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)

امکان سنجی تولید بیواتانل از تفاله چغندر قند با استفاده از جدایه های جهش یافته قارچ *Trichoderma reesei*

ماندانا صفایی[۱]، سمیرا شهبازی[*۲]، حامد عسکری[۲]

۱ – گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه پیام نور کرج، البرز

۲-گروه گیاهپزشکی و نگهداری مواد غذایی، پژوهشکده کشاورزی هسته ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، سازمان انرژی اتمی

نویسنده مسئول: sshahbazi@nrcam.org

چکیده :تفاله چغندر قند یکی از ضایعات جانبی صنایع تولید قند می باشد که به علت دارا بودن درصد بالایی از مواد لیگنوسلولزی می تواند یکی از گزینه های قابل توجه جهت تولید آنزیم سلولاز، ساکاریفیکاسیون آنزیمی و تولید الکل از آن باشد. قارچ *Trichoderma* spp. یکی از ارگانیسم¬های مهم تولید¬کننده آنزیم های تجزیه کننده سلولز در طبیعت است. در این پژوهش از تفاله چغندر قند در محیط تخمیر قارچ تریکودرما استفاده شد و با استفاده از ۲۱ جدایه موتانت پرتو گاما قارچ *T. reesei* ، آنزیم سلولاز در شرایط دمایی 28 °C و سرعت همزدن180 rpm برای مدت ۷۲ ساعت تولید گردید. توانایی تولید آنزیم های تجزیه کننده سلولز در کلیه جدایه ها مورد ارزیابی قرار گرفت. فعالیت آنزیم های اندوگلوکاناز، اگزوگلوکاناز و سلولاز کل در جدایه موتانت T. r M5 بالاترین مقادیر فعالیت آنزیمی را در بین جدایه های موتانت و جدایه والد اولیه نشان داد. همچنین جدایه مذکور دارای فعالیت بتا-گلوکوزیدازی مناسبی بود. سلولاز کل شامل فعالیت آنزیم های اندوگلوکاناز، اگزوگلوکاناز و بتا-گلوکوزیداز می شود که بصورت سینرژیستی باعث هیدرولیز سلولز کریستالی می شوند. پروفایل پروتئینی جدایه موتانت T.r M5 با استفاده از آزمون SDS-PAGE بررسی شد. جدایه فوق دارای باندهای آنزیمی متعددی در وزن های مولکولی مختلف بود که مربوط به آنزیم هایEG IV ، Cel 3C، Cel 3D، Cel 3A، Cel 7A، Cel 6A، Cel 5Aو Cel 61A بودند. نتایج این تحقیق نشان داد که جدایه موتانت T. r M5 بالاترین کارایی را بین جدایه های موتانت برای ساکاریفیکاسیون تفاله چغندر قند داراست. با استفاده از آنزیم های تولیدی از این جدایه، ساکاریفیکاسیون تفاله چغندر به مدت یک ساعت انجام شد و میزان تولید الکل از قندهای آزاد شده در محیط با استفاده از مخمر های صنعتی *Saccharomyces cerevisiae*و *Cluyveromyces marxianus* مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان تولید الکل در تیمار ساکاریفیکاسیون با T. r M5، حدود ۲-۱/۵ برابر بیشتر از والد اولیه خود (*T. reesei*) بود .

واژگان کلیدی: سلولاز، موتاسیون، تریکودرما، *Saccharomyces cerevisiae*، *Cluyveromyces marxianus*، ساکاریفیکاسیون، بیواتانل.

Feasibility of producing bioethanol from sugar beet pulp by *T. reesei* mutants

Safaeie M.[1], S. Shahbazi*[2], H. Askari[2]

1. Biotechnology Department, Faculty of Agricultue, Payam e Noor University, Alborz.
2. Plant Protection Department, Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute (NSTRI), Atomic Energy Organization of Iran (AEOI), Alborz, Iran.
3. **sshahbazi@nrcam.org**

