فنآوری زیستی در کشاورزی/ جلد هفدهم/ شمارهٔ اول/ بهار و تابستان ۹۷
Doi: 10.22084/ab.2018.7877.1249
Archive of SID

بررسی تأثیر آنزیم‌های سلولاز جدایه‌های جهش‌یافته قارچ *Trichoderma harzianum* و *Trichoderma viride* بر تجزیه زیستی سلولز Iα، Iβ و III

Investigating of the Influence of Cellulase Enzymes from Mutated Isolates of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* on Biodegradation of Cellulose Iα, Iβ and III

سمیرا شهبازی[۱*] و حامد عسکری[۲]

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۶/۰۴ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۶/۲۷

چکیده

در این مطالعه، تولید آنزیم سلولاز و پروتئین خارج سلولی دو گونه از قارچ تریکودرما (*Trichoderma harzianum* و *T. viride*) و جهش‌یافته‌های آن‌ها بررسی شد. سنجش فعالیت آنزیم سلولاز با استفاده ازآویسل، کربوکسی متیل سلولز (III)، کاغذ صافی واتمن شماره ۱ و سلولز باکتریایی (Iα) انجام شد. خصوصیات ساختار شیمیایی این ترکیبات با استفاده از اسپکتروسکوپی مادون‌قرمز تبدیل فوریه (FT-IR)، پراش اشعه ایکس (XRD) و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) بررسی شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان داد که سلولز باکتریایی ساختار فیبری ظریف‌تری در مقایسه با آویسل و کربوکسی متیل سلولز دارد. نسبت ضخامت فیبر سلولز باکتریایی در مقایسه با آویسل تقریباً ۱ به ۳۰ بود. ارزیابی‌های اسپکتروسکوپی مادون‌قرمز و پراش اشعه ایکس نشان داد که CMC حاوی گروه‌های کربوکسیلیک بر روی ساختار خود است و کریستالیزاسیون آن ۸۱/۸۴٪ می‌باشد. کریستالیزاسیون آویسل و سلولز باکتریایی نشان داد که شاخص کریستالیزاسیون آویسل (۸۹/۱۵٪) بیشتر از سلولز باکتریایی (۶۶/۴۴٪) می‌باشد. هر دو گونه و جهش‌یافته‌های آن‌ها مقادیر مختلفی از پروتئین خارج سلولی را در محیط تخمیر تولید کردند. در جدایه‌های *T. harzianum* بالاترین میزان فعالیت آنزیم سلولاز به‌ترتیب در جدایه‌های جهش‌یافته Th M7 و Th M6 و در جدایه‌های *T. viride* بالاترین فعالیت آنزیمی به‌ترتیب در جدایه‌های جهش‌یافته Tv M14، Tv M15 مشاهده گردید. اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی با استفاده از سلولز باکتریایی مقادیر بالاتری از فعالیت را در مقایسه با سوبستراهای آویسل و کاغذ صافی نشان داد که این امر نشانه قابلیت دسترسی بالای سلولز باکتریایی یا سلولز Iα برای تجزیه زیستی در مقایسه با آویسل یا سلولز Iβ می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: کریستالیزاسیون، آویسل، سلولز باکتریایی، آنزیم سلولاز، موتانت

۱ و ۲. به‌ترتیب استادیار و کارشناسی‌ارشد گروه گیاهپزشکی و نگهداری مواد غذایی، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران، کرج، ایران
*: نویسنده مسوول Email: SShahbazi@aeoi.org.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

سلولز ساختار بنیادی اصلی در دیواره‌ی سلولی گیاهان و جلبک‌ها می‌باشد و هم‌چنین به‌عنوان جزء اصلی دیواره سلولی اوومیست‌ها نیز محسوب می‌شود *کنون و اندرسون* (Cannon and Anderson, 1991). به‌طورکلی برای سلولز چهار ساختار مختلف بیان شده است که دارای خصوصیات متفاوتی هستند. سلولز I که شامل زنجیره‌های گلوکان با پیوندهای بتا ۱ و ۴ است که به‌صورت موازی در کنار یکدیگر قرار گرفته‌اند. این نوع ساختار عموماً در طبیعت یافت می‌شود. این نوع سلولز هم‌چنین توسط باکتری *Gluconobacter xylinus* تولید می‌شود. در حالت غیر خشک سلولز I می‌تواند به‌عنوان سلولز طبیعی (Native) مطرح شود *راس* و همکاران (Ross *et al.*, 1991). سلولز II شامل زنجیره‌های غیرموازی گلوکان با پیوندهای بتا ۱ و ۴ است که توسط *G. xylinus* در حالت هم‌زدن محیط‌کشت یا بعد از کریستالیزاسیون مجدد یا تیمار شیمیایی سلولز I ایجاد می‌شود (*راس* و همکاران، 1991). سلولز III در دیواره سلولی گیاهان عالی یافت می‌شود و می‌تواند از تیمار شیمیایی سلولز II نیز تولید شود *هیگلر و ویمار* (Haigler and Weimer, 1991). سلولز Iα به‌طور برجسته توسط باکتری‌ها و جلبک‌ها تولید می‌گردد، درحالی‌که سلولز Iβ از گیاهان مشتق می‌شود. با این حال همه سلولزها شامل مقادیری از هر دو آلومورف (Allomorph) می‌باشند *سوگی یاما* و همکاران (Sugiyama *et al.*, 1991). سلولازها (مخلوطی از سیستم‌های آنزیمی پیچیده) به‌طور تجمعی برای هیدرولیز سلولز در ضایعات کشاورزی عمل می‌کنند و تولید واحدهای ساده گلوکز را می‌نمایند. سلولازها توسط قارچ‌های تجزیه‌کننده سلولز از قبیل جنس‌های *Chaetomium*، *Fusarium*، *Myrothecium*، *Penicillium*، *Aspergillus* و گونه‌های *Trichoderma* تولید می‌گردند *ساجیت* و همکاران (Sajith *et al.*, 2016). گونه‌های قارچ تریکودرما حداقل دو اگزوگلوکاناز (سلوبیوهیدرولاز) شامل Cel 6A (CBH III) و Cel 7A (CBH I) و پنج اندوگلوکاناز شامل Cel 5A (EG II)، Cel 7B (EG I)، Cel 12A (EG III)، Cel 45A، EG V و Cel 61A (EG 17)، هم‌چنن دو بتا-گلوکوزیداز شامل Cel 1A (BGL II) و Cel 3A (BGL I) برای تجزیه سلولز تولید می‌کنند *گری شوتین*؛ *فورمن* و همکاران (Grishutin, 2004; Foreman *et al.*, 2003). در طول یک فرایند هیدرولیز آنزیمی هر سه دسته از آنزیم‌ها (سلوبیوهیدرولازها، اندوگلوکانازها و بتا-گلوکوزیدازها) برای شکستن سلولز عمل می‌کنند *لیند* و همکاران (Lynd *et al.*, 2002) و در ابتدای فرایند به سرعت گلوکز آزاد می‌شود. اگر تنها یکی از دسته‌های آنزیم برای هیدرولیز استفاده شود، فرایند هیدرولیز می‌تواند مختل شود. عملکرد با یکدیگر (که اغلب به‌عنوان سینرژی مطرح می‌شود) هر سه دسته آنزیم‌های سلولالیتیک، برای یک فرایند هیدرولیز آنزیمی مؤثر ضروری می‌باشد. باتوجه به پتانسیل کاربرد آنزیم‌های سلولازی در صنایع مختلف و نیز اهمیت نقش گونه‌های تریکودرما در تولید این نوع آنزیم، تحقیق حاضر با هدف شناسایی سوبستراهای مناسب برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی در جدایه‌های متنوع جهش‌یافته گونه‌های قارچی *T. viride* و *T. harzianum* انجام شد و برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی از سوبستراهای مختلف شامل سلولز باکتریایی (BC)، به‌عنوان سلولز Iα، آویسل (A، به‌عنوان سلولز Iβ) و کربوکسی متیل سلولز (CMC، به‌عنوان سلولز III) و کاغذ صافی واتمن شماره ۱ (FP) استفاده شد تا نحوه عملکرد متفاوت جدایه‌های جهش‌یافته بر سوبستراهای مختلف سلولزی موردمطالعه قرار گیرد. هم‌چنین این پژوهش اهمیت و نقش القای جهش در قارچ برای ایجاد تنوع فعالیت آنزیمی و افزایش بازده تولید آنزیم را نشان می‌دهد.

