جداسازی و شناسایی یک سویه جدید مخمر *Pichia kudriavzevii* مولد آنزیم زایلاناز مورد استفاده در صنایع غذایی

هدی سلمانی‌زاده[۱]، **کیوان بهشتی‌مآل[۲]***، هاشم نیری[۳]

[۱]گروه بیوتکنولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران
[۲] گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران
[۳]گروه بیوشیمی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۲۱

چکیده

امروزه قریب به ۴۰۰ نوع آنزیم شناسایی‌شده است که تقریباً ۲۰۰ نوع از آنها در صنعت استفاده می‌شوند. جهت‌گیری بازار جهانی آنزیم‌ها نشان از سهم عمده‌ی زایلاناز، سلولاز و پکتیناز داردکه حدود ۲۰٪ از این بازار را به خود اختصاص خواهند داد. آنزیم‌های زایلاناز در صنایع غذایی، خوراک دام و طیور، صنعت کاغذ، صنایع دارویی، صنعت نان، آبمیوه، تولید پروتئین تک یاخته، تبدیل سوخت جامد به مایع و تولید سوخت گاز مایع، شفافیت روغن خوراکی و تولید اتانل کاربرد دارند. هدف کلی از این پژوهش جداسازی و شناسایی مخمر مولد آنزیم زایلاناز مورد استفاده در صنایع غذایی است. نمونه‌گیری از پساب کارخانه‌های شهرک صنعتی و خاک مرغداری و گاوداری‌های سطح استان اصفهان انجام شد. برای غربال و سنجش کیفی نمونه مولد آنزیم زایلاناز، نمونه‌ها به‌صورت کشت خطی و دیسک‌گذاری بر روی محیط YPG حاوی چوب راش و سنجش کمی فعالیت آنزیم به روش DNS و سنجش پروتئین به روش لوری انجام شد. سپس، برای شناسایی مولکولی جدایه برتر مولد زایلاناز، PCR و پس از آن توالی‌یابی و بلاست انجام شد و سویه جدید مولد آنزیم در بانک ژن جهانی NCBI ثبت شد. از میان مخمرهای جدا شده نمونه مخمر Pichia kudriavzevii strain SBN-IAUF-2 با حداکثر فعالیت آنزیم ۱۳۱۷/۵۶ u/ml و حداکثر فعالیت ویژه‌ی آنزیمی ۳۲۷۱/۶۵۲ u/mg پس از ۴۸ h در دمای ۳۰ °C و سرعت هوادهی ۱۲۰ rpm جداسازی و توالی 18srRNA آن با شماره دسترسی MZ816945 ثبت شد. این اولین گزارش از تولید زایلاناز توسط مخمر Pichia kudriavzevii strain SBN-IAUF-2 در جهان می‌باشد.

واژگان کلیدی: آنزیم زایلاناز، مخمر *پیچیا کودریاوزوی*

*beheshtimaal@iaufala.ac.ir

مقدمه

دیواره سلول گیاهی یک ساختار پیچیده و ناهمگن از پلی‌ساکاریدها و ترکیبات فنولیک است که از دو لایه مجزا به نام دیواره‌های سلول اولیه و ثانویه تشکیل شده است. دیواره‌ی سلول اولیه عمدتا از سلولز، همی‌سلولزها و پکتین تشکیل شده و شامل سلول‌های جوان و در حال رشد است. دیواره سلولی ثانویه نزدیک به سلول اولیه در سلول‌های اولیه رسوب می‌کند. این دیواره علاوه بر سلولز و همی سلولز، لیگنین نیز دارد اما مقدار پکتین در آن کم است. خوشه‌های دیواره‌های سلول ثانویه لیگنوسلولز را تشکیل می دهد. لیگنوسلولز ماده‌ای ناهمگن است که به‌طور عمده از لیگنین، همی‌سلولز و سلولز تشکیل شده است. برای تخریب و پلیمریزاسیون پلی‌ساکاریدهای دیواره‌ی سلولی به قندهای ساده، میکروب‌ها آنزیم‌های ویژه‌ای به نام آنزیم‌های لیتیک دیواره‌ی سلولی (CWLE) دارند (۱). زیست توده گیاهی فراوان‌ترین منبع آلی روی زمین است و کاربردهای گسترده صنعتی در تولید محصولات متنوع دارند. با توجه به هزینه و بازده در صنایع تصفیه خانه، بر تولید سلولازها و زایلانازها تأکید شده است. بنابراین، تولید عناصر آنزیمی بالاتر با استفاده از منابع تجدیدپذیر، تغییر عمده‌ای در زمینه سوخت های زیستی ایجاد می‌کند (۲). سازنده‌ی اصلی دیواره‌ی سلول گیاهی لیگنوسلولز است که از ۲۰-۱۵٪ لیگنین، ۳۰-۲۵٪ همی‌سلولز و حدود ۵۰-۴۰ ٪ سلولز تشکیل شده است. این مؤلفه‌ها به کمک تعاملات کووالانسی و غیر کووالانسی با هم یک شبکه پیچیده‌ی سه بعدی را تشکیل می‌دهند. همی‌سلولزها از زایلان تشکیل شده است و زایلان به راحتی در طبیعت در دسترس است (۳). اکنون سطح هشداردهنده آلودگی و کاهش منابع غیرقابل تجدید انرژی و ذخایر، ضرورت و اجباری برای ایجاد منابع انرژی پایدار جایگزین ایجاد کرده است. هر ساله مقادیر زیادی مواد زائد لیگنوسلولزی (کشاورزی و جنگلداری)، چمنزارها و مواد چوبی تولید می‌شود. علی‌رغم توسعه بسیاری از فن‌آوری‌ها، انتخاب کم و هزینه بالای فرایند همچنان یک تنگنا برای تبدیل جرم زیستی لیگنوسلولزی به مواد شیمیایی خوب با ارزش افزوده است. در سطح جهان، تحقیقات گسترده‌ای برای رفع این مانع در حال انجام است. به‌طورکلی مواد لیگنوسلولزیک، قابلیت تبدیل به موادی مانند خوراک دام، پروتئین تک سلولی، اتانول، زایلیتول، فورفورال، اسیدهای آلی، متان و مونوساکاریدها را دارند (۴). زایلانازها در تجزیه همی سلولز استفاده می شوند و به دلیل تبدیل زیستی مواد زائد گیاهی به محصولات با ارزشی همچون فورفورال، زایلیتول، سوخت‌های زیستی و شیرین کننده‌های مصنوعی از اهمیت تجاری بالایی برخوردار هستند. آنزیم‌های زایلانولیتیک به دلیل تجزیه آرابینوکسی زایلان‌ها برای بهبود قابلیت هضم خوراک دام نیز استفاده می‌شوند. همچنین، این آنزیم‌ها در صنعت کاغذ سازی و سفید شدن خمیر کاغذ مهمترین کاربرد را دارند و سبب کاهش قابل توجه انتشار ترکیبات سمی کلر در محیط هستند. به طورکلی، زایلانازها در صنایع مختلف گیاهی از جمله سفید کردن کاغذ، مواد افزودنی خوراک دام، شفاف‌سازی آب میوه و افزایش استخراج لیگنین از پالپ، تولید منسوجات، آماده‌سازی پروتوپلاست، استخراج قهوه، روغن و نشاسته و تولید بیواتانل و زایلوز و زایلیتول و پروتئین تک یاخته و انواع حلال‌ها و شربت‌های قندی استفاده می‌شوند (۵و۴). زایلانازها توسط ارگانیسم‌های مختلف زنده، از جمله باکتری و قارچ اکتینومیست و تک یاخته‌ها و نرم تنان تولید می‌شود (۳). قارچ‌های گرما دوست، تولیدکننده خوب زایلاناز خارج سلول هستند. زایلانازها حصل از قارچ‌ها قابلیت مقاومت در برابر حرارت، مقاومت گسترده در برابر تغیر pH، مقاومت زیاد در برابر عوامل دناتوراسیون را دارند و در دماهای بالا دارای فعالیت مطلوب هستند. با این‌حال، فعالیت زایلاناز این قارچ‌ها معمولا توسط یون‌های فلزی، به ویژه یون جیوه، مهار می‌شود (۶). قارچ‌ها از جمله انواع تولید کننده‌های آنزیم‌های صنعتی به شمار می‌روند. *آسپرژیلوس*، *کاندیدا ایزانسیس*، *کریپتوکوکوس آلبیدوس*، *کلادوسپوریوم اگزیسپوروم*، *کیتومیوم گلوبوسوم*، *تریکودرما*، *تروما یسس*، *فوزاریوم* و *پنی سیلیوم* از قارچ‌های مولد آنزیم زایلاناز می‌باشند. در این میان گونه‌ی

