افزایش کارایی فرایند ساکاریفیکاسیون تفاله چغندرقند با استفاده از موتانت برتر قارچ *Trichoderma reesei* برای تولید بیواتانل

Increasing the efficiency of sugar beet pulp saccharification by *Trichoderma reesei* superior mutants for bioethanol production

سمیرا شهبازی[1*]، حامد عسکری[2]، محمدعلی ابراهیمی[3]، مهسا کریمی[4] و ماندانا صفایی[4]

تاریخ دریافت: ۹۳/۴/۲۲ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۴/۴/۱۳

س. شهبازی، ح. عسکری، م.ع. ابراهیمی، م. کریمی و م. صفایی. ۱۳۹٤. افزایش کارایی فرایند ساکاریفیکاسیون تفاله چغندرقند با استفاده از موتانت برتر قارچ *Trichoderma reesei* برای تولید بیواتانل. **چغندرقند، ۳۱(۱): ۷٦- ٦۱**

چکیده

تفاله چغندرقند یکی از ضایعات جانبی صنایع تولید قند می‌باشد که به علت دارا بودن درصد بالایی از مواد لیگنوسلولزی می‌تواند یکی از گزینه‌های قابل توجه جهت تولید آنزیم سلولاز، ساکاریفیکاسیون آنزیمی و تولید الکل از آن باشد. قارچ *Trichoderma* spp. یکی از ارگانیسم‌های مهم تولیدکننده دامنه وسیعی از آنزیم‌های تجزیه کننده سلولز در طبیعت است. در این پژوهش از تفاله چغندرقند در محیط تخمیر قارچ تریکودرما استفاده شد و با استفاده از ۲۱ جدایه موتانت پرتو گاما قارچ *T. reesei*، آنزیم سلولاز در شرایط دمایی ۲۸ °C و سرعت همزدن ۱۸۰ rpmبرای مدت ۷۲ ساعت تولید گردید. توانایی تولید آنزیم‌های تجزیه کننده سلولز در کلیه جدایه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. فعالیت آنزیم‌های 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. پروفایل پروتئینی جدایه موتانت *T.r M5* با استفاده از آزمون SDS-PAGE بررسی شد. جدایه فوق دارای باندهای آنزیمی متعددی در وزن‌های مولکولی مختلف بود که مربوط به آنزیم‌های EG IV، Cel 3C، Cel 3D، Cel 3A، Cel 7A، Cel 6A، Cel 5A و Cel 61A بودند. نتایج این تحقیق نشان داد که جدایه موتانت *T. r M5* بالاترین کارایی را بین جدایه‌های موتانت برای ساکاریفیکاسیون تفاله چغندرقند 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 مخمرهای 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.

واژه‌های کلیدی: بیواتانل، ساکاریفیکاسیون، سلولاز ، موتاسیون، *Trichoderma reesei*, *Cluyveromyces marxianus*، *Saccharomyces cerevisiae*

۱ – استادیار گروه گیاهپزشکی، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران- کرج *- نویسنده مسئول
sshahbazi@nrcam.org
۲ – کارشناس ارشد گروه گیاهپزشکی، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران- کرج
۳- دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه پیام نور تهران
۴- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور کرج

مقدمه

سلولز ساختار بنیادی اصلی در دیواره سلولی گیاهان و جلبک‌ها می‌باشد و هم‌چنین به عنوان جزء اصلی دیواره سلولی قارچ‌ها نیز محسوب می‌شود (Cannon and Anderson 1991). سلولز فراوان‌ترین بیوپلیمر در سطح زمین محسوب می‌شود و سالانه ۱۸۰ بیلیون تن از این بیوپلیمر در طبیعت تولید می‌گردد (Zhao 2007). سلولازها (مخلوطی از سیستم‌های آنزیمی پیچیده) به‌طور تجمعی برای هیدرولیز سلولز در ضایعات کشاورزی عمل می‌کنند و تولید واحدهای ساده گلوکز را می‌نمایند. سلولازها توسط قارچ‌های تجزیه کننده سلولز از قبیل *Chaetomium*، *Fusarium*، *Myrothecium* و گونه‌های قارچ *Trichoderma* تولید می‌گردند. گونه‌های دیگر شامل *Penicillium* و گونه‌های *Aspergillus* نیز قادر به تولید سلولاز می‌باشند (Jun *et al.* 2011). گونه‌های 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)، هم‌چنین دو β-گلوکوزیداز شامل Cel 1A (BGL II) و Cel 3A (BGL I) را تولید می‌کنند (Grishutin, 2004; Foreman *et al.* 2003). در طول یک فرایند هیدرولیز آنزیمی هر سه دسته از آنزیم‌ها (سلوبیوهیدرولازها، اندوگلوکانازها و بتا-گلوکوزیدازها) برای شکستن سلولز عمل می‌کنند (Lynd *et al.* 2002). اگر تنها یکی از دسته‌های آنزیم برای هیدرولیز استفاده شود، فرایند هیدرولیز می‌تواند مختل شود. عملکرد با یکدیگر (که اغلب به عنوان سینرژی مطرح می‌شود) هر سه دسته آنزیم‌های سلولالیتیک برای یک فرایند هیدرولیز آنزیمی مؤثر ضروری می‌باشد. سینرژی بین آنزیم‌های سلولالیتیک نشان می‌دهد که درجه هیدرولیز مخلوطی از ترکیبات آنزیمی بیشتر از مجموع درجه هیدرولیز مشاهده شده به وسیله آنزیم‌های منفرد می‌باشد. سینرژیسم بین دسته‌های مختلف آنزیم‌های هیدرولیز کننده سلولز به‌طور وسیعی مطالعه و گزارش شده است (Zhang and Lynd 2004). طی دوره‌ی بهره‌برداری کارخانجات قند علاوه‌بر قند و شکر مقادیر فراوانی ملاس، گل صافی، تفاله (در کارخانجات چغندر) و باگاس (در کارخانجات نیشکری) نیز تولید می‌شود. این مواد اگر چه ضایعات کارخانه‌ای هستند ولی هر کدام به‌عنوان یک سوبسترای مناسب بری تولید موادی مثل آنزیم‌ها، اسیدهای آلی، حلال‌ها، ویتامین‌ها، آنتی‌بیوتیک، اتانول، کاغذ، نئوپان، خوراک دام و... کاربرد دارند. تفاله چغندرقند حاوی مقادیر زیادی الیاف خام است و از پکتین، سلولز و همی‌سلولز به مقادیر تقریباً برابر تشکیل شده است. مقدار لیگنین در تفاله کم بوده و به همین علت تجزیه‌پذیری آن بالاست. تفاله چغندرقند منبع غنی از ترکیبات کربوهیدراتی شامل پکتین (۱۹درصد)، آرابان (۲۱درصد)، سلولز (۲۳ درصد) و دیگر منابع قندی (۱۴درصد) می‌باشد. با توجه به درصد بالای حضور ترکیبات کربوهیدراتی، تجزیه آنزیمی تفاله چغندرقند فراهم آورنده منبع غنی از ترکیبات قندی قابل تخمیر ارزان قیمت جهت تولیدات صنعتی از جمله بیواتانول می‌باشد. امروزه اهمیت سلولاز به‌علت قابلیت استفاده‌ی آن در توسعه تکنولوژی تولید بیواتانول در حال افزایش است. بیشتر مطالعات بر روی آنزیم سلولاز، با استفاده از سیستم‌های سلولولیتیک قارچی انجام گرفته و برای تولید آنزیم‌های سلولازی با اهداف تجاری نیز عمدتاً از قارچ‌ها استفاده شده است. در این میان خصوصاً

