بهینه سازی قارچ *Trichoderma reesei* جهت افزایش تولید آنزیم سلولاز از طریق تکنیک Mutation & Selection

راضیه نظری*[۱] و نسرین معظمی[۲]

[۱] قم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، دانشکده علوم، گروه میکروبیولوژی

[۲] تهران، سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران ، دپارتمان بیوتکنولوژی

تاریخ دریافت: ۸۹/۵/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۲/۱۶

چکیده

قارچ *Trichoderma reesei* یک میکروارگانیسم سلولولتیک می باشد که به منظور تولید آنزیمهای سلولازی تحت شرایط تخمیر غوطه ور مورد استفاده قرار می گیرد. در این تحقیق، بعد از چندین مرحله جهش با موتاژن شیمیایی NTG و موتاژن فیزیکی uv، از مجموع ۶۵۰۰ کلونی بررسی شده از این قارچ، یک سویه سلولولیتیک کارآمد به نام ۲: A۶ به دست آمد که حداکثر میزان تولید آنزیم اگزوکلوکاناز توسط این سویه در روز چهارم ۱/۲۶ U/ml (۱۳۰ درصد بیشتر از تیپ وحشی) و حداکثر میزان تولید آنزیم اندوگلوکاناز در روز چهارم ۰/۸۲ U/ml (۱۵۶ درصد بیشتر از تیپ وحشی) بود.

واژه های کلیدی: بهینه سازی سویه، جهش، سلولاز، *Trichoderma reesei*

* نویسنده مسئول، تلفن: ۶۶۲۹۸۰۷-۰۲۵۱ ، پست الکترونیکی: nazari9465@hotmail.com

مقدمه

سلولز به عنوان فراوان ترین و ارزان ترین کربوهیدرات قابل تجزیه در طبیعت، واجد یک زنجیره خطی از مولکولهای گلوکز با پیوندهای (۴ ← ۱) β می باشد و می تواند به عنوان منبع انرژی و کربن جهت تولید فرآورده های مفیدی نظیر سلولاز ، شربتهای گلوکزی و نیز پروتئین تک یاخته (Single cell protein) مورد استفاده قرار گیرد(۱۵). آنزیمهای سلولولیتیک در تولید اتانول و گلوکز از مواد سلولزی به کار می روند. همچنین سلولاز در صنایع نساجی، پودر های شوینده، آزمایشگاههای تحقیقاتی و همراه با پکتیناز ها در شفاف سازی آب میوه ها در صنایع تهیه آب میوه به کار می رود (۱۳، ۱۹ و ۲۰). هیدرولیز سلولز ، به عمل سینرژیستی حداقل سه گروه از آنزیمها، اندو (۴ ← ۱) β گلوکاناز(EC.3.2.1.4)، اگزو(۴ ← ۱) β گلوکاناز (EC.3.2.1.91) و β ـ گلوکوزیداز (EC.3.2.1.21) نیاز دارد که در ویژگی سوبسترایی با یکدیگر متفاوت می باشند (۵).

در تجزیه آنزیمی سلولز، ابتدا آنزیم اندو (۴ ← ۱) β گلوکاناز روی نواحی بی شکل رشته های سلولز اثر کرده و انتهاهای غیر احیاکننده برای فعالیت اگزو(۴ ← ۱) β گلوکاناز فراهم می کند. در مرحله بعد، اگزو(۴ ← ۱) β گلوکاناز با جداسازی واحد های سلوبیوز از انتهاهای غیر احیاکننده، نواحی کریستالی را تجزیه می کند. سپس آنزیم β ـ گلوکوزیداز، سلوبیوز را به واحد های گلوکز هیرولیز می کند(۱، ۴ و ۱۲).

