

## بررسی تأثیر آنزیم‌های سلولاز جدایه‌های جهش‌یافته قارچ *Trichoderma harzianum* و *Trichoderma viride* بر تجزیه زیستی سلولز Ia، Ib و III

### Investigating of the Influence of Cellulase Enzymes from Mutated Isolates of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* on Biodegradation of Cellulose Ia, Ib and III

سمیرا شهبازی<sup>۱\*</sup> و حامد عسکری<sup>۲</sup>

تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۶/۲۷

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۶/۰۴

#### چکیده

در این مطالعه، تولید آنزیم سلولاز و پروتئین خارج سلولی دو گونه از قارچ تریکودرما (*Trichoderma harzianum* و *T. viride*) و جهش‌یافته‌های آن‌ها بررسی شد. سنجش فعالیت آنزیم سلولاز با استفاده از آویسل، کربوکسی متیل سلولز (III)، کاغذ صافی واتمن شماره ۱ و سلولز باکتریایی (Ia) انجام شد. خصوصیات ساختار شیمیایی این ترکیبات با استفاده از اسپکتروسکوپی مادون قرمز تبدیل فوریه (FT-IR)، پراش اشعه ایکس (XRD) و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) بررسی شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان داد که سلولز باکتریایی ساختار فیبری ظریف‌تری در مقایسه با آویسل و کربوکسی متیل سلولز دارد. نسبت ضخامت فیبر سلولز باکتریایی در مقایسه با آویسل تقریباً ۱ به ۳۰ بود. ارزیابی‌های اسپکتروسکوپی مادون قرمز و پراش اشعه ایکس نشان داد که CMC حاوی گروه‌های کربوکسیلیک بر روی ساختار خود است و کریستالیزاسیون آن ۸۱/۸۴٪ می‌باشد. کریستالیزاسیون آویسل و سلولز باکتریایی نشان داد که شاخص کریستالیزاسیون آویسل (۸۹/۱۵٪) بیشتر از سلولز باکتریایی (۶۶/۴۴٪) می‌باشد. هر دو گونه و جهش‌یافته‌های آن‌ها مقادیر مختلفی از پروتئین خارج سلولی را در محیط تخمیر تولید کردند. در جدایه‌های *T. harzianum* بالاترین میزان فعالیت آنزیم سلولاز به ترتیب در جدایه‌های جهش‌یافته Th M6 و Th M7 و در جدایه‌های *T. viride* بالاترین فعالیت آنزیمی به ترتیب در جدایه‌های جهش‌یافته Tv M14، Tv M15 مشاهده گردید. اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی با استفاده از سلولز باکتریایی مقادیر بالاتری از فعالیت را در مقایسه با سوبستراهای آویسل و کاغذ صافی نشان داد که این امر نشانه قابلیت دسترسی بالای سلولز باکتریایی یا سلولز Ia برای تجزیه زیستی در مقایسه با آویسل یا سلولز Ib می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: کریستالیزاسیون، آویسل، سلولز باکتریایی، آنزیم سلولاز، موتانت

۱ و ۲. به ترتیب استادیار و کارشناسی‌ارشد گروه گیاهپزشکی و نگهداری مواد غذایی، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران، کرج، ایران

Email: SShahbazi@aeoi.org.ir

\*: نویسنده مسوول

## مقدمه

تنها یکی از دسته‌های آنزیم برای هیدرولیز استفاده شود، فرایند هیدرولیز می‌تواند مختل شود. عملکرد با یکدیگر (که اغلب به‌عنوان سینرژی مطرح می‌شود) هر سه دسته آنزیم‌های سلولولیتیک، برای یک فرایند هیدرولیز آنزیمی مؤثر ضروری می‌باشد. با توجه به پتانسیل کاربرد آنزیم‌های سلولولازی در صنایع مختلف و نیز اهمیت نقش گونه‌های ترکیب‌درما در تولید این نوع آنزیم، تحقیق حاضر با هدف شناسایی سوبستراهای مناسب برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی در جدایه‌های متنوع جهش‌یافته گونه‌های قارچی *T. viride* و *T. harzianum* انجام شد و برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی از سوبستراهای مختلف شامل سلولز باکتریایی (BC، به‌عنوان سلولز Ia)، آویسل (A)، به‌عنوان سلولز Iβ و کربوکسی متیل سلولز (CMC، به‌عنوان سلولز III) و کاغذ صافی واتمن شماره ۱ (FP) استفاده شد تا نحوه عملکرد متفاوت جدایه‌های جهش‌یافته بر سوبستراهای مختلف سلولزی مورد مطالعه قرار گیرد. هم‌چنین این پژوهش اهمیت و نقش القای جهش در قارچ برای ایجاد تنوع فعالیت آنزیمی و افزایش بازده تولید آنزیم را نشان می‌دهد.

## مواد و روش‌ها

### تولید سلولز کلونیدی

سلولز کلونیدی به‌عنوان منبع کربن برای تولید آنزیم‌های سلولولاز قرار گرفت. تولید سلولز کلونیدی به‌وسیله پیش تیمار سلولز خالص (آویسل) در اسید ارتوفسفریک ۸۵٪ (وزنی به حجمی) برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴°C انجام گرفت تا خاصیت کلونیدی در سلولز افزایش پیدا کند، به‌نحوی که به آسانی توسط آنزیم مورد استفاده قرار گیرد. بعد از پیش تیمار با اسید، مواد جامد با استفاده از یک فیلتر آب پنی‌گری صاف شد و چندین مرتبه با آب مقطر شستشو گردید تا pH ماده جامد به حدود ۵ برسد. سپس سلولز کلونیدی در دمای ۷۰°C- برای مدت ۲۴ ساعت منجمد گردید و با استفاده از خشک‌کن انجمادی برای مدت ۴۸ ساعت خشک گردید و تا اندازه مش ۱۲۵-۵۳ میکرون آسیاب شد شولین (Schulein, 1997).

### تولید کربوکسی متیل سلولز

از سلولز خالص (آویسل) برای تولید کربوکسی متیل سلولز استفاده گردید. تولید کربوکسی متیل سلولز براساس روش کیرک و/و تومیر (Kirk and Othmer, 1967) انجام شد. درجه استخلاف (Degree of Substitution, DS) کربوکسی متیل سلولز تولیدی با استفاده از روش استاندارد بین‌المللی ای‌اس‌تی‌ام (ASTM, 2005) تعیین شد. از کربوکسی متیل

