

بررسی تاثیر نوع سوبسترا و سویه قارچی تریکودرما ریزی بر تولید سلولاز و اعمال جهش با هدف بهبود تولید آنزیم در سامانه تخمیر حالت جامد

نازنین داراب زاده¹، زهره حمیدی اصفهانی^{1*}، پریسا حجازی²

- 1- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- 2- گروه شیمی، دانشکده مهندسی شیمی، نفت و گاز، دانشگاه علم و صنعت، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: 1396/06/07

تاریخ دریافت: 1395/12/21

چکیده

سلولاز، آنزیمی مرکب شامل اندوگلوکاناز، آگزوگلوکاناز و بتاگلوکوزیداز می باشد که برای آبکافت سلولز استفاده می شود. سومین آنزیم صنعتی بوده و 20 درصد بازار آنزیم جهان را به خود اختصاص داده است. کاربرد وسیعی در صنایع مختلف غذایی و نوشیدنی، سوخت زیستی، کاغذ و پالپ، شوینده ها، غذای حیوان و نساجی دارد. ریزاندامگان مختلف دارای توانایی تولید سلولاز هستند اما، تریکودرما ریزی یکی از مناسب ترین گزینه ها می باشد. از آنجا که کاهش هزینه های تولید، نقش مهمی در کاربردی و صنعتی نمودن فرآیند دارد، کاربرد سوبستراهای ارزان قیمت اهمیت ویژه دارد. لذا در این مطالعه، ضایعات برنج به عنوان سوبسترا مورد بررسی قرار گرفتند. ابتدا تولید سلولاز توسط سه سویه ی تریکودرما ریزی 2414، 2415 و 2416، از طریق آزمون کونگو رد مقایسه شد. نتایج نشان داد تریکودرما ریزی 2414 دارای بیشترین فعالیت تولید سلولاز بود. سپس، کشت روی سوبستراهای سبوس، کاه و پوست برنج به صورت منفرد و ترکیبی انجام شده و با آزمون FPase، ترکیب هر سه سوبسترا با نسبت های یکسان، به عنوان بهترین سوبسترا انتخاب شد. با هدف افزایش فعالیت آنزیمی، تریکودرما ریزی 2414 در معرض تابش پرتو گاما قرار گرفته و جهش داده شد. پس از جهش، ابتدا آزمون کونگو رد انجام شد و دو کلونی انتخاب شدند و سپس میزان فعالیت سلولازی آن ها اندازه گیری شد. نتایج نشان داد یکی از کلونی های جهش یافته به صورت معنی داری، دارای فعالیت FPase بیشتر از سویه مادر بوده و جهش تاثیر معنی دار داشته است. پایداری سویه جهش یافته طی 9 نسل مورد ارزیابی قرار گرفته و تایید شد.

واژه های کلیدی: تریکودرما ریزی، جهش، سلولاز، فعالیت آنزیمی، تخمیر حالت جامد، ضایعات برنج

1- مقدمه

مواد سلولزی، فراوانترین منابع کربنی تجدید پذیر در جهان هستند. برای تبدیل سلولز به واحدهای گلوکز باید آبکافت آنزیمی انجام شود و آنزیم مورد استفاده در این فرآیند، سلولاز می باشد. سلولاز آنزیمی مرکب شامل اندوگلوکاناز، آگزوگلوکاناز و بتاگلوکوزیداز است، که برای آبکافت نمودن سلولز و تبدیل آن به واحدهای گلوکز عمل می کنند (23). این آنزیم سومین آنزیم عمده ی صنعتی در جهان می باشد (21، 34). در سال های اخیر، استفاده از زیست توده به عنوان یک منبع مناسب برای تولید آنزیم ها، مورد توجه قرار گرفته است که از آن جمله می توان از زیست توده سلولولایتیک نام برد که برای تجزیه سلولزها مورد استفاده قرار می گیرند. از این منبع به عنوان مواد کربنی خنثی یاد می شود زیرا مصرف این منابع کربنی منجر به افزایش چشمگیر دی اکسید کربن در هوا نمی شود (22). سلولاز 20 درصد از کل بازار آنزیم جهان را به خود اختصاص داده است. در سال های اخیر به دلیل پیشرفت زیست فناوری توجه زیادی به کاربرد ریزاندامگان های تجزیه کننده سلولز شده است و کاربردهای گسترده ای در صنایع سوخت زیستی، بازیافت کاغذ، استخراج آب میوه، صنایع آبجوسازی، شوینده ها، غذای حیوان، تیمار فاضلاب و صنایع نساجی دارد (25، 32، 34). در حال حاضر سلولاز با روش های زیستی با استفاده از تخمیر باکتریایی یا قارچی تولید می شود. قارچ ها مناسب ترین تولیدکننده های سلولاز هستند زیرا در مقایسه با باکتری ها، یک سامانه سلولازی کامل تولید می کنند، لذا سلولاز تجاری اغلب از دو سویه ی قارچ Soft rot به نام تریکودرما ریزئی و اسپرژیلوس نیجر و با روش تخمیر حالت جامد تولید می شود (8). از آن جا که یکی از ایرادهای سامانه تخمیر غوطه وری، غلظت پایین محصول نهایی می باشد، لذا خالص سازی محصول ضرورت دارد. افزودن فرایند پایین دستی منجر به افزایش هزینه های تولید سلولاز می شود. با توجه به هزینه بر بودن روش تخمیر غوطه وری، محققان برای کاهش هزینه های تولید و افزایش میزان سلولاز تولیدی،

