Isolation and screening of facultative halophilic fungi producing industrial enzymes from Tehran Forest parks

Larypoor M.[1*], Kargar faragheh E.[2], Movahedi M.[3]

1. Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch, mlarypoor@iau-tnb.ac.ir

2. Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch

3. Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch

Abstract

Aim and Background: Facultative halophilic saprophytic fungi, can produce high amounts of extracellular enzymes with industrial consumption, due to their ease of cultivation, and endurance of severe conditions. In this study, it has been attempted to Assay of enzymatic activity of facultative halophilic fungi from Tehran Forest Parks.

Materials and methods: So sampling of soil and air of forest park of Tehran, saprophytes are been identified by the use of microscopic technique and slide culture. Then, the fungi separated were examined qualitatively regarding enzyme activity, and most strains were produced pectinase, lipase, protease, and amylase enzymes. Penicillium halotolerant and E01, E03, E014 strains produced invertase. And only the E13strain produced cellulase.So the enzyme activity of pectinase (via examining the enzyme produced in the media with pectin from pug) in a strain containing the enzyme. In the end stage, the best of enzyme produced strain are been identification to PCR technique and drawn phylogeny tree.

Results: Most separated fungi were Aspergillus sp., Penicillium sp., Fusarium sp., Mucor sp., and Rhizopus sp. from among the fungi separated and identified, 19 isolates were considered for producing extracellular enzymes and were identified using molecular methods, such as Fusarium sublunatum, Aspergillus subramanianii, Penicillium hallotolerans, Mucor circinelloides, and Purpureocillium lilacinum. Cladosporium sp., Penicillium halotolerans strains showed the most activity (with activities of 0.71, and 0.79 U/mL).

Conclusion: Cladosporium sp, and Penicillium halotolerans due to being cultivated on inexpensive substrates and easy enzyme extraction from the culture media, can be used for industrial enzyme production.

Keywords: Pectinase, Fungi, forest park, halophil

جداسازی وغربال گری قارچ های هالوفیل اختیاری تولید کننده آنزیم های صنعتی از پارک های جنگلی تهران

محدثه لاری پور[1*]، انسیه کارگرفراغه[2]، منیره موحدی[3]

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

۲. گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

۳. گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاداسلامی واحد تهران شمال

چکیده

سابقه وهدف: قارچ های ساپروفیت هالوفیل اختیاری به دلیل سهولت در کشت و تحمل شرایط سخت می توانند مقادیر زیادی آنزیم خارج سلولی را با مصرف صنعتی تولید کنند. در این مطالعه سعی شده است فعالیت آنزیمی قارچ های هالوفیل اختیاری از پارک های جنگلی تهران مورد سنجش قرار گیرد.

مواد و روش‌ها: بنابراین نمونه‌برداری از خاک و هوای پارک جنگلی تهران، ساپروفیت‌ها با استفاده از تکنیک میکروسکوپی و کشت اسلاید شناسایی شدند. سپس قارچ های جدا شده از نظر فعالیت آنزیمی مورد بررسی کیفی قرار گرفتند و اکثر سویه ها آنزیم های پکتیناز، لیپاز، پروتئاز و آمیلاز تولید کردند. پنی سیلیوم هالوتولرانت و سویه های E01 ، E03، E014اینورتاز تولید کردند. و تنها سویه E13 سلولاز تولید کرد. بنابراین فعالیت آنزیمی پکتیناز (از طریق بررسی آنزیم تولید شده در محیط با پکتین از پاگ) در سویه حاوی آنزیم. بهترین سویه آنزیمی تولید شده با روش PCR شناسایی و درخت فیلوژنی ترسیم می شود.

یافته ها: بیشترین قارچ های جدا شده آسپرژیلوس، پنی سیلیوم، فوزاریوم، موکور و ریزوپوس بود. از بین قارچ‌های جدا شده و شناسایی شده، ۱۹ جدایه برای تولید آنزیم‌های خارج سلولی در نظر گرفته شد و با استفاده از روش‌های مولکولی مانند Fusarium sublunatum، Aspergillus subramanianii، Penicillium hallotolerans، Mucor circinelloides و Purpureocillium lilacinum شناسایی شدند. سویه های Cladosporium sp. ، Penicillium halotolerans بیشترین فعالیت را نشان دادند) با فعالیت های ۰.۷۱ و ۰.۷۹.(U/mL

نتیجه گیری: Cladosporium sp و Penicillium halotolerans به دلیل کشت روی بسترهای ارزان قیمت و استخراج آسان آنزیمی از محیط کشت، می توانند برای تولید آنزیم صنعتی مورد استفاده قرار گیرند.

کلمات کلیدی: پکتیناز، قارچ، پارک جنگلی، هالوفیل

مقدمه

تاریخچه استفاده از آنزیم ها به استفاده از آنزیم های میکرو ارگانیسم ها در تخمیرآرد نانوایی و تولیدات الکلی و پنیرسازی در یونان باستان بر می گردد(۱). از آنزیم ها در صنایع مختلف مانند صنعت نساجی (آمیلاز، سلولاز، اکسیدوردوکتاز) ، صنعت مواد شوینده (پروتئاز، لیپاز، سلولاز،آمیلاز و اکسیدوردوکتاز) ، صنایع غذایی (پکتیناز،پروتئاز،سلولاز، اکسید ورودوکتاز) ،صنعت کاغذ (گزیلاناز، اکسیدو ردوکتاز و لیپاز)، ، صنعت چرم سازی (پرووتئاز و لیپاز)وغیره استفاده می شود.عمده آنزیم های کاربردی در صنعت (حدود ۸۵ درصد) آنزیم های کلاس هیدرولازها هستند (۲). قار چ ها در طول سالیان متمادی بعنوان منبع مهم آنزیم های صنعتی مورد استفاده قرارگرفته اند و امروزه نیمی از این آنزیم ها از قارچ ها بدست می آیند(۳) . خارج سلولی بودن آنزیم های قارچی و سهو لت استخراج برخی از آنها از مایع کشت ، انعطاف و تنوع قار چ ها ، کارایی سیستمهای آنزیمی ودستکاری آسان ژنتیکی آنها از عوامل مهم صنعتی شدن آنزیم های قارچی است (۴, ۵) . قارچ ها یکی از تولیدکنندگان محصولات بیوتکنولوژیک در سراسر دنیا می‌باشند و امروزه از نظر حجم تولید و جنبه‌های اقتصادی از سایر میکروارگانیسم‌های صنعتی پیشی گرفته‌اند. قارچ ها در انواع زمینه‌های علمی، غذایی، پزشکی و دارویی در کشاورزی اهمیت صنعتی فراوانی دارد. بخش عمده تجارت آنزیم های صنعتی توسط آنزیم های هیدرولیتیک مثل آمیلازها ، لیپازها ، کیتینازها، آمیدازها، استراز ها، فیتاز ها و پنی سیلین آسیلازها تصرف شده است. آنزیم های صنعتی در مقایسه با آنزیم هایی که در موارد درمانی و تشخیصی استفاده می شوند در مقادیر بالا تولید می شوند(۶).

