

بهبود فعالیت آنزیم‌های تجزیه‌کننده سلولز با جهش‌زایی در قارچ *Trichoderma reesei*

Improvement of Cellulose Degrading Enzymes Activity by Mutagenesis in *Trichoderma reesei* Fungi

حامد عسکری^{۱*} و سمیرا شهبازی^۲

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۶/۰۴

تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۹/۱۸

چکیده

قارچ *Trichoderma reesei* یکی از گونه‌های مهم تولیدکننده آنزیم‌های تجزیه‌کننده سلولز در طبیعت است. در این پژوهش ۲۱ جدایه جهش‌یافته پرتو گاما از قارچ *T. reesei* برای تولید آنزیم سلولاز روی محیط محتوی سلولز کلونیدی غربال‌گری شد. غلظت پروتئین‌های خارج سلولی جدایه‌های وحشی و جهش‌یافته با استفاده از روش بردفورد اندازه‌گیری شد. آویسل، کربوکسی متیل سلولز و کاغذ صافی برای اندازه‌گیری فعالیت سلولازی استفاده شد. همچنین خلوص و ترکیب پروتئین‌های غنی از آنزیم با استفاده از آزمون الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید مورد ارزیابی قرار گرفت. بالاترین میزان تولید پروتئین خارج سلولی در جدایه‌های *T. r M7* و *T. r M17* مشاهده شد. فعالیت آنزیم‌های اندوگلوکاناز، اگزوگلوکاناز و سلولاز کل در جدایه جهش‌یافته *T. r M8* بالاترین مقادیر فعالیت آنزیمی را در بین جدایه‌های جهش‌یافته و وحشی نشان داد. اختلاف وزن مولکولی باندهای آنزیمی نشان داد که آنزیم‌های *Cel 1A*، *EG IV*، *Cel 12A*، *Cel 45A*، *Cel 3A*، *Cel 7A*، *Cel 6A*، *Cel 5A* و *Cel 61A* سلولز کلونیدی را به‌صورت هم‌افزایی هیدرولیز می‌کنند. این نتایج نشان می‌دهد که جهش‌زایی با پرتو گاما برای دستیابی به جهش‌یافته‌های تریکودرما با تولید بالای آنزیم سلولاز امکان‌پذیر است.

واژه‌های کلیدی: تریکودرما، آنزیم سلولاز، الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید، پرتوتابی گاما، موتاسیون.

۱ و ۲. به‌ترتیب پژوهشگر و استادیار گروه گیاهپزشکی و نگهداری مواد غذایی، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی

ایران، کرج، ایران

Email: haskari@aeoi.org.ir

*: نویسنده مسوول

این‌گونه *T. reesei* این پیچیدگی به دلیل مشابهت‌های مورفولوژیک داخل گونه دشوارتر است. لذا شناسایی و تفکیک گونه *T. reesei* از گونه‌های نزدیک مانند *T. viride* و *T. longibrachiatum* تنها براساس داده‌های مورفولوژیک دشوار است و مهم‌ترین خصوصیتی که باعث تفکیک سریع این‌گونه می‌شود توانایی بالای تولید آنزیم سلولاز در این‌گونه می‌باشد پسولیت و همکاران (Peciulyte et al., 2014). ژنوم *T. reesei* (۳۴,۱ Mbp) شامل ۹۱۴۳ ژن است. مارتینز و همکاران (Martinez et al., 2008)، که نسبت به اکثر آسکومیست‌های دیگر و حتی بسیاری از گونه‌های تریکودرما مانند *Trichoderma virens* (۱۲۵۱۸ ژن) و *Trichoderma atroviride* (۱۱۸۶۵ ژن) کوتاه‌تر است شوستر و همکاران (Schuster et al., 2012) و احتمالاً به‌دلیل موتاسیون نقطه‌ای ناشی از تکرار (RIP)، در مرحله تولیدمثل جنسی می‌باشد. برجسته‌ترین ویژگی این‌گونه توانایی تولید آنزیم‌های سلولیتیک در آن است. تنها تعداد کمی از قارچ‌ها قادر به تولید هر سه کلاس آنزیم سلولاز بوده و به‌عنوان قارچ‌های سلولولیتیک کارآمد معرفی می‌گردند. یکی از مهم‌ترین قارچ‌های سلولولیتیک قارچ *Trichoderma reesei* است که به‌عنوان یکی از برترین تولیدکنندگان کمپلکس سلولازی در تحقیقات مختلف شناخته شده است. مونتینکورت و اولیچ (Montenecourt and Eveligh, 1997). از آنجاکه گونه‌های مختلف تریکودرما یکی از مفیدترین منابع تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده سلولز می‌باشند، توجه خاصی به تولید آنزیم‌های سلولازی توسط این قارچ، از طریق شناسایی و ایجاد گونه‌های برتر از نظر تولید آنزیم شده است پرسون و همکاران (Persson et al., 1991). از آغاز دهه ۱۹۶۰ که فعالیت سلولازی قارچی گزارش شد، تلاش‌های شایان ملاحظه‌ای در جهت تغییر ژنتیکی گونه‌های تریکودرما و بهینه‌سازی شرایط کشت با فرض افزایش کارایی تولید سلولاز صورت پذیرفته و در دهه اخیر روش‌های متعددی از جمله موتاسیون‌های شیمیایی، استفاده از پرتو فرابنفش و مهندسی ژنتیک برای ایجاد سویه‌های تولیدکننده سلولاز بیش‌تر در اولویت قرار داشته است. مٹوولایودام و ویروتاگیری (Muthuvelayudham and Viruthagiri, 2006). با توجه به پتانسیل کاربرد آنزیم‌های سلولازی در صنایع مختلف و نیز اهمیت نقش گونه‌های تریکودرما در تولید این نوع آنزیم، تحقیق حاضر با هدف ایجاد تنوع در ذخیره ژنتیکی گونه‌های تریکودرما بومی و نیز دستیابی به ژنوتیپ‌های جدید با توان فعالیت آنزیمی بیش‌تر، با استفاده از جهش‌زایی با پرتو گاما در گونه قارچی *Trichoderma reesei* انجام گرفته است.

