بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده‌ی علوم

گروه زیست‌شناسی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست‌شناسی گرایش بیوتکنولوژی میکروبی

عنوان:

جداسازی و شناسایی مولکولی قارچ‌های گرمادوست سلولولیتیک از کود حیوانی و بررسی فعالیت سلولازی آن‌ها

استادان راهنما

دکتر مریم مقدم متین

دکتر منصور مشرقی

استادان مشاور

دکتر احمدرضا بهرامی

دکتر حمید روحانی

ارائه دهنده

شبنم شمع‌ریز

تابستان ۱۳۹۱

تشکر و قدردانی...

ای خوش آن عمر که در خدمت استاد گذشت.

نخستین سپاس به پیشگاه حضرت دوست که هر چه هست از اوست.

سپاس خدای را که سخنوران، در ستودن او بمانند و شمارندگان ، شمردن نعمت‌های او ندانند و کوشندگان، حق او گزاردن، نتوانند. سپاسگزار کسانی هستم که سرآغاز تولد من هستند از یکی زاده می شوم و از یکی جاودانه. استادی که سپیدی را بر تخته سیاه زندگیم نگاشت و مادری که تار مویی از او به پای من سیاه نماند. ارزشمندترین زمان برای نیک اندیشان، لحظه ای است که در محضر استاد می نشینند و از خرمن فضلش خوشه می چینند. فرصتی است مغتنم تا بستایم آنان را که در این سالهای تحصیل به من آموختند چگونه بیاندیشم و چگونه به رسالتی که بر دوش دارم نزدیکتر شوم ، آنان که صبورانه در این فرایند آنچه را نمی دانستم به من آموختند و فرصت اندیشیدن را برایم مهیا ساختند. افتخار دارم صمیمانه ترین سپاس و قدردانی خویش را تقدیم استاد ارجمندی سازم که در طی این دوره توفیق ،رفیق راهم شدند ، تا در حلقه شاگردیشان قرار گیرم و از مراتب علم و دانش شان بهره ها ببرم . در اینجا بر خود واجب می دانم که از استادان محترم سرکار خانم دکتر مقدم متین و جناب آقای دکتر منصور مشرقی به خاطر سعه ی صدر و ارشادات خردمندانه و ارزشمندشان در راهنمایی و به ثمر رسیدن این تحقیق صمیمانه قدردانی و تشکر نمایم . همچنین از استادان فرهیخته جناب آقای دکتر احمد رضا بهرامی و جناب آقای حمید روحانی که مشاورت این پروژه را بر عهده داشتند بینهایت ممنونم و به خود می بالم.

از دو استاد گرانقدر سرکار خانم دکتر معصومه بحرینی و جناب آقای دکتر امیر لگزیان سپاسگزارم که وقت گرانبهایشان را در اختیارم گذاشتند و داوری این پایان نامه را قبول فرمودند.

در پایان از کلیه کسانی که من را در انجام این تحقیق یاری نمودند، به خصوص همکلاسی های عزیزم، دانشجویان کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی ورودی ۸۹ و دوستانم در آزمایشگاه کشت سلول نهایت تشکر را دارم.

برای تمامی این عزیزان از خداوند منان عمری باعزت آرزومندم.

تقدیم به پدر و مادر عزیزم

آنان که اسطوره‌های زندگیم و پناه خستگیم هستند،

و من از نگاهشان صلابت،

و از رفتارشان محبت،

و از صبرشان ایستادگی را آموختم.

پروردگارا؛ نه توان آن دارم موهایشان را که در راه عزت من سفید شد، سیاه کنم و نه برای دست‌های پینه بسته‌شان که ثمره‌ی تلاش برای افتخار من است، مرهمی دارم.

پس توفیقم ده که در هر لحظه شکرگزارشان باشم و ثانیه‌های عمرم را در عصای دست بودنشان بگذرانم.

تقدیم به خواهران عزیزم

به پاس محبت‌های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی‌کند

فهرست اشکال V
فهرست جداول VI
چکیده VII

فصل اول: کلیات

۱-۱ مقدمه ۱
۱-۲ توده زیستی لیگنوسلولزی ۲
۱-۳ تجزیه توده‌زیستی لیگنوسلولزی ۴
۱-۴ آنزیم‌های تجزیه‌کننده سلولز در قارچ‌ها ۴
۱-۴-۱ بتا ۱-۴ اندو گلوکانازها (اندوسلولاز، EC 3.2.1.4) ۵
۱-۴-۲ سلوبیوهیدرولازها (اگزوسلولاز، EC 3.3.1.91) ۶
۱-۴-۳ بتاگلوکوزیدازها (EC 3.2.1.21) ۷
۱-۴-۴ سلولوزوم: کمپلکس سلولازی در قارچ‌های بی‌هوازی ۸
۱-۴-۴-۱ ساختار سلولوزوم ۸
۱-۴-۴-۲ اجزاء سلولوزوم ۹
۱-۴-۵ مکانیسم‌های اکسیداتیو تجزیه سلولز در قارچ‌های آلی ۱۰
۱-۵ قارچ‌های تولید کننده آنزیم‌های لیگنوسلولولیتیک ۱۱
۱-۶ ساختار سلولازهای خارج سلولی ۱۳
۱-۶-۱ شباهت ساختاری بین سلولازها ۱۳
۱-۶-۲ عملکرد دمین انتهایی ۱۴
۱-۷ ژنتیک و ساختار مولکولی سلولازها ۱۴
۱-۸ نقش گلیکوزیلاسیون در عملکرد سلولاز ۱۵
۱-۹ مکانیسم القاء سلولاز در قارچ‌ها ۱۶
۱-۹-۱ القا بوسیله آنالوگ‌های سولفوردار ۱۶
۱-۹-۲ تبدیل سلولز به القاکننده در نتیجه ترانس‌گلوکوزیلاسیون ۱۷
۱-۹-۲-۱تبدیل سلولز به القاکننده‌ها در نتیجه ترانس‌گلوکوزیلاسیون در *Trichoderma* ۱۷
۱-۹-۲-۲ تبدیل سلولز به القاکننده در نتیجه ترانس‌گلوکوزیلاسیون در*Penicillium* ۱۸

