

تولید آنزیم تاناز توسط شبه گونه‌های تریکودرما (*Trichoderma spp.*) با استفاده از تانن به عنوان تنه‌ها منبع کربن و انرژی

مه‌دی به‌گر^{۱*}، پروین شورنگ^۲، فرحناز معتمدی سده^۲، سمیرا شهبازی^۳

چکیده

آزمایشی بمنظور بررسی تولید آنزیم تاناز توسط قارچ‌های *Trichoderma harzianum* و *Trichoderma viride* در محیط کشت حاوی اسید تانیک انجام شد. کلنی‌ها ابتدا صاف بود و سپس دستجات پشمی سفید رنگ در آنها ظاهر و به مرور سبز رنگ شدند. بزرگترین اسپور مربوط به *T. longibrachiatum* و کوچکترین مربوط به *T. ressei* بود. بیشترین و کمترین تعداد اسپور در محیط کشت MYG به ترتیب مربوط به *T. harzianum* ($5/48 \times 10^6$) و *T. viride* ($2/12 \times 10^6$) بود. بیشترین رشد ریشه در *T. longibrachiatum* و کمترین در *T. ressei* مشاهده شد. پروتئین تولیدی توسط تریکودرما رسئی کمتر از سه گونه دیگر بود ($P < 0/05$). فعالیت ویژه آنزیمی در شبه گونه *T. longibrachiatum* بیشتر از *T. viride* (به ترتیب $1/33$ و $0/68$ واحد به ازای میلی گرم پروتئین) بود ($P < 0/05$). وزن مولکولی پروتئین تولیدی در سوپرناتانت محیط کشت TFM تولیدی ۱۳۱ کیلودالتون با دو زیر واحد به وزن تقریبی ۶۲ و ۶۹ کیلودالتون بود.

واژه‌های کلیدی: آنزیم، فعالیت آنزیمی، قارچ، محیط کشت

۱- استادیار پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، کرج، ایران

* (نویسنده مسئول: mbehgar@aeoi.org.ir)

۲- دانشیار پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، کرج، ایران

۳- استادیار پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، کرج، ایران

مقدمه

آنزیم تاناز (E.C 3.1.1.20) که تانن آسپیل هیدرولاز هم نامیده می‌شود به خانواده هیدرولازها تعلق دارد که باعث هیدرولیز آنزیمی تانن می‌شود. تاناز باندهای موجود در مولکول تانن‌های قابل هیدرولیز و استرهای اسید گالیک را هیدرولیز می‌کند و اسید گالیک آزاد تولید می‌کند (Van-de Lagemaat & Pyle, 2001). اسید گالیک در صنایع غذایی برای سنتز شیمیایی یا آنزیمی ترکیباتی همانند گالات‌ها و پیروگالول‌ها (پروپیل گالات به عنوان یک آنتی اکسیدانت قوی) در نگهداری مواد غذایی و در صنعت دارویی برای سنتز داروهای ضد باکتریایی کاربرد دارند (Aguilar *et al.*, 2007).

از دیگر کاربردهای آنزیم تاناز در صنایع غذایی تهیه چای فوری و تهیه نوشیدنی‌های الکلی است. همچنین در تهیه آب‌میوه‌های طبیعی برای بهبود طعم و مزه مورد استفاده قرار می‌گیرد (Iqbal & Kapoor, 2012). بسیاری از آب میوه‌های طبیعی (همانند انار، قره قاط، تمشک و غیره) که بواسطه مقادیر آنتی اکسیدانت بالا و جلوگیری از بیماری‌ها مورد توجه قرار گرفته‌اند. در این آب میوه‌ها مقادیر بالای تانن باعث کدورت، رسوب و مزه گس می‌شود که با افزایش زمان نگهداری افزایش می‌یابد. بنابراین در این محصولات از استفاده از فرآیند آنزیمی بسیار ضروری است (Aguilar *et al.*, 2007).

در مطالعه‌ای استفاده از تاناز به تنهایی و با استفاده از تاناز در ترکیب با ژلاتین (نسبت ۱ به ۱) در آب انار باعث تجزیه تانن به ترتیب به مقدار ۲۵ و ۴۹ درصد شد (Rout & Banerjee, 2006). در مطالعه مشابهی نیز محققان نشان دادند که استفاده از تاناز تولیدی توسط *T. harzianum* موفق به کاهش ۴۰ درصدی تانن و ایجاد شفافیت در آب انار شد (Kapoor & Iqbal, 2013). در سال‌های اخیر استفاده از این آنزیم علاوه بر استفاده در صنایع غذایی و دارویی، کاربردهای دیگر آن همانند استفاده در پرورش طیور و محیط زیست نیز مورد توجه قرار گرفته است. در مطالعه‌ای افزودن تاناز به خوراک جوجه‌های گوشتی در مقایسه با گروه شاهد باعث بهبود انرژی متابولیسمی ظاهری، ابقای نیتروژن، ابقای ماده خشک، قابلیت هضم چربی و ضریب تبدیل غذایی شد (Abdulla *et al.*, 2016). مطالعاتی نیز در خصوص تجزیه تانن در پساب حاصل از فعالیت دباغی و کاهش مشکلات زیست محیطی آنها انجام شده است (Gammoun *et al.*, 2007).

