

## Screening and Molecular Identification of Tyrosinase-producing Actinobacteria from Soils of the Maranjab Desert, the Hampoeil Cave, and the Hormoz Island

**Zeinab Shahrokh**

Department of Microbiology, Faculty of Advanced Sciences and Technologies, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, matin44sh@gmail.com

**Fatemeh Salimi**

Cellular and Molecular Group, School of Biology, Damghan University, Damghan, Iran, f.salimi@du.ac.ir

Javad Hamedī\*

Department of Microbial Biotechnology, School of Biology, College of Science, University of Tehran. Tehran, Iran, jhamedī@ut.ac.ir

### Abstract

**Introduction:** Tyrosine oxidizing enzymes or tyrosinases have various applications in medicine, nutritional, and environmental disciplines. By considering actinobacteria's impacts as one of the most promising bacteria in producing bioactive compounds and valuable enzymes with medical, industrial, and environmental applications, the current study was performed to screen and identify tyrosinase-producing isolates soil samples of the Maranjab Desert, the Hampoeil cave, and the Hormoz Island.

**Materials and Methods:** In this research, the soil samples collected from the Maranjab Desert (10 samples) and Hormuz Island (10 samples) were cultured in ISP2 agar, and the actinobacterial colonies were isolated. The isolates and the previously-isolated strains from the Hampoeil cave were qualitatively screened by culturing on tyrosine agar medium. The result of primary screening was confirmed by culturing in tyrosine broth. Then, the tyrosinase activity of the selected isolates was quantitatively evaluated. Finally, these isolates were identified by sequencing and analyzing the 16S rRNA gene.

**Results:** Among the 89 screened actinobacteria, 17 colonies showed clear zone and brown-black pigmentation around their colonies on tyrosine agar and were subjected to secondary qualitative screening. The results of secondary screening confirmed that 11 isolates produced tyrosinase. Also, the quantitative test results revealed that the strains designated UTMC 3165 and UTMC 3233 had the most enzyme activity, as 33 and 35 unit/ml, respectively. In the molecular identification, the isolates showed 99.67% and 99.88% similarity to *Streptomyces tendae* and *Streptomyces thermocarboxydus*, respectively.

**Discussion and Conclusion:** The results of the present study showed that the soils in Iran possess promising actinobacteria with the ability to produce tyrosinase enzymes. These strains were the members of the *Streptomyces* genus.

**Key words:** Actinobacteria, *Streptomyces*, Tyrosinases, Hormoz Island, Hampoeil Cave, Primary Screening, Secondary Screening, Molecular Identification, Maranjab Desert.

---

\* Corresponding author

**Received:** September 12, 2020 / **Accepted:** April 24, 2021

فصلنامه علمی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها (نوع مقاله پژوهشی)

سال یازدهم، شماره ۴۱، بهار ۱۴۰۱، صفحه ۵۰ - ۳۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۶/۲۲ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۰۴

Doi: [10.22108/BJM.2021.124762.1320](https://doi.org/10.22108/BJM.2021.124762.1320)

## غربالگری و شناسایی مولکولی اکتینوباکترهای مولد آنزیم تیروزیناز از خاک‌های کویر مرنجاب، غار هامپوئیل و جزیره هرمز

زینب شاهرخ: کارشناس ارشد گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران،  
matin44sh@gmail.com

فاطمه سلیمی: استادیار گروه زیست‌شناسی سلولی-مولکولی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران، f.salimi@du.ac.ir

جواد حامدی\*: استاد بخش زیست‌فناوری میکروبی، دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران، jhamedi@ut.ac.ir

### چکیده

**مقدمه:** آنزیم‌های اکسیدکننده تیروزین یا تیروزینازها کاربردهای متنوعی در حوزه‌های درمانی، غذایی و محیطی دارند. با توجه به اهمیت اکتینوباکترها به‌عنوان یکی از مهم‌ترین باکتری‌های نویدبخش مولد ترکیبات زیست‌فعال و آنزیم‌های دارای کاربردهای زیست‌فناورانه، مطالعه حاضر با هدف غربالگری و شناسایی جدایه‌های مولد آنزیم تیروزیناز از نمونه‌های خاک‌های کویر مرنجاب، غار هامپوئیل و جزیره هرمز انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** تعداد ۱۰ نمونه خاک از کویر مرنجاب و ۱۰ نمونه خاک از مناطق مختلف جزیره هرمز، جمع‌آوری و پس از کشت در محیط  $ISP_2$  آگار، جدایه‌های اکتینوباکتر جداسازی و خالص‌سازی شدند. این جدایه‌ها و نیز جدایه‌های تهیه‌شده در پژوهش پیشین از غار هامپوئیل با کشت روی محیط تیروزین آگار و تیروزین برات غربالگری شدند. در ادامه فعالیت تیروزینازی جدایه‌های منتخب به‌صورت کمی ارزیابی شد؛ درنهایت، این جدایه‌ها با تعیین ترادف و آنالیز ژن *16S rRNA* شناسایی شدند.

**نتایج:** از میان ۸۹ جدایه اکتینوباکتریایی غربالگری‌شده، کلنی‌های ۱۷ جدایه در محیط کشت تیروزین آگار هاله شفاف و رنگیزه قهوه‌ای - سیاه داشتند. این جدایه‌ها در غربالگری ثانوی به‌صورت کیفی ارزیابی شدند. نتایج غربالگری ثانوی تأیید کرد ۱۱ جدایه مولد آنزیم تیروزیناز هستند. همچنین، نتایج سنجش کمی نشان دادند سوبه‌های UTMC 3165 و UTMC 3233 به‌ترتیب با میزان فعالیت آنزیمی ۳۳ و ۳۵ واحد در میلی‌لیتر بیشترین فعالیت آنزیمی را دارند. این دو جدایه از نظر ترادف ژن *16S rRNA* به‌ترتیب ۹۹/۶۷ و ۹۹/۸۸ درصد شباهت به سوبه‌های *Streptomyces tendae* و *Streptomyces thermocarboxyidus* داشته‌اند.

**بحث و نتیجه‌گیری:** نتایج این پژوهش نشان دادند خاک‌های ایران دارای اکتینوباکترهای توانمند در زمینه تولید آنزیم تیروزیناز هستند. این جدایه‌ها به جنس *Streptomyces* متعلق‌اند که از غار هامپوئیل جدا شده بودند.

**واژه‌های کلیدی:** اکتینوباکترها، استرپتومایسس، تیروزیناز، جزیره هرمز، غار هامپوئیل، غربالگری اولیه، غربالگری ثانویه، شناسایی مولکولی، کویر مرنجاب

\* نویسنده مسئول مکاتبات



## مقدمه

تیروزیناز (EC ۱،۱۴،۱۸،۱) یک آنزیم اکسیداز محدودکننده سرعت تولید ملانین است. تیروزیناز در واکنش‌های سنتز ملانین از جمله کاتالیز اورتو هیدروکسیلاسیون منوفنل (تیروزین) به اورتو-دی فنل (با فعالیت منوفنولاز) و به دنبال آن اکسید شدن اورتو-دی فنل (دو الکترون) به مشتقات اورتو-کونون و در نهایت هیدروکسیلاسیون دی هیدروکسی فنیل آلانین و تولید کونون (پیش ساز ملانین) مشارکت مستقیم دارد (۱). ملانین یک رنگدانه پلی فنلی تیره رنگ است که توسط برخی قارچ‌ها، گیاهان، جانوران و چندین گونه باکتریایی سنتز می‌شود. تیروزیناز، دو یون مس در جایگاه فعال خود دارد و از کلاس اکسیدوردوکتازها و زیرگروه اکسیژنازا محسوب می‌شود. فعالیت منوفنل هیدروکسیلاز و دی فنل اکسیداز کاربرد گسترده‌ای در صنایع بیوتکنولوژیک دارد. تیروزیناز برای سمیت‌زدایی پساب‌های دارای فنل و خاک‌های آلوده، در ساخت زیست‌حسگر برای پایش فنل، در صنایع دارویی برای تولید اورتو-دی فنل‌ها (برای مثال دی هیدروکسی فنیل آلانین و دوپامین برای درمان بیماری پارکینسون) و در صنایع دارویی و آرایشی کاربرد دارند. ملانین در حفاظت علیه پرتوهای فرابنفش، ایکس و گاما نقش داشته است و نیز به عنوان تبادله‌گر کاتیونی، حامل دارو، آنتی‌اکسیدان و عوامل ضدویروسی یا ایمونوژن‌ها کاربرد دارد (۱).

با توجه به کاربرد زیاد آنزیم تیروزیناز در صنایع مختلف، باید منابع به کاررفته برای تولید این آنزیم برای محیط زیست، گیاهان و جانوران بی‌ضرر باشند و نیز بازده مناسبی داشته باشند. منابع گیاهی از جمله میوه‌ها و سبزیجات مختلف به منظور بررسی تیروزیناز مطالعه

شدند و این آنزیم از انگور، سیب (۲) و دانه آفتابگردان (۳) استخراج شده است. همچنین، قارچ‌های مختلف برای جداسازی تیروزیناز مطالعه شده‌اند که از میان آنها می‌توان به *Agaricus bisporus* (۴)، *Neurospora crassa* (۵)، *Amanita muscaria*، *edodes* (۶)، *Aspergillus oryzae* (۷)، *Portabella* و *Pycnoporus sanguineus mushrooms* (۸) و *Lentinula boryana* (۹) اشاره کرد.

