

بهبود سازی شرایط تولید اندوگلوکاناز باکتری‌های آکتینومیست جدا شده از کمپوست قارچ خوراکی

نفسیه تقی‌زاده\*، محمد فارسی<sup>2</sup>، علی پاکدین پاریزی<sup>3</sup>

- 1- کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
- 2- استاد گروه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
- 3- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: 1390/12/21، تاریخ پذیرش: 1391/4/8

### چکیده

باکتری‌های جنس آکتینومیست، تجزیه‌کنندگان خوبی در طبیعت بوده و از نظر کشاورزی حائز اهمیت می‌باشند. این باکتری‌ها در کمپوست به فراوانی حضور دارند و منابع مهم تولید آنتی‌بیوتیک‌ها و آنزیم‌های خارج سلولی هستند. جدایه‌های آکتینومیست مورد مطالعه در این پژوهش از مراحل متفاوت کمپوست‌سازی قارچ خوراکی تهیه شده و سپس جدایه‌ها مورد تجزیه و تحلیل میکروسکوپی، بیوشیمیایی و مولکولی قرار گرفتند و شناسایی شدند. برای اندازه‌گیری فعالیت اندوگلوکانازی جدایه‌ها، از روش اندازه‌گیری کربوکسی متیل سلولاز (CMC) استفاده شد. جهت بهینه‌سازی شرایط، pHهای 5/7، 6، 6/5، 7 و 7/5 دماهای 45-65°C و زمان‌های واکنش 30، 60 و 90 دقیقه بررسی شد. دمای 60°C بهترین دمایی بود که آکتینومیست‌های مورد مطالعه، بالاترین فعالیت اندوگلوکانازی را نشان دادند. در این دما جدایه 19 با 0/289 واحد در میلی‌لیتر فعالترین جدایه از نظر تولید اندوگلوکاناز بود. براساس نتایج مولکولی حاصل از بررسی شباهت جدایه‌ها با RFLP ژن 16SrRNA، اغلب جدایه‌ها از جنس استرپتومایسس بودند.

**کلمات کلیدی:** آکتینومیست‌ها، کربوکسی متیل سلولاز، فعالیت آنزیمی

اندوگلوکانازها طی یک واکنش شیمیایی کربوکسی متیل سلولز را به گلوکز هیدرولیز می‌کند. اساس اندازه‌گیری فعالیت اندوگلوکانازی گلوکز آزاد شده می‌باشد که این گلوکز با اسیددی‌نیتروسالیسیلیک تشکیل یک کمپلکس رنگی را می‌دهد و شدت رنگ مشاهده شده، نماینده میزان گلوکزی است که توسط نمونه آنزیمی تولید شده است (Dashtban *et al.*, 2010). در این پژوهش به بررسی فعالیت اندوگلوکانازی آکتینومیست‌های کمپوست قارچ خوراکی پرداخته شده است، با این هدف که جدایه‌های فعال آن در جهت بهبود حاصلخیزی کمپوست قارچ به کار برده شوند.

#### مواد و روش‌ها

##### جداسازی باکتریها

نمونه‌های کمپوست مورد استفاده در این تحقیق، از مرکز تحقیقات قارچ‌های خوراکی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شد. نمونه‌برداری از مراحل مختلف فاز دوم کمپوست‌سازی انجام شد. نمونه‌ها توسط تکنیک رقیق‌سازی در محیط کشت کمپوست آگار غنی شده با محیط CYM (مواد تهیه CYM 20X: پیتون 1 گرم، پتاسیم مونو هیدروژن فسفات 0/24 گرم، پتاسیم دی هیدروژن فسفات 0/50 گرم، عصاره مخمر 1 گرم، دکستروز 10 گرم، سولفات منیزیم 0/50 گرم در 100 میلی‌لیتر آب مقطر) در دمای 40°C تا ظاهر شدن کلنی باکتری‌ها در داخل انکوباتور (Orbital Incubator F150) قرار