کاربرد سامانه تخمیر حالت جامد را پیشنهاد نمودند (19، 38). این سامانه روش مناسبی برای تولید سلولاز می باشد زیرا محیطی مشابه با شرایط طبیعی قارچ ها فراهم نموده و نیز مقدار آنزیم تولیدی را افزایش می دهد. پژوهش ها برای تولید سلولاز با استفاده از اسپرژیلوس نیجر و تریکودرما ریزئی در سامانه تخمیر حالت جامد با موفقیت گزارش شده است. برای مثال هنگامی که تریکودرما ریزئی روی کاه گندم در سامانه تخمیر حالت جامد کشت داده شد، فعالیت سلولاز 250-430 IU/g به دست آمد که این مقدار در مقایسه با فعالیت حاصله از روش تخمیر غوطه وری (160-250 IU/g)، حدود 72 درصد افزایش نشان داد (8). سامانه تخمیر حالت جامد در غیاب آب آزاد به کار می رود لذا هزینه ی آب گیری در فرایند پایین دستی به مقدار زیادی کاهش می یابد. هزینه تولید در سامانه تخمیر حالت جامد در مقایسه با سامانه تخمیر غوطه وری کاهش می یابد. این مهم به دلیل مصرف انرژی کم تر و کاربرد سوبسترای لیگنوسلولزی مناسب و ارزان قیمت می باشد. سامانه تخمیر حالت جامد مزایای دیگری نیز دارد، برای مثال غلظت آنزیم بالاتر، بهره وری بالاتر تخمیر و نیاز کم تر به سترون کردن تجهیزات را می توان ذکر نمود. همچنین محلول آنزیمی خامی که از سامانه تخمیر حالت جامد به دست می آید را می توان مستقیماً برای آبکافت سوبسترای لیگنوسلولزی به کار برد (29، 38). انتخاب سوبسترای لیگنوسلولزی از فاکتورهای اساسی در تخمیر حالت جامد می باشد. اغلب از ضایعات کشاورزی ارزان قیمت به عنوان سوبسترا استفاده می شود. کاربرد سبوس برنج، سبوس گندم، باگاس، پوست سویا، کاه برنج و چوب ذرت نیز در مطالعات موفقیت آمیز بوده است (14، 17، 19، 29، 31، 36، 39). در رابطه با تولید سلولاز توسط تریکودرما ریزئی مطالعاتی در سامانه تخمیر حالت جامد به منظور انتخاب سویه و سوبسترای مناسب انجام شده است که به تعدادی از آنها اشاره می شود: در سال 1985، تولید سلولاز با استفاده از تریکودرما ریزئی QM9414 و با کاربرد کاه گندم به عنوان سوبسترا انجام شد.

برنج در مزرعه آتش زده می‌شود و منجر به ایجاد مشکلات زیست‌محیطی می‌گردد (40). قیمت ارزان و حجم بالای تولید این ضایعات و نیز پتانسیل قارچ‌ها برای استفاده از ترکیبات سلولزی موجود در آن‌ها، کاربرد آن‌ها به عنوان سوبسترا در سامانه‌های تخمیر حالت جامد برای تولید سلولاز، را امکان‌پذیر می‌نماید. از آن‌جا که بهبود بازده تولید آنزیم و افزایش فعالیت آنزیمی تولید شده توسط فرآیند میکروبی موضوعی بسیار حائز اهمیت است، پژوهشگران با روش‌های مختلف سعی در اعمال جهش بر سویه‌های مورد مطالعه داشته‌اند و سپس نتایج حاصل از جهش را مورد بررسی قرار داده‌اند. کاربرد زیست‌فناوری و سامانه تخمیر حالت جامد، به دلیل برخی پیچیدگی‌ها در فرآیند تولید، هنوز در مقیاس صنعتی دارای ابهاماتی است. با توجه به لزوم کاهش هزینه‌های جاری تولید، جهت اجرایی شدن این پژوهش‌ها و همچنین ضرورت بهبود تولید آنزیم سلولاز، هدف از این پژوهش، بررسی قابلیت سویه قارچی مورد مطالعه، در کاربرد ضایعات برنج به عنوان سوبسترای ارزان‌قیمت و انتخاب بهترین ترکیب از ضایعات برنج (کاه برنج، پوست برنج، سبوس برنج، ترکیب دو به دو و نیز ترکیب سه تایی این سوبستراها با نسبت یکسان)، در راستای کاهش هزینه‌ها، و نیز انتخاب مناسب‌ترین سویه قارچی تریکودرما ریزی از میان سه سویه مورد بررسی (تریکودرما ریزی 2414، 2415 و 2416) بوده است.

2- مواد و روش‌ها

2-1- تهیه مواد لازم

سبوس، پوست و کاه برنج از شمال ایران تهیه، آسیاب شده و با مش سایز 14-18 الک شدند (31). سویه‌های تریکودرما ریزی 2416، 2415 و 2414 (ATCC 60787، 56746 و 26921) از کلکسیون کشت اسپانیا¹ تهیه شدند. مواد مورد نیاز با درجه‌ی شیمیایی از شرکت سیگمای آلمان خریداری شدند.

در این مطالعه یک افزایش 72 درصدی در بازده سلولاز تولیدی در سامانه تخمیر حالت جامد در مقایسه با تخمیر غوطه‌وری به دست آمد (8). در سال 1381 خیاطی و همکاران، تولید سلولاز با استفاده از ضایعات لیگنوسلولزی با روش تخمیر در بستر جامد را انجام دادند. در این پژوهش از قارچ‌های اسپرژیلوس نیجر و تریکودرما ریزی و سوبستراهای کاه برنج، کاه گندم و خاک اره استفاده شد. در میان دو سویه میکروبی، اسپرژیلوس از توانایی تولید بیشتر برخوردار بود. در میان سوبستراهای مورد استفاده کاه برنج بهترین کارایی را داشت. استفاده از کشت توام سویه‌های قارچی سبب کاهش زمان لازم برای حصول بیشینه‌ی بازدهی شد (3). در سال 2004، لیمینگ و زونلیا، با استفاده از چوب ذرت و توسط تریکودرما ریزی ZU-02 سلولاز تولید نمودند. نتایج نشان داد که فعالیت و بازده سلولاز تولید شده روی چوب ذرت با سلولز خالص قابل مقایسه بود (21). با توجه به این که برنج، دومین گروه بزرگ غلات را تشکیل داده و غذای رایج نیمی از مردم سراسر جهان بوده و تولید جهانی آن طی سال‌های اخیر به سرعت افزایش یافته است به نحوی که سطح زیر کشت جهانی آن در سال 2014 (مطابق با آخرین آمار ارائه شده از سوی فائو) معادل با 162716862 هکتار و تولید 741477711 تن بوده است و ایران یکی از کشورهای مهم در تولید برنج به شمار می‌رود و این محصول در ایران نیز دومین گروه عمده محصولات کشاورزی بوده و در سال 1393 مطابق با آخرین آمار موجود، سطح زیر کشت آن در 54 هزار هکتار و معادل تولید 2347291 تن بوده است و از سوی دیگر، بیشترین مقدار ضایعات در میان غلات مربوط به برنج است، لزوم کاربرد مناسب این محصولات آشکارتر می‌گردد (1، 10). مهم‌ترین محصولات جانبی کشت و فرآوری برنج، سبوس، پوست و کاه برنج هستند. این ترکیبات پتانسیل کاربرد در غذای دام را دارند اما برای مثال قسمت عمده‌ای از کاه