استرپتومایسس متعلق به اکتینومایست‌ها به‌عنوان بهترین تولیدکنندگان آنزیم زایلانولیتیک شناخته شده‌اند (۷و۸). مخمرها مثل *کریپتوکوکوس*، *شفرسومایسس استیپیتز*، *تریکوپورون بریانوم*، *کاندیدا ارگاتنسیز*، *آیرئوبازیدیوم پولولانس* جدا شده از مواد گیاهی، به‌عنوان تولیدکنندگان بالقوه زایلاناز گزارش شده‌اند (۹). هدف از انجام این پژوهش جداسازی و شناسایی مخمرهای مولد زایلاناز از خاک و ضایعات مناطق مختلف و پساب کارخانه جات مختلف و بررسی آنزیم تولید شده می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی و محیط‌کشت‌های مورد استفاده

در این مطالعه محیط‌کشت YPG براث متشکل از عصاره مخمر، (g/l)۱۰؛ پپتون، (g/l)۲۰؛ دکستروز(گلوکز)، (g/l)۲۰؛ آب مقطر، ml ۱۰۰۰، و محیط‌کشت زایلان براث حاوی زایلان،(g/l)۵؛ عصاره مخمر،(g/l) ۵؛ پپتون(g/l)۵؛ دی پتاسیم هیدروژن فسفات(g/l)۱؛ منیزیم سولفات ۷ آبه (g/l)۱؛ آب مقطر، ml ۱۰۰۰ و pH ۷، از شرکت مرک آلمان تهیه شد.

مواد مورد استفاده برای تولید آنزیم زایلاناز، سوبسترای زایلان، معرف DNS جهت سنجش میزان فعالیت آنزیم و محلول نمک راشل بود. سوبسترای زایلان شامل، ۱ g زایلان (sigma (≥٪۹۰)، X ۴۲۵۲ product number ، cas number 9014-63-5) در ml ۱۰۰ بافر سیترات ۵/۵ =pH، M ۰/۰۵ بود. معرف DNS مورد استفاده در این مطالعه برای سنجش میزان فعالیت آنزیم زایلاناز، نیز از ترکیب g/l ۱۰ سود، سولفیت سدیم ، g/l ۰/۵ سولفیت سدیم، g/l ۲ فنل، g/l ۱۰ پودر دی‌نیترو سالسیلیک اسید و ml ۱۰۰۰ تهیه شد. محلول نمک راشل نیز از ترکیب، gr ۸۰ تارتارات سدیم پتاسیم با ml ۲۰۰ آب مقطر تهیه شد .این محلول در ظرف شیشه‌ای دربسته و در جای خنک تا چند ماه قابل نگهداری است (۱۰).

نمونه‌برداری از خاک حاوی مخمرهای مولد آنزیم زایلاناز

برای تهیه نمونه میکروبی، نمونه‌برداری از خاک مرغداری و پساب کارخانه‌های صنعتی سطح استان اصفهان انجام شد. در تمامی نمونه‌گیری‌ها به دلیل احتمال وجود مخمر زایلاناز مثبت تلاش بر استفاده از محیط‌های حاوی قند و ترکیبات گیاهی و آلی بوده است. برای جمع‌آوری نمونه‌های جامد، از قاشقک‌های استریل استفاده شد و حدود gr ۲۰ نمونه از عمق cm ۷ تا ۱۰ برداشته و به ظرف‌های استریل متقل شد. سپس، ظرف‌های دربسته سریعاً و در کوتاه‌ترین زمان ممکن به یخچال °C ۴ در محل ذخیره‌ی منابع میکروبی آزمایشگاه دانشگاه آزاد فلاورجان استان اصفهان انتقال داده شد (۱۱و۱۲).

غربال‌گری مخمرهای مولد آنزیم زایلاناز

نمونه مخمر جداسازی شده از لحاظ کیفی و میزان تجزیه زایلان در محیط‌کشت به‌عنوان سوبسترای اصلی آنزیم، بررسی شد. برای این بررسی، نمونه مخمر خالص در محیط مایع اختصاصی زایلان براث کشت داده شد. سپس، به محیط جامد ypg با تنها منبع کربن خاک‌اره چوب درخت راش که به لحاظ میزان زایلان بالاترین میزان زایلان را در میان گیاهان را دارد، انتقال داده شد و به‌صورت خطی و دیسک بلانک حاوی نمونه مورد نظر کشت داده شد. میزان فعالیت کیفی آنزیم زایلاناز از نظر قطر هاله اطراف کلنی‌ها یا خط کشت بررسی شد. (۱۳).