گروه باکتری‌های آکتینومیست به‌عنوان تجزیه‌کنندگان مواد سلولزی از نظر کشاورزی بسیار حائز اهمیت هستند. این گروه از منابع مهم تولید آنتی‌بیوتیک‌ها و آنزیم‌های خارج سلولی به شمار می‌روند (Jang & Chen, 2003). آکتینومیست‌ها، گرم‌دوست، گرم مثبت و دارای فیلامنت‌های شاخه‌دار می‌باشند و در دیواره سلولی آنها اسید میکولیک وجود ندارد (Forbes *et al.*, 2002). آنها به‌عنوان اجزای اصلی میکروفلور کمپوست به شمار می‌روند و نقش مهمی در تجزیه مواد آلی در دماهای بالا و شرایط هوایی دارند (Seong *et al.*, 2001). این باکتری‌ها آنزیم‌های خارج سلولی سلولاز، کیتیناز، زایلاناز و بسیاری دیگر را ترشح می‌کنند. سلولاز یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های تولید شده توسط آنهاست که کاربردهای زیادی در صنایع مختلف از جمله صنایع غذایی، پارچه، تغذیه حیوانات و تولید کاغذ دارد (Jang & Chen, 2003). سلولازها کمپلکسی آنزیمی، از سه گروه می‌باشند که به‌طور مشارکتی با همدیگر عمل می‌کنند و می‌توانند پیوندهای گلیکوزیدی (1→4) سلولز را هیدرولیز نمایند. این آنزیم‌ها بتا-1 و 4 اندوگلوکاناز، سلویو هیدرولاز و بتا گلوکوزیداز هستند. یکی از مهم‌ترین آنزیم‌ها در این سیستم آنزیمی بتا-1 و 4 اندوگلوکاناز است که CMCCase هم نامیده می‌شود (Zahrei *et al.*, 2005; Chellapandi & Himanshu, 2008).

به دست آمده برای هر جدایه با الگوهای به دست آمده از هضم توالی‌های معتبر اکتینومیسیت‌های ثبت شده در پایگاه داده NCBI که در محیط این سیلیکو<sup>1</sup> هضم شده بود مقایسه شد. با استفاده از این نتایج اکتینومیسیت‌های جداسازی شده شناسایی شدند. رابطه فیلوژنتیکی میان جدایه‌ها با استفاده از نرم‌افزار NTSYSpc رسم شد.

#### اندازه‌گیری فعالیت اندوگلوکانازی

از محیط کشت تولید آنزیم سلولاز با ترکیب (CMC 1 درصد، Yeast extract 0/5 درصد،  $K_2HPO_4$  0/05 درصد، NaCl 0/02 درصد،  $MgSO_4 \times 7H_2O$  0/02 درصد،  $NH_4NO_3$  0/1 درصد و  $FeCl_3$  0/002 درصد) برای تعیین فعالیت آنزیمی جدایه‌ها استفاده شد. باکتری‌ها در دمای  $40^\circ C$  به مدت 72 ساعت در این محیط کشت رشد داده شدند، محیط کشت‌ها پس از عبور از کاغذ صافی، در 10000 rpm به مدت 20 دقیقه سانتریفیوژ (سانتریفیوژ یخچالدار Partoris 3-18K) شدند. عصاره حاصل پس از عبور از فیلتر میلی پور (0/22 میکرومتر) به عنوان منبع آنزیم استفاده گردید. مقدار پروتئین در عصاره آنزیمی ناخالص با روش برادفورد اندازه‌گیری شد (Bradford 1976). از عصاره‌های آنزیمی بدست آمده از رشد هر جدایه برای توانایی هیدرولیز سوبسترهای CMC 1درصد (CMC) در بافر فسفات با pH: 5/7-7/5 استفاده شد. مخلوط سوبسترا با یک میلی‌لیتر عصاره آنزیمی و یک

داده شدند. کلنی‌های با ظاهر گچی و خشبی به محیط جدیدی از کمپوست آگار غنی شده، منتقل شد و کشت‌های خالص از هر کدام از جدایه‌ها تهیه شد.

