# ارزيابي ميزان قندهاي حاصل از تجزيه پكتين و پروتئين‌هاي موثر در تجزيه پكتين توسط چند گونه قارچ *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

## مقدمه

دیواره سلول‌های گیاهی از پکتین و سلولز تشکیل شده که بیشترین میزان پلیمرهای موجود در طبیعت را تشکیل می‌دهند (۳). پکتین‌ها گروه هتروژنی از کمپلکس‌های با وزن ملکولی بالا بوده که از واحدهای اسیدپلی‌گالاکترونیک تشکیل یافته است. آنزیم‌های تجزیه کننده مواد پکتیکی بعنوان پکتینازها شناخته شده که شامل پلی‌گالاکتروناز، پکتین استراز، پکتین لیاز و پکتات لیاز می‌باشند (۲). در طول سال‌ها پکتینازها در چندین فرایند صنعتی متداول همچون نساجی، فراوری فیبرهای گیاهی، تخمیر چای و قهوه و استخراج روغن مورد استفاده بوده‌اند. کاربرد آنها در استخراج ویروس‌ها و تهیه کاغذ گزارش شده است. بیشترین کاربرد صنعتی پکتینازها در استخراج و شفاف سازی شربت‌ها و آبمیوه‌ها می‌باشد. پکتین‌ها موجب چسبندگی و تیرگی آبمیوه‌ها می‌شوند. ترکیبی از پکتینازها و آمیلازها در شفاف‌سازی آبمیوه‌ها و شربت‌های حاصل استفاده می‌شوند که این عمل زمان فیلتراسیون را تا ۵۰ درصد کاهش می دهد (۴). اگر چه تعداد زیادی از موجودات تولید کننده پکتینازها گزارش شده‌اند، با وجود امکان دست یافتن به جدایه‌هایی که از نظر حداکثر راندمان فعالیت پکتینازی، انتخاب ایزوله‌های دارای فعالیت پکتینازی بالاتر وظیفه‌ای مهم و در عین حال پیچیده می‌باشد (۷). هدف از این مطالعه بررسی میزان فعالیت پکتینازی در بین چند جدایه مربوط به قارچ‌های *Mucor* می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

جهت انجام آزمایش، از جدایه‌های موجود در کلکسیون آزمایشگاه گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعي ساری استفاده گردید. در این ارتباط تعدادی از جدایه‌های متعلق به جنس *Mucor* جدا شده از مناطق مختلف کشور مورد بررسی و آزمایش قرار گرفتند. از این جدایه‌ها با کشت روی محیط PDA، سوسپانسیون اسپور تهیه و پس از شمارش با هماسیتومتر و تنظیم غلظت ۵۰۰۰ اسپور در یک میلي‌لیتر به هر کشت افزوده گردید.

### فند سنجش

ارزیابی تجزیه پکتین (فعالیت پکتینازی) در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از محیط کشت اختصاصی حاوی پکتین بعنوان تنها منبع کربنی، منبع ازت و نمک‌های معدنی انجام شد. دو روز پس از تلقیح محیط‌های کشت، ارزیابی میزان قندهای ساده آزاد شده از پکتین در محیط هر دو روز یکبار انجام گرفت. با نمونه برداری از محیط، میزان قندهای ساده ایجاد شده توسط معرف آرسنات مولیبدات آشکارسازی و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۵ نانومتر، جذب قرائت گردید (۵). جهت استفاده از استاندارد در مقایسه و نمره دادن به نمونه‌ها غلظت‌های مختلف گلوکز ۱% تا ۰۱% گرم در لیتر تهیه و با استفاده از معرف ذکر شده در بالا جذب مربوط به نمونه‌های استاندارد قرائت و با مقایسه آنها با جذب نمونه‌های مورد بررسی، میزان قندهای ساده حاصل از تجزیه پلیمر پکتین مشخص 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 كاملاً تصادفي در سه تكرار براي ۱ جدايه انجام شد. جهت آناليز داده‌ها از نرم‌افزار SAS (V.9.1) استفاده گرديد.