2-2- محاسبه ترکیبات شیمیایی سوسترها

محاسبه میزان رطوبت (استفاده از آون با دمای °C 100 تا رسیدن نمونه به وزن ثابت)، خاکستر (سوزاندن 2 گرم نمونه روی شعله و سپس استفاده از کوره الکتریکی با دمای °C 500 تا خاکستر شدن نمون ها)، چربی (روش خشک اندازگی چربی با استفاده از سوکسله) و پروتئین (روش کلدال) نمونه های سیوس برنج، کاه برنج و پوست برنج مطابق روشهای آزمون های اندازه گیری ترکیبات شیمیایی انجام شد (2).

2-3- فعال سازی و پاساژ دادن سویه های تریکودرما**دیزئی**

آمپول های حاوی سویه های 2416، 2415 و 2414 در شرایط اسپتیک، در آب مقطر اسپتیک ریخته شده و چندین ساعت باقی ماندند. سپس از هر کدام از سویه ها روی محیط PDA¹ و PCA² کشت داده شد و در دماهای °C 25 و °C 37 (اولی در معرض نور و دومی در تاریکی) گرمخانه گذاری شد. پس از طی مدت زمان لازم جهت فعال شدن سویه ها و اطمینان از عدم آلودگی آن ها، مجدداً سویه های رشد کرده بر PDA، پاساژ داده شدند.

2-4- انتخاب سویه ای با بالاترین فعالیت آنزیمی

سویه های مورد آزمایش شامل دو سویه ی جهش یافته ی تریکودرما ریزئی 2414 و تریکودرما ریزئی 2415 و نیز سویه ی طبیعی تریکودرما ریزئی 2416 روی محیط کشت مخصوص کونگو رد تست، برای انجام آزمون کونگو رد تست، کشت داده شدند. برای کشت قارچ از تلقیح سوسپانسیون اسپوری روی سوستر استفاده شد (12، 17، 19). برای انجام آزمون کونگو رد تست ابتدا محیط کونگو رد تهیه شد. این محیط شامل ترکیبات زیر می باشد:

NaNO₃ (3 g L⁻¹); K₂HPO₄ (1 g L⁻¹); MgSO₄ (0/5 g L⁻¹); KCl (0/5 g L⁻¹); FeSO₄ 7H₂O (0/01 mg L⁻¹); agar (20 g L⁻¹); CMC (5 g L⁻¹).

pH محیط روی 5 تنظیم شده و محیط پس از استریل درون پلیت ریخته شد. از هر کدام از سویه ها روی محیط PDA کشت داده شده و پس از 8 روز گرمخانه گذاری در دمای °C 25، دایره هایی با قطر 6 میلی متر از محیط کشت جدا شده و در مرکز پلیت های حاوی محیط کونگو رد قرار داده شد. پس از 7 روز گرمخانه گذاری در دمای °C 25، 10 میلی لیتر معرف کونگو رد (2/5 گرم در لیتر) به آن افزوده شد. پس از 15 دقیقه با NaCl 1 مولار شسته و 24 ساعت در یخچال نگه داشته شد. سپس قطر کلونی رشد کرده و قطر هاله شفاف ایجاد شده اندازه گیری شد (11).

2-5- انتخاب سوسترای مناسب

در این پژوهش از ضایعات برنج به عنوان سوستر استفاده شد. برای انتخاب سوسترای مناسب از میان ترکیبات موجود، سویه ی منتخب در مرحله قبل، روی 7 ترکیب از سوسترهای مختلف (سیوس برنج، کاه برنج و پوست برنج، نسبت 50% از هر کدام از سوسترها به صورت دو به دو و ترکیب سه تایی به میزان مساوی از هر سه سوستر) کشت داده شد و انتخاب بهترین سوستر از طریق اندازه گیری فعالیت آنزیمی (FPase³) انجام شد. برای این کار 5 گرم از سوسترهای مختلف توزین و درون ارلن دهان گشاد ریخته شد. میزان آب لازم (که در مرحله قبل محاسبه شده بود) به آن ها اضافه و خوب به هم زده شد. سپس سوسترای مرطوب وارد اتوکلاو شد و در دمای °C 121 به مدت 20 دقیقه اتوکلاو شد تا علاوه بر اسپتیک شدن، به عبارتی پیش تیمار حرارتی تحت فشار بخار نیز بر آن انجام گیرد و شرایط برای رشد قارچ فراهم تر گردد. پس از آن تلقیح با 1 میلی لیتر سوسپانسیون اسپوری با غلظت 2/5 × 10⁷ اسپور در میلی لیتر انجام شده و پس از مخلوط شدن، به مدت 6 روز در انکوباتور با دمای °C 25 قرار گرفتند (19، 31).

1-Potato Dextrose Agar

2- Plate Count Agar

3- Filter Paperase (Filter Paper Assay)

2-7- اعمال جهش بر سويه منتخب

در ابتدا سويهی قارچی منتخب از آزمون کونگو رد تست، بر روی PDA کشت داده شده و پس از گذراندن دروه گرمخانه‌گذاری، سوسپانسیون اسپوری ($2/5 \times 10^7$) اسپور در میلی لیتر) از آن تهیه شد. مقدار 5 میلی لیتر از سوسپانسیون اسپوری در 3 لوله دربیچ دار اسپتیک ریخته شد. پس از آن لوله‌ها در سازمان انرژی اتمی، تحت تابش پرتوی گامای کبالت 60 با مقدار دوز 800 گری قرار گرفتند.

