Downloaded from nbr.khu.ac.ir at 21:40 IRDT on Monday June 18th 2018

افزایش فعالیت آنزیم سلولاز در قارچ *تریکودرما ویریده* با القای جهش با پرتو گاما

خدیجه باقری[۱]، سمیرا شهبازی[۲*]، حامد عسکری[۲]، شیده موجرلو[۳] و فرنگیس امیرلو[۱]

دریافت: ۱۳۹۶/۴/۲۲/ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۱۰/ چاپ: ۱۳۹۶/۱۲/۲۸

[۱]گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

[۲]پژوهشکدهٔ کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران، ایران

[۳]گروه باغبانی و گیاهپزشکی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران

[*]مسئول مکاتبات: sshahbazi@nrcam.org

چکیده. گونه‌های سرده *Trichoderma* ازنظرتولید سلولاز با فعالیت آنزیمی بالا بسیار شناخته شده هستند. با وجود تولید آنزیم‌های سلولازی متنوع در قارچ *تریکودرما*، به‌علت عمل‌کرد آنزیمی پائین و هزینهٔ زیاد تولید، استفاده از آنزی‌مهای سلولازی آنها در تبدیل زیستی پسماندهای سلولزی چندان موفقیت‌آمیز نبوده است. تحقیق حاضر با هدف دست‌یابی به جدایه‌های موتانتی از گونهٔ *Trichodera viride* با توان تولید بیشتر آنزیم سلولاز با استفاده از القای جهش با پرتو گاما انجام گرفته است. سوسپانسیون اسپور قارچ در اپتیمم دوز ۲۵۰ گری تحت پرتوتابی با گاما قرار گرفت. اسپورهای جوانه‌زده به‌منظور بررسی پایداری پنج‌بار واکشت شدند و از بین آنها جدایه‌های موتانت با قابلیت اسپورزایی بهتر انتخاب شدند. فعالیت سلولازی با استفاده از سوبستراهای سلولزی کاغذ صافی واتمن شمارهٔ یک، کربوکسی متیل سلولز، آویسل، سلولز باکتریایی و سلولز کلوئیدی و براساس دستورالعمل IUPAC سنجیده شد. پروفایل پروتئین‌های سلولازی جدایه‌های موتانت با آزمون SDS-PAGE بررسی شد. بیشترین فعالیت سلولاز کل و فعالیت آنزیم آویسلاز به‌ترتیب با ۹۲/۴۳ و ۷۴/۴۰ U/mg در جدایهٔ موتانت M21 و بیشترین فعالیت اندوگلوکانازی در جدایهٔ موتانت M18 مشاهده شد. به‌طور کلی کاربرد اشعهٔ گاما در ۳۸ درصد از جدایه‌های جهش‌یافته به افزایش معنی‌دار در فعالیت سلولازی منجر شد. همچنین، از این روش به‌منزلهٔ روشی ساده و کارآمد برای دست‌یابی به جدایه‌های موتانتی می‌توان استفاده کرد که توانایی تولید مقادیر بالای آنزیم و دیگر متابولیت‌های میکروبی را داشته باشند.

واژه‌های کلیدی. الکتروفورز، پرتوتابی،سلولز،کربوکسی متیل سلولز

Cellulase enzyme production enhancement in *Trichoderma viride* by Gamma ray induced mutation

Khadijeh Bagheri[1], Samira Shahbazi[2*], Hamed Askari[2], Shideh Mojerlou[3] & Farangis Amirlou[1]

Received 13.07.2016/ Accepted 31.12.2017/ Published 19.03.2018

[1]Agronomy and Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran
[2]Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute (NSTRI), Atomic Energy Organization of Iran (AEOI), Iran
[3]Horticulture and Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran
*Correspondent author: sshahbazi@nrcam.org

Abstract. *Trichoderma* species have been famous for production of cellulases with relatively high enzymatic activity. However, attempts to use their cellulolytic enzymes in the bioconversion of cellulosic wastes have not been successful because of high cost of production and low enzymatic yields. This study aimed to obtain gamma-induced mutants of *T. viride* with enhanced extracellular cellulase production. Spore suspensions were exposed to γ-rays at 250 Gy as optimum dose. After irradiation, all germinated spores were grown onto PDA plates and mutant strains with better sporulation were selected and subcultured five times to test their stability. Cellulase activity was tested using Whatman No. 1 filter paper, carboxymethyl cellulose, avicel, bacterial cellulose and walseth cellulose according to the IUPAC recommendation. Extracellular proteins profiles of mutant strains were studied via SDS-PAGE. The maximum activity of total cellulase and avicelase were observed in the isolate of M21 (92.43 and 74.40 U/mg, respectively) and maximum endo-glucanase activity was observed in M18 mutant. The results of this study showed that the application of gamma ray led to a significant increase in Cellulose activity of 38 percent of mutant strains. Thus, this method could be used as a simple and efficient way to achieve strains with the ability to produce high levels of enzymes and other biological metabolites.