Abstract: Sugar beet pulp industry is one of the peripheral lesions due to the high percentage of lignocellulosic materials can be an option due to cellulase enzymes production, *enzymatic saccharification*, and production of alcohol. *Trichoderma spp*. is an important organism that produce wide range of cellulytic enzymes in nature. In this study,

the sugar beet pulp in the fermentation of *Trichoderma* were using 21 strains of mutant gamma ray *Trichoderma* planning enzyme cellulase in temperature 28° C and the stirring speed 180 rpm for 72 hours of production, and the ability to produce cellulytic enzymes were analyzed in All isolates. The enzyme activity of endoglucanase, total cellulase , and *exoglucanase* in mutant strains of T. r M5 showed highest levels of enzyme activity in the mutant strains by other strains an initial parent. In addition, these isolates have suitable ß-glucosidase activity. Total cellulase enzymes including endoglucanase, *exoglucanase* and ß-glucosidase that hydrolyzed cellulose crystals are a synergistic manner. Protein profiles of mutant strains T. r M5 were analyzed using SDS-PAGE. Several different molecular weights of the isolated enzyme bonds that the enzymes of EG IV, Cel 3C, Cel 3D, Cel 3A, Cel 7A, Cel 6A, Cel 5A, and Cel 61A that hydrolyzed sugar beet pulp as synergistic. The results showed that the mutant strains T. r M5 is the best strains for *saccharification* sugar beet pulp. Enzymes produced by these isolates was performed for 1 h *saccharification* sugar beet pulp production of ethanol from sugars released in the environment using an industrial yeast was evaluated by *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*. The amount of alcohol in *saccharification* treated with T. r M 5 compared with wild strains of *T. reesei* and fermentation by these yeasts was about 1.5-2 more than before.

Keywords: Gamma radiation, cellulase, *Trichoderma reesei*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* , Saccharification, bio-ethanol.

مقدمه :

یکی ازمهمترین چالش های جوامع بشری درقرن بیست ویکم افزایش تقاضای انرژی برای حمل و نقل، گرمایش، کارخانجات و صنایع مختلف از منابعی است که پایدار بوده و با محیط زیست سازگار باشد. موفقیت طرح تبدیل ضایعات سلولزی به موادقندی و سوختی درگرو تولید موفقیت آمیز و باصرفه آنزیم سلولاز می باشد. موادآلی عموماً درشکل اصلی خود ارزش غذایی اندکی دارند اما در اثر تجزیه بیولوژیکی، بستر مناسبی را برای سایر میکروارگانیسمها ایجادمی کنند. گونه های قارچ تریکودرما حداقل دو اگزوگلوکاناز (سلوبیوهیدرولاز) شامل CBH I ,Cel 7A ,CBH II ,Cel 6A و پنج اندوگلوکاناز شامل Cel5A (EG II)، Cel 7B (EG I)، Cel 12A (EG III)، EG V. Cel 45A و Cel 61A EG 17، همچنین دوβ-گلوکوزیداز شامل Cel 1A BGLII ,BGL I و Cel 3A برای تجزیه سلولز تولید می کنند(۳). درطول یک فرایند هیدرولیز آنزیمی هرسه دسته از آنزیم ها برای شکستن سلولز عمل می کنند(۶). طی دوره ی بهره برداری کارخانجات قند علاوه برقند و شکر مقادیر فراوانی ملاس، گل صافی، تفاله (درکارخانجات چغندر) و باگاس (درکارخانجات نیشکری) نیزتولید می شود. تفاله چغندرقند حاوی مقادیر زیادی الیاف خام است و از پکتین، سلولز و همی سلولز به مقادیر تقریباً برابرتشکیل شده است. تجزیه آنزیمی تفاله چغندرقند فراهم آورنده منبع غنی ازترکیبات قندی قابل تخمیر ارزان قیمت جهت تولیدات صنعتی از جمله بیواتانول می باشد. قارچ Trichoderma reesei به تولید آنزیمهای سلولازی بافعالیت آنزیمی نسبتاً بالا مشهور است. از زمانی که فعالیت سلولولیتیک قارچی گزارش گردید،تلاش های زیادی برای اصلاح ژنتیکی جدایه های تریکودرما و بهینه سازی شرایط کشت با فرض افزایش کارآیی تولید سلولاز و دستیابی به

ژنوتیپ های جدید باتوان تولید بیشتر کمپلکس آنزیمی صورت پذیرفته است. درپژوهش حاضر، میزان تولیدکمپلکس های آنزیم های سلولازتوسط جدایه های موتانت پرتوتابی شده با اشعه ی گامادر T. ressei بواسطه استفاده ازتفاله چغندرقندبه عنوان سوبسترای تخمیر مورد ارزیابی قرارگرفت و بهترین جدایه موتانت برای ساکاریفیکاسیون تفاله چغندرقند معرفی شد.