جداسازی و خالص‌سازی مخمرهای مولد آنزیم زایلاناز

مقدار gr ۲ نمونه خاک با رعایت شرایط آسپتیک به ml ۱۰۰ محیط کشت YPG براث افزوده شد. سپس، در دمای °C ۳۰ و شدت هوادهی ۱۲۰rpm برای مدت h ۴۸ انکوبه شد. برای غنی‌سازی بیشتر مخمرهای مولد زایلاناز، تحت شرایط استریل مقدار ml ۱ از کشت اول به محیط کشت YPG براث جدید اضافه شد و تحت شرایط قبلی انکوبه شد. پس از h ۴۸ به‌منظور جداسازی کلنی مخمرها، از نمونه مایع روی YPG آگار به روش خطی، کشت داده شد و به مدت h ۴۸ در دمای °C ۳۰ انکوبه شد.

نمونه‌های مایع پساب در ظروف استریل جمع‌آوری شد و پس از انتقال به آزمایشگاه رقت سریال تهیه شد. سپس، میزان ۱۰۰ µl از رقت‌های cfu/ml ۴-۱۰، ۵-۱۰، ۶-۱۰، ۷-۱۰ بر محیط‌کشت ypg آگار انتقال داده شد و کشت سطحی انجام شد. سپس، برای خالص‌سازی کلنی‌ها، بر روی همان محیط به روش کشت خطی، کشت داده شد و برای مدت ۴۸ h در انکوباتور ۳۰ °C قرار داده شد. کلنی‌های خالص به‌دست آمده برای مرحله بعد انتخاب شدند (۱۴ و ۱۳).

بررسی خصوصیات ماکروسکوپی و میکروسکوپی مخمرهای مولد آنزیم زایلاناز

ارزیابی خصوصیات مورفولوژی و ماکروسکوپی کلنی‌ها با بررسی اندازه‌ی کلنی، شکل، حاشیه و جلاء مخمرها روی پلیت محیط جامد انجام شد. سپس، جهت تهیه اسمیر، کلنی منفرد روی لام قرار داده شد و با چند قطره آبی متیلن رنگ‌آمیزی شد. پس از گذشت ۲ min لام با آب مقطر استریل شستشو شد و زیر میکروسکوپ با عدسی‌های مختلف ۴ و ۱۰ و ۴۰ و ۱۰۰ از لحاظ میکروسکوپی بررسی شد (۱۲ و ۱۱).

رسم منحنی استاندارد سنجش فعالیت آنزیم زایلاناز

برای تهیه نمودار استاندارد قند ۵ کربنه زایلوز، ابتدا محلول ۲ gr زایلوز در ۱ lit آب مقطر حل شد و محلول ۲ gr/l زایلوز حاصل شد. برای ایجاد محلول کاملا پایدار، این فرآیند تهیه یک روز قبل انجام شد. سپس، رقت‌های متفاوت زایلوز با غلظت ۰ mM تا ۶/۵ در هر ویال تهیه شد و در مرحله بعد به هر کدام ۱ ml معرف دی نیتروسالسیلیک اسید افزوده شد و به مدت ۱۰ min در آب جوش قرار داده شد. سپس، جذب نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر دو شعاعی درطول موج ۵۴۰ nm خوانده شد (۱۱).

تولید آنزیم زایلاناز توسط مخمرهای خالص‌سازی و جداسازی شده

ابتدا ۱۰۰ ml محیط کشت اختصاصی زایلان براث تهیه شد وسپس، از مخمر خالص‌سازی شده به محیط‌کشت اختصاصی زایلان براث تلقیح شد. محیط زایلان براث برای مدت ۴۸ h در دمای ۳۰ °C و سرعت هوادهی ۱۲۰rpm انکوبه شد. هر ۲۴ h یک بار مقدار ۵ ml از محیط کشت برداشته شد و به مدت ۱۰ min با دور ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. سپس، فعالیت آنزیم زایلاناز در سوپرناتانت به روش DNS اندازه‌گیری شد. سپس، جذب حاصل از قند آزاد شده از تجزیه زایلان در طول‌موج ۵۴۰ nm اندازه گیری و ثبت شد. طبق تعریف، هر واحد فعالیت آنزیمی برابر است با مقدار آنزیمی که در ۱ min، در شرایط خاص و مشخص ۱ µmol سوبسترا را به محصول تبدیل کند (۱۵).

اندازه‌گیری کمی فعالیت آنزیم زایلاناز

ابتدا سوبسترا تهیه شد و برای انحلال بهتر ۱۰ min در دمای ۵۰°C فور قرار داده شد. سپس، ۹۰۰ µl از محلول سوبسترا به ۳۰۰ µl آنزیم (حاصل از سوپرناتانت سوسپانسیون میکروبی محلول با دور ۱۰۰۰۰ rpm و دمای ۴ °C و به مدت ۱۰ min) افزوده شد. پس از گذشت ۲۰ min در دمای ۵۰°C انکوبه شد و ۱۸۰۰ µl معرف دی نیترو سالسیلیک اسید حاوی ۱۲۰۰ µl معرف DNS و ۶۰۰ µl نمک راشل، به‌صورت مجزا و جداگانه اضافه شد و ۱۵ min در دمای ۱۰۰ °C در بن‌ماری قرار داده شد. پس از گذشت زمان لازم به سرعت جذب نمونه‌ی مورد نظر در طول موج ۵۴۰ nm خوانده شد و نتایج ثبت شد (۱۶).

مقایسه منحنی رشد مخمر مولد زایلاناز با منحنی تولیدآنزیم زایلاناز

از پیش‌کشت اولیه بر محیط YPD براث با غلظت اولیه استاندارد معادل کدورت نیم مک فارلند ۳ ml برداشته جهت کشت و بررسی میزان رشد نمونه به ۱۰۰ ml محیط اختصاصی زایلان براث تلقیح شد. پس از کشت نمونه در محیط اختصاصی زایلان براث، میزان کدورت حاصل از رشد میکروارگانیسم هر ۹ h یکبار به دلیل کند رشد بودن مخمر تا فاز سکون ادامه و در طول موج ۶۰۰ nm با بلانک مقایسه و میزان جذب آن توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر دو شعاعی اندازه‌گیری و نمودار و منحنی رشد حاصل از آن توسط نرم‌افزار گراف پد ترسیم شد (۱۷).

