جداسازی و شناسایی قارچ *کائکومایسس* از شکمبه گوسفند و بهینه سازی فعالیت سلولازی آن

نفیسه سادات نقوی[۱]، سمیرا صفاری[۲*]، محمدعلی ضیاء[۳]، غلامرضا قلمکاری[۳]

۱. گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

۲. گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

۳. گروه علوم دامی، واحد خوراسگان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

***نویسنده مسئول:** *saffari_samira@yahoo.com*

چکیده

قارچ‌های بی‌هوازی تجزیه کننده سلولز در مجاری روده و معده گوسفند، گاو و بز و نیز در بسیاری از علف‌خواران نشخوار کننده و غیر نشخوار کننده یافت می‌شوند. زئوسپور این قارچ‌ها معمولاً با اتصال به فیبرهای گیاهی دامنه گسترده‌ای از آنزیم‌های تجزیه‌کننده پلی ساکارید از جمله سلولاز را تولید می‌کنند. در بررسی حاضر نمونه شکمبه از گوسفندان کشتارگاه اصفهان اخذ شد و در شرایط بی‌هوازی و با استفاده از محیط کشت اختصاصی اورپین قارچ‌های آن جداسازی و با استفاده از کلیدهای قارچ شناسی، شناسایی گردید. برای ایجاد شرایط بی‌هوازی محیط‌های کشت با Co2 اشباع گردید. قارچ جداسازی شده بر اساس خصوصیات ماکروسکوپی (ظاهر کلنی) و میکروسکوپی (نوع زئوسپور، ظاهر اسپورانژیوم و ریزوئید) شناسایی شد. برای سنجش فعالیت سلولازی، هر میکروگرم قند احیای آزاد شده در هر دقیقه فعالیت بر روی سوبسترا به عنوان یک واحد فعالیت آنزیم در نظر گرفته شد. فعالیت سلولولیتیک قارچ روی سه نوع سوبسترای کربوکسی متیل سلولز برای سنجش اندوگلوکاناز، آویسل برای سنجش اگزوگلوکاناز و سلوبیوز برای سنجش بتاگلوکوزیداز به صورت روزانه اندازه‌گیری شد. همچنین فعالیت آنزیم در مقادیر مختلف pH و در غلظت‌های مختلف سوبسترا به منظور بهینه کردن فعالیت اندازه‌گیری شد. قارچ جداسازی شده با داشتن زئوسپور تک فلاژل و اسپورانژیوم‌های بیضی شکل، در جنس کائکومایسس قرار گرفت. بهترین فعالیت آنزیمی قارچ روی غلظت‌های متفاوت هر سه نوع سوبسترا در روز سوم مشاهده شد. این غلظت ها برای کربوکسی متیل سلولز ۰/۱ گرم بر میلی‌لیتر (فعالیت آنزیمی ۹/٦٢٤ واحد در دقیقه)، برای آویسل ۰/۰۳ گرم بر میلی‌لیتر (فعالیت آنزیمی ۱۰/۷۷۱ واحد بر دقیقه) و برای سلوبیوز ۰/۰۳ گرم بر میلی‌لیتر (فعالیت آنزیمی ۳۸/۵۳۰ واحد بر دقیقه) به دست آمد. pH مطلوب فعالیت آنزیم برابر با ٦ تعیین شد. کائکومایسس بیشترین فعالیت را بر روی سوبسترای غیر کریستالی سلوبیوز نشان داد.