مواد و روش ها :

قارچ T. reesei به صورت لیوفیلیزه ازمرکزکلکسیون قارچ و باکتری سازمان پژوهش های علمی وصنعتی 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 دردمای ۲۸ °C قرارداده شد. بعدازمدت زمان فوق، اسپورها به شکل رویشی درآمده وسپس برروی محیط PDA انتقال داده شدودرهمان شرایط قبل گرمخانه گذاری گردید. پلیت های کشت به مدت ۷ روزگرمخانه گذاری گردید و اسپورهای تولیدشده با استفاده ازمحلول سیلین جمع آوری گردید و جمعیت آن در spore/ml ۱×۱۰^{۶} تنظیم گردید و جهت اعمال موتاسیون مورداستفاده قرارگرفت (۵). عملیات پرتوتابی با استفاده ازدستگاه گاماسل باچشمه کبالت ۶۰ اکتیویته ۲۵۰۰ کوری ونرخ دز ۰/۲۳ گری درثانیه مستقردرمرکز تحقیقات کشاورزی وپزشکی هسته‌ای کرج (سازمان انرژی اتمی ایران) انجام پذیرفت(۸). ازسوسپانسیون اسپور سریال رقت تهیه گردید و برروی محیط کشت PDA کشت داده شدند وتعداد ۲۱ جدایه موتانت براساس تفاوت های مورفولوژیک و آزمون مندل انتخاب گردید وبرای سنجش توانایی ساکاریفیکاسیون تفاله چغندرقند مورداستفاده قرارگرفت.

تولید آنزیم سلولاز :جدایه های قارچ موتانت و وحشی قارچ T. reesei مطابق روش شهبازی و همکاران(۹) کشت داده شد.این محیط درpH۴/۸تنظیم شده بود و حاوی ٪ ۵ (w/v) تفاله مرطوب چغندرقند بود. شرایط رشد مشابه شرایط قبل انجام شد. بعدازمدت زمان فوق میسلیوم های قارچ توسط سانتریفیوژکردن درrpm۴۵۰۰به مدت ۷ دقیقه خارج گردید و مایع فوقانی برای اندازه گیری پروتئین خارج سلولی وفعالیت آنزیمی مورد استفاده قرارگرفت.

اندازه گیری غلظت پروتیئن خارج سلولی تولیدی درمحیط TFM وتعیین فعالیت آنزیمی :اندازه گیری پروتئین در مایع فوقانی محیط TFM با استفاده از روش بردفورد (۲) انجام گرفت و با استفاده از نمودار استاندارد ترسیم شده با پروتئین خالص Bovine serum albumin (BSA)، مقدار پروتئین ($mg.ml^{-1}$) در مایع فوقانی محیط تخمیر TFM محاسبه گردید. فعالیت آنزیم های Avicelase، CMCase و Cellubiase و FPase 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(۱۰). مخلوط واکنش حاوی ۰/۵ ml از محلول (w/v)۰/۵ ٪ از هر یک از سوبستراها در بافر ۰/۰۵ مولار سیترات سدیم (pH ۴/۸) و ۰/۵ ml از مایع فوقانی محیط تخمیر TFMبود. نمونه ها به مدت ۶۰ دقیقه در حمام آب گرم ۵۰ °C قرار گرفتند و واکنش آنزیمی با افزودن ۳ ml از محلول دی نیترو سالیسیلیک اسید متوقف شد. نمونه ها به خوبی مخلوط شدند و سپس برای مدت ۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شدند و فوراً خنک گردیدند. سپس بعد از رقیق سازی جذب نمونه ها با استفاده از اسپکتروفتومتر در ۵۴۰ nm قرائت گردید. هر واحد فعالیت آنزیمی به عنوان مقدار

آنزیمی که توانایی آزاد کردن ۱µmol گلوکز را به ازای هر ساعت دارد، تعریف شد. همچنین برای تعیین فعالیت FPase (سلولاز کل) از نوارهای cm ۶×۱ کاغذ صافی واتمن شماره ۱ به عنوان سوبسترا استفاده شد.

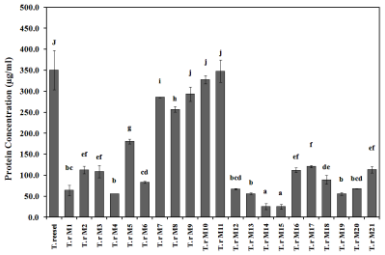
بررسی پروفایل پروتئینی :جدایه موتانت5 *T.r M* به عنوان بهترین جدایه برای هیدرولیز تفاله چغندر قند انتخاب شد و پروفایل پروتئین خارج سلولی آن در مایع فوقانی محیط تخمیر TFM با استفاده از آزمون SDS-PAGE بررسی شد.

