

# NGHIÊN CỨU TẠO DÒNG *Trichoderma* SINH CELLULASE CAO BẰNG XỬ LÝ CHIẾU XẠ GAMMA

NGUYỄN THỊ THOM, HOÀNG ĐĂNG SÁNG, TRẦN XUÂN AN, NGUYỄN VĂN BÌNH, TRẦN BĂNG DIỆP

*Trung tâm chiếu xạ Hà Nội, km 12, Đường 32, Minh Khai - Bắc Từ Liêm - Hà Nội*

*Email: [thom.nguyen1008@gmail.com](mailto:thom.nguyen1008@gmail.com)*

**Tóm tắt:** Cellulase là một trong những enzyme công nghiệp quan trọng, được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực đời sống. Vi sinh vật, đặc biệt là chủng nấm *Trichoderma* là nguồn cung cấp cellulase chủ yếu. Nghiên cứu này tạo dòng *Trichoderma* có khả năng sinh cellulase cao bằng xử lý chiếu xạ. Sau chiếu xạ, tỷ lệ sống sót của *Trichoderma* và dải liều tối ưu tạo đột biến sinh cellulase cao được xác định. Hoạt tính enzyme của chủng thuần và chủng sau chiếu xạ cũng được đánh giá bán định lượng bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch và định lượng bằng phương pháp xác định hoạt độ cellulase dựa vào lượng đường khử được tạo thành (DNS.) Kết quả cho thấy tỷ lệ đột biến cao nhất đạt 12,33-14,25% ở khoảng liều 700-1500 Gy. Năm (05) khuẩn lạc sau chiếu xạ sàng lọc được có khả năng sinh cellulase cao vượt trội và ổn định ít nhất sau 4 thế hệ, hoạt độ - CMCase (thủy phân cơ chất CMC) và hoạt độ enzyme tổng số-FPase (thủy phân giấy lọc Whatman số 1) của các khuẩn lạc này cao hơn chủng thuần tương ứng là 1,51-2,48 lần và 1,2-1,87 lần. Như vậy, xử lý chiếu xạ gamma là phương pháp gây đột biến hiệu quả trong nâng cao khả năng sinh cellulase của chủng *Trichoderma*.

**Từ khóa:** *Cellulase, chiếu xạ gamma, đột biến, Trichoderma, tỷ lệ sống sót*

## I. MỞ ĐẦU

Cellulose là hợp chất cao phân tử được trùng hợp (polyme hóa) từ các gốc  $\beta$ -D-glucose bằng cầu nối  $\beta$ -1-4-glucosid nhờ vào khả năng tự dưỡng dưới ánh sáng mặt trời; do vậy, cellulose là hợp chất phổ biến nhất trong tự nhiên [1, 2]. Để quá trình thủy phân cellulose nhanh chóng và triệt để phải có sự tham gia của phức hệ đa enzyme (cellulosome) gồm ba loại enzyme cellulase là endoglucanase, exoglucanase và  $\beta$ -glucosidase. Cellulosome có khả năng tác động hiệp đồng giúp việc phân cắt đồng thời và triệt để cả vùng vô định hình và vùng tinh thể của phân tử cellulose trong khoảng thời gian ngắn hơn so với tác động của từng loại enzyme riêng rẽ [3, 4, 5].

*Trichoderma* spp. là loại nấm sợi hiện diện gần như trong tất cả các loại đất và trong nhiều môi trường sống khác. Nhờ việc nuôi cấy dễ dàng, không tốn kém cùng với khả năng tiết enzyme cellulase hoạt tính cao gấp vài trăm lần so với vi khuẩn mà các chủng *Trichoderma* đã thu hút được sự quan tâm đặc biệt. Cellulase ngoại bào từ một số chủng *Trichoderma* thường tồn tại dưới dạng cellulosome nhờ vậy theo thống kê của Hiệp hội Hóa Học (Current Opinion Green and Sustainable Chemical) hiện nay, *Trichoderma* được nghiên cứu và ứng dụng nhiều nhất trong sản xuất cellulase công nghiệp [6].

