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)

تاثیر پرتو گاما بر فعالیت آنزیم زایلاناز در قارچ *Trichoderma reesei* و *Trichoderma harzianum*

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 ایران، ۳- گروه علوم دام و دامپزشکی، پژوهشکده کشاورزی هسته ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، سازمان انرژی اتمی، نویسنده مسوول: sshagbazi@nrcam.org

چکیده: تولید آنزیم‌های زایلاناز به دلیل کاربردهای فراوانی که در صنایع مختلف همانند آنزیم‌های خوراکی در تغذیه دام، زیست رنگبری خمیر کاغذ و ... از منابع قارچی و باکتریایی امکان پذیر است. یکی از فعال‌ترین جدایه‌های قارچی از نظرتولید آنزیم *Trichoderma reesei* و *Trichoderma harzianum* می‌باشد که در این تحقیق با ایجاد موتاسیون مستقیم در ژنوم قارچ به منظور افزایش فعالیت آنزیم زایلاناز فعالیت این آنزیم در دما و pH مناسب بررسی شد. در این مطالعه القاء جهش در *T.reesei* و *T.harzianum* با دز اپتیمم ۲۵۰ گری انجام شد و پس از آماده‌سازی سوبسترا و القاء آنزیم زایلاناز در جدایه‌های موتانت فعالیت زایلانازی ۴۱ جدایه موتانت حاصل اندازه‌گیری شد که در این بررسی دو جدایه موتانت *T.hM۳* و *T.rM۱۷* با فعالیت ویژه آنزیمی ۲۰/۲۶ و ۶/۶۶ واحد در میلی‌لیتر فعال‌ترین جدایه‌ها و جدایه *T.hM۱۱* و *T. rc* با فعالیت ویژه آنزیمی ۰/۵۹ و ۰/۶۲ واحد در میلی‌لیتر ضعیف ترین جدایه‌ها بودند. در ۶۵/۵ درصد جدایه‌ها ایجاد جهش در اثر پرتوتابی با اشعه گاما منجر به افزایش فعالیت زایلاناز شد.

واژگان کلیدی: ***Trichoderma reesei*، *Trichoderma harzianum*، پرتوتابی گاما، القاء موتاسیون، آنزیم زایلاناز.**

The effect of gamma radiation on xylanase activity in the*Trichoderma harzianum* and *Trichoderma reesei*

Adeleh Sadat Mohamadi[1], Samira Shahbazi[2]*, Mehdi Behgar[2], 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.

sshagbazi@nrcam.org

Abstract: Xylanase enzyme production due to numerous applications in various industries such as feed enzyme for animals, bio-bleaching of pulp and ... is possible from fungal and bacterial sources. *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 enzymewas 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 17* and *T.h M 13* with specific activity of the enzyme 6.66 and 20.26 U/ml two most active strains and isolates *T.rc* and *T.h M11* by specific activity of the enzyme 0.62 and 0.59 U/ml were weakest isolates. In 65.5% of isolates causing mutations by gamma-ray radiation lead to increased xylanase activity.

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

مقدمه:

آنزیم زایلاناز کاربرد و اهمیت اقتصادی فراوانی دارد همانند استفاده به عنوان آنزیم خوراکی در جیره غذایی حیوانات، زیست رنگبری خمیر کاغذ، صنعت منسوجات، تولید زایلو اولیگوساکاریدها، تصفیه فاضلاب و... . یکی از فعال‌ترین جدایه‌های قارچی از نظر تولید آنزیم *Trichoderma reesei* و *Trichoderma harzianum* هستند [۱].هدف از انجام این مطالعه افزایش تولید آنزیم زایلاناز در این دو گونه آنزیمی قارچ تریکودرما ایجاد جهش با استفاده از پرتو گاما بود.