2-8- غربال کردن جهش یافته‌های تريکودرما ريزی

2414

پس از اعمال جهش، ابتدا رقت‌های سریالی از سوسپانسیون جهش یافته، تهیه شده و بر روی محیط PDA کشت داده شدند. هدف از این کار بدست آوردن کلونی‌هایی بود که به لحاظ ظاهری قابل تفکیک از یکدیگر باشند. پس از گذشت مدت زمان 3 روز در گرمخانه در دمای 25°C ، کلونی‌های بزرگ‌تر و با ظاهر متفاوت، انتخاب شده و خالص‌سازی شدند و مجدداً بر روی محیط PDA کشت داده شدند. در مرحله اول پس از کشت کلونی‌های بزرگ‌تر، آزمون کونگو رد انجام شد. بر اساس نتایج آن آزمون، سه سويه‌ای که نسبت قطر هاله به کلونی بزرگتری نسبت به قبل از جهش داشتند، انتخاب شدند (20).

2-9- اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی پس از اعمال جهش

کلونی‌های انتخاب شده از مرحله غربالگری و آزمون کونگو رد، ابتدا بر روی محیط PDA کشت داده شدند و در دمای 25°C به مدت 8 روز گرمخانه‌گذاری شدند. سپس برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی این جهش یافته‌ها، سوسپانسیون اسپوری با غلظت $2/5 \times 10^7$ اسپور در میلی لیتر تهیه شد و بر روی سوبسترای مورد نظر کشت داده شدند و پس از طی مدت زمان 6 روز گرمخانه‌گذاری در دمای 25°C ، آنزیم تولیدی از آن‌ها استخراج و فعالیت آنزیمی اندازه‌گیری شد.

2-6- استخراج و اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی سلولاز تولیدی

ابتدا وزن توده تخمیر شده محاسبه شده و 5 برابر وزن آن آب مقطر به ارلن‌ها اضافه شد و سپس روی دستگاه همزن مغناطیسی (MR 3001 k Heidolph Germany) با دور 700 دور در دقیقه¹ به مدت 30 دقیقه به هم زده شد. سپس به مدت 15 دقیقه در دور 10000 سانتریفیوژ شده ($3-30\text{K}$) (sigma Germany) و مایع شفاف رویی به عنوان آنزیم استخراج شده، جداسازی شد (19). برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی FPase محلول آنزیمی استخراج شده، از معرف دی نیترو سالیسیلیک اسید (DNS) استفاده شد (12، 26). نوار باریک کاغذ صافی واتمن (حدود 50 mg) را در لوله آزمایش گذاشته و 1 mL محلول بافر سیترات 50 mM به همراه 0/5 mL محلول آنزیمی استخراج شده به آن افزوده شد. نمونه کنترل آنزیم شامل 1 mL بافر سیترات 50 mM و 0/5 mL محلول آنزیمی بود. نمونه کنترل سوبسترا حاوی 1/5 mL بافر سیترات 50 mM و کاغذ صافی واتمن بود و نمونه شاهد شامل 1/5 mL بافر سیترات 50 mM در نظر گرفته شد. نمونه‌ها 1 ساعت در دمای 50°C قرار گرفته و سپس 3 mL معرف DNS به آن‌ها افزوده شده و به مدت 5 دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفتند. سپس در حمام آب و یخ خنک شده و با اسپکتروفوتومتر (Agilent Technologies Cary 60 UV-vis) جذب نمونه‌ها در طول موج 540 نانومتر قرائت شد. پس از محاسبه غلظت آنزیم ($\text{mg}/0.5 \text{ mL}$)، محاسبه فعالیت آنزیمی با استفاده از فرمول انجام شد:

$$\text{فعالیت آنزیمی} = A \times (a + b) / 0.5 \times C \times t \times 0.18$$

که در آن A غلظت آنزیم محاسبه شده از منحنی استاندارد، a میزان آب سوبسترا، b میزان آب افزوده شده طی استخراج، C وزن ماده خشک سوبسترا و t زمان 60 دقیقه می باشد.

10-2- بررسی پایداری سویه جهش یافته

پس از انتخاب سویه جهش یافته برتر (که دارای فعالیت آنزیمی بیشتری نسبت به سویه مادر بود)، آزمون پایداری سویه انجام شد. برای اطمینان از پایداری سویه ی جهش یافته، سویه ی مورد نظر طی 9 نسل بر محیط کشت جامد (سوبسترای بهینه) کشت داده شده و میزان فعالیت آنزیمی (FPase) سلولاز تولیدی اندازه گیری شد. برای افزایش دقت و اطمینان از پایداری سویه جهش یافته در محیط کشت تخمیر حالت جامد، ابتدا وزن مشخصی از سوبسترای بهینه در ارلن ریخته شده و با سوسپانسیون اسپوری با غلظت $2/5 \times 10^7$ اسپور در میلی لیتر تلقیح شد. پس از آن به مدت 6 روز در انکوباتور با دمای 25°C قرار گرفت. پس از طی زمان گرمخانه گذاری، ابتدا کشت نسل دوم با تلقیح حجم مشخصی از درون ارلن نسل اول انجام گرفت. بدین صورت که درون ارلن دوم وزن مشخصی از سوبسترای جامد تازه قرار داده شد و پس از اسپتیک شدن با حجم مشخصی از نسل اول تلقیح شد و به مدت 6 روز در همان شرایط گرمخانه گذاری شد. سپس آنزیم تولیدی نسل اول استخراج شده و فعالیت آنزیمی آن

اندازه گیری شد. در ادامه، نسل سوم با استفاده از سوبسترای جامد تازه و تلقیح با حجم معین از نسل دوم انجام گرفته و سپس آنزیم تولیدی نسل دوم استخراج شد. انجام این روند تا 9 نسل تکرار شد (20).

11-2- تجزیه و تحلیل داده ها

تمام آزمایشها در سه تکرار انجام شده و جهت مطالعه وجود اختلاف آماری معنی دار بین تیمارهای مختلف، از تجزیه واریانس (ANOVA) و آزمون چند دامنه ای دانکن استفاده شد. در تمام مراحل تجزیه و تحلیل آماری داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS18 صورت گرفت.

3- نتایج و بحث

اندازه گیری ترکیبات شیمیایی سوبستراها انجام شده و نتایج در جدول 1 آورده شده است. در این رابطه باید گفت نتایج به دست آمده با نتایج گزارش شده توسط سایر پژوهشگران (5)، (18) قابل مقایسه است که البته تفاوت های موجود، طبیعی و به دلیل تفاوت در نوع برنج مورد استفاده در تولید ضایعات کاربردی، زمان برداشت و شرایط محیطی می باشد.