Các tia X, g, tia neutron có bước sóng ngắn nên có khả năng ion hóa và khả năng xuyên sâu cao. Các tia phóng xạ có thể gây đột biến bằng cách làm đứt gãy ADN, thay đổi cấu trúc của ADN hoặc hình thành các hợp chất có hoạt tính không ổn định làm biến đổi ADN. Bức xạ ion hóa có thể tạo ra đột biến tại những vị trí xác định nhờ đó hoạt tính của vi sinh vật được cải thiện. Ngoài ra, gây đột biến bằng bức xạ có nhiều ưu điểm như phổ đột biến rộng, tần suất đột biến cao... do đó sẽ làm tăng khả năng chọn được đột biến mong muốn và rút ngắn thời gian sàng lọc [7].

Để cải thiện khả năng sinh cellulase của *Trichoderma* nhiều nghiên cứu gây đột biến chủng nấm này bởi bức xạ tia gamma đã được thực hiện. Trong nghiên cứu của Shahbazi và cộng sự, hoạt tính cellulase của *Trichoderma reesei* đã được cải thiện tăng 1,5-1,99 lần nhờ tác nhân gamma [8]. Trên cơ chất là bã mía, chủng *Trichoderma viride* được xử lý chiếu xạ liều 20 krad 2 lần liên tiếp có hoạt tính sinh cellulase tăng 253,5% thay vì chỉ tăng 134,5% khi xử lý 1 lần ở cùng liều chiếu [9]. Tamada và cộng sự khi đánh giá ảnh hưởng của bức xạ gamma lên chủng *Trichoderma reesei* nhận thấy tỷ lệ sống sót của chủng nấm giảm dần theo sự tăng dần của liều chiếu. Đồng thời, chủng đột biến thu được ở liều chiếu 2000 Gy có khả năng sinh cellulase cao hơn chủng thuần 1,8 lần [7].

Với mục đích sử dụng bức xạ gamma tạo dòng *Trichoderma* biến dị có khả năng sinh cellulase cao, nghiên cứu này bước đầu khảo sát ảnh hưởng của bức xạ gamma tới tỷ lệ sống sót và khả năng sinh cellulase của chủng nấm *Trichoderma koningiopsis*.

## II. NỘI DUNG

### II.1. Đối tượng và phương pháp

#### II.1.1. Vật liệu

Chủng *Trichoderma koningiopsis* VTCC 31435 có khả năng sinh tổng hợp cellulase ngoại bào cao được cung cấp bởi Bảo tàng giống chuẩn Vi sinh vật (VTCC), Viện Vi sinh và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc Gia Hà Nội.

Môi trường nuôi cấy vi sinh vật: PDA (Potato Dextrose Agar) do hãng Difco cung cấp. Các hóa chất: CMC (carboxymethyl cellulose) (Sigma), Congo Red (Sigma), Agar (Việt Nam)... đều đảm bảo độ sạch phân tích.

Môi trường nuôi cấy lỏng được sử dụng gồm các thành phần sau: CMC 2g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4 g;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  13,6 g;  $\text{CaCl}_2$  0,8 g;  $\text{MgSO}_4$  0,6 g; pepton; yeast extract 0,1g;  $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1 mg;  $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,32 mg;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,28 mg;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,4 mg;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,25 mg, nước cất vừa đủ 1000 mL.

#### II.1.2. Phương pháp

##### II.1.2.1. Bảo quản và giữ giống

Chủng giống thuần *T. koningiopsis* VTCC 31435 được bảo quản theo phương pháp cấy truyền trên ống thạch nghiêng chứa môi trường PDA, nuôi trong tủ ẩm ở 28°C trong 72 giờ và được bảo quản tối đa 30 ngày ở 4°C trước khi cấy truyền đợt tiếp theo.

##### II.1.2.2. Xử lý chiếu xạ

Chủng *T. koningiopsis* VTCC 31435 được nuôi cấy điểm trên đĩa petri chứa môi trường PDA ở 28°C. Sau 7 ngày, tiến hành gạt toàn bộ số bào tử mọc trên bề mặt đĩa vào 100 mL dung

dịch NaCl 0,9% có bổ sung Tween 80 theo tỷ lệ thể tích 1/99. Dung dịch bào tử được pha loãng sao cho mật độ tế bào khoảng  $10^8$ - $10^9$  CFU/ mL.

