Isolating Yeasts from Aqueous Sediments and Investigating their Enzymatic Properties

Shohre Nasiriproj
Department of Microbiology, Faculty of Life Sciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran, shohrehnasiri13@gmail.com
Abbas Akhavan Sepahy*
Department of Microbiology, Faculty of Life Sciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran, abbasakhavansepahi1990@gmail.com
Farzaneh Hosseini
Department of Microbiology, Faculty of Life Sciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran, farzanehhosseini@yahoo.com
Mohadesse Laripoor
Department of Microbiology, Faculty of Life Sciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran, laripoormohadesse@yahoo.com

Abstract

Introduction: The aquatic sediments of the rivers and the Caspian Sea provide numerous microscopic habitats for a large community of microbial organisms that are actively producing fuel enzymes due to favorable conditions.

Materials and methods: Surface sediment sampling of the Sefidrood, Siahrood, and Haraz rivers as well as the Caspian Sea was carried out. The samples were cultured in YGC agar medium by the pour plate method. Fungi grown on these plates were examined for the presence of Protease, Amylase, Lipase, Dnase, Chitinase, Lectinase and Pectinase. Then, the differentiation between yeast isolates was performed by chromagar media; the molecular identification of the isolated yeasts was performed by PCR and sequencing of PCR products.

Results: A set of four isolates was isolated from fourteen stations in three stages by sampling of rivers and Caspian sediments after continuous sequencing and cultivation on YGC Agar. All isolates produced Lipase, DNase and Amylase. Two isolates produced Protease and Lisetinase. None of the isolates had the ability to produce Chitinase and Pectinase. Two isolates, SHOO2 and SHOO7, had the most diverse enzyme production. Biochemical and morphological identification of four isolates was also performed accurately, and then genetic identification of two isolates SHOO2 and SHOO14 was performed, which were similar to *Candida tropicalis* species and *Candida fameta*, respectively.

Discussion and conclusion: Based on the available sources, there have been reports of Pectinase and Kinase activity in yeasts isolated from different sources. To justify this observation, it can be said that the region was affected by the isolation and the enzymatic activity of the isolated yeasts. Aquatic sediments can be a good source of yeasts with the ability to produce a wide range of useful enzymes needed in the industry.

Key words: Isolation of the Yeast, Aqueous Sediments, Enzyme

* Corresponding author
Received: January 18, 2020 / **Accepted:** May 9, 2020

فصلنامه علمی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها (نوع مقاله پژوهشی)
سال دهم، شماره ۳۷، بهار ۱۴۰۰، ص، ۱۲-۱
تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۲۸ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۲۰
doi: 10.22108/BJM.2020.121015.1263

جداسازی مخمرها از رسوبات آبی و بررسی ویژگی‌های آنزیمی آنها

شهره نصیری پروج: کارشناس ارشد گروه میکروبیولوژی، دانشکدهٔ علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، shohrehnasiri13@gmail.com
عباس اخوان سپهی*: دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکدهٔ علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، abbasakhavansepahi1990@gmail.com
فرزانه حسینی: استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکدهٔ علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، farzanehhosseini@yahoo.com
محدثه لاری‌پور: استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکدهٔ علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال laripoormohadesse@yahoo.com

چکیده

مقدمه: رسوبات آبی رودخانه‌ها و دریای خزر به‌علت ایجاد شرایط مناسب، زیستگاه‌های میکروسکوپی متعددی را برای جامع بزرگی از اعضای میکروبی فراهم می‌کند که فعالانه به تولید آنزیم‌های سوختی بپردازند.

مواد و روش‌ها: نمونه‌برداری رسوبات سطحی برخی رودخانه‌های مسیر شهرستان‌های رشت و انزلیرودخانهٔ سفیدرود، سیاه‌رود، رود هراز و دریای خزر انجام شد. نمونه‌ها در محیط YGC آگار به روش پورپلیت کشت داده شدند. قارچ‌های حاصل از رشد روی پلیت‌های یادشده ازنظر حضور آنزیم‌های پروتئاز، آمیلاز، لیپاز، Dnase، کیتیناز، لسیتیناز و پکتیناز بررسی شدند؛ در ادامه، افتراق بین جدایه‌های مخمری با محیط‌های کروم‌آگار انجام و شناسایی مولکولی جدایه‌های جداسازی‌شده به روش PCR و در ادامه، توالی‌یابی محصولات PCR انجام شد.

نتایج: چهار جدایهٔ بررسی‌شده طی سه مرحله نمونه‌برداری از چهارده ایستگاه از رسوبات رودخانه‌ها و دریای خزر پس‌از تهیهٔ رقت‌های پی‌درپی و کشت روی YGC آگار جدا شدند. همهٔ جدایه‌ها آنزیم لیپاز، DNase و آمیلاز و دو جدایه آنزیم پروتئاز و لسیتیناز را تولید می‌کردند. هیچ‌یک از جدایه‌ها توانایی تولید آنزیم کیتیناز و پکتیناز را نداشتند. دو جدایهٔ SH002 و SH007 بیشترین تنوع آنزیمی را داشتند. شناسایی بیوشیمیایی و ریخت‌شناختی چهار جدایه و سپس شناسایی ژنتیکی دو جدایهٔ SH002 و SH014 انجام شد که به‌ترتیب به گونه‌های *Candida tropicalis* و *Candida fameta* شبیه بودند.

بحث و نتیجه‌گیری: بر اساس بررسی‌های انجام‌شده در منابع دردسترس، گزارش‌هایی از فعالیت پکتینازی و کیتینازی در مخمرهای جداشده از منابع مختلف مشاهده می‌شوند که در توضیح این مشاهده می‌توان گفت علاوه‌بر تأثیر عوامل، منطقه‌ای که مخمر از آن جداسازی شده است، ممکن است بر تولیدشدن یا تولیدنشدن این آنزیم‌ها تأثیرگذار باشد.