Keywords. carboxy methyl cellulose, cellulose, electrophoresis, irradiation, mutation

Downloaded from nbr.khu.ac.ir at 21:40 IRDT on Monday June 18th 2018

مقدمه

امروزه، اهمیت آنزیم سلولاز به‌علت پتانسیل استفاده از آن در توسعهٔ تکنولوژی اتانول در حال افزایش است. در آیندهٔ نزدیک، یکی ازکاربردهای مهم سلولاز، تبدیل زیستی بیوماس لیگنو-سلولزی به سوخت اتانول خواهد بود (Dillon *et al.*, 2008). آنزیم‌های سلولازی به‌ویژه سلولاز دو قارچ *تریکودرما* و *آسپرژیلوس* ۲۰ درصد بازار آنزیم دنیا را از آن خود ساخته‌اند. عمل‌کرد کم آنزیم‌های سلولازی و هزینهٔ زیاد تولید آنها، دو چالش اصلی در کاربرد صنعتی آنها به‌شمار می‌رود. ازهمین‌رو، روش‌های متعددی برای ارتقای فعالیت سلولازی، خصوصاً در قارچ سرده *تریکودرما* به‌کار گرفته می‌شود. بیشتر این تلاش‌ها در جهت افزایش فعالیت سلولاز کل یا فعالیت بخش بتاگلوکوزیدی سیستم سلولازی است (Awafo, 1997).

ازآنجاکه گونه‌های مختلف *تریکودرما* یکی از مفیدترین منابع تولید آنزیم‌های تجزیه‌کنندهٔ سلولز هستند، توجه خاصی به تولید آنزیم‌های سلولازی توسط این قارچ، ازطریق شناسایی و ایجاد گونه‌های برتر ازنظر تولید آنزیم، شده است (Persson *et al.*, 1991). از آغاز دههٔ ۱۹۶۰، که فعالیت سلولازی قارچی گزارش شد، تلاش‌های شایان توجهی در جهت تغییر ژنتیکی جدایه‌های *تریکودرما* و بهینه‌سازی کشت با فرض افزایش کارایی تولید سلولاز صورت گرفت و در دههٔ اخیر، روش‌های متعددی ازجمله جهش‌های شیمیایی، استفاده از پرتو فرابنفش ومهندسی ژنتیک برای به‌دست‌آوردن جدایه‌های تولیدکنندهٔ سلولاز بیشتر در اولویت قرار داشته است (Muthuvelayudham & Viruthagiri, 2006).

با توجه به پتانسیل کاربرد آنزیم‌های سلولازی در صنایع مختلف و نیز اهمیت نقش قارچ *تریکودرما* در تولید این نوع آنزیم، تحقیق حاضر با هدف ایجاد تنوع در ذخیرهٔ ژنتیکی قارچ *تریکودرما* بومی و نیز دست‌یابی به ژنوتیپ‌های جدید با توان فعالیت آنزیمی بیشتر، با استفاده از القای جهش با پرتو گاما در گونهٔ قارچی *Trichoderma viride* انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها

جداسازی قارچ *T. viride*

برای جداسازی قارچ *تریکودرما*، نمونه‌برداری از خاک اطراف ریشهٔ مزارع کشت محصولات مختلف انجام گرفت و سوسپانسیون نمونه‌های خاک به محیط کشت عصارهٔ سیب زمینی- دکستروز-آگار انتقال داده شد. پرگنه‌های حاصل، پس از تهیهٔ کشت تک-اسپور (به‌منظور خالص‌سازی)، با استفاده از کلید شناسایی قارچ-های ناقص و براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی فیالیدها و فیالوسپورها و اونتوژنز کنیدیوم‌ها شناسایی و جدایه‌ها برای اجرای تحقیق انتخاب شدند.

عملیات دوزیابی به‌منظور القای جهش در ژنوم قارچ *تریکودرما*

به‌منظور القای جهش در ژنوم قارچ، کنیدیوم‌ها (اسپورهای غیر-جنسی) به‌مثابهٔ اندام هدف برای پرتوتابی انتخاب شدند. سطح تشتک پتری حاوی کشت هفت‌روزهٔ قارچ روی محیط کشت PDA با محلول نمکی استریل شست‌وشو داده شد. سپس، به-کمک لوپ استریل، اسپورها از سطح پتری جمع‌آوری و تراکم اسپورها در این سوسپانسیون در زیر میکروسکوپ نوری با استفاده از لام گلبول‌شمار در غلظت 10^7 اسپور در میلی‌لیتر تنظیم شد. عملیات پرتوتابی بر سوسپانسیون اسپورها در ۹ دامنهٔ دوز صفر-۵۰- ۱۵۰- ۲۰۰- ۲۵۰- ۳۰۰- ۳۵۰- ۴۰۰- ۴۵۰ گرمی در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از دستگاه گاماسل با چشمهٔ کبالت ۶۰، اکتیویتهٔ ۲۵۰۰ کوری و نرخ دوز ۰/۲۳گرمی در ثانیه مستقر در مرکز تحقیقات کشاورزی، صنعتی و پزشکی هسته‌ای کرج انجام گرفت. درصد جوانه‌زنی اسپورهای پرتوتابی‌شده برای هر محدودهٔ دوز با شمارش اسپورهای جوانه‌زده (در محدودهٔ بزرگ-نمایی ۱۰ میکروسکوپ نوری) اندازه‌گیری شد (Moradi *et al.*, 2013).