جدول 1 - ترکیبات شیمیایی سوبستراهای کاه برنج، سبوس برنج و پوست برنج

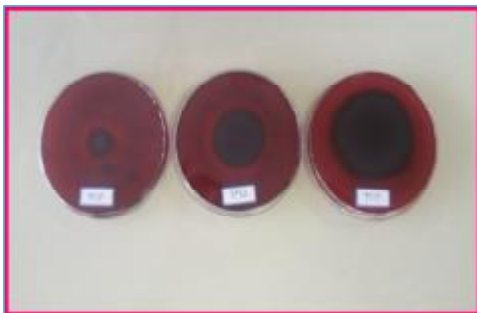
نمونه	(%) رطوبت	خاکستر	(%) چربی
کاه برنج	$4/297 \pm 0/223^a$	$12/71 \pm 0/071^a$	$0/39 \pm 0/177^a$
پوست برنج	$7/967 \pm 0/335^c$	$14/53 \pm 0^c$	$3/57 \pm 0/226^b$
سبوس برنج	$6/712 \pm 0/022^b$	$14/51 \pm 0/035^b$	$10/71 \pm 0/035^c$

در هر ستون میانگین های دارای حروف متفاوت، معنی داری در سطح $\alpha = 0/05$ را نشان می دهند.

گرفت. تعیین دقیق میزان رطوبت لازم برای سامانه تخمیر حالت جامد اهمیت بسیار دارد، چنانچه میزان رطوبت کم تر از

اندازه گیری میزان رطوبت سوبستراها برای محاسبه ی میزان رطوبت لازم در سامانه تخمیر حالت جامد، مورد استفاده قرار

گندم بود و میزان رطوبت 70 % بهینه گزارش شد (24). در سال 2010، بریجوانی و همکاران با استفاده از سامانه تخمیر حالت جامد و مخلوط کشت *Trichoderma reesei* و *Aspergillus oryzae* به تولید سلولاز پرداختند. در این مطالعه از مخلوط پوست لوبیای سویا و سبوس گندم (4:1) به عنوان سوبسترا استفاده شد و میزان رطوبت بهینه 70 % بود که اختلاف با نتایج این پژوهش، به دلیل تفاوت سوبسترا و آب پیوندی می باشد (19، 24، 27). با توجه به اینکه انتخاب سوبسترا و سويه قارچی مناسب، از مهم ترین فاکتورها در سامانه تخمیر حالت جامد می باشد (35)، در ادامه ی پژوهش با استفاده از آزمون کونگو رد، سويهی مناسب تر انتخاب شد. نتایج در شکل 1 نشان داده شده است. همان طور که در شکل مشخص است با وجودی که سويهی تريکودرما ريزی 2414 قطر کلونی کمتری داشته، اما نسبت قطر هاله ی شفاف تشکیل شده به قطر کلونی از دو سويهی دیگر بیشتر است. قطر هاله شفاف و کلونی تشکیل شده در محیط کونگو رد اندازه گیری شده و در جدول 2 نتایج مربوط به این آزمون، نشان داده شده است.



شکل 1 - نتایج آزمون کونگو رد برای سه سويه قارچی مختلف (از راست به چپ به ترتیب سويه های تريکودرما ريزی 2416، 2415 و 2414)

بر اساس نتایج حاصله از این آزمون، تريکودرما ريزی 2414 بالاترین فعالیت سلولازی را داشته و برای ادامه پژوهش مورد استفاده قرار گرفت. زیر سويه های مختلف از تريکودرما

حد لازم باشد، رشد قارچ در حد مطلوب نبوده و دسترسی قارچ ها به مواد مغذی کاهش می یابد و در نتیجه محصول مورد نظر با راندمان کم تولید می شود، اگر میزان رطوبت بیشتر از حد لازم باشد، سبب پر شدن خلل و فرج شده و فضای اکسیژن را اشباع کرده و در نتیجه قارچ با کمبود هوا مواجه می شود. لذا تعیین میزان دقیق رطوبت در شروع کار اهمیت خاص دارد (27، 35). برای محاسبه میزان رطوبت لازم برای سوبستراها، در ابتدا با توجه به نتایج سایر پژوهش ها (19) مقادیر اولیه ای مناسب تشخیص داده شد، اما پس از طی زمان گرمخانه گذاری، آب محیط کاهش یافت و مجدداً میزان رطوبت لازم محاسبه شد. در نهایت مقادیر رطوبت برای کاه، پوست، سبوس، سبوس-پوست، کاه-سبوس، کاه-پوست و هر سه سوبسترا به ترتیب 80، 55، 55، 65، 65، 55% مطلوب تشخیص داده شد. میزان رطوبت لازم برای کاه برنج، به دلیل توانایی بیشتر این سوبسترا در جذب آب، بیشتر بود در حالی که سبوس و پوست برنج شرایط مشابهی داشتند. در ترکیبات دوتایی که کاه برنج وجود داشت نیز میزان جذب آب بیشتر شده و درصد بالاتری رطوبت مورد نیاز بود. در پژوهش های مشابه انجام شده و با کاربرد سوبستراهای گوناگون، میزان رطوبت لازم بسته به نوع سوبسترای لیگنوسلولزی مورد استفاده، متفاوت است. تخلخل و سطح مخصوص ذرات جامد، کارایی نفوذ هوا و ظرفیت نگهداری آب را تحت تاثیر قرار می دهد (38). در سال 2007، لطیفیان و همکاران به ارزیابی شرایط کشت برای تولید سلولاز با استفاده از دو سويهی جهش یافته ی *Trichoderma reesei* در سامانه تخمیر حالت جامد پرداختند. سوبسترای مورد استفاده آن ها، سبوس برنج بود و میزان رطوبت 70-55% مناسب گزارش شد که با نتایج به دست آمده در این پژوهش مطابقت دارد (19). در سال 2012، مایوریا و همکاران، بهینه سازی شرایط سامانه تخمیر حالت جامد برای تولید سلولاز با استفاده از *Trichoderma reesei* NCIM992 را انجام دادند. سوبسترای مورد استفاده کاه برنج، باگاس نیشکر و سبوس

ریزنی توسط پژوهشگران برای تولید سلولاز مورد استفاده قرار گرفته‌اند در پژوهش‌های مختلف، از زیرسویه‌های تریکودرما ریزنی QM9414، تریکودرما ریزنی ZU-02، تریکودرما ریزنی RUTC30، تریکودرما ریزنی MCG77، تریکودرما ریزنی HY07، تریکودرما ریزنی PTCC 5142 و تریکودرما ریزنی NCIM992 استفاده شده است (4، 8، 13، 19، 21، 36، 41).