۱-۹-۳ مدل‌های القا سلولاز در *P. purpurogenum* و *T. reesei* ۱۹
۱-۹-۳-۱ مدل القا در *T. reesei* ۱۹
۱-۹-۳-۲ مدل القا در *P. purpurogenum* ۲۰
۱-۱۰ روش‌های بهبود تولید، فعالیت و پایداری آنزیم‌های قارچی ۲۱
۱-۱۰-۱ جهش ۲۱
۱-۱۰-۲ کشت همزمان ۲۴
۱-۱۰-۳ بیان هترولوگ سلولازها ۲۵
۱-۱۱ تجزیه زیستی و جنبه‌های بیوتکنولوژیکی تجزیه سلولز به وسیله میکروارگانیسم‌ها ۲۵
۱-۱۱-۱ پیش‌فرآوری ۲۶
۱-۱۱-۲ هیدرولیز ۲۷
۱-۱۱-۳ تخمیر ۲۸
۱-۱۲ کاربردهای صنعتی سلولاز ۳۰
۱-۱۲-۱ صنعت نساجی ۳۱
۱-۱۲-۲ صنعت کاغذ و خمیر ۳۱
۱-۱۲-۳ سوخت زیستی ۳۲
۱-۱۲-۴ صنایع غذایی ۳۳
۱-۱۲-۵ صنایع کشاورزی ۳۴
۱-۱۲-۶ استخراج کارتنوئیدها ۳۵
۱-۱۲-۷ صنایع شوینده و خشکشویی ۳۵
۱-۱۲-۸ مدیریت پس ماند ۳۵
۱-۱۲-۹ تولید محصولات با ارزش شیمیایی از توده‌زیستی لیگنوسلولزی ۳۶
۱-۱۳ اهداف پروژه ۳۶

فصل دوم: مواد و روش ها

۲-۱ مواد و وسایل مورد استفاده ۳۸
۲-۱-۱ مواد مورد استفاده ۳۸
۲-۱-۲ وسایل مورد استفاده ۴۰
۲-۲ استریل کردن وسایل ۴۱
۲-۳ تهیه‌ی محلول‌های مورد استفاده ۴۱

۲-۳-۱ TBE (5X) ۴۱
۲-۳-۲ EDTA (pH=۸ ,۰/۵ M) ۴۱
۲-۳-۳ بافر PBS ۴۲
۲-۳-۴ بافر تخریب ۴۲
۲-۳-۵ SDS ۰/۳ ٪ ۴۲
۲-۳-۶ آمپی‌سیلین ۴۳
۲-۳-۷ محلول تک اسپور سازی ۴۳
۲-۳-۸ رنگ قرمز کنگو ۴۳
۲-۳-۹ بافر سیترات ۴۳
۲-۳-۱۰ معرف DNS ۴۴
۲-۴ تهیه ژل آگارز ۱/۲٪ ۴۴
۲-۵ تهیه‌ی محیط کشت ۴۵
۲-۵-۱ محیط PDA ۴۵
۲-۵-۲ محیط PDA جهت تک اسپورسازی ۴۵
۲-۵-۳ محیط سلولزی جامد ۴۵
۲-۶ نمونه‌گیری، نگهداری و کشت قارچ‌ها ۴۶
۲-۶-۱ بررسی و مقایسه رشد قارچ‌ها و تنوع آن‌ها در محیط‌های مختلف ۴۷
۲-۶-۲ تک اسپورسازی ۴۷
۲-۶-۳ تهیه‌ی کلکسیون قارچی ۴۸
۲-۶-۳-۱ کلکسیون‌سازی با گلیسرول ۴۸
۲-۶-۳-۲ کلکسیون‌سازی با ماسه ۴۸
۲-۷ سنجش فعالیت سلولازی ۴۹
۲-۷-۱ سنجش کیفی با استفاده از رنگ قرمز کنگو ۴۹
۲-۷-۲ سنجش فعالیت آنزیم به روش Fiter Paper Assay ۴۹
۲-۷-۲-۱ کشت در محیط مایع اختصاصی سلولز و بررسی تولید آنزیم ۴۹
۲-۷-۲-۲ رسم منحنی استاندارد گلوکز ۴۹
۲-۷-۲-۳ سنجش فعالیت آنزیمی جدایه‌ها ۵۰
۲-۸ استخراج DNA ۵۱
۲-۸-۱ استخراج DNA از نمونه کود حیوانی ۵۱

