بررسی تاثیر نوع سوبسترا و سویه قارچی تریکودرما ریزیی بر تولید سلولاز و اعمال جهش با هدف بهبود تولید آنزیم در سامانه تخمیر حالت جامد

نازنین داراب زاده[1]، زهره حمیدی اصفهانی[1*]، پریسا حجازی[2]

۱-گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲-گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی شیمی، نفت و گاز، دانشگاه علم و صنعت، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۲/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۶/۰۷

چکیده

سلولاز، آنزیمی مرکب شامل اندوگلوکاناز، اگزوگلوکاناز و بتاگلوکوزیداز می‌باشد که برای آبکافت سلولز استفاده می‌شود. سومین آنزیم صنعتی بوده و ۲۰ درصد بازار آنزیم جهان را به خود اختصاص داده است. کاربرد وسیعی در صنایع مختلف غذایی و نوشیدنی، سوخت زیستی، کاغذ و پالپ، شوینده‌ها، غذای حیوان و نساجی دارد. ریزاندامگان مختلف دارای توانایی تولید سلولاز هستند اما، تریکودرما ریزئی یکی از مناسب‌ترین گزینه‌ها می‌باشد. از آنجا که کاهش هزینه‌های تولید، نقش مهمی در کاربردی و صنعتی نمودن فرآیند دارد، کاربرد سوبستراهای ارزان‌قیمت اهمیت ویژه دارد. لذا در این مطالعه، ضایعات برنج به عنوان سوبسترا مورد بررسی قرار گرفتند. ابتدا تولید سلولاز توسط سه سویه‌ی تریکودرما ریزئی ۲۴۱۴، ۲۴۱۵ و ۲۴۱۶، از طریق آزمون کونگو رد مقایسه شد. نتایج نشان داد تریکودرما ریزئی ۲۴۱۴ دارای بیشترین فعالیت تولید سلولاز بود. سپس، کشت روی سوبستراهای سبوس، کاه و پوست برنج به صورت منفرد و ترکیبی انجام شده و با آزمونFPAse ، ترکیب هر سه سوبسترا با نسبت‌های یکسان، به عنوان بهترین سوبسترا انتخاب شد. با هدف افزایش فعالیت آنزیمی، تریکودرما ریزئی ۲۴۱۴ در معرض تابش پرتو گاما قرار گرفته و جهش داده شد. پس از جهش، ابتدا آزمون کونگو رد انجام شد و دو کلونی انتخاب شدند و سپس میزان فعالیت سلولازی آن‌ها اندازه گیری شد. نتایج نشان داد یکی از کلونی‌های جهش‌یافته به صورت معنی‌داری، دارای فعالیت FPase بیشتر از سویه مادر بوده و جهش تاثیر معنی‌دار داشته است. پایداری سویه جهش‌یافته طی ۹ نسل مورد ارزیابی قرار گرفته و تایید شد.

واژه های کلیدی: تریکودرماریزئی، جهش، سلولاز، فعالیت آنزیمی، تخمیر حالت جامد، ضایعات برنج

*مسئول مکاتبات: hamidy_z@modares.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

۱- مقدمه

مواد سلولزی، فراوان‌ترین منابع کربنی تجدید پذیر در جهان هستند. برای تبدیل سلولز به واحدهای گلوکز باید آبکافت آنزیمی انجام شود وآنزیم مورد استفاده در این فرآیند، سلولاز می‌باشد. سلولاز آنزیمی مرکب شامل اندوگلوکاناز، اگزوگلوکاناز و بتاگلوکوزیداز است، که برای آبکافت نمودن سلولز و تبدیل آن به واحدهای گلوکز عمل می‌کنند (۲۳). این آنزیم سومین آنزیم عمده‌ی صنعتی در جهان می‌باشد (۲۱، ۳۴). در سال‌های اخیر، استفاده از زیست‌توده به عنوان یک منبع مناسب برای تولید آنزیم‌ها، مورد توجه قرار گرفته است که از آن جمله می‌توان از زیست‌توده سلولولایتیک نام برد که برای تجزیه سلولزها مورد استفاده قرار می‌گیرند. از این منبع به عنوان مواد کربنی خنثی یاد می‌شود زیرا مصرف این منابع کربنی منجر به افزایش چشمگیر دی اکسید کربن در هوا نمی‌شود (۲۲). سلولاز ۲۰ درصد از کل بازار آنزیم جهان را به خود اختصاص داده است. در سال‌های اخیر به دلیل پیشرفت زیست‌فناوری توجه زیادی به کاربرد ریزاندامگان های تجزیه‌کننده سلولز شده است و کاربردهای گسترده‌ای در صنایع سوخت زیستی، بازیافت کاغذ، استخراج آب میوه، صنایع آبجوسازی، شوینده‌ها، غذای حیوان، تیمار فاضلاب و صنایع نساجی دارد (۲۵، ۳۲، ۳۴). در حال حاضر سلولاز با روش‌های زیستی با استفاده از تخمیر باکتریایی یا قارچی تولید می‌شود. قارچ‌ها مناسب‌ترین تولیدکننده‌های سلولاز هستند زیرا در مقایسه با باکتری‌ها، یک سامانه سلولازی کامل تولید می‌کنند، لذا سلولاز تجاری اغلب از دو سویه‌ی قارچ Soft rot به نام تریکودرما ریزئی و آسپرژیلوس نیجر و با روش تخمیر حالت جامد تولید می‌شود (۸). از آن جا که یکی از ایرادهای سامانه تخمیر غوطه‌وری، غلظت پایین محصول نهایی می‌باشد، لذا خالص‌سازی محصول ضرورت دارد. افزودن فرایند پایین‌دستی منجر به افزایش هزینه‌های تولید سلولاز می‌شود. با توجه به هزینه‌بر بودن روش تخمیر غوطه‌وری، محققان برای کاهش هزینه‌های تولید و افزایش میزان سلولاز تولیدی، کاربرد سامانه تخمیر حالت جامد را پیشنهاد نمودند (۱۹، ۳۸). این سامانه روش مناسبی برای تولید سلولاز می‌باشد زیرا محیطی مشابه با شرایط طبیعی قارچ ها فراهم نموده و نیز مقدار آنزیم تولیدی را افزایش می‌دهد. پژوهش‌ها برای تولید سلولاز با استفاده از آسپرژیلوس نیجر و تریکودرما ریزئی در سامانه تخمیر حالت جامد با موفقیت گزارش شده است. برای مثال هنگامی که تریکودرما ریزئی روی کاه گندم در سامانه تخمیر حالت جامد کشت داده شد، فعالیت سلولاز IU/g ۲۵۰-۴۳۰ به دست آمد که این مقدار در مقایسه با فعالیت حاصله از روش تخمیر غوطه‌وری (IU/g ۱۶۰-۲۵۰)، حدود ۷۲ درصد افزایش نشان داد (۸). سامانه تخمیر حالت جامد در غیاب آب آزاد به کار می‌رود لذا هزینه‌ی آب‌گیری در فرایند پایین‌دستی به مقدار زیادی کاهش می‌یابد. هزینه تولید در سامانه تخمیر حالت جامد در مقایسه با سامانه تخمیر غوطه‌وری کاهش می‌یابد. این مهم به دلیل مصرف انرژی کم‌تر و کاربرد سوبسترای لیگنوسلولزی مناسب و ارزان‌قیمت می‌باشد. سامانه تخمیر حالت جامد مزایای دیگری نیز دارد، برای مثال غلظت آنزیم بالاتر، بهره‌وری بالاتر تخمیر و نیاز کم‌تر به سترون کردن تجهیزات را می‌توان ذکر نمود. همچنین محلول آنزیمی خامی که از سامانه تخمیر حالت جامد به دست می‌آید را می‌توان مستقیما برای آبکافت سوبسترای لیگنوسلولزی به کار برد (۲۹، ۳۸). انتخاب سوبسترای لیگنوسلولزی از فاکتورهای اساسی در تخمیر حالت جامد می‌باشد. اغلب از ضایعات کشاورزی ارزان‌قیمت به عنوان سوبسترا استفاده می‌شود. کاربرد سبوس برنج ، سبوس گندم، باگاس، پوست سویا ، کاه برنج و چوب ذرت نیز در مطالعات موفقیت‌آمیز بوده است (۱۴، ۱۷،۱۹، ۲۹، ۳۱، ، ۳۶، ۳۹).

