ارزيابي ميزان قندهاي حاصل از تجزيه پكتين و پروتئين‌هاي موثر در تجزيه پكتين توسط چند گونه فارچ *Mucor*

م. ح. ملكي[۱]، غ. ع. رنجبر[۲]، م. ع. تاجيك[۲]، ا. اصغرزاده[۳] و ا. لطفي[۴]

چكيده

در اين بررسي توانايي تجزيه پكتين در چند جدايه قارچ *Mucor* جداسازي شده از مناطق مختلف كشور ارزيابي گرديد. بدين منظور از محيط كشت حاوي ۵۰ سي سي محيط مينيمال با نيم درصد پكتين بعنوان تنها منبع كربن و همچنين نمك‌هاي معدني مورد نياز استفاده گرديد. محيط كشت مورد نظر در سه تكرار با يک سي سي سوسپانسيون اسپور تلقيح و در ۲۵ درجه سانتي‌گراد نگهداري شدند. ارزيابي ميزان قندهاي ساده آزاد شده در محيط كشت ۲ روز پس از تلقيح آغاز و هر ۲ روز يكبار تا روز بيست و يكم ادامه يافت. ميزان پروتئين‌هاي مترشحه در محيط با استفاده از معرف مربوطه و هر ۲ روز يكبار انجام شد. نتيجه واكنش قندهاي ساده با معرف مربوط توسط اسپكتروفتومتر در ۵۲۵ نانومتر و در مورد ميزان پروتئين در طول موج ۵۷۵ نانومتر قرائت گرديد. بين جدايه‌هاي مورد مطالعه در توليد قندهاي ساده تفاوت معني‌داري مشاهده گرديد. بطوريكه جدايه *Mucor hiemalis* f.*silvaticus* بيشترين و جدايه *Mucor circinelloides* f.*janssenii* كمترين ميزان توليد قندهاي ساده را نشان دادند. در مورد ميزان پروتئين‌هاي مترشحه در محيط جدايه‌هاي *Mucor circinelloides* f.*lusitanicus* و *Mucor plumbeus* به ترتيب بيشترين و كمترين ميزان را نشان دادند. در جدايه‌هاي برتر نوسان ميزان قندهاي ساده در محيط تا روز پانزدهم افزايشي، تا روز نوزدهم كاهشي و سپس تا روز بيست و يكم تقريبا يكنواخت بود. در مورد ميزان پروتئين‌هاي مترشحه اين نوسان تا روز سيزدهم افزايشي، تا روز نوزدهم كاهشي و سپس ثابت بود.

واژه هاي كليدي: *Mucor*، پكتين، اسپكتروفتومتر

۱- دانش آموخته كارشناسي ارشد دانشگاه علوم كشاورزي و منابع طبيعي ساري
۲- استاديار دانشگاه علوم كشاورزي و منابع طبيعي ساري
۳- استاديار موسسه تحقيقات آب و خاك تهران
۴- مربي دانشگاه علوم كشاورزي و منابع طبيعي ساري

