشح آنزیم در نمونه شاهد در این بازه زمانی تا میزان ۳ واحد بر میلی لیتر رسید که در مقایسه با روز چهارم ۲/۴ واحد بیشتر بوده است. این افزایش می تواند به دلیل تکامل ریسه های قارچی در این بازه و تحریک بیشتر جهت تولید متابولیت های ثانویه باشد. در محیط های کشت تیمار شده با هر دو غلظت عصاره جلبکی در هر روز چهارم میزان سطوح آنزیمی به طور معناداری بیشتر از نمونه پایه بود. اگرچه این افزایش تولید آنزیم توسط قارچ در روز هشتم نیز مشاهده شد، اما در این بازه زمانی به دلیل افزایش

طبیعی در ترشح آنزیم در نمونه شاهد، این میزان افزایش، در محیط کشت حاوی عصاره ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره جلبکی در سطح یک درصد معنی دار نبود (شکل ۳). جایاراج و همکاران (۲۰۰۸) با تیمار گیاه هویج توسط عصاره جلبک قهوه ای *Ascophyllum nodosum* و آلوده سازی گیاه با قارچ *Alternaria radiciana* و *Botrytis cinerea* نشان دادند که گیاهان تیمار شده پس از ۱۰ روز مقاومت بیشتری در برابر پاتوژن های بیماری زا نسبت به نمونه شاهد و گیاه تیمار شده با سالسیلیک اسید داشته است و میزان ترشح آنزیم های پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز، فنیل آلانین آمونیالیاز، کیتیناز و بتاگلوکاناز در نمونه تیمار شده با جلبک قهوه ای نسبت به نمونه شاهد بیشتر بوده است. همچنین سطح بیان ژن های مرتبط با بیماری زایی *PR1*، *PR5*، و *NPR1* نسبت به نمونه های کنترل منفی و تیمار شده با سالیسیلیک اسید افزایش یافت (۲۹). گویکوچا و همکاران (۲۰۰۴) با پرورش گیاه فلفل با استفاده از محیط کشت تقویت شده با COA H شامل سالیسیلیک اسید، نمک های آمونیومی محلول و عصاره علف دریایی (جلبک قهوه ای) نشان دادند، گیاهان تیمار شده نسبت به نمونه های شاهد پس از تلقیح با قارچ *Verticillium dahliae* با افزایش سطح ترکیبات فنلی در روز هفتم با کاهش شاخص توسعه بیماری، افزایش تحمل و مقاومت را داشتند (۳۰). نتایج این پژوهش نشان داد که ترکیبات پکتینی و سلولزی ساختاری در دیواره جلبک سبز اسپیروژیر در صورتی که در دسترس قارچ آسپرژیلوس قرار گیرند، با فعال سازی سیستم سیگنال دهی بیان ژن های رمز کننده تجزیه کننده این مواد، ترشح این آنزیم ها را تحت تاثیر قرار دهد (۳۰). با توجه به کاهش بیماریزایی قارچ های بیمارگر در گیاهان در هنگام افزودن عصاره جلبکی، این ایده به ذهن پرورانده می شود که افزودن عصاره جلبک باعث تحریک قارچ در گیاه به تولید آنزیم های غیر ضروری برای بیماریزایی شده و این امر تمرکز قارچ برای تولید آنزیم خاص در بیماریزایی بهم می زند و باعث بهبود گیاه می شود در حالیکه هیچ مقاومتی صورت نگرفته و فقط توانایی قارچ بر اثر دریافت مواد محرک خارجی کاهش یافته است. البته افزایش آنزیم های آنتی اکسیدانتی که در واکنش های فوق حساسیت گیاهان به بیمارگرهای اختصاصی نقش دارند می تواند این فرضیه را حداقل برای گیاهان نسبتا متحمل به بیماری تضعیف نماید. ترکیبات پکتینازی تولید شده توسط قارچ های آسپرژیلوس به شکل گسترده ای در صنایع غذایی و کاغذی مورد استفاده قرار می گیرد. از طرفی مشخص شده است که دیواره سلولی جلبک رشته ای اسپیروژیر از دولایه تشکیل شده که بخش درونی را عمدتا ترکیبات سلولزی و لایه بیرونی را ترکیبات پکتینی تشکیل می‌دهند (۳۱). با توجه به خاصیت بالای این جلبک در تحریک قارچ بعنوان یک میکروارگانیسم زنده و با توجه به مطالعات جدید در ارتباط با نقش آنتی اکسیدانتی جلبکها (۴۰)، مطالعه بیشتر در تعیین اثر بخشی این جلبک در مهار رشد سلولهای سرطانی می تواند جالب باشد. استفاده از تکنیکهای مهندسی ژنتیک نظیر استفاده از جهش یافته های برتر در قارچ *Trichoderma ressei* نشان داده است که این تکنیک باعث تولید جدایه های کارآمد قارچ در تولید آنزیم پکتیناز شده است (۴۱) که استفاده از این جلبک نیز می تواند در کنار تولید جهش یافته ها کارایی قارچ آسپرژیلوس را در تولید آنزیم افزایش دهد.