در رابطه با تولید سلولاز توسط تریکودرما ریزئی مطالعاتی در سامانه تخمیر حالت جامد به منظور انتخاب سویه و سوبسترای مناسب انجام شده است که به تعدادی از آنها اشاره می‌شود: در سال ۱۹۸۵، تولید سلولاز با استفاده از تریکودرما ریزئی QM9414 و با کاربرد کاه گندم به عنوان سوبسترا انجام شد.

Archive of SID

www.SID.ir

در این مطالعه یک افزایش ۷۲ درصدی در بازده سلولاز تولیدی در سامانه تخمیر حالت جامد در مقایسه با تخمیر غوطه‌وری به دست آمد (۸). در سال ۱۳۸۱ خیاطی و همکاران، تولید سلولاز با استفاده از ضایعات لیگنوسلولزی با روش تخمیر در بستر جامد را انجام دادند. در این پژوهش از قارچ‌های آسپرژیلوس نیجر و تریکودرما ریزئی و سوبستراهای کاه برنج، کاه گندم و خاک اره استفاده شد. در میان دو سویه‌ی میکروبی، آسپرژیوس از توانایی تولید بیشتر برخوردار بود. در میان سوبستراهای مورد استفاده کاه برنج بهترین کارایی را داشت. استفاده از کشت توام سویه‌های قارچی سبب کاهش زمان لازم برای حصول پیشینه‌ی بازدهی شد (۳). در سال ۲۰۰۴، لیمینگ و زوئلیا، با استفاده از چوب ذرت و توسط تریکودرما ریزئی ZU-02 سلولاز تولید نمودند. نتایج نشان داد که فعالیت و بازده سلولاز تولید شده روی چوب ذرت با سلولز خالص قابل مقایسه بود (۲۱). با توجه به این که برنج، دومین گروه بزرگ غلات را تشکیل داده و غذای رایج نیمی از مردم سراسر جهان بوده و تولید جهانی آن طی سال های اخیر به سرعت افزایش یافته است به نحوی که سطح زیر کشت جهانی آن در سال ۲۰۱۴ (مطابق با آخرین آمار ارائه شده از سوی فائو) معادل با ۱۶۲۷۱۶۸۶۲ هکتار و تولید ۷۴۱۴۷۷۷۱۱ تن بوده است و ایران یکی از کشورهای مهم در تولید برنج به شمار می‌رود و این محصول در ایران نیز دومین گروه عمده محصولات کشاورزی بوده و در سال ۱۳۹۳ مطابق با آخرین آمار موجود، سطح زیر کشت آن در ۵۴ هزار هکتار و معادل تولید ۲۳۴۷۲۹۱ تن بوده است و از سوی دیگر، بیشترین مقدار ضایعات در میان غلات مربوط به برنج است، لزوم کاربرد مناسب این محصولات آشکارتر می‌گردد (۱، ۱۰). مهم‌ترین محصولات جانبی کشت و فرآوری برنج، سبوس، پوست و کاه برنج هستند. این ترکیبات پتانسیل کاربرد در غذای دام را دارند اما برای مثال قسمت عمده‌ای از کاه برنج در مزرعه آتش زده می‌شود و منجر به ایجاد مشکلات زیست‌محیطی می‌گردد (۴۰). قیمت ارزان و حجم بالای تولید این ضایعات و نیز پتانسیل قارچ‌ها برای استفاده از ترکیبات سلولزی موجود در آن‌ها، کاربردآن‌ها به عنوان سوبسترا در سامانه‌های تخمیر حالت جامد برای تولید سلولاز، را امکان‌پذیر می‌نماید. از آن‌جا که بهبود بازده تولید آنزیم و افزایش فعالیت آنزیمی تولید شده توسط فرآیند میکروبی موضوعی بسیار حائز اهمیت است، پژوهشگران با روش‌های مختلف سعی در اعمال جهش بر سویه‌های مورد مطالعه داشته‌اند و سپس نتایج حاصل از جهش را مورد بررسی قرار داده‌اند. کاربرد زیست‌فناوری و سامانه تخمیر حالت جامد، به دلیل برخی پیچیدگی‌ها در فرآیند تولید، هنوز در مقیاس صنعتی دارای ابهاماتی است. با توجه به لزوم کاهش هزینه‌های جاری تولید، جهت اجرایی شدن این پژوه‌ها و همچنین ضرورت بهبود تولید آنزیم سلولاز، هدف از این پژوهش، بررسی قابلیت سویه قارچی مورد مطالعه، در کاربرد ضایعات برنج به عنوان سوبسترای ارزان‌قیمت و انتخاب بهترین ترکیب از ضایعات برنج (کاه برنج، پوست برنج، سبوس برنج، ترکیب دو به دو و نیز ترکیب سه تایی این سوبستراها با نسبت یکسان)، در راستای کاهش هزینه‌ها، و نیز انتخاب مناسب‌ترین سویه قارچی تریکودرما ریزئی از میان سه سویه مورد بررسی (تریکودرما ریزئی ۲۴۱۴، ۲۴۱۵ و ۲۴۱۶) بوده است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱-تهیه مواد لازم

سبوس، پوست و کاه برنج از شمال ایران تهیه ، آسیاب شده و با مش سایز ۱۴-۱۸ الک شدند (۳۱). سویه‌های تریکودرما ریزئی ۲۴۱۶، ۲۴۱۵ و ۲۴۱۴ (ATCC ۶۰۷۸۷، ۵۶۷۴۶ و۲۶۹۲۱) از کلکسیون کشت اسپانیا[1] تهیه شدند. مواد مورد نیاز با درجه‌ی شیمیایی از شرکت سیگمای آلمان خریداری شدند.