مواد و روش‌ها

تولید سلولز کلوئیدی

سلولز کلوئیدی به‌عنوان منبع کربن برای تولید آنزیم‌های سلولاز قرار گرفت. تولید سلولز کلوئیدی به‌وسیله پیش تیمار سلولز خالص (آویسل) در اسید ارتوفسفریک ۸۵٪ (وزنی به حجمی) برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴°C انجام گرفت تا خاصیت کلوئیدی در سلولز افزایش پیدا کند، به‌نحوی‌که به آسانی توسط آنزیم مورداستفاده قرار گیرد. بعد از پیش‌تیمار با اسید، مواد جامد با استفاده از یک فیلتر آب پنیرگیری صاف شد و چندین مرتبه با آب‌مقطر شستشو گردید تا pH ماده جامد به حدود ۵ برسد. سپس سلولز کلوئیدی در دمای ۷۰°C- برای مدت ۲۴ ساعت منجمد گردید و با استفاده از خشک‌کن انجمادی برای مدت ۴۸ ساعت خشک گردید و تا اندازه مش ۱۲۵-۵۳ میکرون آسیاب شد *شولین* (Schulein, 1997).

تولید کربوکسی متیل سلولز

از سلولز خالص (آویسل) برای تولید کربوکسی متیل سلولز استفاده گردید. تولید کربوکسی متیل سلولز براساس روش *کیرک و اوتمیر* (Kirk and Othmer, 1967) انجام شد. درجه استخلاف (Degree of Substitution, DS) کربوکسی متیل سلولز تولیدی با استفاده از روش استاندارد بین‌المللی ای‌اس‌تی‌ام (ASTM, 2005) تعیین شد. از کربوکسی متیل

www.SID.ir

Archive of SID

سلولز (CMC) جهت تعیین فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز یا کربوکسی متیل سلولاز (CMCase) استفاده گردید.

تولید سلولز باکتریایی

به‌منظور بررسی نحوه عملکرد آنزیم سلولاز بر روی سلولز باکتریایی از باکتری *Gluconobacter xylinus* برای تولید سلولز باکتریایی استفاده گردید و برای سنجش فعالیت آنزیم سلولاز مورداستفاده قرار گرفت. باکتری *G. xylinus* از مرکز کلکسیون قارچ و باکتری سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به شماره PTCC 1734 تهیه گردید. سلولز باکتریایی مطابق روش *موسوی نسب* و همکاران (Moosavi-Nasab *et al.*, 2010) تولید و خالص‌سازی شد. سپس به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۷۰°C- منجمد گردید و با استفاده از خشک کن انجمادی برای مدت ۴۸ ساعت خشک گردید و تا اندازه مش ۱۲۵-۵۳ میکرون آسیاب شد *شهبازی* و همکاران، 2014؛ *موسوی نسب* و همکاران، 2010 (Shahbazi *et al.*, 2014).

طیف‌سنجی مادون‌قرمز تبدیل فوریه (FT-IR)، پراش اشعه ایکس (XRD) و بررسی میکروساختار سوبسترا

طیف‌سنجی مادون‌قرمز تبدیل فوریه (FT-IR)، پراش اشعه ایکس (XRD) و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) پودر آویسل، کربوکسی متیل سلولز و سلولز باکتریایی براساس روش *شهبازی* و همکاران (2014) مطالعه شد.

آماده‌سازی قارچ و تولید آنزیم سلولاز

جدایه‌های قارچ *T. harzianum* و *T. viride* (جهش‌یافته و وحشی از کلکسیون آزمایشگاه بیماری شناسی- گروه پژوهشی گیاه‌پزشکی پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای به‌ترتیب با شماره دسترسی Nrcam T7 و Nrcam T6) تهیه گردید (مرادی و همکاران، ۱۳۹۰). پلیت‌های کشت به‌مدت ۷ روز در دمای ۲۸°C نگهداری شدند. اسپورهای تولید شده با استفاده از محلول سیلین جمع‌آوری و جمعیت آن در ۱×۱۰^{۶} اسپور/ میلی‌لیتر تنظیم گردید و برای پرتوتابی مورداستفاده قرار گرفت. معیار دز جذبی مناسب برای القای موتاسیون حداکثری در اسپورها، ظهور تقریباً ۵۰-۴۰ درصد جوانه‌زنی اسپور پس از پرتوتابی می‌باشد. (مرادی و همکاران، ۱۳۹۰). نتایج مطالعات قبلی نشان داد که در دز ۲۵۰ Gy تقریباً ۴۳/۷ درصد از اسپورها جوانه زده‌اند و این دز به‌عنوان دز مناسب پرتوتابی انتخاب گردید (مرادی و همکاران، ۱۳۹۰). پرتوتابی با استفاده از دستگاه گاماسل با چشمه کبالت ۶۰– اکتیویته ۲۵۰۰ کوری و نرخ دز ۰/۲۳ گری در ثانیه مستقر در پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای کرج (پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای- سازمان انرژی اتمی ایران) انجام شد. از سوسپانسیون اسپور سریال رقت تهیه گردید و بر روی محیط‌کشت PDA کشت داده شدند. اسپورهای جوانه زده شده به محیط‌کشت تازه انتقال داده شد و بیست جدایه موتانت براساس تفاوت‌های مورفولوژیک (شکل و رنگ کلنی، سرعت رشد در محیط‌کشت PDA، سرعت جوانه‌زنی اسپور و میزان تولید اسپور) انتخاب گردید.