مÈدمه

دیـواره سـلول‌هـای گیـاهی از پکتـین و سـلولز تـشکیل شـده کـه بیـشترین میـزان پلیمرهـای موجـود در طبیعـت را تـشکیل می‌دهنـد (۳). پکتـین‌هـا گـروه هتروÿانـی از کمپلکس‌های با وزن ملکولی باè بـوده کـه از واحدهای اسیدپلی‌گاèکترونیک تشکیل یافته است. آنزیم‌های تجزیه کننـده مـواد پکتیکـی بعنوان پکتینازهـا شـناخته شـده کـه شـامل پلی‌گاèکتروناز، پکتین استراز، پکتـین لیـاز و پکتات لیاز می‌باشـند (۲). در طـول سـال‌هـا پکتینازها در چندین فرایند صـنعتی متـداول همچون نـساجی، فـراوری فیبرهـای گیـاهی، تخمیر چای و قهوه و اسـتخراج روغـن مـورد اسـتفاده بـوده‌انـد. کـاربرد آنهـا در اسـتخراج ویرو2 ها و تهیه کاغـz گـزارp شـده اسـت. بیـشترین کـاربرد صـنعتی پکتینازهـا در استخراج و شفاف سازی شربت‌ها و آبمیوه‌هـا می‌باشد. پکتین‌ها موجب چسبندگی و تیرگی آبمیوه‌ها مـی‌شـوند. ترکیبـی از پکتینازهـا و آمیÊازهـا در شـفاف‌سـازی آبمیـوه‌هـا و شربت‌های حاصل استفاده می‌شـوند کـه ایـن عمل زمان فیلتراسیون را تا ۵۰ درصد کاهش مـی دهـد (۴). اگـر چـه تعـداد زیـادی از موجـودات تولیـد کننـده پکتینازهـا گـزارp شده‌انـد، بـا وجـود امکـان دسـت یـافتن بـه جدایه‌هایی که از نظر حداکÞر راندمان فعالیت پکتینازی، انتخاب ایزولـه‌هـای دارای فعالیـت پکتینازی باèتر وÖیفه‌ای مهم و در عین حال پیچیده می‌باشـد (آ). هـدف از ایـن مطالعـه بررسی میزان فعالیت پکتینازی در بین چنـد جدایه مربوط به قارچ‌های *Mucor* می‌باشد.

مواد و رواIJ

جهت انجام آزمایش، از جدایه‌های موجود در کلکـسیون آزمایـشگاه گـروه گیاهپزشـکی دانشکاه علوم کشاورزی و منابع طبیعي ساری اسـتفاده گردیـد. در ایـن ارتبـاط تعـدادی از جدایه‌های متعلق به جنس *Mucor* جدا شده از منـاطق مختلـف کـشور مـورد بررسـی و آزمایش قرار گرفتند. از این جدایه‌ها با کشت روی محیط PDA، سوسپانسیون اسپور تهیـه و پس از شـمارp بـا هماسـیتومتر و تنظـیم غلظت ۵۰۰۰ اسپور در یک میلي‌لیتر بـه هـر کشت ijافه گردید.

فند سنجÙ

ارزیابی تجزیه پکتین (فعالیت پکتینازی) در شرایط آزمایشگاهی بـا اسـتفاده از محـیط کشت اختžÙاصی حاوی پکتـین بعنـوان تنهـا منبع کربنی، منبع ازت و نمـک‌هـای معـدنی انجام شد. دو روز پس از تلقـیح محـیط‌هـای کشت، ارزیابی میزان قندهای ساده آزاد شـده از پکتین در محـیط هـر دو روز یکبـار انجـام گرفـت. بـا نمونـه بـرداری از محـیط، میـزان قنـدهای سـاده ایجـاد شـده توسـط معـرف آرسـنات مولیبـدات آشکارسـازی و توسـط دستگاه اسـپکتروفتومتر در طـول مـوج ۵۲۵ نـانومتر، جـžب قرائـت گردیـد (۵). جهـت استفاده از استاندارد در مقایـسه و نمـره دادن به نمونه‌ها غلظت‌های مختلـف گلـوکز ۱% تـا ۰۱% گرم در لیتر تهیه و با استفاده از معـرف žکر شده در باè جžب مربوط بـه نمونـه‌هـای استاندارد قرائت و بـا مقایـسه آنهـا بـا جـžب نمونه‌های مورد بررسی، میزان قندهای سـاده حاصل از تجزیه پلیمر پکتین مشخDŽ شد.

پروتئين سنجي

ميزان پروتئين‌هاي مترشحه در محيط با استفاده از معرف برادفورد و قرائت ميزان جذب در طول موج ۵۷۵ نانومتر انجام گرديد (۱). جهت تعيين ميزان پروتئين از BSA بعنوان استاندارد استفاده گرديد.

