مطالعه تولید آنزیم سلوبیوهیدرولاز در قارچ *Trichoderma reesei*

فرهاد قجقی[۱]، مصطفی مطلبی[۲] و محمدرضا زمانی[۲]

[۱]گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی

[۲] پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

چکیده

سلوبیوهیدرولاز از آنزیمهای سلولازی می باشد که بهمراه دو آنزیم اندوگلوکاناز و بتاگلوکوزیداز باعث تجزیه ملکولهای سلولز می شوند. در این تحقیق، تعداد ۳۰ جدایه قارچ تریکودرما از نظر تولید آنزیمهای سلولازی در محیط swollen cellulose مورد بررسی قرار گرفته و جدایه *Trichoderma reese*i (PTCC5142) با ایجاد هاله ای به قطر ۱٦ میلی متر بعنوان فعالترین جدایه انتخاب گردید. برای مطالعه میزان فعالیت آنزیمهای سلولازی از محیط مندلز(Mandels) استفاده شد که در آن شرایط محیطی مختلف شامل دما (۲۵، ۲۸ و ۳۲ درجه سانتیگراد)، منابع کربنی (CMC, Avicel, Filter paper)، القا کننده ها (لاکتوز و سلوبیوز)، pH (٤، ٥، ٦ و ۷) و زمان کشت (روزانه تا ۱٤ روز) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصله نشان داد که دمای ۲۹ درجه سانتیگراد، CMC بعنوان بهترین منبع کربنی, لاکتوز به عنوان عامل القا کننده, pH برابر ٥ و روز هفتم کشت بعنوان شرایط بهینه تولید آنزیم سلوبیوهیدرولاز در این قارچ می باشند. مقایسه تولید این آنزیم در جدایه های مختلف در شرایط بهینه بدست آمده نشان داد که جدایه *T. ressei* (PTCC5142) با تولید ٤/٤٥ U/ml بعنوان فعالترین جدایه از نظر تولید آنزیم سلوبیوهیدرولاز می باشد.

واژه های کلیدی: تریکودرما – آنزیمهای سلولازی – سلوبیوهیدرولاز – سلولز.

مقدمه

سلولز بعنوان فراوان ترین ماده آلی قابل تجزیه، حدود نیمی از تولید ناخالص مواد حیاتی توسط فتوسنتز گیاهان را تشکیل می دهد. این ماده با پیوندهای گلیکوزیدی بتا ۱و٤ قسمت اعظم دیواره سلولی گیاهان را شامل می شود. سلولز علاوه بر دیواره سلولی گیاهان، در جلبکها، بسیاری از قارچها و کیست برخی از پروتوزوئرها نیز وجود دارد (۲).

هیدرولیز سلولز به دو روش شیمیایی و آنزیمی صورت می‌گیرد. هیدرولیز شیمیایی توسط اسیدها و هیدرولیز آنزیمی بوسیله آنزیم های سلولازی انجام می گیرد. با توجه به مشکلات هیدرولیز اسیدی سلولز، توجه بیشتری به هیدرولیز آنزیمی شده است (۱). محصولات هیدرولیز معمولاً قندهای احیایی به شکل گلوکز می باشند. مزیت هیدرولیز آنزیمی سلولز نسبت به روشهای هیدرولیز اسیدی، پایین بودن هزینه‌ها می باشد زیرا هیدرولیز آنزیمی در شرایط ملایم یعنی pH= ٤/٨ و دمای ٥۰-٤٥ درجه سانتیگراد انجام می گیرد وهمچنین در آن عمل شیمیایی(خورندگی) وجود ندارد (۱٦).

سلولاز ها آنزیمهایی هستند که بصورت کمپلکسی از سه گروه آنزیمی و بطور سینرژیسمی با همدیگر عمل می کنند و می توانند پیوند های گلیکوزیدی بتا ۱و٤ را در سلولز هیدرولیز نمایند. این آنزیمها عبارتند از بتا ۱ و ٤ اندوگلوکاناز، سلوبیوهیدرولاز و بتا گلوکوزیداز. آنزیم سلوبیوهیدرولاز که نام دیگر آن اگزوگلوکاناز می باشد واحدهای سلوبیوز را از انتهای غیر احیاء کننده زنجیره سلولز و یا قطعات الیگومری حاصل از عمل بتا ۱ و ٤ اندوگلوکاناز را جدا می کند (۱٤).

Archive of SID

www.SID.ir

گونه های مختلف تریکودرما یکی از مفیدترین منابع آنزیمهای سلولازی می باشند و توجه خاصی به تولید آنزیمهای سلولازی توسط تریکودرما، از طریق شناسایی وتولید گونه های برتر از نظر تولید آنزیم شده است. در این قارچ میزان تولید آنزیمهای سلولازی ترشحی قابل ملاحظه می باشد (۱۲).

