Archive of SID

بررسی میزان تولید و فعالیت آنزیم بتا ۱و۳ گلوکاناز در جدایه های مختلف قارچ تریکودرما

نوشین بهرامسری[۲]، محمدرضا زمانی[۱] و مصطفی مطلبی[۱]

[۱]پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

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

چکیده

بتاگلوکان هموپلیمر خطی از واحد های دی گلوکز است که با پیوند های بتاگلیکوزیدی به یکدیگر متصل شده اند. این ترکیب یکی از اجزاء اصلی تشکیل دهنده دیواره سلولی قارچها است و بهمراه ترکیباتی همچون کیتین و انواع پروتئینها باعث حفظ استحکام دیواره سلولی قارچها می شود. آنزیمهای بتاگلوکاناز این پلیمر را با شکستن اتصالات بتاگلیکوزیدی میان زیر واحد ها، به اجزاء سازنده آن تجزیه می کنند. قارچ رشته ای تریکودرما بدلیل ترشح آنزیم بتا ۱و۳ گلوکاناز، بعنوان عاملی قوی در کنترل بیولوژیک بیماریهای قارچی مورد استفاده قرار می گیرد. در این تحقیق جهت دستیابی به جدایه قارچی با توان تولید آنزیمی مناسب تعداد ۳۰ جدایه قارچ از گونه های مختلف تریکودرما مورد مطالعه قرار گرفت. جهت مطالعه شرایط بهینه تولید آنزیم بتا ۱و۳ گلوکاناز نقش عوامل مختلف محیطی نظیر تغییرات pH، دما، طول مدت کشت و شرایط هوادهی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که شرایط بهینه تولید این آنزیم عبارت است از pH برابر ۵، مدت کشت ٤۸ ساعت، دما ۲۲ درجه سانتیگراد و در حالت سکون می باشد. شرایط مناسب برای فعالیت این آنزیم عبارت از pH برابر ۵ و دمای ۵۰ درجه سانتیگراد تعیین گردید. مقایسه جدایه های مختلف قارچ تریکودرما از نظر تولید این آنزیم در شرایط بهینه نشان داد که جدایه *T. reesei* با فعالیت ویژه آنزیمی ۲۲/۰۷ U/mg و جدایه *T. viridae*1 با فعالیت ویژه آنزیمی ٤/۷۱ U/mg بترتیب فعالترین و ضعیفترین جدایه ها می باشد

واژه های کلیدی: تریکودرما- بتا ۱ و۳ گلوکاناز- فعالیت آنزیمی

مقدمه

مهمترین عوامل شرکت کننده در کنترل بیولوژیک قارچها و باکتریهای سازگار با محیط اطراف ریشه (Rhizospher) گیاهان می باشند. این ارگانیسمها به روشهای گوناگون بر علیه عوامل بیماریزای گیاهی فعالیت آنتاگونیستی انجام می دهند. یکی از مهمترین این روشها استفاده ازآنزیمهای هیدرولازی نظیر کیتیناز و گلوکاناز است که باعث نابودی و فرو پاشیدن ساختار سلولی عوامل بیماریزای گیاهی می گردد. از آنجا که دیواره سلولی، نخستین و مهمترین سد در برابر آنزیمهای هیدرولازی است، از بین بردن اجزای تشکیل دهنده دیواره قارچی از جمله کیتین و گلوکان وظیفه اختصاصی بسیاری از این آنزیمها می باشد(۷).

مطالعه ساختمان دیواره قارچها نشان می دهد که تقریباً، الگوی کلی ساختمان دیواره (شامل ملکولهای بتا گلوکان، شبکه ای از گلیکوپروتئینها و میکروفیبریلهای کیتین) است که اکثراً در رده های مختلف قارچها مشابه بوده و تنها نسبت ترکیبات تغییر می کند (۳) . بتاگلوکان هموپلیمری از منومر دی گلوکز است که با فرم بتا بهم متصل شده و از فراوان ترین رده پلی ساکاریدهای موجود در طبیعت است (۷ و ۱۲).

www.SID.ir

Archive of SID

یکی از ویژگیهای قابل توجه بسیاری از موجودات زنده تولید آنزیمهای تجزیه کننده بتاگلوکان بوده و قارچها بعنوان مهمترین تولید کننده های آنزیمهای بتاگلوکاناز مورد توجه می باشند. بتا گلوکاناز های بدست آمده از قارچها نه تنها در گونه های مختلف، بلکه در یک موجود زنده دارای ویژگیهای فیزیکو شیمیایی متفاوتی می باشند. بعنوان مثال وزن مولکولی آنها بطور معمول بین ۲۰ تا ۸۰ کیلو دالتون متغیر است (۱۲). بهترین pH گزارش شده برای فعالیت این آنزیمها بین ٤ تا ٦ است، هر چند در این زمینه نیز استثنا هایی وجود دارد. بطوریکه بعضی از آنها در pH بالاتر از ۷ و بعضی در pH های کمتر از ٤ فعالند. دمای مناسب برای حفظ پایداری این آنزیمها، بدون در نظر گرفتن استثنا های موجود، ۵۰ تا ٦۰ درجه سانتیگراد می باشد (۱۲).