کلمات کلیدی: شکمبه گوسفند، قارچ بی‌هوازی کائکومایسس، آنزیم های سلولولیتیک

مقدمه

نشخوارکنندگان به دلیل استفاده از گیاهان نیاز به فعالیت هایی برای تجزیه لیگنین موجود در دیواره سلولی گیاهان دارند. از این‌رو میکروارگانیسم‌هایی که در هضم نقش دارند در بخش‌های مختلف دستگاه گوارش به ویژه معده حضور دارند (Mandel et al., 1976; Davies et al., 1993). اکوسیستم میکروبی شکمبه شامل حداقل ۳۰ گونه باکتریایی، ٤٠ نوع تک یاخته و ٦ گونه قارچی است که مسئول ۵۰ تا ۸۲ درصد از تجزیه دیواره سلولی مواد گیاهی (Gordon and Phillips, Gordon and Phillips, 1989; Ho and Bar, 1995; 1998). قارچ‌های شکمبه از جمله میکروارگانیسم‌های بی‌هوازی هستند که اولین بار توسط اورپین (1975) از شکمبه گوسفند جدا شدند. این قارچ‌ها بر اساس تعداد اسپورانژیوم تولید شده توسط هر زئوسپور به انواع مونوسنتریک و پلی‌سنتریک طبقه‌بندی می‌شوند. زئوسپور در انواع مونوسنتریک یک اسپورانژیوم ایجاد می کند (Low et al., 1987).

قارچ‌های بی‌هوازی نقش کلیدی در تجزیه فیبر گیاهی در شکمبه دارند و این را عمل به وسیله آزاد کردن طیف

وسیعی از آنزیم‌ها برای تجزیه فیبرها از جمله سلولازها، همی‌سلولازها، پروتئازها، گزیلانازها، گلیکوزیدازها، آمیلوگلوکوزیدازها، استرازها، پکتینازها، انواع دی-ساکاریدازها، اگزوگلوکانازها و یا آویسلازها انجام می‌دهند. از این قارچ‌ها و آنزیم‌های آنها به عنوان افزودنی‌های غذایی حیوان برای بهبود تغذیه نشخوارکنندگان استفاده می‌شود (Low et al., 1987; Ho and Bar, 1995). هدف از تحقیق حاضر جداسازی و شناسایی قارچ‌های بی‌هوازی مولد آنزیم‌های سلولاز از شکمبه گوسفند و بهینه‌سازی فعالیت آنزیمی در شرایط آزمایشگاهی بوده است.

مواد و روش کار

نمونه‌گیری و جداسازی قارچ‌ها

با استفاده از سرنگ استریل، از ۱۵ گوسفند نمونه شکمبه گرفته شد. جهت جداسازی و رشد قارچ‌های بی‌هوازی از محیط کشت بی‌هوازی مخصوص رشد این قارچ‌ها به نام محیط کشت C استفاده شد که بر اساس روش اروپین (۱۹۷۷) تهیه شد (Samson et al., 2004). برای ساخت این محیط ابتدا دو محلول نمکی ساخته شد. محلول نمکی ۱ حاوی ۳ گرم بر لیتر K_2HPO_4 در آب مقطر و محلول نمکی ۲ شامل ۳ گرم KH_2PO_4، ٦ گرم$(NH_4)_2SO_4$ ، ٦ گرم NaCl، ۰/٦ گرم $MgSO_4.7H_2O$ و ۰/٦ گرم $CaCl_2.2H_2O$ در یک لیتر آب مقطر بود. ترکیب محیط کشت شامل ۱۵۰ میلی‌لیتر از هر کدام از محلول‌های نمکی، ۱۵۰ میلی‌لیتر مایع شکمبه سانتریفوژ شده در دور ۱۰۰۰۰rpm به مدت ۳۰ دقیقه، ۲/۵ گرم عصاره مخمر، ۱گرم تریپتیکاز پپتون، محلول رآزورین (w/v) ۰/۱٪، ۱ میلی‌لیتر محلول کلرامفنیکل (حاوی ۵۰ میلی‌گرم کلرامفنیکل در ۱۰ میلی‌لیتر الکل ۹۵ ٪) و ۱ میلی‌لیتر محلول سیستئین هیدروکلراید بود. محلول کلرامفنیکل با استفاده از فیلتر ۰/٤٥ میکرومتری و سایر ترکیبات محیط کشت در درجه حرارت ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شد. به منظور بی‌هوازی کردن شرایط کشت از دستگاه تزریق CO_2 استفاده شد به‌طوری‌که با اشباع شدن این گاز، شرایط درون لوله‌های درپیچ‌دار (لوله Hungate) بی‌هوازی می‌شد. برای جداسازی قارچ بی-هوازی نمونه شکمبه به محیط کشت اضافه شد و به مدت ۳ روز در دمای ۳۹°C انکوبه گردید. شناسایی قارچ جداسازی شده بر اساس مورفولوژی ماکروسکوپی شامل ظاهر پشت و روی کلنی، مورفولوژی میکروسکوپی شامل نوع زئوسپور، ظاهر اسپورانژیوم و ریزوئیدها و مقایسه آن با کلیدهای شناسایی انجام گرفت (Samson et al., 2004).