*آدرس نویسنده مسئول: گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

پست الکترونیک: m.larypoor@iau-tnb.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۰۸/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۱۴

میکروارگانیسم های مولد این آنزیم ها با روش های غنی سازی جدایه های مطلوب وسنجش تقریبی میزان تولید آنزیم، غربال می شوند (۷).

قارچ های ساپروفیت که اغلب هالوفیل اختیاری هستند به علت کشت آسان و تحمل شرایط خاص و دشوار می توانند مقادیر بالایی از آنزیم های خارج سلولی پر مصرف با پتانسیل صنعتی ایجاد کنند (۵, ۸).

ساپروفیت ها جمعیت کثیری از میکرو ارگانیسم های طبیعت را تشکیل می دهند و اسپور بسیاری از این قارچ ها به طور وسیعی سراسر دنیا پراکنده می باشد بطوریکه می توان گفت این قارچ ها در هوا، خاک و آب حضور فعال دارند. باتوجه به سازگاری میکروارگانیسم ها با شرایط محیطی و اقلیمی زیستگاه خود استفاده ازقارچ های غیر بومی که از مناطقی با ویژگیهای متفاوت نسبت شرایط اقلیمی کشور بدست آمده اند جهت تولید آنزیم های کاربردی در صنعت واستفاده از آنها در شرایط اقلیمی کشورمسلما از کارایی کافی برخوردار نخواهد بود و هزینه زیادی را به همراه خواهد داشت بنابراین استفاده از فلور قارچ های بومی که نه تنها با شرایط خاک و اقلیم کشور سازگارند ،بلکه در دسترس هستند وارزانتر می باشند،برای تولید بهینه آنزیم های مهم و کاربردی درصنعت از ارزش ویژه ای برخوردارند(۹, ۱۰).

روش کار

۱-نمونه برداری

ازبین پار کهای جنگلی تهران هفت پارک انتخاب شد (پارک های جنگلی چیتگر ،خجیر ،پردیسان، لویزان ،یاس فاطمی ،سرخه حصار و سوهانک) و نمونه برداری از هوا و خاک این پارک ها صورت گرفت. برای نمونه برداری از خاک ابتدا سطح خاک رو کنار زده ، سپس با قاشقک استریل از عمق ۱۰-۵ سانتی متر خاک برداشت شد این نمونه برداری از نقاط مختلف پارک انجام شد . برای نمونه برداری از هوا ، از محیط کشت سابرو دکستروز آگار (SDA)، سابرو دکستروز آگار ۳ ٪ نمک وسابرو دکستروز آگار ۴ ٪ نمک و کورن میل آگار (CMA) استفاده گردید پلیتها به منظور انکوبه کردن

به آزمایشگاه منتقل شد. در مرحله بعدی برای کشت نمونه خاک، رقتهای سریالی (10^{-5}- 10^{-1}) تهیه شد و با اضافه کردن یک میلی لیتر رقت تهیه شده به محیط های کشت (SDA,SDA 3%, SDA 4% ,CMA) وپخش نمودن نمونه در سطح پلیت توسط سوآپ استریل و پور پلیت کردن نمونه ها ، نهایتا به مدت یک یا دو هفته در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد انکوبه شدند.

۲-شناسایی ماکروسکوپی و میکروسکوپی کلنی ها

پس از رشد کلنی ها ، در اولین مرحله، کلنی ها در هر پلیت شماره گذاری شد و خصوصیات ظاهری هر کلنی را با ذکر شماره یاد داشت شد . از نمونه قارچی، لام میکروسکوپی مستقیم تهیه شد و بررسی شد. برای تشخیص دقیق قارچ ها که ساختمان زایشی مشخصی در مشاهده مستقیم نداشتند از روش Slide Culture کمک گرفته شد.(۱۱)

۳- خا لص سازی نمونه های مورد نظر

تقریبا از ۳۵۰ کلنی بدست آمده نوزده کلنی به روش سوسپانسیون استاندارد خالص سازی شد.برای تهیه سوسپانسیون استاندارد، تعداد اسپور استاندارد برطبق مقالات و بوسیله لام نئوبار شمارش شد. بعنوان مثال تعداد اسپور برای*Aspergillus sp.* ($10^{6}\times$ ۵-۱) و برای *Mucor sp.* (10^{5} × ۵-۱) و برای *Rhizopus sp.* ($10^{5}\times$۹ -۴) در نظر گرفته شد(۱۱).

۴- بررسی کیفی وجود آنزیم ها

در تمامی آزمایشات ابتدا جدایه‌های قارچ ها بر روی محیط SDA به صورت سوسپانسیون استاندارد، کشت تازه تهیه شد (به عنوان محیط پیش کشت) و سپس بر روی محیط‌های اختصاصی واجد سوبسترای آنزیمی به صورت نشاکاری کشت داده شد وبا بررسی وجود هاله شفاف یا کدر وجود یا عدم وجود آنزیم ارزیابی شد.

۴-۱-بررسی کیفی وجود آنزیم پروتئاز

ترکیب محیط کشت برای بررسی وجود آنزیم پروتئاز : ۱/۵گرم اسکیم میلک ، ۲۰ گرم آگار، ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر,pH محیط روی ۶/۶ تنظیم شد (۱۲). پلیت‌ها به مدت سه تا پنج روز در دمای ۳۰ - ۲۵ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد مشاهده هاله شفاف در اطراف کلنی نشان دهنده حضور آنزیم پروتئاز بود.

۴-۲- بررسی کیفی وجود آنزیم پکتیناز

ترکیب محیط برای بررسی وجود آنزیم پکتیناز : ۱۰ گرم پکتین، ۱/۴ گرم سولفات آمونیوم، ۲ گرم دی پتاسیم فسفات، ۰/۲ گرم سولفات منیزیم ، ۱۵ گرم اگار، ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطرو pH بر روی ۵ تنظیم شد(۱۳). پلیت‌ها به مدت سه تا پنج روز در دمای ۳۰ – ۲۵ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد پس از این مدت به هر پلیت محلول پتاسیم– یدید اضافه شد. در اطراف جدایه‌های تولید کننده پکتیناز، هاله شفاف تشکیل ی شود.

۴-۳- بررسی کیفی وجود آنزیم آمیلاز

ترکیب محیط کشت برای بررسی وجود آنزیم آمیلاز: ۱۰ گرم نشاسته، ۵ گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات ، ۱۰گرم پپتون، ۱۰ گرم عصاره مخمر، ۱۸ گرم آگار، ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر pH محیط بر روی ۶ تنظیم شد (۱۴).ترکیب معرف لوگل (گرم در لیتر)نیز شامل ۱۰ گرم ید در ۲ گرم یدید بود. به منظور بررسی وجود آنزیم آمیلاز، جدایه‌های قارچ بر روی محیط جامد واجد نشاسته برای تولید آنزیم آمیلاز کشت داده شدند. پلیت‌ها به مدت سه تا پنج روز در دمای ۳۰ -۲۵ درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند. پس از این مدت سطح پلیت با معرف لوگل پوشانده شد. مشاهده هاله شفاف در زمینه بنفش رنگ پلیت نشان دهنده وجود آنزیم آمیلاز بود.