مواد و روش‌ها:

قارچ *Trichoderma reesei* به صورت لیوفیلیزه از مرکز کلکسیون قارچ و باکتری سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران به شماره ۵۱۴۲ تهیه شد و قارچ *Trichoderma harzianum* از اطراف مزارع چغندر قند خراسان جداسازی شده است. قارچ‌های فوق روی محیطکشت PDA منتقل شد.

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

القاء تولید آنزیم زایلاناز در جدایه‌های جهش یافته قارچ تریکودرما: جهت القاء آنزیم زایلاناز 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 القاء آنزیم زایلاناز به محیط کشت TFM (*Trichoderma Fermentation medium*)[۳] که حاوی زایلان ۰/۵درصد (وزنی/حجمی) به عنوان سوبسترا جهت القاء آنزیم زایلاناز اضافه شد. میسلیوم‌های قارچ توسط سانتریفوژ کردن خارج و از مایع فوقانی برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی استفاده شد. تعیین فعالیت آنزیم زایلاناز با استفاده از معرف DNS (اسید دی نیتروسالیسلیک) برحسب میزان قند احیا آزاد شده در حین فعالیت آنزیمی انجام شد.

سنجش فعالیت آنزیم زایلاناز: سنجش آنزیمی جدایه‌های جهش یافته انجام شد [۴] و میزان جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد.

اندازه‌گیری غلظت پروتئین خارج سلولی: برای اندازه‌گیری مقدار پروتئین از روش Bradford (بردفورد، ۱۹۷۶) که در آن از پروتئین BSA[۱] بعنوان استاندارد استفاده شد [۴]. جذب پروتئین با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵

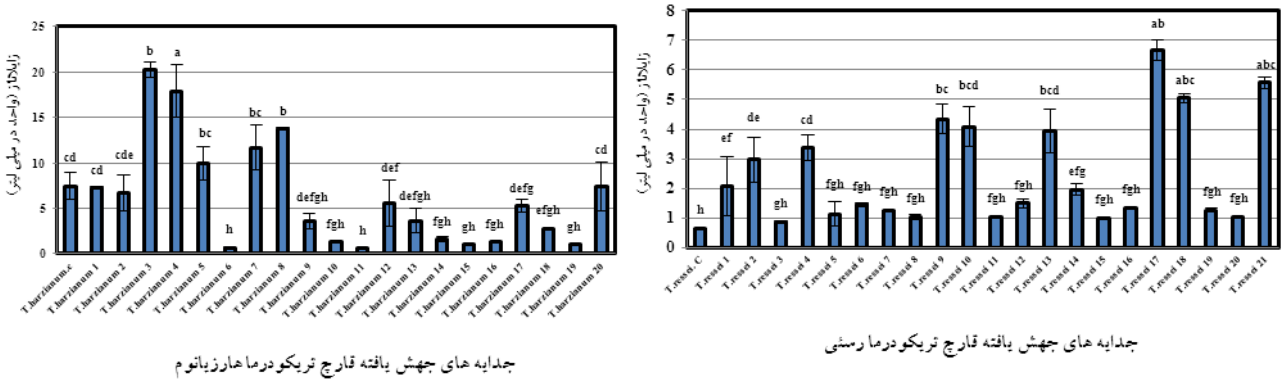
[۳] Bovineserumalbomin

نانومتر قرائت شد.آماده سازی ژل SDS PAGE جهت تعیین وزن مولکولی آنزیم زایلاناز: مایع فوقانی TFM و از استون جهت ترسیب پروتئین استفاده شد [۴]. وزن مولکولی آنزیم زایلاناز 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.