در این تحقیق، شرایط بهینه تولید آنزیم سلوبیوهیدرولاز توسط قارچ تریکودرما مورد بررسی قرار می گیرد و جدایه های مختلف این قارچ از نظر تولید این آنزیم مورد مطالعه و مقایسه قرار خواهند گرفت.

مواد و روشها

جدایه های قارچ تریکودرما: تعداد ۳۰ جدایه قارچ *Trichoderma* sp. که در طول این تحقیق مورد بررسی و مطالعه قرار گرفته اند عمدتاً از مناطق مختلف ایران جمع آوری شده اند (۱۵). جهت نگهداری قارچ از محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar, Merck) استفاده گردید. برای تهیه این محیط پودر PDA به میزان ۳۹ گرم در لیتر در آب حل و پس از سترون کردن مورد استفاده قرار گرفت.

تشخیص سریع فعالیت آنزیمهای سلولازی: جهت تشخیص سریع جدایه های با فعالیت سلولازی مناسب از روش test plate استفاده گردید. بدین منظور با اضافه کردن ۱۰ گرم Avicel (Rotch) (microcrystalline cellulose) به ۵۰۰ میلی لیتر اسید فسفریک ۸۵ درصد سرد، مخلوط حاصل بمدت ۳ ساعت در cold room روی شیکر قرار داده شد مخلوط حاصل در حالیکه توسط یک میله شیشه ای بهم زده می شد به ۱۵۰۰ میلی لیتر آب سرد اضافه گردید تا زمانیکه بصورت یک توده ابر مانند درآید. پس از سانتریفیوژ (7000 rpm) بمدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتیگراد، رسوب حاصل در آب دو بار تقطیر سترون شده به حالت سوسپانسیون در آمده و جهت تنظیم pH محلول برابر ۵، حدود ٤۰۰ میلی لیتر کربنات سدیم یک مولار به آن اضافه گردید. سوسپانسیون مورد نظر پنج مرتبه با آب مقطر شستشو داده شده و در هر مرحله سانتریفیوژ گردید. رسوب نهایی توسط Freez drayer بصورت پوره ای یکنواخت در آمد که از آن بعنوان سوبسترا (swollen cellulose) برای تشخیص سریع فعالیت آنزیمی استفاده گردید. جهت تشخیص سریع فعالیت آنزیمهای سلولازی از محیط کشت تغییر یافته Mandels (۱٤) ، [که به آن swollen cellulose(5.4%)، Triton X-100 (0.1% v/v) (Merck)و L-sorbose(4%) (Rotch) (برای محدود کردن رشد میسلیوم) اضافه شده بود] استفاده گردید.

پس از تهیه محیط کشت، تلقیح اسپور به تعداد 10^5 عدد در چاهکهای ایجاد شده صورت گرفت. سپس محیطها بمدت ۳ روز در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد ، و ۱۸ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. این روش نیازی به رنگ آمیزی نداشت زیرا محیط بعلت دارا بودن swollen cellulose کدر بوده و وجود هاله شفاف در اطراف چاهک نشان دهنده حضور آنزیمهای سلولازی که موجب تجزیه swollen cellulose می شوند می باشد (۱۹). اندازه قطر هاله ها نشان دهنده میزان تولید و فعالیت آنزیمهای سلولازی ترشح شده در محیط توسط جدایه های مختلف قارچ می باشد.

تولید و سنجش فعالیت آنزیم سلوبیوهیدرولاز: برای بررسی شرایط بهینه تولید آنزیم از منابع کربنی مختلف (CMC, Avicel, Filter paper) به میزان یک درصد(w/v)، pH های ٤، ۵، ٦ و ۷ ، زمانهای کشت (تا ۱٤ روز با فواصل ۲٤ ساعت برای نمونه برداری)، دماهای ۲۵، ۲۸ و ۳۲ درجه سانتیگراد و استفاده از لاکتوز و سلوبیوز (۱ درصد) بعنوان عامل القا کننده استفاده شد.