۴-۴- بررسی کیفی وجود آنزیم لیپاز

ترکیبات محیط کشت برای بررسی وجود آنزیم لیپاز (گرم بر لیتر): ۱۰ گرم پپتون، ۰/۱ گرم کلرید کلسیم، ۵ گرم کلرید سدیم، ۱۵ گرم آگار، ۱۰ میلی لیترتوئین ۸۰ ،بعد از استریل شدن با فیلتر غشایی ۰/۴۵ میلی لیتر به محیط پایه استریل افزوده شد. pH محیط بر روی ۷ تنظیم شد(14). از کشت تازه قارچ بر روی محیط واجد سوبسترای توئین ۸۰ کشت داده شدند. پلیت‌ها به مدت سه تا پنج روز در دمای ۳۰ - ۲۵ درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند. پس از این مدت مشاهده هاله شیری رنگ در اطراف کلنی نشان دهنده حضور آنزیم لیپاز بود.(۱۴)

۴-۵- بررسی کیفی وجود آنزیم سلولاز

ترکیب محیط برای بررسی وجود آنزیم سلولاز : تهیه محیط عصاره مخمر به علاوه کربوکسی متیل سلولز بعنوان محیط حاوی سوبسترا و کنگورد ۲ درصد (۲ گرم در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر) بعنوان معرف تهیه می گردد. جدایه ها برروی محیط حاوی سوبسترا کشت داده شد و به مدت سه تا پنج روز در دمای ۳۰-۲۵ درجه سانتی گراد گرما گذاری شد و پس از آن به مدت سه دقیقه در مجاورت معرف کنگورد قرار گرفت هاله شفاف در محیط قرمزرنگ نشانه وجود سلولاز بود.

۴-۶- بررسی کیفی وجود آنزیم اینورتاز

ترکیب محیط برای بررسی وجود آنزیم اینورتاز : ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر ،۴۰ گرم ساکارز، ۳۰ گرم عصاره ذرت، ۳ گرم نیترات سدیم،۰/۵ گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات، ۰/۰۵ سولفات منیزیوم ۷ آبه، ۲/۵ گرم کربنات کلسیم و pH روی ۵/۵ تنظیم می شود (۱۵). جدایه ها برروی پلیت‌های حاوی گلوکز کشت داده شد و به مدت سه تا پنج روز در دمای ۳۰ – ۲۵ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد پس از این مدت در اطراف جدایه‌های تولید کننده اینورتاز، مناطق شفافی تشکیل می‌شود.

۵- بررسی کمی وجود آنزیم پکتیناز

۵-۱ -ارزیابی قدرت تولید آنزیم قارچ های تولید کننده پکتیناز (برآورد کمی)

قارچ هایی که در مرحله قبل دارای هاله شفاف آنزیم بودند، فعالیت آنزیمی شان توسط تخمیر غوطه ور بررسی شد. درنهایت بهترین سویه های دارای بیشترین فعالیت آنزیمی انتخاب شدند.

۵-۲- تولید پکتیناز با روش کشت غوطه ور

سولفات آمونیوم ۰/۶ درصد، دی پتاسیم فسفات ۰/۶درصد، مونوپتاسیم فسفات ۰/۶ درصد، سولفات منیزیوم ۰/۰۱ درصد، پکتین سیب یک درصد، تفاله سیب یک درصدو pH برابر با ۵/۵ مورد نیاز می باشد (۱۶).

محیط مایع بدست آمده در ۱۲۱ درجه سانتی گراد برای ده دقیقه استریلیزه شد. پس از استریلیزاسیون ۰/۵ میلی لیتر سوسپانسیون اسپور قارچ هایی که در مرحله قبل دارای هاله شفاف بودند به محیط تلقیح شد. محیط تخمیر در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد، داخل انکوباتور شیکردار درrpm ۱۶۰ به مدت پنج روز شیک شد. آزمایه ها در ظرف های ۱۲۰ میلی لیتری با حجم ۳۰ میلی لیتر محیط کشت، انجام شد .پس از پنج روز، محیط تخمیر برای انجام آزمایشات فعالیت پلی گالاکتوروناز، با استفاده از کاغذ واتمن شماره یک، خالص سازی شد. (۱۷)

۵-۳ اندازه گیری فعالیت آنزیم پکتیناز

فعالیت پلی گالاکتوروناز(PG) توسط اندازه گیری گروه های قند آزاد شده از پکتین سیب، با استفاده از معرف سه و پنج دی نیتروسالیسیلیک اسید (DNS) تعیین شد (۱۷). مخلوط واکنش حاوی دو میلی لیتر پکتین سیب یک درصد در بافر فسفات سیترات۲ /۰ مولاربا pH برابر با ۵/۵ و ۰/۵ میلی لیترمحلول آنزیم خام در ۴۰درجه سانتی گراد به مدت ده دقیقه گرماگذاری شد. سپس سه میلی لیتر معرف DNS اضافه شد و در حمام آب برای مدت زمان ۱۵دقیقه جوشید. پس از سرد شدن، جذب نوری در ۵۴۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانده شد(۱۸).

یک واحد فعالیت آنزیمی، مقدار آنزیمی است که توانایی آزادسازی یک میکرو مول گالاکتورونیک اسید بر واحد حجم آنزیم در مخلوط واکنش بر واحد زمان در شرایط استاندارد آزمایش را داشته باشد.

۶- شناسایی ملکولی برخی جدایه ها

برای شناسایی گونه برخی از جدایه ها از تکنیک PCRاستفاده شد.DNA تخلیص شده با واکنش زنجیره ای پلیمراز تکثیر شد. آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق شامل آغازگر ITS4, ITS1 بودند که توالی آنها در ذیل ذکر شده است(۱۹).

ITSl TCCGTAGGTGAACCTGCGG;
ITS4 TCCTCCGCTTATTGATATGC;

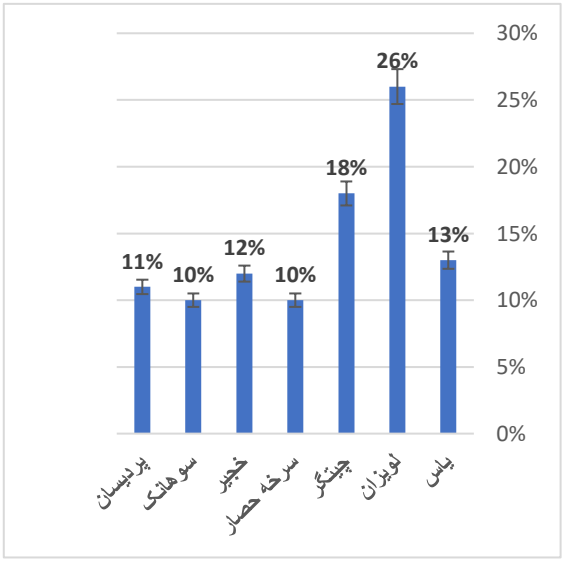
یافته ها

درپلیتهای نمونه هوا ۲۱۱ کلنی شماره گذاری شد که از این تعداد ۱۵۹ کلنی به صورت ماکروسکوپی و میکروسکوپی در سطح جنس شناسایی شد.درپلیتهای نمونه خاک ۱۳۹ کلنی

شماره گذاری شد که از این تعداد ۱۱۳ کلنی به صورت ماکروسکوپی و میکروسکوپی در سطح جنس شناسایی شد. بیشترین جنسهای شناسایی شده شامل گونه های *Fusarium Penicillium sp. , Aspergillus sp. sp, Trichoderma sp., Cladiosporium sp., Mucor sp., Rhizopus sp.,* و ... بودند که در شکلها دقیقا جدایه ها با ذکر درصد جداسازی عنوان شده است.