تعیین فعالیت آنزیم

فعالیت آنزیمی براساس روش مندل و همکاران بررسی گردید (Khachatourians et al., 2009). ۱/۵ میلی‌لیتر محلول آنزیمی از هر لوله کشت، به ویال‌های ۱/۵ میلی-لیتری منتقل و در دور ۱۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید، ۱ میلی‌لیتر محلول رویی برداشته شد و پس از اضافه‌کردن ۱ میلی لیتر بافر سیترات ۰/۱ مولار، به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری ٤٥°C قرار داده شد. سپس برای توقف فعالیت آنزیم ۱ میلی‌لیتر محلول دی‌نیترو-سالیسیلیک اسید به هر لوله اضافه شد و برای ایجاد رنگ مناسب لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه در بن‌ماری ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از آن میزان جذب نوری در طول موج ۵۷۵ نانومتر قرائت گردید و با توجه به منحنی استاندارد گلوکز، میزان قند آزاد شده اندازه‌گیری شد. هر میکرومول گلوکز آزاد شده در هر دقیقه به عنوان یک واحد

فعالیت آنزیم در هر میلی‌لیتر محلول آنزیمی (U/min) در نظر گرفته شد.

تولید روزانه آنزیم در سوبستراهای مختلف تعداد $۱/٦٥×۱۰^{۷}$ اسپور قارچ جداسازی شده به هر ۲۰ میلی لیتر محیط کشت C که هر کدام حاوی یک نوع سوبسترا بود تلقیح و انکوبه گردید. سنجش فعالیت آنزیمی به صورت روزانه به مدت ۵ روز در شرایط کشت انجام گرفت. از سوبستراهای کربوکسی متیل سلولز (CMC) برای سنجش فعالیت اندو ۱و٤ β گلوکاناز، آویسل برای سنجش فعالیت اگزو ۱و٤ β گلوکاناز و سلوبیوز برای سنجش فعالیت β گلوکوزیداز در غلظت‌های مختلف استفاده شد. به طوری که ۳ نوع سوبسترا در ٤ غلظت متفاوت ۰/۰۳، ۰/۰۵، ۰/۰۷ و ۰/۱ گرم در لیتر تهیه گردید.

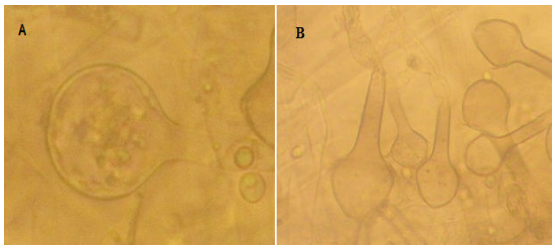
تأثیر pH برتولید آنزیم

محیط‌های کشت C با مقادیر مختلف pH ۵، ٦، ۷ و ۸ و غلظت سوبسترای ۰/۰۷ گرم در میلی‌لیتر تهیه شد و به هر کدام $۱/٦٥×۱۰^{۷}$ اسپور قارچ به ازای هر ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت اضافه گردید. سپس تولید آنزیم‌های اندوگلوکاناز، اگزوگلوکاناز و بتاگلوکوزیداز در روزهای سوم، پنجم و هفتم در شرایط کشت مورد سنجش قرار گرفت.

