مجموعه مقالات
چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹٤، پژوهشکده کشاورزی هسته ای)
The 4th National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

بررسی خصوصیات کمپلکس های آنزیمی سلولیتیک از موتانت های پرتو گاما قارچ *Trichoderma reesei*

حامد عسکری[۱]، سمیرا شهبازی*[۱]، مهران عنایتی شریعت پناهی[۲]، خدایار ایسپره[۳]، فرنگیس امیرلو [۴]

۱. گروه گیاهپزشکی و نگهداری مواد غذایی، پژوهشکده کشاورزی هسته ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، سازمان انرژی اتمی، ۲. پژوهشکده تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، ۳. گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه پیام نور کرج، البرز، ۴. گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، نویسنده مسوول: sshahbazi@nrcam.org

خلاصه: قارچ *Trichoderma reesei* یکی از ارگانیسم‌های مهم تولیدکننده آنزیم های تجزیه کننده سلولز در طبیعت است. در این پژوهش ۲۱ جدایه موتانت پرتو گاما قارچ *T. reesei* برای تولید آنزیم سلولاز در شرایط دمایی ۲۸ °C و سرعت همزدن ۱۸۰rpm برای مدت ۷۲ ساعت و سلولز کلوئیدی به عنوان سوبسترا تولید گردید. غلظت پروتئین های خارج سلولی *T. reesei* و موتانت های آن با استفاده از روش بردفورد اندازه گیری شد. آویسل، کربوکسی متیل سلولز و کاغذ صافی واتمن #۱ برای اندازه گیری فعالیت آنزیم سلولاز استفاده شد. همچنین خلوص و ترکیب پروتئین های غنی از آنزیم با استفاده از آزمون SDS-PAGE مورد ارزیابی قرار گرفت. بالاترین میزان تولید پروتئین خارج سلولی در جدایه های *T. r M7* و *T. r M17* مشاهده شد. فعالیت آنزیم های اندوگلوکاناز، اگزوگلوکاناز و سلولاز کل در جدایه موتانت *T. r M8* بالاترین مقادیر فعالیت آنزیمی را در بین جدایه های موتانت و جدایه والد اولیه نشان داد. سلولاز کل شامل فعالیت آنزیم های اندوگلوکاناز، اگزوگلوکاناز و بتا-گلوکوزیداز می شود که بصورت سینرژیستی باعث هیدرولیز سلولز کریستالی می شوند. اختلاف وزن مولکولی باند های آنزیم های نشان داد که آنزیم های EG IV، Cel 1A، Cel 12A، Cel 45A، Cel 3A، Cel 7A، Cel 6A، Cel 5A و Cel 61A سلولز کلوئیدی را بصورت سینرژیستی هیدرولیز می کنند. این نتایج اولیه پیشنهاد می کند که موتاسیون پرتو گاما برای جداسازی موتانت های با تولید بالای آنزیم سلولاز قارچ تریکودرما استفاده قابل توجهی در توسعه گونه های سلولیتیک تجاری خواهد داشت.

واژگان کلیدی: ***Trichoderma reesei*، آنزیم سلولیتیک، SDS-PAGE، پرتوتابی گاما، موتاسیون.**

Characterization of cellulolytic enzyme complexes obtained from gamma radition mutants of *Trichoderma reesei*

Askari H. [1], S. Shahbazi*[1], M. Shariat Panahi[2], Kh. Ispareh[3], F. Amirlou[4]

1. Plant Protection and Food Preservation Department, Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute (NSTRI), Atomic Energy Organization of Iran (AEOI), Alborz, Iran.
2. Agricultuer anb Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Alborz, Iran.
3. Biotechnology Department, Faculty of Payam e Noor University, Alborz, Iran.
4. Biotechnology Department, Faculty of Agricultue, Zanjan University, Zanjan, Iran.

sshahbazi@nrcam.org

Abstract:*Trichoderma reesei* is an important organism that produces wide range of cellulolytic enzymes in nature. In this study, 21 strains of gamma radiation mutants of *Trichoderma reesei* were used for cellulose production in temperature 28° C and the stirring speed 180 rpm for 72 hours by colloidal cellulose as a substrate. The extracellular protein concentration of *T. reesei* and its mutants were determined by the dye binding method of Bradford. The Avicel, CMC and Whatman NO.1 filter paper, were used to cellulase activity assay. Also, the purity and composition of enzyme-rich

protein samples were evaluated under denaturing conditions by SDS-PAGE. The highest extracellular protein production was observed in *T. r* M7 and *T. r* M17. The enzyme activity of endoglucanase, exoglucanase, and total cellulase in mutant strains of T. r M8 showed highest levels of enzyme activity. Total cellulase enzymes including endoglucanase, *exoglucanase* and ß-glucosidase that hydrolyzed cellulose crystals are a synergistic manner. Different molecular weights of the enzyme bonds showed that the enzymes of EG IV, Cel 1A, Cel 12A, Cel 45A, Cel 3A, Cel 7A, Cel 6A, Cel 5A, and Cel 61A hydrolyzed colloidal celloluse as synergistically. These initial results suggest that the gamma radiation mutation for isolating hyper-cellulase-producing mutants of *Trichoderma* will be of considerable use in the development of commercially useful cellulolytic strains.

Keywords: *Trichoderma reesei*, Cellulolytic enzyme, SDS-PAGE, Gamma radiation, Mutation.

