جداسازی وشناسایی دو قارچ تولیدکننده آنزیم لاکاز از باگاس و ریزوسفر نیشکر

فاطمه شیخی[1*]، محمد رعایایی اردکانی[1]، نعیمه عنایتی ضمیر[2] و غلامرضا قزلباش[1]

[1] **اهواز، دانشگاه شهید چمران، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، بخش میکروبیولوژی**

[2] **اهواز، دانشگاه شهیدچمران، دانشکده کشاورزی، گروه خاکشناسی، بخش بیولوژی خاک**

تاریخ دریافت: ۹۱/۲/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۱/۱۰

چکیده

در تجزیه لیگنین، مجموعه‌ای از آنزیمها تحت عنوان لیگنیناز نقش دارند. لاکاز به علت ویژگیهای خاص خود در بین آنزیمهای تجزیه‌کننده لیگنین از اهمیت خاصی برخوردار است. از ویژگیهای لاکاز، اکسیداسیون انواع متعدد سوبستراها، تحمل گرمایی بالا، داشتن pH ایزوالکتریک اسیدی است. شناسایی میکروارگانسیم‌های جدید با قدرت تولید و ترشح بالاتر این آنزیم صنعتی از اهمیت انکارناپذیری برخوردار است. لذا در این تحقیق جداسازی، غربالگری و شناسایی قارچهای تولیدکننده لاکاز از باگاس و ریزوسفر نیشکر انجام شد. به منظور غربالگری سویه‌های مولد لاکاز از محیط کشت MEA حاوی ۰/۱ گرم در لیتر ABTS و ۰/۵ میلی‌مول در لیتر گایاکل استفاده شد. برای سنجش میزان کمی آنزیم لاکاز از روش نیکو پاولا استفاده شد. در این تحقیق از بین ۲۲ قارچ غربالگری شده، دو جدایه *Alternaria alternata* و *Retroconis* sp با بیشترین میزان تولیدآنزیم لاکاز شناسایی شدند. دو جدایه با استفاده از تکثیر PCR و تعیین توالی ناحیه ITS، DNA ریبوزومی و همچنین خصوصیات مورفولوژیک شناسایی شدند. میزان تولید لاکاز جدایه‌ها در شرایط هوادهی و سکون بررسی شد. مطالعه بر روی این جدایه‌ها نشان داد که شرایط هوادهی و سکون اثرات متفاوتی در میزان تولید لاکاز ازاین جدایه‌ها داشت.

واژه‌های کلیدی: لاکاز، باگاس، ریزوسفرنیشکر، *Alternaria alternata* و *Retroconis* sp

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۴۶۳۶۱۴۲ ، پست الکترونیکی: fatemehsheikhi87@yahoo.com

مقدمه

یکی از ترکیبات عمده زیست توده، لیگنوسلولز می‌باشد که تقریباً نیمی از مواد حاصل از فرآیند فتوسنتز را شامل می شود(۱۴). لیگنوسلولز از سه نوع پلیمر سلولز، همی سلولز و لیگنین تشکیل شده که از لحاظ شیمیایی توسط پیوندهای غیرکووالانسی و اتصالات عرضی کووالانسی به یکدیگر متصل شده‌اند(۷). برخی میکروارگانیسم‌ها خصوصاً انواع قارچها، سیستمهای آنزیمی خاصی را توسعه داده‌اند تا توانایی تخریب لیگنین را به دست آورند (۲ و ۹). این قارچها را بر اساس ریخت‌پوسیدگی به سه نوع قارچهای پوسیدگی سفید، پوسیدگی قهوه‌ای و پوسیدگی نرم تقسیم می‌کنند. واکنشهایی که توسط قارچها، بالاخص قارچهای پوسیدگی سفید برای تأثیر بر لیگنین انجام می‌دهند، غالباً توسط مجموعه‌ای از آنزیمهای پراکسیداز خارج سلولی تحت عنوان لیگنیناز انجام می‌گیرد که شامل لاکاز (Lac:EC 1.10.3.2)، لیگنین‌پراکسیداز (Lip:EC 1.11.1.14)، منگنزپراکسیداز(Mnp:EC1.11.1.13) و ... می‌باشند. از بین آنزیمهای لیگنولیتیک، فنل‌اکسیدازها با نام لاکاز و پراکسیدازها مانند لیگنین‌پراکسیداز و منگنزپراکسیداز نقش اساسی در تجزیه لیگنین دارند (۱۱). لاکاز (بنزودیول :اکسیژن اکسیدوردکتاز EC:1.10.3.2) گروهی از آنزیمها

