

# افزایش فعالیت آنزیم سلولاز در قارچ *تریکودرما ویریده* با القای جهش با پرتو گاما

خدیجه باقری<sup>۱</sup>، سمیرا شهبازی<sup>۲\*</sup>، حامد عسکری<sup>۲</sup>، شیده موجرلو<sup>۳</sup> و فرنگیس امیرلو<sup>۱</sup>

دریافت: ۱۳۹۶/۴/۲۲ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۱۰ چاپ: ۱۳۹۶/۱۲/۲۸

<sup>۱</sup>گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

<sup>۲</sup>پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران، ایران

<sup>۳</sup>گروه باغبانی و گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران

\*مسئول مکاتبات: sshahbazi@nrcam.org

**چکیده.** گونه‌های سرده *Trichoderma* از نظر تولید سلولاز با فعالیت آنزیمی بالا بسیار شناخته شده هستند. با وجود تولید آنزیم‌های سلولازی متنوع در قارچ *تریکودرما*، به علت عمل کرد آنزیمی پائین و هزینه زیاد تولید، استفاده از آنزیم‌های سلولازی آنها در تبدیل زیستی پسماندهای سلولزی چندان موفقیت‌آمیز نبوده است. تحقیق حاضر با هدف دست‌یابی به جدایه‌های موتانتی از گونه *Trichoderma viride* با توان تولید بیشتر آنزیم سلولاز با استفاده از القای جهش با پرتو گاما انجام گرفته است. سوسپانسیون اسپور قارچ در اپتیمم دوز ۲۵۰ گری تحت پرتوتابی با گاما قرار گرفت. اسپورهای جوانه‌زده به منظور بررسی پایداری پنج‌بار واکشت شدند و از بین آنها جدایه‌های موتانت با قابلیت اسپورزایی بهتر انتخاب شدند. فعالیت سلولازی با استفاده از سوبستراهای سلولزی کاغذ صافی و اتمن شماره یک، کربوکی متیل سلولز، آویسل، سلولز باکتریایی و سلولز کلوتیدی و براساس دستورالعمل IUPAC سنجیده شد. پروفایل پروتئین‌های سلولازی جدایه‌های موتانت با آزمون SDS-PAGE بررسی شد. بیشترین فعالیت سلولاز کل و فعالیت آنزیم آویسلز به ترتیب با ۹۲/۴۳ و ۷۴/۴۰ U/mg در جدایه موتانت M21 و بیشترین فعالیت اندوگلوکانازی در جدایه موتانت M18 مشاهده شد. به طور کلی کاربرد اشعه گاما در ۳۸ درصد از جدایه‌های جهش یافته به افزایش معنی‌دار در فعالیت سلولازی منجر شد. همچنین، از این روش به منزله روشی ساده و کارآمد برای دست‌یابی به جدایه‌های موتانتی می‌توان استفاده کرد که توانایی تولید مقادیر بالای آنزیم و دیگر متابولیت‌های میکروبی را داشته باشند.

**واژه‌های کلیدی.** الکتروفورز، پرتوتابی، سلولز، کربوکی متیل سلولز

## Cellulase enzyme production enhancement in *Trichoderma viride* by Gamma ray induced mutation

Khadijeh Bagheri<sup>1</sup>, Samira Shahbazi<sup>2\*</sup>, Hamed Askari<sup>2</sup>, Shideh Mojerlou<sup>3</sup> & Farangis Amirlou<sup>1</sup>

Received 13.07.2016/ Accepted 31.12.2017/ Published 19.03.2018

<sup>1</sup>Agronomy and Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran

<sup>2</sup>Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute (NSTRI), Atomic Energy Organization of Iran (AEOI), Iran

<sup>3</sup>Horticulture and Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran

\*Correspondent author: sshahbazi@nrcam.org

**Abstract.** *Trichoderma* species have been famous for production of cellulases with relatively high enzymatic activity. However, attempts to use their cellulolytic enzymes in the bioconversion of cellulosic wastes have not been successful because of high cost of production and low enzymatic yields. This study aimed to obtain gamma-induced mutants of *T. viride* with enhanced extracellular cellulase production. Spore suspensions were exposed to  $\gamma$ -rays at 250 Gy as optimum dose. After irradiation, all germinated spores were grown onto PDA plates and mutant strains with better sporulation were selected and subcultured five times to test their stability. Cellulase activity was tested using Whatman No. 1 filter paper, carboxymethyl cellulose, avicel, bacterial cellulose and walseth cellulose according to the IUPAC recommendation. Extracellular proteins profiles of mutant strains were studied via SDS-PAGE. The maximum activity of total cellulase and avicelase were observed in the isolate of M21 (92.43 and 74.40 U/mg, respectively) and maximum endo-glucanase activity was observed in M18 mutant. The results of this study showed that the application of gamma ray led to a significant increase in Cellulose activity of 38 percent of mutant strains. Thus, this method could be used as a simple and efficient way to achieve strains with the ability to produce high levels of enzymes and other biological metabolites.