Archive of SID
www.SID.ir

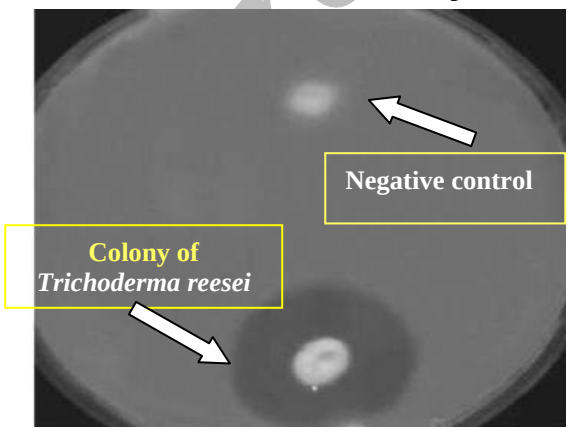
جهت تولید آنزیم سلوبیوهیدرولاز مورد نیاز در این تحقیق، جدایه های مورد نظر در ارلن‌های ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت مایع Mandels (۹) حاوی سوبسترای CMC (Carboxy Methyl Cellulase, Rotch) یک درصد به همراه لاکتوز یک درصد بعنوان عامل القاء کننده تلقیح و سپس محیط کشت‌ها به انکوباتور منتقل شدند و دستگاه روی حالت بهم زن (۱۵۰ دور در دقیقه) و دمای ۲۹ درجه سانتیگراد تنظیم و پس از هفت روز در pH برابر ۵ از آنها نمونه برداری شد و با استفاده از کاغذ صافی استریل، محیط کشتها از صافی عبور داده شدند. از محیط کشت صاف شده بعنوان محلول حاوی پروتئینهای ترشحی که دارای آنزیم سلوبیوهیدرولاز میباشد استفاده گردید.

برای سنجش فعالیت آنزیم سلوبیوهیدرولاز به یک میلی لیتر نمونه آنزیمی ۵۰ میلی گرم کاغذ صافی واتمن شماره یک (بعنوان سوبسترای آنزیم) اضافه و یک میلی لیتر بافر سیترات ۰/۰۵ مولار با pH=٤/۸ افزوده شد. مخلوط حاصله بمدت یک ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد انکوبه و برای توقف واکنش آنزیمی ۲ میلی لیتر معرف دی نیترو سالیسیلیک اسید DNS (Sigma)(۱۸) به آن اضافه گردید. سپس نمونه ها بمدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار داده شده تا در اثر احیاء معرف DNS توسط قند احیا شده (گلوکز)، تغییر رنگ معرف از زرد به قرمز انجام پذیرد. برای پایداری رنگ معرف یک میلی لیتر محلول تارتارات مضاعف سدیم پتاسیم ٤۰ درصد به آن اضافه و جذب نوری آنها در طول موج ۵۷۵ نانومتر خوانده شد. در این آزمایش از گلوکز بعنوان استاندارد استفاده گردید.

یک واحد آنزیمی مقدار آنزیمی است که برای آزاد شدن یک میکرومول قند احیا شده بصورت گلوکز در مدت یک دقیقه لازم می باشد. برای اندازه گیری مقدار پروتئین از روش Bradford (۳) استفاده شد که در آن از پروتئین Bovine serum albomin(Rotch) (BSA) بعنوان استاندارد استفاده گردید.

نتایج

آنزیمهای سلولازی در قارچ تریکودرما بطور سینرژیسمی با همدیگر عمل کرده و موجب تجزیه سلولز می شوند. قطعات یا الیگومرهای حاصل از عمل آنزیم اندو گلوکاناز بعنوان سوبسترا برای آنزیم سلوبیوهیدرولاز عمل نموده و نهایتا دی ساکاریدهای حاصله توسط آنزیم بتاگلوکوزیداز به گلوکز تبدیل می شوند (۲). در این تحقیق جهت بررسی و مطالعه تولید آنزیم سلوبیوهیدرولاز از جدایه های مختلف قارچ تریکودرما استفاده گردید. اکثر جدایه های مورد مطالعه در این تحقیق بومی ایران بوده و در تحقیقات قبلی مورد شناسایی قرار گرفته اند (۱۵). برای تشخیص سریع حضور آنزیمهای سلولازی در جدایه های مختلف قارچ تریکودرما تعداد 10^5 اسپور از هر جدایه در شرایط کاملاً یکسان بطور جداگانه در محیط کشت حاوی swollen cellulose بعنوان سوبسترای آنزیمی تلقیح شدند. نتایج بدست آمده نشان داد که قطر هاله های شفاف در جدایه های مختلف متفاوت میباشد بطوریکه قطر آنها از یک تا ۱٦ میلی متر مشاهده گردید (شکل ۱).