مقدمه

سلولز فراوان‌ترین و تجدید پذیرترین بیوپلیمر حاضر در زیست کره است که قرنها است توسط بشر مورد استفاده قرار می-گیرد و به عنوان عمده‌ترین پلیمر ارگانیک حدود $۱/۵ \times ۱۰^{۱۲}$ تن از تولید سالانه بیوماس فتوسنتزی گیاهان را تشکیل می‌دهد (Klemm et al., 2002). امروزه توجه جهانی به سلولز به عنوان یک منبع کربن تجدید شونده[۱] که پتانسیل تبدیل شدن به انواع فرآورده‌ها و انرژی زیستی[۲] را دارد جلب شده است. استراتژی مؤثر برای بهره‌مندی کارآمد از این منبع تجدید پذیر، هیدرولیز میکروبی ضایعات لیگنوسلولزی و تخمیر قندهای احیا کننده حاصل برای تولید انواع متابولیت‌ها است (Kim et al., 2003). نظر به تقاضای در حال رشد برای سلولازها و نیز به منظور بهره‌مندی از تمام پتانسیل آنها در بیوتکنولوژی، مطالعه مستمر بر روی این آنزیم‌ها امری ضروری است (Bhat, 2000). عملکرد کم آنزیم‌های سلولازی و هزینه بالای تولید آنها، دو چالش اصلی در کاربرد صنعتی آنها به شمار می‌رود. از همین رو، روش‌های متعددی برای ارتقای فعالیت سلولازی، خصوصاً در قارچ جنس تریکودرما به کار گرفته شده است. بیشتر این تلاش‌ها در جهت افزایش فعالیت سلولاز کل یا فعالیت بخش بتاگلوکوزیدی سیستم سلولازی است. امروزه بسیاری از سویه‌های قارچی به علت توانایی ترشح مقادیر زیاد آنزیم‌های تجزیه کننده سلولز در مطالعات موتاسیون به کار گرفته می‌شوند. سلولازها توسط قارچ های تجزیه کننده سلولز از قبیل *Chaetomium*، *Fusarium*، *Myrothecium* و گونه های قارچ *Trichoderma* تولید می گردند. گونه های دیگر شامل *Penicillium* و گونه های *Aspergillus* نیز قادر به تولید سلولاز می باشند (Jun et al, 2011). گونه های قارچ تریکودرما حداقل دو اگزوگلوکاناز (سلوبیوهیدرولاز) شامل Cel 6A (CBH II) 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 β-گلوکوزیداز شامل Cel 1A (BGL II) و Cel 3A (BGL I) را تولید می

۱- Renewable

۲- Bioenergy

کنند (Foreman et al., 2003). سلولازهای صنعتی تولید شده از قارچ *Trichoderma reesei* توسط موتاسیون تصادفی یا با تغییرات ژنتیکی هدفمند بهبود یافته‌اند (Nevalainen et al., 1994). از آنجا که گونه‌های مختلف تریکودرما یکی از مفیدترین منابع تولید آنزیم‌های تجزیه کننده سلولز می‌باشند، 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 ملاحظه‌ای در جهت تغییر ژنتیکی سویه‌های تریکودرما و بهینه‌سازی شرایط کشت با فرض افزایش کارایی تولید سلولاز صورت پذیرفته و در دهه اخیر روش‌های متعددی از جمله موتاسیون‌های شیمیایی، استفاده از پرتو فرابنفش و مهندسی ژنتیک برای ایجاد سویه‌های تولید کننده سلولاز بیشتر در اولویت قرار داشته است (Muthuvelayudham and 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 تریکودرمای بومی و نیز دستیابی به ژنوتیپ‌های جدید با توان فعالیت آنزیمی بیشتر، با استفاده از القای موتاسیون با پرتو گاما در گونه قارچی *Trichoderma reesei* انجام گرفته است.

مواد و روش ها

تهیه و آماده سازی قارچ وحشی و موتانت *T.reesei*

قارچ *T. reesei* به صورت لیوفیلیزه از مرکز کلکسیون قارچ و باکتری سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران به شماره ۵۱۴۲ تهیه گردید. قارچ فوق تحت شرایط اسپتیک به داخل محیط کشت مایع Potato dextrose broth انتقال داده شد و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۸ $^{\circ}C$ قرار داده شد. بعد از مدت زمان فوق، اسپورها به شکل رویشی درآمده و سپس بر روی محیط PDA انتقال داده شد و در همان شرایط قبل گرمخانه گذاری گردید. پلیت های کشت به مدت ۷ روز گرمخانه گذاری گردید و اسپورهای تولید شده با استفاده از محلول سیلین جمع آوری گردید و جمعیت آن در spore/ml ۱×۱۰^{۶} تنظیم گردید و به منظور اعمال موتاسیون با دز ۲۵۰ گری (مرادی و همکاران ۱۳۹۰) مورد استفاده قرار گرفت. اسپورهای جوانه زده شده به محیط کشت تازه انتقال داده شد و تعداد ۲۱ جدایه موتانت بر اساس تفاوت های مورفولوژیک و آزمون مندل انتخاب شدند و برای سنجش توانایی تولید آنزیم سلولاز مورد آزمایش قرار گرفت.