اين آزمايش در غالب طرح كامل تصادفي در سه تكرار براي هر جدايه انجام شد. جهت آناليز داده‌ها از نرم‌افزار SAS (V.9.1) استفاده گرديد.

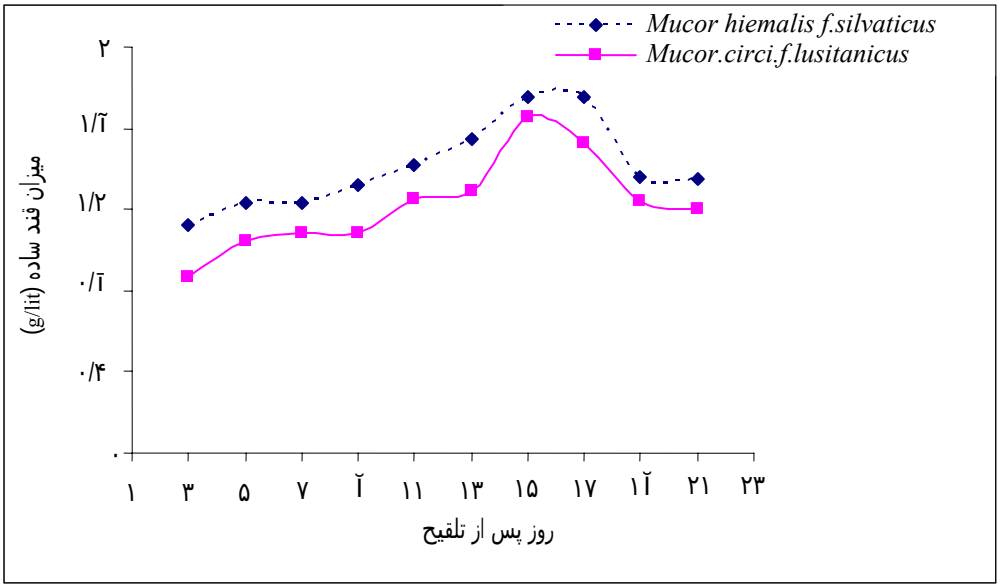
براساس نتايج بدست آمده از اندازه‌گيري‌هاي انجام شده نوسانات در ميزان توليد پكتينازها و تجزيه پكتين و به دنبال آن قندهاي ساده در طول دوره اندازه‌گيري به خوبي به چشم مي‌خورد كه حاكي از فعاليت قارچ در تجزيه پليمر پكتين و تدارك شرايط مورد نياز براي رشد مي‌باشد. در بين جدايه‌هاي مورد بررسي از نظر فعاليت پكتينازي و تجزيه پليمر پكتين، تفاوت معني‌داري مشاهده گرديد. بطوريكه جدايه *Mucor hiemalis* f.*silvaticus* با ميزان توليد قند ساده ۱/۳۰۰ گرم بر ليتر و جدايه *Mucor circinelloides* f.*janssenii* با ميزان توليد قند ساده ۰/۲۳۴۲ گرم بر ليتر به ترتيب بيشترين و كمترين ميزان فعاليت پكتينازي را نشان دادند. از نظر ميزان پروتئين‌هاي مترشحه جدايه‌هاي *Mucor circinelloides* f.*lusitanicus* با ميزان توليد ۰/۱۲۴۵ ميلي گرم بر ليتر و *Mucor plumbeus* با ميزان ۰/۰۵۴۲ ميلي گرم بر ليتر به ترتيب بيشترين و كمترين ميزان توليد را نشان دادند (جدول ۱).