واژه‌های کلیدی: جداسازی مخمر، رسوبات آبی، آنزیم

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2021, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

مخمرها یکی از زیررده‌های مهم قارچ‌ها هستند که به‌شکل تک‌سلولی، یوکاریوتی، غیرمتحرک و معمولا بزرگ‌تر از باکتری‌ها دیده می‌شوند. اندازهٔ آنها ۵ تا ۳۰ میکرومتر با طول ۵/۱ میکرومتر که عرض آنها متفاوت است و ممکن است کروی، تخم‌مرغی‌شکل یا دراز باشند (۱)؛ این موجودات ساکنان طبیعی سطح گیاهان هستند، با حیوانات ارتباط دارند و در برخی زیستگاه‌های ساختهٔ دست بشر مانند انواع غذاها حضور دارند. ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی محیط‌زیست مانند دما، اسیدیته، فشار هوا، میزان اشعهٔ ماوراءبنفش، میزان شوری، فلور گیاهی و جانوری منطقه و ... عوامل اکولوژیکی درونی و بیرونی‌اند که بر تنوع، فعالیت متابولیکی، ترشح انواع آنزیم‌ها و رشد و بقای مخمر تأثیر می‌گذارند (۲ و ۳). طی قرن گذشته، مخمرهای خاکی کاربرد گسترده‌ای در صنایع مختلف ازجمله صنایع نانوایی، بیواتانول و تولید پروتئین‌های دارویی داشته‌اند؛ باوجوداین، توجه اندکی به مخمرهای دریایی معطوف شده است. پژوهش‌های اخیر نشان داده‌اند مخمرهای دریایی چندین ویژگی منحصربه‌فرد و عالی نسبت به مخمرهای خاکی دارند؛ برای نمونه، آنها دارای تحمل فشار اسمزی بیشتر، بهره‌وری ویژهٔ شیمیایی بیشتر و دارای تولید آنزیم صنعتی بیشتر هستند که نشان می‌دهد مخمرهای دریایی پتانسیلی عالی برای استفاده در صنایع مختلف دارند (۴). اکوسیستم‌های آبی میزبان گونه‌های مختلف ازجمله ریزموجوداتی هستند که پایهٔ شبکهٔ مواد غذایی پستانداران بزرگ و موجودات زندهٔ این زیستگاه‌ها را تشکیل می‌دهند، یکی از کلیدهای اصلی چرخه‌های عناصر و شبکهٔ مواد غذایی در محیط‌های افراطی هستند و بالقوه می‌توانند مولکول‌های زیستی منحصربه‌فردی را برای صنعت و پزشکی ارائه کنند (۵).در سال ۱۸۹۴، برنارد فیشر[1] نخستین مخمرهای آبی را از اقیانوس اطلس جداسازی کرد (۶). مشخص شده است مخمرهای دریایی مواد فعال زیستی ازجمله آمیلاز[2]، لیپاز[3]، پروتئاز[4]، فیتاز، ویتامین C، آمینواسید، گلوتاتیون و گلوکان را تولید می‌کنند (۵). دانشمندان ریزموجوداتی مانند مخمرهای مواد غذایی را کشف کرده‌اند که با زندگی انسان ارتباط دارند (۷)؛ درحالی‌که ازنظر تولید آنزیم، مطالعه‌های کمتری روی مخمرهای دارای منشأ زیست‌محیطی انجام شده‌اند (۸). آنزیم‌های یادشده در مقایسه با مواد شیمیایی مناسب‌تر، ارزان‌تر و سازگار با محیط‌زیست هستند (۹).

کشور ایران دارای زیستگاه‌های مختلف و متنوعی مانند دریاچه‌های شور و شیرین، نواحی کوهستانی، کویرها، شوره‌زارها، شالیزارهای برنج و ... است. بررسی تنوع و جمعیت میکروبی اکوسیستم‌های بومی و به دنبال آن، بررسی توانایی‌های خاص ریزموجودات این نواحی در حفظ ذخایر میکروبی (در قالب بانک‌های ذخایر زیستی) و غربال‌گری جدایه‌های جدید بومی با توانایی‌های خاص برای کاربرد در صنایع مختلف بسیار مفید است؛ در این میان، رودخانه و دریای خزر به‌علت حضور انواع حیوانات آبزی، گیاهان آبزی، پروژهٔ اکوسیستم رسوبات آبی و رسوبات دریایی ناحیهٔ شمال ایران به‌منظور غربال‌گری جدایه‌های مخمر مولد آنزیم‌ها بررسی شد و از ویژگی‌های آنزیمی مخمرهای جداسازی‌شده می‌توان در صنایع مختلف استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از رسوبات سطحی برخی رودخانه‌های مسیر شهرستان‌های رشت و انزلی شامل رودخانه‌های سفیدرود، سیاه‌رود، رود هراز و دریای خزر در سه مرحله طی فصل پاییز انجام شد. نمونه‌های جمع‌آوری‌شده در فلاسک حاوی یخ و در کمتر از ۲۴ ساعت به آزمایشگاه منتقل شدند؛ در ادامه، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه روی محیط YGC آگار به روش پورپلیت کشت شد (۱۰). پلیت‌ها به‌مدت دست‌کم ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند و در انتها، حضور آنزیم‌های پروتئاز، آمیلاز، لیپاز، Dnase، کیتیناز[۵]، لسیتیناز[۶] و پکتیناز[۷] در قارچ‌های حاصل از رشد روی پلیت‌های یادشده بررسی شد.

نگهداری جدایه‌های مخمری: کشت خالص مخمرهای جداشده در پژوهش حاضر طی ۳۰ روز به محیط غنی و تازهٔ YGC آگار منتقل شد. به‌منظور نگهداری طولانی‌مدت جدایه‌ها از محلول آبی‌گلیسرول ۱۰ درصد (۱۱ و ۱۲) برای نگهداری در فریزر منفی ۷۰ درجهٔ سانتی‌گراد و از محیط سابرودکستروزآگار برای نگهداری در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد استفاده شد (۱۳).

بررسی آزمون‌های بیوشیمیایی: آزمون‌های تخمیر قندها، جذب منابع کربن مختلف، دکربوکسیلاسیون آمینواسید لیزین، تجزیهٔ آمینواسید تریپتوفان، فعالیت پروتئولیتیکی جدایه‌ها و احیای نیترات انجام شدند؛ به این منظور، از کشت تازهٔ مخمر روی محیط مدنظر کشت داده شد و محیط‌کشت به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری و سپس بررسی شد (۱ و ۱۴).

افتراق بین جدایه‌های مخمری به کمک محیط‌های کروم‌آگار: از سوسپانسیون تازهٔ مخمر با استفاده از لوپ روی محیط‌های کروم‌آگار کشت داده شد؛ سپس پلیت‌ها به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. افتراق بین جدایه‌های مخمر باتوجه‌به رنگ کلنی آنها انجام شد (۱۵).

