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

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

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

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

مقدمه

طی میلیون‌ها سال پیش کربن اتمسفری از طریق فرآیندی بنام فتوسنتز بوسیله گیاهان جذب و با گذشت زمان به نفت خام و ذغال سنگ تبدیل شده است. اما از زمان انقلاب صنعتی بخش زیادی از این منابع انرژی مصرف گردیده و باعث آزاد سازی مقدار زیادی کربن به اتمسفر شده است. با افزایش رو به رو رشد نیاز به انرژی و کاهش منابع انرژی، استفاده از توده‌زیستی لیگنوسلولزی برای تولید سوخت زیستی بعنوان یک منبع تمیز و قابل تجدید مدنظر قرار گرفته‌است (۱). لیگنوسلولز ماده آلی تجزیه‌پذیری است که جزء ساختاری اصلی تمام گیاهان می‌باشد. این توده‌زیستی متشکل از سه پلیمر سلولز، همی‌سلولز و لیگنین است که با نیروهای کووالان و پیوندهای تقاطعی کووالان به‌طور محکم به یکدیگر متصل شده‌اند (۸). سلولز جزء اصلی دیواره سلولی گیاهی و فراوان‌ترین ملکول آلی روی کره زمین، پلیمر خطی از واحدهای D-گلوکز است که با پیوندهای گلیکوزیدی بتا ۱-۴ بهم متصل شده‌اند (۶). در طبیعت تجزیه توده‌زیستی لیگنوسلولزی توسط میکروارگانیسم‌هایی مانند قارچ‌ها و باکتری‌ها که قادر به تجزیه این ترکیبات هستند آغاز می‌شود .تمام این ارگانیسم‌ها آنزیم‌های هیدرولیتیک مختلفی تولید می‌کنند که بر یکدیگر تاثیر هم‌افزایی دارند و به‌طور کلی سلولازها نامیده می‌شوند (۱۰). قارچ‌ها با تولید آنزیم‌های لیگنوسلولولیتیک مختلف نقش بسیار مهمی در تجزیه بقایای سلولزی در طبیعت دارند. این قارچ‌ها شامل گونه‌هایی از آسکومیست‌ها (برای مثال *Trichoderma reesei*)، بازیدیومایست‌ها شامل قارچ‌های پوسیدگی سفید (برای مثال *Phanerochaete chrysosporium*) و قارچ‌های پوسیدگی قهوه‌ای (برای مثال *Fomitopsis palustris*) و در آخر برخی گونه‌های بی‌هوازی (برای مثال *Orpinomyces sp.*) هستند (۱). تا به حال تلاش‌های زیادی در جهت تبدیل حجم بالای توده‌زیستی به محصولات با ارزش مانند سوخت زیستی، مواد شیمیایی، غذای حیوانات و... انجام شده‌است (۳). از نظر تئوری این امر امکان‌پذیر است اما از دیدگاه تکنولوژی به دلیل نقص‌های مختلف موجود در تکنولوژی یک کار ساده نیست (۴). ریخت‌شناسی پیچیده و ساختار بلورین توده‌زیستی لیگنوسلولزی یکی از مشکلات اصلی در فرآیندهای تجزیه و تبدیل زیستی است (۹). روش‌های بیوتکنولوژیکی مختلفی بکار گرفته شده‌اند تا فرآیندهای تجزیه و تبدیل تا حد ممکن از نظر صنعتی بهینه و مقرون به صرفه گردند اما تاکنون موفقیت زیادی حاصل نشده‌است (۴). در سال ۲۰۰۵ Bower و همکارانش اندوگلوکاناز را از *Acidothermus cellulolyticus* به سلوبیوهیدرولاز *Trichoderma reesei* متصل کردند. این پروتئین کایمر در *T. reesei* بیان گردید. نتایج نشان دادند که این آنزیم سلولولیتیک با دو عملکرد اندو و اگزوگلوکانازی باعث بهبود فعالیت ساکاریفیکاسیون (قندزدایی) می‌شود (۲). در سال ۲۰۱۰ Li و همکارانش با ایجاد جهش در *Trichoderma viride* با استفاده از اشعه ماوراء بنفش و ماکروویو ۷ سویه جهش‌یافته بدست آوردند. جستجوی سویه‌های برتر به کمک کربوکسی متیل سلولز سدیم و قرمز کنگو نشان داد که در ۵ تا از این ۷ سویه تولید آنزیم‌های سلولازی نسبت به سویه نرمال افزایش یافته‌است (۵).