رسم منحنی استاندارد پروتئین و اندازه‌گیری فعالیت ویژه‌ی آنزیمی

برای رسم منحنی استاندارد پروتئین به روش لوری از کیت سنجش پروتئین شرکت تالی ژن پارس استفاده شد. ابتدا ۲۰۰ µl بافر سیترات با اسیدیته ی ۵/۵ M و ۰/۰۵ به ۳۰۰ µl از نمونه‌ی موردنظر اضافه شد. طبق پروتکل کیت سنجش پروتئین شرکت تالی ژن پارس ۴۵۰ µl معرف A افزوده و به مدت ۱۰ min در بن ماری ۵۰ °C قرار داده شد. سپس، ۵۰ µl معرف B به مدت ۱۰ min در دمای اتاق قرار داده شد و در نهایت ۱/۵ ml معرف C افزوده شد و به مدت ۱۰ min در دمای ۵۰ °C در شرایط تاریک در بن ماری قرار داده شد. پس از گذشت زمان سریعاً جذب نوری آن را در طول موج ۶۵۰ nm خوانده و بررسی شد (۱۸).

بررسی خصوصیات مولکولی مخمرهای مولد آنزیم زایلاناز

برای بررسی خصوصیات مولکولی مخمرهای مولد آنزیم زایلاناز، از بافر استخراج استفاده شد. این بافر حاوی g/l ۲۰پودر CTAB و g/l ۱۰Tris-HCl با غلظت mM ۱۰۰ و NaCl۱۰g/l با غلظت M ۱/۴ g/l ۵ EDTA با غلظت mM ۵۰۰ و µl ۲ مرکاپتواتانول است. مقدار ml ۱ از بافر با µl ۵۰۰ از محیط‌کشت مایع حاوی مخمر ترکیب شد و به مدت h ۱ در دمای °C ۶۵ قرار گرفت. پس از آن، نمونه‌ها به مدت min ۱ با سرعت rpm ۸۰۰۰ سانتریفوژ شدند و به محلول رویی µl ۶۰۰ مخلوط ایزوآمیل الکل و کلروفرم با نسبت ۱:۲۴ افزوده شد و به مدت min ۱ لوله به آرامی تکان داده شد. مخلوط حاصل به مدت min ۸ با سرعت rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ شد. پس از سانتریفوژ دولایه در مخلوط ایجاد شد. لایه رویی به لوله دیگری منتقل شد و به اندازه هم حجم آن ایزوپروپانول سرد افزوده شد.

جدول۱. توالی پرایمر مورد استفاده در PCR

Name	Sequence	Accession Number	Target length
F1R (فوروارد)	5’-CATTAAATCAGTTATCGTTTATTTG-3’	Universal	789 bp
R1Y (ریورس)	5’-TGATACCCCCGACCGTCCC-3’		

جدول۲. حجم و غلظت مواد مورد استفاده در PCR

ماده	غلظت استوک	غلظت برای واکنشPCR	حجم نهایی در ۲۵ µl
آب مقطر	–	–	۱۸/۰۵ µl
بافرPCR	X۱۰	X۱	۲/۵ µl
کلرید منیزیم	۵۰ mM	mM ۱/۵	۰/۷۵ µl
dNTP	۱۰ mM	۲۰۰ µM	۰/۵ µl
پرایمر پیشرو	۱۰ µM	µM ۰/۴	۱ µl
پرایمر معکوس	۱۰ µM	µM ۰/۴	۱ µl
نمونه DNA استخراجی	متغیر	۱	۱ µl
Taq پلی‌مراز	۵ U/µl	یونیت۱	۰/۲ µl
حجم نهایی			۲۵ µl

جدول ۳. سیکل و میزان دمای مراحل مختلف فرایند PCR جهت تکثیر قطعات

بخش	تعداد چرخه	دما/ زمان واسرشته شدن	دما/زمان اتصال آغازگر	دما/زمان طویل‌شدن
۱	۱	۵ min / ۹۴ ºC	–	–
۲	۳۵	۳۰ s / ۹۴ ºC	۴۰ s / ۵۵ ºC	۳۰ s / ۷۲ ºC
۳	۱	–	–	۵ min/ ۷۲ ºC

مخلوط به آرامی تکان داده شد و به مدت h ۱ در فریزر با دمای ۲۰ ºC- قرار گرفت. سپس به مدت min ۵ با سرعت ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد و مولکول‌های DNA دو بار با الکل اتانول ۷۰ ٪ شستشو داده شدند و هر دو بار به مدت min ۱ با سرعت rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ شدند. رسوبات در دمای ۳۷ ºC به مدت h ۲ قرار داده شدند تا خشک شوند. DNA حاصل در µl ۱۰۰ آب مقطر حل و در فریزر با دمای ۲۰ ºC- نگهداری شد. فرایند تکثیر قطعات نمونه جدایه‌ی مجهول با استفاده از توالی پرایمر ذکر شده در جدول۱ و حجم‌های مواد مورد نیاز برای PCR مطابق جدول ۲ طی سیکل و دوره و میزان حرارت‌دهی انجام شد (جدول ۳). الکتروفورز روی ژل آگارز به‌طورکلی برای تفکیک و تعیین ماهیت و خالص سازی قطعات DNA استفاده می‌شود. در این مطالعه به‌منظور تایید وجود و اختصاصی بودن قطعات تکثیرشده با PCR از ژل آگارز ۱٪ استفاده شد. برای این کار میزان µl ۶ از هر محصول PCR با µl ۱ بافر لودینگ مخلوط و بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد. همچنین، برای مشخص کردن اندازه محصولات تکثیر شده، مقدار µl ۱ از شناساگر اندازه DNA اضافه شد. به‌طورکلی یک روش مناسب برای ارزیابی اندازه DNA قیاس کردن با رشته‌های DNA است با نام DNA ladder است که هم زمان با نمونه‌ها در یکی از چاهک‌ها بارگذاری می‌شوند. پس از بارگزاری کلیه نمونه‌ها، برای مهاجرت نمونه‌های DNA، تانک الکتروفورز به دستگاه مولد جریان با ولتاژ مناسب متصل می‌شود. در این مطالعه الکتروفورز نمونه‌ها در ولتاژ V ۷۵ و به مدت min ۴۵ انجام شد.

برای ردیابی مولکولی نمونه‌های مورد مطالعه، با استفاده از پرایمرهای یونیورسال فوروارد و ریورس قطعه‌ای از 18srRNA تکثیر و برای تعیین توالی به شرکت پیشگام ارسال شد. توالی‌های به‌دست آمده به کمک سرور BLAST مورد ارزیابی هومولوژی قرار گرفتند. سپس، توالی نمونه توسط نرم‌افزار Finch TV و Mega x بررسی و درخت فیلوژنی آن ترسیم شد و نمونه در بانک جهانی ژن در NCBI ثبت شد (۱۲).