سلولز ساختار بنیادی اصلی در دیواره‌ی سلولی گیاهان و جلبک‌ها می‌باشد و هم‌چنین به‌عنوان جزء اصلی دیواره سلولی اوومیست‌ها نیز محسوب می‌شود کنون و/ندرسون (Cannon and Anderson, 1991). به‌طور کلی برای سلولز چهار ساختار مختلف بیان شده است که دارای خصوصیات متفاوتی هستند. سلولز I که شامل زنجیره‌های گلوکان با پیوندهای بتا ۱ و ۴ است که به‌صورت موازی در کنار یکدیگر قرار گرفته‌اند. این نوع ساختار عموماً در طبیعت یافت می‌شود. این نوع سلولز هم‌چنین توسط باکتری *Gluconobacter xylinus* تولید می‌شود. در حالت غیر خشک سلولز I می‌تواند به‌عنوان سلولز طبیعی (Native) مطرح شود راس و همکاران (Ross et al., 1991). سلولز II شامل زنجیره‌های غیرموازی گلوکان با پیوندهای بتا ۱ و ۴ است که توسط *G. xylinus* در حالت هم‌زدن محیط کشت یا بعد از کریستالیزاسیون مجدد یا تیمار شیمیایی سلولز I ایجاد می‌شود (راس و همکاران، 1991). سلولز III در دیواره سلولی گیاهان عالی یافت می‌شود و می‌تواند از تیمار شیمیایی سلولز II نیز تولید شود هیگلر و ویمار (Haigler and Weimer, 1991). سلولز Ia به‌طور برجسته توسط باکتری‌ها و جلبک‌ها تولید می‌گردد، درحالی که سلولز Iβ از گیاهان مشتق می‌شود. با این حال همه سلولزها شامل مقادیری از هر دو آلومورف (Allomorph) می‌باشند سوگی یاما و همکاران (Sugiyama et al., 1991). سلولزها (مخلوطی از سیستم‌های آنزیمی پیچیده) به‌طور تجمعی برای هیدرولیز سلولز در ضایعات کشاورزی عمل می‌کنند و تولید واحدهای ساده گلوکز را می‌نمایند. سلولزها توسط قارچ‌های تجزیه‌کننده سلولز از قبیل جنس‌های *Fusarium*، *Chaetomium*، *Aspergillus*، *Penicillium*، *Myrothecium* و گونه‌های *Trichoderma* تولید می‌گردند ساجیت و همکاران (Sajith et al., 2016). گونه‌های قارچ ترکیب‌درما حداقل دو آنزیم گلوکاناز (سلوبیوهیدرولاز) شامل Cel 6A (CBH III) و Cel 7A (CBH I) و پنج آنزیم گلوکاناز شامل Cel 5A (EG II)، Cel 7B (EG I)، Cel 12A (EG III)، Cel 45A، Cel 61A (EG V) و EG 17. هم‌چنین دو بتا-گلوکوزیداز شامل Cel 1A (BGL II) و Cel 3A (BGL I) برای تجزیه سلولز تولید می‌کنند گری شوتین؛ فورمن و همکاران (Grishutin, 2004; Foreman et al., 2003). در طول یک فرایند هیدرولیز آنزیمی هر سه دسته از آنزیم‌ها (سلوبیوهیدرولازها، اندوگلوکانازها و بتا-گلوکوزیدازها) برای شکستن سلولز عمل می‌کنند لیند و همکاران (Lynd et al., 2002) و در ابتدای فرایند به سرعت گلوکز آزاد می‌شود. اگر

و نرخ دز ۰/۲۳ گری در ثانیه مستقر در پژوهشگاه کشاورزی هسته‌ای کرج (پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای - سازمان انرژی اتمی ایران) انجام شد. از سوسپانسیون اسپور سرپال رقت تهیه گردید و بر روی محیط کشت PDA کشت داده شدند. اسپورهای جوانه زده شده به محیط کشت تازه انتقال داده شد و بیست جدایه موتانت براساس تفاوت‌های مورفولوژیک (شکل و رنگ کلنی، سرعت رشد در محیط کشت PDA، سرعت جوانه‌زنی اسپور و میزان تولید اسپور) انتخاب گردید.

جدایه‌های Nrcam T6 و Nrcam T7 و بیست جدایه جهش یافته از هرگونه بر روی محیط کشت Malt Yeast Glucose Agar (MYG agar) حاوی ۵ گرم در لیتر عصاره مالت، ۲/۵ گرم در لیتر عصاره مخمر، ۱۰ گرم در لیتر گلوکز و ۲۰ گرم در لیتر آگار کشت داده شدند و در دمای ۲۸°C نگهداری گردیدند. با استفاده از محلول سیلین از پلیت‌های هفت روزه حاوی اسپور، سوسپانسیون اسپوری با جمعیت ۱۰<sup>۷</sup>-۱۰<sup>۸</sup> اسپور در میلی لیتر تهیه گردید. کشت اولیه سوسپانسیون اسپوری در محیط (TCM) *Trichoderma Complete Medium* حاوی ۱ گرم در لیتر باکتوپیتون، ۰/۳ گرم در لیتر اوره، ۲ گرم در لیتر  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ، ۱/۴ گرم در لیتر  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ، ۰/۳ گرم در لیتر  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۳ گرم در لیتر  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۰۰۵ گرم در لیتر  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۰۰۲ گرم در لیتر  $\text{MnSO}_4$ ، ۰/۰۰۲ گرم در لیتر  $\text{ZnSO}_4$  و  $\text{COSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ۰/۰۰۲ گرم در لیتر و ۲ میلی لیتر در لیتر توئین انجام گرفت. pH محیط کشت TCM بر روی ۴/۸ تنظیم گردید و با ۰/۳٪ (وزنی به حجمی) گلوکز ترکیب گردید. انجام عمل تخمیر در محیط کشت TCM در ارن لاین مایر ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط TCM در دمای ۲۸°C به مدت ۲۴ ساعت و ۱۸۰ دور در دقیقه انجام گرفت و بعد از مدت زمان فوق اسپورها تبدیل به حالت رویشی میسلیم گردیدند. با استفاده از سانتریفیوژ کردن در ۴۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۷ دقیقه میسلیم‌ها از محیط TCM جداسازی شدند و جهت القای تولید آنزیم‌های سلولازی میسلیم‌های شسته شده با سیلین به ارن لاین مایر ۵۰۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط *Trichoderma Fermentation Medium* (TFM) حاوی ۰/۳ گرم در لیتر اوره، ۲ گرم در لیتر  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ، ۱/۴ گرم در لیتر  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ، ۰/۳ گرم در لیتر  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۳ گرم در لیتر  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۰۰۵ گرم در لیتر  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۰۰۲ گرم در لیتر  $\text{MnSO}_4$ ، ۰/۰۰۲ گرم در لیتر  $\text{ZnSO}_4$  و  $\text{COSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ۲ میلی لیتر در لیتر توئین انتقال داده شد. این محیط در pH ۴/۸ تنظیم شده بود و حاوی ۰/۵٪

سلولز (CMC) جهت تعیین فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز یا کربوکسی متیل سلولاز (CMCase) استفاده گردید.