[1] COLECCION ESPANOLA DE CULTIVOS TIPO

Archive of SID

www.SID.ir

۲-۲-محاسبه ترکیبات شیمیایی سوبستراها

محاسبه میزان رطوبت (استفاده از آون با دمای ۱۰۰C ° تا رسیدن نمونه به وزن ثابت)، خاکستر (سوزاندن ۲ گرم نمونه روی شعله و سپس استفاده از کوره الکتریکی با دمای ۵۰۰ C° تا خاکستر شدن نمون ها)، چربی (روش خشک اندازه‌گیری چربی با استفاده از سوکسله) و پروتئین (روش کلدال) نمونه‌های سبوس برنج،کاه برنج و پوست برنج مطابق روشهای آزمون های اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی انجام شد (۲).

۳-۲-فعال‌سازی و پاساژ دادن سویه‌های تریکودرما ریزئی

آمپول‌های حاوی سویه های ۲۴۱۶، ۲۴۱۵ و ۲۴۱۴ در شرایط اسپتیک، در آب مقطر اسپتیک ریخته شده و چندین ساعت باقی ماندند. سپس از هرکدام از سویه‌ها روی محیط PDA[1] و PCA[2] کشت داده شد و در دماهای ۲۵C° و ۳۷C° (اولی در معرض نور و دومی در تاریکی) گرمخانه‌گذاری شد. پس از طی مدت زمان لازم جهت فعال شدن سویه‌ها و اطمینان از عدم آلودگی آن‌ها، مجددا سویه‌های رشد کرده بر PDA، پاساژ داده شدند.

۴-۲-انتخاب سویه‌ای با بالاترین فعالیت آنزیمی

سویه‌های مورد آزمایش شامل دو سویه‌ی جهش یافته‌ی تریکودرما ریزئی ۲۴۱۴ و تریکودرما ریزئی ۲۴۱۵ و نیز سویه‌ی طبیعی تریکودرما ریزئی ۲۴۱۶روی محیط کشت مخصوص کونگو رد تست، برای انجام آزمون کونگو رد تست، کشت داده شدند. برای کشت قارچ از تلقیح سوسپانسیون اسپوری روی سوبسترا استفاده شد (۱۲، ۱۷، ۱۹). برای انجام آزمون کونگو رد تست ابتدا محیط کونگو رد تهیه شد. این محیط شامل ترکیبات زیر می باشد:

$NaNO_3$ (۳ g L^{-1}); K_2HPO_4 (۱ g L^{-1}); $MgSO_4$ (۰/۵ g L^{-1}); KCl (۰/۵ g L^{-1}); $FeSO_4$ $7H_2O$ (۰/۰۱ mg L^{-1}); agar (۲۰ g L^{-1}); CMC (۵ g L^{-1}).

pH محیط روی ۵ تنظیم شده و محیط پس از استریل درون پلیت ریخته شد. از هر کدام از سویه ها روی محیط PDA کشت داده شده و پس از ۸ روز گرمخانه‌گذاری در دمای ۲۵°C، دایره‌هایی با قطر ۶ میلی متر از محیط کشت جدا شده و در مرکز پلیت‌های حاوی محیط کونگو رد قرار داده شد. پس از ۷روز گرمخانه‌گذاری در دمای۲۵C°، ۱۰ میلی لیتر معرف کونگو رد (۲/۵ گرم در لیتر) به آن افزوده شد. پس از ۱۵ دقیقه با NaCl ۱ مولار شسته و ۲۴ ساعت در یخچال نگه داشته شد. سپس قطر کلونی رشد کرده و قطر هاله شفاف ایجاد شده اندازه‌گیری شد (۱۱).

۵-۲-انتخاب سوبسترای مناسب

در این پژوهش از ضایعات برنج به عنوان سوبسترا استفاده شد. برای انتخاب سوبسترای مناسب از میان ترکیبات موجود، سویه‌ی منتخب در مرحله قبل، روی ۷ ترکیب از سوبستراهای مختلف (سبوس برنج، کاه برنج و پوست برنج، نسبت ۵۰٪ از هر کدام از سوبستراها به صورت دو به دو و ترکیب سه تایی به میزان مساوی از هر سه سوبسترا) کشت داده شد و انتخاب بهترین سوبسترا از طریق اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی (FPase[3]) انجام شد. برای این کار ۵ گرم از سوبستراهای مختلف توزین و درون ارلن دهان گشاد ریخته شد. میزان آب لازم (که در مرحله قبل محاسبه شده بود) به آن ها اضافه و خوب به هم زده شد. سپس سوبسترای مرطوب وارد اتوکلاو شد و در دمای C° ۱۲۱ به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد تا علاوه بر اسپتیک شدن، به عبارتی پیش تیمار حرارتی تحت فشار بخار نیز بر آن انجام گیرد و شرایط برای رشد قارچ فراهم‌تر گردد. پس از آن تلقیح با ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون اسپوری با غلظت $۲/۵\times۱۰^{۷}$ اسپور در میلی‌لیتر انجام شده و پس از مخلوط شدن، به مدت ۶ روز در انکوباتور با دمای C° ۲۵ قرار گرفتند (۱۹، ۳۱).

[1] Potate Dextrose Agar
[2] Plate Count Agar
[3] Filter Paperase (Filter Paper Assay)

Archive of SID

www.SID.ir

۲-۶-استخراج و اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی سلولاز تولیدی

