Comparative production of cellulases by mutants of *Trichoderma parceramosume* PTCC5140

Hoda Nouri
M.Sc. of Microbiology, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran, hoda.nouri@yahoo.com
Tahere Sajadi
M.Sc. of Microbiology, Science and Research baranch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, sajadi_tahere@yahoo.com
Mehrdad Azin *
Associate professor of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran, azin@irost.ir

Abstract

Introduction: Cellulose is the most abundant biopolymer in the world. Cellulase, including endoglucanase, cellobiohydrolase and beta-glucosidase, catalyzes the hydrolysis of cellulose. Released glucose from enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass is used in different biotechnology fields.

Materials and methods: In this study, seven different Trichoderma species were obtained from Persian Type Culture Collection (PTCC) and in order to select the best ones, cellulase activity of native strains was determined. Sodium salt of carboxymethyl cellulose (CMC-Na), Avicel and cellobiose were used for endoglucanase, cellobiohydrolase (exoglucanase) and cellobiase (beta-glucosidase) assays, respectively. Kinetics of cellulose production was evaluated for the selected strain. Finally, random mutagenesis with 0.2 M sodium nitrate was done.

Results: Among 7 different fungal species**,** *Trichoderma parceramosum* PTCC 5140 was selected as the best strain with the highest cellulase activity. This strain, by production of 0.182 U/ml of endoglucanase, 0.538 U/ml of exoglucanase and 0.109 U/ml of cellubiase, showed the highest amount of all three constituents of cellulolytic complex. Random mutagenesis and mutant selection of this strain caused to isolate 4 stable mutants that were able to produce 2 to 11 fold more enzymes compared with the parent strain.

Discussion and conclusion: Evaluation of cellulase production in mutant strains of *Trichoderma parceramosume* PTCC 5140 showed that use of chemical mutagenesis with 2 to 11 fold increasing in enzyme activity is a potent method to improve cellulase complex activity. In the current study, obtained mutant strains could be introduced as a potent cellulase producer for further studies in bioconversion processes.

Key words: *Trichoderma parceramosume* PTCC 5140, Random mutagenesis, Acid nitro, Cellulase

* Corresponding author
Received: January 16, 2016/ **Accepted:** November 5, 2016

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال ششم، شماره ۲۲، تابستان ۱۳۹۶، صفحه ۱- ۱۳
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۲۶ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۸/۱۵

مقایسه تولید سلولاز در سلول‌های جهش‌یافتهٔ *Trichoderma parceramosume PTCC5140*

هدی نوری: کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران، hoda.nouri@yahoo.com
طاهره سجادی: کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران، sajadi_tahere@yahoo.com
مهرداد آذین *: دانشیار بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران، azin@irost.ir

چکیده

مقدمه: سلولز فراوان‌ترین پلیمر زیستی در طبیعت است. کمپلکس آنزیمی سلولاز از سه آنزیم اندوگلوکاناز، سلوبیوهیدرولاز و β-گلوکوزیداز تشکیل شده است. گلوکز آزادشده از هیدرولیز آنزیمی سلولز به‌عنوان یک سوبسترای مناسب در زیست‌فناوری استفاده می‌شود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش ۷ گونهٔ مختلف از جنس *Trichoderma* از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران دریافت و فعالیت سلولازی در آنها بررسی شد. کربوکسی‌متیل سلولز، آویسل و سلوبیوز به‌ترتیب به‌عنوان سوبسترای سنجش فعالیت آنزیم‌های اندوگلوکاناز، اگزوگلوکاناز و سلوبیاز استفاده شد و همچنین زیست‌تودهٔ خشک سلولی و روند تولید آنزیم بررسی شد. درنهایت جهش‌زایی با اسید نیترو ۰/۲ مولار انجام شد.

نتایج: براساس سنجش فعالیت آنزیمی از بین ۷ گونهٔ مختلف تریکودرما، *Trichoderma parceramosume PTCC5140* به‌عنوان بهترین سویه با بالاترین فعالیت سلولولیتیک انتخاب شد. این سویه با داشتن فعالیت اندوگلوکانازی ۰/۱۸۲ واحد در میلی‌لیتر، فعالیت اگزوگلوکانازی ۰/۵۳۸ واحد در میلی‌لیتر و فعالیت سلوبیازی ۰/۱۰۹ واحد در میلی‌لیتر به‌عنوان سویه‌ای که بالاترین فعالیت را در هر سه آنزیم داشت انتخاب شد. جهش‌زایی تصادفی سویهٔ والد و انتخاب سویه‌های جهش‌یافته منجر به تولید ۴ سویهٔ جهش‌یافتهٔ پایدار شد که میزان تولید آنزیم در آنها از ۲ تا ۱۱ برابر بیشتر از سویهٔ والد بود.

بحث و نتیجه‌گیری: بررسی سلولاز تولیدشده در جهش‌یافته‌های حاصل از *T. parceramosume PTCC 5140* نشان داد که استفاده از روش جهش‌زایی، با افزایش ۲ تا ۱۱ برابری فعالیت آنزیمی می‌تواند به‌عنوان روش مناسبی برای افزایش فعالیت کمپلکس آنزیمی سلولاز باشد. جهش‌یافته‌های به‌دست‌آمده در این پژوهش، می‌توانند به‌عنوان انتخابی مناسب جهت فرآیندهای تبدیل سلولز به سوبستراهای ساده‌تر مطرح باشند.

واژه‌های کلیدی: *Trichoderma parceramosume PTCC 5140*، جهش‌زایی تصادفی، اسید نیترو، سلولاز

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2017, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

با رشد روزافزون جمعیت جهان و صنعتی‌شدن بیشتر کشورها، مصرف انرژی پیوسته در حال افزایش است. به نظر می‌رسد که تقاضای انرژی در ایران به‌طور متوسط سالیانه ۲/۶درصد در سال‌های ۲۰۰۳-۲۰۳۰ افزایش یابد. استفاده از انرژی‌های تجدیدپذیر به‌ویژه سوخت‌های زیستی[1] سبب می‌شود که ایران شانس بهتری در مبادلهٔ منابع انرژی غیرفسیلی داشته باشد و مصرف سوخت‌های فسیلی را کاهش دهد. در ایران تولید سوخت‌های زیستی براساس باقیمانده‌های کشاورزی از پتانسیل بالایی برخوردار است (۱، ۲ و ۳).

