دانشکده‌ی علوم
گروه زیست‌شناسی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست‌شناسی- گرایش بیوتکنولوژی میکروبی

عنوان:

جداسازی و شناسایی مولکولی گونه‌های قارچ *Trichoderma* از خاک جنگل‌های شمال ایران و بررسی فعالیت اندوگلوکانازی آن‌ها

استادان راهنما

دکتر احمدرضا بهرامی

دکتر منصور مشرقی

استادان مشاور

دکتر مریم مقدم متین

دکتر حمید روحانی

گردآورنده

الناز باقری ازغدی

تابستان 1392

شکر و سپاس خدا را که بزرگ‌ترین امیدوارم در لحظه لحظه زندگی‌ام است.

خدایا، امید را در مسیری معنوی و روحانی قرار دهد، تا روحم را با تو درآمیزم، و لذت بودن با تو را در لحظه لحظه زندگی‌ام دریابم.

با تقدیر و تشکر شایسته از استادان فرهیخته و فرزانه

جناب آقای دکتر بهروز جناب آقای دکتر مشرقی

صدرکوه بلصبوری مرا راهنمایی نموده و با نکته‌های دلاویز و گفته‌های بلند، صحیفه‌های

سخن را علم‌پرور نمودند و همواره راهنما و راه‌گشایم در اتمام و اکمال این پایان‌نامه بودند.

از استادان مشاور ارجمند

.

سرکار خانم دکتر مقدم متین و جناب آقای دکتر روحانی که دل‌طاهین تحقیق با

رهنمودها و تشویق‌های خود مرا مورد لطف خویش قرار دادند صمیمانه سپاسگزارم.

با تشکر فراوان از استادان محترم

جناب آقای دکتر گلکزیان رهبر کار خانم دکتر بحریه‌ای که با رویی گشاده، پذیرای

بوده‌اند از جرئت داوری این پایان نامه را عهده دار شدند.

تقدیم به پدرم

بزرگ استادکه درس تلاش و زندگی را از او آموخته ام

به مادرم

بانند تکیه گاهم، منظر صبر و مهربانی که هرچه دارم از اوست

دو وجود مقدس که توانشان رفت تا من به قله ای رسم

و موهایشان سپیدی گرفت تا من سپیدروی شوم.

با تشکر فراوان از همسر مهربانم که همواره مشوق، پشتیبان و همگام من

بوده و کمک های شایانی در به ثمر رسیدن این پایان نامه نموده اند.

با تشکر از برادر عزیزم

به پاس محبت بی دریغش که هرگز فروکش نمی کند.

از تمام هم کلاسیهای عزیزم

خانم هانیه مرتضوی ریز، فکری راد، بشارتی، زجلاده، عابدی و آقای سردار آبادی

که در طول این مدت افتخار آشنایی و مصاحبت با آنها را داشتم، به پاس محبت‌های بی دریغشان بینهایت سپاسگزارم.

از همکار خانم پردلی، مسئول آزمایشگاه میکروبیولوژی به خاطر راهنمایی‌های ارزشمندشان کمال تشکر و امتنان را دارم.

از خانم دکتر آزمایشگاه کشت سلول و دانشجویان محترم دکترای

سلولی و مولکولی نهایت تشکر را دارم.

چکیده:

جداسازی و شناسایی مولکولی قارچ *Trichoderma* از خاک جنگل‌های شمال ایران و بررسی فعالیت اندوگلوکانازی آن‌ها