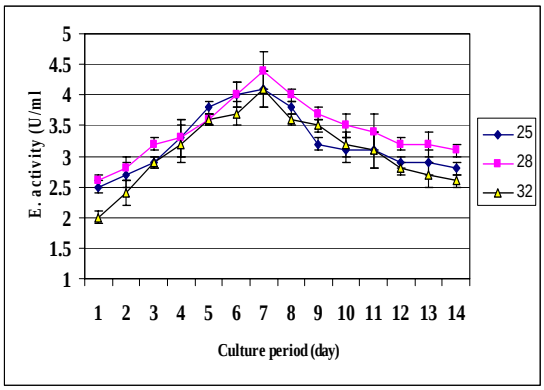


شکل ۱) نمونه ای از هاله شفاف ایجاد شده در اثر فعالیت آنزیمهای سلولازی در مقایسه با کنترل منفی

Archive of SID
www.SID.ir

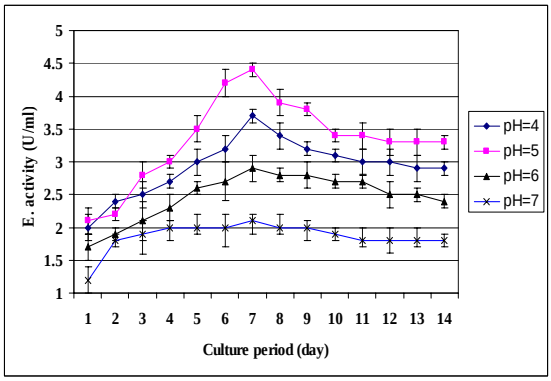
مقایسه نتایج بدست آمده نشان می دهد که از جدایه های تولید کننده آنزیمهای سلولازی مورد مطالعه جدایه *Trichoderma reesei* (PTCC 5142) با قطر هاله ۱٦ میلی متر بعنوان بیشترین و تعداد ۹ جدایه با قطر حدود ۱ میلی متر بعنوان کمترین تولید کننده های آنزیمهای سلولازی می باشند (نمودار ۱).

بررسی میزان تولید آنزیم سلوبیوهیدرولاز: عوامل مختلفی نظیر زمان کشت، دما، pH، نوع منبع کربن و عوامل القاء کننده میتوانند بر میزان تولید آنزیمهای سلولازی توسط قارچها مؤثر باشند. در این تحقیق جهت بررسی شرایط بهینه تولید آنزیم سلوبیوهیدرولاز، نقش عوامل فوق مورد مطالعه قرار گرفت. برای رسیدن به شرایط بهینه برای تولید این آنزیم ابتدا اثر دماهای ۲۵، ۲۸ و ۳۲ درجه سانتیگراد بمدت ۱٤ روز در تولید این آنزیم مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد و روز هفتم بیشترین فعالیت آنزیمی به میزان ٤/٤٥ U/ml مشاهده می گردد (نمودار ۲).



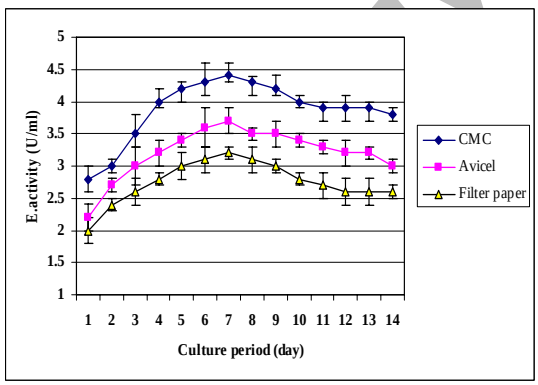
نمودار ۲) میزان تولید آنزیم سلوبیوهیدرولاز جدایه *T. reesei* (PTCC5142) در دماهای مختلف (۲۵، ۲۸ و ۳۲ درجه سانتیگراد) در طول ۱٤ روز

سپس فعالیت آنزیم سلوبیوهیدرولاز در pH های مختلف (٤، ٥، ٦ و ۷) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان می دهد که ماکزیمم فعالیت این آنزیم در روز هفتم، دمای ۲۸ درجه سانتیگراد و pH= ٥ می باشد (نمودار ۳).



نمودار ۳) میزان تولید آنزیم سلوبیوهیدرولاز جدایه *T. reesei* (PTCC5142) در pH های مختلف (٤، ٥، ٦ و ۷)

تأثیر منابع مختلف کربن (CMC، Avicel و Filter paper) بر میزان تولید آنزیم سلوبیوهیدرولاز در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد و pH برابر ٥ بمدت ۱٤ روز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که بیشترین میزان فعالیت آنزیم سلوبیوهیدرولاز به میزان ٤/٤ U/ml در حضور CMC بعنوان منبع کربن و در روز هفتم می باشد (نمودار ٤).