شناسایی فراتر ویژگی‌های بیوشیمیایی: آزمون‌های مقاومت به سیکلوهگزیمید ۱ و ۲ درصد، تحمل استیک‌اسید ۱ درصد و تولید اسید از گلوکز، مانیتول، گالاکتوز، ترهالوز، آرابینوز، رافینوز، سوربیتول، فروکتوز، زایلوز، لاکتوز، ساکارز و مالتوز انجام شد (۱ و ۱۴). رشد جدایه‌ها در دماها و اسیدیته‌های مختلف بررسی شد (۱۶).

بررسی کیفی وجود آنزیم‌ها در جدایه‌های مخمری: در تمام آزمایش‌ها، ابتدا کشت تازه از جدایه‌های مخمر روی محیط YGCآگار تهیه شد (محیط پیش‌کشت) و سپس به‌شکل نقطه‌ای روی محیط‌های جامد دارای پیش‌مادهٔ آنزیمی کشت داده شد؛ سه تکرار از هر جدایه برای هر آنزیم در نظر گرفته شد و نتایج در هر بار یکسان بودند.

بررسی کیفی وجود آنزیم پروتئاز: به‌منظور بررسی تولید آنزیم پروتئاز، جدایه‌های مخمر روی محیط جامد دارای شیر بدون چربی[۸] کشت داده شدند (۱۷). پلیت‌ها به‌مدت دو تا پنج روز در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند و مشاهدهٔ هالهٔ شفاف در اطراف کلنی نشان‌دهندهٔ حضور آنزیم پروتئاز بود.

بررسی کیفی وجود آنزیم آمیلاز: به‌منظور بررسی تولید آنزیم آمیلاز، جدایه‌های مخمر روی محیط جامد دارای نشاسته کشت داده شدند (۱۸). پلیت‌ها به‌مدت دو تا پنج روز در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند و پس‌از این مدت، سطح پلیت با معرف لوگل[۹] پوشانده شد. مشاهدهٔ هاله شفاف در

زمینهٔ بنفش‌رنگ پلیت نشان‌دهندهٔ وجود آنزیم آمیلاز بود.

بررسی کیفی وجود آنزیم لیپاز: به‌منظور بررسی کیفی وجود آنزیم لیپاز، از کشت تازهٔ مخمر روی محیط دارای پیش‌مادهٔ توئین کشت داده شد. پلیت‌ها به‌مدت دو تا پنج روز در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند و پس‌از این مدت، مشاهدهٔ رسوب سفید در اطراف کلنی نشان‌دهندهٔ حضور آنزیم لیپاز بود (۱).

بررسی کیفی وجود آنزیم DNase: به‌منظور بررسی کیفی وجود آنزیم DNase، از کشت تازهٔ مخمر روی محیط دارای DNA کشت داده شد (۱۹). پلیت‌ها به‌مدت سه تا پنج روز در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند و پس‌از این مدت، سطح پلیت به‌مدت ۲۰ دقیقه با محلول HCl یک نرمال پوشانده شد. پس‌از گذشت مدت زمان یادشده، مشاهدهٔ هالهٔ شفاف در زمینهٔ کدر پلیت نشان‌دهندهٔ حضور آنزیم DNase بود.

بررسی کیفی وجود آنزیم کیتیناز: به‌منظور بررسی کیفی وجود آنزیم کیتیناز، از کشت تازهٔ مخمر روی محیط دارای پیش‌مادهٔ کیتین کشت داده شد (۲۰). پلیت‌ها به‌مدت سه تا پنج روز در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند و پس‌از این مدت، مشاهدهٔ هالهٔ شفاف در اطراف کلنی نشان‌دهندهٔ حضور آنزیم کیتیناز بود.

بررسی کیفی وجود آنزیم لسیتیناز: به‌منظور بررسی کیفی وجود آنزیم لسیتیناز، از کشت تازهٔ مخمر روی محیط دارای پیش‌مادهٔ زردهٔ تخم‌مرغ کشت داده شد (۲۱). پلیت‌ها به‌مدت هفت روز در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند و پس‌از این مدت، مشاهدهٔ هالهٔ رسوب سفیدرنگ در اطراف کلنی نشان‌دهندهٔ حضور آنزیم لسیتیناز بود.

بررسی کیفی وجود آنزیم پکتیناز: به‌منظور بررسی کیفی وجود آنزیم پکتیناز، از کشت تازهٔ مخمر روی محیط دارای پیش‌مادهٔ پکتین کشت داده شد (۲۲). پلیت‌ها به مدت سه تا پنج روز در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند و پس‌از این مدت، محلول ید-یدید به‌مدت دو دقیقه به هر پلیت اضافه شد. مناطق شفافی در اطراف جدایه‌های تولیدکنندهٔ پکتیناز تشکیل شدند.

استخراج پکتین از پوست پرتقال: پوسته‌های سفیدرنگ پرتقال در HCl یک نرمال ریخته و کاملا مخلوط شدند. مخلوط اسید و پوسته‌های پرتقال صاف و الکل ۹۶ درجه به‌آرامی به محلول صاف‌شده افزوده شد. پس‌از افزودن الکل، پکتین موجود در محلول رسوب کرد. رسوب به‌دست‌آمده با صافی جمع‌آوری و چندین بار با آب مقطر شستشو شد. در انتها، رسوب سفیدرنگ به‌دست‌آمده در آون دارای دمای ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد خشک و با هاون پودر شد (۲۳).

بررسی ریخت‌شناختی و میکروسکوپی جدایه‌های مخمری: به‌منظور بررسی ماکروسکوپی جدایه‌های مخمری و تعیین ویژگی‌های کلنی، از کشت تازهٔ مخمر روی محیط YGC آگار به‌شکل تک‌کلنی کشت داده شد و پس از سه روز گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد، ظاهر کلنی ازنظر برجستگی، قوام، رنگ و حاشیه با استریومیکروسکوپ بررسی شد (۱).