۲-۸-۲ استخراج DNA از قارچ ۵۲
۲-۸-۲-۱ تهیه میسلیوم‌های قارچ به منظور استخراج DNA ۵۲
۲-۸-۲-۲ روش استخراج از میسلیوم‌های قارچ ۵۲
۲-۹ انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز ۵۳
۲-۹-۱ مواد مورد نیاز ۵۳
۲-۹-۲ انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز جدایه‌ها با آغازگر rDNA اختصاصی قارچ‌ها ۵۳
۲-۱۰ الکتروفورز محصول نهایی ۵۴
۲-۱۱ تعیین توالی ۵۴
۲-۱۲ بررسی قرابت نتایج حاصل از blast براساس ساختار ژنتیکی ۵۵

فصل سوم: نتایج

۳-۱ خالص‌سازی و تک اسپورسازی قارچ‌های گرمادوست سلولولیتیک از کود حیوانی ۵۸
۳-۲ تهیه کلکسیون قارچی ۵۹
۳-۳ استخراج DNA از نمونه کود حیوانی ۵۹
۳-۴ بررسی رشد روی محیط اختصاصی سلولز فاقد عصاره مخمرو محیط Omeliansky ۵۹
۳-۵ کشت مایع در محیط اختصاصی سلولز ۶۰
۳-۶ سنجش فعالیت سلولازی و بتا ۱ و ۴ اندوگلوکانازی ۶۱
۳-۶-۱ سنجش کیفی فعالیت بتا ۱ و ۴ اندوگلوکانازی با استفاده از رنگ قرمز کنگو ۶۱
۳-۶-۲ سنجش کمّی فعالیت سلولازی و بتا ۱ و ۴ اندوگلوکانازی ۶۲
۳-۶-۲-۱ رسم منحنی استاندارد گلوکز ۶۲
۳-۶-۲-۲ سنجش کمّی فعالیت بتا ۱ و ۴ اندوگلوکانازی ۶۳
۳-۶-۲-۳ سنجش فعالیت سلولازی ۶۶
۳-۷ تهیه میسلیوم‌های قارچ به منظور استخراج DNA ۶۷
۳-۸ استخراج DNA از قارچ و انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۶۸
۳-۹ آنالیز بیوانفورماتیکی نتایج حاصل از تعیین توالی ۶۸

فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری ۷۰

منابع ۷۶

پیوست ۸۸

فصل اول

شکل ۱-۱ سلوبیوز واحد ساختاری سلولز که n بار تکرار می شود ۳
شکل ۱-۲ طرح شماتیکی از سلولز ۳
شکل ۱-۳ ساختار کلی کمپلکس سلولوزوم ۹
شکل ۱-۴ سلولازهای *T. reesei* ۱۳
شکل ۱-۵ مدلی فرضی برای آنزیم‌های سلولولیتیک ۱۵
شکل ۱-۶ مدل القا سلولاز در *T. reesei* ۲۰
شکل ۱-۷ مدل القا سلولاز در *P. purpurgenum* ۲۱
شکل ۱-۸ تأثیر پیش‌فرآوری ۲۶

فصل سوم

شکل ۳-۱ برخی از قارچ‌های جداسازی شده ۵۸
شکل۳-۲ بررسی حضور قارچ‌ها در نمونه کود حیوانی به کمک PCR ۵۹
شکل ۳- ۳ شش جدایه دارای رشد بیشتر و سریع‌تر روی محیط سلولزی فاقد عصاره مخمر و Omeliansky ۶۰
شکل ۳-۴ کشت اختصاصی در محیط مایع به منظور به دست آوردن پروتئین‌های ترشحی موجود در محیط کشت ۶۰
شکل ۳-۵ مشاهده هاله شفاف پس از استفاده از قرمز کنگو اطراف جدایه‌های رشد یافته روی محیط CMC ۶۲
شکل ۳-۶ منحنی استاندارد گلوکز ۶۳
شکل ۳-۷ منحنی جذب هر نمونه در طی مدت سنجش ۶۴
شکل ۳-۸ منحنی مقدار گلوکز آزاد شده از هر جدایه طی مدت سنجش ۶۵
شکل ۳-۹ میزان فعالیت بتا ۱ و ۴ اندوگلوکانازی هر جدایه در فواصل مختلف سنجش و مقایسه آن با فعالیت جدایه‌های دیگر ۶۶
شکل ۳-۱۰ نمودار فعالیت سلولازی ۶ جدایه انتخاب شده ۶۷
شکل ۳-۱۱ باندهای حاصل از PCR با آغازگر rDNA اختصاصی قارچ‌ها ۶۸
شکل ۳-۱۲ بررسی قرابت نتایج حاصل از بلاست براساس ساختار ژنتیکی ۶۹

فصل اول

جدول ۱-۱ مثال‌هایی از قارچ‌های تولیدکننده انواع آنزیم‌های لیگنوسلولولیتیک و سوبسترای آن‌ها ۱۲

فصل دوم

جدول ۲-۱-۱ مواد مورد استفاده ۳۸
جدول ۲-۱-۲ وسایل مورد استفاده ۴۰
جدول ۲-۳ رقت‌های مختلف گلوکز و مقدار گلوکز موجود در هر لوله به میلی گرم ۵۰
جدول ۲-۴ مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در واکنش PCR ۵۳
جدول ۲-۵ برنامه زمانی و دمایی PCR برای تکثیر قطعه مورد نظر ۵۴

