تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی گیاه سیاهدانه تحت سطوح مختلف ورمی‌کمپوست می‌باشد. تیمارهای آزمایش شامل غلظت‌های ۰، ۲۵، ۵۰ و ۷۵٪ از ورمی-کمپوست بود که به نسبت حجمی با خاک مخلوط شدند. بعد از مرحله گلدهی، بذرها و ساقه گیاه جمع‌آوری شدند و پتانسیل آنتی‌اکسیدانتی و قدرت پاکسازی رادیکال بوسیله روش سنجش DPPH اندازه گیری شد همچنین میزان حضور ترکیبات فنولیک در بذر و ساقه گیاه اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که بالاترین میزان ترکیبات فنولیک و بالاترین قدرت پاکسازی رادیکال آزاد در تیمار ۲۵٪ ورمی‌کمپوست یافت شد. بنابراین آزادسازی کند و تدریجی مواد مغذی از ورمی‌کمپوست باعث افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانتی وترکیبات فنولیک می‌گردد.

واژگان کلیدی:سیاهدانه، ورمی‌کمپوست، ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی، DPPH

کنترل بیولوژیک Sclerotinia sclerotiorum با استفاده از باکتری بومی Bacillus licheniformis RBA 08 جدا شده از چشمه‌های آب شمال کشور

کوثر رحیم زاده*[۱]، سعید ملک زاده شفارودی [۱]، رضا بهروزی[۲]، کامبیز اکبری نوقابی[۲]

گروه مهندسی کشاورزی، بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران

موسسه ملی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

kosarrahimzadeh@yahoo.com

قارچ Sclerotina sclerotinum از مهم‌ترین پاتوژن‌های خاکزی می‌باشد که عامل بیماری پوسیدگی ساقه و ریشه در دامنه میزبانی وسیعی می‌باشد. با هدف به دست آوردن سویه‌ای با تولید بالای آنزیم کیتیناز علیه قارچ مذکور، غربالگری در میان باکتری‌های مولد این آنزیم از چشمه‌های آب در شمال غرب کشور صورت گرفت و باکتری مطلوب انتخاب گردید. با استفاده از روش هم‌کشتی باکتری با قارچ مورد نظر و اندازه گیری قطر ناحیه ممانعت از رشد، سویه Bascillus licheniformis RBA 08 توانست درشرایط آزمایشگاه با میزان بازدارندگی ۷۷ درصد از فعالیت قارچ جلوگیری کند. بررسی‌های میکروسکوپی نشان داد باکتری توانسته است از رشد هیف‌های قارچ جلوگیری کند و باعث تغییر شکل و رنگ هیف‌های آن شود. در ادامه با استفاده از الگوی SDS- page وزن مولکولی آنزیم ۷۰ کیلو دالتون تخمین زده شد که دارای مقاومت نسبی به دماهای بالا بود. باکتری‌ها به دلیل ترشح آنزیم‌های کیتینازی تجزیه کننده دیواره سلولی قارچ‌ها به عنوان عاملی قوی در کنترل بیولوژیک قارچ‌های بیماری‌زا مورد استفاده قرار می‌گیرند. اکثر پاتوژن‌های دارای کیتین در دیواره نسبت به کیتینازهای حاصل از باکتری‌ها حساس بوده و در عین حال غلظت‌های بالای این آنزیم‌ها برای گیاهان و محیط زیست، اثرات سمی ندارد.

واژگان کلیدی:Bascillus licheniformis، Sclerotina sclerotinum ، بیوکنترل، کیتیناز.

معرفی گونه های تریکودرما با قابلیت آنزیم اندوگلوکانازی در خاک‌های جنگلی بومی ایران

الناز باقری، احمدرضا بهرامی ، منصور مشرقی، مریم مقدم متین ، حمید روحانی، شبنم شمعریز

دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

استاد گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

Elnaz.bagheri1986@gmail.com

سلولز یکی از مهمترین ترکیبات توده زیستی گیاهی است. تعدادی از میکروارگانیسم ها از جمله قارچ ها توانایی تولید سلولاز و تجزیه توده زیستی را دارند. تریکودرما یکی از قارچ های آسکومیست مزوفیل است که به طور گسترده در صنعت به عنوان منبع تولید سلولاز مورد استفاده قرار می گیرد. سیستم سلولیتیک تریکودرما از دو نوع سلوبیوهیدرولاز و حداقل پنج نوع اندوگلوکاناز تشکیل شده است. برای جدا کردن وشناسایی گونه های مختلف تریکودرمای ایران ، از هفت منطقه متفاوت از خاک جنگل های شمال نمونه گیری صورت گرفت. سپس روی محیط کشت اختصاصی الاد و چت (Elad and chet)، کشت انجام شد. پس از مشاهده کلنی ها، خالص سازی و تک اسپور کردن آنها صورت گرفت. در مرحله بعد شناسایی مورفولوژیکی قارچ های جدا سازی شده انجام شده و فعالیت سلولازی آنها به کمک FPase (filter paper assay) بررسی گردید. نتایج در این گزارش آورده خواهد شد.

واژگان کلیدی:تریکودرما، اندوگلوکاناز، محیط کشت اختصاصی الاد و چت، filter paper assay، سلولاز

جداسازی و شناسایی ملکولی قارچ‌های گرمادوست سلولولیتیک از کود حیوانی و بررسی فعالیت سلولازی آنها

شبنم شمعریز، مریم مقدم متین، منصور مشرقی، احمدرضا بهرامی، حمید روحانی، الناز باقری ازغدی

دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

استاد گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

Shamriz.shbm@gmail.com

لیگنوسلولز ماده آلی تجزیه‌پذیری است که جزء ساختاری اصلی تمام گیاهان می‌باشد. در طبیعت تجزیه توده‌زیستی لیگنوسلولزی توسط میکروارگانیسم‌هایی مانند قارچ‌ها و باکتری‌ها که قادر به تجزیه این ترکیبات هستند صورت می‌گیرد. قارچ‌ها با تولید آنزیم‌های لیگنوسلولولیتیک مختلف نقش بسیار مهمی در تجزیه بقایای سلولزی در طبیعت دارند. تاکنون بیش از ۱۴۰۰۰ گونه قارچی مختلف قادر به تجزیه سلولز جداسازی شده‌اند، اما تنها تعداد کمی از آنها مورد مطالعه دقیق قرار گرفته‌اند. هدف این مطالعه جداسازی و شناسایی ملکولی قارچ‌های گرمادوست سلولولیتیک از کود حیوانی و بررسی فعالیت سلولازی آنها است. از کود حیوانی مرطوب در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد نمونه‌گیری انجام شد. رقت‌های مختلف از نمونه کود مورد نظر تهیه و بر روی محیط کشت اختصاصی سلولز کشت و در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. پس از حدود یک هفته کلنی‌هایی روی پلیت‌ها ظاهر گردیدند که روی محیط کشت عمومی PDA واکشت داده شدند. سپس تک اسپور کردن کلنی‌های خالص‌سازی شده صورت گرفت تا قارچ‌هایی خالص و حاصل از یک اسپور به دست آیند. به منظور شناسایی قارچ‌های جداسازی شده بررسی مورفولوژیکی صورت گرفت. در آخر فعالیت سلولازی به روش Filter Paper Activity (FPase) Assay مورد بررسی قرار گرفت که نتایج در این گزارش آورده خواهد شد.

واژگان کلیدی:قارچ‌های گرمادوست سلولولیتیک، محیط اختصاصی سلولز، Filter Paper Activity (FPase) Assay، سلولاز

معرفی گونه های تریکودرما با قابلیت آنزیم اندوگلوکانازی در خاک‌های جنگلی بومی ایران

الناز باقری ازغدی*[۱]، احمدرضا بهرامی[۱،۲]، منصور مشرقی[۱]،مریم مقدم متین[۱،۲]، حمید روحانی[۳]، شبنم شمعریز[۱]

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد
۲- گروه پژوهشی سلولی و ملکولی،پژوهشکده فناوری زیستی دانشگاه فردوسی
۳- گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

