

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 الزهراء، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، 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 هوای و گوناگونی سوبسترا، زیستگاهها و مراتب اکولوژیک متنوع و متعددی را برای میکروارگانیسم های مولد آنزیم از جمله باکتریها، مخمرها و قارچهای ریشه 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 ترشحي 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 ترشحي، آنزیمهای کاتابولیک، بازیدیومیکوتا، سودوزیما، شالیزار، مخمر

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

مقدمه

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

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، شرح انواع آنزیمها و رشد و بقای مخمر را تحت تأثیر قرار می دهند (۴). وسیع ترین

ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری گردید. به منظور غنی‌سازی بیشتر نمونه‌های خاک، ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون خاک تهیه شده در محلول رینگر به محیط YPG براث افزوده و پس از دو ساعت همزنی در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، به هر فلاسک، آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل با غلظت نهایی ۲۵۰ mg/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 سانتی‌گراد گرماگذاری شد. پس از این مدت، پلیتها از نظر حضور مخمرها بررسی گردید.

نگهداری جدایه‌های 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 جدایه‌ها از محلول آبی گلیسرول ۱۰ درصد (۱۱ و ۱۵) برای نگهداری در فریزر -۷۰ درجه سانتی‌گراد و همچنین آب مقطر برای نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد 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 سانتی‌گراد 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 سانتی‌گراد گرماگذاری شد. پس از

دریاچه‌های شور، قلل مرتفع در نواحی کوهستانی، غارها، یخچالها و یخرودها، کویرها، شوره زارها، دریاچه‌های 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 میکروارگانیسم‌های این نواحی در حفظ ذخایر میکروبی و معرفی سویه‌های 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 میکروارگانیسم‌ها محیطی غنی و مغذی به شمار می‌رود و به همین علت در این پروژه اکوسیستم بومی شالیزارهای برنج به منظور غربالگری جدایه‌های مخمر مولد آنزیمهای ترش‌کننده 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. نمونه‌ها از آب و خاک خزانه‌های دستی جمع‌آوری شد و در فلاسک حاوی یخ در کمتر از ۲۴ ساعت به آزمایشگاه منتقل شد.

کشت نمونه‌های آب: مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه آب بر روی محیط YPG آگار حاوی ۲۵۰ mg/l آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل کشت داده شد. پلیتها به مدت حداقل ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری گردید.

کشت نمونه‌های خاک: معادل ۱۰ گرم از نمونه‌های خاک در ۹۰ میلی‌لیتر محلول رینگر سوسپانسیون شد و پس از گرماگذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، مقدار ۱۰۰ μ l برداشته و بر روی محیط YPG آگار با غلظت ۲۵۰ mg/l کلرامفنیکل کشت داده شد (۲۱). پلیتها به مدت حداقل ۷۲

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 سانتی‌گراد گرماگذاری شد. پس از این مدت مشاهده رنگ آبی و یا فیروزه‌ای 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 سانتی‌گراد 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 سانتی‌گراد 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 سانتی‌گراد 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 سانتی‌گراد گرماگذاری

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 سانتی‌گراد 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 سانتی‌گراد گرماگذاری شد. پس از این مدت مشاهده هاله قهوه‌ای رنگ در زیر و اطراف کلنی نشان دهنده حضور آنزیم لاکاز است.

ب- با استفاده از سوبسترای گویکول: از محیط جامد واجد گویکول برای بررسی تولید آنزیم لاکاز استفاده شد (۲۴). پلیتها به مدت ۲ تا ۵ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. پس از این مدت، مشاهده رنگ قرمز تا قهوه‌ای 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 سانتی‌گراد 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 سانتی‌گراد گرماگذاری شد. پس از این مدت، از رنگ آمیزی افتراقی با محلول آبی ۲ درصد (w/v) کلرید کبالت، محلول آبی مولبیدات آمونیوم ۶/۲۵

۳۰، ۳۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد 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 سانتی‌گراد، 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 سانتی‌گراد گرماگذاری شد. پس از این مدت، لامها توسط رنگ آمیزی لاکتوفنل بلو از نظر شکل سلولها، نحوه جوانه زنی و تولید ریشه بررسی شد.

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

نتایج

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 سانتی‌گراد 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 سانتی‌گراد 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 سانتی‌گراد گرماگذاری شد. پس از این مدت به هر پلیت محلول آبی معرف قرمز روتینوم 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 و ۲۷).