ترکیبات لیگنوسلولزی به‌فراوانی در طبیعت وجود دارد و می‌تواند در تولید صنعتی و انبوه بیواتانول به‌عنوان مادهٔ اولیهٔ ارزان‌قیمت و تجدیدپذیر استفاده شود. سلولز، همی‌سلولز و لیگنین اجزای اصلی سازندهٔ ترکیبات لیگنوسلولزی هستند. جهت استفاده از سلولز لازم است به‌کمک تیمارهای مقدماتی، سازمان‌بندی کریستالی سلولز به هم بخورد و سپس مولکول‌های خطی حاصل، به الیگوساکاریدهای کوچک‌تر و درنهایت به واحد ساختمانی خود یعنی د-گلوکز تبدیل شود. پیش‌تیمار-های به‌کاررفته می‌تواند فیزیکی، شیمیایی، آنزیمی یا ترکیبی از این روش‌ها باشد تا حداکثر بازده و خلوص قند مدنظر به دست آید (۴ و ۵).

هیدرولیز آنزیمی سلولز یک فرایند پیچیده است که نیاز به مشارکت حداقل سه گروه آنزیم دارد: اندوگلوکاناز، اگزوگلوکاناز و سلوبیاز که به‌طور سینرژیستی با یکدیگر عمل می‌کنند. آنزیم اندو- بتا-۱و۴ گلوکاناز[2] یا زیرواحد اندوگلوکاناز، به‌طور تصادفی به مناطق درونی بی‌شکل فیبر سلولز حمله می‌کند و در آن نواحی پیوندهای بتا ۱و۴ گلیکوزیدی زنجیره سلولز را به‌طور تصادفی می‌شکنند و زنجیره‌هایی با انتهای آزاد ایجاد می‌کند. کربوکسی‌متیل سلولز[3] سوبسترای مناسبی برای این آنزیم است. حاصل عمل این آنزیم، گلوکز و سلوالیگوساکاریدها است. آنزیم اگزو- بتا-۱و۴-گلوکاناز[4] یا زیرواحد اگزوگلوکوناز، بخش عمدهٔ کمپلکس سلولاز قارچی را تشکیل می‌دهد. میزان آن بین ۴۰ الی ۷۰درصد کل پروتئین‌های تشکیل‌دهندهٔ سلولاز محاسبه‌شده است که در اکثر مواقع نواحی بلورین سلولز را هدف قرار می‌دهد پیوند گلیکوزیدی بتا ۱و۴ را از سر شکسته و از انتهای غیراحیاکننده، زنجیره‌های آزاد واحدهای سلوبیوز را جدا می‌کند. آنزیم بتا-۱و۴-گلوکوزیداز[5] که سلوبیاز هم نامیده می‌شود، بر خود سلولز بی‌تأثیر است و واحدهای دوتایی گلوکوزیدی و سلوبیوز و همچنین در برخی موارد الیگوساکاریدهای تولیدشده را هیدرولیز و به گلوکز تبدیل می‌کند (۶، ۷ و ۸).

در میان میکروارگانیسم‌ها قارچ‌ها عامل اساسی تجزیهٔ زیستی مواد سلولزی خاک هستند. انواع متعددی از قارچ‌ها شامل جنس‌های *Aspergillus*، *Fusarium*، *Trichoderma*، *Neurospora* و *Thermomonospora* دارای فعالیت تجزیه‌کنندگی سلولز هستند. مهم‌ترین گونه‌های صنعتی مولد سلولاز شامل *Trichoderma reesei* , *Trichoderma viride* هستند. از قارچ‌های دیگر که قادر به تجزیهٔ سلولز هستند، می‌توان به *Fusarium solani*، *Penicellium* ، *T. koningii* و *T. viridae* اشاره کرد (۹ و ۱۰). قارچ‌ها به‌دلیل تولید مقادیر فراوان آنزیم سلولولیتیک خارج سلولی و اهمیت آنها در صنعت، مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند.

به‌دلیل تولید کم محصول، به‌ندرت از سویه‌های

وحشی جداشده از طبیعت برای تولید تجاری فرآوردهٔ مختلف استفاده می‌شود. استفاده از روش‌های مختلف بهسازی و افزایش تولید محصولات مختلف سابقهٔ طولانی در زیست‌فناوری دارد و یکی از مهم‌ترین راهبردها برای این منظور جهش‌زایی سویهٔ وحشی است که بدین منظور می‌توان از عوامل جهش‌زای فیزیکی همچون اشعه ماوراء بنفش و روش‌های شیمیایی همچون تیمار با اتیدیوم بروماید و یا اسید نیترو نام برد (۱۱).

براین‌اساس هدف از انجام این مطالعه بررسی گونه‌های مختلف جنس *Trichoderma* موجود در مرکز منطقه‌ای کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران به‌منظور ارزیابی توانایی آنها در تولید اجزای آنزیم سلولاز بود. سپس از روش ایجاد جهش‌های القایی با استفاده از اسید نیترو به‌عنوان ابزاری در بهبود سویه استفاده شد. نتایج به‌دست‌آمده در میزان تولید آنزیم در سویه‌های جهش‌یافته مقایسه شد و درنهایت، بهترین سویه‌ها با بیشترین میزان تولید زیرواحدهای مختلف آنزیم نسبت به سویهٔ وحشی معرفی شدند. معرفی سویه‌های قارچی جهش‌یافته با افزایش ۲ تا ۱۱ برابری در فعالیت آنزیم سلولاز از جمله یافته‌های این پژوهش کاربردی است.

مواد و روش‌ها

میکروارگانیسم‌های موردِاستفادهٔ مولد سلولاز: در این پژوهش ۷ گونهٔ مختلف جنس *Trichoderma* شامل *T.viride PTCC 5157*، *T. virens PTCC 5300*، *Trichoderma* sp. *PTCC 5238*، *T. reesei PTCC 5142*، *T. Paraceramosome PTCC 5140*، *T. longibrachiatum PTCC 5307* و *T. longibrachiatum PTCC 5308* از مرکز منطقه‌ای کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران[۶] استفاده شد.

غربالگری قارچ‌های تولیدکنندهٔ سلولاز و انتخاب گونهٔ برتر: انتخاب گونهٔ برتر از میان ۷ گونهٔ تهیه‌شده براساس فعالیت آنزیم‌های سلولولیتیک و وزن خشک سلولی حاصل انجام شد که در ادامه به روش انجام هریک اشاره شده است.

بررسی فعالیت سلولازی سویه‌های قارچی: ازآنجاکه سلولاز متشکل از سه آنزیم است و سوبسترای موردنیاز آنزیم‌ها جهت فعالیت متفاوت‌اند، برای تهیهٔ محیط تولید آنزیم از دو سوبسترای آویسل و کربوکسی‌متیل سلولز استفاده شد. به این صورت که جهت بررسی فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز از سوبسترای کربوکسی‌متیل سلولز و جهت فعالیت آنزیم‌های سلوبیاز و اگزوگلوکاناز از سوبسترای آویسل استفاده شد. برای این منظور ۸۰ میلی‌لیتر محیط نمکی مندل حاوی ۱۰ گرم در لیتر آویسل[۷] و یا کربوکسی‌متیل سلولز همراه با ۱ گرم در لیتر پپتون در ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتر تهیه شد و قارچ‌ها در آن کشت داده شدند. محیط کشت مندل علاوه بر منبع کربن و نیتروژن، حاوی محلول نمکی و عناصر ناچیز نیز بود و pH محیط بر روی ۷±۰/۲ تنظیم شد. محیط کشت به‌مدت ۵ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار با ۱۵۰ دور در دقیقه هوادهی شد و نمونه‌ها از نظر میزان تولید زیست‌توده و فعالیت آنزیم‌های سلوبیاز، اگزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز بررسی شدند. تمامی آزمایش‌ها با سه تکرار انجام شد (۱۲ و ۱۳).