قارچ‌های جنس تریکودرما *Trichoderma* spp. به تولید آنزیم‌های سلولازی با فعالیت آنزیمی نسبتاً بالا مشهورند. سلولاز به‌دست آمده از تریکودرما نسبت به مهارکننده‌های شیمیایی مقاوم بوده و شامل همه‌ی ترکیبات موردنیاز برای هیدرولیز سلولز کریستالی می‌باشد. از زمانی که فعالیت سلولولیتیک قارچی گزارش گردید، تلاش‌های زیادی برای اصلاح ژنتیکی جدایه‌های تریکودرما و بهینه‌سازی شرایط کشت با فرض افزایش کارآیی تولید سلولاز و دستیابی به ژنوتیپ‌های جدید با توان تولید بیشتر کمپلکس آنزیمی صورت پذیرفته است. چالش‌های تولید سلولاز شامل فرآیندهای زیستی مناسب، بستر و شرایط محیطی مناسب و ارزان قیمت و القاکننده تر تخمیر می‌باشد که به عنوان سوالات اصلی این طرح پژوهشی به دنبال یافتن راه حل و پاسخ آن‌ها می‌باشیم. بنابراین، در پژوهش حاضر، میزان تولید کمپلکس‌های آنزیم‌های سلولاز توسط جدایه‌های موتانت پرتوتابی شده با اشعه ی گاما در *T. ressei* به‌واسطه استفاده از تفاله چغندرقند به عنوان سوبسترای تخمیر مورد ارزیابی قرار گرفت و بهترین جدایه موتانت برای ساکاریفیکاسیون تفاله چغندرقند معرفی شد. با استفاده از جدایه برتر تفاله چغندر مورد هیدرولیز آنزیمی قرار گرفت و امکان تولید الکل از این سوبسترای هیدرولیز شده با استفاده از دو گونه مخمر (*Saccharomyces cerevisia* و *Cluyveromyces marxianus*) مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه و آماده‌سازی قارچ وحشی و موتانت *T.reesei*

قارچ *T.reesei* به صورت لیوفیلیزه از مرکز کلکسیون قارچ و باکتری سازمان پژوهش‌های 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 °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. پلیت‌های کشت به مدت هفت روز گرمخانه‌گذاری گردید و اسپورهای تولید شده با استفاده از محلول سیلین جمع‌آوری گردید و جمعیت آن در spore/ml 1×10^{6} تنظیم گردید و به منظور اعمال موتاسیون مورد استفاده قرار گرفت. معیار دز جذبی مناسب برای القای موتاسیون غیرکشنده در اسپورها، ظهور تقریباً ۵۰-۴۰ درصد جوانه‌زنی اسپور پس از پرتوتابی می‌باشد. از طرفی میزان دز نباید موجب کاهش سرعت رشد قارچ در مقایسه با تیپ مادری شود (Ahari 2009). نتایج مطالعات قبلی نشان داد که در دز ۲۵۰ Gy ۴۷/۵ درصد از اسپورها جوانه زنی داشته و این دز به عنوان دز مناسب پرتوتابی انتخاب گردید (Moradi *et al.* 2010). عملیات پرتوتابی با استفاده از دستگاه گاماسل با چشمه کبالت ۶۰ – اکتیویته ۲۵۰۰ کوری و نرخ دز ۰/۲۳ گری در ثانیه مستقر در پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای کرج (سازمان انرژی اتمی ایران) انجام پذیرفت. از سوسپانسیون اسپور سریال رقت تهیه گردید و بر روی محیط کشت PDA کشت داده شدند. اسپورهای جوانه زده شده به محیط کشت تازه انتقال داده شد و تعداد ۲۱ جدایه موتانت بر اساس تفاوت‌های مورفولوژیک و آزمون مندل انتخاب شدند و برای سنجش توانایی ساکاریفیکاسیون تفاله چغندرقند مورد استفاده قرار گرفت.

تولید آنزیم سلولاز

جدایه‌های قارچ موتانت و وحشی قارچ *T. reesei* بر روی محیط کشت MYG agar حاوی پنج گرم در لیتر عصاره مالت، ۲/۵ گرم در لیتر عصاره مخمر، ۱۰گرم در لیتر گلوکز و ۲۰ گرم در لیتر آگار کشت داده شدند و در دمای ۲۸ °C

گرمخانه‌گذاری گردیدند. با استفاده از محلول سیلین از پلیت‌های هفت روزه حاوی اسپور، سوسپانسیون اسپوری با جمعیت 10^{7}–10^{8} $spore.ml^{-1}$ با استفاده از لام گلبول شمار (همی‌سایتومتر) تهیه گردید. کشت اولیه سوسپانسیون اسپوری در محیط Trichoderma complete medium (TCM) حاوی یک گرم در لیتر باکتوپپتون، ۰/۳ گرم در لیتر اوره، دو گرم در لیتر KH_2PO_4، ۱/۴ گرم در لیتر $(NH_4)_2SO_4$، ۰/۳ گرم در لیتر $MgSO_4.7H_2O$، ۰/۳ گرم در لیتر $CaCl_2.6H_2O$، ۰/۰۰۵ گرم در لیتر $FeSO_4.7H_2O$، ۰/۰۰۲ گرم در لیتر $MnSO_4$، ۰/۰۰۲ گرم در لیتر $ZnSO_4$ و ۰/۰۰۲ گرم در لیتر $CoSO_4.7H_2O$ و ۲ میلی‌لیتر در لیتر توئین ۸۰ انجام گرفت. pH محیط کشت TCM بر روی ۴/۸ تنظیم گردید و با ۰/۳ درصد (وزن به حجم) گلوکز ترکیب گردید. انجام عمل تخمیر در محیط کشت TCM در ارلن مایر ۲۵۰میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط TCM در دمای ۲۸ سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت و ۱۸۰ rpm انجام گرفت و بعد از مدت زمان فوق اسپورها تبدیل به حالت رویشی میسلیوم گردیدند. با سانتریفوژ در ۴۵۰۰ rpm به‌مدت هفت دقیقه میسلیوم‌ها از محیط TCM جداسازی شدند و جهت القای تولید آنزیم‌های تجزیه کننده سلولز میسلیوم‌های شسته شده با سیلین به ارلن‌مایر ۵۰۰میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط *Trichoderma*fermentation medium (TFM) حاوی ۰/۳ گرم در لیتر اوره، ۲ گرم در لیتر KH_2PO_4، ۱/۴ گرم در لیتر $(NH_4)_2SO_4$، ۰/۳ گرم در لیتر $MgSO_4.7H_2O$، ۰/۳ گرم در لیتر $CaCl_2.6H_2O$، ۰/۰۰۵ گرم در لیتر $FeSO_4.7H_2O$، ۰/۰۰۲ گرم در لیتر $MnSO_4$، ۰/۰۰۲ گرم در لیتر $ZnSO_4$ و ۰/۰۰۲ گرم در لیتر $CoSO_4.7H_2O$ و ۲ میلی‌لیتر توئین ۸۰ انتقال داده شد. این محیط در pH ۴/۸ تنظیم شده بود و حاوی پنج درصد (وزن به حجم) تفاله مرطوب چغندرقند بود. شرایط رشد مشابه شرایط قبل در rpm ۱۸۰ و دمای ۲۸°C به مدت ۷۲ ساعت انجام شد. بعد از مدت زمان فوق میسلیوم‌های قارچ توسط سانتریفیوژ کردن در rpm ۴۵۰۰ به مدت ۷ دقیقه خارج گردید و مایع فوقانی برای اندازه‌گیری پروتئین خارج سلولی و فعالیت آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت (Wen *et al.* 2005).