جدول 2 - نتایج آزمون کونگورد

سویه	قطر کلونی (cm)	قطر هاله شفاف (cm)	قطر هاله شفاف / قطر کلونی
2414	2/5	3/75	^c 1/53 ± 0/085
2415	3/97	5	^b 1/26 ± 0/036
2416	5/35	6/05	^a 1/13 ± 0/02

میانگین‌های دارای حروف متفاوت، معنی‌داری در سطح 0/05 a، را نشان می‌دهند.

بازده تولید آنزیم می‌انجامد. از سوی دیگر چون خود کاه برنج میزان ترکیبات مغذی کمتری نسبت به سبوس و پوست برنج دارد، لذا ترکیبی از هر سه سوبسترا منجر به تلفیق مزایای هر کدام شده و بیشترین میزان فعالیت آنزیمی را موجب شده است. مروری بر پژوهش‌های سایر محققان نشان داد که با استفاده از سوبستراهای گوناگون و کشت قارچ تریکودرما ریزنی، مقادیر مختلفی از فعالیت آنزیمی به دست آمده است. با استفاده از سبوس گندم - چوب ذرت مقدار فعالیت آنزیمی ds U/g 0/7-1/1، ترکیب کاه گندم، کاه برنج، سبوس گندم، چوب ذرت: ds U/g 2/2، سبوس برنج در مطالعات مختلف ds U/g 13/57 و 11/648 و ds U/g 0/32-3/2، پوست سویا و سبوس گندم ds U/g 10/7، سبوس گندم ds U/g 3/8-0/605 و پوست سویا ds U/g 29/1 (7، 14، 19، 29، 31، 32، 33، 34) گزارش شده است. به دلیل تفاوت در نوع سوبسترای به کار رفته در پژوهش‌ها، نتایج مختلفی گزارش شده است که تا حدودی با نتایج این پژوهش مطابقت دارد.

جدول 3، فعالیت آنزیمی حاصل از کشت سویه‌ی تریکودرما ریزنی 2414 بر سوبستراهای مختلف را نشان می‌دهد. بر اساس نتایج حاصله، هنگامی که سویه‌ی مورد نظر بر روی مخلوطی از هر سه سوبسترای کاه برنج، سبوس برنج و پوست برنج (به نسبت‌های مساوی از هر کدام) کشت داده شد، بیشترین فعالیت آنزیمی حاصل شده است. به نظرمی رسد حضور کاه برنج در سوبسترا به دلیل استحکام بیشتر و ساختار فیزیکی مستحکم‌تر این ماده، ساختار مناسب‌تری ایجاد کرده و از فشرده شدن مجموعه سوبسترا جلوگیری می‌نماید که این مهم منجر به حفظ خلل و فرج موجود و در نتیجه وجود میزان کافی هوا، برای استفاده‌ی قارچ مورد استفاده و رشد بهتر قارچ و تولید بیشتر آنزیم سلولاز می‌گردد. همچنین توانایی کاه برنج، برای افزایش جذب آب، منجر به نگهداری آب بیشتر در سامانه شده و این امر نیز به رشد سوبسترا کمک می‌نماید. زیرا به تدریج و در طی زمان رشد، میزان رطوبت مورد نیاز را در اختیار میکروارگانیزم قرار می‌دهد و این مهم به افزایش

جدول 3 - فعاليت آنزيمي حاصل از کشت تريکودرما ريزی 2414 بر سوبستراهای مختلف (سبوس برنج، پوست برنج، کاه برنج و ترکيبات دوتایی و سه تایی اين سوبستراها)

نمونه	فعاليت آنزيمي (u/g dry substrate)
سبوس	0/0325 ± 0/01 ^a
پوست	0/325 ± 0/04 ^b
سبوس و پوست	0/520 ± 0/01 ^c
پوست و کاه	0/555 ± 0/05 ^{c,d}
کاه	0/600 ± 0/01 ^{d,e}
سبوس و کاه	0/620 ± 0/01 ^e
هر سه	0/720 ± 0/01 ^f

میانگین‌های دارای حروف متفاوت، معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ £ a، را نشان می‌دهند.

آنزيمي آن‌ها اندازه‌گیری شد. بنابراین جهش یافته‌های تريکودرما ريزی 2414 شماره 3، 5 و 6 انتخاب شدند و در مرحله‌ی بعد بر روی ترکيب هر سه سوبسترا کشت داده شده و میزان فعاليت آنزيمي آن‌ها اندازه‌گیری شده و نتایج با سويه‌ی مادر قبل از جهش مقایسه شد.

در جدول 4 نتایج آزمون کونگو رد برای کلونی‌ها پس از جهش، آورده شده است. بر اساس نتایج این آزمون سه کلونی که دارای بالاترین قطر هاله به کلونی بوده و نتایج آزمون کونگو رد آن‌ها به صورت معنی‌دار بیشتر از نتایج این آزمون برای سويه مادر قبل از جهش بود، انتخاب شده و فعاليت

جدول 4 - نتایج آزمون کونگو رد برای سویه‌های جهش یافته تریکودرما ریزئی 2414 و سویه مادر

شماره گذاری	نسبت قطر کلونی/قطر هاله
سویه مادر 2414	1/36±0/1 ^{a,b}
جهش یافته 1	1/25±0/07 ^a
جهش یافته 2	1/25±0/06 ^a
جهش یافته 3	2/05±0/35 ^d
جهش یافته 4	1/55±0/57 ^{b,c}
جهش یافته 5	1/7±0/5 ^c
جهش یافته 6	2±0/28 ^d

میانگین‌های دارای حروف متفاوت، معنی داری در سطح 0/05 £ a، را نشان می‌دهند.