از روش دی‌نیتروسالیسیلیک‌اسید[۸] جهت تعیین غلظت قندهای احیاکنندهٔ حاصل از فعالیت آنزیم‌ها و کیت سنجش گلوکز شرکت پارس آزمون استفاده شد (۱۴و ۱۵). جداسازی سوپرناتانت حاصل از فعالیت قارچ جهت بررسی فعالیت آنزیمی توسط فیلتراسیون انجام شد.

بررسی فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز: جهت سنجش فعالیت اندوگلوکانازی، ۰/۲۵ میلی‌لیتر سوپرناتانت کشت قارچی به ۰/۲۵ میلی‌لیتر محلول کربوکسی‌متیل سلولز ۲درصد در بافر سیترات ۵۰ میلی‌مولار و pH۴/۸، اضافه شد و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه گرماگذاری شد. سپس ۱/۵ میلی‌لیتر معرف DNS جهت توقف واکنش اضافه شد. نمونه‌ها به‌مدت ۵ دقیقه مخلوط و جوشانده شد. پس از سردشدن نمونه‌ها، جذب نوری آنها در طول موج ۵۰۰ نانومتر خوانده شد.

بررسی فعالیت اگزوگلوکانازی: جهت سنجش فعالیت اگزوگلوکاناز بعد از صاف‌کردن محیط کشت، ۰/۵ میلی‌لیتر بافر ۵۰ میلی‌مولار و pH۴/۸، به ۰/۲۵ میلی‌لیتر سوپرناتانت کشت قارچی افزوده شد و انکوباسیون در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۶۰ دقیقه انجام شد. به‌منظور توقف واکنش ۱/۵ میلی‌لیتر معرف DNS به مخلوط واکنش اضافه شد. نمونه‌ها به‌مدت ۵ دقیقه مخلوط و جوشانده شد. پس از سردشدن نمونه‌ها، جذب نوری آنها در طول موج ۵۰۰ نانومتر خوانده شد.

بررسی فعالیت سلوبیازی: جهت سنجش فعالیت سلوبیاز، ۰/۵ میلی‌لیتر از سوپرناتانت کشت قارچی به‌همراه ۰/۵ میلی‌لیتر محلول ۱۵ میلی‌مولار سلوبیوز در بافر سیترات ۵۰ میلی‌مولار و pH۴/۸، در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. نمونه‌ها به‌مدت ۵ دقیقه مخلوط و جوشانده شد. پس از سردشدن نمونه‌ها، جذب نوری آنها در طول موج ۵۰۰ نانومتر خوانده شد. ۱۰ میکرولیتر از نمونهٔ حاصل از واکنش به ۱ میلی‌لیتر کیت گلوکز اضافه شد و سپس جذب نوری در طول موج ۵۰۰ نانومتر خوانده شد.

تعیین واحد آنزیمی: یک واحد آنزیمی، معرف مقدار آنزیمی است که در هر دقیقه ۱ میکرومول گلوکز را آزاد می‌کند. برای محاسبهٔ واحد آنزیمی از فرمول زیر استفاده شد. در این رابطه بالا ۱۹۸/۱۷ وزن مولکولی گلوکز است.

$$X(\text{میلی لیتر/واحد}) = \frac{\text{غلظت گلوکز (میلی گرم)}}{\text{زمان (دقیقه)} \times ۳ - ۱۰ \times ۱۹۸.۱۷}$$

وزن خشک سلولی: وزن خشک سلولی به‌عنوان شاخص رشد قارچ در محیط کشت تولید آنزیم (مندل) و درنتیجه مقدار مصرف سوبسترا توسط میکروارگانیسم اندازه‌گیری شد. به این منظور، کشت ۵روزهٔ قارچ بعد از فیلتراسیون روی کاغذ واتمن شماره ۱ به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد خشک و وزن توده سلولی براساس گرم در لیتر گزارش شد.

بررسی منحنی تولید آنزیم سلولاز توسط *T. parceramosume* PTCC 5140: برای تعیین بهترین زمان جهت سنجش فعالیت آنزیمی، سینتیک تولید آنزیم سلولاز در گونه پرتولید بررسی شد. برای این منظور ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتر حاوی ۸۰ میلی‌لیتر محیط نمکی مندل تهیه و در هرکدام یک قطعهٔ ۱×۱ سانتی‌متری از سطح پلیت PDA[۹] حاوی میسلوم‌های اسپوردار *T. parceramosume* PTCC 5140 تلقیح شد. محیط کشت به‌مدت ۷ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار با ۱۵۰ دور در دقیقه قرار داده شد. میزان تولید آنزیم‌های سلوبیاز، اگزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز ازطریق سنجش فعالیت هر یک از زیرواحدها به‌صورت روزانه بررسی شد. تمامی آزمایش‌ها با سه تکرار انجام شد.

جهش‌زایی *T. parceramosume* PTCC 5140 به‌منظور افزایش تولید آنزیم سلولاز: در این پژوهش برای ایجاد

سویه‌های جهش‌یافتهٔ مناسب، از روش جهش‌زایی شیمیایی و تیمار با اسید نیترو استفاده شد. غلظت ۰/۲ مولار از نیتریت‌سدیم در بافر استات ۰/۲ مولار و اسیدیته ۴/۸ تهیه شد و در مراحل جهش‌زایی استفاده شد. جهت رسم نمودار درصد بقا، رقت‌های سریالی از سوسپانسیون حاوی اسپور قارچی به‌تعداد 10^8 اسپور در میلی‌لیتر تهیه شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاوی اسپور قارچی به ۴ میلی‌لیتر اسید نیترو اضافه شد و در شیکر با ۱۵۰ دور در دقیقه و در زمان‌های ۳۰،۲۰،۱۰، ۴۰، ۴۵، ۵۰ و ۶۰ دقیقه قرار داده شد. برداشت از نمونه به‌میزان ۱۰۰ میکرولیتر همراه با افزودن ۴۰۰ میکرولیتر بافر فسفات صورت گرفت. ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت به پلیت حاوی محیط کشت تولید آنزیم افزوده شد و انکوباسیون نمونه‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ۳ تا ۵ روز انجام شد. شمارش تعداد کلنی‌های موجود در هر پلیت مربوط به زمان‌های مختلف جهش به‌منظور دست‌یابی به زمانی که در آن ۹۹/۹۹درصد از اسپورها از بین رفته باشند، انجام شد (۱۶).