**Keywords.** carboxy methyl cellulose, cellulose, electrophoresis, irradiation, mutation

## مقدمه

امروزه، اهمیت آنزیم سلولاز به علت پتانسیل استفاده از آن در توسعه تکنولوژی اتانول در حال افزایش است. در آینده نزدیک، یکی از کاربردهای مهم سلولاز، تبدیل زیستی بیوماس لیگنو-سلولزی به سوخت اتانول خواهد بود (Dillon et al., 2008). آنزیم‌های سلولازی به‌ویژه سلولاز دو قارچ *تریکودرما* و *آسپرژیلوس* ۲۰ درصد بازار آنزیم دنیا را از آن خود ساخته‌اند. عمل‌کرد کم آنزیم‌های سلولازی و هزینه زیاد تولید آنها، دو چالش اصلی در کاربرد صنعتی آنها به‌شمار می‌رود. از همین‌رو، روش‌های متعددی برای ارتقای فعالیت سلولازی، خصوصاً در قارچ سرده *تریکودرما* به‌کار گرفته می‌شود. بیشتر این تلاش‌ها در جهت افزایش فعالیت سلولاز کل یا فعالیت بخش بتاگلوکوزیدی سیستم سلولازی است (Awafo, 1997).

از آنجاکه گونه‌های مختلف *تریکودرما* یکی از مفیدترین منابع تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده سلولز هستند، توجه خاصی به تولید آنزیم‌های سلولازی توسط این قارچ، از طریق شناسایی و ایجاد گونه‌های برتر از نظر تولید آنزیم، شده است (Persson et al., 1991). از آغاز دهه ۱۹۶۰، که فعالیت سلولازی قارچی گزارش شد، تلاش‌های شایان توجهی در جهت تغییر ژنتیکی جدایه‌های *تریکودرما* و بهینه‌سازی کشت با فرض افزایش کارایی تولید سلولاز صورت گرفت و در دهه اخیر، روش‌های متعددی از جمله جهش‌های شیمیایی، استفاده از پرتو فرابنفش و مهندسی ژنتیک برای به‌دست‌آوردن جدایه‌های تولیدکننده سلولاز بیشتر در اولویت قرار داشته است (Muthuvelayudham & Viruthagiri, 2006).

با توجه به پتانسیل کاربرد آنزیم‌های سلولازی در صنایع مختلف و نیز اهمیت نقش قارچ *تریکودرما* در تولید این نوع آنزیم، تحقیق حاضر با هدف ایجاد تنوع در ذخیره ژنتیکی قارچ *تریکودرما* بومی و نیز دستیابی به ژنوتیپ‌های جدید با توان فعالیت آنزیمی بیشتر، با استفاده از القای جهش با پرتو گاما در گونه قارچی *Trichoderma viride* انجام گرفته است.

## مواد و روش‌ها

### جداسازی قارچ *T. viride*

برای جداسازی قارچ *تریکودرما*، نمونه‌برداری از خاک اطراف

ریشه مزارع کشت محصولات مختلف انجام گرفت و سوسپانسیون نمونه‌های خاک به محیط کشت عصاره سیب زمینی-دکستروز-آگار انتقال داده شد. پرگنه‌های حاصل، پس از تهیه کشت تک-اسپور (به‌منظور خالص‌سازی)، با استفاده از کلید شناسایی قارچ-های ناقص و براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی فیلیدها و فیاوسپورها و اونتوژنز کنیدیوم‌ها شناسایی و جدایه‌ها برای اجرای تحقیق انتخاب شدند.

### عملیات دوزیابی به‌منظور القای جهش

#### در ژنوم قارچ *تریکودرما*

به‌منظور القای جهش در ژنوم قارچ، کنیدیوم‌ها (اسپورهای غیر-جنسی) به‌مثابه اندام هدف برای پرتوآبی انتخاب شدند. سطح تشک پتری حاوی کشت هفت‌روزه قارچ روی محیط کشت PDA با محلول نمکی استریل شست‌وشو داده شد. سپس، به-کمک لوپ استریل، اسپورها از سطح پتری جمع‌آوری و تراکم اسپورها در این سوسپانسیون در زیر میکروسکوپ نوری با استفاده از لام گلیول‌شمار در غلظت  $10^7$  اسپور در میلی‌لیتر تنظیم شد. عملیات پرتوآبی بر سوسپانسیون اسپورها در ۹ دامنه دوز صفر-۵۰-۱۵۰-۲۰۰-۲۵۰-۳۰۰-۳۵۰-۴۰۰-۴۵۰ گرمی در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از دستگاه گاماسل با چشمه کبالت ۶۰، اکتیویته ۲۵۰۰ کوری و نرخ دوز ۰/۲۳ گرمی در ثانیه مستقر در مرکز تحقیقات کشاورزی، صنعتی و پزشکی هسته‌ای کرج انجام گرفت. درصد جوانه‌زنی اسپورهای پرتوآبی‌شده برای هر محدوده دوز با شمارش اسپورهای جوانه‌زده (در محدوده بزرگ-نمایی ۱۰ میکروسکوپ نوری) اندازه‌گیری شد (Moradi et al., 2013).