Các ống nghiệm vô trùng có chứa 10 mL dung dịch bào tử *T. koningiopsis* VTCC 31435 được đem xử lý chiếu xạ trên nguồn gamma Co-60 ở dải liều 0-2500 Gy (3 ống nghiệm lặp lại cho mỗi liều). Liều kế Gammachrome YR được sử dụng để đo liều hấp thụ.

#### II.1.2.3. Xác định số lượng bào tử:

Dung dịch bào tử (trước và sau chiếu xạ) được pha loãng theo dãy thập phân 0,1 mL mẫu ở các độ pha loãng thích hợp được cấy vào đĩa petri chứa môi trường PDA (3 đĩa petri/độ pha loãng). Sử dụng que gạt vô trùng dàn đều dịch cấy trên bề mặt thạch. Tiến hành đếm số khuẩn lạc sau 72 giờ nuôi cấy ở 28°C và tính số lượng bào tử (Mi) trong 1 mL mẫu theo công thức [7]:

$$Mi \text{ (CFU/ mL)} = Ai \times Di/V$$

Trong đó:  $A_i$  là số khuẩn lạc trung bình/đĩa;  $D_i$  là độ pha loãng và  $V$  là thể tích dịch bào tử cấy vào mỗi đĩa (mL)

#### II.1.2.4. Sàng lọc các đột biến sinh cellulase cao

Khả năng phân hủy cellulose của chủng *T. koningiopsis* được xác định định tính bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch PDA có chứa cơ chất CMC và chất chỉ thị Congo đỏ.

Sau khi chiếu xạ, dung dịch bào tử *T. koningiopsis* ở các liều khác nhau ngay lập tức được cấy trải lên môi trường PDA có bổ sung CMC và congo đỏ. Đĩa sau khi cấy được ủ ở 28°C trong 24 giờ. Sau 24 giờ nuôi cấy, nhiệt độ ủ sẽ được nâng lên 37°C trong 3 đến 5 ngày nhằm hạn chế sự lan rộng của khuẩn lạc và thu vòng phân giải CMC tối đa. Khả năng thủy phân cellulose được đánh giá thông qua chỉ số HC (Hydrolysis Capacity) theo công thức [10]:

$$HC = \text{Đường kính vòng phân giải} / \text{Đường kính khuẩn lạc}$$

Những khuẩn lạc có chỉ số HC lớn hơn 10% so với chỉ số HC của chủng thuần đều được coi là các khuẩn lạc đột biến có khả năng sinh cellulase cao.

#### II.1.2.5. Phương pháp DNS (axit 3,5 dinitrosalicylic)

Hoạt độ cellulase do các chủng *Trichoderma* sinh ra trong quá trình nuôi cấy được định lượng theo TCVN 12104:2018 [11] bằng phương pháp DNS. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá hai loại hoạt độ enzyme endoglucanase - CMCCase (thủy phân cơ chất CMC) và hoạt độ enzyme tổng số-FPase (thủy phân giấy lọc Whatman số 1).