#### تشخیص اکتینومیسیت‌ها

جدایه‌های انتخاب شده از کمپوست توسط روش مورفولوژیکی شناسایی شدند. ساختار میسلیم‌ها رنگ و شکل اسپورها توسط میکروسکوپ اینورت مشاهده شد. آزمون‌های احیای نیترات، کاتالاز، هیدرولیز اوره، اسیدفست جزئی و رنگ آمیزی گرم روی جدایه‌ها انجام شد. باکتری‌ها برای بررسی ظاهر کلنی و اندام هوایی روی محیط کشت آب-آگار کشت شدند. توانایی تولید ملانین با استفاده از محیط کشت ISP7 و تولید رنگیزه در هر کدام از جدایه‌ها با استفاده از محیط کشت ISP5 مورد بررسی قرار گرفت (Schaad, 1988). نتایج تست‌های بیوشیمیایی و مورفولوژیکی با کتاب *Bergey's manual of Determinative Bacteriology* مقایسه شد (Bergey, 1994). DNA ژنومی استخراج شد (Cook & Meyers, 2003) و ژن 16SrRNA با استفاده از پرایمرهای عمومی fd1 و rP2 (Weisburg et al., 1991) توسط واکنش زنجیره پلیمرز تکثیر شد. به منظور شناسایی جدایه‌های اکتینومیسیت، الگوی برشی ژن 16SrRNA برای هر کدام از جدایه‌ها پس از هضم با آنزیم‌های *MboI*, *KpnI*, *PstI*, *HindIII* با *SalI*, *PaeI*, *VspI* از نرم‌افزار TotalLabTL120 تهیه شد. الگوهای برشی

<sup>1</sup> In silico

مثبت بودند. نتایج حاصله، مطابق با مشخصات آکتینومیست‌ها در کتاب *Bergey's manual of Determinative Bacteriology* بود (Bergey, 1994).

الگوی برشی ژن *16SrRNA* برای تایید نتایج مورفولوژیکی بررسی شد. بر این اساس ابتدا ژن *16SrRNA* توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تکثیر شد و توسط آنزیم‌های برشی *MboI*, *VspI*, *PaeI*, *SalI*, *HindIII*, *PstI*, *KpnI* برش داده شد. روابط شباهتی جدایه‌های آکتینومیست با استفاده از ماتریکس دوتایی به‌دست آمده از الگوی برشی ژن *16SrRNA* با استفاده از نرم‌افزار NTSYSpc بررسی شد. شکل 1 گروه‌بندی جدایه‌ها را بر اساس ضریب شباهت جاکارد<sup>2</sup> و روش خوشه‌بندی UPGMA نشان می‌دهد.

این نمودار را می‌توان این گونه تفسیر کرد که 90 درصد (درصد محاسبه شده براساس تعداد باکتری‌های خوشه 1 به کل 24 جدایه مورد بررسی است) جدایه‌های جدا شده با هم شباهت دارند و تنها 10 درصد از جدایه‌ها هستند که با بقیه متفاوت بوده‌اند که این جدایه‌ها در خوشه 2 و 3 قرار گرفته‌اند. بر طبق الگوی برشی حاصل از آنزیم‌های بررسی شده، جدایه‌های خوشه 1 متعلق به جنس استرپتومایسس<sup>3</sup> هستند. البته خوشه 1 به سه زیر خوشه تقسیم شده است که این نشان‌دهنده تفاوت‌های این جنس در سطح گونه است.

میلی‌لیتر بافر فسفات 5/7-7/5 pH: به مدت 30، 60 و 90 دقیقه در حمام آب گرم (Behdad Water Bath) با دماهای 45-65°C نگهداری شد. مقدار قند احیا شده با استفاده از روش DNS (Miller, 1944; Ghose, 1987) اندازه‌گیری شد و میزان رنگ ایجاد شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل S2100) در طول موج 540 نانومتر تعیین شد. برای تعیین میزان صحیح جذب گلوکز در تمامی شرایط یک نمونه شاهد در نظر گرفته شد که تمامی ترکیبات واکنش به جز سوبسترا را دارا بود، سپس میزان جذب بر اساس منحنی استاندارد که توسط نمونه‌های استاندارد گلوکز در غلظت‌های 0/5، 1، 1/33 و 2 میلی‌گرم گلوکز در میلی‌لیتر، تهیه شده بود به میزان گلوکز تبدیل شد. فعالیت اندوگلوکانازی جدایه‌ها به‌صورت واحد در میلی‌لیتر عصاره ناخالص آنزیمی گزارش شد. بر این مبنا که یک واحد آنزیمی میزان گلوکزی بود که از یک میلی‌لیتر عصاره ناخالص آنزیمی در مدت یک دقیقه آزاد می‌شد.