فصل سوم

جدول ۳-۱ رقت‌های مختلف گلوکز و جذب آنها در ۵۴۰ نانومتر ۶۲
جدول ۳-۲ میانگین جذب هر جدایه در فواصل مختلف سنجش ۶۳
جدول ۳-۳ میانگین مقدار گلوکز آزاد شده(mg) در اثر فعالیت آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکانازی هر جدایه در فواصل مختلف سنجش ۶۴
جدول ۳-۴ میانگین فعالیت به دست آمده(U/ml) برای هر جدایه در فواصل مختلف اندازه‌گیری ۶۵
جدول ۳-۵ نتایج حاصل از سنجش فعالیت سلولازی به روش FPA ۶۷

چکیده

لیگنوسلولز ماده آلی تجزیه‌پذیری است که جزء ساختاری اصلی تمام گیاهان می‌باشد. در طبیعت، تجزیه توده‌زیستی لیگنوسلولزی، توسط میکروارگانیسم‌هایی مانند قارچ‌ها و باکتری‌ها که قادر به تجزیه این ترکیبات هستند، صورت می‌گیرد. قارچ‌ها با تولید آنزیم‌های لیگنوسلولولیتیک مختلف، نقش بسیار مهمی در تجزیه بقایای سلولزی در طبیعت دارند. تاکنون بیش از ۱۴۰۰۰ گونه قارچی مختلف قادر به تجزیه سلولز جداسازی شده‌اند، اما تنها تعداد کمی از آن‌ها مورد مطالعه دقیق قرار گرفته‌اند. هدف این مطالعه جداسازی و شناسایی مولکولی قارچ‌های گرمادوست سلولولیتیک از کود حیوانی و بررسی فعالیت سلولازی آن‌ها است. بدین منظور از کود حیوانی مرطوب در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد نمونه‌گیری انجام شد. رقت‌های مختلف از نمونه کود مورد نظر تهیه و بر روی محیط کشت اختصاصی سلولز کشت و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از حدود ۴ روز کلنی‌هایی روی پلیت‌ها ظاهر گردیدند که روی محیط کشت عمومی PDA[1] واکشت داده شدند. سپس تک اسپور کردن کلنی‌های خالص‌سازی شده، صورت گرفت تا قارچ‌هایی خالص و حاصل از یک اسپور به دست آیند. سپس توانایی و میزان رشد جدایه‌ها، روی دو محیط اختصاصی دیگر نیز مورد بررسی قرار گرفت. پس از بررسی میزان رشد، ۶ جدایه برای انجام مراحل بعدی آزمایش انتخاب شدند. سپس فعالیت سلولازی به دو روش کیفی و کمّی مورد سنجش قرار گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده، از جدایه های فعال‌تر استخراج DNA صورت گرفت و پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آغازگر rDNA اختصاصی قارچ‌ها، قطعه تکثیر یافته برای تعیین توالی فرستاده شد. با توجه به نتایج حاصل از مقایسه توالی جدایه‌ها با توالی‌های موجود در بانک اطلاعاتی NCBI و نیز سایر اطلاعات موجود در مورد جدایه های مد نظر، به احتمال زیاد می‌توان گفت جدایه CDF5 متعلق به جنس *Paecilomyces* و جدایه CDF6 متعلق به جنس *Thermoascus* می‌باشد.

کلمات کلیدی: قارچ‌های گرمادوست سلولولیتیک، سنجش فعالیت سلولازی، سلولاز، کود حیوانی

[1] Potato dextrose agar

فصل اول

کلیات

۱-۱ مقدمه

دیواره سلولی گیاهان از پلی ساکاریدهای زیادی مانند سلولز، همی‌سلولز، لیگنین و پکتین ساخته شده است. حدوداً ۴×۱۰^{۹} تن سلولز در هر سال تولید می‌شود که بخشی از آن به طور طبیعی به وسیله باکتری‌ها و قارچ‌ها تجزیه می‌شود. این موجودات نقش مهمی در بازگرداندن کربن به اکوسیستم دارند. تجزیه ترکیبات دیواره سلولی گیاهان، فرآیند پیچیده‌ای است که مستلزم فعالیت هم‌افزایی شمار زیادی از آنزیم‌ها است (Sidik, *et al.*, 2011). قارچ‌های رشته ای به کمک این آنزیم‌های تجزیه کننده دیواره سلولی مانند سلولازها، همی‌سلولازها، پکتینازها و لیگنینازها، انرژی و مواد غذایی مورد نیاز را از پلیمرهای زیستی دیواره سلولی گیاهان به دست می‌آورند (Béguin and Aubert, 1994). سلولز فراوان ترین پلیمر زیستی در طبیعت است و جزء اصلی تشکیل دهنده دیواره سلولی گیاهان می‌باشد. سلولز پلیمری از واحدهای قندی گلوکز است که با اتصالات بتا ۱-۴ به هم متصل شده‌اند. در شکل بلورین، زنجیره‌های سلولز از طریق پیوندهای هیدروژنی به هم اتصال یافته و ساختارهای به شدت نامحلولی را ایجاد می‌کنند (Béguin, 1992; Béguin and Aubert, 1994). هیدرولیز کامل سلولز به گلوکز نیازمند فعالیت چندین آنزیم مختلف است که نسبت به سوبستراهای مختلف اختصاصی هستند. سلوبیوهیدرولازها، واحدهای سلوبیوز را از انتهای زنجیره سلولزی آزاد می‌کنند. اندوگلوکانازها، زنجیره سلولزی را از درون، از نواحی بی شکل می‌شکنند تا انتهاهای آزاد بیشتری برای عمل سلوبیوهیدرولازها فراهم کنند. در نهایت بتا گلوکوزیدازها، سلوبیوز را به گلوکز هیدرولیز می‌کنند که به عنوان منبع کربن برای موجودات عمل می‌کند (Teeri, 1997).