اندازه‌گیری غلظت پروتئین خارج سلولی تولید شده در محیط کشت تخمیری

در ابتدا، با استفاده از غلظت‌های مختلف آلبومین به‌روش بردفورد، منحنی استاندارد رسم شد. سپس، پروتئین محلول ($mg.ml^{-1}$) در مایع فوقانی محیط TFM اندازه‌گیری شد. اساس این روش که یکی از دقیق‌ترین روش‌های بیوشیمیایی است، استفاده از تکنیک رنگ‌سنجی است. تغییر رنگ متفاوت کماسی بریلیانت بلو در پاسخ به غلظت‌های مختلف پروتئین رخ می‌دهد و اتصال آن به پروتئین سبب انتقال جذب حداکثر از ۳۶۵ نانومتر به ۵۹۵ نانومتر می‌شود (Bradford, 1976). با قرائت جذب نمونه

Downloaded from nbr.khu.ac.ir at 21:40 IRDT on Monday June 18th 2018

های مجهول و مقایسهٔ آنها با منحنی استاندارد، غلظت پروتئین خارج‌سلولی در محیط کشت تخمیری محاسبه شد (Shahbazi *et al.*, 2016).

سنجش فعالیت آنزیم سلولاز

فعالیت آنزیم سلولاز براساس سیستم IUPAC (Ghose, 1987) و با استفاده از گلوکز به‌مثابهٔ استاندارد اندازه‌گیری شد و فعالیت آنزیمی ویژه براساس واحد Units/mg گزارش شد. فعالیت آنزیمی ویژه به‌صورت مقدار فعالیت آنزیم براساس واحد Unit/ml (که در آن هر Unit مقدار آنزیمی است که یک میکرومول قند احیاکننده (گلوکز) را در دقیقه از سوبسترای سلولزی آزاد می‌کند) به مقدار کل پروتئین موجود در محیط (mg/ml) تعریف می‌شود (Shahbazi *et al.*, 2014).

اندازه‌گیری فعالیت سلولاز کل (FPase)

برای اندازه‌گیری فعالیت سلولاز کل از نیم‌میلی‌لیتر مایع فوقانی محیط TFM و کاغذ صافی واتمن شمارهٔ یک به‌منزلهٔ سوبسترا استفاده شد. جذب نوری نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت شد و مقادیر جذب نوری نمونه‌ها به واحد آنزیمی تبدیل شد (Shahbazi *et al.*, 2014).

تعیین فعالیت اندوگلوکانازی (CMCase)

برای اندازه‌گیری فعالیت اندوگلوکانازی از کربوکسی متیل سلولز به‌منزلهٔ سوبسترا و ۰/۵ میلی‌لیتر از مایع فوقانی محیط کشت TFM استفاده شد (Shahbazi *et al.*, 2016).

اندازه‌گیری فعالیت اگزوگلوکانازی (Avicelase)

برای اندازه‌گیری فعالیت اگزوگلوکانازی از محلول ۰/۵درصد آویسل به‌مثابهٔ سوبسترا و ۰/۵میلی‌لیتر از مایع فوقانی محیط کشت TFM استفاده شد (Shahbazi *et al.*, 2016).

الکتروفورز SDS- PAGE

برای بررسی الگوی پروتئینی از الکتروفورز SDS-PAGE به‌روش لاملی (Laemmli, 1970) در سیستم ناپیوسته (ژل ردیف کننده، ۴/۵درصد و ژل تفکیک‌کننده، ۱۲درصد) استفاده شد.

نتایج و بحث

تعیین محدودهٔ مناسب پرتوتابی

مقایسهٔ درصد جوانه‌زنی اسپور، پس از گذشت ۲۴ ساعت از زمان پرتوتابی، در ۹ دوز مختلف به‌منظور تعیین مناسب‌ترین محدوده جهت پرتوتابی، تیمارها را در چند گروه مختلف قرار داد. با افزایش در میزان دوز، قدرت جوانه‌زنی اسپور به‌تدریج کاهش یافت و پرتوتابی در محدودهٔ دوز ۴۵۰ گرمی، جوانه‌زنی اسپور قارچ را به‌طور کامل متوقف کرد (جدول ۱). براساس مطالعهٔ Ahari Mostafavi و Safaie (2008)، معیار دوز جذبی مناسب برای القای موتاسیون غیرکشنده در میکروارگانیسم‌ها ظهور تقریباً ۴۰ تا ۵۰ درصد جوانه‌زنی اسپور بعد از پرتوتابی است (Moradi *et al.*, 2013). برهمین‌اساس، دوز ۲۵۰ گرمی، به‌مثابهٔ دوز بهینه به‌منظور القای موتاسیون در ژنوم قارچ تریکودرما انتخاب شد.