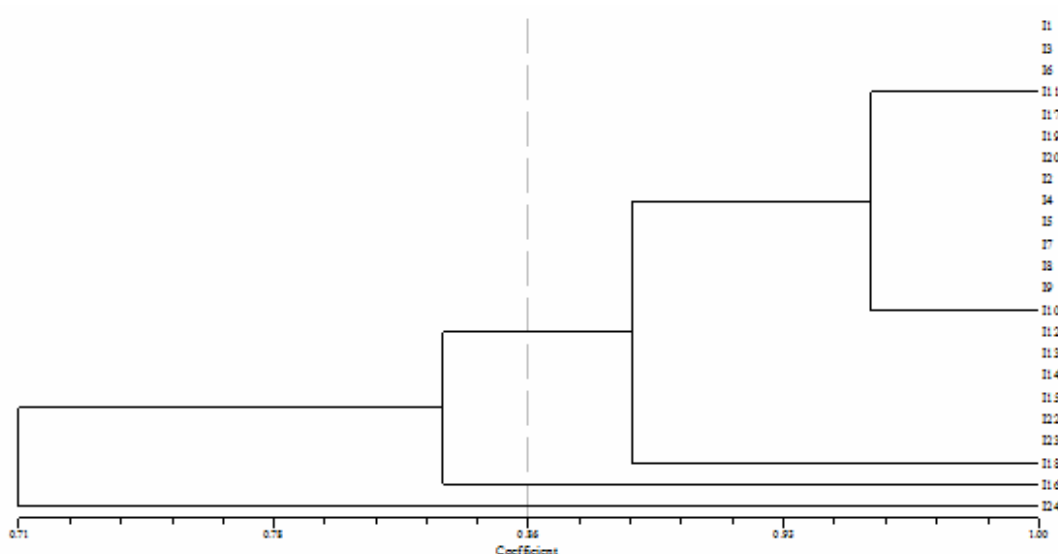
## نتایج و بحث

### تشخیص آکتینومیست‌ها

شکل اسپورها و ساختار میسلیم‌های مشاهده شده توسط میکروسکوپ اینورت ساختار انشعابی آکتینومیست‌ها را تایید کرد. بر اساس نتایج حاصل از آزمون‌های بیوشیمیایی، باکتری‌های آکتینومیست جدا شده گرم مثبت، غیر اسید فست، کاتالاز مثبت و اغلب آنها اوره‌آز

<sup>2</sup> jakard

<sup>3</sup> *Streptomyces*



شکل 1- گروه‌بندی جدایه‌های آکتینومیست بر اساس ضریب شباهت جاکارد و روش خوشه‌ای UPGMA.

Figure 1- Clustering of actinomycetes isolates by Jaccard similarity coefficient and UPGMA clustering method.

جدول 1- جنس‌های مربوط به خوشه‌های طبقه‌بندی شده برای 24 جدایه مورد آزمایش.

Table 1- Genus of clusters for 24 isolates.

جنس‌های مربوط به هر خوشه (Genus of each cluster)	شماره جدایه (Number of isolate)
خوشه 1: استرپتومایسس Cluster 1: <i>Streptomyces</i>	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17, 19,20,21,22,23
خوشه 2: ترمونوسپورا Cluster 2: <i>Thermomonospora</i>	24
خوشه 3: ساکارومونوسپورا Cluster 3: <i>Saccharomonospora</i>	18

آلبومین میزان پروتئین آنها تعیین شد. در جدول 2 میزان پروتئین کل جدایه‌ها بیان شده است. براساس برادفورد انجام شده جدایه 23 و 16 با میزان پروتئین 183/17 و 165/63 میکروگرم در میلی‌لیتر دارای بیشترین مقادیر بوده‌اند و جدایه‌های 19 و 18 با میزان پروتئین 5/73 و 7/12 میکروگرم در میلی‌لیتر دارای کمترین مقادیر بوده‌اند

**تعیین شرایط بهینه برای ارزیابی اندوگلوکاناز**  
تعیین pH بهینه: اندوگلوکانازهای پروکاریوتی برای حداکثر فعالیت نیاز به pH و دمای بهینه دارند (Heck, 2002). جدول 3 اثر pHهای مورد بررسی را بر فعالیت اندوگلوکانازی نشان می‌دهد.

این نتیجه مشابه نتایج محققین پیشین بود که استریتومایسس‌ها را جنس غالب آکتینومیست‌ها می‌دانستند (Chellapandi & Himanshu, 2008; Aboul-Enein *et al.*, 2010). در خوشه 2 جدایه 18 از جنس ساکارومونوسپورا<sup>4</sup>، در خوشه 3 جدایه 24 از جنس ترمونوسپورا<sup>5</sup> قرار گرفته است.