تولید آنزیم سلولاز

جدایه های قارچ موتانت و وحشی قارچ *T. reesei* بر روی محیط کشت MYG agar حاوی گرم در لیتر۵ عصاره مالت، گرم در لیتر ۲/۵ عصاره مخمر، ۱۰گرم در لیتر گلوکز و ۲۰ گرم در لیتر آگار کشت و با استفاده از روش ون و همکاران به تولید و ترشح آنزیم های سلولیتیک القا شدند . (Wen et al., 2005).

اندازه گیری غلظت پروتئین خارج سلولی تولیدی در محیط TFM و تعیین فعالیت آنزیمی

اندازه گیری پروتئین در مایع فوقانی محیط TFM با استفاده از روش بردفورد انجام گرفت. فعالیت آنزیم های آویسلاز، کربوکسی متیل سلولاز، سلوبیاز و سلولاز کل بوسیله اندازه گیری مقدار گلوکز آزاد شده از سوبستراهای آویسل، کربوکسی

متیل سلولز، سلوبیوز و کاغذ صافی واتمن ۱ با استفاده از روش DNS و گلوکز به عنوان استاندارد اندازه گیری شد (Nidetzky and Steiner, 1993).

الکتروفورز و تعیین وزن مولکولی آنزیم ها

آزمون الکتروفورز با استفاده از روش Laemmli (۱۹۹۷) با استفاده از ژل متراکم کننده ۴ درصد و ژل تفکیک کننده ۱۲/۵ درصد انجام شد. آزمون الکتروفورز در آمپر ثابت ۲۰ میلی آمپر انجام شد و ژل الکتروفورز با استفاده از کوماسی بریلیانت گرین R-250 رنگ آمیزی گردید و با استفاده از رنگبر حاوی متانول : اسید استیک : آب به نسبت های ۸:۱:۱ رنگبری گردید.

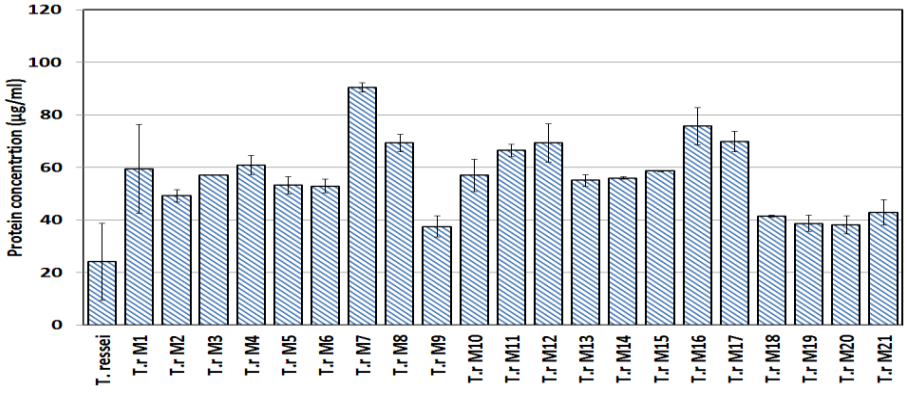
آنالیز آماری

کلیه نتایج آزمایشات با استفاده از آنالیز واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین ها به روش دانکن در سطح آماری P< ۰/۰۵ انجام گرفت. آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS (ویرایش ۱۶) انجام گرفت و کلیه آزمایشات در سه تکرار انجام شد.

نتایج و بحث

تعیین غلظت پروتئین خارج سلولی در جدایه های موتانت

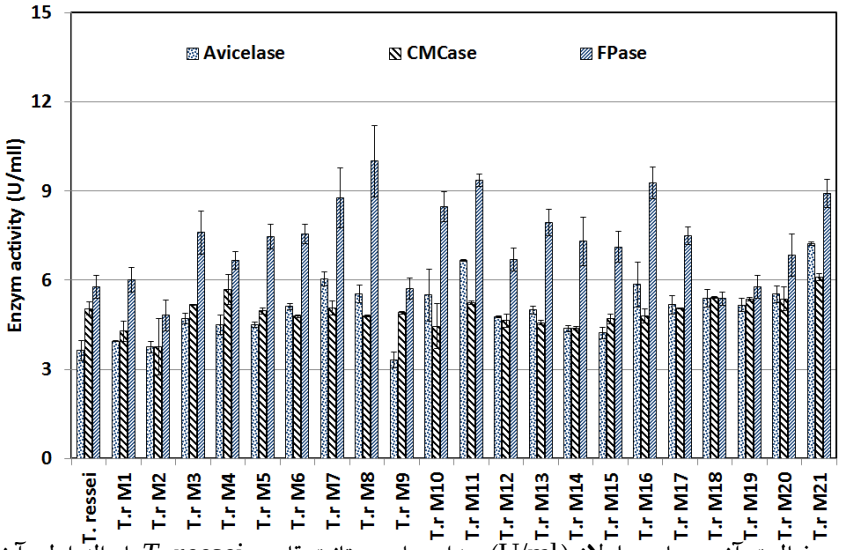
شکل ۱ مقایسه میانگین غلظت پروتئین خارج سلولی (µg/ml) تولید شده در مایع فوقانی محیط تخمیر TFM قارچ *T. reesei* و جدایه های موتانت آن را نشان می دهد. کلیه داده ها در سطح آماری ۰/۰۵ دارای اختلاف معنی دار آماری بودند و جدایه های موتانت مقادیر پروتئین خارج سلولی بیشتری را نسبت به نمونه وحشی تولید کرده است. بالاترین مقادیر پروتئین خارج سلولی تولید شده به ترتیب در جدایه های موتانت قارچ های Tr M7 و Tr M17 مشاهده گردید. میزان تولید پروتئین خارج سلولی از ۲۴/۱۱ الی ۹۰/۴۳ µg/ml متغیر بود. کمترین میزان تولید پروتئین خارج سلولی مربوط به نمونه وحشی *T. reesei* بود.