راهکار نویدبخش دیگر، غربالگری منابع میکربی با هدف یافتن سویه‌های مولد آنزیم تیروزیناز است. تیروزینازهای باکتریایی معمولاً خارج سلولی‌اند. این آنزیم در گونه‌هایی مانند *Rhizobium sp.*، *Pseudomonas*، *Symbiobacterium thermophilum*، *Sinorhizobium meliloti*، *maltoiphilia*، *Thermomicrobium*، *Marinomonas mediterranea*، *Pseudomonas*، *Bacillus thuringiensis*، *roseum*، *Streptomyces putida* (۱۰، ۱۱)، *Ralstonia solanacearum*، *castaneoglobisporus* و *Verrucomicrobium spinosum* یافت شده است (۱۲). اکتینوباکترها یکی از گروه‌های باکتریایی مهم و مولد آنزیم‌های متنوع‌اند (۱۳، ۱۴). این باکتری‌های گرم مثبت با مقدار GC بالا در DNA، در اکوسیستم‌های آبی و خاکی به فراوانی حضور دارند. برخی اکتینوباکترها بی‌هوازی و بسیاری هوازی و برخی از آنها مولد اسپور هستند. بسیاری از گونه‌های اکتینوباکترها دارای میسلیم‌اند و چرخه زندگی پیچیده‌ای با اشکال مورفولوژیک متنوع دارند. گونه *Streptomyces* به تنهایی تقریباً ۵ درصد از حدود ۱۶۰۰۰ گونه باکتری‌های شناخته‌شده را تشکیل می‌دهد (۱۵). این باکتری‌ها همچنین متابولیسم ثانویه گسترده‌ای دارند و

حدود دو سوم از آنتی‌بیوتیک‌هایی که به صورت بالینی استفاده می‌شوند و بسیاری از داروهای ضدسرطان (۱۶)، آنتی‌اکسیدان (۱۷)، ضدکلسیفیکاسیون عروقی (۱۸)، ضدانعقاد خون (۱۹)، ضد دیابت (۲۰) و ترکیبات ضدقارچی را تولید می‌کنند؛ در نتیجه، این باکتری‌ها در زیست‌فناوری، پزشکی و کشاورزی اهمیت فراوانی دارند. اکتینوباکترها همچنین آنزیم‌های ارزشمندی همانند لیپازها (۲۱)، پروتازها (۲۲) و آمیلازها (۲۳) را تولید می‌کنند. با توجه به کاربردهای درخور توجه آنزیم تیروزیناز در صنایع مختلف و توانایی بالای اکتینوباکترها در ارائه ترکیبات زیست‌فعال با کاربردهای درمانی و آنزیم‌های متنوع با کاربردهای درمانی و صنعتی، پژوهش حاضر با هدف غربالگری و شناسایی مولکولی اکتینوباکترهای مولد آنزیم تیروزیناز از نمونه‌های خاکی جمع‌آوری شده از کویر مرنجاب (یک محیط گرم و خشک) و جزیره هرمز (یک محیط گرم و مرطوب) انجام شده است. این دو اکوسیستم دارای خاک‌های شور بوده و از نظر وجود اکتینوباکترهای مولد تیروزیناز مطالعه نشده‌اند. در این پژوهش همچنین جدایه‌های حاصل از پژوهش پیشین (۲۴) غربالگری شدند که از غار هامپوئیل (یک محیط الیگوتروف) در مراغه جدا شده بودند.

## مواد و روش

**جداسازی و نگهداری باکتری‌ها:** تعداد ۱۰ نمونه خاک از کویر مرنجاب و ۱۰ نمونه خاک از مناطق مختلف جزیره هرمز از عمق ۲۰ سانتی‌متری جمع‌آوری و در ظروف استریل و در کوتاه‌ترین زمان ممکن به آزمایشگاه منتقل شدند. در هنگام نمونه‌برداری توجه شد تا نقاط نمونه‌برداری از نظر ظاهری و ویژگی‌های

اکولوژیک با یکدیگر متفاوت باشند؛ برای مثال، از خاک‌های بدون پوشش گیاهی، دارای پوشش گیاهی، نمک سود، خشک، مرطوب و نظایر آن نمونه‌برداری شد. همه نمونه‌ها در دمای اتاق در تاریکی خشک و الک شده و تا زمان کشت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده‌اند. سپس یک گرم از هر نمونه خاک در سرم فیزیولوژی، حل و رقت‌های متوالی اعشاری از آنها تهیه شد. در مرحله بعد ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های  $10^{-1}$  و  $10^{-2}$  در محیط کشت ویژه جداسازی اکتینوباکترها (ISP2 agar) (دارای ترکیبات زیر (g/l) عصاره مالت ۱۰، عصاره مخمر ۴، گلوکز ۴، کلسیم کربنات ۲ و آگار ۱۸) کشت داده شد. پلیت‌های تلقیح شده ۱۴ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. پس از خالص‌سازی، جدایه‌های حاصل در کلکسیون میکروارگانیسم‌های دانشگاه تهران، ثبت و در محیط نگهداری دارای ISP2 و گلیسرول (۳۰ درصد) در دمای ۷۶- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

**غربالگری کیفی اولیه جدایه‌های مولد آنزیم تیروزیناز در محیط کشت تیروزین آگار:** هریک از جدایه‌ها و نیز جدایه‌های به دست آمده در پژوهش پیشین که از غار هامپوئیل جدا شد بودند (۲۴)، روی محیط ISP2 agar کشت داده شده و به مدت ۱۰-۷ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شده‌اند. به منظور غربالگری اولیه و یافتن جدایه‌های مولد آنزیم تیروزیناز یا غربالگری کیفی، جدایه‌ها روی محیط کشت تیروزین آگار (دارای ۰/۵ درصد پیتون، ۰/۳ درصد عصاره گوشت، ۰/۵ درصد L-تیروزین و ۲ درصد آگار با ۷/۳ pH) به صورت خطی کشت داده شدند. پلیت‌های تلقیح شده تیروزین آگار به مدت ۲ تا ۳ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. در پایان

(، یک میلی‌لیتر محلول تیروزین (۰/۰۰۱ مولار) و ۰/۹ میلی‌لیتر آب، اضافه و مخلوط واکنش با یک لوله موئین برای ۴-۵ دقیقه هوادهی (اکسیژن‌رسانی) شد (اکسیژن برای عملکرد تیروزیناز ضروری است). در نهایت، جذب آن با استفاده از اسپکتروفوتومتر در طول موج ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. محاسبه فعالیت آنزیم با استفاده از فرمول زیر انجام شد (۲۸):

$$\text{Units of enzyme/ml} = \frac{\Delta A_{280\text{nm}} / \text{min Test} - \Delta A_{280\text{nm}} / \text{min Blank}}{(0/001)(0/1)}$$

**شناسایی سویه‌های منتخب:** مطالعه مورفولوژی کلنی و مورفولوژی میکروسکوپی جدایه‌ها، نخستین روش شناسایی جدایه‌ها بوده است. در این موارد ظهور کلنی‌های خشک و چسبیده به محیط که به آسانی با لوپ از سطح محیط کشت جدا نمی‌شوند و وجود میسلیم در بیشتر جدایه‌های اکتینوباکتر، به‌ویژه گونه‌های جنس *Streptomyces* از سایر جدایه‌ها در نظر گرفته شد.

**تعیین نوع دی‌آمینوبی‌میلیک اسید:** ابتدا به میزان کافی از رشد تراکم کشت خالص اکتینوباکترها در محیط ISP2 مایع تهیه شد. سپس بیوماس با استفاده از سانتریفیوژ کردن مایع کشت در ۳۰۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه تهیه شد. رسوب حاصل با آب مقطر شستشو و دوباره سانتریفیوژ شد. رسوب به دست آمده روی یک سطح آلومینیومی، ریخته و در آون در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد. مقدار ۲۰ میلی‌گرم از وزن خشک سلولی به دست آمده با هاون، کوبیده و در داخل لوله‌های دربیچ‌دار با درب تفلونی تمیز ریخته شد. سپس ۱/۵ میلی‌لیتر HCl (۶ نرمال) به لوله‌ها اضافه شد و پس از بستن درب لوله‌ها در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت قرار داده شدند. پس از

گرماگذاری، پلیت‌ها برای هاله‌های شفاف در اطراف کلنی بررسی شدند. نتایج تفسیر شده به صورت «-» برای نبود هاله شفاف و «+» برای مشاهده هاله شفاف گزارش شدند (۲۷-۲۵). همچنین، ظهور کلنی‌هایی با رنگدانه قهوه‌ای که به تدریج (به دلیل تشکیل ملانین) سیاه‌رنگ می‌شوند، مولدین تیروزیناز در نظر گرفته شدند.

**غربالگری کیفی ثانوی تولید آنزیم تیروزیناز:** برای غربالگری کیفی ثانوی، جدایه‌ها در محیط کشت تیروزین برات (با ترکیبات مشابه تیروزین آگار ولی بدون آگار) دارای چند قطره کلروفورم کشت داده شدند. لوله‌های تلقیح شده در شیکر - انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه به مدت ۲-۳ روز گرماگذاری شدند (۲۵). ظهور رنگ قرمز تیره، نشانه تولید تیروزیناز و یک نمونه محیط کشت تلقیح نشده، شاهد در نظر گرفته شد.