ابتدا وزن توده تخمیر شده محاسبه شده و ۵ برابر وزن آن آب مقطر به ارلن ها اضافه شد و سپس روی دستگاه همزن مغناطیسی (MR 3001 k Heidolph Germany) با دور ۷۰۰ دور در دقیقه[1] به مدت ۳۰ دقیقه به هم زده شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دور g ۱۰۰۰۰سانتریفیوژ شده (3-30K sigma Germany) و مایع شفاف رویی به عنوان آنزیم استخراج شده، جداسازی شد (۱۹). برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی FPAse محلول آنزیمی استخراج شده، از معرف دی نیترو سالیسیلیک اسید (DNS) استفاده شد (۱۲، ۲۶). نوار باریک کاغذ صافی واتمن (حدود mg ۵۰) را در لوله آزمایش گذاشته و mL ۱ محلول بافر سیترات mM ۵۰ به همراه mL ۰/۵ محلول آنزیمی استخراج شده به آن افزوده شد. نمونه کنترل آنزیم شامل mL ۱ بافر سیترات mM ۵۰ و mL ۰/۵ محلول آنزیمی بود. نمونه کنترل سوبسترا حاوی mL ۱/۵ بافر سیترات mM ۵۰ و کاغذ صافی واتمن بود و نمونه شاهد شامل mL ۱/۵ بافر سیترات mM ۵۰ در نظر گرفته شد. نمونه‌ها ۱ ساعت در دمای °۵۰C قرار گرفته و سپس mL ۳ معرف DNS به آن‌ها افزوده شده و به مدت ۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفتند. سپس در حمام آب و یخ خنک شده و با اسپکتروفوتومتر (Algilent Technologies Cary 60 UV-vis) جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت شد. پس از محاسبه غلظت آنزیم(mg/0.5 mL)، محاسبه فعالیت آنزیمی با استفاده از فرمول انجام شد:

$$\text{فعالیت آنزیمی} = A \times (a + b)/\ 0.5 \times C \times t \times 0.18$$

که در آن A غلظت آنزیم محاسبه شده از منحنی استاندارد، a میزان آب سوبسترا، b میزان آب افزوده شده طی استخراج، C وزن ماده خشک سوبسترا و t زمان ۶۰ دقیقه می باشد.

۲-۷-اعمال جهش بر سویه منتخب

در ابتدا سویه‌ی قارچی منتخب از آزمون کونگو رد تست، بر روی PDA کشت داده شده و پس از گذراندن دروه گرمخانه‌گذاری، سوسپانسیون اسپوری ($۲/۵\times۱۰^{۷}$ اسپور در میلی لیتر) از آن تهیه شد. مقدار ۵ میلی لیتر از سوسپانسیون اسپوری در ۳ لوله درپیچ دار اسپتیک ریخته شد. پس از آن لوله‌ها در سازمان انرژی اتمی، تحت تابش پرتوی گامای کبالت ۶۰ با مقدار دوز ۸۰۰ گری قرار گرفتند.

۲-۸-غربال کردن جهش یافته‌های تریکودرما ریزئی ۲۴۱۴

پس از اعمال جهش، ابتدا رقت‌های سریالی از سوسپانسیون جهش یافته، تهیه شده و بر روی محیط PDA کشت داده شدند. هدف از این کار بدست آوردن کلونی هایی بود که به لحاظ ظاهری قابل تفکیک از یکدیگر باشند. پس از گذشت مدت زمان ۳ روز در گرمخانه در دمای °C ۲۵ ، کلونی‌های بزرگ‌تر و با ظاهر متفاوت، انتخاب شده و خالص‌سازی شدند و مجددا بر روی محیط PDA کشت داده شدند. در مرحله اول پس از کشت کلونی‌های بزرگ‌تر، آزمون کونگو رد انجام شد. بر اساس نتایج آن آزمون، سه سویه‌ای که نسبت قطر هاله به کلونی بزرگتری نسبت به قبل از جهش داشتند، انتخاب شدند (۲۰).

۲-۹-اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی پس از اعمال جهش

کلونی‌های انتخاب شده از مرحله غربالگری و آزمون کونگو رد، ابتدا بر روی محیط PDA کشت داده شدند و در دمای °۲۵C به مدت ۸ روز گرمخانه‌گذاری شدند. سپس برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی این جهش یافته‌ها، سوسپانسیون اسپوری با غلظت $۲/۵\times۱۰^{۷}$ اسپور در میلی‌لیتر تهیه شد و بر روی سوبسترای مورد نظر کشت داده شدند و پس از طی مدت زمان ۶ روز گرمخانه‌گذاری در دمای °C ۲۵ ، آنزیم تولیدی از آن‌ها استخراج و فعالیت آنزیمی اندازه‌گیری شد.

[1] RPM

Archive of SID

www.SID.ir

۱۰-۲-بررسی پایداری سویه جهش‌یافته

پس از انتخاب سویه جهش‌یافته برتر (که دارای فعالیت آنزیمی بیشتری نسبت به سویه مادر بود)، آزمون پایداری سویه انجام شد. برای اطمینان از پایداری سویه‌ی جهش‌یافته، سویه‌ی مورد نظر طی ۹ نسل بر محیط کشت جامد (سوبسترای بهینه) کشت داده شده و میزان فعالیت آنزیمی (FPase) سلولاز تولیدی اندازه‌گیری شد. برای افزایش دقت و اطمینان از پایداری سویه جهش‌یافته در محیط کشت تخمیر حالت جامد، ابتدا وزن مشخصی از سوبسترای بهینه در ارلن ریخته شده و با سوسپانسیون اسپوری با غلظت $۲/۵\times۱۰^{۷}$ اسپور در میلی‌لیتر تلقیح شد. پس از آن به مدت ۶ روز در انکوباتور با دمای ۲۵ °C قرار گرفت. پس از طی زمان گرمخانه‌گذاری، ابتدا کشت نسل دوم با تلقیح حجم مشخصی از درون ارلن نسل اول انجام گرفت. بدین صورت که درون ارلن دوم وزن مشخصی از سوبسترای جامد تازه قرار داده شد و پس از اسپتیک شدن با حجم مشخصی از نسل اول تلقیح شد و به مدت ۶ روز در همان شرایط گرمخانه‌گذاری شد. سپس آنزیم تولیدی نسل اول استخراج شده و فعالیت آنزیمی آن اندازه‌گیری شد. در ادامه، نسل سوم با استفاده از سوبسترای جامد تازه و تلقیح با حجم معین از نسل دوم انجام گرفته و سپس آنزیم تولیدی نسل دوم استخراج شد. انجام این روند تا ۹ نسل تکرار شد (۲۰).

۱۱-۲-تجزیه و تحلیل داده‌ها

تمام آزمایشها در سه تکرار انجام شده و جهت مطالعه وجود اختلاف آماری معنی‌دار بین تیمارهای مختلف، از تجزیه واریانس (ANOVA) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد. در تمام مراحل تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS۱۸ صورت گرفت.

۳- نتایج و بحث

اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی سوبستراها انجام شده و نتایج در جدول ۱ آورده شده است. در این رابطه باید گفت نتایج به دست آمده با نتایج گزارش شده توسط سایر پژوهشگران (۵، ۱۸) قابل مقایسه است که البته تفاوت‌های موجود، طبیعی و به دلیل تفاوت در نوع برنج مورد استفاده در تولید ضایعات کاربردی، زمان برداشت و شرایط محیطی می‌باشد.