جدایه‌های Nrcam T7 و Nrcam T6 و بیست جدایه جهش یافته از هرگونه بر روی محیط‌کشت Malt Yeast Glucose Agar (MYG agar) حاوی ۵ گرم در لیتر عصاره مالت، ۲/۵ گرم در لیتر عصاره مخمر، ۱۰ گرم در لیتر گلوکز و ۲۰ گرم در لیتر آگار کشت داده شدند و در دمای ۲۸°C نگهداری گردیدند. با استفاده از محلول سیلین از پلیت‌های هفت روزه حاوی اسپور، سوسپانسیون اسپوری با جمعیت $۱۰^{۸}$-$۱۰^{۷}$ اسپور در میلی‌لیتر تهیه گردید. کشت اولیه سوسپانسیون اسپوری در محیط Trichoderma Complete Medium (TCM) حاوی ۱ گرم در لیتر باکتوپپتون، ۰/۳ گرم در لیتر اوره، ۲ گرم در لیتر KH_2PO_4، ۱/۴ گرم در لیتر $(NH_4)_2SO_4$، ۰/۳ گرم در لیتر $MgSO_4.7H_2O$، ۰/۳ گرم در لیتر $CaCl_2.6H_2O$، ۰/۰۰۵ گرم در لیتر $FeSO_4.7H_2O$، ۰/۰۰۲ گرم در لیتر $MnSO_4$، ۰/۰۰۲ گرم در لیتر $ZnSO_4$ و ۰/۰۰۲ $COSO_4.7H_2O$ گرم در لیتر و ۲ میلی‌لیتر در لیتر توئین انجام گرفت. pH محیط‌کشت TCM بر روی ۴/۸ تنظیم گردید و با ۰/۳٪ (وزنی به حجمی) گلوکز ترکیب گردید. انجام عمل تخمیر در محیط‌کشت TCM در ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط TCM در دمای ۲۸°C به‌مدت ۲۴ ساعت و ۱۸۰ دور در دقیقه انجام گرفت و بعد از مدت زمان فوق اسپورها تبدیل به حالت رویشی میسلیوم گردیدند. با استفاده از سانتریفیوژ کردن در ۴۵۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۷ دقیقه میسلیوم‌ها از محیط TCM جداسازی شدند و جهت القای تولید آنزیم‌های سلولازی میسلیوم‌های شسته شده با سیلین به ارلن مایر ۵۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط Trichoderma Fermentation Medium (TFM) حاوی ۰/۳ گرم در لیتر اوره، ۲ گرم در لیتر KH_2PO_4، ۱/۴ گرم در لیتر $(NH_4)_2SO_4$، ۰/۳ $MgSO_4.7H_2O$ گرم در لیتر، ۰/۳ گرم در لیتر $CaCl_2.6H_2O$، ۰/۰۰۵ گرم در لیتر $FeSO_4.7H_2O$، ۰/۰۰۲ گرم در لیتر $MnSO_4$، ۰/۰۰۲ گرم در لیتر $ZnSO_4$ و ۰/۰۰۲ $COSO_4.7H_2O$ گرم در لیتر و ۲ میلی‌لیتر در لیتر توئین انتقال داده شد. این محیط در pH ۴/۸ تنظیم شده بود و حاوی ۰/۵٪

www.SID.ir

Archive of SID

(وزنی به حجمی) سلولز کلوئیدی بود. شرایط رشد مشابه شرایط قبل در ۱۸۰ دور در دقیقه و دمای ۲۸°C به‌مدت ۷۲ ساعت انجام شد. بعد از مدت زمان فوق میسلیوم‌های قارچ توسط سانتریفیوژ کردن در ۴۵۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۷ دقیقه خارج گردید و مایع فوقانی برای اندازه‌گیری پروتئین خارج سلولی و فعالیت آنزیمی مورداستفاده قرار گرفت *ون* و همکاران، 2005؛ *شهبازی* و همکاران، 2016 (Wen *et al.*, 2005; Shahbazi *et al.*, 2016).

اندازه‌گیری غلظت پروتئین خارج سلولی تولیدی در محیط تخمیر و تعیین فعالیت آنزیمی

اندازه‌گیری پروتئین در مایع فوقانی محیط TFM با استفاده از روش *بردفورد* (Bradford, 1976) انجام گرفت. از پروتئین خالص Bovine Serum Albumin (BSA) به‌عنوان استاندارد پروتئین استفاده شد و مقدار پروتئین (میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در مایع فوقانی محیط تخمیر TFM محاسبه گردید. فعالیت آنزیم‌های اگزوگلوکاناز یا Avicelase، اندوگلوکاناز یا CMCase و سلولاز کل (با استفاده از سوبسترای کاغذ صافی یا FPase (Filter Paper-ase) و با استفاده از سوبسترای سلولز باکتریایی یا BCase) به‌وسیله اندازه‌گیری مقدار گلوکز آزاد شده از سوبستراهای آویسل، کربوکسی متیل سلولز و کاغذ صافی واتمن ۱ با استفاده از معرف دی‌نیتروسالیسیلیک اسید و گلوکز به‌عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد *گاما و موتا* (Gama and Mota, 1998). مخلوط واکنش حاوی ۰/۵میلی‌لیتر از محلول ۰/۵٪ (وزنی به حجمی) از هر یک از سوبستراها در بافر ۰/۰۵ مولار سیترات سدیم (pH ۴/۸) و ۰/۵ میلی‌لیتر از مایع فوقانی محیط تخمیر TFM بود. نمونه‌ها به‌مدت ۶۰ دقیقه در حمام آب گرم ۵۰°C قرار گرفتند و واکنش آنزیمی با افزودن ۳ میلی‌لیتر از محلول دی‌نیترو سالیسیلیک اسید متوقف شد. نمونه‌ها به‌خوبی مخلوط شدند و سپس برای مدت ۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شدند و فوراً خنک گردیدند. سپس بعد از رقیق‌سازی جذب نمونه‌ها با استفاده از اسپکتروفتومتر در ۵۴۰ نانومتر قرائت گردید. هر واحد فعالیت آنزیمی به‌عنوان مقدار آنزیمی که توانایی آزاد کردن ۱ میکرومول گلوکز را به ازای هر ساعت دارد، تعریف شد. هم‌چنین برای تعیین فعالیت FPase (سلولاز کل) از نوارهای ۶×۱ سانتی‌متر کاغذ صافی واتمن شماره ۱ به‌عنوان سوبسترا استفاده شد. فعالیت آنزیم برحسب واحد در میلی‌لیتر گزارش گردید (*شهبازی* و همکاران، 2016).

تجزیه و تحلیل آماری

کلیه نتایج آزمایشات با استفاده از آنالیز واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها به‌روش دانکن در سطح آماری $P<0/05$ انجام گرفت. آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۶) انجام گرفت و کلیه آزمایشات در سه تکرار انجام شد.