آنزیمهای سلولولیتیک توسط میکروارگانیسم های مختلفی از دسته پروکاریوت ها و یوکاریوت ها تولید می شود. باکتریها و تعدادی از قارچها تنها قادر به تولید آنزیم اندوگلوکاناز بوده و سلولز را به طور ناقص هیدرولیز

می نمایند(۱۷ و ۱۸). تنها تعداد کمی از قارچها قادر به تولید هر سه کلاس آنزیم سلولاز بوده و به عنوان قارچهای سلولولیتیک کارآمد معرفی می گردند. یکی از مهم ترین قارچهای سلولولیتیک قارچ *Trichoderma reesei* است که به عنوان یکی از برترین تولید کنندگان کمپلکس سلولازی در تحقیقات مختلف شناخته شده است(۲). سیستم آنزیمهای سلولولیتیک در این قارچ به صورت خارج سلولی بوده و واجد حداقل سه نوع اندو (۴ → ۱) β گلوکاناز (EG IP-III) ، دو نوع اگزو (۴ → ۱) β گلوکاناز (CBH I , CBH II) و همچنین β ـ گلوکوزیداز می باشد که به طور مؤثر کریستال سلولز را با همکاری یکدیگر تجزیه می نمایند (۲ و ۱۴).

در این تحقیق تکنیک (Mutation and Selection) با استفاده از ترکیب موتاژن شیمیایی NTG و موتاژن فیزیکی uv ، جهت افزایش تولید آنزیم سلولاز، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

ارگانیسم: ارگانیسم مورد استفاده در این تحقیق ، قارچ *Trichoderma reesei* می باشد که به صورت آمپول لئوفیلیزه از کلکسیون قارچها و باکتریهای سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران با کد PTCC 5142 تهیه شده است.

جهت رشد و نگهداری سویه *T. reesei PTCC 5142* از محیط (Potato dextrose agar)PDA (۲) استفاده شد.

جهش و انتخاب: برای به دست آوردن موتانتهایی با تولید بیشتر آنزیم سلولاز از تکنیک جهش ترکیبی استفاده شد. در این تکنیک از ترکیب جهشزای شیمیایی NTG و جهشزای فیزیکی uv استفاده گردید. در این روش ابتدا توسط محلول نرمال سالین استریل از محیط کشت سویه والد *T. reesei PTCC 5142* سوسپانسیون اسپوری تهیه شد و پس از حذف سیلیومها، رقت 10^{7}/ml از آن تهیه گردید. سپس این سوسپانسیون اسپوری با حجم مشخص سانتریفیوژ شده و به رسوب اسپوری حجم مشخصی از محلول NTG ۰/۰۵ درصد (۰/۰۱ g پودر NTG در ۲۰ ml با فر Tris HCL M ۰/۰۵ ، ۹/۴ pH) اضافه و ورتکس گردیده و در شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از گذشت ۵ ساعت ، مخلوط NTG و اسپورها سانتریفیوژ شده و رسوب اسپور جهت حذف NTG با نرمال سالین شستشو گردید و در نهایت سوسپانسیون اسپور تیمار شده با NTG ، در محیط پایه موتاسیون واجد نمکهای وگلز (۱۶) تغییر یافته(۹، ۱۰ و ۱۷) به همراه (w/v) ۱ درصد سلوبیوز ،(w/v) ۰/۱ درصد پپتون، (v/v) ۰/۲ درصد Triton X100 ،(w/v) ۰/۰۵ درصد کافئین و(w/v) ۲ درصد آگار تلقیح شده و پس از پخش توسط میله شیشه ای سرکج ، در زیر هود شیمیایی از فاصله cm ۲۳ لامپ uv ۳۰ واتی (nm ۲۵۴) به مدت ۷۵ ثانیه در معرض تابش پرتو uv قرار گرفت. پلیت های تابش یافته با پرتو uv ، با رعایت کامل شرایط تاریکی به مدت ۶ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. کلونیهای رشد یافته در محیط پایه موتاسیون، به صورت تصادفی انتخاب و به منظور خالص سازی در محیط PDA واجد (w/v) ۰/۰۵ درصد کافئین (PDA C+) به صورت خطی کشت داده شد. در مرحله بعد کلونیهای خالص در اسلنت های PDA C+ نگهداری و جهت بررسی میزان تولید آنزیم سلولاز مورد آزمایش قرار گرفتند.