شناسایی مولکولی جدایه‌های جداسازی‌شده

استخراج DNA: ابتدا باکتری در محیط‌کشت مایع کشت داده شد. به‌منظور استخراج، ۱ میلی‌لیتر از بافر استخراج (حاوی ۲۰ گرم‌درلیتر پودر CTAB، ۱۰

گرم‌درلیتر Tris-HCl با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار، ۱۰ گرم‌درلیتر NaCl با غلظت ۱/۴ میلی‌مولار، ۵ گرم‌درلیتر EDTA با غلظت ۵۰۰ میلی‌مولار و ۲ میکرولیتر مرکاپتواتانول) با ۵۰۰ میکرولیتر محیط‌کشت مایع حاوی مخمر ترکیب و به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۶۵ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد؛ سپس نمونه به‌مدت ۱ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ دوردردقیقه سانتریفیوژ شد و ۶۰۰ میکرولیتر مخلوط ایزوآمیل‌الکل و کلروفرم با نسبت ۲۴:۱ به محلول رویی افزوده و لوله به‌مدت ۱ دقیقه به‌آرامی تکان داده شد و سپس مخلوط به‌مدت ۸ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دوردردقیقه سانتریفیوژ شد. پس‌از سانتریفیوژ، دو لایه در مخلوط ایجاد شد؛ لایهٔ رویی به لولهٔ دیگری منتقل و هم‌حجم آن، ایزوپروپانول سرد افزوده شد. مخلوط به‌آرامی تکان و به‌مدت ۱ ساعت در فریزر با دمای منفی ۲۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد. پس‌از گذشت زمان یادشده، مخلوط به‌مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دوردردقیقه سانتریفیوژ شد و مولکول‌های DNA دو بار با الکل اتانول ۷۰ درصد شستشو و هر دو بار به‌مدت ۱ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دوردردقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوبات به‌مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شدند تا خشک شوند. DNA حاصل در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر حل و در فریزر با دمای منفی ۲۰ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شد (۲۴).

شناسایی مخمرها با استفاده از روش PCR: به‌منظور شناسایی گونه‌های مخمر بررسی‌شده در مطالعهٔ حاضر، تکثیر منطقهٔ D1/D2 از زیرواحد بزرگ rDNA (LSU) به‌واسطهٔ آغازگرهای NL1 (5′-GCATATCAATAAGCGGAAAAG-3′) و NL4 (5′-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3′) انجام شد. مخلوط واکنش PCR در جدول ۱ گزارش شده است (۲). برنامهٔ اجراشدهٔ PCR در جدول ۲ نشان داده شده است. به‌منظور اطمینان از کیفیت محصولات به‌دست‌آمده، ۵ میکرولیتر از هرکدام از محصولات روی ژل آگارز ۱ درصد با ولتاژ ۷۰ ولت بررسی شد.

توالی‌یابی: به‌منظور تعیین توالی، ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR به میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتری منتقل شد و درنهایت، نمونه‌ها برای تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره ارسال شدند. کیفیت نتایج تعیین توالی با نرم‌افزارهای Finch TV و Mega 4 بررسی و در ادامه، توالی حاصل با توالی‌های موجود در پایگاه دادهٔ Gen Bank، BLAST شدند و نوع مخمرها در سطح گونه مشخص شد.

جدول ۱- مقادیر و مواد به‌کاررفته در تهیهٔ مخلوط واکنش PCR

حجم	مواد استفاده‌شده
۲/۵ میکرولیتر	PCR Buffer (10X)
۱/۵ میکرولیتر	$MgCl_2$ (25 mM)
۱ میکرولیتر	dNTPs (10 mM)
۱ میکرولیتر	Primer Forward (10 pmol/µl)
۱ میکرولیتر	Primer Reverse (10 pmol/µl)
۱/۲۵ میکرولیتر	Taq DNA Polymerase (5U/µl)
۱ میکرولیتر	Template DNA
۱۵/۷۵ میکرولیتر	ddH_2O
۲۵ میکرولیتر	Total volume

جدول ۲- شرایط به‌کاررفته برای انجام واکنش PCR

مرحله	دما	زمان
دناتوراسیون اولیه	۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد	۵ دقیقه
آغاز چرخه (۳۵ چرخه)		
دناتوراسیون	۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد	۳۰ ثانیه
دمای اتصال آغازگر	۵۸ درجهٔ سانتی‌گراد	۴۵ ثانیه
تکثیر	۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد	۱ دقیقه
پایان چرخه		
تکثیر نهایی	۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد	۵ دقیقه

نتایج

از مجموع مراحل کشت نمونه‌های رسوبات به روش کشت مستقیم، کشت پورپلیت و غنی‌سازی نمونه‌های رسوبات آبی مرحلهٔ اول، دوم و سوم، چهار جدایهٔ مخمر (SH002، SH005، SH007 و SH014) به دست آمد که به‌ترتیب به رودخانهٔ سفیدرود، دریای خزر، تالاب انزلی و سد لتیان تعلق داشتند. به‌منظور جداسازی جدایه‌های SH002، SH005 و SH014 از کشت پورپلیت روی محیط YGC آگار و برای جدایهٔ SH007 از غنی‌سازی نمونهٔ کشت روی محیط YPG براث و سپس کشت روی YPG آگار حاوی ۲۵۰ میلی‌گرم‌درلیتر کلرامفیکل استفاده شد. نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی جدایه‌ها و نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی فراتر به‌ترتیب در جدول‌های ۳ و ۴ دیده می‌شوند.

جدول ۳- نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی کلیدی جدایه‌های رسوبات آبی

نام سویه	اوره	کاتالاز	اکسیداز	تخمیر قندها																
				مانیتول	گالاکتوز	ترهالوز	گلوکز	آرابینوز	رامنوز	رافینوز	سوربیتول	فروکتوز	زایلوز	لاکتوز	ساکارز	مالتوز	سیترات	دکربوکسیلاسیون لیزین	نیترات	نیتریک
SH002	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
SH005	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
SH007	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
SH014	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	+	+	+	-	+	-	-

جدول ۴- نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی فراتر جدایه‌های رسوبات آبی

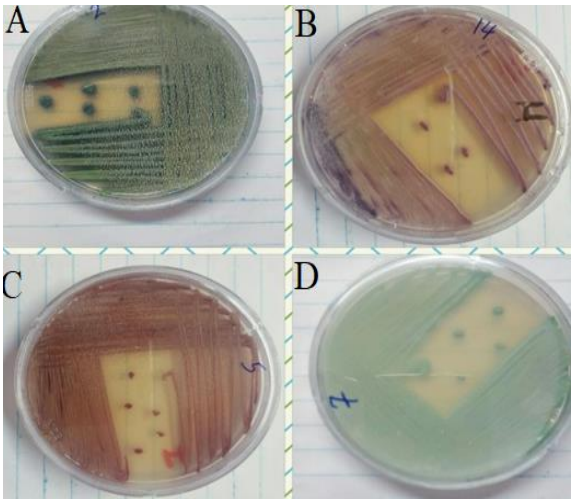
نام جدایه	رشد روی محیط‌های مختلف			رشد در حضور NaCl			رشد در اسیدیته‌های اولیهٔ محیط رشد							رشد در دماهای مختلف								رشد در غلظت‌های مختلف قند	
	تجزیه تریپتوفان	ژلاتین	تولید اسید از گلوکز	٪۵	٪۱۰	٪۱۵	۲	۴	۶	۸	۱۰	۱۲	۱۴	۱۵ °C	۲۰ °C	۳۰ °C	۳۵ °C	۳۷ °C	مقاومت به سیکلوهگزیمید ۱ درصد	مقاومت به سیکلوهگزیمید ۲ درصد	مقاومت به استیک اسید	رشد در حضور گلوکز ۵۰ درصد	رشد در حضور گلوکز ۶۰ درصد
SH002	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SH005	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SH007	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SH014	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+

