

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

امیر مسعود حیدری نژاد<sup>۱</sup>، ناصر پنجه که<sup>۱</sup>، سید کاظم صباغ<sup>۲\*</sup>، محمد سالاری<sup>۱</sup> و محمدرضا سرافراز اردکانی<sup>۲</sup>



<sup>۱</sup> زابل، دانشگاه زابل، دانشکده کشاورزی، گروه گیاهپزشکی

<sup>۲</sup> یزد، دانشگاه یزد، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

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

### چکیده

قارچ *Aspergillus niger* میکروارگانیسمی است که آنزیم‌های گروه پکتیناز را در سطوح بالایی تولید می‌کند. در این قارچ ژن‌های *PgaA* خانواده شماره ۲۸ گلیکوزید هیدرولازها که آنزیم‌های پلی‌گالاکتوروناز ترشح می‌کنند را کد می‌کنند. جلبک‌های سبز و جلبک‌های سبز-آبی با داشتن ترکیبات پکتینی، سلولزی و همی سلولزی زایلان، آرابینوزایلان و غیره در ساختار خود می‌توانند به عنوان پیش‌ماده برای تولید آنزیم‌های سلولاز، زایلاناز و پکتیناز در قارچ‌ها عمل نمایند. در این پژوهش تأثیر غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره جلبک سبز *Spirogyra sp.* بر میزان ترشح آنزیم پکتیناز و همچنین سطح بیان ژن *PgaA* در بازه‌های زمانی چهار و هشت روز پس از افزودن عصاره جلبک به محیط کشت، با استفاده از تکنیک *Quantitative Real-time PCR* ارزیابی گردید. بیشترین میزان ترشح آنزیم در روز هشتم پس از اضافه کردن عصاره جلبک با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به محیط کشت مشاهده شد (۴/۲۸ واحد بر میلی‌لیتر). 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 میکروگرم در میلی‌لیتر بوده است. با توجه به تأثیر مثبت ترکیبات جلبک اسپیروژیر بر میزان بیان ژن رمزکننده آنزیم‌های پکتیناز و افزایش ترشح آنزیم، چنین نتیجه‌گیری می‌شود که ریزجلبک‌ها می‌توانند منابع بسیار مناسبی جهت تولید آنزیم از قارچ‌های مستعد باشند و در صنایع بیوتکنولوژی مورد استفاده قرار گیرند.

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

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۵۳۱۲۳۲۲۵۷ پست الکترونیکی: [sksabbagh@yazd.ac.ir](mailto:sksabbagh@yazd.ac.ir)

### مقدمه

شفاف‌سازی و بالا بردن کیفیت آبمیوه‌ها می‌باشد (۲). آنزیم‌های تجاری پکتین‌لیازی در صنعت آبمیوه از تقاضای بالایی برخوردار هستند. پکتیناز کاربردهای بسیار زیادی در صنایع استخراج آبمیوه، استخراج روغن، تیمار کردن ضایعات آبی، غذای دام، خالص‌سازی ویروس‌های گیاهی استفاده در صنعت کاغذسازی، تخمیر چای و قهوه و نرم کردن فیبرهای گیاهی دارد (۲). قارچ *Aspergillus niger* یکی از میکروارگانیسم‌هایی است که

آنزیم پکتیناز یک آنزیم پکتولیتیکی است که ماده پکتین را که یک سوبسترای پلی‌ساکاریدی تشکیل‌دهنده دیواره سلول گیاهان است می‌شکند. پکتینازها از مهمترین گروه‌های آنزیمی هستند که به طور گسترده‌ای در باکتری‌ها و قارچ‌ها توزیع شده و سه گروه مهم آن‌ها شامل پلی‌گالاکتورونازها (PG)، پکتین استرازها (PE) و پکتین‌لیازها (PL) می‌باشند (۱). یکی از اولین موارد استفاده از آنزیم پکتیناز (جدا شده از قارچ‌ها) در صنایع غذایی، مربوط به