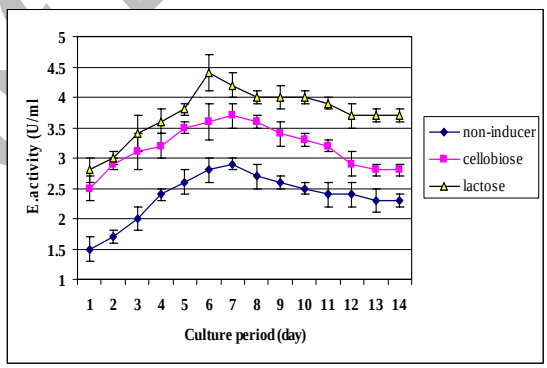


نمودار ٤) اثر منابع کربنی مختلف (CMC, Avicel, Filter paper) در میزان تولید آنزیم سلوبیوهیدرولاز جدایه *T. reesei* (PTCC5142)

مقایسه میزان تولید این آنزیم در حضور CMC با منابع کربنی Avicel و Filter paper نشان می دهد که میزان فعالیت این آنزیم در حضور CMC نسبت به منابع کربنی Avicel و Filter paper بترتیب به میزان ۱۹ و

Archive of SID
www.SID.ir

۳۷/۵ درصد افزایش نشان می دهد. در مرحله بعد اثر لاکتوز و سلوبیوز بعنوان عوامل القاء کننده بر میزان تولید آنزیم سلوبیوهیدرولاز در حضور CMC ، ۵ =pH و دمای ۲۸ درجه سانتیگراد در روزهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت. دراین بررسی مشخص گردید میتوان از لاکتوز بعنوان یک عامل القا کننده مناسب برای تولید آنزیم سلوبیوهیدرولاز استفاده نمود (نمودار ۵)، بطوریکه حضور لاکتوز در محیط کشت باعث افزایش تولید آنزیم به میزان ۵۲ درصد می شود درصورتیکه اثر سلوبیوز بعنوان عامل القاء کننده تنها باعث افزایش ۲۷ درصدی تولید این آنزیم می شود. ضمن اینکه افزایش لاکتوز نسبت به سلوبیوز به میزان حدود ۲۲ درصد میزان تولید آنزیم را افزایش می دهد.



نمودار ۵) بررسی اثر عوامل القاء کننده لاکتوز و سلوبیوز بر میزان تولید آنزیم سلوبیوهیدرولاز جدایه *T. reesei* (PTCC5142)

بررسی نتایج بدست آمده از شرایط فوق نشان می دهد که بهترین شرایط برای کشت جدایه ها و تولید آنزیم سلوبیوهیدرولاز در محیط کشت، عبارت از دمای ۲۸ درجه سانتیگراد، pH =۵، CMC بعنوان منبع کربن، لاکتوز بعنوان عامل القاء کننده و روز هفتم کشت می باشد.

برای بررسی و مقایسه تولید و فعالیت آنزیمی در ۳۰ جدایه قارچ تریکودرما، جدایه های قارچی در شرایط بهینه ذکر شده جهت تولید آنزیم، کشت داده شده و فعالیت آنزیم سلوبیوهیدرولاز در آنها مقایسه گردید.

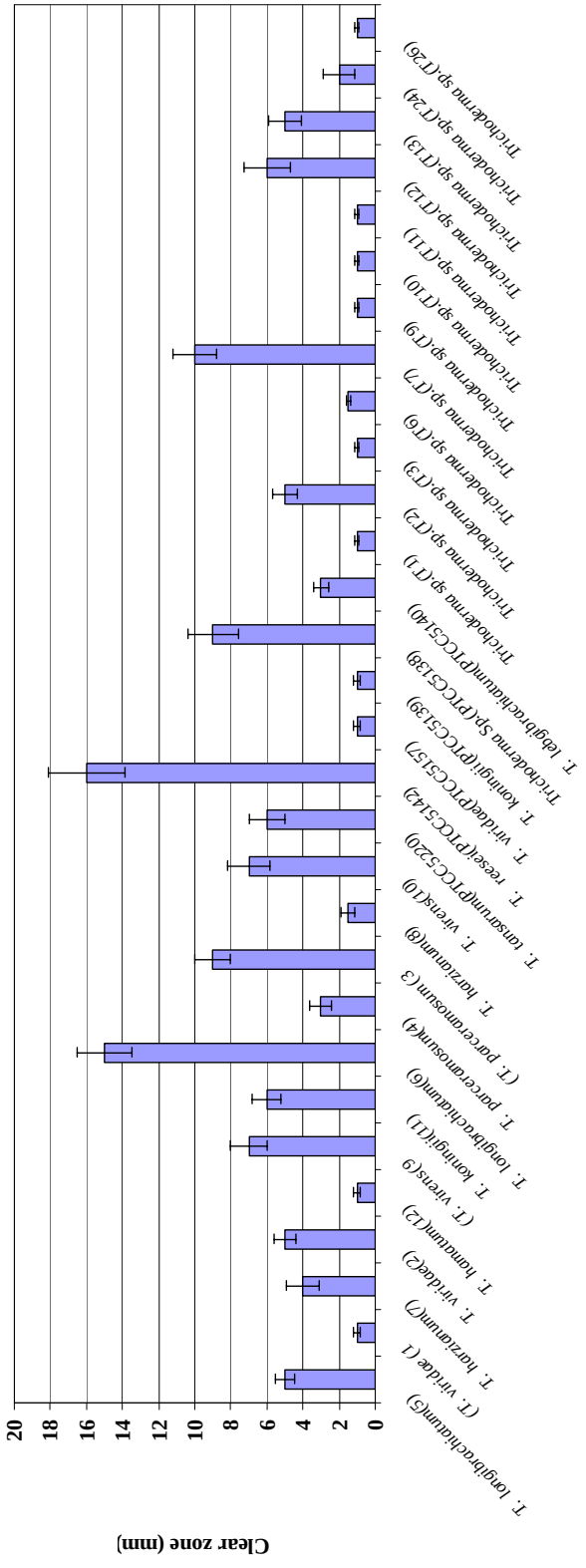
بررسی فعالیت آنزیمی جدایه های مورد مطالعه نشان می دهد که عمده این جدایه ها، توانایی مناسبی جهت تولید آنزیم سلوبیوهیدرولاز داشته، بطوریکه جدایه *T. reesei* (PTCC 5142) با فعالیت آنزیمی ٤/٤٥ U/ml بیشترین مقدار فعالیت آنزیمی را از خود نشان می دهد (نمودار ٦).