شکل ۱. مقایسه غلظت پروتئین (µg/ml) جدایه های موتانت قارچ *T. reesei* با والد اولیه آن در مایع فوقانی محیط تخمیر TFM حاوی سلولز کلوئیدی

تعیین فعالیت آنزیم های سلولیتیک در جدایه های موتانت

شکل ۲ مقایسه میانگین فعالیت آنزیم های اگزوگلوکاناز، اندوگلوکاناز و سلولاز کل را در مایع فوقانی محیط تخمیر TFM در قارچ وحشی *T. reesei* و جدایه های موتانت آن را نشان می دهد. کلیه نمونه ها در سطح آماری ۰/۰۵ دارای اختلاف معنی دار آماری بودند.

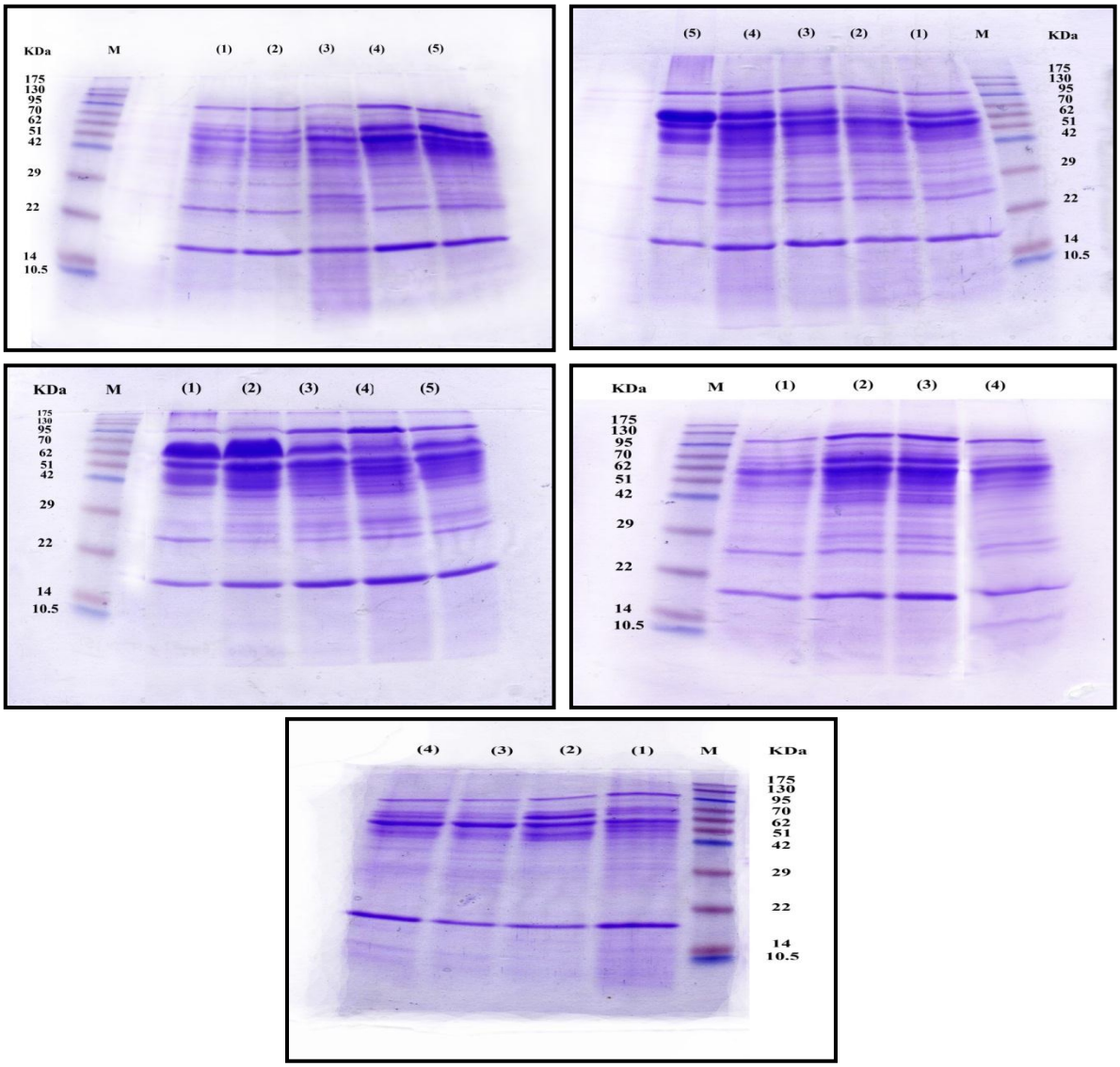


شکل ۲. مقایسه فعالیت آنزیم های سلولاز (U/ml) جدایه های موتانت قارچ *T. reesei* با والد اولیه آن در مایع فوقانی محیط تخمیر TFM حاوی سلولز کلوئیدی

