

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

نقیسه 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 پذیرش: ۹۱/۴/۱۱

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۲/۱۹

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 *16S rRNA* 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 سانتی‌گراد جدایه ۲۳ با میانگین ۱/۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، فعال‌ترین ایزوله سلولازی معرفی شد. این ایزوله‌ها جهت بهینه‌سازی کمپوست قارچ به کار برده شدند.

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

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

مقدمه

دارد (۵). افزایش عملکرد قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید وابستگی مستقیم با کیفیت کمپوست دارد. برای پژوهشگرانی که راجع به 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 مهم‌ترین اجزای جمعیت میکروبی کمپوست هستند که به عنوان تجزیه‌کننده مواد سلولزی از نظر کشاورزی، بسیار حائز

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

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، Yeast Extract ۱ گرم، Dextrose ۱۰ گرم، KH_2PO_4 ۰/۵ گرم، $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ۰/۵ گرم در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر) در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد 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 احیای نیترات، کاتالاز، هیدرولیز اووره، 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 ISP₇ [ترکیبات ISP₇: Glycerol ۱۵ گرم، L-Tyrosine ۰/۵ گرم، L-Asparagine ۱ گرم، K_2HPO_4 ۰/۵ گرم، $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ۰/۱ گرم، Trace Element HO-LE ۱ میلی لیتر (ترکیبات Element HO-LE: H_3BO_3 ۲/۸۵ گرم، $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ۱/۸ گرم، Sodium Tartate ۱/۷۷ گرم، $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ۱/۳۶ گرم، $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ۰/۰۴ گرم، $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ ۰/۰۲۷ گرم،

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 میسلیم هوایی و رویشی طبقه‌بندی شده‌اند. جنسهای مختلفی در این گروه از آکتینومیست‌ها وجود دارند (۲۱).

جنس *Streptomyces* یکی از مهم‌ترین 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 خارج سلولی از جمله سلولاز ترشح می‌کنند (۱۳).

سلولازها کمپلکسی آنزیمی از سه گروه می‌باشند که بطور هم‌افزایی با یکدیگر عمل می‌کنند و می‌توانند پیوندهای گلوکوزیدی (۴-۱)β را هیدرولیز نمایند. این آنزیم از بتا ۴-۱ 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. reticuli*، *S. albaduncus*، *S. lividens* 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 مهم‌ترین عوامل مؤثر در میزان عملکرد قارچ خوراکی است. شناسایی آکتینومیست‌های دارای قدرت تجزیه سلولز می‌تواند جهت دستورزی ترکیب کمپوست

از این نتایج آکتینومیست‌های جداسازی شده شناسایی شدند.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی: از محیط کشت تولید آنزیم سلولاز با ترکیب ((CMC(Carboxymethylcellulose) ۱ درصد، Yeast extract ۰/۵ درصد، K_2HPO_4 ۰/۰۵ درصد، NH_4NO_3 ۰/۰۲ درصد، $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ۰/۰۲ درصد، $NaCl$ ۰/۰۱ درصد و $FeCl_3$ ۰/۰۰۲ درصد) برای تعیین فعالیت آنزیمی جدایه‌ها استفاده شد. باکتریها در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد 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 ۱×۶ 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 دمای ۴۵ تا ۶۵ درجه سانتی‌گراد 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 این سیلیکوی توالیهای ژن *16SrRNA* با

$ZnCl_2$ ۰/۰۲ گرم، $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ ۰/۰۲۵ گرم، $Agar$ ۱۵ گرم در ۱۰۰۰ 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: $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ۱ گرم، $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ۱/۰ گرم و $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 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 *fdI*، *16SrRNA* (توالی پرایمر رفت *fdI*: 5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3' و *rP2* (توالی پرایمر برگشت *rP2*: 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') (۲۲) واکنش زنجیره‌ای پلیمرز انجام گردید. چرخه حرارتی PCR به صورت مرحله دنا تورا سیون اولیه در دمای ۹۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، دنا تورا سیون در دمای ۹۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه در بقیه چرخه‌ها، مرحله اتصال در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله طولیل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه انجام گرفت. مرحله آخر طولیل 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 *MboI*, *KpnI*, *PstI*, *HindIII*, *SalI*, *PaeI*, *VspI*، با استفاده از نرم افزار TotalLabTTL120 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 این سیلیکو هضم شده بود مقایسه شد. با استفاده

استفاده از آنزیمهای برشی، آنزیم *MboI* به عنوان آنزیم کلیدی در شناسایی آکتینومیسست‌های 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).