### اندازه‌گیری غلظت پروتئین خارج سلولی تولید شده در محیط کشت تخمیری

در ابتدا، با استفاده از غلظت‌های مختلف آلبومین به‌روش بردفورد، منحنی استاندارد رسم شد. سپس، پروتئین محلول ( $\text{mg.ml}^{-1}$ ) در مایع فوقانی محیط TFM اندازه‌گیری شد. اساس این روش که یکی از دقیق‌ترین روش‌های بیوشیمیایی است، استفاده از تکنیک رنگ‌سنجی است. تغییر رنگ متفاوت کماسی بریلیانت بلو در پاسخ به غلظت‌های مختلف پروتئین رخ می‌دهد و اتصال آن به پروتئین سبب انتقال جذب حداکثر از ۳۶۵ نانومتر به ۵۹۵ نانومتر می‌شود (Bradford, 1976). با قرائت جذب نمونه

محدوده جهت پرتوتابی، تیمارها را در چند گروه مختلف قرار داد. با افزایش در میزان دوز، قدرت جوانه‌زنی اسپور به تدریج کاهش یافت و پرتوتابی در محدوده دوز ۴۵۰ گرمی، جوانه‌زنی اسپور قارچ را به طور کامل متوقف کرد (جدول ۱). براساس مطالعه Ahari Mostafavi و Safaie (2008)، معیار دوز جذبی مناسب برای القای موتاسیون غیرکشنده در میکروارگانیسم‌ها ظهور تقریباً ۴۰ تا ۵۰ درصد جوانه‌زنی اسپور بعد از پرتوتابی است (Moradi *et al.*, 2013). برهمن اساس، دوز ۲۵۰ گرمی، به-مثابه دوز بهینه به منظور القای موتاسیون در ژنوم قارچ تریکودرما انتخاب شد.

### اندازه‌گیری غلظت پروتئین خارج سلولی در محیط کشت تخمیری

پروتئین خارج سلولی اندازه‌گیری شده برای جدایه‌های جهش-یافته در محدوده (mg/ml) ۰/۰۵ تا ۰/۱۸۲ قرار دارد. بیشترین غلظت پروتئین، به جدایه M2 با ۰/۱۸۲ mg/ml مربوط است که نسبت به جدایه وحشی با ۰/۱۲۰ mg/ml، افزایش ۱/۵ برابری نشان داده است. قارچ‌های رشته‌ای خصوصاً قارچ‌های سرده تریکودرما، ظرفیت زیادی برای تولید پروتئین خارج سلولی دارند (Durand *et al.*, 1988) که این ظرفیت، به کمک جهش تصادفی در برنامه‌های بهبود جدایه‌ها افزایش یافته است (Vu *et al.*, 2011).

### سنجش فعالیت سلولاز

میزان هیدرولیز سوبسترا به ترکیب منبع کربنی استفاده شده وابسته است دارد. برای انجام آزمایش‌های هیدرولیز از سوبستراهای مدل متفاوتی استفاده شد که گرچه فاقد ویژگی‌های یکسان با چیزی هستند که سلولز در دیواره سلولی ترکیبات گیاهی از خود نشان می‌دهد، در تحقیقات به شکل گسترده‌ای به منظور نشان دادن تفاوت‌های عمل‌کردی آنزیم به کار می‌روند. سوبستراهای معمولی که در تعیین فعالیت سیستم سلولازی به کار می‌روند شامل کاغذ صافی، کربوکی متیل سلولز، آویسل و  $\alpha$ -سلولز هستند.

در کنار این سوبستراها، سلولز باکتریایی و سلولز آمورف هم به-مثابه سوبسترای مدل در اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی به کار گرفته می‌شوند (Andersen, 2007). از آنجا که تفاوت جدایه‌ها از نظر میزان غلظت پروتئین خارج سلولی، امکان مقایسه مستقیم بین فعالیت آنزیمی آنها را نمی‌دهد، بهتر آن است مقایسه فعالیت

های مجهول و مقایسه آنها با منحنی استاندارد، غلظت پروتئین خارج سلولی در محیط کشت تخمیری محاسبه شد (Shahbazi *et al.*, 2016).

### سنجش فعالیت آنزیم سلولاز

فعالیت آنزیم سلولاز براساس سیستم IUPAC (Ghose, 1987) و با استفاده از گلوکز به مثابه استاندارد اندازه‌گیری شد و فعالیت آنزیمی ویژه براساس واحد Units/mg گزارش شد. فعالیت آنزیمی ویژه به صورت مقدار فعالیت آنزیم براساس واحد Unit/ml (که در آن هر Unit مقدار آنزیمی است که یک میکرومول قند احیاکننده (گلوکز) را در دقیقه از سوبسترای سلولزی آزاد می‌کند) به مقدار کل پروتئین موجود در محیط (mg/ml) تعریف می‌شود (Shahbazi *et al.*, 2014).

### اندازه‌گیری فعالیت سلولاز کل (FPase)

برای اندازه‌گیری فعالیت سلولاز کل از نیم میلی لیتر مایع فوقانی محیط TFM و کاغذ صافی واتمن شماره یک به منزله سوبسترا استفاده شد. جذب نوری نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت شد و مقادیر جذب نوری نمونه‌ها به واحد آنزیمی تبدیل شد (Shahbazi *et al.*, 2014).

### تعیین فعالیت اندوگلوکانازی (CMCase)

برای اندازه‌گیری فعالیت اندوگلوکانازی از کربوکی متیل سلولز به منزله سوبسترا و ۰/۵ میلی لیتر از مایع فوقانی محیط کشت TFM استفاده شد (Shahbazi *et al.*, 2016).

### اندازه‌گیری فعالیت اگزوگلوکانازی (Avicelase)

برای اندازه‌گیری فعالیت اگزوگلوکانازی از محلول ۰/۵ درصد آویسل به مثابه سوبسترا و ۰/۵ میلی لیتر از مایع فوقانی محیط کشت TFM استفاده شد (Shahbazi *et al.*, 2016).

