Archive of SID

در
زراعت و باغبانی شماره ۷۸، بهار ۱۳۸۷
پژوهش و سازندگی

بررسی شرایط بهینه تولید آنزیم بتاگلوکوزیداز توسط قارچ *Trichoderma reesei* (PTCC5142)

• **فرهاد قجقی**
گروه زیست شناسی،دانشکده علوم، دانشگاه رازی
• **محمدرضا زمانی**
پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری
• **مصطفی مطلبی**
پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری
• **صابر زهری**
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی
تاریخ دریافت: بهمن‌ماه ۱۳۸۳ تاریخ پذیرش: مردادماه ۱۳۸۶
Email: mrzamani97@yahoo.com

چکیده

بتاگلوکوزیداز از آنزیم‌های سلولازی میباشد که سلوبیوز و سلوالیگوساکاریدهای با زنجیره کوتاه را به گلوکز تجزیه می‌نماید. در این تحقیق از ۳۰ جدایه تریکودرما که اکثراً بومی ایران بودند جهت مطالعه میزان تولید این آنزیم استفاده گردید. با توجه به نقش عوامل مختلفی نظیر زمان کشت، دما، pH نوع منبع کربن و عوامل القاء کننده بر میزان تولید آنزیمهای سلولازی توسط قارچها، شرایط بهینه تولید آنزیم بتاگلوکوزیداز، در جدایه *Trichoderma reesei* (PTCC) ۵۱۴۲ که در تحقیقات قبلی مشخص شده بود از فعال‌ترین جدایه های تولید کننده آنزیم‌های سلولازی می‌باشد) مطالعه گردید. بدین منظور از محیط کشت مندلز حاوی یکی از منابع کربنی CMC، Avicel ویا کاغذ صافی، با pH های ۴، ۵، ۶ و ۷، لاکتوز و سلوبیوز به عنوان عوامل القاء کننده در طول ۱۴ روز کشت در دماهای ۲۵، ۲۹ و ۳۲ درجه سانتی گراد استفاده گردید. نتایج بدست آمده نشان داد که شرایط بهینه برای تولید آنزیم بتا گلوکوزیداز در محیط کشت، دمای ۲۸ درجه سانتی گراد، pH= ۵، CMC به عنوان منبع کربن، لاکتوز به عنوان عامل القاء کننده و روز هفتم کشت میباشد. این شرایط بهینه جهت تولید آنزیم بتاگلوکوزیداز در ۳۰ جدایه تریکودرما مورد استفاده قرار گرفت و مقایسه نتایج بدست آمده نشان داد که جدایه *T. reesei* (PTCC 5142) دارای بیشترین فعالیت ویژه آنزیمی (۰/۴۵ U/mg) می‌باشد. همچنین جهت شناسایی ژن کد کننده آنزیم بتاگلوکزیداز استخراج DNA ژنومی به روش CTAB صورت گرفت. این قطعه از ژن بتاگلوکوزیداز با استفاده از دو آغازگر اختصاصی (CP11,CP12) و با طول قطعه مورد انتظار (۵۶۶ جفت باز) تکثیر شد. الگوی هضم آنزیمی توسط آنزیم برشی PstI قطعه مذکور را تأیید نمود.

کلمات کلیدی: بتاگلوکوزیداز، آنزیمهای سلولازی، سلولز، قارچ Trichoderma

www.SID.ir

Archive of SID

Pajouhesh & Sazandegi No 78 pp: 141-148

Optimized conditions for production of β-glucosidase enzyme in *Trichoderma reesei* (PTCC5142)

By: M.R. Zamani, M. Motallebi National Research Center for Genetic Engineering & Biotechnology (NRCGEB), Tehran, Iran, Ghoujeghi F Biology Dept., Faculty of Science, Razi Univ., Kermanshah, Iran and S. Zahri Biology Dept, Faculty of Science, Mohaghegh Ardabili University Ardabil, Iran.

β-glucosidase, is one of the cellulase enzymes system, hydrolyses cellobiose or cellooligoschrides to glucose. In this research for production of β-glucosidase enzyme, β-glucosidase activity was measured in the optimum conditions in 30 isolates of Trichoderma sp. In order to obtain the optimum conditions: an isolate of Trichoderma (*T. reesei* PTCC 5142) was grown in Mandels media containing CMC, Avicel and filter paper as carbon source at pH 4,5, 6 and 7. Lactose and cellubiose were added to media as inducer agents. Media were incubated at 25, 29 and 32 ^{o}C for 14 days. Samples were collected in 24h intervals, and enzyme activity was measured. Results showed that the optimum conditions for hyperproduction of β-glucosidase were pH=5, CMC as carbon source, lactose as inducer on seventh day at 29 ^{o}C. After screening the β-glucosidase activity of all 30 isolates in the optimized conditions, it was shown that *T. reesei* PTCC 5142 had the highest level of β-glucosidase specific activity (0.45 U/mg). For characterization and study of β-Glucosidase gene, CTAB method used for genomic DNA extraction. The expected PCR product with 566 bp was amplified with two specific primers (CP11 & CP12). The amplified fragment was confirmed by restriction pattern.

Key words: glucosidase- Trichoderma, Cellulose, Cellulase enzymes

مقدمه

سلولز که یک بیوپلیمر خطی متشکل از هزار تا یک میلیون واحد گلوکز با پیوندهای گلیکوزیدی β-۱و۴ می‌باشد را با اسامی دیگری مانند Cellophane، Rayon و Regenerated cellulose نیز می شناسند (۲). میزان پلیمریزاسیون در هر زنجیره سلولز بین ۵۰۰ تا ۱۴ هزار می‌باشد(۷). هرگلوکز نسبت به گلوکز مجاور ۱۸۰ درجه می‌چرخد به نحوی که واحد تکراری اصلی سلولز، سلوبیوز بدون آب است و درنتیجه به نظر می‌رسدکه آنزیم‌های سلولازی زیر واحدهای سلوبیوز ملکول سلولز را تشخیص می‌دهند. زنجیره های گلوکزی پلیمر توسط شبکه ای از پیوندهای هیدروژنی و واندروالس به هم چسبیده‌اند که باعث می‌شود در نواحی خاصی از میکروفیبریل سلولز، منجر به کریستاله شدن گردد. این نواحی توسط مناطق کمتر کریستالی شده بنام نواحی بی شکل احاطه می شوند (۱۶). میزان کریستالی بودن سلولز از صفر در سلولز بی شکل و سلولز تیمار شده با اسید تا ۱۰۰ درصد برای سلولز جلبک *Valona macrophysa* وجود دارد (۲ ، ۵).