هستند که اکسیدازهای مس آبی نامیده می‌شوند (۱۹). لاکاز از اکسیژن به عنوان پذیرنده الکترون استفاده کرده و کوینون تولید می‌کند و به این دلیل جزء خانواده فنل اکسیداز می-باشد(۱۶). این آنزیم طیف وسیعی از سوبستراهای آلی شامل مونو، دی و پلی‌فنل‌ها، آمینهای آروماتیک، اسیدهای کربوکسیلیک و نیز سوبستراهای غیرفنلی و غیرآلی را اکسید می‌کند. البته تمایل آن به اکسیدکردن پارا دی‌فنول بیشتر است. این آنزیم به علت قدرت اکسیدکنندگی ترکیبات فنلی و غیرفنلی ترکیبات لیگنین می‌تواند ترکیبات مشابه که در طبیعت بسیار سخت تجزیه‌پذیر هستند را نیز تجزیه و در حذف آلاینده‌ها نقش داشته باشد. لاکاز درطبیعت به طور وسیع پراکنده می باشد به طوری که در بسیاری از گیاهان آلی، قارچها، باکتریها و حتی در بعضی از حشرات دیده شده است(۴). لاکازها درانواع قارچها از جمله آسکومیست‌ها، دترومیست‌ها و به ویژه در تعدادی از بازدیومیست‌ها تحت عنوان قارچهای پوسیدگی سفید به وفور یافت می گردد. از تولیدکنندگان لاکاز از قارچهای آسکومیکوتا می‌توان به قارچهای *Gaeumannomyces graminis Melanocarps albomyces, Monocillium ,Neurospora crassa, Podospora anserina , Aspergillus, Curvularia* و*Penicillium* اشاره کرد(۴). با توجه به اهمیتی که آنزیم لاکاز در بیوتکنولوژی و کاربردهای فراوان آن در صنعت دارد. تحقیقات بسیار گسترده‌ایی در حال حاضر در سراسر دنیا برای جداسازی انواع میکروارگانیسم‌های تولید کننده خوب این آنزیم و استفاده از آنها در صنعت انجام می‌شود. در ایران نیز صفری و همکاران (۲۰۰۶) بررسی مقایسه‌ایی در رابطه با تولید لاکاز خارج سلولی تحت شرایط مختلف داشتند، در این مطالعه تولید لاکاز از انواع قارچهای بازدیومیست و دترومیست در شرایط مختلف محیط کشت بررسی گردیده است(۱۵)، اما تاکنون هیچ تحقیقی مبنی بر جداسازی قارچهای مولد لاکاز از ایران وجود نداشته است. لذا این پژوهش در راستای جداسازی قارچهای مولد لاکاز از زیست بوم ایران و تعیین بهترین سویه تولید کننده آن انجام شد .همچنین در این تحقیق اثر هوادهی بر میزان تولید لاکاز از جدایه های برتر مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

جداسازی قارچها: برای جداسازی قارچهای تولید کننده لاکاز، نمونه‌برداری هدفمند از مناطق مستعد صورت گرفت. این مناطق شامل مزارع نیشکر واقع در استان خوزستان، نمونه‌هایی از باگاس، فاضلاب کارخانه‌های کاغذسازی، خاک مناطق جنگلی، قطعات چوب و درختان در حال پوسیده شدن بودند. تعداد۹۰ نمونه از مناطق مختلف به صورت تصادفی انتخاب شدند. نمونه برداری خاک ازعمق ۲۰-۱۵ سانتیمتری توسط وسیله‌ای به نام اوگر صورت گرفت. نمونه‌های فاضلاب از سه قسمت ابتدای فاضلاب، قسمت میانی و خروجی نهایی فاضلاب تهیه شدند. یک گرم از نمونه‌های جامد و یک میلی‌لیتر از نمونه‌های مایع به ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه و در انکوباتور شیکردار به مدت ۲ ساعت در دمای۳۰ درجه، ۱۳۰ دور در دقیقه هوادهی شدند و بعد از سکون به مدت ۳۰ دقیقه، از مایع رویی به نسبت ۱ به ۱۰ به محیط کشت غنی‌کننده تلقیح شدند، سپس مدت ۱ روز در انکوباتور شیکردار(۳۰ درجه و ۱۳۰ دور در دقیقه)گرماگذاری شدند و بعد از آنها به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به محیط کشت (MEA) حاوی دو آنتی-بیوتیک کلروتتراسیکلین و کلرآمفنیکل (Sigma آلمان) تلقیح شد. بعد از یک هفته انکوباسیون پلیتها در دمای ۳۳-۲۸ درجه سانتی گراد، پرگنه‌های قارچی رشد کرده قابل رؤیت شدند، سپس با کشت متوالی، کشت خالص هر قارچ به دست آمد. به منظور غربالگری قارچهای تولید کننده لاکاز، از محیط کشت (MEA) به همراه نشانگر ۰/۱ گرم در لیتر ABTS یا ۰/۰۲ درصد گایاکل (Sigma آلمان) استفاده شد(شکل۱). pH محیطهای کشت برابر۴/۵ تنظیم گردید (۸ و ۱۵). قارچ *Trametes pubecens* به عنوان کنترل مثبت و

از قارچ *Phanerochyte crysosporium* به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

جدول۱- ترکیبات محیط کرک مورد استفاده برای سنجش میزان کمی آنزیم لاکاز

مقدار مورد استفاده در یک لیتر	مواد
۱۰ گرم	گلوکز
۲ گرم	تارتارات آمونیوم
۱ گرم	پتاسیم دی هیدروژن فسفات
۰/۵ گرم	سولفات منیزیم آبدار
۰/۵ گرم	کلرید پتاسیم
۱ گرم	عصاره مخمر
۱۵۰میکرومول	سولفات مس آبدار
۱۰ ml/l	محلول مینرال حاوی ۲/ ۰گرم در لیتر سولفات آهن،۰/۰۱ گرم در لیتر سولفات روی آبدار ۰/۰۰۱ گرم در لیتر کلرید کبالت آبدار،۰/۰۰۳ گرم در لیتر پرمنگنات سدیم