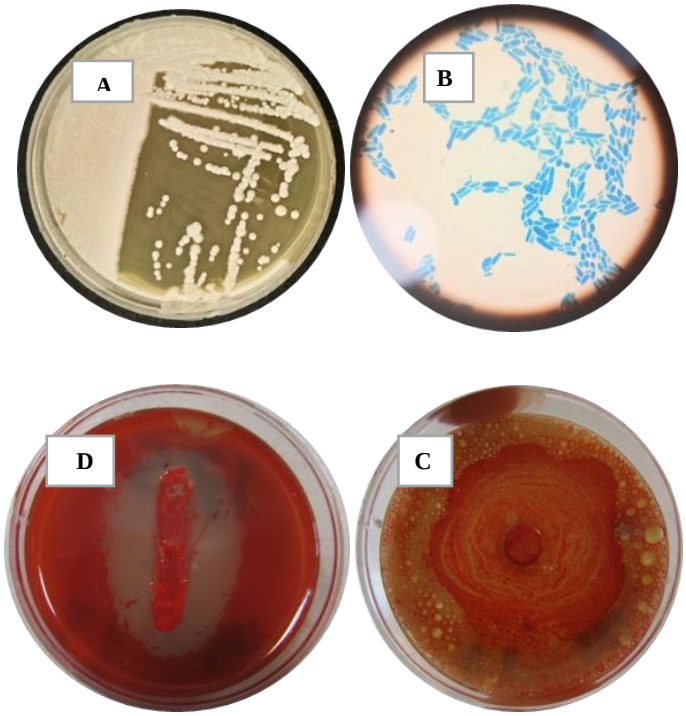
شناسایی مولکولی نمونه مخمر مولد آنزیم زایلاناز

برای تهیه ژل آگارز ۱٪، ابتدا gr ۰/۲۵ پودر آگارز با ml ۲۵ بافر TBE1X در داخل بشر حل شد و به مدت min ۱ در ماکروویو حرارت داده شد و محلول یکنواخت و شفافی به‌دست آمد. پس از گذشت حدود min ۱، مقدار µl ۱ Green viewer به آن اضافه و به آرامی هم زده شد تا با محتویات بشر به خوبی مخلوط شود. سپس این ترکیب داخل سینی ژل ریخته شد و شانه ژل داخل سینی قرار داده شد. پس از بستن ژل شانه به آرامی از داخل ژل خارج شد و سینی ژل داخل تانک الکتروفورز افقی قرار داده شد. در این مرحله مقداری بافر TBE1X داخل تانک ریخته شد، به طوری که سطح ژل با بافر پوشیده شد. مقدار µl ۶/۵ از نمونه‌های DNA در حدود µl ۱ Loading Dye حل وداخل چاهک ها ریخته شد. پس از بارگذاری نمونه‌ها، جریان الکتروفورز روی ولتاژ ۷۵ تنظیم شد و در نهایت ژل در دستگاه UV DOC مشاهده شد (۱۲).

نتایج

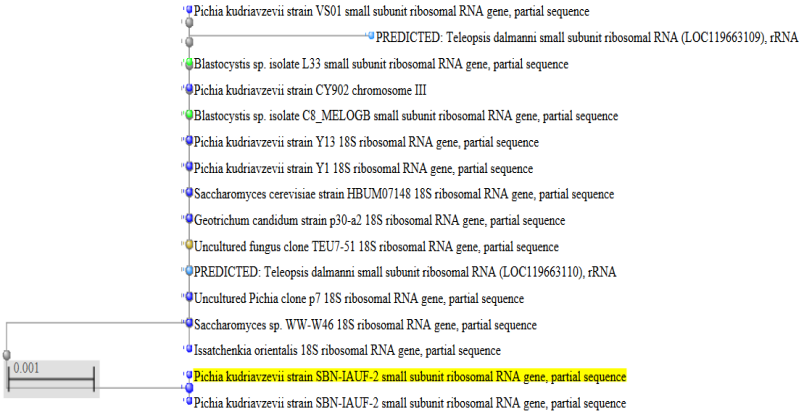
در مجموع آزمایشات انجام شده تعداد ۳۷ نمونه از خاک ها و پساب کارخانجات مختلف جمع‌آوری شد که از این نمونه ها تعداد ۱۰ عدد جدایه مخمری خالص سازی شدند. از تعداد کل ۱۰ جدایه مخمری، تعداد ۴ جدایه، مخمر زایلاناز مثبت تشخیص داده شدند. همان طور که در شکل ۱ نشان داده شده است نمونه *پیچیا کودریاوزوی* strain SBN-IAUF-2 با قطر هاله بالاتر نسبت به سایرین منتخب و جهت آزمون سنجش کمی استفاده شد.

شکل ۲ نتایج حاصل از الکتروفوز قطعه تکثیر شده S-۱۶rDNA را پس از انجام PCR نشان می‌دهد. همان طورکه در این شکل نشان داده شده است محصول حاصل دارای وزن مولکولی حدود ۴۸۰ bp می‌باشد. پس از تعیین ترادف قطعه حاصل و بلاست آن، مشخص شد این توالی به مخمر *پیچیا کوردیاوزوی* متعلق می‌باشد. شکل ۳ درخت فیلوژنیک این مخمر را نشان می‌دهد. این گونه مخمری به عنوان بهترین مخمر مولد آنزیم زایلاناز در بانک جهانی ژن تحت عنوان *Pichia kudriavzevii* strain SBN-IAUF-2 به ثبت رسید. از میان تعداد کل جدایه‌ی مخمری خالص سازی شده از منابع مختلف، مخمر *Pichia kudriavzevii* strain SBN-IAUF-2 جداسازی شده از خاک مرغداری دانیال دارای بیشترین فعالیت آنزیمی شناخته شد. جدول ۴ و شکل‌های ۴ و ۵، فعالیت ویژه آنزیم زایلاناز و فعالیت آنزیم زایلاناز حاصل از *Pichia kudriavzevii* strain SBN-IAUF-2 را پس از مدت زمان‌های h ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ نشان می‌دهد. همان طور که از شکل‌های ۴ و ۵ مشخص شده است، بیشترین فعالیت آنزیمی معادل u/ml ۱۳۱۷/۵۶ و فعالیت ویژه معادل u/mg ۳۲۷۱/۶۵۲ پس از h ۴۸ اندازه‌گیری شده است که هم در سطح کیفی و هم در سطح کمی قابل قبول می‌باشد. شکل ۶ منحنی رشد مخمر مورد نظر را نشان می‌دهد. با توجه به این شکل و مقایسه آن با شکل‌های قبل مشخص می‌شود که بیشترین فعالیت آنزیم در h ۴۸ و در دوره رشد مخمر اندازه‌گیری شده است.