جدول ۱- ميزان توليد قند ساده و پروتئين‌هاي مترشحه توسط جدايه‌هاي مورد بررسي و گروه‌هاي دانكني مربوطه

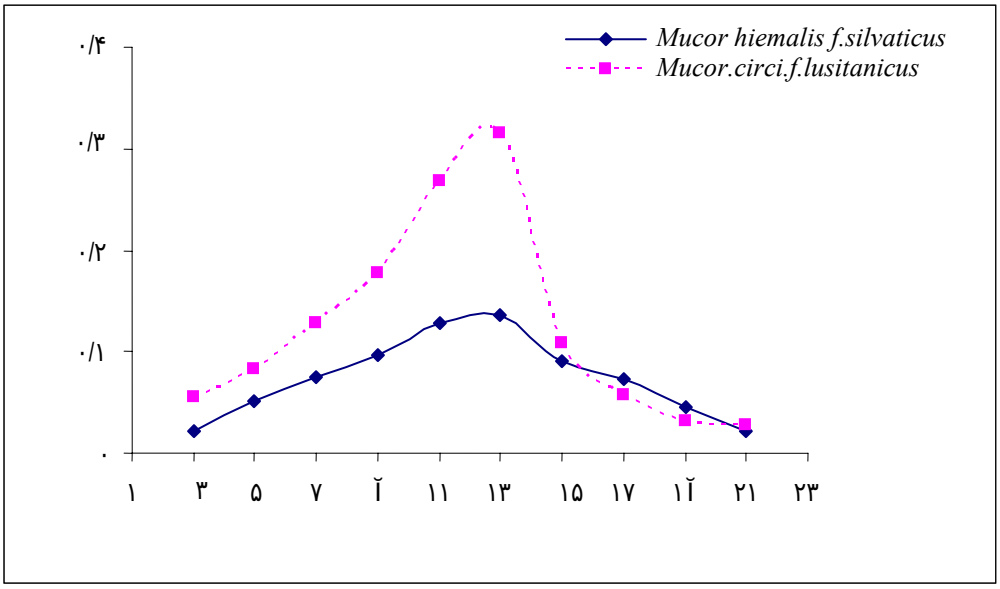
جدايه	قند سنجي (g/lit)	پروتئين سنجي (mg/lit)
Mucor circinelloides f.*circinelloides*	۱/۴۰۱AB	۰/۰۲۱E
Mucor circinelloides f.*janssenii*	۰/۲۳۴۲EF	۰/۱۱۲۳AB
Mucor circinelloides f.*lusitanicus*	۱/۲۲۴CD	۰/۱۲۵۴A
Mucor hiemalis f.*corticola*	۱/۳۰۰B	۰/۰۵EF
Mucor hiemalis f.*silvaticus*	۱/۴۰۷A	۰/۰۷۳CD
Mucor plumbeus	۱/۲۷۳C	۰/۰۵۴۲F
Mucor racemosus f.*chibinensis*	۰/۲۷۲۱E	۰/۰۲C
Mucor strictus	۱/۲۷۳BC	۰/۰۷۲۴CD

از نظر نوسان ميزان توليد قندهاي ساده در جدايه‌هاي برتر اين ميزان تا روز پانزدهم سير صعودي داشته سپس ميزان توليد آن تا روز نوزدهم كاهش يافته و به ميزان ثابتي تا انتهاي دوره آزمايش رسيد (شكل ۱). در مورد نوسان ميزان پروتئين اين ميزان تا روز

سیزدهم افزایش، تا روز نوزدهم کاهش و سپس به میزان یکنواختی تا روز بیست و یکم رسید (شکل ۲).



شکل ۱- نوسان میزان قندهای آزاد حاصل از تجزیه پکتین توسط جدایه‌های *Mucor hiemalis f.silvaticus* و *Mucor circinelloides f.lusitanicus*.



شکل ۲- نوسان میزان قندهای آزاد حاصل از تجزیه پکتین توسط جدایه‌های *Mucor hiemalis* f.*silvaticus* و *Mucor circinelloides* f.*lusitanicus*.