افزایش رو به رشد نیاز صنایع به سلولازها، باعث گسترش تحقیقات روی این آنزیم‌ها شده است. بسیاری از صنایع مانند صنایع غذای انسان و حیوان، صنعت کود، صنعت کاغذ و خمیر، صنعت نساجی و ... از سلولازها به طور گسترده استفاده می‌کنند (Cheng and Timilsina, 2011). همچنین با افزایش رو به رو رشد نیاز به انرژی و کاهش منابع انرژی، استفاده از توده‌زیستی لیگنوسلولزی، برای تولید سوخت زیستی به عنوان یک منبع قابل تجدید مدنظر قرار گرفته است. علاوه بر سوخت‌زیستی

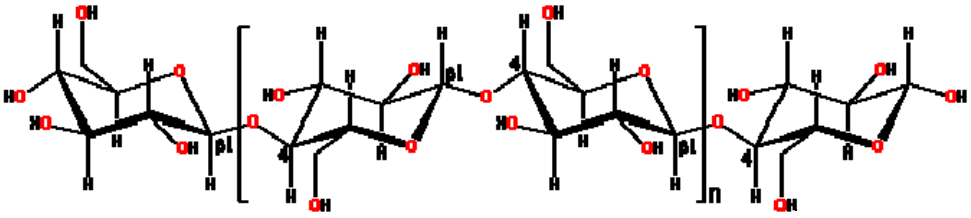
می‌توان با استفاده از تکنولوژی‌های مناسب سایر محصولات با ارزش مانند قندهای قابل تخمیر، اسیدهای آلی، حلال‌ها و ... را نیز از توده‌زیستی لیگنوسلولزی به دست آورد. از نظر تئوری این امر امکان‌پذیر است، اما از دیدگاه تکنولوژی به دلیل نقص‌های مختلف موجود در تکنولوژی کار ساده ای نیست (Kumar, *et al.*, 2008). ریخت‌شناسی پیچیده و ساختار بلورین توده زیستی لیگنوسلولزی، یکی از مشکلات اصلی در فرآیندهای تجزیه و تبدیل زیستی است. تجزیه و تبدیل زیستی سلولز، فرآیندی چند مرحله‌ای است که برای تبدیل کارآمد سلولز به قندهای قابل تخمیر، نیازمند چندین آنزیم می‌باشد. در حالی که هیچ ارگانیسم شناخته شده‌ای قادر به تولید تمام آنزیم‌های ضروری به مقدار کافی نیست (Sun and Cheng, 2002). علاوه بر این، شرایط فیزیکی و شیمیایی مورد نیاز برای جذب آنزیمی و هیدرولیز توده‌زیستی لیگنوسلولزی متفاوت با شرایط بهینه برای تولید زیستی آنزیم‌ها است. در نتیجه روش‌های بیوتکنولوژیکی مختلفی به کار گرفته شده‌اند تا فرآیندهای تجزیه و تبدیل تا حد ممکن از نظر صنعتی بهینه و مقرون به صرفه گردند، هرچند تاکنون موفقیت زیادی حاصل نشده است (Kumar, *et al.*, 2008).

۱-۲ توده زیستی لیگنوسلولزی

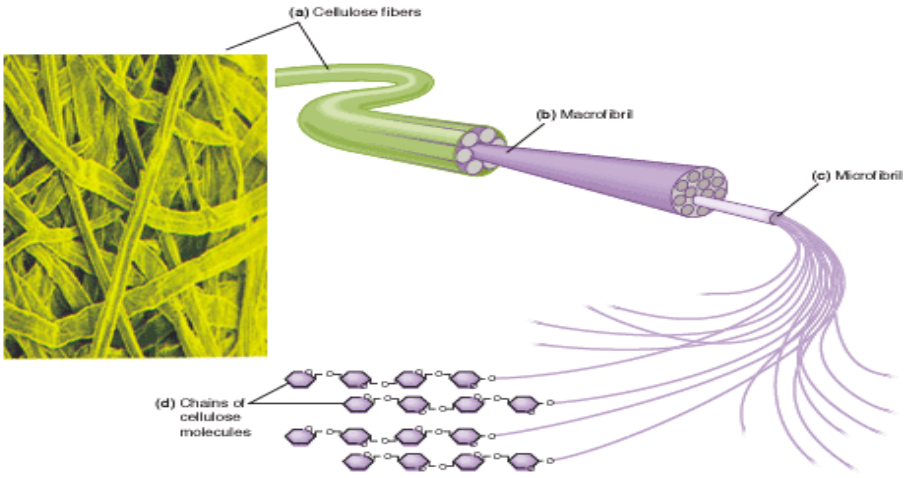
لیگنوسلولز ماده آلی تجزیه‌پذیری است که جزء ساختاری اصلی تمام گیاهان می‌باشد. این توده‌زیستی متشکل از سه پلیمر سلولز، همی‌سلولز و لیگنین است که با نیروهای کووالان و پیوندهای تقاطعی کووالان به طور محکم به یکدیگر متصل شده‌اند. علاوه بر این مقادیر کمی از ترکیبات دیگر مانند پروتئین‌ها و پکتین در ترکیب لیگنوسلولز دیده می‌شود. نسبت وزنی هر یک از پلیمرها بر حسب گونه و سن گیاه و از اندامی به اندام دیگر متفاوت است (Sanchez, 2009).