بررسی کمی آنزیم لاکاز جدایه های غربالگری شده: به منظور تولید و سنجش فعالیت آنزیم لاکاز از محیط کرک استفاده شد (جدول ۱). pH محیط کشت کرک برابر ۴/۵ تنظیم شد(۱۵). برای تعیین میزان فعالیت آنزیم لاکاز در هر ایزوله و تعیین بهترین جدایه تولیدکننده آنزیم لاکاز، هر کدام از ایزوله‌های خالص‌شده در فلاسک ۲۵۰ml حاوی ۳۰ml محیط کشت کرک کشت داده شد. بدین منظور چهار قرص پنج میلی‌متری از حاشیه پرگنه‌های هفت تا ده روزه جدایه مولد لاکاز به فلاسکهای ارلن حاوی محیط کشت کرک انتقال داده و فلاسکها به مدت ۱۵روز در دمای ۳۳-۲۸درجه سانتی گراد بر روی شیکر دورانی با سرعت ۱۱۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. همچنین میزان فعالیت آنزیم هریک از جدایه‌ها در حالت سکون نیز بررسی شد. لازم به ذکر است مقایسه بین دو حالت سکون و هوادهی در شرایط کاملاً یکسان صورت گرفت، فقط در حالت هوادهی هم زدن محیط کشت با شیکر دورانی برای تحریک تولید لاکاز انجام گرفت و در حالت سکون این فاکتور حذف شد و فلاسکهای محیط کشت در همان دما بدون حرکت قرار گرفتند تا اثر فاکتور هوادهی بر تولید لاکاز مشخص شود. برای سنجش فعالیت، از روز سوم کشت، هر روز یک میلی لیتر از مایع رویی محیط کشت در شرایط آسپتیک برداشته شد و سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و بعد از ته‌نشینی اسپور قارچها، به محلول رویی ۱۰۰۰ واحد آنزیم کاتالاز افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد(۶). به هنگام سنجش آنزیمی هریک از جدایه‌ها به نمونه‌ها آنزیم کاتالاز افزوده شد تا احتمال وجود پراکسیدهیدروژن در نمونه مورد آزمایش از بین برود. میزان فعالیت آنزیمی هر سویه با روش سینیتیک و با استفاده از بافر سوکسینات با pH=۴/۵ به عنوان بافر واکنش، ABTS به عنوان سوبسترا با استفاده از اسپکتروفتومتر (Spocol 2000 آلمان) در طول موج ۴۳۶ نانومترسنجیده شد (شکل۱). قابل ذکر است که یک واحد فعالیت آنزیم لاکاز برابر است با اکسید شدن یک میکرومول ABTS در هر دقیقه که به صورت U/L بیان می‌شود (۱۳). سنجش آنزیمی برای هرنمونه قارچی بیش از ۳ بار تکرار شد.

فعالیت آنزیم (U/L)= ΔAbs./Δt 1/(ε d) ضریب رقت

(ضریب خاموشی) $\varepsilon = 48000\ mol^{-1}\ cm^{-1}$

(قطر کوت) d=1 cm

ضریب رقت (نهایی) =1500/1150 (حجم نمونه رقیق شده/ حجم)

$(U/L) = \Delta Abs./3\ min\ 1/(48000\ mol^{-1}\ cm^{-1}\ 1\ cm)$
$1500/1150\ 10^6\ \mu mol/mol$ (میزان فعالیت آنزیم) (۱۳)

شناسایی قارچها:.خصوصیات مورفولوژیکی تمام قارچها به روش کشت معمول قارچ بر روی پلیت انجام شد و خصوصیات کلنی قارچها به مدت یک هفته به طور روزانه بررسی شد. همچنین خصوصیات میکروسکوپی نیز در این دوره بررسی گردید و برای بررسی دقیق این خصوصیات از روش کشت روی لام استفاده شد. برای شناسایی مولکولی، جدایه‌های مورد بررسی در فلاسکهای ارلن مایر حاوی محیط MEB کشت و در شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰-۱۴ روز با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه گرماگذاری شدند. استخراج DNA طبق روش ویلند انجام شد(۱۷). در این روش حدود ۱- ۰/۵ گرم میسلیوم قارچ بعد ازقرارگرفتن در ازت مایع، با استفاده از هاون چینی به خوبی پودر شد. حدود یک گرم پودر حاصل را به میکروتیوبهای ۱/۵ میلی لیتری منتقل کرده و ۵۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (SDS ۵ درصد ۲۰ میلی لیتر، ۵۰۰ میلی مولار NaCl، ۱۰۰ میلی مولار Tris-HCl با ۸ =pH، ۵۰ میلی مولار EDTA با ۸ =pH و ۴۰ میلی لیتر آب دو بار تقطیر استریل) به آن افزوده شد تا به صورت سوسپانسیون درآید. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم نگهداری شدند و بعد از این نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه روی یخ قرار گرفته و هم حجم محتوی میکروتیوبها مخلوط اشباع بافری فنل-کلروفرم-ایزوآمیل الکل (به نسبت ۱:۲۴:۲۵) اضافه گردید و پس از به هم زدن به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز رویی به میکروتیوبهای جدید منتقل و دو تا سه برابر حجم آن کلروفرم-ایزوآمیل الکل (به نسبت ۱:۲۴) اضافه گردید. میکروتیوبها پس از هم زدن به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. فاز رویی به میکروتیوبهای جدید وارد و ۳/۴ حجم آن، ایزوپروپانول سرد اضافه گردید و به مدت یک ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد قرار گرفتند. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از حذف فاز رویی، رسوب DNA با اتانول ۷۰ درصد شستشو و در دمای اتاق نگهداری شد تا خشک شود. پس از خشک شدن کامل، ۵۰ تا ۸۰ میکرولیتر بافر TE (۱۰ میلی مولار Tris-HClبا ۸ =pH، یک میلی مولار EDTA با ۸ =pH) به آن اضافه گردید(۱۲). بافر حاوی DNA در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. کیفیت DNA نمونه‌ها به وسیله الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد. حضور تک باند شفاف با وزن مولکولی بالا، نشانه DNA سالم و بدون شکستگی تلقی گردید. بررسی میزان و غلظت DNA استخراج شده و خلوص آن از طریق نانودراپ انجام گرفت. میزان خلوص DNA در نمونه‌هایی که نسبت جذب آنها در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر مناسب در نظر گرفته شد که در محدوده ۱/۸ تا ۲ قرار داشت. جهت انجام آزمایشات مولکولی، غلظت DNA کلیه نمونه‌ها در حد ۲۵ ng/µl تنظیم گردید. DNA استخراج شده با واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) تکثیر شد. آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق دو آغازگر ITS5&4 بودند(۱۸)(جدول ۲). تکثیر DNA در واکنش ۲۵ میکرولیتری شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X PCR، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (غلظت نهایی ۰/۱۵ mM) ، ۲/۵ میکرولیتر dNTP (غلظت نهایی۰/۲۵mM)، ۱ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت(غلظت نهایی۵۰ ng)، ۲ میکرولیتر DNA ژنومی (غلظت نهایی۵ ng) و ۰/۳ میکرولیتر آنزیم تک پلیمراز (۱Unit)بود و واکنش با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Biorad آمریکا) انجام شد (جدول۳). برنامه حرارتی برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل مراحل: ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد ، ۳۰ سیکل با ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد ، ۱ دقیقه در ۵۵ درجه سانتی گراد ، ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد و مرحله گسترش نهایی با ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد بود(۳). محصول PCR به منظور تعیین ترادف به شرکت ژن فن آوران ارسال گردید. و سپس نتایج حاصل با استفاده از نرم افزار Blast درسایت GeneBank مورد بررسی قرار گرفت.

