



## مجموعه مقالات

چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی  
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹۴، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای)

The 4<sup>th</sup> National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

### بررسی تاثیر آنزیم های سلولاز جدایه های موتانت قارچ *Trichomerma viride* و *Trichomerma harzianum* بر زیست تخریب پذیری سلولز I $\alpha$ ، I $\beta$ و III

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

۱- گروه گیاهپزشکی و نگهداری مواد غذایی، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی

۲- گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

نویسنده مسوول: sshahbazi@nrcam.org

**چکیده:** دو گونه از قارچ تریکودرما (*T. viride* و *T. harzianum*) و موتانت های آنها برای تولید آنزیم سلولاز مورد استفاده قرار گرفتند. آویسل، کربوکسی متیل سلولز، کاغذ صافی واتمن #۱ و سلولز باکتریایی برای سنجش فعالیت آنزیم سلولاز استفاده شد. کربوکسی متیل سلولز (CMC)، سلولز (III) و سلولز باکتریایی (BC، سلولز I $\alpha$ ) به ترتیب از اصلاح شیمیایی آویسل و تخمیر ساکارز بوسیله باکتری *G. xylinus* تولید شدند. خصوصیات ساختار شیمیایی آنها با استفاده از FT-IR، XRD و SEM در مقایسه با آویسل بررسی شد. وزن مولکولی آنزیم های سلولاز تولیدی با استفاده از آزمون SDS-PAGE تعیین شد. تصاویر SEM از سوبستراها نشان داد که سلولز باکتریایی ساختار فیبری ظریفتری در مقایسه با آویسل و کربوکسی متیل سلولز دارد. نسبت ضخامت فیبر سلولز باکتریایی در مقایسه با آویسل تقریباً ۱ به ۳۰ یا کمتر بود. ارزیابی های اسپکتروسکوپی FT-IR و XRD نشان داد که CMC حاوی گروه های کربوکسیلیک بر روی ساختار خود می باشد و کریستالیزاسیون آن ۸۴/۸۱٪ می باشد. کریستالیزاسیون آویسل و سلولز باکتریایی نشان داد که شاخص کریستالیزاسیون آویسل (۸۹/۱۵٪) بیشتر از سلولز باکتریایی (۶۶/۴۴٪) می باشد. هر دو گونه و موتانت های آنها مقادیر مختلفی از پروتئین خارج سلولی را در محیط تخمیر تولید می کنند. در جدایه های *T. harzianum* بالاترین میزان فعالیت آنزیم سلولاز به ترتیب در جدایه های موتانت Th M6 و Th M7 و در جدایه های *T. viride* بالاترین فعالیت آنزیمی به ترتیب در جدایه های موتانت Tv M14، Tv M15 مشاهده گردید. اندازه گیری فعالیت آنزیمی با استفاده از سلولز باکتریایی مقادیر بالاتری از فعالیت را در مقایسه با سوبستراهای آویسل و کاغذ صافی نشان داد که این امر نشانه قابلیت دسترسی بالای سلولز I $\alpha$  برای زیست تخریب پذیری در مقایسه با سلولز I $\beta$  می باشد.

**واژگان کلیدی:** کریستالیزاسیون، آویسل، سلولز باکتریایی، آنزیم سلولاز، موتانت، تریکودرما

### Investigating the influence of cellulase enzymes from mutated isolates of *Trichomerma harzianum* and *Trichomerma viride* on biodegradability of cellulose I $\alpha$ , I $\beta$ and III

Askari, H.<sup>1</sup>, Shahbazi\*<sup>1</sup>, S., Bagheri<sup>2</sup>, Kh., Amirlou<sup>2</sup>, F.

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

**Abstract:** Two strain of *Trichoderma* (*T. harzianum* and *T. virid*) and their mutants were used for cellulase enzyme production. The Avicel, CMC, BC and Whatman NO.1 filter paper, were used to cellulase activity assay. The carboxy methyl cellulose (cellulose III, CMC) and bacterial cellulose (cellulose I $\alpha$ , BC) were produced by chemical modification of Avicel (cellulose I $\beta$ ) and fermentation of sucrose by *G. xylinus*, respectively. Their chemical structural properties were investigated by FT-IR, XRD and SEM in compare with Avicel. The molecular weight of cellulase enzymes were studied using SDS-PAGE. The SEM image of substrates, showed more delicacy of BC fibers relative to Avicel and CMC. The diameter ratio of BC to Avicel is approximately 1/30 or less. The FTIR spectroscopy and XRD assessments designated that the produced CMC is carrying a carboxylic group and its crystallinity is 81.84. The crystallinity of the Avicel and BC were demonstrated that the crystallinity index of Avicel (89.15%) was more than that of bacterial cellulose



## مجموعه مقالات

چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی  
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹۴، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای)

The 4<sup>th</sup> National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

(66.44%). Both species and their mutants varying amounts of extracellular proteins produced in the fermentation medium. In *T. harzianum* and its mutants, the highest cellulase enzyme activity, respectively were showed in Th M7 and Th M6 and in *T. viride* and its mutants, the highest enzymatic activity of mutant strains, respectively was observed in Tv M14, Tv M15. The results showed that bacterial cellulose is a good substrate for total cellulase activity assay, because it has the highest enzyme activity in compare of filter paper and avicel. That signs accessibility of cellulose Ia for biodegradable in compared with cellulose I $\beta$ .