### تولید سلولز باکتریایی

به منظور بررسی نحوه عملکرد آنزیم سلولاز بر روی سلولز باکتریایی از باکتری *Gluconobacter xylinus* برای تولید سلولز باکتریایی استفاده گردید و برای سنجش فعالیت آنزیم سلولاز مورد استفاده قرار گرفت. باکتری *G. xylinus* از مرکز کلکسیون قارچ و باکتری سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به شماره PTCC 1734 تهیه گردید. سلولز باکتریایی مطابق روش موسوی نسب و همکاران (Moosavi-Nasab et al., 2010) تولید و خالص سازی شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۷۰°C منجمد گردید و با استفاده از خشک کن انجمادی برای مدت ۴۸ ساعت خشک گردید و تا اندازه مش ۱۲۵-۵۳ میکرون آسیاب شد شهبازی و همکاران، ۲۰۱۴؛ موسوی نسب و همکاران، ۲۰۱۰ (Shahbazi et al., 2014).

### طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FT-IR)، پراش اشعه ایکس (XRD) و بررسی میکروساختار سوبسترا

طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FT-IR)، پراش اشعه ایکس (XRD) و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) پودر آویسل، کربوکسی متیل سلولز و سلولز باکتریایی براساس روش شهبازی و همکاران (۲۰۱۴) مطالعه شد.

### آماده‌سازی قارچ و تولید آنزیم سلولاز

جدایه‌های قارچ *T. viride* و *T. harzianum* (جهش یافته و وحشی از کلکسیون آزمایشگاه بیماری شناسی - گروه پژوهشی گیاه پزشکی پژوهشگاه کشاورزی هسته‌ای به ترتیب با شماره دسترسی Nrcam T6 و Nrcam T7 تهیه گردید (مرادی و همکاران، ۱۳۹۰). پلیت‌های کشت به مدت ۷ روز در دمای ۲۸°C نگهداری شدند. اسپورهای تولید شده با استفاده از محلول سیلین جمع‌آوری و جمعیت آن در ۱×۱۰<sup>۶</sup> اسپور/میلی لیتر تنظیم گردید و برای پرتوتابی مورد استفاده قرار گرفت. معیار دز جذبی مناسب برای القای موتاسیون حداکثری در اسپورها، ظهور تقریباً ۵۰-۴۰ درصد جوانه‌زنی اسپور پس از پرتوتابی می‌باشد. (مرادی و همکاران، ۱۳۹۰). نتایج مطالعات قبلی نشان داد که در دز ۲۵۰ Gy تقریباً ۴۳/۷ درصد از اسپورها جوانه زده‌اند و این دز به عنوان دز مناسب پرتوتابی انتخاب گردید (مرادی و همکاران، ۱۳۹۰). پرتوتابی با استفاده از دستگاه گاماسل با چشمه کبالت ۶۰- اکتیویته ۲۵۰۰ کوری

(وزنی به حجمی) سلولز کلئیدی بود. شرایط رشد مشابه شرایط قبل در ۱۸۰ دور در دقیقه و دمای ۲۸°C به مدت ۷۲ ساعت انجام شد. بعد از مدت زمان فوق میسلیموم‌های قارچ توسط سانتریفیوژ کردن در ۴۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۷ دقیقه خارج گردید و مایع فوقانی برای اندازه‌گیری پروتئین خارج سلولی و فعالیت آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت و ون همکاران، ۲۰۰۵؛ شهبازی و همکاران، ۲۰۱۶ (Wen *et al.*, 2016). (2005; Shahbazi *et al.*, 2016).

### اندازه‌گیری غلظت پروتئین خارج سلولی تولیدی در محیط تخمیر و تعیین فعالیت آنزیمی

اندازه‌گیری پروتئین در مایع فوقانی محیط TFM با استفاده از روش بردفورد (Bradford, 1976) انجام گرفت. از پروتئین خالص Bovine Serum Albumin (BSA) به عنوان استاندارد پروتئین استفاده شد و مقدار پروتئین (میلی گرم در میلی لیتر) در مایع فوقانی محیط تخمیر TFM محاسبه گردید. فعالیت آنزیم‌های آگروگلوکاناز یا Avicelase، اندوگلوکاناز یا CMCase و سلولاز کل (با استفاده از سوبسترای کاغذ صافی یا FPase (Filter Paper-ase) و با استفاده از سوبسترای سلولز باکتریایی یا BCASE) به وسیله اندازه‌گیری مقدار گلوکز آزاد شده از سوبستراهای آویسل، کربوکسی متیل سلولز و کاغذ صافی واتمن ۱ با استفاده از معرف دی‌نیتروسالیسیلیک اسید و گلوکز به عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد گاما و موتا (Gama and Mota, 1998). مخلوط واکنش حاوی ۰/۵ میلی لیتر از محلول ۰/۵٪ (وزنی به حجمی) از هر یک از سوبستراها در بافر ۰/۵ مولار سیترات سدیم (pH ۴/۸) و ۰/۵ میلی لیتر از مایع فوقانی محیط تخمیر TFM بود. نمونه‌ها به مدت ۶۰ دقیقه در حمام آب گرم ۵۰°C قرار گرفتند و واکنش آنزیمی با افزودن ۳ میلی لیتر از محلول دی‌نیترو سالیسیلیک اسید متوقف شد. نمونه‌ها به خوبی مخلوط شدند و سپس برای مدت ۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شدند و فوراً خنک گردیدند. سپس بعد از رقیق‌سازی جذب نمونه‌ها با استفاده از اسپکتروفتومتر در ۵۴۰ نانومتر قرائت گردید. هر واحد فعالیت آنزیمی به عنوان مقدار آنزیمی که توانایی آزاد کردن ۱ میکرومول گلوکز را به ازای هر ساعت دارد، تعریف شد. همچنین برای تعیین فعالیت FPase (سلولاز کل) از نوارهای ۱×۶ سانتی متر کاغذ صافی واتمن شماره ۱ به عنوان سوبسترا استفاده شد. فعالیت آنزیم بر حسب واحد در میلی لیتر گزارش گردید (شهبازی و همکاران، 2016).