اندازه‌گیری غلظت پروتئین خارج سلولی در محیط کشت تخمیری

پروتئین خارج‌سلولی اندازه‌گیری‌شده برای جدایه‌های جهش‌یافته در محدودهٔ (mg/ml) ۰/۰۵ تا ۰/۱۸۲ قرار دارد. بیشترین غلظت پروتئین، به جدایهٔ M2 با۰/۱۸۲mg/ml مربوط است که نسبت به جدایهٔ وحشی با mg/ml ۰/۱۲۰، افزایش ۱/۵ برابری نشان داده است. قارچ‌های رشته‌ای خصوصاً قارچ های سرده *تریکودرما*، ظرفیت زیادی برای تولید پروتئین خارج‌سلولی دارند (Durand *et al.*, 1988) که این ظرفیت، به‌کمک جهش تصادفی در برنامه‌های بهبود جدایه‌ها افزایش یافته است (Vu *et al.*, 2011).

سنجش فعالیت سلولاز

میزان هیدرولیز سوبسترا به ترکیب منبع کربنی استفاده‌شده وابسته است دارد. برای انجام آزمایش‌های هیدرولیز از سوبستراهای مدل متفاوتی استفاده شد که گرچه فاقد ویژگی‌های یکسان با چیزی هستند که سلولز در دیوارهٔ سلولی ترکیبات گیاهی از خود نشان می‌دهد، در تحقیقات به‌شکل گسترده‌ای به‌منظور نشان‌دادن تفاوت‌های عمل‌کردی آنزیم به‌کار می‌روند. سوبستراهای معمولی که در تعیین فعالیت سیستم سلولازی به‌کار می‌روند شامل کاغذ صافی، کربوکسی متیل سلولز، آویسل و α-سلولز هستند.

درکنار این سوبستراها، سلولز باکتریایی و سلولز آمورف هم به‌مثابهٔ سوبسترای مدل در اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی به‌کار گرفته می‌شوند (Andersen, 2007). ازآنجاکه تفاوت جدایه‌ها ازنظر میزان غلظت پروتئین خارج‌سلولی، امکان مقایسهٔ مستقیم بین فعالیت آنزیمی آنها را نمی‌دهد، بهتر آن است مقایسهٔ فعالیت

Downloaded from nbr.khu.ac.ir at 21:40 IRDT on Monday June 18th 2018

جدول ۱- مقایسهٔ میانگین درصد جوانه‌زنی اسپور قارچ تریکودرما در ۹ دوز اشعه گاما.

Table 1. Mean comparison of *Trichoderma* spore germination rate in nine doses of gamma ray.

	دوز پرتوتابی (Gy)								
	۰	۵۰	۱۵۰	۲۰۰	۲۵۰	۳۰۰	۳۵۰	۴۰۰	۴۵۰
قدرت جوانه زنی (٪)	۸۵/۵^{a}	۸۱/۱^{b}	۷۳/۹^{c}	۵۹/۷^{d}	۴۳/۴^{e}	۱۵/۵^{f}	۱۱/۹^{g}	۹/۷^{g}	۰^{h}

جدول ۲- مقایسهٔ میانگین FPase (U/mg) جدایه‌های وحشی و موتانت گونهٔ *T. viride*.

Table 2. Mean comparison of FPase (U/mg) of wild and mutant strains of *T. viride.*

جدایهٔ قارچ	فعالیت آنزیمی ویژه (U/mg)	جدایهٔ قارچ	فعالیت آنزیمی ویژه (U/mg)
*T. viride*control	۲۹/۷۵^{kl}	*T. viride*M11	۲۹/۰۳^{kl}
T. viride M1	۲۴/۶۲^{lmn}	*T. viride* M12	۳۷/۰۶^{ghi}
T. viride M2	۱۹/۵۱^{n}	*T. viride* M13	۳۱^{jk}
T. viride M3	۲۲/۷۳^{mn}	*T. viride* M14	۴۲/۳۴^{fg}
T. viride M4	۲۸/۳۵^{kl}	*T. viride* M15	۴۹/۸۲^{de}
T. viride M5	۳۱/۴۴^{jk}	*T. viride* M16	۶۷/۰۳^{b}
T. viride M6	۲۷/۶۰^{klm}	*T. viride* M17	۴۹/۵۲^{e}
T. viride M7	۳۶/۹۱^{hi}	*T. viride* M18	۵۲/۵۲^{de}
T. viride M8	۳۲^{ijk}	*T. viride* M19	۵۴/۴۳^{cde}
T. viride M9	۳۶/۳۸^{hij}	*T. viride* M20	۷۱/۰۱^{b}
T. viride M10	۳۰/۱۵^{kl}	*T. viride* M21	۹۲^{a}

سلولازی جدایه‌ها برمبنای غلظت پروتئین موجود در مایع فوقانی محیط تخمیر صورت گیرد (Martins *et al*., 2008). ازهمین‌رو، در تحقیق حاضر، فعالیت آنزیمی جدایه‌ها براساس فعالیت آنزیمی ویژهٔ آنها، به‌صورت مقدار فعالیت آنزیم (Units/ml) به مقدار کل پروتئین تعریف می‌شود، گزارش شده است.