**Keyword: crystallinity, Avicel, Bactrial cellulose, Cellulase enzyme, mutant, Trichoderma**

### مقدمه

سلولز ساختار بنیادی اصلی در دیواره سلولی گیاهان و جلبک ها می باشد و همچنین به عنوان جزء اصلی دیواره سلولی قارچ ها نیز محسوب می شود (Canon & Anderson, 1991). بطور کلی برای سلولز چهار ساختار مختلف بیان شده است که دارای خصوصیات متفاوتی هستند. سلولز I که شامل زنجیره های گلوکان با پیوندهای  $\beta$  (۴،۱) است که بصورت موازی در کنار یکدیگر قرار گرفته اند. این نوع ساختار عموماً در طبیعت یافت می شود. این نوع سلولز همچنین توسط باکتری *Gluconobacter xylinus* تولید می شود. در حالت غیر خشک سلولز I می تواند به عنوان سلولز "Native" مطرح شود (Ross et al., 1991). سلولز II شامل زنجیره های غیر موازی گلوکان با پیوند های  $\beta$  (۴،۱) است که توسط *G. xylinus* در حالت همزدن محیط کشت یا بعد از کریستالیزاسیون مجدد یا تیمار شیمیایی سلولز I ایجاد می شود (Ross et al., 1991). سلولز III در دیواره سلولی گیاهان عالی یافت می شود و می تواند از تیمار شیمیایی سلولز II نیز تولید شود (Haigler & Weimer, 1991). سلولز Ia بطور برجسته توسط باکتری ها و آلگ ها تولید می گردد، درحالیکه سلولز I $\beta$  از گیاهان مشتق می شود. با این حال همه سلولز ها شامل مقادیری از هر دو آلومورف می باشند (Sugiyama et al., 1991). سلولزها (مخلوطی از سیستم های آنزیمی پیچیده) بطور تجمعی برای هیدرولیز سلولز در ضایعات کشاورزی عمل می کنند و تولید واحد های ساده گلوکز را می نمایند. سلولزها توسط قارچ های سلولولیتیک از قبیل *Chaetomium*, *Fusarium*, *Myrothecium* و گونه های قارچ *Trichoderma* تولید می گردند. گونه های دیگر شامل *Penicillium* (Justin, 1989) و گونه های *Aspergillus* نیز قادر به تولید سلولاز می باشند. گونه های قارچ تریکودرما حداقل دو اگزوگلوکاناز (سلوبیوهیدرولاز) شامل Cel 6A (CBH III) 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, Cel 61A و EG 17)، همچنن دو  $\beta$ -گلوکوزیداز شامل Cel 1A (BGL II) و Cel 3A (BGL I) برای تجزیه سلولز تولید می کنند (Grishutin, 2004; Foreman et al., 2003). در طول یک فرایند هیدرولیز آنزیمی هر سه دسته از آنزیم ها (سلوبیوهیدرولازها، اندوگلوکانازها و بتا-گلوکوزیدازها) برای شکستن سلولز عمل می کنند (Lynd et al., 2002) و در ابتدای فرایند به سرعت گلوکز آزاد می شود. اگر تنها یکی از دسته های آنزیم برای هیدرولیز استفاده شود، فرایند هیدرولیز می تواند مختل شود. عملکرد با یکدیگر (که اغلب به عنوان سینرژی مطرح می شود) هر سه دسته آنزیم های سلولولیتیک برای یک فرایند هیدرولیز آنزیمی موثر ضروری می باشد. در این پژوهش از سلولز کلونیدی در محیط تخمیر استفاده گردیده و با استفاده از با استفاده از گونه های مختلف قارچ تریکودرما (*T. harzianum* و *T. viride*) و موتانت های آنها، آنزیم سلولاز تولید گردید. برای اندازه گیری فعالیت آنزیمی از سوبستراهای مختلف شامل سلولز باکتریایی (BC)، به عنوان سلولز Ia، آویسل (A)، به عنوان سلولز I $\beta$  و کربوکسی متیل سلولز (CMC)، به عنوان سلولز III و کاغذ صافی واتمن شماره ۱ (FP) استفاده شد. اختلاف در ساختار و ترکیبات شیمیایی و جزء کریستالی سلولز در مواد سلولزی نشان داده است که بر پتانسیل مواد برای هیدرولیز تاثیر می گذارد (Teeri & Koivula, 1997) و



## مجموعه مقالات

چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی  
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹۴، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای)

The 4<sup>th</sup> National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

مقایسه مستقیم بین مواد سلولزی انتخاب شده برای اندازه گیری فعالیت آنزیمی مسیر خوبی را برای مطالعه سینرژی فراهم می آورد.

### مواد و روش ها

#### تولید سلولز کلونیدی

سلولز کلونیدی به عنوان منبع کربن برای تولید آنزیم های سلولاز و سنجش فعالیت آنزیم سلولاز مورد استفاده قرار می گیرد. سلولز کلونیدی بوسیله پیش تیمار کیتین سلولز خالص (آویسل) در اسید ارتوفسفریک ۸۵٪ (w/v) برای مدت ۲۴ ساعت در ۴ °C انجام گرفت تا خاصیت کلونیدی در سلولز افزایش پیدا کند به نحوی که به آسانی توسط آنزیم مورد استفاده قرار گیرد. بعد از پیش تیمار با اسید، مواد جامد با استفاده از یک فیلتر آب پنیر گیری صاف شد و چندین مرتبه با آب مقطر شستشو گردید تا pH ماده جامد به حدود ۵ برسد. سپس کیتین کلونیدی در دمای ۷۰ °C- برای مدت ۲۴ ساعت منجمد گردید و با استفاده از خشک کن انجمادی برای مدت ۴۸ ساعت خشک گردید و تا اندازه مش ۱۲۵-۵۳ میکرون آسیاب شد.

#### تولید کربوکسی متیل سلولز

از سلولز خالص (آویسل) برای تولید کربوکسی متیل سلولز استفاده گردید. تولید کربوکسی متیل سلولز بر اساس روش Othmer و Kirk (۱۹۶۷) انجام شد. درجه استخلاف (DS) کربوکسی متیل سلولز تولیدی با استفاده از روش استاندارد ASTM (2005) تعیین شد. از کربوکسی متیل سلولز (CMC) جهت تعیین فعالیت آنزیم کربوکسی متیل سلولاز (CMCase) استفاده گردید.

