توان شماری از قارچ ها در ساخت آنزیم لاکاز، هنگام رشد بر روی برخی از مانده‌های کشاورزی

علی اکبر صفری سنجانی، گیتی امتیازی، شاپور حاج رسولیها و حسین شریعتمداری

به ترتیب : استادیار گروه خاکشناسی دانشگاه بوعلی سینا ، دانشیار گروه زیست‌شناسی دانشگاه اصفهان و استاد و استادیار گروه خاکشناسی دانشگاه صنعتی اصفهان

مقدمه

لاکاز(E.C.1.10.3.2) آنزیمی اکسیداز و برون یاخته‌ای است که در ساختمان خود مس دارد . این آنزیم در فروزینگی‌لیگنین کارایی بالایی دارد و می‌تواند فنل‌های با گروه‌های جانشینی ارتو، متا و پارا را اکسید کند . آنزیم لاکازمی‌تواند مونوفنل‌ها، پلی‌فنل‌ها، فنل‌های با گروه‌های جانشینی متوکسی، آمینوفنل‌ها، و فنیلن دی آمین را اکسیدکند ولی تیروزین را نمی‌تواند . لاکاز همانند پراکسیداز وابسته به منگنز، می‌تواند یک الکترون از گروه‌های فنلی‌بگیرد و رادیکال‌های فنوکسی پدید آورد و بدین گونه در فرایند هوموفیکاسیون مواد آلی در خاک کارایی ویژه ای دارد (۳،۱۷،۱۸،۱۹). آنزیم لاکاز را نخستین بار در سال ۱۸۸۳ از شیره یک درخت ژاپنی از جنس سماق جداسازی کردند (۳). این آنزیم در گیاهان و بسیاری از قارچها ساخته می‌شود . ولی شگفت انگیز است که این آنزیم‌در کشتگاه قارچ *فانروکت کریزوسپوریوم* که یکی از ریزجانداران کاری پوساننده لیگنین است دیده نشده‌است(۱۳و ۱۵). در این نوشتار تلاش بر آن است که برخی از جنبه های فروزینگی زیستی مواد لیگنوسلولوزی و ساخت آنزیم لاکاز توسط شماری از قارچ ها هنگام رشد بر روی برخی از مانده‌های کشاورزی آشکار گردد.

مواد و روشها

برای ارزیابی توان قارچها در فروزینگی مانده های لیگنوسلولوزی، کنشوری یا فعالیت آنزیم لاکاز یک مخمر سلولولیتیک و قارچ‌های *آسپرژیلوس ترئوس، تریکود رماریسی، آرمیلاریا، پلی‌پوروس* و *فانروکت کریزوسپوریوم* در کشتگاه‌های (محیطهای) زیر ارزیابی و بررسی شد.

کشتگاه شماره ۱: برای تکثیر هر یک از قارچهای آزمایشی در دمای 27-30 °C و نگهداری آنها در یخچال با دمای 4 °C ، از کشتگاه آماده و جامد سیب‌زمینی-دکستروز-آگار (PDA) بهره‌گیری شد.

کشتگاه شماره ۲: برای سنجش توان قارچها در فرآوری آنزیم لاکاز از کشتگاه آبکی آویسل که یک لیتر آن‌دارای ترکیب‌های زیر است، بهره‌گیری شد (آویسل یک سلولز ریزبلوراست که از شرکت مرک خریداری شده است).

سلولز نامحلول ۱۰گرم، پروتئوز پپتون ۰/۵گرم، اوره ۰/۳گرم، توین-۸۰ ۰/۲ گرم، $(NH_4)_2SO_4$ ۱/۴گرم، $MgSO_4.7H_2O$ ۱/ گرم، K_2HPO_4 ۰/۱گرم، KH_2PO_4 ۰/۲گرم، $CaCl_2$ ۰/۳ گرم، $FeSO_4.7H_2O$ ۰/۰۰۵گرم، $CoCl_2$ ۰/۰۰۲ گـــــرم، $MnSO_4$ ۰/۰۰۱۶ گرم، $ZnSO_4.7H_2O$ ۰/۰۰۱۴گرم، وpH برابر ۵ .

کشتگاه شماره ۳: در کشت قارچها بر روی محیط آبکی مانده‌های کشاورزی، هر ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری دارای۱ گرم از کاه آسیاب‌شده (اندازه کوچکتر از ۲ میلی متر)گندم، جو، برنج، نخود، یا خاک اره چوب‌های جنگلی در۱۰۰میلی‌لیتر آب مقطر بود.