شناسایی دو جدایه دارای بیشترین تنوع آنزیمی: الف- شناسایی بیوشیمیایی: آزمونهای دی آزونیم آبی، هیدرولیز اوره، تخمیر قندها، بررسی تولید ریشه، جذب منابع کربن، جذب منابع نیتروژن، مقاومت به سیکلوهاگزیمید 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،

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. همان‌طور که مشاهده می‌شود 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.

دو جدایه SA006 و SA044 به ترتیب از شالیزارهای روستاهای رضاکلا و زرگرمحله در محدوده طول و عرض جغرافیایی $36^{\circ}31.213'$ و $052^{\circ}38.130'$ - $052^{\circ}35.567'$ و $36^{\circ}36.716'$ و به ترتیب از نمونه‌های آب‌خزانه و خاک شالیزار جدا شدند. برای جداسازی جدایه SA006 از روش کشت مستقیم نمونه بر روی محیط YPG آگار حاوی 250mg/l کلرامفنیکل استفاده شد و جداسازی جدایه SA044 از طریق غنی‌سازی نمونه خاک در محیط YPG برات و سپس کشت بر روی محیط YPG آگار حاوی 250mg/l کلرامفنیکل انجام شد.

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

لیپاز	کراتیناز	آمیلاز	پروتئاز	نوکلئاز	سلولاز	استراز	لاکار	فیئاز	زیادلاتاز	کتیناز	سیتیناز	پکتیناز
S+	-	S+	S+	S+	-	+	+	-	-	-	+	-
-	-	+	S+	S+	-	+	-	-	-	-	+	-

*نسبت درصد سوبه‌های مولد آنزیم												
nd	nd	nd	nd	۰٪	۲٪	۲۳٪	nd	۲۳٪	۴٪	۴٪	nd	nd

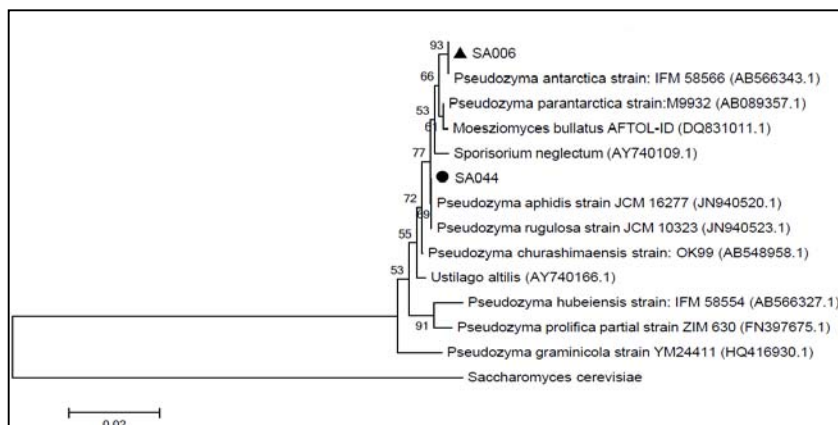
nd: بررسی نشده است

S: آنزیمهای برون ریز

*از کل ۴۶ سوبه غربال شده

نتایج بررسی فیلوژنی تشابه ۱۰۰ درصد توالی جدایه SA006 را به گونه شاخص *Pseudozyma antarctica* تأیید می‌کند. توالی جدایه SA044 به دو گونه شاخص *Pseudozyma aphidis* و *Pseudozyma rugulosa* ۱۰۰ درصد شباهت دارد. جدایه‌های برتر SA006 *Pseudozyma antarctica* و SA044 *Pseudozyma aphidis* به ترتیب با شماره دسترسی mb-nlim201034 و mb-nlim201036 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.

پس از تکثیر قطعه D1/D2 از rDNA ۲۶S زیر واحد بزرگ ریپوزوم در واکنش PCR (polymerase chain reaction) استفاده از پرایمر پیش رو NL-1 و پرایمر پس رو NL-4 قطعه‌ای به طول حدود ۶۰۰ جفت باز از DNA جدایه‌های SA006 و SA044 به دست آمد. توالیهای به دست آمده پس از ویرایش توسط نرم افزار Bioedit، برای مقایسه با توالیهای DNA ریپوزومی سایر مخمرها در بانک ژنتیکی NCBI و CBS، BLASTN شدند. برای هم‌ردیف‌سازی 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.