تجزیه کامل سلولز یک فرایند پیچیده است. ابتدا باید سازمان کریستالی آن بهم خورده و سپس ملکول‌های خطی حاصل به اولیگوساکاریدهای کوچکترو در نهایت به واحد ساختمانی خود یعنی D-گلوکز تبدیل شود. در هیدرولیز سلولز از دو روش اسیدی و آنزیمی استفاده می‌شود. درهیدرولیز اسیدی از اسید رقیق یا غلیظ سولفوریک و کلریدریک استفاده می‌شود. معایب این روش محصول کمتر قند، مصرف زیاد انرژی، نیاز به وسایل و نیز فرسایش دستگاه‌ها به مرور زمان است و این مشکلات سبب توجه بیشتر به هیدرولیز آنزیمی سلولز شده است.

باکتری‌ها و قارچ‌ها می‌توانند آنزیمهای سلولازی برای هیدرولیز مواد لیگنوسلولزی تولید کنند. این میکروارگانیسم‌ها می‌توانند از نوع هوازی یا بی هوازی، متوسط الحرارت دوست یا گرما دوست باشند. بیشتر محققان برای تولید آنزیمهای سلولازی با اهداف تجاری از قارچها استفاده می‌کنند. قارچهایی که برای تولید آنزیمهای سلولازی مورد استفاده قرار گرفته اند، عمدتاً شامل جنسهای Trichoderma sp.، Schizophyllum sp ، Aspergillus sp.، Sclerotinium sp. و Penicillium sp. می‌باشند (۳، ۷ ، ۲۵). سلولازها آنزیم‌هایی هستند که پیوندهای گلیکوزیدی بتا ۱و۴ را در سلولز هیدرولیز می‌کنند (۲۳). این آنزیی‌ها به صورت کمپلکسی از سه گروه آنزیمی می‌باشند که به طور سینرژیستی با یکدیگر عمل می‌کنند و عبارتند از: اندوگلوکانازها، اگزوگلوکانازها و بتا گلوکوزیدازها (۲۳). بتاگلوکوزیدازها که نام دیگر آن‌ها سلوبیاز می‌باشد، گروهی از آنزیم‌های سلولازی می‌باشند که پیوندهای گلیکوزیدی را تجزیه نموده، واحدهای منوساکارید را از انتهای غیر احیاکننده دی و الیگوساکاریدها جدا مینمایند (۱۴). بسته به منوساکارید آزاد شده آن‌ها را بتا گلوکوزیداز گلوکز، بتاگلوکوزیداز گالاکتوز و غیره می‌نامند (۱۸). بتاگلوکوزیدارها، سلوبیوز و سلواولیگوساکاریدهای با زنجیر کوتاه را به گلوکز هیدرولیز میکنند و مهار اندوگلوکاناز و اگزوگلوکاناز توسط سلوبیوز را رفع می‌نماید (۱۳).

گزارشات موجود نشان می دهد که ژن آنزیم گلوکوزیداز در قارچهای *Aspergillus niger*، *Humicola grisea* و برخی از گونه های Trichoderma تکثیر و مورد مطالعه قرار گرفته است (۱ ، ۲۶). این مطالعات نشان می دهد که طول این ژن حدود ۱/۴kb بوده و دارای یک اینترون کوتاه می باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

در ایـن تحقیق شـرایط بهینه تولید آنزیم بتاگلوکوزیـداز و عوامل موثر بر بیان آن مورد بررسـی قرار گرفتـه و ژن تولید کننده این آنزیم بـا اسـتفاده از PCR و الگوی هضم آنزیمی مورد شناسـایی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

جدایه های قارچ تریکودرما: تعـداد ۳۰ جدایه قارچ Trichoderma sp که در طول این تحقیق مورد بررسـی و مطالعه قرار گرفته‌اند عمدتاً از مناطق مختلف ایران می باشـند (۲۴). این جدایه‌ها توسـط مؤسسه تحقیقات و بیماریهای گیاهی وزارت جهاد کشاورزی شناسایی و تعیین گونـه گردیده‌اند. جهت نگهداری قارچ از محیط کشـت (PDA Potato Dextrose Agar) استفاده گردید.

تولید و سـنجش فعالیت آنزیم بتا گلوکوزیداز: برای بررسی شرایط بهینه تولید آنزیم از منابع کربنی مختلف (Avicel، CMC و کاغذ صافی) بـه میزان یک درصد (w/v)، pH های ۴، ۵، ۶ و ۷، زمانهای کشـت (تا ۱۴ روز با فواصل ۲۴ ساعت برای نمونه برداری)، دماهای ۲۵، ۲۸ و ۳۲ درجه سانتی گراد و استفاده از لاکتوز و سلوبیوز (۱ درصد) به عنوان عامل القا کننده اسـتفاده شـد. جهت تولید آنزیم بتا گلوکوزیداز مورد مطالعـه در این تحقیق، جدایه‌های مورد نظـر در ارلن‌های ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت مایع (۱۸) Mandels حاوی بستره CMC (Carboxy Methyl Cellulase)یک درصد به همراه لاکتوز یک درصد به عنوان عامل القاء کننده تلقیح و سپس محیط کشت‌ها به انکوباتور شـیکردار (۱۵۰ دور در دقیقه) و دمای ۲۸ درجه سانتی گراد منتقل و پس از هفت روز در pH برابر ۵ از آن‌ها نمونه برداری شـد و با استفاده از کاغذ صافی سترون شده، محیط کشت‌ها از صافی عبور داده شـدند. از محیط کشت صاف شده به عنوان محلول حاوی پروتئین‌های ترشحی که دارای آنزیم بتا گلوکوزیداز می‌باشد استفاده گردید.