بالاترین فعالیت آنزیم اگزوگلوکاناز در جدایه های موتانت Tr M21، Tr M11 و Tr M7 مشاهده گردید. میزان تغییرات فعالیت اگزوگلوکاناز از ۳/۳۱ الی ۷/۲۲ متغیر بود. پایین ترین میزان فعالیت آنزیمی در جدایه موتانت Th M9 مشاهده گردید. بالاترین فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز (CMCase) به ترتیب در جدایه های موتانت Tr M21، Tr M11 و Tr M7 مشاهده گردید. میزان فعالیت آنزیمی از مقدار ۳/۳۱ الی ۷/۲۲ U/ml متغیر بود. پایین ترین میزان فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز در جدایه موتانت Tr M2 مشاهده گردید. سیستم سلولازی کامل شامل اندوگلوکانازها، اگزوگلوکانازها و بتاگلوکوزیدازهاست. به منظور تعیین فعالیت سلولاز کل از سوبسترای ناهمگن کاغذ صافی واتمن شماره‌ی یک که در ساختار خود شامل هر دو بخش کریستالی و آمورف است، استفاده شد و فعالیت آنزیمی (FPase) برحسب U/ml بیان گردید. بالاترین میزان فعالیت آنزیم FPase در جدا های موتانت Tr M8، Tr M11، Tr M16، Tr M7، Tr M21، Tr M13، Tr M6 و Tr M5 مشاهده گردید. میزان فعالیت آنزیم سلولاز کل از مقدار ۴/۸۱ U/ml الی ۱۰/۰۰ U/ml متغیر بود. کمترین میزان فعالیت آنزیمی در جدایه موتانت Tr M2 مشاهده گردید. در این مطالعه نیز بالاترین فعالیت آنزیم سلولاز کل در جدایه موتانت Tr M8 مشاهده شد که نسبت به سویه شاهد ۱/۷۳ برابر شده است.

بررسی پروفایل پروتئینی آنزیم های سلولاز در قارچ T. reesei و جدایه های موتانت آن

شکل ۳- (a) پروفایل پروتئین آنزیم های سلولاز قارچ وحشی *T.reesei* و جدایه های موتانت Tr M1، Tr M2، Tr M3 را نشان می دهد. در کلیه نمونه های مورد مطالعه در این پروفایل پروتئینی باند های آنزیمی متفاوتی در محدوده وزن مولکولی KDa ۱۷۵-۱۰/۵ مشاهده گردید. چاهک شماره ۱ در این پروفایل پروتئینی باند های آنزیمی تولید شده توسط قارچ وحشی *T. reesei* را نشان می دهد. باند شارپ ایجاد شده در وزن مولکولی KDa ۵۴ مربوط به آنزیم Cel 6A (CBH II) می باشد.



شکل ۳. مقایسه پروفایل پروتئین (الگوی الکتروفورزیس) بدست آمده از آزمون SDS-PAGE پروتئین های خارج سلولی مایع فوقانی محیط تخمیر TFM حاوی آنزیم های سلولاز در قارچ وحشی *T. reesei* و جدایه های موتانت آن

(a) : به ترتیب (۱): *T. reesei* (تکرار اول تخمیر)، (۲) *T. reesei* (تکرار دوم تخمیر)،(۳): Tr M1، (۴): Tr M2، (۵): Tr M3 و M: مارکر پروتئین.

(b) : به ترتیب (۱): Tr M4، (۲): Tr M5، (۳): Tr M6، (۴): Tr M7، (۵): Tr M8 و M: مارکر پروتئین.

(c) : به ترتیب (۱): Tr M9، (۲): Tr M10، (۳): Tr M11، (۴): Tr M12، (۵): Tr M13 و M: مارکر پروتئین.

(d) : به ترتیب (۱): T. reesei، (۲): Tr M14، (۳): Tr M15، (۴): Tr M16 و M: مارکر پروتئین.

(e) : به ترتیب (۱): Tr M18، (۲): Tr M19، (۳): Tr M20، (۴): Tr M21 و M: مارکر پروتئین.