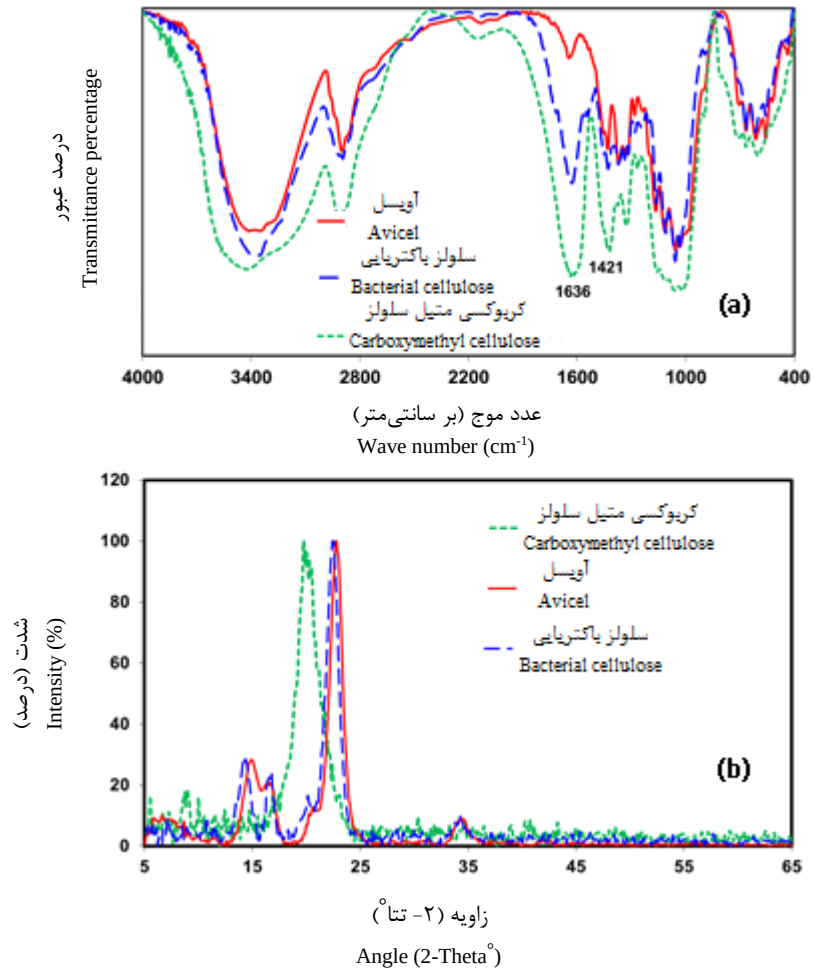
نتایج و بحث

بررسی گروه‌های استخلافی سوبستراها و تعیین میزان کریستالیزاسیون

گروه‌های استخلافی موجود بر روی سوبستراها با استفاده از آزمون طیف‌سنجی مادون‌قرمز تبدیل فوریه (FT-IR) موردبررسی قرار گرفت. طیف FT-IR آویسل، سلولز باکتریایی و کربوکسی متیل سلولز در شکل (۱a) نشان داده شده است که دلالت بر ساختار کلی کربوهیدرات‌ها را دارند. باند ظاهر شده در ۱۶۳۶ و ۱۴۲۱ (بر سانتی‌متر) در کربوکسی متیل سلولز نشان‌دهنده گروه‌های استخلافی کربوکسی متیل سلولز است که باعث می‌شود این کربوهیدرات دارای بار منفی بر روی زنجیره اصلی خود باشد و نشان‌دهنده تبدیل شیمیایی صحیح آویسل به کربوکسی متیل سلولز می‌باشد. شکل (۱b) الگوی XRD سوبستراهای مورداستفاده در سنجش فعالیت آنزیم سلولاز شامل آویسل، سلولز باکتریایی و کربوکسی متیل سلولز را نشان می‌دهد. میزان کریستالیزاسیون سوبستراهای آویسل، سلولز باکتریایی و کربوکسی متیل سلولز با استفاده از داده‌های آزمون XRD اندازه‌گیری شد و نتایج آن در شکل (۱b) نشان داده شده است. الگوی سلولز باکتریایی سه پیک اصلی در °۱۴/۱۳، °۱۶/۶۰ و °۲۲/۵۷ به‌ترتیب مربوط به بازتاب‌های 101، 10$\bar{1}$ و 002 را نشان داد. پیک‌های اصلی در آویسل در °۱۴/۶۸، °۱۶/۱۵ و °۲۲/۷۱ به‌ترتیب مربوط به بازتاب‌های 101، 10$\bar{1}$ و 002 مشاهده شد. این اطلاعات دلالت بر این دارد که نمونه‌های سلولز باکتریایی و آویسل نوعی از فرم کریستالی سلولز I می‌باشند *یان* و همکاران (Yan *et al.*, 2008). سطح زیر پیک در الگوی XRD میزان کریستالیزاسیون نمونه‌ها را نشان می‌دهد که برای آویسل، سلولز باکتریایی و کربوکسی متیل سلولز این مقادیر به‌ترتیب ۸۹/۱۵٪، ۶۶/۴۴٪ و ۸۱/۸۴٪ می‌باشد. کریستالیزاسیون کم‌تر CMC نسبت به آویسل باعث می‌شود که این ماده در واکنش‌های شیمیایی واکنش‌پذیرتر ظاهر شود.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱: (a) طیف FT-IR و (b) الگوی XRD آویسل، سلولز باکتریایی و کربوکسی متیل سلولز

Fig. 1: (a) FT-IR spectrum and (b) XRD pattern of avicel, bacterial cellulose and carboxymethyl cellulose

بررسی میکروساختار سوبسترای تولیدی برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سلولاز

شکل (a, b, c) ۲ به‌ترتیب نشان‌دهنده تصاویر میکروساختار آویسل، سلولز باکتریایی و کربوکسی متیل سلولز می‌باشد. تصاویر نشان‌دهنده اختلاف مورفولوژیکی در سوبسترا های مختلف می‌باشد. همان‌طورکه در شکل ۳ نشان داده شده است ضخامت رشته‌های سلولز باکتریایی نسبت به آویسل ۱ به ۳۰ می‌باشد (۱۲ میکرومتر برای سلولز باکتریایی و ۴۱۲ میکرومتر برای آویسل) که نشان‌دهنده ظرافت بیش‌تر فیبرهای سلولز باکتریایی در برابر آویسل می‌باشد. این نسبت ممکن است به ۱ به ۱۰۰ نیز در بین فیبرهای دیگر برسد. در شکل (a, b) ۳ در بزرگ‌نمایی ۶k، سلولز باکتریایی پیچ و تاب بیش‌تری را در مقایسه با آویسل از خود نشان می‌دهد، چراکه دارای فیبرهای نازک‌تری می‌باشد و این امر باعث می‌شود که این پلیمر در مقایسه با آویسل توسط قارچ بهتر تجزیه شود.

ظرافت بیش‌تر فیبرهای سلولز باکتریایی می‌تواند بر خصوصیاتش از قبیل ظرفیت جذب آب و نیز سطح مقطع در تماس با آنزیم تأثیر بگذارد. سلولز باکتریایی قابلیت استفاده توسط قارچ و ظرفیت نگهداری آب تا ۷۰۰ برابر وزن خشک خود را دارد.