لیگنوسلولز ماده آلی تجزیه پذیری است که جز ساختار اصلی تمام گیاهان می‌باشد. در طبیعت، تجزیه توده زیستی توسط کمپلکس سلولازی میکروارگانیسم‌هایی از جمله قارچ‌ها و باکتری‌ها، صورت می گیرد. این کمپلکس شامل 3 نوع فعالیت آنزیمی اندوگلوکانازی، اگزوگلوکانازی و بتا گلوکوزیدازی می-باشد. *Trichoderma* از قارچ‌های آسکومیست مزوفیل می‌باشد که به طور گسترده در صنعت به عنوان منبع تولید سلولاز استفاده می‌شود. این قارچ توسط محیط اختصاصی الاد و چت جداسازی و در محیط کشت اختصاصی سلولز، قادر به ترشح آنزیم‌های سلولازی می‌باشد. هدف این مطالعه جداسازی و شناسایی ریخت‌شناسی و مولکولی گونه‌های مختلف *Trichoderma* از خاک جنگل‌های شمال ایران و بررسی فعالیت سلولازی آنهاست. برای دستیابی به این هدف سوسپانسیون خاک‌های مناطق مختلف در محیط کشت اختصاصی الاد وچت کشت داده شد. پس از آن بررسی کیفی فعالیت سلولاز با معرف قرمز کنگو انجام گرفت. به این ترتیب 4 جدایه CDT1، CDT2، CDT3 و CDT4 جداسازی و بررسی کمّی فعالیت اندوگلوکانازی، اگزوگلوکانازی و FPase به روش FPA بر روی آنها انجام شد. جدایه‌ی CDT1 بالاترین فعالیت اندوگلوکانازی و اگزوگلوکانازی و FPase را به ترتیب به میزان 3/6331 U/ml و0/7418 U/ml و 1/2197 را در مقایسه با سایر جدایه‌ها نشان داد. تعیین توالی بخشی از 18S rDNA نشان داد که این جدایه بیشترین شباهت را به جنس *Hypocera lixii* دارد. با توجه به فعالیت بالای اندوگلوکانازی این جدایه، همسانه‌سازی ژن مربوطه حائز اهمیت می‌باشد.