تولید و سنجش فعالیت آنزیمهای سلولازی: میزان تولید آنزیمهای سلولاز توسط سویه والد و سویه های موتانت به صورت غوطه ور در محیط تغییر یافته مندل واجد (w/w) ۲ درصد پودر (PCSP) Powdered corn steep liquor، (w/w) ۱ درصد میکرو کریستالین سلولز و(v/v) ۰/۱ درصدTritonX 100 در محلول نمکی مندل(۸) مورد بررسی قرار گرفت. فلاسکهای ml ۲۵۰ واجد ml ۵۰ محیط تغییر یافته مندل با ml ۱ از سوسپانسیون اسپوری ml / 10^{6} فاقد میسلیوم تلقیح شده و به مدت ۸ روز در

دمای ۲۸ درجه سلسیوس در شیکر انکوباتور با دور ۱۷۰ rpm/min گرماگذاری شد.

برای تعیین فعالیت آنزیمهای اندوگلوکاناز و اگزوگلوکاناز از روش مندل (۸) استفاده شد که علت آن دقت بالا، سادگی و مقرون به صرفه بودن روش می باشد(۸).

در این روش برای تعیین فعالیت اگزوگلوکاناز از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ به عنوان سوبسترا ، و برای تعیین فعالیت اندوگلوکاناز از کربوکسی متیل سلولز (CMC) به عنوان سوبسترا استفاده شد. برای تعیین فعالیت آنزیم در این روش از معرف دی نیترو سالیسیلیک اسید جهت تعیین قند های احیا شده حاصل از فعالیت آنزیم استفاده شد. این معرف در برابر قند های احیا شده، بر حسب غلظت قند از زرد به قهوه ای تغییر رنگ می دهد. در نهایت جذب لوله در طول موج ۵۵۰ نانومتر خوانده شده و اختلاف جذب بین لوله های شاهد و تست در رابطه با منحنی استاندارد گلوکز تعیین گردید که مقدار آن برابر با میلی گرم قند آزاد شده در اثر عملکرد ml ۰/۵ محلول آنزیمی در مدت زمان مشخص انکوباسیون می باشد(۸).

فعالیت اگزوگلوکانازی به صورت میلی گرم گلوکز تولید شده از مخلوط ml ۰/۵ محلول آنزیمی با ۵۰ میلی گرم کاغذ صافی واتمن شماره ۱ در ml ۱ بافر سیترات pH ۴/۸ و گرماگذاری در دمای ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۱ ساعت تعریف گردید. فعالیت اندوگلوکانازی به صورت میلی گرم گلوکز آزاد شده از مخلوط ml ۰/۵ محلول آنزیمی با ml ۰/۵ محلول کربوکسی متیل سلولز ۱ درصد (w/v) در بافر سیترات pH ۴/۸ و گرماگذاری در دمای ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه تعریف شد.

میزان تولید آنزیمهای اگزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز توسط سویه والد و سویه های موتانت هر ۲۴ ساعت یکبار در فاصله زمانی ۱۹۲-۲۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری: پس از ورود داده ها در نرم افزار SPSS فراوانی مطلق و نسبی متغیرهای مختلف محاسبه گردید. نتایج حاصل از تکرار سه تایی برخی متغیرها به صورت میانگین گزارش شد.

نتایج

تولید آنزیمهای سلولاز تحت شرایط تخمیر غوطه ور: جهت بررسی میزان تولید آنزیمهای سلولازی توسط والد *T. reesei PTCC 5142* در ابتدای تحقیق از محیط مندل به عنوان محیط تولید آنزیم ، استفاده شد. در محیط مندل، حداکثر میزان تولید هر دو کلاس آنزیمی اگزوکلوناز و اندوگلوکاناز در روز هفتم (۱۶۸ h) مشاهده می شود که به ترتیب U/ml ۰/۴۶و U/ml ۰/۲۹ بود(شکل ۱). سپس با کار بر روی محیط تولید آنزیم، محیط تولیدی به نام محیط تغییر یافته مندل طراحی گردید و جهت بررسی میزان تولید آنزیمهای سلولازی توسط سویه والد *T. reesei PTCC 5142* مورد استفاده قرار گرفت. در محیط تغییر یافته مندل، حداکثر میزان تولید هر دو کلاس آنزیمی اگزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز در روز چهارم (۹۶ h) مشاهده می شود که به ترتیب U/ml ۰/۵۵ و U/ml ۰/۳۲ می باشد و پس از روز چهارم تا روز هفتم ، میزان تولید آنزیم روند کاهشی دارد، اما در روز هفتم میزان تولید آنزیم اگزوگلوکاناز به میزان جزئی افزایش می یابد و پیک کوچکی از تولید در منحنی مشاهده می شود که این تولید به میزان U/ml ۰/۴۴ می باشد(شکل ۱).