زیستی (Biosorption) در جذب رنگ‌های باقی مانده در پساب‌های نسابی موثر است (۱۱). دیواره سلولی این جلبک دو لایه است که لایه بیرون پکتینی و لایه درونی غنی از ترکیبات سلولزی می‌باشد پکتین در خارجی‌ترین لایه دیواره سلولی حل می‌شود و به ریسه‌ها حالت لغزنده و لزج می‌دهد (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 مشاهده‌های میکروسکوپی و مطالعه ویژگی‌های ریخت‌شناسی اندامی نظیر هاگ، هاگ بر، انشعابات اولیه و ثانویه هاگ‌ها انجام شد (شکل ۲). همچنین بمنظور شناسایی مولکولی قارچ، استخراج DNA کل از توده میسلیمی 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 ریپوزومی برای تایید مولکولی جدایه قارچ با روش واکنش زنجیره پلیمرز استفاده گردید. پس از بهینه‌سازی باند حاصل از تکثیر قطعه هدف بر روی ژل آگارز ۱ درصد، نمونه جهت تعیین توالی به شرکت Bioneer کره ارسال شد.

**نمونه‌گیری و شناسایی جلبک *Spirogyra*** نمونه جلبک سبز رشته‌ای از آب چشمه‌های شیرین شهر طبرس جمع‌آوری شد و در محیط کشت مایع Bold's Basal (*MediumBBM, Merck*) کشت، خالص‌سازی و نگهداری شد. با استفاده از مطالعات میکروسکوپی و بررسی

سطح بالایی از آنزیم‌های گروه پکتیناز را تولید می‌کند (۳). با کشت قارچ‌ها در محیط کشت مناسب و اضافه کردن مواد حاوی پکتین به محیط، تولید این آنزیم‌ها القاء می‌شود. سپس با انجام فیلتراسیون این آنزیم‌ها را جداسازی می‌کنند (۴). خانواده گلیکوزید هیدرولازها گروه گسترده‌ای از آنزیم‌ها هستند که پیوند گلیکوزیدی بین دو یا تعداد بیشتری از کربوهیدرات‌ها را تجزیه می‌کنند (۵). قارچ *Aspergillus niger* قادر خواهد بود در محیط‌های محرک، با افزایش بیان ژن Alkaline Protease (*APga*) منجر به تولید و افزایش آنزیم پلی‌گالاکتوروناز (EC 3.2.1.15) از خانواده شماره ۲۸ گلیکوزید هیدرولازها شود (۶). بهینه‌سازی شرایط تخمیر و ترکیب مواد غذایی محیط کشت قارچ *Aspergillus oryzae* نشان داده است که ترکیباتی نظیر سویا، قند، اوره، آب و سولفات منیزیم در دمای ۳۳ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۶۷٪ و اسیدیته ۵/۹ قادر به تحریک قارچ در افزایش میزان آنزیم‌های سلولاز و پکتیناز شده است (۷). استفاده از تفاله انگور در تحریک قارچ *Aspergillus awamori* در تولید آنزیم‌های زیلاز و پلی‌گالاکتوناز نشان داده است که محیط جامد و اندازه ذرات در مراحل تخمیر و تولید آنزیم خللی ایجاد نمی‌کند (۸). جلبک‌های سبز (*Chlorophyta*) و جلبک‌های سبز-آبی (*Cyanophyta*) با داشتن ترکیبات پکتینی، سلولزی و همی سلولزی زایلان، آرابینوزایلان و غیره در ساختار خود می‌توانند محرک‌های خوبی به عنوان پیش‌ماده برای تحریک بیان ژن رمزکننده و تولید آنزیم‌های سلولاز، زیلاناز و پکتیناز در قارچ‌ها باشند (۹). جلبک سبز رشته *Spirogyra sp.* (*Zygnematophyceae*) دارای ریسه‌های سبز رنگ، غیر منشعب و مرکب از ردیفی از سلول‌های دارای ۱ تا ۱۶ کلروپلاست مارپیچی می‌باشند که به صورت آزاد و شناور در روی سطح آب‌های شیرین رشد می‌کنند (۱۰). مطالعات ثابت کرده است که استفاده از زیست‌توده جلبک *Spirogyra* و قارچ *Aspergillus niger* بعنوان جاذب

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 گلاکتوروناز 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. در نهایت طراحی آغازگر مناسب در نواحی بین دو اگزون ( Exon-exon junction) (دارای یک ناحیه ایترونی به طول ۵۳ جفت باز) در رونوشت ژن *PgaA*، به کمک نرم افزارهای بیوانفورماتیکی Oligo7 (۱۷)، Primer premier 5 (۱۸) و وبگاه آنالین Primer 3 انجام شد.