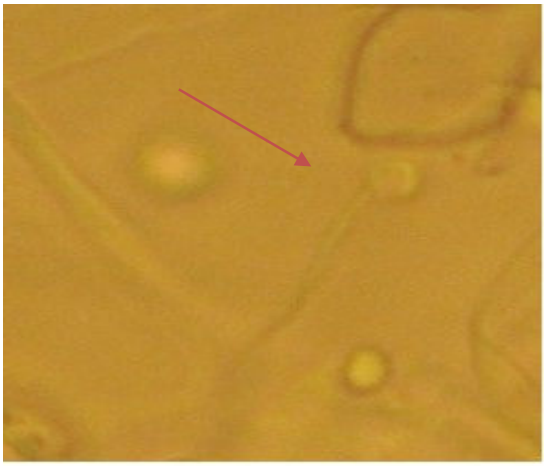
نتایج

قارچ جداسازی شده

قارچ جداسازی شده در شرایط کاملاً اشباع از CO_2 رشد کرد. شکل ظاهری آن ر روی محیط کشت جامد به صورت یک شبکه ریزومیسلیومی گسترده سفید رنگ در سطح کلنی بود و پشت کلنی ظاهر قرمز رنگ داشت. در نمای میکروسکوپی، میسلیوم‌ها با دیواره عرضی و اسپورانژیوم‌ها با اشکال متفاوت مشاهده گردید ولی بیشتر حالت بیضوی داشت (شکل ۱) که دارای زئوسپورهای مونو فلاژل بود (شکل ۲). این قارچ بر اساس کلید شناسایی در جنس کائکومایسس (*Caecomycea*) قرار گرفت (Samson et al., 2004)



شکل ۱- زئوسپورهای درون اسپورانژیوم (A) و ظاهر اسپورانژیوم ها (B) قارچ *کائکومایسس* جداسازی شده

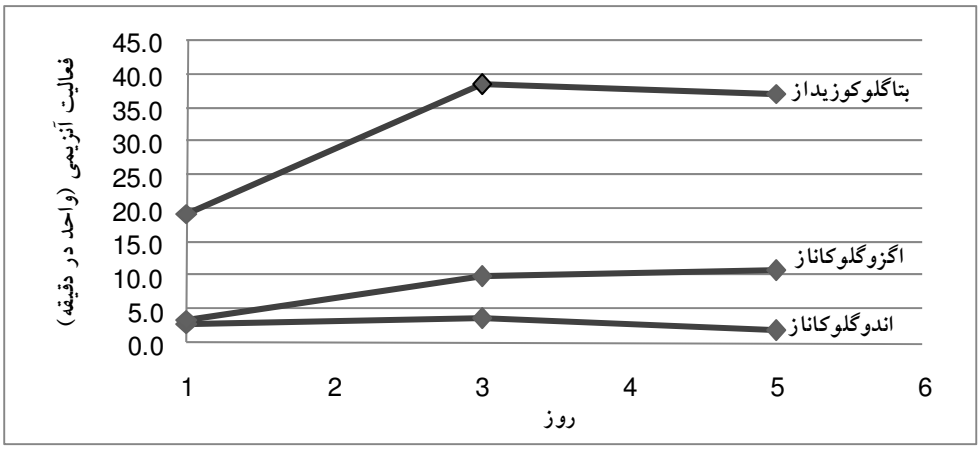


شکل ۲- زئوسپور تک فلاژلی در قارچ *کائکومایسس* جداسازی شده

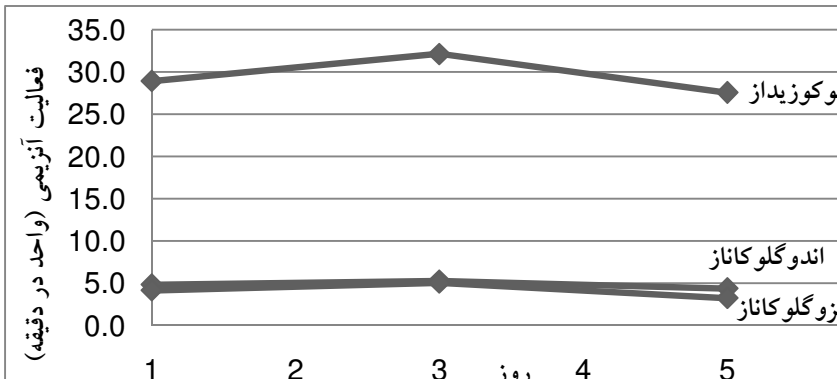
فعالیت سلولازی

تولید آنزیم اندوگلوکاناز، اگزوگلوکاناز و β گلوکوزیداز به ترتیب در سوبستراهای کربوکسی متیل سلولز، آویسل و سلوبیوز در غلظت های مختلف در نمودار های ۳، ٤، ۵ و ٦ نشان داده شده است. بیشترین فعالیت اندوگلوکاناز در سوبسترای کربوکسی متیل سلولز در غلظت ۰/۱ گرم بر لیتر و در روز سوم برابر با ۹/٦٢٤ واحد در دقیقه، بیشترین فعالیت اگزوگلوکاناز در سوبسترای آویسل با غلظت ۰/۰۳

گرم بر لیتر و در روز سوم برابر ۱۰/۷۷۱ واحد در دقیقه و بیشترین فعالیت برای β گلوکوزیداز در غلظت ۰/۰۳ گرم بر میلی لیتر از سلوبیوز در روز سوم ۳۸/۵۳ واحد در دقیقه به دست آمد.