آنزیم تاناز به روش غوطه‌وری و یا کشت جامد توسط طیف وسیعی از باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها تولید می‌شود. همچنین مطالعات جامعی بر میکروارگانسیم‌های تولیدکننده تاناز انجام شده است (Aguilar *et al.*, 2007). Gammoun *et al.*, (2007). مطالعاتی به منظور شناسایی توانایی تولید برخی گونه‌های قارچی انجام شده و نتایج نشان دادند که بالاترین تولید آنزیم تاناز در *Trichoderma spp.* مشاهده شد در حالی که گونه *T. viride* دارای توان تولیدی متوسطی بود (Bradoo *et al.*, 1996). در مقایسه با سایر گونه‌های قارچی، مطالعات محدودی بر تولید آنزیم تاناز توسط گونه‌های قارچی *Trichoderma spp.* انجام شده است در حالیکه این جنس قارچ‌های خاکزاد، دارای تنوع متابولیتی و آنزیمی بسیار زیادی هستند (Shajitha, & Nisha).

Shajitha,) *T. viride* مانند *Trichoderma spp.* مطالعات نشان داده است برخی از قارچ‌های (Iqbal & Kapoor, 2012; 2018).
(Iqbal & Kapoor, 2012) *T. harzianum* و (& Nisha 2018) به عنوان جدایه های کارآمد تولید تاناز با استفاده از پسماندهای صنایع غذایی به شمار می‌روند و می‌توانند برای طراحی خطوط تولید آنزیم در کارخانجات تولید آبیوم و کنسانتره از مواد پسماندهای خط تولید، قابل توصیه باشند (Kapoorand & Iqbal, 2013).
هدف از این مطالعه بررسی خصوصیات مورفولوژیکی و توانایی تولید آنزیم تاناز توسط قارچ‌های *Trichoderma spp.* در محیط‌های کشت حاوی تانن به عنوان تنها منبع کربنی بود.

مواد و روش‌ها

شبه گونه‌های قارچ *Trichoderma spp.* (شامل *T. viride*، *T. harzianum*، *T. resei* و *T. longibrachiatum*) از نمونه خاک‌های جمع آوری شده از مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد در سال ۱۳۸۹-۱۳۸۸ جداسازی شدند (شهبازی و عسکری، ۱۳۹۷). جدایه‌های *Trichoderma spp.* از طریق رقیق‌سازی سوسپانسیون خاک و کشت روی محیط‌های پیتون رزبنگال و سیب زمینی/دکستروز/آگار بهینه‌سازی شده (Papavizas & Lumsden, 1982)، جداسازی و خالص‌سازی شدند. شناسایی جدایه‌ها نیز بر اساس ویژگی‌های کلنی‌ها، خصوصیات ریخت‌شناسی کنیدیوم‌ها، کنیدیوفرها و فیالیدها با استفاده از کلید شناسایی گامس و بیست انجام شد (Gams et al., 1998). تایید شناسایی شبه گونه‌ها از طریق تعیین ترادف اسیدهای نوکلئیک حاصل از تکثیر با آغازگرهای ITS1 و ITS4، و رسم درخت فیلوژنتیک با استفاده از نرم افزار MEGA6 بر اساس توالی ناحیه ITS1 در قارچ‌های *Trichoderma spp.* در کنار گونه‌های دیگری که از دیگر منابع اطلاعاتی یا بانک‌های ژنی دریافت شده بودند و با استفاده از روش Neighbor-Joining انجام شد (Ghasemi et al., 2019). جدایه قارچ *T. resei* (PTCC ۵۱۴۲) از کلکسیون قارچ و باکتری مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد.

به منظور شناسایی شبه گونه‌ها خصوصیات مورفولوژیک جدایه‌ها شامل شکل کلنی، رنگ کلنی، سرعت رشد میسلیم، و تعداد اسپور روی محیط کشت MYG حاوی مالت، مخمر و گلوکز (حاوی ۵/۰ درصد عصاره مالت، ۲۵/۰ درصد عصاره مخمر، ۱ درصد گلوکز و ۲ درصد آگار) استفاده شد. برای اندازه‌گیری خصوصیات ریخت‌شناسی ابتدا پلاک‌های میسلیم (به عرض و طول ۵ میلی‌متر) از کشت‌های تازه هر یک از جدایه‌های قارچ *Trichoderma spp.* به مرکز ظرف پتری حاوی محیط کشت MYG انتقال داده شد و در دمای 25°C گرمخانه‌گذاری شد. اندازه‌گیری سرعت رشد ریشه (سانتی‌متر/روز) در فواصل ۲۴ ساعت به مدت ۳ روز (۷۲ ساعت) انجام شد. به منظور مقایسه شکل کلنی‌ها و رنگ آنها در جدایه‌های برتر از پلیت‌های MYG کشت شده برای اندازه‌گیری سرعت رشد شعاعی ریشه‌ها استفاده شد و مشخصات کلنی‌ها شامل شکل و رنگ آنها ثبت شد. ابعاد اسپور با استفاده از لام گلبول شمار و بزرگنمایی ۴۰ میکروسکوپ نوری و برای ۱۰۰ اسپور از هر جدایه انجام و میانگین‌گیری شد.