برخی نمونه‌ها در سطح آماری ۵٪ دارای اختلاف معنی‌دار آماری بودند و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن نشان داد که بالاترین غلظت پروتئین تولید شده به‌ترتیب در نمونه‌های Th M9، Th M10، Th M11، Th M15 و Th M18 بودند و کم‌ترین میزان پروتئین در نمونه Th M16 مشاهده گردید. شکل (۴b) مقایسه غلظت پروتئین خارج سلولی قارچ *T. viride* و جدایه‌های جهش‌یافته آن را نشان می‌دهد. برخی جدایه‌ها و گونه وحشی آن‌ها در سطح آماری ۵٪ دارای اختلاف معنی‌دار آماری بوده و مقایسه میانگین‌های آن‌ها به روش دانکن نشان داد که بالاترین غلظت پروتئین تولید شده به‌ترتیب در نمونه‌های Tv M2، Tv M1، Tv M3، Tv M14، Tv M10 و Tv M4 مشاهده می‌شود و کم‌ترین میزان پروتئین خارج سلولی در محیط تخمیر قارچ جهش‌یافته Tv M21 می‌باشد.

www.SID.ir

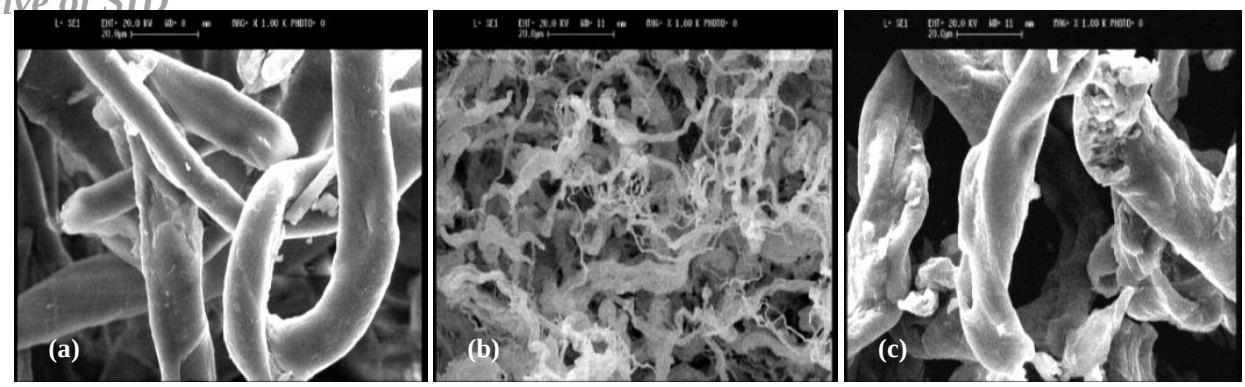
Archive of SID

میزان تغییرات پروتئین از مقدار ۰/۰۵۰ الی ۰/۱۸۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر متغیر بود و تعدادی از جدایه‌های جهش‌یافته مقادیر کم‌تری از پروتئین خارج سلولی را در مقایسه با گونه وحشی قارچ *T. viride* تولید می کردند. اندازه‌گیری فعالیت‌های آنزیمی جدایه وحشی (قارچ *T. harzianum* و *T. viride*) و جدایه‌های جهش‌یافته آن با استفاده از سوبسترای آویسل، کربوکسی متیل سلولز، سلولز باکتریایی، کاغذ صافی واتمن شماره ۱، اندازه‌گیری شد که به‌ترتیب بیانگر فعالیت آنزیم‌های اگزوگلوکاناز یا آویسلاز، اندوگلوکاناز یا کربوکسی متیل سلولاز و سلولاز کل (سلولاز کل با سوبسترای سلولز باکتریایی و سلولاز کل با سوبسترای کاغذ صافی) بودند. شکل (a, b) ۵ مقایسه میانگین فعالیت آنزیم اگزوگلوکاناز (U/ml) قارچ وحشی *T. harzianum* و *T. viride* و جدایه‌های جهش‌یافته آن را در مایع فوقانی محیط تخمیر TFM را نشان می‌دهد. کلیه نمونه‌ها در سطح آماری ۵٪ دارای اختلاف معنی‌دار آماری بودند.

بالاترین فعالیت آنزیم اگزوگلوکاناز در جدایه‌های جهش‌یافته Th M8، Th M10، Th M18 و Th M9 مشاهده گردید. میزان تغییرات فعالیت اگزوگلوکاناز از ۲/۵۰ الی ۵/۲۷ واحد بر میلی‌لیتر متغیر بود. پایین‌ترین میزان فعالیت آنزیمی در جدایه جهش‌یافته Th M14 مشاهده گردید. هم‌چنین بالاترین میزان فعالیت اگزوگلوکانازی در بین قارچ وحشی *T. viride* و جدایه‌های جهش‌یافته آن تنها در جدایه جهش‌یافته قارچ Tv M18 مشاهده گردید. میزان تغییرات فعالیت اگزوگلوکانازی از ۱/۶۶ الی ۵/۵۶ واحد بر میلی‌لیتر متغیر است. پایین‌ترین میزان فعالیت اگزوگلوکانازی در جدایه جهش‌یافته TV M9 مشاهده گردید. شکل(c, d) ۵ مقایسه میانگین فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز (CMCase) را در مایع فوقانی محیط تخمیر TFM قارچ وحشی *T. harzianum* و *T. viride* و جدایه‌های جهش‌یافته آن را نشان می‌دهد. کلیه نمونه‌ها در سطح آماری ۵٪ دارای اختلاف معنی‌دار بودند. بالاترین فعالیت آنزیمی از مقدار ۲/۷۷ الی ۵/۵۸ واحد بر میلی‌لیتر متغیر بود. پایین‌ترین میزان فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز در جدایه جهش‌یافته Th M16 مشاهده گردید. سوبستراهای مورداستفاده برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سلولاز می‌توانند براساس حلالیت در آب به دو دسته تقسیم شوند. کربوکسی متیل سلولز که مشتقی یونی از سلولز است (CMC، به‌عنوان سوبسترای محلول در آب)، اغلب برای تعیین فعالیت اندوگلوکاناز که CMCase نامیده می‌شود، استفاده می‌گردد، چرا که اندوگلوکانازها باندهای گلیکوزیدی بتا ۴،۱ داخل مولکولی را به‌صورت تصادفی می‌شکنند و باعث کاهش چشم‌گیر در درجه پلیمریزاسیون (Degree of Polymerization; DP) (مثلاً ویسکوزیته ویژه) در CMC می‌شوند. ساختار اندوگلوکانازها شناخته شده است و باقیمانده‌های جایگاه فعال آنزیم‌ها در شکافی واقع شده است که می‌تواند با گروه‌های کربوکسی متیل تطبیق پیدا کند و به این ترتیب می‌تواند به واحدهای انفرادی گلوکز حمله ببرد *پالما* و همکاران (Palma *et al.*, 2001). بالاترین فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز (CMCase) به‌ترتیب در جدایه‌های جهش‌یافته Tv M16، Tv M14، Tv M15، Tv M18 و Tv M17 مشاهده گردید که مقادیر بالاتری از فعالیت آنزیمی قارچ وحشی را از خود نشان می‌دادند. فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز (CMCase) در قارچ *T. viride* و جدایه‌های جهش‌یافته آن از ۳/۳۴ الی ۶/۱۰ واحد بر میلی‌لیتر متغیر بود. کم‌ترین فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز (CMCase) در جدایه جهش‌یافته Tv M6 مشاهده گردید. سیستم سلولازی کامل شامل اندوگلوکانازها، اگزوگلوکانازها و بتاگلوکوزیدازهاست. شکل (e, f) ۵ مقایسه میانگین فعالیت آنزیم سلولاز کل (BCase و FPase) را در مایع فوقانی محیط تخمیر TFM در قارچ وحشی *T. harzianum* و *T. viride* و جدایه‌های جهش‌یافته آن‌ها را نشان می‌دهد. کلیه نمونه‌ها در سطح آماری ۵٪ دارای اختلاف معنی‌دار بودند. بالاترین فعالیت آنزیم سلولاز کل با استفاده از سوبسترای کاغذ صافی به‌ترتیب در جدایه‌های جهش‌یافته Th M9، Th M10 و Th M18 مشاهده گردید که مقادیر بالاتری از فعالیت آنزیمی قارچ وحشی را از خود نشان می‌دادند. فعالیت آنزیم سلولاز کل (FPAse) در قارچ *T. harzianum* و جدایه‌های جهش‌یافته آن از ۴/۰۳ الی ۱۰/۷۰ واحد بر میلی‌لیتر متغیر بود. کم‌ترین فعالیت آنزیم FPase در جدایه جهش‌یافته Th M16 مشاهده گردید. بالاترین میزان فعالیت آنزیم سلولاز کل به‌ترتیب در جدایه‌های جهش‌یافته Tv M15، Tv M8، Tv M14، Tv M17 و Tv M10 مشاهده گردید. میزان فعالیت آنزیم FPase در بین جدایه‌های مختلف از ۲/۲۱ الی ۱۰/۵۳ واحد بر میلی‌لیتر متغیر بود. کم‌ترین میزان فعالیت آنزیم سلولاز کل در جدایه جهش‌یافته Tv M21 مشاهده گردید.