### فعالیت اندوگلوکانازی

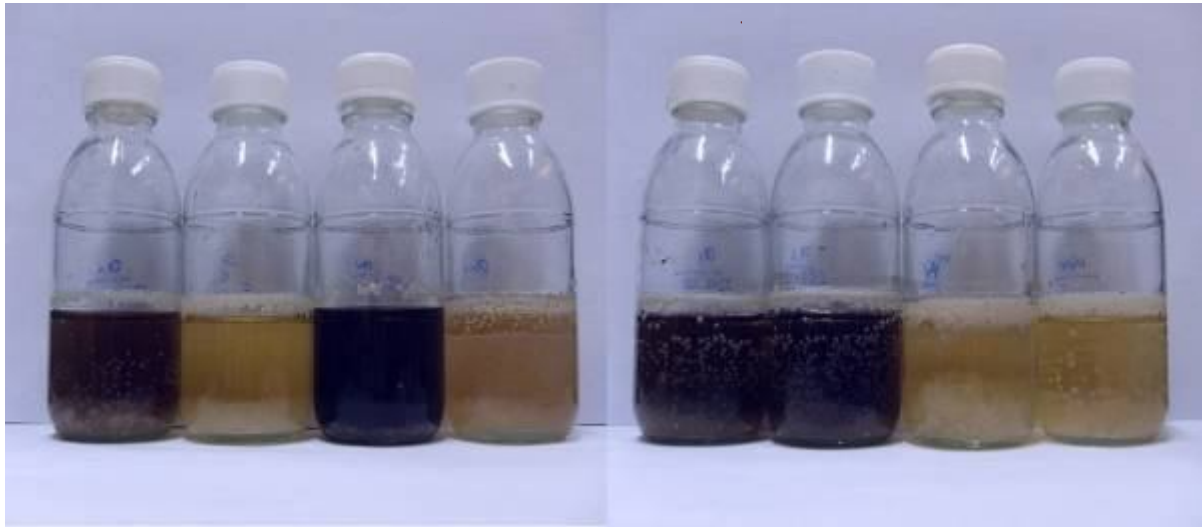
جدایه‌ها در محیط کشت CMC یک درصد به مدت 72 ساعت در 150 rpm انکوبه شدند. شکل 2 رشد تعدادی از جدایه‌ها را در این محیط نشان می‌دهد، این باکتری‌ها به خاطر گرم مثبت بودن، دارای رشد گلوله‌ای‌اند. شکل 3 تولید اسپور جدایه‌های مورد بررسی را نشان می‌دهد که خاصیت اسپورزایی آکتینومیست‌ها را در این جدایه‌ها تایید می‌کند.

### اندازه‌گیری پروتئین کل

برای اندازه‌گیری پروتئین کل از روش برادفورد (Bradford, 1976) استفاده شد. بر اساس این روش، نمودار استاندارد سرم آلبومین (BSA) را در غلظت‌های 75-750 میکروگرم در میلی‌لیتر رسم شد و سپس نمونه‌ها با محلول برادفورد مخلوط شد و جذب آنها در 595 نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. براساس نمودار استاندارد سرم

<sup>4</sup> *Saccharomonospora*

<sup>5</sup> *Thermomonospora*



شکل 2- رشد جدایه‌های اکتینومیست در محیط CMC یک درصد بعد از 72 ساعت در درجه حرارت 40°C.

Figure 2- Growth of actinomycetes isolates after 72h in % 1CMC at 40°C.



شکل 3- تشکیل دو نوع اسپور در جدایه‌ها بعد از 72 ساعت در درجه حرارت 40°C.

Figure 3- Producing two kinds of spores in isolates after 72 h at 40°C

جدول 2- پروتئین کل (میکروگرم در میلی لیتر) اندازه گیری شده با روش برادفورد.

**Table 2- Total protein (ug/ml) of 24 isolates by Bradford procedure.**

شماره جدایه ها (Number of isolate)	مقدار پروتئین (میکروگرم در میلی لیتر) (Protein content (ug/ml))
1	86/73
2	83/96
3	85/70
4	80/86
5	43/43
6	42/70
7	108/91
8	82/41
9	92/40
10	72/10
11	124/38
12	75/19
13	88/60
14	78/28
15	90/34
16	165/63
17	26/71
18	5/73
19	7/12
20	67/65
21	104/26
22	71/58
23	183/17
24	16/92

جدول 3- مقادیر میانگین فعالیت اندوگلوکانازی جدایه ها برای pHهای مورد بررسی.