کشتگاه شماره ۴: در کشت قارچها بر روی محیط کم‌آب مانده‌های کشاورزی، هر ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری دارای۱ گرم از کاه آسیاب شده گندم، جو یا برنج و تنها ۵ میلی‌لیتر آب مقطر است.

کشتگاه شماره ۵: در کشت قارچها بر روی محیط کم‌آب مانده‌های کشاورزی که با خاک تیمار شده است، هر ارلن‌مایر ۲۵۰ میلی لیتری دارای ۱ گرم از کاه آسیاب شده گندم یا برنج، ۲۵ گرم خاک و ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر است . خاک‌بکار رفته در این کشتگاه‌ها از ژرفای ۰-۳۰ سانتی‌متری خاک یک کشتزار سیب زمینی در تراس بالایی رودخانه زاینده رود درمنطقه پل شهرستان اصفهان به روش مرکب نمونه برداری شده است(۱).

روش کشت قارچها و ارزیابی توان آنزیمی آنها: برای بررسی توان آنزیمی هر یک از قارچهای آزمایشی به اندازه cm^2 ۰/۲۵ از کشت قارچها در کشتگاه شماره ۱(PDA) ، در هر یک از کشتگاهها مایه زنی شده است . برای مایه زنی قارچهای‌تند رشد *آسپرژیلوس ترئوس*، *تریکودرما ریسی*، فانروکت کریزوسپوریم و مخمر از کشت ۳ روزه و برای مایه زنی قارچهای کندرشد *آرمیلاریا* و *پلی‌پوروس* از کشت ۷ روزه آنها بهره‌گیری شده است . کشت‌های آبکی قارچها، در دمای ^{o}C ۳۰-۲۷ درانکوباتور دارای دستگاه تکان‌دهنده (شیکر)با دوران ۱۲۰ دور در دقیقه و کشت‌های کم‌آب آنها در انکوباتور با دمای ^{o}C ۳۰-۲۷ نگهداری شد. کشت‌های آبکی قارچها در هر هفته به کمک کاغذ واتمن شماره (۱)پالایش و فعالیت آنزیم لاکاز تا ۳ هفته در آنهااندازه‌گیری شد . عصاره آنزیمی کشتگاه‌های کم‌آب قارچها پس از گذشت ۳ هفته با افزودن ۱۰۰ میلی لیتر بافر استات‌سدیم ۲۵ میلی مولار (پ-اچ ۵/۵)پس از۱/۵ساعت لرزاندن با دستگاه تکان‌دهنده به کمک کاغذ واتمن شماره (۱) پالایش‌گردید و فعالیت آنزیم لاکاز در آن اندازه‌گیری شد. ارزیابی کارایی آنزیم لاکاز به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر در محلول بافری ۵۰ میلی مولار فسفات سدیم در پ-اچ برابر ۵، که هرمیلی لیتر آن دارای ۷۵ میلی مول کاتکول است، انجام شد(۱۵).

نتایج و بحث

شکل ۱ کارایی آنزیم لاکاز قارچها در هر یک از کشتگاه‌های شماره ۲ و ۳ را نشان‌می‌دهد . قارچ *پلی‌پوروس* در میان قارچها بیشترین توان فرآوری آنزیم لاکاز را دارد . بیشترین کارایی اندازه‌گیری‌شده نزدیک۰/۰۵ واحد بر میلی‌لیتر است که در کشتگاه آبکی کاه گندم ارزیابی شده است . فرآوری آنزیم‌لاکاز این قارچ در کشتگاه‌های آبکی آویسل، کاه برنج و تراشه‌های چوب نزدیک همو کمی پایین‌تر از۰/۰۵ واحد آنزیمی بر میلی‌لیتر است . فرآوری آنزیم لاکاز با کاهش نسبت C/N در کاه جو وبویژه نخود در این کشتگاه‌ها کاهش می‌یابد تا جایی که در کشتگاه آبکی دارای کاه نخود به صفر نزدیک‌می‌شود . گزارش شده است که قارچها در زیستگاه‌های خود به هنگام کمبود نیتروژن، کربن و یا گوگرد لیگنینازبیشتری را می‌سازند و افزایش نیتروژن به ریخت اسیدهای آمینه گلوتامات، گلوتامین، هیستیدین و یا یون آمونیوم‌مایه کاهش ساخت لیگنینازها می‌شود(۸،۹ .)کم بودن کارایی آنزیم لاکاز قارچ *پلی‌پوروس* در کشتگاه کاه‌نخود می‌تواند به رشد کمتر این قارچ و بالا بودن نیتروژن کشتگاه وابسته باشد.