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 ۱/۱ گرم از عصاره استحصال شده جلبک در ۱۰۰ میلی لیتر آب حل شده و از رقیق سازی عصاره پایه جلبکی با غلظت

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه

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

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

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 حاوی ۲۰ 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 سانتیگراد، ۱ میلی لیتر معرف DNS به نمونه ها اضافه و ۵ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتی گراد قرار داده

**القای ترشح و سنجش آنزیم پکتیناز:** به منظور سنجش میزان ترشح آنزیم پکتیناز، محیط کشت مایع حاوی  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ،  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ،  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (۶ گرم) و  $\text{MgSO}_4$  (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

$$\Delta C_t \text{ target} = C_t \text{ control} - C_t \text{ treatment}$$

$$\Delta C_{\text{reference}} = C_t \text{ control} - C_t \text{ treatment}$$

$$\Delta \Delta C_t = \Delta C_t \text{ reference} - \Delta C_t \text{ target}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta \Delta C_t}$$

ترسیم نمودارها با استفاده از نرم افزار Graphpad 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 اسپرژیلوس نیجر استفاده گردید. مشاهده باند حاصل از قطعه تکثیری در واکنش زنجیره ای پلیمرز 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 ۱۰۰ درصدی 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

شدند. سپس جذب نوری محلول واکنش با استفاده از دستگاه طیف سنج نوری (AnalytikaJena, Germany) در طول موج 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 آلودگی های احتمالی RNA بوسیله DNA از کیت RNase-free (Fermentase) استفاده گردید. از آنزیم DNaseI (SinaClon, Iran) برای حذف مولکولهای DNA باقیماده در محلول استفاده گردید.

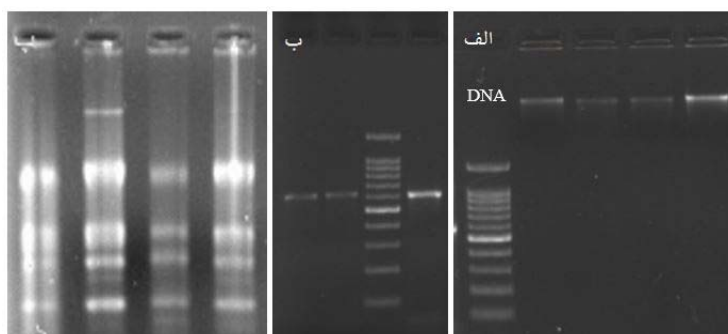
سنتر cDNA با استفاده از کیت تجاری AccuPowerRCycleScript RT PreMix (dN6) kit انجام شد. به منظور بررسی سطح بیان و میزان تغییرات ژن *PgaA* در تیمارهای بکار رفته، از تکنیک آنالیز بیان ژن در زمان واقعی (Quantitative Real-time PCR) با استفاده از دستگاه Applied Biosystems® StepOnePlus™ Real-Time PCR استفاده 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  $2^{-\Delta \Delta C_t}$  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.