افتراق بین جدایه‌های مخمر به کمک محیط‌های کروم‌آگار: پس‌از گرمخانه‌گذاری در محیط‌های کروم‌آگار، جدایه‌های مخمری با آرایش رشد متفاوت ظاهر شدند که امکان افتراق بین جدایه‌ها را فراهم کرد (شکل ۱). باتوجه‌به نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی و محیط‌های کروم‌آگار، به نظر می‌رسد جدایهٔ SH007 با تشکیل کلنی‌های سبز متمایل به آبی به *Candida* و جدایهٔ SH005 با تشکیل کلنی‌های قرمز به *Rhodotrull* شباهت داشته باشد (۲۵).

نتایج بررسی وجود آنزیم‌ها در چهار جدایهٔ SH002، SH005، SH007 و SH014: پس‌از کشت جدایه‌ها روی محیط جامد دارای پیش‌مادهٔ مدنظر و گرمخانه‌گذاری برای مدت مناسب، نتایج حضورداشتن و حضورنداشتن آنزیم‌ها بررسی شدند (جدول ۵ و شکل‌های ۲-۶).

به‌منظور بررسی شکل میکروسکوپی، جدایه‌ها روی YGC آگار کشت و با لاکتوفنل‌بلو رنگ‌آمیزی و زیر میکروسکوپ مشاهده شدند (شکل‌های ۷-۱۰).

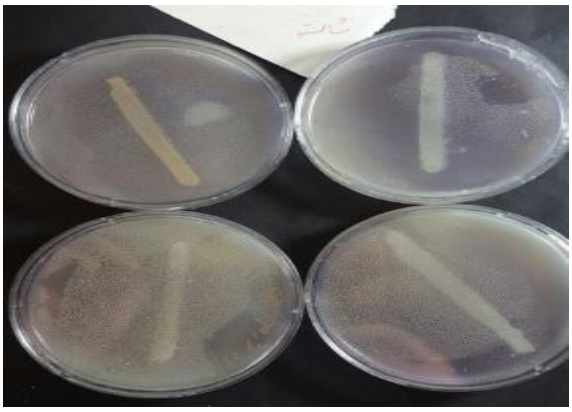
مقایسهٔ نتایج توالی‌یابی مخمرهای جداشده با توالی‌های موجود در پایگاه اطاعات ژنومی با استفاده از نرم‌افزار BLAST انجام شد و مخمرهای مدنظر بر اساس تحلیل توالی ژنومی شناسایی شدند. نتایج نشان دادند جدایهٔ SH002 به میزان ۱۰۰ درصد با *Candida tropicalis* و جدایهٔ SH014 به میزان ۱۰۰ درصد با *Candida fameta* قرابت فیلوژنی دارد.



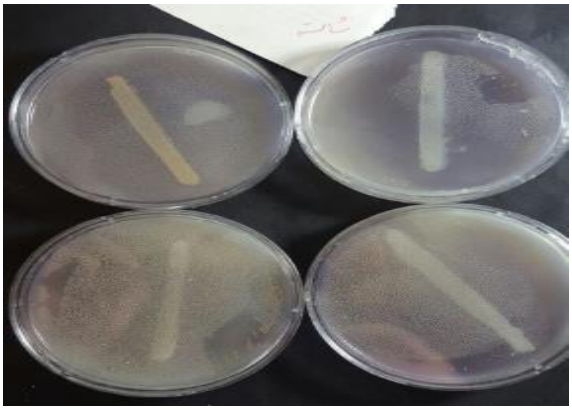
شکل ۱- بررسی جدایه‌های رسوبات آبی روی محیط کروم‌آگار؛ پس‌از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد، پلیت‌ها با آرایش رشد و رنگ‌های متفاوت ظاهر شدند. A. جدایهٔ SH002، B: جدایهٔ SH014، **C:** جدایهٔ جدایه SH005، D. جدایهٔ SH007 در محیط کروم‌آگار

جدول ۵- نتایج کیفی حضور آنزیم در جدایه‌ها

نام جدایه	آنزیم‌های بررسی‌شده						
	لیپاز	پروتئاز	آمیلاز	لسیتیناز	کیتیناز	پکتیناز	Dnase
SH002	+	+	+	+	-	-	+
SH005	+	+	+	−	−	−	+
SH007	+	+	+	+	−	−	+
SH014	+	−	+	+	−	−	+

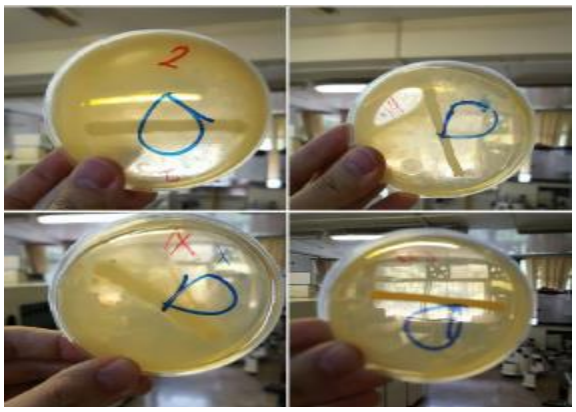


شکل ۲- بررسی تولید آنزیم آمیلاز دو تا پنج روز پس‌از گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد (هالهٔ شفاف در اطراف کشت خطی مخمر پس‌از اضافه‌کردن معرف مشاهده شد)

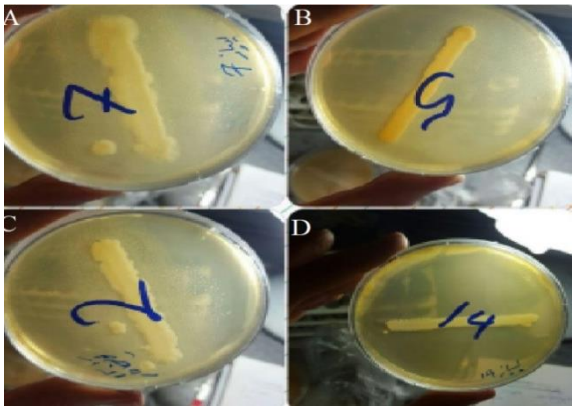


شکل ۳- بررسی تولید آنزیم لسیتیناز دو تا پنج روز پس‌از گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد (پلیت سمت چپ از پایین که بدون هاله و منفی گزارش شد، به جدایهٔ SH005 تعلق دارد)