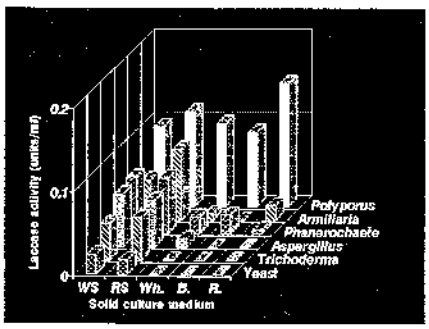
پس از قارچ *پلی‌پوروس*، قارچ *آرمیلاریا* تواناترین قارچ سازنده آنزیم لاکاز در این کشتگاه‌ها است . این‌قارچ در کشتگاه‌های آبکی دارای کاه گندم، جو و تراشه چوب بیشترین توان خود را نشان داده است که در آنهاکارایی آنزیم لاکاز نزدیک۰/۰۲۵ است . توانایی قارچهای *فانروکت کریزوسپوریوم* و *آسپرژیلوس ترئوس* درساخت آنزیم لاکاز در کشتگاه‌های آبکی دارای آویسل و کاه گندم بیشتر از کشتگاه‌های دیگر است، که نزدیک۰/۰۲۵ واحد آنزیمی برآورد شده است . قارچ آسپرژیلوس در کشتگاه‌های دیگر آنزیم چندانی نساخته است‌ولی قارچ *فانروکت کریزوسپوریوم* مانند دیگر بازیدیومیست‌ها، در کشتگاه‌های دارای کاه برنج و تراشه چوب،توان خود را در ساخت آنزیم لاکاز هر چند اندک نشان داده است.

توانایی قارچ *تریکودرما ریسی* در ساخت آنزیم لاکاز کمتر از قارچهای دیگر است . کارایی آنزیم لاکازاین قارچ در کشتگاه‌های دارای آویسل و کاه گندم بیشترین است که به ۰/۰۲ واحد آنزیمی نزدیک می‌شود . درمیان قارچها مخمر کمترین توان ساخت آنزیم لاکاز را از خود نشان می‌دهد . بیشترین کارایی ارزیابی شده این‌قارچ در کشتگاه دارای کاه گندم (نزدیک ۰/۰۱ واحد آنزیمی) است . بنابر این توان قارچهای آزمایشی درساخت و فرآوری آنزیم لاکاز، به ترتیب زیر است :*پلی‌پوروس*>*آرمیلاریا*> *فانروکت کریزوسپوریوم*>*آسپرژیلوس ترئوس*>*تریکودرما ریسی* > مخمر.

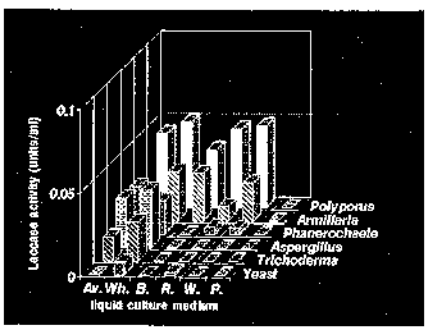
از برابری گزارشهای پیشین (۱۶) و نتایج کنونی چنین برمی آید که فرآوری آنزیم لاکاز درکشتگاه آلوده شده به ترکیب‌های آروماتیک بیشتر از کشتگاه دارای مانده‌های کشاورزی است . گزارش شده‌است که قارچها برای کاهش زیان افزودنی‌های آروماتیک فرآوری آنزیم‌های اکسید کننده و لاکاز خود را بالامی‌برند تا بتوانند در برابر آنها پایدار بمانند (۴،۵،۱۰،۱۲). نتایج ارزیابی آنزیم لاکاز در کشتگاه‌های کم‌آب مانده‌های کشاورزی (شکل ۲) نشان‌می‌دهد که در میان قارچها، قارچ *پلی‌پوروس* بیشترین توان فرآوری آنزیم لاکاز را دارد. بیشترین کارایی اندازه‌گیری شده نزدیک ۰/۱۵ واحد بر میلی‌لیتر است که در کشتگاه کم‌آب کاه برنج ارزیابی‌شده است . افزودن ۲۵ گرم خاک سترون، به‌کاه برنج ساخت آنزیم لاکاز آن قارچ را کاهش داده است و

به ۰/۱۱۸ واحد بر میلی‌لیتر رسانده است . فرآوری‌آنزیم لاکاز قارچ *پلی‌پوروس* در کشتگاه کم‌آب کاه گندم نیز بالا و نزدیک ۰/۱ واحد بر میلی‌لیتر است که درکشتگاه خاک + کاه گندم کمی کاهش داشته است . قارچ *پلی‌پوروس* در کشتگاه دارای کاه جو آنزیم لاکاز کمتری‌را ساخته است.