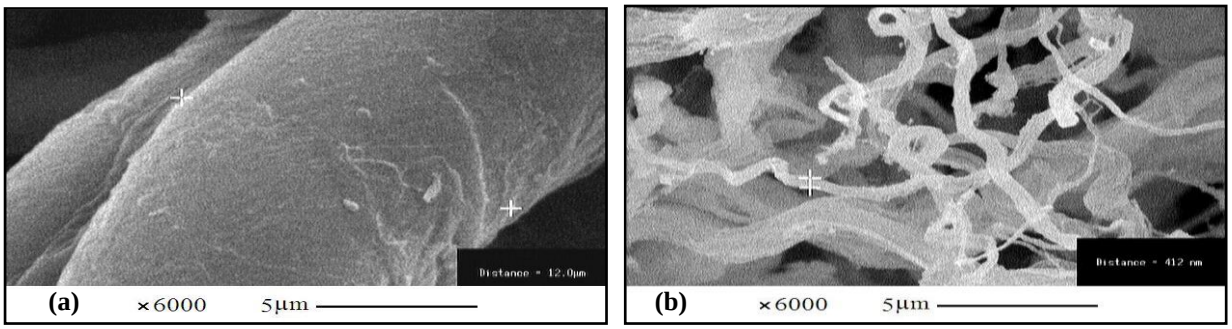
www.SID.ir

Archive of SID



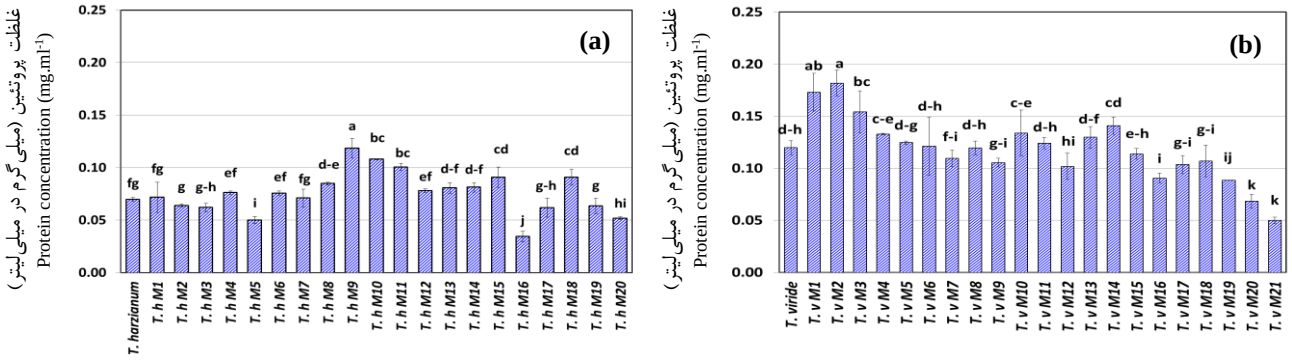
شکل ۲: تصاویر میکروسکوپ الکترونی (a) آویسل، (b) سلولز باکتریایی، (c) کربوکسی متیل سلولز (بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰ برابر)

Fig. 2: Scaning Electron microscopy (SEM) of (a) Avisel, (b) Bacterial cellulose and (c) Carboxymethyl cellulose (Magnification 1000X)



شکل ۳: تصاویر میکروسکوپ الکترونی (a) آویسل و (b) سلولز باکتریایی (بزرگنمایی ۶۰۰۰ برابر)

Fig. 3: Scaning Electron microscopy (SEM) of (a) Avisel and (b) Bacterial cellulose (Magnification 6000X)