همچنین باند آنزیمی دیگری در وزن مولکولی ۶۲ KDa ایجاد شده است که در محدوده وزن مولکولی آنزیم Cel 7A (CBH I) قرار دارد. باند شارپ دیگری در وزن مولکولی ۲۴/۴ KDa ایجاد شده است که مربوط به آنزیم Cel 12A (EG III) می باشد که از دسته خانواده اندوگلوکانازها می باشد. این باند آنزیمی در دیگر جدایه های موتانت (شامل Tr M2 و Tr M3) نیز مشاهده گردید، اما جدایه موتانت Tr M1 فاقد این باند آنزیمی بود و آنزیم اندوگلوکاناز در جدایه موتانت Tr M1 دارای وزن مولکولی ۲۷ KDa و با وزن مولکولی کمی بالاتر نسبت به دیگر جدایه های موتانت قارچ وحشی *T. reesei* ایجاد شد که این باند آنزیمی مربوط به Cel 61B (EG) بود. در این پروفایل پروتئینی بالاترین بیان آنزیم مربوط به Cel 6A (CBH II) در جدایه موتانت Tr M2 مشاهده گردید. همچنین بالاترین بیان آنزیم Cel 7A (CBH I) در جدایه موتانت Tr M3 مشاهده گردید. بیان آنزیم Cel 7A (CBH I) نسبت به آنزیم Cel 6A (CBH II) در جدایه موتانت Tr M3 ضعیفتر بود. کلیه جدایه ها دارای باند پروتئینی شارپی در وزن مولکولی KDa ۱۷/۳ بودند که نوعی از آنزیم های خانواده اندوگلوکاناز می باشند. همچنین کلیه جدایه های موتانت و قارچ وحشی *T.reesei* در این پروفایل پروتئینی دارای باند پروتئینی قابل توجهی در وزن مولکولی KDa ۱۰۲ بودند که بیانگر آنزیم EG VI می باشد. بالاترین بیان این آنزیم در جدایه های موتانت Tr M2 و Tr M3 مشاهده گردید. شکل ۳- (b) مقایسه پروفایل پروتئین آنزیم های سلولاز در جدایه های موتانت Tr M4 الی Tr M8 را نشان می دهد. کلیه نمونه های مورد مطالعه در این پروفایل پروتئینی دارای باند های آنزیمی متفاوتی در محدوده وزن مولکولی KDa ۱۷۵-۱۰/۵ بودند. در جدایه های موتانت مورد مطالعه در این پروفایل پروتئینی باند آنزیمی شارپی در وزن مولکولی KDa ۱۰۲ مشاهده گردید که مربوط به آنزیم EG VI بود. در هر پنج جدایه موتانت فوق بیان این آنزیم به یک میزان صورت گرفته بود. آنزیم Cel 7A (CBH I) باند آنزیمی شارپی در جدایه های موتانت Tr M4، Tr M6، Tr M7 و Tr M8 در وزن مولکولی KDa ۶۴ ایجاد نمود. این آنزیم دارای بیان پروتئینی شدیدتری نسبت به دیگر جدایه ها در جدایه موتانت Tr M8 بود. بیان آنزیم(Cel 7A (CBH I در جدایه موتانت Tr M5 صورت نگرفته بود. باند آنزیمی شارپ دیگری با وزن مولکولی KDa ۵۴ در پروفایل پروتئینی در کلیه جدایه های موتانت ایجاد گردید که مربوط به آنزیم Cel 6A (CBH II) بود. جدایه های موتانت Tr M5، Tr M6، Tr M7 و به میزان کمتری Tr M4، دارای باند پروتئینی ضعیفی در وزن مولکولی KDa ۲۷ مربوط به آنزیم Cel 61B (EG) بودند. جدایه موتانت Tr M8 فاقد این باند آنزیمی بود. باند آنزیمی دیگری با وزن مولکولی KDa ۲۵ مربوط به آنزیم Cel 12A (EG III) ایجاد گردید. در کلیه جدایه های

موتانت در این پروفایل پروتئینی این آنزیم اندوگلوکاناز موجود بود، با این حال بصورت جزئی جدایه موتانت Tr M4 نسبت به دیگر جدایه های مورد مقایسه دارای بیان آنزیم EG III کمتری بود. باند شارپ دیگری با وزن مولکولی KDa ۱۷ در کلیه جدایه های موتانت در این پروفایل پروتئینی مشاهده گردید که مربوط به آنزیم های خانواده اندوگلوکاناز بود. شکل ۳- (C) پروفایل پروتئین آنزیم های سلولاز در جدایه های موتانت قارچ وحشی *T. reesei* (جدایه های موتانت Tr M9 الی Tr M13) را نشان می دهد. کلیه نمونه های مورد مطالعه در این پروفایل پروتئینی دارای باندهای پروتئینی متفاوتی در محدوده وزن مولکولی KDa ۱۷۵-۱۰/۵ بودند. باند پروتئینی شارپی در وزن مولکولی KDa ۱۰۲ در کلیه نمونه ها قابل مشاهده بود که نمایانگر آنزیم EG VI می باشد. بالاترین بیان این آنزیم در این پروفایل پروتئینی به ترتیب در جدایه های موتانت Tr M12، Tr M11 و Tr M13 مشاهده گردید. آنزیم های Cel 7A (CBH I) و Cel 6A (CBH II) به ترتیب در وزن های مولکولی KDa ۶۴ و ۵۴ قابل مشاهده بودند. جدایه های موتانت Tr M10 و Tr M9 بالاترین بیان آنزیم Cel 7A (CBH I) را به خود اختصاص دادند. جدایه موتانت Tr M12 از لحاظ تولید آنزیم Cel 7A (CBH I) عملکرد خیلی ضعیفی داشت و باند پروتئینی ضعیفی را در وزن مولکولی KDa ۶۴ ایجاد نمود. همچنین بالاترین بیان آنزیم Cel 6A (CBH II) با وزن مولکولی KDa ۵۴ در این پروفایل پروتئینی در جدایه موتانت Tr M10 مشاهده شد. دیگر جدایه های مورد آزمون در این پروفایل پروتئینی تفاوت چندانی از لحاظ بیان این آنزیم نداشتند. جدایه موتانت Tr M12 که دارای بالاترین بیان آنزیم اندوگلوکاناز بود، دو باند آنزیمی دیگر با وزن های مولکولی ۴۸ و KDa ۴۵ ایجاد نمود که به ترتیب مربوط به آنزیم های Cel 5A (EG II) و Cel 5B (EG) بودند. بالاترین بیان این آنزیم ها تنها در جدایه های موتانت Tr M12 مشاهده گردید. همچنین باند آنزیم های اندوگلوکاناز دیگری شامل Cel 45A (EG V) با وزن مولکولی KDa ۲۳، آنزیم Cel 12A (EG III) با وزن مولکولی KDa ۲۵ و Cel 61B (EG) با وزن مولکولی KDa ۲۷ نیز در این جدایه قابل مشاهده بود. بالاترین بیان آنزیم Cel 61B (EG) با وزن مولکولی KDa ۲۷ در جدایه موتانت Tr M12 مشاهده گردید. همچنین آنزیم Cel 61A (EG IV) با وزن مولکولی KDa ۳۴ در جدایه موتانت Tr M12 مشاهده گردید. دیگر جدایه های موتانت در این پروفایل پروتئینی نیز حاوی این باند پروتئینی بودند. Tr M13 دارای باند آنزیمی Cel 61A (EG IV) ضعیفتری نسبت به دیگر جدایه های موتانت مورد مطالعه در این پروفایل پروتئینی بود. همچنین بالاترین بیان آنزیم Cel 45A (EG V) با وزن مولکولی KDa ۲۳ به ترتیب در جدایه های موتانت Tr M12، Tr M13 و Tr M9 و به میزان کمتری در جدایه های Tr M11 و Tr M10 مشاهده گردید. باند آنزیمی شارپ دیگری با وزن مولکولی KDa ۱۷ در کلیه جدایه های موتانت قابل مشاهده بود. این باند آنزیمی مربوط به نوعی آنزیم اندوگلوکاناز می باشد. بالاترین بیان این آنزیم به ترتیب در جدایه های موتانت Tr M12، Tr M11، Tr M13، Tr M10 و Tr M9 مشاهده گردید. جدایه موتانت Tr M9 فاقد باند آنزیمی Cel 12A (EG III) با وزن مولکولی KDa ۲۵ و Cel 61B (EG) با وزن مولکولی KDa ۲۷ بود. جدایه موتانت Tr M10 دارای باند آنزیمی شارپی در وزن مولکولی KDa ۳۹ بود که احتمالاً نوعی آنزیم اندوگلوکاناز می باشد. این باند