برای سـنجش فعالیت آنزیـم بتاگلوکوزیداز بـه ۰/۵ میلی لیتر از محلول سالیسـین یا سلوبیوز ۱ درصد (بعنوان بسـتره) ۰/۵ میلی لیتر نمونه آنزیمی و ۱ میلی لیتر بافر سیترات ۰/۰۵ مولار با pH =۴/۸ اضافه شـد. مخلوط حاصله بمدت یک ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد نگه داری و ۲ میلی لیتر معرف دی نیترو سالیسیلیک اسید (۲۱) DNS به آن اضافه گردید. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار داده شـده تا در اثر احیاء معرف DNS توسـط قند احیا شده (گلوکز)، تغییر رنگ معرف از زرد به قرمز انجام پذیرد. برای پایداری رنگ معرف ۱ میلی لیتر محلول تارتارات مضاعف سـدیم پتاسـیم ۴۰ درصد به آن اضافه و جذب نوری آن‌ها در طول موج ۵۷۵ نانومتر خوانده شـد. تمام آزمایش‌ها در سـه تکرار انجام شـد و میانگین آن‌ها مورد استفاده قرار گرفت. در این آزمایش از گلوکز به عنوان استاندارد استفاده گردید.

بـرای اندازه‌گیری مقـدار پروتئین از روش Bradford(۶) اسـتفاده شـد که در آن از پروتئین BSA(Bovine Serum Albomin) به عنوان اسـتاندارد استفاده گردید. فعالیت ویژه آنزیمی، به صورت مقدارفعالیت آنزیم(U/ml) به مقدار کل پروتئین (µg/ml) موجود در محیط، تعریف گردید.

استخراج DNA: از میسلیومهای بدست آمده از محیط کشت مرحله فوق جهت اسـتخراج DNA استفاده گردید. میسلیوم منجمد شده قارچ توسـط ازت مایع بصورت پودر درآمده و اسـتخراج DNA ژنومی آن به روش CTAB انجام شـد (۸). DNA بدست آمده در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر سـترون حل و در ۲۰- درجه سـانتی گراد برای اسـتفاده بعدی نگهداری گردید.

انجـام PCR اختصاصـی: PCR اختصاصی در مخلوط واکنشـی به حجم ۲۵ میکرولیتر، شـامل ۲ میلی مولار $MgCl_2$، ۴۰ نانوگرم DNA، ۰/۵ میکرومـولار، ۰/۴ میلـی مـولار dNTP، و ۲/۵ واحد آنزیم Taq polymerase و ۲/۵ میکرولیتـر بافـر (۱۰X) (۲۰۰) میلی مولار Tris-HCl, pH=۸/۴, ۵۰۰ میلی مولار KCl و ۵۰ میلی مولار $MgCl_2$) صورت گرفـت. قبل از انتقال نمونه‌ها به دسـتگاه ترموسـایکلر هر کدام با یک قطره از روغن پارافین پوشـش داده شد. سـپس واکنش برای ۳۴ دور، شـامل دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ ثانیه، دمای ۵۶ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت، دمای ۷۲ درجه سانتی گراد بمدت ۴۵ ثانیه انجام گردید. بعد از اتمام ۳۴ دور, واکنش در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه قرار گرفت. محصول PCR روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز گردید. جهت تایید الگوی هضم آنزیمی قطعه بدسـت آمده توسط PCR، از آنزیم PstI استفاده گردید. توالی آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق در جدول ۱ ارائه شده است.

نتایج و بحث

از آنجا که سـلولز فراوان تریـن بیوپلیمر موجـود در طبیعت بوده و تولید سـالانه آن بیـش از ۴ میلیارد تن و میزان کربن تثبیت شـده سالانه در گیاهان بالغ بر ۱۰۰ بیلیون تن می باشد (۵ ، ۱۵)، این ماده بـه عنوان فراوان ترین مـاده آلی قابل تجزیه می تواند به عنوان بهترین ذخیره برای تولید انرژی، غذا و مواد شـیمیایی مورد نیاز انسان در نظر گرفته شـود. آنزیمهای سلولازی قادرند سـلولز را به واحدهای تشکیل

جدول- ۱: توالی آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق

نام آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال (T° C)	درصد G+C
CP11	5ACAGGCAGCACAGCCTTTAC-3	57	55
CP12	5GTGCCAGGCA TTGACATGTC-3	56	50