تولید بیواتانول :برای تولید بیواتانول از دو مخمر *K. marxianus* و *S. cerevisiae* استفاده گردید. رطوبت تفاله چغندر با استفاده از محیط کشت TFM در ۶۵درصد و pH ۴/۸ تنظیم گردید و با استفاده از ریسه های قارچ *T. reesei* و *T. r M5* در شرایط اسپتیک و با حجم توده سلولی یکسان تلقیح گردید و به مدت ۷۲ ساعت در دمای °C ۲۸ قرارداده شد. بعد از مدت زمان فوق به میزان ۵۰ میلی لیتر به محیط کشت فوق، بافر سیترات سدیم ۰/۰۵ مولار اضافه گردید و به مدت ۱ ساعت در گرمخانه °C۵۰ قرار داده شد. بعد از هیدرولیز تفاله چغندر قند با استفاده از آنزیم های تولیدی توسط قارچ تریکودرما، با استفاده از مخمر های *K. marxianus* و *S. cerevisiae* تلقیح گردید و میزان الکل تولیدی بعد از ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری در دمای °C ۳۵ و سرعت همزدن rpm ۱۸۰ با استفاده از الکل سنج یا بومه الکل اندازه گیری شد.

آنالیز آماری:کلیه نتایج آزمایشات با استفاده از آنالیز واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین ها به روش دانکن در سطح آمای P< ۰/۰۵ انجام گرفت. آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPPS (ویرایش ۱۳) انجام گرفت و کلیه آزمایشات در سه تکرار انجام شد.

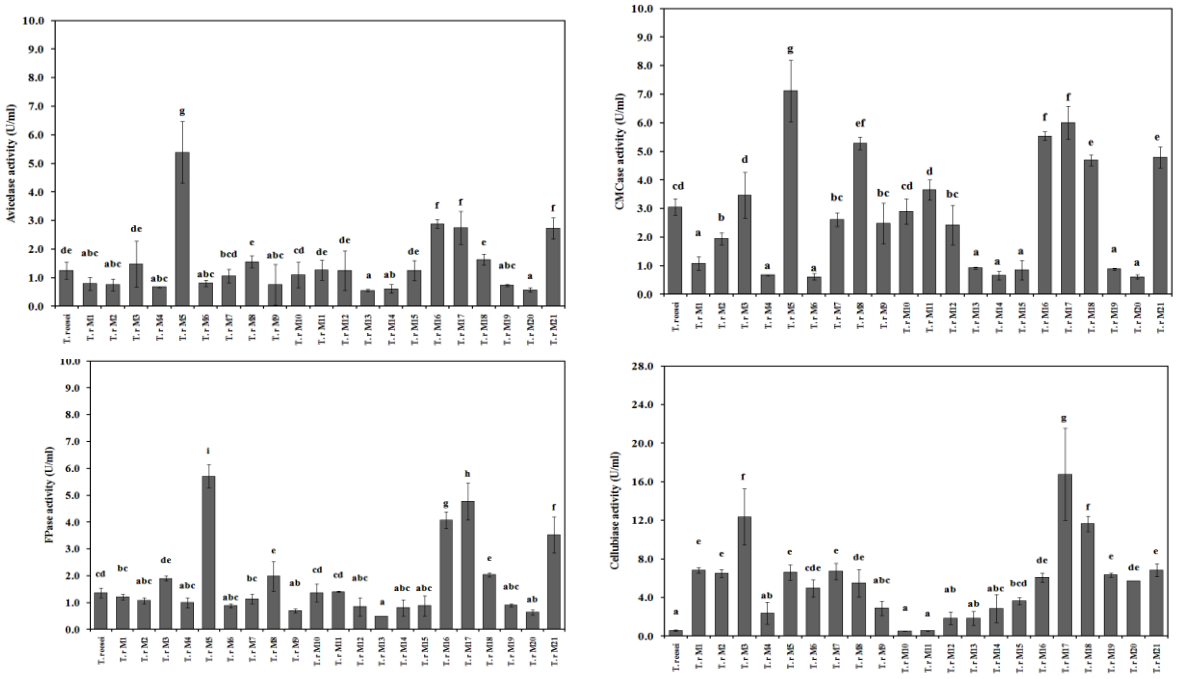
نتایج و بحث :