Elnaz.bagheri1986@gmail.com

سلولز یکی از مهمترین ترکیبات توده زیستی گیاهی است. تعدادی از میکروارگانیسم ها از جمله قارچ ها توانایی تولید سلولاز و تجزیه توده زیستی را دارند. تریکودرما یکی از قارچ های آسکومیست مزوفیل است که به طور گسترده در صنعت به عنوان منبع تولید سلولاز مورد استفاده قرار می گیرد. سیستم سلولیتیک تریکودرما از دو نوع سلوبیوهیدرولاز و حداقل پنج نوع اندوگلوکاناز تشکیل شده است. برای جدا کردن وشناسایی گونه های مختلف تریکودرمای ایران ، از هفت منطقه متفاوت از خاک جنگل های شمال نمونه گیری صورت گرفت. سپس روی محیط کشت اختصاصی الاد و چت (Elad and chet)، کشت انجام شد. پس از مشاهده کلنی ها، خالص سازی و تک اسپور کردن آنها صورت گرفت. در مرحله بعد شناسایی مورفولوژیکی قارچ های جدا سازی شده انجام شده و فعالیت سلولازی آنها به کمک FPase (filter paper assay) بررسی گردید. نتایج در این گزارش آورده خواهد شد.

واژگان کلیدی: تریکودرما، اندوگلوکاناز، محیط کشت اختصاصی الاد و چت، filter paper assay، سلولاز

مقدمه

قسمت اعظم دیواره سلولی گیاهان عالی از سلولز تشکیل میشود. در دیواره سلولی گیاهان، سلولز در زمینه ای از پلی ساکاریدهای دیگر از جمله همی سلولز، لیگنین و پکتین قرار دارد که موجب دسترسی کمتر آنزیم های تجزیه کننده به آن می شود.(Beguin,1990) لیگنین یک ترکیب مقاوم برای حمله میکروارگانیسم‌هاست، بنابراین دسترسی میکروارگانیسم‌ها را به سلولز محدود می‌کند (Cullen, 1997).سلولز علاوه بر دیواره سلول گیاهان ، در جلبکها، برخی از پروتوزئرها نیز وجود دارد.

سلولز پلیمری خطی از واحد های گلوکز با پیوندهای بتا ۱ به ۴ می باشد که هیدرولیز آن به دو روش شیمیایی و آنزیمی صورت می گیرد. هیدرولیز شیمیایی توسط اسیدها و هیدرولیز آنزیمی توسط آنزیم های سلولازی انجام می شود. با توجه به مشکلات هیدرولیز اسیدی سلولز، محققان توجه بیشتری به هیدرولیز آنزیمی نموده اند.محصولات هیدرولیز سلولز معمولا قندهای احیایی به شکل گلوکز می باشد.مزیت هیدرولیز آنزیمی سلولز نسبت به روش های هیدرولیز اسیدی، پایین بودن هزینه های آن می باشد زیرا هیدرولیز آنزیمی در شرایط ملایم یعنی pH ۴.۸، و دمای ۵۰ درجه سانتیگراد انجام می شود . (Bhat,2000)

سلولازها، گلیکوزیل هیدرولازهایی هستند که می‌توانند پیوند بتا ۱-۴ سلولزی را بشکنند. کمپلکس این آنزیم به ۳ گروه مهم که شامل اندوگلوکانازها، سلوبیوهیدرولازها و β -گلیکوزیدازها هستند تقسیم می‌شود (Romero, 1999). اتصال گلیکوزیلاسیون N و اتصال گلیکوزیلاسیون O باعث افزایش تمایل سلولاز به سلولز و پایداری سلولاز می‌شود. دومین‌های گلیکوزیله شده تقریباً نیمی از توالی سلولاز را تشکیل می‌دهند که کاملاً تصادفی گلیکوزیله می شوند (Zhou and Ying, 2002).

قارچ‌هایی مانند تریکودرما و آسپارژیلوس مقادیر بالایی از آنزیم‌های سلولیتیک خارج سلولی ترشح می‌کنند. این در حالی است که باکتری‌ها و بعضی از قارچ‌ها آنزیم‌های سلولیتیکی را به صورت کمپلکسی که سلولوزوم نامیده می‌شود و به دیواره سلولی متصل است ، تولید می‌کنند (Dashtban et al., 2009). اولین بار کمپلکس سلولوزوم در باکتری کلستردیوم ترموسلوم مشاهده شد (Gilbert, 2007).