شکل ۱- درخت فیلوژنتیکی رابطه بین دو جدایه 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 بار را نشان می‌دهد. میزان Bootstrap (1000 replication) به صورت درصد در گره هر شاخه آورده شده است. نشانه ▲ جدایه SA006 را نشان می‌دهد که بیشترین قرابت را با گونه *Pseudozyma antarctica* دارد و نشانه ■ جدایه SA044 را با بیشترین قرابت به *Pseudozyma aphidis* و *Pseudozyma rugulosa* مشخص می‌کند.

antarctica (۳) دارد و جدایه SA044 نیز به گونه‌های *Pseudozyma rugulosa* و *Pseudozyma aphidis* (۳) بسیار شبیه است. جدایه‌های SA006 و SA044 جز در برخی موارد جذب منابع کربن و رشد در حضور گلوکز ۵۰ درصد و ۶۰ درصد به گونه‌های شاخص خود شباهت نزدیکی دارند.

آزمون بیوشیمیایی جذب منابع مختلف کربن جدایه‌های 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*

جدول ۲- توانایی جذب منابع کربن در دو جدایه SA006، SA044 و مقایسه با گونه‌های شاخص آنها

نام جدایه و گونه تبیین آن	جذب منابع کربن																								
	گلوکز	گالاکتوز	رافینوز	مالتوز	سلولزیوز	ملی یوز	سوکروز	لاکتوز	تره هالوز	ملریترز	نشاسته	اینولین	آل-آرابینوز	د-آرابینوز	رامنوز	ریبوز	مانیتول	اتانول	ایزوپنول	گلوکز آمین	سوکسینات	گلوکونات	سیترات	ریبیتول	منانول
SA006	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudozyma antarctica</i>	+	+	+	+	v	+	+	+	+	+	+	-	+	+	d	d	d	+	+	+	+	d	+	-	-
SA044	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudozyma aphidis</i>	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Pseudozyma rugulosa</i>	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

d: مثبت تاخیری پس از ۷ روز گرماگذاری

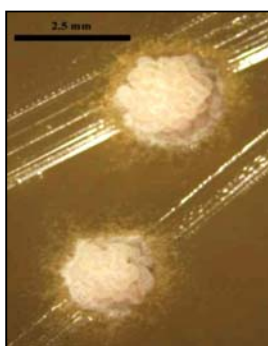
v: متغیر

جدول ۳- نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی فراتر در دو جدایه SA044, SA006 و مقایسه با گونه‌های شاخص آنها

نام جدایه و گونه تیپیک آن	رشد در دماهای مختلف															مقاومت به سیکلوهرگرمید ۱/۰/۰/۱	مقاومت به سیکلوهرگرمید ۱/۱	مقاومت به استیک اسید ۱/۱	رشد در حضور گلوکز ۵۰٪	رشد در حضور گلوکز ۶۰٪	تولید نشاسته خارج سلولی	
	۱۵°C	۲۰°C	۳۰°C	۳۵°C	۳۷°C	۱۴	۱۲	۱۰	۹	۶	۲	۱/۵	۱/۱۰	۱/۵	رشد در حضور NaCl							جذب منابع نیتروژن
SA006	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
<i>Pseudozymaantarctica</i>	+	+	+	+	-	n	N	n	n	n	n	n	n	n	n	n	+	v	-	-	-	-
SA044	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
<i>Pseudozymaaphidis</i>	+	+	+	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	-	-	n	-
<i>Pseudozymarugulosa</i>	+	+	+	n	n	-	n	n	n	n	n	n	n	+	+	+	+	+	+	-	-	-

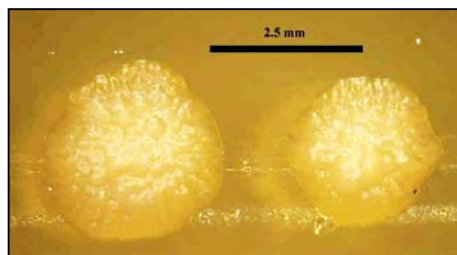
n: نتیجه مشخص نیست و بررسی نشده است

بررسی شد. کلنیهای جدایه SA006، چرمی، صورتی رنگ، محدب و دارای کناره‌های نامنظم و قطر آن ۲/۵mm بود. کلنیهای جدایه SA044، غشایی، کرم تا زرد رنگ، برآمده و دارای کناره‌های نامنظم و قطر آن ۲/۵mm بود.