واژگان کلیدی: *Trichoderma*، سلولاز، سنجش فعالیت آنزیم، 18S rDNA

فهرست

فصل اول:کلیات

1-1 ساختار لیگنوسلولز 2

1-1-1 سلولز 2

1-1-2 همی سلولز 3

1-1-3 لیگنین 3

1-2 سلولز کریستالی شده 4

1-3 تیمار مواد لیگنوسلولزی به منظور تجزیه بهتر توسط آنزیمها 4

1-3-1 تیمار فیزیکی 4

1-3-1-1 مکانیسم خرد شدن 4

1-3-1-2 تجزیه حرارتی 4

1-3-2 تیمار فیزیکی- شیمیایی 5

1-3-2-1 انفجار بخار 5

1-3-2-2 انفجار فیبر آمونیاک 6

1-3-3 تیمار شیمیایی 6

1-3-3-1 اوزون دار کردن 6

1-3-3-2 هیدرولیز اسیدی 7

1-3-3-3 هیدرولیز قلیایی 7

1-3-4 تیمار بیولوژیکی 8

1-4 کمپلکس سلولاز 9

1-4-1 اندوگلوکانازها 11

1-4-2 سلوبیوهیدرولاز ها 12

1-4-3 بتا گلوکوزیدها 12

1-5 همی‌سلولازها 14

1-6 لیگنینازها 15

1-7 قارچ های تولید کننده آنزیم های لیگنوسلولزی 15

1-8 سلولوزوم، سلولازهای غیر آزاد در میکروارگانیسم های بی هوازی 18

1-9 سلولازها با عمکرد آزاد (free acting celluloses) 19

1-10 فاکتورهای موثر برای تبدیل زیستی مواد سلولزی 19

1-10-1 فاکتورهای فیزیکی 19
1-10-1-1 pH 19
1-10-1-2 دما 20
2-10-1 فاکتورهای شیمیایی 20
1-2-10-1 منبع کربن 20
2-2-10-1 منبع نیتروژن 21
3-2-10-1 منبع فسفر 21
4-2-10-1 ترکیبات فنولی 21
5-2-10-1 قندها 22
6-2-10-1 سلولاز 22
11-1 گلیکوزیلاسیون 23
12-1 مهار محصول نهایی از فعالیت سلولاز 24
13-1 القاگر های تولید سلولاز 25
14-1 روش های بیوشیمیایی برای شناسایی آنزیم سلولاز 27
15-1 جنبه های بیوتکنولوژی برای تبدیل زیستی لیگنوسلولز 28
1-15-1 کشت همزمان 28
2-15-1 جهش‌های ژنتیکی 28
3-15-1 ژنوم میکروارگانیسم های سلولیتیک 29
16-1 *T.reesei* مهمترین قارچ سلولیتیکی 30
17-1 تولید کنندگان صنعتی آنزیم سلولاز 31
18-1 کاربرد سلولاز 33
1-18-1 صنایع کشاورزی 34
2-18-1 صنعت نساجی 34
3-18-1 صنایع کاغذسازی 36
4-18-1 صنایع غذایی 37
5-18-1 کاربرد سلولاز در تولید بیواتانول 37
19-1 تولید لیگنوسلولز از ضایعات زیستی و تبدیل به مواد با ارزش 38
فصل دوم: مواد وروش‌ها
مواد و تجهیزات مورد استفاده 41

2-1 مواد و وسایل مورد استفاده 41
2-2 استریل کردن وسایل 44
2-3 تهیه محیط کشت 45
2-3-1 محیط کشتPDA 45
2-3-2-محیط کشت PDA به منظور تک اسپورسازی 45
2 -3-3 محیط کشت اختصاصی دارای سلولز و فاقد عصاره مخمر 46
2-3-3-1 محیط سلولزی جامد 46
2-3-4 محیط سلولزی مایع 47
2-3-5 محیط کشت الاد وچت 47
2-4 روشهای تهیه محلولهای مورد نیاز 48
2-4-1 TBE (5X) 48
2-4-2 EDTA (pH=8 ، 0/5 M) 49
2-4-3 بافر PBS 49
2-4-4 بافر تخریب 49
2-4-5 SDS 50
2-4-6 آمپی‌سیلین 50
2-4-7 محلول تک اسپور سازی 50
2-4-8 رنگ قرمز کنگو 50
2-4-9 بافر سیترات 50
2-4-10 معرف DNS 51
2-4-11 اتیدیوم برماید (10 mg/µl) 51
2-5 تهیه ژل آگارز 1/2% 51
2-6 نگهداری و کشت قارچها 52
2-6-1 کشت 52
2-6-2 واکشت کلنی‌ها 52
2-6-3 تک اسپورسازی 53
2-7 بررسی ریخت‌شناسی قارچها 53
2-8 تهیه‌ی کلکسیون قارچی 54
2-8-1- کلکسیون سازی با گلیسرول 54

2-8-2 کلکسیون سازی با ماسه 54
2-9 سنجش فعالیت سلولازی 54
2-9-1 سنجش کیفی فعالیت بتا 1 و 4 اندوگلوکانازی با استفاده از رنگ قرمز کنگو 54
2-9-2 سنجش فعالیت سلولازی به روش Fiter Paper Assay 55
2-9-2-1 کشت در محیط مایع اختصاصی سلولز و تولید آنزیم 55
2-9-2-2 رسم منحنی استاندارد گلوکز 55
2-9-2-3 سنجش فعالیت آنزیمی جدایه ها 56
2-10 محل و شرایط جمع آوری و نگهداری خاک 57
2-11 جداسازی قارچ *Trichoderma* با استفاده از روش مستقل از کشت 58
2-11-1 نحوه استخراج DNA به دو روش متفاوت 58
2-11-1-1 روش استخراج DNA از کشت مایع 58
2-11-1-2 استخراج DNA از میسیلیومهای قارچ 1 58
2-11-1-3 روش استخراج DNA از میسلیومهای قارچ 2 59
2-12 انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز 60
2-12-1 مواد مورد نیاز 60
2-12-2 انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز با آغازگرهای مخصوص 18s rDNA مربوط به قارچها 60
2-13 الکتروفورز محصول نهایی 62
2-14 تعیین توالی 62
2-15 بررسی قرابت نتایج حاصل از BLAST بر اساس ساختار ژنتیکی 63
2-16 انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز نمونه با آغازگر دژنره مخصوص ژن eg1 64
2-17 استخراج DNA از ژل 65