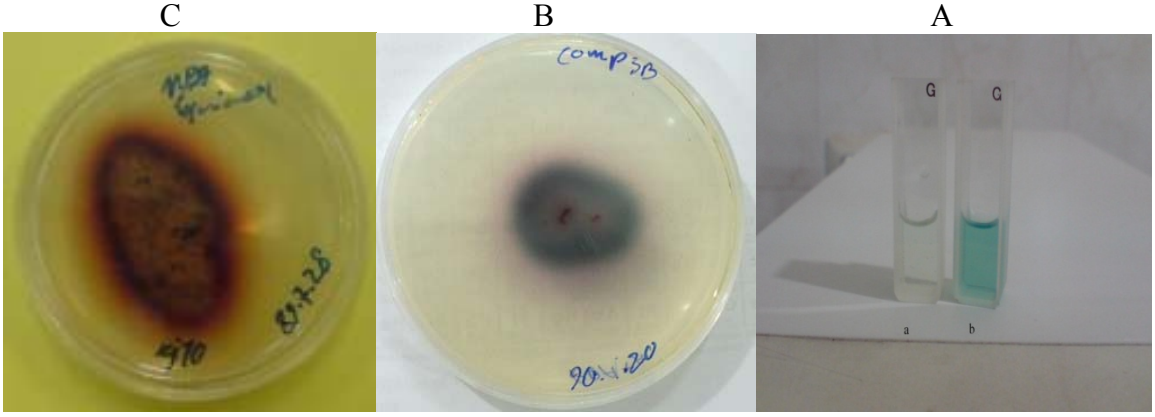
جدول۳ – مواد مورد استفاده در هر واکنش زنجیره ای پلی مراز برای تکثیر جدایه ها

محتوای میکروتیوب	میزان مورد استفاده
آب	۱۴ میکرولیتر
نوکلئوتیدهای تری فسفات (غلظت ۰/۲۵میلی مولار)	۲/۵میکرولیتر
پرایمر رفت (غلظت ۵۰ نانوگرم)	۱ میکرولیتر
پرایمر برگشت (غلظت ۵۰ نانوگرم)	۱ میکرولیتر
بافر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (۱۰X)	۵ میکرولیتر
کلرید منیزیم (۰/۱۵میلی مولار)	۱/۵ میکرولیتر
ژنوم (۵نانوگرم)	۲میکرولیتر
آنزیم تک پلیمراز (۱U)	۰/۳ میکرولیتر
حجم کلی	۲۵میکرولیتر

نتایج

از بین جدایه‌های مختلف قارچی جداسازی شده، ۲۲ جدایه قارچی با تولید هاله در اطراف کلونی قارچ در محیط کشت حاوی نشانگرها غربالگری شدند. ۲۰ جدایه توانایی تغییر رنگ در محیط کشت حاوی گویاکل را از خود نشان دادند و هاله‌ایی به رنگ قهوه‌ای در اطراف کلنی قارچ ایجاد شد و ۱۸ جدایه هاله سبز رنگ در محیط کشت حاوی ABTS ایجاد کردند.