**غربالگری کمی تولید آنزیم تیروزیناز جدایه‌های منتخب:** برای بررسی کمی تولید آنزیم تیروزیناز از محیط کشت SS<sup>1</sup> (دارای نشاسته محلول "۲۵ گرم"، گلوکز "۱۰ گرم"، عصاره مخمر "۲ گرم"، کلسیم کربنات "۳ گرم" و محلول نمک‌های کمیاب "۱ میلی‌لیتر" [فروسولفات، مس سولفات، روی سولفات و منیزیم کلراید] غنی شده با ۰/۱ درصد تیروزین و مس سولفات "۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر" [استفاده شد (۲۸)]. به این منظور یک لوپ پر از جدایه مدنظر در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط تولید آنزیم، تلقیح و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ روز در شیکر با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه گرماگذاری شد. میزان تیروزیناز تولید شده در محیط به روش اسپکتروفوتومتری سنجیده شد. به این منظور به ۰/۱ میلی‌لیتر از مایع رویی محیط کشت تولید تیروزیناز، یک میلی‌لیتر بافر فسفات (۰/۵ مولار با pH ۶/۵

دور در دقیقه به مدت ۷-۵ روز گرماگذاری شدند. پس از اطمینان از نداشتن آلودگی محیط با استفاده از رنگ آمیزی گرم، محیط حاوی میسلیوم رشد یافته در شرایط سترون با دور ۱۳۰۰۰ g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و در نهایت رسوب به دست آمده با آب مقطر شسته و رسوب نهایی برای استخراج DNA استفاده شد. میکروتیوب‌ها تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. مراحل استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA (شرکت پویا ژن آزما) طبق روش کار شرکت سازنده انجام شد. به منظور بررسی کیفیت استخراج DNA، الکتروفورز با ژل آگارز ۰/۸ درصد به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد؛ در نهایت، باندها در دستگاه ژل داک، زیر نور فرابنفش مشاهده شدند. برای تکثیر ژن *16S rRNA* جدایه‌ها از پرایمرهای عمومی ۹F و R1۵۴۱ استفاده شد. توالی پرایمرهای استفاده شده در این پژوهش و دمای ذوب مربوط به آنها به ترتیب زیر است (۲۹):

۹F: '۵-AAG AGT TTG ATC ATG GCT CAG- '۳(T<sub>m</sub>:۶۰)

۱۵۴۱R: '۵-AGG AGG TGA TCC ACC CGC A- '۳(T<sub>m</sub>:۶۰)

بررسی محصول PCR، با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد صورت گرفت. واکنش PCR طبق روش استاندارد انجام گرفت. واسرشت شدن اولیه در دمای ۹۶ درجه سانتی‌گراد و مدت زمان ۵ دقیقه بود تا دو رشته از هم باز شوند. ۳۰ چرخه تکثیر شامل ۳۰ ثانیه در دمای ۹۶ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و ۱ دقیقه و ۲۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از این مراحل به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به منظور تکمیل نهایی سنتز و همانندسازی نهایی DNA نگه داشته شد. سپس برای تخلیص به شرکت توپاز ژن (کرج، ایران) و سپس

سرد شدن لوله‌ها، محتوی لوله از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ عبور داده شد و بخش صاف شده در یک ویال شیشه‌ای تمیز ریخته و در آون در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد. برای حذف کامل بخش اسیدی یک میلی‌لیتر آب مقطر به ویال‌ها افزوده شد و تا خشک شدن کامل دوباره درون آون با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. این عمل برای ۲ تا ۳ بار تکرار شد. باقی مانده به دست آمده در ۳۰ میکرولیتر آب مقطر حل شد. سپس ۱-۳ میکرولیتر از نمونه همگن شده با کمک لوله موئین روی کاغذ TLC قرار داده شد. کاغذ در تانک حاوی آب مقطر - HCl - پیریدین - متانول با نسبت حجمی (۸۰:۲۶:۴:۱۰) قرار داده شد. بعد از اتمام تفکیک، کاغذ از تانک خارج و در معرض هوا خشک شد. برای مشاهده لکه‌ها، کاغذ خشک شده با محلول ۰/۱ درصد نین‌هیدرین در استون اسپری و پس از خشک شدن به مدت دو دقیقه در آون با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. مولکول‌های DAP به دلیل قطبیت زیاد، Rf پایین تری نسبت به اسید آمینه‌های دیگر نشان می‌دهند. اسید آمینه‌های اخیر به رنگ بنفش و ارغوانی نمایان می‌شوند و جلوتر از لکه‌های DAP حرکت می‌کنند. پس از اعمال حرارت، لکه‌های DAP به رنگ سبز مایل به خاکستری نمایان شدند. ایزومر فرم LL دارای Rf کمتری نسبت به ایزومر مزو است (۲۸). به عنوان شاهد از یک نمونه دارای ایزومر مزو (*Micromonospora* sp. UTMC 2067) استفاده شد.

#### شناسایی مولکولی سویه‌ها: به منظور استخراج DNA،

جدایه‌های مدنظر در فلاسک‌های ارلن‌مایر ۱۰۰ میلی‌لیتر حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط BHI برات با ۷/۲ pH، تلقیح و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد با دور ۲۰۰

### نتایج

**ویژگی‌های مورفولوژی جدایه‌های اکتینوباکتریایی:** در این پژوهش از ۲۰ نمونه خاک جمع‌آوری شده، ۳۱ جدایه اکتینوباکتریایی به دست آمد. در جدول ۱ ویژگی‌های این جدایه‌ها و نیز جدایه‌های غار هامپوئیل ارائه شده که از کلکسیون میکروارگانیسم‌های دانشگاه تهران گرفته شده‌اند و شامل رنگ و شکل کلنی‌ها و توانایی یا عدم توانایی آنها در تشکیل اسپورند.

از طریق این شرکت برای تعیین توالی به شرکت میکروسینس (بالگاش، سوئیس) ارسال شد. برای بررسی نتیجه توالی‌ها، توالی‌های ژن *16S rRNA*، با استفاده از نرم‌افزار بیوادیت<sup>۲</sup>، مرتب و سپس با نرم‌افزار کروماس<sup>۳</sup> بررسی شدند؛ در نهایت، توالی به دست آمده در سایت Ez-taxon هم‌ترازی شد. درخت فیلوژنی سویه‌های برتر با استفاده از نرم‌افزار مگا ۵ با روش بیشترین احتمال ممکن رسم شد.

جدول ۱- ویژگی‌های ریخت‌شناسی جدایه‌های اکتینوباکتریایی، ردیف‌های ۱ تا ۱۸ از جزیره هرمز، ۱۹ تا ۳۱ از کویر مرنجاب جدا شده‌اند. ردیف‌های ۳۲ تا ۸۹ طی پژوهش پیشین از غار هامپوئیل به دست آمده‌اند.

ردیف	شماره سویه	ویژگی‌های کلنی (رنگ و شکل)	تشکیل اسپور و رنگ آن
۱	۳۸۱۸	نارنجی با رنگیزه لعابی	بدون اسپور
۲	۳۸۱۹	سفید - کرم، چروکیده و برجسته	اسپوردار
۳	۳۸۲۰	نارنجی - کرم	بدون اسپور
۴	۳۸۲۱	نارنجی	بدون اسپور
۵	۳۸۲۲	نارنجی مشکی	بدون اسپور
۶	۳۸۲۳	زرد با قوام کره‌ای	بدون اسپور
۷	۳۸۲۴	سفید - کره‌ای	بدون اسپور
۸	۳۸۲۵	نارنجی مشکی	بدون اسپور
۹	۳۸۲۶	نارنجی صورتی	بدون اسپور
۱۰	۳۸۲۷	زرد چروکیده برآمده	اسپوردار
۱۱	۳۸۲۸	نارنجی با رنگدانه مشکی	بدون اسپور
۱۲	۳۸۲۹	نارنجی	بدون اسپور
۱۳	۳۸۳۰	سفید - کرم	بدون اسپور
۱۴	۳۸۳۱	قهوه‌ای با رنگیزه محلول قهوه‌ای	دارای اسپور قهوه‌ای
۱۵	۳۸۳۲	قهوه‌ای مشکلی ریز	بدون اسپور
۱۶	۳۸۳۳	کرم زرد بزرگ پیگمان محلول زرد	دارای اسپور سفید
۱۷	۳۸۳۴	کرم رنگ	اسپوردار
۱۸	۳۸۳۵	نارنجی قهوه‌ای	بدون اسپور
۱۹	۳۸۳۷	قهوه‌ای با رنگیزه بادمجانی محلول‌های نارنجی - ریز	بدون اسپور
۲۰	۳۸۳۸	خاکستری برجسته و چروکیده	دارای اسپور خاکستری
۲۱	۳۸۴۱	قهوه‌ای تیره	دارای اسپور خاکستری
۲۲	۳۸۴۲	مشکی لعابی	بدون اسپور