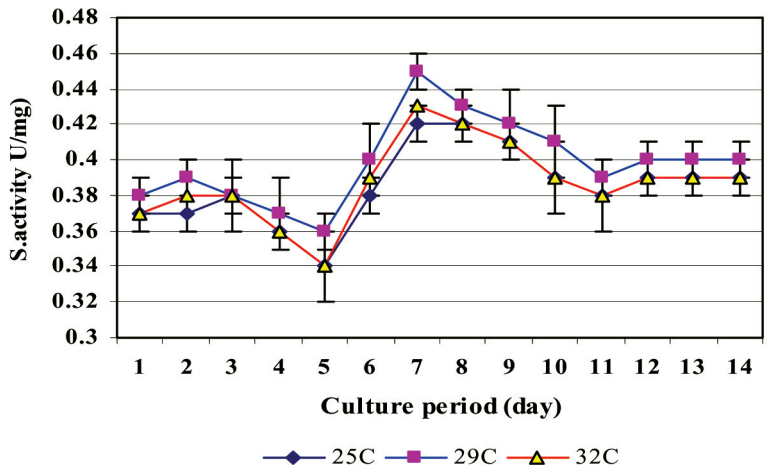
www.SID.ir

Archive of SID

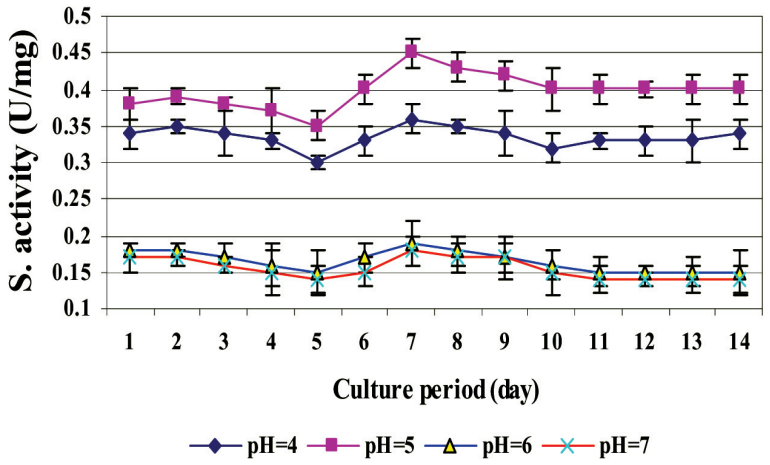
دهنـده آن تجزیـه نموده و محصول بدسـت آمده می‌توانـد در صنایع مختلف مورد استفاده قرار گیرد.

بـا توجه بـه اهمیت نقش قارچها در تولید آنزیمهای سـلولازی که در صنایع مختلف از جمله صنایع غذایی، دارویی، نساجی، بهداشتی، خوراک دام و تحقیقاتی مورد استفاده قرار گیرد (۴، ۵، ۱۲، ۱۷، ۱۹، ۲۰ ، ۲۸)، لذا در این تحقیق از قارچ Trichoderma جهت تولید آنزیم بتاگلوکوزیداز اسـتفاده گردیـد. این آنزیم یکی از مجموعـه آنزیم‌های سـلولازی می باشـد که در تجزیه کامل سـلولز نقش مهمی را ایفا می کند (۹ ، ۱۰)

تولیـد آنزیم بتـا گلوکوزیداز: نقـش تغییرات مختلـف نظیر درجه حرارت، طول دوره کشـت، pH، منابع کربنـی مختلف و عوامل القاء کننـده در میزان تولید آنزیمهای سـلولازی در منابـع مختلف گزارش شـده است (۱۷، ۲۲ ، ۲۸). در این تحقیق جهت بررسی شرایط بهینه تولید آنزیم بتا گلوکوزیـداز، نقش این عوامل مورد مطالعه قرار گرفت. با توجه به اینکه در تحقیقات قبلی با اسـتفاده از روش غربالگری سریع مشـخص گردیده بود که جدایه (PTCC ۵۱۴۲ *T. reesei*) فعال‌ترین جدایه از لحاظ تولید آنزیم‌های سـلولازی می‌باشد (۱۱). در این تحقیق از این جدایه جهت بهینه سـازی شـرایط تولید آنزیم بتـا گلوکوزیداز اسـتفاده گردید. برای رسـیدن به شـرایط بهینه برای تولید این آنزیم ابتـدا اثر دماهای ۲۵، ۲۸ و ۳۲ درجه سـانتی گراد به مـدت ۱۴ روز در تولید این آنزیم مورد بررسـی قرار گرفت. مقایسه نتایج بدست آمده نشـان می‌دهد که در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد و روز هفتم بیشترین فعالیت آنزیمی به میزان ۰/۴۵U/mg مشـاهده میگردد (شکل ۱). نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که بیشترین فعالیت این آنزیم در روز هفتم، دمای ۲۸ درجه سـانتی گراد و pH= ۵ می‌باشـد (شـکل ۲). بیشترین میـزان فعالیت آنزیم بتـا گلوکوزیداز به میـزان ۰/۴۵U/mg در حضور CMC به عنوان منبع کربن و در روز هفتم می‌باشـد (شکل ۳). مقایسه میـزان تولید این آنزیم در حضور CMC با منابع کربنی Avicel و کاغذ صافی نشان میدهد که میزان فعالیت این آنزیم در حضور CMC نسبت بـه منابع کربنـی Avicel و کاغذ صافی بترتیب به میزان ۱۲/۵ و ۱۸/۴ درصد افزایش نشان میدهد. در مرحله بعد اثر لاکتوز و سلوبیوز به عنوان عوامـل القاء کننده بر میزان تولید آنزیـم بتا گلوکوزیداز در حضور۵ = pH، CMC و دمای ۲۸ درجه سـانتی گراد در روزهـای مختلف مورد بررسی قرار گرفت. دراین بررسی مشخص گردید که در مقایسه با حالت غیر القاء و نیز اثر القایی سلوبیوز، افزودن لاکتوز در محیط کشت باعث افزایش تولید آنزیم به میزان ۵ درصد می‌شـود درصورتیکه اثر سلوبیوز بـه عنوان عامل القاء کننده تاثیر معنـی داری بر تولید این آنزیم نمی گذارد (شکل ۴). نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که بهترین شـرایط برای کشـت جدایه‌ها و تولید آنزیم بتا گلوکوزیـداز در محیط کشـت، عبارت از دمـای ۲۸ درجه



شـکل ۱): میزان تولید آنزیم بتاگلوکوزیداز جدایه (PTCC۵۱۴۲ *T. reesei*) در دماهای مختلف (۲۵، ۲۹ و ۳۲ درجه سانتی گراد) در طول ۱۴ روز (مقادیر فعالیت ویژه آنزیمی، میانگین سـه تکرار بوده و error barها نشـان دهنده میزان انحراف معیار (SD) می‌باشند). S. activity = Specific activity.