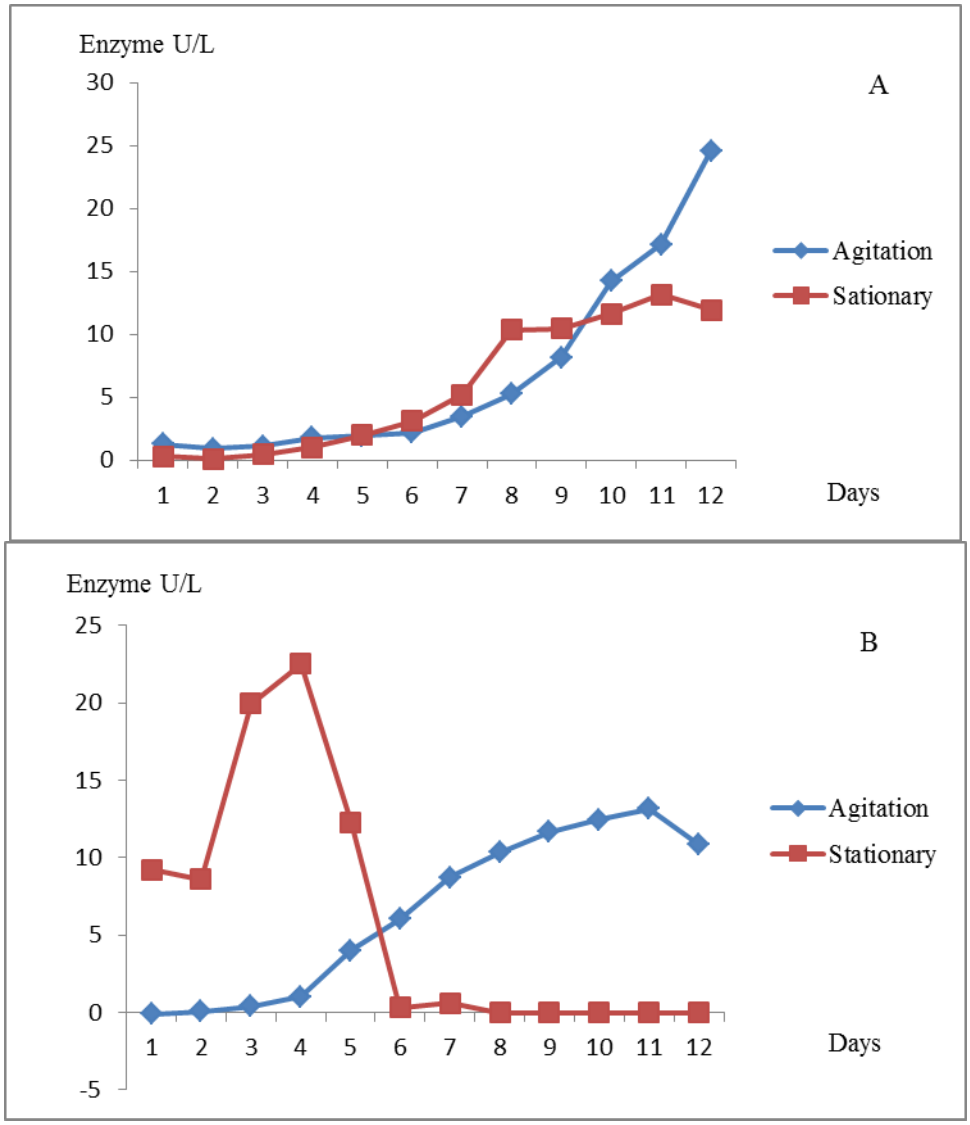
دو جدایه از بین جدایه های غربالگری شده براساس بیشترین میزان فعالیت آنزیمی بعد از سنجش کمی آنزیم انتخاب شدند. میزان فعالیت آنزیمی دو جدایه برتر در شرایط هوادهی و سکون طی ۱۲ روز در نمودارهای ۱ و ۲ آورده شده است. بیشترین میزان فعالیت لاکاز جدایه *Retroconis* sp در شرایط هوادهی ۲۴/۵۹ U/L بود در حالی که بیشترین میزان فعالیت لاکاز جدایه *Alternaria alternata* در شرایط سکون و به میزان۲۲/۵۲ U/L به دست آمد. دو جدایه برتر با تولید لاکاز بالا از خاک اطراف ریشه نیشکر مزارع نیشکر هفت تپه و نمونه باگاس جمع‌آوری شده از کشت و صنعت دعبل خزاعی جداسازی شدند.



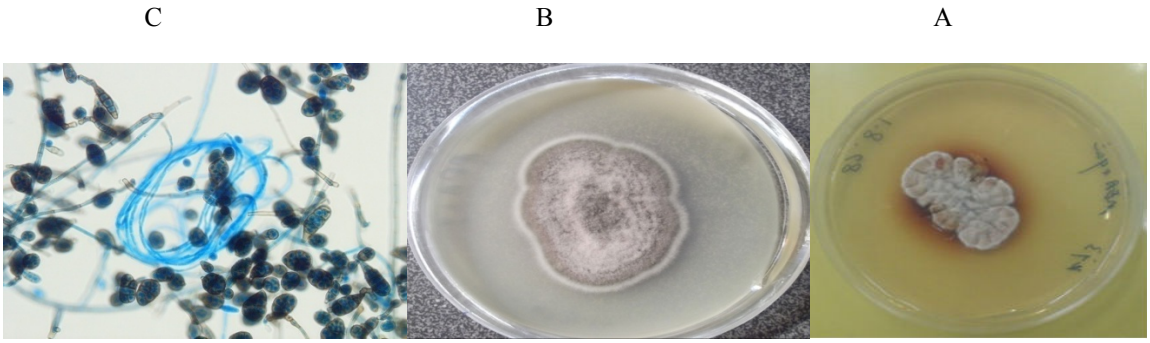
شکل ۱– تصویر A :سنجش آنزیمی نمونه قارچی a) نمونه شاهد b) نمونه بعد از اضافه کردن سوبسترا. تصویر B : تصویر غربالگری قارچها بر روی محیط کشت حاوی ABTS با تولید هاله سبز. رنگ تصویر C: تصویر غربالگری قارچها بر روی محیط کشت حاوی گایاکل با تولید هاله قهوه‌ایی

جدول۲– آغازگرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره ای پلی مراز برای تکثیر جدایه ها