فصل سوم: نتایج

3-1 رشد قارچهای *Trichoderma* در محیط الاد و چت و خالص سازی کلنی‌ها 68
3-2 سنجش فعالیت 1و4 اندوگوکانازی، اگزوسلولازی و FPase 69
3-2-1 سنجش کیفی فعالیت بتا 1 و 4 اندوگلوکانازی با استفاده از رنگ قرمز کنگو 69
3-2-2 سنجش کمّی فعالیتهای بتا 1 و 4 اندوگلوکانازی، اگزوگلوکانازی و سلولازی به روش Filter Paper Assay 71
3-2-2-1 رسم منحنی استاندارد گلوکز 72
3-3 نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیمی جدایهها 73

4-3 استخراج DNA و انجام واکنش زنجیرهای پلیمراز جهت تعیین توالی 84
5-3 آنالیز بیوانفورماتیکی نتایج حاصل از تعیین توالی 86
6-3 PCR با آغازگر دژنره 88
فصل چهارم: بحث ونتیجه گیری
1-4 انتخاب زیستگاه مناسب جهت جداسازی قارچ *Trichoderma* 91
2-4 انتخاب محیط کشت مناسب 92
3-4 بررسی کیفی و کمّی فعالیت سلولازی 95
4-4 شناسایی مولکولی جدایه‌ها 103
5-4 پیشنهادها 105
منابع ۱۰۶
پیوست 127

فهرست جدول‌ها

جدول 1-1: خصوصیات آنزیم‌های سلولیتیکی 10
جدول 1-2: قارچ‌های تولید کننده انواع آنزیم‌های لیگنوسلولزی و سوبسترای آنها 16
جدول 1- 3: ضایعات لیگنوسلولزی تولید شده از طریق صنایع متفاوت برای تولید اتانول 31
جدول 2-1: مواد و وسایل مورد استفاده 41
جدول 2-2: تجهیزات مورد استفاده 44
جدول 3- 2:مواد ونسبت‌های لازم به منظور تهیه 1000 mlمحیط کشت اختصاصی سلولز فاقد عصاره مخمر 47
جدول 2- 4: محیط کشت اختصاصی الاد وچت 48
جدول 2- 5: رقت های مختلف گلوکز و مقدار گلوکز موجود در هر لوله 56
جدول 2-6: مشخصات آغازگرهای عمومی مورد استفاده در واکنش PCR 61
جدول 2- 7: برنامه زمانی و دمایی PCR برای تکثیر قطعه مورد نظر 61
جدول 2- 8: مشخصات آغازگرهای eg 1F و eg 1R برای تکثیر ژن اندوگلوکاناز 64
جدول 3- 1: معرفی جدایه‌های شناسایی شده و اندازه قطر هاله شفاف آنها 70
جدول 3- 2: رقت‌های مختلف گلوکز وجذب آنها در 540 nm 72
جدول 3- 3: میانگین غلظت گلوکز آزاد شده (mg/ 0/5ml) در اثر فعالیت آنزیم بتا 1 و 4 اندوگلوکاناز هر جدایه 76
جدول 3- 4: میانگین غلظت گلوکز آزاد شده (mg/0/5 ml) در اثر فعالیت آنزیم اگزوگلوکاناز هر جدایه 77