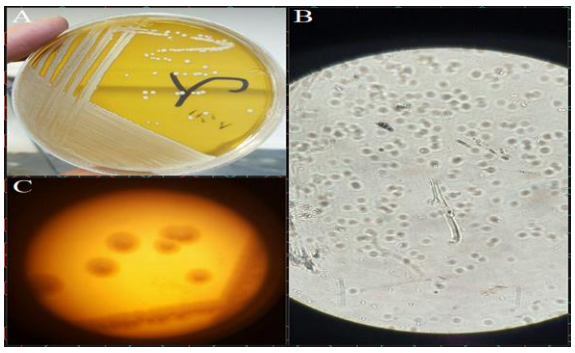
شکل ۴- بررسی آنزیم پروتئاز دو تا پنج روز پس‌از گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد (شکل‌های سمت راست و چپ آنزیم پروتئاز را نشان می‌دهند)



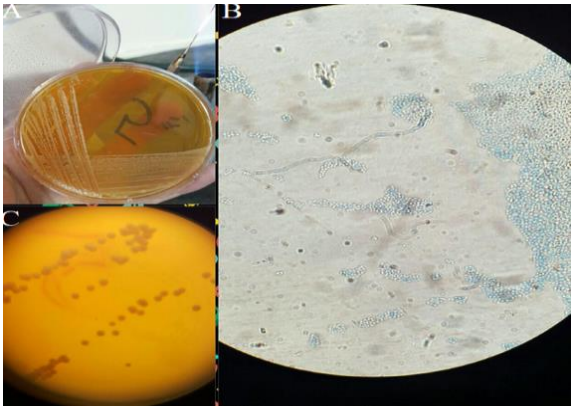
شکل ۵- بررسی تولید آنزیم DNase دو تا پنج روز پس‌از گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد (هر چهار پلیت دارای هالهٔ شفاف در اطراف کشت خطی مخمر هستند)



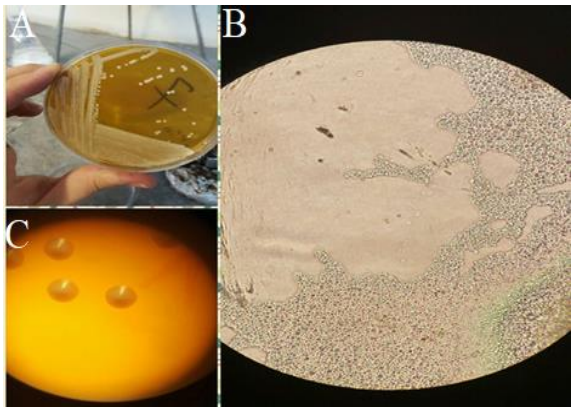
شکل ۶- بررسی تولید آنزیم لیپاز دو تا پنج روز پس‌از گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد (هر چهار پلیت دارای هالهٔ شفاف در اطراف کشت خطی مخمر هستند)؛ A. جدایهٔ SH007، B. جدایهٔ SH005، C. جدایهٔ SH002، D. جدایهٔ SH014



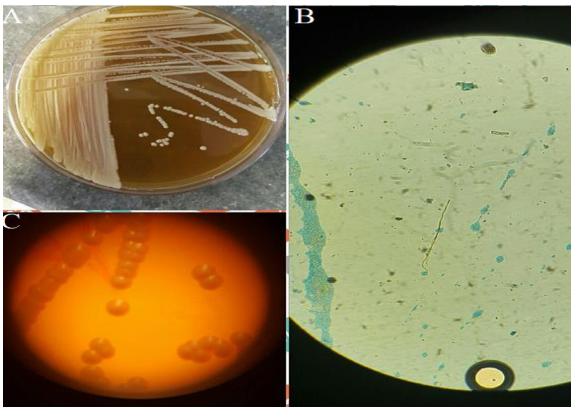
شکل ۷- تصویر جدایهٔ SH002؛ A. پلیت جدایه، B. رنگ‌آمیزی جدایه با لاکتوفنل‌بلو (بزرگ‌نمایی ۴۰×، C. کلنی زیر استریومیکروسکوپ



شکل ۸- تصویر جدایهٔ SH005؛ A. پلیت جدایه، B. رنگ‌آمیزی جدایه با لاکتوفنل‌بلو (بزرگ‌نمایی ۴۰×)، C. کلنی زیر استریومیکروسکوپ



شکل ۹- تصویر جدایهٔ SH007؛ A. پلیت جدایه، B. رنگ‌آمیزی جدایه با لاکتوفنل‌بلو (بزرگ‌نمایی ۴۰×)، C. کلنی زیر استریومیکروسکوپ



شکل ۱۰- تصویر جدایهٔ SH014؛ A. پلیت جدایه، B. رنگ‌آمیزی جدایه با لاکتوفنل‌بلو (بزرگ‌نمایی ۴۰×)، C.کلنی زیر استریومیکروسکوپ

بحث

طی سال‌های اخیر، مطالعه‌های وسیعی روی مخمرهای جداشده از محیط‌های مختلف انجام شده‌اند؛ باوجوداین، بیشتر مطالعه‌ها در زمینهٔ مخمرهای دارای منشأ غذایی بوده‌اند و کمتر به گونه‌های محیطی توجه شده است (۲۶). به‌منظور شناسایی و جداسازی مناسب مخمرها باید در نظر داشت ویژگی‌های فیزیکی-شیمیایی محیط، عامل مهم بوم‌شناختی برای تعیین زیستگاه آنهاست؛ این ویژگی به همراه ویژگی‌های تغذیه‌ای در تنوع زیستگاه مخمرها نقش دارد (۲۷). وانگ[۱۰] و همکاران (۲۰۰۸) برای نخستین‌بار، مخمرهایی را از آب دریا جداسازی کردند که به اثر مهاری آهن مقاوم بودند (۲۸). طبق منابع بررسی‌شده، تاکنون هیچ‌گونه بررسی به‌منظور جداسازی و شناسایی مخمر روی رسوبات رودخانه‌ها و دریاهای ایران انجام نشده است. تمام جدایه‌های پژوهش حاضر آنزیم آمیلاز را تولید کردند. النامانی[۱۱] و همکاران در سال ۲۰۱۵ پژوهشی انجام و نشان دادند مخمری که آنها جداسازی کردند توانایی استفاده از نشاسته را دارد (۲۹). نتایج کار کاراسکو[۱۲] و همکاران نشان دادند برخی از جدایه ها فاقد قدرت تولید آمیلاز هستند که با تحقیق حاضر همخوانی ندارد که می‌تواند به دلیل قدرت تولید آنزیم آمیلاز در محیط جامد توسط قارچ‌های رشته‌ای در محیط مایع می‌باشد که در تحقیق این محققین استفاده شده بود (۳۰).