مطالعه آنزیمهای بتا ۱و۳ گلوکاناز در قارچ تریکودرما نشان می دهد که در این قارچ انواعی از آنزیمهای Endo-β-1,3-glucanase تولید و ترشح می شود. طبق مطالعات انجام شده، بیشترین میزان تولید و ترشح این آنزیمها در حضور سوبسترای اختصاصی آنها، لامینارین (بتا ۱و۳ گلوکان)، و نیز دیواره سلولی قارچهایی نظیر *Rhizoctonia solani*، *Sclerotium rolfsii* و *Saccharomyces cerevisiea* و کمترین میزان آن در حضور گلوکز قابل مشاهده است (۲، ۵، ۷، و ۲۱).

بررسی آنزیمهای Endo-β-1,3-glucanase در گونه های مختلف قارچ تریکودرما نشان داده است که تفاوتهای بسیاری در ویژگیهای مولکولی این آنزیمها وجود دارد. بعنوان مثال آنزیم استخراج شده از قارچ *T. longibrachiatum* دارای وزن مولکولی ۷۰kDa، pH بهینه فعالیت ۵ می باشد (۱٦ و ۲۲). در حالیکه در گونه *T. harzianum* این آنزیم دارای وزن مولکولی ۳٦ کیلو دالتون و pH بهینه فعالیت ٤/٤ می باشد (۱۱).

مواد و روشها

جدایه های قارچ تریکودرما و محیط کشت نگهداری: تعداد ۳۰ جدایه قارچ تریکودرما مورد استفاده در این تحقیق که اکثر آنها از مناطق مختلف ایران جمع آوری و شناسایی شده بودند (۱۵) در جدول شماره ۱ ارائه شده است. جهت نگهداری قارچ از محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar) استفاده گردید، که برای تهیه آن پودر PDA بمیزان ۳۹ گرم در لیتر در آب حل و سترون گردید.

تولید و سنجش فعالیت آنزیم بتا ۱و۳ گلوکاناز: برای القاء آنزیم بتا ۱و۳ گلوکاناز در محیط کشت قارچ تریکودرما، از دیواره سلولی قارچ *Rhizoctonia solani* که حاوی مقادیر فراوانی بتا ۱و۳ گلوکان است، بعنوان سوبسترا استفاده شد. تهیه این سوبسترا از روش تغییر یافته Vazquez-Garciduenas و همکاران (۲۱) و بشرح ذیل انجام گردید. ابتدا قارچ فوق را در محیط RCM (Rhizoctonia Culture Medium) حاوی ۲۰ گرم گلوکز، ۱۰ گرم $(NH4)_2SO_4$، ۱۰ گرم KH_2PO_4، ۱۰ گرم NaCl، ۰/۵ گرم $MgSO_4.7H_2O$ در حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر با pH= ٦/۵ کشت داده و پس از شش روز میسلیوم قارچ با صافی از محیط کشت، جمع آوری گردید. برای اطمینان از عدم وجود گلوکز در توده حاصل، آنرا چند بار با آب مقطر شستشه، سپس با افزودن بافر فسفات پتاسیم ۲۰ میلی مولار با pH= ۷ و به نسبت ۵ به ۱ (v/w) بحالت سوسپانسیون در آمد. جهت تخریب دیواره سلولی قارچ و جدا شدن سیتوزول مخلوط حاصل بمدت ۳۰ دقیقه با هموژنایزر یکنواخت گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱) لیست جدایه های قارچ تریکودرمای مورد استفاده در این تحقیق.

نام جنس و گونه	شماره جدایه	محل جمع آوری
Trichoderma longibrachiatum	5	تلاسر (گیلان)
Trichoderma viridae	1	رزوان شهر (گیلان)
Trichoderma harzianum	7	پرش کوه (گیلان)
Trichoderma viridae	2	فتالم (گیلان)
Trichoderma hamatum	12	رشت (گیلان)
Trichoderma virens	9	رشت (گیلان)
Trichoderma koningii	11	ارومیه
Trichoderma longibrachiatum	6	خاک سر (گیلان)
Trichoderma parceramosum	4	خاک سر (گیلان)
Trichoderma parceramosum	3	فجر (گیلان)
Trichoderma harzianum	8	زاله پر (گیلان)
Trichoderma virens	10	دانشکده کشاورزی همدان
Trichoderma tansarum	PTCC 5220	سویه بومی ایران
Trichoderma reesei	PTCC 5142	CBS 383.78(هلند)
Trichoderma viridae	PTCC 5157	36268 Paris Historic Natural Museum
Trichoderma koningii	PTCC 5139	CBS 124.79(هلند)
Trichoderma Sp.	PTCC 5138	سویه بومی ایران
Trichoderma sp.	T1	کرمان
Trichoderma sp.	T2	کرمان
Trichoderma sp.	T3	کرمان
Trichoderma sp.	T6	کرمان
Trichoderma sp.	T7	کرمان
Trichoderma sp.	T9	کرمان
Trichoderma sp.	T10	کرمان
Trichoderma sp.	T11	کرمان
Trichoderma sp.	T12	کرمان
Trichoderma sp.	T13	کرمان
Trichoderma sp.	T24	کرمان
Trichoderma sp.	T26	کرمان