**Table 3- Means of endogluconase activity of isolates in different pHs.**

pH	فعالیت اندوگلوکانازی (Endogluconase activity)
5/7	0/036
6	0/043
6/5	0/05
7	0/0001
7/5	0



است ( $\alpha=0/05$ ). تا قبل از رسیدن به این دما تمامی جدایه‌ها در حال افزایش فعالیت خود هستند. اما به محض رسیدن به این دما فعالیت اندوگلوکانازی به سرعت کاهش یافته است. بنابراین آنزیم اندوگلوکاناز جدایه‌های مورد بررسی تحمل دمای بیشتر از  $60^{\circ}\text{C}$  را نداشته است.

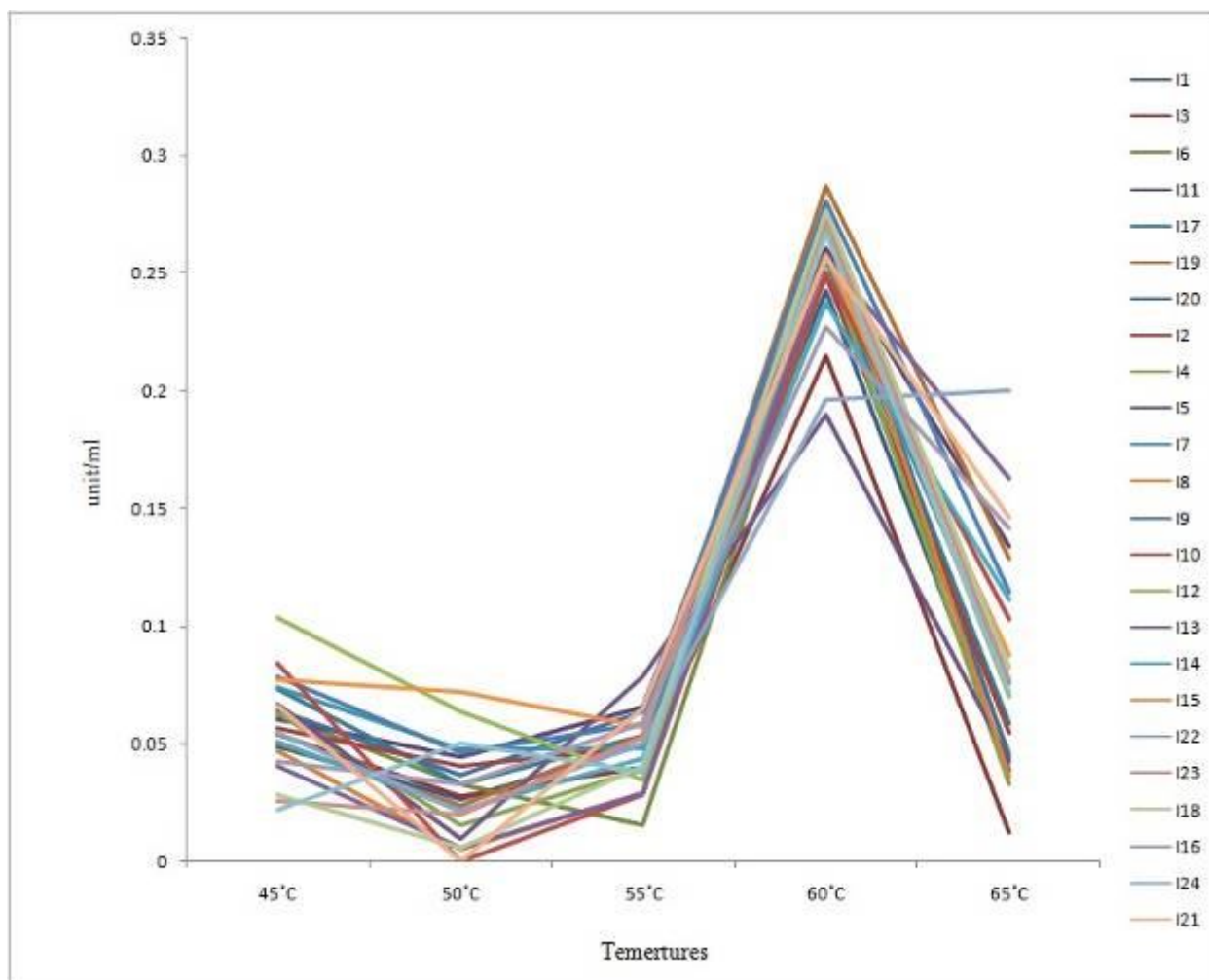
بنابراین دمای  $60^{\circ}\text{C}$  به عنوان دمای بهینه مشخص شد. البته گزارشاتی مشابه نیز وجود دارد که در بررسی آکتینومیست‌های ترموفیل قلیادوست دمای  $60^{\circ}\text{C}$  را پیشنهاد نموده‌اند (George et al., 2001)، همچنین در پژوهش دیگری برای *Streptomyces sp.* استرین J2 دمای  $60^{\circ}\text{C}$ ، دمای بهینه معرفی شده است (Jaradat et al., 2008). علاوه بر این، گزارشات متفاوتی هم ارائه شده است، به عنوان مثال دمای مناسب ایزوله استریتومایسس T3-1 دمای  $50^{\circ}\text{C}$  معرفی شده است (Jang & Chen, 2003) و همچنین دمای  $55^{\circ}\text{C}$  برای *S. reticuli* بهینه بوده است (Schremp & Walter., 1995).