انتخاب سویه های موتانت و بررسی تولید آنزیمهای سلولازی در آنها: در این تحقیق برای به دست آوردن موتانتهایی با افزایش تولید آنزیم سلولاز، از تکنیک جهش ترکیبی با استفاده از موتاژنهای NTG و uv استفاده شد. از مجموع ۶۵۰۰ کلونی بررسی شده دراین تحقیق، ۱۳۰ کلونی به صورت تصادفی انتخاب گردید. در میان ۱۳۰ کلونی انتخاب شده تنوعات زیادی از لحاظ ویژگیهای مرفولوژیکی مشاهده گردید. میزان تولید اسپور در برخی

سویه ها نظیر D12، D15، B38 و C20 به شدت کاهش و در برخی سویه ها نظیر D10، D28 و B14 به شدت افزایش یافته بود. رنگ اسپور ها در برخی سویه ها از رنگ سبز به رنگهای سفید، زرد و قهوه ای تغییر یافته بود. تمامی ۱۳۰ سویه انتخاب شده، جهت بررسی میزان تولید آنزیمهای سلولاز در محیط تغییر یافته مندل کشت داده شدند. لازم به ذکر است که در این مرحله برای تمامی سویه ها ۳ تکرار در نظر گرفته شد و میزان تولید آنزیمهای سلولاز در زمانهای ۱۲۰-۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. از میان سویه هایی که تولید آنزیم سلولاز در آنها نسبت به سویه والد افزایش یافته بود، ۱۰ سویه به عنوان سویه های موتانت انتخاب و پس از کشت در محیط تغییر یافته مندل، میزان تولید آنزیمهای سلولازی در آنها در فواصل زمانی۱۹۲-۲۴ ساعت هر ۲۴ ساعت یکبار مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در میان سویه های موتانت بررسی شده، سویه موتانت ۲: A۶ بالاترین میزان تولید آنزیمهای اگزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز را نسبت به سویه والد *T. reesei PTCC 5142* نشان می داد، بنابراین سویه موتانت ۲: A۶ به عنوان بهترین سویه موتانت انتخاب و معرفی گردید(جدول ۱).

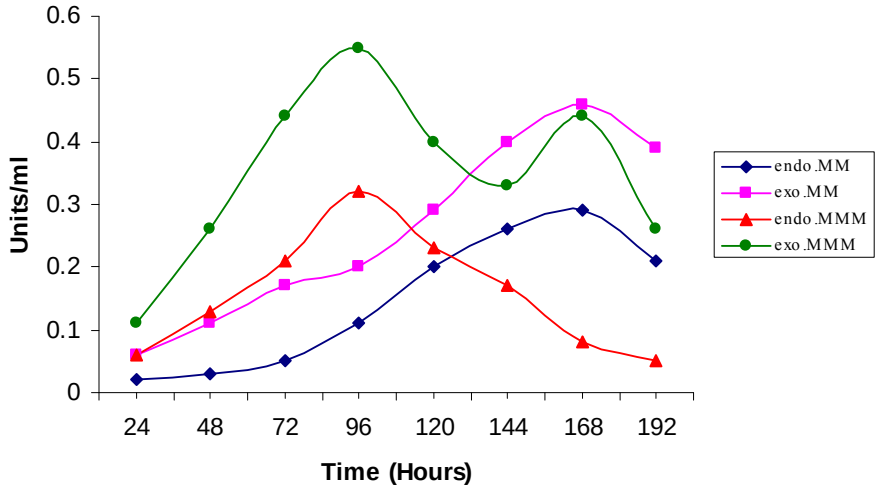
جدول ۱- میزان تولید آنزیمهای اگزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز توسط سویه والد*T. reesei PTCC 5142* و ۱۰ سویه موتانت انتخابی در محیط تغییر یافته مندل (MMM)