جدول ۱ - ترکیبات شیمیایی سوبستراهای کاه برنج، سبوس برنج و پوست برنج

نمونه	(٪) رطوبت	خاکستر	(٪) چربی
کاه برنج	۴/۲۹۷ ± ۰/۲۲۳ [a]	۱۲/۷۱ ± ۰/۰۷۱ [a]	۰/۳۹ ± ۰/۱۷۷ [a]
پوست برنج	۷/۹۶۷ ± ۰/۳۳۵ [c]	۱۴/۵۳ ۰± [c]	۳/۵۷ ± ۰/۲۲۶ [b]
سبوس برنج	۶/۷۱۲ ± ۰/۰۲۲ [b]	۱۴/۵۱ ± ۰/۰۳۵ [b]	۱۰/۷۱ ± ۰/۰۳۵ [c]

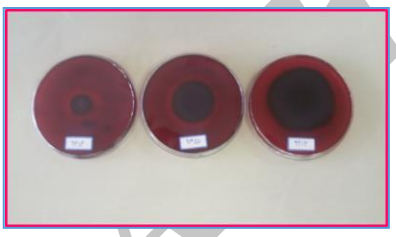
در هر ستون میانگین های دارای حروف متفاوت، معنی داری در سطح ۰/۰۵ ≥ α، را نشان می دهند.

اندازه‌گیری میزان رطوبت سوبستراها برای محاسبه ی میزان رطوبت لازم در سامانه تخمیر حالت جامد، مورد استفاده قرار گرفت. تعیین دقیق میزان رطوبت لازم برای سامانه تخمیر حالت جامد اهمیت بسیار دارد، چنانچه میزان رطوبت کم‌تر از

Archive of SID

www.SID.ir

حد لازم باشد، رشد قارچ در حد مطلوب نبوده و دسترسی قارچ‌ها به مواد مغذی کاهش می‌یابد و در نتیجه محصول مورد نظر با راندمان کم تولید می‌شود، اگر میزان رطوبت بیشتر از حد لازم باشد، سبب پر شدن خلل و فرج شده و فضای اکسیژن را اشباع کرده و در نتیجه قارچ با کمبود هوا مواجه می‌شود. لذا تعیین میزان دقیق رطوبت در شروع کار اهمیت خاص دارد (۲۷، ۳۵). برای محاسبه میزان رطوبت لازم برای سوبستراها، در ابتدا با توجه به نتایج سایر پژوهش‌ها (۱۹) مقادیر اولیه‌ای مناسب تشخیص داده شد، اما پس از طی زمان گرمخانه‌گذاری، آب محیط کاهش یافت و مجددا میزان رطوبت لازم محاسبه شد. در نهایت مقادیر رطوبت برای کاه، پوست، سبوس، سبوس-پوست، کاه-سبوس، کاه-پوست و هر سه سوبسترا به ترتیب ۸۰، ۵۵، ۵۵، ۶۵، ۶۵، ۵۵٪ مطلوب تشخیص داده شد. میزان رطوبت لازم برای کاه برنج، به دلیل توانایی بیشتر این سوبسترا در جذب آب، بیشتر بود در حالی که سبوس و پوست برنج شرایط مشابهی داشتند. در ترکیبات دوتایی که کاه برنج وجود داشت نیز میزان جذب آب بیشتر شده و درصد بالاتری رطوبت مورد نیاز بود. در پژوهش‌های مشابه انجام شده و با کاربرد سوبستراهای گوناگون، میزان رطوبت لازم بسته به نوع سوبسترای لیگنوسلولزی مورد استفاده، متفاوت است. تخلخل و سطح مخصوص ذرات جامد، کارایی نفوذ هوا و ظرفیت نگهداری آب را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۳۸). در سال ۲۰۰۷، لطیفیان و همکاران به ارزیابی شرایط کشت برای تولید سلولاز با استفاده از دو سویه‌ی جهش یافته‌ی Trichoderma reesei در سامانه تخمیر حالت جامد پرداختند. سوبسترای مورد استفاده آن‌ها، سبوس برنج بود و میزان رطوبت ۷۰-۵۵٪ مناسب گزارش شد که با نتایج به دست آمده در این پژوهش مطابقت دارد (۱۹). در سال ۲۰۱۲، مایوریا و همکاران، بهینه‌سازی شرایط سامانه تخمیر حالت جامد برای تولید سلولاز با استفاده از Trichoderma reesei NCIM992 را انجام دادند. سوبسترای مورد استفاده کاه برنج، باگاس نیشکر و سبوس گندم بود و میزان رطوبت ۷۰ ٪ بهینه گزارش شد (۲۴). در سال ۲۰۱۰، بریجوانی و همکاران با استفاده از سامانه تخمیر حالت جامد و مخلوط کشت Trichoderma reesei و Aspergillus oryzae به تولید سلولاز پرداختند. در این مطالعه از مخلوط پوست لوبیای سویا و سبوس گندم (۴: ۱) به عنوان سوبسترا استفاده شد و میزان رطوبت بهینه ۷۰ ٪ بود که اختلاف با نتایج این پژوهش، به دلیل تفاوت سوبسترا و آب پیوندی می‌باشد (۱۹، ۲۴، ۲۷). با توجه به اینکه انتخاب سوبسترا و سویه‌ی قارچی مناسب، از مهم‌ترین فاکتورها در سامانه تخمیر حالت جامد می‌باشد (۳۵)، در ادامه‌ی پژوهش با استفاده از آزمون کونگو رد، سویه‌ی مناسب‌تر انتخاب شد. نتایج در شکل ۱ نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل مشخص است با وجودی که سویه‌ی تریکودرما ریزئی ۲۴۱۴ قطر کلونی کمتری داشته، اما نسبت قطر هاله‌ی شفاف تشکیل شده به قطر کلونی از دو سویه‌ی دیگر بیشتر است. قطر هاله شفاف و کلونی تشکیل شده در محیط کونگو رد اندازه‌گیری شده و در جدول ۲ نتایج مربوط به این آزمون، نشان داده شده است.



شکل ۱ - نتایج آزمون کونگو رد برای سه سویه قارچی مختلف (از راست به چپ به ترتیب سویه‌های تریکودرما ریزئی ۲۴۱۶، ۲۴۱۵ و ۲۴۱۴)

بر اساس نتایج حاصله از این آزمون، تریکودرما ریزئی ۲۴۱۴ بالاترین فعالیت سلولازی را داشته و برای ادامه پژوهش مورد استفاده قرار گرفت. زیر سویه‌های مختلف از تریکودرما

Archive of SID

www.SID.ir

ریزئی توسط پژوهشگران برای تولید سلولاز مورد استفاده قرار گرفته‌اند در پژوهش‌های مختلف، از زیرسویه‌های تریکودرما ریزئی QM9414، تریکودرما ریزئی ZU-02 ، تریکودرما ریزئی RUTC30، تریکودرما ریزئی MCG77 ، تریکودرما ریزئی HY07، تریکودرما ریزئی PTCC 5142 و تریکودرما ریزئی NCIM992 استفاده شده است (۴، ۸، ۱۳، ۱۹، ۲۱، ۳۶ ، ۴۱).