۳۰/ مهدی بهگر و همکاران: تولید آنزیم تاناز توسط شبه گونه‌های تریکودرما (*Trichoderma spp.*)

با اضافه کردن محلول سرم فیزیولوژیک استریل (محلول ۹ گرم در لیتر NaCl) به کشت‌های ۷ روزه جدایه‌های قارچ بر روی محیط سیب‌زمینی-دکستروز آگار (PDA)، سوسپانسیون اسپور تهیه شد. یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور (۱۰^۶) تهیه شده به ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت کامل *Trichoderma spp.* (TCM) حاوی گرم/لیتر: پیتون ۱/۰، اوره ۰/۳، KH₂PO₄ ۲/۰، (NH₄)₂SO₄ ۱/۴، MgSO₄.7H₂O ۰/۳، CaCl₂.H₂O ۰/۳، FeSO₄.7H₂O ۰/۰۰۵، MnSO₄ ۰/۰۰۲، ZnSO₄ ۰/۰۰۲، CoSO₄.7H₂O ۰/۰۰۲) اضافه شد. محیط‌های کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر با دور ۱۸۰ دور در دقیقه قرار گرفت. پس از رشد توده میسلیوم، محیط‌های کشت با استفاده از سانتریفیوژ در دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه حذف و فاز بالایی حذف گردید و فاز پایینی (ریسه قارچ) دوبار متوالی با اضافه کردن یک میلی‌لیتر محلول سرم فیزیولوژیک شستشو شدند و برای اطمینان از عدم حضور نمک ضافی مجدداً با استفاده از سانتریفیوژ در دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه فاز بالایی حذف گردید و میسلیوم به عنوان فاز جامد پایینی جداسازی شد. پس از رشد توده میسلیوم، محیط‌های کشت برای دوبار متوالی شستشو و سانتریفیوژ شد. سپس میسلیوم‌ها برای تولید آنزیم به محیط‌های کشت تخمیری TFM (شهبازی و عسکری ۱۳۹۷) که ۱۰ گرم در لیتر تانن به عنوان تنها منبع کربن به عنوان القاء کننده تولید آنزیم تاناز به آن افزوده شده بود، اضافه شدند و به مدت ۵ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در شیکر انکوباتور با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه گرمخانه گذاری شد. سپس محیط‌های کشت مذکور سانتریفیوژ شد و مایع فوقانی که حاوی ترکیبات پروتئینی (آنزیم تاناز) بود در ادامه کار به منظور سنجش آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت.

فعالیت آنزیم تاناز به وسیله روش اسپکتروفوتومتری اندازه‌گیری شد (Libuchi *et al.*, 1967). برای این کار ۰/۵ میلی لیتر از سوپرناتانت محیط کشت (آنزیم خام) به ۲ میلی لیتر از محلول اسید تانیک ۳۵ درصد (وزنی/حجمی) در بافر سیترات ۰/۰۵ مولار (pH ۵/۵) در لوله‌های آزمایشی اضافه شد. مقدار ۲۰ میکرولیتر از مخلوط واکنش برداشته شد و ۲ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد برای توقف واکنش به آن اضافه شد. جذب در طول موج ۳۱۰ خوانده شد. یک واحد از فعالیت تاناز بر اساس مقدار آنزیمی که برای هیدرولیز ۱ میکرو مول استر در ۱ دقیقه و به صورت واحد در میلی لیتر در دقیقه بیان شد.

برای اندازه‌گیری مقدار پروتئین (Bradford, 1976) ابتدا ۳ میلی لیتر معرف برادفورد (Bradford) را در لوله‌های آزمایش انتقال داده و سپس مقدار ۲۵۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی بدست آمده از مایع فوقانی محیط تخمیر TFM به آن اضافه شد و جذب نوری آن در ۵۹۵ نانومتر قرائت شد. فعالیت ویژه آنزیمی، به صورت مقدار فعالیت آنزیم (U/ml) به مقدار کل پروتئین (μg/ml) موجود در محیط، تعریف شد.

الکتروفورز و تعیین وزن مولکولی آنزیم‌ها

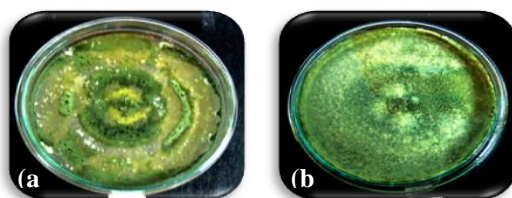
آزمون الکتروفورز (Laemmli, 1970) با استفاده از ژل متراکم کننده ۴ درصد و ژل تفکیک کننده ۱۲/۵ درصد انجام شد. جهت آماده‌سازی پروتئین، ابتدا مقدار ۵ میلی‌لیتر از مایع فوقانی محیط تخمیر TFM با مقدار ۵ میلی‌لیتر از استون سرد (۲۰- درجه سانتی‌گراد) مخلوط شد و رسوب پروتئینی آن با استفاده از سانتریفیوژ در سرعت ۴۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۷ دقیقه جمع‌آوری شد. بعد از خروج استون از نمونه‌ها، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر به آنها اضافه و به خوبی مخلوط شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از بافر نمونه به آنها اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در حمام آب گرم قرار داده شد و به مقدار ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌ها در هر چاهک تزریق شد. آزمون الکتروفورز در شدت جریان ثابت ۲۰ میلی‌آمپر انجام شد و ژل الکتروفورز با استفاده از کوماسی بریلیانت بلو R-250 رنگ آمیزی شد و با استفاده از رنگبر حاوی متانول:اسید استیک:آب به نسبت‌های ۸:۱:۱ رنگبری شد. برای تعیین وزن مولکولی باندهای پروتئینی مجهول از روش تعیین ارزش RF و برازش آن در برابر وزن مولکولی استانداردها تعیین شد.