نتایج و بحث

میکروارگانیسم‌ها در طبیعت با پتانسیل‌های وسیعی شناخته شده‌اند چنانچه در طول سال‌ها در تولید تجاری آنزیم‌ها استفاده شده است. پکتینازها از با اهمیت‌ترین آنزیم‌ها با کاربردهای فراوان در

صنعت و يكي از آنزيم‌هاي مهم بخش تجاري بخdلو ! در صنعت آبميوه و غzا و تهيه كاغz مي‌باشند. يكي از dèيل استفاده از قارچ‌ها در تهيه اين آنزيم‌ها ارتباط نزديک آنها با طبيعت بوده، همچنين آنزيم‌هاي بدست آمده از آنها داراي pH بهينه عملكرد آنزيم نزديک با شرايط تهيه آبميوه‌ها و شربت‌ها مي‌باشند (۲). jاروورت بررسي گونه‌هاي قارچي با پتانسيل توليد باèي آنزيم همچنين توليد آنزيم‌هايي با خوا ! بيوشيميايي دلخواه امري بديهي است (۷). اگر چه استفاده از جدايه‌هاي با توليد باè، شرائط بهينه تخمير جهت توليد آنزيم و توليد موثر و كارآمد آنزيم هزينه توليد را كاهش مي‌دهد اما شايد عامل اصلي در تجاري بودن منابع جديد توليد آنزيم‌ها هزينه باèي توليد آنها باشد. در حقيقت تحقيق در مورد پكتينازها با پتانسيل‌هاي جديد نيازمند يافتن جدايه‌هاي ميكروبي جديد مي‌باشد. همچنين مشخDŽ شده كه كاربرد پكتينازها در زمينه‌هاي متنوع در حال افزايش بوده و نياز به كشف منابع جديد توليد اين آنزيم با خdžوصيات جديد مي‌باشد (۱۰). به dèيل گفته شده روp هاي گزينش (غربالگري) جهت بررسي توليد كننده‌هاي پكتينازها jاروري است. در اين مطالعه فعاليت آنزيمي توسط اندازه‌گيري ميزان هيدروليز سوبسترا اندازه‌گيري شد. توليد پكتيناز توسط قارچ‌هاي هيفي بسته به جدايه، تركيب محيط كشت و شرايط كشت (pH، دما، هوادهي، شيک نمودن محيط و مدت زمان تلقيح) متغير است (۲). اما از آنجا كه در مطالعه حاjار شرايط و تركيب محيط كشت براي تمام جدايه‌هاي قارچي مورد مطالعه يكسان در نظر گرفته شده‌اند، بنابراين تفاوت در فعاليت پكتينازي و توليد پكتيناز بيانگر تفاوت ژنتيكي آن‌هاست. اگر چه جدايه *Mucor hiemalis* f.*silvaticus* باèترين فعاليت پكتينازي را نشان داد، توليد ميزان پروتين پايين توسط آن مشاهده شد كه شايد اين نتيجه بعلت باè بودن راندمان فعاليت آنزيمي در پروتئين‌هاي مترشحه باشد. همچنين در جدايه *Mucor circinelloides* f.*lusitanicus* عليرغم ميزان باèي توليد پروتئين، فعاليت پكتينازي پايين مي‌باشد كه ممكن است غلظت پكتيناز در كل پروتئين‌هاي مترشحه ناچيز بوده و يا راندمان فعاليت آنزيم پايين مي‌باشد. در ارتباط با دوره زماني قندهاي آزاد شده در محيط كشت پكتين، در مرحله اول افزايش مداوم و در مرحله بعد كاهش واjاحي مشاهده گرديد. توليد آنزيم‌هاي پكتينوليتيک با غلظت‌هاي پايين اسيد گاèكترونيک القا شده و غلظت‌هاي باèتر قند سطوح پايين‌تري از آنزيم‌ها را در برداشته كه اين امر نشان دهنده اثر بازدارندگي غلظت‌هاي باèي اسيد گاèكترونيک بر مسير كاتابوليتي آن است (۴). در حNjور گلوكز آزاد شده پس از تجزيه پكتين، توليد پكتيناز و فعاليت پكتينازي كاهش مي يابد در حاليكه با كاهش و mžرف گلوكز فعاليت پكتينازي بازيابي مي شود. اين نتيجه بيانگر عمل بازدارندگي گلوكز بر فعاليت پكتينازي است.