شکل ۱. نتایج حاصل از بررسی ماکروسکوپی و میکروسکوپی نمونه تست سنجش کیفی و هاله تجزیه سوبسترای داخل محیط‌کشت توسط آنزیم برون‌سلولی مخمر *Pichia kudriavzevii* جدایه SBN-IAUF-2؛ A: تصویر ماکروسکوپی و مورفولوژی کلنی جدایه مخمر؛ B: تصویر میکروسکوپی نمونه جدایه مخمر؛ C: تصویر تشکیل هاله تجزیه زایلان توسط تست چاهک پلیت؛ D: تصویر تشکیل هاله تجزیه زایلان توسط کشت خط نمونه

شکل ۲. نتایج حاصل از ژل الکتروفورز 18s-rDNA جدایه مخمری ، مارکر: 1000 bp،
Neg: کنترل منفی، اندازه باند مشخص شده در ستون جدایه: 480 bp

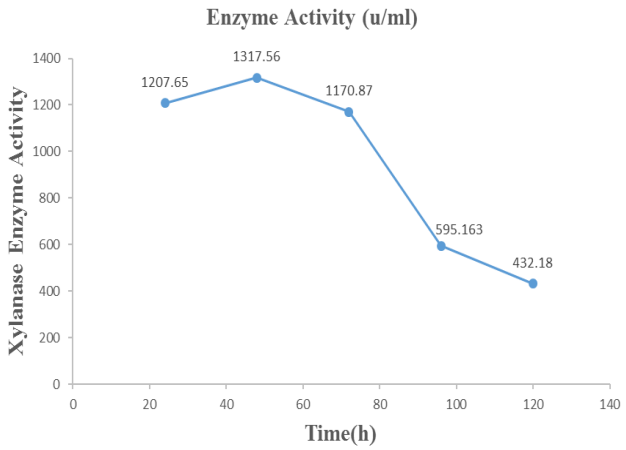


شکل ۳. نتیجه حاصل از ترسیم درخت فیلوژنی جدایه SBN-IAUF-2 مخمر *Pichia kudriavzevii*

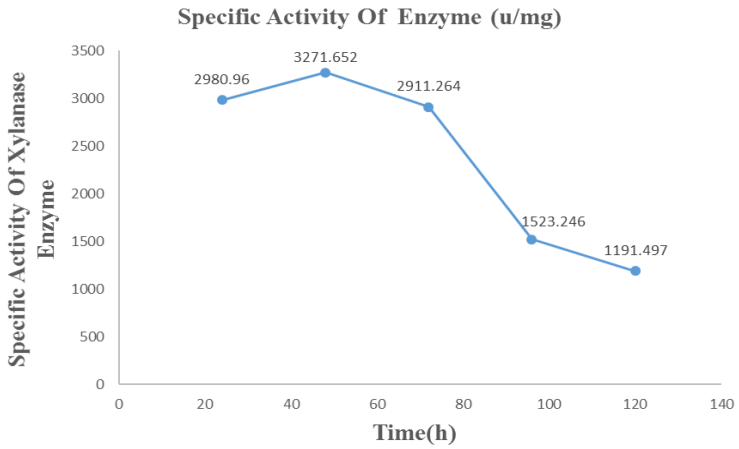
جدول ٤. فعالیت آنزیم و فعالیت ویژه‌ی آنزیم Pichia kudriavzevii strain SBN-IAUF-2 طی ۱۲۰ h

ردیف	۲۴ h (u/ml)	۴۸ h (u/ml)	۷۲ h (u/ml)	۹۶ h (u/ml)	۱۲۰ h (u/ml)
نمونه مخمر Pichia kudriavzevii strain SBN-IAUF-2	۱۲۰۷/۶۵	۱۳۱۷/۵۶	۱۱۷۰/۸۷	۵۹۵/۱۶۳	۴۳۲/۱۸

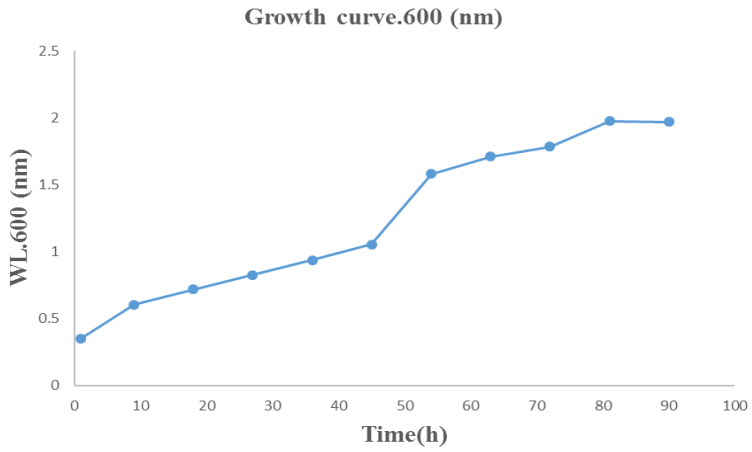
ردیف	۲۴ h (u/ mg)	۴۸ h (u/ mg)	۷۲ h (u/ mg)	۹۶ h (u/ mg)	۱۲۰ h (u/ mg)
نمونه مخمر Pichia kudriavzevii strain SBN-IAUF-2	۲۹۸۰/۹۶	۳۲۷۱/۶۵۲	۲۹۱۱/۲۶۴	۱۵۲۳/۲۴۶	۱۱۹۱/۴۹۷



شکل ٤. فعالیت ویژه‌ی آنزیم زایلاناز نمونه جدایه مخمری *Pichia kudriavzevii strain* SBN-IAUF-2 طی ۱۲۰ h



شکل ۵. فعالیت آنزیم زایلاناز حاصل از نمونه جدایه مخمری *Pichia kudriavzevii* strain SBN-IAUF-2 طی ۱۲۰ h



شکل ٦. منحنی رشد نمونه جدایه مخمری *Pichia kudriavzevii* strain SBN-IAUF-2 طی ۷۲ h