قارچ *آرمیلاریا* نیز مانند قارچ *پلی‌پوروس* بیشترین توان آنزیمی خود را در کشتگاه دارای کاه برنج نشان‌می‌دهد . این قارچ در کشتگاه‌های دارای کاه گندم و بویژه جو آنزیم لاکاز کمتری را می‌سازد . به هر گونه کارایی‌آنزیم لاکاز قارچ *آرمیلاریا* بسیار کمتر از *پلی‌پوروس* و نزدیک ۰/۰۲ واحد آنزیمی است . از سوی دیگر کارایی‌آنزیم لاکاز این قارچ در کشتگاه‌های خاک دار بسیار بیشتر از کشتگاه‌های بدون خاک است . برای نمونه درکشتگاه خاک + کاه برنج، کارایی آن نزدیک ۰/۰۸۵ واحد آنزیمی بر بر میلی‌لیتر است.



شکل۱ - میانگین کارایی آنزیم لاکاز فرآوری شده در کشتگاه‌های شماره ۲ و ۳پس از ۲۱ روز رشد در دمای$28\ ^{o}C$. Avآویسل،. Wh کاه گندم،. B کاه جو،. R کاه برنج،. W تراشه چوب و. P کاه نخود.



شکل۲- میانگین کارایی آنزیم لاکاز فرآوری شده در کشتگاه‌های شماره ۴ و ۵ پس از ۲۱ روز رشد در دمای $28\ ^{o}C$ WSخاک + کاه گندم،RS خاک + کاه برنج،. Wh کاه گندم،. B کاه جو،. R کاه برنج.

توانایی قارچ *فانروکت کریزوسپوریوم* در ساخت آنزیم لاکاز در کشتگاه‌های کم‌آب دارای کاه گندم و جوبیشتر از کاه برنج است، که نزدیک ۰/۰۳ واحد آنزیمی برآورد شده است . قارچ *آسپرژیلوس ترئوس* در کشتگاه‌گندم بیشترین توان (نزدیک ۰/۰۲ واحد آنزیمی) را داشته و در کشتگاه‌های دیگر آنزیم چندانی نساخته است. قارچ *تریکودرما ریسی* و مخمر در کشتگاه‌های کم‌آب کاه گندم، جو و برنج آنزیم چندانی را نمی‌سازند . ولی‌کارایی آنزیم لاکاز این قارچ‌ها مانند قارچ *آرمیلاریا*، در کشتگاه‌های خاک دار (بویژه خاک + کاه برنج) بسیاربیشتر از کشتگاه‌های بدون خاک است.

در باره کم بودن رشد و کارایی قارچ‌های سپید پوساننده چوب در خاک گزارش‌های فراوانی شده است. گفته می‌شود که خاک زیستگاه این قارچ‌ها نبوده و برای بهره‌گیری از آنها در خاک باید خاک را مناسب زیست‌آنها کرد (۲،۱۱). افزودن خاک به کشت قارچ *پلی‌پوروس* در کشتگاه‌های خاکدار با کاهش آنزیم لاکاز همراه‌است و این نتیجه با این یافته‌ها همخوانی دارد. از آنجایی که توان قارچ‌های دیگر در ساخت آنزیم لاکاز کم است، بالا بودن کارایی آنزیم لاکاز این‌قارچ‌ها در کشتگاه‌های خاکدار چند دلیل می‌تواند داشته باشد :یکی اینکه این قارچ‌ها در کشتگاه‌های خاکدار بهتربتوانند رشد کنند . دوم اینکه عصاره خاک ترکیب‌های

آروماتیکی را داشته باشد که در ارزیابی آنزیم لاکازدخالت کنند (۲،۶،۷،۱۴ .)به هر گونه این موارد در ارزیابی آنزیم لاکاز قارچ *پلی‌پوروس* نتوانسته استخود را نشان دهد. از آنجایی که رشد قارچها و کارایی دیگر آنزیم‌های لیگنوسلولولیتیک درکشتگاه‌های دارای کاه برنج و تراشه چوب در برابر کشتگاه‌های دیگر بسیار کم است (نتایج نشان داده نشده است) بنابراین بالا بودن کارایی‌آنزیم لاکاز این قارچها بویژه قارچ *پلی‌پوروس* در کشتگاه‌های دارای کاه برنج و تراشه چوب نشان از برانگیختگی‌قارچ ها برای ساخت این آنزیم در آن کشتگاه‌ها دارد.