بدون اسپور	نارنجی مشکی	۳۸۴۳	۲۳
اسپور سفید - صورتی	صورتی	۳۸۴۴	۲۴
اسپور سفید	کرم - قهوه‌ای	۳۸۴۵	۲۵
بدون اسپور	نارنجی قهوه‌ای	۳۸۴۶	۲۶
اسپور سفید	خاکستری	۳۸۴۷	۲۷
اسپور سفید	کرم صورتی	۳۸۴۸	۲۸
بدون اسپور	کرم زرد با رنگیزه محلول زرد	۳۸۴۹	۲۹
بدون اسپور	زرد با قوام کره‌ای	۳۸۵۰	۳۰
اسپور سفید	سفید چروکیده	۳۸۵۱	۳۱
فاقد اسپور	کلنی‌های قهوه‌ای رنگ - کوچک	۳۱۶۱	۳۲
فاقد اسپور	کلنی‌های سفید نارنجی - ریز	۳۱۶۲	۳۳
فاقد اسپور	کلنی‌های زرد - کره‌ای شکل - ریز	۳۱۶۳	۳۴
اسپوردار	کلنی‌های سفید نارنجی	۳۱۶۴	۳۵
اسپور سفید (گچی)	کلنی‌های قهوه‌ای رنگ	۳۱۶۵	۳۶
فاقد اسپور	کلنی‌های زرد - کره‌ای و موکونیدی	۳۱۶۶	۳۷
فاقد اسپور	کلنی‌های نارنجی صورتی با تولید رنگدانه مشکی ریز	۳۱۶۸	۳۸
فاقد اسپور	کلنی‌های زرد رنگ - کره‌ای شکل - ریز	۳۱۶۹	۳۹
فاقد اسپور	کلنی‌های نارنجی صورتی - رنگدانه مشکی ریز	۳۱۷۰	۴۰
فاقد اسپور	کلنی‌های نارنجی - ریز	۳۱۷۱	۴۱
فاقد اسپور	کلنی‌های نارنجی صورتی - ریز با رنگدانه مشکی	۳۱۷۲	۴۲
فاقد اسپور	کلنی زرد رنگ کره‌ای - ریز	۳۱۷۳	۴۳
فاقد اسپور	کلنی‌های زرد رنگ - کره‌ای شکل - ریز	۳۱۷۴	۴۴
فاقد اسپور	کلنی‌های نارنجی صورتی - با تولید رنگدانه مشکی - ریز	۳۱۷۵	۴۵
فاقد اسپور	کلنی نارنجی رنگ - ریز	۳۱۷۶	۴۶
فاقد اسپور	کلنی‌های زرد رنگ - کره‌ای شکل و ریز	۳۱۷۷	۴۷
فاقد اسپور	کلنی‌های سفید با حاشیه صاف و ریز	۳۱۷۸	۴۸
فاقد اسپور	کلنی‌های نارنجی	۳۱۷۹	۴۹
فاقد اسپور	کلنی‌های نارنجی - ریز	۳۱۸۰	۵۰
فاقد اسپور	کلنی‌های قهوه‌ای رنگ کوچک با رنگدانه مشکی	۳۱۸۱	۵۱
فاقد اسپور	کلنی‌های سفید قهوه‌ای با رنگدانه مشکی - ریز	۳۱۸۲	۵۲
فاقد اسپور	کلنی سفید رنگ - کوچک - با مرکز سوراخ	۳۱۸۳	۵۳
اسپور سفید (گچی)	کلنی‌های سفید رنگ - ریز	۳۱۸۵	۵۴
فاقد اسپور	کلنی‌های قهوه‌ای با رنگدانه مشکی ریز	۳۱۸۶	۵۵
فاقد اسپور	کلنی‌های نارنجی صورتی با رنگدانه مشکی ریز	۳۱۸۷	۵۶
اسپوردار	کلنی‌های سفید رنگ با مرکز سوراخ	۳۱۸۸	۵۷
فاقد اسپور	کلنی زرد رنگ - کره‌ای شکل - ریز	۳۱۸۹	۵۸
اسپور سفید (گچی)	کلنی‌های قهوه‌ای رنگ - حاشیه چروکیده	۳۱۹۰	۵۹
اسپور سفید - خاکستری	قهوه‌ای - متوسط رو به کوچک - حاشیه صاف	۳۲۲۵	۶۰

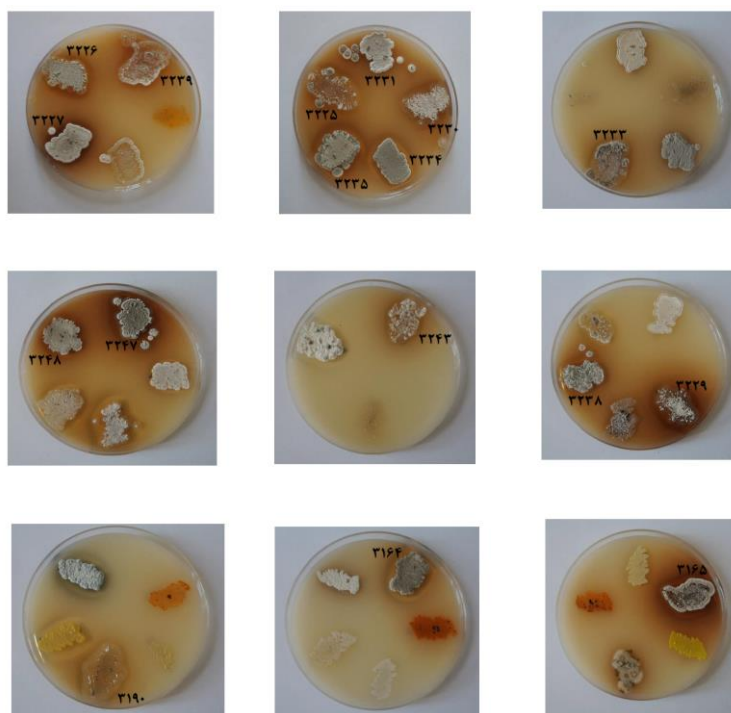


اسپور سفید (گچی)	قهوه‌ای پررنگ - متوسط - صاف و کمی چروکیده	۳۲۲۶	۶۱
اسپور خاکستری پررنگ	قهوه‌ای پررنگ - متوسط - صاف	۳۲۲۷	۶۲
اسپور سفید	کرم روشن - کوچک - حاشیه صاف	۳۲۲۸	۶۳
اسپور سفید - خاکستری پررنگ	قهوه‌ای پررنگ - کوچک - حاشیه صاف	۳۲۲۹	۶۴
اسپور سفید با حاشیه خاکستری	قهوه‌ای - کوچک - حاشیه صاف	۳۲۳۰	۶۵
اسپور خاکستری	قهوه‌ای - متوسط - حاشیه صاف	۳۲۳۱	۶۶
فاقد اسپور	کرم قهوه‌ای - کوچک - حاشیه چروکیده	۳۲۳۲	۶۷
اسپور سفید و خاکستری	کلنی قهوه‌ای پررنگ - حاشیه چروکیده و صاف	۳۲۳۳	۶۸
اسپور سفید (گچی)	قهوه‌ای پررنگ - کوچک - هم چروکیده هم صاف	۳۲۳۴	۶۹
اسپور سفید - خاکستری پررنگ	قهوه‌ای - بزرگ - حاشیه چروکیده	۳۲۳۵	۷۰
اسپور خاکستری	قهوه‌ای پررنگ - متوسط - حاشیه چروکیده	۳۲۳۶	۷۱
فاقد اسپور	کرم روشن - کوچک - حاشیه صاف	۳۲۳۷	۷۲
اسپور سفید - خاکستری	کرم - بزرگ - حاشیه چروکیده	۳۲۳۸	۷۳
اسپور کمی سفید و خاکستری	قهوه‌ای پررنگ - کوچک و تعدادی بزرگ - مرکز فرورفته	۳۲۳۹	۷۴
فاقد اسپور	قهوه‌ای و کرم - کوچک - حاشیه چروکیده	۳۲۴۰	۷۵
اسپور سفید - خاکستری	کرم روشن - کوچک - صاف	۳۲۴۱	۷۶
اسپور سفید	کلنی کرم قهوه‌ای - متوسط - حاشیه صاف	۳۲۴۲	۷۷
اسپور سفید (گچی)	قهوه‌ای پررنگ - بزرگ - حاشیه چروکیده	۳۲۴۳	۷۸
اسپور سفید (گچی)	کرم و قهوه‌ای - متوسط - حاشیه صاف	۳۲۴۴	۷۹
اسپور سفید و خاکستری	کلنی کرم و قهوه‌ای - متوسط - حاشیه صاف	۳۲۴۵	۸۰
اسپور سفید (گچی)	کرم روشن - بسیار کوچک - بدون حاشیه	۳۲۴۶	۸۱
اسپور سفید - خاکستری	کرم و قهوه‌ای - بزرگ - حاشیه چروکیده	۳۲۴۷	۸۲
اسپور خاکستری پررنگ	قهوه‌ای رو به مشکی - کوچک - حاشیه صاف	۳۲۴۸	۸۳
اسپور خاکستری	کرم با حاشیه قهوه‌ای - کوچک - حاشیه چروکیده	۳۲۵۰	۸۴
اسپور سفید - خاکستری	کرم و قهوه‌ای - کوچک - حاشیه صاف و چروکیده	۳۲۵۱	۸۵
اسپور خاکستری	قهوه‌ای پررنگ - متوسط - حاشیه صاف	۳۲۵۲	۸۶
اسپور سفید (گچی)	کرم و قهوه‌ای - کوچک - صاف و کمی چروکیده	۳۲۵۳	۸۷
اسپور سفید (گچی)	کرم - کوچک - حاشیه صاف	۳۲۵۴	۸۸
اسپور سفید (گچی)	کرم روشن - بسیار کوچک - حاشیه صاف	۳۲۵۵	۸۹

### غربالگری کیفی اولیه جدایه‌های مولد آنزیم

تیروزیناز با کشت بر محیط تیروزین آگار: نتایج مربوط به آزمون غربالگری کیفی اولیه جدایه‌های اکتینوباکتریایی برای تولید آنزیم تیروزیناز در محیط کشت تیروزین آگار در جدول ۲ ارائه شده‌اند. با توجه به نتایج، از بین ۸۹ جدایه غربال شده، ۱۷ جدایه از نظر

تشکیل آنزیم تیروزیناز و هاله شفاف جواب مثبت داده و به عنوان سویه‌های منتخب برای مراحل بعدی پژوهش برگزیده شده‌اند. وجود کلنی‌های دارای رنگدانه‌های قهوه‌ای - سیاه به عنوان سویه‌های اکتینوباکتر مولد آنزیم تیروزیناز در نظر گرفته شد (شکل ۱، جدول ۲).