سلولز فراوان‌ترین و تجدید پذیرترین پلیمر زیستی حاضر در کره زمین است که حدود $10^{12} \times 1/5$ تن از تولید سالانه زیست‌توده فتوسنتزی گیاهان را تشکیل می‌دهد کلم و همکاران (Klemm et al., 2002). امروزه توجه جهانی به سلولز به‌عنوان یک منبع کربن تجدیدشونده که ظرفیت تبدیل به انواع فرآورده‌ها و انرژی زیستی را دارد جلب شده است. تدبیر مؤثر برای بهره‌مندی کارآمد از این منبع تجدیدپذیر، هیدرولیز میکروبی ضایعات لیگنوسلولزی و تخمیر فندهای احیاکننده حاصل برای تولید انواع متابولیت‌ها است کیم و همکاران (Kim et al., 2003). با توجه به تقاضای در حال رشد برای سلولازها و نیز به‌منظور بهره‌مندی از تمام ظرفیت آن‌ها در بیوتکنولوژی، مطالعه مستمر بر روی این آنزیم‌ها امری ضروری است بهات (Bhat, 2000). عملکرد کم آنزیم‌های سلولازی و هزینه بالای تولید آن‌ها، دو چالش اصلی در کاربرد صنعتی آن‌ها به‌شمار می‌رود. از این‌رو، روش‌های متعددی برای ارتقای فعالیت سلولازی، خصوصاً در قارچ‌های متعلق به جنس *Trichoderma* به‌کار گرفته شده است. بیش‌تر این تلاش‌ها در جهت افزایش فعالیت سلولاز کل یا فعالیت بخش بتاگلوکوزیدی سیستم سلولازی است. امروزه بسیاری از سویه‌های قارچی به علت توانایی ترشح مقادیر زیاد آنزیم‌های تجزیه‌کننده سلولز در مطالعات موتاسیون به‌کار گرفته می‌شوند. سلولازها توسط قارچ‌های تجزیه‌کننده سلولز از قبیل جنس‌های *Chaetomium*، *Fusarium*، *Myrothecium*، *Penicillium* و *Aspergillus* و گونه‌های *Trichoderma* تولید می‌گردند ساجید و همکاران (Sajith et al., 2016). گونه‌های تریکودرما حداقل دو اگزوگلوکاناز (سلوبیوهیدرولاز) شامل Cel 6A (CBH II) و Cel 7A (CBH I) و پنج اندوگلوکاناز شامل Cel 5A (EG II)، Cel 7B (EG I)، Cel 12A (EG III)، Cel 45A، EG V، Cel 61A و Cel 1A (BGL II) (EG 17)، هم‌چنین دو β -گلوکوزیداز شامل Cel 3A (BGL I) و Cel 1A (BGL II) را تولید می‌کنند فورمن و همکاران (Foreman et al., 2003). سلولازهای صنعتی تولید شده از قارچ *Trichoderma reesei* توسط موتاسیون تصادفی یا با تغییرات ژنتیکی هدفمند بهبود یافته‌اند نوالینن و همکاران (Nevalainen et al., 1994). قارچ *Trichoderma reesei* مرحله غیرجنسی قارچ آسکومیست *Hypocrea jecorina* (خانواده *Hypocreaceae*) رده *Sordariomycetes*، راسته *Pezizomycotina* می‌باشد کوهلر و همکاران (Kuhls et al., 1996). از نظر تاکسونومیک مرحله غیرجنسی قارچ‌ها (قارچ‌های ناقص) دارای پیچیدگی‌های زیادی می‌باشد و به‌خصوص در

تهیه و آماده‌سازی قارچ وحشی و موتانت *T. reesei*

قارچ *T. reesei* به صورت خشک‌شده انجمادی از مرکز کلکسیون قارچ و باکتری سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به شماره ۵۱۴۲ تهیه گردید. قارچ فوق تحت شرایط سترون به داخل محیط کشت (PDB) Potato Dextrose Broth انتقال داده شد و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۸°C و سرعت هم‌زدن ۱۸۰ دور بر دقیقه قرار داده شد. سپس توده میسلیومی بر روی محیط (PDA) Potato Dextrose Agar انتقال داده شد و در همان شرایط دمایی قرار گرفت. تشتک‌های کشت به مدت ۷ روز گرمخانه‌گذاری گردید و اسپورهای تولید شده با استفاده از محلول سیلین جمع‌آوری گردید و جمعیت آن در غلظت 1×10^6 اسپور در میلی‌لیتر تنظیم گردید. معیار دوز جذبی مناسب برای جهش‌زایی غیرکشنده در اسپورها، ظهور تقریباً ۵۰-۴۰ درصد جوانه‌زنی اسپور پس از پرتوتابی می‌باشد. از طرفی میزان دز نباید موجب کاهش سرعت رشد قارچ در مقایسه با تیپ مادری شود. نتایج مطالعات قبلی نشان داد که در دز ۲۵۰ Gy تقریباً نیمی از اسپورها جوانه‌زنی داشته و این دز به عنوان دز مناسب پرتوتابی انتخاب گردید (مرادی و همکاران، ۱۳۹۰). عملیات پرتوتابی با استفاده از دستگاه گاماسل با چشمه کبالت ۶۰-اکتیویته ۲۵۰۰ کوری و نرخ دز ۰/۲۳ گری در ثانیه مستقر در مرکز تحقیقات کشاورزی و پزشکی هسته‌ای کرج (سازمان انرژی اتمی ایران) انجام پذیرفت. از سوسپانسیون اسپور سریال رقت تهیه گردید و بر روی محیط کشت PDA کشت داده شدند و در دمای ۲۵°C برای مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. اسپورهای جوانه زده شده به دقت جداسازی و به محیط کشت تازه انتقال داده شد و تعداد ۲۱ جدایه جهش‌یافته از بین ۱۲۰ جدایه، بر اساس تفاوت‌های ریخت‌شناسی و آزمون‌های غربالگری داخل ظروف برای تولیدکنندگان برتر آنزیم سلولاز (داده‌ها ارائه نشده است) انتخاب شدند و برای سنجش توانایی تولید آنزیم سلولاز مورد آزمایش قرار گرفت.

تولید آنزیم سلولاز

جدایه‌های جهش‌یافته و وحشی گونه *T. reesei* بر روی محیط کشت (MYG agar) Malt Yeast Glucose 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 گرمخانه‌گذاری گردیدند. با استفاده از محلول سیلین از پلیت‌های هفت روزه حاوی اسپور، سوسپانسیون اسپوری با جمعیت 10^7-10^8 اسپور در میلی‌لیتر تهیه گردید.

کشت اولیه سوسپانسیون اسپوری در محیط *Trichoderma* Complete Medium (TCM) حاوی ۱ گرم در لیتر باکتوپیتون، ۰/۳ گرم در لیتر اوره، ۲ گرم در لیتر KH_2PO_4 ، ۱/۴ گرم در لیتر $(NH_4)_2SO_4$ ، ۰/۳ گرم در لیتر $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، ۰/۳ گرم در لیتر $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ ، ۰/۰۰۵ گرم در لیتر $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ، ۰/۰۰۲ گرم در لیتر $MnSO_4$ ، ۰/۰۰۲ گرم در لیتر $ZnSO_4$ و ۰/۰۰۲ گرم در لیتر $CO_2 \cdot 7H_2O$ و ۲ میلی‌لیتر در لیتر توئین انجام گرفت. pH محیط کشت TCM بر روی ۴/۸ تنظیم گردید و با ۰/۳ درصد (w/v) گلوکز ترکیب گردید. انجام عمل تخمیر در محیط کشت TCM در ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط TCM در دمای ۲۸°C به مدت ۲۴ ساعت و ۱۸۰ rpm انجام گرفت و بعد از مدت زمان فوق اسپورها تبدیل به حالت رویشی میسلیوم گردیدند. با استفاده از سانتریفیوژ کردن در ۴۵۰۰ rpm به مدت ۷ دقیقه میسلیوم‌ها از محیط TCM جداسازی شدند و جهت القای تولید آنزیم‌های سلولیتیک میسلیوم‌های شسته شده با سیلین به ارلن مایر ۵۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط *Trichoderma* Fermentation Medium (TFM) حاوی ۰/۳ گرم در لیتر اوره، ۲ گرم در لیتر KH_2PO_4 ، ۱/۴ گرم در لیتر $(NH_4)_2SO_4$ ، ۰/۳ گرم در لیتر $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، ۰/۳ گرم در لیتر $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ ، ۰/۰۰۵ گرم در لیتر $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ، ۰/۰۰۲ گرم در لیتر $MnSO_4$ ، ۰/۰۰۲ گرم در لیتر $ZnSO_4$ و ۰/۰۰۲ گرم در لیتر $CO_2 \cdot 7H_2O$ و ۲ میلی‌لیتر در لیتر توئین انتقال داده شد. این محیط در pH= ۴/۸ تنظیم شده بود و حاوی ۰/۵ درصد (وزنی به حجمی) سلولز کلونیدی بود. شرایط رشد مشابه شرایط قبل در ۱۸۰ rpm و دمای ۲۸°C به مدت ۷۲ ساعت انجام شد. بعد از مدت زمان فوق میسلیوم‌های قارچ توسط سانتریفیوژ کردن در ۴۵۰۰ rpm به مدت ۷ دقیقه خارج گردید و مایع فوقانی برای اندازه‌گیری پروتئین خارج سلولی و فعالیت آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت ون و همکاران (2005, Wen et al.).