پس از یکنواخت کردن سوسپانسیون فوق، آنرا بمدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۰ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ (۲۵۰۰×g) و رسوب حاصل دوباره با بافر فسفات پتاسیم مخلوط شد. این فرایند تا بدست آوردن دیواره سلولی قارچ ادامه یافت. رسوب نهایی لیوفیلیزه شد و برای القای تولید آنزیم بتا ۱و۳ گلوکاناز استفاده گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

برای سنجش فعالیت آنزیم بتا ۱و۳ گلوکاناز در قارچ تریکودرما، ابتدا این قارچ در محیط مایع و معدنی SM ، حاوی ۲ گرم در لیتر سوبسترا (لامینارین) کشت داده شد (۲۳). پس از طی مدت زمان لازم برای رشد قارچ (۲٤، ٤۸، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت)، و با استفاده از کاغذ صافی سترون، کشتها صاف شدند. از محیط کشت صاف شده بعنوان محلول حاوی پروتئینهای ترشحی استفاده گردید. به محلول بدست آمده که حاوی آنزیم بتا ۱و۳ گلوکوناز میباشد، استن سرد به نسبت ۱:۱ را افزوده و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد قرار داده شد. مخلوط حاصل پس از ۱۲ ساعت در دمای ٤ درجه سانتیگراد بمدت۲۰ دقیقه سانتریفیوژ (۱۲۰۰۰×g) گردید. رسوب حاصل، در یک میلی لیتر بافر استات ۵۰ میلی مولار با pH= ۵ حل و از آن بعنوان منبع آنزیم استفاده شد. برای بهینه سازی شرایط واکنش، ابتدا واکنش آنزیمی در pH های ۸،۷،٦،۵،٤،۳ و دمای ٤۰، ٤۵، ۵۰ ،۵۵ و ٦۰ درجه سانتیگراد مورد بررسی قرار گرفت.. در این آزمایشها برای تنظیم pH های ۳، ٤ و۵ از بافر استات ۵۰ میلی مولار و جهت تنظیم pH های ٦، ۷، ۸ و ۹ از بافر فسفات ۲۰ میلی مولار استفاده گردید.

مخلوط واکنش آنزیمی شامل ۲۵۰ میکرولیتر محلول پروتئینی حاوی آنزیم و ۲۵۰ میکرولیتر محلول ۰/۵ درصد سوبسترا می باشد. این مخلوط بمدت یک ساعت در دمای بهینه برای فعالیت آنزیم بتا ۱و۳ گلوکاناز قرار داده شده و بمدت یک دقیقه سانتریفیوژ (٦۰۰۰×g) گردید.

برای سنجش میزان گلوکز آزاد شده در اثر فعالیت آنزیم، روش Nelson-Somogyi بکار رفت (۱۰ و ۱۸) و از گلوکز بعنوان استاندارد استفاده شد. واحد فعالیت آنزیم بتا ۱و۳ گلوکاناز (U)، برابر با مقدار آنزیمی است که می تواند در مدت یک دقیقه واکنش، در دما و pH مشخص یک میکرومول گلوکز را در یک میلی لیتر مخلوط واکنش آزاد نماید.

اندازه گیری مقدار پروتئین با روش Bradford (۱) انجام شد که و پروتئین Bovine serum (BSA) albomin برای تهیه منحنی استاندارد استفاده گردید. فعالیت ویژه آنزیمی ، بصورت مقدار فعالیت آنزیم(U/ml) بمقدار کل پروتئین (µg/ml) موجود در محیط، تعریف می شود.

در این تحقیق، برای بدست آوردن پروتئینهای ترشحی از جمله آنزیم بتا ۱ و ۳ گلوکاناز مورد نیاز جدایه ها انتخاب شده در ارلنهای ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت مایع SM حاوی ۲۰ گرم در لیتر سوبسترا (دیواره سلولی قارچ *Rhizoctonia* sp. بدست آمده) تلقیح و سپس محیط کشتها به انکوباتور منتقل شدند. برای بررسی شرایط بهینه تولید آنزیم نقش تغییرات pH، دما، طول زمان کشت و در نهایت شرایط هوا دهی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، از سه ایزوله انتخاب شده، کشتهایی در pH های ۳، ٤، ۵، ٦، ۷، ۸ و ۹، دمای ۲۰، ۲۲،۲۵،۲۸ و۳۱ درجه سانتیگراد، و طول مدت کشت ۲٤، ٤۸، ۷۲ و ۱۲۰ساعت در حالت تکان خوردن (Shaking و ۱۰۰ دور در دقیقه) و سکون (non-shaking) تهیه گردید. در حالت سکون کشت در پتری کم عمق با قطری ۹ سانتیمتر انجام شد.