بحث و نتیجه‌گیری

آنزیم‌های میکروبی در حوزه‌ی بیوتکنولوژی از تولیدات در حال توسعه محسوب می‌شوند و ارزش اقتصادی آنزیم‌های صنعتی در سال ۱۹۹۰ در بازار جهانی یک میلیارد دلار آمریکا بوده است (۱۹). آنزیم‌های زیستی و میکروبی در برابر دیگر کاتالیست‌های شیمیایی مزایای قابل‌توجهی از جمله سوبسترای اختصاصی، فعالیت‌های کاتالیتیکی بالا، امکان تولید بالا، قابلیت تجزیه‌پذیری زیستی دارند و برای محیط زیست مخرب محسوب نمی شوند (۲۰). زایلان‌ها بخش عمده‌ای از ضایعات کشاورزی و صنایع غذایی را تشکیل می‌دهند از این‌رو زایلانازها برای تبدیل زایلان به زایلوز در این ضایعات مورد استفاده قرار می‌گیرند. زایلانازهای زیستی میکروبی کاتالیست‌های مناسبی برای تجزیه زایلان هستند، زیرا در شرایط روتین و معمول تولید و اختصاصیت سوبسترایی بالایی داشته و فراورده‌های خطرناک و سمی تولید نمی‌کنند (۲۱). به دلیل تغییرات بین آزمایشگاهی روش‌های سنجش زایلاناز و مشکلات ناشی از آن، آژانس بین المللی انرژی پس از بررسی های متعدد روش سنجش استاندارد بر پایه بستر و بر پایه روش DNS را مورد تایید قرار داده است (۱۵) اگرچه پروسه‌ی ساموگی نلسون مزایای مشخصی دارد، اما اغلب مزایای آن نسبت به روش DNS کمتر است. مزایای عمده‌ی این روش استوکیومتری پاسخ رنگ‌ها با الیگوساکاریدها با افزایش درجه پلیمریزاسیون و همچنین حساسیت سنجش است. همچنین، این روش برای اندازه‌گیری قندهای احیا کننده، حتی هنگام ثابت بودن سایر شرایط سنجش، از حساسیت کمتری برخوردار است. از عوامل مهم سنجش فعالیت زایلاناز سنجش زایلاناز و مقایسه‌ی بستر زایلان استفاده شده در آن است (۲۲). فعالیت آنزیمی ۱ و ۴ زایلاناز با تخمین زایلوز آزاد شده در محیط حاوی بلغور جو دو سر به عنوان سوبسترا و استفاده زایلان ۱ ٪ و با روش DNS فعالیت آنزیمی سنجش شد (۲۳). فعالیت زایلاناز با استفاده از زایلان درخت توس به‌عنوان سوبسترا ۱٪ در بافر سیترات فسفات در دمای ۵۰ °C مدت ۳۰ min انکوبه سپس قند آزاد شده توسط روش DNS با استفاده از زایلوز به‌عنوان استاندارد میزان فعالیت تخمین زده شد (۲۴). میزان فعالیت آنزیم زایلاناز با افزودن معرف سوموگی قندهای کاهش دهنده به عنوان زایلوز تعیین شدند. یک واحد فعالیت انزیمی زایلاناز مقدار آنزیمی است که بتواند ۱ µmol زایلوز را در مدت زمان ۱ min از سوبسترای زایلان آزاد کند. (۲۵و۲۶).). Duarte و همکاران (۲۰۱۳) تولید آنزیم های لیپاز و پروتئاز و زایلاناز را توسط گونه‌های مخمری در دمای کم و متوسط گزارش کردند. از ۹۷ گونه مخمر جمع آوری شده بیشترین فعالیت پروتئولیتیک، لیپولیتیک و زایلانولیتیک در گونه‌های بازیدیومیکوتا مشاهده شد که عمدتاً از ستاره دریایی، گلسنگ‌ها، خارپوست دریایی و رسوبات دریایی جداسازی شده بودند (۲۷). Morais و همکاران (۲۰۱۳) با جداکردن گونه‌های جدید مخمر از چوب پوسیده در اقیانوس اطلس این مخمرها از غنی‌سازی با استفاده از نیتروژن پایه مخمر محیط‌کشت YNB گونه‌ی جدید مخمر *باسیلیفرم آسکوپورس* از جنس سوجیامیلا و نزدیکترین نسل به توالی *کاندیدا ماریوننسیز* است. مخمر قادر به رشد در محیط کشت با زایلان به‌عنوان تنها منبع کربن و آنزیم‌های خارج‌سلولی با فعالیت زایلانولیتیک تولید می‌کند (۹). Salmon و همکاران (۲۰۱۴) اثر سوبستراهای مختلف سلولز، کربوکسی‌متیل سلولز، زایلان و زایلوز را در تولید آنزیم‌های سلولاز و زایلاناز توسط *گانودرما اپلانوم* بررسی کردند. (۲۸). در این پژوهش بهترین مخمر مولد آنزیم زایلاناز از خاک مرغداری بر اساس تشکیل هاله تجزیه روی سوبسترای زایلان غربالگری و خالص‌سازی شد. بررسی منحنی رشد و مقایسه آن با فعالیت آنزیمی در زمان‌های مختلف نشان داد که بیشترین تولید آنزیم پس از ۴۸ h و در ابتدای فاز رشد لگاریتمی مخمر اتفاق افتاده است. از میان مخمرهای جداسازی‌شده بیشترین فعالیت آنزیمی به نمونه مخمر *Pichia kudriavzevii* strain SBN-IAUF-2 با حداکثر فعالیت آنزیمی (u/ml) ۱۳۱۷/۵۶ و حداکثر فعالیت ویژه‌ی آنزیمی (u/mg) ۳۲۷۱/۶۵۲ پس از ۴۸ h در دمای ۳۰ °C و سرعت

هوادهی rpm ۱۲۰ تعلق داشت. بررسی‌ها نشان داده است این اولین گزارش از تولید زایلاناز توسط مخمر *Pichia kudriavzevii* strain SBN-IAUF-2 در جهان می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از حوزه معاونت پژوهشی و مسئولین محترم آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان به دلیل همکاری صمیمانه کمال سپاسگزاری را دارند.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافعی میان نویسندگان وجود ندارد.