### تجزیه و تحلیل آماری

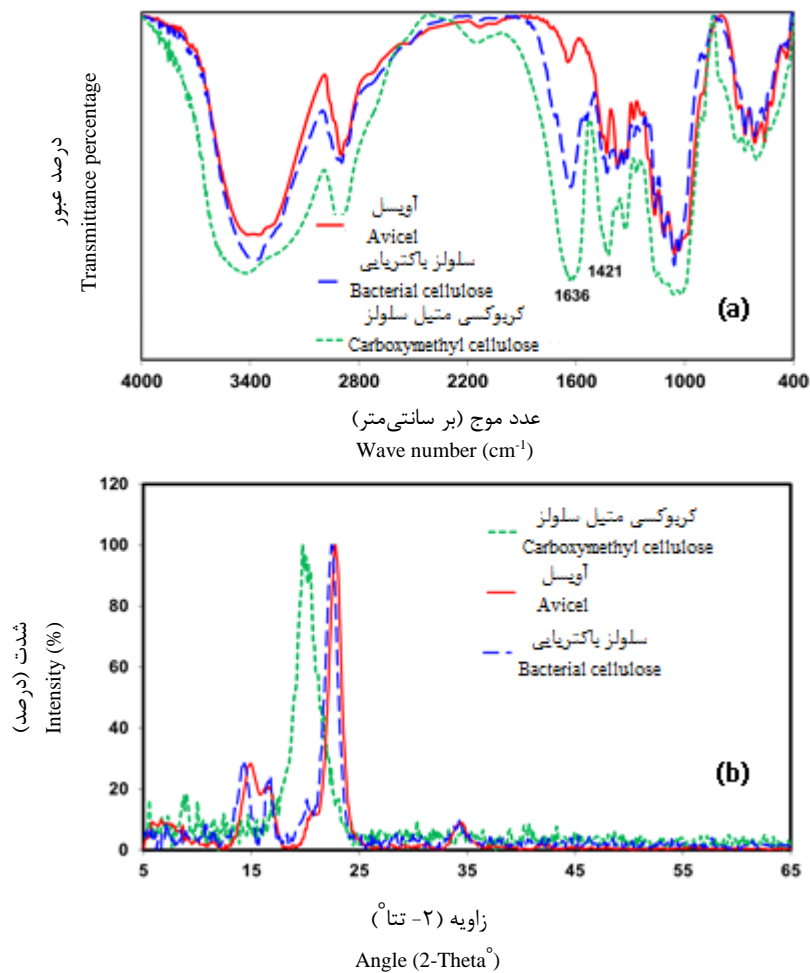
کلیه نتایج آزمایشات با استفاده از آنالیز واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن در سطح آماری  $P < 0.05$  انجام گرفت. آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS (نسخه ۱۶) انجام گرفت و کلیه آزمایشات در سه تکرار انجام شد.

### نتایج و بحث

#### بررسی گروه‌های استخلافی سوبستراها و تعیین میزان

#### کریستالیزاسیون

گروه‌های استخلافی موجود بر روی سوبستراها با استفاده از آزمون طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FT-IR) مورد بررسی قرار گرفت. طیف FT-IR آویسل، سلولز باکتریایی و کربوکسی متیل سلولز در شکل (۱a) نشان داده شده است که دلالت بر ساختار کلی کربوهیدرات‌ها را دارند. باند ظاهر شده در ۱۶۳۶ و ۱۴۲۱ (بر سانتی متر) در کربوکسی متیل سلولز نشان‌دهنده گروه‌های استخلافی کربوکسی متیل سلولز است که باعث می‌شود این کربوهیدرات دارای بار منفی بر روی زنجیره اصلی خود باشد و نشان‌دهنده تبدیل شیمیایی صحیح آویسل به کربوکسی متیل سلولز می‌باشد. شکل (۱b) الگوی XRD سوبستراهای مورد استفاده در سنجش فعالیت آنزیم سلولز شامل آویسل، سلولز باکتریایی و کربوکسی متیل سلولز را نشان می‌دهد. میزان کریستالیزاسیون سوبستراهای آویسل، سلولز باکتریایی و کربوکسی متیل سلولز با استفاده از داده‌های آزمون XRD اندازه‌گیری شد و نتایج آن در شکل (۱b) نشان داده شده است. الگوی سلولز باکتریایی سه پیک اصلی در ۱۴/۱۳°، ۱۶/۶۰° و ۲۲/۵۷° به ترتیب مربوط به بازتاب‌های 101، 10 $\bar{1}$  و 002 را نشان داد. پیک‌های اصلی در آویسل در ۱۴/۶۸°، ۱۶/۱۵° و ۲۲/۷۱° به ترتیب مربوط به بازتاب‌های 101، 10 $\bar{1}$  و 002 مشاهده شد. این اطلاعات دلالت بر این دارد که نمونه‌های سلولز باکتریایی و آویسل نوعی از فرم کریستالی سلولز I می‌باشند یان و همکاران (2008). Yan *et al.*، سطح زیر پیک در الگوی XRD میزان کریستالیزاسیون نمونه‌ها را نشان می‌دهد که برای آویسل، سلولز باکتریایی و کربوکسی متیل سلولز این مقادیر به ترتیب ۰/۸۹/۱۵٪، ۰/۶۶/۴۴٪ و ۰/۸۱/۸۴٪ می‌باشد. کریستالیزاسیون کم‌تر CMC نسبت به آویسل باعث می‌شود که این ماده در واکنش‌های شیمیایی واکنش‌پذیرتر ظاهر شود.



شکل ۱: (a) طیف FT-IR و (b) الگوی XRD آویسل، سلولز باکتریایی و کربوکسی متیل سلولز  
 Fig. 1: (a) FT-IR spectrum and (b) XRD pattern of avicel, bacterial cellulose and carboxymethyl cellulose

تماس با آنزیم تأثیر بگذارد. سلولز باکتریایی قابلیت استفاده توسط قارچ و ظرفیت نگهداری آب تا ۷۰۰ برابر وزن خشک خود را دارد.

برخی نمونه‌ها در سطح آماری ۵٪ دارای اختلاف معنی‌دار آماری بودند و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن نشان داد که بالاترین غلظت پروتئین تولید شده به ترتیب در نمونه‌های Th M9، Th M10، Th M11، Th M15 و Th M18 بودند و کم‌ترین میزان پروتئین در نمونه Th M16 مشاهده گردید. شکل (۴b) مقایسه غلظت پروتئین خارج سلولی قارچ *T. viride* و جدایه‌های جهش‌یافته آن را نشان می‌دهد. برخی جدایه‌ها و گونه وحشی آن‌ها در سطح آماری ۵٪ دارای اختلاف معنی‌دار آماری بوده و مقایسه میانگین‌های آن‌ها به روش دانکن نشان داد که بالاترین غلظت پروتئین تولید شده به ترتیب در نمونه‌های Tv M2، Tv M1، Tv M3، Tv M14، Tv M10 و Tv M4 مشاهده می‌شود و کم‌ترین میزان پروتئین خارج سلولی در محیط تخمیر قارچ جهش‌یافته Tv M21 می‌باشد.