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

به منظور بررسی ریخت‌شناسی، پس از کشت دو جدایه بر روی محیط YPG آگار و گرماگذاری آن، کلنی‌های جدایه SA006 و SA044 (شکل ۲ و ۳) از نظر برجستگی، قوام، رنگ، حاشیه و قطر کلنی توسط استریومیکروسکوپ



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

ذخیره دانه‌های چربی و مولد ریسه حقیقی و کاذب است. جوانه زنی به صورت قطبی انجام می‌شود و سلولها فاقد تولید مثل جنسی هستند. SA006 دارای سلولهای میله‌ای با ذخیره دانه‌های چربی و ریسه حقیقی و کاذب است و در اغلب موارد بلاستوکینیدی تشکیل می‌دهد. جوانه زنی

برای بررسی شکل میکروسکوپی نیز از جدایه‌های SA006 و SA044 بر روی محیط YPG آگار، کشت بر روی لام تهیه شد و پس از گرماگذاری، لامها توسط رنگ آمیزی لاکتوفنل بلو بررسی شد. SA044 دارای سلولهای درشت و پلی‌مورفیک از بیضی کوتاه تا میله‌ای، دارای

به صورت یک قطبی انجام می‌شود 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، کارایی 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. در این 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 بذره های مختلف و کودهای متفاوت، حضور انواع حیوانات کوچک و گیاهان علفی

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

در این بررسی از محیطهای جامد واجد سوبسترای آنزیمی به منظور غربالگری جدایه‌های مولد آنزیم استفاده شد. استفاده از محیط جامد برای غربالگری اولیه و سریع جدایه‌های 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 جدایه‌های مولد آنزیم و متابولیتها معرفی شده است (۲۲).

دو جدایه بازیدیومیست این بررسی (جدایه‌های 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*، ۹۹/۳ درصد به *Pseudozyma rugulosa* و *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 می‌تواند خارج سلولی و یا متصل به دیواره باشد. به طور کلی قارچها از طریق تجزیه ترکیبات آلی انرژی خود را به دست می‌آورند 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 ریشه کپک و محل جوانه زنی مخمر) منتقل می‌شوند و به همراه سایر وزیکولهای حاوی مواد سنتز دیواره به سمت محل رشد می‌روند. در برخی موارد این وزیکولها به سطح سلول منتقل و ترشح می‌شوند در صورتی که در بیشتر موارد متصل به دیواره باقی می‌مانند مانند آنزیم گلوکزآکسیداز 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 می‌شد (۱۲). علاوه بر این، پلی ساکاریدها و سایر ماکرومولکولها مانند پروتئین و لیپید جزو سوبسترهای رایج مخمرها نیستند و تنها گونه‌های محدودی از مخمرها آنزیمهای هیدرولیتیک خارج سلولی تولید می‌کنند (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 جدایه‌های SA006 و SA044 با استفاده از روش چاهک پلیت برون ریز گزارش شد. در بیشتر مطالعات برای بررسی ترشحی بودن آنزیم از روشهای

یافته دیده می‌شد می‌توان این‌طور گفت که احتمالاً آنزیم‌های استراز و لاکاز جدایه‌ها متصل به دیواره هستند. مخمرها به‌طور طبیعی مقادیر کمی پروتئین ترشح می‌کنند 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 کارایی بالا در سویه‌های دستکاری ژنتیکی شده به اثبات رسیده است اما سویه‌های وحشی مانند جدایه‌های SA006 و SA044 با قابلیت ترشح پروتئین ذاتی از این لحاظ و به‌عنوان کاندید برای تولید آنزیم بسیار با ارزش می‌باشند.

سنجش آنزیمی در صاف شده کشت استفاده می‌شود. 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 نمی‌توان به‌طور 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 آسان‌تر می‌کند. به همین علت آنزیم‌های استراز و لاکاز که با این روش جواب ندادند احتمالاً و نه به‌طور قطعی غیر ترشحی گزارش شدند. با توجه به این که هاله آنزیمی در محیط رشد مخمر و در اطراف سلول‌های رشد

منابع

1. Abedin, R. M. A. 2008. Decolorization and biodegradation of crystal violet and malachite green by *Fusarium solani* (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 Eveleigh, 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 *Aspergillus flavus* 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.

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 thermophilic mould *Sporotrichum 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, R.J. ST. and et al. 2000. Lack of host specialization in *Aspergillus flavus*. *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 *Aspergillus flavipes* 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 ecophysiology of yeasts. Springer-Verlag.
35. Sandhya, C. and et al. 2005. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* 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.

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 bacterial 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