مقایسه تولید آنزیم تاناز و غلظت پروتئین در محیط کشت توسط *Trichoderma spp.* در قالب طرح کاملاً تصادفی و در نرم‌افزار SAS نسخه ۹ و روش GLM انجام شد. مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون دانکن و در سطح احتمال ۰/۰۱ انجام شد.

نتیجه و بحث

خصوصیات ماکروسکپی و مورفولوژیک

کلنی‌های *Trichoderma spp.* در محیط کشت MYG ابتدا صاف بود و سپس به تدریج دستجات پشمی سفید رنگ در آنها ظاهر و به مرور سبز رنگ شد (شکل ۱ و جدول ۱). رنگ کلنی *Trichoderma spp.* مورد مطالعه سبز روشن، رنگ پشت کلنی‌ها سفید و شکل ظاهری کلنی‌ها صاف بود. تعداد و ابعاد اسپور *Trichoderma spp.* در محیط کشت MYG در جدول ۱ نشان داده شده است. بزرگترین اسپور مشاهده شده مربوط به *T. longibrachiatum* و کوچکترین مربوط به *T. ressei* بود. بیشترین و کمترین تعداد اسپودر در هر میلی‌لیتر محیط کشت به ترتیب در *T. longibrachiatum* ($5/48 \times 10^6$) و *T. viride* ($2/12 \times 10^6$) مشاهده شد.



شکل ۱: ظروف پتری کشت‌های قارچی: (a) *T. viride*، (b) *T. harzianum*، (c) *T. ressei*، (d) *T. longibrachiatum*

جدول ۱: خصوصیات مورفولوژیکی اسپور در *Trichoderma spp.* (در محیط کشت MYG در دمای ۲۵ C°)

شکل کلنی	پشت کلنی	رنگ کلنی	تعداد اسپور در میلی لیتر (×۱۰ ^۶)	ابعاد اسپور (میکرو متر)		جدایه
				عرض	طول	
صاف	سفید	سبز روشن	۲/۱۴	۲/۱۲	۲/۰۹	<i>T. viride</i>
صاف	سفید	سبز روشن	۵/۴۸	۲/۸۴	۲/۹۲	<i>T. harzianum</i>
صاف	سفید	سبز روشن	۳/۶۰	۱/۰۸	۱/۷۸	<i>T. ressei</i>
صاف	سفید	سبز روشن	۲/۱۹	۲/۰۴	۳/۱۹	<i>T. longibrachiatum</i>

سرعت رشد ریشه‌های گونه‌های *Trichoderma spp.* بر حسب سانتی‌متر در روز در جدول ۲ نشان داده شده است. سرعت رشد ریشه در ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تلقیح اسپور در محیط کشت بین گونه‌های مختلف تفاوت معنی‌دار داشت ($P < 0.05$). بیشترین رشد ریشه در *T. longibrachiatum* با ۱/۲۵ سانتی‌متر در روز و کمترین در *T. ressei* با ۰/۴۵ سانتی‌متر در روز مشاهده شد. این روند رشدی در ۷۲ ساعت نیز مشابه بود.

اندازه اسپور *T. harzianum* در محدوده عرض و طول ۲/۵×۲/۵ تا ۳/۰×۳/۰ میکرومتر مربع گزارش شده است با رنگ کلنی سبز تیره، که اسپورهای مشاهده شده در مطالعه حاضر در این محدوده قرار دارد، اما رنگ کلنی در مطالعه حاضر سبز روشن بود (Kannangara et al., 2017). در مطالعه حاضر اندازه اسپور و ریشه در *T. viride* کوچک‌تر از *T. harzianum* بود که مخالف با گزارشات بود، با این حال رنگ کلنی آن مشابه گزارشات بود (Kannangara et al., 2017). در این مطالعه بر خلاف مطالعه حاضر اندازه ریشه در *T. viride* بیشتر از *T. harzianum* بود.

رنگ کلنی *T. longibrachiatum* سبز تیره-زیتونی گزارش شده است (Devi et al., 2012). رنگ کلنی‌های *T. ressei* سبز متمایل به زرد و رنگ پشت کلنی زرد رنگ پریده گزارش شده است (Sekhar et al., 2017). در این مطالعه رشد ریشه در *T. ressei* و *T. viride* مشابه هم و بیشتر از *T. harzianum* بود که مغایر با نتایج مشاهده شده در مطالعه حاضر بود.

خصوصیات مورفولوژیک قارچ‌ها تحت تاثیر عوامل مختلفی همانند نوع محیط کشت (ترکیبات، pH و ...)، مراحل رشدی، شرایط دمایی و حتی جدایه مورد بررسی متفاوت است. تفاوت جدایه‌ای در مورفولوژی قارچ‌ها بسیاری از مطالعات گزارش شده است (Kannangara et al., 2017). گزارش شده است که در *T. harzianum* وجود زیر گونه‌ها (۳، ۴ یا ۵ زیرگونه) با توجه به جدایه مورد بررسی می‌تواند خصوصیات مورفولوژیکی متفاوتی را نشان دهد (Grondona et al., 1997).