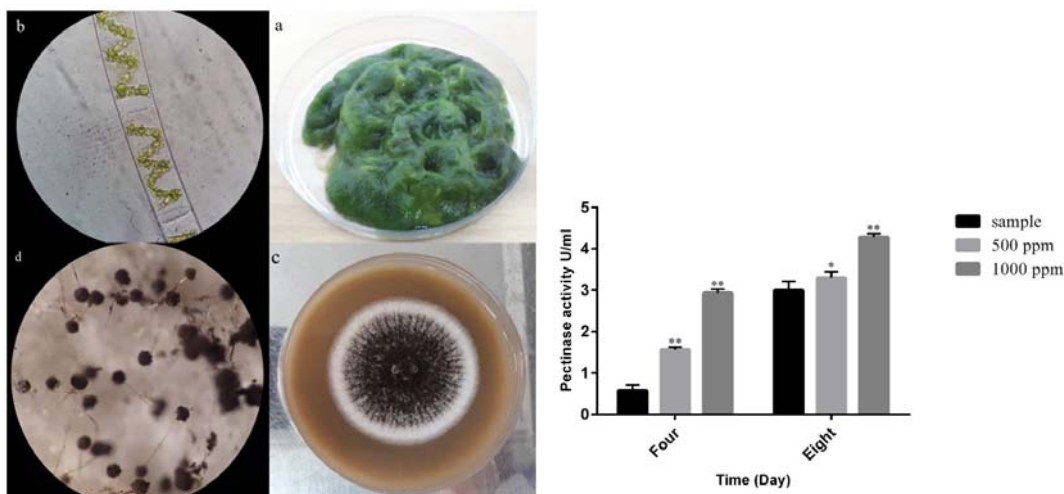
نمونه شاهد فقط در سطح پنج درصد تفاوت معنی‌دار داشت. (شکل ۳).

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 میلی‌لیتر جلبک سبز *Spirogyra* بوده است.

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



شکل ۱- نتایج بررسی کیفیت قطعات استخراج 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 tRNA نشان از کیفیت مناسب استخراج RNA دارد.

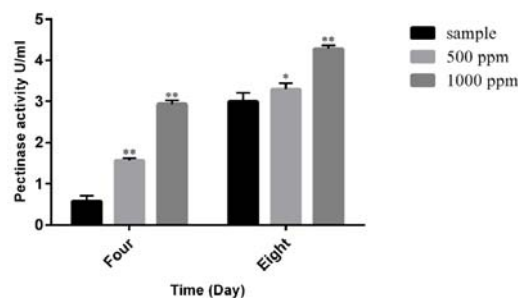


شکل ۲- (a) تصویر میکروسکوپی توده رشته ای جلبک *Spirogyra* sp. (b). تصویر درشت نمایی شده میکروسکوپ نوری از ریشه جلبک *Spirogyra* همراه با کلروپلاست ماریپیچی (c). تصویر میکروسکوپی از هیف و اسپوره های قارچ *A. niger* روی محیط کشت PDA. (d). تصویر درشت نمایی شده میکروسکوپ نوری قارچ *A. niger*

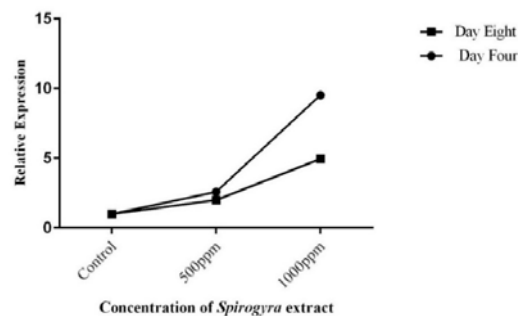
ژن *PgaA* در روز چهارم نسبت به روز هشتم پس از کشت به میزان قابل توجهی بیشتر بوده است (شکل ۴). مقایسه نتایج حاصل از سنجش سطح آنزیمی گروه پکتیاز و تغییرات بیان ژن رمز کننده آنزیم پلی گالاکتوروناز ارتباط و همبستگی نزدیکی را با هم نشان داد. در روز چهارم پس از کشت نمونه های تیمار شده با پیش ماده عصاره جلبکی 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 قرار گرفته 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 جلبک‌ها به عنوان منابع سرشاری از هیدرات‌های کربن در تحریک قارچ‌ها به تولید آنزیم‌های 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



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 عصاره ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر عصاره جلبکی، سطح رونوشت این ژن به ترتیب به میزان ۲/۰۱۲ و ۴/۹۵۷ برابر بیشتر از نمونه شاهد بوده است (جدول ۲). بطور کلی میزان تغییرات بیان