سلولز جزء اصلی دیواره سلولی گیاهی و فراوان‌ترین ملکول آلی روی کره زمین، پلیمر خطی از واحدهای D-گلوکز است که با پیوندهای گلیکوزیدی بتا ۱-۴ به هم متصل شده‌اند. کوچکترین واحد تکرار شونده در ساختار سلولز، سلوبیوز (حاصل اتصال دو گلوکز با پیوند گلیکوزیدی بتا ۱-۴) است (شکل ۱) (Liu, *et al.*, 2011). جفت شدن زنجیره‌های مجاور و موازی سلولز با یکدیگر به وسیله

پیوندهای هیدروژنی، برهمکنش‌های هیدروفوبیک و نیروهای واندروالس باعث تشکیل ساختارهای بلورینی به نام میکروفیبریل می‌شود. از ترکیب میکروفیبریل‌ها با یکدیگر فیبریل‌های بزرگتری تشکیل می‌گردند که دارای نواحی بلورین و غیربلورین می‌باشند (شکل ۲) (Sukumaran, *et al.*, 2005). سلولز در آب نامحلول است، قدرت کشش بسیار بالایی دارد و در مقایسه با سایر پلیمرهای گلوکز نسبت به تجزیه بسیار مقاوم‌تر است. نقش اصلی پلیمرهای سلولز استحکام دیواره سلولی گیاهی است (Vries and Visser, 2011).



شکل ۱- ۱ سلوبیوز واحد ساختاری سلولز که n بار تکرار می‌شود (Nishiyama, 2009).



شکل ۱- ۲ طرح شماتیکی از سلولز (alevelnotes.com).

۱-۳ تجزیه توده‌زیستی لیگنوسلولزی

ترکیبات لیگنوسلولزی حاصل از فعالیت‌های کشاورزی، جنگلداری و صنعتی، بخش اعظم توده‌زیستی موجود در کلّ جهان را تشکیل می‌دهند. امروزه در کشورهای در حال توسعه (مانند بسیاری از کشورها در گذشته)، این توده‌زیستی با ارزش، جزء مواد زائد در نظر گرفته می‌شود و آلودگی‌های محیطی زیادی را به همراه دارد. تا به حال تلاش‌های زیادی در جهت تبدیل این حجم بالای توده زیستی به محصولات با ارزش مانند مواد شیمیایی، غذای حیوانات و... انجام شده‌است (Dashtban, *et al.*, 2009). همچنین به دلیل افزایش قیمت نفت‌خام، حفظ ذخایر نفتی و مسائل محیطی مانند گرم شدن کره زمین و آلودگی هوا باید به دنبال منابع انرژی جایگزین بود. از آن جا که توده‌زیستی فراوان‌ترین و نیز تجزیه‌پذیرترین ماده زیستی در سیاره ما می‌باشد، باید تکنولوژی‌هایی را توسعه داد که به کمک آن‌ها بتوان از بیلیون‌ها تن توده‌زیستی در هر سال برای تولید سوخت زیستی استفاده کرد (Béguin and Aubert, 1994). تجزیه توده‌زیستی لیگنوسلولزی توسط میکروارگانیسم‌هایی مانند قارچ‌ها و باکتری‌ها که قادر به تجزیه این ترکیبات هستند، آغاز می‌شود و مستلزم تشکیل پلی-ساکاریدهای بلند زنجیره، اساسا سلولز و همی‌سلولز و هیدرولیز متوالی این پلی‌ساکاریدها به قندهای ۶ کربنه و ۵ کربنه است (Zhou and Ingram, 2001).

۱-۴ آنزیم‌های تجزیه‌کننده سلولز در قارچ‌ها

سلولز پلی‌مر ساده‌ای است و ترکیب شیمیایی پیچیده‌ای ندارد، اما میکروفیبریل‌های بلورین و نامحلولی ایجاد می‌کند که در مقابل هیدرولیز آنزیمی مقاومت می‌نماید (Schwarz, 2001). بسیاری از میکروارگانیسم‌ها شامل باکتری‌ها و قارچ‌ها قادر به تجزیه سلولز هستند (Mandels and Sternberg, 1976). تمام این ارگانیسم‌ها، آنزیم‌های هیدرولیتیک مختلفی تولید می‌کنند که بر یکدیگر تاثیر هم‌افزایی دارند و به‌طور کلی سلولازها نامیده می‌شوند (Schwarz, 2001).

ارگانیسم‌های هوازی، آنزیم‌های خارج سلولی را که دارای دمین اتصال به اشکال مختلف سلولزی هستند، به صورت تک آنزیم تولید می‌کنند (بتا ۱-۴ اگزوگلوکاناز (سلوبیوهیدرولاز)، بتا ۱-۴

اندوگلوکاناز، بتا ۱-۴ گلوکوزیداز) (Cullen and Kersten, 1992). در مقابل ارگانیسم‌های بی‌هوازی یک کمپلکس واحد چند آنزیمی خارج سلولی به نام سلولوزوم دارند که در آن آنزیم‌های مختلف بر روی یک داربست پروتئینی غیرکاتالیتیک قرار گرفته‌اند. سلولوزوم به پوشش سلول و سوبسترا هر دو متصل می‌شود و در نتیجه مجاورت سلول‌ها با سلولز را تسهیل می‌کند (Fontes and Gilbert, 2010).