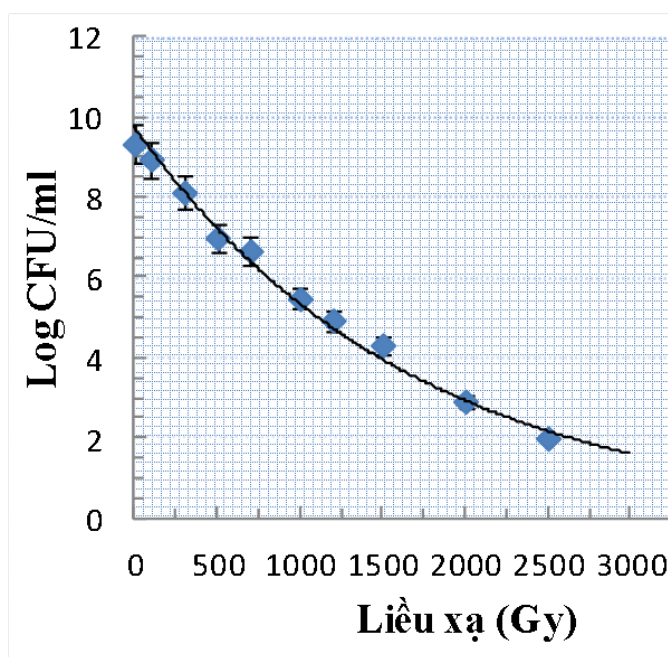
Xác định hoạt độ thủy phân CMC và giấy lọc (Whatman số 1) bằng cách xác định lượng đường khử được tạo thành khi cho 0,1-mL cellulase tác dụng với cơ chất CMC và giấy lọc ở pH 4,8 và nhiệt độ 50°C trong 20 phút đối với CMC và 60 phút với giấy lọc. Lượng đường khử sinh ra phản ứng với thuốc thử DNS, cường độ màu (màu lục) của hợp chất tạo thành sau phản ứng được đo bằng máy quang phổ UV-2450 Shimadzu ở bước sóng 540 nm.

Một đơn vị hoạt độ của enzyme được định nghĩa là lượng enzyme có khả năng xúc tác chuyển hóa 1  $\mu\text{mol}$  glucose trong 1 phút ở điều kiện thí nghiệm [11]

## II. Kết quả và thảo luận

### II.1. Ảnh hưởng của chiếu xạ lên sống sót của chủng nấm *T. koningiopsis* VTCC 31435

Tác động của bức xạ gamma tới sự phát triển của chủng *T. koningiopsis* VTCC 31435 được chúng tôi xác định thông qua số khuẩn lạc sống sót sau xử lý chiếu xạ liều từ 100 đến 2500 Gy. **Hình 1** biểu diễn mối tương quan giữa Logarit số lượng bào tử nấm sống sót (CFU/mL) và liều xạ. Kết quả cho thấy, số lượng bào tử sống sót phụ thuộc vào liều chiếu. Số lượng bào tử giảm mạnh trong khoảng liều từ 100 đến 1200 Gy, ở các liều cao hơn số lượng bào tử ít có sự chênh lệch hơn.



**Hình 1.** Mối tương quan giữa số lượng bào tử *T. koningiopsis* VTCC 31435 sống sót trong dịch bào tử và liều xạ.

Sau các lần chiếu xạ, tính toán tỉ lệ sống sót chủng *T. koningiopsis* VTCC 31435, chúng tôi nhận thấy số lượng tế bào sống sót còn khoảng 10% khi xử lý chiếu xạ dung dịch bào tử ở khoảng liều 400 Gy. Giá trị D10 trong nghiên cứu Trandafir và cộng sự trên *T. viride* trong khoảng từ 450 đến 500 Gy [12]. Nghiên cứu ảnh hưởng của chiếu xạ gamma tới đặc điểm hình thái và tính đối kháng của *T. viride* với nấm gây bệnh *M. phaseona*, Baharvand và cộng sự nhận thấy, tỷ lệ sống sót của *T. viride* là 9,7% ở liều chiếu 400 Gy và nhóm tác giả đã không quan sát được bất cứ sự nảy mầm nào của các bào tử nấm ở liều 450 Gy [13]. Những khác biệt trong các kết quả nghiên cứu nêu trên có thể được giải thích khi cho rằng các yếu tố như chủng giống, giai đoạn sinh trưởng, nhiệt độ, bản chất của môi trường dạng khí, thành phần hóa học của môi trường nuôi cấy... cũng như điều kiện sinh lý và khả năng tự sửa chữa của tế bào nấm đã ảnh hưởng đến sự tồn tại của chúng sau chiếu xạ.