نتیجه گیری

سطوح ترشح آنزیم های قارچی به طور طبیعی با افزایش زمان تا رشد کامل اندام های رویشی افزایش می یابد، نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که ترکیبات پکتینی جلبک سبز اسپیروژیر می تواند میزان ترشح آنزیم های گروه پلی گالاکتوروناز را به ویژه در روزهای ابتدایی رشد قارچ، به طور معنی داری افزایش دهد. امید است بتوان از ترکیبات تجاری جلبک های سبز به عنوان یک پیش ماده فعال در صنعت، جهت بهره وری بیشتر تولید این گروه از

آنزیم ها در قارچ *Aspergillus niger* و سایر میکروارگانیسم های تولید کننده این دسته از آنزیم ها استفاده شود.

منابع

1- Bhagavathy, S., Sumathi, P. and Bell, I.J.S. 2011. Green algae Chlorococcum humicola-a new source of bioactive compounds with antimicrobial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 1(1): S1-S7.

2- Bloom, J.D., Meyer, M.M., Meinhold, P., Otey, C.R., MacMillan, D and Arnold, F.H. 2005. Evolving strategies for enzyme engineering. *Current Opinion in Structural Biology* 15: 447-452.

3- Botella C., Diaz A., De Ory I., Webb C. and Blandino A. 2007. Xylanase and pectinase production by *Asprgillusawamori* on grape pomeca in solid state fermentation. *Process Biochemistry* 42: 98- 101.

4- Cheng, Z., Chen, D., Wang, Q., Xian, L., Lu B. and Wei Y. 2017. Identification of an acidic endo-polygalacturonase from *Penicillium oxalicum* CZ1028 and its broad use in major tropical and subtropical fruit juices production. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 123: 665-672.

5- Chojnacka, K., Kim, S. 2015. Introduction of Marine Algae Extracts. In:Marine Algae Extracts: Processes, Products, and Applications (1st edition). Wiley-VCH Verlag Publisher, Korea:1-13.

6- Cluzet, S., Torregrosa, C., Jacquet, C., Lafitte, C., Fournier, J., Mercier, L., Salamagne, S., Briand, X., Esquerre Tugaye, M.T. and Dumas, B. 2004. Gene expression profiling and protection of *Medicago trunca*tula against a fungal infection in response to an elicitor from green algae *Ulva spp*. *Plant, Cell & Environment* 27: 917-928.

7- Demirbas, Ayhan (2010). "Use of algae as biofuel sources." *Energy Conversion and Management* 51(12): 2738-2749.

8-Denman, S., and McSweeney, C. 2005. Quantitative (real-time) PCR. *Methods in Gut Microbial Ecology for Ruminants* 105-115.

9- Esawy, M.A., Gamal, A.A., Kamel, Z., Ismail, A.M. S. and Abdel-Fattah, A.F. 2013. Evaluation of free and immobilized *Aspergillus niger* NRC1ami pectinase applicable in industrial processes. *Carbohydrate Polymers* 92: 1463-1469

10- Favela-Torres, E., Volke-Sepulveda, T. and Vinigra-Gonzalez, G. 2006. Production of hydrolytic depolymerising pectinases. *Food Technology and Biotechnology* 44: 222-227.

11- Gawel, N.J. and Jarret, R.L. 1991. A modified CTAB DNA extraction procedure for Musa and Ipomoea. *Plant Molecular Biology Reporter* 9: 262-266.