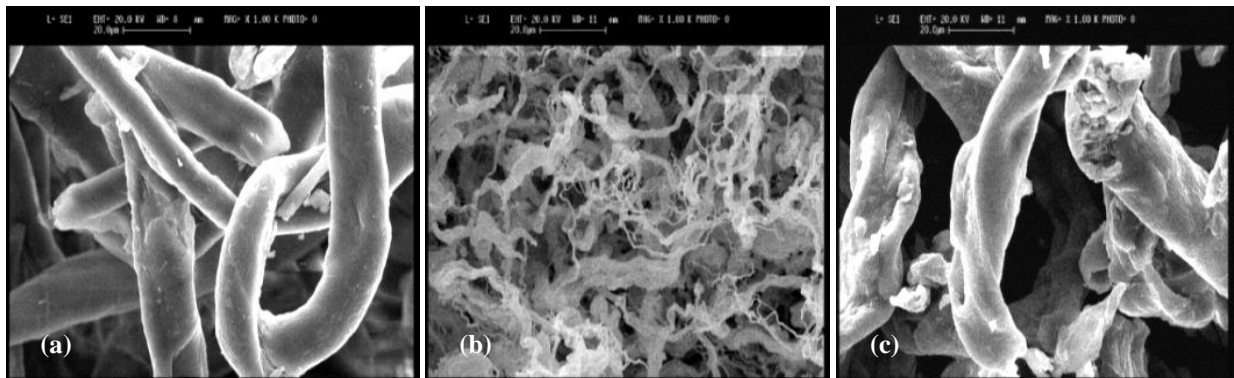
### بررسی میکروساختار سوبستراهای تولیدی برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سلولاز

شکل (a, b, c) به ترتیب نشان‌دهنده تصاویر میکروساختار آویسل، سلولز باکتریایی و کربوکسی متیل سلولز می‌باشد. تصاویر نشان‌دهنده اختلاف مورفولوژیکی در سوبستراهای مختلف می‌باشد. همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است ضخامت رشته‌های سلولز باکتریایی نسبت به آویسل ۱ به ۳۰ می‌باشد (۱۲ میکرومتر برای سلولز باکتریایی و ۴۱۲ میکرومتر برای آویسل) که نشان‌دهنده ظرافت بیش‌تر فیبرهای سلولز باکتریایی در برابر آویسل می‌باشد. این نسبت ممکن است به ۱ به ۱۰۰ نیز در بین فیبرهای دیگر برسد. در شکل (a, b) در بزرگ‌نمایی ۶k، سلولز باکتریایی پیچ و تاب بیش‌تری را در مقایسه با آویسل از خود نشان می‌دهد، چراکه دارای فیبرهای نازک‌تری می‌باشد و این امر باعث می‌شود که این پلیمر در مقایسه با آویسل توسط قارچ بهتر تجزیه شود. ظرافت بیش‌تر فیبرهای سلولز باکتریایی می‌تواند بر خصوصیاتش از قبیل ظرفیت جذب آب و نیز سطح مقطع در

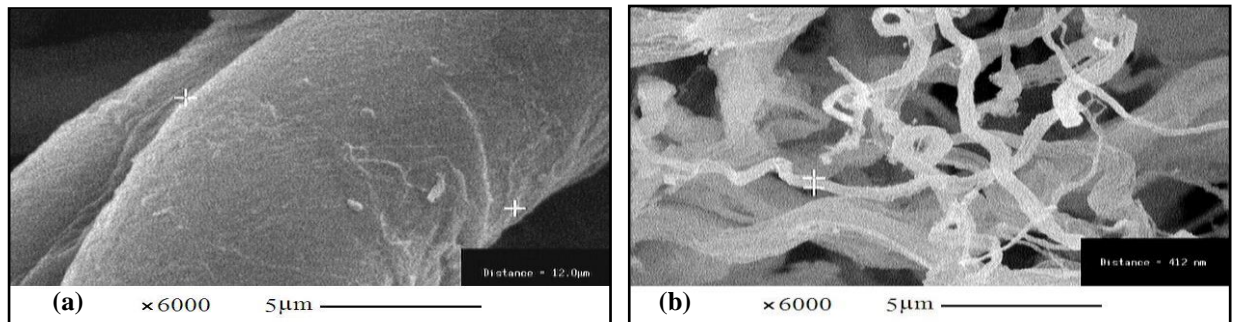
سوبسترای محلول در آب)، اغلب برای تعیین فعالیت اندوگلوکاناز که CMC<sub>Case</sub> نامیده می‌شود، استفاده می‌گردد، چرا که اندوگلوکانازها باندهای گلیکوزیدی بتا ۴،۱ داخل مولکولی را به صورت تصادفی می‌شکنند و باعث کاهش چشم‌گیر در درجه پلیمریزاسیون (Degree of Polymerization; DP) (مثلاً ویسکوزیته ویژه) در CMC می‌شوند. ساختار اندوگلوکانازها شناخته شده است و باقیمانده‌های جایگاه فعال آنزیم‌ها در شکافی واقع شده است که می‌تواند با گروه‌های کربوکسی متیل تطبیق پیدا کند و به این ترتیب می‌تواند به واحدهای انفرادی گلوکز حمله ببرد پالما و همکاران (Palma et al., 2001). بالاترین فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز (CMC<sub>Case</sub>) به ترتیب در جدایه‌های جهش‌یافته Tv M16، Tv M14، Tv M15، Tv M18 و Tv M17 مشاهده گردید که مقادیر بالاتری از فعالیت آنزیمی قارچ وحشی را از خود نشان می‌دادند. فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز (CMC<sub>Case</sub>) در قارچ *T. viride* و جدایه‌های جهش‌یافته آن از ۳/۳۴ الی ۶/۱۰ واحد بر میلی‌لیتر متغیر بود. کم‌ترین فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز (CMC<sub>Case</sub>) در جدایه جهش‌یافته Tv M6 مشاهده گردید. سیستم سلولازی کامل شامل اندوگلوکانازها، اگزوگلوکانازها و بتاگلوکوزیدازهاست. شکل (e, f) ۵ مقایسه میانگین فعالیت آنزیم سلولاز کل (FPase و BCase) را در مایع فوقانی محیط تخمیر TFM در قارچ وحشی *T. harzianum* و *T. viride* و جدایه‌های جهش‌یافته آن‌ها را نشان می‌دهد. کلیه نمونه‌ها در سطح آماری ۵٪ دارای اختلاف معنی‌دار بودند. بالاترین فعالیت آنزیم سلولاز کل با استفاده از سوبسترای کاغذ صافی به ترتیب در جدایه‌های جهش‌یافته Th M9، Th M10، Th M18 و Th M16 مشاهده گردید که مقادیر بالاتری از فعالیت آنزیمی قارچ وحشی را از خود نشان می‌دادند. فعالیت آنزیم سلولاز کل (FPase) در قارچ *T. harzianum* و جدایه‌های جهش‌یافته آن از ۴/۰۳ الی ۱۰/۷۰ واحد بر میلی‌لیتر متغیر بود. کم‌ترین فعالیت آنزیم FPase در جدایه جهش‌یافته Th M16 مشاهده گردید. بالاترین میزان فعالیت آنزیم سلولاز کل به ترتیب در جدایه‌های جهش‌یافته Tv M15، Tv M8، Tv M14، Tv M17 و Tv M10 مشاهده گردید. میزان فعالیت آنزیم FPase در بین جدایه‌های مختلف از ۲/۲۱ الی ۱۰/۵۳ واحد بر میلی‌لیتر متغیر بود. کم‌ترین میزان فعالیت آنزیم سلولاز کل در جدایه جهش‌یافته Tv M21 مشاهده گردید.