شـکل ۲): میزان تولید آنزیم بتاگلوکوزیداز جدایه (PTCC۵۱۴۲ *T. reesei*) در pH هـای مختلف (۴، ۵، ۶ و ۷). (مقادیر فعالیت ویژه آنزیمی، میانگین سـه تکرار بوده و error barها نشـان دهنـده میزان انحراف معیـار (SD) می‌باشند). S. activity = Specific activity.

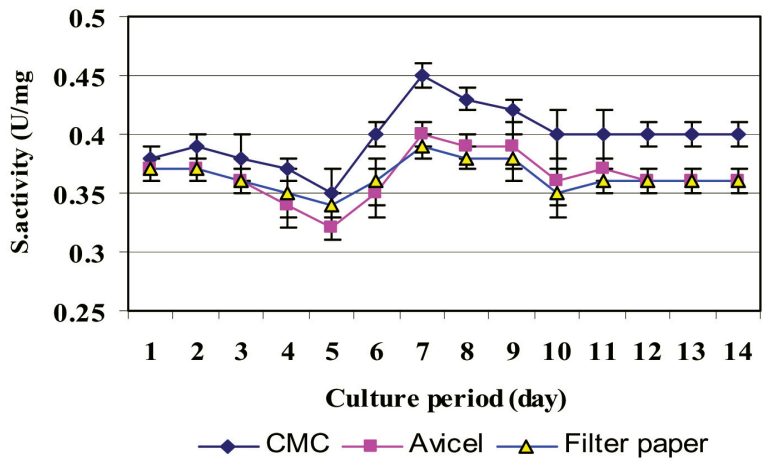
www.SID.ir

Archive of SID

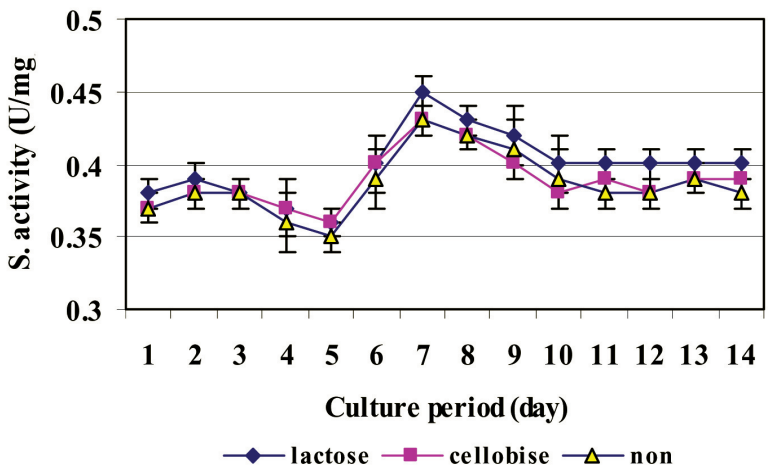
سانتی گراد، pH = ۵، CMC به عنوان منبع کربن، لاکتوز به عنوان عامل القاء کننده و روز هفتم کشت میباشد. پارامترهای مؤثر بر تولید بهینه آنزیم بتاگلوکوزیداز در گونه های مختلف قارچ تریکودرما توسط سایر محققین نیز گزارش شده است. Zaldivar و همکاران (۲۸) جهت تولید این آنزیم از قارچ *T. harzianum* از دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، pH برابر ۵، روز ۱۴ کشت قارچ و لاکتوز به عنوان عامل القاء کننده استفاده نموده‌اند. Xueliang و Liming (۱۷) دمای بین ۳۰-۲۸ درجه سانتی‌گراد، pH محیط کشت برابر ۴/۸ و لاکتوز به عنوان عامل القاء کننده را برای تولید آنزیم بتاگلوکوزیداز *T. reesei* مورد استفاده قرار داده‌اند. Salaheimo و همکاران (۲۳) نیز حداکثر تولید آنزیم در قارچ *T. reesei* را پس از ۶ روز در محیط کشت حاوی لاکتوز به عنوان عامل القاء کننده در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد گزارش نموده‌اند.

برای بررسی و مقایسه تولید و فعالیت آنزیمی در ۳۰ جدایه قارچ تریکودرما، جدایه‌های قارچی در شرایط بهینه بدست آمده در این تحقیق جهت تولید آنزیم بتا گلوکوزیداز، کشت داده شده و فعالیت آنزیمی در آن‌ها مقایسه گردید. بررسی فعالیت آنزیمی جدایه‌های مورد مطالعه نشان میدهد که عمده این جدایه ها، توانایی مناسبی جهت تولید آنزیم بتا گلوکوزیداز داشته، و جدایه *T. reesei* (PTCc ۵۱۴۲) با فعالیت ویژه آنزیمی ۰/۴۵U/mg بیشترین مقدار فعالیت آنزیمی را از خود نشان میدهد (شکل ۵).