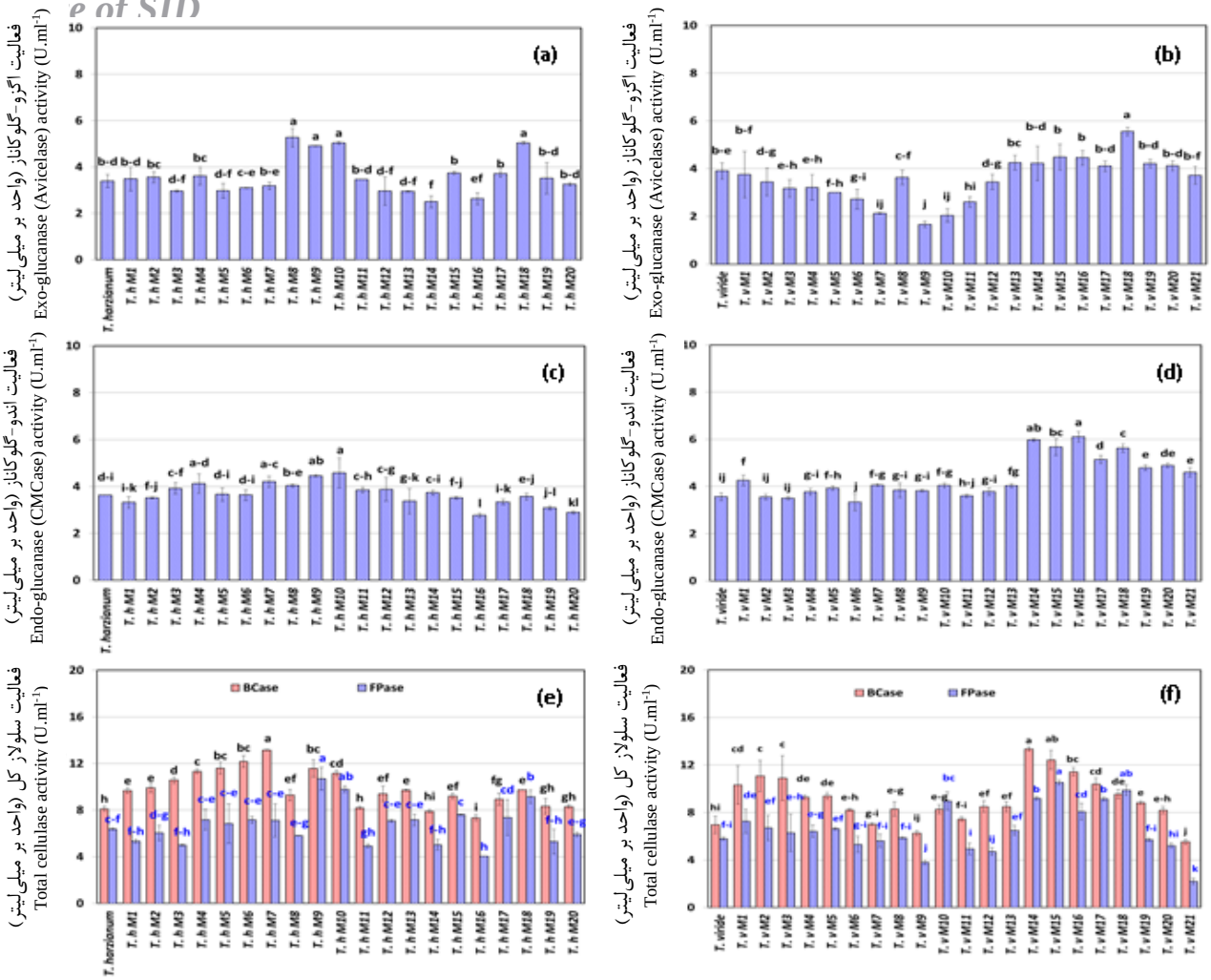
شکل ۴: مقایسه غلظت پروتئین خارج سلولی (میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در جدایه‌های جهش‌یافته و وحشی قارچ (a) *T. harzianum* و (b) *T. viride* در مایع فوقانی محیط تخمیر حاوی سلولز کلوئیدی. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۵٪ می‌باشد

Fig. 4: Comparison of extracellular protein concentration ($mg.ml^{-1}$) in mutant and wildtype isolates of (a) *T. harzianum* and (b) *T. viride* in supernatant of *Trichoderma* fermentation medium (TFM) containing colloidal cellulose. Different letters indicate a statistically significant difference of 5%

بالاترین میزان فعالیت آنزیم سلولاز کل با استفاده از سوبسترای سلولز باکتریایی به‌ترتیب در جدایه‌های جهش‌یافته Th M7 و Th M6 مشاهده گردید. میزان تغییرات فعالیت آنزیم سلولاز از ۷/۳۵ الی ۱۳/۱۷ واحد بر میلی‌لیتر متغیر بود. میزان تغییرات فعالیت آنزیمی از ۵/۵۳ الی ۱۳/۳۷ واحد بر میلی‌لیتر متغیر بود. بالاترین فعالیت آنزیمی بر روی سلولز باکتریایی به‌ترتیب در جدایه‌های جهش‌یافته Tv M14، Tv M15، Tv M16، Tv M2 و Tv M3 مشاهده گردید. پایین‌ترین فعالیت آنزیم سلولاز با استفاده از سوبسترای سلولز باکتریایی در جدایه جهش‌یافته Tv M21 مشاهده گردید. اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی با استفاده از سلولز باکتریایی مقادیر بالاتری از فعالیت را در مقایسه با سوبستراهای دیگر نشان داد که این امر نشانه قابلیت دسترسی بالای آن برای آنزیم‌ها می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵: مقایسه میانگین فعالیت آنزیمی (واحد بر میلی‌لیتر) جدایه‌های جهش‌یافته و وحشی قارچ *T. harzianum* و *T. viride* با استفاده از سوبسترای (a، b) آویسل، (c، d) کربوکسی متیل سلولز (CMC)، (e، f) کاغذ صافی واتمن شماره ۱ و سلولز باکتریایی جهت سنجش فعالیت آنزیم خارج سلولی تولید شده در مایع فوقانی محیط تخمیر TFM حاوی سلولز کلوئیدی. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۵٪ می‌باشد

Fig. 5: Comparison of the average enzyme activity (U/ml) of the mutant and wildtype isolates of *T. harzianum* and *T. viride* using (a, b) Avicel, (c, d) carboxymethyl cellulose (CMC), (e, f) Whatman no. 1 filter paper and bacterial cellulose to measure the activity of the extracellular enzyme produced in the supernatant of the *Trichoderma* fermentation medium (TFM) containing colloidal cellulose. Different letters indicate a statistically significant difference of 5%

تعیین غلظت پروتئین خارج سلولی و فعالیت آنزیم‌های سلولاز در جدایه‌های موتانت

شکل (۴a) غلظت پروتئین خارج سلولی (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) تولید شده در محیط تخمیر TFM حاوی سلولز کلوئیدی به‌عنوان سوبسترای تخمیر را در قارچ *T. harzianum* نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری

در پلیمرهای سلولزی، تفاوت‌های موجود در ساختار و ترکیبات شیمیایی و جزء کریستالی سلولز بر میزان هیدرولیز آن تأثیرگذار است *تری* و *کوییوولا* (Teeri and Koivula, 1997). برای مطالعه سینرژی در فعالیت سلولازی، مقایسه مستقیم بین میزان هیدرولیز مواد سلولزی راهکار مناسبی است. تصور کلی بر این است که ساختار سلولز به دو ناحیه تقسیم می‌شود، یکی ناحیه بی‌نظم (بی‌شکل) است که به آسانی توسط آنزیم هیدرولیز می‌شود و یکی دیگر ناحیه کریستالی است که به‌سختی توسط آنزیم هیدرولیز می‌گردد. این موضوع فراهم‌آورنده فهم مناسبی از سینتیک‌های مشاهده شده برای هیدرولیز سلولز است که زمانی‌که آنزیم‌ها به‌سرعت هیدرولیز را انجام دهند آن ترکیب بیش‌تر دارای ناحیه بی‌نظم (بی‌شکل) است و اگر هیدرولیز به سختی صورت بگیرد آن ماده بیش‌تر دارای نواحی کریستالی می‌باشد. براساس نتایج الگوی XRD ارائه شده در این تحقیق، بالاترین میزان

www.SID.ir

Archive of SID

کریستالیزاسیون به‌ترتیب مربوط به آویسل، کربوکسی متیل سلولز و سلولز باکتریایی بود. آویسل تجاری (که هم‌چنین سلولز میکروکریستال یا هیدروسلولز نیز نامیده می‌شود) برای اندازه‌گیری فعالیت اگزوگلوکانازاستفاده شد، زیرا درجه پایینی از پلیمریزاسیون سلولز را داراست و هرچند میزان کریستالیزاسیون نسبتاً بالایی دارد، اما با وجود برخی از نواحی بی‌نظم (بی‌شکل)، برای هیدورلیز توسط اندوگلوکانازها غیرقابل دسترس می‌باشد.