آنزیمی در جدایه موتانت Tr M12 نیز قابل مشاهده بود. شکل ۳ – (d) مقایسه پروفایل پروتئینی آنزیم های سلولاز در قارچ وحشی *T.rersei* و جدایه های موتانت Tr.M14، TrM15، TrM16 را نشان میدهد. کلیه نمونه ها دارای باندهای پروتئینی متفاوت در محدوده وزن مولکولی ۱۷۵-۱۰,۵ KDa بودند. باند آنزیمی شارپی در وزن مولکولی ۱۰۲KDa در کلیه نمونه ها قابل مشاهده بود که مربوط به آنزیم EG VI می باشد. جدایه موتانت Tr M14 و Tr M15 دارای بیان آنزیمی بالاتری نسبت به قارچ وحشی *T. reesei* و جدایه موتانت Tr M16 در این پروفایل پروتئینی بودند. آنزیم های Cel 7A (CBH I) و Cel 6A (CBH II) با وزن های مولکولی ۶۴ و ۵۴ KDa در کلیه نمونه های مورد آزمون قابل مشاهده بودند. بالاترین بیان این آنزیم در جدایه های موتانت Tr M14 و Tr M15 مشاهده گردید. بیان آنزیم Cel 7A (CBH I) در قارچ وحشی *T. reesei* و جدایه موتانت Tr M16 دارای بیان پروتئینی کمتری نسبت به آنزیم Cel 6A (CBH II) بودند. کلیه جدایه های قارچ *T. reesei* و همچنین جدایه وحشی این قارچ دارای آنزیم Cel 12A (EG III) با وزن مولکولی ۲۵ KDa بودند. جدایه های موتانت Tr M14 و Tr M15 همچنین دارای باند آنزیمی دیگری در وزن مولکولی ۲۷ KDa مربوط به آنزیم Cel 61B (EG) بودند. جدایه موتانت Tr M16 دارای باند آنزیمی ضعیفی در وزن مولکولی ۲۳ KDa مربوط به آنزیم Cel 45A (EG V) بود. جدایه های موتانت Tr M14 و Tr M15 همچنین دارای باند های آنزیمی متعددی در محدوده وزن مولکولی ۴۲ الی ۶۲ KDa بودند که مربوط به آنزیم های خانواده اندوگلوکاناز می باشند. همچنین آنزیم Cel 5A (EG II) با وزن مولکولی ۴۸ KDa در گونه وحشی قارچ *T. reesei* و جدایه های موتانت Tr M14، Tr M15 و Tr M16 قابل مشاهده بود. باند آنزیمی شارپ دیگری با وزن مولکولی ۱۷ KDa نیز در این پروفایل پروتئینی قابل مشاهده بود که مربوط به نوعی آنزیم اندوگلوکاناز می باشد. بالاترین بیان این آنزیم به ترتیب در جدایه های موتانت Tr M15 و Tr M14 مشاهده شد. باند آنزیمی Cel 3B (BGL) با وزن مولکولی ۹۴ KDa تنها در جدایه های موتانت Tr M14 و Tr M15 مشاهده گردید. این باند آنزیمی بصورت خیلی ضعیفی در جدایه موتانت Tr M16 نیز قابل مشاهده بود. شکل ۳- (e) مقایسه پروفایل پروتئین آنزیم های سلولاز در جدایه های موتانت Tr M 18 الی Tr M21 را نشان می دهد. کلیه جدایه های موتانت مورد مطالعه در پروفایل پروتئینی دارای باندهای پروتئینی متفاوتی در محدوده وزن مولکولی ۱۷۵-۱۰/۵ KDa مشاهده گردید. آنزیم های Cel 7A (CBH I) و Cel 6A (CBH II) به ترتیب با وزن های مولکولی ۶۴ و ۵۴ KDa در نمونه های مورد آزمون قابل مشاهده بودند. آنزیم Cel 7A (CBH I) بصورت باند شارپ تنها در جدایه موتانت Tr M19 مشاهده گردید و در دیگر جدایه های موتانت تنها باند ضعیفی از این آنزیم قابل مشاهده بود. آنزیم Cel 6A (CBH II) در کلیه جدایه ها دارای باند پروتئینی قابل توجهی بود. آنزیم EG VI با وزن مولکولی ۱۰۲ KDa در کلیه نمونه های مورد مطالعه در این پروفایل پروتئینی قابل مشاهده بود. جدایه موتانت Tr M19 دارای یک باند پروتئینی با وزن مولکولی ۴۸ KDa مربوط به آنزیم Cel 5A (EG II) بود که در دیگر جدایه های موتانت این باند پروتئینی قابل مشاهده نبود. همچنین در این جدایه باند آنزیم اندوگلوکانازی با وزن مولکولی ۱۷ KDa قابل مشاهده بود که بیان این آنزیم

