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)

استفاده از پرتو تابی با اشعه گاما به منظور افزایش فعالیت پکتینازی قارچ تریکودرما

عادله سادات محمدی[۱]، سمیرا شهبازی*[۲]، مهدی بهگر[۳]، حامد عسکری[۲]
۱-گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه پیام نور کرج
۲-گروه گیاهپزشکی و نگهداری مواد غذایی، پژوهشکده کشاورزی هسته ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، سازمان انرژی اتمی
۳- گروه علوم دام و دامپزشکی، پژوهشکده کشاورزی هسته ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، سازمان انرژی اتمی
نویسنده مسوول: sshahbazi@nrcam.org

چکیده: تولید آنزیم‌های پکتیناز از منابع قارچی همانند تریکودرما با توجه به پایداری بیشتر و تنوع قابل توجهی که در سیستم‌های آنزیمی آن وجود دارد در مقایسه با پروکاریوت‌هایی که در حال حاضر برای تولید ترکیبات آنزیمی استفاده می‌شود، دارای مزیت‌های بسیاری است. یکی از فعال‌ترین جدایه‌های قارچی از نظر تولید آنزیم *Trichoderma reesei* و *Trichoderma harzianum* می‌باشد که در این تحقیق با ایجاد موتاسیون مستقیم در ژنوم قارچ به منظور افزایش فعالیت آنزیم پکتیناز فعالیت این آنزیم در دما و pH مناسب بررسی شد. در این مطالعه القای جهش در *T. reesei* و *T.harzianum* با دز اپتیمم ۲۵۰ گری انجام شد و پس از آماده‌سازی سوبسترا و القاء آنزیم پکتیناز در جدایه‌های موتانت فعالیت پکتینازی ۴۱ جدایه موتانت حاصل اندازه‌گیری شد که در این بررسی دو جدایه موتانت *T.h M۴* و۱۳ *T.r M* با فعالیت ویژه آنزیمی ۱/۸۹ و ۴/۰۱ واحد در میلی‌لیتر فعال‌ترین جدایه‌ها و جدایه *T.h M ۶* و *T.r M۷* با فعالیت ویژه آنزیمی ۰/۷۲ و ۰/۱۶ واحد در میلی‌لیتر ضعیف ترین جدایه‌ها بودند. در ۶۲/۵ درصد از جدایه‌ها ایجاد جهش با استفاده از پرتوتابی با اشعه گاما منجر به افزایش فعالیت پکتیناز آنها شد.

واژگان کلیدی: *Trichoderma reesei*، *Trichoderma harzianum* ، پرتوتابی گاما، القای موتاسیون، آنزیم پکتیناز

Application of gamma radiation to increased activity of pectinase enzymes in *Trichoderma spp*.

Adeleh sadat Mohamadi[1], Samira Shahbazi[2]*, Mehdi Behgar[3], Hamed Askari[2]

1. M.Sc. Student of Agricultural Biotechnology, Department of Agricultural Biotechnology, Payam-e-Noor University, I.R. of IRAN.

2. Plant Protection Department, Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute (NSTRI), Atomic Energy Organization of Iran (AEOI), P. O. Box: 31485-498, Karaj, Iran.

3. Animal Science Department, Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute (NSTRI), Atomic Energy Organization of Iran (AEOI), P. O. Box: 31485-498, Karaj, Iran.

sshahbazi@nrcam.org

Abstract: Pectinase enzyme production from fungal sources due to greater stability and diversity significant in eukaryotes compared to prokaryotes enzyme systems that are currently used for the production of an enzyme compounds have many advantages. *Trichoderma reesei* and *Trichoderma harzianum* is one of the most active isolates in enzyme production that in this study with direct mutation in the genome of the fungus, the activity of this enzyme was investigated in a suitable temperature and pH in order to increase the activity of fungal pectinase. In this case, mutation induction was performed in *T. reesei* and *T.harzianum* with optimum dose of 250 Gy and after substrate preparation and induction of pectinase activity in pectinase mutant isolates obtained 41 mutant strains

were measured in the two mutant strains *T.r M 13* and *T.h M 4* with specific activity of the enzyme 4.01 and 1.89 U/ml two most active strains and isolates *T.r M 7* and *T.h M6* by specific activity of the enzyme 0.16 and 0.72 U/ml were weakest isolates. In 62.5% of isolates causing mutations by gamma-ray radiation lead to increased pectinase activity.