*A. terreus* FP-370 نشان داد که افزایش میزان غلظت منبع کربن قابل دسترس برای قارچ در افزایش تولید آنزیم نقش مستقیم و اثر معنی‌داری 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 تأثیر و افزایش بیان ژن دارد بطوریکه در نمونه‌هایی که دو غلظت مختلف پیش‌ماده اضافه شده‌اند، نسبت به نمونه کنترل افزایش داشت. با افزایش میزان دو برابری غلظت عصاره از ۵۰۰ به ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، سطح رونوشت ژن رمزکننده آنزیم پلی‌گالاکتوروناز در روز هشتم تقریباً بین ۲-۵ برابر افزایش داشت (جدول ۲).

پیشین تأثیر نوع منبع کربنی و محرک‌های طبیعی پکتین نظیر سبوس گندم، میوه سیب، توت‌فرنگی و پرتقال و در میزان ترشح آنزیم‌های قارچی اثبات کرده است (۲۳، ۲۴). همچنین بهینه‌سازی شرایط رشدی قارچ *Aspergillus giganteus* برای بهره‌وری هر بیشتر در تولید حداکثری آنزیم نشان داده است که در اسیدیته ۴/۵ و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد 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 تأثیر 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

جدول ۲- محاسبه Ct میانگین هر نمونه و مقایسه نسبی میانگین بیان ژن *PgaA* نسبت به نمونه شاهد

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

\*Target Gene

گیاه در اثر کاهش جمعیت بیمارگر می‌شود. کاربرد این ترکیبات با اثر تحریک به سلولاز در قارچ‌های بیمارگر می‌تواند منجر به افزایش بیماری در گیاه شود زیرا توانایی قارچ را در هیدرولیز دیواره سلولزی گیاه بیشتر می‌نماید.

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 میلی‌لیتر رسید که در مقایسه با روز چهارم ۲/۴ واحد بیشتر بوده است. این افزایش می‌تواند به دلیل تکامل ریشه‌های قارچی در این بازه و تحریک بیشتر جهت تولید متابولیت‌های ثانویه باشد. در محیط‌های 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

کاهش روند افزایش بیان ژن با افزایش غلظت در بازه زمانی ۸ روز پس کشت نشان از تأثیر 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 می‌باشد. با بررسی میزان بیان ژن در بازه‌های زمانی بیشتر می‌توان 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 تأیید رسید. مطالعه کلوزت و همکاران (۲۰۰۴) با تلقیح عصاره جلبک سبز *Ulva sp.* به گیاه یونجه به عنوان القاگر و مشاهده نتایج آزمون نوردردن بلات نشان داد، پاسخ‌های 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

زند و باعث بهبود گیاه می‌شود در حالیکه هیچ مقاومتی صورت نگرفته و فقط توانایی قارچ بر اثر دریافت مواد محرک خارجی کاهش یافته است. البته افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی که در واکنش‌های فوق حساسیت گیاهان به بیمارگرهای اختصاصی نقش دارند می‌تواند این فرضیه را حداقل برای گیاهان نسبتاً متحمل به بیماری تضعیف نماید. ترکیبات پکتینازی تولید شده توسط قارچ‌های اسپریلوس به شکل گسترده‌ای در صنایع غذایی و کاغذی مورد استفاده قرار می‌گیرد. از طرفی مشخص شده است که دیواره سلولی جلبک رشته‌ای اسپروژیر از دولایه تشکیل شده که بخش درونی را عمدتاً 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 آنتی‌اکسیدانتی جلبکها (۴۰)، مطالعه بیشتر در تعیین اثر بخشی این جلبک در مهار رشد سلولهای سرطانی می‌تواند جالب باشد. استفاده از تکنیکهای مهندسی ژنتیک نظیر استفاده از جهش یافته‌های برتر در قارچ *Trichoderma reesei* نشان داده است که این تکنیک باعث تولید جدایه‌های کارآمد قارچ در تولید آنزیم پکتیناز شده است (۴۱) که استفاده از این جلبک نیز می‌تواند در کنار تولید جهش یافته‌ها کارایی قارچ اسپریلوس را در تولید آنزیم افزایش دهد.