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 (1976) انجام گرفت. از پروتئین خالص سرم آلبومین گاوی (Bovine Serum Albumin, BSA) به عنوان استاندارد پروتئین استفاده شد و مقدار پروتئین (میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در مایع فوقانی محیط تخمیر TFM محاسبه گردید. فعالیت آنزیم‌های Avicelase, CMCase و سلولاز کل (FPase) به وسیله اندازه‌گیری مقدار گلوکز آزاد شده از سوبستراهای آویسل، کربوکسی متیل سلولز و کاغذ صافی واتمن ۱ با استفاده

بهبود فعالیت آنزیم‌های تجزیه‌کننده سلولز با جهش‌زایی...

از معرف دی‌نیتروسالیسیلیک اسید و گلوکز به‌عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد گاما و موتا (Gama and Mota, 1998). مخلوط واکنش حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول ۰/۵ درصد (وزنی به حجمی) از هر یک از سوبستراها در بافر ۰/۰۵ مولار سترات سدیم (pH= ۴/۸) و ۰/۵ میلی‌لیتر 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 میلی‌لیتر از محلول دی‌نیتروسالیسیلیک اسید متوقف شد. نمونه‌ها به‌خوبی 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 به‌عنوان 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 سانتی‌متر کاغذ صافی واتمن شماره ۱ به‌عنوان سوبسترا استفاده شد.

الکتروفورز و تعیین وزن مولکولی آنزیم‌ها

برای بررسی الگوی پروتئینی از آزمون الکتروفورز (SDS-PAGE) به روش لاملی (1970) در سیستم ناپیوسته (ژل ردیف‌کننده، ۴ درصد و ژل تفکیک‌کننده، ۱۲/۵ درصد) استفاده شد. آزمون الکتروفورز در آمپر ثابت ۲۰ میلی‌آمپر انجام شد و ژل الکتروفورز با استفاده از کوماسی بریلیانت بلو R-250 رنگ‌آمیزی گردید و با استفاده از رنگ‌بر حاوی متانول - اسید استیک - آب به نسبت ۱:۱:۸ (حجمی به حجمی) رنگ‌بری گردید. تعیین وزن مولکولی آنزیم‌ها با استفاده از نرم‌افزار دانسیتومتری Gel-Pro Analyzer 6.0 با استفاده از نشانگر پروتئینی متعلق به شرکت Vivantis محدوده وزن مولکولی ۱۷۵-۱۰/۵ KDa انجام گرفت لاملی (Laemmli, 1970).

آنالیز 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 نرم‌افزار SPSS (ویرایش ۱۶) انجام گرفت و کلیه آزمایشات در سه تکرار انجام شد.

نتایج و بحث

تعیین غلظت پروتئین خارج سلولی در جدایه‌های جهش‌یافته

نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین غلظت پروتئین خارج سلولی (میلی‌گرم در میلی‌لیتر) تولید شده در مایع فوقانی محیط تخمیر TFM قارچ *T. reesei* و جدایه‌های جهش‌یافته نشان دادند که کلیه داده‌ها در سطح آماری ۰/۰۵ دارای اختلاف معنی‌دار آماری بوده و جدایه‌های جهش‌یافته مقادیر پروتئین خارج سلولی بیش‌تری را نسبت به نمونه وحشی تولید کرده است (شکل ۱a). بالاترین مقادیر پروتئین خارج سلولی تولید شده به‌ترتیب در جدایه‌های جهش‌یافته T.rM7 و T.rM17 مشاهده گردید. میزان تولید پروتئین خارج سلولی از ۰/۰۱۶ الی ۰/۰۹۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر متغیر بود. کم‌ترین میزان تولید پروتئین خارج سلولی مربوط به نمونه وحشی *T. reesei* بود. نتایج اندازه‌گیری پروتئین خارج سلولی نشان داد که نمونه‌های مختلف مورد آزمون داری اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۰/۰۵ می‌باشند. در بیش‌تر مواقع تعیین غلظت پروتئین خارج سلولی کار ساده‌ای نمی‌باشد، چرا که عوامل مختلفی ممکن است بر روی نتایج نهایی تأثیرگذار باشد آدنی و همکاران؛ زیا و همکاران، (Adney et al., 1995; Zaia et al., 1998). سه فاکتور اصلی وجود دارد که ممکن است در اندازه‌گیری غلظت پروتئین تأثیر بگذارند که شامل موارد زیر می‌شوند: (الف) هر روش تعیین میزان پروتئین بر پایه اختلاف و اصول کمی استوار است؛ (ب) حضور ترکیبات غیرپروتئینی در محلول آنزیمی و یا محیط واکنش اگر در نتایج روش‌های کمی دخالت کنند می‌توانند منبعی از خطا باشند و (ج) حضور پروتئین‌های غیرسلولازی در آماده‌سازی آنزیم می‌تواند در تفسیر داده‌های فعالیت آنزیمی ویژه ایجاد مشکل نماید. چنین اختلافاتی هم‌چنین ناشی از این حقیقت است که ایزوله‌های آنزیمی مختلف ساختارهای اولیه متفاوتی دارند، گذشته از این در درجه گلیکوزیلاسیون نیز متفاوت می‌باشند. بنابراین این فاکتورها در پاسخ پروتئین‌ها از گونه‌های مختلف قارچ تریکودرما منعکس می‌شوند.

تعیین فعالیت آنزیم‌های سلولیتیک در جدایه‌های جهش‌یافته

شکل ۱ (b, c و d) مقایسه میانگین فعالیت آنزیم‌های اگزوگلو-

کاناز، اندوگلوکاناز و سلولاز کل را در مایع فوقانی محیط تخمیر TFM در قارچ وحشی *T. reesei* و جدایه‌های جهش‌یافته آن را نشان می‌دهد. کلیه نمونه‌ها در سطح آماری ۰/۰۵ دارای اختلاف معنی‌دار آماری بودند.