انتخاب سویهٔ برتر جهش‌یافته: جهت انتخاب سویهٔ جهش‌یافته برتر از دو روش کیفی (غربال اولیه) و کمی (غربال ثانویه) استفاده شد. در روش کیفی، تشکیل هالهٔ شفاف درنتیجهٔ هیدرولیز سلولز توسط آنزیم تولیدی همراه با افزودن رنگ قرمز کنگو استفاده شد. بدین منظور محلول ۰/۱درصد قرمز کنگو به محیط کشت اضافه شد و سپس شستشوی پلیت با کلرید سدیم ۱ مولار پس از ۱۵ دقیقه انجام شد. فعالیت آنزیم سلولاز با توجه به قطر هالهٔ ایجادشده به قطر کلنی سویهٔ جهش‌یافته (H/C) ارزیابی شد. سویه‌های جهش‌یافتهٔ دارای مقیاس بزرگ‌تر ($H/C \geq 1.5$) جهت سنجش کمی انتخاب شدند. جهت بررسی کمی، سوپرناتانت مایع تخمیر توسط فیلتراسیون جداسازی شد و فعالیت آنزیم‌های سلولاز برای هر سویه اندازه‌گیری شد. جهش‌یافته‌هایی با توان بالای تولید آنزیم انتخاب شدند (۱۶).

سنجش پایداری در تولید و فعالیت آنزیم سلولاز در سویه‌های جهش‌یافته: میزان پایداری تولید و فعالیت آنزیمی سویه‌های جهش‌یافته منتخب و همچنین سویهٔ وحشی بررسی شدند. بدین منظور سویه‌های پرتولید ۱۰ بار واکشت داده شدند و درانتها فعالیت آنزیمی در هر سویه منتخب سنجیده شد.

آنالیز آماری: نتایج و اطلاعات به دست آمده در مراحل مختلف، به‌وسیلهٔ نرم‌افزار آماری SPSS ویرایش ۱۹ تجزیهٔ آماری شدند. در این پژوهش از آزمون آماری One-way ANOVA، Tukey با ضریب اطمینان ۹۵درصد استفاده شد و سطح معناداری نتایج به صورت $P \leq 0.05$ گزارش شد.

نتایج

بررسی ماکروسکوپی گونه‌های *Trichoderma*: قارچ‌های کشت‌شده در محیط مندل از لحاظ رنگ، میزان رشد و ویسکوزیته ظاهری (به‌صورت کیفی) محیط بررسی شدند. با توجه به اینکه این محیط حاوی سوبسترای کربوکسی‌متیل سلولز بود و از ویسکوزیتهٔ بالایی برخوردار بود، کاهش ویسکوزیته در محیط می‌تواند نشان‌دهندهٔ تولید سلولاز و شکست سوبسترا باشد. نتایج، حاکی از آن بود که در محیط مندلی که از کربوکسی‌متیل سلولز به‌عنوان سوبسترا استفاده شده بود، ویسکوزیتهٔ محیط حاوی سویه‌های *PTCC 5308* و *PTCC 5300* پس از گذشت ۵ روز نسبت به سایر سویه‌ها، تغییر چندانی نداشته است. با این حال سویه‌های

PTCC 5307 و *PTCC 5140* کاهش ویسکوزیته درنتیجهٔ مصرف کربوکسی‌متیل سلولز را نشان دادند (جدول۱). همچنین براساس نتایج به‌دست‌آمده مشخص شد که دربارهٔ محیط مندلی که در آن از آویسل به‌عنوان سوبسترا استفاده شده بود نیز سویه‌های *PTCC 5140* و*PTCC 5307* نسبت به سایر سویه‌ها رشد بهتری داشتند.

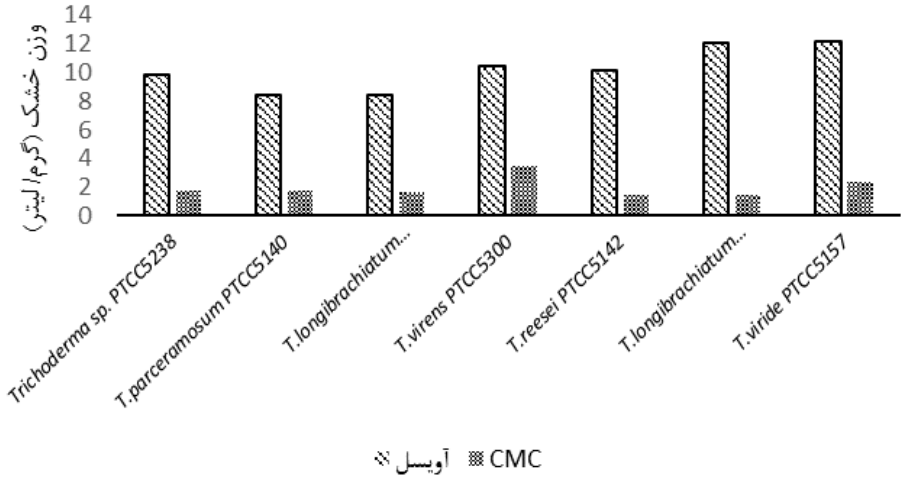
غربالگری قارچ‌های تولیدکنندهٔ سلولاز: غربالگری قارچ‌های تولیدکنندهٔ سلولاز با تعیین وزن خشک سلولی و همچنین بررسی فعالیت زیرواحدهای آنزیم سلولاز انجام شد.

بررسی وزن خشک سلولی: در شکل ۱ وزن خشک حاصل از رشد ۷ گونهٔ *Trichoderma* بر روی دو نوع سوبسترای کربوکسی‌متیل سلولز و آویسل در محیط مندل نشان داده شده است. طبق نتایج به‌دست‌آمده در محیط‌هایی که از کربوکسی‌متیل سلولز به‌عنوان سوبسترا استفاده شده بود، سویهٔ *PTCC 5300* بیشترین میزان رشد را داشت و در محیط‌هایی که از آویسل به‌عنوان سوبسترا استفاده شده بود، سویه‌های *PTCC 5157* و *PTCC 5308* بیشترین میزان رشد را داشتند. نتایج بیانگر آن بود که لزوماً سویه‌هایی که رشد بالایی دارند، میزان فعالیت آنزیم‌های سلولاز آنها بالا نیست، به‌طوری که سویهٔ *PTCC 5140* با رشد متوسط (شکل ۱)، میزان فعالیت آنزیم بسیار بیشتری نسبت به سایر سویه‌ها داشت (شکل ۲).