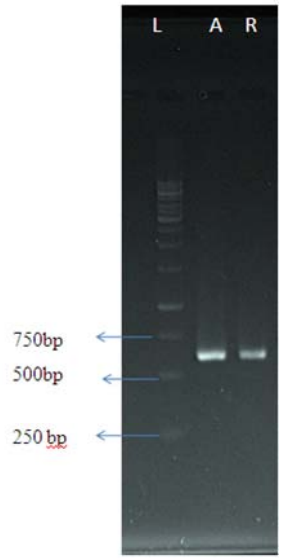
توالی جفت آغازگرITS5&4
ITS5: 5′-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3′
ITS4: 5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′



نمودار۱- نمودار فعالیت آنزیمی جدایه Ht2q در دو حالت سکون و هوادهی (A)، نمودار۲: نمودار فعالیت آنزیمی جدایه B4e در دو حالت سکون و هوادهی(B)



شکل۲- تصویر A: تصویر میکروسکوپی جدایه B4e، تصویر B: تصویر جدایه B4e بر روی پلیت، تصویر C: تصویر تصویر جدایه Ht2q بر روی پلیت



شکل۳- الکترفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز حاصل از تکثیر ژنومITS5&4 : از سمت چپ نوار Lمارکر یک کیلوباز، B: جدایه B4e(۵۶۰bp) ، H: جدایه Ht2q(۵۶۰bp)

نتایج بررسی خصوصیات مورفولوژیکی ازجمله خصوصیات ماکروسکوپی و میکروسکوپی این دو جدایه برتر نشان داد که جدایه B4e، دارای کلنی تیره که سطح آن حالت پنبه‌ایی روشن با کنیدیفور و کنیدی تیره، شکل کنیدی بیضوی و یا تخم مرغی شکل، انتهای کندیفور برآمده و ظاهر کلنی به دلیل وجود کنیدی شبکه مانند بود (شکل ۲)، جدایه Htq2، دارای کلنی کرم رنگ توده‌ای با حاشیه مضرس و فرو رفته در محیط کشت و کنیدی زیر میکروسکوپ نامشخص بود. برای شناسایی مولکولی جدایه ها، استخراج ژنوم قارچها به صورت دستی انجام شد و نتایج حاصل با الکتروفورز ژنوم این جدایه ها تأیید شد. همان طور که انتظار می‌رفت کل ژنوم یوکاریوتی سنگین بوده و در بالای ژل قرار گرفت و باندهای حاصل از استخراج ژنوم بالاتر از باند ۱۰ کیلوباز مارکر قرارگرفت. میزان جذب ژنوم استخراج شده از قارچها در طول موجهای ۲۶۰/۲۸۰ بین ۱/۸ تا ۲ بود. محصول واکنش PCR بر روی ژل آگارز الکتروفورز گردید که نتایج آن در (شکل۳) مشاهده می‌شود. نتایج حاصل از تعیین توالی محصول واکنش PCR جدایه های منتخب پس از بررسی با نرم‌افزار Blast و توالی تکثیر یافته دو جدایه با بانک ژنی مقایسه شد. سپس توالی قطعهITS1.5/8S.ITS 2 ژنوم جدایه-Ht2q در بانک ژنی با accession number JQ414022 و جدایه B4e باJQ414021 accession number ثبت شدند.

بحث

برای جداسازی وخالص‌سازی جدایه‌های قارچی با توجه منابع مورد استفاده از محیط مالت اکسترکت آگار استفاده شد و با توجه به شرایط اسیدی آن، این محیط برای جداسازی قارچهای مولد لاکاز مناسب می‌باشد(۱). از بین دو ترکیب آروماتیک که برای غربالگری قارچها استفاده شد، روشی که در آن محیط (MEA) حاوی ۰/۱ گرم ABTS بود، به عنوان بهترین محیط غربالگری انتخاب گردید، ABTS سوبسترای بسیار حساسی برای لاکاز محسوب می‌شود و تمامی قارچهای غربالگری شده‌ایی که با این روش هاله سبز ایجاد کردند، جزء تولیدکنندگان واقعی لاکاز بودند، زیرا ۱۰۰ درصد قارچهای غربالگری شده با ABTS به هنگام سنجش میزان کمی آنزیم، علی رغم افزودن آنزیم کاتالاز، فعالیت لاکازی داشتند. در حالی که ۲۲ درصد از قارچهایی که با گایاکل غربالگری شدند در زمان سنجش کمی آنزیم، بعد از افزودن آنزیم کاتالاز توانایی اکسید کردن سوبسترا را از دست دادند و تنها ۷۸ درصد باقیمانده این توانایی را حفظ کردند. در این تحقیق آنزیم کاتالاز به مخلوط واکنش قبل از سنجش کمی اضافه شد تا در صورت تولید آب اکسیژنه (حتی با میزان بسیار اندک) توسط قارچها، این ترکیب از مخلوط واکنش حذف شود. یکی از امتیازات آنزیم لاکاز به عنوان یک آنزیم اکسیداز نسبت به آنزیم منگنز پراکسیداز و دیگر آنزیمهای اکسیدکننده لیگنین، عدم نیاز این آنزیم به اکسیژن نوزاد جهت اکسیداسیون ترکیبات فنلی می‌باشد. در این تحقیق برای حذف قارچهایی که مولد دیگر اکسید کننده‌ها، از جمله منگنزپراکسیداز بودند آنزیم کاتالاز به محلول

سنجش افزوده شد که در نتیجه آن ۲۲درصد از قارچهای غربالگری شده با گایاکل حذف شدند.