نتایج شناسایی و غربالگری جدایه ها

نتایج جداسازی قارچ های هالوفیل اختیاری در شکل ها (۱) وجدول(۱) بیان شده است.چنانچه نتایج،نشان میدهد،بیشترین میزان قارچ ساپروفیت جداسازی شده ،در پارک جنگلی لویزان ارزیابی شد که معادل ٪۲۶ بود وکمترین مقداردر پارک سرخه حصار مشاهده گردید که درصدی معادل ٪۱۰داشت.

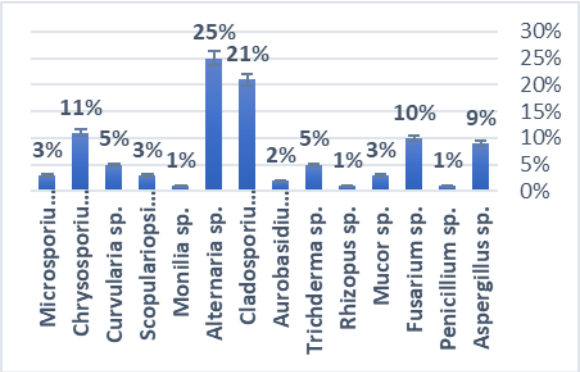


شکل(۱):درصد جنس قارچ های ساپروفیت جدا شده از پارک های جنگلی

جدول (۱): درصد قارچ های جداشده از هر پارک جنگلی

پارک های جنگلی	منطقه شهرداری	تعداد جنس قارچ های جداشده	درصد جنس های جدا شده
یاس	۱,۴	۳۷	٪۱۳
لویزان	۴	۷۱	٪۲۶
چیتگر	۲۲	۴۸	٪۱۸
سرخه حصار	۱۳	۲۶	٪۱۰
خجیر	-	۳۳	٪۱۲
سوهانک	۱	۲۶	٪۱۰
پردیسان	۲	۳۰	٪۱۱

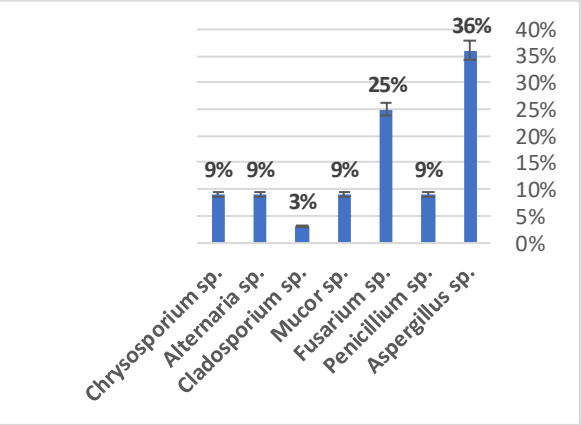
نتایج ارزیابی جنس های جداشده از پارک های جنگلی مختلف در شکلهای (۲)تا (۸)بیان شده است.طبق نتایج بررسی شده درشکل(۲) درپارک جنگلی لویزان ،بیشترین درصد جداسازی قارچ های هالوفیل اختیاری،مربوط به قارچ های ساپروفیت سیاه شامل Alternariaو Cladosporiumاست وکمترین درصد جدا شده مربوط به جنس ساپروفیت های شفاف Mucor و Monilia می باشد که هر دو از قارچ های شفاف می باشند.



شکل (۲):درصد قارچ های ساپروفیت جدا شده از پارک جنگلی لویزان

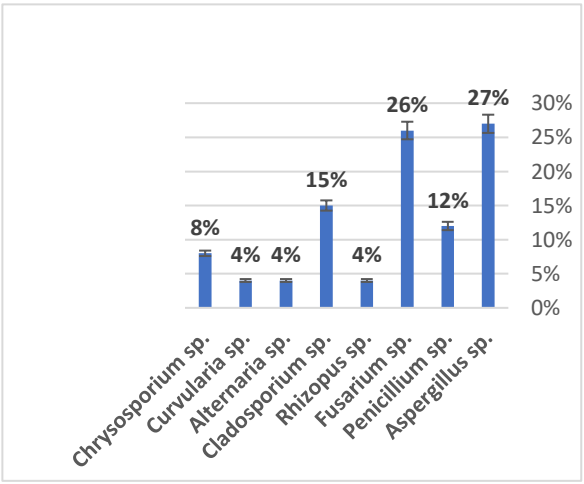
طبق نتایج بررسی شده درشکل(۳) درپارک جنگلی خجیر ،بیشترین درصد جداسازی قارچ های هالوفیل اختیاری،مربوط به قارچ های ساپروفیت شفاف شامل Aspergillus و Fusariumاست وکمترین درصد جدا

شده مربوط به جنس Cladosporium می باشد که از قارچ های ساپروفیت رنگی می باشد.



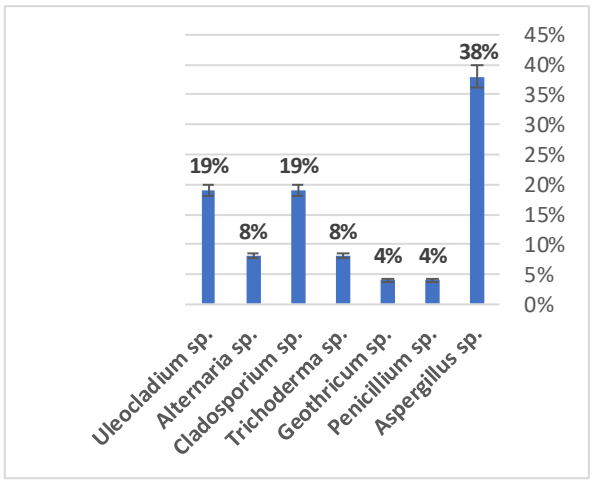
شکل (۳):درصد قارچ های ساپروفیت جدا شده از پارک جنگلی خجیر

طبق نتایج بررسی شده درشکل(۴) درپارک جنگلی سرخه حصار ،بیشترین درصد جداسازی قارچ های هالوفیل اختیاری،مربوط به قارچ شفاف Aspergillus است وکمترین درصد جدا شده مربوط به جنس ساپروفیت شفاف وسینوسیت Rhizopusو قارچ های ساپروفیت رنگی شامل Curvularia و Alternariaمی باشد .