جدایه برتر در بین 24 جدایه مورد بررسی: جدایه‌ای که بیشترین میانگین را در دمای  $60^{\circ}\text{C}$  نشان داد، جدایه 19 با 0/289 واحد در میلی‌لیتر فعالیت اندوگلوکانازی بود. این جدایه با توجه به این که دارای تفاوت معنی‌داری در سطح فعالیت اندوگلوکانازی در این دما است می‌تواند به‌عنوان یک جدایه کاندید برای تحقیقات بعدی مورد استفاده قرار گیرد.

فعالیت اندوگلوکانازی تا رسیدن به  $\text{pH}=6/5$  در حال افزایش است. اما در  $\text{pH}$ های بعد از 6/5، فعالیت اندوگلوکانازی به شدت کاهش یافت و به سمت صفر میل می‌کند. علت این امر را می‌توان در عدم پایداری این آنزیم در  $\text{pH}$ های بالا دانست. البته این فرض در صورتی درست است که هیچ محدودیتی از سایر منابع متوجه واکنش نباشد. در این مورد از لحاظ سوبسترا و دیگر شرایط واکنش اطمینان حاصل شده است.

**اثر زمان واکنش:** زمان واکنش نیز فاکتور مهمی است، زیرا هرچه زمان تماس سوبسترا با آنزیم بیشتر باشد امکان تجزیه کربوکسی متیل سلولز به گلوکز بیشتر است (George et al., 2001). بنابراین در این آزمایش زمان واکنش‌های 30، 60 و 90 دقیقه بررسی شد که همه جدایه‌ها بیشترین فعالیت اندوگلوکانازی خود را در زمان 30 دقیقه نشان دادند ( $\alpha=0/05$ ). البته این نکته قابل توجه است که مدت زمان تماس بیشتر سوبسترا با آنزیم، سبب افزایش محصول واکنش می‌شود که علت این کاهش را می‌توان در کاهش قابل ملاحظه آنزیم بعد از 30 دقیقه دانست.

**اثر دمای واکنش:** دماهای بررسی شده 45، 50، 55، 60 و  $65^{\circ}\text{C}$  بود. شکل 4 دماهای بررسی شده در 24 جدایه آزمایش را نشان می‌دهد. در بررسی دما زمان 30 دقیقه و  $\text{pH}=6/5$  در نظر گرفته شده است. در بین دماهای بررسی شده دمای  $60^{\circ}\text{C}$  بیشترین میانگین فعالیت اندوگلوکانازی جدایه‌ها را به خود اختصاص داده



شکل 4- اثر دماهای 45-65°C روی فعالیت اندوگلوکانازی 24 جدایه مورد آزمایش.

Figure 4- Effect of temperatures 45-65°C on endoglucanase activity of 24 isolates.

پژوهشکده اقبال دانشگاه فردوسی مشهد، آقای  
مهندس ملک‌زاده و خانم مهندس جلال‌زاده که ما  
را در انجام این پروژه یاری نمودند تقدیر و  
تشکر نمایم.