12- Goicoechea, N., Aguirreolea, J. and Garcıa-Mina, J. M. 2004. Alleviation of verticillium wilts in pepper (*Capsicum annuum* L.) by using the organic amendment COA H of natural origin. *Scientia horticulturae* 101: 23-37.

13- Hannan, A., Bajwa, R. and Latif, Z. 2009. Status of *Aspergillus niger* strains for pectinases production potential. *Pakistan Journal Phytopathology* 21(1): 77-82.

14- Heerd, D., Yegin, S., Tari, C. and Fernandez-Lahore, M. 2012. Pectinase enzyme-complex production by *Aspergillus spp*. in solid-state fermentation: a comparative study. *Food and Bioproducts Processing* 90(2): 102-110.

15- Heinze, S., Mechelke, M., Kornberger, P., Liebl, W., Schwarz, W. H. and Zverlov, V. V. 2017. Identification of endoxylanaseXynE from *Clostridium thermocellum* as the first xylanase of glycoside hydrolase family GH141. *Scientific Reports* 7.

16- Hoa, B. T. and Hung, P.V. 2013. Optimization of nutritional composition and fermentation conditions for cellulase and pectinase production by *Aspergillus oryzae* using response surface methodology. *International Food Research Journal* 20(6): 3269-3279

17- Jayaraj, J., Wan, A., Rahman, M. and Punja, Z.K. 2008. Seaweed extract reduces foliar fungal diseases on carrot. *Crop Protection*27: 1360-1366.

18- Khalaf, M.A. 2008. Biosorption of reactive dye from textile wastewater by non-viable biomass of *Aspergillus niger* and *Spirogyra* sp. *Bioresource Technology99*(14): 6631-6634.

19- Lee, Y.C., Chang, S.P., Lee, C.S. and Kao, N.H., 2013. Influence of pigment extraction on Pb (II) biosorption of Cladophora and Spirogyra algae powder. Advanced Materials Research 610:3591-3598.

20- Lombard, V., GolacondaRamulu, H., Drula, E., Coutinho, P.M. and Henrissat, B. 2013. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research 42*(1);490-495.

21- Malvessi, E. and Silveira, M.M.D., 2004. Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillusoryzae*. *Brazilian Archives of Biology and Technology 47*(5), pp.693-702.

22- MartínezTrujillo, A., ArreguínRangel, L., García Rivero, M. and Aguilar Sorio, G., 2011. Use of fruit residues for pectinase production by Aspergillus flavipes FP□500 and *Aspergillus terreus* FP□370. *Letters in Applied Microbiology*, *53*(2): 202-209.

23- Martos, M., Baumann, A., Cruz, N., Hours, R. and Garro, O., 2012. Partial characterization of enzymatic activities produced by a wild strain of *A. niger*. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 2(3):917.

24- Ramezani, A., Niazi, A., Abolimoghadam, A.A., Babgohari, M.Z., Deihimi, T., Ebrahimi, M. and Ebrahimie, E. 2013. Quantitative expression analysis of TaSOS1 and TaSOS4 genes in cultivated and wild wheat plants under salt stress. *Molecular Biotechnology* 53: 189-197.

25- Onu, JC. 2015. Production of Bio Fuel Using Green Algea. *Journal of Clean Energy Technologies* 5: 135- 139.

26- Pedrolli, D.B., Gomes, E., Monti, R. and Carmona, E.C. 2008. Studies on productivity and characterization of polygalacturonase from *Aspergillus giganteus* submerged culture using citrus pectin and orange waste. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *144*(2):191-200.

27- Pittman, J.K., Dean, A.P. and Osundeko, O., 2011. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology*, 102(1) pp.17-25.

28- Ramluckan, K., Moodley, K.G. and Bux, F. 2014. An evaluation of the efficacy of using selected solvents for the extraction of lipids from algal biomass by the soxhlet extraction method. *Fuel* 116: 103-108.

29- Rychlik W .2007. OLIGO 7 primer analysis software. PCR Primer Design, 35-59

30- Sahoo, D. and Seckbach, J. 2015. The Algae World. (Vol. 26). Dordrecht: Springer.