Keywords: *Trichoderma reesei*, *Trichoderma harzianum*, gamma Radiation, Induced mutation, Pectinase enzyme.

مقدمه

از جمله آنزیم‌های میکروبی بسیار مهم و کاربردی در صنایع مختلف از جمله صنایع غذایی آنزیم‌های پکتولیتیک است که درصنعت تولید آبمیوه کاربرد فراوانی دارند. میکروارگانسیم‌های مختلفی قادر به تولید آنزیم‌های تجزیه کننده پکتین هستند که مهمترین آنها عبارتند از گونه‌های باسیلوس،گونه‌های سودوموناس، اکتینومیست‌ها، آسپرژیلوس و گونه‌های پنی‌سیلیوم. در حال حاضر مهمترین منبع تولید تجاری آنزیم‌های تجزیه کننده پکتین، آسپرژیلوس نایجر است. یکی از فعال‌ترین جدایه-های قارچی از نظر تولید آنزیم پکتیناز *Trichoderma reesei* و *Trichoderma harzianum* هستند [۱]. هدف از انجام این مطالعه افزایش تولید آنزیم پکتیناز در این دو گونه آنزیمی قارچ تریکودرما با ایجاد جهش با استفاده از پرتو گاما بود.

مواد و روش‌ها

قارچ *Trichoderma reesei* به صورت لیوفیلیزه از مرکز کلکسیون قارچ و باکتری سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به شماره۵۱۴۲ تهیه شد و قارچ *Trichoderma harzianum* از اطراف مزارع چغندر قند خراسان جداسازی شده است. قارچ‌های فوق روی محیط کشت PDA منتقل شد.

دزیابی و پرتوتابی به منظور القای موتاسیون در قارچ تریکودرما**:** به منظور ایجاد جهش در قارچ‌های تریکودرما رسئی و هارزیانوم، عملیات دزیابی و پرتوتابی در مرکز تحقیقات کشاورزی و پزشکی هسته‌ای کرج (سازمان انرژی اتمی ایران) انجام شد [۲]. پس از ایجاد جهش و تهیه جدایه‌های جهش یافته خالص سازی شده فعالیت آنزیم پکتیناز اندازه‌گیری شد.

القاء تولید آنزیم پکتیناز در جدایه‌های جهش یافته قارچ تریکودرما: جهت القاء آنزیم پکتیناز تعداد ۲۱ جدایه جهش‌یافته قارچ تریکودرما رسئی و ۲۰ جدایه جهش یافته تریکودرما هارزیانوم در محیط MYG کشت داده شد. برای انجام سنجش آنزیمی از سوسپانسیون به محیط کشت TCM *(Trichoderma complete medium)*, [۳] تا اسپورها به مسلیوم تبدیل شوند بعد مسیلیوم‌ها با استفاده از دستگاه سانتریفوژ از محیط کشت TCM جدا و جهت القای آنزیم پکتیناز و به محیط کشت TFM *(Trichoderma Fermentation medium)* [۳] که حاوی پکتین ۰/۵٪ (وزنی/حجمی) به عنوان سوبسترا جهت القای آنزیم پکتیناز اضافه شد. میسلیوم‌های قارچ توسط سانتریفوژ کردن خارج و از مایع فوقانی برای

اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت. تعیین فعالیت آنزیم پکتیناز با استفاده از معرف DNS (اسید دی نیتروسالیسلیک) برحسب میزان قند احیا آزاد شده در حین فعالیت آنزیمی انجام شد.