سنجش فعالیت سلولاز کل

تجزیهٔ کامل سلولز به مونوساکارید سازندهٔ آن (گلوکز)، مستلزم فعالیت هم‌افزایی اجزای مختلف سیستم سلولازی (اندوگلوکاناز-ها، اگزوگلوکانازها و بتاگلوکوزیدازها) است. فعالیت سلولزی کل، که FPase هم نامیده می‌شود، نشان‌دهندهٔ برهم‌کنش این آنزیم‌ها با سوبسترای سلولزی است و با استفاده از سوبسترای ناهمگن کاغذ صافی واتمن شمارهٔ یک، که در ساختار خود شامل هر دو بخش کریستالی و آمورف است، اندازه‌گیری می‌شود (Xu *et al*., 2011). براساس نتایج جدول ۲ بیشترین فعالیت FPase با ۹۲/۴۳ Unit/mg به جدایهٔ M18 مربوط است که نسبت به جدایهٔ وحشی، که فعالیتی برابر با ۴۸/۳۳ Unit/mg دارد، ۱/۹ برابر شده است.

سنجش فعالیت اندوگلوکانازی (CMCase)

اندوگلوکانازها پیوندهای گلیکوزیدی داخلی را به‌شکل تصادفی هیدرولیز می‌کنند و سبب کاهش سریع در طول پلیمر و افزایش تدریجی در تراکم قندهای احیاکننده می‌شوند (Vlasenko *et al*., 2010). جدول ۳ مقایسهٔ میانگین فعالیت CMCase در جدایه‌های وحشی و موتانت را نشان می‌دهد. جدایهٔ موتانت M21، که میزان CMCase آن در مقایسه با جدایهٔ مادری ۳/۱ برابر افزایش داشته است، با ۹۲ U/mg بیشینه فعالیت اندوگلوکانازی را در مقایسه با دیگر جدایه‌های موتانت این گونه به خود اختصاص داده است.

سنجش فعالیت اگزوگلوکانازی (Avicelase)

یکی از ویژگی‌های مهم تمامی سلوبیوهیدرولازها آن است که قادر به عمل‌کردن روی سوبسترای میکروکریستالی هستند. به-منظور تعیین فعالیت اگزوگلوکانازی در این تحقیق از سلولز میکروکریستالی آویسل استفاده شد که برای حملهٔ آنزیم‌های اندوگلوکانازی نسبتاً غیرقابل دسترس است و سوبسترای مناسبی برای سنجش فعالیت اگزوگلوکانازی به‌شمار می‌رود (Zhang & Lind, 2004). مقایسهٔ میانگین فعالیت آویسلاز جدایه‌های وحشی و موتانت (جدول ۴) نشان داد که بیشینهٔ فعالیت اگزوگلوکانازی به

Downloaded from nbr.khu.ac.ir at 21:40 IRDT on Monday June 18th 2018

جدول ۳- مقایسهٔ میانگین CMCase (U/mg) جدایه‌های وحشی و موتانت گونهٔ *T. viride*.

Table 3. Mean comparison of CMCase (U/mg) of wild and mutant strains of *T. viride.*

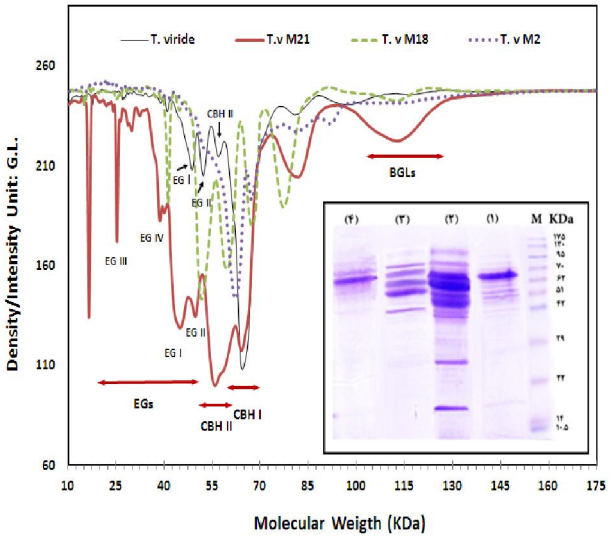
جدایهٔ قارچ	فعالیت آنزیمی ویژه (U/mg)	جدایهٔ قارچ	فعالیت آنزیمی ویژه (U/mg)
T. viride control	۴۸/۳۳^{ghi*}	*T. viride* M11	۳۹/۸۴^{hi}
T. viride M1	۴۱/۹۷^{hi}	*T. viride* M12	۴۶/۳۷^{hi}
T. viride M2	۳۶/۸۷^{i}	*T. viride* M13	۵۰^{ghi}
T. viride M3	۴۰/۹۱^{hi}	*T. viride* M14	۶۵/۳۲^{ed}
T. viride M4	۴۸/۲۷^{ghi}	*T. viride* M15	۹۲/۳۷^{a}
T. viride M5	۵۳/۲۰^{efgh}	*T. viride* M16	۸۸/۷۹^{ab}
T. viride M6	۴۳/۹۷^{hi}	*T. viride* M17	۸۷/۹۸^{ab}
T. viride M7	۵۱^{fghi}	*T. viride* M18	۹۲/۴۳^{a}
T. viride M8	۴۸/۷۵^{ghi}	*T. viride* M19	۶۴/۸۹^{def}
T. viride M9	۳۸/۲۹^{i}	*T. viride* M20	۷۵/۸۰^{bcd}
T. viride M10	۶۶/۹۲^{cde}	*T. viride* M21	۴۴/۲۰^{hi}