### الکتروفورز SDS- PAGE

برای بررسی الگوی پروتئینی از الکتروفورز SDS-PAGE به-روش لاملی (Laemmli, 1970) در سیستم ناپیوسته (ژل ردیف کننده، ۴/۵ درصد و ژل تفکیک کننده، ۱۲ درصد) استفاده شد.

### نتایج و بحث

#### تعیین محدوده مناسب پرتوتابی

مقایسه درصد جوانه‌زنی اسپور، پس از گذشت ۲۴ ساعت از زمان پرتوتابی، در ۹ دوز مختلف به منظور تعیین مناسب‌ترین

**جدول ۱- مقایسه میانگین درصد جوانه زنی اسپور قارچ تریکودرما در ۹ دوز اشعه گاما.**
**Table 1.** Mean comparison of *Trichoderma* spore germination rate in nine doses of gamma ray.

| دوز پرتوتابی (Gy)  |                  |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |
|--------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| ۴۵۰                | ۴۰۰              | ۳۵۰               | ۳۰۰               | ۲۵۰               | ۲۰۰               | ۱۵۰               | ۵۰                | ۰                 |
| ۰ <sup>h</sup>     | ۹/۷ <sup>g</sup> | ۱۱/۹ <sup>g</sup> | ۱۵/۵ <sup>f</sup> | ۴۳/۴ <sup>c</sup> | ۵۹/۸ <sup>d</sup> | ۷۳/۹ <sup>c</sup> | ۸۱/۱ <sup>b</sup> | ۸۵/۵ <sup>a</sup> |
| قدرت جوانه زنی (%) |                  |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |

**جدول ۲- مقایسه میانگین FPase (U/mg) جدایه های وحشی و موتانت گونه *T. viride*.**
**Table 2.** Mean comparison of FPase (U/mg) of wild and mutant strains of *T. viride*.

| جدایه قارچ               | فعالیت آنزیمی ویژه (U/mg) | جدایه قارچ           | فعالیت آنزیمی ویژه (U/mg) |
|--------------------------|---------------------------|----------------------|---------------------------|
| <i>T. viride</i> control | ۲۹/۷۵ <sup>kl</sup>       | <i>T. viride</i> M11 | ۲۹/۰۳ <sup>kl</sup>       |
| <i>T. viride</i> M1      | ۲۴/۶۱ <sup>lmn</sup>      | <i>T. viride</i> M12 | ۳۷/۰۶ <sup>ghi</sup>      |
| <i>T. viride</i> M2      | ۱۹/۵۱ <sup>n</sup>        | <i>T. viride</i> M13 | ۳۱ <sup>jk</sup>          |
| <i>T. viride</i> M3      | ۲۲/۷۳ <sup>mn</sup>       | <i>T. viride</i> M14 | ۴۲/۳۴ <sup>fg</sup>       |
| <i>T. viride</i> M4      | ۲۸/۳۵ <sup>kl</sup>       | <i>T. viride</i> M15 | ۴۹/۸۲ <sup>de</sup>       |
| <i>T. viride</i> M5      | ۳۱/۴۴ <sup>jk</sup>       | <i>T. viride</i> M16 | ۶۷/۰۳ <sup>h</sup>        |
| <i>T. viride</i> M6      | ۲۷/۶۰ <sup>klm</sup>      | <i>T. viride</i> M17 | ۴۹/۵۲ <sup>c</sup>        |
| <i>T. viride</i> M7      | ۳۶/۹۱ <sup>hi</sup>       | <i>T. viride</i> M18 | ۵۲/۵۲ <sup>de</sup>       |
| <i>T. viride</i> M8      | ۳۲ <sup>ijk</sup>         | <i>T. viride</i> M19 | ۵۴/۴۳ <sup>cde</sup>      |
| <i>T. viride</i> M9      | ۳۶/۳۸ <sup>hij</sup>      | <i>T. viride</i> M20 | ۷۱/۰۱ <sup>b</sup>        |
| <i>T. viride</i> M10     | ۳۰/۱۵ <sup>kl</sup>       | <i>T. viride</i> M21 | ۹۲ <sup>a</sup>           |

سلولازی جدایه ها بر مبنای غلظت پروتئین موجود در مایع فوقانی محیط تخمیر صورت گیرد (Martins et al., 2008). از همین رو، در تحقیق حاضر، فعالیت آنزیمی جدایه ها بر اساس فعالیت آنزیمی ویژه آنها، به صورت مقدار فعالیت آنزیم (Units/ml) به مقدار کل پروتئین تعریف می شود، گزارش شده است.

**سنجش فعالیت سلولاز کل**

تجزیه کامل سلولز به مونوساکارید سازنده آن (گلوکز)، مستلزم فعالیت هم افزایی اجزای مختلف سیستم سلولازی (اندوگلوکاناز-ها، اکزوگلوکانازها و بتاگلوکوزیدازها) است. فعالیت سلولزی کل، که FPase هم نامیده می شود، نشان دهنده برهم کنش این آنزیم ها با سوبسترای سلولزی است و با استفاده از سوبسترای ناهمگن کاغذ صافی واتمن شماره یک، که در ساختار خود شامل هر دو بخش کریستالی و آمورف است، اندازه گیری می شود (Xu et al., 2011). بر اساس نتایج جدول ۲ بیشترین فعالیت FPase با ۹۲/۴۳ Unit/mg به جدایه M18 مربوط است که نسبت به جدایه وحشی، که فعالیتی برابر با ۴۸/۳۳ Unit/mg دارد، ۱/۹ برابر شده است.