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

اندازه‌گیری پروتئین در مایع فوقانی محیط TFM با استفاده از روش بردفورد انجام گرفت. مقدار سه میلی‌لیتر از معرف بردفورد در داخل لوله آزمایش ریخته شد و به آن ۱۵۰ میکرولیتر از مایع فوقانی TFM تخمیر شده اضافه شد. ازمایع فوقانی TFM استریل به عنوان نمونه شاهد استفاده گردید. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر قرائت گردید و با استفاده از نمودار استاندارد ترسیم شده با پروتئین خالص Bovine serum albumin (BSA)، مقدار پروتئین بر حسب میلی‌گرم در میلی‌لیتر ($mg.ml^{-1}$) در مایع فوقانی محیط تخمیر TFM محاسبه گردید. فعالیت آنزیم‌های آویسلاز، کربوکسی متیل سلولاز، سلوبیاز و سلولاز کل به‌وسیله اندازه‌گیری مقدار گلوکز آزاد شده از سوبستراهای آویسل، کربوکسی متیل سلولز، سلوبیوز و کاغذ صافی واتمن یک با استفاده از روش DNS و گلوکز به عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد (Nidetzky and Steiner 1993). مخلوط واکنش حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول (وزن به حجم) ۰/۵ درصد از هریک از سوبستراها در بافر ۰/۰۵ مولار سیترات سدیم (pH ۴/۸) و ۰/۵ میلی‌لیتر از مایع فوقانی محیط تخمیر TFM بود. نمونه‌ها به مدت ۶۰ دقیقه در حمام آب گرم ۵۰ °C قرار گرفتند و واکنش آنزیمی با افزودن سه میلی‌لیتر از محلول

دی نیترو سالیسیلیک اسید متوقف شد. نمونه‌ها به‌خوبی مخلوط شدند و سپس برای مدت پنج دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شدند و فوراً خنک گردیدند. بعد از رقیق‌سازی جذب نمونه‌ها با استفاده از اسپکتروفتومتر در ۵۴۰ نانومتر قرائت گردید. هر واحد فعالیت آنزیمی به عنوان مقدار آنزیمی که توانایی آزاد کردن یک میکرومول گلوکز را به ازای هر ساعت دارد، تعریف شد. هم‌چنین برای تعیین فعالیت سلولاز کل از نوارهای ۶×۱ سانتی‌متری کاغذ صافی واتمن شماره یک به عنوان سوبسترا استفاده شد.

الکتروفورز و تعیین وزن مولکولی آنزیم ها

آزمون الکتروفورز با استفاده از روش Laemmli (۱۹۹۷) با استفاده از ژل متراکم کننده چهار درصد و ژل تفکیک کننده ۱۲/۵ درصد انجام شد. برای آماده‌سازی پروتئین، ابتدا مقدار پنج میلی‌لیتر از مایع فوقانی محیط تخمیر TFM با مقدار پنج میلی‌لیتر از استون سرد (°C ۲۰-) مخلوط شد و رسوب پروتئینی آن پس از سانتریفیوژ در rpm ۴۵۰۰ به مدت هفت دقیقه جمع‌آوری شد. بعد از خروج استون از نمونه‌ها، مقدار ۱۰۰ مایکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر به آنها اضافه شد و به خوبی مخلوط گردید. سپس ۱۰۰ مایکرولیتر از بافر نمونه به آن‌ها اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شد و به مقدار ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌ها در هر چاهک تزریق شد. آزمون الکتروفورز در آمپر ثابت ۲۰ میلی‌آمپر انجام شد و ژل الکتروفورز با استفاده از کوماسی بریلیانت گرین R-250 رنگ‌آمیزی گردید و با استفاده از رنگبر حاوی متانول: اسید استیک: آب به نسبت‌های ۸:۱:۱ رنگبری گردید.

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 ریسه‌های 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 ۲۸°C قرارداده شد. بعد از مدت زمان فوق به میزان ۵۰ میلی‌لیتر به محیط کشت فوق، بافر سیترات سدیم ۰/۰۵ مولار اضافه گردید و به مدت یک ساعت در گرمخانه ۵۰°C قرار داده شد. بعد از هیدرولیز تفاله چغندرقند با استفاده از آنزیم‌های تولیدی توسط قارچ تریکودرما، با استفاده از مخمرهای *K. marxianus* و *S. cerevisiae* تلقیح گردید و میزان الکل تولیدی بعد از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۵°C و سرعت همزدن rpm ۱۸۰ با استفاده از الکل‌سنج یا بومه الکل اندازه‌گیری شد.

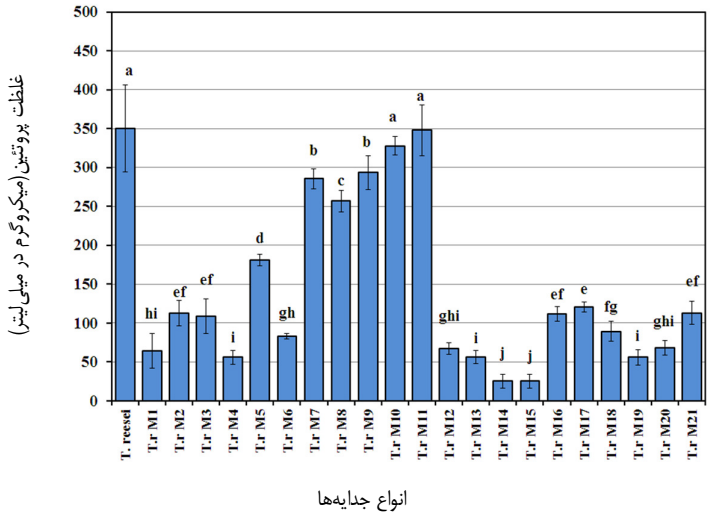
تحلیل آماری

کلیه نتایج آزمایشات با استفاده از آنالیز واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن در سطح آمای $P< ۰/۰۵$ انجام گرفت. تجزیه‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPPS (ویرایش ۱۳) انجام گرفت.

نتایج

تعیین غلظت پروتئین خارج سلولی فعالیت آنزیمی

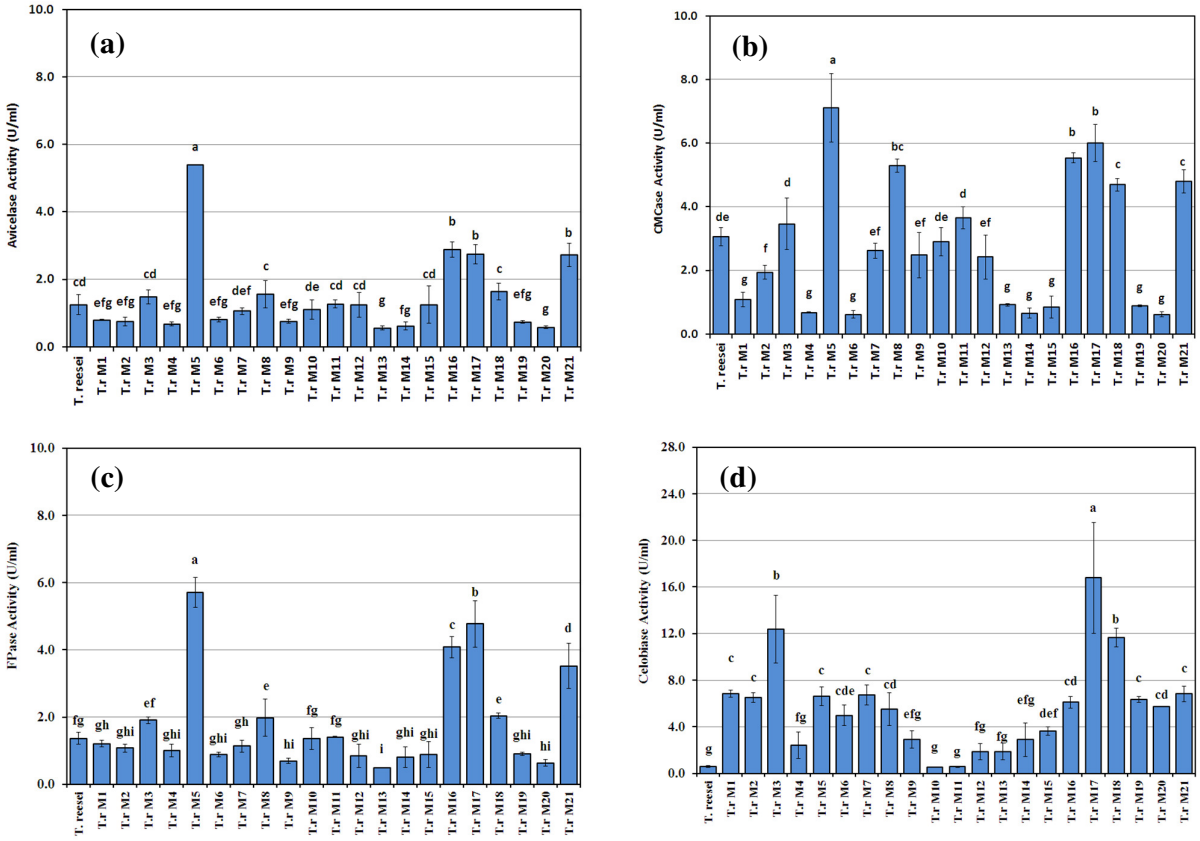
شکل ۱ مقدارپروتئین خارج سلولی را در قارچ وحشی و ۲۱ جدایه موتانت *T. reesei* را نشان می‌دهد. غلظت پروتئین از مقدار ۵/۵۷ الی ۴۶/۷۵ (µg/ml) متغیر بود. بالاترین محتوای پروتئین مربوط به قارچ وحشی *T. reesei* بود. پایین‌ترین غلظت پروتئین در مایع فوقانی محیط تخمیر *T. r M15* محاسبه گردید.