بالاترین فعالیت آنزیم اگزوگلوکاناز در جدایه‌های جهش‌یافته بالاترین فعالیت آنزیم اگزوگلوکاناز در جدایه‌های جهش‌یافته T. r M7 و T. r M11، T. r M21 مشاهده گردید. میزان تغییرات فعالیت اگزوگلوکاناز از ۳/۳۱ الی ۷/۲۲ (واحد در میلی‌لیتر) متغیر بود. پایین‌ترین میزان فعالیت آنزیمی در جدایه جهش‌یافته T. r M9 مشاهده گردید. بالاترین فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز (CMCase) به ترتیب در جدایه‌های جهش‌یافته T. r M21، T. r M4 و T. r M18 مشاهده گردید. میزان فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز از مقدار ۳/۷۵ الی ۶/۰۹ واحد در میلی‌لیتر متغیر بود. پایین‌ترین میزان فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز در جدایه جهش‌یافته T. r M2 مشاهده گردید. سلولاز کل شامل فعالیت آنزیم‌های اندوگلوکاناز، اگزوگلوکاناز و بتا-گلوکوزیداز می‌شود که به صورت سینرژیستی باعث هیدرولیز سلولز کریستالی می‌شوند. به منظور تعیین فعالیت سلولاز کل از بستر ناهمگن کاغذ صافی واتمن شماره ۱ که در ساختار خود شامل هر دو بخش کریستالی و بی‌نظم است، استفاده شد و فعالیت آنزیمی (FPase) برحسب واحد در میلی‌لیتر بیان گردید. بالاترین میزان فعالیت آنزیم FPase در جدایه‌های جهش‌یافته T. r M8، T. r M11، T. r M16، T. r M7، T. r M21 مشاهده گردید. میزان فعالیت آنزیم سلولاز کل از مقدار ۴/۸۱ واحد در میلی‌لیتر الی ۱۰/۰۰ واحد در میلی‌لیتر متغیر بود. کم‌ترین میزان فعالیت آنزیمی در جدایه جهش‌یافته T. r M2 مشاهده گردید. در این مطالعه نیز بالاترین فعالیت آنزیم سلولاز کل در جدایه جهش‌یافته T. r M8 مشاهده شد که نسبت به سویه شاهد ۱/۷۴ برابر شده است. اندازه‌گیری فعالیت سلولاز کل همیشه با استفاده از سوبستراهای نامحلول شامل سوبستراهای سلولزی خالص از قبیل کاغذ صافی واتمن شماره ۱، کرک پنبه، سلولز میکروکریستال، سلولز باکتریایی، سلولز باکتریایی، سلولز جلبکی و سوبستراهای حاوی سلولز از قبیل سلولزهای رنگدار، α - سلولز و لیگنوسولز پیش‌تیمار شده انجام می‌شود. آویسل حاوی برخی نواحی آمورف و سلودکسترین‌های محلول می‌باشد که می‌تواند به عنوان سوبسترا برای هم اگزو و هم اندوگلوکانازها عمل کند. هیچ سوبسترای ویژه خیلی عالی برای آزمایش فعالیت اگزوگلوکانازها در مخلوط‌های سلولازی وجود ندارد وود و بهات (Wood and Bhat, 1988). با این حال این سوبسترا نمی‌تواند برای تعیین فعالیت CBH II در قارچ *T. reesei* مناسب باشد، چرا که دارای یک فعالیت اگزوگلوکانازی مؤثر برای این سوبسترا نمی‌باشد ون تیلبورگ و همکاران (van

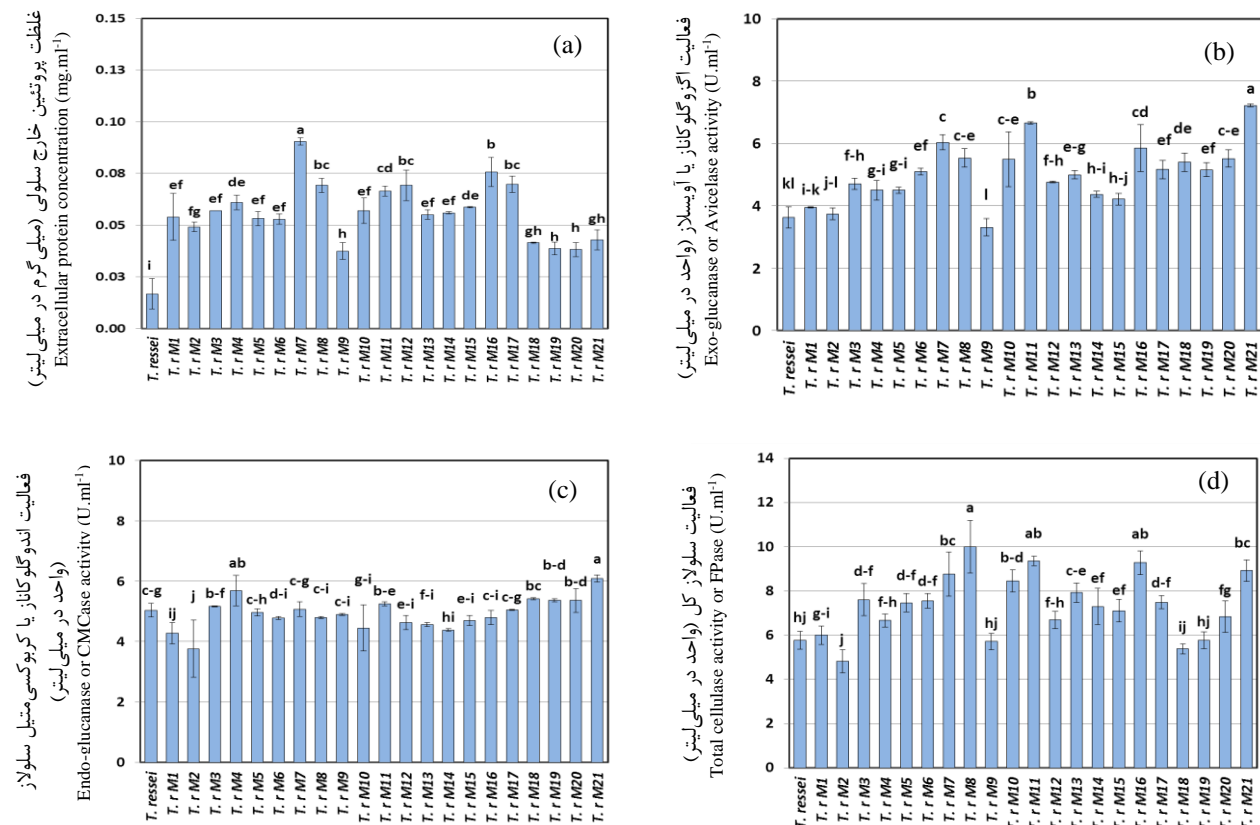
فناوری زیستی در کشاورزی / جلد هفدهم / شماره دوم / پاییز و زمستان ۹۷

۱۹۸۵; ۱۹۸۲) *Tilbeurgh et al.*). آویسل بالاترین نسبت زنجیره‌های انتهایی به باندهای بتا-گلوکوزیدی داخلی قابل‌دسترسی را در میان مدل‌های سوبستراهای سلولزی دارد. آنزیم‌های CBH I و CBH II می‌توانند باندهای متعددی را به دنبال جذب حتی قبل از تفکیک کمپلکس سوبسترا و آنزیم، بشکنند *والزنامه* و همکاران (Valjamae et al., 1998). بنابراین عملکرد CBH I و CBH II منجر به کاهش تدریجی در درجه پلیمریزاسیون سلولز می‌شود سربوسودسوک و همکاران (Srisodsuk et al., 1998). مطالعات قبلی گزارش کرده‌اند که فعالیت ویژه آنزیم CBH II تقریباً دو برابر فعالیت آنزیم CBH I می‌باشد نیدتسکی و همکاران؛ مدو و همکاران (Nidetzky et al., 1994; Medve et al., 1994). بالا بودن فعالیت آویسلز در قارچ موتانت T. r M21 احتمالاً به علت بالا بودن توانایی این قارچ در تجزیه نواحی کریستالی می‌باشد. فعالیت اندوگلوکانازها اغلب بر اساس هیدرولیز مشتقات محلول سلولز از قبیل کربوکسی متیل سلولز اندازه‌گیری می‌شود. گزارشی مبنی بر ارتباط ضعیف فعالیت CMCase با توانایی هیدرولیز سلولز نامحلول حتی برای اندوگلوکانازهای خالص شده وجود ندارد کلیوسو (Klyosov, 1988; 1990). از میان سه اندوگلوکاناز *T. viride* خالص‌سازی شده به وسیله شو/میکر و برون، یکی از آن‌ها که بالاترین سرعت هیدرولیز آویسل را نشان داد، دارای کم‌ترین میزان فعالیت CMCase بود شو/میکر و برون (Shoemaker and Brown, 1978). در تحقیقی کلیوسو به‌وضوح با اشاره به فعالیت اندوگلوکاناز از بسیاری از میکروارگانیسم‌های اندازه‌گیری شده بر روی CMC نشان داد که هیچ ارتباطی با فعالیت‌های بر علیه سلولز نامحلول وجود ندارد (کلیوسو، 1990). سرعت تولید قندهای احیاکننده محلول به‌وسیله EG I نسبت به CBH I برای سلولز آمورف بالاتر از ۱ (≥ 1)، برای آویسل کم‌تر از یک (≤ 1) و برای سلولز باکتریایی میکروکریستال (BMCC) و کتان نیز کم‌تر از ۱ (≤ 1) بود ژانگ و لیند (Zhang and Lynd, 2004). سرعت نسبتاً پایین آزاد شدن قندهای احیا به‌وسیله EG I بر روی سلولز کریستالی سازگار با اکثر انتهای احیا تولید شده توسط فعالیت اندوگلوکانازها در فاز جامد می‌باشد و لزوماً حاکی از سرعت پایین‌تر شکستن باندهای بتا-گلوکوزیدی نمی‌باشد. هیدرولیز کارآمد سلولز کریستالی به‌وسیله سلولاز نیازمند به عملکرد سینرژیستی اندوگلوکانازها و سلوبیوهیدرولازها می‌باشد که توسط تری و کوپوولا (1995) مرور شده است (Teeri and Koivula, 1995). این عملکرد سینرژیستیکی به‌خوبی در قارچ موتانت T. r M8 به‌خوبی قابل‌مشاهده بود. ماکزیمم سینرژی معمولاً با مقادیر بالایی از اگزوآنزیم‌ها و مقادیر اندکی از