جدول ٤- مقایسهٔ میانگین Avicelase (U/mg) جدایه‌های وحشی و موتانت گونهٔ *T. viride*.

Table 4. Mean comparison of Avicelase (U/mg) of wild and mutant strains of *T. viride.*

جدایهٔ قارچ	فعالیت آنزیمی ویژه (U/mg)	جدایهٔ قارچ	فعالیت آنزیمی ویژه (U/mg)
T. viride control	۳۲/۵۸^{fg*}	*T. viride* M11	۲۰/۹۷^{ij}
T. viride M1	۲۱/۷۳^{ij}	*T. viride* M12	۳۳/۷۳^{efg}
T. viride M2	۱۸/۹۶^{ij}	*T. viride* M13	۳۲/۶۹^{fg}
T. viride M3	۲۰/۶۵^{ij}	*T. viride* M14	۲۹/۹۳^{g}
T. viride M4	۲۴/۲۱^{hi}	*T. viride* M15	۳۹/۳۹^{def}
T. viride M5	۲۴^{hi}	*T. viride* M16	۴۹/۰۱^{c}
T. viride M6	۲۲/۴۸^{ij}	*T. viride* M17	۳۹/۴۲^{def}
T. viride M7	۱۹/۳۶^{ij}	*T. viride* M18	۵۱/۹۶^{c}
T. viride M8	۳۰/۲۵^{gh}	*T. viride* M19	۴۷/۸۴^{c}
T. viride M9	۱۵/۸۱^{j}	*T. viride* M20	۵۹/۷۱^{b}
T. viride M10	۱۵/۲۲^{j}	*T. viride* M21	۷۴/۴۰^{a}

Downloaded from nbr.khu.ac.ir at 21:40 IRDT on Monday June 18th 2018



شکل ۱– الگوی پروتئین‌های خارج سلولی در *T. viride* و نمودار غلظت سنجی باندهای مربوط به هر آنزیم، (M) مارکر (۱) *T. v* control (۲) *T.v* *T. v* M2 (۴) *T. v* M18(۳)M21

Fig. 1. Extracellular protein profile of *T. viride* and its densitometry of related enzymes bands. (M); marker, (1); *T. v.* control, (2); *T.v.*M21, (3); *T. v* M18 , (4); *T. v* M2.

جدایهٔ M21 اختصاص دارد که با U/mg ۷۴/۴۰ فعالیت آن در قیاس با جدایهٔ مادری ۲/۳ برابر شده است.