بحث

با توجه به تقاضای روزافزون انرژی جایگزین سوختهای فسیلی، امروزه تحقیقات وسیعی برای تبدیل مواد سلولزی به اتانل بعنوان یک منبع انرژی تجدید پذیر صورت گرفته است. سلولز فراوانترین ماده آلی قابل تجزیه می باشد که سالیانه حدود 10^{11} تن از آن در طبیعت تولید می گردد (۷). تبدیل سلولز به اتانل شامل دو فرایند می باشدکه عبارتند از: هیدرولیز سلولز به قندهای قابل تخمیر، و تخمیر این قندها به اتانل. هیدرولیز سلولز به دو روش شیمیایی و آنزیمی صورت می‌گیرد. با توجه به مشکلات هیدرولیز اسیدی سلولز، امروزه توجه بیشتری به هیدرولیز آنزیمی سلولز که بوسیله آنزیم های سلولازی انجام می‌گیرد معطوف شده است.

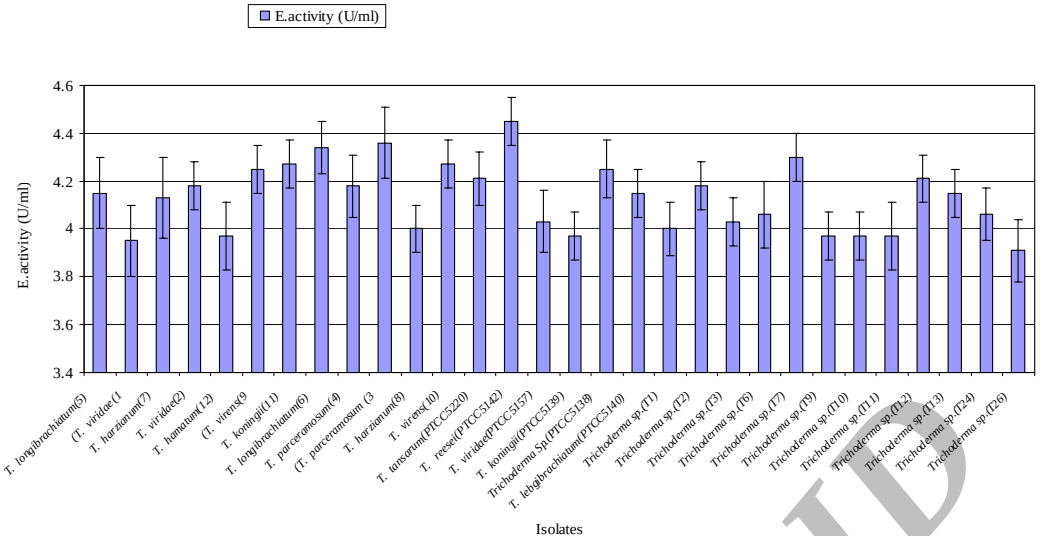
در این تحقیق عمدتاً از جدایه های بومی قارچ تریکودرما که در محیط swollen cellose دارای فعالیت سلولازی بودند جهت مطالعه تولید آنزیم سلوبیوهیدرولاز استفاده گردید. جهت بهینه سازی شرایط تولید آنزیم سلوبیوهیدرولاز در این تحقیق از جدایه *T. reessei* (PTCC 5142) استفاده شد. دلیل این امر فعالیت بالای این جدایه در تست غربالگری بین ۳۰ جدایه مورد مطالعه می باشد. نقش عوامل مختلف نظیر درجه حرارت (۲۸ تا ۳۰ درجه سانتیگراد)، pH (از pH برابر ۵ تا ٦/۵)، منابع کربن (CMC, Avicel, Filter paper) و عوامل القاء کننده ای نظیر لاکتوز و سلوبیوز در میزان تولید آنزیمهای سلولازی در منابع مختلف