جدول ۱- مشخصات ظاهری رشد گونه‌های مختلف *Trichoderma* در محیط حاوی کربوکسی‌متیل سلولز و آویسل

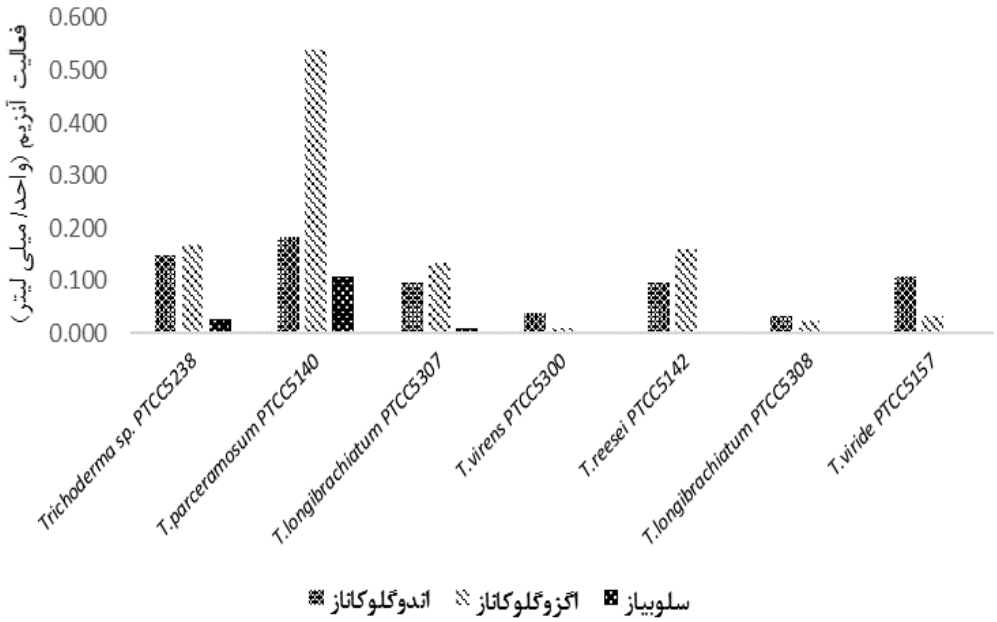
کد سویه					تغییر ویسکوزیته	
	کربوکسی‌متیل سلولز	آویسل	کربوکسی‌متیل سلولز	آویسل	کربوکسی‌متیل سلولز	آویسل
۵۱۵۷	کرم روشن	کرم تیره	++	+	+	−
۵۳۰۸	کرم مات	زرد روشن	+	+	++++	+
۵۳۰۰	صورتی روشن	شیری روشن	+	−	+++	+
۵۲۳۸	صورتی روشن	شیری کدر	+++	++	++	−
۵۱۴۲	صورتی روشن	صورتی کدر	++	++	++	−
۵۳۰۷	کرم- قهوه ای	زیتونی روشن	+++	+++	−	−
۵۱۴۰	صورتی	زیتونی	++++	++++	−	−

رشد: − عدم رشد و یا تغییر + ضعیف ++ متوسط +++ خوب ++++ خیلی خوب. ویسکوزیته: − عدم تغییر + تا ++++ کاهش گرانروی از ضعیف تا خیلی خوب



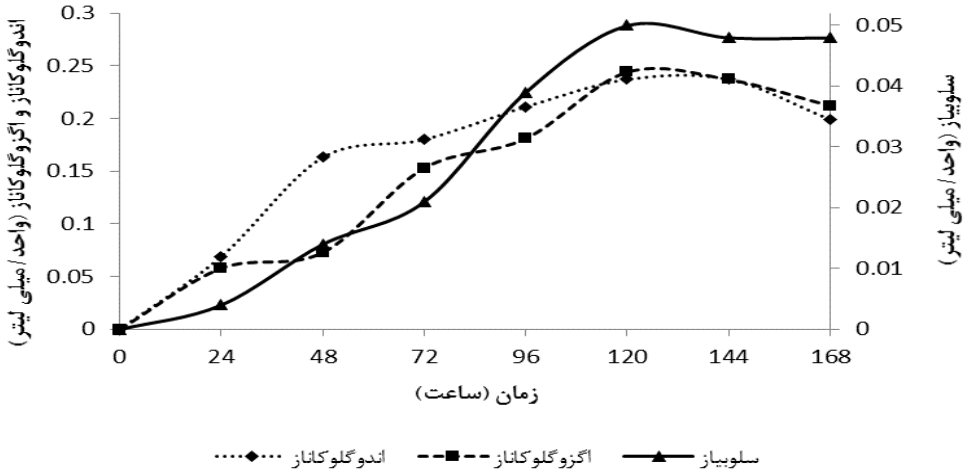
شکل ۱- وزن خشک حاصل از رشد گونه‌های قارچ *Trichoderma* در محیط حاوی آویسل و کربوکسی‌متیل سلولز

بررسی فعالیت سلولازی: جهت تعیین بهترین سویه از میان ۷ قارچ تهیه شد و فعالیت آنزیم‌های سلوبیاز، اگزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز بررسی شدند (شکل ۲). با توجه به نتایج به‌دست‌آمده مشخص شد که سویهٔ *T. parceramosume* با داشتن فعالیت اندوگلوکانازی ۰/۱۸۲ واحد در میلی‌لیتر فعالیت اگزوگلوکانازی ۰/۵۳۸ واحد در میلی‌لیتر و فعالیت سلوبیازی ۰/۱۰۹ واحد در میلی‌لیتر به‌عنوان سویه‌ای که بالاترین فعالیت را در هر سه آنزیم داشت انتخاب شد. نتایج حاصل از فعالیت سلولازی در (شکل ۲) نشان داده شده است.



شکل ۲- فعالیت زیرواحدهای مختلف آنزیم سلولاز حاصل از رشد گونه‌های مختلف جنس *Trichoderma*

روند تولید آنزیم سلولاز توسط سویهٔ *T. PTCC 5140 parceramosume* در محیط تولید آنزیم: به‌منظور تعیین بهترین زمان جهت سنجش فعالیت آنزیمی، روند تولید آنزیم در روزهای مختلف بررسی شد. برای این منظور میزان فعالیت آنزیم‌های اندوگلوکاناز، اگزوگلوکاناز و سلوبیاز در ۱ میلی‌لیتر محیط کشت در زمان یک دقیقه برای هر سه آنزیم و به‌صورت روزانه تعیین شد.