پروفایل پروتیئنی برخی از جدایه‌های موتانت *T. viride*

پروفایل پروتئین‌های خارج‌سلولی در برخی سویه‌های موتانت *T.viride* در شکل ۱ آمده است. جدایهٔ M21 *T. viride*، که براساس نتایج سنجش فعالیت آنزیمی، بیشترین میزان فعالیت اگزوگلوکانازی (آویسلازی) را به خود اختصاص داده است، در پروفایل پروتئینی خود در محدودهٔ مربوط به آنزیم‌های سلوبیوهیدرولاز، به‌ترتیب، باندهایی با وزن مولکولی (KDa) ۶۴ و ۵۶ برای CBH I و CBH II نشان داد. با مقایسهٔ الگوی پروتئینی این جدایه با جدایهٔ وحشی *T. virid* ، که باند مربوط به آنزیم CBH II آن ضعیف است، آشکار می‌شود که افزایش در میزان هیدرولیز آویسل در این جدایه نسبت به جدایهٔ وحشی به حضور دو باند با شدت رنگ‌پذیری زیاد متعلق به آنزیم‌های اگزوگلوکاناز و عمل‌کرد هم‌افزایندهٔ اگزو-اگزو آنها با یکدیگر مربوط است. بررسی الگوی باندهای پروتئینی جدایهٔ *T. viride* M21 که بیشینهٔ فعالیت اندوگلوکانازی را در مقایسه با گونهٔ والد *T. viride* از خود نشان داده، حضور باندهایی با وزن‌های مولکولی ۲۵، ۴۹، ۴۵ و ۳۸ کیلو دالتون به ترتیب برای آنزیم‌های EG III، EG I، EG II و EG IV را مشخص می‌سازد. الکتروفورز SDS-PAGE پروتئین‌های ترشحی برای جدایهٔ *T. viride* M18، که براساس نتایج اندازه‌گیری فعالیت آنزیم بیشترین میزان FPase را به خود اختصاص داده، باندهایی با وزن مولکولی KDa ۶۸ و KDa ۶۰ مربوط به آنزیم‌های CBH I و CBH II را نشان می‌دهد. در مقایسه با جدایهٔ وحشی، که در پروفایل خود در محدودهٔ گزارش‌شده برای آنزیم‌های اندوگلوکانازی، تنها باندهای ضعیف آنزیم EG I و EG II قابل مشاهده بود، در الگوی پروتئینی جدایهٔ *T. viride* M18 باند قوی با وزن مولکولی ۵۲ و KDa ۴۱ به‌ترتیب مربوط به EG II و EG IV حضور داشت. همان‌گونه که پیش از این ذکر شد، هیدرولیز کارآمد سلولاز نیازمند حضور هر سه گروه آنزیم‌های تشکیل-دهندهٔ سیستم سلولازی (CBHs, EGs, BGLs) است. میزان زیاد FPase در جدایهٔ *T. viride* M21 به ترشح یک کمپلکس سلولازی کامل در این جدایه و رفتار هم‌افزایی اجزای منفرد حاضر در این سیستم برای تجزیهٔ سوبسترای سلولزی ناهمگن کاغذ صافی واتمن مربوط است. در پروفایل پروتئینی جدایهٔ *T. viride* M2، که ضعیف‌ترین جدایهٔ موتانت در گونهٔ *T. viride* ازلحاظ فعالیت CMCase و FPase است و ازنظر فعالیت

Downloaded from nbr.khu.ac.ir at 21:40 IRDT on Monday June 18th 2018

اگزوگلوکانازی نیز یکی از جدایه‌هایی است که کمترین فعالیت آویسلازی را داشته است، در محدودهٔ مربوط به آنزیم‌های سلوبیو هیدرولاز تنها باندی با وزن مولکولی KDa ۶۲ مربوط به آنزیم CBH I تشکیل شده است و در محدودهٔ مربوط به آنزیم‌های اندوگلوکانازی نیز باند واضحی قابل تشخیص نبود.

نتیجه‌گیری

نتایج اندازه‌گیری فعالیت سلولازی با استفاده از سوبستراهای مختلف نشان داد که حداکثر فعالیت آنزیمی، در تمامی جدایه‌های تحت بررسی در حضور سلولز کلوئیدی، که طی انجام مراحل آزمایش از تیمار آویسل با اسیدفسفریک تولید شد، حاصل شده است. ازآنجاکه ساختار کریستالی و منظم بیوپلیمر سلولز، چالشی در هیدرولیز شیمیایی و آنزیمی آن محسوب می‌شود، تبلورزدایی بیوماس لیگنوسلولزی طی تیمار آن با اسیدفسفریک، با درنظرگرفتن ویژگی غیرخورندگی و غیرسمی‌بودن این اسید، می‌تواند راه‌کاری مؤثر در بهبود فرآیند تجزیهٔ مواد سلولزی به‌منظور تسهیل در تولید قندهای قابل تخمیر به‌شمار آید که کاربردهای متعددی در مصارف مختلف صنعتی دارند.

به‌طورکلی، نتایج این تحقیق نشان داد که امکان ایجاد تغییر در میزان تولید پروتئین خارج‌سلولی و فعالیت سلولازی در اثر کاربرد پرتو گاما وجود دارد و ایجاد جدایه‌های قارچی با توان تولید آنزیم‌های سلولازی بیشتر، که پتانسیل بالاتری در کاربردهای صنعتی به‌ویژه در مدیریت ضایعات و بقایای گیاهی، تخمیر و بازیافت سلولز، تولید زیست انرژی و دیگر فرآورده‌های زیستی داشته باشند، توسط القای جهش با پرتو گاما میسر است. جدایه‌های جهش‌یافتهٔ حاصل از این تحقیق مانند M2، که بیشترین فعالیت سلولاز کل و فعالیت آنزیم آویسلاز (با ۹۲/۴۳ و ۷۴/۴۰ U/mg به‌ترتیب) را نشان داد و M18 که بیشترین فعالیت اندوگلوکانازی را داراست، جدایه‌های مناسبی برای تحقیقات کاربردی در زمینهٔ تولید این آنزیم‌ها با مصارف گوناگون هستند. نتایج این مطالعه اثبات کرد که کاربرد روش القای جهش با پرتودهی گاما در ۳۸ درصد از جدایه‌های جهش‌یافتهٔ گونهٔ *T. viride* به افزایش معنی‌دار در فعالیت سلولازی منجر می‌شود. این دستاورد راه را برای کاربردی‌کردن هرچه بیشتر این روش القای جهش و ایجاد تنوع ژنتیکی در قارچ‌های (سرده‌های *Trichoderma*, *Aspergillus*) تولیدکنندهٔ آنزیم‌های ارزشمندی مانند انواع سلولازها، کیتینازها، پروتئازها، پکتیناز و فیتازها و دست‌یابی به جدایه‌های قابل استفاده در تولید انبوه و صنعتی آنزیم هموار می‌سازد.