سویه	اگزوگلوکاناز	درصد افزایش اگزوگلوکاناز	اندوگلوکاناز	درصد افزایش اندوگلوکاناز
PTCC 5142	۰/۵۵	-	./۳۲	-
A ۶ : ۲	۱/۲۶	٪۱۳۰	./۸۲	٪۱۵۶
D۱۷	۱/۱۷	٪۱۱۲	./۳۲	-
A۲۸	۱/۱۱	٪۱۰۱	./۳۲	-
D۲۲	۱/۰۲	٪۸۵	./۴۴	٪۳۷
E۳۲	./۹۷	٪۷۹	./۴۱	٪۲۸
C۲۵	./۸۹	٪۶۱	./۳۵	٪۹
B۱۶	./۸۸	٪۶۰	./۵۲	٪۶۲
D۳۳	./۸۵	٪۵۴	./۳۵	٪۹
B۵	./۷۹	٪۴۳	./۴۷	٪۴۶
D۱۸	./۷۳	٪۳۲	./۳۲	-

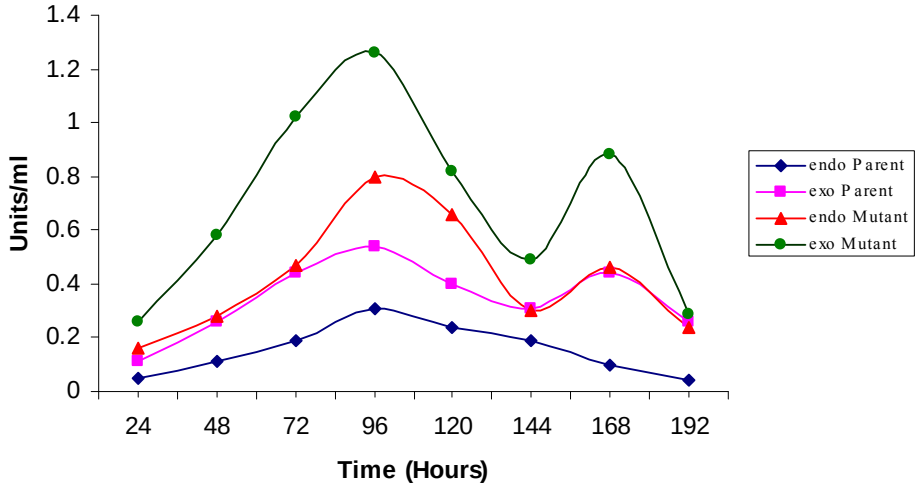
با بررسی ویژگیهای مرفولوژیکی سویه موتانت ۲: A۶ تغییراتی نسبت به سویه والد *T. reesei PTCC 5142* مشاهده گردید، به طوری که سطح کلونیهای سویه موتانت ۲: A۶ روی محیط PDA ظاهری تخت دارد در حالی که سویه والد در این محیط کلونیهای برآمده ایجاد می کند. در ضمن میزان اسپور دهی توسط سویه موتانت نسبت به سویه والد کاهش یافته است. میزان تولید آنزیمهای اگزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز توسط سویه موتانت ۲: A۶ در فواصل زمانی۱۹۲-۲۴ ساعت هر ۲۴ ساعت یکبار مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان می دهد که حداکثر میزان تولید آنزیم اگزوکلوکاناز توسط سویه ۲ : ۶ A در روز چهارم U/ml ۱/۲۶ و حداکثر میزان تولید آنزیم اندوگلوکاناز توسط این سویه در روز چهارم U/ml ۰/۸۲ می باشد(شکل ۲).

بحث

از آنجایی که سلولز فراوان ترین و ارزان ترین ماده آلی قابل تجزیه در طبیعت می باشد، می تواند به عنوان بهترین ماده برای تولید انرژی و غذا و مواد شیمیایی مورد نیاز انسان در نظر گرفته شود که در این صورت باید ابتدا از طریق هیدرولیز توسط آنزیم سلولاز به گلوکز و سپس سایر مواد تبدیل گردد (۱۱ و ۱۵).