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

به‌طورکلی، نتایج نشان داد که غلظت پروتئین خارج سلولی (µmg/ml) تولید شده در محیط تخمیر TFM در کلیه قارچ‌های مورد مطالعه دارای اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۰/۰۵ می‌باشند. جدایه‌های 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 معنی‌دار آماری با والدوحشی خود بودند. نتایج تعیین فعالیت آنزیم‌های سلولاز در مایع فوقانی محیط تخمیر TFM با استفاده از سوبستراهای مختلف (کربوکسی متیل سلولز، آویسل، سلوبیوز و کاغذ صافی) در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج دلالت بر تنوع در مقادیر فعالیت آنزیمی در جدایه‌های موتانت قارچ تریکودرما داشت. این مقادیر بین هم دارای اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۰/۰۵ بودند. فعالیت آنزیمی بر اساس واحد بین‌المللی (U) نشان داده شده‌اند که هر واحد فعالیت آنزیمی به‌عنوان مقدار آنزیم موردنیاز برای آزادسازی یک میکرومول محصول به ازای هر ساعت تعریف می‌شود. مقدار قند احیا آزاد شده (گلوکز) به‌وسیله روش دی‌نیترو سالیسیلیک اسید تعیین گردید. در این تحقیق از کربوکسی متیل‌سلولز که مشتقی یونی از سلولز است (CMC، به‌عنوان سوبسترای محلول در آب)، برای تعیین فعالیت اندوگلوکاناز که CMCase نیز نامیده می‌شود؛ استفاده گردید که به دلیل ماهیت یونی آن دارای ساختاری آمورف می‌باشد و آنزیم‌های اندوگلوکاناز به‌صورت تصادفی باندهای گلیکوزیدی β (۴،۱) داخل مولکولی را در آن هیدرولیز می‌کنند. هم‌چنین برای سنجش سلوبیوهیدرولازها (اگزو گلوکانازها) از آویسل تجاری (که هم‌چنین سلولز میکروکریستال یا هیدروسلولز نیز نامیده می‌شود)استفاده شد، چراکه دارای درجه پایینی از پلیمریزاسیون سلولز بوده و نسبتاً برای حمله اندوگلوکانازها با وجود برخی از نواحی آمورف غیرقابل دسترس می‌باشد. آنزیم‌هایی که فعالیت نسبتاً بالایی را بر روی آویسل نشان می‌دهند و دارای فعالیت کمی بر روی کربوکسی متیل‌سلولز هستند، به عنوان اگزو گلوکاناز تعریف می شوند (Maki *et al.* 2009). جهت سنجش فعالیت β-گلوکوزیداز نیز از سوبسترای

سلوبیوز استفاده شد. فعالیت آنزیم کربوکسی متیل‌سلولاز در سه گونه وحشی قارچ تریکودرما با استفاده از کربوکسی متیل‌سلولز تولیدی مورد آزمایش قرار گرفت و نتایج آن در شکل ۲ نشان داده شده است. بالاترین فعالیت آنزیم کربوکسی متیل‌سلولاز مقدار ۷/۱۲ U/ml بدست آمد که در مایع فوقانی محیط تخمیر قارچ *T. r M5* مشاهده شد. پایین‌ترین فعالیت کربوکسی متیل‌سلولاز تنها ۰/۶۲ U/ml بود که در مایع فوقانی محیط تخمیر قارچ *T. r M20* به‌دست آمد. فعالیت آویسلاز با استفاده از آویسل خالص اندازه گیری شد و نتایج آن در شکل ۲ آورده شده است.



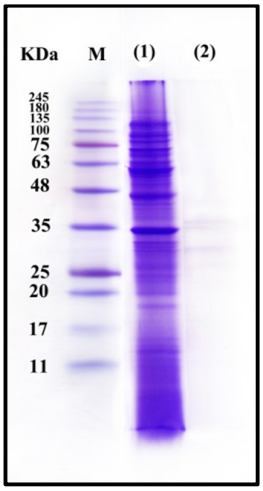
شکل ۲ فعالیت آنزیم‌های (a) آویسلاز، (b) کربوکسی متیل‌سلولاز، (c) سلولاز کل و (d) سلوبیاز (U/ml) قارچ *T. reesei* و جدایه‌های موتانت آن

بالاترین فعالیت آویسلاز در مایع فوقانی محیط تخمیر قارچ *T. r M5* با مقدار ۵/۳۹U/ml به‌دست آمد. پایین‌ترین فعالیت آویسلاز تنها ۰/۵۶ U/ml بود که در مایع فوقانی محیط کشت قارچ *T. r M13* به‌دست آمد. نتایج اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سلولاز کل با استفاده از کاغذ صافی واتمن در مایع فوقانی محیط تخمیر قارچ *T. reesei* و جدایه‌های موتانت آن نیز در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داده‌اند که بالاترین فعالیت سلولاز کل مربوط به آنزیم های تولید شده توسط جدایه موتانت*T. r M5* است که فعالیت آنزیمی ۵/۷۱U/ml را نشان داد. میزان فعالیت آنزیم β-گلوکوزیداز (یا

سلوبیاز) نیز با استفاده از سوبسترای سلوبیوز اندازه‌گیری شد و نتایج آن در شکل c-۲ نشان داده شده است. کلیه نتایج در سطح آماری ۰/۰۵ دارای اختلاف معنی‌دار آماری بودند. بیشترین فعالیت آنزیم β-گلوکوزیداز در جدایه موتانت *T. r M17* مشاهده شد (شکل d-۲).

الکتروفورز و تعیین وزن مولکولی آنزیم‌ها

جدایه موتانت *T. r M5* به‌عنوان بهترین جدایه برای هیدرولیز تفاله چغندرقند انتخاب شد و پروفایل پروتئین خارج سلولی آن در مایع فوقانی محیط تخمیر TFM با استفاده از آزمون SDS-PAGE بررسی شد و نتایج آن در شکل ۳ نشان داده شده است. باندهای 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. در پروفایل پروتئینی ژل SDS-PAGE قارچ *T. r M5* (شکل ۳) باند قوی آنزیم Cel5A در وزن مولکولی ۴۶/۲۵ مشاهده گردید. آنزیم Cel6A در وزن مولکولی ۵۹/۱۹ KDa مشاهده گردید. آنزیم Cel7A در وزن مولکولی ۶۳KDa درپروفایل پروتئینی ژل SDS-PAGE مشاهده گردید.