جدول ۲ - نتایج آزمون کونگو رد

سویه	قطر کلونی (cm)	قطر هاله شفاف (cm)	قطر هاله شفاف / قطر کلونی
۲۴۱۴	۲/۵	۳/۷۵	$۱/۵۳ \pm ۰/۰۸۵^{c}$
۲۴۱۵	۳/۹۷	۵	$۱/۲۶ \pm ۰/۰۳۶^{b}$
۲۴۱۶	۵/۳۵	۶/۰۵	$۱/۱۳ \pm ۰/۰۲^{a}$

میانگین‌های دارای حروف متفاوت، معنی‌داری در سطح $\alpha \leq ۰/۰۵$، را نشان می‌دهند.

جدول ۳، فعالیت آنزیمی حاصل از کشت سویه‌ی تریکودرما ریزئی ۲۴۱۴ بر سوبستراهای مختلف را نشان می‌دهد. بر اساس نتایج حاصله، هنگامی که سویه‌ی مورد نظر بر روی مخلوطی از هر سه سوبسترای کاه برنج، سبوس برنج و پوست برنج (به نسبت های مساوی از هر کدام) کشت داده شد، بیشترین فعالیت آنزیمی حاصل شده است. به نظرمی رسد حضور کاه برنج در سوبسترا به دلیل استحکام بیشتر و ساختار فیزیکی مستحکم‌تر این ماده، ساختار مناسب‌تری ایجاد کرده و از فشرده شدن مجموعه سوبسترا جلوگیری می‌نماید که این مهم منجر به حفظ خلل و فرج موجود و در نتیجه وجود میزان کافی هوا، برای استفاده‌ی قارچ مورد استفاده و رشد بهتر قارچ و تولید بیشتر آنزیم سلولاز می‌گردد. همچنین توانایی کاه برنج، برای افزایش جذب آب، منجر به نگهداری آب بیشتر در سامانه شده و این امر نیز به رشد سوبسترا کمک می‌نماید. زیرا به تدریج و در طی زمان رشد، میزان رطوبت مورد نیاز را در اختیار میکروارگانیزم قرار می‌دهد و این مهم به افزایش بازده تولید آنزیم می‌انجامد. از سوی دیگر چون خود کاه برنج میزان ترکیبات مغذی کمتری نسبت به سبوس و پوست برنج دارد، لذا ترکیبی از هر سه سوبسترا منجر به تلفیق مزایای هر کدام شده و بیشترین میزان فعالیت آنزیمی را موجب شده است. مروری بر پژوهش‌های سایر محققان نشان داد که با استفاده از سوبستراهای گوناگون و کشت قارچ تریکودرما ریزئی، مقادیر مختلفی از فعالیت آنزیمی به دست آمده است. با استفاده از سبوس گندم- چوب ذرت مقدار فعالیت آنزیمی ۰/۱-۷/۱ U/g ds، ترکیب کاه گندم، کاه برنج، سبوس گندم، چوب ذرت: ۲/۲ U/g ds، سبوس برنج در مطالعات مختلف ۱۳/۵۷ U/g ds و ۱۱/۶۴۸ و ۳/۲-۰/۳۲، پوست سویا و سبوس گندم ۱۰/۷ U/g ds، سبوس گندم ۳/۸ U/g ds- ۰/۶۰۵ و پوست سویا ۲۹/۱ U/g ds (۷، ۱۴، ۱۹، ۲۹، ۳۱، ۳۲، ۳۳، ۳۴) گزارش شده است. به دلیل تفاوت در نوع سوبسترای به کار رفته در پژوهش‌ها، نتایج مختلفی گزارش شده است که تا حدودی با نتایج این پژوهش مطابقت دارد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳ – فعالیت آنزیمی حاصل از کشت تریکودرما ریزئی ۲۴۱۴ بر سوبستراهای مختلف (سبوس برنج، پوست برنج، کاه برنج و ترکیبات دوتایی و سه تایی این سوبستراها)

نمونه	فعالیت آنزیمی (u/g dry substrate)
سبوس	۰/۰۳۲۵ ۰±۰/۰۱ [a]
پوست	۰/۳۲۵ ± ۰/۰۴ [b]
سبوس و پوست	۰/۵۲۰ ۰±۰/۰۱ [c]
پوست و کاه	۰/۵۵۵ ± ۰/۰۵ [c,d]
کاه	۰/۶۰۰ ۰±۰/۰۱ [d,e]
سبوس و کاه	۰/۶۲۰ ۰±۰/۰۱ [e]
هر سه	۰/۷۲۰ ± ۰/۰۱ [f]

میانگین‌های دارای حروف متفاوت، معنی‌داری در سطح $\alpha \leq$ ۰/۰۵، را نشان می‌دهند.

در جدول ۴ نتایج آزمون کونگو رد برای کلونی‌ها پس از جهش، آورده شده است. بر اساس نتایج این آزمون سه کلونی که دارای بالاترین قطر هاله به کلونی بوده و نتایج آزمون کونگو رد آن ها به صورت معنی‌دار بیشتر از نتایج این آزمون برای سویه مادر قبل از جهش بود، انتخاب شده و فعالیت آنزیمی آن‌ها اندازه‌گیری شد. بنابراین جهش یافته‌های تریکودرما ریزئی ۲۴۱۴ شماره ۳، ۵ و ۶ انتخاب شدند و در مرحله‌ی بعد بر روی ترکیب هر سه سوبسترا کشت داده شده و میزان فعالیت آنزیمی آن‌ها اندازه‌گیری شده و نتایج با سویه‌ی مادر قبل از جهش مقایسه شد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۴ – نتایج آزمون کونگو رد برای سویه‌های جهش‌یافته تریکودرما ریزئی ۲۴۱۴ و سویه مادر

نسبت قطر کلونی/قطر هاله	شماره گذاری
±۳۶/۱ ۰/۱ ^{a,b}	سویه مادر ۲۴۱۴
۱/۰±۲۵/۰۷ ^{a}	جهش یافته۱
۱/۲۵ ۰±/۰۶ ^{a}	جهش یافته۲
۲/۰±۰۵/۳۵ ^{d}	جهش یافته۳
۱/۵۵ ۰±/۵۷ ^{b,c}	جهش یافته۴
۱/۰±۷/۵ ^{c}	جهش یافته۵
۰±۲/۲۸ ^{d}	جهش یافته۶

میانگین‌های دارای حروف متفاوت، معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ ≥ α، را نشان می‌دهند.