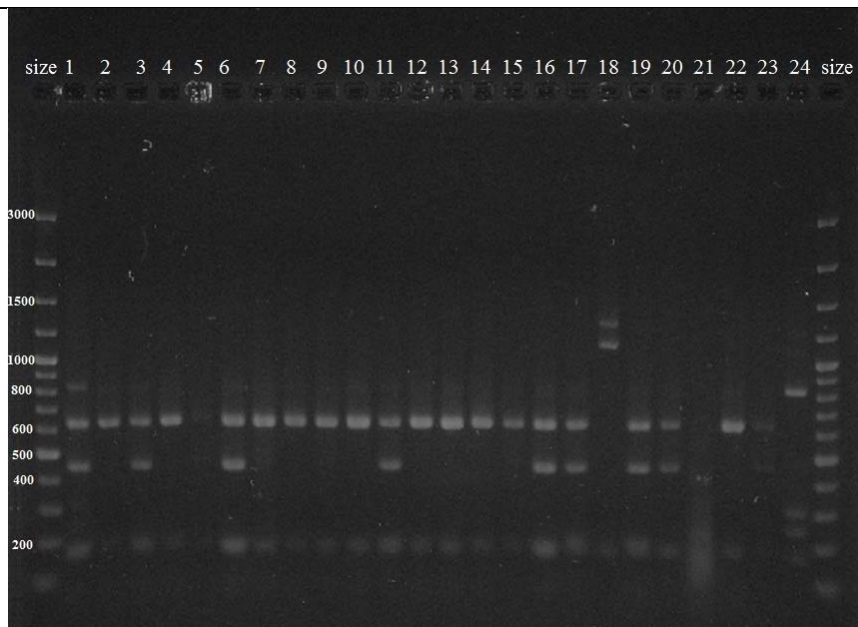
جدول ۱- مشخصات جدایه‌ها همراه با نتایج تستهای بیوشیمیایی آنها

شماره جدایه‌ها	محل جمع‌آوری (کمپوست)	رنگ اسپور	آزمون گرم	آزمون اسیدفست	آزمون کاتالاز	آزمون اوره‌آز	آزمون احیای نترات	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	+	+	+	-	+	+	+

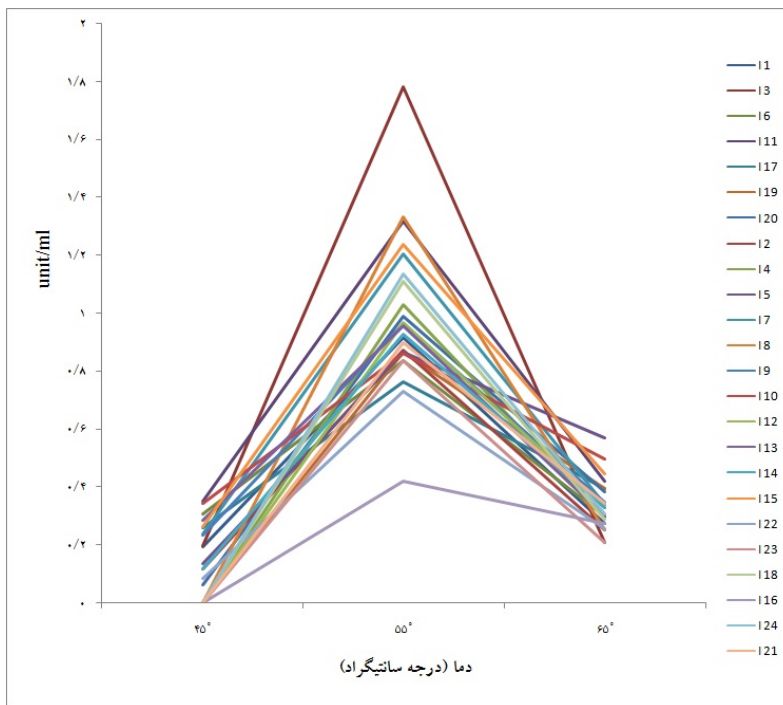
جدول ۲- تقسیم‌بندی باکتریها به سه گروه اصلی براساس الگوی برشی آنزیم *MboI*

شماره جدایه	الگوی برشی با آنزیم <i>MboI</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)

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



شکل ۱- الگوی برشی جدایه‌ها بر اساس ژن *16SrRNA*، توسط آنزیم برشی *MboI*



شکل ۲- نمودار تغییرات فعالیت سلولازی جدایه‌ها بر اساس تغییرات دما در روش FPU در دماهای ۴۵-۶۵ درجه سانتی گراد

گردد به حداکثر خود رسیده اما روند فعالیت سلول‌لازی بعد از این دما کاهش یافته است ($\alpha=0/05$). بنابراین در بین دماهای بررسی شده دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد با بیشترین میانگین فعالیت سلول‌لازی در تمام جدایه‌ها، بهترین دمای تولید سلول‌لاز برای این جدایه‌ها است. که البته محققین قبلی نیز این دما را به عنوان دمای بهینه گزارش نموده بودند (۱۹ و ۱۵).