پس از تعیین شرایط بهینه تولید و فعالیت آنزیم، ۳۰ جدایه تریکودرما در شرایط بدست آمده کشت داده شد و میزان فعالیت آنزیمی آنها در شرایط بهینه واکنش تعیین گردید.

نتایج و بحث

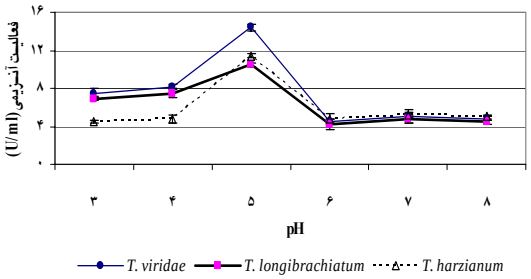
در این تحقیق جهت دستیابی به جدایه قارچی که از توان تولید آنزیمی مناسبی برخوردار باشد تعداد ۳۰ جدایه قارچ از گونه های مختلف تریکودرما مورد

www.SID.ir

Archive of SID

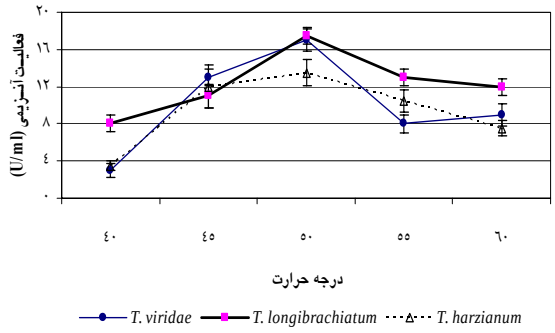
مطالعه قرار گرفت. با توجه به اینکه شرایط تولید و فعالیت آنزیم بتا ۱و۳ گلوکاناز در گونه های مختلف جنس تریکودرما متفاوت گزارش شده است (٤، ٦، ۲۱)، برای تعیین شرایط بهینه تولید و فعالیت این آنزیم در جدایه های مورد مطالعه، نقش مهمترین فاکتورهای مؤثر در سه جدایه قارچی مختلف (*T. harzianum7*، *T. longibrachiatum5* و *T. viridae1*) که بصورت تصادفی انتخاب شده بودند مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت.

شرایط بهینه سنجش فعالیت آنزیم بتا ۱و۳ گلوکاناز: در بررسی شرایط بهینه فعالیت آنزیم بتا ۱و۳ گلوکاناز، دو عامل دما و pH جهت سنجش فعالیت این آنزیم مورد مطالعه قرار گرفت. در گزارشات موجود pH های ٤/٤، ۵/۰ و۵/۵ بعنوان pH های مناسب برای فعالیت آنزیم بتا ۱و۳ گلوکاناز ذکر شده است (٤، ۵ و ۱۹). بنابراین فعالیت این آنزیم در pH های ۳، ٤، ۵، ٦، ۷ و ۸ مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه این بررسیها نشان می دهد که بیشترین فعالیت آنزیم در pH = ۵ صورت می گیرد (شکل ۱).



شکل ۱) pH بهینه برای فعالیت آنزیم بتا ۱و۳ گلوکاناز قارچهای انتخابی فوق. فعالیت آنزیمی در pH های مختلف اندازه گیری شده است.

در گزارشهای مختلف، آنزیم بتا ۱و۳ گلوکاناز بعنوان یک آنزیم مقاوم به حرارت نسبتاً بالا معرفی شده است و شرایط مطلوب برای فعالیت این آنزیم بین ٤۵ تا ۵۵ درجه سانتیگراد ذکر شده است (۱۲ و ۲۱). بدین منظور فعالیت این آنزیم در سه جدایه انتخابی، در دماهای ٤۰، ٤۵، ۵۰، ۵۵ و ٦۰ درجه سانتیگراد اندازه گیری گردید. نتایج حاصله نشان داد که هر سه جدایه مورد مطالعه در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد بیشترین فعالیت آنزیمی را از خود نشان می دهند(شکل ۲). بنابراین در این تحقیق جهت سنجش میزان فعالیت آنزیم بتا ۱و۳ گلوکاناز در قارچ تریکودرما از pH= ۵ و دمای ۵۰ درجه سانتیگراد در واکنش آنزیمی استفاده گردید.



شکل ۲) دمای بهینه برای فعالیت آنزیم بتا ۱و۳ گلوکاناز قارچهای انتخابی فوق. فعالیت آنزیمی در دماهای مختلف اندازه گیری شده است.