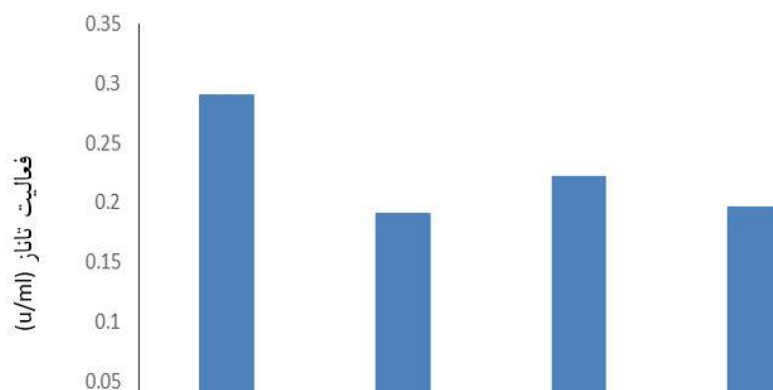
جدول ۲: سرعت رشد میسیلیوم در *Trichoderma spp.* (در محیط کشت MYG در دمای ۲۵ C°)

سرعت رشد شعاعی ریشه (سانتی‌متر/روز)		نام جدایه
۷۲ ساعت	۴۸ ساعت	
$d.0.1 \pm 0.0105$	$c.0.1 \pm 0.0170$	<i>T. viride</i>
$b.0.1 \pm 0.0762$	$b.0.1 \pm 0.090$	<i>T. harzianum</i>
$c.1 \pm 0.07112$	$d.0.1 \pm 0.045$	<i>T. ressei</i>
$a.0.1 \pm 0.075$	$a.0.1 \pm 0.0525$	<i>T. longibrachiatum</i>

حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار آماری در سطح ۰/۰۵ می باشد.

فعالیت آنزیمی، فعالیت ویژه آنزیمی و مقدار پروتئین در محیط کشت

نتایج حاصل از فعالیت آنزیمی (U/ml) در شکل ۲ نشان داده شده است. تفاوت معنی‌داری بین فعالیت آنزیمی شبه‌گونه‌های مختلف *Trichoderma spp.* مشاهده نشد. با وجود این کمترین مقدار فعالیت آنزیمی در *T. ressei* (۰/۱۹ واحد در میلی‌لیتر) و بیشترین مقدار در *T. longibrachiatum* (۰/۲۹ واحد در میلی‌لیتر) مشاهده شد.



شکل ۲: فعالیت آنزیمی تاناز (U/ml) تولید شده در *Trichoderma spp.*

نتایج حاصل از مقدار پروتئین (میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و فعالیت ویژه آنزیمی در سوپرناتانت محیط‌های کشت در جدول ۳ نشان داده شده است. کمترین مقدار پروتئین تولیدی در *T. ressei* (۱۶۶/۳۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در مقایسه با دیگر شبه گونه‌های *Trichoderma spp.* مشاهده شد ($P > 0.05$). به طور عددی *T. longibrachiatum* مقدار پروتئین بیشتری در محیط کشت تولید کرد (۲۳۷/۶۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر). فعالیت ویژه آنزیمی تفاوت معنی‌داری ($P > 0.05$) بین شبه گونه‌ها داشت و در *T. longibrachiatum* بیشترین مقدار (۱/۳۳ واحد در گرم پروتئین) و در *T. viride* کمترین مقدار (۰/۸۶ واحد در گرم پروتئین) بود. مقادیر متوسط از فعالیت آنزیمی در *T. ressei* و *T. harzianum* دیده شد.

جدول ۳: مقدار پروتئین و فعالیت ویژه آنزیمی تاناز در شبه گونه‌های *Trichoderma*

<i>Trichoderma spp.</i>			
<i>T. longibrachiatum</i>	<i>T. ressei</i>	<i>T. harzianum</i>	<i>T. viride</i>
۲۳۳/۱۸±۱۵/۳۸ ^a	۱۶۶/۳۳±۸/۷۴ ^b	۲۳۷/۶۷±۲۱/۶۷ ^a	۲۸۸/۰۰±۱۲/۳۳ ^a
۱/۳۳±۰/۲۰ ^a	۱/۱۶±۰/۱۲ ^{ab}	۰/۹۷±۰/۱۷ ^{ab}	۰/۸۶±۰/۳۵ ^b

حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تمامی قارچ‌های *Trichoderma spp.* مورد استفاده توانایی رشد در محیط‌های کشت حاوی اسید تانیک به عنوان تنها منبع کربن را داشتند. فعالیت‌های آنزیمی مشاهده شده در آزمایش حاضر در محدوده (۰/۸۷-۰/۱۹ واحد در میلی‌لیتر) بود. در داخل کشور مطالعه‌ای در خصوص توانایی تولید آنزیم تاناز توسط *Trichoderma spp.* توسط نگارندگان یافت نشد. همچنین گزارشات اندکی از مطالعه تولید آنزیم تاناز توسط گونه‌های *Trichoderma spp.* در سایر کشورها توسط نگارندگان یافت شد (Shajitha & Nisha 2018; Iqbal & Kapoor, 2012). در مطالعه‌ای (Bradoo et al., 1996) از روش غربالگری سریع با استفاده از محیط‌های کشت جامد حاوی اسید تانیک به عنوان تنها منبع کربن برای بررسی توان تولیدی تاناز در گونه‌های قارچی استفاده کرد و نشان داد قارچ‌های *Aspergillus spp.* دارای توانایی بالا و برخی همانند *Penicillium spp.* و *Trichoderma spp.* دارای توانایی متوسط در تولید تاناز هستند. در این مطالعه مقدار فعالیت آنزیمی *T. viride* و *T. harzianum* به ترتیب ۱/۲۹ و ۹/۵۷ واحد در میلی‌لیتر بود که به خصوص در مورد *T. viride* بیشتر از تاناز تولیدی در آزمایش حاضر بود.