Archive of SID
www.SID.ir



نمودار ۱) مقایسه قطر هاله شفاف ایجاد شده توسط جدایه های مختلف قارچ تریکودرما در تشخیص سریع فعالیت آنزیمهای سلولازی در محیط کشت مندلز حاوی swollen cellulose بعنوان سوبسترا

www.SID.ir



نمودار ٦) مقایسه میزان تولید آنزیم سلوبیوهیدرولاز جدایه های مختلف قارچ تریکودرما در شرایط بهینه تولید آنزیم (CMC، pH برابر ٥، ٢٨ درجه سانتیگراد، حضور لاکتوز و ٧ روز طول زمان کشت)

بررسی و گزارش شده است (٤، ٥، ٦، ٨، ١٠، ١٢ و ١٣). در تحقیق حاضر بررسی شرایط بهینه تولید این آنزیم نشان داد که در هفت روز اول کشت تولید آنزیم افزایش و پس از آن کاهش می یابد. Wen و همکاران (١٧) میزان تولید آنزیمهای سلولازی را در جدایه *T. reesei* ATCC56765 سویه Rut-C30 در طول دو هفته بررسی و نتایج آنها نشان داد که میزان تولید آنزیم در ٥ روز اول کشت افزایش یافته و در روزهای پنجم تا هشتم به حداکثر میزان خود رسیده و پس از آن بتدریج کاهش می یابد. Zaldivar و همکاران (١٩) نیز میزان تولید این آنزیمها را در قارچ *T. reesei* 7-121 در طول ١٤ روز بررسی نموده و روز هفتم و هشتم را بعنوان زمان تولید حداکثر این آنزیمها بیان نموده اند. مقایسه این نتایج با نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر نشان می دهد که جدایه *T. reesei* PTCC5142 نیز تقریباً در زمان مشابهی از محیط کشت حداکثر میزان تولید آنزیمهای سلولازی را از خود نشان می دهد.

تأثیر دمای محیط کشت بر میزان تولید آنزیمهای سلولازی توسط Nakari-Setale و Penttila (١١) در جدایه *T. resesei* سویه QM9414 مورد بررسی قرار گرفته است. آنها مشخص نموده اند که در دمای ٢٨ درجه سانتیگراد میزان تولید این آنزیمها به حداکثر خود می رسد. ضمن اینکه گزارشات نشان می دهد که جدایه *T. reesei* 7-121 نیز در دمای ٢٨ درجه سانتیگراد حداکثر میزان تولید آنزیم را نشان می دهد (١٩). این نتایج با نتایج بدست آمده از تأثیر دما (٢٨ درجه سانتیگراد) بر میزان تولید آنزیم مورد مطالعه در این تحقیق بر جدایه *T. reesei* PTCC5142 مطابقت دارد.

از عوامل مهم تأثیر گذار بر روند تولید آنزیمهای سلولازی pH محیط کشت می باشد، بطوریکه در مطالعات مختلف که گونه های متفاوتی از جنس تریکودرما جهت تولید این آنزیمها مورد استفاده قرار گرفته اند گزارش شده است که در pH برابر ٦ بیشترین میزان تولید صورت می گیرد (١١، ١٧ و ١٩) درحالیکه جدایه مورد استفاده در این تحقیق در pH برابر ٥ بیشترین میزان تولید آنزیم را از خود نشان می داد و در pH برابر ٦ از میزان تولید آن کاسته می شد. افزایش لاکتوز بعنوان عامل القاء کننده به محیط کشت قارچ نیز

Archive of SID
www.SID.ir

باعث افزایش نسبی تولید آنزیم سلوبیوهیدرولاز می شود.

با توجه به نتایج بدست آمده از این تحقیق در بهینه سازی شرایط تولید آنزیم و مقایسه جدایه های مختلف تریکودرما در شرایط فوق و انتخاب جدایه برتر (*T. reesei* PTCC5142) از نظر تولید آنزیم مورد مطالعه، می توان از این جدایه برای مطالعه تولید انبوه این آنزیم جهت مصارف صنعتی استفاده نمود.

منابع

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

2-Beguin, P. (1990). Molecular Biology of Cellulose Degradation. Annu. rev. Microbiol. **44**: 219-248.

3-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.

4-Chen, S., and M. Wayman. (1991). Cellulose production induced by carbon sources derived from waste newspaper. Procces Biochem. **26**: 93-100.