در چدایه های Tr M18 و Tr M21 نسبت به دو جدایه موتانت دیگر بیشتر بود. تاکنون بسیاری از تکنیک‌های موتاژنز کلاسیک جهت ارتقای تولید و فعالیت آنزیم سلولاز سویه‌های مختلف میکروبی مورد استفاده قرار گرفته است. به طور کلی، نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان داد امکان ایجاد تغییر در تولید میزان پروتئین خارج سلولی و فعالیت سلولازی و تغییر در پروفایل پروتئینی آنزیم های تولیدی در جهت بهبود عملکرد، در اثر کاربرد پرتو گاما وجود دارد و ایجاد سویه‌های قارچی با توان بیشتر تولید آنزیم که پتانسیل بیشتری در کاربردهای صنعتی به ویژه در تجزیه‌ی زیستی ترکیبات سلولزی، مدیریت بقایای گیاهی، تخمیر و بازیافت سلولز و تولید زیست انرژی و دیگر فرآورده‌های زیستی را داشته باشند، توسط موتاسیون کلاسیک ممکن 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. پرتو یونیزه کننده گاما هم با اثرات موتاژنی خود در ایجاد تنوع در ذخیره ژنتیکی قارچ تریکودرمای بومی کشور مؤثر بوده و می‌تواند به عنوان ابزاری ساده و کارآمد در برنامه‌های اصلاح سویه‌های میکروبی به منظور افزایش تولید یا فعالیت متابولیت‌های مختلف به‌کار گرفته شود.

منابع:

۱. مرادی، ر. شهبازی، س. مصطفوی، ح. (۱۳۹۰) تعیین دزمناسب پرتوتابی درراستای القای جهش مطلوب وبررسی تاثیرات مورفولوژیکی درقارچ تریکودرما، اولین کنگره ملی علوم وفناوری های نوین کشاورزی. ۱۹ تا ۲۱ شهریور، دانشگاه دولتی زنجان، صفحه ۲۹.

2. Bhat. M. K. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. Biotechnology Advances. 18: 355-383.
3. Chandra, M. Kalra, A. Sangwan, N. and Gaurav, S. 2009. Development of a mutant of *Trichoderma* citrino*viride* for enhanced production of cellulases. Bioresource Technology 100: 1659-1662.
4. Kim, K. C. Seung-Soo, Y. Oh Young, A. and Seong-Jun, K. 2003. Isolation and characteristics of *Trichoderma harzianum* FJ1 producing cellulases and xylanase. J. Microbiol. Biotechnol. 13: 1-8.
5. Klemm, D. Schmauder, H-P. and Heinze, T. 2002. Cellulose. 6: 290-292. In: Vandamme, E. J. De Baets, S. and Steinbüchel, A. (eds). Biopolymers. Wiley, Weinheim.
6. Laemmli UK, Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970; 227: 680-685.
7. Muthuvelayudham, R. and Viruthagiri. T. 2006. Fermentative production and kinetics of cellulose protein on *Trichoderma reesei* using sugarcane bagasse and rice straw. African Journal of Biotechnology. 5(20): 1873-1881.
8. Nevalainen, H. Suominen, P. and Taimisto, K. 1993. On the safety of *Trichoderma reesei*. J Biotechnol. 37: 193-200.
9. Persson, I. Tjerneld, F. and Hahn-Hagerdahl, B. 1991. Fungal cellulytic enzyme production: a review. Process Biochemistry. 26: 65-74.
10. Wen Z, Liao W, Chen Sh. Production of cellulase by Trichoderma reesei from dairy manure. Bioresour. Technol. 2005; 96: 491-499.