بهبود فعالیت آنزیم‌های تجزیه‌کننده سلولز با جهش‌زایی...

(Zhang and Lynd, 2006). تئوری که به‌طور وسیعی برای عملکرد سینرژیستیکی بین CBH و EG پذیرفته شده است، مدل "اندو-اگزو" نامیده می‌شود. در ابتدا، اندوگلوکاناز باند‌های گلیکوزیدی بتا ۱ و ۴ داخلی را به‌صورت تصادفی در زنجیره‌ها در سطوح فیبرهای سلولزی هیدرولیز می‌کند و به‌موجب آن تولید زنجیره‌هایی انتهایی آزاد می‌کند. حمله اولیه اندوگلوکانازها (به‌ویژه در نواحی آمورف) سایت‌های اضافی را برای هیدرولیز توسط CBH تولید می‌کند تا الیگوساکاریدهای کوچک (عمدتاً سلوبیوز) تولید شود. بنابراین، مقادیر بالای فعالیت FPase جدایه موتانت T. r M8 به علت حضور آنزیم‌های CBH و EG می‌باشد و عملکرد با یکدیگر یا به عبارتی سینرژی آنزیم‌های CBH و EG اتفاق می‌افتد موجب هیدرولیز کامل سلولز به گلوکز می‌شود. هم‌چنین نشان داده شده است که بتا-گلوکوزیداز به‌طور وسیعی سرعت و وسعت هیدرولیز را به‌وسیله حصول اطمینان از هیدرولیز کارآمد سلوبیوز که یک محصول انتهایی ممانعت‌کننده مؤثر می‌باشد را افزایش می‌دهد.

اندوآنزیم‌ها به‌دست می‌آید رینیکنین (Reinikainen, 1994). هم‌چنین مشخص شده است که درجه سینرژی بستگی به سوبسترای مورد‌استفاده نیز دارد نیدتزیکی و همکاران (Nidetzky et al., 1993). هتروژن بودن سلولز نامحلول و پیچیدگی سیستم‌های سلولازی سبب مشکلات دشواری در اندازه‌گیری فعالیت سلولاز کل می‌شود. نتایج آزمایشات نشان داده است که ساختار هتروژنی سلولز (کاغذ صافی) کاهش شدید در سرعت هیدرولیز را در یک زمان کوتاه (کم‌تر از یک ساعت) را افزایش خواهد داد، حتی زمانی که اثرات سلولاز غیرفعال شود و محصولات ممانعت‌کننده شروع به تجمع بکنند *والز/امه* و همکاران، 1998؛ ژانگ و همکاران (Zhang et al., 1999). در تلاش برای روشن شدن این وضعیت، یک مدل مبتنی بر عملکرد، برای نشان دادن سینرژی بین اندوگلوکانازها و اگزوگلوکانازها توسعه داده شد و نشان داد که درجه سینرژی بین اندوگلوکانازها و اگزوگلوکانازها تحت تأثیر خصوصیات سوبسترا، شرایط آزمایش، مقدار آنزیم و نسبت ترکیبات می‌باشد (ژانگ و لیند



شکل ۱: مقایسه غلظت پروتئین خارج سلولی (میلی گرم در میلی لیتر) و فعالیت آنزیم‌های سلولاز (واحد در میلی لیتر) جدایه‌های جهش‌یافته فارچ *T. reesei* با والد اولیه آن در مایع فوقانی محیط تخمیر TFM حاوی سلولز کلئیدی بعد از ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۲۸°C و ۱۸۰rpm. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۵ درصد می‌باشد

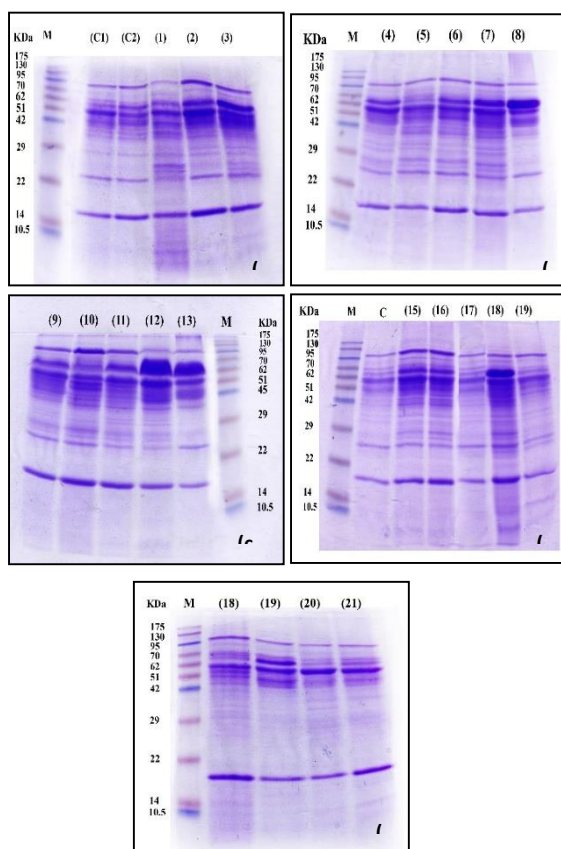
Fig. 1: Comparison of extracellular protein concentration (mg.ml⁻¹) and enzymes cellulase activity (U.ml⁻¹) of the mutant and wildtype isolates of *T. reesei* in supernatant of *Trichoderma* fermentation medium (TFM) containing colloidal cellulose after 72h incubation at 28°C and 180rpm. Different letters indicate a statistically significant difference of 5%

به خانواده ۶ گلوکوهیدرولازها می‌باشد. این آنزیم دارای وزن مولکولی ۴۷KDa و بر روی ژل SDS-PAGE دارای وزن مولکولی ۵۳KDa است و نقطه ایزوالکتریک آن ۵/۹ می‌باشد فاگرستام و پترسون؛ بهیخابهی (Fägerstam and Pettersson 1980;) (Bhikhabhai *et al.*, 1984). البته گزارشاتی نیز وجود دارد که محدوده وزن مولکولی این آنزیم را ۵۰-۵۸KDa گزارش کرده است. آنزیم Cel6A یا CBH II آنزیمی است که باعث شکستن باندهای گلیکوزیدی از انتهای غیراحیا زنجیره می‌شود (بارر و همکاران (Barr *et al.*, 1996) و در میان آنزیم‌های مترشحه از *T. reesei* بین ۲۰-۱۷ درصد از کل آنزیم‌های سلولاز بیان شده مربوط به Cel6A بوده است (استالبرگ، ۱۹۹۱؛ یلمن و همکاران، ۱۹۹۷). Cel7A یا CBH I یک سلوبیوهیدرولاز متعلق به خانواده ۷ گلوکوهیدرولازها می‌باشد و اولین آنزیم سلولاز *T. reesei* می‌باشد که شناسایی شده است. Cel7A دارای وزن مولکولی ظاهری ۵۲KDa و بر روی ژل SDS-PAGE دارای وزن مولکولی ۶۶KDa با نقطه ایزوالکتریک ۴/۳ می‌باشد (شومایکر و همکاران؛ فاگرستام و همکاران (Shoemaker *et al.*, 1983; Fägerstam *et al.*, 1977).