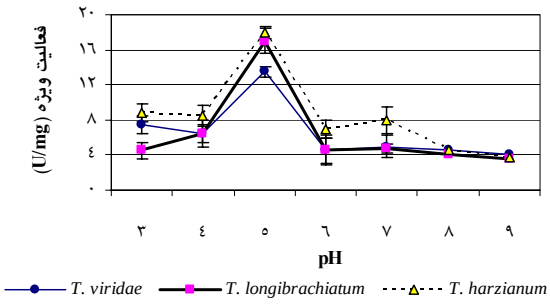
شرایط بهینه تولید آنزیم بتا ۱و۳ گلوکاناز: در بررسی شرایط بهینه تولید آنزیم بتا ۱و۳ گلوکاناز، نقش فاکتورهای pH، دما، طول زمان کشت و در نهایت هوادهی، در سه جدایه انتخاب شده مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی میزان فعالیت آنزیمی در شرایط بهینه بدست آمده اندازه گیری شد.

با توجه به اینکه طیف نسبتا وسیعی از pH برای تولید آنزیم بتا ۱و۳ گلوکاناز گزارش شده است (۲ و ۱۲). سه جدایه مورد مطالعه در این تحقیق در pH های ۳، ٤، ۵، ٦، ۷، ۸ و ۹ کشت داده شد و تولید آنزیم در آنها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصله نشان داد که بیشترین میزان آنزیم بتا ۱و۳ گلوکاناز تولید شده در pH=۵ است (شکل ۳). حداکثر مقدار تولید آنزیم در

www.SID.ir

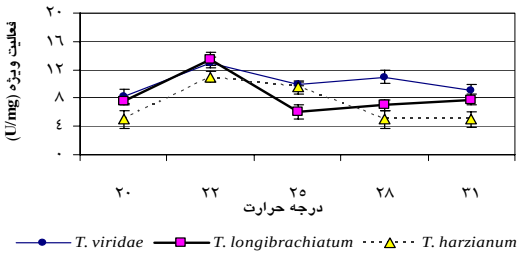
Archive of SID

سه جدایه *T. viridae*، *T. longibrachiatum* و *T. harzianum* بترتیب برابر ۱۳/۵، ۱۷ و ۱۸ U/mg می باشد.



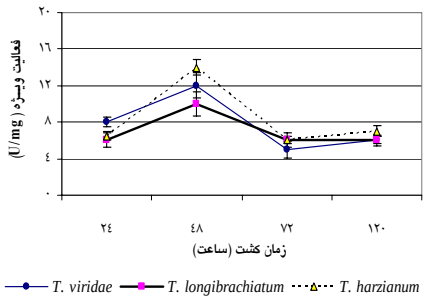
شکل ۳) pH بهینه برای تولید آنزیم بتا ۱و۳ گلوکاناز ترشحی از قارچهای انتخابی فوق در محیط کشت. فعالیت ویژه آنزیمی در pH های مختلف اندازه گیری شده است.

دمای بهینه برای تولید آنزیم مورد بحث، بین ۲٤ تا ۲۸ درجه سانتیگراد گزارش شده است (۲، ۱۳ و ۲۰). لذا تولید آنزیم بتا ۱و۳ گلوکاناز در این سه جدایه، در دماهای ۲۰، ۲۲، ۲۵، ۲۸ و ۳۱ درجه سانتیگراد مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه نتایج بدست آمده نشان می دهد که بیشترین میزان تولید این آنزیم در دمای ۲۲ درجه سانتیگراد صورت می گیرد و در قارچهای *T. viridae*، *T. longibrachiatum* و *T. harzianum* بترتیب برابر ۱۳، ۱۳/۵ و ۱۱ U/mg می باشد(شکل ٤).



شکل ٤) دمای بهینه برای تولید آنزیم بتا ۱و۳ گلوکاناز ترشحی از قارچهای انتخابی فوق در محیط کشت. فعالیت ویژه آنزیمی در دماهای مختلف اندازه گیری شده است.

اطلاعات موجود در خصوص مناسبترین زمان برای تولید آنزیم بتا ۱و۳ گلوکاناز در کشت قارچ تریکودرما محدوده زمانی بین ۹٦-٤۸ ساعت را شامل می شود (۲، ۸، ۱٤ و ۲۱). بدین منظور اثر زمان کشت بر تولید آنزیم بتا ۱و۳ گلوکاناز در سه گونه مورد مطالعه در زمانهای ۲٤، ٤۸، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از مطالعه فوق نشان داد که بیشترین میزان فعالیت ویژه آنزیم، بعد از ٤۸ ساعت بدست می آید. بنابراین دوره کشت ٤۸ ساعت زمان بهینه برای تولید آنزیم بتا ۱و۳ گلوکاناز در نظر گرفته می شود. مقدار تولید آنزیم بتا ۱و۳ گلوکاناز پس از ٤۸ ساعت در سه جدایه *T. viridae*، *T. longibrachiatum* و *T. harzianum* بترتیب برابر ۱۲، ۱۰ و ۱٤ U/mg می باشد (شکل ۵).