**سنجش فعالیت اندوگلوکانازی (CMCase)**

اندوگلوکانازها پیوندهای گلیکوزیدی داخلی را به شکل تصادفی هیدرولیز می کنند و سبب کاهش سریع در طول پلیمر و افزایش تدریجی در تراکم قندهای احیا کننده می شوند (Vlasenko et al., 2010). جدول ۳ مقایسه میانگین فعالیت CMCase در جدایه های وحشی و موتانت را نشان می دهد. جدایه موتانت M21، که میزان CMCase آن در مقایسه با جدایه مادری ۳/۱ برابر افزایش داشته است، با ۹۲ U/mg بیشینه فعالیت اندوگلوکانازی را در مقایسه با دیگر جدایه های موتانت این گونه به خود اختصاص داده است.

**سنجش فعالیت اکزوگلوکانازی (Avicelase)**

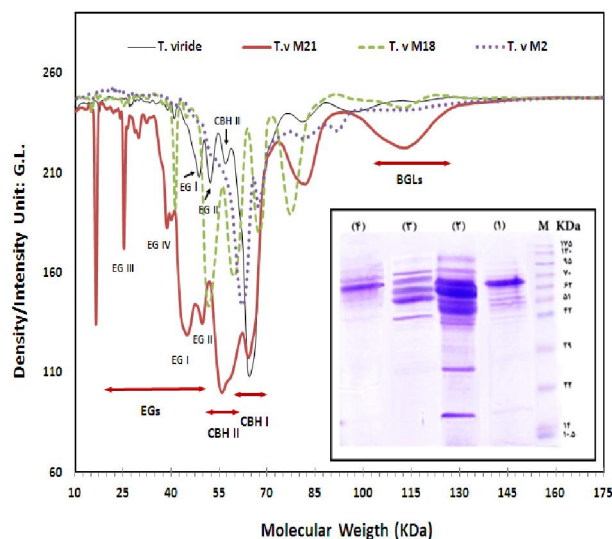
یکی از ویژگی های مهم تمامی سلوبیوهیدرولازها آن است که قادر به عمل کردن روی سوبسترای میکروکریستالی هستند. به منظور تعیین فعالیت اکزوگلوکانازی در این تحقیق از سلولز میکروکریستالی آویسل استفاده شد که برای حمله آنزیم های اندوگلوکانازی نسبتاً غیرقابل دسترس است و سوبسترای مناسبی برای سنجش فعالیت اکزوگلوکانازی به شمار می رود (Zhang & Lind, 2004). مقایسه میانگین فعالیت آویسلز جدایه های وحشی و موتانت (جدول ۴) نشان داد که بیشینه فعالیت اکزوگلوکانازی به

**جدول ۳- مقایسه میانگین CMCase (U/mg) جدایه‌های وحشی و موتانت گونه *T. viride*****Table 3.** Mean comparison of CMCase (U/mg) of wild and mutant strains of *T. viride*.

| جدایه قارچ               | فعالیت آنزیمی ویژه (U/mg) | جدایه قارچ           | فعالیت آنزیمی ویژه (U/mg) |
|--------------------------|---------------------------|----------------------|---------------------------|
| <i>T. viride</i> control | ۴۸/۳۳ <sup>ghi*</sup>     | <i>T. viride</i> M11 | ۳۹/۸۴ <sup>hi</sup>       |
| <i>T. viride</i> M1      | ۴۱/۹۷ <sup>hi</sup>       | <i>T. viride</i> M12 | ۴۶/۳۷ <sup>hi</sup>       |
| <i>T. viride</i> M2      | ۳۶/۸۷ <sup>i</sup>        | <i>T. viride</i> M13 | ۵۰ <sup>ghi</sup>         |
| <i>T. viride</i> M3      | ۴۰/۹۱ <sup>hi</sup>       | <i>T. viride</i> M14 | ۶۵/۳۳ <sup>cd</sup>       |
| <i>T. viride</i> M4      | ۴۸/۲۷ <sup>ghi</sup>      | <i>T. viride</i> M15 | ۹۲/۳۷ <sup>a</sup>        |
| <i>T. viride</i> M5      | ۵۳/۲۰ <sup>efgh</sup>     | <i>T. viride</i> M16 | ۸۸/۷۹ <sup>ab</sup>       |
| <i>T. viride</i> M6      | ۴۳/۹۷ <sup>hi</sup>       | <i>T. viride</i> M17 | ۸۷/۹۸ <sup>ab</sup>       |
| <i>T. viride</i> M7      | ۵۱ <sup>fghi</sup>        | <i>T. viride</i> M18 | ۹۲/۴۳ <sup>a</sup>        |
| <i>T. viride</i> M8      | ۴۸/۷۵ <sup>ghi</sup>      | <i>T. viride</i> M19 | ۶۴/۸۹ <sup>def</sup>      |
| <i>T. viride</i> M9      | ۳۸/۲۹ <sup>i</sup>        | <i>T. viride</i> M20 | ۷۵/۸۰ <sup>bcd</sup>      |
| <i>T. viride</i> M10     | ۶۶/۹۴ <sup>cd</sup>       | <i>T. viride</i> M21 | ۴۴/۲۰ <sup>hi</sup>       |