میزان تغییرات پروتئین از مقدار ۰/۰۵۰ الی ۰/۱۸۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر متغیر بود و تعدادی از جدایه‌های جهش‌یافته مقادیر کم‌تری از پروتئین خارج سلولی را در مقایسه با گونه وحشی قارچ *T. viride* تولید می‌کردند. اندازه‌گیری فعالیت‌های آنزیمی جدایه وحشی (قارچ *T. harzianum* و *T. viride*) و جدایه‌های جهش‌یافته آن با استفاده از سوبسترای آویسل، کربوکسی متیل سلولز، سلولز باکتریایی، کاغذ صافی واتمن شماره ۱، اندازه‌گیری شد که به ترتیب بیانگر فعالیت آنزیم‌های اگزوگلوکاناز یا آویسلاز، اندوگلوکاناز یا کربوکسی متیل سلولاز و سلولاز کل (سلولاز کل با سوبسترای سلولز باکتریایی و سلولاز کل با سوبسترای کاغذ صافی) بودند. شکل (a, b) ۵ مقایسه میانگین فعالیت آنزیم اگزوگلوکاناز (U/ml) قارچ وحشی *T. harzianum* و *T. viride* و جدایه‌های جهش‌یافته آن را در مایع فوقانی محیط تخمیر TFM را نشان می‌دهد. کلیه نمونه‌ها در سطح آماری ۵٪ دارای اختلاف معنی‌دار آماری بودند.

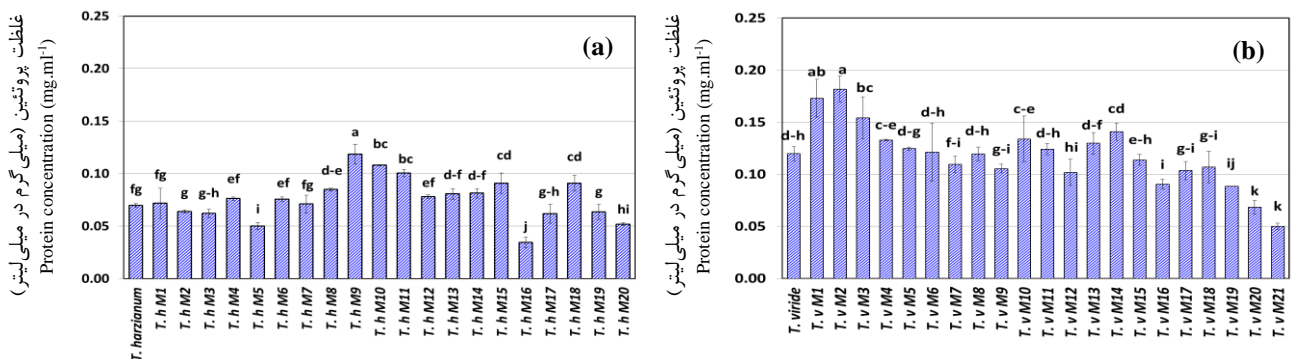
بالاترین فعالیت آنزیم اگزوگلوکاناز در جدایه‌های جهش‌یافته Th M8، Th M10، Th M18 و Th M9 مشاهده گردید. میزان تغییرات فعالیت اگزوگلوکاناز از ۲/۵۰ الی ۵/۲۷ واحد بر میلی‌لیتر متغیر بود. پایین‌ترین میزان فعالیت آنزیمی در جدایه جهش‌یافته Th M14 مشاهده گردید. هم‌چنین بالاترین میزان فعالیت اگزوگلوکانازی در بین قارچ وحشی *T. viride* و جدایه‌های جهش‌یافته آن تنها در جدایه جهش‌یافته قارچ Tv M18 مشاهده گردید. میزان تغییرات فعالیت اگزوگلوکانازی از ۱/۶۶ الی ۵/۵۶ واحد بر میلی‌لیتر متغیر است. پایین‌ترین میزان فعالیت اگزوگلوکانازی در جدایه جهش‌یافته TV M9 مشاهده گردید. شکل (c, d) ۵ مقایسه میانگین فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز (CMC<sub>Case</sub>) را در مایع فوقانی محیط تخمیر TFM قارچ وحشی *T. harzianum* و *T. viride* و جدایه‌های جهش‌یافته آن را نشان می‌دهد. کلیه نمونه‌ها در سطح آماری ۵٪ دارای اختلاف معنی‌دار بودند. بالاترین فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز (CMC<sub>Case</sub>) به ترتیب در جدایه‌های جهش‌یافته Th M10، Th M9 و Th M7 مشاهده گردید. میزان فعالیت آنزیمی از مقدار ۲/۷۷ الی ۵/۵۸ واحد بر میلی‌لیتر متغیر بود. پایین‌ترین میزان فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز در جدایه جهش‌یافته Th M16 مشاهده گردید. سوبستراهای مورد استفاده برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سلولاز می‌توانند بر اساس حلالیت در آب به دو دسته تقسیم شوند. کربوکسی متیل سلولز که مشتقی یونی از سلولز است (CMC)، به‌عنوان



شکل ۲: تصاویر میکروسکوپ الکترونی (a) آویسل، (b) سلولز باکتریایی، (c) کربوکسی متیل سلولز (بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰ برابر)  
Fig. 2: Scanning Electron microscopy (SEM) of (a) Avisel, (b) Bacterial cellulose and (c) Carboxymethyl cellulose (Magnification 1000X)



شکل ۳: تصاویر میکروسکوپ الکترونی (a) آویسل و (b) سلولز باکتریایی (بزرگ‌نمایی ۶۰۰۰ برابر)  
Fig. 3: Scanning Electron microscopy (SEM) of (a) Avisel and (b) Bacterial cellulose (Magnification 6000X)