#### تولید سلولز باکتریایی

به منظور بررسی نحوه عملکرد آنزیم سلولاز بر روی سلولز باکتریایی از باکتری *Gluconobacter xylinus* برای تولید سلولز باکتریایی استفاده گردید و برای سنجش فعالیت آنزیم سلولاز مورد استفاده قرار گرفت. باکتری *G. xylinus* از مرکز کلکسیون قارچ و باکتری سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران به شماره PTCC 1734 تهیه گردید. سلولز باکتریایی مطابق روش موسوی نسب و همکاران (۲۰۱۰) تولید و خالص سازی شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۷۰ °C- منجمد گردید و با استفاده از خشک کن انجمادی برای مدت ۴۸ ساعت خشک گردید و تا اندازه مش ۱۲۵-۵۳ میکرون آسیاب شد (Shahbazi et al., 2014).



## مجموعه مقالات

چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی  
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹۴، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای)

The 4<sup>th</sup> National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

### طیف سنجی مادون قرمز (FT-IR)، آنالیز XRD و بررسی میکروساختار آویسل، کربوکسی متیل سلولز و سلولز باکتریایی

بررسی طیف سنجی مادون قرمز (FT-IR)، آنالیز XRD و بررسی میکروساختار پودر آویسل، کربوکسی متیل سلولز و سلولز باکتریایی بر اساس روش **Shahbazi** و همکاران (۲۰۱۴) مورد مطالعه قرار گرفتند.

#### تولید آنزیم سلولاز

جدایه های قارچ *T. viride* و *T. harzianum* (موتانت و وحشی - کلکسیون گروه پژوهشی گیاه پزشکی و نگهداری مواد غذایی پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای) بر روی محیط کشت MYG agar حاوی گرم در لیتر ۵ عصاره مالت، گرم در لیتر ۲/۵ عصاره مخمر، ۱۰ گرم در لیتر گلوکز و ۲۰ گرم در لیتر آگار کشت داده شدند و در دمای °C ۲۸ گرمخانه گذاری گردیدند. با استفاده از محلول سیلین از پلیت های هفت روزه حاوی اسپور، سوسپانسیون اسپوری با جمعیت  $10^8-10^7$  spore.ml<sup>-1</sup> با استفاده از لام گلبول شمار (همی سایتومتر) تهیه گردید. تولید آنزیم سلولاز بر اساس روش **Wen** و همکاران (۲۰۰۵) تولید شد.

#### 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** (۱۹۷۶) انجام گرفت. از مایع فوقانی TFM استریل به عنوان نمونه شاهد استفاده گردید. مقدار پروتئین بر حسب میلی گرم در میلی لیتر ( $mg.ml^{-1}$ ) در مایع فوقانی محیط تخمیر TFM محاسبه گردید. فعالیت آنزیم های آویسلاز، کربوکسی متیل سلولاز و سلولاز کل بوسیله اندازه گیری مقدار گلوکز آزاد شده از سوبستراهای آویسل، کربوکسی متیل سلولز، سلولز باکتریایی و کاغذ صافی واتمن ۱ با استفاده از روش **DNS** و گلوکز به عنوان استاندارد اندازه گیری شد (**Nidetzky and Steiner, 1993**).

#### آنالیز آماری

کلیه نتایج آزمایشات با استفاده از آنالیز واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین ها به روش دانکن در سطح آماری  $P < 0/05$  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

بررسی گروه های استخلافی سوبستراها با استفاده از آزمون **FT-IR** و میزان کریستالیزاسیون با استفاده از **XRD**

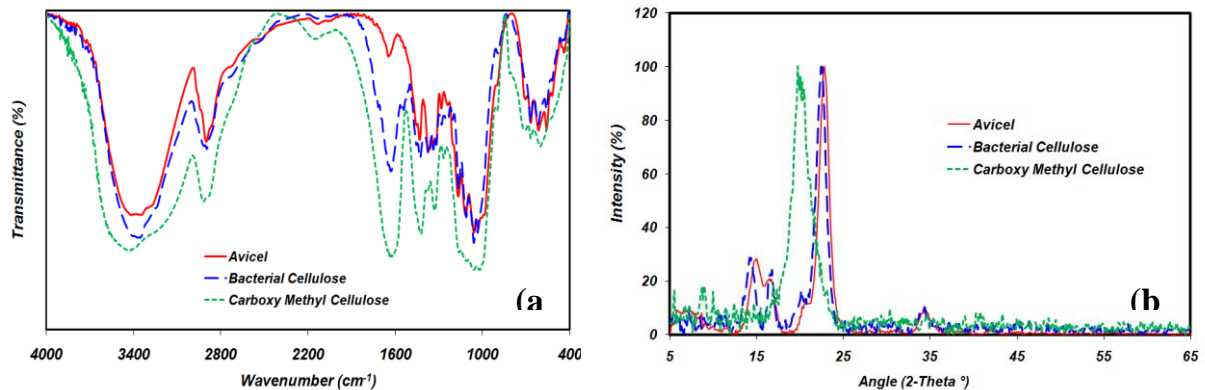
اسپکتروم **FT-IR** آویسل، سلولز باکتریایی و کربوکسی متیل سلولز در شکل ۱-a نشان داده شده است که دلالت بر ساختار کلی کربوهیدرات ها را دارند. باند ظاهر شده در  $1636\text{ cm}^{-1}$  و  $1421\text{ cm}^{-1}$  در کربوکسی متیل سلولز نشان دهنده گروه های استخلافی کربوکسی متیل سلولز است که باعث می شود این کربوهیدرات دارای بار منفی بر روی زنجیره اصلی خود باشد و نشان دهنده تبدیل شیمیایی صحیح آویسل به کربوکسی متیل سلولز می باشد.