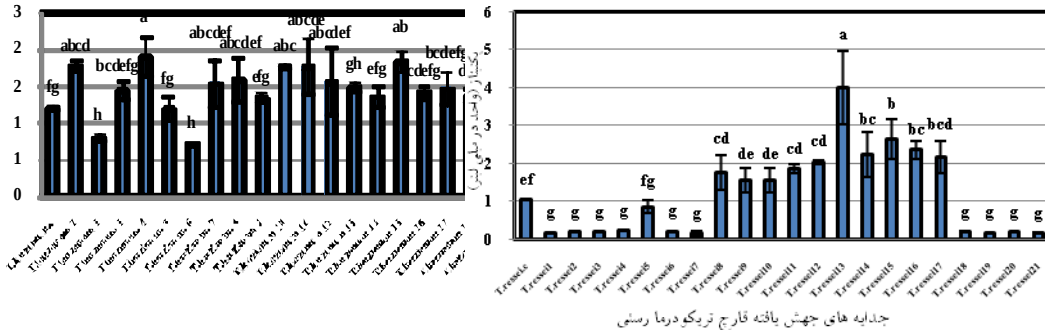
سنجش فعالیت آنزیم پکتیناز: سنجش آنزیمی جدایه‌های جهش یافته انجام شد [۴] و میزان جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد. هر واحد فعالیت آنزیمی به عنوان مقدار آنزیمی که توانایی آزاد کردن ۱ میکرومول گالاکتورونیک اسید را به ازای هر ساعت دارد تعریف شد.اندازه‌گیری غلظت پروتئین خارج سلولی: برای اندازه‌گیری مقدار پروتئین از روش Bradford (۱۹۷۶ Bradford) که در آن از پروتئین BSA[۱] بعنوان استاندارد استفاده شد [۴]. جذب پروتئین با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد.آماده سازی ژل SDS PAGE جهت تعیین وزن مولکولی آنزیم پکتیناز: مایع فوقانی TFM و از استون جهت ترسیب پروتئین استفاده شد [۴]. وزن مولکولی آنزیم پکتیناز سدیم دو دسیل سولفات پلی آکریل آمید ژل الکتروفورز با استفاده از روش Laemmli(۱۹۷۰) تعیین شد [۴].آنالیز آماری داده‌ها: کلیه آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد و آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS و روش ANOVA و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن و سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت.

نتایج

بررسی میزان تولیدآنزیم پکتیناز: نتایج فعالیت آنزیم پکتیناز در مایع فوقانی تخمیر TFM بعد از ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری با سوبسترای پکتین حاصل از جدایه‌های جهش یافته تریکودرما رسئی و تریکودرما هارزیانوم در نمودار ۱ نشان داده شده است. نتایج دلالت بر تنوع در مقادیر فعالیت آنزیمی در جدایه‌های موتانت قارچ ترکودرما رسئی و هارزیانوم داشت. این مقادیر دارای اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۰/۰۵ بودند. بررسی فعالیت جدایه‌های مورد مطالعه نشان می‌دهد که از نظر فعالیت آنزیم پکتیناز دو جدایه موتانت *T.r M۱۳* و *T.r M۱۵* با فعالیت آنزیمی به ترتیب ۴/۰۱ و ۲/۶۵ واحد در میلی‌لیتر فعال‌ترین جدایه‌ها بوده‌اند که تا میزان سه تا چهار برابر فعالیت بالاتری از جدایه شاهد (غیر موتانت) داشته‌اند. این در حالی است که جدایه *T.r M۷* و *T.r M ۱* با فعالیت آنزیمی به ترتیب ۰/۱۶ و ۰/۱۸ واحد در میلی‌لیتر ضعیف‌ترین جدایه‌ها بوده‌اند (نمودار ۱). نتایج نشان می‌دهد که در ۵۰ درصد از جدایه‌ها ایجاد جهش در اثر پرتوتابی با اشعه گاما منجر به افزایش فعالیت پکتیناز آنها شده است و در ۵۰ درصد جمعیت موتانت حاصل فعالیت پکتیناز کاهش یافته که جهش نامطلوب به شمار می‌رود. از بین ۲۰ جدایه جهش یافته قارچ تریکودرما هارزیانوم ۱۵ جدایه (۷۵ درصد از جدایه‌ها) میزان فعالیت آنزیم پکتیناز بیشتری نسبت به جدایه شاهد داشتند. در این بین جدایه *T.h M ۱*، *T.h M ۴*، *T.h M ۱۰*، *T.h M۱۱* و *T.h M ۱۵* دارای بیشترین (P<۰/۰۵) فعالیت پکتیناز بودند. جدایه *T.hM4* ۱/۸۹ واحد در میلی‌لیتر بیشترین فعالیت آنزیمی و جدایه ۶