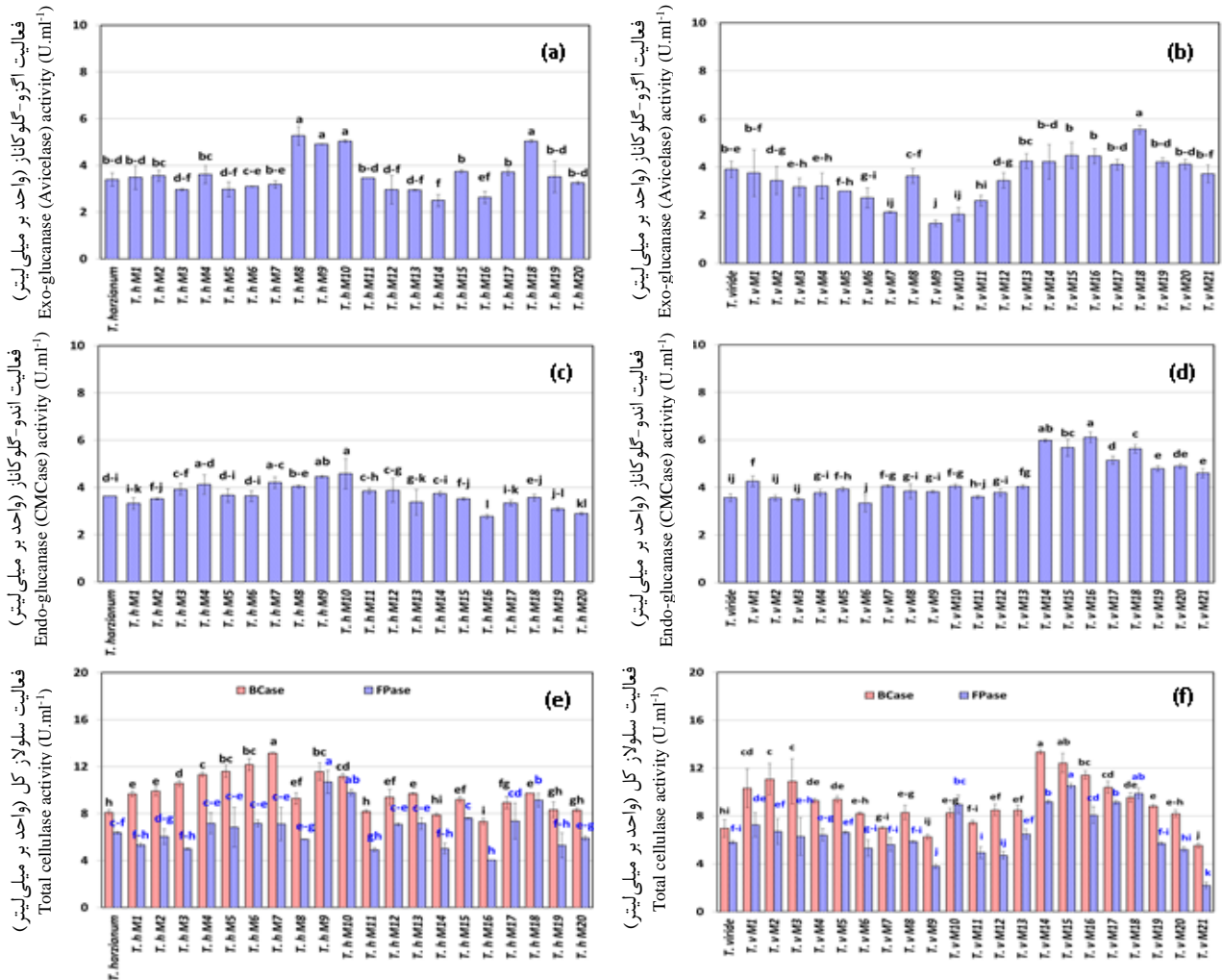


شکل ۴: مقایسه غلظت پروتئین خارج سلولی (میلی گرم در میلی لیتر) در جدایه‌های جهش‌یافته و وحشی قارچ *T. harzianum* (a) و *T. viride* (b) در مایع فوقانی محیط تخمیر حاوی سلولز کلوئیدی. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۵٪ می‌باشد

Fig. 4: Comparison of extracellular protein concentration (mg.ml<sup>-1</sup>) in mutant and wildtype isolates of (a) *T. harzianum* and (b) *T. viride* in supernatant of *Trichoderma* fermentation medium (TFM) containing colloidal cellulose. Different letters indicate a statistically significant difference of 5%

پایین‌ترین فعالیت آنزیم سلولاز با استفاده از سوبسترای سلولز باکتریایی در جدایه جهش‌یافته *Tv* M21 مشاهده گردید. اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی با استفاده از سلولز باکتریایی مقادیر بالاتری از فعالیت را در مقایسه با سوبستراهای دیگر نشان داد که این امر نشانه قابلیت دسترسی بالای آن برای آنزیم‌ها می‌باشد.

بالاترین میزان فعالیت آنزیم سلولاز کل با استفاده از سوبسترای سلولز باکتریایی به ترتیب در جدایه‌های جهش‌یافته *Th* M6 و *Th* M7 مشاهده گردید. میزان تغییرات فعالیت آنزیم سلولاز از ۷/۳۵ الی ۱۳/۱۷ واحد بر میلی لیتر متغیر بود. تغییرات فعالیت آنزیمی از ۵/۵۳ الی ۱۳/۳۷ واحد بر میلی لیتر متغیر بود. بالاترین فعالیت آنزیمی بر روی سلولز باکتریایی به ترتیب در جدایه‌های جهش‌یافته *Tv* M15، *Tv* M14،



شکل ۵: مقایسه میانگین فعالیت آنزیمی (واحد بر میلی‌لیتر) جدایه‌های جهش‌یافته و وحشی قارچ *T. viride* و *T. harzianum* با استفاده از سوبسترای (a, b) آویسل، (c, d) کربوکسی متیل سلولز (CMC)، (e, f) کاغذ صافی واتمن شماره ۱ و سلولز باکتریایی جهت سنجش فعالیت آنزیم خارج سلولی تولید شده در مایع فوقانی محیط تخمیر TFM حاوی سلولز کلئوئیدی. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۵٪ می‌باشد

Fig. 5: Comparison of the average enzyme activity (U/ml) of the mutant and wildtype isolates of *T. harzianum* and *T. viride* using (a, b) Avicel, (c, d) carboxymethyl cellulose (CMC), (e, f) Whatman no. 1 filter paper and bacterial cellulose to measure the activity of the extracellular enzyme produced in the supernatant of the *Trichoderma* fermentation medium (TFM) containing colloidal cellulose. Different letters indicate a statistically significant difference of 5%

1997). برای مطالعه سینرژی در فعالیت سلولازی، مقایسه مستقیم بین میزان هیدرولیز مواد سلولزی راهکار مناسبی است. تصور کلی بر این است که ساختار سلولز به دو ناحیه تقسیم می‌شود، یکی ناحیه بی‌نظم (بی‌شکل) است که به آسانی توسط آنزیم هیدرولیز می‌شود و یکی دیگر ناحیه کریستالی است که به سختی توسط آنزیم هیدرولیز می‌گردد. این موضوع فراهم‌آورنده فهم مناسبی از سینتیک‌های مشاهده شده برای هیدرولیز سلولز است که زمانی که آنزیم‌ها به سرعت هیدرولیز را انجام دهند آن ترکیب بیش‌تر دارای ناحیه بی‌نظم (بی‌شکل) است و اگر هیدرولیز به سختی صورت بگیرد آن ماده بیش‌تر دارای نواحی کریستالی می‌باشد. براساس نتایج الگوی XRD ارائه شده در این تحقیق، بالاترین میزان

### تعیین غلظت پروتئین خارج سلولی و فعالیت آنزیم‌های سلولاز در جدایه‌های موتانت

شکل (۴a) غلظت پروتئین خارج سلولی (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) تولید شده در محیط تخمیر TFM حاوی سلولز کلئوئیدی به‌عنوان سوبسترای تخمیر را در قارچ *T. harzianum* نشان می‌دهد.