همان طور که در جدول ۵ نشان داده شده است، مقایسه‌ی میان میزان فعالیت آنزیمی حاصل از کشت سویه مادر و جهش یافته‌ها بر ترکیبی از مخلوط سه سوبسترا مشخص کرد که جهش‌یافته ۵، به صورت معنی‌داری دارای فعالیت آنزیمی بیشتر نسبت به سویه مادر (قبل از جهش) بوده است. بدین معنی که تاباندن اشعه گاما بر تریکودرما ریزئی ۲۴۱۴ به صورت معنی‌داری منجر به افزایش فعالیت آنزیمی شده است و به عبارت دیگر جهش موفقیت‌آمیز بوده است. لذا در ادامه، برای حصول اطمینان از ثبات این جهش، پایداری سویه جهش یافته طی ۹ نسل پیاپی مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده از آزمون‌ها، پایداری سویه جهش‌یافته مورد تایید می‌باشد. در پژوهش‌های پیشین نیز اعمال جهش بر سویه‌های قارچی نتایج موفقیت‌آمیزی به دست داده است. Li و همکاران (۲۰۱۰) و Xu و همکاران (۲۰۱۱)، با کاربرد عوامل جهش‌زای فیزیکی مانند اشعه ماورای بنفش، امواج ماکروویو و اشعه های یونیزه کننده و Bhargavi و Singara (۲۰۱۰) با استفاده از مواد شیمیایی جهش‌زا مانند نیتروزوگوانیدین، اتیل متیل سولفونات و دی اتیل سولفونات، اقدام به اصلاح سویه نموده اند و تولید سویه‌های بهبودیافته برای تولید سلولاز موفقیت‌آمیز بوده است (۱۵،۶، ۲۰، ۳۸). در ادامه می‌توان به تولید سلولاز با استفاده از تریکودرما ویریده اشاره نمود که با اعمال جهش از طریق اشعه ماورای بنفش و امواج مایکروویو و سپس کاربرد اتیل متان سولفونات، بازده تولید آنزیم افزایش یافت (۹). همچنین کاربرد تریکودرما اتروویریده توسط Kavocs و همکاران (۲۰۰۸) و اعمال جهش با استفاده از متیل نیترو نیتروزوگوانیدین و سپس قرار دادن در معرض اشعه ماورای بنفش منجر به افزایش تولید آنزیم سلولاز شد. در این پژوهش سویه‌های جهش یافته‌ی تریکودرما اتروویریده سریع‌تر از سویه مادر رشد کرده و مقادیر بالاتری از سلولازهای خارج سلولی و بتا گلوکوزیداز تولید نمودند (۱۶).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۵ - فعالیت آنزیمی حاصل از کشت سویه‌های مادر و جهش‌یافته

فعالیت آنزیمی (u/g dry substrate)	سویه قارچی
۰/۰±۷۵۹/۱ [b]	تریکودرما ریزئی ۲۴۱۴ قبل از جهش
۰/۰±۶۰۳/۰۲ [a]	تریکودرما ریزئی ۲۴۱۴ جهش یافته۶
۰/۰±۹۸۰/۰۲ [c]	تریکودرما ریزئی ۲۴۱۴ جهش یافته۵
۰/۰±۵۳۵/۰۲ [a]	تریکودرما ریزئی ۲۴۱۴ جهش یافته۳

میانگین‌های دارای حروف متفاوت در سطح ۰۵/۰ ≥ α، دارای اختلاف معنی‌دار هستند.

۴- نتیجه‌گیری

از آنجا که مواد سلولزی، فراوان ترین منابع کربنی تجدید پذیر در جهان هستند و نیاز روزافزون به کاربرد این مواد به عنوان مواد اولیه با اهداف مختلف احساس می‌شود و نیز سلولاز، آنزیم مورد استفاده برای آبکافت سلولز، می‌باشد و نظر به اهمیت کاربرد زیست‌فناوری در تولید سلولاز و توجه ویژه‌ای که اخیرا به دلیل مزایای مخصوص و منحصر به فرد سامانه تخمیر حالت جامد، به سمت آن معطوف شده است، کاربرد سامانه تخمیر حالت جامد برای تولید سلولاز مجال بررسی دارد. از سوی دیگر لزوم کاهش هزینه‌های تولید در این سامانه، کاربرد سوبستراهای ارزان‌قیمت مانند ضایعات کشاورزی و نیز بهبود سویه با هدف افزایش راندمان تولید آنزیم را می‌طلبد.

۵-منابع

۱. احمدی، ک.، قلی زاده، ح.، عباد زاده، ح.، حسین پور، ر.، حاتمی، ف.، فضلی، ل.، کاظمیان، آ. و رفیعی، م. (۱۳۹۴). آمارنامه کشاورزی سال ۱۳۹۳. چاپ اول. وزارت جهاد کشاورزی، معاونت برنامه ریزی و اقتصادی، مرکز فناوری اطلاعات و ارتباطات. ص ۱۶-۱۹.

۲. حسینی، ز. (۱۳۸۵). روش‌های متداول در تجزیه‌ی مواد غذایی. شیراز. دانشگاه شیراز.

۳. خیاطی، غ.، انوری، م. و فاطمی، م. (۱۳۸۱). تولید آنزیم سلولاز از ضایعات لیگنوسلولزی به کمک تکنیک تخمیر در بستر جامد. مجله علوم پایه دانشگاه الزهرا، جلد ۱۵، شماره ۲، ص ۲۹ -۳۵.

۴. قربانی تنکابنی، ا، خیاطی، غ. و نصرالهی، آ. (۱۳۹۱). استفاده از پسماند کشاورزی توسط قارچ تریکودرما ریسئی به منظور افزایش تولید آنزیم سلولاز. مجله علمی- پژوهشی زیست‌فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی، ۴ (۱۵)، ۳۹-۴۴.

۵. کشاورز هدایتی، ع. ا.، اعلمی، م.، معتمدزادگان، ع.، مقصودلو، ی.، قربانی، م. و دارائی گرمه خانی، ا. (۱۳۹۰). بررسی ترکیب شیمیایی و خواص فیزیکوشیمیایی سبوس برنج ایرانی. مجلّه ی علمی پژوهشی علوم و فنّاوری غذایی، سال چهارم، شماره ی ۳، ۱-۷.