### II.2. Ảnh hưởng chiếu xạ tới khả năng sinh cellulase của chủng *T. koningiopsis* VTCC 31435

Các khuẩn lạc đơn kháng xạ sẽ được lựa chọn ngẫu nhiên (50 khuẩn lạc cho mỗi liều chiếu) để đánh giá khả năng thủy phân cellulose thông qua chỉ số HC. Những khuẩn lạc có chỉ số HC lớn hơn 10% so với chỉ số HC của chủng thuần đều được coi là các khuẩn lạc kháng xạ và có khả năng sinh cellulase cao. Kết quả trong **Bảng 1** cho thấy, khuẩn lạc sinh cellulase xuất hiện ở tất cả các liều chiếu xạ với vòng phân giải CMC bao quanh các khuẩn lạc trên môi trường sàng lọc có chỉ thị Congo đỏ. Tuy nhiên, số lượng khuẩn lạc có chỉ số HC cao hơn chủng thuần là khác nhau ở mỗi liều chiếu xạ.

**Bảng 1. Khả năng thủy phân cellulose ở các khuẩn lạc *T. koningiopsis* xử lý chiếu xạ liều khác nhau**

Liều chiếu (Gy)	Khả năng thủy phân cellulose (Giá trị HC)		Tỷ lệ khuẩn lạc sinh cellulase cao (%)
	Trung bình	Max	
VTTC 31435	-	1,74	-
300	1,95±0,10	2,22	4,33±0,28
500	1,94±0,05	2,23	7,67±0,28
700	2,05±0,09	2,48	12,33±0,56
1000	2,21±0,11	2,38	14,05±0,67
1200	2,17±0,09	2,41	14,25±0,78
1500	2,06±0,14	2,62	13,67±0,62
2000	2,01±0,07	2,36	7,33±0,44
2500	1,95±0,02	2,15	5,33±0,28

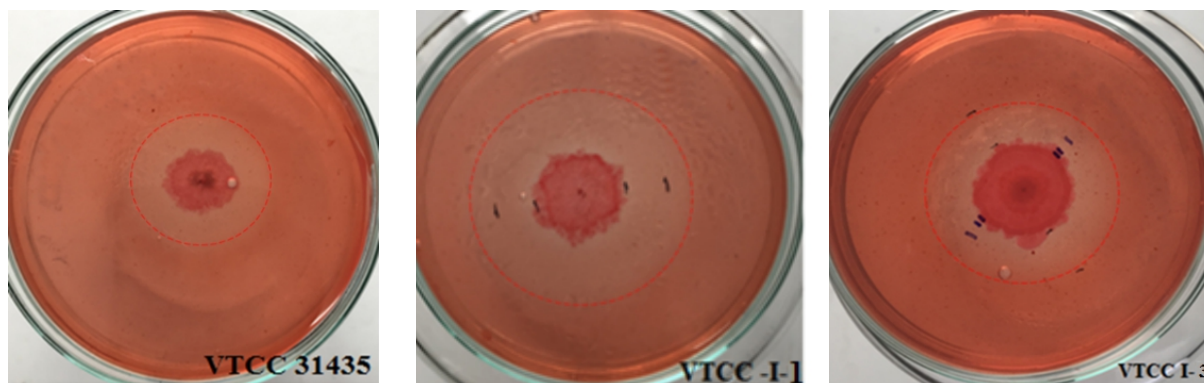
Kết quả trong **Bảng 1** cũng cho thấy khoảng liều chiếu từ 700 đến 1500 Gy thu được nhiều hơn các khuẩn lạc *T. koningiopsis* có chỉ số HC cao hoặc có chỉ số HC cao vượt trội so với các liều xử lý còn lại. Điều này được thể hiện rõ ở giá trị HC trung bình, giá trị này là 2,05; 2,21; 2,17 và 2,06 tương ứng với các liều 700, 1000, 1200 và 1500 Gy. Tại các liều chiếu xạ này, chúng tôi cũng thu được các khuẩn lạc có giá trị HC lớn nhất là 2,48; 2,38; 2,41 và 2,62, trong khi đó giá trị này ở chủng thuần là 1,74. So sánh giá trị HC trong nghiên cứu của chúng tôi với các nghiên cứu trên thế giới, nhận thấy: Damaso và cộng sự đặt ngưỡng cho giá trị HC là 1,0 [14], giá trị HC do Florencio và cộng sự đề xuất là 1,5 [15], trong khi giá trị HC trong nghiên cứu của Sazci và cộng sự lên tới đến 2,5 [16]. Như vậy giá trị HC trong nghiên cứu của chúng tôi tương đồng với các nghiên cứu khác trên thế giới.