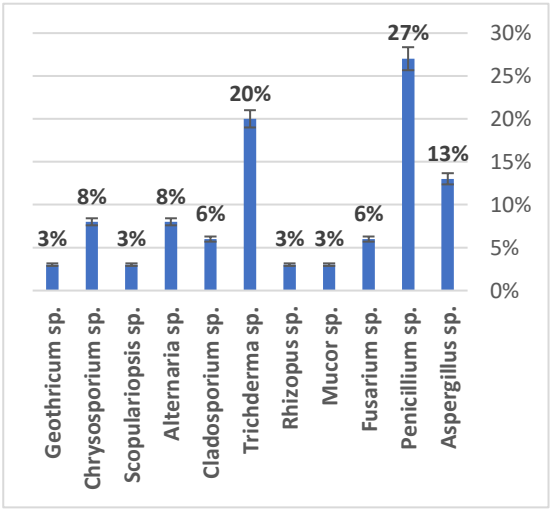
شکل (۴): درصد قارچ های جدا شده پارک جنگلی سرخه حصار

طبق نتایج بررسی شده درشکل(۵) درپارک جنگلی سوهانک،بیشترین درصد جداسازی قارچ های هالوفیل اختیاری،مربوط به قارچ شفاف Aspergillus است وکمترین درصد جدا شده مربوط به جنس ساپروفیت شفاف Penicilliumوشبه مخمرشفاف Geotrichumمی باشد.



شکل (۵): درصد قارچ های جدا شده پارک جنگلی سوهانک

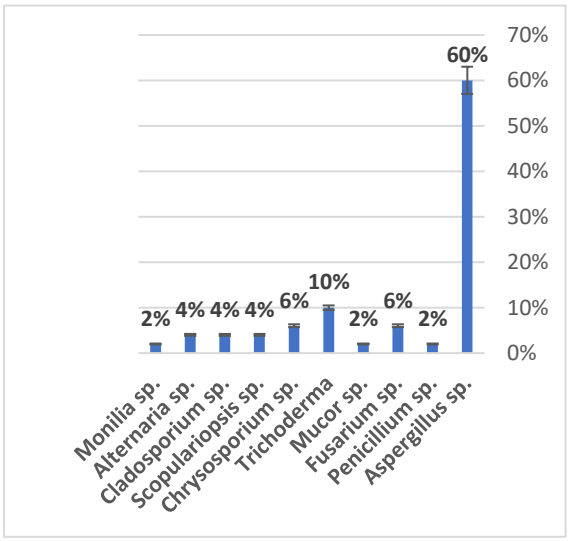
طبق نتایج بررسی شده درشکل(۶) درپارک جنگلی یاس،بیشترین درصد جداسازی قارچ های هالوفیل اختیاری،مربوط به قارچ ساپروفیت شفاف Penicilliumاست وکمترین درصد جدا شده مربوط به جنس های ساپروفیت شفاف Scopulariopsis وRhizopusوMucor وشبه مخمرشفافGeotrichum می باشد



شکل (۶):درصد قارچ های ساپروفیت جدا شده از پارک

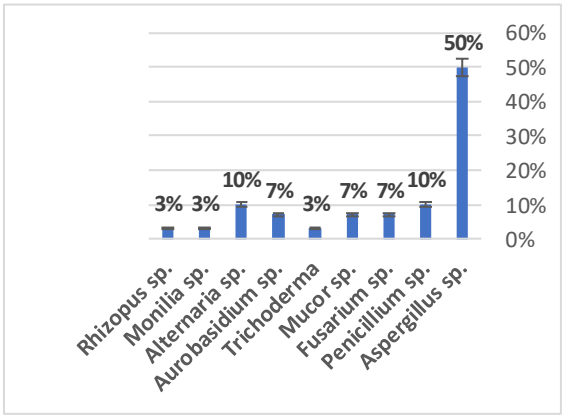
جنگلی یاس

طبق نتایج بررسی شده درشکل(۷) درپارک جنگلی چیتگر،بیشترین درصد جداسازی قارچ های هالوفیل اختیاری،مربوط به قارچ ساپروفیت شفاف Aspergillus است وکمترین درصد جدا شده مربوط به جنس های ساپروفیت شفافMucor، Penicilliumو Monilia می باشد.



شکل (۷):درصد قارچ های جدا شده از پارک جنگلی چیتگر

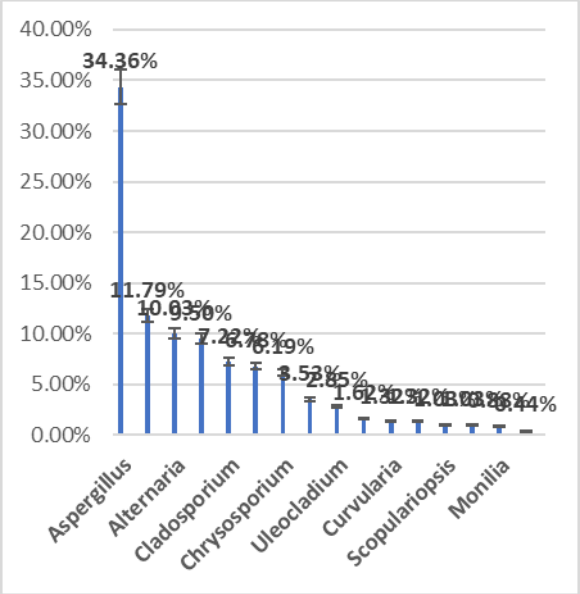
طبق نتایج بررسی شده درشکل(۸) درپارک جنگلی پردیسان،بیشترین درصد جداسازی قارچ های هالوفیل اختیاری،مربوط به قارچ ساپروفیت شفاف Aspergillus است وکمترین درصد جدا شده مربوط به جنس های ساپروفیت شفافRhizopus،Trichodermaو Monilia می باشد.



شکل(۸): درصد قارچ های جدا شده از پارک جنگلی

پردیسان

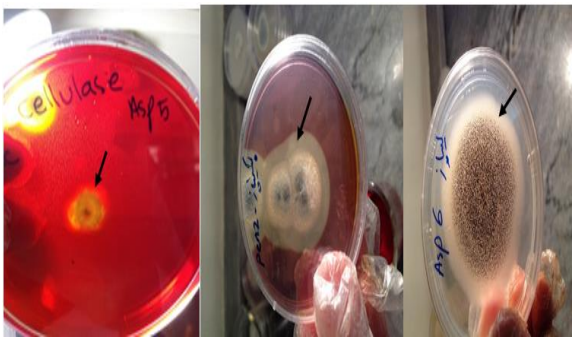
در شکل (۹)درصد کلی قارچ های ساپروفیت شفاف ورنگی وشبه مخمر سیاه وسفید جدا شده از پارک های جنگلی هفت گانه تهران نشان داده شده است.بیشترین درصد قارچ ساپروفیت جدا شده مربوط به آسپرژیلوس که از مهمترین ساپروفیت هالوتولورنت با درصدی معادل ۳۴/۳۶٪می باشد وکمترین قارچ جدا شده مربوط به مونیلیا بادرصدی برابر۰/۸٪می باشد.البته ۰/۴۴میکروسپوروم هم جداسازی شده که از قارچ های درماتوفیت وخاکدوست می باشد ،که به دلیل درصد بسیار پایین قابل اغماض می باشد.از میان قارچ هایی جدا شده شبه مخمر سیاه Aurobasidium که از قارچ های نمک دوست اختیاری بسیار مهم است با درصد۱/۳۲ وشبه مخمر سفید Geotrichumبا در صد۱/۰۳نیز به چشم می خورد.