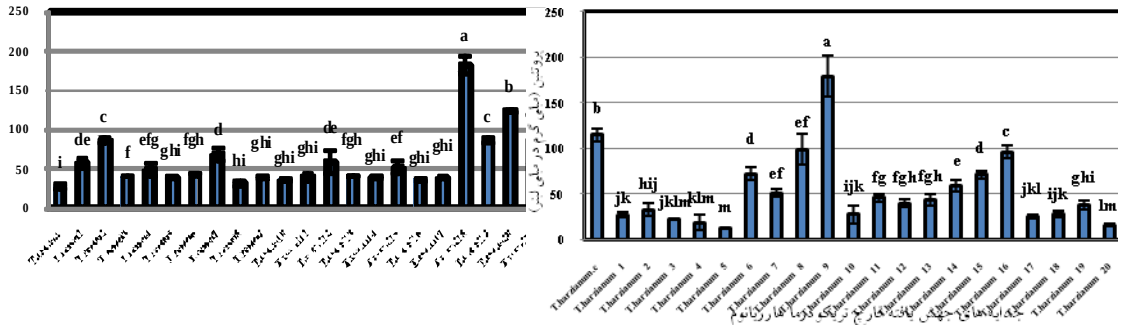
[۳] Bovine serum albomin

T.h M و ۲۰ *T.hM* با فعایت آنزیمی ۰/۷۲ واحد در میلی‌لیتر کمترین مقدار فعالیت آنزیم را نشان دادند. از مقایسه بین جدایه‌های جهش یافته قارچ تریکودرما رسئی و تریکودرما هارزیانوم، ۱۳ *T.r M* دارای بیشترین (P<۰/۰۵) فعالیت آنزیمی نسبت به بقیه جدایه‌های جهش یافته بود.



نمودار۱- فعالیت آنزیم پکتیناز قارچ تریکودرما رسئی و هارزیانوم و جدایه‌های موتانت آنها در مایع فوقانی محیط تخمیر بعد از ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۱۸۰ دور در دقیقه

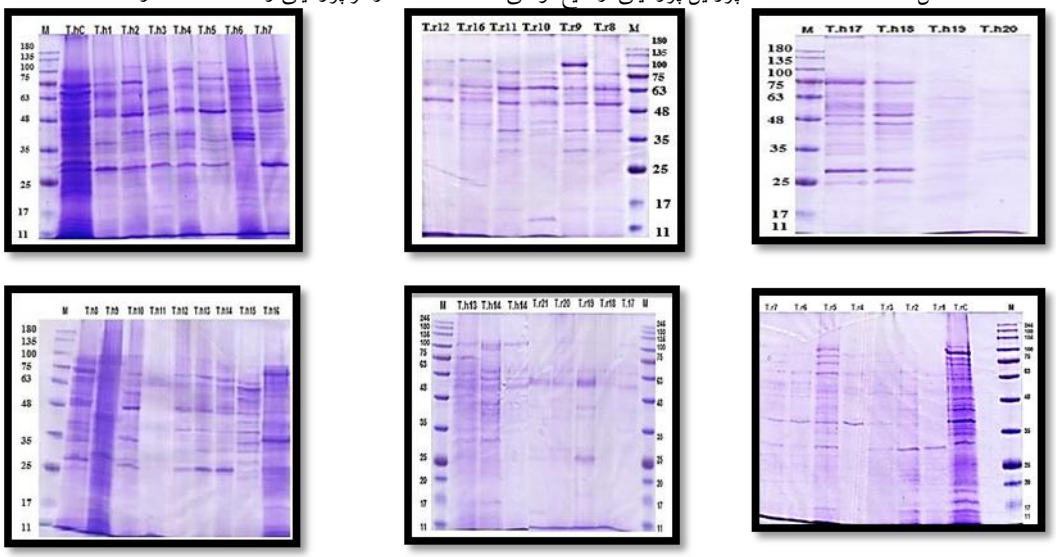
غلظت پروتئین در جدایه‌های جهش یافته قارچ تریکودرما: جدایه‌های موتانت ۲۰ *T.r M*، ۱۸ *T.r M* و ۱۹ *T.r M* از نظر تولید پروتئین خارج سلولی در مایع فوقانی محیط تخمیر TFM دارای بیشترین اختلاف معنی‌داری آماری با قارچ وحشی بودند (P<۰/۰۵). غلظت پروتئین جدایه‌های جهش یافته قارچ تریکودرما هارزیانوم ترتیب از مقدار ۱۳/۰۵ تا ۱۷۹/۵۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر متغیر بود. بالاترین محتوی پروتئین مربوط به جدایه ۹ *T.h M* با مقدار ۱۷۹/۵۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر که نسبت به شاهد ۱/۶۵ برابر پروتئین بیشتری (P<۰/۰۵) تولید کرده بود. کمترین غلظت پروتئین خارج سلولی تولید شده ۱۳/۰۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده که در مایع فوقانی محیط تخمیر جدایه ۵ *T.h M* محاسبه شد. بالاترین محتوی پروتئین مربوط به جدایه ۱۸ *T.r M* با مقدار ۱۸۳/۱۶۲میلی‌گرم بر میلی‌لیتر که نسبت به شاهد ۶/۶۲ برابر بیشتر (P<۰/۰۵) پروتئین تولید کرده است.