مطالعه و بررسی ژن بتاگلوکوزیداز توسط PCR: جهت بررسی حضور ژن بتا گلوکوزیداز در ۱۴ جدایه قارچ تریکودرمای مورد مطالعه در این تحقیق که بیشترین میزان از آنزیم بتا گلوکوزیداز را تولید می نمودند، DNA ژنومی استخراج و جهت PCR اختصاصی مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور دو آغازگر اختصاصی (CP۱۱ و CP۱۲) از توالی ژن بتاگلوکوزیداز گزارش شده در بانک ژنی (۲۶) طراحی و سنتز گردید. جهت طراحی این دو آغازگر از برنامه Oligo۵ استفاده گردید. با استفاده از این برنامه تأیید گردیدکه دو آغازگر انتخاب شده لوپ و primer dimer تشکیل نمی دهند و لذا به عنوان ابزار مناسبی جهت شناسایی این ژن می توانند مورد استفاده قرار گیرند. طول DNA تکثیر شده توسط این آغازگرها ۵۶۶ bp مورد انتظار می‌باشد (۲۶). بررسی قطعه تکثیر شده فوق در شرایط اختصاصی، نشان می‌دهد که این آغازگرها، DNA با طول مورد انتظار را تنها در دو جدایه *T. reesei* و Trichoderma sp. (TY) تکثیر می‌نمایند(شکل ۶). از آنجا که در الگوی باندی حاصل از PCR این دو جدایه علاوه بر باند مورد انتظار (۵۶۶ bp) باندهای دیگری با شدت کمتر نیز مشاهده میشود، در این مرحله از شرایط بسیار اختصاصی که در آن با افزایش ۲ درجه سانتی گراد دمای اتصال (از ۵۶ به ۵۸ درجه سانتی گراد تغییر داده شد)، واکنش PCR تکرار گردید. نتایج حاصله نشان داد که در شرایط استفاده شده فوق قطعه مورد انتظار (بصورت تک باند) در



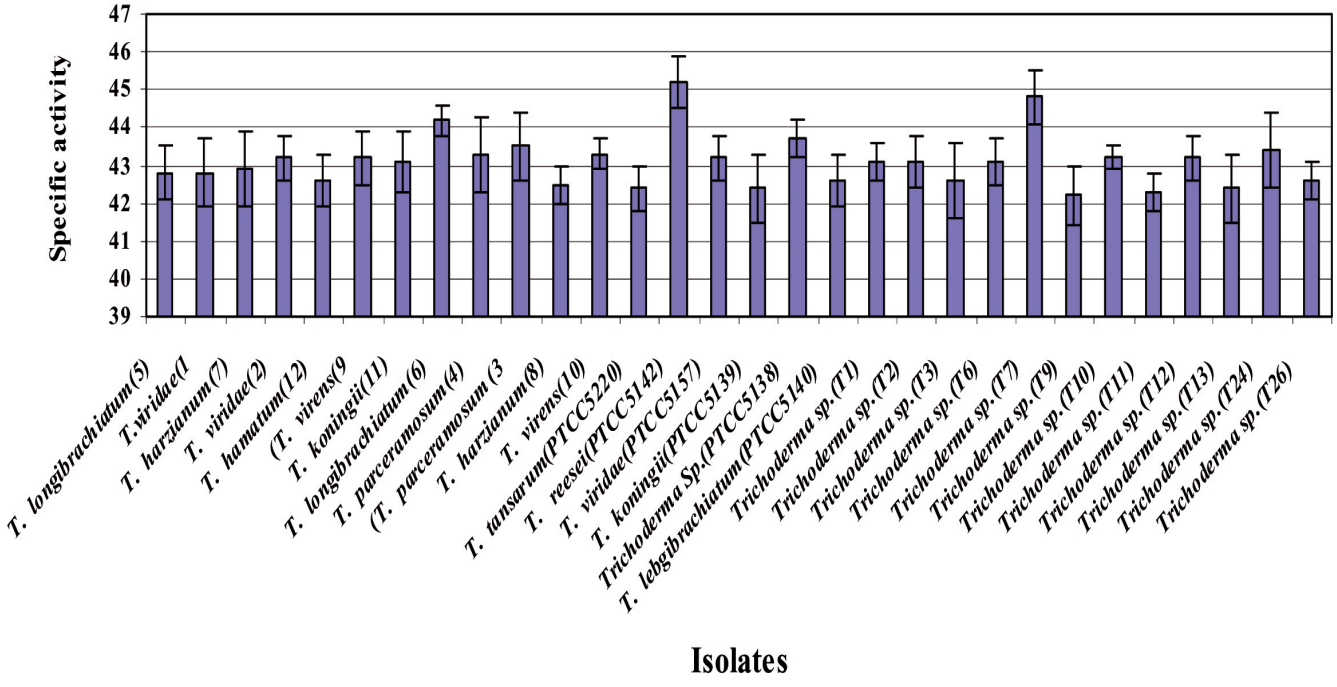
شکل ۳): اثر منابع کربنی مختلف (CMC, Avicel, Filter paper) در میزان تولید آنزیم بتاگلوکوزیداز جدایه (*T. reesei* (PTCC۵۱۴۲). (مقادیر فعالیت ویژه آنزیمی، میانگین سه تکرار بوده و error barها نشان دهنده میزان انحراف معیار (SD) می‌باشند). S. activity = Specific activity.



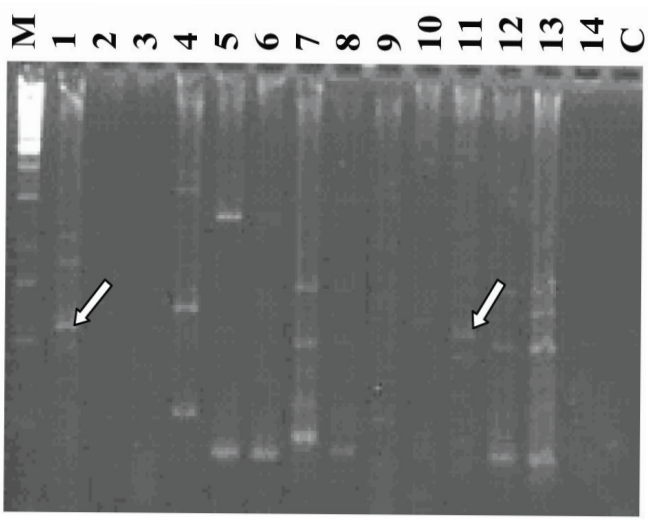
شکل ۴): بررسی اثر عوامل القاء کننده لاکتوز و سلوبیوز بر میزان تولید آنزیم بتاگلوکوزیداز جدایه (*T. reesei* (PTCC۵۱۴۲). (مقادیر فعالیت ویژه آنزیمی، میانگین سه تکرار بوده و error barها نشان دهنده میزان انحراف معیار (SD) می‌باشند). S. activity = Specific activity.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵): مقایسه میزان تولید آنزیم بتاگلوکوزیداز جدایه های مختلف قارچ تریکودرما در شرایط بهینه تولید آنزیم (CMC بعنوان منبع کربن، pH برابر ۵، دمای ۲۹ درجه سانتی گراد، حضور لاکتوز بعنوان عامل القاء کننده و ۷ روز طول زمان کشت). (مقادیر فعالیت ویژه آنزیمی، میانگین سه تکرار بوده و error bar ها نشان دهنده میزان انحراف معیار (SD) میباشند). Specific activity براساس U/mg x ۱۰-۲ میباشد.