در پژوهش حاضر، تمام جدایه‌ها آنزیم پکتیناز را نداشتند. در بررسی سهیل[۱۳] و همکاران (۲۰۰۹) که روی قارچ‌های مولد آنزیم‌های هیدرولیتیک جداشده از نمونه‌های خاک در پاکستان انجام شد، آنزیم‌های آمیلاز، پروتئاز، زایلاناز و پکتیناز بررسی شدند و نتایج

با یافته‌های پژوهش حاضر همخوانی داشتند؛ به‌طوری‌که سویه‌هایی که این پژوهشگران جدا کردند، قادر به تولید پکتیناز نبودند (۹). بوزینی[۱۴] و مارتینی[۱۵] (۲۰۰۷) به بررسی فعالیت ترشحی آنزیم‌های آمیلاز، پروتئاز، لیپاز، پکتیناز، کیتیناز و سلولاز مخمرهای جداشده از یخ رودها و آب‌های سرد شمال آرژانتین پرداختند. مقایسهٔ نتایج کار این پژوهشگران با پژوهش حاضر نشان داد سویه‌های جداشده خاصیت پکتینازی دارند؛ درنتیجه، تطابق‌نداشتن یافته‌های آنها با یافته‌های پژوهش حاضر ممکن است به‌علت جداشدن سویه‌ها از مناطق سرد و یخی باشد (۲۰). نتایج پژوهش‌های براندون[۱۶] و همکاران (۲۰۱۱) از بررسی آنزیم‌های بیرون‌سلولی استراز، سلولاز، پکتیناز، آمیلاز و پروتئاز مخمرهای جداشده از دریاچهٔ الیگوتروفیک در آرژانتین با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارند (۳۱). کریشن[۱۷] و همکاران (۲۰۱۱) به بررسی‌های آنزیمی آمیلاز، سلولاز و پروتئاز قارچ‌های جداشده از خاک جزیرهٔ King Georage پرداختند و نشان دادند مخمرهای جداشده از این نواحی خاصیت آمیلازی، پروتئازی و لیپازی دارند که این یافته‌ها با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارند (۳۲). جدایه‌های بررسی‌شده در پژوهش حاضر در طیف اسیدیتهٔ ۲ تا ۱۰ قادر به رشد بودند و توانستند اسیدیتهٔ محیط را به محدودهٔ مناسب خود یعنی ۶ تا ۷ برسانند. جدایه‌های بررسی‌شده در پژوهش حاضر در محدودهٔ دمایی ۱۵ تا ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد به‌خوبی رشد کردند و نتایج با نتایج پژوهش‌های شتایا و همکاران (۲۰۱۶) مطابقت داشتند؛ به‌طوری‌که مخمرهایی که این پژوهشگران جدا کردند، توانایی تحمل اسیدیته و دما در محدودهٔ یادشده را داشتند (۳۳). نتایج پژوهش‌های وانگ و همکاران (۲۰۱۶) که مخمرها را از آب‌های عمیق جداسازی کردند، ازنظر تحمل شرایط اسیدیته و دما با پژوهش حاضر مطابقت دارند (۳۴).

گفتنی است بر اساس بررسی‌های انجام‌شده، گزارش‌هایی از فعالیت پکتینازی و کیتینازی در مخمرهای جداشده از منابع مختلف وجود دارند که نشان می‌دهند منطقهٔ مخمر جداسازی‌شده بر فعالیت آنزیمی آن تأثیرگذار است.

توالی جدایه‌های شناسایی‌شده

SH002:GGAGGAAAGGAAACCAACAGGGATTGCCTTAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAA
GCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTCAGAGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTG
GGTCTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACAGAACGTCACAGGAGAATCCCGTGCGATGAG
ATGATCCAGGCCTATGTAAAGTTCCTTCGAAGTCGGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTG
GGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGT
GATGGAAAGATGAAAAGATTTGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGC
TTGAGATCAGACTTGGTATTTTGTATGTTACTTCTTCGGGGGTGGCCTCTACAGTTTATCGG
GCCAGCATCAGTTTGGGCGGTAGGAGAATTGCGTTGGAATGTGGCACGGCTTCGGTTGTGT
GTTATAGCCTTCGTCGATACTGCCAGCCTAGACTGAGGACTGCGGTTTATACCTAGGATGT
TGGCATAATGATCTTAAGTCGCCCGTCT

SH014:CGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAA
AGCTCAAATTTGAAATCCTGCGGGAATTGTAATTTGAAGGTTTCGTGGTCTGAGTCGGCCG
CGCCCAAGTCCATTGGAACATGGCGCCTGGGAGGGTGAGAGCCCCGTATGGCGCACGCCG
ACTCTTTGCACCGCGGCTCCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTA

References

(1) Barnett JA., Payne RW., Yarrow D. *Yeasts: Characteristics and identification*. Cambridgeshire: Cambridge University Press; 2000.

(2) Satyanarayana T., Kunze G. (2009) *Yeast biotechnology: Diversity and applications*. New York: Springer; 2009.

(3) Rosa CA., Peter G. Biodiversity and ecophysiology of yeasts. Retrieved from academic.oup.com; 2018.

(4) Zaky AS., Tucker GA., Daw ZY., Du C. Marine yeast isolation and industrial application. *FEMS Yeast Research* 2014; 14: 813-825.

(5) Bharathi S., Saravanan D., Radhakrishnan M., Balagurunathan R. Bioprospecting of marine yeast with special reference to inulinase production. *International Journal of ChemTech Research* 2011; 3: 1514-1519.

(6) Kutty SN., Philip R. Marine yeasts- a review. *Yeast* 2008; 25: 465-483.

(7) Stewart GG. Saccharomyces species in the production of beer. *Beverages* 2016; 2: 34.

(8) Rosi I., Vinella M., Domizio P. Characterization of β-glucosidase activity in yeasts of oenological origin. *Journal of Applied Microbiology* 1994; 77: 519-527.