شکل ۳- تولید آنزیم اندوگلوکاناز، اگزوگلوکاناز و سلوبیاز توسط سویهٔ *T. parceramosume PTCC 5140*

نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که تولید آنزیم اندوگلوکاناز، ۲۴ ساعت پس از تلقیح اسپورها در محیط مندل شروع شد و با گذشت زمان افزایش یافت. حداکثر میزان تولید آنزیم اندوگلوکاناز در روز ۵ به ۰/۲۳۷ واحد در میلی‌لیتر رسید و از روز ۷ به بعد به‌تدریج کاهش نشان داد (شکل۳). تولید آنزیم اگزوگلوکاناز نیز ۲۴ ساعت پس از تلقیح اسپورها در محیط مندل شروع شد. حداکثر میزان تولید آنزیم اگزوگلوکاناز در روز ۵ به‌میزان ۰/۲۴۴ واحد در میلی-لیتر اندازه‌گیری شد و از روز ۷ به بعد به‌تدریج کاهش یافت (شکل۳). تولید آنزیم سلوبیاز ۲۴ ساعت پس از تلقیح اسپورها در محیط مندل شروع شد و حداکثر میزان تولید آنزیم سلوبیاز در روز ۵ به‌میزان ۰/۰۵ واحد در میلی‌لیتر به دست آمد و پس از روز ۷ به‌تدریج کاهش یافت (شکل۳).

انتخاب سویهٔ برتر جهش‌یافته: پس از رسم نمودار درصد بقا و به‌دست‌آوردن معادله، ۵۳ دقیقه زمانی است که در آن ۹۹/۹۹ درصد سویه‌ها تحت‌تأثیر جهش با اسید نیترو از بین می‌روند و سویه‌هایی که در این زمان بر روی پلیت تشکیل کلنی می‌دهند، به احتمال زیاد جهش‌یافته هستند.

در بررسی کیفی فعالیت آنزیم، از میان ۱۰۰ پرگنه جهش‌یافته توسط اسید نیترو، ۲۰ پرگنه که قطر هالهٔ آنها بزرگ‌تر از سویهٔ والد بودند، به‌عنوان سویه‌های برتر انتخاب شدند. بررسی کمّی فعالیت آنزیم نشان داد که فعالیت اندوگلوکانازی و سلوبیازی سویهٔ ۱۹، به‌ترتیب ۲/۸ و ۱۱/۲ برابر و فعالیت اگزوگلوکانازی سویهٔ ۱۰ نسبت به سویهٔ والد ۱/۳ برابر افزایش یافته است (جدول ۲).

جدول ۲- سنجش فعالیت آنزیم‌های اندوگلوکاناز، اگزوگلوکاناز و سلوبیاز سویه‌های جهش‌یافته نسبت به سویهٔ والد

نمونه	اندوگلوکاناز (واحد در میلی‌لیتر)	افزایش فعالیت	اگزوگلوکاناز (واحد در میلی‌لیتر)	افزایش فعالیت	سلوبیاز (واحد در میلی‌لیتر)	افزایش فعالیت
سویه والد	۰/۱۵۶	-	۰/۲۴۳	-	۰/۰۱۳	-
۱	۰/۲۰۲	۱/۲	۰/۱۰۸	-	۰/۰۱۸	۱/۳
۲	۰/۳۹	۲/۵	۰/۲۷۷	۱/۱	۰/۰۰۸	-
۳	۰/۲۷۷	۱/۷	۰/۲۹۱	۱/۱	۰/۰۳۲	۲/۴
۴	۰/۲۷۱	۱/۷	۰/۲۶	۱/۰۶	۰/۰۰۴	-
۵	۰/۳۵۴	۲/۲	۰/۲۴۹	۱/۰۲	۰/۰۰۴	-
۶	۰/۳۱۷	۲	۰/۰۹۲	-	۰/۰۲۱	۱/۶
۷	۰/۲۷۵	۱/۷	۰/۱۵۲	-	۰/۰۴۱	۳/۱
۸	۰/۱۹۹	۱/۲	۰/۰۷۳	-	۰/۰۰۸	-
۹	۰/۳۱۸	۲	۰/۲۳۳	-	۰/۰۴۸	۳/۶
۱۰	۰/۳۰۵	۱/۹	۰/۳۱۶	۱/۳	۰/۰۵۴	۴/۱
۱۱	۰/۳۱۷	۲	۰/۲۶۴	۱/۰۸	۰/۱۴۹	۱۱/۴
۱۲	۰/۳۵۱	۲/۲	۰/۳۰۱	۱/۲	۰/۱۳۶	۱۰/۴
۱۳	۰/۲۵۹	۱/۶	۰/۲۵۸	۱/۰۶	۰/۰۶۸	۵/۲
۱۴	۰/۳۶۱	۲/۳	۰/۳۰۸	۱/۲	۰/۱۱۵	۸/۸
۱۵	۰/۳۳۳	۲/۱	۰/۲۶۹	۱/۱	۰/۰۸۹	۶/۸
۱۶	۰/۳۴۴	۲/۲	۰/۳۰۱	۱/۲۳	۰/۱۲۱	۹/۳
۱۷	۰/۴۲۱	۲/۶	۰/۲۶۱	۱/۰۷	۰/۰۹۴	۷/۲
۱۸	۰/۳۱۳	۲	۰/۲۶۹	۱/۱	۰/۰۵۹	۴/۵
۱۹	۰/۴۵۱	۲/۸	۰/۲۶۵	۱/۰۹	۰/۱۴۶	۱۱/۲
۲۰	۰/۳۷۵	۲/۴	۰/۲۷۴	۱/۱	۰/۰۶۹	۵/۳

براساس نتایج به‌دست‌آمده در جدول ۲، سویه‌های جهش‌یافته ۱۰، ۱۱، ۱۷ و ۱۹ بالاترین میزان تولید آنزیم‌های سلولازی را نسبت به سویهٔ والد نشان می‌دهند.

سنجش پایداری فعالیت آنزیمی در سویه‌های جهش‌یافته و والد: به‌منظور تعیین میزان پایداری فعالیت هر یک از زیرواحدهای آنزیم سلولاز، فعالیت آنزیمی سویهٔ وحشی در ۴ سویهٔ جهش‌یافته و پس از ۱۰ بار کشت مجدد سنجیده شد. نتایج حاصل از میانگین ۱۰ تکرار در جدول ۳ ذکر شده است.

جدول ۳- میانگین سنجش فعالیت آنزیم‌های اندوگلوکاناز، اگزوگلوکاناز و سلوبیاز سویه‌های جهش‌یافته نسبت به سویهٔ والد (۱۰ تکرار)

شماره سویه	میانگین فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز (واحد در میلی‌لیتر)	میانگین فعالیت آنزیم اگزوگلوکاناز (واحد در میلی‌لیتر)	میانگین فعالیت آنزیم سلوبیاز (واحد در میلی‌لیتر)
سویهٔ والد	۰/۲۳۸	۰/۲۴۵	۰/۵۰
۱۰	–	۰/۳۲۰	–
۱۱	–	–	۰/۱۴۹
۱۷	۰/۴۳۸	–	–
۱۹	۰/۴۴۶	–	۰/۱۵۳

سویهٔ جهش‌یافتهٔ ۱۰ با فعالیت اگزوکلوکانازی ۰/۳۲۰ واحد در میلی‌لیتر و سویهٔ جهش‌یافتهٔ شماره ۱۹ با فعالیت اندوگلوکانازی ۰/۴۴۶ واحد در میلی‌لیتر و فعالیت سلوبیازی ۰/۱۵۳ واحد در میلی‌لیتر سویهٔ جهش‌یافتهٔ شماره ۱۷ با فعالیت اندوگلوکانازی ۰/۴۳۸ واحد در میلی‌لیتر و سویهٔ موتانت شماره ۱۱ با فعالیت سلوبیازی ۰/۱۴۹ واحد در میلی‌لیتر به‌عنوان سویه‌های جهش‌یافته انتخاب شدند. نتایج حاصل از پایداری فعالیت آنزیمی نتایج نشان داد که فعالیت اندوگلوکانازی، اگزوگلوکانازی و سلوبیازی در سویه‌های جهش‌یافته پس از ۱۰ بار کشت تغییری نداشته و تولید پایدار آنزیم مشاهده شد (جدول۳).