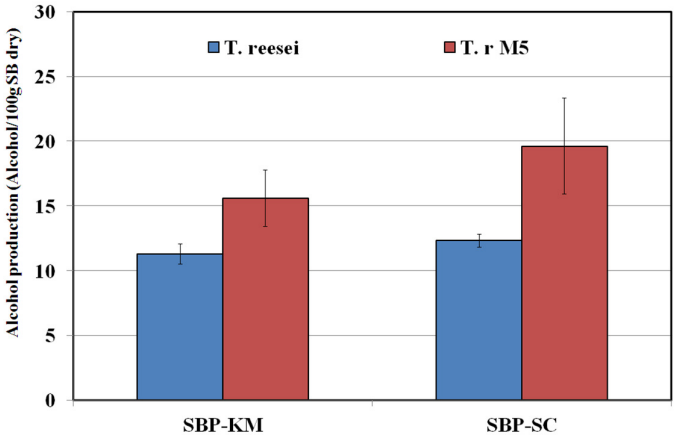
شکل ۳ پروفایل پروتئین آنزیم‌های سلولاز، (۱): مایع فوقانی محیط تخمیر TFMتلقیح شده با قارچ موتانت *T. r M5*، (۲): مایع فوقانی محیط تخمیر TFM تلقیح نشده و (M): مارکر پروتئین

باند آنزیمی Cel7B تنها در پروفایل پروتئینی قارچ *T. reesei* در وزن مولکولی ۵۴ KDa دیده شد. هم‌چنین Cel3A (BGLI) 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 به‌ترتیب با وزن‌های مولکولی ۹۱/۹۱ و ۱۱۹/۴۴ KDa مشاهده گردید.

تولید بیواتانل

میزان قند اندازه‌گیری شده در چغندرقند برابر با ۰/۲۲ گرم بر میلی‌لیتر و میزان قند در تفاله چغندرقند قندگیری شده برابر با ۰/۰۰۷ گرم بر میلی‌لیتر اندازه‌گیری گردید. نتایج نشان

دادند که نمونه‌های تیمار شـده با تفاله‌ی چغندرقند و موتانت *T. reesei* که پس از هیدرولیز ۴۸ ساعته در اختیار مخمر قرار گرفته اند، در تیمار مخمر *S. cerevisiae* ۱۹/۶۱ درصد و در تیمار مخمر *C. marxianus* ۱۵/۵۹ درصد الکل تولید شده بود. در دو تیمار دیگر که به‌صورت مستقیم از چغندرقند، قندگیری نشده استفاده شده بود و تیمار *T. reesei* نداشتند نتایج حاصل نشان دادند که در محیط کشت تیمار شده با *S. cerevisia* ۴۵/۳۷ درصد و در محیـط کشـت تیمـار شده با *C. marxianus* ۴۶/۹۴ درصد الکل اندازه‌گیری شد. یعنی میزان الکل تولیدی با مخمر *S. cerevisia* در محیط حاصل از چغندرقند قندگیـری نشده ۲/۳۱ برابر الکل تولیـدی با مخمر *S. cerevisia* در محیط حاصل از تفاله چغندرقند اندازه‌گیری شد. میزان الکل تولیدی با مخمر *C. marxianus* در محیط حاصل از چغندرقند قندگیری نشده ۳/۰۱ برابر الکل تولیدی با مخمر *S. cerevisia* در محیط حاصل از تفاله چغندرقند اندازه‌گیری 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 چغندرقند در موتانت *T. rM5* می‌باشد.



شکل ٤ مقایسه میزان تولید الکل (درصد الکل به ازای هر ۱۰۰ گرم ماده خشک تفاله چغندرقند) با استفاده از مخمر *Cluyveromyces marxianus* و *Saccharomyces cerevisiae* بعد از ساکاریفیکاسیون تفاله چغندرقند با استفاده از *T. reesei* و *T. r M5*

شکل ۴ میزان تولید الکل در تفاله چغندرقند هیدرولیز شده با استفاده از آنزیم‌های *T. reesei* و*T. r M5* را با استفاده از دو مخمر *C. marxianus* و *S. cerevisiae* نشان می‌دهد. 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) که نشان دهنده کارآمدی بیشتر این جدایه موتانت در تجزیه آنزیمی تفاله چغندرقند 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 گرفته‌اند، در تیمار مخمر *S. cerevisiae* ۱۲/۵۱ درصد و در تیمار مخمر *C. marxianus* ۱۱/۴۵ درصد الکل تولید شده بود. در دو تیمار دیگر که به صورت مستقیم از

چغندرقند، قندگیری نشده استفاده شده بود و تیمار *T. reesei* نداشتند نتایج حاصل نشان دادند که در محیط کشت تیمار شده با *S. cerevisiae* ۴۵/۳۷ درصد و در محیط کشت تیمار شده با *C. marxianus* ۴۶/۹۴ درصد الکل اندازه‌گیری 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 اندازه‌گیری 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 اندازه‌گیری 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. cerevisia*e ۶۲/۰۹ درصد ماده‌ی خشک به الکل تبدیل گردید. در تیمار تفاله‌ی چغندرقند با مخمر *C. marxianus* ۴۹/۱۷ درصد ماده‌ی خشک به الکل تبدیل گردید. در تیمار تیپ والدی قارچ *T. reesei* تفاله‌ی چغندرقند با مخمر *S. cerevisia*e ۵۹/۹۶ درصد ماده‌ی خشک به الکل تبدیل گردید. در تیمار تفاله‌ی چغندرقند با مخمر *C. marxianus* ۴۷/۷۷ 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. marxianus* ۶۹/۳۸درصد ماده‌ی خشک به الکل تبدیل گردید و در تیمار مخمر *S. cerevisia*e ۶۸/۴۳ درصد ماده‌ی خشک به الکل تبدیل گردید.

بحث

تفاله چغندرقند یکی از محصولات جانبی صنایع قند محسوب می‌شود که حجم بالایی از صنایع تبدیلی چغندر قند را به خود اختصاص می‌دهد. این ماده لیگنوسلولزی در مقایسه با سوبستراهای تخمیر مورد استفاده در صنعت دارای ارزش تجاری پایین می‌باشد و قسمت عمده آن به‌عنوان خوراک دام مورد استفاده قرار می‌گیرد و یکی از گزینه‌های قابل توجه صنایع تبدیلی به علت قابل دسترس بودن و دارا بودن درصد بالای مواد لیگنوسلولزی قابل تجزیه می‌باشد. به علت افزایش هزینه‌های فرایند تخمیر برای تولید بیواتانل، تولید آنزیم‌های تجزیه کننده سلولز یکی از مراحل کلیدی برای هیدرولیز مواد لیگنوسلولزی همچون تفاله چغندرقند و استفاده از آن به عنوان سوبسترای تخمیر محسوب می‌شود. گونه‌های متعدد قارچ تریکودرما تولیدکننده آنزیم‌های تجزیه کننده سلولز می باشند و تحقیقات متعددی جهت القای موتاسیون بر روی این قارچ جهت افزایش تولید آنزیم‌های سلولاز انجام گرفته است. از این قارچ علاوه بر تولید آنزیم در زمینه‌های دیگر نظیر تولید خوراک دام، داروسازی و صنایع نساجی نیز استفاده شده است. در این پژوهش از تفاله چغندرقند در محیط تخمیر استفاده شد و با استفاده از ۲۱ جدایه موتانت پرتو گاما قارچ تریکودرما ریزیی آنزیم سلولاز تولید گردید و توانایی تولید آنزیم‌های تجزیه کننده سلولز در کلیه جدایه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج اندازه‌گیری پروتئین خارج سلولی نشان داد که نمونه‌های مختلف مورد آزمون داری اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۰/۰۵ می باشند. با توجه به ماهیت پروتئینی آنزیم‌های خارج سلولی مترشحه از قارچ‌های مورد آزمون، بررسی غلظت پروتئین خارج سلولی اطلاعات مفیدی در رابطه با میزان تولید این آنزیم‌ها را نشان خواهد داد. در بیشتر مواقع تعیین غلظت پروتئین خارج سلولی کار ساده‌ای نمی‌باشد، چراکه فاکتورهای مختلفی ممکن است برروی نتایج نهایی تاثیرگذار باشد