سپاسگزاری

این مقاله از اعتبارات پروژه "تولید مواد بیولوژیک به منظور کنترل عوامل بیماری زای گیاهی خاکزاد- A88A099" انجام شده و نویسندگان از همکاری پژوهشکدهٔ کشاورزی هسته‌ای و دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه زنجان تشکر می‌نمایند.

REFERENCES

Ahari Mostafavi, H. and Safaie, N. 2008. Application of nuclear technology in plant protection. – Zolal Kosar Publisher. Tehran. 122 pp.

Andersen, N. 2007. Enzymatic hydrolysis of cellulose: experimental and modeling studies. – Ph.D. Thesis. University of Technical, Denmark.

Awafo, V.A. 1997. Biosynthesis of cellulase system from *Trichoderma reesei* and its characteristics. – Ph.D. Thesis. University of McGill, Montreal, Canada.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. – Anal. Biochem.72: 248-54.

Dillon, A.J.P., Camassola, M., Henriques, J.A.P., Fungaro, M.H.P., Azevedo, A.C.S., Velho, T.A.F. and Laguna, S.E. 2008. Generation of recombinants strains to cellulases production by protoplast fusion between *Penicillium echinulatum* and *Trichoderm-aharzianum*. – Enzyme Microb. Technol. 43: 403-409.

Durand, H., Clanet, M. and Tiraby, G. 1988. Genetic improvement of *Trichoderma reesei* for large scale cellulase production. – Enzyme Microbiol. Technol. 10: 341-346.

Ghose, T.K. 1987. Measurement of cellulase activities. – Pure Appl. Chem. 59: 257-68.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. – Nature 227: 680-685.

Martins, L.F., Kolling, D., Camassola, M., Dillon, A.J.P. and Ramos, L.P. 2008. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. – Bioresource Technol. 99: 1417-1424.

Moradi, R., Shahbazi, S., Ahari mostafavi, H., Ebrahimi, M.A., Askari, H. and Mirmajlesi, M. 2013. Investigation of gamma radiation effects on morphological and antagonistic characteristics of *Trichoderma harzianum*. – Crop Biotech. 4: 109-117.

Muthuvelayudham, R. and Viruthagiri. T. 2006. Fermentative production and kinetics of cellulose protein on

Downloaded from nbr.khu.ac.ir at 21:40 IRDT on Monday June 18th 2018

Trichoderma reesei using sugarcane bagasse and rice straw. – Afr. J. Biotechnol. 5: 1873-1881.

Persson, I., Tjerneld, F. and Hahn-Hagerdahl, B. 1991. Fungal cellulytic enzyme production: a review. – Process Biochem. 26: 65-74.

Shahbazi, S., Askari, H. and Mojerlou, S. 2016. The impact of different physicochemical parameters fermentation on extracellular cellulolytic enzyme production by *Trichoderma harzianum*. – J. Crop Protec. 5: 397-412.

Shahbazi, S., Ispareh, Kh., Karimi, M., Askari, H. and Ebrahimi, M.A. 2014. Gamma and UV radiation induced mutagenesis in *Trichoderma reesei* to enhance cellulases enzyme activity. – Intl. J. Farm. Alli. Sci. 3: 543-554.

Vlasenko, E., Schülein, M., Cherry, J. and Xu, F. 2010. Substrate specificity of family 5, 6, 7, 9, 12, and 45 endoglucanases. – Bioresour. Technol. 101: 2405-2411.

Vu, V.H., Pham, T.A. and Kim, K. 2011. Improvement of fungal cellulase production by mutation and optimization of solid State Fermentation. – Mycobiol. 39: 20-25.

Xu, F., Jin, H., Li, H., Tao, L., Wang, J. and Chen, S. 2011. Genome shuffling of *Trichoderma viride* for enhanced cellulase production. – Ann. Microbiol. 5: 176-191.

Zhang, Y.H.P. and Lynd, L.R. 2004. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. – Biotechnol. Bioeng. 88: 797-824.

*****

How to cite this article:

Bagheri, Kh, Shahbazi, S., Askari, H., Mojerlou, Sh. And Amirlou, F. 2018. Cellulase enzyme production enhanceement in *Trichoderma viride* by Gamma ray induced mutation. – Nova Biologica Rep. 4: 329-336.

باقری، خ.، شهبازی، س.، عسکری، ح.، موجرلو، ش. و امیرلو، ف. ۱۳۹۶.
افزایش فعالیت آنزیم سلولاز در قارچ *تریکودرما ویریده* با القای جهش با پرتو گاما.
– یافته‌های نوین در علوم زیستی ۳۳۶-۳۲۹.