شکل (۹)درصد کلی قارچ های ساپروفیت شفاف ورنگی وشبه مخمر سیاه وسفید جدا شده از پارک های جنگلی هفت گانه تهران

نتایج کیفی بررسی وجود آنزیم‌ها درجدایه ها

پس از کشت جدایه ها در محیط های کشت اختصاصی ، ساپروفیت هایی که تولید کننده آنزیم لیپاز وسلولاز بودند ،در محیط کشت هاله آنزیمی تشکیل دادند که در شکل (۱) فلش ها فعالیت آنزیمی قارچ را در محیط کشت اختصاصی نمایش می دهد.



شکل (۱):مشاهده (a) هاله شیری رنگ لیپاز مثبت در جنس آسپرژیلوس (b)هاله شفاف پکتیناز مثبت در جنس پنی سلیوم (c)هاله شفاف سلولاز مثبت درجنس تریکودرما

نتایج کیفی تولید آنزیم توسط جدایه های مختلف جدا شده از پارک های جنگلی در جدول (۲)نشان داده شده است.از بین جدایه های مختلف ،بیشترین میزان ترشح آنزیم های مختلف به ترتیب توسط گونه های مختلف آسپرژیلوس وسپس پنی سلیوم اتفاق افتاده است.

جدول (۲):نتایج کیفی حضور آنزیم ها در جدایه های مورد بررسی،۱- W+: نشان دهنده قطر ۲-۰ میلیمتری هاله آنزیمی می‌باشد،۲-مثبت: نشان دهنده قطر۷-۲ میلیمتری هاله آنزیمی می باشد،۳-منفی : عدم ایجاد هاله آنزیمی

جدایه	جنس قارچ	آنزیم‌های تحت آزمایش					
		لیپاز	پروتئاز	آمیلاز	اینورتاز	پکتیناز	سلولاز
E01	*Penicillium 1 sp.*	+	+	W+[1]	+	+[2]	-[3]
E02	*Penicillium halotoleras*	+	+	+	+	+	-
E03	*Penicillium 3 sp.*	+	+	+	+	+	-
E04	*Purpureocillium lilacinum*	-	+	W+	-	-	-
E05	*Scopolariopsis sp.*	-	W+	W+	-	W+	-

	E06	E07	E08	E09	E10	E11	E12	E13	E14	E15	E16
E06	***Cladosporium sp.***	***Fusarium sublunatum***	***Fusarium2 sp.***	***Aspergillus 1 sp.***	***Aspergillus 2 sp.***	***Aspergillus 3 sp.***	***Aspergillus 4 sp.***	***Aspergillus 5 sp.***	***Aspergillus 6 sp.***	***Aspergillus 7 sp.***	***Aspergillus subramanii***
E07	-	-	-	+	W+	+	+	+	+	W+	+
E08	-	+	-	+	W+	-	-	-	-	-	-
E09	-	W+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
E10	-	W+	-	+	W+	-	-	-	-	-	-
E11	-	W+	-	+	W+	-	-	-	+	+	+
E12	-	W+	-	+	W+	-	-	-	+	+	+
E13	-	W+	-	+	W+	-	-	-	+	+	+
E14	-	W+	-	+	W+	-	-	-	+	+	+
E15	-	W+	-	+	W+	-	-	-	+	+	+
E16	-	W+	-	+	W+	-	-	-	+	+	+
E17	***Aspergillus 9 sp.***	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E18	***Mucor circinelloides***	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
E19	***Rhizopus sp.***	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

نتایج بررسی کمی آنزیم ها در جدایه ها

با توجه به داده های جدول(۲)اکثر جدایه ها هاله آنزیمی پکتیناز را دارا بودند . در این پژوهش به بررسی کمی آنزیم پکتیناز در برخی جدایه ها پرداخته شده است.جدول (۳)میزان فعالیت آنزیمی مهمترین جدایه های جدا شده از پارک های جنگلی را نشان میدهد که با روش طیف سنجی نوری سنجیده شده است. بیشترین فعالیت آنزیمی را جدایه های E06,E02 داشت که پس از سنجش مولکولی مشخص شد که متعلق است به جنس های پنی سلیوم هالوتولرانس وکلادوسپوریوم و کمترین فعالیت آنزیمی از این جدایه های مورد بررسی مربوط به جدایه های E14,E16 بود که پس از سنجش مولکولی مشخص شد که به جنس آسپرژیلوس تعلق دارد.

جدول(۳): فعالیت آنزیم پکتیناز برخی جدایه ها درطول موج ۵۴۰ نانومتر

فعالیت آنزیمی (U/ml)	جدایه های مورد بررسی	جدا شده از پارک جنگلی
۰/۵۶	E01 (Penicillium sp.)	یاس
۰/۷۱	E02 (Penicillium halotoleras)	سرخه حصار

۰/۷۹	E06 (Cladosporium sp.)	خجیر
۰/۳۶	E14 (Aspergillus 6 sp.)	خجیر
۰/۶۵	E15 (Aspergillus 7 sp.)	سرخه حصار
۰/۳۵	E16 (Aspergillus subramanianii)	سرخه حصار

نتایج سنجش مولکولی

محصول PCR به منظور تعیین ترادف به شرکت تکاپوزیست (ماکروژن کره) ارسال گردید و سپس نتایج حاصل با استفاده از نرم افزار Blast درسایت GenBank مورد بررسی گرفت.در این تحقیق با توجه به خصوصیات مورفولوژیک و ابزار ملکولی جدایه E02 که بیشترین مقدار تولید آنزیم پکتیناز را تولید کرد،۹۸ درصد به *Penicillium halotolerans* ،جدایه E04 ،۹۹ درصد به *Purpureocillium lilacinum* ، جدایه *E07* ،۹۸ درصد به *Fusarium sublunatum* ،جدایه *E16* ،۹۸ درصد به *Aspergillus subramanianii* وجدایه *E18*،۹۸ درصد به *Mucor circinelloides* شباهت داشت.

بحث

قارچها موجوداتی همه‌جایی هستند و به جهت عمق و گسترده فعالیت اکولوژیک جزو مهمترین میکروارگانیسم‌های یوکاریوتی و مهمترین منبع تولید آنزیم‌های صنعتی می باشند (۲۰).خارج سلولی بودن آنزیم‌های قارچی و سهولت استخراج آن‌ها از محیط کشت (۲۱)، انعطاف و تنوع فیزیولوژیک قارچها، کارآیی سیستم‌های آنزیمی و در اغلب موارد ایمن بودن ، از عوامل مهم صنعتی شدن آنزیم‌های قارچی است (۲۲) .