بحث و نتیجه‌گیری

ترکیبات لیگنوسلولزی به‌فراوانی در طبیعت وجود دارد و به‌عنوان مادهٔ اولیه در تولید صنعتی و انبوه بیواتانول به‌عنوان یک مادهٔ ارزان‌قیمت و تجدیدپذیر، می‌تواند استفاده شود. ترکیب اصلی شیمیایی زیست‌توده در منابع لیگنوسلولزی مختلف، متفاوت است؛ اما به‌طور کلی از ۲۵درصد لیگنین و ۷۵درصد پلیمرهای کربوهیدراتی سلولز و همی‌سلولز تشکیل شده است (۴، ۱۷ و ۱۸).

قبل از استفادهٔ میکروارگانیسم از سوبسترای لیگنوسلولزی، چاره‌ای جز هیدرولیز این ترکیبات جهت تولید قندهای قابلِ‌تخمیر نیست. پیش تیمارهای فیزیکی، شیمیایی، آنزیمی یا ترکیبی از این روش‌ها می‌تواند در آزادسازی قندهای موجود در ساختارهای لیگنوسلولزی به کار برده شود. هیدرولیز آنزیمی به‌دلیل شرایط متعادل از نظر pH و دمای فعالیت، معایب روش‌های رایج مانند هیدرولیز اسیدی یا قلیایی از جمله خوردگی را ندارد، اختصاصیت و بازده در تولید گلوکز بالا است و ترکیبات سمی کمی تولید می‌شود در عین حال باید اشاره کرد که در حال حاضر، قیمت تولید آنزیم‌های میکروبی تجزیه‌کننده بالا است (۴، ۵ و ۱۹). جهت استفاده از سلولز به‌عنوان منبع انرژی، ابتدا سلولز ازطریق هیدرولیز توسط آنزیم‌های سلولاز باید به گلوکز تبدیل شود و سپس به‌وسیلهٔ عمل تخمیر اتانول تولید شود. تولید سلولاز، پرهزینه‌ترین قسمت این فرآیند است به همین سبب کاستن هزینهٔ تولید آنزیم سبب کاهش هزینهٔ نهایی تولید اتانول خواهد شد؛ علاوه بر این، آنزیم سلولاز موارد کاربرد متعدد دیگری نظیر استفاده در صنایع نساجی و صنایع کاغذسازی دارد (۱۷ و ۲۰). میکروارگانیسم‌های سلولیتیک قادر به تجزیهٔ سلولز هستند و عمدتاً در دو گروه قارچ‌ها و باکتری‌ها قرار می‌گیرند. باکتری‌ها در مقایسه با قارچ‌ها آنزیم کمتری تولید می‌کنند و کارایی کمتری در تولید آنزیم دارند. در حال حاضر روش‌های رایج برای بهبود سویه جهت استفاده در صنعت، استفاده از روش‌های فیزیکی و شیمیایی برای ایجاد جهش و مهندسی ژنتیک است. با این حال در گام اول باید سویهٔ والد توانایی مناسبی در تولید آنزیم داشته باشد. قارچ‌های تجزیه‌کنندهٔ سلولز از جمله گونه‌های مختلف جنس‌های *Trichoderma*، *Aspergillus* و *Penicillium* از مهم‌ترین قارچ‌های تولیدکنندهٔ سلولاز هستند و در این میان *Trichoderma* جهت تولید سلولاز در صنعت بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. به همین دلیل در این پژوهش برای اولین بار گونه‌های مختلف جنس *Trichoderma* بررسی شد. در بسیاری از پژوهش‌های انجام‌شده *T. reesei* به‌عنوان سویهٔ برتر در تولید سلولاز معرفی شده است (۸، ۹ و ۱۰). در این تحقیق میزان فعالیت زیرواحدهای آنزیم سلولاز در بین ۷ گونه جنس *Trichoderma* مقایسه شد. نتایج نشان داد که *T. parceramosum PTCC 5140* در

مقایسه با سایر گونه‌ها توانایی بالاتری در تولید آنزیم سلولاز دارد. این سویه با داشتن فعالیت اندوگلوکانازی ۰/۱۸۲ واحد در میلی‌لیتر فعالیت اگزوگلوکانازی ۰/۵۳۸ واحد در میلی‌لیتر و فعالیت سلوبیازی ۰/۱۰۹ واحد در میلی‌لیتر به‌عنوان سویه‌ای که بالاترین فعالیت را در هر سه آنزیم داشت انتخاب شد. بررسی منحنی تولید آنزیم در این سویه نشان داد که تولید آنزیم‌های سلولاز، ۲۴ ساعت پس از تلقیح اسپورها در محیط مندل شروع شد و با گذشت زمان افزایش یافت. حداکثر میزان تولید هر سه آنزیم در روز ۵ و به‌ترتیب به‌میزان ۰/۲۳۷، ۰/۲۴۴ و ۰/۰۵ واحد در میلی‌لیتر به دست آمد و پس از روز ۷ روند کاهشی داشت. این کاهش احتمالاً به‌علت کمبود مواد غذایی به‌خصوص منابع کربنی و درنتیجه تجزیهٔ آنزیم‌های سلولازی توسط آنزیم‌های پروتئازی و مصرف این آنزیم‌ها به‌منظور تأمین رشد سلول است.

استفاده از روش‌های کلاسیک و مدرن جهش‌زایی سویه‌های صنعتی با استفاده از مواد جهش‌زایی شیمیایی و یا روش‌های فیزیکی و مهندسی ژنتیک به‌عنوان مهم‌ترین ابزار بهینه‌سازی و افزایش تولید از زمان‌های گذشته مورد توجه دانشمندان بوده است (۲۱).