سلولز موجود در دیواره سلولی گیاهان، به دو دلیل اساسی به راحتی در دسترس سلولازها قرار نمی-گیرد: ۱) سطح در دسترس میکروفیبریل‌های سلولزی کم است، که مانع عملکرد کارآمد سلولازها می‌شود. ۲) حضور لیگنین و همی‌سلولز روی سطح سلولز، که مانع دسترسی کارآمد سلولازها به سوبسترا می‌شود (Zhang, *et al.*, 2006).

سلولازها از دو مکانیسم کاتالیتیک مختلف، مکانیسم حفظ و معکوس‌سازی، برای هیدرولیز توده سلولزی استفاده می‌کنند. در هر دو مکانیسم، دو باقیمانده کربوکسیلات کاتالیتیک دخیل هستند و واکنش را با کاتالیز اسید- باز کاتالیز می‌کنند (Dashtban, *et al.*, 2009). اکثر سلولازها دارای مدول اتصال به کربوهیدرات (CBM)[1] هستند که به وسیله یک رابط انعطاف‌پذیر به دمین کاتالیتیک متصل شده‌است. CBM مسئول اتصال آنزیم به سلولز بلورین است، در نتیجه فعالیت آنزیمی را افزایش می‌دهد (Knowles, *et al.*, 1987).

۱-۴-۱ بتا ۱-۴ اندوگلوکانازها (اندوسلولاز، EC 3.2.1.4)

اندوگلوکانازها، که به آن‌ها کربوکسی‌متیل‌سلولازها نیز گفته می‌شود (این نامگذاری پس از استفاده از سوبسترای مصنوعی کربوکسی متیل سلولز به منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی صورت گرفت)، تجزیه سلولز را با حمله به نواحی غیربلورین سلولز آغاز می‌کنند و با تولید انتهاهای آزاد زنجیره آن را برای عمل سلوبیوهیدرولازها آماده می‌نمایند. اندوگلوکانازهای قارچی معمولاً مونومر هستند، گلیکوزیلاسیون کمی روی آن‌ها صورت گرفته است، دارای یک شکاف اتصالی باز هستند، pH بهینه آن‌ها بین ۴ و ۵ و دمای بهینه برای عملکرد آن‌ها بین ۵۰ تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد

[1] Carbohydrate binding module

(Cantarel, *et al.*, 2009). مطالعات نشان داده‌اند که بیشتر قارچ‌ها چند نوع اندوگلوکاناز تولید می‌کنند. برای مثال *Trichoderma reesei* حداقل ۵ نوع اندوگلوکاناز (EGI/Cel7B, EGII/Cel5A, EGIII/Cel12A, EGIV/Cel61A, EGV/Cel45A) تولید می‌کند (Baldrian and Valaskova, 2008; Foreman, *et al.*, 2003). علاوه بر این برخی اندوگلوکانازها فاقد CBM هستند. برای مثال ۴ تا از ۵ اندوگلوکاناز موجود در *T. reesei* شامل EGI، EGII، EGIV و EGV دارای CBM هستند در حالی که EGIII فاقد CBM می‌باشد (Sandgren, *et al.*, 2005).

۱-۴-۲ سلوبیوهیدرولازها (اگزوسلولاز, EC 3.3.1.91)

سلوبیوهیدرولازها، پیوندهای قندی بتا ۱ و ۴ را از انتهای زنجیره سلولزی هیدرولیز می‌کنند و سلوبیوز را به عنوان محصول نهایی تولید می‌کنند (Cullen and Kersten, 1992). سلوبیوهیدرولازها با لوپ‌های گسترده خود تونل اتصال به سوبسترایی را ایجاد می‌کنند که سلولز را احاطه می‌کند (Divne, *et al.*, 1994). این آنزیم‌ها مانند اندوگلوکانازها مونومر هستند، گلیکوزیلاسیون کمی روی آن‌ها صورت گرفته، pH بهینه آن‌ها معمولا بین ۴ و ۵ و دمای بهینه برای عملکرد آن‌ها در محدوده ۳۷ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد (محدوده دمای بهینه سلوبیوهیدرولازها گسترده‌تر از اندوگلوکانازها است) (Cantarel, *et al.*, 2009). سلوبیوز، محصول نهایی سلوبیوهیدرولازها، مهارکننده رقابتی است که توانایی آنزیم‌ها در تجزیه ملکول‌های سلولز را محدود می‌کند. مطالعات نشان داده‌اند که برخی از سلوبیوهیدرولازها از انتهاهای غیراحیایی و برخی دیگر از انتهاهای احیایی زنجیره سلولزی فعالیت خود را آغاز می‌کنند. این امر باعث افزایش هم‌افزایی بین آنزیم‌ها می‌شود. برای مثال CBHII/Cel6A در *T. reesei* از انتهاهای غیراحیایی و CBHI/Cel7A از انتهاهای احیایی شروع به فعالیت می‌کنند در نتیجه تجزیه سلولولیتیک به‌طور مؤثرتری صورت می‌گیرد. علاوه بر این CBM می‌تواند در انتهای کربوکسی یا انتهای آمین قرار داشته باشد. برای مثال در *T. reesei* آنزیم CBHI در انتهای کربوکسی و CBHII در انتهای آمینی مدول کاتالیتیک خود دارای CBM هستند (Baldrian and Valaskova, 2008).