بررسی پروفایل پروتئین‌های خارج سلولی استرین‌های

وحشی و جهش‌یافته *T. reesei*

شکل ۲، مقایسه پروفایل پروتئینی (SDS-PAGE) پروتئین‌های خارج سلولی مایع فوقانی محیط تخمیر TFM حاوی آنزیم‌های سلولاز روی ژل پلی‌اکریل آمید مربوط به استرین‌های وحشی و جهش‌یافته *T. reesei* را نشان می‌دهد. جدایه فوق دارای باندهای آنزیمی متعددی در وزن‌های مولکولی مختلف بود که مربوط به آنزیم‌های Cel 6A، Cel 5A، Cel 61A، Cel 3C، Cel 3D، Cel 3A، Cel 7A، Cel 4، Cel 5A، 6A و Cel 6A بودند که به صورت سینژیستی باعث هیدرولیز سلولز می‌شدند. Cel5A یک اندوگلوکاناز متعلق به خانواده ۵ گلوکوهیدرولازها می‌باشد. وزن مولکولی این آنزیم ۴۲KDa تخمین زده شده است. با این وجود دارای وزن مولکولی ظاهری ۴۸KDa بر روی ژل SDS-PAGE می‌باشد. نقطه ایزوالکتریک این آنزیم ۵/۶-۵/۵ می‌باشد (شومایکر و برون، ۱۹۷۸). در میان آنزیم‌های بیان شده در *T. reesei* تخمین زده شده است که بین ۵ تا ۱۰ درصد از بیان سلولاز کل مربوط به آنزیم Cel5A می‌باشد (استالبرگ، یلمن و همکاران (Ståhlberg, 1991; Ilmen *et al.*, 1997). Cel6A یک سلوبیوهیدرولاز متعلق



شکل ۲: مقایسه پروفایل پروتئین‌های خارج سلولی در مایع فوقانی محیط تخمیر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید (SDS-PAGE) مربوط به

استرین‌های وحشی و جهش‌یافته *T. reesei*. (a): به ترتیب (C2 و C1): *T. reesei* و (1) الی (۲۱): *T. r M1* الی *T. r M21*

Fig. 2: Compare extracellular protein profiles in TFM supernatant of *T. reesei* (Lane C1 and C2) and its mutants (Lane 1-21) by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Cel7A بیش‌ترین سلولاز بیان شده توسط *T. reesei* می‌باشد و مقدار ۶۰-۵۰ درصد از کل سلولاز بیان شده را شامل می‌شود (استالبرگ، ۱۹۹۱؛ ایلمن و همکاران، ۱۹۹۷). با این حال در این تحقیق با توجه به خصوصیات سوبسترای تخمیر این آنزیم بیان کم‌تری نسبت به Cel6A یا CBH II از خود نشان داده است. احتمالاً این آنزیم نقشی کلیدی در هیدرولیز سلولز کریستالی را بازی می‌کند. Cel7A یک آنزیم کارآمد در هیدرولیز پیوندهای گلیکوزیدی در سلولز بوده و ترجیحاً هیدرولیز را از انتهای احیای زنجیره انجام می‌دهد (بار و همکاران، ۱۹۹۶؛ دیون و همکاران، ۱۹۹۸). Cel7B یک اندوگلوکاناز متعلق به خانواده ۷ گلوکوهِیدرولازها می‌باشد که دارای وزن مولکولی تخمینی ۴۸KDa بوده و بر روی ژل SDS-PAGE وزن مولکولی ۵۵KDa-۵۰ را نشان می‌دهد و دارای نقطه ایزوالکتریک ۴/۵ می‌باشد (شوایمیکر و همکاران، ۱۹۸۳؛ بهیخا، ۱۹۸۴). آنزیم Cel7B زنجیره‌های گلیکوزیدی در سلولز را با مکانیسم مشخصی هیدرولیز می‌کند. در قارچ *T. reesei* بیان Cel7B بین ۱۰-۶ درصد از بیان سلولاز کل را شامل می‌شود (استالبرگ، ۱۹۹۱؛ ایلمن و همکاران، ۱۹۹۷). بتاگلوکوزیدازها با هیدرولیز الیگوساکاریدهای محلول تولید گلوکز می‌نمایند و گزارش شده است که در هیدرولیز سلولز، افزودن بتاگلوکوزیداز قارچ *T. reesei* سبب عملکرد بهتر ساکاریفیکاسیون گردیده است (زاین و همکاران، ۱۹۹۳). بتاگلوکوزیداز باعث هیدرولیز سلوبیوز که یک ممانعت‌کننده از فعالیت آنزیم سلولاز است، می‌شود.

شکل (۲a) پروفایل پروتئین‌های خارج سلولی حاوی آنزیم‌های سلولاز قارچ وحشی *T. reesei* و جدایه‌های جهش‌یافته T. r M1، T. r M2، T. r M3 را نشان می‌دهد. چاهک C1 و C2 در این پروفایل پروتئینی باندهای آنزیمی تولید شده توسط قارچ وحشی *T. reesei* را نشان می‌دهد. باند پرواضح ایجاد شده در وزن مولکولی ۵۴KDa مربوط به آنزیم Cel 6A (CBH II) می‌باشد. هم‌چنین باند آنزیمی دیگری در وزن مولکولی ۶۲KDa ایجاد شده است که در محدوده وزن مولکولی آنزیم Cel 7A (CBH I) قرار دارد و باند با وزن مولکولی ۲۴/۴KDa ایجاد شده است که مربوط به آنزیم Cel 12A (EG III) می‌باشد که از دسته خانواده اندوگلوکانازها می‌باشد. این باند آنزیمی در دیگر جدایه‌های جهش‌یافته (شامل T. r M2 و T. r M3) نیز مشاهده گردید، اما جدایه جهش‌یافته T. r M1 فاقد این باند آنزیمی بود و آنزیم اندوگلوکاناز در جدایه جهش‌یافته T. r M1 دارای وزن مولکولی ۲۷KDa و با وزن مولکولی کمی بالاتر نسبت به دیگر جدایه‌های جهش‌یافته قارچ وحشی *T. reesei* ایجاد شد که این