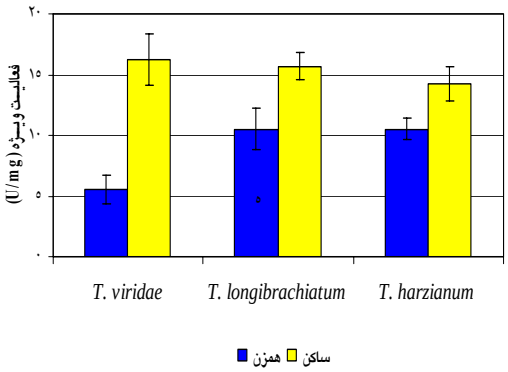
شکل ۵) زمان بهینه برای تولید آنزیم بتا ۱و۳ گلوکاناز ترشحی از قارچهای انتخابی فوق در محیط کشت. فعالیت ویژه آنزیمی در زمانهای مختلف اندازه گیری شده است.

جهت بررسی نقش هوادهی در تولید آنزیم بتا ۱و۳ گلوکاناز سه جدایه انتخابی تریکودرما، قارچها در دوحالت تکان خوردن و سکون کشت داده شد و پس از ٤۸ ساعت، فعالیت ویژه آنزیمی در آنها مقایسه گردید. مقایسه نتایج بدست آمده از این آزمایش نشان می دهد که میزان تولید این آنزیم در حالت سکون در قارچهای *T. viridae*، *T. longibrachiatum* و *T. harzianum* بترتیب بمقدار ۲/۹، ۱/۵ و ۱/۳ برابر بیشتر از حالت

www.SID.ir

Archive of SID

تکان خوردن آنها می باشد (شکل ٦). باید توجه داشت که در حالت سکون قارچ در سطح محیط کشت مایع در پلیتهای ۹ سانتیمتری با عمق کم، می تواند بسرعت بصورت هوازی رشد نماید لذا تولید آنزیم در کوتاه مدت (٤٨ ساعت) در این حالت قابل توجه می باشد. در صورتیکه در حالت تکان خوردن قارچ بیشتر بصورت غوطه ور در محیط مایع رشد می نماید لذا فرصت کافی جهت تولید مقدار قابل ملاحظه آنزیم در این مدت برای قارچ فراهم نخواهد بود.



شکل ٦) بررسی اثر Shaking/ non-shaking در تولید آنزیم بتا ۱و۳ گلوکاناز ترشحی از قارچهای انتخابی فوق در محیط کشت. فعالیت ویژه آنزیمی در شرایط shaking و non-shaking اندازه گیری شده است.

با توجه به بررسیهای انجام شده بنظر می رسد شرایط بهینه تولید آنزیم بتا ۱و۳ گلوکاناز در محیط کشت عبارت از: pH= ۵، ٤٨ ساعت کشت، دمای ۲۲ درجه سانتیگراد و در حالت سکون می باشد.