شکل ۱- غربالگری کیفی اولیه جدایه‌های مولد آنزیم تیروزیناز روی محیط کشت تیروزین آگار. ظهور هاله شفاف و رنگ قهوه‌ای - سیاه در اطراف کلنی‌ها به عنوان نشانه تولید تیروزیناز در نظر گرفته شده است. شدت هاله شفاف و رنگ قهوه‌ای در اطراف کلنی‌ها با + نشان داده شده است.

**غربالگری کیفی ثانوی جدایه‌های مولد آنزیم تیروزیناز در محیط تیروزین برات:** غربالگری کیفی ثانوی در محیط تیروزین برات نشان داد از ۱۷ جدایه منتخب در غربالگری کیفی اولیه، فعالیت تیروزینازی در ۱۱ جدایه با تولید رنگ صورتی تا قرمز تأیید شد (جدول ۳). در نهایت، با مقایسه نتایج به دست آمده از آزمون‌های کیفی اولیه و ثانوی که به ترتیب در محیط‌های تیروزین آگار و تیروزین برات انجام گرفته است، ۴ جدایه ۳۲۳۳، ۳۲۲۹، ۳۲۴۷ و ۳۱۶۵ که در هر دو آزمون نتایج بهتری داشتند، به عنوان جدایه‌های منتخب برای آزمون‌های بعدی به کار گرفته شدند. براساس نتایج به دست آمده وجود هر دو ویژگی هاله شفاف و قهوه‌ای رنگ در اطراف کلنی‌ها برای انتخاب جدایه به منظور بررسی‌های فراتر ضروری است؛ با وجود این، در غربالگری اولیه احتمال خطا وجود دارد که لزوم استفاده از چندین غربالگری را گوشزد می‌کند.

جدول ۲- فعالیت تیروزینازی در جدایه‌های اکتینوباکتریایی

شماره سویه	آنزیم تیروزیناز	هاله شفاف
۳۱۶۴	+	+++
۳۱۶۵	+++	+
۳۱۹۰	+	+
۳۲۲۵	+	+
۳۲۲۶	+	+
۳۲۲۷	++	-
۳۲۲۹	+++	+
۳۲۳۰	++	+
۳۲۳۱	+	-
۳۲۳۳	+	-
۳۲۳۴	+	++
۳۲۳۵	++	++
۳۲۳۸	++	+
۳۲۳۹	+	+
۳۲۴۳	+	-
۳۲۴۷	+++	+
۳۲۴۸	++	+

**بررسی کمی تولید آنزیم تیروزیناز: نتایج بررسی**  
 فعالیت آنزیمی جدایه‌های برتر به صورت کمی با کشت این جدایه‌ها در محیط SS در جدول ۴ ارائه شده‌اند. براساس نتایج به دست آمده سویه‌های ۳۱۶۵ و ۳۲۳۳ بیشترین فعالیت آنزیمی را داشته‌اند (جدول ۴).

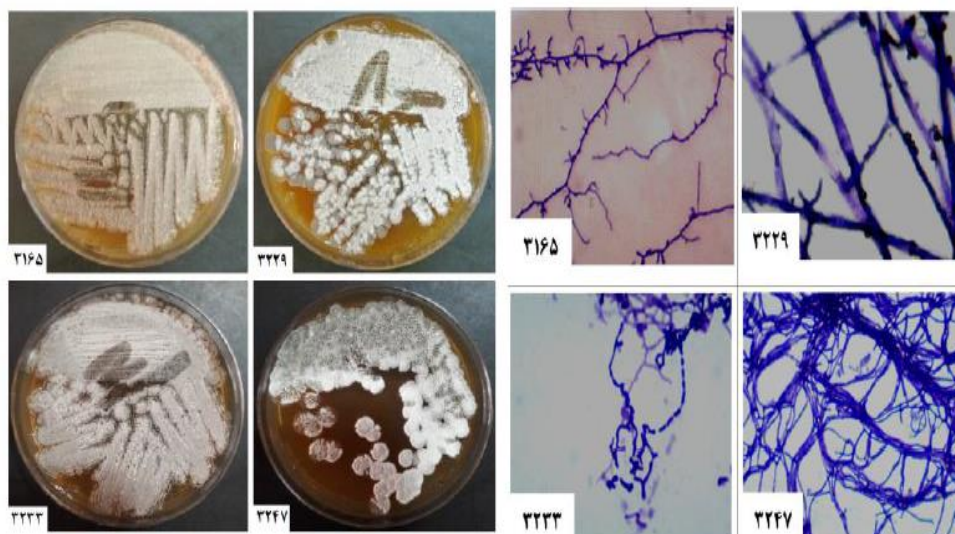
جدول ۴- میزان فعالیت آنزیم تیروزیناز در جدایه‌های منتخب

سویه	میزان فعالیت آنزیم (Unit/ml)
۳۲۲۹	۱۳
۳۲۳۳	۳۳
۳۲۴۷	۲۴
۳۱۶۵	۳۵

**شناسایی جدایه‌های منتخب:** همه جدایه‌های مطالعه شده دارای مورفولوژی تپیک اعضای جنس *Streptomyces*، یعنی کلنی‌های خشک، چسبیده به محیط بودند که به آسانی با لوپ از سطح محیط کشت جدا نمی‌شدند؛ در ضمن، در مطالعه میکروسکوپی همه جدایه‌ها فرم گرم مثبت را نشان دادند و دارای میسلیم بودند (شکل ۳).

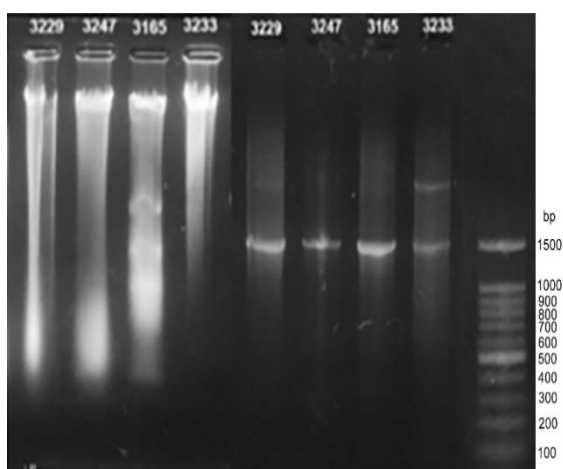
جدول ۳- فعالیت آنزیم تیروزیناز

شماره سویه	آنزیم تیروزیناز
شاهد	-
۳۲۳۳	++++
۳۲۳۵	++++
۳۲۴۷	+++
۳۲۲۵	+++
۳۲۳۸	+++
۳۱۶۵	+++
۳۲۲۹	+++
۳۱۹۰	+++
۳۲۳۰	+++
۳۲۴۳	+++
۳۲۳۹	++
۳۲۳۱	-
۳۱۶۴	-
۳۲۲۶	-
۳۲۳۴	-
۳۲۲۷	-
۳۲۴۸	-



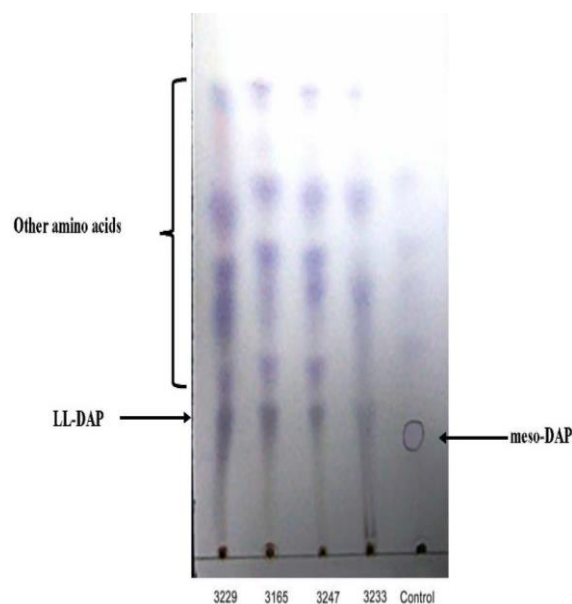
شکل ۳- مورفولوژی ماکروسکوپی و میکروسکوپی (بزرگنمایی  $\times 1000$ ) جدایه‌های اکتینوباکتر منتخب دارای فعالیت تیروزینازی

نتیجه استخراج ژنوم جدایه‌های اکتینوباکترهای منتخب و همچنین محصول PCR (ژن *16S rRNA*) در ژل آگارز به ترتیب در شکل ۵ الف و ب نشان داده شده است. محصول PCR مورد نیاز اندازه‌ای حدود ۱۵۰۰ جفت‌باز داشته است. در جدول ۵ و شکل ۶ نیز نتیجه آنالیز فیلوژنی جدایه‌های منتخب ارائه شده است. همه این جدایه‌ها به جنس *Streptomyces* متعلق بوده‌اند.