## مجموعه مقالات

چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی  
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹۴، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای)

The 4<sup>th</sup> National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

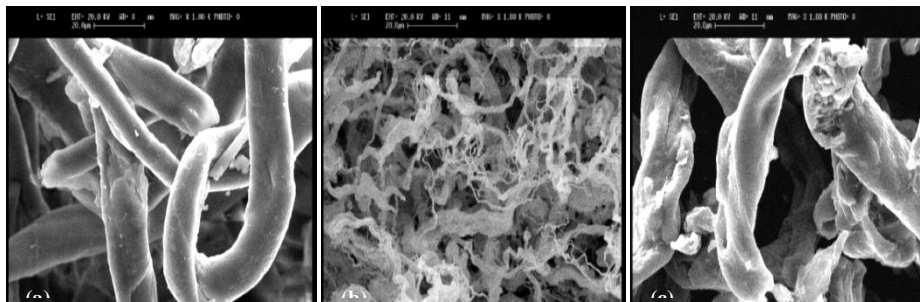


شکل ۱. (a) اسپکتروم FT-IR و (b) الگوی XRD آویسل، سلولز باکتریایی و کربوکسی متیل سلولز

شکل ۱-b الگوی XRD سوبستراهای مورد استفاده در سنجش فعالیت آنزیم سلولاز شامل آویسل، سلولز باکتریایی و کربوکسی متیل سلولز را نشان می‌دهد. میزان کریستالیزاسیون سوبستراهای آویسل، سلولز باکتریایی و کربوکسی متیل سلولز با استفاده از داده‌های آزمون XRD اندازه‌گیری شد و نتایج آن در شکل ۱-b نشان داده شده است. الگوی سلولز باکتریایی سه پیک اصلی در  $14/13^\circ$ ،  $16/60^\circ$  و  $22/57^\circ$  به ترتیب مربوط به بازتاب‌های  $101$ ،  $10\bar{1}$  و  $002$  را نشان داد. پیک‌های اصلی در آویسل در  $14/68^\circ$ ،  $16/15^\circ$  و  $22/71^\circ$  به ترتیب مربوط به بازتاب‌های  $101$ ،  $10\bar{1}$  و  $002$  مشاهده شد. این اطلاعات دلالت بر این دارد که نمونه‌های سلولز باکتریایی و آویسل نوعی از فرم کریستالی سلولز I می‌باشند (Yan et al., 2008). سطح زیر پیک در الگوی XRD میزان کریستالیزاسیون نمونه‌ها را نشان می‌دهد که برای آویسل، سلولز باکتریایی و کربوکسی متیل سلولز این مقادیر به ترتیب  $89/15\%$ ،  $66/44\%$  و  $81/84\%$  می‌باشد. کریستالیزاسیون کمتر CMC نسبت به آویسل باعث می‌شود که این ماده در واکنش‌های شیمیایی واکنش پذیرتر ظاهر شود.

### اسکن میکروسکوپ الکترونی از سوبستراهای اندازه‌گیری فعالیت سلولاز (SEM)

شکل ۲ a، b و c به ترتیب نشان‌دهنده ساختار مورفولوژیکی آویسل، سلولز باکتریایی و کربوکسی متیل سلولز می‌باشد. تصاویر نشان‌دهنده اختلاف مورفولوژیکی در سوبستراهای مختلف می‌باشد.



شکل ۲. تصویر میکروسکوپ الکترونی (a) آویسل، (b) سلولز باکتریایی، (c) کربوکسی متیل سلولز (بزرگنمایی  $\times 1000$ )

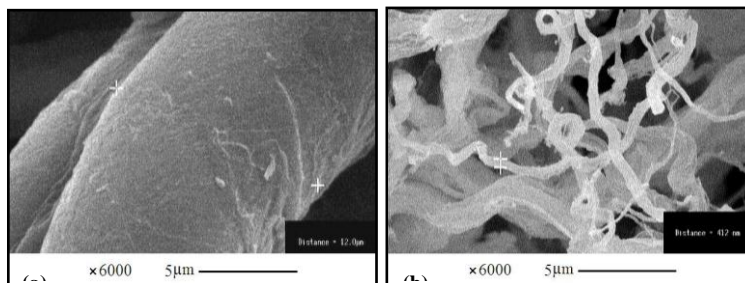


## مجموعه مقالات

چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی  
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹۴، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای)

The 4<sup>th</sup> National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است ضخامت رشته های سلولز باکتریایی نسبت به آویسل ۱ به ۳۰ می باشد ( $12\ \mu\text{m}$  به  $412\ \mu\text{m}$ ) که نشان دهنده ظرافت بیشتر فیبرهای سلولز باکتریایی در برابر آویسل می باشد. این نسبت ممکن است به ۱ به ۱۰۰ نیز در بین فیبرهای دیگر برسد. در شکل ۳ a و b در بزرگنمایی  $6k\times$  سلولز باکتریایی پیچ و تاب بیشتری را در مقایسه با آویسل از خود نشان می دهد، چراکه دارای فیبرهای نازکتری می باشد و این امر باعث می شود که این پلیمر در مقایسه با آویسل توسط قارچ بهتر استفاده شود. ظرافت بیشتر فیبرهای سلولز باکتریایی می تواند بر خصوصیاتش از قبیل ظرفیت جذب آب و همچنین سطح مقطع در تماس با آنزیم تاثیر بگذارد. سلولز باکتریایی قابلیت استفاده توسط قارچ و ظرفیت نگهداری آب تا ۷۰۰ برابر وزن خشک خود را دارد.