نمودار۲- محتوای پروتئین خارج سلولی (میلی‌گرم در میلی‌لیتر) دو گونه قارچ تریکودرما و جدایه‌های موتانت آنها در مایع فوقانی محیط تخمیر بعد از ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۱۸۰ دور در دقیقه

تعیین وزن مولکولی آنزیم پکتیناز: پروفایل پروتئینی آنزیم پکتیناز در مایع فوقانی محیط تخمیر TFM با استفاده از آزمون SDS PAGE بررسی شد و نتایج آن در شکل ۱ نشان داده شده است. باندهای مولکولی متعددی در پروفایل پروتئینی مشاهده گردیده است. طبق مطالعات [۵] وزن مولکولی آنزیم پکتیناز ۳۲ کیلو دالتون، آنزیم پکتین لیاز ۱۲ کیلو دالتون و آنزیم پلی گالاکتروناز ۷۲ و ۱۳۰کیلو دالتون ۳۷ کیلو دالتون [۶] و ۳۵-۶۰ کیلو دالتون گزارش شده است. همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است به خوبی باند مربوط به آنزیم پکتیناز را که در محدوده ۳۷-۳۲ کیلو دالتون است در جدایه‌های مختلف قارچ تریکودرما هارزیانوم و تریکودرما رسئی نشان می‌دهند که تأیید کننده تولید این آنزیم در این جدایه‌ها بود.

شکل۱- SDS- PAGE پروفیل پروتئینی از مایع فوقانی TFM. M مارکر پروتئینی و *T.r M*۱-۲۱ و *T.h M*۱-۲۰



بحث

در این مطالعه تعیین فعالیت آنزیم پکتیناز با استفاده از معرف DNS (اسید دی نیتروسالیسلیک) (۱) برحسب میزان قند احیا آزاد شده در حین فعالیت آنزیمی با استفاده از جدایه‌های موتانت قارچ تریکودرما استفاده شد که طبق بررسی‌های [۷] با ۲/۳ واحد در میلی‌لیتر فعالیت توسط قارچ آسپرژیلوس و [۸] با ۱/۵ واحد در میلی‌لیتر توسط قارچ آسپرژیلوس حاصل شده است. در این آزمایش از سوبسترای خالص پکتین استفاده شد و میزان فعالیت آنزیم پکتیناز بین ۰/۱۶ تا ۴/۰۱ واحد در میلی‌لیتر بوده که ۱۳ *T.r M* بالاترین راندمان تجزیه پکتین به میزان ۲/۹۷ واحد در میلی‌لیتر نسبت به نمونه شاهد را نشان داد. طبق مطالعات Arijit و همکاران (۲۰۱۳) وزن مولکولی آنزیم پکتیناز ۳۲ کیلودالتون، آنزیم پکتین‌لیاز ۱۲ کیلودالتون و آنزیم پلی‌گالاکتروناز ۷۲ و ۱۳۰ کیلو دالتون [۶] ۳۵-۶۰ کیلو دالتون گزارش شده است در نتیجه مشاهدات و تجزیه پروفیل پروتئینی تریکودرما رسئی و تریکودرما هارزیانوم در شرایط القای تولید آنزیم پکتیناز، باند ۳۷ کیلو دلتون که مربوط به آنزیم پکتیناز است در جدایه‌های موتانت *T.r M* ۳، *T.r M* ۴، *T.r M* ۵، *T.r M* ۶، *T.r M*۷، *T.r M*۸، *T.r* ۹، *M*، *T.r M*۱۱ به خوبی نشان داده شده است. با سنجش آنزیم پکتینازهای جهش‌یافته تریکودرما رسئی دو جدایه موتانت