شکل ۱ – مقایسه منحنیهای تولید آنزیمهای اگزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز توسط سویه والد *T. reesei PTCC 5142* در محیط مندل (MM) و محیط تغییر یافته مندل (MMM)



شکل ۲– مقایسه منحنیهای تولید آنزیمهای اگزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز توسط سویه والد *T. reesei PTCC 5142* و سویه موتانت ۲ : ۶ A در محیط تغییر یافته مندل

در میان میکروارگانیسم های سلولولیتیک تنها تعداد کمی از آنها قادر به تولید هر سه کلاس آنزیم سلولاز می باشند. یکی از مهم ترین میکروارگانیسم های سلولولیتیک که بیشتر از سایرین مورد توجه قرار گرفته است، قارچ *Trichoderma reesei* می باشد که قادر به تولید هر سه کلاس آنزیم سلولاز به صورت خارج سلولی بوده و همچنین ایزو آنزیمهای زیادی از هر گروه نیز تولید می کند و از این رو در این تحقیق از این قارچ استفاده گردید(۲).

بررسی میزان تولید دو کلاس آنزیمی اگزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز توسط سویه والد *T. reesei PTCC 5142* در محیط مندل نشان می دهد که در این محیط میزان تولید هر دو کلاس آنزیمی اگزوکلوناز و اندوگلوکاناز از روز اول تا روز هفتم روند افزایشی داشته به طوری که در روز هفتم (۱۶۸ h) حداکثر میزان تولید هر دو کلاس آنزیمی اگزوکلوناز و اندوگلوکاناز مشاهده می شود که به ترتیب ۴۶ U/ml/. و ۲۹ U/ml/. می باشد. بعد از روز هفتم میزان تولید کاهش یافته است که احتمالاً به علت کمبود مواد غذایی بالاخص منابع کربنی و در نتیجه تجزیه آنزیمهای سلولاز توسط پروتئاز ها و مصرف آن به منظور تأمین رشد سلول می باشد. نتایج مذکور با نتایج گزارش شده توسط مندل و همکارانش مطابقت دارد(۸). در محیط تغییر یافته مندل ، میزان تولید هر دو کلاس آنزیمی اگزوکلوناز و اندوگلوکاناز از روز اول تا روز چهارم روند افزایشی داشته به طوری که در روز چهارم (۹۶ h) حداکثر میزان تولید هر دو کلاس آنزیمی اکروگلوکاناز و اندوگلوکاناز مشاهده می شود که به ترتیب ۰/۵۵ U/ml و ۰/۳۲ U/ml می باشد. با مقایسه منحنی تولید هر دو کلاس آنزیمی اکزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز توسط سویه والد *T. reesei PTCC 5142* در محیط مندل و محیط تغییر یافته مندل در شکل (۱) مشخص می شود که سرعت آنزیمهای سلولازی در محیط تغییر یافته مندل نسبت به محیط مندل افزایش داشته ، به طوری که حداکثر میزان تولید آنزیم از روز هفتم در محیط مندل به روز چهارم در محیط تغییر یافته مندل کاهش می یابد. از طرف دیگر میزان تولید آنزیمهای اگزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز در محیط تغییر یافته مندل نسبت به محیط مندل به ترتیب افزایش ۱۹ درصد و ۱۰ درصد را نشان می دهد. از آنجائی که کاهش زمان تخمیر در صنعت به دلیل کاهش هزینه های مصرفی در هر پروسه تخمیر ، فاکتور بسیار مهمی در تولید محسوب می شود، محیط تغییر یافته مندل نسبت به محیط مندل برتری می یابد و در این تحقیق به عنوان محیط تولید آنزیم معرفی شده و جهت بررسی میزان تولید آنزیمهای سلولازی توسط سویه والد *T. reesei PTCC 5142* و سویه های موتانت مورد استفاده قرار می گیرد.