شکل ۳. تصاویر میکروسکوپ الکترونی (a) آویسل و (b) سلولز باکتریایی

### تعیین غلظت پروتئین خارج سلولی و فعالیت آنزیم های سلولاز در جدایه های موتانت

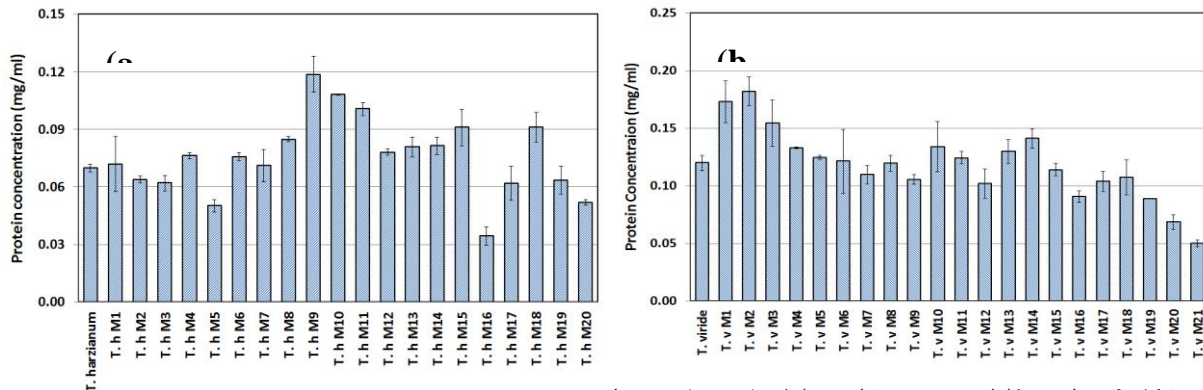
شکل ۴-a غلظت پروتئین خارج سلولی ( $\text{mg/ml}$ ) تولید شده در محیط تخمیر TFM حاوی سلولز کلونیدی به عنوان سوبسترای تخمیر را در قارچ *T. harzianum* نشان می دهد. کلیه نمونه ها در سطح آماری  $0/05$  دارای اختلاف معنی دار آماری بودند و مقایسه میانگین ها به روش دانکن نشان داد که بالاترین غلظت پروتئین تولید شده به ترتیب در نمونه های  $\text{Th M}_{13}$ ،  $\text{Th M}_{14}$ ،  $\text{Th M}_8$ ،  $\text{Th M}_{15}$ ،  $\text{Th M}_{18}$ ،  $\text{Th M}_9$  و  $\text{Th M}_{10}$  بودند و کمترین میزان پروتئین در نمونه  $\text{Th M}_{16}$  مشاهده گردید. شکل ۴-b مقایسه غلظت پروتئین خارج سلولی قارچ *T. viride* و جدایه های موتانت آن را نشان می دهد. کلیه جدایه ها و گونه وحشی آنها در سطح آماری  $0/05$  دارای اختلاف معنی دار آماری بوده و مقایسه میانگین های آنها به روش دانکن نشان داد که بالاترین غلظت پروتئین تولید شده به ترتیب در نمونه های  $\text{Tv M}_2$ ،  $\text{Tv M}_1$ ،  $\text{Tv M}_3$ ،  $\text{Tv M}_{14}$ ،  $\text{Tv M}_{10}$  و  $\text{Tv M}_4$  مشاهده می شود و کمترین میزان پروتئین خارج سلولی در محیط تخمیر قارچ موتانت  $\text{Tv M}_{21}$  می باشد. میزان تغییرات پروتئین از مقدار  $0/050$  الی  $0/182\ \text{mg/ml}$  متغیر بود و برخی از جدایه های موتانت مقادیر کمتری از پروتئین خارج سلولی را در مقایسه با گونه وحشی قارچ *T. viride* تولید می کردند.



## مجموعه مقالات

چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی  
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹۴، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای)

The 4<sup>th</sup> National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)



شکل ۴. مقایسه غلظت پروتئین خارج سلولی (mg/ml) در جدایه های مودت و وحشی قارچ و *T. harzianum* (a) و *T. viride* (b) در مایع فوقانی محیط تخمیر TFM حاوی سلولز کلونیدی.

اندازه گیری فعالیت های آنزیمی جدایه وحشی (قارچ *T. harzianum* و *T. viride*) و جدایه های موتانت آن با استفاده از سوبسترای آویسل، کربوکسی متیل سلولز، سلولز باکتریایی، کاغذ صافی واتمن #۱، اندازه گیری شد که به ترتیب بیانگر فعالیت آنزیم های آویسلز و CMCCase، باکتریال سلولاز، FPase بودند. اندازه گیری فعالیت آنزیم های اگزوگلوکانازی با استفاده از سوبسترای کریستالی نظیر سلولز و آویسل انجام می شود. شکل ۵ مقایسه میانگین فعالیت آنزیم اگزوگلوکاناز (U/ml) قارچ وحشی *T. harzianum* و *T. viride* و جدایه های موتانت آن را در مایع فوقانی محیط تخمیر TFM را نشان می دهد. کلیه نمونه ها در سطح آماری ۰/۰۵ دارای اختلاف معنی دار آماری بودند. بالاترین فعالیت آنزیم اگزوگلوکاناز در جدایه های موتانت Th M8، Th M10، Th M18 و Th M9 مشاهده گردید. میزان تغییرات فعالیت اگزوگلوکاناز از ۲/۵۰ الی ۵/۲۷ متغیر بود. پایین ترین میزان فعالیت آنزیمی در جدایه موتانت Th M14 مشاهده گردید. همچنین بالاترین میزان فعالیت اگزوگلوکانازی در بین قارچ وحشی *T. viride* و جدایه های موتانت آن تنها در جدایه موتانت قارچ Tv M18 مشاهده گردید. میزان تغییرات فعالیت اگزوگلوکانازی از ۱/۶۶ الی ۵/۵۶ U/ml متغیر است. پایین ترین میزان فعالیت اگزوگلوکانازی در جدایه موتانت TV M9 مشاهده گردید. شکل ۵ مقایسه میانگین فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز (CMCase) را در مایع فوقانی محیط تخمیر TFM قارچ وحشی *T. harzianum* و *T. viride* و جدایه های موتانت آن را نشان می دهد. کلیه نمونه ها در سطح آماری ۰/۰۵ دارای اختلاف معنی دار آماری بودند. بالاترین فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز (CMCase) به ترتیب در جدایه های موتانت Th M7 و Th M9، Th M10 مشاهده گردید. میزان فعالیت آنزیمی از مقدار ۲/۷۷ الی ۵/۵۸ U/ml متغیر بود. پایین ترین میزان فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز در جدایه موتانت Th M16 مشاهده گردید. همچنین بالاترین فعالیت آنزیم آنزیم اندوگلوکاناز (CMCase) (U/ml) به ترتیب در جدایه های موتانت Tv M16، Tv M14، Tv M15، Tv M18 و Tv M17 مشاهده گردید که مقادیر بالاتری از فعالیت آنزیمی قارچ وحشی را از خود نشان می دادند. فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز (CMCase) در قارچ *T. viride* و جدایه های موتانت آن از ۳/۳۴ الی ۶/۱۰ U/ml متغیر بود. کمترین فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز (CMCase) در جدایه موتانت Tv M6 مشاهده گردید. سیستم سلولازی کامل شامل اندوگلوکانازها، اگزوگلوکانازها و بتاگلوکوزیدازهاست. به منظور تعیین فعالیت سلولاز کل از سوبسترای ناهمگن کاغذ صافی واتمن شماره ۱ یک که در ساختار خود شامل هر دو بخش کریستالی و آمورف است، استفاده شد و فعالیت آنزیمی