اتصال گلیکوزیلاسیون N و اتصال گلیکوزیلاسیون O باعث افزایش تمایل سلولاز به سلولز و پایداری سلولاز می‌شود. دومین‌های گلیکوزیله شده تقریباً نیمی از توالی سلولاز را تشکیل می‌دهند که کاملاً تصادفی گلیکوزیله می شوند (Zhou and Ying, 2002).

تریکودرما یکی از قارچ‌های آسکومیست مزوفیل با خاصیت پوسیدگی نرم است که به طور گسترده در صنعت به عنوان منبع تولید سلولاز و همی‌سلولاز برای هیدرولیز دیواره سلول گیاهان استفاده می‌شود. این قارچ مناسب برای تولید آنزیم‌های صنعتی و مدل مهم برای مطالعات تجزیه لیگنوسلولزی است (Diego and Los, 2006). سیستم سلولیتیک تریکودرما از ۲ نوع سلوبیوهیدرولاز CBHI، CBHII و حداقل ۵ نوع EGI، EGII، EGIII، EGIV و EGV تشکیل شده است (Saloheimo et al., 1997) . از دست دادن EGIII باعث کاهش فعالیت اندوگلوکانازی تا ٪۵۵، در حالیکه از دست دادن EGI باعث کاهش فعالیت اندوگلوکانازی تا ٪۲۵ می‌شود (Suominen et al., 1993).بنابراین EGIII از مهمترین تولیدکنندگان اندوگلوکاناز در *T.reesie* می‌باشد. EGI حاصل از *T.reesei* ٪۵ تا ٪۱۰ از پروتئین‌های ترشحی را شامل می‌شود.EGII سلولاز خالص شده حاصل از *T.ressei* باعث از بین بردن رنگ از

پارچه‌های کتانی و سنگ‌شویی موثر بدون آسیب به سطح پارچه می‌شود. اندوگلوکاناز همچنین در تجزیه β گلوکان موجود در مواد غذایی مؤثر است، تجزیه β گلوکان باعث کاهش ویسکوزیته محتوای روده‌ای و بهبود کیفیت غذا می‌شود (Miettinen-Oinonen et al., 2002).

به دلیل افزایش قیمت نفت خام، کاهش ذخایر نفتی آلودگی هوا و گرم شدن زمین، استفاده از توده‌زیستی گیاهان به عنوان منبع کربن مورد توجه زیادی قرار گرفته است. زائدات کشاورزی، علف‌ها، چوب‌ها و سایر زائدات جامد سلولزی منابع قابل تجدیدی هستند که به طور قابل توجهی در تولید سوخت زیستی نقش دارند.گرچه جایگزینی اتانول سلولیتیکی بجای گازوئیل باعث کاهش گازهای گلخانه‌ای در اتمسفر و کاهش گرم شدن جهان می‌شود اما هزینه هیدرولیز پلی‌ساکاریدهای توده زیستی به قندهای قابل تخمیر بالا ا ست و بنابراین قبل از تجاری‌سازی تولید اتانول باید بر این مشکل غلبه کرد. یکی از راههای غلبه بر این مشکل فراهم آوردن منابع ارزان‌تری از انرژی است (Demain et al., 2005).سلولز فراوان ترین ماده آلی قابل قابل تجزیه می باشد .از موارد عمده استفاده از مواد سلولزی، تولید الکل و گلوکز با استفاده از آنزیم های سلولازی می باشد.الکل به عنوان منبع انرژی و ماده اولیه در تهیه برخی از موارد آلی با مصارف دارویی و بهداشتی مورد استفاده قرار می گیرد. (Schulein,2000)

مواد و روش‌ها

از هفت منطقه متفاوت از خاک جنگل هاای شمال نمونه گیری صورت گرفت. ۳۰ گرم از نمونه هر خاک در ۷۰ میلی لیتر آب ریخته شد و به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۱۵۰ rpm تکان داده شد. پس از صاف کردن نمونه ها با کاغذ صافی،آنها را بر روی محیط اختصاصی تریکودرما (Elad&Chet) کشت و در دمای ۱۵ و ۳۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.پس از حدود یک هفته کلنی‌های ظاهر شده روی پلیت‌ها روی محیط کشت عمومی potato dextrose agar خالص-سازی شدند. سپس تک اسپور کردن کلنی‌های خالص‌سازی شده صورت گرفت تا قارچهایی خالص و حاصل از یک اسپور به دست آیند.قارچ های تک اسپور شده روی محیط اختصاصی جامد سلولز (Epping & pugh 1986) کشت داده شدند و در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