مقدارپروتئین خارج سلولی تولید شده در قارچ وحشی و جدایه های موتانت*T. reesei* در شکل ۱ نشان داده شده است. غلظت پروتئین از مقدار ۵/۵۷ الی (µg/ml) ۴۶/۷۵ متغیر بود. بالاترین محتوای پروتئین مربوط به قارچ وحشی T. reesei بدست آمد و پایین ترین غلظت پروتئین در مایع فوقانی محیط تخمیر T. r M15 محاسبه گردید. بطورکلی، نتایج نشان داد که غلظت پروتئین خارج سلولی تولید شده در محیط تخمیر TFM (µmg/ml) در کلیه قارچ های مورد مطالعه دارای اختلاف معنی دار آماری در سطح ۰/۰۵ می باشند. جدایه های موتانت T. r M9، T. r M10 و T. r M11 از نظر تولید پروتئین خارج سلولی در مایع فوقانی محیط تخمیر TFM، فاقد اختلاف معنی دار آماری با قارچ وحشی بودند.



شکل ۱. محتوای پروتئین خارج سلولی (mg/ml) قارچ *T.* reesei و جدایه های موتانت آن در مایع فوقانی محیط تخمیر بعد از ۷۲ ساعت گرمخانه گذاری در °C ۲۸ و rpm ۱۸۰.

چنین اختلافاتی می تواند ناشی از این حقیقت باشد که ایزوله های آنزیمی مختلف ساختارهای اولیه متفاوتی دارند. نتایج فعالیت آنزیم های سلولاز در مایع فوقانی محیط تخمیر TFM بعد از ۷۲ ساعت گرمخانه گذاری در سرعت همزدن rpm ۱۸۰ و دمای °C ۲۸ با سوبستراهای مختلف (کربوکسی متیل سلولز، آویسل، سلوبیوز و کاغذ صافی) در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج این مقادیر دارای اختلاف معنی دار آماری در سطح ۰/۰۵ بودند. فعالیت آنزیمی بر اساس واحد بین المللی (U) نشان داده شده اند. کربوکسی متیل سلولز به عنوان سوبسترای محلول در آب، اغلب برای تعیین فعالیت اندوگلوکاناز که CMCase نیز نامیده می شود، استفاده می گردد؛ چراکه اندوگلوکانازها باند های گلیکوزیدی β (۴،۱) داخل مولکولی را بصورت تصادفی می شکنند و باعث کاهش چشمگیر در درجه پلیمریزاسیون (DP[۱]) (مثلاً ویسکوزیته ویژه) در CMC می شوند. آویسل تجاری برای اندازه گیری فعالیت اگزوگلوکاناز(آویسلاز)استفاده شد. بالاترین فعالیت آویسلاز در مایع فوقانی محیط تخمیر قارچ T.r M5 با مقدار U/ml ۵/۳۹ بدست آمد. نتایج نتایج اندازه گیری فعالیت آنزیمی نشان داده اند که بالاترین فعالیت FPase مربوط به آنزیم های تولید شده توسط جدایه موتانت T.r M5است که فعالیت آنزیمی U/ml ۵/۷۱ را نشان داد. میزان فعالیت آنزیم β-گلوکوزیداز (یا سلوبیاز) نیز با استفاده از سوبسترای سلوبیوز اندازه گیری شد و نتایج آن در شکل ۲ نشان داده شده است. کلیه نتایج در سطح آماری ۰/۰۵ دارای اختلاف معنی دار آماری بودند .

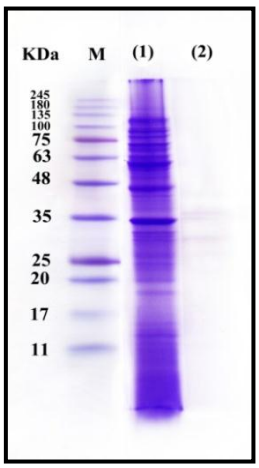


شکل ۲. فعالیت آنزیمی آویسلاز(a)و CMC ase (b)و FPase(c)و(d) سلوبیاز (U/ml) قارچ T.reesei و جدایه های موتانت آن در مایع فوقانی محیط تخمیر بعد از ۷۲ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد و rpm ۱۸۰.

۱ . Degree of polymerization

مقادیر بالای فعالیت FPase در جدایه موتانت T.r M5 به علت حضور آنزیم های CBH و EG می باشد. جدایه موتانت T.r M5 به عنوان بهترین جدایه برای هیدرولیز آنزیمی تفاله چغندر قند انتخاب شد.