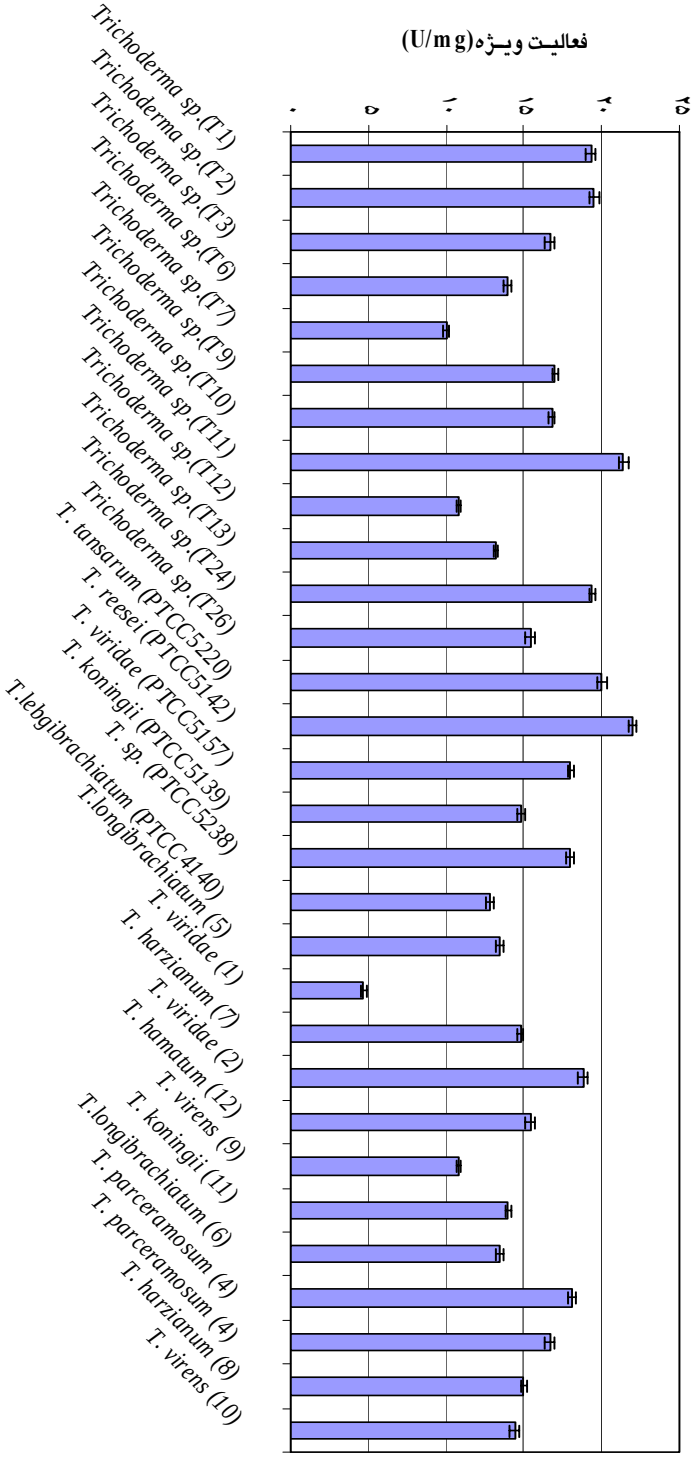
مقایسه فعالیت آنزیم بتا ۱و۳ گلوکاناز در جدایه های مختلف تریکودرما: برای بررسی و مقایسه تولید و فعالیت آنزیم بتا ۱و۳ گلوکاناز در ۳۰ جدایه قارچ تریکودرمای مورد مطالعه، جدایه های قارچی در شرایط بهینه بدست آمده جهت تولید آنزیم، کشت داده شده و فعالیت ویژه آنزیمی در آنها مقایسه گردید. بررسی فعالیت ویژه آنزیمی جدایه های مورد مطالعه نشان می دهد که این جدایه ها، از نظر تولید این آنزیم، تنوع نسبتاً زیادی را از خود نشان می دهند (شکل ۷)، ضمن اینکه، جدایه *T. reesei* (PTCC5142) با فعالیت ویژه آنزیمی ۲۲/۰۷ U/mg و جدایه *T. viridae1* با فعالیت ویژه آنزیمی ٤/۷۱ U/mg ، بترتیب، بعنوان فعالترین و ضعیفترین جدایه از نظر تولید آنزیم مشخص شدند (شکل ۷) .

مطالعات انجام شده در این تحقیق نشان می دهد که جدایه *T. reesei* نسبت به جدایه های سایر گونه های تریکودرما از پتانسیل فعالیت آنزیم بتا ۱و ۳ گلوکانازی بیشتری برخوردار می باشد، لذا می تواند در تحقیقات بعدی بعنوان یک عامل بیوکنترل مناسب جهت مبارزه با قارچهای بیماریزا، مورد مطالعه و بررسیهای دیگر نظیر مطالعات گلخانه ای قرار گیرد.

سپاسگزاری: هزینه اجرای این پژوهش از طریق طرح مطالعات و تحقیقات بین دانشگاهی در راستای اهداف برنامه سوم توسعه با شماره ۳۱۳۰۳۳۹۵ تأمین شده است که بدین وسیله از سازمان مدیریت و برنامه ریزی کشور و پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری (طرح ۱۷۱) سپاسگزاری می شود.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۷) میزان فعالیت ویژه آنزیم بتا ۱و ۳ گلوکاناز در ۳۰ ایزوله قارچ تریکودرما

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

1- 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.

2- De la Cruz, J., Pintor-Toro, J. A., Benitez, T., and Llobell, N. (1995). Purification and Characterization of an Endo-β-1,6-Glucanase from *Trichoderma harzianum* That Is Related to Its Mycoparasitism. Journal of Bacteriology *177*, 1864-1871.

3- Deacon, J. W. (1997). Modern Mycology, 3rd edition Edition (Edinburgh: Blackwell Science Ltd).

4- Donzelli, B. G. G., Lorito, M., Scala, F., and Harman, G. E. (2001). Cloning, Sequence and Structure of a Gene Encoding an Antifungal Glucan 1,3-β-Glucosidase from *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum*). Gene *277*, 199-208.

5- Dubourdieu, D., Desplanques, C., Villettaz, J.-C., and Ribereau-Gayon, P. (1985). Investigation of An Industrial β-Glucanase from *Trichoderma harzianum*. Carbohydrate Research *144*, 277-287.

6- El- Katatny, M.H., M. Gudelj, K.H. Robra, M.A. Elnaghy and G.M. Gubitz. (2001). Characterization of a chitinase and an endo-beta-1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phtopathogen *Sclerotium rolfsii*. Applied Microbiology and Biotechnology 56(1-2): 137-143.