منابع

1. Benedetti, M., et al., Green production and biotechnological applications of cell wall lytic enzymes. Applied Sciences, 2019. 9(23): p. 5012.
2. Sunkar, B., B. Kannoju, and B. Bhukya, Optimized Production of Xylanase by Penicillium purpurogenum and Ultrasound Impact on Enzyme Kinetics for the Production of Monomeric Sugars From Pretreated Corn Cobs. Frontiers in microbiology, 2020. 11: p. 772.
3. Bhardwaj, N., B. Kumar, and P. Verma, A detailed overview of xylanases: an emerging biomolecule for current and future prospective. Bioresources and Bioprocessing, 2019. 6(1): p. 1-36.
4. Malhotra, G. and S.S. Chapadgaonkar, Production and applications of xylanases–an overview. BioTechnologia. Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology, 2018. 99(1).
5. Singh, A. and P. Mishra, Microbial pentose utilization: current applications in biotechnology. 1995: Elsevier.
6. Seemakram, W., et al., Purification, characterization and partial amino acid sequences of thermo-alkali-stable and mercury ion-tolerant xylanase from Thermomyces dupontii KKU–CLD–E2–3. Scientific Reports, 2020. 10(1): p. 1-10.
7. Beg, Q., et al., Microbial xylanases and their industrial applications: a review. Applied microbiology and biotechnology, 2001. 56(3): p. 326-338.
8. Polizeli, M., et al., Xylanases from fungi: properties and industrial applications. Applied microbiology and biotechnology, 2005. 67(5): p. 577-591.
9. Morais, C.G., et al., Sugiyamaella xylanicola sp. nov., a xylan-degrading yeast species isolated from rotting wood. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2013. 63(Pt_6): p. 2356-2360.
10. McCleary, B.V. and P. McGeough, A comparison of polysaccharide substrates and reducing sugar methods for the measurement of endo-1, 4-β-xylanase. Applied biochemistry and biotechnology, 2015. 177(5): p. 1152-1163.
۱۱. سلطان دلال م م، ترکاشوند ن، شریفی یزدی م ک، موسیوند م، هاشمی م. ۱۳۹۴. استفاده از پسماندهای کشاورزی- صنعتی در تولید آنزیم زایلاناز سویه بومی *باسیلوس سابتیلوس*، مجله دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، ۱۳، ۲: ۶۹- ۷۸
۱۲. لطفی م، بهشتی‌مآل ک، نیری ه. ۱۳۹۳. بررسی تولید آنزیم پروتئاز قلیایی توسط مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* با استفاده از محیط‌کشت‌های مختلف، فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها، سال چهارم، ش ۱۴، ۷۰-۶۱
13. Strauss, M., et al., Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-Saccharomyces wine yeasts. Journal of applied microbiology, 2001. 91(1): p. 182-190.
14. Lara, C. A, Santos, R. O, Cadete, R. M, Ferreira, C, Marques, S, Gírio, F, Fonseca, C. 2014. Identification and characterisation of xylanolytic yeasts isolated from decaying wood and sugarcane bagasse in Brazil. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *105*(6), 1107-1119
15. Bailey, M.J., P. Biely, and K. Poutanen, Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. Journal of biotechnology, 1992. 23(3): p. 257-270.
16. Guan, G.-Q., et al., Production and partial characterization of an alkaline xylanase from a novel fungus Cladosporium oxysporum. BioMed research international, 2016. 2016.
17. Pumam, Y., et al., Production, purification, and characterization of thermostable alkaline xylanase from anoxybacillus kamchatkensis NASTPD13. Frontires in Bioengineering and Biotechnology, 2018
18. Ayat, a a., Comparative study for production and characterization of D-Xylanase produced from locally isolate aspergillus niger by submerged and solid state fermentation. Environmental Application & Science, 2016,. 11(2).189-197
19. Kumar, L., et al., Modulation of xylanase production from alkaliphilic Bacillus pumilus VLK-1 through process optimization and temperature shift operation. 3 Biotech, 2014. 4(4): p. 345-356.
20. Motta, F., C. Andrade, and M. Santana, A review of xylanase production by the fermentation

of xylan: classification, characterization and applications. Sustainable degradation of lignocellulosic biomass-techniques, applications and commercialization, 2013. 1.
21. Kulkarni, N., A. Shendye, and M. Rao, Molecular and biotechnological aspects of xylanases. FEMS microbiology reviews, 1999. 23(4): p. 411-456.
22. Khanna, P., S.S. Sundari, and N.J. Kumar, Production, isolation and partial purification of xylanases from an Aspergillus sp. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1995. 11(2): p. 242-243.
23. Miller, G.L., Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical chemistry, 1959. 31(3): p. 426-428.
24. Abbas, A., et al., Partial Purification and Characterization of a Xylanase from Trichoderma Harzianum. Journal of the Chemical Society of Pakistan, 2012. 34(6).
25. Biely, P., D. Mislovičová, and R. Toman, Soluble chromogenic substrates for the assay of endo-1, 4-β-xylanases and endo-1, 4-β-glucanases. Analytical biochemistry, 1985. 144(1): p. 142-146.
26. Liu, W., et al., Production, partial purification and characterization of xylanase from Trichosporon cutaneum SL409. Process Biochemistry, 1998. 33(3): p. 331-336.
27. Duarte, A., et al., Taxonomic assessment and enzymes production by yeasts isolated from marine and terrestrial Antarctic samples. Extremophiles, 2013. 17(6): p. 1023-1035.
28. Salmon, D.N.X., et al., Analysis of inducers of xylanase and cellulase activities production by Ganoderma applanatum LPB MR-56. Fungal biology, 2014. 118(8): p. 655-662.

Isolation and identification of xylanase-producing yeast, *Pichia kudriavzevii* used in the food industry

Hoda Salmanizadeh [1], Keivan Beheshti-Maal[2*], Hashem Nayeri [3]

[1]Department of Microbial Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
[2]Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
[3]Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

Abstract

Today, among 400 types of identified enzymes, approximately 200 types are used in industry. The global enzyme market depict a major portion for xylanase, cellulase and pectinase at around 20%. Xylanase enzyme is used in different industries such as food industry, animal and poultry feed, paper industry and pharmaceutical industry. The aim of this study was to identify xylanase-producing yeast. Effluents from factories and poultry farms in Isfahan were sampled. In order to isolate the xylanase-producing yeasts, the samples were cultured on YPG medium containing beech wood using streak plate method. The enzyme activity was measured by DNS method and protein assay was done by Laurie method. The molecular identification of the best xylanase-producing isolate was performed using PCR followed by sequencing and blasting procedures. The yeast *Pichia kudriavzevii* strain SBN-IAUF-2 was isolated as the best xylanase producing yeast with the maximum enzyme activity of 1317.56 (u/ml) and maximum specific enzyme activity of 3272/3271 (u/mg) after 48 hours at 30 degree Celsius and aeration speed of 120 rpm. The 18s-rDNA partial sequence of the isolated yeast was deposited in GenBank, NCBI under the accession number of MZ816945. This is the first report of isolation and identification of xylanase-producing yeast *Pichia kudriavzevii* strain SBN-IAUF-2 conducted in Iran and it is recommended to be applied for optimal production of xylanase.

Keywords: Xylanase enzyme, *Pichia kudriavzevii*, yeast

* beheshtimaal@iaufala.ac.ir