در این تحقیق تعیین میزان سوبسترای آروماتیک در محیط کشت به صورت ابتکاری انجام شد و تاکنون هیچ گزارشی برای غربالگری تولیدکنندگان لاکاز با این میزان اندک سوبسترا وجود نداشته است. لو و همکاران (۲۰۰۵) با میزان ۰/۵۵ گرم در لیتر ABTS موفق به جداسازی ۲۳ سویه قارچی تولید کننده لاکاز از دریا شدند(۱۲). دهیوب و همکاران (۲۰۰۵) با میزان ۰/۳۵ گرم در لیتر ABTS موفق به جداسازی ۶ سویه تولید کننده لاکاز از مناطق جنگلی تانزانیا شدند (۶) ، اما در این تحقیق با میزان ۰/۱ گرم در لیتر از این سوبسترا، ۱۸ سویه قارچی از ۲۲ سویه غربالگری شده که همگی تولید کننده لاکاز بودند جداسازی شد. نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان می‌دهد که قارچهای غربالگری شده توانایی تولید میزان قابل توجهی از آنزیم لاکاز را داشتند همچنین توان ترشح لاکاز توسط این قارچها نیز بالا بوده است که این موضوع برای صنعتی شدن این میکروارگانیسم-ها حائز اهمیت می‌باشد.

مزایای استفاده از ABTS حساسیت بالای آن در ایجاد هاله و تغییر رنگ در هفته اول غربالگری در پلیتها می‌باشد. روش دیگر غربالگری استفاده از نشانگر گایاکل بود که یکی از روشهای متداول غربالگری تولیدکنندگان لاکاز می‌باشد، این تحقیق نشان داد که گایاکل به عنوان یکی از سوبستراهای لاکاز حساسیت کمتری نسبت به ABTS دارد. لاکاز آنزیمی است که در اثر هوادهی تولید آن تحریک می‌شود(۱۵). مشاهدات در این تحقیق حاکی از این بود که علی رغم نتایج دیگر تحقیقات به عمل آمده در سراسر دنیا، گاهی قارچهای تولید کننده لاکاز با توجه به خصوصیات فیزیولوژیک خود در اثر هوادهی رشد کندتری داشته و در نتیجه تولید این آنزیم در آنها پایین می‌آید و همیشه هوادهی باعث افزایش تولید لاکاز نمی‌شود. جدایه Ht2q به عنوان یک قارچ آسکومیست در شرایط هوادهی میزان بیشتری آنزیم لاکاز تولید کرد و هوادهی تأثیر مثبت بر تولید آنزیم داشت. اما در مورد جدایه B4e که این سویه نیز قارچ آسکومیست بود، بیشترین تولید لاکاز در شرایط سکون با میزان U/L ۲۲ به دست آمد. نتایج آزمایشات نشان داد، میزان تولید آنزیم به دلیل رشد بیش از اندازه جدایه B4e در شرایط سکون و تمام شدن مواد غذایی مورد نیاز، دوام چندانی نداشت، البته تولید آنزیم در شرایط هوادهی روند رو به رشدی داشت اما تولید نهایی در این شرایط کمتر از شرایط سکون بود و هوادهی تأثیر چندانی بر تولید آنزیم نداشت. تولید آنزیم در دیگر قارچهای غربالگری شده، نسبت به سویه‌های منتخب کمتر بود و در بعضی از جدایه‌ها تولید آنزیم حتی کمتر از ۱۲ روز دوام داشت. با استفاده از خصوصیات مورفولوژیکی، اکثر قارچهای رشته‌ای دست کم تا حد جنس قابل شناسایی می-باشند اما گاهی به دلیل تغییر شرایط زیست، قارچها به فازی از مراحل زیست خود وارد می‌شوند که شناسایی مورفولوژیک امکان پذیر نمی‌باشد، لذا برای شناسایی قارچها در این شرایط و همچنین برای شناسایی قارچهای تا حد گونه از ابزار مولکولی استفاده می‌شود. در این تحقیق با توجه به خصوصیات مورفولوژیک و ابزار مولکولی جدایه B4e بیشترین شباهت به گونه *Alternaria alternate* داشت اما در جدایه Ht2q که بیشترین شباهت را به جنس *Retroconis* داشت تنها از ابزار مولکولی برای شناسایی استفاده شد. هر دو جدایه قارچی *Retroconis.* sp. , *Alternaria alternate* از شاخه آسکومیستها بوده و جدایه *Alternaria alternate* یک قارچ پوسیدگی نرم محسوب می‌شود (۱۰ و۱۱). با توجه به منابع محیطی استفاده شده در این تحقیق امکان جداسازی قارچهای پوسیدگی نرم دور از انتظار نبود. تابنده و همکاران (۱۳۸۸) قارچهای تجزیه کننده باگاس را جداسازی کردند که این قارچها مولد مجموعه آنزیمی قادر به تجزیه باگاس بودند. در تحقیق مذکور جداسازی قارچهای مولد آنزیمهای تجزیه کننده لیگنین با تاکید بر منگنز پراکسیداز و لیگنین

پراکسیداز انجام گرفت(۲). اما در این تحقیق هر دو قارچ با داشتن آنزیم لاکاز از تجزیه کنندگان لیگنین می‌باشند. قارچ *Alternaria alternate* از نمونه باگاس و*Retroconis* sp از ریزوسفر نیشکر مزارع نیشکر هفت تپه جداسازی شد. تاکنون هیچ گزارشی مبنی بر تولید آنزیم لاکاز توسط قارچ *Retroconis* sp در منابع اطلاعاتی مشاهده نشده است (۴ و ۵).