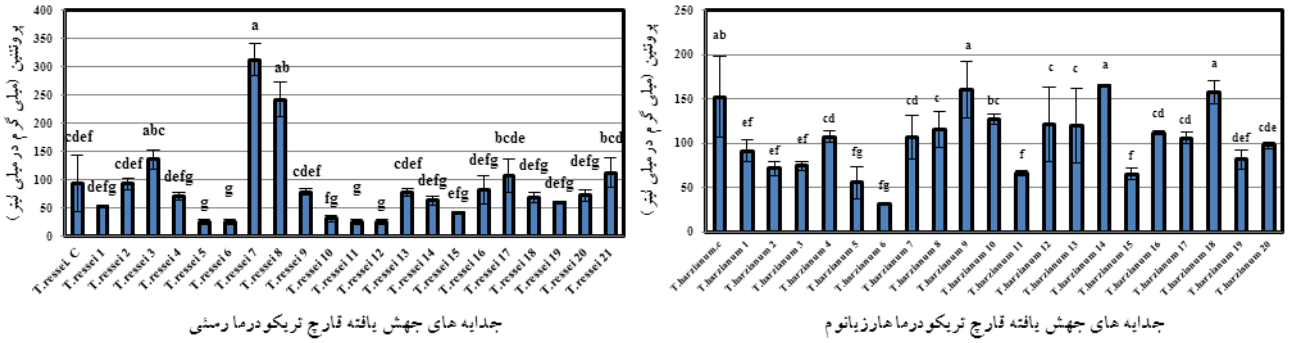
نتایج:

بررسی میزان تولیدآنزیم زایلاناز: نتایج فعالیت آنزیم زایلاناز در مایع فوقانی تخمیر TFM بعد از ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری با سوبسترای پسلیوم 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 زایلاناز در جدایه‌های جهش یافته قارچ تریکودرما هارزیانوم ۵ جدایه (۲۵ درصد از جدایه‌ها) میزان فعالیت آنزیم زایلاناز بیشتری نسبت به جدایه شاهد داشته‌اند. در این بین جدایه *T.hM۳*، *T.hM۴*، *T.hM۵*، *T.hM۷* و *T.hM۸* اختلاف بیشتری ($P<۰/۰۵$) با شاهد داشتند. جدایه *T.hM۳* با ۲۰/۲۶ واحد در میلی‌لیتر بیشترین فعالیت آنزیمی و جدایه *T.hM۱۱* با فعالیت آنزیمی ۰/۵۹ واحد در میلی‌لیتر کمترین ($P<۰/۰۵$) میزان فعالیت آنزیمی را نشان دادند. از بین ۲۰ جدایه جهش یافته قارچ تریکودرما رسئی، ۲۰ جدایه (۱۰۰ درصد از جدایه‌ها) میزان فعالیت آنزیم زایلاناز بیشتری نسبت به جدایه شاهد داشته‌اند. در این بین جدایه‌های *T.rM۹*، *T.rM۱۰*، *T.rM۱۳*، *T.rM۱۷* و *T.rM۲۱* دارای اختلاف بیشتری ($P<۰/۰۵$) با نمونه شاهد داشتند. جدایه *T.rM۱۷* با ۶/۶۶ واحد در میلی‌لیتر بیشترین فعالیت آنزیمی و جدایه *T.rc* با فعالیت آنزیمی ۰/۶۲ واحد در میلی‌لیتر کمترین ($P<۰/۰۵$) میزان فعالیت آنزیم را نشان دادند.