همانطور که درشکل ۳ نشان داده شده است باند های مولکولی متعددی در پروفایل پروتئینی مشاهده گردید، در حالیکه مایع فوقانی محیط تخمیر TFM تلقیح نشده فاقد باند پروتئینی مشخصی بود. کمترین وزن مولکولی مربوط به آنزیم Cel61A (EG IV) بود که یک باند قوی در ۳۴/۱۴ KDa ظاهر ساخت. Cel5A یک اندوگلوکاناز متعلق به خانواده ۵ گلوکوهیدرولازها می باشد. وزن مولکولی این آنزیم ۴۲ KDa تخمین زده شده است. با این وجود دارای وزن مولکولی ظاهری ۴۸ KDa بر روی ژل SDS-PAGE می باشد. نقطه ایزوالکتریک این آنزیم ۵/۶-۵/۵ می باشد (۴). در پروفایل پروتئینی ژل SDS-PAGE قارچ *T.r M5* (شکل ۳) باند قوی از این آنزیم در وزن مولکولی ۴۶/۲۵ مشاهده گردید. در میان آنزیم های بیان شده در *T. reesei* تخمین زده شده است که بین ۵ تا ۱۰٪ از بیان سلولاز کل مربوط به آنزیم Cel5A می باشد . Cel6A یک سلوبیوهیدرولاز متعلق به خانواده ۶ گلوکوهیدرولازها می باشد. این آنزیم دارای وزن مولکولی ۴۷ KDa و بر روی ژل SDS-PAGE دارای وزن ۵۳ KDa است و نقطه ایزوالکتریک آن ۵/۹ می باشد(۱۱). البته گزارشاتی نیز وجود دارد که محدوده وزن مولکولی این آنزیم را ۵۸ KDa-۵۰ گزارش کرده است. آنزیم Cel6A یا CBH II آنزیمی است که باعث شکستن باند های گلیکوزیدی از انتهای غیر احیا زنجیره می شود) و در برخی گزارشات نیز ذکر شده است که دارای برخی از فعالیت های اندوگلوکانازی می باشد .در میان آنزیم های مترشحه از *T. reesei* بین ۲۰-۱۷ ٪ از کل آنزیم های سلولاز بیان شده مربوط به Cel6A بوده است (۱۱). Cel6A در وزن مولکولی ۵۹/۱۹ KDa مشاهده گردید.Cel7A یا CBH I یک سلوبیوهیدرولاز متعلق به خانواده ۷ گلوکوهیدرولازها می باشد و اولین آنزیم سلولاز *T. reesei* می باشد که شناسایی شده است.Cel7A دارای وزن مولکولی ظاهری ۵۲ KDa و بر روی ژل SDS-PAGE دارای وزن مولکولی ۶۶ KDa با نقطه ایزوالکتریک ۴/۳ می باشد(۴). این آنزیم در وزن مولکولی ۶۳ KDa درپروفایل پروتئینی ژل SDS-PAGE مشاهده گردید.



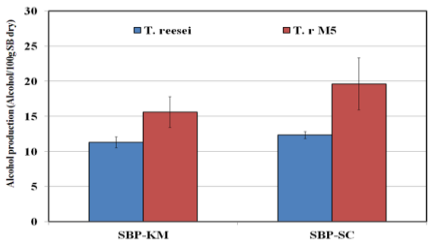
شکل ۳. پروفایل پروتئین آنزیم های سلولاز،

(۱): مایع فوقانی محیط تخمیر (۲) : مایع فوقانی محیط تخمیر تلقیح شده

Cel7A بیشترین سلولاز بیان شده توسط *T. reesei* می باشد و مقدار ۶۰-۵۰ ٪ از کل سلولاز بیان شده را شامل می شود(۸) با این حال در این تحقیق با توجه به خصوصیات سوبسترای تخمیر این آنزیم بیان کمتری نسبت به Cel6A یا CBH II از خود نشان داده است. احتمالاً این آنزیم نقشی کلیدی در هیدرولیز سلولز کریستالی را بازی می کند. Cel7A یک آنزیم کارآمد در هیدرولیز پیوندهای گلیکوزیدی در سلولز بوده و