برای بدست آوردن پروتئین‌های ترشحی حاوی آنزیم سلولاز قارچ‌های جداسازی شده در ارلن‌های ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت مایع (Epping & Pugh 1962) واجد سلولز بعنوان منبع کربن تلقیح و سپس محیط کشت‌ها به انکوباتور منتقل و در حالت همزن و دمای ۳۰ درجه سانتی گراد تنظیم گردید. نمونه‌برداری در فواصل منظم ۴۸ ساعت انجام و با استفاده از کاغذ صافی استریل، محیط کشت از صافی عبور داده شد. محلول صاف شده بعنوان محلول حاوی آنزیم های سلولاز ترشحی استفاده گردید. برای سنجش فعالیت آنزیمی به یک میلی لیتر محلول ۰/۷ درصد سلولز ۵۰۰ میکرولیتر نمونه آنزیمی و ۵۰۰ میکرولیتر بافر سیترات ۰/۰۵ مولار اضافه شد. مخلوط یک ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد انکوبه و برای توقف واکنش آنزیمی ۲ میلی لیتر معرف دی نیترو سالیسیلیک اسید به آن اضافه گردید.سپس نمونه‌ها ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار داده شدند تا در اثر احیا معرف توسط قند احیا شده (گلوکز)، تغییر رنگ معرف از زرد به قرمزانجام پذیرد. برای پایداری رنگ معرف یک میلی لیتر محلول تارتارات مضاعف سدیم پتاسیم ۴۰ در صد به آن اضافه و جذب نوری آنها در طول موج ۵۵۰ نانومترخوانده شد. در این آزمایش از گلوکز بعنوان استاندارد استفاده گردید

نتایج و بحث

از نمونه خاک جنگل های شمال ۵ گونه قارچ تریکودرما شامل T.viridae , T.virens , T .longibrachatum , T.reesei و T.harizanum در طول این تحقیق جدا سازی و شناسایی شد.

قارچ های شناسایی شده توانایی رشد روی محیط کشت اختصاصی جامد و مایع سلولز را داشتند ،بنابراین قارچ های فوق دارای فعالیت سلولازی بهینه هستند. میزان فعالیت سلولازی متعاقبا اعلام خواهد شد.

منابع

Cullen, D. (1997). Recent advances on the molecular genetics of ligninolytic fungi. *Biotechnol* 53:: 273–289.

Bhat M.K. (2000).Cellulase and related enzyme in biotechnology. Biotechnology advances 18,355-383

Dashtban, M., Schraft, H. &Qin, W., 2009. Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspective . *International Journal of Biological Sciences* 5(6): 578-595

Demain, A., Newcomb, M. &JH, W. (2005). Cellulase, clostridia, and ethanol. *Microbiol Mol Biol* 69: 124–154.

Gilbert, H. J. (2007). Cellulosomes: microbial nanomachines that display plasticity in quaternary structure.Mol.

Miettinen-Oinonen, A., Suominen, P. &Ltd, P. (2002). Enhanced Production of Trichoderma reesei Endoglucanases and Use of the New Cellulase Preparations in Producing the Stonewashed Effect on Denim Fabric applied and environmrntal microbiology: 3956-3964

Romero, M. D. (1999). Cellulase production by Neurospora crassa on wheat straw. *Enzyme Microb* 25: 244-250.

Saloheimo, M., Nakari.T., Seta, l ,.Tenkanen.M. &Penttila.M (1997). cDNA cloning of a Trichoderma reesei cellulase and demonstration of endoglucanase activity by expression in yeast. *Biochem* 249: 584–591.

Schulein,M.(2000).Protein engineering of cellulose.Biochemica et Biophysica Acta 239-252

Suominen, P., Ma¨ntyla, T., Karhunen.T.,, Hakola, S. &Nevalainen.H (1993). High frequency one-step gene replacement in Trichoderma reesei. II.Effects of deletions of individual cellulase genes. *Gen Genet* 241: 523–530.

Zhou, F. &Ying, x. (2002). Large-Scale Analyses of Glycosylation in Cellulases. *Department of Biochemistry and Molecular Biology* 75.