منابع

1. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein of utilizing the principle dye binding. Anal. Biochemistry. 72: 680-685.
2. Gupta, S., M. Kapoor, K. Kant Sharma, L.M. Nair and R. Chander Kuhad. 2008. Production and recovery of an alkaline exo-polygalacturonase from *Bacillus subtilis* RCK under solid-state fermentation using statistical approach. Bioresource Technology. 99: 937-945.
3. Hadj-Taieb, N., M. Ayadi, M. Khlif, K. Mrad and I. Hassairi. 2006. Fermentor production of pectinases on gruel, a local by-product and their use in olive oil extraction. Enzyme and Microbial Technology. 39: 1072-1076.
4. Jayani, R.S., S. Saxena and R. Gupta. 2005. Microbial pectinolytic enzymes: A review. Process Biochemistry. 40: 2931-2944.
5. Kossem, A. and P. Nannipieri. 1995. Soil cellulase activity methods. In: Kossem A, Nannipieri P (eds) Applied Soil Microbial and Biochnology. Academic Press: San Diego, pp: 345-350.
6. Patil, S.R. and A. Dayanand. 2006. Exploration of Regional Agrowastes for the Production of Pectinase by *Aspergillus niger*. Food Technology. Biotechnology. 44(2): 289-292.
7. Silva, D., E.M. Martin, R. Silva and E. Gomes. 2002. Pectinase production by *penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by-products. Brazil Journal of Microbiology. 33: 318-324.
8. Soares. M., R. Silva and E. Gomes. 1999. Screening of bacterial strains for pectinolytic activity: characterization of the polygalacturonase producted by *bacillus* sp. Revista de Microbiology. 30: 299-303.
9. Souza. J., E. Silva, M. Maia and M. Teixeira. 2003. Screening of fungal strains for pectinolytic activity: endopolygalacturonase production by Peacilomyces clav isporus 2A.UMIDA.1. Process Biochemistry. 39: 455-458.
10. Tari. C., N. Dogan and N. Gogus. 2008. Biochemical and thermal characterization of crude exo-polygalacturonase produced by *Aspergillus sojae*. Food Chemistry. 111: 824-829.

A Study on Released Sugars From Pectin and Related Proteins By Several *Mocur*

M.H. Maleki[1], G.A. Ranjbar[2], M.A. Tajick[2], A. Asgharzadeh[3] and A. Lotfi[4]

Abstract

The present study was aimed to screen the pectinase activity from some genera of *Mocur* in laboratory conditions. Pectin was used as the only carbon source in a minimal culture medium. Tow days after inoculation released proteins and sugars were assayed with related reagents and repeated each 2 days up to 21th day. Statistical analysis showed significant variation in released sugars and released proteins among tested genera. *Mucor hiemalis silvaticus* had highest and *Mucor circinelloides janssenii* had lowest sugar levels. Also *Mucor circinelloides* f. *lusitanicus* had highest and *Mucor plumbeus* had lowest protein levels. Glucose and protein levels for superior Species have increased until 15 and 13 days, respectively for glucose and protein after inoculation, then decreased until 25th day, but had no variation until 30th day. These results showed that isolates belong to the same forms had no significance difference in pectinase activity.

Keywords: *Mocur,* Pectin, Spectrophotometer, Pectinase activity

1- Former M. Sc. Student, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
2- Assistant Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
3- Associate Professor, Soil and Water Research Institute, Tehran
4- Instructor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University