1. Bhargavi. M. and Singara, C. (2010). Influence of physical and chemical mutagens on dye decolorizing Mucormucedo. Afr. J. Microbiol Res Sept., 4(17), 1808-1813.
2. Brijwani, Kh., Singh Oberoi, H. and Vadlani, P. V. (2010). Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-

Archive of SID

www.SID.ir

culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. Process Biochem., 45, 120-128.
3. Chahal, D. S. (1985). Solid-state fermentation with Trichoderma reesei for cellulose production. Appl Environ Microbiol., 49, 205-210.
4. Elakkiya, P. and Muralikrishnan, V. (2014). Cellulase production and purification of mutant strain Trichoderma viride. Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci., 3(9), 720-727.
5. FAO, 2014. Rice market monitor.Florencio, C., Couri, S. and Sanchez Farinas, C. (2012). Correlation between agar alate screening and Solid-State Fermentation for the prediction of cellulase production by Trichoderma strains. Enzyme Res., 1-7.
6. Ghose, T.K., (1987). Measurements of cellulase activities. Pure Appl. Chem., 59: 257–268.
7. Guowei, Sh., Man, H., Shikai, W. and He, Ch. (2011). Effect of some factors on Production of cellulase by Trichoderma reesei HY07 Procedia. Environ Sci., 8, 357-361.
8. Jha, K., Khare, S. K. and Gandhi, A. P. (1995). Solid state fermentation of soyhull for the production of cellulase. Bioresour. Technol., 54, 321-322.
9. Kotchoni, O.S. and Shonukan, O.O. (2002). Regulatory mutations affecting the synthesis of cellulose in B. pumilus. World J. Microbiol. Biotechnol., 18, 487-491.
10. Kovas, K., Megyeri, L., Szakacs, G., Kubicek, Ch. P., Galbe, M., and Zacchi, G. (2008). Trichoderma atroviride mutants with enhanced production of cellulase and β-glucosidase on pretreated willow. Enzyme Microb. Technol., 43 (1), 48-55.
11. Kuar, P. P., Arneja, J. S. and Singh, J. (1998). Enzymic Hydrolysis of Rice Straw by Crude Cellulase from Trichoderma reesei. Bioresour. Technol., 66, 267-269.
12. Kumar, A., Mohanta, K., KumarT D. and Parkash, O. (2012). Properties and industrial applications of rice husk: IJESE., 2(10), 86-90.
13. Latifian, M., Hamidi-Esfahani, Z. and Barzegar, M. (2007). Evaluation of culture conditions for cellulase production by two Trichoderma reesei mutants under solid-state fermentation conditions. Bioresour. Technol., 98, 3634-3637.
14. Li, X.H., Yang, J., Roy, B., Park, E.Y. and Jiang, L.J. (2010). Enhanced cellulase production of the Trichoderma viride mutated by microwave and ultraviolet. J. Microbiol. Res., 165 (3), 190-198.
15. Liming, X. and Xueliang, Sh. (2004). High-yield cellulase production by Trichoderma reesei ZU-02 on corn cob residue. Bioresour. Technol., 91, 259-262.
16. Lin, Y., Tanaka, S. (2006). Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. Appl. Microbiol. Biotechnol., 69 (6), 627–42.
17. Ma, L., Li, Ch., Yang, Zh., Jia, W., Zhang, D. and Chen, Sh. (2013). Kinetic studies on batch cultivation of Trichoderma reesei and application to enhance cellulase production by fed-batch fermentation. J. Biotechnol., 166, 192-197.
18. Maurya, D. P., Singh, D., Pratap, D. and Maurya, J.P. (2012). Optimization of solid state fermentation condition for the production of cellulase by Trichoderma reesei. J. Env. Biol., 33, 5-8.
19. Miettinen-Oinonen, A., Suominen, P. Enhanced production of Trichoderma reesei endoglucanases and use of the new cellulose preparations in producing the stone- washed effect on denimfabric. (2002). Appl. Environ. Microbiol., 68 (8), 3956–64.
20. Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem., 31, 426-429.
21. Pandey, A. (2003). Solid state fermentation. Biochem. Eng. J., 13 (2-3), 81-84.

Archive of SID

www.SID.ir

22. Pandey, S., Srivastava, M., Shahid, M., Kumar, V., Singh, A., Trivedi, S. et al. (2015). Trichoderma species cellulases produced by solid state fermentation. J Data Mining Genomics Proteomics., 6(2), 1-4.
23. Panedy, A., Selvakumar, P., Soccol, C., R. and Nigam, P. (1999).Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. Curr. Sci., 77(1), 149-162.
24. Raghuwanshi, S., Deswal, D., Karp, M. and Kuhad, R. Ch. (2014). Bioprocessing of enhanced cellulase production from a mutant of Trichoderma asperellum RCK2011 and its application in hydrolysis of cellulose. Fuel 124: 183- 189.
25. Rocky-Salimi, K. and Hamidi-Esfahani, Z. (2010). Evaluation of the effect of particle size, aeration rate and harvest time on the production of cellulase by Trichoderma reesei QM9414 using response surface methodology. Food Bioprod. Process., 88, 61-66.
26. Singh Dhillon, G., Singh Oberoi, H., Kaur, S., Bansal, s. and Kaur Brar, S. (2011). Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. Ind. Crops. Prod., 34, 1160-1167.
27. Singhania, R. R., Sukumaran, R. K. and Pandey, A. (2007). Improved cellulase production by Trichoderma reesei RUT C30 under SSF through process optimization. Appl. Biochem. Biotechnol., 142(1), 60-70.
28. Singhania, R. R., Sukumaran, R. K., Patel, A. K., Larroche, Ch. And Pandey, A. (2010). Advancement and comparative profiles in the technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. Enzyme. Microb. Technol., 46, 541-549.
29. Thomas, L., Larroche, Ch., and Pandey, A. (2013). Current developments in solid-state fermentation. Biochem. Eng. J., 81, 146-161.
30. Xia, L. and Cen, P. (1999). Cellulase production by solid state fermentation on lignocellulosic waste from the xylose industry. Process Biochem., 34, 909-912.
31. Xu, F., Wang, J., Chen, S., Qin, W., Yu, Z., Zhao, H., Xing, X. and Li, H. (2011). Strain improvement for enhanced production of cellulase in Trichoderma viride. Appl. Biochem. Microbiol., 47 (1), 53-58.
32. Yoon, L. W., Ang, T. N., Ngoh, G. Ch. And Chua, A. S. M. (2014). Fungal solid state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. Biomass Bioenerg., 67, 319-338.
33. Zhang, Q. and Cai, W. (2008). Enzymatic hydrolysis of alkali-pretreated rice straw by Trichoderma reesei ZM4-F3. Biomass Bioenerg., 32, 1130-1135.
34. Zhang, Y., Ghaly, A. E. and Li, B. (2012). Physical properties of rice residues as affected by variety and climatic and cultivation conditions in three continents. Am. J. Appl. Sci., 9 (11), 1757-1768.
35. Zhiyou, W., Wei, L. and Shulin, Ch. (2005). Production of cellulase by Trichoderma Reesei from dairy manure. Bioresour. Technol., 96 (4), 491-499.

Archive of SID

www.SID.ir