Tỷ lệ đột biến thường liên quan tới liều chiếu xạ [17]. Kết quả cho thấy đột biến sinh cellulase cao xuất hiện ở tất cả các liều xạ, tỷ lệ đột biến dường như cao hơn trong khoảng liều từ 700 đến 1500 Gy so với các liều khảo sát còn lại. Dựa vào đường cong sống sót phụ thuộc liều chiếu xạ của chủng *T. koningiopsis* VTCC 31435 (**Hình 1**), chúng tôi nhận thấy đột biến sinh cellulase cao hơn chủng thuần thu được nhiều hơn khi số lượng TB sống sau chiếu xạ giảm từ  $10^3$  đến  $10^5$  lần (3-5 đơn vị Log) so với dạng thuần không chiếu xạ.

Sau quá trình sàng lọc này, 05 khuẩn lạc tiềm năng nhất đã được lựa chọn. Giá trị HC của 05 khuẩn lạc sau sàng lọc được trình bày trong **Bảng 2**, vòng phân giải CMC của một số khuẩn lạc tiềm năng sau chiếu xạ được biểu diễn ở **Hình 2**.

**Bảng 2.** Giá trị HC của 05 chủng lạc *T. koningiopsis* có khả năng sinh cellulase cao nhờ chiếu xạ

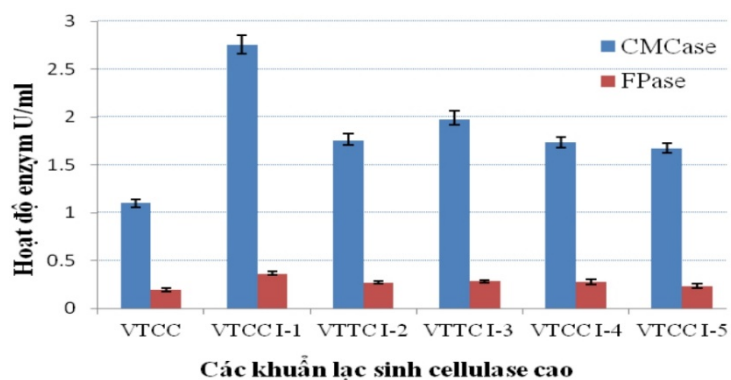
STT	Khuẩn lạc đột biến	Giá trị HC
1	<i>T. koningiopsis</i> VTCC 31435	1,74
2	VTCC I-1	2,66±0,07
3	VTTC I-2	2,37±0,09
4	VTTC I-3	2,40±0,11
5	VTCC I-4	2,35±0,11
6	VTCC I-5	2,29±0,05



**Hình 2.** Vòng phân giải CMC của một số chủng lạc *T. koningiopsis* sau nuôi cấy 28°C trong 24 giờ và ủ ở 37°C trong 5 ngày

### II.3. Hoạt độ cellulase của các chủng lạc tiềm năng

Để chọn các chủng lạc có hoạt tính cellulase cao nhất, 05 chủng lạc tiềm năng có giá trị HC cao nhất (được liệt kê trong **Bảng 2**) được định lượng hoạt độ CMCase và FPase bằng phương pháp DNS. Hoạt độ CMCase và FPase của chủng thuần *T. koningiopsis* VTCC 31435 và 05 chủng lạc tiềm năng sinh ra trong quá trình nuôi cấy được biểu diễn trên **Hình 3**.



**Hình 3.** Hoạt độ CMCase và FPase của 05 chủng lạc *T. koningiopsis* có khả năng sinh cellulase cao tạo được bằng chiếu xạ.