7- Haran, S., Schickler, H., and Chet, I. (1996). Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. Microbiology *142*, 2321-2331.

8- Hermosa, M. R., Grondona, I., Iturriaga, E. A., Diaz-Minguez, J. M., Castro, C., Monte, E., and Garcia-Acha, I. (2000). Molecular Characterization and Identification of Biocontrol Isolates of *Trichoderma* spp. Applied and Enviromental Microbiology *66*, 1890-1898.

9- Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature *227*, 680-685.

10- Nelson, N. J. (1957). Colorimetric Analysis of Sugars. Methods in Enzymology *3*, 85-86.

11- Noronha, E. F., and Ulhoa, C. J. (1996). Purification and characterization of an Endo-β-1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. Canadian Journal of Microbiology *42*, 1039-1044.

12- Pitson, S. M., Seviour, R. J., and McDougall, B. M. (1993). Noncellulolytic Fungal β-Glucanases: Their Physiology and Regulation. Enzyme Microbiology and Technology *15*, 178-192.

13- Ridout, C. J., and Coley-Smith, J. R. (1988). Fractionation of Extracellular Enzymes from A Mycoparasitic Strain of *Trichoderma harzianum*. Enzyme Microb. Technol. *10*, 180-187.

14- Ridout, C. J., Coley-Smith, J. R., and Lynch, J. M. (1986). Enzyme activity and electrophoretic profile of extracellular protein induced by cell walls of *Rhizoctonia solani*. Journal of General Microbiology *132*, 2345-2352.

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

www.SID.ir

Archive of SID

16- Sharma, A., and Nakas, J. P. (1987). Preliminary Characterization of Laminarinase from *Trichoderma longibrachiatum*. Enzyme Microbiology and Technology *9*, 89-93.

17- Sivan, A., and Chet, I. (1992). Microbial control of plant diseases. In New Concepts in Environmental Microbiology, R. Mitchell, ed. (New York: Wiley-Liss), pp. 335-354.

18- Somogyi, M. (1951). Notes on Sugar Determination. Journal of Biological Chemistry *195*, 19-23.

19- Tangarone, B., Royer, J. C., and Nakas, J. P. (1989). Purification and characterization of an Endo-1,3-β-D-Glucanase from *Trichoderma longibrachiatum*. Applied and Environmental Microbiology *55*, 177-184.

20- Vasseur, V., Montagu, M. V., and Goldman, G. H. (1995). *Trichoderma harzianum* genes induced during growth on *Rhizoctonia solani* cell walls. Microbiology *141*, 767-774.

21- Vazquez-Garciduenas, S., Leal-Morales, C. A., and Herrera-Estrella, A. (1998). Analysis of the β-1,3-Glucanolytic System of the Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology *64*, 1442-1446.

22- Villaneuva, J. R., Notaio, V., Ssantos, T., and Villa, T. G. (1976). β-glucanases in nature: biochemistry and function of β-glucanases in yeasts, F. Peabody, R. A. H., H. J. Rogers and E. C. Cocking, eds. (New York: Academic Press, Inc.).

23- Zeilinger, S., Galhaup, C., Payer, K., Woo, S. L., Mach, R. L., Feket, C., Lorito, M., and Kubicek, C. P. (1999). Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum* with its host. Fungal Genetics and Biology *26*, 131-140.

www.SID.ir

Archive of SID

β-1,3-glucanase production in Trichoderma isolates

Bahramsari N.[2], Zamani M.R.[1] , and Motallebi M.[1]

[1]National Research Center for Genetic Engineering & Biotechnology (NRCGEB), Tehran, Iran

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

Abstract

β-glucan is a homopolymer of D-glucose residues which are linked through β-1,3 glycosidic bonds in the main chain. This polysaccharide, comprising the highest percentage of the fungal cell walls, has a major role in providing the cell wall with rigidity and protection. This is generally achieved through the assistance of other cell wall components, such as chitin and different proteins. β-glucanase enzymes degrade the polymer into its component residues by breaking the β-glycosidic bonds. As a producer of a variety of β-1,3 glucanase enzymes, the filamentous fungus *Trichoderma*, has become an important means of biological control for fungal diseases.

In this study, after optimizing the glucanolytic conditions at both enzyme production and reaction stages for three randomly selected isolates, the glucanolytic activities of 30 *Trichoderma* isolates were assayed, leading to selection of the most and least active ones, *T reesei* with 22.07 U/mg and *T. viridae* 1 with 4.71 U/mg specific activity, respectively. In this regard, the *T. reesei* isolate, having the strongest β-1,3 glucanolytic activity among all isolates assayed, can be a nominee for further use as a biological control agent to protect against the fungal pathogens.

Key words: *Trichoderma ressei* – β-1,3 glucanase – enzyme activity

www.SID.ir