31- Sandri, I.G., Lorenzoni, C.M. T., Fontana, R.C., and Silveira, M.M. 2013. Use of pectinases produced by a new strain of *Aspergillus niger* for the enzymatic treatment of apple and blueberry juice. *LWT-Food Science and Technology* 51: 469-475.

32- Semenova, M.V., Grishutin, S.G., Gusakov, A.V., Okunev, O.N. and Sinitsyn, A.P. 2003. Isolation and properties of pectinases from the fungus *Aspergillus japonicus*. *Biochemistry* 68: 559-569.

33- Shevchenko, N.M., Burtseva, Y.V., Zvyagintseva, T.N., Makar, T.N., Sergeeva, O.S., Zakharenko, A.M. and Van Huyen, P. 2009. Polysaccharides and sterols from green algae *Caulerpa lentillifera* and *C. sertularioides*. *Chemistry of Natural Compounds* 45: 1-5.

34- Siddiqui,M.A., Pande, V., and Arif, M. 2012. Production, purification, and characterization of polygalacturonase from *Rhizomucorpus illus* isolated from decomposting orange peels. *Enzyme Research* 2012.

35- Simms, D., Cizdziel, P.E. and Chomczynski, P., 1993. TRIzol: A new reagent for optimal single-step isolation of RNA. *Focus* 15(4): 532-535

36- Van den Brink, J. and de Vries, R.P. 2011. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 91(6): 64-77.

37- Wubben, J.P., ten Have, A., van Kan, J.A. and Visser, J., 2000. Regulation of endopolygalacturonase gene expression in *Botrytis cinerea* by galacturonic acid, ambient pH and carbon catabolite repression. *Current Genetics*37:152-157.

38- Yuan J. S., Reed A., Chen F. and Stewart Jr C. N. 2006. Statistical analysis of real time PCR data, MBC Bioanformatic 7: 85.

39- Zhang, XY. and Gao YN. 2004. To design PCR primers with Oligo 6 and Primer Premier 5 [J]. Bioinformatics 4, 003

40- Kiana Pirian, K. and Piri, KH. 2018. Evaluation of antioxidant and a-amylase inhibitory activity of two species Sargassum angostifolium and Palisada perforate. *Journal of Molecular and Cellular Research* 31(2): 256-267

42- Nazari, R. and Moazemi, N. 2013. Preparation of mutants of Trichoderma reesei PTCC 5142 with increased production of cellulase. *Journal of Molecular and Cellular Research* 26(3): 393-400

Effect of green algae extract; *Spirogyra* sp. on the rate of pectinase enzyme secretion and expression level of *PgaA* gene in *Aspergillus niger*

Heydari Nejad A.M.[1], Panjehkeh N.[1], Sabbagh S.k.[2], Salari M.[1] and Sarafraz Ardakani M.R.[2]

[1] Dept. of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, I.R. of Iran.

[2] Dept. of Biology., Campus of Science, Yazd University, Yazd, I.R. of Iran.

Abstract

Aspergillusniger is one of the microorganisms that produce the pectinase enzymes group at thehigh levels. In this fungus, *PgaA* genes code Glycoside hydrolase family 28 that secrete polygalacturonase enzymes. Green algae (*Chlorophyceae*) and blue-green algae (*Myxophyceae*) having pectin, cellulose and hemicellulose compounds such as xylan, arabinoxylan in their structure could act as a precursor to the production of cellulase, xylanase and pectinase enzymes in fungi. In this work, the effect of green algae extract; *Spirogyra* sp. at 500 and 1000 mg/mL concentration on the rate of pectinase enzyme secretion and the relative expression of *PgaA* gene at 4 and 8 day after adding algae extract to culture medium was evaluated using qRT-PCR analysis. The highest level of enzyme secretion was observed at 8th days after algae extract adding to culture medium at 1000 mg/mL concentration (4.28 U/ml). Gene expression analysis of *PgaA* gene showed that the highest expression level was related to 4th day time interval after adding algae extract at 1000 mg.mL (10/142). According to positive effect of spirogyra algae compounds on expression level of *PgaA* gene responsible to pectinase production and increase of enzyme secretion, it is concluded that microalgaes could be used as important sources of enzyme production from favorable fungi and could be useful in biotechnological industry

Key words: Gene expression, Green algae, Pectinase, *PgaA* gene, Real-time PCR.