شکل ۵- باندهای معرف ژنوم اکتینوباکترهای منتخب در استخراج ژنوم (الف) و باند معرف ژن *16S rRNA* تکثیر شده در PCR

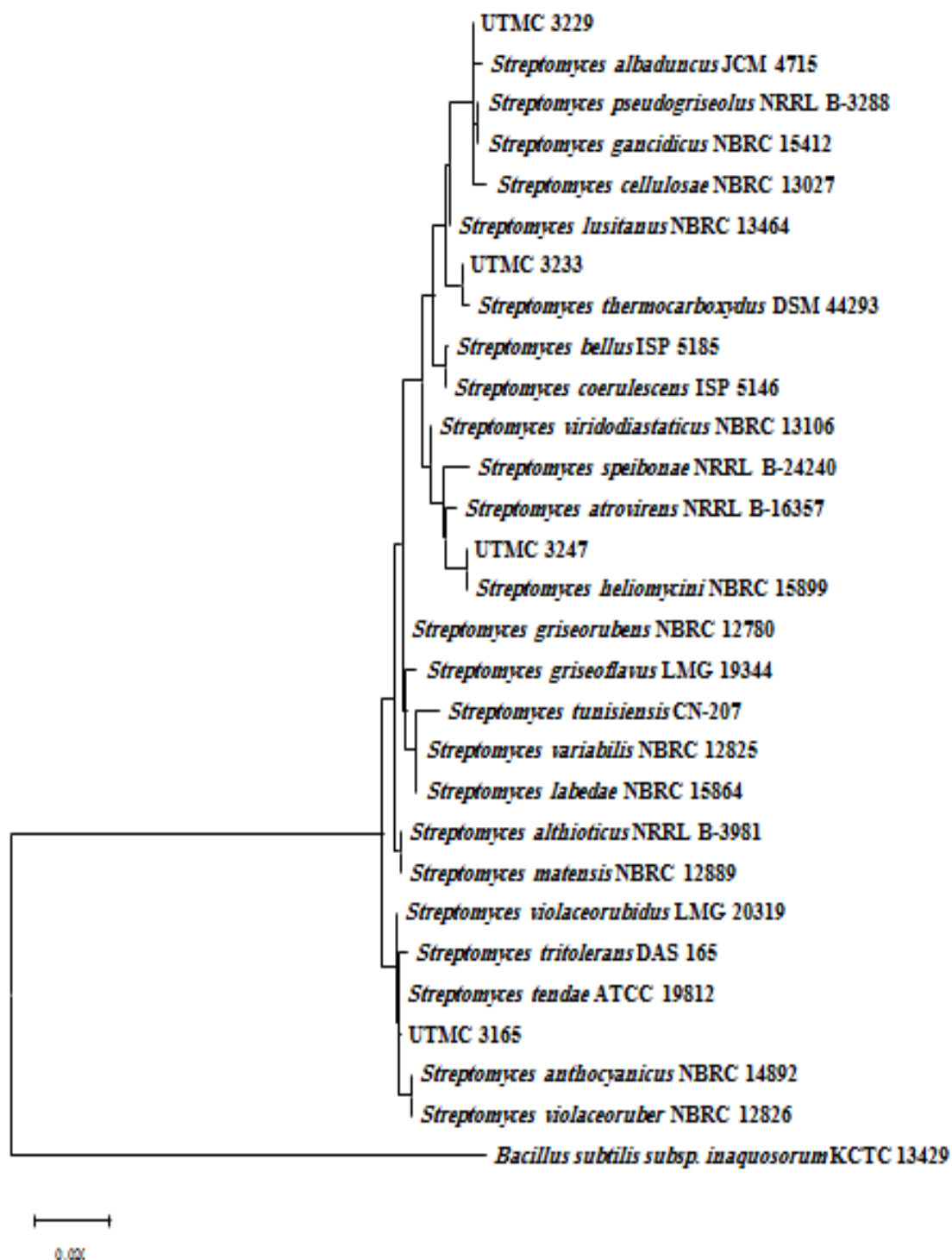
نتایج تعیین نوع ایزومر دی‌آمینوپایملیک اسید در دیواره سلولی جدایه‌های مطالعه شده در شکل ۴ نشان داده شده‌اند. همان‌گونه که مشاهده می‌شود در همه جدایه‌ها ایزومر LL مشاهده شده است.



شکل ۴- نتایج آنالیز TLC نوع ایزومر دی‌آمینوپایملیک اسید (DAP) در جدایه‌های منتخب. ایزومر مزو در نمونه شاهد (*Micromonospora* sp. UTMC2067) با دایره مشخص شده است.

جدول ۵- نتیجه انطباق توالی ژن *16S rRNA* در میان جدایه‌های منتخب

میزان شباهت	نزدیک‌ترین سویه شناسایی شده با بیشترین تشابه	شماره سویه
۹۹/۶۷ درصد	<i>Streptomyces tendae</i>	۳۱۶۵
۱۰۰ درصد	<i>Streptomyces pseudogriseolus</i>	۳۲۲۹
۹۹/۸۸ درصد	<i>Streptomyces thermocarboxydus</i>	۳۲۳۳
۹۹/۷۶ درصد	<i>Streptomyces heliomycini</i>	۳۲۴۷



شکل ۶- آنالیز تکاملی سویه‌های مولد آنزیم تیروزیناز با روش بیشترین احتمال ممکن. هم‌ردیفی یا تطبیق تمامی توالی‌های ژن *16S rRNA* با نرم‌افزار Clustal W انجام شد. درخت فیلوژنی با استفاده از نرم‌افزار MEGA5 رسم شد.

## بحث

تیروزینازهای میکربی کاربردهای گسترده‌ای در صنایع مختلف دارند. از زیست‌حسگرهای تیروزینازی قارچی و باکتریایی برای تعیین مقدار ترکیبات فنلی آب میوه، چای و مربا استفاده شده است (۳۱، ۳۰). تیروزینازها می‌توانند روی انواع گسترده‌ای از ترکیبات مختلف فنلی شامل انواع منو، دی و پلی‌فنل‌ها عمل کنند. این ویژگی تیروزیناز برای تولید ارتو - دی‌فنل‌ها اهمیت دارد که در سنتز داروها و آنتی‌اکسیدان‌ها استفاده می‌شود. نخستین محصول واکنش تیروزیناز با تیروزین، دی‌هیدروکسی فنیل‌آلانین یا L-دوپا بوده است و ارزش اقتصادی بالایی دارد؛ زیرا داروی اصلی درمان بیماری پارکینسون است (۳۲). کاربرد پزشکی تیروزیناز شامل تولید ملانین‌ها به‌عنوان ترکیبات ضدباکتری طبیعی برای درمان زخم، ازجمله استفاده موضعی از پیش‌ماده ملانین و تیروزیناز به‌صورت کرم یا پماد است (۳۲).

همچنین تیروزیناز در سم‌زدایی پساب با حذف ترکیبات فنلی و رنگ‌زدایی کاربرد زیادی دارد؛ برای مثال، تیروزیناز به‌دست‌آمده از *Streptomyces antibioticus* روی آلاینده‌های صنعتی مانند ۳ و ۴-کلروفنل (۳۳) و ۳ و ۴-فلوروفنل‌ها تأثیر داشته است. تیروزینازهای باکتریایی را می‌توان در رنگ‌زدایی پساب به کار برد؛ برای مثال، *Trichosporon aciyoshidainum* و *Trichosporon beigeli* NCIM-3326 در تجزیه مولکول‌های رنگی کاربرد دارند که معمولاً در صنعت نساجی استفاده می‌شوند (۳۴، ۳۵).

این آنزیم همچنین می‌تواند با ایجاد پیوند عرضی، ساختار مواد غذایی را تغییر دهد. تیروزینازهای به‌دست‌آمده از گونه‌های میکربی مختلف به‌عنوان عامل

ایجادکننده پیوند عرضی در انواع مختلفی از پروتئین شیر، گوشت و غلات مطالعه شده‌اند (۳۶).

دال‌فرد<sup>۴</sup> و همکاران در سال ۲۰۰۶ با غربالگری‌های مختلف یک جدایه متعلق به جنس *Bacillus* مولد ملانین را از خاک‌های همدان جدا کردند. این جدایه توانایی تولید انواع پلی‌فنل اکسیدازها ازجمله کروزولازها، کاتکولازها و لاکازها را دارد. محققان فعالیت تیروزینازی این سویه را با استفاده از L-تیروزین و L-دوپا به‌عنوان سوبسترا مطالعه کردند. pH و دمای بهینه به‌دست‌آمده برای همه انواع پلی‌فنل اکسیدازها، به‌ترتیب ۵/۵ و ۵۵ درجه سانتی‌گراد بود. فعالیت تیروزین هیدروکسیلازی تیروزیناز این سویه با تأخیر انجام می‌شود که با افزودن مقادیر کمی از L-دوپا و سدیم دودسیل سولفات می‌توان آن را رفع کرد. علاوه بر این، نتایج نشان دادند تیروزیناز و لاکاز با افزودن سدیم دودسیل سولفات با اتیلن دی‌آمین تترا استیک‌اسید<sup>۵</sup> یک مولار مهار می‌شود. محققان مقاومت سلول‌های ملانین‌دار را برای پرتو فرابنفش A، C و هیدروژن پراکسید سنجش کردند. نتایج نشان دادند ملانین این سویه را در برابر پرتوهای فرابنفش و عوامل اکسیدان محافظت می‌کند (۳۷).

سابهاش<sup>۶</sup> و همکاران در سال ۲۰۱۶ هفت نمونه خاکی را از منطقه شیرالا در هند جمع‌آوری کردند. از این نمونه‌های خاک، ۷۰ جدایه اکتینوباکتریایی در محیط گلیسرول آسپارژین آگار تکمیل‌شده با سیکلوهگزیمید به دست آمد. از ۷۰ جدایه اکتینوباکتریایی ۸۲/۸۵ درصد، ۱۰ درصد، ۲/۸۵ درصد، ۲/۸۵ درصد به‌ترتیب متعلق به جنس‌های *Streptomyces*، *Streptovercillum*، *Nocardia* و *Micromonospora* و بقیه جدایه‌ها متعلق به جنس

کشت نشاسته - نیترات آگار جداسازی شدند. در غربالگری اولیه با محیط تیروزین آگار، ۸ جدایه رنگدانه سیاه - قهوه‌ای مولد ملانین به دست آمد. از میان این جدایه‌ها در غربالگری ثانویه در محیط تیروزین برات، ۳ جدایه *Streptomyces* با تولید ۸/۴، ۴/۸ و ۱/۲ واحد بر میلی‌لیتر بیشترین فعالیت تیروزینازی را نشان دادند (۳۹).