جدول 3- 5: میانگین غلظت گلوکز آزاد شده (mg/0/5 ml) در اثر فعالیت آنزیم FPase هر جدایه..... 78
جدول 3- 6: میانگین فعالیت بتا 1و 4 اندوگلوکانازی به دست آمده (U/ml) برای هر جدایه..... 79
جدول 3- 7: میانگین فعالیت اگزوگلوکانازی به دست آمده (U/ml) برای هر جدایه..... 81
جدول 3- 8: میانگین فعالیت FPase به دست آمده (U/ml) برای هر جدایه 83
جدول 3-11: خلاصه‌ی نتایج حاصل از Blast جدایه‌ها با مشابه‌ترین قارچ‌های ثبت شده در NCBI 87
جدول 3- 12: ویژگی تاکسونومی قارچ *Trichoderma* 87
جدول4-1: خلاصه مطالعات انجام شده.....94
جدول 4-2 نمونه‌ای از فعالیت‌های اندو، اگزو و FPase حاصل از تلاش سایر محققان.....101

فهرست شکل‌ها

شکل 1- 1: طرح شماتیکی از سلولز 3
شکل 1- 2: شکل ساده‌ای از روند هیدرولیز آنزیم سلولاز..... 14
شکل 1- 3: ترکیبات ساختار سلولوزوم باکتری و الگوی جذب آنها روی پیوند سلولزی..... 19
شکل 1- 4: سلوبیوز 27
شکل 1- 5: جنتی‌بیوز 27
شکل 1- 6: سوفورز 27
شکل 1- 7: تیوسلوبیوز 27
شکل 1- 8 تیوجنتی‌بیوز..... 27
شکل 1- 1: حذف آنزیمی جوهر از ضایعات کاغذی 31
شکل 3- 1: برخی از قارچ‌های *Trichoderrma* جداسازی شده و تک اسپور شده در ابعاد ماکروسکوپی و میکروسکوپی با بزرگنمایی 25 برابر 68
شکل 3- 2: بررسی کیفی فعالیت بتا 1 و4 اندوگلوکاناز جدایه‌های CDT1، CDT2 ، CDT3 و CDT4 و همچنین جدایه CDT5 مشکوک به *T. reesei* به کمک قرمز کنگو..... 72
شکل 3- 3: کشت اختصاصی در محیط مایع به منظور بدست آوردن پروتئین‌های ترشحی موجود در محیط کشت 76
شکل 3-4 لوله‌های استاندارد گلوکز و شاهد پس از اضافه کردن DNS و انکوباسیون در حمام آب جوش و یخ.....77
شکل 3-5 منحنی استاندارد گلوکز.....78
شکل 3- 6: منحنی جذب هر نمونه طی 10 روز سنجش فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز 74

شکل 3- 7: منحنی جذب هر نمونه طی 10 روز سنجش فعالیت آنزیم اگزوگلوکاناز. 74
شکل 3- 8: منحنی جذب هر نمونه طی 10 روز سنجش فعالیت آنزیم FPase 75
شکل 3- 9: منحنی مقدار گلوکز آزاد شده در نتیجه‌ی فعالیت آنزیم بتا 1 و 4 اندوگلوکاناز در هر جدایه..... 76
شکل 3- 10: منحنی مقدار گلوکز آزاد شده در نتیجه‌ی فعالیت آنزیم اگزوگلوکاناز در هر جدایه 77
شکل 3- 11: منحنی مقدار گلوکز آزاد شده در نتیجه‌ی فعالیت آنزیم FPase در هر جدایه 78
شکل 3- 12: میزان فعالیت بتا 1 و 4 اندوگلوکانازی چهار جدایه 80
شکل 3-13 اعداد داده شده میانگین و انحراف معیار فعالیت بتا 1و4 اندوگلوکانازی 4 جدایه ونمونه استاندارد..... 80
شکل 3- 14: میزان فعالیت اگزوگلوکانازی چهار جدایه 81
شکل 3-15 اعداد داده شده میانگین و انحراف معیار فعالیت اگزوگلوکانازی 4 جدایه ونمونه استاندارد..... 82
شکل 3- 16: میزان فعالیت FPase، چهار جدایه 82
شکل 3-17 اعداد داده شده میانگین و انحراف معیار فعالیت FPase 4 جدایه و نمونه استاندارد..... 84
شکل 3- 18: واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن 18S rDNA مربوط به جدایه CDT1 با آغازگرهای عمومی قارچ‌ها 85
شکل 3-19 واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن 18 S rDNA مربوط به جدایه CDT1 با آغازگرهای عمومی قارچ‌ها..... 85
شکل 3-20 واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن 18S rDNA مربوط به جدایه CDT1 با آغازگرهای عمومی قارچ-ها..... 86
شکل 3- 21: درخت فیلوژنی مربوط به چهار جدایه‌ی CDT1، CDT2، CDT3 و CDT4 88
شکل 3- 22: واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن سلولاز جدایه CDT1 با آغازگرهای eg 1F و eg 2R..... 89