(2010) با استفاده از مواد شیمیایی جهش‌زا مانند نیتروزوگوانیدین، اتیل متیل سولفونات و دی اتیل سولفونات، اقدام به اصلاح سویه نموده اند و تولید سویه‌های بهبود یافته برای تولید سلولاز موفقیت آمیز بوده است (15، 6، 20، 38). در ادامه می‌توان به تولید سلولاز با استفاده از تریکودرما ویریده اشاره نمود که با اعمال جهش از طریق اشعه ماورای بنفش و امواج میکروویو و سپس کاربرد اتیل متان سولفونات، بازده تولید آنزیم افزایش یافت (9). همچنین کاربرد تریکودرما اتروویریده توسط Kavocs و همکاران (2008) و اعمال جهش با استفاده از متیل نیترو نیتروزوگوانیدین و سپس قرار دادن در معرض اشعه ماورای بنفش منجر به افزایش تولید آنزیم سلولاز شد. در این پژوهش سویه‌های جهش یافته‌ی تریکودرما اتروویریده سریع‌تر از سویه مادر رشد کرده و مقادیر بالاتری از سلولازهای خارج سلولی و بتا گلوکوزیداز تولید نمودند (16).

همان طور که در جدول 5 نشان داده شده است، مقایسه‌ی میان میزان فعالیت آنزیمی حاصل از کشت سویه مادر و جهش یافته‌ها بر ترکیبی از مخلوط سه سوبسترا مشخص کرد که جهش یافته 5، به صورت معنی داری دارای فعالیت آنزیمی بیشتر نسبت به سویه مادر (قبل از جهش) بوده است. بدین معنی که تاباندن اشعه گاما بر تریکودرما ریزئی 2414 به صورت معنی داری منجر به افزایش فعالیت آنزیمی شده است و به عبارت دیگر جهش موفقیت آمیز بوده است. لذا در ادامه، برای حصول اطمینان از ثبات این جهش، پایداری سویه جهش یافته طی 9 نسل پیایی مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده از آزمون‌ها، پایداری سویه جهش یافته مورد تایید می‌باشد. در پژوهش‌های پیشین نیز اعمال جهش بر سویه‌های قارچی نتایج موفقیت آمیزی به دست داده است. Li و همکاران (2010) و Xu و همکاران (2011)، با کاربرد عوامل جهش‌زای فیزیکی مانند اشعه ماورای بنفش، امواج ماکروویو و اشعه‌های یونیزه کننده و Singara و Bhargavi

جدول 5 - فعالیت آنزیمی حاصل از کشت سویه‌های مادر و جهش یافته

سویه قارچی	فعالیت آنزیمی (u/g dry substrate)
تریکودرما ریزی 2414 قبل از جهش	0/759±0/1 ^b
تریکودرما ریزی 2414 جهش یافته 6	0/603±0/02 ^a
تریکودرما ریزی 2414 جهش یافته 5	0/980±0/02 ^c
تریکودرما ریزی 2414 جهش یافته 3	0/535±0/02 ^a

میانگین‌های دارای حروف متفاوت در سطح 05/0 £ a، دارای اختلاف معنی دار هستند.

4- نتیجه گیری

از آنجا که مواد سلولزی، فراوان ترین منابع کربنی تجدید پذیر در جهان هستند و نیاز روزافزون به کاربرد این مواد به عنوان مواد اولیه با اهداف مختلف احساس می شود و نیز سلولاز، آنزیم مورد استفاده برای آبکافت سلولز، می باشد و نظر به اهمیت کاربرد زیست فناوری در تولید سلولاز و توجه ویژه‌ای که اخیرا به دلیل مزایای مخصوص و منحصر به فرد سامانه تخمیر حالت جامد، به سمت آن معطوف شده است، کاربرد سامانه تخمیر حالت جامد برای تولید سلولاز مجال بررسی دارد. از سوی دیگر لزوم کاهش هزینه‌های تولید در این سامانه، کاربرد سوبستراهای ارزان قیمت مانند ضایعات کشاورزی و نیز بهبود سویه با هدف افزایش راندمان تولید آنزیم را می طلبد.

5- منابع

1. احمدی، ک.، قلی زاده، ح.، عباد زاده، ح.، حسین پور، ر.، حاتمی، ف.، فضل، ل.، کاظمیان، آ. و رفیعی، م. 1394. آمارنامه کشاورزی سال 1393. چاپ اول. وزارت جهاد کشاورزی، معاونت برنامه ریزی و اقتصادی، مرکز فناوری اطلاعات و ارتباطات. ص 16-19.

2. حسینی، ز. 1385. روش‌های متداول در تجزیه‌ی مواد غذایی. شیراز. دانشگاه شیراز.
 3. خیاطی، غ.، انوری، م. و فاطمی، م. 1381. تولید آنزیم سلولاز از ضایعات لیگنوسلولزی به کمک تکنیک تخمیر در بستر جامد. مجله علوم پایه دانشگاه الزهراء، جلد 15، شماره 2، ص 29-35.
 4. قربانی تنکابنی، ا.، خیاطی، غ. و نصرالهی، آ. 1391. استفاده از پسماند کشاورزی توسط قارچ تریکودرما ریزی به منظور افزایش تولید آنزیم سلولاز. مجله علمی- پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی، 4 (15)، 39-44.
 5. کشاورز هدایتی، ع. ا.، اعلمی، م.، معتمدزادگان، ع.، مقصدلو، ی.، قربانی، م. و دارائی گرمه خانی، ا. 1390. بررسی ترکیب شیمیایی و خواص فیزیکوشیمیایی سبوس برنج ایرانی. مجله علمی پژوهشی علوم و فناوری غذایی، سال چهارم، شماره 3، 1-7.
1. Bhargavi, M. and Singara, C. 2010. Influence of physical and chemical mutagens on dye decolorizing *Mucormucedo*. *Afr. J. Microbiol Res* Sept., 4(17), 1808-1813.
 2. Brijwani, Kh., Singh Oberoi, H. and Vadlani, P. V. 2010. Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-