موتالاکسمی<sup>۱۱</sup> و همکاران سویه‌های *Bacillus* sp. و *Acinetobacter* sp. را به‌عنوان منابع بالقوه تیروزیناز باکتریایی معرفی کردند (۴۰). طبق مطالعات پیشین *Streptomyces albus*، *Streptomyces nigrifaciens* و *Streptomyces michiganensis* فعالیت تیروزینازی بسیار قوی داشته‌اند (۴۱، ۴۲).

بیشتر اکتینوباکترها (به‌ویژه *Streptomyces*) ارگانیسم‌های ساپروفیت و ساکن در خاک‌اند که بیشتر دوره‌های زندگی خود را به‌عنوان اسپورهای نیمه‌فعال به‌خصوص در شرایط نامطلوب از لحاظ مواد مغذی صرف می‌کنند (۴۳). این باکتری‌ها در خاک، به‌ویژه در خاک‌های قلیایی و غنی از مواد آلی، بیشتر از سایر محیط‌ها حضور دارند. اکتینوباکترها انواع ملانین‌ها را تولید می‌کنند که با توجه به نوع سویه، محیط استفاده‌شده و سن کشت، ممکن است قرمز، زرد، نارنجی، صورتی، قهوه‌ای، قهوه‌ای روشن، قهوه‌ای متمایل به سبز، آبی یا سیاه باشند (۴۴). ملانین‌ها برای رشد و توسعه ارگانیسم ضروری نیستند؛ اما برای بهبود بقا و رقابت باکتری نقش حیاتی دارند.

در این پژوهش از بین ۲۰ نمونه خاک مطالعه‌شده، ۳۱ جدایه اکتینوباکتریایی به دست آمد و در نهایت با

*Actinomadura* بودند. غربالگری اولیه ۷۰ جدایه برای تولید تیروزیناز انجام شد و ۱۹ مولد تیروزیناز شناخته شد (۲۵).

آریکان<sup>۷</sup> و والی‌پور<sup>۸</sup> در سال ۲۰۱۵ یک سویه *Bacillus* sp. مولد تیروزیناز را از یک نمونه خاک جداسازی کردند. مطالعات ریخت‌شناسی، بیوشیمیایی و مولکولی نشان دادند این سویه ۹۹ درصد به *Bacillus megaterium* DSM319 شباهت دارد. تولید تیروزیناز این سویه به روش پاسخ سطح با فاکتورهای دمای رشد ۳۶ درجه سانتی‌گراد، حضور نمک ۳/۴ درصد و مس سولفات ۱۴۸/۴ میکرومولار بهینه‌سازی شد. در شرایط بهینه بازده تولید آنزیم ۰/۵۲۲ واحد بود. وزن مولکولی این آنزیم با آنالیز SDS-PAGE، ۳۴ کیلودالتون برآورد شده است (۲۶).

دولاشکی<sup>۹</sup> و همکاران ویژگی‌های آنزیم تیروزیناز تولیدشده توسط *Streptomyces albus* را مشخص کردند. آنزیم خام نخست با سانتریفیوژ و در ادامه با رسوب آمونیوم سولفات و اولترافیلتراسیون خالص‌سازی شد. برای حذف ملانین از رزین Servacell DEAE 52 استفاده شد. وزن مولکولی آنزیم به روش اسپکتروسکوپی جرمی در حدود ۳۰۰۹۶ دالتون برآورد شد. با استفاده از دی فنل-L- دوپا ( $K_m=7/8 \text{ mM}$ ،  $K_{cat}/K_m=157 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  و مونوفنل-L- تیروزین ( $K_m=0/5 \text{ mM}$ ،  $K_{cat}/K_m=23 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) به‌عنوان سوبسترا، پارامترهای کینتیکی برای هر دو سوبسترا مشخص شد (۳۸).

ابو-دوبارا<sup>۱۰</sup> و همکاران با هدف جداسازی و غربالگری آنزیم تیروزیناز تولیدشده با اکتینوباکترها، ۵ نمونه خاک از مناطق مصر و لیبی جمع‌آوری کردند. تعداد ۳۶ جدایه اکتینوباکتریایی با استفاده از محیط

همان‌گونه که مشاهده می‌شود میزان فعالیت تیروزینازی در سویه‌های *Streptomyces tendae*، *Streptomyces thermocarboxydus*، *Streptomyces heliomycini* و *Streptomyces pseudogriseolus* حاصل از این پژوهش به ترتیب ۵/۵، ۴، ۲/۱۷ و برابر بیش از سویه *Streptomyces espinosus* Lk-4 جدا شده از منابع دریایی هند بوده است؛ براساس این، می‌توان چهار جدایه *Streptomyces* برتر حاصل از این پژوهش را به عنوان سویه‌های نویدبخش برای پژوهش‌های بعدی به منظور تولید تیروزیناز استفاده کرد. همچنین، این سویه‌ها می‌توانند از نظر توان تجزیه آلاینده‌های فنلی مطالعه شوند.

با توجه به کاربردهای متعدد آنزیم تیروزیناز در صنایع مرتبط با بیوتکنولوژی و لزوم استفاده از روش‌های دوستدار با محیط زیست و مقرون به صرفه در صنایع مختلف و با در نظر گرفتن تنوع زیستی درخور توجه کشور، نتیجه پژوهش کنونی نشان می‌دهد اکتینوباکترها منابع میکروبی نویدبخشی برای تولید انواع آنزیم‌های تیروزیناز هستند.

### سپاسگزاری

از همکاری خانم‌ها لیلا پرویزی و فهیمه محمدنیا کارشناسان کلکسیون میکروارگانیسم‌های دانشگاه تهران برای نگهداری سویه‌های باکتریایی سپاسگزاریم.

### References

- (1) Cheng M, Chen Z. Screening of tyrosinase inhibitors by capillary electrophoresis with immobilized enzyme microreactor and molecular docking. *Electrophoresis*. 2017; 38 (3-4): 486-93.

غربالگری کمی و کیفی این جدایه‌ها و نیز ۵۸ جدایه حاصل از پژوهش پیشین (۲۴)، چهار جدایه ۳۱۶۵، ۳۲۲۹، ۳۲۳۳ و ۳۲۴۷ بیشترین فعالیت آنزیمی را داشتند. نزدیک‌ترین گونه‌های شناخته شده به این جدایه‌ها براساس توالی ژن *rRNA 16S* به ترتیب *Streptomyces tendae*، *Streptomyces lusitanus*، *Streptomyces heliomycini* و *Streptomyces thermocarboxydus* تعیین شدند. همه این جدایه‌ها از غار هامپوئیل جدا شده بودند. با توجه به حجم کم نمونه به دشواری می‌توان این نکته را به محل جداسازی جدایه‌ها نسبت داد؛ اگرچه نسبت جدایه‌های متعلق به جنس *Streptomyces* به نسبت دیگر جدایه‌ها از غار هامپوئیل در مقایسه با دو محیط دیگر یعنی جزیره هرمز و کویر مرنجاب بیشتر بوده است.

روی<sup>۱۲</sup> و همکاران در سال ۲۰۱۴، فعالیت تیروزینازی بیست جدایه حاصل از نمونه رسوبات دریایی ساحل مارینا در هندوستان را با استفاده از محیط Skim milk agar غربالگری کردند. نتایج به دست آمده نشان دادند از ۲۰ نمونه جمع‌آوری شده، دو جدایه Lk-۴ و Lk-۲۰ هیدرولیز تیروزین را نشان داده‌اند و براساس نتایج غربالگری ثانویه، Lk-۴ برای تجزیه و تحلیل بیشتر انتخاب شد. براساس شناسایی مولکولی، سویه Lk-۴-*Streptomyces espinosus* بیشترین شباهت را به دارد. همچنین، آنزیم تیروزیناز ترکیبات فنلی را از محلول‌های آبی در عرض چند ساعت حذف کرده است و نشان می‌دهد عصاره کشت تولیدشده توسط *Streptomyces espinosus* سویه Lk-۴ با فعالیت آنزیمی ۶ واحد در میلی‌لیتر به‌طور چشمگیری کارآیی حذف فنل و ترکیبات فنلی از پساب‌های آلوده را دارد (۲۴).