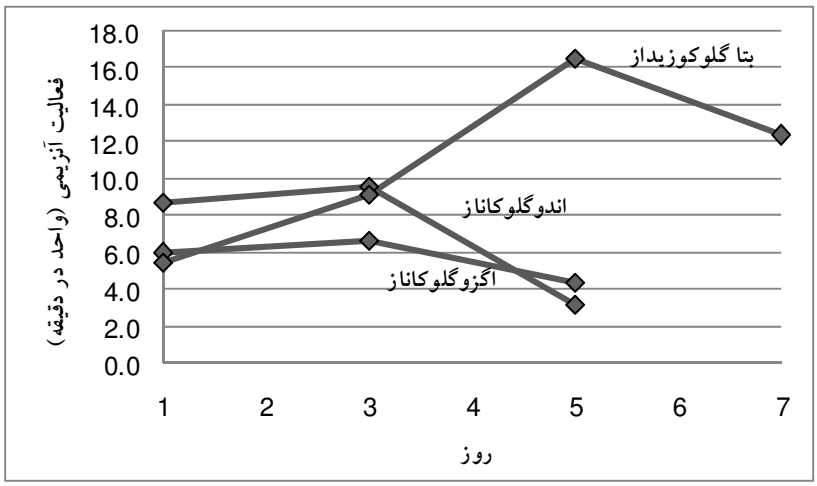


نمودار ۱- بررسی روزانه تولید ۳ نوع آنزیم در سوبستراهای اختصاصی با غلظت ۰/۰۳ گرم در میلی لیتر در قارچ کائکومایسس



نمودار ۲- بررسی روزانه تولید ۳ نوع آنزیم در سوبستراهای اختصاصی با غلظت ۰/۰۵ گرم در میلی لیتر در قارچ کائکومایسس

نمودار ۳- بررسی روزانه تولید ۳ نوع آنزیم در سوبستراهای اختصاصی با غلظت ۰/۰۷ گرم در میلی لیتر در قارچ کائکومایسس



نمودار ٤- بررسی روزانه تولید ۳ نوع آنزیم در سوبستراهای اختصاصی با غلظت ۰/۱ گرم در میلی لیتر در قارچ کائکومایسس

pH بهینه تولید آنزیم

همان‌طورکه در جدول ۱ مشاهده می‌شود، تولید هر ۳ آنزیم در pH=٦ بیشترین مقدار را دارد. به‌طوری‌که در روز سوم کشت در این pH و در غلظت سوبسترای ۰/۰۷ گرم در میلی‌لیتر، فعالیت اندوگلوکاناز ٤/۲۵۹ واحد در دقیقه، اگزوگلوکاناز ۱۰/۷۷۱ واحد در دقیقه و بتاگلوکوزیداز ۳۸/۵۳۰ واحد در دقیقه به دست آمد.

جدول ۱- بررسی فعالیت انواع آنزیم های سلولاز تولید شده به وسیله قارچ کائکومایسس در مقادیر مختلف pH

اندوگلوکاناز					
روز پنجم		روز سوم		روز اول	
فعالیت آنزیمی (واحد در دقیقه)	pH	فعالیت آنزیمی (واحد در دقیقه)	pH	فعالیت آنزیمی (واحد در دقیقه)	pH
۱/۸۰۴	۵	۲/۷۲۴	۵	۲/۲۸۳	۵
۱/۸۲۴	۶	۴/۲۵۹	۶	۲/۹۷۱	۶
۱/۳۶۵	۷	۳/۹۵۱	۷	۲/۷۴۲	۷
۱/۳۶۵	۸	۲/۵۱۲	۸	۱/۸۲۴	۸
۱/۸۰۴	۵	۲/۷۲۴	۵	۲/۲۸۳	۵