**جدول ۴- مقایسه میانگین Avicelase (U/mg) جدایه‌های وحشی و موتانت گونه *T. viride*****Table 4.** Mean comparison of Avicelase (U/mg) of wild and mutant strains of *T. viride*.

| جدایه قارچ               | فعالیت آنزیمی ویژه (U/mg) | جدایه قارچ           | فعالیت آنزیمی ویژه (U/mg) |
|--------------------------|---------------------------|----------------------|---------------------------|
| <i>T. viride</i> control | ۳۲/۵۸ <sup>fg*</sup>      | <i>T. viride</i> M11 | ۲۰/۹۷ <sup>ij</sup>       |
| <i>T. viride</i> M1      | ۲۱/۷۳ <sup>ij</sup>       | <i>T. viride</i> M12 | ۳۳/۷۳ <sup>efg</sup>      |
| <i>T. viride</i> M2      | ۱۸/۹۶ <sup>ij</sup>       | <i>T. viride</i> M13 | ۳۲/۶۹ <sup>efg</sup>      |
| <i>T. viride</i> M3      | ۲۰/۶۵ <sup>ij</sup>       | <i>T. viride</i> M14 | ۲۹/۹۳ <sup>g</sup>        |
| <i>T. viride</i> M4      | ۲۴/۲۱ <sup>hi</sup>       | <i>T. viride</i> M15 | ۳۹/۳۹ <sup>def</sup>      |
| <i>T. viride</i> M5      | ۲۴ <sup>hi</sup>          | <i>T. viride</i> M16 | ۴۹/۰۱ <sup>c</sup>        |
| <i>T. viride</i> M6      | ۲۲/۴۸ <sup>ij</sup>       | <i>T. viride</i> M17 | ۳۹/۴۴ <sup>def</sup>      |
| <i>T. viride</i> M7      | ۱۹/۳۶ <sup>ij</sup>       | <i>T. viride</i> M18 | ۵۱/۹۶ <sup>c</sup>        |
| <i>T. viride</i> M8      | ۳۰/۲۵ <sup>gh</sup>       | <i>T. viride</i> M19 | ۴۷/۸۴ <sup>c</sup>        |
| <i>T. viride</i> M9      | ۱۵/۸۱ <sup>j</sup>        | <i>T. viride</i> M20 | ۵۹/۷۱ <sup>b</sup>        |
| <i>T. viride</i> M10     | ۱۵/۲۷ <sup>j</sup>        | <i>T. viride</i> M21 | ۷۴/۴۰ <sup>a</sup>        |



شکل ۱- الگوی پروتئین‌های خارج سلولی در *T. viride* و نمودار غلظت سنجی باندهای مربوط به هر آنزیم، (M) مارکر (۱) *T. v* control (۲) *T. v* M21 (۳) *T. v* M18 (۴) *T. v* M2

**Fig. 1.** Extracellular protein profile of *T. viride* and its densitometry of related enzymes bands. (M); marker, (1); *T. v* control, (2); *T.v*.M21, (3); *T. v* M18 , (4); *T. v* M2.

جدایه M21 اختصاص دارد که با  $74/40$  U/mg فعالیت آن در قیاس با جدایه مادری  $2/3$  برابر شده است.

**پروفایل پروتئینی برخی از جدایه‌های موتانت *T. viride***

پروفایل پروتئین‌های خارج سلولی در برخی سویه‌های موتانت *T.viride* در شکل ۱ آمده است. جدایه *T. viride* M21، که براساس نتایج سنجش فعالیت آنزیمی، بیشترین میزان فعالیت اگزوگلوکانازی (آویسلازی) را به خود اختصاص داده است، در پروفایل پروتئینی خود در محدوده مربوط به آنزیم‌های سلویو هیدرولاز، به ترتیب، باندهایی با وزن مولکولی  $64$  (KDa) و  $56$  برای CBH I و CBH II نشان داد. با مقایسه الگوی پروتئینی این جدایه با جدایه وحشی *T. virid*، که باند مربوط به آنزیم CBH II آن ضعیف است، آشکار می‌شود که افزایش در میزان هیدرولیز آویسل در این جدایه نسبت به جدایه وحشی به حضور دو باند با شدت رنگ‌پذیری زیاد متعلق به آنزیم‌های اگزوگلوکاناز و عمل کرد هم‌افزاینده اگزو-اگزو آنها با یکدیگر مربوط است. بررسی الگوی باندهای پروتئینی جدایه *T. viride* M21 که بیشینه فعالیت اندوگلوکانازی را در مقایسه با گونه والد *T. viride* از خود نشان داده، حضور باندهایی با وزن‌های مولکولی  $25$ ،  $49$ ،  $45$  و  $38$  کیلو دالتون به ترتیب برای آنزیم‌های