باند آنزیمی مربوط به Cel 61B (EG) بود. در این پروفایل پروتئینی بالاترین بیان آنزیم مربوط به Cel 6A (CBH II) در جدایه جهش‌یافته T. r M2 مشاهده گردید. هم‌چنین بالاترین بیان آنزیم Cel 7A (CBH I) در جدایه جهش‌یافته T. r M3 مشاهده گردید. بیان آنزیم Cel 7A (CBH I) نسبت به آنزیم Cel 6A (CBH II) در جدایه جهش‌یافته T. r M3 ضعیف‌تر بود. کلیه جدایه‌ها دارای باند پروتئینی شارپی در وزن مولکولی ۱۷/۳KDa بودند که نوعی از آنزیم‌های خانواده اندوگلوکاناز می‌باشند. هم‌چنین کلیه جدایه‌های جهش‌یافته و قارچ وحشی *T. reesei* در این پروفایل پروتئینی دارای باند پروتئینی قابل‌توجهی در وزن مولکولی ۱۰۲KDa بودند که بیانگر آنزیم EG VI می‌باشد. بالاترین بیان این آنزیم در جدایه‌های جهش‌یافته T. r M2 و T. r M3 مشاهده گردید. شکل (۲b) مقایسه پروفایل پروتئین آنزیم‌های سلولاز در جدایه‌های جهش‌یافته T. r M4 الی T. r M8 را نشان می‌دهد. کلیه نمونه‌های مورد مطالعه در این پروفایل پروتئینی دارای باندهای آنزیمی متفاوتی در محدوده وزن مولکولی ۱۷۵KDa-۱۰/۵ بودند. در جدایه‌های جهش‌یافته مورد مطالعه در این پروفایل پروتئینی باند آنزیمی شارپی در وزن مولکولی ۱۰۲KDa مشاهده گردید که مربوط به آنزیم EG VI بود. در هر پنج جدایه جهش‌یافته فوق بیان این آنزیم به یک میزان صورت گرفته بود. آنزیم Cel 7A (CBH I) باند آنزیمی شارپی در جدایه‌های جهش‌یافته T. r M4، T. r M6، T. r M7 و T. r M8 در وزن مولکولی ۶۴KDa ایجاد نمود. این آنزیم دارای بیان پروتئینی شدیدتری نسبت به دیگر جدایه‌ها در جدایه جهش‌یافته T. r M8 بود. بیان آنزیم Cel 7A (CBH I) در جدایه جهش‌یافته T. r M5 صورت نگرفته بود. باند آنزیمی شارپ دیگری با وزن مولکولی ۵۴KDa در پروفایل پروتئینی در کلیه جدایه‌های جهش‌یافته ایجاد گردید که مربوط به آنزیم Cel 6A (CBH II) بود. جدایه‌های جهش‌یافته T. r M5، T. r M6 و T. r M7 و به میزان کم‌تری T. r M4، دارای باند پروتئینی ضعیفی در وزن مولکولی ۲۷KDa مربوط به آنزیم Cel 61B (EG) بودند. جدایه جهش‌یافته T. r M8 فاقد این باند آنزیمی بود. باند آنزیمی دیگری با وزن مولکولی ۲۵KDa مربوط به آنزیم Cel 12A (EG III) ایجاد گردید. در کلیه جدایه‌های جهش‌یافته در این پروفایل پروتئینی این آنزیم اندوگلوکاناز موجود بود، با این حال به صورت جزئی جدایه جهش‌یافته T. r M4 نسبت به دیگر جدایه‌های مورد مقایسه دارای بیان آنزیم EG III کم‌تری بود. باند شارپ دیگری با وزن مولکولی ۱۷KDa در کلیه جدایه‌های جهش‌یافته در این پروفایل پروتئینی مشاهده گردید که مربوط به آنزیم‌های خانواده

بود. این باند آنزیمی مربوط به نوعی آنزیم اندوگلوکاناز می‌باشد. بالاترین بیان این آنزیم به ترتیب در جدایه‌های جهش یافته T. r M12، T. r M11، T. r M13، T. r M10 و T. r M9 مشاهده گردید. جدایه جهش یافته T. r M9 فاقد باند آنزیمی Cel 12A (EG III) با وزن مولکولی ۲۵KDa و Cel 61B (EG) با وزن مولکولی ۲۷KDa بود. جدایه جهش یافته T. r M10 دارای باند آنزیمی شاری در وزن مولکولی ۳۹KDa بود که احتمالاً نوعی آنزیم اندوگلوکاناز می‌باشد. این باند آنزیمی در جدایه جهش یافته T. r M12 نیز قابل مشاهده بود. شکل (۲d) مقایسه پروفایل پروتئینی آنزیم‌های سلولاز در قارچ وحشی *T. reesei* و جدایه‌های جهش یافته T. r M16، T. r M15، T. r M14 را نشان می‌دهد. کلیه نمونه‌ها دارای باندهای پروتئینی متفاوت در محدوده وزن مولکولی ۱۰/۵-۱۷۵KDa بودند. باند آنزیمی شاری در وزن مولکولی ۱۰۲KDa در کلیه نمونه‌ها قابل مشاهده بود که مربوط به آنزیم EG VI می‌باشد. جدایه جهش یافته T. r M14 و M15 دارای بیان آنزیمی بالاتری نسبت به قارچ وحشی *T. reesei* و جدایه جهش یافته T. r M16 در این پروفایل پروتئینی بودند. آنزیم‌های Cel 6A (CBH) و Cel 7A (CBH I) با وزن‌های مولکولی ۶۴KDa و ۵۴KDa در کلیه نمونه‌های مورد آزمون قابل مشاهده بودند. بالاترین بیان این آنزیم در جدایه‌های جهش یافته T. r M14 و T. r M15 مشاهده گردید. بیان آنزیم Cel 7A (CBH I) در قارچ وحشی *T. reesei* و جدایه جهش یافته T. r M16 نسبت به آنزیم Cel 6A (CBH II) بودند. کلیه جدایه‌های قارچ *T. reesei* و همچنین جدایه وحشی این قارچ دارای آنزیم Cel 12A (EG III) با وزن مولکولی ۲۵KDa بودند. جدایه‌های جهش یافته T. r M14 و M15 هم‌چنین دارای باند آنزیمی دیگری در وزن مولکولی ۲۷KDa مربوط به آنزیم Cel 61B (EG) بودند. جدایه جهش یافته T. r M16 دارای باند آنزیمی ضعیفی در وزن مولکولی ۲۳KDa مربوط به آنزیم Cel 45A (EG V) بود. جدایه‌های جهش یافته T. r M14 و T. r M15 هم‌چنین دارای باندهای آنزیمی متعددی در محدوده وزن مولکولی ۴۲KDa الی ۶۲KDa بودند که مربوط به آنزیم‌های خانواده اندوگلوکاناز می‌باشند. هم‌چنین آنزیم Cel 5A (EG II) با وزن مولکولی ۴۸KDa در گونه وحشی قارچ *T. reesei* و جدایه‌های جهش یافته T. r M14، T. r M15 و T. r M16 قابل مشاهده بود. باند آنزیمی شارپ دیگری با وزن مولکولی ۱۷KDa نیز در این پروفایل پروتئینی قابل مشاهده بود که مربوط به نوعی آنزیم اندوگلوکاناز می‌باشد. بالاترین بیان این آنزیم به ترتیب در جدایه‌های جهش یافته T. r M15 و T. r M14 مشاهده شد. باند آنزیمی Cel 3B (BGL) با