ترجیحاً هیدرولیز را از انتهای احیای زنجیره انجام می دهد(۱۱). Cel7B یک اندوگلوکاناز متعلق به خانواده ۷ گلوکوهیدرولازها می باشد که دارای وزن مولکولی تخمینی ۴۸ KDa بوده و بر روی ژل SDS-PAGE وزن مولکولی ۵۵-۵۰ KDa را نشان می دهد و دارای نقطه ایزوالکتریک ۴/۵ می باشد(۴). Cel7B زنجیره های گلیکوزیدی در سلولز را با مکانیسم مشخصی هیدرولیز می کند. در قارچ *T. reesei* بیان Cel7B بین ۱۰-۶ ٪ از بیان سلولاز کل را شامل می شود(۴). باند آنزیمی Cel7B تنها در پروفایل پروتئینی قارچ *T. reesei* در وزن مولکولی ۵۴ KDa دیده شد. همچنین Cel3A (BGL I) با وزن مولکولی ۷۱/۵۷ KDa در پروفایل پروتئینی قارچ T. r M5 مشاهده شد. Cel 3D (BGL) نیز با وزن مولکولی ۷۸/۶۷ KDa نیز در پروفایل پروتئینی *T. r M5* قابل مشاهده بود.Cel3C (BGL) و EG VI به ترتیب با وزن های مولکولی ۹۱/۹۱ و ۱۱۹/۴۴ KDa مشاهده گردید.

تولید بیواتانل: میزان قند اندازه گیری شده در چغندرقند برابر با ۰/۲۲ گرم بر میلی لیتر و میزان قند در تفاله چغندرقند قندگیری شده برابر با ۰/۰۰۷ گرم بر میلی لیتر اندازه‌گیری گردید. نتایج نشان دادند که نمونه‌های تیمار شده با تفاله‌ی چغندرقند و موتانت T. reesei که پس از هیدرولیز ۴۸ ساعته در اختیار مخمر قرار گرفته اند، در تیمار مخمر S. cerevisiae61/19درصد و در تیمار مخمر C. marxianus 59/15 درصد الکل تولید شده بود. در دو تیمار دیگر که به صورت مستقیم از چغندر قند، قندگیری نشده استفاده شده بود و تیمار T. reesei نداشتند نتایج حاصل نشان دادند که در محیط کشت تیمار شده با S. cerevisia 37/45 درصد و در محیط کشت تیمار شده با C. marxianus 94/46 درصد الکل اندازه گیری شد. یعنی میزان الکل تولیدی با مخمر S. cerevisia در محیط حاصل از چغندرقند قندگیری نشده ۲/۳۱ برابر الکل تولیدی با مخمر S. cerevisia در محیط حاصل از تفاله چغندرقند اندازه گیری شد. میزان الکل تولیدی با مخمر C. marxianusدر محیط حاصل از چغندرقند قندگیری نشده ۳/۰۱ برابر الکل تولیدی با مخمر S. cerevisia در محیط حاصل از تفاله چغندرقند اندازه گیری شد .این در حالی است که میزان قند موجود در چغندرقند ۴ /۳۱ برابر قند موجود در تفاله چغندرقند اندازه‌گیری گردید ، که حاکی از قدرت بالای هیدرولیز آنزیمی ساختار کریستالی (آمورف) تفاله چغندر قند در موتانت T. rM5 می باشد .



شکل ۴. مقایسه میزان تولید الکل (درصد الکل به ازای هر ۱۰۰ گرم ماده خشک تفاله چغندر قند) با استفاده از مخمر *Cluyveromyces marxianus* و *Saccharomyces cerevisiae* بعد از ساکاریفیکاسیون تفاله چغندر قند با استفاده از T. reesei و T. r M5

شکل ۴ میزان تولید الکل در تفاله چغندر قند هیدرولیز شده با استفاده از آنزیم های T. reesei و T. r M5را با استفاده از دو مخمر C. marxianus و S. cerevisiae را نشان می دهد. میزان تولید الکل در تیمار ساکاریفیکاسیون با T. r M5 در