Các kết quả của chúng tôi cho thấy cả 05 chủng (tạo được trong khoảng liều chiếu từ 700-1500 Gy) đều có hoạt độ CMCase và FPase cao hơn chủng thuần. Hoạt độ CMCase ở các chủng tiềm năng cao hơn chủng thuần 1,51-2,48 lần. Trong khi đó, hoạt độ FPase của chúng cao hơn chủng thuần 1,20-1,87 lần. Chủng VTCCI-1 tạo được ở liều chiếu 1500 Gy có hoạt độ CMCase đạt 2,753 U/ mL, cao hơn chủng gốc tới 2,48 lần và hoạt độ FPase đạt 0,365 U/mL, cao hơn chủng gốc 1,87 lần. Chủng VTCC I-3 tạo được ở liều 700 Gy có hoạt độ CMCase và FPase tương ứng là 1,987 U/mL và 0,284 U/mL, lần lượt cao hơn chủng thuần là 1,78 và 1,45 lần. Kết quả mà chúng tôi thu được tương đồng với với nghiên cứu của Florencio và cộng sự khi đánh giá mỗi tương gian giữa phương pháp bán định lượng (trên môi trường PDA có bổ sung chỉ thị Congo đỏ) và định lượng hoạt độ cellulase (phương pháp DNS) của chủng nấm *Trichoderma*. Nhóm nghiên cứu cũng khẳng định cả hai phương pháp này là phù hợp để đánh giá và sàng lọc các chủng VSV có khả năng sinh cellulase cao [15].

Đánh giá tính bền vững sau chiếu xạ hai chủng VTCC-I-1 và VTCC-I-3, nhận thấy hai chủng này ổn định ít nhất sau 4 thế hệ liên tiếp (4 lần cấy truyền, mỗi lần cách nhau 01 tháng) (số liệu không được trình bày trong báo cáo này). Hoạt độ CMCase của chủng VTCC I-1 và VTCC I-3 ở thế hệ đầu tiên và thế hệ thứ 4 cũng đã được kiểm tra và xác nhận bởi Trung tâm Hóa sinh Công nghiệp và Môi trường, Viện Công nghiệp Thực phẩm.

### III. KẾT LUẬN

Tỷ lệ sống sót của chủng nấm sợi *Trichoderma koningiopsis* VTCC 31435 giảm dần theo sự tăng dần liều chiếu. Liều D10 khoảng 400 Gy và khoảng liều 700-1500 Gy là phù hợp để sàng lọc các chủng sau chiếu xạ có khả năng sinh cellulase cao. Sau chiếu xạ, đã sàng lọc được 05 chủng có khả năng sinh cellulase cao vượt trội, hoạt độ CMCase và FPase của các chủng này cao hơn chủng thuần tương ứng là 1,51-2,48 lần và 1,2-1,87 lần; trong đó 2 chủng VTCC-I-1 và VTCC-I-3 có hoạt tính cellulase ổn định ít nhất sau 4 thế hệ. Các kết quả nghiên cứu đã chứng minh bức xạ gamma là tác nhân hiệu quả trong việc nâng cao khả năng sinh cellulase của chủng nấm *T. koningiopsis*.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Gardner K.H., Blackwell J., The structure of native cellulose. *Biopolymers*, 13: 1975-2001, 1974.
2. Jarvis M., 2003, Cellulose stacks up, *Nature*, 426(6967), pp. 611–612, 2003.
3. Gupta P., Samant K., Sahu A., Isolation of cellulose- degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential. *International Journal of Microbiology*, 6, pp. 1-5, 2012.
4. Bayer E.A., Belaich J.-P., Shoham Y., Lamed R., The cellulosomes: multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides, *Annu Rev Microbiol*, 58, pp. 521–554, 2004.
5. Miklaszewska B., Macko D., Kłosowski G., Mikulski D., Application of semi-quantitative and quantitative methods for the selection of cellulolytic filamentous fungi isolated from pulp mill materials, *BioTechnologia*, 3, pp. 169–178, 2016.
6. Xu, F., Wang, J., Chen, S., Qin, W., Yu, Z., Zhao, H., Xing, X., Li, H, Strain Improvement for enhanced production of cellulose in *Trichoderma viride*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, Vol. 47, 1, 2011.