EG IV و EG II، EG I، EG III را مشخص می‌سازد. الکتروفورز SDS-PAGE پروتئین‌های ترشحی برای جدایه *T. viride* M18، که براساس نتایج اندازه‌گیری فعالیت آنزیم بیشترین میزان FPase را به خود اختصاص داده، باندهایی با وزن مولکولی  $68$  KDa و  $60$  KDa مربوط به آنزیم‌های CBH I و CBH II را نشان می‌دهد. در مقایسه با جدایه وحشی، که در پروفایل خود در محدوده گزارش شده برای آنزیم‌های اندوگلوکانازی، تنها باندهای ضعیف آنزیم EG I و EG II قابل مشاهده بود، در الگوی پروتئینی جدایه *T. viride* M18 باند قوی با وزن مولکولی  $52$  و  $41$  KDa به ترتیب مربوط به EG و EG IV حضور داشت. همان‌گونه که پیش از این ذکر شد، هیدرولیز کارآمد سلولاز نیازمند حضور هر سه گروه آنزیم‌های تشکیل-دهنده سیستم سلولازی (CBHs، EGs، BGLs) است. میزان زیاد FPase در جدایه *T. viride* M21 به ترشح یک کمپلکس سلولازی کامل در این جدایه و رفتار هم‌افزایی اجزای منفرد حاضر در این سیستم برای تجزیه سوبسترای سلولزی ناهمگن کاغذ صافی واتمن مربوط است. در پروفایل پروتئینی جدایه *T. viride* M2، که ضعیف‌ترین جدایه موتانت در گونه *T. viride* از لحاظ فعالیت CMCase و FPase است و از نظر فعالیت

EG IV و EG II، EG I، EG III را مشخص می‌سازد. الکتروفورز SDS-PAGE پروتئین‌های ترشحی برای جدایه *T. viride* M18، که براساس نتایج اندازه‌گیری فعالیت آنزیم بیشترین میزان FPase را به خود اختصاص داده، باندهایی با وزن مولکولی  $68$  KDa و  $60$  KDa مربوط به آنزیم‌های CBH I و CBH II را نشان می‌دهد. در مقایسه با جدایه وحشی، که در پروفایل خود در محدوده گزارش شده برای آنزیم‌های اندوگلوکانازی، تنها باندهای ضعیف آنزیم EG I و EG II قابل مشاهده بود، در الگوی پروتئینی جدایه *T. viride* M18 باند قوی با وزن مولکولی  $52$  و  $41$  KDa به ترتیب مربوط به EG و EG IV حضور داشت. همان‌گونه که پیش از این ذکر شد، هیدرولیز کارآمد سلولاز نیازمند حضور هر سه گروه آنزیم‌های تشکیل-دهنده سیستم سلولازی (CBHs، EGs، BGLs) است. میزان زیاد FPase در جدایه *T. viride* M21 به ترشح یک کمپلکس سلولازی کامل در این جدایه و رفتار هم‌افزایی اجزای منفرد حاضر در این سیستم برای تجزیه سوبسترای سلولزی ناهمگن کاغذ صافی واتمن مربوط است. در پروفایل پروتئینی جدایه *T. viride* M2، که ضعیف‌ترین جدایه موتانت در گونه *T. viride* از لحاظ فعالیت CMCase و FPase است و از نظر فعالیت

ارزشمندی مانند انواع سلولازها، کیتینازها، پروتئازها، پکتیناز و فیتازها و دستیابی به جدایه‌های قابل استفاده در تولید انبوه و صنعتی آنزیم هموار می‌سازد.

### سپاسگزاری

این مقاله از اعتبارات پروژه "تولید مواد بیولوژیک به منظور کنترل عوامل بیماری زای گیاهی خاکزاد - A88A099" انجام شده و نویسندگان از همکاری پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای و دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان تشکر می‌نمایند.

### REFERENCES

- Ahari Mostafavi, H. and Safaie, N. 2008. Application of nuclear technology in plant protection. – Zolal Kosar Publisher. Tehran. 122 pp.
- Andersen, N. 2007. Enzymatic hydrolysis of cellulose: experimental and modeling studies. – Ph.D. Thesis. University of Technical, Denmark.
- Awafo, V.A. 1997. Biosynthesis of cellulase system from *Trichoderma reesei* and its characteristics. – Ph.D. Thesis. University of McGill, Montreal, Canada.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. – Anal. Biochem. 72: 248-54.
- Dillon, A.J.P., Camassola, M., Henriques, J.A.P., Fungaro, M.H.P., Azevedo, A.C.S., Velho, T.A.F. and Laguna, S.E. 2008. Generation of recombinants strains to cellulases production by protoplast fusion between *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma harzianum*. – Enzyme Microb. Technol. 43: 403-409.
- Durand, H., Clanet, M. and Tiraby, G. 1988. Genetic improvement of *Trichoderma reesei* for large scale cellulase production. – Enzyme Microbiol. Technol. 10: 341-346.
- Ghose, T.K. 1987. Measurement of cellulase activities. – Pure Appl. Chem. 59: 257-68.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. – Nature 227: 680-685.
- Martins, L.F., Kolling, D., Camassola, M., Dillon, A.J.P. and Ramos, L.P. 2008. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. – Bioresource Technol. 99: 1417-1424.
- Moradi, R., Shahbazi, S., Ahari mostafavi, H., Ebrahimi, M.A., Askari, H. and Mirmajlesi, M. 2013. Investigation of gamma radiation effects on morphological and antagonistic characteristics of *Trichoderma harzianum*. – Crop Biotech. 4: 109-117.
- Muthuvelayudham, R. and Viruthagiri, T. 2006. Fermentative production and kinetics of cellulose protein on

اگزوگلوکانازی نیز یکی از جدایه‌هایی است که کمترین فعالیت آویسلازی را داشته است، در محدوده مربوط به آنزیم‌های سلویو هیدرولاز تنها باندی با وزن مولکولی ۶۲ KDa مربوط به آنزیم CBH I تشکیل شده است و در محدوده مربوط به آنزیم‌های اندوگلوکانازی نیز باند واضحی قابل تشخیص نبود.