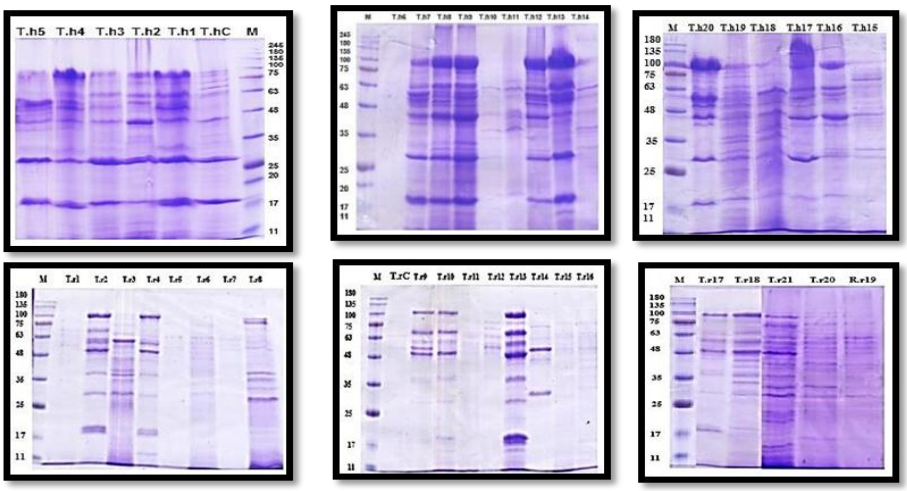
نمودار۱- فعالیت آنزیم زایلاناز قارچ تریکودرما رسئی و هارزیانوم و جدایه‌های موتانت آنها در مایع فوقانی محیط تخمیر بعد از ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۱۸۰ دور در دقیقه

غلظت پروتئین در جدایه‌های جهش یافته قارچ تریکودرما: غلظت پروتئین در جدایه های جهش یافته قارچ تریکودرما رسئی به ترتیب از مقدار ۳۱۳/۰۲۶ تا ۲۵/۲۶۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر متغیر بود. بالاترین محتوای پروتئین مربوط به جدایه $T.rM۷$ با مقدار ۳۱۳/۰۲۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر که نسبت به شاهد ۳/۳۰ برابر بیشتر ($P<۰/۰۵$) پروتئین تولید کرده بود. پائین‌ترین غلظت پروتئین خارج سلولی تولید شده فقط ۲۵/۲۶۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده که در مایع فوقانی محیط تخمیر جدایه $T.rM۱۲$ محاسبه شد. غلظت پروتئین در بین ۲۰ جدایه جهش یافته قارچ تریکودرما هارزیانوم ترتیب از مقدار ۱۶۰/۹۲۶ تا ۳۱/۳۸۹ میلی‌گرم در میلی‌لیتر متغیر بود. بالاترین محتوی پروتئین مربوط به جدایه $T.hM۹$ با مقدار ۱۶۰/۹۲۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر که نسبت به شاهد ۱/۰۲ برابر بیشتر پروتئین تولید کرده است. پایین‌ترین غلظت پروتئین خارج سلولی تولید شده توسط جدایه، $T.hM۶$ ۳۱/۳۸۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در مایع فوقانی محیط تخمیر بود.



نمودار۲- محتوای پروتئین خارج سلولی (میلی‌گرم در میلی‌لیتر) قارچ تریکودرما هارزیانوم و رسئی 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 زایلاناز: پروفایل پروتئینی آنزیم زایلاناز 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]۸۴ کیلو دالتون مربوط به آنزیم زایلاناز گزارش شده است. همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است به خوبی باند مربوط باندهای ۳۶، ۴۳، ۵۸، ۶۶، ۸۴ و ۱۱۰ کیلو دالتون طبق گزارشات بدست آمده مربوط به پروتئین‌های کدکننده آنزیم زایلانازاست [۵] در جدایه‌های مختلف قارچ تریکودرما هارزیانوم و تریکودرما رسئی نشان می‌دهند که دلالت بر تولید این آنزیم در این جدایه‌های موتانت می‌باشد.