۱-۴-۳ بتاگلوکوزیدازها (EC 3.2.1.21)

بتا گلوکوزیدازها از گونه‌های قارچی مختلفی از جمله آسکومایست‌ها مانند *T. reesei* و بازیدیومایست‌ها مانند قارچ‌های پوسیدگی سفید و قهوه‌ای جداسازی شده‌اند (Henrissat, 1991). بتا گلوکوزیدها با استفاده از مکانیسم حفظ، پیوندهای قندی بتا ۱ و ۴ را هیدرولیز می‌کنند (Dan, *et al.*, 2000). این آنزیم‌ها به واسطه تنوع در ساختمان و محل قرارگیری درون سلول در بین آنزیم‌های سلولولیتیک از بیشترین تنوع برخوردار هستند. در حالی که برخی از بتا گلوکوزیدازها ساختار مونومری ساده با وزن مولکولی حدود ۳۵ کیلودالتون دارند (برای مثال *Pleurotus ostreatus*) (Morais, *et al.*, 2002)، برخی دیگر دارای ساختار دایمر (برای مثال *Sporobolomyces singularis* با وزن مولکولی ۱۴۶ کیلودالتون) (Ishikawa, *et al.*, 2005) و برخی ساختار تریمر با وزن مولکولی بیش از ۴۵۰ کیلودالتون (برای مثال *Pisolithus tinctorius*) (Cao and Crawford, 1993) دارند. بر اساس محل قرارگیری درون سلول، بتا گلوکوزیدازها به سه دسته درون سلولی، محصور در دیواره سلولی و خارج سلولی تقسیم‌بندی می‌شوند. pH بهینه بسته به محل قرارگیری آنزیم متفاوت است، اما محدوده دمای بهینه برای عملکرد آن‌ها بین ۴۵ تا ۷۵ درجه سانتی‌گراد می‌باشد (Cai, *et al.*, 1999).

سلولازهای قارچی در تجزیه سلولز بلورین بر یکدیگر تأثیر هم‌افزایی دارند. هیدرولیز با عمل اندوگلوکانازها که پیوندهای بتا ۱ و ۴ را به طور تصادفی درون رشته سلولزی می‌شکنند، آغاز می‌شود. به دنبال آن‌ها سلوبیوهیدرولازها، سلوبیوز را از انتهای زنجیره سلولزی آزاد می‌کنند. اما این فرضیه ناقص است. مثلاً در *T. reesei* که دارای دو CBHI و CBHII است، اندوگلوکانازها تنها روی پیوندهای بتا ۱-۴ گلیکان‌های محلول فعال هستند، اما سلوبیوهیدرولاز آن بدون همکاری اندوگلوکانازها قادر به تجزیه نواحی به شدت بلورین است (Cullen and Kersten, 1992).

۱-۴-۴ سلولوزوم: کمپلکس سلولازی در قارچ‌های بی‌هوازی

قارچ‌های بی‌هوازی مانند باکتری‌های بی‌هوازی مجموعه‌ای از آنزیم‌های سلولولیتیک و همی‌سلولازها را در کمپلکس چندآنزیمی بنام سلولوزوم تولید می‌کنند. هدف این کمپلکس تجزیه کارآمد پلی-ساکاریدهای دیواره سلولی گیاهان خصوصا سلولز است (Fontes and Gilbert, 2010). سلولوزوم اولین بار در باکتری بی‌هوازی *Clostridium thermocellum* در سال ۱۹۸۳کشف شد (Lamed, *et al.*, 1983) و سپس برای اولین بار در قارچ‌ها، در قارچ بی‌هوازی *Neocallimastix frontalis* در سال ۱۹۹۲ مشاهده گردید (Wilson and Wood, 1992). در باکتری‌های بی‌هوازی، سلولوزوم معمولاً متشکل از ۲۰ یا تعداد بیشتری آنزیم‌های سلولولیتیک و همی‌سلولولیتیک مختلف است. در حالی که در قارچ‌های بی‌هوازی، سلولوزوم از حداقل ۶ یا ۱۰ آنزیم تشکیل شده است (Bayer, *et al.*, 2004). محصول اصلی تجزیه سلولز به وسیله سلولوزوم‌های قارچی، گلوکز است. در نتیجه دیگر نیازی به افزودن بتا گلوکوزیداز نیست. در حالی که محصول اصلی سلولوزوم‌های باکتریایی سلوبیوز می‌باشد (Dijkerman, *et al.*, 1997). علی رغم مزایای زیاد سلولوزوم‌ها، مانند فعالیت هم‌افزایی بین اجزاء و هیدرولیز کارآمد هم سلولز و هم همی‌سلولز، سلولوزوم‌های قارچی در مقایسه با سلولوزوم‌های باکتریایی مورد مطالعه کمتری قرار گرفته‌اند (Dashtban, *et al.*, 2009).

۱-۴-۴-۱ ساختار سلولوزوم

سلولوزوم متشکل از یک زیر واحد چند عملکردی به نام داربست [1] است که مسئول سازمان دهی زیر واحدهای سلولولیتیک مختلف درون کمپلکس است. درون سلولوزوم، اندوگلوکانازها، سولبیوهیدرولازها، گزیلانازها و سایر آنزیم‌های تجزیه‌کننده با تأثیر هم‌افزایی که بر یکدیگر دارند، به سوبستراهای ناهمگن و نامحلول حمله می‌کنند. این حمله با برهمکنش بین دو دسته مدول مکمل که روی دو نوع زیر واحد برهمکنش‌دهنده مجزا قرار گرفته‌اند، انجام می‌شود. یکی از این مدول‌ها، مدول چسبنده [2] است که روی

[1] scaffoldin
[1] cohesin