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 سلول‌لازی 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 سانتی‌گراد که دمای کمپوست محسوب می‌شود، است. به منظور بررسی فعالیت آنزیمی تمام جدایه‌ها در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد تحت شرایط یکسان در تماس با کاغذ و اتمن 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 سانتی‌گراد، 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 ($\alpha=0/05$).

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

گروه اول که براساس الگوی برشی آنزیم *MboI* طبقه‌بندی شده بودند، توسط الگوی برشی حاصله از آنزیم‌های *AsnI*، *KpnI* و *SphI* شناسایی شدند. تمام جدایه‌های این گروه به جنس *Streptomyces* تعلق داشتند. بر این اساس جنس *Streptomyces* جنس غالب در میان آکتینومیسیت‌های گرمادوست جدا شده بود. در گزارشات سایر محققین نیز این جنس به عنوان جنس غالب معرفی شده است (۸ و ۶). در گروه دوم بر اساس الگوی برشی آنزیم *MboI* تنها یک جدایه وجود داشت که با استفاده از الگوهای برشی آنزیم‌های *AsnI*، *PstI*، *HindIII* و *SphI* شناسایی شد. این جدایه در جنس *Thermomonospora* قرار گرفت. برای شناسایی تک جدایه گروه سوم در الگوی برشی آنزیم *MboI* از آنزیم‌های *AsnI*، *SphI*، *KpnI*، *HindIII*، *Sall* و *Psp14061* 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 دسترس‌ترین. 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 سلول‌لازی: سلول‌لازهای پروکاریوتی
حداکثر فعالیت را در دماهای متفاوت نشان می‌دهند (۱۲)، بنابراین برای تعیین دمای بهینه فعالیت سلول‌لازی جدایه‌ها دماهای ۴۵-۶۵ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت. شکل ۲، نمودار تغییرات فعالیت سلول‌لازی عصاره ناخالص جدایه‌ها را در دماهای مختلف نشان می‌دهد.

تغییرات دما سبب تغییر در فعالیت سلول‌لازی عصاره آنزیمی جدایه‌ها شد. فعالیت سلول‌لازی از ۴۵ درجه سانتی‌گراد شروع به افزایش نموده است و در ۵۵ درجه سانتی‌گراد

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 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 پارچه‌های جین می‌باشد. به علاوه افزودن سلولاز به پودرهای شوینده سبب جدا شدن ریزشته‌های 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 میوه‌جات و مواد گیاهی، تولید سرکه و تیمار مواد زاید مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۱).

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 ۰/۸۷، ۰/۸۸ و ۰/۸۲ واحد در میلی‌لیتر فعالیت آنزیمی، بیشترین مقادیر را نشان دادند و بیشترین اختلاف را با سایر جدایه‌ها داشتند ($\alpha=0/05$).

از جدایه‌های فعال در هر دما استفاده‌های خاصی می‌شود. جدایه‌های فعال در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای بهینه‌سازی شرایط کمپوست مفیدند. چرا که محدوده دمایی کمپوست ۴۵-۵۵ درجه سانتی‌گراد است. بنابراین جدایه‌ها فعال این دماها برای بهینه‌سازی 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 جدایه‌ها 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 ($\alpha=0/05$). در نتیجه pH در نقطه ۶/۵ با

منابع

۱. پاکدین، ع.، ۱۳۸۶. شناسایی و بهینه‌سازی میکروفلور کمپوست قارچ خوراکی دکمه‌ای. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، ۸۰ ص.
۲. رجب‌خانی، ز.، زمانی، م.، مطلبی، م.، عنصری، ح.، ۱۳۸۸. بهینه‌سازی آنزیم بتا او ۴ اندوگلوکاناز (سلولاز) قارچ *Aspergillus niger* (R4) و همسانه‌سازی ژن *egIB*. مجله زیست‌شناسی ایران، جلد ۲۲، شماره ۴، ص ۶۹۰-۶۸۲.
۳. زهری، ص.، زمانی، م.، مطلبی، م.، بابایی، ع.، ۱۳۸۴. کلون کردن، تعیین توالی و مطالعه خصوصیات ژن و cDNA بتا ۱ و ۴.
۴. عبدی صوفیانی، ص.، دهناد، ع.، ۱۳۸۸. آکتینومیست‌ها و ویژگی‌های ضد میکروبی آنها. آموزش زیست‌شناسی، دوره بیست و سوم، شماره ۲، ص ۵۰-۴۷.
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., Sahn, D.F., Weissfeld, A.S., 2002. Bailey and Scott's diagnostic microbiology. 11th ed, Mosby Publications.
11. Ghose, T.K., 1987. Measurement 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 bean 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. Rebolledo, R., Martine, J., Aguilera, 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. Schrepf, H., Walter, S., 1995. The cellulolytic system of *Streptomyces reticulii*. 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 improvement 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.

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 Resources, 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*