5-Domingues, F.C.; J.A., Queiroz; J.M.S., Cabral; L.P., Fonseca. (2000). The influence of culture condition on mycelial structure and cellulose production by Trichoderma reesei Rut C-30. Enzyme Microbial Technol. **26**: 394-401.

6-Esterbauer, H.; W., Labudova; A., Hermann; M., Hayn (1991). Production of *Terichoderma* cellulose in laboratory and pilot scale. Bioresource Technology **36**: 51-65.

7-Kim,J.O., Park, S.R., Lim, W.J., Ryu, S.K., Kim, M.K., An, C.L., Cho, S.J., Park, Y.W., and Kim, M.K. (2000). Cloning and characterization of thermostable endoglucanase (Cel8Y) from the hyperthermophilic *Aquifex aeolicus* VF5. Biochemical and Biophysical Research communications. **279**: 420-426.

8-Liming, X. and S. Xueliang. (2004). High-yield cellulose production by *Trichoderma reesei* ZU-02 on corn cob residue. Bioresoure Technology **91**: 259-262.

9-Linko, M. (1977). An evoluation of enzymatic hydrolysis of cellulostic materials. Adv. Biochem. Eng. **5**: 27-46.

10-Maheshwari, D.K.; S., Gohade; J., Paul; A. Varma (1994). Paper mill sludge as a potential source for cellulose production by *Trichoderma reesei* QM9123 and *Aspergillus niger* using mixed cultivation. Carbohydrate Polym. **23**: 161-163.

11-Nakari T., Penttila M. (1995). Production of *Trichoderma reesei* cellulases on glucose – containing media. Applied and Environmental Microbiology, **61**(10): 3650-3655.

12-Persson, I.; F., Tjerneld; B., Hahn-Hagerdahl (1991). Fungal cellulytic enzyme production: a review. Process Biochem. **26**: 65-74.

13-Reczey, K.; Z.S., Szengyel; R., Eklund; G., Zacchi (1996). Cellulase production by *Trichoderma reesei*. Bioresource Technology **57**: 25-30.

14-Schulein, M. (2000). Protein engineering of cellulase, Biochemica et Biophysica Acta : 239-252

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

16-Sun, Y., and Cheng, J. (2001). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production. Bioresource Technology **38**: 1-11.

17-Wen Z., Liao W., Chen S.. (2005). Production of cellulase by *Trichoderma reesei* from dairy manure. Bioresource Technology **96**: 491-499.

18-Wood, T. M. and Bhat M. (1998). Methods for measuring cellulase activities. Methods Enzymol. **160**:87-112.

19-Zaldivar, M., Velasquez, J. C., Contreras, I., and Perez, L. M. (2001). *Trichoderma auroviride* 7-121, a mutant with enhanced production of lytic Enzymes: its potentioal use in wast cellulose degradation and/or biocontrol. EJB Electronic Journal of Biotechnology **4**(3): 1-7.

Archive of SID
www.SID.ir

The study of cellobiohydrolase production from *Trichoderma reesei*

Ghoujeghi F[1]., Motallebi M.[2], and Zamani M. R.[2]

[1]**Biology Dept., Faculty of Science, Razi Univ., Kermanshah, Iran.**

[2]**National Institute for Genetic Engineering & Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran**

Abstract

Cellobiohydrolase is one of the cellulase enzymes which is involved in degradation of cellulose, the most abundant biopolymer in nature. *Trichoderma* species are known as a usefull source of cellulytic enzymes.

In this research cellulase enzymes activity in 30 isolates of *Trichoderma* sp. were studied by rapid screening on medium containing swollen cellulose and isolate *Trichoderma reesei* (PTCC5142) was selected on the basis of clearing zone diameter (16 mm). The enzyme activity was measured in the optimum conditions for production of cellobiohydrolase enzyme in *Trichoderma*. In order to obtain the optimum conditions: the selected isolate was grown in Mandels media with CMC, Avicel and Filter paper as carbon source at pH 4, 5,6, and7. Lactose and cellubiose were added to media as inducer agents. Media were incubated at different temperatures (25, 28 and 32ºC) for 14 days. Samples were collected in 24h intervals, and enzyme activity was measured. Results showed that the optimum conditions for hyperproduction of cellobiohydrolase were pH=5, CMC as carbon source, temperature 28 ºC, lactose as inducer on 7th day. After screening the cellobiohydrolase activity of all 30 isolates in the optimized conditions, results showed that isolate *Trichoderma reesei* (PTCC5142) with the highiest enzyme activity (4.45U/ml) was the best producer of cellobiohydrolase enzyme.

Key words: cellobiohydrolase – *Trichoderma*- cellulose- cellulase enzymes.

Archive of SID

www.SID.ir