(9) Sohail M., Naseeb S., Sherwani SK., Sultana S., Aftab S., Shahzad S., et al. Distribution of hydrolytic enzymes among native fungi: Aspergillus the pre-dominant genus of hydrolase producer. Pakistan Journal of Botany 2009; 41: 2567-2582.

(10) Diosma G., Romanin DE., Rey-Burusco MF., Londero A., Garrote GL. Yeasts from kefir grains: isolation, identification, and probiotic characterization. World Journal of Microbiology and Biotechnology 2014; 30:43-53.

(11) Uzunova-Doneva T., Donev T. Influence of the freezing rate on the survival of strains Saccharomyces cerevisiae after cryogenic preservation. *Journal of Culture Collections* 2002; 3: 78-83.

(12) Crespo MJ., Abarca ML., Cabañes FJ. Evaluation of different preservation and storage methods for Malassezia spp. Journal of Clinical Microbiology 2000; 38: 3872-3875.

(13) Bueno L., Gallardo R. Filamentous fungi preservation in distilled water.Revista Iberoamericana de Micología 1998; 15: 166-168.

(14) Kurtzman C., Fell JW., Boekhout T. The yeasts: A taxonomic study. New York: Elsevier; 1998.

(15) Murray MP., Zinchuk R., Larone DH. CHROMagar Candida as the sole primary medium for isolation of yeasts and as a source medium for the rapid-assimilation-of-trehalose test. Journal of Clinical Microbiology 2005; 43: 1210-1212.

(16) Matousek JL., Campbell KL., Kakoma I., Solter PF., Schaeffer DJ. Evaluation of the effect of pH on in vitro growth of Malassezia pachydermatis. Canadian Journal of Veterinary Research 2003; 67: 56.

(17) Brizzio S., Turchetti B., De Garcia V., Libkind D., Buzzini P., Van Broock M. Extracellular enzymatic activities of basidiomycetous yeasts isolated from glacial and subglacial waters of northwest Patagonia (Argentina). Canadian Journal of Microbiology 2007; 53: 519-525.

(18) Goud MJP., Suryam A., Lakshmipathi V., Charya MAS. Extracellular hydrolytic enzyme profiles of certain South Indian basidiomycetes. African Journal of Biotechnology 2009; 8: 354-360.

(19) Hankin L., Anagnostakis SL. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia* 1975; 597-607.

(20) Buzzini P., Martini A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. *Journal of Applied Microbiology* 2002; 93: 1020-1025.

(21) Van den Mooter M., Swings J. Numerical analysis of 295 phenotypic features of 266 Xanthomonas strains and related strains and

an improved taxonomy of the genus. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 1990; 40: 348-369.

(22) Martínez-Trujillo A., Aranda JS., Gómez-Sánchez C., Trejo-Aguilar B., Aguilar-Osorio G. Constitutive and inducible pectinolytic enzymes from Aspergillus flavipes FP-500 and their modulation by pH and carbon source. *Brazilian Journal of Microbiology* 2009; 40: 40-47.

(23) Kliemann E., De Simas KN., Amante ER., Prudêncio ES., Teófilo RF., Ferreira MMC., et al. Optimisation of pectin acid extraction from passion fruit peel (Passiflora edulis flavicarpa) using response surface methodology. *International Journal of Food Science and Technology* 2009; 44: 476-483.

(24) Gawel NJ. A modified CTAB DNA extraction procedure for Musa and Ipomea. Plant Mol Biol Rep 1991; 9: 292-296.

(25) Vijaya D., Harsha TR., Nagaratnamma T. Candida speciation using CHROM agar. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2011; 5: 755-757.

(26) Naseeb S., Ames RM., Delneri D., Lovell SC. Rapid functional and evolutionary changes follow gene duplication in yeast. *Proceedings of the Royal Society (The Proceedings of the Royal Society of London)* 2017; 284: 20171393.

(27) Troncoso E., Barahona S., Carrasco M., Villarreal P., Alcaíno J., Cifuentes V., Baeza M. Identification and characterization of yeasts isolated from the South Shetland Islands and the Antarctic Peninsula. *Polar Biology* 2017; 40: 649-658.

(28) Wang L., Chi Z., Wang X., Ju L., Chi Z., Guo N. Isolation and characterization of Candida membranifaciens subsp. flavinogenie W14-3, a novel riboflavin-producing marine yeast. *Microbiological Research* 2008; 163: 255-266.

(29) Al-Naamani LSH., Dobretsov S., Al-Sabahi J., Soussi B. Identification and characterization of two amylase producing bacteria Cellulosimicrobium sp. and Demequina sp. isolated from marine organisms. *Journal of Agricultural and Marine Sciences [JAMS]* 2015; 20: 8-15.

(30) Carrasco M., Villarreal P., Barahona S., Alcaíno J., Cifuentes V., Baeza M. Screening and characterization of amylase and cellulase activities in psychrotolerant yeasts. *BMC Microbiology* 2016; 16: 21.

(31) Brandão LR., Libkind D., Vaz ABM., Espírito Santo LC., Moliné M., de García V., van Broock M., Rosa CA. Yeasts from an oligotrophic lake in Patagonia (Argentina): Diversity, distribution and synthesis of photoprotective compounds and extracellular enzymes. *FEMS Microbiology Ecology* 2011; 76: 1-13.

(32) Krishnan A., Alias SA., Wong CMVL., Pang K-L., Convey P. Extracellular hydrolase enzyme production by soil fungi from King George Island, Antarctica. *Polar Biology* 2011; 34: 1535-1542.

(33) Shetaia YMH., Mohamed TM., Farahat LA., ElMekawy A. Potential biodegradation of crude petroleum oil by newly isolated halotolerant microbial strains from polluted Red Sea area. *Marine Pollution Bulletin* 2016; 111: 435-442.

(34) Wang J-W., Luo Z-H., Xu W., Ding J-F., Zheng T-L. Transformation of dimethyl phthalate esters (DMPEs) by a marine red yeast Rhodotorula mucilaginosa isolated from deep sea sediments of the Atlantic Ocean. *International Biodeterioration and Biodegradation* 2016; 109: 223-228.

---

[1]- Bernard Fisher
[2]- Amylase
[3]- Lipase
[4]- Protease
[5]- Chitinase
[6]- Lecitinase
[7]- Pectinase
[8]- Skim milk
[9]- Lugol
[10]- Wang
[11]- Al-Naamani
[12]- Carrasco
[13]- Sohail
[14]- Buzzini
[15]- Martini
[16]- Brandão
[17]- Krishnan