اگزوگلوکاناز					
روز پنجم		روز سوم		روز اول	
فعالیت آنزیمی (واحد در دقیقه)	pH	فعالیت آنزیمی (واحد در دقیقه)	pH	فعالیت آنزیمی (واحد در دقیقه)	pH
۸/۲۴۱	۵	۹/۳۹۱	۵	۳/۶۵۹	۵
۱۰/۳۱۲	۶	۱۰/۷۷۱	۶	۳/۸۴۳	۶
۹/۶۲۴	۷	۱۰/۰۸۱	۷	۱/۳۶۵	۷
۷/۳۳۰	۸	۸/۷۰۶	۸	۱/۳۴۵	۸

بتاگلوکوزیداز					
روز پنجم		روز سوم		روز اول	
فعالیت آنزیمی (واحد در دقیقه)	pH	فعالیت آنزیمی (واحد در دقیقه)	pH	فعالیت آنزیمی (واحد در دقیقه)	pH
۱۴/۹۰۱	۵	۱۶/۷۳۶	۵	۱۳/۷۵۳	۵
۳۶/۶۹۵	۶	۳۸/۵۳۰	۶	۱۶/۹۶۵	۶
۲۱/۳۲۴	۷	۲۱/۷۸۳	۷	۱۳/۷۵۳	۷
۱۳/۹۸۳	۸	۱۵/۸۱۸	۸	۱۳/۷۴۴	۸

بحث

قارچ جداسازی شده در این بررسی بر اساس خصوصیات مورفولوژیک جزء انواع مونوسنتریک شناسایی شد. انواع مونوسنتریک به طور کلی شامل جنس *نئوکالیماستیکس* (*Neocallimastix*) دارای زئوسپورهای چند تاژکی و ریزوئیدهای رشته ای نسبتاً بزرگ و بسیار منشعب، جنس *پیرومایسس* (*Piromyces*) دارای زئوسپورهایی با یک یا گاه دو تاژک و ریزوئیدهای رشته‌ای با اندازه‌ها و درجات گوناگون انشعاب و جنس *کائکومایسس* (*Caecomycea*) می‌باشد که دارای زئوسپورهایی با یک یا دو تاژک و تالوس و ریزوئیدهایی به حالت پیازچه‌ای هستند (Chen et al., Low et al., 1987; 2007).

تمام قارچ‌های بی‌هوازی مطالعه شده در شکمبه سلولیتیک هستند و قادر به تجزیه کربوهیدرات‌های ساختاری در دیواره سلولی گیاه می‌باشند. این قارچ‌ها در زمانی‌که حیوان از رژیم‌های غذایی پر فیبر تغذیه می‌کند با تعداد زیاد و در حیوانی که از برگ‌های نرم تغذیه می‌کند با تعداد کم وجود دارند. بنابراین به نظر می‌رسد که قارچ‌های بی-هوازی در هضم علوفه‌های کم‌کیفیت با فیبر بالا مهم می-باشند (Ho and Bar, 1995). قارچ‌های شکمبه مانند *پیرومایسس* و *نئوکالیماستیکس* علاوه بر فعالیت سلولازی بالا، محصولات حاصل از تخمیر مانند فرمات، لاکتات و اتانول نیز تولید می‌کنند (Teunissen et al., 1991). pH اپتیمم فعالیت آنزیمی سلولازی و گزیلانازی برای قارچ‌های مونوسنتریک جدا شده در مطالعات قبلی مانند *کائکومایسس* و *نئوکالیماستیکس* در محدوده ۵/۵ تا ۷/۵ گزارش شده است که همان محدوده pH شکمبه می‌باشد (Borneman et al., 1989). در این مطالعه نیز قارچ کائکومایسس جداسازی شده در محدوده pH ۵ تا ۸ قادر به تولید آنزیم سلولاز بود و بیشترین فعالیت سلولازی را در pH=٦ نشان داد.