فصل اول

کلیات

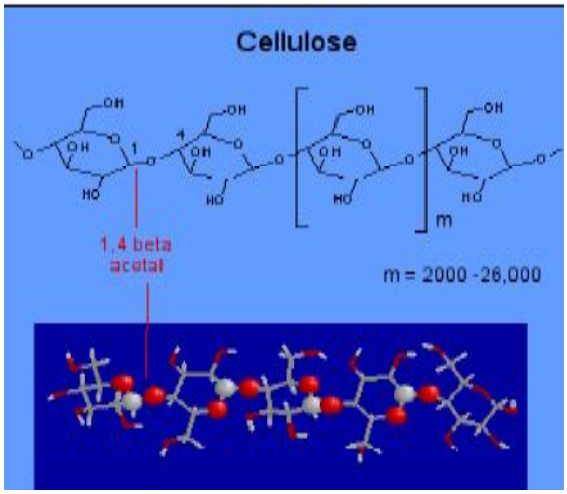
1-1 ساختار لیگنوسلولز

لیگنوسلولز بزرگترین توده زیستی قابل تجدید روی زمین است که با فتوسنتز گیاهان به طور مستقیم از CO2، در سراسر جهان تولید می‌شود و از مهمترین ترکیبات ساختاری در تمام گیاهان است. لیگنوسلولز از سه ترکیب مهم شامل سلولز، همی سلولز و لیگنین تشکیل شده است، علاوه بر این مقادیر کمّی از مواد دیگر از جمله پروتئین و پکتین در باقیمانده‌های لیگنوسلولزی یافت می‌شود. بسیاری از گونه‌های قارچی می‌توانند این ماکرومولکول‌ها را با استفاده از آنزیم‌های اکسیداسیون و هیدرولیتیکی قطعه قطعه کنند و به عنوان منبع کربن استفاده کنند. (Sanchez, 2009).

1-1-1 سلولز

سلولز از مهمترین اجزای گیاهان و از فراوان‌ترین مولکول‌های آلی در روی زمین است. ترکیبات شیمیایی سلولز ساده هستند، اما ساختار فیزیکی آن پیچیده و ناهمگن است. زنجیره بسپار[1] سلولز از بیش از 10000 واحد Dگلوکز تشکیل شده است که با پیوند بتا 1 به 4 گلیکوزیدی به هم متصل می‌شوند. کریستال انفرادی سلولز شامل زنجیره گلوکزی با جهت‌یابی موازی با انتهای احیا کننده در یک سو و انتهای غیر احیا کننده در طرف دیگر آن است. زنجیره‌های سلولز مجاور از طریق باندهای هیدروژنی، میانکنش‌های هیدروفوبی و واندروالسی به هم متصل می‌شوند که منجر به ایجاد ساختار کریستالی سلولز معروف به میکروفیبریل می‌شود (Zhang *et al*, 2006). از ترکیب میکروفیبریل‌ها در کنار هم فیبریل های بزرگتری تشکیل می شود که دارای نواحی بلورین و غیربلورین می‌باشند. سلولز در آب نامحلول است و قدرت کشش بسیار بالایی دارد و در مقایسه با سایر بسپارهای گلوکز نسبت به تجزیه بسیار مقاوم‌تر است. نقش اصلی بسپارهای سلولز استحکام دیواره سلول گیاهی است (Vries and visser., 2011).