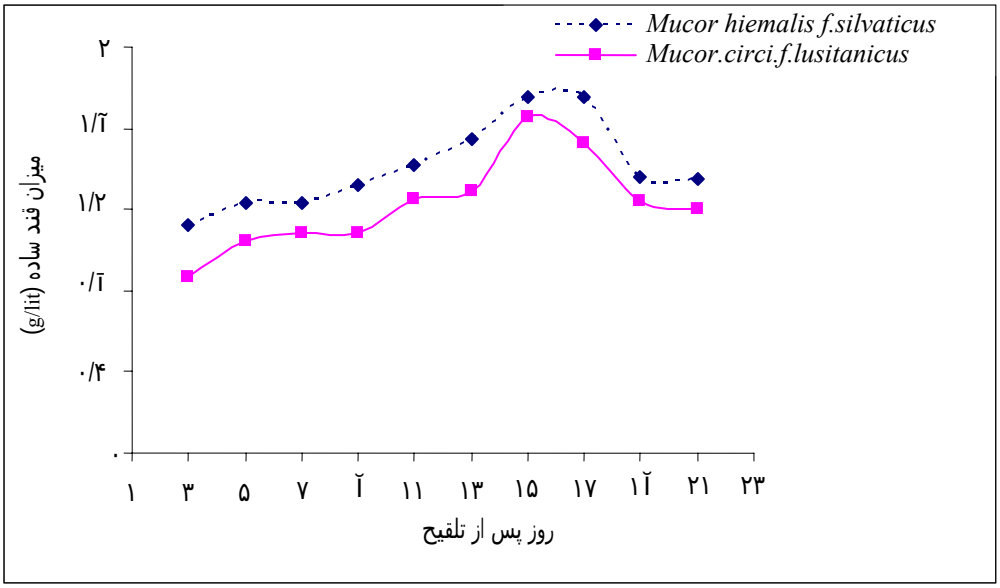
براساس نتايج بدست آمده از اندازه‌گيري‌هاي انجام شده نوسانات در ميزان توليد پكتينازها و تجزيه پكتين و به دنبال آن قندهاي ساده در طول دوره اندازه‌گيري به خوبي به چشم مي‌خورد كه حاكي از فعاليت قارچ در تجزيه پليمر پكتين و تدارك شرايط مورد نياز براي رشد مي‌باشد. در بين جدايه‌هاي مورد بررسي از نظر فعاليت پكتينازي و تجزيه پليمر پكتين، تفاوت معني‌داري مشاهده گرديد. بطوريكه جدايه *Mucor hiemalis* f.*silvaticus* با ميزان توليد قند ساده ۱/۳۰۰۱ 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