شکل ۶): قطعه تکثیر شده ژن بتاگلوکوزیداز جدایه های مختلف قارچ تریکودرما با فعالیت آنزیمی بالا

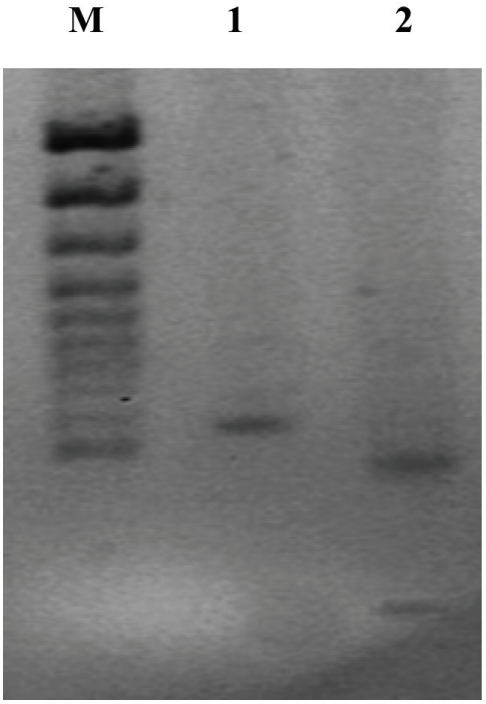
M= مارکر DNA (GeneRuler ۱۰۰ bp DNA ladder plus)، ردیفهای ۱= *T. reesei* (PTCC۵۱۴۲)، ۲=*T. longibrachiatum* (۶) ۳= *T. longibrachiatum* (۵)، ۴= T. *viride* (۲)، ۵= *T. virens* (۹)، ۶= *T. viride* (۱۰)، ۷= *T. harzianum* (۷)، ۸= T.*parceramosum* (۳)، ۹= *T. tansarum* (PTCC۵۲۲۰)، ۱۰= *Trichoderma* sp. (PTCC۵۱۳۸)، ۱۱= *Trichodema* sp. (T۷)، ۱۲= *Trichodema* sp. (T۱۲)، ۱۳= *Trichodema* sp. (T۱۳)، ۱۴= *Trichodema* (T۲)، C کنترل منفی. فلش‌ها نشان دهنده قطعه مورد انتظار (حدودbp ۵۶۶) می‌باشند.

جدایه *T. reesei* (PTCC۵۱۴۲) (فعالترین جدایه تولید کننده آنزیم بتا گلوکوزیداز) تکثیر گردید (شکل ۷). علت عدم تکثیر باند مورد انتظار در واکنش PCR مربوط به سایر گونه‌های قارچ تریکودرمای مورد مطالعه استفاده در این تحقیق می تواند به دلیل وجود نوکلئوتید mismatch در انتهای ۳ آغازگر (های) سنتز شده باشد. با این توضیح که اگر به جای نوکلئوتید مکمل مربوط به نوکلئوتید انتهای ۳ آغازگر در DNA الگو نوکلئوتید دیگر وجود داشته باشد (mismatch primer)، در این صورت واکنش PCR انجام نخواهد شد و محصول مورد انتظار تکثیر نمی گردد (۲۷). از آنجا که احتمال تفاوت نوکلئوتیدی در توالی ژنی مورد انتظار در گونه های مختلف وجود دارد بنابراین، این پدیده می تواند تکثیر نشدن قطعه مورد انتظار در گونه هایی که باند PCR مورد نظر در آن‌ها تکثیر نشده است را توجیه نماید.

با توجه به این که، حتی در شرایط PCR بسیار اختصاصی، احتمال دارد آغازگرها قطعه‌ای خارج از محدوده ژن مورد نظر را با اندازه مشابه تکثیر نمایند، به منظور تأیید محصول PCR، الگوی هضم آنزیمی DNA تکثیر شده با آنزیمPstI، مورد مطالعه قرار گرفت. قطعات حاصل از هضم آنزیمی محصول PCR، بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شدند(شکل ۷). مطابق پیش بینی براساس اطلاعات این ژن در بانک ژنی، در نتیجه عمل آنزیم PstI بر روی قطعه حاصل از PCR ژن بتا گلوکوزیداز، دو قطعه به طول‌های ۴۵۲ و ۱۱۴ جفت‌باز مورد انتظار می‌باشد. نتایج بدست آمده از الگوی هضم آنزیمی DNA تکثیر شده با

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۷): قطعه تکثیر شده ژن بتاگلوکوزیداز جدایه (*T. ressei* PTCC۵۱۴۲) توسط آغازگرهای اختصاصی CP۱۱ و CP۱۲
M= مارکر DNA (GeneRuler ۱۰۰ bp DNA ladder plus)، ردیف۱= قطعه تکثیر شده (حدود ۵۶۶ bp)، ردیف۲= الگوی هضم آنزیمی قطعه تکثیر شده توسط آنزیم PstI (حدود ۴۵۲ bp و ۱۱۴ bp)

PCR، صحت قطعات مذکور را مورد تایید قرار می‌دهد (شکل ۷). با توجه به نتایج حاصل از الگوی هضم آنزیمی با استفاده از عمل آنزیم فوق و نیز تعیین توالی قطعه تکثیر شده می‌توان نتیجه‌گیری نمود که آغازگرهای اختصاصی CP۱۱ و CP۱۲ قطعه‌ای که به طول حدود ۵۶۶ جفت باز را تکثیر نموده‌اند، همان قطعه مورد انتظار از ژن بتا گلوکوزیداز میباشد. از این قطعه تکثیر شده میتوان برای تهیه پروب جهت شناسایی و جداسازی ژن کامل کد کننده آنزیم بتاگلوکوزیداز در مطالعات بعدی استفاده نمود.