در تحقیقاتی بر *T. harzianum*، محققین (Aguilar et al., 2007) نشان دادند که فعالیت آنزیم تاناز در این قارچ بین ۱۶/۳۶- ۸/۶۱ واحد در میلی‌لیتر متغیر بود. در مطالعه‌ای (Lokeswari et al., 2010) تولید آنزیم تاناز توسط *T. viride* در شرایط مختلف دمایی و pH مورد بررسی و نشان داده شد که فعالیت آنزیمی تاناز تولیدی در بهترین شرایط دمایی کشت (۴۵ درجه سانتی‌گراد) و pH ۵/۵ به ترتیب برابر با ۲۲/۶۴ و ۲۳/۴۶ واحد در میلی‌لیتر بود. در این مطالعه حداقل فعالیت آنزیمی ۱۲/۰ واحد در میلی‌لیتر گزارش شد.

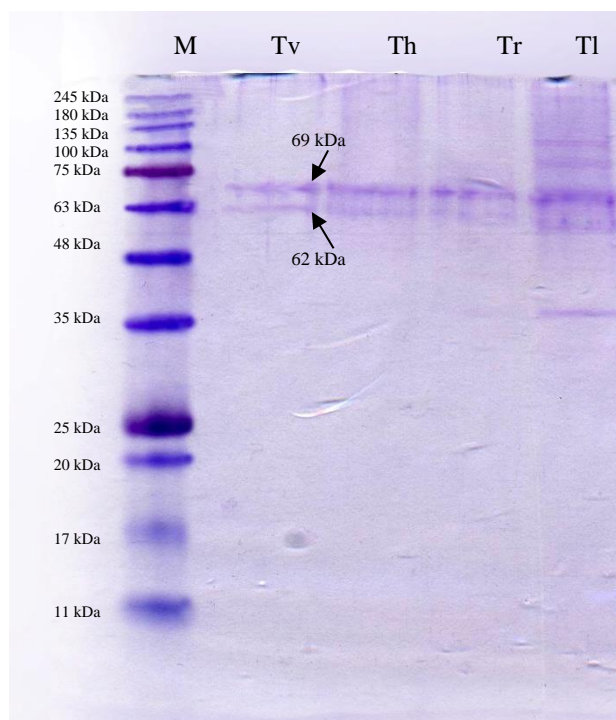
از دلایل اصلی پایین بودن فعالیت تاناز در آزمایش حاضر در مقایسه با دیگر مطالعات می‌تواند عدم استفاده از قندها در محیط کشت باشد. در مطالعه‌ای (Kannan et al., 2010) نشان داده شد که تولید تاناز توسط *Lactobacillus plantarum* در محیط‌های کشتی که تنها از اسید تانیک برای تامین کربن استفاده شد در مقایسه با محیط‌های کشت حاوی گلوکز و گالاکتوز بسیار کمتر و حدود ۰/۷ واحد در میلی‌لیتر بود. به غیر از ترکیب محیط کشت از دیگر عوامل تاثیرگذار بر فعالیت تاناز زمان گرمخانه‌گذاری، درجه حرارت، pH و مقدار سوبستراست که می‌تواند مقدار تاناز تولیدی را تحت تاثیر قرار دهد. در مطالعه‌ای (Iqbal & Kapoor, 2012) تولید تاناز در شرایط کشتی مختلف برای *T. harzianum* مورد بررسی قرار گرفت و بهترین دما و pH به ترتیب ۳۰ درجه سانتی‌گراد و ۵/۵ گزارش شد.

پروفایل پروتئین‌های ترشح شده خارج ریشه‌ای در سوپرناتانت محیط‌های کشت TFM شبه گونه‌های *Trichoderma spp* در شکل ۳ نشان داده شده است. با توجه به وجود تانن به عنوان تنها منبع انرژی در محیط‌های کشت، وزن تاناز تولیدی حدود ۱۳۱ کیلودالتون تخمین زده شد (دو زیر واحد ۶۲ و ۶۹ کیلودالتونی) که در تمامی شبه گونه‌های *Trichoderma spp* مورد مطالعه وجود داشت. دیگر باندهای پروتئینی مشاهده شده در محیط کشت *T. longibrachiatum* می‌تواند به دلیل لیز شدن دیواره سلولی قارچ و در نتیجه ورود دیگر پروتئین‌ها در محیط کشت باشد. زیرا فرآیند لیز شدن و کدر شدن محیط کشت در فلاسک‌های حاوی این شبه گونه در روز پایانی قابل مشاهده بود.

اطلاعاتی در خصوص وزن مولکولی تانازهای تولیدی توسط *Trichoderma spp* توسط نگارندگان یافت نشد. وزن مولکولی تاناز در دیگر میکروارگانیسم‌ها ۵۰ تا ۳۲۰ کیلودالتون است و گزارش شده است که تاناز دارای دو یا تعداد بیشتری زیر واحد است (Chávez-González et al., 2012). در مطالعه حاضر دو زیر واحد با وزن ۶۲ و ۶۹ کیلودالتون مشاهده شد. در مطالعه‌ای (Nadaf et al., 2011) گزارش شد که باکتری *Rhodococcus spp* دو آنزیم تاناز با دو زیر واحد با وزن مولکولی حدود ۶۰ و ۶۲ کیلودالتون تولید می‌کند.