منابع مورد استفاده

۱- صفری سنجانی، ع.ا . ۱۳۷۹ . فروزینگی زیستی برخی از مانده‌های کشاورزی و ارزیابی کارایی آنزیم‌های‌لیگنوسلولولیتیک قارچها در خاک . پایان نامه دکترا گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان.

2- Boyle, D., Wiesner, C., and Richardson, A., 1998. Factors affecting the degradation of poly aromatic hydrocarbons in soil by white-rot fungi, *Soil Biol. Biochem.*, 30:873-882.

3- Chefetz, B., Kerem, Z., Chen, Y. and Hadar, Y. 1998. Isolation and partial characterization of laccase from a thermophilic composted municipal solid waste. *Soil Biol. Biochem.* 30: 1091-1098.

4- Haars, A., Chet, I. and H ttermann, A. 1981. Effect of phenolic compounds and tannin on growth and laccase activity of *Fomes annosus*. *Eur. J. For. Pathol.* 11: 67-76.

5- Highley, T.L. and Ricard, J. 1988. Antagonism of *Trichoderma* spp. and *Gliocladium virens* against wood decay fungi. *Master. Org.* 23: 157-169.

6- Hoff, T., Liu, S., and Bollag, J. M., 1985. Transformation of halogen-, alkyl-, andalkoxy-substituted anilines by a laccase of *Trametes* versicolor, *Appl. Environ. Microbiol.*, 49,: 1040-1045.

7- H ttermann, A., Milstein, O., Nicklas B., Trojanowski, J., Haars, A. and Kharazipour, A. 1989. Enzymatic modification of lignin for technical use. P. 361-370 -In Glasser, W.G. ; and S., Sarkanen (Ed.). *Lignin: properties and materials*. American Chemical Society, Washington DC.

8- Jeffries, T.W., Choi, S. and Kirk, T.K. 1981. Nutritional regulation of lignin degradation by *phanerchaete chrysosporium* . *Appl. Environ. Microbiol.* 42: 290-296.

9- Keyser, P., Kirk, T.K. and Zeikus, J.G. 1978. Ligninolytic enzyme system of *Phanerochaete chrysosporium*: synthesized in the absence of lignin in response to nitrogen starvation. *J. Bacteriol.* 153: 790-797.

10- Lundell, T., Leonowicz, A, Rogalski, J. and Hatakka, A. 1990. Formation and action of lignin-modifying enzymes in cultures of *Phlebia radiata* supplemented with veratric acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2623-2629.

11- Morgan, P., Lee, S.A., Lewis S.T., Sheppard A.N., and Watkinson R.J., 1993. Growth and biodegradation by white-rot fungi inoculated into soil, *Soil Biol. Biochem.*, 25:279-287.

12- Niku-Paavola, M.L., Karhunen, E., Kentelinen, A., Viikari, L., Lundell, T. and Hatakka, A. 1990. The effect of culture conditions on the production of lignin-modifying enzymes by the white-rot fungus *Phlebia radiata* . *J. Biotech.* 13: 201-211.

13- Reid, I.D., 1995. Biodegradation of lignin. *Can. J. Bot.* 73:S1011-S1013.

14- Roy-Arcand, L., and Archibald F.S., 1991. Direct dechlorination of chlorophenolic compounds by laccases from *Trametes (Coriolus) versicolor*, *Enzyme Microb. Technol.*, 13: 194-203.

15- R ttiman, C., Schwember, E., Salas, L., Cullen, D. and Vicuna, R. 1992. Ligninolytic enzymes of the white-rot basidiomycetes *Phlebia bravispora* and *Ceriporioposis subvermispora*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 16: 64-76.

16- Safari Sinegani A. A., G. Emtiazi and S. Hajrasuliha.2001.Induction of laccase by cultureadditives in *Aspergillus terreus* and some basidiomycetes. *J. Biochem. Mol. Biol. & Biophys* 5: 9-14.

17- Thurston,C.F.1994.The structure and function of fungal laccase.*Microbiol.* 140:19-26.

18- Yaropolov, A.I., Skorobogatko, O.V., Vartanov, S.S. and Varfolomeyev, S.D. 1994. Laccase properties, catalitic mechanism and applicability. *Appl. Biochem. Biotech.* 49: 257-280.

19- Young H.D., Kim, K.J., Meang, J.S., Han, Y.H., Joeng, I.B., Joen, G., Kang, S.O., and Hah, Y.C., 1994a. Single electron transfer by an extracellular laccase from the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* , *microbiol.*, 141: 393-398.