در این مطالعه حضور آنزیم‌های آمیلاز، پروتئاز، لیپاز، پکتیناز، اینورتازو سلولاز در ۱۹ جدایه قارچی بصورت کیفی بررسی شد که در صد فراوانی تولید پکتیناز بیش از سایر آنزیم ها در جدایه های مورد بررسی بوده است به همین دلیل دربرخی جدایه ها بررسی کمی آنزیم پکتیناز نیز انجام گرفته است.پکتینازها در بسیاری از فرآیندهای متداول صنعتی مانند فرآوری فیبر گیاهی، چای، قهوه، استخراج روغن، ساخت کاغذ ،تصفیه فاضلاب صنعتی حاوی مواد پکتینی وصنایع تولید آب میوه و منسوجات نیزکاربردهای زیادی را دارند.پکتینازهای اسیدی بیشتر درصنایع غذایی مانند صنعت آب میوه و نوشابه سازی وپکتینازهای قلیایی در منسوجات و صمغ زدایی محصولات فیبری،ساخت کاغذ، استخراج روغن و تخمیر قهوه و چای مورد استفاده قرار می گیرند. این آنزیم ها، مولکول های بزرگ و پیچیده به نام پکتین را تجزیه می کنند که به عنوان پلی ساکارید های ساختاری در لاملای میانی و در دیواره اولیه سلول های گیاهی ذخیره می شوند(۲۳).

پکتینازها حدود ۲۵ ٪ از فروش جهانی آنزیم را به خود اختصاص داده اند. اما تخمین زده می شد که این فروش در سال اخیر افزایش یابد. تولید پکتیناز توسط قارچ های رشته ای با توجه به سویه قارچ، ترکیبات محیط رشد و شرایط کشت(pH ، دما، هوادهی، هم زدن و زمان انکوباسیون تغییر می یابد) (۲۴و۲۵) .

آنزیم آمیلاز در صنایع نانوایی ، مواد لبنی، شیرین کننده‌ها، صنایع نوشیدنی وتولید شربت، صنایع نساجی ، صنایع کاغذسازی ، شوینده‌ها و تولید سوخت الکلی کاربرد دارد (۲۷و۲۶) .

پروتئازها درصنایع دارویی، صنایع غذایی، صنایع پزشکی و آزمایشگاهی، صنایع شوینده‌ها، صنایع نساجی،صنایع چرم‌سازی به واسطه استفاده از آلکالین پروتئاز با قابلیت تجزیه الاستین و کراتین برای فرآوری چرم کاربرد دارد(۲۸). Lakshmi و همکاران در سال ۲۰۱۴ قارچ هایی با خاصیت سلولازی را در شهرChitoor هندوستان شناسایی و غربالگری کردند(۲۹) . *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* بالاترین میزان تولید سلولازرا داشت ، در این پژوهش نیز که برروی ۱۹ جدایه از پارکهای جنگلی تهران انجام شده است نشان داده شدکه *جدایه (E13)* متعلق به جنس *Aspergillus sp.* آنزیم سلولاز تولید کرد که نتایج این بررسی با تحقیق Lakshmi همخوانی

دارد(۲۹).

Anisa و همکاران در سال ۲۰۱۳ با جداسازی و غربالگری گونه های آسپرژیلوس فعالیت پکتینازی آن را بررسی کردند. در پژوهش حاضر اکثر جدایه ها آنزیم پکتیناز تولید می کنند و *Penicillium sp.* و*Cladosporium sp.* بیشترین فعالیت وگونه های *Aspergillus sp.* در رده های بعدی قرار می گیرند. علت متفاوت بودن نتیجه این تحقیق با مطالعه انجام شده، بدلیل تفاوت های جغرافیایی وتفاوت فلور قارچی خاک وهوای پارک های جنگلی ما بین محیط های مختلب می باشد. همچنین فلور میکروبی هر مکان و هر کشور، بومی آن کشور می باشد و کاملا می تواند متفاوت باشد اما برخی از قارچ ها مانند آسپرژیلوس در سراسر دنیا فراوانی بیشتری دارند (۳۰).

Mukunda و همکاران در سال ۲۰۱۲ قارچهای مهم صنعتی را از خاکها ی شرق هندوستان جداسازی و غربالگری کردند. بررسی کیفی آنزیم های آمیلاز،کربوکسی متیل سلولاز ، لیپاز و پروتئاز انجام شد و بیشتر قارچ ها آنزیم آمیلاز تولید کردند . درپژوهش حاضر نیزتولید آنزیم آمیلاز بررسی شد (۳۱).

با توجه به اینکه جداسازی و بهینه سازی سویه های بومی صنعتی مهم هر کشور ارزانتر از خریدن سویه از کشورهای دیگر می باشد، بنابراین جداسازی این قارچ ها از منابع بومی ایران می تواند بسیار ارزان و در دسترس باشد.بررسی کیفی آنزیم های پکتیناز، سلولاز، لیپاز، پروتئاز، اینورتاز در جدایه ها انجام شد و بدلیل اینکه در صد فراوانی آنزیم پکتیناز در جدایه ها بیشتر از در صد فراوانی دیگر آنزیم ها بود بررسی کمی آنزم پکتیناز در برخی جدایه ها نیز انجام شد که نشان داده شد *Cladosporium sp.* با فعالیت ۰/۷۹ (U/ml) و *Penicillium holotolerans* با فعالیت ۰/۷۱(U/ml) بیشترین فعالیت پکتینازی را دارا هستند.

Maciel و همکاران درسال ۲۰۱۱ در برزیل، تولید پکتیناز از پوست درخت خرما را توسط *Aspergillus niger URM4645* بررسی کردند. حداکثر فعالیت آنزیمی(U/g) ۵۹ /۳ پس از۲۴ ساعت تخمیر به دست آمد.در مطالعه حاضر،فعالیت آنزیم پکتیناز مربوط به جدایه *E14(Aspergillus niger)* با فعالیت (U/ml) ۳۶ /۰می باشد و بیشترین فعالیت مربوط به *Cladosporium.sp* با فعالیت ۰/۷۹ U/ml می باشد که این تفاوت مقدار می تواند به علت متفاوت بودن مقدار آنزیم مورد آزمایش باشد و یا متفاوت بودن سویه با توجه به شرایط و اقلیمهای متفاوت باشد.(۳۲)

نتیجه گیری

تولید آنزیم ها به شیوه سنتتیک بسیار گران تمام می شود به همین علت استفاده از قارچ ها در تولید آنزیم بسیار ارزان تر و مقرون به صرفه تر است. همچنین دسترسی به قارچ های بومی ایران، هم راحتتر است.

سویه های تعیین توالی شده در این پژوهش بدلیل اینکه هالوتولورانت هستند در شرایط تولید آنزیم، پایداری لازم را دارند پس تحت تغییر پارامترهای محیطی در تانک تولید آنزیم می توانند پایدار بمانند و مدت زمان زیادی شرایط تولید را تحمل کرده و بیشترین فعالیت آنزیمی را داشته باشند.

فعالیت پکتینازی شش جدایه که هاله شفاف بر روی محیط پکتین ایجاد کرده بودند، توسط تفاله وپکتین سیب به عنوان تنها منابع کربن سنجش شد. بیشترین فعالیت پکتیناز (۷/۹ U/ml) مربوط به *Cladosporium sp.* و (۷/۱ U/ml) مربوط به *Penicillium halotolerans* بود که توسط مشخصات مورفولوژیکی و بررسی ملکولی شناسایی شدند.