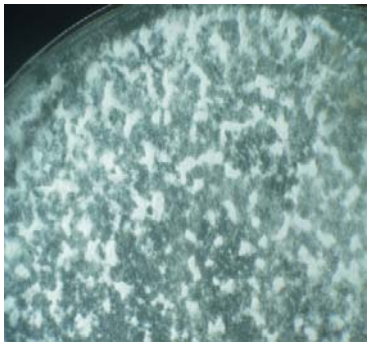
مواد و روش‌ها

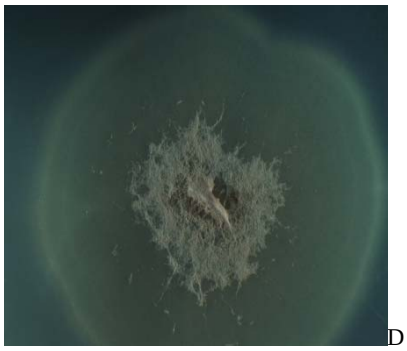
از کود حیوانی مرطوب در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد نمونه‌گیری انجام شد. ۱۰ گرم از نمونه کود در ۹۰ میلی لیتر آب ریخته شد و به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۱۵۰ rpm تکان داده شد. سپس رقت‌های مختلف از نمونه کود مورد نظر تهیه و بر روی محیط کشت اختصاصی سلولز (Epping & Pugh 1962) کشت و در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. پس از حدود یک هفته کلنی‌های ظاهر شده روی پلیت‌ها روی محیط کشت عمومی potato dextrose agar خالص‌سازی شدند. سپس تک اسپور کردن کلنی‌های خالص‌سازی شده صورت گرفت تا قارچهایی خالص و حاصل از یک اسپور به دست آیند. 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 ۵۰ درجه سانتی گراد تنظیم گردید. نمونه‌برداری در فواصل منظم انجام و با استفاده از کاغذ صافی استریل، محیط کشت از صافی عبور داده شد. محلول صاف شده بعنوان محلول حاوی پروتئین‌های 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

چهار قارچ ترموفیل از نمونه کود حیوانی جداسازی گردید که بررسی‌ها نشان دادند از لحاظ مورفولوژیکی با یکدیگر متفاوت هستند. از نظر فعالیت سلولازی قارچ A از سایرین فعال‌تر است. در نتیجه می‌توان شرایط محیطی این قارچ را بهینه‌سازی کرد تا میزان تولید سلولاز آن افزایش یابد. همچنین می‌توان آن را از لحاظ ملکولی مورد مطالعه قرار داد.

B


A


D

C

تقدیر و تشکر

از تمام عزیزانی که در تهیه‌ی تمامی مراحل این مقاله مرا یاری نموده‌اند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایم.

منابع

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

Bower, B., Larenas, E. &Mitchinson, C., 2005. Exo-endo cellulase fusion protein. *Patent WO2005093073.*

Han, W. & He, M., 2010. The application of exogenous cellulase to improve soil fertility and plant growth due to acceleration of straw decomposition. *Bioresource Technology* 101: 3724-3731.

Kumar, R., Singh, S. &Singh, V., 2008. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *Industrial Microbiology and Biotechnology* 35: 377–391.

Li, X.-H., Yanga, H. J., Roy, B., Park, E. Y., Jiang, L.-J., Wang, D. &Miao, Y.-G., 2010. Enhanced cellulase production of the Trichoderma viride mutated by microwave and ultraviolet. *Microbiological Research* 165: 190-198.

Liu, D., Zhang, R., Yang, X., Xu, Y., Tang, Z., Tian, W. &Shen, Q., 2011. Expression, purification and characterization of two thermostable endoglucanases cloned from a lignocellulosic decomposing fungi Aspergillus fumigatus Z5 isolated from compost. *Protein Expression and Purification* 79: 176–186.

Sanchez, C., 2009. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology advances*.1873-1899.

Sun, Y. & Cheng, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology* 83: 1-11.

Zhou, S. &Ingram, L. O., 2001. Simultaneous saccharification and fermentation of amorphous cellulose to ethanol by recombinant Klebsiella oxytoca SZ21 without supplemental cellulase. *Biotechnology Letters*: 1455–1462