### نتیجه‌گیری

در پلیمرهای سلولزی، تفاوت‌های موجود در ساختار و ترکیبات شیمیایی و جزء کریستالی سلولز بر میزان هیدرولیز آن تأثیرگذار است تری و کویوولا ( Teeri and Koivula )



پرتو یونیزه کننده گاما هم با اثرات موتاژنی خود در ایجاد تنوع در ذخیره ژنتیکی قارچ تریکودرمای بومی کشور مؤثر بوده و می تواند به عنوان ابزاری ساده و کارآمد در برنامه های اصلاح سوبه های میکروبی به منظور افزایش تولید یا فعالیت متابولیت های مختلف به کار گرفته شود. در این تحقیق دو گونه قارچ تریکودرما (*T. viride* و *T. harzianum*) و بیست جدایه جهش یافته با استفاده از پرتوتابی با پرتو گاما از نظر میزان فعالیت آنزیم سلولاز و پروفایل پروتئینی خارج سلولی مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان داد امکان ایجاد تغییر در تولید میزان پروتئین خارج سلولی و فعالیت سلولازی و تغییر در تنوع آنزیم های تولیدی در جهت بهبود عملکرد، در اثر پرتوتابی با دز ۲۵۰ گری پرتو گاما وجود دارد و ایجاد سوبه های قارچی با توان بیش تر تولید آنزیم که پتانسیل بیش تری در تجزیه ی زیستی ترکیبات سلولزی، مدیریت بقایای گیاهی، تخمیر و بازیافت سلولز و تولید زیست انرژی و دیگر فرآورده های زیستی را داشته باشند، توسط این روش القای جهش امکان پذیر است. موتاسیون با ایجاد تنوع ژنتیکی بیش تر، در بخشی از فرآیند دو قسمتی تکامل شامل تنوع و انتخاب، نقش دارد و بدین ترتیب در اصلاح و تکامل موجودات حائز اهمیت است. نتایج نشان داد که سلولز باکتریایی سوبسترای خوبی برای تعیین فعالیت سلولاز کل می باشد. چرا که بالاترین فعالیت آنزیمی در مقایسه با کاغذ صافی و آویسل را از خود نشان داد. در تمامی موارد آزمایش، در هر دو قارچ *T. viride* و *T. harzianum* و جدایه های جهش یافته آن ها، مقادیر فعالیت آنزیم سلولاز کل با استفاده از سوبسترای سلولز باکتریایی باتوجه به تنوع آنزیم های تولید شده در جدایه های موتانت، مقادیر بالاتری را نسبت به سلولاز کل به دست آمده از سوبسترای کاغذ صافی (FPase) نشان داد. هتروژن بودن سلولز نامحلول و پیچیدگی سیستم های سلولازی سبب مشکلات دشواری در اندازه گیری فعالیت سلولاز کل می شود. درجه سینرژی بین اندوگلوکانازها و اگزوگلوکانازها تحت تأثیر خصوصیات سوبسترا، شرایط آزمایش، مقدار آنزیم و نسبت ترکیبات می باشد ژانگ و لیند (Zhang and Lynd, 2006). بالا بودن مقادیر فعالیت سلولاز کل با استفاده از سوبسترای سلولز باکتریایی نشان داد که سلولز باکتریایی پتانسیل خوبی برای هیدرولیز و تولید آنزیم به وسیله گونه های قارچ تریکودرما را دارا می باشد چرا که دارای خصوصیات مکانیکی قابل توجه در هر دو حالت مرطوب و خشک، تخلخل، جذب آب، قابلیت تجزیه توسط قارچ ها،

کریستالیزاسیون به ترتیب مربوط به آویسل، کربوکسی متیل سلولز و سلولز باکتریایی بود. آویسل تجاری (که هم چنین سلولز میکروکریستال یا هیدروسولولز نیز نامیده می شود) برای اندازه گیری فعالیت اگزوگلوکاناز استفاده شد، زیرا درجه پایینی از پلیمریزاسیون سلولز را داراست و هرچند میزان کریستالیزاسیون نسبتاً بالایی دارد، اما با وجود برخی از نواحی بی نظم (بی شکل)، برای هیدرولیز توسط اندوگلوکانازها غیر قابل دسترس می باشد.

آنزیم هایی که فعالیت نسبتاً بالایی را بر روی آویسل نشان می دهند و دارای فعالیت کمی بر روی CMC هستند، به عنوان اگزوگلوکاناز تعریف می شوند مکی و همکاران (Maki et al., 2009). سلوبیوهیدرولازها (اگزوگلوکانازها) بر پایه عملکردهای خارجی شان دسته بندی می شوند که آن ها همگی باندهای گلیکوزیدی بتا- ۴و۱ را از انتهای زنجیره می شکنند و تولید سلوبیوز و برخی مولکول های گلوکز می کنند. کربوکسی متیل سلولز که مشتقی یونی از سلولز است (CMC)، به عنوان سوبسترای محلول در آب، اغلب برای تعیین فعالیت اندوگلوکاناز که CMCCase نامیده می شود، استفاده می گردد، چراکه اندوگلوکانازها باندهای گلیکوزیدی بتا- ۴و۱ داخل مولکولی را به صورت تصادفی می شکنند کارلسون و همکاران (Karlsson et al., 2001). نتایج FT-IR نشان داد که کربوکسی متیل سلولز دارای گروه های کربوکسی می باشد که باعث ایجاد بار منفی بر روی زنجیره پلیمر می گردد. این امر باعث می شود پلیمر در محلول های آبی به علت دافعه الکترواستاتیک در زنجیره های مولکول بیش تر به شکل بی نظم (بی شکل) و محلول باشد و درصد کم تری از ساختار به صورت کریستالی وجود داشته باشد که این امر این پلیمر را برای اندازه گیری فعالیت اندوگلوکانازها مناسب می سازد. سلولاز کل شامل فعالیت آنزیم های اندوگلوکاناز، اگزوگلوکاناز و  $\beta$ -گلوکوزیداز می باشد که به صورت سینرژیستی باعث هیدرولیز سلولز کریستالی می شوند. هیدرولیز کارآمد سلولز کریستالی به وسیله سلولاز نیازمند به عملکرد سینرژیستی اندوگلوکانازها و سلوبیوهیدرولازها می باشد که توسط تری و کوپولا (1995) مرور شده است. برای تعیین فعالیت سلولازی مخلوط های آنزیمی یا عملکردهای سینرژیستی کمپلکس های آن ها، سوبستراهای هتروژن از قبیل کاغذ صافی و سلولز باکتریایی می توانند استفاده گردند. هم چنین مشخص شده است که درجه سینرژی بستگی به سوبسترای مورد استفاده نیز دارد نیدزکی و همکاران (Nidetzky et al., 1994).

بررسی تأثیر آنزیم‌های سلولاز جدا شده‌های جهش یافته قارچ...

حسین اهری مصطفوی در پرتوتابی گونه‌های تریکودرما و سایر همکارانی که در انجام این مطالعه ما را یاری داده‌اند، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

ضخامت کم تر رشته‌های مولکول، سطح مقطع بالاتر، تجزیه پذیری و تمایل بیولوژیکی عالی می‌باشد.

### سیاسگزاری

نویسندگان از همکاری مهندس هادی فتح اللهی و مهندس

### منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۸-۹ متن انگلیسی مراجعه شود.