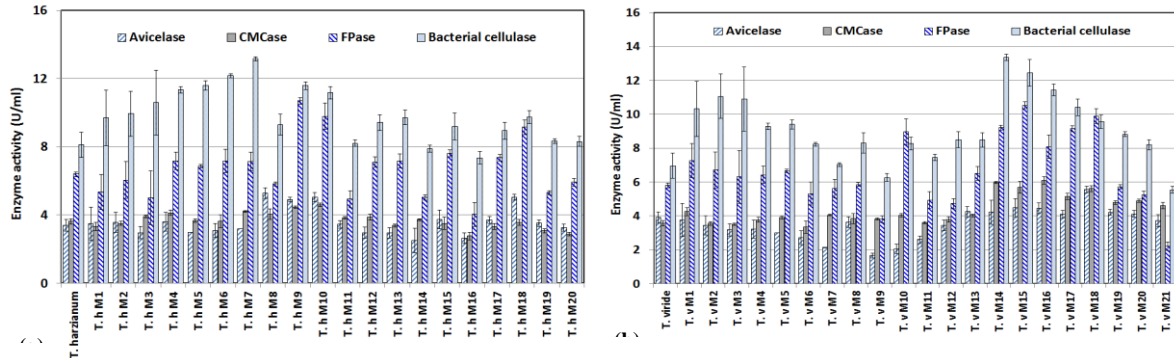


## مجموعه مقالات

چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی  
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹۴، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای)

The 4<sup>th</sup> National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

شکل ۵ مقایسه میانگین فعالیت آنزیم سلولاز کل (FPase) را در مایع فوقانی محیط تخمیر TFM در قارچ وحشی *T. viride* و جدایه های موتانت آنها را نشان می دهد. کلیه نمونه ها در سطح آماری ۰/۰۵ دارای اختلاف معنی دار آماری بودند.



شکل ۵. مقایسه میانگین فعالیت آنزیمی (U/ml) جدایه های موتانت و وحشی قارچ (a) *T. viride* و (b) *T. viride* با استفاده از سوبسترای آویسل، کربوکسی متیل سلولز (CMC)، کاغذ صافی واتمن #۱ و سلولز باکتریایی جهت سنجش فعالیت آنزیم خارج سلولی تولید شده در مایع فوقانی محیط تخمیر TFM حاوی سلولز کلوئیدی.

بالاترین فعالیت آنزیم سلولاز کل (U/ml) به ترتیب در جدایه های موتانت Th M9، Th M10 و Th M18 مشاهده گردید که مقادیر بالاتری از فعالیت آنزیمی قارچ وحشی را از خود نشان می دادند. فعالیت آنزیم سلولاز کل در قارچ *T. harzianum* و جدایه های موتانت آن از ۴/۰۳ الی ۱۰/۷۰ U/ml متغیر بود. کمترین فعالیت آنزیم FPase در جدایه موتانت Th M16 مشاهده گردید. بالاترین میزان فعالیت آنزیم سلولاز کل به ترتیب در جدایه های موتانت Tv M8، Tv M14، Tv M17 و Tv M10 مشاهده گردید. میزان فعالیت آنزیم FPase در بین جدایه های مختلف از ۲/۲۱ الی ۱۰/۵۳ U/ml متغیر بود. کمترین میزان فعالیت آنزیم سلولاز کل در جدایه موتانت Tv M21 مشاهده گردید. شکل ۵ نتایج مقایسه میانگین فعالیت آنزیم سلولاز بر سوبسترای سلولز باکتریایی را در قارچ وحشی *T. harzianum* و *T. viride* و جدایه های موتانت آن را در مایع فوقانی محیط تخمیر TFM حاوی سلولز کلوئیدی نشان می دهد. کلیه نتایج در سطح آماری ۰/۰۵ دارای اختلاف معنی دار آماری بودند. بالاترین میزان فعالیت آنزیم سلولاز به ترتیب در جدایه های موتانت Th M6 و Th M7 مشاهده گردید. یزان تغییرات فعالیت آنزیم سلولاز از ۷/۳۵ الی ۱۳/۱۷ متغیر بود. میزان تغییرات فعالیت آنزیمی از ۵/۵۳ الی ۱۳/۳۷ U/ml متغیر بود. بالاترین فعالیت آنزیمی به ترتیب در جدایه های موتانت Tv M14، Tv M15، Tv M16، Tv M2 و Tv M3 مشاهده گردید. پایین ترین فعالیت آنزیم سلولاز با استفاده از سوبسترای سلولز باکتریایی در جدایه موتانت Tv M21 مشاهده گردید. اندازه گیری فعالیت آنزیمی با استفاده از سلولز باکتریایی مقادیر بالاتری از فعالیت را در مقایسه با سوبستراهای دیگر نشان داد که این امر نشانه قابلیت دسترسی بالای آن برای آنزیم ها می باشد.