آنزیم‌هایی که فعالیت نسبتاً بالایی را بر روی آویسل نشان می‌دهند و دارای فعالیت کمی بر روی CMC هستند، به‌عنوان اگزوگلوکاناز تعریف می‌شوند مکی و همکاران (Maki *et al.*, 2009). سلوبیوهیدرولازها (اگزوگلوکانازها) بر پایه عملکردهای خارجی‌شان دسته‌بندی می‌شوند که آن‌ها همگی باندهای گلیکوزیدی بتا- ۱و۴ را از انتهای زنجیره می‌شکنند و تولید سلوبیوز و برخی مولکول‌های گلوکز می‌کنند. کربوکسی متیل سلولز که مشتقی یونی از سلولز است (CMC، به‌عنوان سوبسترای محلول در آب)، اغلب برای تعیین فعالیت اندوگلوکاناز که CMCase نامیده می‌شود، استفاده می‌گردد، چراکه اندوگلوکانازها باندهای گلیکوزیدی بتا- ۱و۴ داخل مولکولی را به‌صورت تصادفی می‌شکنند *کارلسون* و همکاران (Karlsson *et al.*, 2001). نتایج FT-IR نشان داد که کربوکسی متیل سلولز دارای گروه‌های کربوکسی می‌باشد که باعث ایجاد بار منفی بر روی زنجیره پلیمر می‌گردد. این امر باعث می‌شود پلیمر در محلول‌های آبی به علت دافعه الکترواستاتیک در زنجیره‌های مولکول بیش‌تر به شکل بی‌نظم (بی‌شکل) و محلول باشد و درصد کم‌تری از ساختار به‌صورت کریستالی وجود داشته باشد که این امر این پلیمر را برای اندازه‌گیری فعالیت اندوگلوکانازها مناسب می‌سازد. سلولاز کل شامل فعالیت آنزیم‌های اندوگلوکاناز، اگزوگلوکاناز و β-گلوکوزیداز می‌باشد که به‌صورت سینرژیستی باعث هیدرولیز سلولز کریستالی می‌شوند. هیدرولیز کارآمد سلولز کریستالی به‌وسیله سلولاز نیازمند به عملکرد سینرژیستکی اندوگلوکانازها و سلوبیوهیدرولازها می‌باشد که توسط *تری* و *کوییوولا* (1995) مرور شده است. برای تعیین فعالیت سلولازی مخلوط‌های آنزیمی یا عملکردهای سینرژیستی کمپلکس‌های آن‌ها، سوبسترای‌های هتروژن از قبیل کاغذ صافی و سلولز باکتریایی می‌توانند استفاده گردند. هم‌چنین مشخص شده است که درجه سینرژی بستگی به سوبسترای مورداستفاده نیز دارد *نیدزکی* و همکاران (Nidetzky *et al.*, 1994).

پرتو یونیزه‌کننده گاما هم با اثرات موتاژنی خود در ایجاد تنوع در ذخیره ژنتیکی قارچ تریکودرمای بومی کشور مؤثر بوده و می‌تواند به‌عنوان ابزاری ساده و کارآمد در برنامه‌های اصلاح سویه‌های میکروبی به‌منظور افزایش تولید یا فعالیت متابولیت‌های مختلف به‌کار گرفته شود. در این تحقیق دو گونه قارچ تریکودرما (*T. harzianum* و *T. viride*) و بیست جدایه جهش یافته با استفاده از پرتوتابی با پرتو گاما از نظر میزان فعالیت آنزیم سلولاز و پروفایل پروتئینی خارج سلولی موردمطالعه قرار گرفتند. نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق نشان داد امکان ایجاد تغییر در تولید میزان پروتئین خارج سلولی و فعالیت سلولازی و تغییر در تنوع آنزیم‌های تولیدی در جهت بهبود عملکرد، در اثر پرتوتابی با دز ۲۵۰ گری پرتو گاما وجود دارد و ایجاد سویه‌های قارچی با توان بیش‌تر تولید آنزیم که پتانسیل بیش‌تری در تجزیه‌ی زیستی ترکیبات سلولزی، مدیریت بقایای گیاهی، تخمیر و بازیافت سلولز و تولید زیست انرژی و دیگر فرآورده‌های زیستی را داشته باشند، توسط این روش القای جهش امکان‌پذیر است. موتاسیون با ایجاد تنوع ژنتیکی بیش‌تر، در بخشی از فرآیند دو قسمتی تکامل شامل تنوع و انتخاب، نقش دارد و بدین ترتیب در اصلاح و تکامل موجودات حائز اهمیت است. نتایج نشان داد که سلولز باکتریایی سوبسترای خوبی برای تعیین فعالیت سلولاز کل می‌باشد. چرا که بالاترین فعالیت آنزیمی در مقایسه با کاغذ صافی و آویسل را از خود نشان داد. در تمامی موارد آزمایش، در هر دو قارچ *T. harzianum* و *T. viride* و جدایه‌های جهش‌یافته آن‌ها، مقادیر فعالیت آنزیم سلولاز کل با استفاده از سوبسترای سلولز باکتریایی باتوجه به تنوع آنزیم‌های تولید شده در جدایه‌های موتانت، مقادیر بالاتری را نسبت به سلولاز کل به‌دست‌آمده از سوبسترای کاغذ صافی (FPase) نشان داد. هتروژن بودن سلولز نامحلول و پیچیدگی سیستم‌های سلولازی سبب مشکلات دشواری در اندازه‌گیری فعالیت سلولاز کل می‌شود. درجه سینرژی بین اندوگلوکانازها و اگزوگلوکانازها تحت تأثیر خصوصیات سوبسترا، شرایط آزمایش، مقدار آنزیم و نسبت ترکیبات می‌باشد *ژانگ* و *لیند* (Zhang and Lynd, 2006). بالا بودن مقادیر فعالیت سلولاز کل با استفاده از سوبسترای سلولز باکتریایی نشان داد که سلولز باکتریایی پتانسیل خوبی برای هیدرولیز و تولید آنزیم به‌وسیله گونه‌های قارچ تریکودرما را دارا می‌باشد چرا که دارای خصوصیات مکانیکی قابل‌توجه در هر دو حالت مرطوب و خشک، تخلخل، جذب آب، قابلیت تجزیه توسط قارچ‌ها،

www.SID.ir

Archive of SID

ضـخامت کم‌تـر رشـته‌های مولکـول، سـطح مقطـع بـالاتر، تجزیه‌پذیری و تمایل بیولوژیکی عالی می‌باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان از همکاری مهندس هادی فـتح اللهـی و مهنـدس حسین اهری مصطفوی در پرتوتابی گونه‌های تریکودرما و سایر همکارانی که در انجام این مطالعه ما را یـاری داده‌انـد، تشـکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۸-۹ متن انگلیسی مراجعه شود.

www.SID.ir