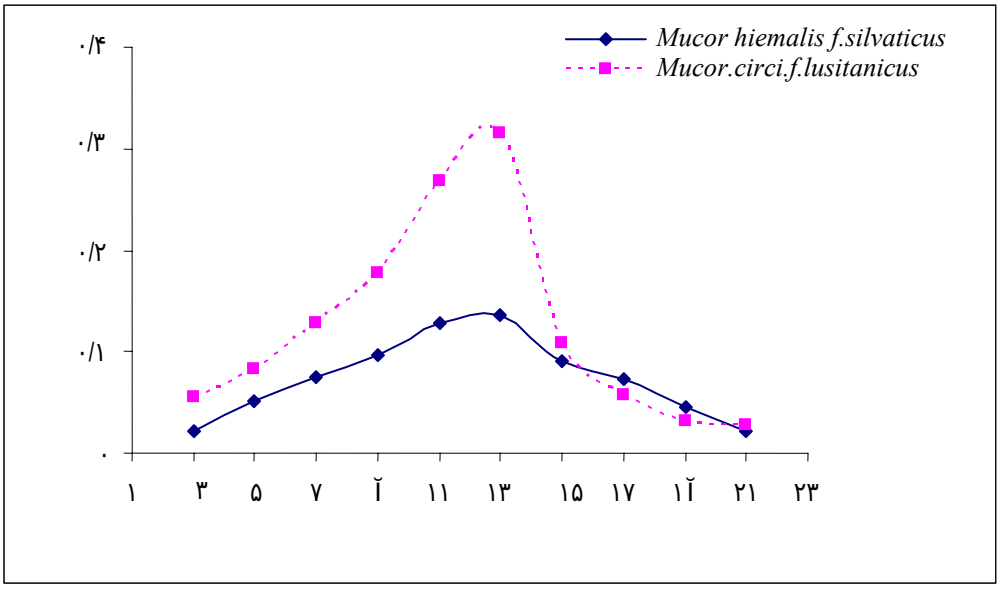
| جدايه | قند سنجي (g/lit) | پروتئين سنجي (mg/lit) |
|---|---|---|
| *Mucor circinelloides* f.*circinelloides* | ۱/۴۰۱۱AB | ۰/۰۱۲۱E |
| *Mucor circinelloides* f.*janssenii* | ۰/۲۳۴۲EF | ۰/۱۱۲۳AB |
| *Mucor circinelloides* f.*lusitanicus* | ۱/۲۲۴۱CD | ۰/۱۲۵۴A |
| *Mucor hiemalis* f.*corticola* | ۱/۳۰۰۱B | ۰/۰۵۱۱EF |
| *Mucor hiemalis* f.*silvaticus* | ۱/۴۰۷۱A | ۰/۰۷۳۱CD |
| *Mucor plumbeus* | ۱/۲۱۷۳C | ۰/۰۵۴۲F |
| *Mucor racemosus* f.*chibinensis* | ۰/۲۷۲۱E | ۰/۰۱۱۲C |
| *Mucor strictus* | ۱/۲۷۳۱BC | 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

سـیزدهم افـزایش، تـا روز نـوزدهم کـاهش و سپس به میـزان یکنـواختی تـا روز بیـست 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 بخدمو ! در صنعت آبميوه و غذا و تهيه كاغذ مي‌باشند. يكي از دليل 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 (۱). ضرورت بررسي گونه‌هاي قارچي با پتانسيل توليد بالاي آنزيم همچنين توليد آنزيم‌هايي با خوا ! بيوشيميايي دلخواه امري بديهي است (۷). اگر چه استفاده از جدايه‌هاي با توليد بالا، 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 بالاي توليد آنها باشد. در حقيقت تحقيق در مورد پكتينازها با پتانسيل‌هاي جديد نيازمند يافتن جدايه‌هاي ميكروبي جديد مي‌باشد. همچنين مشخص شده كه كاربرد پكتينازها در زمينه‌هاي متنوع در حال افزايش بوده و نياز به كشف منابع جديد توليد اين آنزيم با خصوصيات جديد مي‌باشد (۱۰). به دليل گفته شده روش هاي گزينش (غربالگري) جهت بررسي توليد كننده‌هاي پكتينازها ضروري 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 (۱). اما از آنجا كه در مطالعه حاضر 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* بالاترين فعاليت پكتينازي را نشان داد، توليد ميزان پروتين پايين توسط آن مشاهده شد كه شايد اين نتيجه بعلت بالا بودن راندمان فعاليت آنزيمي در پروتئين‌هاي مترشحه باشد. همچنين در جدايه *Mucor circinelloides* f.*lusitanicus* عليرغم ميزان بالاي 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 واضحي مشاهده گرديد. توليد آنزيم‌هاي پكتينوليتيک با غلظت‌هاي پايين اسيد گالاكترونيک القا شده و غلظت‌هاي بالاتر قند سطوح پايين‌تري از آنزيم‌ها را در برداشته كه اين امر نشان دهنده اثر بازدارندگي غلظت‌هاي بالاي اسيد گالاكترونيک بر مسير كاتابوليتي آن است (۴). در حضور گلوكز آزاد شده پس از تجزيه پكتين، توليد پكتيناز و فعاليت پكتينازي كاهش مي يابد در حاليكه با كاهش و مصرف 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 21$^{th}$ 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 25$^{th}$ day, but had no variation until 30$^{th}$ 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