(Adney *et al.* 1995; Zaia *et al.* 1998). سه فاکتور اصلی وجود دارد که ممکن است در اندازه گیری غلظت پروتئین در نمونه‌های مورد آزمون تأثیر باشند شامل: (الف) هر روش تعیین میزان پروتئین بر پایه اختلاف و اصول کمی استوار است؛ (ب) حضور ترکیبات غیرپروتئینی در محلول آنزیمی و یا محیط واکنش اگر در نتایج روش‌های کمی دخالت کنند می‌توانند منبعی از خطا باشند و (ج) حضور پروتئین‌های غیرسلولازی در آماده‌سازی آنزیم می‌تواند در تفسیر داده‌های فعالیت آنزیمی ویژه ایجاد مشکل نماید. چنین اختلافاتی هم‌چنین ناشی از این حقیقت است که ایزوله‌های آنزیمی مختلف ساختارهای اولیه متفاوتی دارند، گذشته از این در درجه گلیکوزیلاسیون نیز متفاوت می‌باشند. لذا این فاکتورها در پاسخ پروتئین‌ها از گونه‌های مختلف قارچ تریکودرما منعکس می‌شوند. فعالیت آنزیم‌های اندوگلوکاناز، اگزوگلوکاناز و سلولاز کل در جدایه موتانت *T. r M5* بالاترین مقادیر فعالیت آنزیمی را در بین جدایه های موتانت دیگر و جدایه والد اولیه از خود نشان داد. هم‌چنین جدایه مذکور دارای فعالیت بتا-گلوکوزیدی مناسبی بود. سلولاز کل شامل فعالیت آنزیم‌های اندوگلوکاناز، اگزوگلوکاناز و بتا-گلوکوزیداز می‌شود که به‌صورت سینرژیستی باعث هیدرولیز سلولز کریستالی می‌شوند. سینرژیسم بین اندوگلوکانازها و اگزوگلوکانازها دارای بیشترین مطالعات انجام شده می باشند. بیشترین گزارشات سینرژی اندو-اگزو آنزیم‌ها بر روی سوبستراهایی است که برای کاهش کریستالیزاسیون تیمار شده‌اند، مثل آویسل هموژن شده (Henrissat *et al.* 1985) و SolkaFlok آسیاب شده (Fan *et al.* 1981). کریستالیزاسیون سلولز نقش مهمی در هیدرولیز آنزیمی بازی می‌کند. تصور کلی بر این است که ساختار سلولز به دو ناحیه تقسیم می‌شود، یکی ناحیه آمورف است که به آسانی توسط آنزیم هیدرولیز می‌شود و یکی دیگر ناحیه کریستالی است که به سختی توسط آنزیم هیدرولیز می‌گردد. این موضوع فراهم آورنده فهم مناسبی از سینتیک‌های مشاهده شده برای هیدرولیز سلولز است که زمانی‌که آنزیم‌ها 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 می‌باشد. بنابراین با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که ساختار کریستالی تفاله چغندرقند مرطوب بیشتر از نواحی آمورف تشکیل شده است و بیشتر مستعد تجزیه توسط اندوگلوکانازها می‌باشد. علاوه‌بر خصوصیات سوبسترا، شرایط آزمون نیز بر وسعت سینرژی اثر می‌گذارد. گزارش شده است که سینرژی اندو-اگزو با افزایش میزان آنزیم در زیر نقطه اشباع، افزایش می‌یابد اما با افزایش آن در بالا نقطه اشباع باعث کاهش سینرژی می‌شود (Watson *et al.* 2002). اندازه‌گیری فعالیت سلولاز کل همیشه با استفاده از سوبستراهای نامحلول شامل سوبستراهای سلولزی خالص از قبیل کاغذ صافی واتمن #۱، کرک پنبه، سلولز میکروکریستال، سلولز باکتریایی، سلولز باکتریایی، سلولز جلبکی و سوبستراهای حاوی سلولز از قبیل سلولزهای رنگدار، α-سلولز ولیگنوسلولز پیش تیمار شده انجام می‌شود. آویسل حاوی برخی نواحی آمورف و سلودکسترین‌های محلول می‌باشد که می‌تواند به‌عنوان سوبسترا برای هم اگزو و هم اندو گلوکانازها عمل کند. هیچ سوبسترای ویژه خیلی عالی برای آزمایش فعالیت اگزوگلوکانازها در مخلوطهای سلولازی وجود ندارد (Wood and Bhat 1988). با این حال این سوبسترا نمی‌تواند برای تعیین فعالیت CBH II در قارچ *T. reesei* مناسب باشد، چراکه دارای یک فعالیت اگزو گلوکانازی مؤثر برای این سوبسترا نمی‌باشد (Van Tilbeurgh *et al.* 1982; 1985). آویسل بالاترین نسبت زنجیره‌های انتهایی به باندهای β-گلوکوزیدی داخلی قابل دسترسی را در میان مدل‌های سوبستراهای سلولزی دارد. آنزیم‌های CBH I و CBH II می‌توانند باندهای متعددی را به دنبال جذب حتی قبل از