اندوگلوکاناز بود. شکل (۲c) پروفایل پروتئین آنزیم‌های سلولاز در جدایه‌های جهش یافته قارچ وحشی *T. reesei* (جدایه‌های جهش یافته T. r M9 الی T. r M13) را نشان می‌دهد. کلیه نمونه‌های مورد مطالعه در این پروفایل پروتئینی دارای باندهای پروتئینی متفاوتی در محدوده وزن مولکولی ۱۰/۵-۱۷۵KDa بودند. باند پروتئینی شاری در وزن مولکولی ۱۰۲KDa در کلیه نمونه‌ها قابل مشاهده بود که نمایانگر آنزیم EG VI می‌باشد. بالاترین بیان این آنزیم در این پروفایل پروتئینی به ترتیب در جدایه‌های جهش یافته T. r M12، T. r M11 و T. r M13 مشاهده گردید. آنزیم‌های Cel 7A (CBH I) و Cel 6A (CBH II) به ترتیب در وزن‌های مولکولی ۶۴KDa و ۵۴KDa قابل مشاهده بودند. جدایه‌های جهش یافته T. r M10 و T. r M9 بالاترین بیان آنزیم Cel 7A (CBH I) را به خود اختصاص دادند. جدایه جهش یافته T. r M12 از لحاظ تولید آنزیم Cel 7A (CBH I) عملکرد خیلی ضعیفی داشت و باند پروتئینی ضعیفی را در وزن مولکولی ۶۴KDa ایجاد نمود. هم‌چنین بالاترین بیان آنزیم Cel 6A (CBH II) با وزن مولکولی ۵۴KDa در این پروفایل پروتئینی در جدایه جهش یافته T. r M10 مشاهده شد. دیگر جدایه‌های مورد آزمون در این پروفایل پروتئینی تفاوت چندانی از لحاظ بیان این آنزیم نداشتند. جدایه جهش یافته T. r M12 که دارای بالاترین بیان آنزیم اندوگلوکاناز بود، دو باند آنزیمی دیگر با وزن‌های مولکولی ۴۸KDa و ۴۵KDa ایجاد نمود که به ترتیب مربوط به آنزیم‌های Cel 5A (EG II) و Cel 5B (EG) بودند. بالاترین بیان این آنزیم‌ها تنها در جدایه‌های جهش یافته T. r M12 مشاهده گردید. هم‌چنین باند آنزیم‌های اندوگلوکاناز دیگری شامل Cel 45A (EG V) با وزن مولکولی ۲۳KDa، آنزیم Cel 12A (EG III) با وزن مولکولی ۲۵KDa و Cel 61B (EG) با وزن مولکولی ۲۷KDa نیز در این جدایه قابل مشاهده بود. بالاترین بیان آنزیم Cel 61B (EG) با وزن مولکولی ۲۷KDa در جدایه جهش یافته T. r M12 مشاهده گردید. هم‌چنین آنزیم Cel 61A (EG IV) با وزن مولکولی ۳۴KDa در جدایه جهش یافته T. r M12 مشاهده گردید. دیگر جدایه‌های جهش یافته در این پروفایل پروتئینی نیز حاوی این باند پروتئینی بودند. T. r M13 دارای باند آنزیمی Cel 61A (EG IV) ضعیف‌تری نسبت به دیگر جدایه‌های جهش یافته مورد مطالعه در این پروفایل پروتئینی بود. هم‌چنین بالاترین بیان آنزیم Cel 45A (EG V) با وزن مولکولی ۲۳KDa به ترتیب در جدایه‌های جهش یافته T. r M12، T. r M13 و T. r M9 و به میزان کم‌تری در جدایه‌های T. r M11 و T. r M10 مشاهده گردید. باند آنزیمی شارپ دیگری با وزن مولکولی ۱۷KDa در کلیه جدایه‌های جهش یافته قابل مشاهده

بهبود فعالیت آنزیم‌های تجزیه‌کننده سلولز با جهش‌زایی...

وزن مولکولی ۹۴KDa تنها در جدایه‌های جهش‌یافته T. r M14 و T. r M15 مشاهده گردید. این باند آنزیمی به صورت خیلی ضعیفی در جدایه جهش‌یافته T. r M16 نیز قابل مشاهده بود. شکل (۲e) مقایسه پروفایل پروتئین آنزیم‌های سلولاز در جدایه‌های جهش‌یافته T. r M18 الی T. r M21 را نشان می‌دهد. کلیه جدایه‌های جهش‌یافته مورد مطالعه در پروفایل پروتئینی دارای باندهای پروتئینی متفاوتی در محدوده وزن مولکولی ۱۰/۵-۱۷۵KDa مشاهده گردید. آنزیم‌های Cel 7A (CBH I) و Cel 6A (CBH II) به ترتیب با وزن‌های مولکولی ۶۴KDa و ۵۴KDa در نمونه‌های مورد آزمون قابل مشاهده بودند. آنزیم Cel 7A (CBH I) به صورت باند شارپ تنها در جدایه جهش‌یافته T. r M19 مشاهده گردید و در دیگر جدایه‌های جهش‌یافته تنها باند ضعیفی از این آنزیم قابل مشاهده بود. آنزیم Cel 6A (CBH II) در کلیه جدایه‌ها دارای باند پروتئینی قابل توجهی بود. آنزیم EG VI با وزن مولکولی ۱۰۲KDa در کلیه نمونه‌های مورد مطالعه در این پروفایل پروتئینی قابل مشاهده بود. جدایه جهش‌یافته T. r M19 دارای یک باند پروتئینی با وزن مولکولی ۴۸KDa مربوط به آنزیم Cel 5A (EG II) بود که در دیگر جدایه‌های جهش‌یافته این باند پروتئینی قابل مشاهده نبود. هم‌چنین در این جدایه باند آنزیم اندوگلوکانازی با وزن مولکولی ۱۷KDa قابل مشاهده بود که بیان این آنزیم در جدایه‌های T. r M18 و T. r M21 نسبت به دو جدایه جهش‌یافته دیگر بیش‌تر بود. تاکنون بسیاری از تکنیک‌های جهش‌زایی کلاسیک جهت ارتقای تولید و فعالیت آنزیم سلولاز سویه‌های مختلف میکروبی مورد استفاده قرار گرفته است (یک و همکاران؛ پترسون و نوالاینن (Ike et al., 2010);

Peterson and Nevalainen, 2012). به‌طور کلی، نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق نشان داد امکان ایجاد تغییر در تولید میزان پروتئین خارج سلولی و فعالیت سلولازی و تغییر در پروفایل پروتئینی آنزیم‌های تولیدی در جهت بهبود عملکرد، در اثر کاربرد پرتو گاما وجود دارد و ایجاد سویه‌های قارچی با توان بیش‌تر تولید آنزیم که پتانسیل بیش‌تری در تجزیه‌ی زیستی ترکیبات سلولزی، مدیریت بقایای گیاهی، تخمیر و بازیافت سلولز و تولید زیست‌انرژی و دیگر فرآورده‌های زیستی را داشته باشند، توسط موتاسیون کلاسیک ممکن است. موتاسیون با ایجاد تنوع ژنتیکی بیش‌تر، در بخشی از فرآیند دو قسمتی تکامل شامل تنوع و انتخاب، نقش دارد و بدین ترتیب در اصلاح و تکامل موجودات حائز اهمیت است. پرتو یونیزه‌کننده گاما هم با اثرات موتاژنی خود در ایجاد تنوع در ذخیره ژنتیکی قارچ تریکودرمای بومی کشور مؤثر بوده و می‌تواند به‌عنوان ابزاری ساده و کارآمد در برنامه‌های اصلاح سویه‌های میکروبی به‌منظور افزایش تولید یا فعالیت متابولیت‌های مختلف به‌کار گرفته شود.

سپاسگزاری

این مقاله از اعتبارات پروژه "تولید مواد بیولوژیک به‌منظور کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی خاکزاد فاز دوم PRC-A3-96002" انجام شده و نویسندگان از همکاری مهندس هادی فتح‌اللهی در پرتوتابی گونه‌های تریکودرما و سایر همکاری‌هایی که در انجام این مطالعه ما را یاری داده‌اند، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۹-۱۱ متن انگلیسی مراجعه شود.