T.r M ۱۳ و *T.r M* ۱۵ با فعالیت آنزیمی ۴/۰۱ و ۲/۶۵ واحد در میلی‌لیتر فعال‌ترین جدایه‌ها و جدایه ۴ *T.h M* با فعالیت آنزیمی ۱/۸۹ واحد در میلی‌لیتر قوی‌ترین جدایه‌ها از نظر تولید آنزیم بوده‌اند. در ۶۲/۵ درصد جدایه‌ها ایجاد جهش در اثر پرتوتابی با اشعه گاما منجر به افزایش فعالیت پکتیناز آنها شده است و القاء جهش فیزیکی در ژنوم تریکودرما رسئی و تریکودرما هارزیانوم برای بهبود کیفیت و کمیت آنزیم پکتیناز در ۶۲/۵ درصد جدایه‌های جهش‌یافته موفقیت‌آمیز بوده که شانس موفقیت بالایی در افزایش توانایی تولید آنزیم پکتیناز با استفاده از القاء جهش تصادفی به شمار می‌رود. با توجه به کاربردهای فراوانی که آنزیم پکتیناز در کشور دارد و از آنجایی که میزان واردات آنزیم‌های صنعتی (آنزیم پکتیناز ۲۵ درصد این آنزیم‌ها را شامل می‌شود) به کشور در سال۱۳۹۱، ۲۰۱۴۰۰۳۳ دلار است و به دلیل مشکلات فراوان تولید انبوه این آنزیم در داخل کشور عملی نشده است. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که از بین موتانت‌های مورد بررسی دو جدایه *T.r* ۱۳ *M* و *T.r M* ۱۵ قابل پیشنهاد برای بهینه‌سازی شرایط تولید آنزیم پکتیناز در مقیاس نیمه صنعتی هستند و می‌توانند در ارتقای راندمان تولید این آنزیم و رقابت‌پذیری تولید داخلی آنزیم‌های پکتینولیتیک با واردات آنها نقش داشته باشند. ایجاد تنوع در ذخیره ژنتیکی قارچ تریکودرما رسئی و هارزیانوم و دستیابی به جدایه‌های جدید با استفاده از جهش‌زایی توسط پرتو گاما برای نخستین بار در کشور انجام شده است.

تشکر و قدردانی

از همکاران طرح" کنترل بیماری‌های خاکزاد گیاهی با استفاده از فناوری‌های هسته‌ای و مولکولی" در گروه پژوهشی کشاورزی هسته‌ای پژوهشکده تحقیقات کشاورزی سازمان انرژی اتمی که در انجام این مطالعه ما را یاری داده‌اند تشکر و قدردانی می‌نماییم.

منابع

1. I. Persson, F. Tjereneld, B. Hahn-Hagerdahl,” Fungal cellulytic enzyme production: A Review”, process Biochem. 26: 65-74. (1991).
2. R. Moradi, S. Shahbazi, H. Ahari Mostafari, M.A. Ebrahimi, H. Askari, M. Mirmajlesi, “Invitation of Gamma Radiation Effects on Morphological and Antagonisitic Characteristics of *Trichoderma harzianum”*. Crop biotechnology, 3, 109-117 .(2013).
3. S. Shahbazi, H. Askari, M. Safaei, M. M. Cheraghi,” Investigation of potential of cellulose and glucanase enzymes using agricultural of lignocellulosic waste”. 2nd international conference & Exhibition of waste management Recycling, Biomassp. 37. (2012).
4. A.S. Mohammadi, S. Shahbazi, M. behgar, S. Mansouri fard, H. Askari, “ A stedy of pectinase enzyme activity changes in gamma- irradiated

Trichoderma reesei mutants", International Journal of Farming and Allied Sciences. Vol., 3 (5): 555-561, (2014).

5. D. Arijit, B. Sourav, R. Naimisha , S. Rajan," Improved Production and Purification of Pectinase from Streptomyces sp". GHBA10 isolated from Valapattanam mangrove habitat, Kerala, India. International Research Journal of Biological Sciences. pp.16-22. (2013).
6. D. J. Mukesh kumar, G. M. Saranya, K. Suresh, D. Andal Priyadharshini, R. Rajakumar , P.T. Kalaichelvan," Production and Optimization of Pectinase from Bacillus sp. MFW7 using Cassava Waste", Asian Journal of Plant Science and Research. pp.365-375. (2012).
7. V. Meenakshisundaram," Optimization Of Pectinase Enzyme Production By Using Sour Orange Peel As Substrate In Solid State Fermentation". Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research. pp.16-26. (2012).

L. Kutateladze, N. Zakariashvili, M. Jobava, T. Urushadze, R. Khvedelidze , I. Khokhashvili, "Selection of Microscopic Fungi - Pectinase Producers" Bulletin of the Georgian national academy of sciences. pp.136-141. (2009).