در این تحقیق جهت افزایش کارآیی جهش، برنامه بهینه سازی سویه والد *T. reesei PTCC 5142* از طریق تیمار دو گانه با جهشزای فیزیکی پرتو uv و جهشزای شیمیایی NTG انجام گرفت. با استفاده از تکنیک جهش ترکیبی، از مجموع ۶۵۰۰ کلونی رشد یافته در محیط پایه موتاسیون طی چند مرحله جهش، ۱۳۰ کلونی به صورت تصادفی بر اساس ویژگیهای مرفولوژیکی انتخاب و میزان تولید آنزیمهای سلولازی در تمامی آنها مورد بررسی قرار گرفت. از میان سویه هایی که میزان تولید آنزیمهای سلولازی در آنها نسبت به سویه والد *T. reesei PTCC 5142* افزایش یافته بود، ۱۰ سویه به عنوان سویه موتانت انتخاب و در محیط تغییر یافته مندل کشت داده شد. میزان تولید آنزیمهای سلولازی در تمامی سویه ها در فواصل زمانی۱۹۲-۲۴ ساعت هر ۲۴ ساعت یکبار مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در میان سویه های موتانت بررسی شده، سویه موتانت ۲: A۶ بالاترین میزان تولید آنزیمهای اکزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز را نسبت به سویه والد *T. reesei PTCC 5142* نشان می دهد و بنابراین به عنوان بهترین سویه موتانت انتخاب و معرفی گردید.

مقایسه میزان تولید هر دو کلاس آنزیمی اکزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز توسط سویه والد*T. reesei PTCC 5142* و سویه موتانت ۲ : ۶ A در محیط تغییر یافته مندل (شکل ۲) نشان داد که میزان تولید آنزیمهای اکزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز توسط سویه موتانت ۲ : ۶ A نسبت به سویه والد *T. reesei PTCC 5142* به ترتیب ۱۳۰ درصد و ۱۵۶ درصد افزایش یافته است.

Farkas وLabudova با جهش بر روی سویه *QM9414 T. reesei* از طریق تیمار دو گانه با موتاژن فیزیکی UV و موتاژن شیمیایی NTG سویه موتانتی را به دست آوردند که میزان تولید آنزیمهای اکزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز در این سویه نسبت به سویه والد ۱۰۰ درصد افزایش یافته بود(۷،۶،۲).

از طرف دیگر Gadgil و Daginawala با جهش بر روی سویه *T. reesei QM9414* از طریق تیمار دو گانه با موتاژن فیزیکی UV و ترکیب شیمیایی نیتریت سدیم سویه موتانتی را به دست آوردند که میزان تولید آنزیم اکزوگلوکاناز در این سویه نسبت به سویه والد ۵۰ درصد و میزان تولید آنزیم اندوگلوکاناز در این سویه نسبت به سویه والد ۸۰ درصد افزایش یافته بود(۳).

با مقایسه نتایج تحقیق کنونی با نتایج حاصل از تحقیقات مذکور مشخص می گردد که سویه موتانت ۲ : ۶ A نسبت به سویه های موتانت ایجاد شده از لحاظ درصد افزایش تولید آنزیمهای اکزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز نسبت به سویه والد به کار رفته برتری دارد.

با تلفیق نتایج مربوط به تغییر محیط کشت تولید آنزیم و نتایج مربوط به مرحله جهش، نهایتاً در این تحقیق دو نتیجه مهم کاهش زمان تخمیر و افزایش تولید آنزیم سلولاز حاصل شد که به دلیل کاهش هزینه های مصرفی در پروسه تخمیر، در تولید صنعتی آنزیم بسیار مهم می باشند.