7. Tamada M., Kasai N., and Kaetsu I., Effects of gamma-ray irradiation on cellulase secretion of *Trichoderma reesei*, *J Ferment Technol* 65(6), pp. 703–705, 1987.
8. Shahbazi S., Ispareh K., Karimi M., Askari H., Ebrahimi M. A., Gamma and UV radiation induced mutagenesis in *Trichoderma reesei* to enhance cellulases enzyme activity. *International Journal of Farming and Allied Sciences*. 3 (5): 543-554, 2014.
9. El-Zawahry, Y.A., Mostafa, I.Y., Effect of gamma irradiation on the production of cellulase enzyme by some fungal isolates. *Isotope and Radiation Research*, Vol. 19, 1, 43-50, 1991.
10. Pratima, G., Kalpana S., Avinash S., Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential. *International Journal of Microbiology*, Vol. 2012, Article ID 578925, 2011.
11. TCVN 12104: 2018, Xác định hoạt độ xenlulaza trong vi sinh vật phân giải xenlulo, 2018.
12. Blakely W.F., *Introduction: Chromosome aberration induced by radiation*, Lecture of regional training course on biological radiation dosimetry, Seoul, Korea, 2007.
13. Trandafir T., Florina L.Z., Mioara A., Mihaele E., Mihai C., Alexandru A., Ovidiu I., oRdica I.S., *Radioresistance of biodegradation in estabshing the decontamination dose*, ICAMS 2014 – 5 th International Conference on Advanced Materials and Systems, 2012.
14. Damaso M.C.T., Terzi S.D.C, Farias A.X., Oveira A.C.P.D, Fraga M.E, Couri S., Selection of cellulolytic fungi isolated from diverse substrates, *Braz. Arch. Biol. Technol*, 55(4), pp. 513-520, 2012.
15. Florencio C., Couri S., Farinas C.S., Correlation between agar plate screening and sod-state fermentation for the prediction of cellulase production by *Trichoderma* strains. *Enzyme Res*, pp.1-7, 2012.
16. Sazci A., Radford A., Erenle K., Detection of cellulolytic fungi by using Congo red as an indicator a comparative study with the dinitrosalicylic acid reagent method, *Journal of Apped Bacteriology* 61, pp. 559-562, 1986.
17. Satoh K., Oono Y., Studies on application of ion beam breeding to industrial microorganisms at TIARA, *Quantum Beam Sci*, 3(2), pp. 1-16, 2019.



# STUDY ON CREATION OF HIGH PRODUCING CELLULASE MUTANT LINES OF *Trichoderma* BY GAMMA IRRADIATION

NGUYEN THI THOM, HOANG DANG SANG, TRAN XUAN AN, NGUYEN VAN  
BINH, TRAN BANG DIEP

*Hanoi Irradiation Centre, Minh Khai- Tu Liem- Hanoi*

*Email: [thom.nguyen1008@gmail.com](mailto:thom.nguyen1008@gmail.com)*

**Abstract:** Cellulase is one of industrially important enzymes used in variety of applications. Microorganisms, especially filamentous fungus *Trichoderma* spp are the main source of cellulase producing. The aim of this study is to enhance cellulase production of *Trichoderma* using gamma irradiation. After irradiation, the survival rate of *Trichoderma* and the optimal dose range for high cellulase producing mutations were determined. The enzyme activity of wild type and mutant strains were also determined semi-quantitatively by the diffusion method on PDA plate containing CMC and Congo-red indicator and quantified by DNS method. The results showed that the highest mutation rate was 12.33-14.25% at the dose range of 700-1500 Gy. After screening, 05 stability mutants for at least 4 generations with superior cellulase producing were selected. CMCase and FPase activity of mutants ranged from 1.51-2.48 and 1.2-1.87, fold higher than that in parent one. Thereby, gamma irradiation can be used as a simple and efficient method for enhancement of cellulase producing of *Trichoderma*.

**Key word:** *Cellulase, gamma irradiation, mutant, Trichoderma, survival rate*