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

بحث

طبق بررسی‌های منتشر نشده قبلی که نویسندگان همین مقاله انجام داده اند، میزان فعالیت آنزیم زایلاناز را در هشت گونه مختلف قارچ تریکودرما بررسی شد وگونه تریکودرما هارزیانوم، ۶/۶۲ واحد در میلی لیتر و تریکودرما ویریده، تریکودرما رسئی، تریکودرما لونجیبراچیوم، تریکودرما آتروویریده۱-۳ و تریکودرما آتروویریده ۶۰۲۲ به ترتیب ۰/۵۲، ۰/۵۸، ۱/۸۲، ۱/۳۹ و ۰/۹۱ واحد در میلی‌لیتر توانایی تولید آنزیم زایلاناز را داشتند. در این آزمایش از سوبسترای پسلیوم استفاده شد (پسلیوم، از پوسته بذر گیاه اسفرزه از خانواده بارهنگ تهیه شده است که منبع خوبی از فیبرهای محلول و نامحلول بوده و باعث ایجاد لعاب می‌شود) که بیشترین میزان فعالیت آنزیم زایلاناز در ۲۰ جدایه مختلف تریکودرما هارزیانوم مربوط به جدایه *T.h M*۳ با ۲۰/۲۶ واحد در میلی‌لیتر بیشترین فعالیت آنزیمی و جدایه *T.h M*۱۱ با فعالیت آنزیمی ۰/۵۹ واحد در میلی-لیترکمترین (P<۰/۰۵) میزان فعالیت آنزیم را نشان دادند. از بین ۲۰ جدایه جهش یافته قارچ تریکودرما رسئی، ۲۰ جدایه (۱۰۰ درصد از جدایه‌ها) میزان فعالیت آنزیم زایلاناز بیشتری نسبت به جدایه شاهد داشته‌اند. جدایه *T.r M*۱۷ با ۶/۶۶ واحد در میلی‌لیتر بیشترین فعالیت آنزیمی و جدایه *T.rc* با فعالیت آنزیمی ۰/۶۲ واحد در میلی‌لیترکمترین (P<۰/۰۵) میزان فعالیت آنزیم را نشان داده‌اند. طبق مطالعات وزن مولکولی آنزیم زایلاناز، ۴۳، ۵۸، ۶۶، ۸۴ و ۱۱۰ کیلودالتون گزارش شده است[۵] در نتیجه مشاهدات و تجزیه پروفیل پروتئینی تریکودرما رسئی و تریکودرما هارزیانوم در شرایط القاء تولید آنزیم زایلاناز به خوبی نشان داده شده است. در ۶۵/۵ درصد جدایه‌ها ایجاد جهش در اثر پرتوتابی با اشعه گاما منجر به افزایش فعالیت زایلانازی آنها شده است والقاء جهش فیزیکی در ژنوم تریکودرما رسئی و تریکودرما هارزیانوم برای بهبود کیفیت و کمیت آنزیم زایلاناز در ۶۵/۵ درصد جدایه‌های جهش‌یافته موفقیت‌آمیز بوده که شانس موفقیت بالایی در افزایش توانایی تولید آنزیم زایلاناز با استفاده از القاء جهش تصادفی به شمار می‌رود. باتوجه به کاربردهای فراوانی که آنزیم زایلاناز در کشور دارد

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 $T.h\ M۳$ و $T.h\ M۴$ قابل پیشنهاد برای بهینه سازی شرایط تولید آنزیم زایلاناز در مقیاس نیمه صنعتی هستند و می‌توانند در ارتقای راندمان تولید این آنزیم و رقابت‌پذیری تولید داخلی آنزیم‌های زایلانازی 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 شد.

تشکروقدردانی

ازهمکاران طرح" کنترل بیماری‌های خاکزاد گیاهی با استفاده از فناوری‌های هسته‌ای ومولکولی" 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. AhariMostafari, M.A. Ebrahimi, H. Askari, M. Mirmajlesi, “Invitation of Gamma Radiation Effects on Morphological and Antagonisitic Characteristics of*Trichodermaharzianum”.* 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. Mansourifard, H. Askari, “ A study of pectinase enzyme activity changes in gamma- irradiated *Trichodermareesei* mutants”, International Journal of Farming and Allied Sciences.Vol., 3 (5): 555-561, (2014).
5. JE.Mellon,PJ. Cotty, KA.Callicott, H.Abbas ."Identification of a major xylanase fromAspergillusflavus"Mycopathologia. Oct; 172(4):299-305. doi: 10.1007/s11046-011-9425-7. Epub 2011 Apr 10.(2011).