عموماً تاناز تولیدی توسط *Aspergillus spp* نیز دارای چند زیر واحد پپتیدی با وزن مولکولی ۱۶۸ تا ۳۱۰ کیلودالتون گزارش شده است (Sabu et al., 2005; Hatamoto et al., 1996). هاتاموتو و همکاران (Hatamoto et al., 1996) گزارش کردند

که *Aspergillus oryzae* دارای چهار جفت از دو نوع مختلف زیر واحد (۳۰ و ۳۳ کیلودالتون) هستند که با استفاده از پیوندهای دی‌سولفیدی بهم متصل شده‌اند که وزن ۳۰۰ کیلودالتون را ایجاد می‌کنند. در مطالعه‌ای وزن مولکولی تاناز *Aspergillus phoenicis* را ۲۱۸ کیلو دالتون با زیر واحد ۱۲۰ و ۹۳ کیلودالتون گزارش شد (Riul et al., 2013).



شکل ۳: پروفایل پروتئین‌های ترشح شده در روش‌های کشت‌های (*Tv*) *T. viride*، (*Th*) *T. harzianum*، (*Tr*) *T. resei* و (*Tl*) *T. longibrachiatum*.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر برای نخستین بار چهار شبه گونه *Trichoderma spp.* را از نظر تولید آنزیم تاناز، تنها با استفاده با اسید تانیک به عنوان تنها منبع تامین کننده انرژی، مورد بررسی قرار داد که سه جدایه بومی ایران برای نخستین بار جداسازی و شناسایی شدند. نتایج این بررسی نشان داد که هر چهار شبه گونه مورد بررسی توانستند در محیط کشت‌های دارای تانن به عنوان تنها منبع کربنی رشد نموده و آنزیم تاناز تولید کنند. کلیه جدایه‌های جدید جدا شده از خاک در مقایسه با جدایه قارچ *T. resei* (PTCC ۵۱۴۲) تهیه شده توانایی تولید پروتئین و آنزیم تاناز بالاتری داشتند که نشان می‌دهد احتمال دستیابی به جدایه‌های قارچی که کاندید مناسبی برای تولید آنزیم تاناز باشند وجود دارد. این مطالعه اولین گام در غربالگری به منظور دستیابی به چنین منابع ژنتیکی در قارچ‌های ساپروفیت ایرانی بوده است. پروفایل پروتئینی جدایه‌های قارچی مورد بررسی نشان دادند که وزن مولکولی تاناز تولید ۱۳۱ کیلودالتون با دو زیر واحد به وزن تقریبی ۶۲ و ۶۹ کیلودالتون است. با توجه به این که

مطالعات اندکی بر تولید تاناز توسط *Trichoderma spp.* انجام شده است و همچنین از آنجا که برای اولین بار در آزمایش حاضر تولید تاناز در *T. longibrachiatum* و *T. reesei* بررسی شده است، بهینه سازی محیط تخمیر به منظور القای تولید آنزیم تاناز در ادامه مطالعات ضرورت دارد. مطالعه دقیق تر خصوصیات تاناز تولیدی و همچنین تعیین توالی نواحی کد کننده آنزیم در مطالعات آتی نیز باید مورد توجه قرار گیرد.

منابع

- Abdulla, J., Rose S.P., Mackenzie, A.M., Mirza, W. and Pirgozliev, V. (2016). Exogenous tannase improves feeding value of a diet containing field beans (*Vicia faba*) when fed to broilers. *British Poultry Science*, 57: 246-250.
- Aguilar, C.N., Rodríguez, R., Gutiérrez-Sánchez, G., Augur, C., Favela-Torres, E., Prado-Barragan, L.A., Ramírez-Coronel, A. and Contreras-Esquivel, J.C. (2007). Microbial tannases: advances and perspectives. *Applied Microbiology Biotechnology*, 76: 47-59.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Bradoo, S., Gupta, R. and Saxena, R. (1996). Screening of extracellular tannase producing fungi: development of a rapid simple plate assay. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 42: 325-329.
- Chávez-González, M., Rodríguez-Durán, L.V., Balagurusamy, N., PradoBarragán, A., Rodríguez, R., Contreras, J.C. and Aguilar, C.N. (2012). Biotechnological Advances and Challenges of Tannase: An Overview. *Food Bioprocess Technology*. 445-459.
- Devi, P., Prabhakaran, N., Kamil, D., Pandey, P. and Borah, J.L. (2012) Characterization of Indian native isolates of *Trichoderma spp.* and assessment of their bio-control efficiency against plant pathogens. *African Journal of Biotechnology*, 11: 15150-15160.
- Gammoun, A., Moros, J., Tahiri, S., Garriques, S. and Guardia, M. (2006). Partial least-squares near-infrared determination of hydrocarbons removed from polluted waters by tanned solid wastes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385: 766-770.
- Gams, W. and Bissett, J. (1998). Morphology and Identification of *Trichoderma*. In: Kubicek, C.P., Harman, G.E. (Eds.), *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 1. Basic Biology, Taxonomy and Genetics. Taylor and Francis Ltd., London, 3-34.