[1] polymer



شکل 1-1: طرح شماتیکی از سلولز **(**Ophardt, 2003**)**

2-1-1 همی سلولز

همی‌سلولز در مرتبه دوم از فراوان‌ترین ترکیبات توده زیستی لیگنوسلولزی است، که از بسپارهای ناهمگن پنتوز (شامل زایلوز و آرابینوز)، هگزوز (اساسا مانوز و مقادیر کمّی از گلوکز و گالاکتوز) و اسید-های قندی تشکیل شده است. ترکیبات همی‌سلولز در طبیعت بسیار متنوع و وابسته به منابع گیاهی هستند (Saha, 2000 Himmel *et al*, 2007;).

3-1-1 لیگنین

لیگنین در مرتبه سوم از مهمترین بسپارهای ناهمگن در باقی‌مانده‌های لیگنوسلولزی است، که به طور عمومی از سه الکل آروماتیک شامل کنیفریل، سیناپیل و pکوماریل تشکیل شده است. لیگنین به عنوان مانعی برای اتصال هر آنزیم یا محلول به سلولز و همی‌سلولز عمل می‌کند و از سوراخ شدن ساختار لیگنوسلولزی هنگام اتصال آنزیم‌های لیگنوسلولزی به آن جلوگیری می‌کند. لیگنین از سخت‌ترین ترکیبات لیگنوسلولزی است (Sanchez, 2009 Kim and Dale, 2004;).

2-1 سلولز کریستالی شده

آنالیز انکسار اشعه x آشکار کرد که سلولز از چندین فرم کریستالی تشکیل شده است. آنزیم‌های میکروارگانیسم‌ها در تجزیه فرم کریستالی سلولز ناتوان هستند، در حالی که مناطق آب دوست سلولز بسیار سریع هیدرولیز می‌شوند. حضور لیگنین و همی‌سلولز دسترسی آنزیم‌های سلولازی را به سلولز مشکل می‌کند، بنابراین بازده هیدرولیز پایین خواهد آمد. بر اساس نوع ماده خام انتخاب شده روش‌های تیمار متنوعی برای تجزیه زیستی وجود دارد (Paul and Verma., 1990).

۱-3 تیمار مواد لیگنوسلولزی به منظور تجزیه بهتر توسط آنزیم‌ها

1-3-1 تیمار فیزیکی

کوچک کردن و کاهش سایز ذرات دسترسی میکروارگانیسم‌ها را برای حمله آنزیمی افزایش می‌دهد (Hartree *et al.*, 1987).

1-1-3-1 مکانیسم خرد شدن

آسیاب کردن و خردکردن ضایعات باعث کاهش میزان کریستالیسیته سلولز می شود. گوی‌های آسیابگر متحرک باعث خرد شدن بیشتر ذرات می‌شود. نیروی مورد نیاز به منظور خرد کردن مواد زائد کشاورزی وابسته به اندازه ذرات و خصوصیات توده زیستی ضایعات می‌باشد(Cadoche and opez., 1989).

2-1-3-1 تجزیه حرارتی

تجزیه حرارتی نیز برای تیمار مواد لیگنوسلولزی استفاده می‌شود. برای این منظور مواد در دمای بالاتر از 300 درجه سانتیگراد تیمار می‌شوند، سلولز به سرعت به محصولات گازی (بخار) تجزیه می‌شود و باقیمانده‌ها تبدیل به زغال می‌شوند. در دمای پایین‌تر تجزیه آهسته‌تر انجام می‌شود و بخار محصولات به میزان کمتری حاصل می‌شود. هیدرولیز اسیدی ملایم (1نرمالH_2So_4، 97درجه سانتیگراد، 2.5ساعت)80% تا 85% از سلولز به قندهای کاهش یافته تبدیل می‌شوند که بیشتر از 50% از آنها را گلوکز تشکیل می‌دهند (Fan *et al.*, 1987). این فرایند در حضور اکسیژن افزایش می‌یابد. هنگامی که