منابع

1. Beguin P and Aubert J (1994) The biological degradation of cellulose. FEMS Microbial Rev, 13:25-58.
2. Farkas V, Labudova I, Bauer S and Ferenczy L (1981) Preparation of mutants of *Trichoderma viridae* with increased production of cellulase. Folia Microbial, 26:129-132.
3. Gadgil N, Daginawala H, Chakrabarti T and Khanna P (1995) Enhanced cellulase Production by a mutant of *Trichoderma reesei*. Enzym and Microbial Technol, 17:942-946
4. Gilbert H and Haziewood G (1993) Bacterial cellulases and xylanases . J Gen Microbial, 139:187-194.
5. Kosaric N, Wieczorek A, Cosentno G and Magee R (1978) Ethanol fermentation. Biotechnol, 8:293-315.
6. Labudova I and Farkas V (1983) Enrichment technigue for the selection of catabolite repression resistant mutants of *Trichoderma* as producers of cellulase. FEMS Microbial Lett, 20:211-215.
7. Labudova I, Farkas V, Bauer S, Kolarova N and Branyik A (1981) Characterization of cellulolytic enzyme complexes obtained from mutants of *Trichoderma reesei* with enhanced cellulase production. Europ Appl Microbial Biotech, 12:16-21.
8. Mandels M, Sternberg D (1976) Recent Advancess in cellulase technology. Ferment Technol, 54:267-286.
9. Montenecourt B and Eveligh D (1997) Semiguantitative plate Assay for determination of cellulase production by *Trichoderma viridae*. Appl Environ Microbial, 33:178–183.
10. Montenecourt B and Eveligh D (1997) Preparation of mutants of *Trichoderma reesei* with enhanced cellulase production. Appl Environ Microbial, 34:777-782.
11. Nevalainen K and Pavala E (1980) A high cellulose producing mutant strain of *Trichoderma reesei.* Enzyme Microbial Technol, 2:59-61.
12. Nidetzly (1993) Synergism of *Trichoderma reesei* cellulases while degradation different cellulose. Biotech Lett, 15:71-76.

13. Ogawa K, Toyama D and Fujii N (1991) Microcrystaline cellulose hydrolyzing Cellulose from *Trichoderma reesei CDU-11*. Jour Gen Appl Microbial, 37:249-259.

14. Singh A and Hayashi K (1995) Microbial cellulose. Advanced in Appl in Microbial, 40:1-44.

15. Swapan K, Vinay K and Singh A (1994) Production and hydrolytic potential of cellulase enzymes from a mutant strain of *Trichoderma reesei*. Biotechnol Appl Biochem, 20: 233-239.

16. Vogel H (1956) A convenient growth medium for *Neurospora*. Microbial Gen, 13:42 – 43.

17. Yazdi M, Radford A, Keen J and Woodward J (1990) Cellulase production by *Neurospora Crassa*, Purification and characterization of cellulolytic enzymes. Enzyme Microbial Technol, 12:120-123.

18. Yazdi M, Woodward J and Radford A (1990) Cellulase production by *Neurospora Crassa*,The enzymes of the complex and their regulation. Enzyme Microbial Technol, 12:116-119.

19. Yazdi M, Noori-Daloii M, Malekzadeh F, Kamranpour N and Khaleghparast S (1998) Purification of high molecular weight cellulolytic enzymes from *cellulomonas strain O*. J Sci I R Iran, 9:4-9.

20. Yazdi M, Malekzadeh F, Erfanian A and Noori-Daloii M (1997) Production and release of thermal characterization of cellulolytic enzyme *cellulomonas strain O*. J Sci I R Iran, 8:217-222.

Preparation of mutants of *Trichoderma reesei* PTCC 5142 with increased production of cellulase

Nazari R.[1] and Moazami N.[2]

[1] Department of Microbiology, Faculty of Science, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

[2] Biotechnology department. Iranian Research Organization for Science and Technology

Abstract

The aim of this study was a strain – improvement program for *Trichoderma reesei* PTCC 5142 by using a combination of UV light and NTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) for enhanced cellulase production. Following mutagenesis after several rounds, mutant A6: 2 was selected from a total of 6500 colonies. Results obtained after 4 days were: Enzyme activity 1.26 U/ml and 0.82 U/ml for exoglucanase and endoglucanase, respectively. The comparative results showed increased production exoglucanase and endoglucanase by mutant A6: 2 than *Trichoderma reesei* PTCC 5142 to amount 130% for exoglucanase and 156% for endoglucanase.

Keywords: Cellulase; Mutation; Strain improvement; *Trichoderma reesei*