تفکیک کمپلکس سوبسترا و آنزیم، بشکنند (Valjamae *et al.* 1998). بنابراین عملکرد CBH I و CBH II منجر به کاهش تدریجی در درجه پلیمریزاسیون سلولز می‌شود (Srisodsuk *et al.* 1998). مطالعات قبلی گزارش کرده‌اند که فعالیت ویژه آنزیم CBH II تقریباً دو برابر فعالیت آنزیم CBH I می‌باشد (Nidetzky *et al.* 1994; Medve *et al.* 1994). بالا بودن فعالیت آویسلاز در قارچ موتانت *T.r M5* احتمالاً به علت بالا بودن توانایی این قارچ در تجزیه نواحی کریستالی می‌باشد. فعالیت اندوگلوکانازها اغلب بر اساس هیدرولیز مشتقات محلول سلولز از قبیل کربوکسی متیل سلولز اندازه‌گیری می‌شود. گزارشی مبنی بر ارتباط ضعیف فعالیت کربوکسی متیل سلولاز با توانایی هیدرولیز سلولز نامحلول حتی برای اندوگلوکانازهای خالص شده وجود ندارد (Klyosov 1988; 1990). از میان سه اندوگلوکاناز *T. viride* خالص‌سازی شده به‌وسیله شومکر و براون (1978)، یکی از آن‌ها که بالاترین سرعت هیدرولیز آویسل را نشان داد، دارای کمترین میزان فعالیت کربوکسی متیل سلولاز بود. در تحقیقی کلیسوف (1990) به وضوح با اشاره به فعالیت اندوگلوکاناز از بسیاری از میکروارگانیسم‌های اندازه‌گیری شده بر روی کربوکسی متیل سلولز نشان داد که هیچ ارتباطی با فعالیت‌های بر علیه سلولز نا محلول وجود ندارد. سرعت تولید قندهای احیا کننده محلول بوسیله EG I نسبت به CBH I برای سلولز آمورف بالاتر از ۱ (≥۱)، برای آویسل کمتر از یک (≤۱) و برای سلولز باکتریایی میکروکریستال (BMCC) و کتان نیز کمتر از (≤۱) بود (Zhang and Lynd 2004). سرعت نسبتاً پایین آزاد شدن قندهای احیا به‌وسیله EG I بر روی سلولز کریستالی سازگار با اکثر انتهاهای احیا تولید شده توسط فعالیت اندوگلوکانازها در فاز جامد می‌باشد و لزوماً حاکی از سرعت پایینتر شکستن باندهای β-گلوکوزیدی نمی‌باشد. هیدرولیز کارآمد سلولز کریستالی به‌وسیله سلولاز نیازمند به عملکرد سینرژیستکی اندوگلوکانازها و سلوبیوهیدرولازها می‌باشد که توسط تین و کویواولا (1995) مرورشده است. این عملکرد سینرژیستیکی به خوبی در قارچ موتانت *T. r M5* به خوبی قابل مشاهده بود. ماکزیمم سینرژی معمولاً با مقادیر بالایی از اگزوآنزیم‌ها و مقادیر اندکی از اندوآنزیم‌ها به‌دست می‌آید (Reinikainen 1994). پروفایل پروتئینی جدایه موتانت *T. r M5* با استفاده از آزمون SDS-PAGE بررسی شد. جدایه فوق دارای باندهای آنزیمی متعددی در وزن‌های مولکولی مختلف بود که مربوط به آنزیم‌های EG IV، Cel 3C، Cel 3D، Cel 3A، Cel 7A، Cel 6A، Cel 5A و Cel 61A بودند که بصورت سینژیستی باعث هیدرولیز تفاله چغندرقند می‌شدند. Cel5A یک اندوگلوکاناز متعلق به خانواده ۵ گلوکوهیدرولازها می‌باشد. وزن مولکولی این آنزیم ۴۲ KDa تخمین زده شده است. با این وجود دارای وزن مولکولی ظاهری ۴۸ KDa بر روی ژل SDS-PAGE می‌باشد. نقطه ایزوالکتریک این آنزیم ۵/۶–۵/۵ می باشد (Shoemaker and Brown 1978). در میان آنزیم‌های بیان شده در *T. reesei* تخمین زده شده است که بین ۵ تا ۱۰درصد از بیان سلولاز کل مربوط به آنزیم Cel5A می‌باشد (Ståhlberg 1991; Ilmen *et al.* 1997). Cel6A یک سلوبیوهیدرولاز متعلق به خانواده ۶ گلوکوهیدرولازها می‌باشد. این آنزیم دارای وزن مولکولی ۴۷ KDa و بر روی ژل SDS-PAGE دارای وزن ۵۳ KDa است و نقطه ایزوالکتریک آن ۵/۹ می‌باشد (Fägerstam and Pettersson 1980; Bhikhabhai *et al.* 1984). البته گزارشاتی نیز وجود دارد که محدوده وزن مولکولی این آنزیم را ۵۸–۵۰ KDa گزارش کرده است. آنزیم Cel6A یا CBH II آنزیمی است که باعث شکستن باندهای گلیکوزیدی از انتهای غیراحیا زنجیره می‌شود (Barr *et al.* 1996; Boisset *et al.* 2000) و در برخی گزارشات نیز ذکر شده است که دارای برخی از فعالیت های اندوگلوکانازی می باشد (Nutt *et al.* 1998).

در میان آنزیم‌های مترشحه از *T. reesei* بین ۲۰-۱۷ درصد از کل آنزیم‌های سلولاز بیان شده مربوط به Cel6A بوده است (Ståhlberg 1991; Ilmen *et al.* 1997). Cel7A یا CBH I یک سلوبیوهیدرولاز متعلق به خانواده ۷ گلوکوهیدرولازها می‌باشد و اولین آنزیم سلولاز *T. reesei* می‌باشد که شناسایی شده است (Wey *et al.* 1994). Cel7A دارای وزن مولکولی ظاهری ۵۲ KDa و بر روی ژل SDS-PAGE دارای وزن مولکولی ۶۶ KDa با نقطه ایزوالکتریک ۴/۳ می‌باشد (Fägerstam *et al.* 1977; Shoemaker *et al.* 1983). Cel7A بیشترین سلولاز بیان شده توسط *T. reesei* می‌باشد و مقدار ۶۰-۵۰ درصد از کل سلولاز بیان شده را شامل می‌شود (Ståhlberg 1991; Ilmen *et al.* 1997)، 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 می‌کند. Cel7A یک آنزیم کارآمد در هیدرولیز پیوندهای گلیکوزیدی در سلولز بوده و ترجیحاً هیدرولیز را از انتهای احیای زنجیره انجام می‌دهد (Barr *et al.* 1996; Divne *et al.* 1998). Cel7B یک اندوگلوکاناز متعلق به خانواده ۷-گلوکوهیدرولازها می‌باشد که دارای وزن مولکولی تخمینی ۴۸ KDa بوده و بر روی ژل SDS-PAGE وزن مولکولی ۵۵-۵۰ KDa را نشان می‌دهد و دارای نقطه ایزوالکتریک ۴/۵ می‌باشد (Shoemaker *et al.* 1983; Bhikhabhai *et al.* 1984). Cel7B زنجیره‌های گلیکوزیدی در سلولز را با مکانیسم مشخصی هیدرولیز می‌کند. در قارچ *T. reesei* بیان Cel7B بین ۱۰-۶ درصد از بیان سلولاز کل را شامل می‌شود (Ståhlberg 1991; Ilmen *et al.* 1997). بتاگلوکوزیدازها باهیدرولیز الیگوساکاریدهای محلول تولید گلوکز می‌نمایند و گزارش شده است که در هیدرولیز سلولز، افزودن بتاگلوکوزیداز قارچ *T. reesei* سبب عملکرد بهتر ساکاریفیکاسیون گردیده است (Xin *et al.* 1993). بتاگلوکوزیداز باعث هیدرولیز سلوبیوز که یک ممانعت کننده از فعالیت آنزیم سلولاز است، می‌شود. نتایج این تحقیق نشان داد که جدایه موتانت T. r M5 بهترین جدایه برای ساکاریفیکاسیون تفاله چغندرقند است. میزان تولید الکل در تیمار ساکاریفیکاسیون با *T. r M5* در مقایسه با قارچ وحشی *T. reesei* و تخمیر با مخمرهای مورد آزمون در حدود ۲-۱/۵ برابر بیشتر بود. به‌طور کلی می‌توان نتیجه‌گیری نمود که اعمال موتاسیون بر روی قارچ *T. reesei* منجر به تولید جدایه موتانت T. r M5 گردید که توانایی بالایی در تولید آنزیم‌های تجزیه کننده سلولز در تجزیه تفاله چغندرقند را دارا می‌باشد و نتایج آزمایشات مشخص نمود که ساکاریفیکاسیون تفاله چغندرقند با استفاده از این جدایه منجر به تولید درصد بالاتری از الکل در تخمیر با *K. marxianus* و *S. cerevisiae* می‌باشد که از این جدایه می‌توان در صنعت برای تجزیه سلولز و تولید الکل استفاده نمود. این جدایه در کلکسیون قارچ و باکتری گروه پژوهشی گیاه پزشکی و نگه‌داری مواد غذایی، پژوهشکده کشاورزی هسته ای سازمان انرژی اتمی نگه‌داری می‌شود.

منابع مورد استفاده:

References:

Ahari Mostafavi H. The use of nuclear technology for weeds and plant disease management, Second National Conference on the application of nuclear technology for agricultural sciences and natural resources. 9-10 June. 2009;pp:331-335. (In Persian)

Adney WS, Mohagheghi A, Thomas SR, Himmel M. Comparison of protein contents of cellulose preparations in a worldwide round-robin assay. In: Saddler, J.N., Penner, M.H. (Eds.), Enzymatic Degradation of Insoluble Carbohydrates, ACS Symposium Series 618. American Chemical Society, Washington. 1995; pp. 256–271.

Barr BK, Hsieh Y-L, Ganem B, Wilson, DB. Identification of two functionally different classes of exocellulases. Biochemistry. 1996; 35: 586-592.

Bhikhabhai R, Johansson G, Pettersson G. Isolation of cellulolytic enzymes from *Trichoderma reesei* QM 9414. J ApplBiochem. 1984; 6: 336-345.