### نتیجه‌گیری

سطوح ترشح آنزیم‌های قارچی به طور طبیعی با افزایش زمان تا رشد کامل اندام‌های رویشی افزایش می‌یابد، نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که ترکیبات پکتینی جلبک سبز اسپروژیر می‌تواند میزان ترشح آنزیم‌های گروه پلی‌گالاکتوروناز را به ویژه در روزهای ابتدایی رشد قارچ، به طور معنی‌داری افزایش دهد. امید است بتوان از ترکیبات تجاری جلبک‌های سبز به عنوان یک پیش‌ماده فعال در صنعت، جهت بهره‌وری بیشتر تولید این گروه از

طبیعی در ترشح آنزیم در نمونه شاهد، این میزان افزایش، در محیط کشت حاوی عصاره ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره جلبکی در سطح یک درصد معنی‌دار نبود (شکل ۳). جایاراج و همکاران (۲۰۰۸) با تیمار گیاه هویج توسط عصاره جلبک قهوه‌ای *Ascophyllum nodosum* و آلوده‌سازی گیاه با قارچ *Alternaria radicina* و *Botrytis cinerea* نشان دادند که گیاهان تیمار شده پس از ۱۰ روز مقاومت بیشتری در برابر پاتوژن‌های بیماری‌زا نسبت به نمونه شاهد و گیاه تیمار شده با سالیسیلیک اسید داشته است و میزان ترشح آنزیم‌های پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز، فنیل آلانین آمونیلایز، کیتیناز و بتاگلوکاناز در نمونه تیمار شده با جلبک قهوه‌ای نسبت به نمونه شاهد بیشتر بوده است. همچنین سطح بیان ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی *PR1*، *PR5* و *NPR1* نسبت به نمونه‌های کنترل منفی و تیمار شده با سالیسیلیک اسید افزایش یافت (۲۹). گوپکوچا و همکاران (۲۰۰۴) با پرورش گیاه لفلل با استفاده از محیط کشت تقویت شده با COA H شامل سالیسیلیک اسید، نمک‌های آمونیومی محلول و عصاره علف دریایی (جلبک قهوه‌ای) نشان دادند، گیاهان تیمار شده نسبت به نمونه‌های 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 اسپروژیر در صورتی که در دسترس قارچ اسپریلوس قرار گیرند، با فعال‌سازی سیستم سیگنال دهی بیان ژن‌های رمزکننده تجزیه‌کننده این مواد، ترشح این آنزیم‌ها را تحت تأثیر قرار دهد (۳۰). با توجه به کاهش بیماری‌زایی قارچ‌های بیمارگر در گیاهان در هنگام افزودن عصاره جلبکی، این ایده به ذهن پرورنده می‌شود که افزودن عصاره جلبک باعث تحریک قارچ در گیاه به تولید آنزیم‌های غیر ضروری برای بیماری‌زایی شده و این امر تمرکز قارچ برای تولید آنزیم خاص در بیماری‌زایی بهم می‌



استفاده شود.

آنزیم‌ها در فارچ *Aspergillus niger* و سایر میکروارگانیسم‌های تولیدکننده این دسته از آنزیم‌ها

### 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 truncatula* 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 Garcia-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 endoxylanase XynE 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 Technology* 99(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 *Aspergillus oryzae*. *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, J.C. 2015. Production of Bio Fuel Using Green Algae. *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 Sinityn, 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 decomposing 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 Bioinformatic* 7: 85.
- 39- Zhang, X.Y. 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  $\alpha$ -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.<sup>1</sup>, Panjehkeh N.<sup>1</sup>, Sabbagh S.k.<sup>2</sup>, Salari M.<sup>1</sup> and Sarafranz Ardakani M.R.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dept. of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, I.R. of Iran.

<sup>2</sup> Dept. of Biology., Campus of Science, Yazd University, Yazd, I.R. of Iran.

### Abstract

*Aspergillus niger* is one of the microorganisms that produce the pectinase enzymes group at the high 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 4<sup>th</sup> 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 microalgae 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.