منابع مورد استفاده

1- Ai Y.C. and Meng F.M.2000; Molecular cloning and sequencing of a beta-glucosidase gene from *Aspergillus niger* AMS11. Submitted to NCBI under accession number of AAF74209.

2-Bayer E.A., Chanzy H., Lamed R., and Shoham Y. 1998; Cellulose, cellulases and cellulosomes. Current Opinion in Structural Biology. 8:548-557.

3-Beguin P. 1990; Molecular biology of cellulose degradation. Annu. rev. Microbiol. 44: 219-248.

4-Bhat M. K. 2000; Cellulases and related enzymes in biotechnology. Biotechnology Advances 18, 355-383.

5-Bhat M.K., and Hazlewood G.P. 2001; Enzymes in farm animal nutrition.,12-42. (CAB International Press.)

6-Bradford M. M. 1976; A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein -Dye Binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

7-Criquet S. 2002; Measurement and characterization of cellulase activity in sclerophyllous forest litter. Journal of Microbiological Methods. 50:165-173

8-Doyle J.J. and Doyle J.L. 1987; A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull. 19:11-15.

9-Easterby J.S. 1989; The analysis of metabolite channeling in multienzyme complexes and multifunctional proteins. Biochemical Journal. 264:605-607

10-Ferreira A.H.P., Marana S.R., Terra W.R., and Ferreira C. 2001; Purification, molecular cloning, and properties of a β-glycosidase isolated from midgut of *Tenebrio moltor* (Coleoptera) larvae. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 31:1065-1076

11-Ghoujeghi F., Motallebi M., and Zamani M.R.. 2005; Enzyme production and amplification of cellobiohydrolase (CBH) gene from Trichoderma sp.. Iranian Journal of Biology. 18(1): 15-23.

12-Gusakov A.V., Sinitsyn A.P., Markov A.V., Sinitsyna O.A., Ankudimova N.V., and Berlin A.G. 2001. Study of protein adsorption on indigo particles confirms the existence of enzyme-indigo interaction sites in cellulase molecules. Journal of Biotechnology. 87:83-90.

13-Hoh Y.K., Yeoh H.H., and Tan T.K.1992; Properties of β-glucosidase purified from *Aspergillus niger* mutants USDB 0827 and USDB 0828. Appl Microbiol Biotechnol 37:590-593.

14-Krishna C. 1999; Production of bacterial cellulases by solid state bioprocessing of banana wastes. Bioresource Technology 69: 231-239.

15- Lenting, H. B. M., and Warmoeskerken, M. M. C. G. 2001; Mechanism of interaction between cellulase action and applied force, hypotesis. Journal of Biotechnology. 89: 217-226.

16-Levy I., Shani Z., and Shoseyov O. 2002; Modification of polysaccharides and plant cell wall by endo-1,4- β-glucanase and cellulose-binding domains. Biomolecular Engineering. 19: 17-30.

17-Liming X. and Xueliang S. 2004; High- yield cellulose production by Trichoderma reesei ZU-02 on corn cob residue. Bioresoure Technology. 91: 259-262.

www.SID.ir

Archive of SID

18-Linko M. 1977; An evoluation of enzymatic hydrolysis of cellulostic materials. Adv. Biochem. Eng. 5: 27-46.

19-Lynd L.R., Weimer P.J., Van Zyl W.H., and Pretorius I.S. 2002; Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 66:506-577.

20-Mawadza C., Hatti-Kaul R., Zvauya R., and Mattiasson B. 2000; Purification and characterization of cellulases produced by two Bacillus strains. Journal of Biochemistry. 83:177-187.

21-Park J.W., Park K., Song H., and Shin H. 2002; Sacchrificatin and adsorptin characteristics of modified cellulases with hydrophilic/hydrophobic copolymers. Journal of Biotechnology. 93:203-208.

22- Saloheimo M., Kuja-Panula, Ylosmaki E., Ward M., and Penttila M. 2002; Enzymatic properties and intracellular localization of the novel Trichoderma reesei beta glucanase BGLII (CellA). Applied and environmental Microbiology. 68(9): 4546-4553.

23-Schulein M. 2000; Protein engineering of cellulase, Biochemica et Biophysica Acta: 239-252.

24-Seyed Asli N., Zamani M.R., Motallebi M. and Harighi M.J. 2004; Study of chitinolytic enzyme production in Trichoderma isolates. Iranian Journal of Biology. 17(3):227-246.

25-Sun Y., and Cheng J. 2001; Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production. Bioresource Technology. 38: 1-11.

26-Takashima S., Iikura H., Nakamura A., Hidaka M., Masaki H., and Uozumi T. 1998; Overproduction of recombinant Trichoderma reesei cellulases by Aspergillus oryzae and their enzymatic properties. Journal of Biotechnology, 65: 163-171.

27- Ye S., Dhillon S., Ke X., Collins A.R. and Day I.N.M. 2001; An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. Nucleic Acids Research, 2001, 29 (17): 1-8.

28-Zaldivar M., Velasquez J.C., Contreras I., and Perez L.M. 2001; Trichoderma aureoviride 7-121, a mutant with enhanced production of lytic enzymes: its potential use in waste cellulose degradation and/or biocontrol. Electronic Journal of Biotechnology. 4(3): 160- 168.

www.SID.ir