Cannon RE, Anderson SM. Biogenesis of Bacterial Cellulose, *Critical Reviews in Microbiology.* 1991; 17, 435-447.

Divne C, Ståhlberg J, Teeri TT, Jones TA. High-resolution crystal structures reveal how a cellulose chain is bound in the 50 Å long tunnel of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. J. Mol. Biol. 1998; 275: 309-325.

Fägerstam L, Håkansson U, Pettersson G, Andersson L. Purification of three different cellulolutic enzymes from *Trichoderma viride* QM 9414 on a large scale. In Proceedings of Bioconversion Symposium, 1977; pp. 165-178. Indian Institute of Technology, New Delhi.

Fägerstam LG, Pettersson LG. The 1,4-beta-glucan cellobiohydrolases of *Trichoderma reesei* QM 9414. A new type of cellulolytic synergism. FEBS Letters. 1980; 119: 97-100.

Foreman PK, Brown D, Dankmeyer L, Dean R, Diener S, Dunn-Coleman NS, Goedegebuur F, Houfek TD, England GJ, Kelley AS, Meerman HJ, Mitchell T, Mitchinson C, Olivares HA, Teunissen PJ, Yao J, Ward M. Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichodermareesei*. J Biol Chem. 2003; 278: 31988-31997.

Grishutin SG, Gusakov AV, Markov AV, Ustinov BB, Semenova M, Sinitsyn AP, Specific xyloglucanases as a new class of polysaccharide-degrading enzymes. Biochim. Biophys. Acta. 2004; 1674: 268–281.

Henrissat B, Driguez H, Viet C, Shulein M. Synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose. Bio/Technol. 1985; 3:722– 726.

Ilmen M, Saloheimo A, Onnela M-L, Penttila ME. Regulation of cellulose gene expression in the filamentous fungus Trichodermareesei. Appl Environ Microbiol. 1997; 63:1298–306.

Jun H, Kieselbach T, Jönsson L J, Enzyme production by filamentous fungi: analysis of the secretome of *Trichoderma reesei* grown on unconventional carbon source. Microbial Cell Factories. 2011; 10:68.

Karlsson J, Saloheimo M, Siika-aho M, Tenkanen M, Penttilä M, Tjerneld F. Homologous expression and characterization of Cel61A (EG IV) of *Trichoderma reesei*. Eur. J. Biochem. 2001; 268: 6498-6507.

Klemm D, Philipp B, Heinze T, Heinze U, Wagenknecht W. Comprehensive cellulose chemistry. I. Fundamentals and analytical methods. Weinheim: Wiley-VCH. 1998.

Klyosov AA. Cellulases of the third generation. In: Aubert J-P, Beguin P, Millet J, editors. Biochemistry and genetics of cellulose degradation. London: Academic Press. 1988; p 87–99.

Klyosov AA. Trends in biochemistry and enzymology of cellulose degradation. Biochemistry. 1990; 29:10577–10585.

Laemmli UK, Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970; 227: 680-685.

Lynd LR, Weimer PJ, Van Zyl WH, Pretorius IS. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2002; 66:506-577.

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

Medve J, Stahlberg J, Tjerneld F. Adsorption and synergism of cellobiohydrolase I and II of *Trichoderma reesei* during hydrolysis of microcrystalline cellulose. Biotechnol Bioeng. 1994; 44:1064– 1073.

Moradi R, Shahbazi S, Ahari Mostafavi H. Determine the appropriate dose of radiation in order to induce the desired mutation effects of morphological investigation of Trichoderma, First National Congress of Agricultural Science and New Technologies. 10-12 Septamber. 2010; pp:29.

Nidetzky B, Claeyssens M. Specific quantification of *Trichoderma reesei* cellulases in reconstituted mixtures and its application to cellulase-cellulose binding studies. Biotechnol Bioeng. 1994; 44:961–966.

Nidetzky B, Steiner W. A new approach for modeling cellulase-cellulose adsorption and the kinetics of the enzymatic hydrolysis of microcrystalline cellulose. Biotechnol Bioeng. 1993; 42:469– 479.

Reinikainen T. The cellulose-binding domain of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei* VTT publications 206 (1994) ISBN 951-38-4644-x.

Shoemaker SP, Brown RD. Enzymatic activities of endo-1, 4-h-D-glucanases purified from Trichodermaviride. Biochim BiophysActa. 1978; 523:133– 146.

Shoemaker S, Schweickaut V, Ladner M, Gelfand D, Kwok S, Myambo K, Innis M, Molecular cloning of exocellobiohydrolase I derived from *Trichoderma reesei* strain L27. Bio/Technology. 1983; 1:691–696.

Srisodsuk M, Kleman-Leyer K, Keranen S, Kirk TK, Teeri TT. Modes of action on cotton and bacterial cellulose of a homologous endoglucanase-exoglucanase pair from *Trichoderma reesei*. Eur J Biochem. 1998; 251(3):885–892..

Ståhlberg J. Functional organization of cellulases from *Trichoderma reesei*. In Doctoral thesis. Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science. 1991; 344. 45pp, Uppsala. ISBN 91-554-2800-2. Uppsala University.

Teeri T, Koivula A. 1995. Cellulose degradation by native and engineered fungal cellulases. Carbohydr. Eur. 12, 28–33.

Valjamae P, Sild V, Pettersson G, Johansson G. The initial kinetics of hydrolysis by cellobiohydrolases I and II is consistent with a cellulose surface - erosion model. Eur. J. Biochem. 1998; 253:469 – 475.

Van Tilbeurgh H, Claeyssens M, Bruyne CK. Te use of 4-methylum-belliferyl and other chromophoric glycosides in the study of cellulolytic enzymes. FEBS Lett. 1982; 149: 152–156.

VanTilbeurgh H, Pettersson G, Bhikabhai R, Boeck H, Claeyssens M. Studies of the cellulolytic system of Trichodermareesei QM 9414. Reaction specificity and thermodynamics of interactions of small substrates and ligands with the 1,4-beta-glucan cellobiohydrolase II. Eur. J. Biochem. 1985; 148: 329–334.

Watson DL, Wilson DB, Walker LP. Synergism in binary mixtures of Thermo bifidafusca cellulases Cel6B, Cel9A, and Cel5A on BMCC and Avicel. Appl. Biochem. Biotechnol. 2002; 101:97– 111.

Wen Z, Liao W, Chen Sh. Production of cellulase by Trichoderma reesei from dairy manure. Bioresour. Technol. 2005; 96: 491-499.

Wood TM, Bhat KM. Methods for measuring cellulase activities. Methods Enzymol 1988; 160:87– 117.

Xin Z, Yinbo Q, Peiji G, Acceleration of ethanol production from paper mill waste fiber by supplementation with β-glucosidase. Enzyme Microb. Technol. 1993; 15: 62–65.

Zaia DAM, Zaia CTBV, Lichtig J. Determinatio de proteinastotais via espectrofometria: vantagens e desvantagens dos métodosexistentes. Quim. 1998; 21: 787–793.

Zhang S, Wolfgang DE, Wilson DB. Substrate heterogeneity causes the nonlinear kinetics of insoluble cellulose hydrolysis. Biotechnol. Bioeng. 1999; 66:35– 41.

Zhang Y-HP, Lynd LR. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: non complexes cellulase systems. Biotechnol. Bioeng, 2004; 88:797–824.

Zhang Y-HP, Lynd LR. A Functionally Based Model for Hydrolysis of Cellulose by Fungal Cellulase. You have free access to this content. Biotechnology and Bioengineering, 2006; 94(5):888-898.

Zhao H, Kwak JH, Zhang ZC, Brown HM, Arey BW, Holladay JE. Studying cellulose fiber structure by SEM, XRD, NMR and acid hydrolysis. Carbohydrate Polymers. 2007; 68: 235-241.