### نتیجه‌گیری

نتایج اندازه‌گیری فعالیت سلولازی با استفاده از سوبسترای مختلف نشان داد که حداکثر فعالیت آنزیمی، در تمامی جدایه‌های تحت بررسی در حضور سلولز کلونیدی، که طی انجام مراحل آزمایش از تیمار آویسل با اسیدفسفریک تولید شد، حاصل شده است. از آنجاکه ساختار کریستالی و منظم بیوپلیمر سلولز، چالشی در هیدرولیز شیمیایی و آنزیمی آن محسوب می‌شود، تبلورزدایی بیوماس لیگنوسلولزی طی تیمار آن با اسیدفسفریک، با در نظر گرفتن ویژگی غیرخوردگی و غیرسمی بودن این اسید، می‌تواند راه‌کاری مؤثر در بهبود فرآیند تجزیه مواد سلولزی به‌منظور تسهیل در تولید قندهای قابل تخمیر به‌شمار آید که کاربردهای متعددی در مصارف مختلف صنعتی دارند.

به‌طور کلی، نتایج این تحقیق نشان داد که امکان ایجاد تغییر در میزان تولید پروتئین خارج‌سلولی و فعالیت سلولازی در اثر کاربرد پرتو گاما وجود دارد و ایجاد جدایه‌های قارچی با توان تولید آنزیم‌های سلولازی بیشتر، که پتانسیل بالاتری در کاربردهای صنعتی به‌ویژه در مدیریت ضایعات و بقایای گیاهی، تخمیر و بازیافت سلولز، تولید زیست انرژی و دیگر فرآورده‌های زیستی داشته باشند، توسط القای جهش با پرتو گاما میسر است. جدایه‌های جهش‌یافته حاصل از این تحقیق مانند M2، که بیشترین فعالیت سلولاز کل و فعالیت آنزیم آویسلاز (با ۹۲/۴۳ و ۷۴/۴۰ U/mg به ترتیب) را نشان داد و M18 که بیشترین فعالیت اندوگلوکانازی را داراست، جدایه‌های مناسبی برای تحقیقات کاربردی در زمینه تولید این آنزیم‌ها با مصارف گوناگون هستند. نتایج این مطالعه اثبات کرد که کاربرد روش القای جهش با پرتو دهی گاما در ۳۸ درصد از جدایه‌های جهش‌یافته گونه *T. viride* به افزایش معنی‌دار در فعالیت سلولازی منجر می‌شود. این دستاورد راه را برای کاربردی کردن هرچه بیشتر این روش القای جهش و ایجاد تنوع ژنتیکی در قارچ‌های (سرد-های *Trichoderma*, *Aspergillus*) تولیدکننده آنزیم‌های

- Trichoderma reesei* using sugarcane bagasse and rice straw. – Afr. J. Biotechnol. 5: 1873-1881.
- Persson, I., Tjerneld, F. and Hahn-Hagerdahl, B.** 1991. Fungal cellulytic enzyme production: a review. – Process Biochem. 26: 65-74.
- Shahbazi, S., Askari, H. and Mojerlou, S.** 2016. The impact of different physicochemical parameters fermentation on extracellular cellulolytic enzyme production by *Trichoderma harzianum*. – J. Crop Protec. 5: 397-412.
- Shahbazi, S., Ispareh, Kh., Karimi, M., Askari, H. and Ebrahimi, M.A.** 2014. Gamma and UV radiation induced mutagenesis in *Trichoderma reesei* to enhance cellulases enzyme activity. – Intl. J. Farm. Alli. Sci. 3: 543-554.
- Vlasenko, E., Schüle, M., Cherry, J. and Xu, F.** 2010. Substrate specificity of family 5, 6, 7, 9, 12, and 45 endoglucanases. – Bioresour. Technol. 101: 2405-2411.
- Vu, V.H., Pham, T.A. and Kim, K.** 2011. Improvement of fungal cellulase production by mutation and optimization of solid State Fermentation. – Mycobiol. 39: 20-25.
- Xu, F., Jin, H., Li, H., Tao, L., Wang, J. and Chen, S.** 2011. Genome shuffling of *Trichoderma viride* for enhanced cellulase production. – Ann. Microbiol. 5: 176-191.
- Zhang, Y.H.P. and Lynd, L.R.** 2004. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. – Biotechnol. Bioeng. 88: 797-824.

\*\*\*\*\*

**How to cite this article:**

**Bagheri, Kh, Shahbazi, S., Askari, H., Mojerlou, Sh. And Amirlou, F.** 2018. Cellulase enzyme production enhancement in *Trichoderma viride* by Gamma ray induced mutation. – Nova Biologica Rep. 4: 329-336.

باقری، خ.، شهبازی، س.، عسکری، ح.، موجرلو، ش. و امیرلو، ف. ۱۳۹۶.  
 افزایش فعالیت آنزیم سلولاز در قارچ *تریکودرما ویریده* با القای جهش پرتو گاما.  
 – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۳۳۶-۳۲۹.