در بررسی حاضر این نکته مشخص شد که آنزیم‌های سلولازی قارچ بی‌هوازی جدا شده از شکمبه بیشتر قادر است انواع ترکیبات سلولزی ساده مانند سلوبیوز را به گلوکز بشکند، هر چند می‌تواند ترکیبات پیچیده سلولزی مانند کربوکسی متیل سلولز و آویسل را نیز تجزیه کند. به-طوری‌که بیشترین فعالیت برای β گلوکوزیداز در غلظت ۰/۰۳ گرم بر میلی‌لیتر سلوبیوز در روز سوم برابر با ۳۸/۵۳ واحد در دقیقه به دست آمد. این موضوع احتمالاً به این دلیل است که در فضای شکمبه قارچ‌های هوازی و باکتری-ها بیشتر قادر به انجام مراحل اولیه شکستن سلولز هستند و

قارچ بی‌هوازی بقیه مراحل را تا تولید گلوکز انجام می‌دهند (Gordon and Phillips, 1989). در سایر مطالعات نیز اثبات شده است که قارچ‌های بی‌هوازی مانند کائکومایسس بیشتر می‌توانند به سلولز شکسته متصل شوند (Hogan et al., 1990).

با توجه به اینکه قارچ‌های بی‌هوازی شکمبه برای تولید آنزیم نیاز به هوادهی ندارند و تجزیه سلولز را تا مراحل انتهایی یعنی تولید گلوکز به خوبی پیش می‌برند، استفاده از آنها برای تجزیه بی‌هوازی سلولز در مقیاس صنعتی می‌تواند موجب کاهش هزینه های تولید گردد.

References

1. Borneman, W.S., Akin, D.E., and Ljungdahl, L.G. 1989. Fermentation products and plant cell wall-degradation enzymes product by monocentric and polycentric anaerobic ruminal fungi. Appl. Environ. Microbiol. 55: 1066-1973.
2. Chen, Y.C., Tsai, S.D., Cheng, H.L., Chien, C.Y., Hu, C.Y., and Cheng, T.Y. 2007. *Caecomyces sympodialis* sp. Nov., a new rumen fungus isolated from Bos indicus. Mycol. 99: 125-130.
3. Davies, D.R., Theodorou, M.K., Lawrence, M.I.G., and Trinci, A.P.J. 1993. Distribution of anaerobic fungi in the digestive tract of cattle and their survival in feces. J. General Microbiol. 139: 1395-1400.
4. Gordon, G.L.R., and Phillips, M.W. 1989. Degradation and utilization of cellulose and straw by three different anaerobic fungi from the ovine rumen. Appl Environ. Microbiol. 55: 1703-1710.
5. Gordon, G.L.R., and Phillips, M.W. 1998. The role of anaerobic gut fungi in ruminants. Nutr. Res. Rev. 11: 133-168.
6. Hogan, C.H., Mes-Hartree, M., Saddler, J.N., and Kushner, D.J. 1990. Assessment of methods to determine minimal cellulase concentrations for efficient hydrolysis of cellulose. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32: 614-620.
7. Ho, Y.W., and Bar, D.J.S. 1995. Classification of anaerobic fungi from herbivores with emphasis on rumen fungi from Malaysia. Mycol. 87: 655-677.
8. Low, S.E., Griffith, G.G., Milne, A., Theodorou, M.K., and Trinci, P.J. 1987. The life cycle and growth kinetic of an anaerobic rumen fungi. J. General Microbiol. 133: 1518-1827.
9. Mandel, M., Andreoti, R., and Roche, C. 1976. Measurement of saccharifying cellulase. Biotechnol. Bioengin. 6: 21-33.
10. Khachatourians, G.G., Arora, D.K., Rajendran, T.P., and Srivastava, A.K. 2009. Agriculturally important microorganisms, 1st ed., Kidmore End, Acad. World Int. p. 375- 393.
11. Orpin, C.G. 1975. Studies on the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*. J. General Microbiol. 91: 249-262.
12. Samson, R.A., Hoekstra, E.S., and Frisvad, J.C. 2004. Introduction to Food- and Airborne Fungi, 1st ed., ASM press, Herndon, p. 103.
13. Teunissen, M.J., Opdencamp, H.J.M., and Orpin, C.G. 1991.

Comparison of growth characteristics of anaerobic fungi isolated from ruminants and non-ruminant herbivores during cultivation in a defined medium. J. General Microbiol. 137: 1401-1408.