#### سپاسگزاری

بر خود لازم می‌دانیم از مرکز پژوهش‌های  
قارچ خوراکی دانشگاه فردوسی مشهد و اعضای  
هیئت علمی پرورش قارچ‌های خوراکی

#### منابع

- Aboul-Enein A, Abou elalla F, Serour E, Hussien T (2010). Purification and characterization of novel thermoactive cellulase thermophilic actinomycetes isolated from sample of Egypt. *International Journal of Academic Research* 2: 81-86.
- Bergey DH, Holt JG (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Lippincott Williams & Wilkins. 787 pages.

- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Chellapandi P, Himanshu MJ (2008). Production of endoglucanase by the native strain of *Streptomyces* isolated in submerged fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology* 39: 122-127.
- Cook AE, Meyers PR (2003). Rapid identification of filamentous actinomycetes to the genus level using genus-specific 16S rRNA gene restriction fragment patterns. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53:1907-1915.
- Dashtban M, Maki M, Leung KT, Mao C, Qin W (2010). Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison. *Critical Reviews in Biotechnology*. Early Online: 1-8.
- Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS (2002). *Bailey and Scott's diagnostic microbiology*. 11th ed. Mosby Publications.
- George SP, Ahmad A, Rao MB (2001). Studies on carboxymethyl cellulase produced by an alkalothermophilic actinomycete. *Bioresource Technology* 77: 171-175.
- Ghose TK (1987). Measurement of cellulase activities. *Applied Chemistry* 59(2):257-268.
- Heck JX; Hertz PF; Ayub MAZ (2002). Cellulase and xylanase production by isolated Amazon *Bacillus* strains using soya been industrial residue based solid-state cultivation. *Brazilian Journal Microbiology* 33: 213-218.
- Jang HD, Chen KS (2003). Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces transformant* T3-1. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 19: 263-268.
- Jaradat Z, Dawagreh A, Ababneh Q, Saadoun I (2008). Influence of Culture Conditions on Cellulase Production by *Streptomyces* Sp. (Strain J2). *Jordan Journal of Biological Sciences* 1:141-146.
- Miller GL (1959). Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31: 426-428.
- Schaad NW (1988). *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. APS press. USA.
- Schrepf H, Walter S (1995). The cellulolytic system of *Streptomyces reticulatus*. *International Journal Macromolecules* 15: 353-355.
- Seong CN, Choi JH, Baik KS (2001). An improvement selective isolation of rare actinomycetes from forest soil. *Journal of Microbiology* 39:17-23.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173: 697-703.
- Zahrei S, Zamani M, Motalebi M, Babaei A (2005). Cloning, sequencing and specification gene and cDNA of beta 1,4 endoglucanase in *Trichoderma reesei*. *Iranian Journal of Biology* 18: 129-140.

## Optimizing the Condition for Endoglucanase Production in Actinomyces Isolates of Edible Mushroom Compost

Taghizadeh N.<sup>\*1</sup>, Farsi M.<sup>2</sup>, Pakdin Parizy A.<sup>3</sup>

- 1- M.Sc of Agricultural Biotechnology, Ferdowsi university of Mashhad, Mashhad, Iran.
- 2- Professor of Department of Biotechnology, Collage of Agriculture, Ferdowsi university of Mashhad, Mashhad, Iran.
- 3- Ph.D. Student, Department of Biotechnology, Ferdowsi university of Mashhad, Mashhad, Iran.

### Abstract

Actinomyces bacteria are the best parser microorganisms in environment and agriculture. These bacteria are frequent in compost and produce antibiotics & extracellular enzymes. In this study, some strains of actinomycetes were separated from different steps in composting process. After that, morphological, biochemical and molecular tests were performed for identification of them. Carboxy Methyl Cellulase assay was applied for endoglucanase activity. For optimizing conditions different treatments including pHs: 5.7, 6, 6.5, 7, 7/5, temperatures 45-65°C and times 30, 60 and 90 minutes were used. Optimum temperature for high endoglucanase activity was 60°C and isolate No.19 with 0.289 unit/ml showed the highest endoglucanase activity in this temperature. According to molecular result obtained from RFLP of 16SrRNA, most of actinomyces isolates were from *streptomyces* genus.

**Keywords:** *Actinomyces*, *Carboxy methyl cellulase*, *Enzyme activity*.

---

\* Corresponding Author: Taghizadeh N.

Tel: 09363251748

Email: na65\_taghizadeh@yahoo.com