- Ghasemi, S., Safaie, N., Shahbazi, S., Shams-Bakhsh, M. and Askari, H. (2019). Enhancement of Lytic Enzymes Activity and Antagonistic Traits of *Trichoderma harzianum* Using γ -Radiation Induced Mutation. *Journal of Agricultural Science and Technology*. 21:1035-1048.
- Grondona, I., Hermosa, R., Tejada, M., Gomis, M.D., Mateos, P.F., Bridge, P.D., Monte, E. and Garcia-Acha, I. (1997). Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *Applied Environmental Microbiology*, 63, 3189-3198.
- Hatamoto, O., Watarai, T., Kikuchi, M., Mizusawa, K. and Sekine, H. (1996). Cloning and sequencing of the gene encoding tannase and a structural study of the tannase subunit from *Aspergillus oryzae*. *Gene*, 175: 215-221.
- Iqbal, H. and Kapoor, A. (2012). Culture Conditions for the Production of Tannase from *Trichoderma harzianum* MTCC 10841. *International Journal of Science and Technology*, 1: 584-595.
- Kannan, N., Aravindan, R. and Viruthagiri, T. (2010). Effect of culture conditions and kinetic studies on extracellular tannase production by *Lactobacillus plantarum* MTCC 1407. *Indian Journal of Biotechnology*, 10: 321-328.
- Kannangara, S.R., Dharmarathna, M.G.C.S. and Jayarathna, D.L. (2017) Isolation, Identification and Characterization of *Trichoderma* Species as a Potential Biocontrol Agent against *Ceratocystis paradoxa*. *The Journal of Agricultural Sciences*, 12: 51-62.
- Kapoor, A. and Iqbal, H. (2013). Efficiency of Tannase Produced by *Trichoderma Harzianum* MTCC 10841 in Pomegranate Juice Clarification and Natural Tannin Degradation. *International Journal of Biotechnology and Bioengineering Research*, 4: 641-650.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Libuchi, S., Minoda, Y. and Yamada, K. (1967). Studies on tannin acyl hydrolase of microorganisms. Part II. A new method determining the enzyme activity using the change of ultra violet absorption. *Agricultural and Biological Chemistry*. 31: 513-518.
- Lokeswari, N., Jaya Raju, K., Pola, S. and Bobbarala, V. (2010). Tannin acyl hydrolase from *Trichoderma viride*. *International Journal of Chemical and Analytical Science*, 1: 106-109.
- Nadaf, N.H. and Ghosh, J.S. (2011). Production, Purification and Characterization of Tannase from *Rhodococcus* NCIM 2891. *Current Research Journal of Biological Sciences*, 3: 246-253.

- Papavizas, G.C. and Lumsden, R.D. (1982). Improved medium for isolation of *Trichoderma* spp. from soil. *Plant Disease*, 66: 1019-1020.
- Riul, A.J., Gonc, H.B., Goncalves, H.B., Jorge, J.A. and Guimaraes, L.H.S. (2013). Characterization of a glucose- and solvent-tolerant extracellular tannase from *Aspergillus phoenicis*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 85: 126-133 .
- Rout, S. and Banerjee, R. (2006). Production of tannase under mSSF and its application in fruit juice debittering. *Indian Journal of Biotechnology*, 5: 351-356.
- Sabu, A., Kiran, G.S. and Pandey, A. (2005). Purification and characterization of tannin acyl hydrolase from *Aspergillus niger* ATCC 16620 *Food Technology and Biotechnology*, 43: 133-138.
- Shahbazi, S. and Askari, H. (2017) Investigating of the Influence of Cellulase Enzymes from Mutated Isolates of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* on Biodegradation of Cellulose I α , I β and III. *Agriculture Biotechnology*, 17: 35-44.
- Sekhar, Y.C., Ahammed, S.K., Prasad, T.N.V.K.V. and Devi, R.S.J. (2017). Identification of *Trichoderma* species based on morphological characters isolated from rhizosphere of groundnut (*ARACHIS HYPOGAEA* L). *International Journal of Science, Environment and Technology*, 6: 2056-2063.
- Shajitha, G. and Nisha, M.K., 2018. Tannase production from agro-wastes as substrate by *Trichoderma viride*. *International Journal of Current Research in Life Sciences*, 7(05), pp.1994-1997.
- Van-de Lagemaat, J. and Pyle, D.L. (2001). Solid-state Fermentation and Bioremediation: Development of a Continuous Process for the Production of Fungal Tannase. *Chemical Engineering Journal*, 84: 115-123 .

Tannase Production by *Trichoderma* Species in Tannin Containing Medium as a Sole Carbon and Energy Source

M. Behgar¹, P. Shawrang², F. Motamedi Sedeh², S. Shahbazi³

Received:2021.1.22

Accepted:2021.3.15

Abstract

This study investigated tannase production by *Trichoderma viride* (*Tv*), *Trichoderma harzianum* (*Th*), *Trichoderma longibrachiatum* (*Tl*) and *Trichoderma reesei* (*Tr*) in the medium containing tannin as the sole carbon and energy source. *Trichoderma* colonies were flat, and then gradually showed a white unsmooth appearance and finally turned to green. The largest and smallest spores were belonged to *Tl* and *Tr*, respectively. The highest and lowest spore numbers in MYG were belonged *Th* (5.48×10^6) and *Tv* (12.26×10^6), respectively. The largest growth rate of mycelium was observed in *Tl* and the lowest in *Tr* (1.25 and 0.45 cm/d, respectively). The level of protein produced in TFM by *Tr* was lower ($P < 0.05$) than the other species. The tannase production and its specific activity were similar across species. The enzyme-specific activity in *Tl* was significantly more ($P < 0.05$) than *Tv* (1.33 and 0.68 ul/mg protein). The molecular weight of the produced tannase was 131 kDa with two subunits weighing approximately 62 and 69 kDa.

Keywords: *Enzyme, Enzyme activity, Fungi, Medium*

1-Assistant Professor, Nuclear Science & Technology Research Institute

*(Corresponding author: mbehgar@aeoi.org.ir)

2-Associate professor, Nuclear Science & Technology Research Institute

3- Assistant Professor, Nuclear Science & Technology Research Institute