چاندرا[۱۰] و همکاران در سال ۲۰۰۹ افزایش تولید آنزیم سلولاز در *T. citrinoviride* را ازطریق جهش‌زایی اتیل، متیل سولفونات و اتیدیوم برماید بررسی کردند. براساس نتایج ارائه‌شده عنوان شد که جهش‌زایی شیمیایی این سویه به‌منظور افزایش تولید سلولاز باعث افزایش ۲/۱۴، ۲/۱۰ و ۱/۷۳ برابری به‌ترتیب در تولید اگزوکلوکاناز، اندوگلوکاناز و سلوبیاز شده است (۲۲). در پژوهش دیگر انجام‌شده توسط ادسول[۱۱] و همکاران در سال ۲۰۰۷ به‌منظور افزایش تولید سلولاز ازطریق جهش‌زایی با اشعهٔ ماوراء بنفش و ترکیب شیمیایی اتیل متیل سولفونات در *Penicillium janthinellum* NCIM 1171 عنوان شد که دو برابر افزایش فعالیت در آنزیم‌های اگزوکلوکاناز و کربوکسی‌متیل سلولاز مشاهده شد (۱۱). براساس نتایج به‌دست‌آمده دراین پژوهش در سویهٔ جهش‌یافته ۱۰، فعالیت آنزیم‌های اندوگلوکاناز، اگزوگلوکاناز و سلوبیاز به‌ترتیب ۱/۹، ۱/۳ و ۴/۱ برابر به‌صورت پایدار افزایش یافت. همچنین افزایش تولید در سویهٔ جهش‌یافته ۱۱ برای این سه آنزیم به‌ترتیب ۲، ۱/۰۸ و ۱۱/۴ برابر بود که بیشترین افزایش تولید آنزیم سلوبیاز را نشان داد. سویهٔ ۱۷ نیز با ۲/۶، ۱/۰۷ و ۷/۲ برابر و سویهٔ ۱۹، ۲/۸، ۱/۰۹ و ۱۱/۲ افزایش تولید را به‌ترتیب در فعالیت آنزیم‌های اندوگلوکاناز، اگزوگلوکاناز و سلوبیاز نشان دادند (جدول ۲). تولید آنزیم‌های سلوبیاز و اندوگلوکاناز در سویهٔ جهش‌یافته ۱۹ و همچنین تولید آنزیم اگزوگلوکانازدر سویهٔ موتانت ۱۰ نسبت به سویهٔ والد تفاوت چشمگیری داشته به همین دلیل دو سویهٔ موتانت ۱۰و ۱۹ به‌عنوان سویه‌های جهش‌یافتهٔ برتر انتخاب شدند (جدول۳). درنهایت نتایج این تحقیق نشان داد که سویهٔ جهش‌یافتهٔ *T. PTCC 5140 parceramosum* می‌توانند به‌عنوان سویهٔ مناسبی جهت استفاده در صنعت مورد توجه قرار گیرد و باعث افزایش بهره‌وری تولید قندهای ساده در مرحلهٔ هیدرولیز آنزیمی ترکیبات سلولزی به‌منظور استفاده به‌عنوان سوبسترای تولید محصولات مختلف در حوزهٔ زیست‌فناوری شود.

References

(1) Chiaramonti D. Bioethanol: role and production technologies. In: *Improvement of crop plants for industrial end uses* (ebook). Springer link; 2007; 209-251.

(2) Hansen AC., Zhang Q., Lyne PW. Ethanol diesel fuel blends a review. *Bioresource technology* 2005; 96(3): 277-285.

(3) Najafi G., Ghobadian B., Tavakoli T., Yusaf T. Potential of bioethanol production from agricultural wastes in Iran. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2009; 13(6-7): 1418-1427.

(4) Naik S., Goud VV., Rout PK., Dalai AK. Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2010; 14(2): 578-597.

(5) Sun Y., Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource technolog* 2002; 83(1): 1-11.

(6) Badger P. Ethanol from cellulose: A general review. *Trends in new crops and new use*, Proceedings of the fifth National Symposium, New Crops and New Uses 2002. 17-21.

(7) Bhat M. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology advances* 2000; 18(5): 355-383.

(8) Taherzadeh MJ., Karimi K. Pretreatment of Lignocellusic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *International Journal of Molecular Science* 2008; 9(9): 1621-1651.

(9) Goyal A., Ghosh B., Eveleigh D. Characteristics of fungal cellulases. *Bioresource Technolog* 1991; 36(1): 37-50.

(10) Schuster A., Schmoll M., Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied microbiology and biotechnology* 2010; 87(3): 787-799.

(11) Adsul MG., Bastawde KB., Varma AJ., Gokhale DV. Strain improvement of *Penicillium janthinellum* NCIM 1171 for increased cellulase production. *Bioresource Technology* 2007; 98(7): 1467-1473.

(12) Ghose TK. Measurement of Cellulase Activities. *Pure and Applied Chemistry* 1987; 59(2): 257-268.

(13) Eveleigh DE., Mandels M., Andreotti R., Roche C. Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnology and Biofuel* 2009; 2(21): 1-8.

(14) Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry* 1959; 31(3): 426-428.

(15) Lott JA., Turner K. Evaluation of Trinder's glucose oxidase method for measuring glucose in serum and urine. *Clinical Chemistr* 1975; 21(12): 1754-60.

(16) Azin M., Noroozi E. Random mutagenesis and use of 2-deoxy-D-glucose as an antimetabolite for selection of α-amylase-overproducing mutants of *Aspergillus oryzae*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 2001; 17(7): 747-50.

(17) Chandel AK., Chan E., Rudravaram R., Narasu ML., Rao LV., Ravindra P. Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal. *Biotechnology and Molecular Biology Review* 2007; 2(1): 14-32.

(18) Hahn-Hägerdal B., Galbe M., Gorwa-Grauslund MF., Lidén G., Zacchi G. Bio-ethanol the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in biotechnology* 2006; 24(12): 549-556.

(19) Carere CR., Sparling R., Cicek N., Levin DB. Third generation biofuels via direct cellulose fermentation. *International journal of molecular science* 2008; 9(7): 1342-1360.

(20) Eggeman T., Elander RT. Process and economic analysis of pretreatment technologies. *Bioresource technology* 2005; 96(18): 2019-2025.

(21) Ghazi S., Azin M., Akhavan sepahi A. Over production of xylanase from *Bacillus mojavensis* by classical mutagenesis. *Biological Journal of Microorganism* 2014; 3(11) :21-36.

(22) Chandra M., Kalra A., Sangwan NS., Gaurav SS., Darokar MP., Sangwan RS. Development of a mutant of *Trichoderma citrinoviride* for enhanced production of cellulases. *Bioresource Technology* 2009; 100(4): 1659-1662.

[1]- Biofules
[2]- EC 3.2.1.4
[3]- CMC
[4]- EC 3.2.1.91
[5]- EC 3.2.1.2
[6]- PTCC
[7]- Avicel
[8]- DNS
[9]- Potato Dextrose Agar (PDA)
[10]- Chandra
[11]- Adsul