### بحث

کریستالیزاسیون سلولز نقش مهمی در هیدرولیز آنزیمی بازی می کند. تصور کلی بر این است که ساختار سلولز به دو ناحیه تقسیم می شود، یکی ناحیه آمورف است که به آسانی توسط آنزیم هیدرولیز می شود و یکی دیگر ناحیه کریستالی





## مجموعه مقالات

چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی  
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹۴، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای)

The 4<sup>th</sup> National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

است که به سختی توسط آنزیم هیدرولیز می‌گردد. این موضوع فراهم آورنده فهم مناسبی از سینتیک های مشاهده شده برای هیدرولیز سلولز است که زمانیکه آنزیم ها به سرعت هیدرولیز را انجام دهند آن ترکیب بیشتر دارای ناحیه آمورف است و اگر هیدرولیز به سختی صورت بگیرد آن ماده بیشتر دارای نواحی کریستالی می باشد. بر اساس نتایج الگوی XRD، بالاترین میزان کریستالیزاسیون به ترتیب مربوط به آویسل، کربوکسی متیل سلولز و سلولز باکتریایی بود. آویسل تجاری (که همچنین سلولز میکروکریستال یا هیدروسلولز نیز نامیده می شود) برای اندازه گیری فعالیت اگزوگلوکاناز استفاده شد، چراکه دارای درجه پایینی از پلیمریزاسیون سلولز بوده، میزان کریستالیزاسیون بالا و نسبتاً برای حمله اندوگلوکانازها با وجود برخی از نواحی آمورف غیر قابل دسترس می باشد. آنزیم هایی که فعالیت نسبتاً بالایی را بر روی آویسل نشان می دهند و دارای فعالیت کمی بر روی CMC هستند، به عنوان اگزو گلوکاناز تعریف می شوند (Maki et al., 2009). سلوبیوهیدرولازها (اگزو گلوکانازها) بر پایه عملکردهای خارجی اشان دسته بندی می شوند که آنها همگی باندهای گلیکوزیدی  $\beta$  (۴۰۱) از انتهای زنجیره می شکنند و تولید سلوبیوز و برخی مولکول های گلوکز می کنند. کربوکسی متیل سلولز که مشتقی یونی از سلولز است (CMC)، به عنوان سوپسترای محلول در آب، اغلب برای تعیین فعالیت اندوگلوکاناز که CMCCase نامیده می شود، استفاده می گردد، چراکه اندوگلوکانازها باند های گلیکوزیدی  $\beta$  (۴۰۱) داخل مولکولی را بصورت تصادفی می شکنند (Karlsson et al., 2001). نتایج FT-IR نشان داد که کربوکسی متیل سلولز دارای گروه های کربوکسی می باشد که باعث ایجاد بار منفی بر روی زنجیره پلیمر می گردد. این امر باعث می شود پلیمر در محلول های آبی به علت دافعه الکترواستاتیک در زنجیره های مولکول بیشتر به شکل آمورف و محلول باشد و درصد کمتری از ساختار بصورت کریستالی وجود داشته باشد که این امر این پلیمر را برای اندازه گیری فعالیت اندوگلوکانازها مناسب می سازد. سلولاز کل شامل فعالیت آنزیم های اندوگلوکاناز، اگزوگلوکاناز و  $\beta$ -گلوکوزیداز می باشد که بصورت سینرژیستی باعث هیدرولیز سلولز کریستالی می شوند. هیدرولیز کارآمد سلولز کریستالی بوسیله سلولاز نیازمند به عملکرد سینرژیستی اندوگلوکانازها و سلوبیوهیدرولازها می باشد که توسط Teeri و Koivula (۱۹۹۵) مرور شده است. برای تعیین فعالیت سلولیتیک مخلوط های سلولازی یا عملکردهای سینرژیستی کمپلکس های آنها، سوپسترهای هتروژن از قبیل کاغذ صافی و سلولز باکتریایی می توانند استفاده گردند. نتایج نشان داد که سلولز باکتریایی سوپسترای خوبی برای تعیین فعالیت سلولاز کل می باشد. چراکه بالاترین فعالیت آنزیمی در مقایسه با کاغذ صافی و آویسل را از خود نشان داد. هتروژن بودن سلولز نامحلول و پیچیدگی سیستم های سلولازی سبب مشکلات دشواری در اندازه گیری فعالیت سلولاز کل می شود. درجه سینرژی بین اندوگلوکانازها و اگزوگلوکانازها تحت تاثیر خصوصیات سوپستر، شرایط آزمایش، مقدار آنزیم و نسبت ترکیبات می باشد (Zhang & Lynd, 2006). بالا بودن مقادیر فعالیت BCase نشان داد که سلولز باکتریایی پتانسیل خوبی برای هیدرولیز و تولید آنزیم بوسیله گونه های قارچ تریکودرما را دارا می باشد چراکه دارای خصوصیات مکانیکی قابل توجه در هر دو حالت مرطوب و خشک، تخلخل، جذب آب، قابلیت تجزیه توسط قارچ ها، ضخامت کمتر رشته های مولکول، سطح مقطع بالاتر، تجزیه پذیری و تمایل بیولوژیکی عالی می باشد.

### منابع

- [1]. AA. Klyosov, Cellulases of the third generation. In: J-P, Aubert, P. Beguin, J. Millet, editors. Biochemistry and genetics of cellulose degradation. London: Academic Press (1988) pp 87-99.