- industrial applications of rice husk: IJESE., 2(10), 86-90.
13. Latifian, M., Hamidi-Esfahani, Z. and Barzegar, M. 2007. Evaluation of culture conditions for cellulase production by two *Trichoderma reesei* mutants under solid-state fermentation conditions. *Bioresour. Technol.*, 98, 3634-3637.
 14. Li, X.H., Yang, J., Roy, B., Park, E.Y. and Jiang, L.J. 2010. Enhanced cellulase production of the *Trichoderma viride* mutated by microwave and ultraviolet. *J. Microbiol. Res.*, 165 (3), 190-198.
 15. Liming, X. and Xueliang, Sh. 2004. High-yield cellulase production by *Trichoderma reesei* ZU-02 on corn cob residue. *Bioresour. Technol.*, 91, 259-262.
 16. Lin, Y., Tanaka, S. 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 69 (6), 627-42.
 17. Ma, L., Li, Ch., Yang, Zh., Jia, W., Zhang, D. and Chen, Sh. 2013. Kinetic studies on batch cultivation of *Trichoderma reesei* and application to enhance cellulase production by fed-batch fermentation. *J. Biotechnol.*, 166, 192-197.
 18. Maurya, D. P., Singh, D., Pratap, D. and Maurya, J.P. 2012. Optimization of solid state fermentation condition for the production of cellulase by *Trichoderma reesei*. *J. Env. Biol.*, 33, 5-8.
 19. Miettinen-Oinonen, A., Suominen, P. Enhanced production of *Trichoderma reesei* endoglucanases and use of the new cellulose preparations in producing the stone-washed effect on denim fabric. 2002. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68 (8), 3956-64.
 20. Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31, 426-429.
 21. Pandey, A. 2003. Solid state fermentation. *Biochem. Eng. J.*, 13 (2-3), 81-84.
 2. culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. *Process Biochem.*, 45, 120-128.
 3. Chahal, D. S. 1985. Solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulose production. *Appl Environ Microbiol.*, 49, 205-210.
 4. Elakkiya, P. and Muralikrishnan, V. 2014. Cellulase production and purification of mutant strain *Trichoderma viride*. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.*, 3(9), 720-727.
 5. FAO, 2014. Rice market monitor. Florencio, C., Couri, S. and Sanchez Farinas, C. 2012. Correlation between agar plate screening and Solid-State Fermentation for the prediction of cellulase production by *Trichoderma* strains. *Enzyme Res.*, 1-7.
 6. Ghose, T.K., (1987). Measurements of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.*, 59: 257-268.
 7. Guowei, Sh., Man, H., Shikai, W. and He, Ch. 2011. Effect of some factors on Production of cellulase by *Trichoderma reesei* HY07. *Procedia. Environ Sci.*, 8, 357-361.
 8. Jha, K., Khare, S. K. and Gandhi, A. P. 1995. Solid state fermentation of soyhull for the production of cellulase. *Bioresour. Technol.*, 54, 321-322.
 9. Kotchoni, O.S. and Shonukan, O.O. 2002. Regulatory mutations affecting the synthesis of cellulose in *B. pumilus*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 18, 487-491.
 10. Kovas, K., Megyeri, L., Szakacs, G., Kubicek, Ch. P., Galbe, M., and Zacchi, G. 2008. *Trichoderma atroviride* mutants with enhanced production of cellulase and β -glucosidase on pretreated willow. *Enzyme Microb. Technol.*, 43 (1), 48-55.
 11. Kuar, P. P., Arneja, J. S. and Singh, J. 1998. Enzymic Hydrolysis of Rice Straw by Crude Cellulase from *Trichoderma reesei*. *Bioresour. Technol.*, 66, 267-269.
 12. Kumar, A., Mohanta, K., Kumar T. D. and Parkash, O. 2012. Properties and

- profiles in the technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme. Microb. Technol.*, 46, 541-549.
29. Thomas, L., Larroche, Ch., and Pandey, A. 2013. Current developments in solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.*, 81, 146-161.
30. Xia, L. and Cen, P. 1999. Cellulase production by solid state fermentation on lignocellulosic waste from the xylose industry. *Process Biochem.*, 34, 909-912.
31. Xu, F., Wang, J., Chen, S., Qin, W., Yu, Z., Zhao, H., Xing, X. and Li, H. 2011. Strain improvement for enhanced production of cellulase in *Trichoderma viride*. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 47 (1), 53-58.
32. Yoon, L. W., Ang, T. N., Ngoh, G. Ch. And Chua, A. S. M. 2014. Fungal solid state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. *Biomass Bioenerg.*, 67, 319-338.
33. Zhang, Q. and Cai, W. 2008. Enzymatic hydrolysis of alkali-pretreated rice straw by *Trichoderma reesei* ZM4-F3. *Biomass Bioenerg.*, 32, 1130-1135.
34. Zhang, Y., Ghaly, A. E. and Li, B. 2012. Physical properties of rice residues as affected by variety and climatic and cultivation conditions in three continents. *Am. J. Appl. Sci.*, 9 (11), 1757-1768.
35. Zhiyou, W., Wei, L. and Shulin, Ch. 2005. Production of cellulase by *Trichoderma Reesei* from dairy manure. *Bioresour. Technol.*, 96 (4), 491-499.
22. Pandey, S., Srivastava, M., Shahid, M., Kumar, V., Singh, A., Trivedi, S. et al. 2015. *Trichoderma* species cellulases produced by solid state fermentation. *J Data Mining Genomics Proteomics.*, 6(2), 1-4.
23. Panedy, A., Selvakumar, P., Soccol, C., R. and Nigam, P. 1999. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Curr. Sci.*, 77(1), 149-162.
24. Raghuwanshi, S., Deswal, D., Karp, M. and Kuhad, R. Ch. 2014. Bioprocessing of enhanced cellulase production from a mutant of *Trichoderma asperellum* RCK 2011 and its application in hydrolysis of cellulose. *Fuel* 124: 183- 189.
25. Rocky-Salimi, K. and Hamidi-Esfahani, Z. 2010. Evaluation of the effect of particle size, aeration rate and harvest time on the production of cellulase by *Trichoderma reesei* QM9414 using response surface methodology. *Food Bioprod. Process.*, 88, 61-66.
26. Singh Dhillon, G., Singh Oberoi, H., Kaur, S., Bansal, s. and Kaur Brar, S. 2011. Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. *Ind. Crops. Prod.*, 34, 1160-1167.
27. Singhania, R. R., Sukumaran, R. K. and Pandey, A. 2007. Improved cellulase production by *Trichoderma reesei* RUT C30 under SSF through process optimization. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 142(1), 60-70.
28. Singhania, R. R., Sukumaran, R. K., Patel, A. K., Larroche, Ch. And Pandey, A. 2010. Advancement and comparative