منابع

۱- حمیدی مطلق، روح اله.، نحوی، ایرج.، امتیازی، گیتی.، قزلباش، غلامرضا.(۱۳۸۸).جداسازی و شناسایی مخمرهای تولید کننده اتانول از قند دی‌زایلوز. مجله زیست شناسی جلد ۲۲ شماره ۱.

۲- تابنده، فاطمه.، رعایایی اردکانی، محمد.، بمبئی، بیژن.، ملایی، منیر.، قاسمی، فهیمه.(۱۳۸۸) جداسازی و شناسایی قارچهای تجزیه کننده باگاس . مجله زیست شناسی جلد ۲۲ شماره ۳ .

3-Alaniz, S., Leon, M., Vicent, A., Garcia-Jimenez, J., Abad-Campos, P., and Armengol, J. (2007). Characterization of *Cylindrocarpon* Species Associated With Black Foot Disease of Grapevine in Spin. Plant disease. (9): 1187-1193.

4- Baldrian, P .(2005). Review: Fungal laccases occurrence and properties. 10.1111/j.1574-4976

5-Claus, H .(2004). Laccases: structure, reactions, distribution. Micron35:93-96.

6-Dhouib, A., Hamza, M., Zouari, H., Mechichi, T., Hmidi, R., Labat, M., Jesus. M. Martinez. and Sayadi,S.(2005). Screening for ligninolytic enzyme production by diverse fungi from Tunisia. World J. Microbiol & Biotechnol 21:1415–1423.

7-EI-Gammal, A.A.(1998). Biodegradation of lignocellulosic substances and production of sugars and lignin degradation intermediates by four selected microbial strains. Polymer Degradition.stab.61:535-542

8-Kiiskinen, L.-L., Ratto, M., and Kruuse, K.(2004).Screening for novel laccase-producing microbes. Appl Microbiol 97:640-646

9-Kirk, T.K. and Farrell, R.L.(1987).Enzymatic " combustion " :the microbial degradation of lignin. Annue. Rev. Microbial .41: 465-505.

10-Leonowicz, A., Cho, NS., Luterek, J., Wilkolazka, A., Wojtas-Wasilewska, M., Matuszewska, A., Hofrichter, M., Wesenberg, D and Rogalski, J. (2001). Review : Fungal laccase: properties and activity on lignin. J. Basic Microbiol. 41: 185–227.

11-Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J.,Ziegenhagen, D.,Wojtas-wasilewska, M., Cho, N. S., and Hofrichtr, M. (1999). Review; Biodegradation of lignin by White rot fungi. Fung. gen. Biol.77:175-185.

12-Luo, W., Vrijmoed, L.L.P., and Gareth Jones, E.B .(2005).Screening of marine fungi for lignocellulose-degrading enzyme activities. Botanical Marina 48: 379–386.

13-Niku-Paavola, M.L., Raaska, L.and Itvaara, M.(1990). Detection of white-rot fungi by a nontoxic strain. Mycol. Res.94 : 27–31.

14-Perez, J.(2005) .Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicelluloses and lignin: an overview.Int.Microbiol.5:53-63.

15-Safari,A., Emtiazi, G.and Hajrasuliha,S.(2006). Comparative studies of extracellular fungi laccase under different condition.J .Agric. Sci.Techol.9:69-76.

16-Solano, F.,Garcia, E.,Perez De Egea, E. and Sanchez-Amat, A.(1997) .Isolation and characterization of strain MMB-1(CECT 4803), a novel melanogenic marine bacterium. Appl and Environ Microbiol.63:3499-3506.

17-Weiland, J. J. (2002). Rapid procedure for the extraction of DNA from fungal spores and mycelia [On line]. Available: www.ars. usda. Gov / pandp/ pepole/ people.htm

18-White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. W. Taylor. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322 In: PCR Protocols.

19-Xu, F.(1996).Oxidation of phenol, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. Biochem. 35:7608-7614.

Isolation and identification of two laccase producer fungi from Bagasse and sugarcane rhizosphere

Sheikhi F.[1], Roayaee Ardakani M.[1], Enayati Zamir N.[2] and Ghezelbash Gh.R.[1]

[1] Microbiology Sec., Biology Dept., Faculty of Science, Shahid Chamran University, Ahwaz, I.R. of Iran

[2] Soil Biology Sec., Soil Sciences Dept., Faculty of Agriculturte, Shahid Chamran University, Ahwaz, I.R. of Iran

Abstract

Complex of enzymes in the name of Ligninase are involved in lignin degradation. Special properties of Laccase among the lignin degradation enzymes make them more important. Oxidation of wide range of substrates, high heat tolerance and acidic isoelectric pH are main properties of laccase. Identification of new microorganism with higher production and secretion laccase is very valuable. In this research, laccase producing fungi was isolated, screened and identified from Bagasse and sugarcane rhizosphere. In order to screen laccase producing strains malt extract agar medium containing $0.1gl^{-1}$ ABTS or $0.5mMl^{-1}$ Guaiacol was used. Laccase activity was determined as described by Niku-Paavola et al. In this study, among 22 fungi screened, *Alternaria alternata* and *Retroconis* sp isolates were identified with the highest laccase production. Two species were identified using PCR amplification and sequencing of the internal transcribed spacer 'ITS'regions of the ribosomal DNA and by basic morphology. In this research laccase activity has been determined in agitation and stationary state. These results showed that agitation and stationary conditions had different effects on laccase production rate of these isolates.

Key words: Laccase, Bagasse, Sugarcane rhizosphere, *Alternaria alternate, Retroconis* sp