- (2) Janovitz-Klapp A, Richard F, Nicolas J. Polyphenoloxidase from apple, partial purification and some properties. *Phytochemistry*. 1989; 28 (11): 2903-7.
- (3) Raymond J, Rakariyatham N, Azanza J. Purification and some properties of polyphenoloxidase from sunflower seeds. *Phytochemistry*. 1993; 34 (4): 927-31.
- (4) Strothkamp K, Jolley R, Mason H. Quaternary structure of mushroom tyrosinase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1976; 70 (2): 519-24.
- (5) Lerch K. *Neurospora* tyrosinase: structural, spectroscopic and catalytic properties. *Mol Cell Biochem*. 1983 ;52 (2): 38-125
- (6) Kanda K, Sato T, Ishii S, Enei H, Ejiri S-i. Purification and properties of tyrosinase isozymes from the gill of *Lentinus edodes* fruiting body. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 1996; 60 (8): 1273-8.
- (7) Nakamura M, Nakajima T, Yasunori O, Yamauchi S, Lee BR, Ichishima E. Identification of copper ligands in *Aspergillus oryzae* tyrosinase by site-directed mutagenesis. *Biochem J*. 2000; 350 (2): 537-45.
- (8) Halaouli S, Asther M, Kruus K, Guo L, Hamdi M, Sigoillot JC, et al. Characterization of a new tyrosinase from *Pycnoporus* species with high potential for food technological applications. *J Appl Microbiol*. 2005; 98 (2): 332-43.
- (9) de Faria RO, Rotuno Moure V, Balmant W, Lopes de Almeida Amazonas MA, Krieger N, Mitchell DA. The tyrosinase produced by *Lentinula boryana* (Berk. & Mont.) Pegler suffers substrate inhibition by L-DOPA. *Food Technol Biotechnol*. 2007; 45 (3): 334-40.
- (10) Liu Z, Liu Y, Yang H, Yang Y, Shen G, Yu R. A phenol biosensor based on immobilizing tyrosinase to modified core-shell magnetic nanoparticles supported at a carbon paste electrode. *Analytica Chimica Acta*. 2005; 533 (1): 3-9.
- (11) McMahon AM, Doyle EM, Brooks S, O'Connor KE. Biochemical characterisation of the coexisting tyrosinase and laccase in the soil bacterium *Pseudomonas putida* F6. *Enzyme Microb Technol*. 2007; 40 (5): 1435-41.
- (12) Matoba Y, Kumagai T, Yamamoto A, Yoshitsu H, Sugiyama M. Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis. *J Biol Chem*. 2006; 281 (13): 8981-90.
- (13) Zaidi KU, Ali AS, Ali SA, Naaz I. Microbial tyrosinases: promising enzymes for pharmaceutical, food bioprocessing, and environmental industry. *Biochem Res Int*. 2014; 1-16.
- (14) della-Cioppa G, Garger Jr SJ, Sverlow GG, Turpen TH, Grill LK, Chedekal MR. Melanin production by *Streptomyces*. *Google Patents*; 1998.
- (15) Hopwood DA. *Streptomyces* in nature and medicine: the antibiotic makers: *Oxford University Press*; 2007.
- (16) Azman A-S, Othman I, Fang C-M, Chan K-G, Goh B-H, Lee L-H. Antibacterial, anticancer and neuroprotective activities of rare Actinobacteria from mangrove forest soils. *Indian J Microbiol*. 2017;57 (2): 177-87.
- (17) Mohammadipanah F, Momenilandi M. Potential of rare actinomycetes in the production of metabolites against multiple oxidant agents. *Pharm Biol*. 2018;56 (1): 51-9.
- (18) Salimi F, Hamedi J, Motevaseli E, Mohammadipanah F. Isolation and screening of rare Actinobacteria, a new insight for finding natural products with antivasular calcification activity. *J Appl Microbiol*. 2018; 124 (1): 254-66.
- (19) Salimi F, Hamedi J, Motevaseli E, Mohammadipanah F. Coexistence of anticoagulant and anti-vascular calcification activities in *Kribbella* sp. UTMC 267 metabolites. *Iran J Pharm Sci: IJPR*. 2019; 18 (1): 459.

- (20) Salimi F, Jafari-Nodooshan S, Zohourian N, Kolivand S, Hamed J. Simultaneous anti-diabetic and anti-vascular calcification activity of *Nocardia* sp. UTMC 751. *Lett Appl Microbiol*. 2018; 66 (2): 110-7.
- (21) Imanparast S, Hamed J, Faramarzi MA. Enzymatic esterification of acylglycerols rich in omega-3 from flaxseed oil by an immobilized solvent-tolerant lipase from *Actinomyces sediminis* UTMC 2870 isolated from oil-contaminated soil. *Food Chem*. 2018; 245: 934-42.
- (22) Mohammadipanah F, Ghelichkhani F, Khajeh K, Hamed J. Alkaline Protease from *Nocardia arvensis* UTMC 1492 Isolated from Saline Soil with the Ability to Produce Bioactive Protein Hydrolysate. *Ind Biotechnol*. 2018; 14 (1): 54-60.
- (23) Singh R, Kumar V, Kapoor V. Partial purification and characterization of a heat stable  $\alpha$ -amylase from a thermophilic actinobacteria, *Streptomyces* sp. MSC702. *Enzyme Res*. 2014; 2014.
- (24) Hamed J, Kafshnouchi M, Ranjbaran M. A Study on actinobacterial diversity of Hampeil cave and screening of their biological activities. *Saudi J Biol Sci*. 2019; 26 (7): 1587-95.
- (25) Subhash GS, Karad D, Kulkarni S. Screening of Tyrosinase Producing Soil Actinomycetes from Shirala Region of Maharashtra, India. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 2016; 5 (3): 345-53.
- (26) Valipour E, Arian B. Increased production of tyrosinase from *Bacillus megaterium* strain M36 by the response surface method. *Arch Biol Sci*. 2016; 68 (3): 659-668.
- (27) Roy S, Das I, Munjal M, Karthik L, Kumar G, Kumar S, et al. Isolation and characterization of tyrosinase produced by marine actinobacteria and its application in the removal of phenol from aqueous environment. *Front Biol*. 2014; 9 (4): 3306-316.
- (28) Raval KM, Vaswani PS, Majumder D. Biotransformation of a single amino-acid L-Tyrosine into a bioactive molecule L-DOPA. *Int J Sci Res*. 2012; 2: 2250-3153.
- (29) Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. 1987; 4 (4): 406-25.
- (30) Girelli AM, Giuliani T, Mattei E, Papaleo D. Determination of an antioxidant capacity index by immobilized tyrosinase bioreactor. *J Agric Food Chem*. 2009; 57 (12): 51786-8.
- (31) Abhijith K, Kumar PS, Kumar M, Thakur M. Immobilised tyrosinase-based biosensor for the detection of tea polyphenols. *Anal Bioanal*. 2007; 389 (7-8): 2227-34.
- (32) Dalet F-GE, Guadalupe T-FJ, del Carmen C-HM, Humberto G-AC, Antonio S-UM. Insights into the structural biology of G-protein coupled receptors impacts drug design for central nervous system neurodegenerative processes. *Neural Regen Res*. 2013; 8 (24): 2290.
- (33) Marino SM, Fogal S, Bisaglia M, Moro S, Scartabelli G, De Gioia L, et al. Investigation of *Streptomyces antibioticus* tyrosinase reactivity toward chlorophenols. *Arch Biochem Biophys*. 2011; 505 (1): 67-74.
- (34) Pajot HF, Fariña JI, de Figueroa LIC. Evidence on manganese peroxidase and tyrosinase expression during decolorization of textile industry dyes by *Trichosporon akiyoshidainum*. *Int Biodeterior Biodegradation*. 2011; 65 (8): 1199-207.
- (35) Saratale R, Saratale G, Chang J-S, Govindwar S. Decolorization and biodegradation of textile dye Navy blue HER by *Trichosporon beigeli* NCIM-3326. *J Hazard Mater*. 2009; 166 (2-3): 1421-8.
- (36) Horne DS. Casein structure, self-assembly and gelation. *Curr Opin Colloid Interface Sci*. 2002; 7(5-6): 456-61.
- (37) Dalfard AB, Khajeh K, Soudi MR,

- Naderi-Manesh H, Ranjbar B, Sajedi RH. Isolation and biochemical characterization of laccase and tyrosinase activities in a novel melanogenic soil bacterium. *Enzyme Microb Technol.* 2006; 39 (7): 1409-16.
- (38) Dolashki A, Gushterova A, Voelter W, Tchorbantov B. Identification and characterization of tyrosinase from *Streptomyces albus* by mass spectrometry. *Biotechnol Equip.* 2009; 23(sup1): 946-50.
- (39) Abou-Dobara M, El-Sayed A, El-Fallal A, Sauf M. Survey for Tyrosinase production by *Streptomyces* species. Journal of Egyptian Academic Society for Environmental Development D, *Environ Stud.* 2019; 20 (1): 79-90.
- (40) Muthulakshmi T, Sivakumar U, Nadella RK, Murugadas V, Prasad M, Greeshma S. Study on Melanized Shrimp Reveals *Bacillus* sp and *Acinetobacter* sp as Potential Sources for Bacterial Tyrosinase. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 2019; 8 (12): 1430-8.
- (41) Nambudiri A, Bhat J, Rao PS. Conversion of p-coumarate into caffeate by *Streptomyces nigrifaciens*. Purification and properties of the hydroxylating enzyme. *Biochem J.* 1972; 130 (2): 425-33.
- (42) Philipp S, Held T, Kutzner HJ. Purification and characterization of the tyrosinase of *Streptomyces michiganensis* DSM 40015. *J Basic Microbiol.* 1991; 31(4): 293-300.
- (43) Mayfield C, Williams S, Ruddick S, Hatfield H. Studies on the ecology of actinomycetes in soil IV. Observations on the form and growth of streptomycetes in soil. *Soil Biol Biochem.* 1972; 4 (1): 79-91.
- (44) Lechevalier H, Lechevalier MP, editors. Classification des actinomycètes aérobies basée sur leur morphologie et leur composition chimique. Annales DE L Institut Pasteur; 1965; 108(5), 662.

- <sup>3</sup>- Chromas  
<sup>4</sup>- Dalfard  
<sup>5</sup>- EDTA  
<sup>6</sup>- Subhash  
<sup>7</sup>- Aarikan  
<sup>8</sup>- Valipour  
<sup>9</sup>- Dolashki  
<sup>10</sup>- Abou-Dobara  
<sup>11</sup>- Muthulakshmi  
<sup>12</sup>- Roy

<sup>1</sup>- *Salmonella shigella*

<sup>2</sup>- BioEdit