## مجموعه مقالات

چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی  
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹۴، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای)

The 4<sup>th</sup> National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

- [2]. AA. Klyosov, Trends in biochemistry and enzymology of cellulose degradation. *Biochemistry* 29(1990) 10577–10585.
- [3]. ASTM, Analytical method for determining Degree of substitution in the Product, Document CK-G06 Edition, 05 (2005) D-1439-03.
- [4]. B. Henrissat, H. Driguez, C. Viet, M. Shulein, Synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose. *Bio/Technol* 3 (1985) 722– 726.
- [5]. B. Nidetzky, M. Claeysens, Specific quantification of *Trichoderma reesei* cellulases in reconstituted mixtures and its application to cellulase-cellulose binding studies. *Biotechnol Bioeng* 44 (1994) 961–966.
- [6]. B. Nidetzky, W. Steiner, A new approach for modeling cellulase-cellulose adsorption and the kinetics of the enzymatic hydrolysis of microcrystalline cellulose. *Biotechnol Bioeng*, 42 (1993) 469– 479.
- [7]. C. H. Haigler, P. J. Weimer, *Biosynthesis and biodegradation of cellulose*, Marcel Dekker, New York (1991).
- [8]. cellulase enzyme activities in biomass conversion; Part1: comparison of cellulose  $\alpha$ ,  $\beta$  and III. *Intl J Agri Crop Sci. Vol.*, 7 (8) (2014) 442-453.
- [9]. H. van Tilbeurgh, G. Pettersson, R. Bhikabhai, H. De Boeck, M. Claeysens, Studies of the cellulolytic system of *Trichoderma reesei* QM 9414. Reaction specificity and thermodynamics of interactions of small substrates and ligands with the 1, 4-beta-glucan cellobiohydrolase II. *Eur J Biochem* 148 (1985) 329–334.
- [10]. H. van Tilbeurgh, M. Claeysens, CK. de Bruyne, The use of 4-methylumbelliferyl and other chromophoric glycosides in the study of cellulolytic enzymes. *FEBS Lett.* 149 (1982) 152–156.
- [11]. J. Karlsson, M. Saloheimo, M. Siika-aho, M. Tenkanen, M. Penttilä, F. Tjerneld, Homologous expression and characterization of Cel61A (EG IV) of *Trichoderma reesei*. *Eur J Biochem.* 268 (2001) 6498-6507.
- [12]. J. Ståhlberg, Functional organization of cellulases from *Trichoderma reesei*. In Doctoral thesis. *Acta Universitatis Upsaliensis*.
- [13]. J. Sugiyama, R. Vuong, H. Chanzy, Electron diffraction study of two crystalline phases occurring in native cellulose from an algal cell wall macromolecules. *Macromolecules* 24 (1991) 4168-4175.
- [14]. L.R. Lynd, P.J. Weimer, W.H. Van Zyl, I.S. Pretorius, Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 66 (2002) 506-577.
- [15]. L.T. Fan, Y-H. Lee, D.R. Beardmore, The influence of major structural features of cellulose on rate of enzymatic hydrolysis. *Biotechnol Bioeng* 23 (1981) 419– 424.
- [16]. M. Srisodsuk, K. Kleman-Leyer, S. Keranen, T.K. Kirk, T.T. Teeri, Modes of action on cotton and bacterial cellulose of a homologous endoglucanase-exoglucanase pair from *Trichoderma reesei*. *Eur J BioChem* 251 (1998) 885– 892.
- [17]. MM., Bradford. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72 (1976) 248-258.
- [18]. P. Ross, R. Mayer, M. Benziman, Cellulose Biosynthesis and Function in Bacteria, *Microbiol. Rev.* 55 (1991) 35-58.



## مجموعه مقالات

چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی  
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹۴، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای)

The 4<sup>th</sup> National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

- [19]. P. Valjamae, V. Sild, G. Pettersson, G. Johansson, The initial kinetics of hydrolysis by cellobiohydrolases I and II is consistent with a cellulose surface - erosion model. *Eur J Biochem* 253 (1998) 469 – 475.
- [20]. P.K. Foreman, D. Brown, L. Dankmeyer, R. Dean, S. Diener, N.S. DunnColeman, F. Goedegebuur, T.D. Houfek, G.J. England, A.S. Kelly, H.J. Meerman, T. Mitchell, C. Mitchinson, H.A. Olivares, P.J.M. Teunissen, J. Yao, M. Ward, Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 31988–31997.
- [21]. Palma R.; Zuccato P.; Himmel M. E.; Liang G.; Brady J. W. Molecular Mechanics Studies of Cellulases. In *Glycosyl Hydrolases for Biomass Conversion*; Himmel, M. E.; Baker, J. O.; Saddler, J. N., eds. *Glycosyl Hydrolases for Biomass Conversion*. ACS Symposium Series No. 769. Washington, DC: American Chemical Society (2000) pp. 112-130; NREL Report No. CH-580-29519.
- [22]. R. E. Kirk, D. F. Othmer, *Cellulose* (2nd ed.). *Encyclopedia of chemical technology* (Vol. 4). New York: Wiley (1967) pp: 593–683.
- [23]. S., Shahbazi. H., Askari. T., Naseripour. M., Moosavi-Nasab. M., Bakhtiyari. The synergistic interactions of *Trichoderma* spp.
- [24]. S.G. Grishutin, A.V. Gusakov, A.V. Markov, B.B. Ustinov, M. Semenova, A.P. Sinityn, Specific xyloglucanases as a new class of polysaccharide-degrading enzymes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1674 (2004) 268–281.
- [25]. S.P. Shoemaker, Jr. R.D. Brown, Enzymatic activities of endo-1,4-h-D-glucanases purified from *Trichoderma viride*. *Biochim Biophys Acta*, 523 (1978) 133– 146.
- [26]. T. Reinikainen, The cellulose-binding domain of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei* VTT publications 206 (1994) ISBN 951-38-4644-x
- [27]. T. Teeri, A. Koivula, Cellulose degradation by native and engineered fungal cellulases. *Carbohydr. Eur.* 12 (1995) 28–33.
- [28]. T.M. Wood, K.M. Bhat, Methods for measuring cellulase activities. *Methods Enzymol* 160 (1988) 87– 117.
- [29]. Y-HP. Zhang, L.R. Lynd, Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnol Bioeng*, 88 (2004)797–824.
- [30]. Z. Yan, S. Chen, H. Wang, B. Wang, C. Wang, J. Jiang, Cellulose synthesized by *Acetobacter xylinum* in the presence of multi-walled carbon nanotubes. *Carbohydrate Research* 343(2008) 73-80.
- [31]. Z., Wen, W., Liao, Chen Sh. Production of cellulase by *Trichoderma reesei* from dairy manure. *Bioresour. Technol.* 96(2005): 491-499.