مقایسه با قارچ وحشی T. reesei و تخمیر با مخمرهای مورد آزمون بالاتر بود (۲-۱/۵ برابر بیشتر) که نشان دهنده کارآمدی بیشتر این جدایه موتانت در تجزیه آنزیمی تفاله چغندر قند و آزاد سازی قندهای احیاء بیشتر جهت تخمیر می باشد.نتایج نشان دادند که نمونه‌های تیمار شده با تفاله‌ی چغندرقند و موتانت T. reesei که پس از هیدرولیز ۴۸ ساعته در اختیار مخمر قرار گرفته اند، در تیمار مخمر S. cerevisiae 51/12 درصد و در تیمار مخمر C. marxianus 45/11 درصد الکل تولید شده بود. در دو تیمار دیگر که به صورت مستقیم از چغندر قند، قند گیری نشده استفاده شده بود و تیمار T. reesei نداشتند نتایج حاصل نشان دادند که در محیط کشت تیمار شده با S. cerevisiae 37/45 درصد و در محیط کشت تیمار شده با C. marxianus 94/46درصد الکل اندازه گیری شد. یعنی میزان الکل تولیدی با مخمر S. cerevisia در محیط حاصل از چغندرقند قندگیری نشده ۳/۹۶ برابر الکل تولیدی با مخمر S. cerevisiae در محیط حاصل از تفاله چغندرقند اندازه گیری شد. میزان الکل تولیدی با مخمر C. marxianus در محیط حاصل از چغندرقند قندگیری نشده ۴/۰۹ برابر الکل تولیدی با مخمر S. cerevisiae در محیط حاصل از تفاله چغندرقند اندازه گیری شد .این در حالی است که میزان قند موجود در چغندرقند ۴ /۳۱ برابر قند موجود در تفاله چغندرقند اندازه‌گیری گردید. با توجه به اینکه در هر محیط کشت به میزان برابر ۲۰ گرم ماده خشک جامد قرار داشت نتایج حاصل پس از تخمیر بدین گونه حاصل شد. در تیمار T. rM5 تفاله‌ی چغندرقند با مخمر S. cerevisiae 09/62 درصد ماده‌ی خشک به الکل تبدیل گردید. در تیمار تفاله‌ی چغندرقند با مخمر C. marxianus 17/49 درصد ماده‌ی خشک به الکل تبدیل گردید. در تیمار تیپ والدی قارچ T. reesei تفاله‌ی چغندرقند با مخمر S. cerevisiae 96/59 درصد ماده‌ی خشک به الکل تبدیل گردید. در تیمار تفاله‌ی چغندرقند با مخمر C. marxianus 77/47 درصد ماده‌ی خشک به الکل تبدیل گردید. این درحالی است که در دو تیماری که از چغندرقند قندگیری نشده استفاده گردید در تیمار مخمر C. marxianus38/69 درصد ماده‌ی خشک به الکل تبدیل گردید و در تیمار مخمر S. cerevisiae 43/68 درصد ماده‌ی خشک به الکل تبدیل گردید.

منابع :

[1]. **Ahari Mostafavi, H. 1387.** The application of nuclear techniques in weed and plant disease management. The 2nd national congress of nuclear technology application in agricultural and natural resource science. Karaj, p:331-335.

[2]. **Bradford, MM. 1976.** A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantitites of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

[3]. **Chand** P,. **Aruna** A,. **Maqsood** A.M. Novel mutation method for increased cellulase production. Department of Microbiology, Osmania University, Hyderabad, India. Journal of Applied Microbiology **2005**, 98, 318–323

[4]. **Gama, F.M., Mota, M. 1998.** Cellulases for oligosaccharide synthesis: a preliminary study. Carbohydrate Polymers, 37: 279–281.

[5]. **Grishutin, S.G., Gusakov, A.V., Markov, A.V., Ustinov, B.B., Semenova, M., Sinitsyn, A.P., 2004.** Specific xyloglucanases as a new class of polysaccharide-degrading enzymes. Biochim.Biophys.Acta.1674, 268–281.

[6]. **Lynd L.R., Weimer P.J., Van Zyl W.H., Pretorius I.S., 2002.** Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology". Microbiology and Molecular Biology Reviews. 66:506-577,.

[7]. **Maki M, Leung KT, Qin W. 2009.** The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. Int J Biol Sci 5: 500–516,.

[8]. **Moradi, R., Shahbazi, S., Ahari Mostafavi, H. 1390**. Determination of appropriate dose of irradiation for favorable induced mutation and investigation morphological effects on Trichoderma fungi. The 1nd National Conference on Modern Agricultural Sciences & Technologies (MAST). Zanjan University. P:29.

[9]. **Shahbazi, S. Askari, H. Safaei, M. Cheraghi, M .M. 2012.**Investigation of potential of cellulase and glucanase enzymes using agricultural of lignocellulosic waste. 2nd international conference & Exhibition of Waste Management Recycling, Biomass : 37.

[10]. **Shoemaker SP, Brown RD Jr. 1978**. Enzymatic activities of endo-1,4-h-D-glucanases purified from Trichoderma viride. Biochim Biophys Acta, 523:133– 146.

[11]. **Zhang Y-HP, Lynd LR. 2004.** toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. Biotechnol Bioeng, 88:797–824.