*Penicillium halotolerans*و *Cladosporium sp.* بدلیل مورد تایید بودن توسط FDA، قابل کشت بودن بر روی سوبستراهای ارزان، بازیافت آسان آنزیم از محیط کشت می توانند برای تولید آنزیم مورد استفاده قرار گیرد. سویه های هالوتولرانت جدا شده به دلیل پایداری در حرارت های بالا و پایداری در تغییرات اسیدیته محیط می تواند در صنایع مختلف غذایی که نمک جزءاصلی مراحل تولید آن است، مورد استفاده قرارگیرد.

سپاسگزاری

نویسندگان از کادر آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال تشکر می کنند.

منابع

1. Haki GDaR, S.K. Developments in industrially important thermostable enzymes; areview. Bioresource Technology. 2003;89:17-34.
2. Kirk O, Borchert, T.V and Fuglsang, C.C. . Industrial enzyme applications. Current Opinion in Biotechnology 2002;13:345-51.
3. Oyeleke SBaO, A.A. Production of amylase by bacteria isolated from a cassava waste dumpsite in Minna, Niger state, Nigeria. African Journal of Microbiology Research 2009;3(4):143-6.
4. Gropinath SCBaea. Extracellular enzymatic activity profiles Fungi isolated from oil-rich enviroments. Mycorience. 2005;46:119-26.
5. Mishra BKaD, S.K. . Production of amylase and xylanase enzymes from soil fungi of Rajasthan. Journal of Advances in developmental Research 2010;1(1):21-3.
6. Walsh G. Proteins biochemistry and biotechnology: John Wiley and Sons.

; 2002. Chapter 6.
7. Ronivaldo Rodrigues da Silva. Bacterial and Fungal Proteolytic Enzymes: Production, Catalysis and Potential Applications. Applied Biochemistry and Biotechnology.2017;183(1):1-19.
8. Gostincar C, LENASSI M.Gunde-Cimerman N.,plemenitas A. Fungal adaption to extremely high salt concentration. Adv ApplMicrobial. 2011;77:71-96.
9. Mishra RV, D . Pandey ,BK . Pathak,N and Zeeshan ,M. Direct Colony Nested-PCR for the Detection of Fusarium oxysporum f. sp. Psidii Causing Wilt Disease in Psidium guajaval. Jof Horticulture 2014;1(2).
10. Imran A, Akbar.A, Yanwisetpakdee.B, Prasongsuk.S, Lotrakul.P ,and Punnapayak.H. Purification, Characterization, and Potential of Saline Waste Water Remediation of a Polyextremophilic α-Amylase from an Obligate Halophilic Aspergillus gracilis. BioMed Research International 2014; Article ID 106937, 7.
11. Espinel-Ingroff A. KT. Spectrophotometric method of inoculum preparation for the in vitro susceptibility testing of filamentous fungi. J Clin Microbial. 1991;29(2):393-4.
12. Brizzio Saea. Extracellular enzymatic activities of basidiomycetous yeasts isolated from glacial and subglacial waters of Northwest Patagonia (Argentina). Can J Microbiol. 2007;53(519-525).
13. Martmez - Trujillo Aaea. Constitutive and mducible pectinolytic enzymes from AspergUlustlavipes FP - 500 and their modulation by PH and carbon source. Braz J Microbiol. 2009;1(40).
14. Rajan A, Kumar, D.R.S and Nair, A.J. Isolation of a novel alkaline lipase producing fungus Aspergillus fumigatus MTCC 9657 from aged and crude rice bran oiland quantification by HPTLC. Isolation of a novel alkaline lipase producing fungus Aspergillus fumigatus MTCC 9657 from aged and crude rice bran oiland quantification by HPTLC. 2011;5(2):116-26.
15. Poonam S. N. Microbial Enzymes with Special Characteristics for Biotechnological Applications. Biomolecules. 2013 ; 3(3): 597–611.
16. Oluwayemisi OA. Effect of Blanching, Ripening and Other Treatments on the Production Characteristics of Pectinolytic Enzymes from Banana Peels by Aspergillus Niger. Global Journal of Science Frontier Research Chemistry. 2012;12(2).
17. Nouri goushki A, Kargar,M. ,Amini,J. . Identification and optimization of fungal pectinase isolated in screening stage

for fruit juice industry. Journal of Microbial World. 2015;8(1).
18. Miller G. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Analytical Chemistry. 1959;31:426-9.
19. White TJ, Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. W. . Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Academic Press, Inc. 1990:315-22.
20. Mueller GMaS, j.p. fungeal biodiversity : what do we know? what can we predict? Biodiversconserv. 2007;16:1-5.
21. Sandhya Caea. Comparative evaluation of neutral protease production by Aspergillus oiyzae in submerged and solid - state fermentation. Process Biochemistry. 2005;40:2689 - 94.
22. Gopinath SCBaea. Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil - rich environments. Mycoscience. 2005;46:119-26.
23. Kashyap DR, Soni SK, Tiwari R. Enhanced production of pectinase by Bacillus sp. DT7 using solid sate fermentation. Bioresource Technology. 2003;88(3):251-4.
24. Jayani R, Saxena, S. and Gupta, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. Process Biochemistry. 2005;40:2931-44.
25. Souza J, Silva, ES., Maia MLS and Teixeira MFS. Screening of fungal strains for pectinolytic activity: endopolygalacturonase production by Peacilomyces clavisporus 2A.UMIDA.1. Process Biochemistry. 2003;39:455-8.
26. De Souza PMaEM, P. O. . Application of microbial a - amylase in industry - a review. Brazilian Journal of Microbiology. 2010;41:850-61.
27. Padayachee T. Application of thermostable α - amylase from thermomyces lannginosus ATCC 58157 to nutritionally enhance starch based food.: Durban University of Technology, South Africa.; 2006.
28. Djamal C. Acid protease production by isolated species of penidllium. European Journal of Science Research. 2009;25(3):469-77.
29. Lakshmi P, Suresh Babu.B, Radhaiah.A and Sreeramulu.A. . Screening, Identification and Isolation of Cellulolytic fungi from soils of Chittoor District, India. IntJCurrMicrobiolAppSci 2014;3(7):661-71.
30. Anisa S K,Ashwini S, Girish K .Isolation and screening of Aspergillus spp. for pectinolytic activity. Electronic Journal of Biology 2013;9(2):37-41 ·
31. Mukunda S, Onkarappa.R, Prashith Kekuda.TR . Isolation and Screening of Industrially Important Fungi from the Soils of Western Ghats of Agumbe and Koppa, Karnataka. Technology and Arts Research Journal. 2012;1(4):27-32.
32. Maciel M, Herculano PN, Porto TS, eixeira MFST , Moreira KA and De Souza-Motta CM. . Production and partial characterization of pectinases from forage palm by Aspergillus niger URM4645. African Journal of Biotechnology. 2011;10(13):2469-79.