

ABSTRACT

Lignocellulosic agricultural residues, particularly rice straw, represent an abundantly available yet chronically underutilized biomass resource with considerable potential for enzymatic valorization into food-relevant and biotechnologically important compounds. The efficient deconstruction of lignocellulose is primarily mediated by glycoside hydrolases (GHs), a diverse class of carbohydrate-active enzymes (CAZymes) whose secretion by cellulolytic fungi is dynamically regulated in response to the inducing substrate. Despite the biotechnological significance of *Trichoderma* as a producer of cellulolytic enzyme systems, the secretome diversity of wild-type isolates recovered from locally abundant tropical biomass remains largely uncharacterized. This study investigated the cellulolytic potential of *Trichoderma* sp. isolates obtained from decayed rice straw through comprehensive biochemical screening, followed by LC-MS/MS secretome profiling of the most active isolate. Of the twelve strains evaluated, eleven wild-type isolates and one characterized reference strain *Trichoderma asperellum* PK1J2 (PRJNA699105), isolate BT4 consistently demonstrated superior cellulase activity across all screening levels, exhibiting peak enzyme production at day 3 of submerged fermentation. Congo Red-CMC assays of concentrated day-3 supernatants confirmed authentic endoglucanase activity in BT4, while native-PAGE zymogram analysis revealed a distinct protein band co-localizing with a clear zone of CMC hydrolysis, providing direct protein-level evidence of cellulolytic activity. Based on molecular identification using the internal transcribed spacer (ITS) region, isolate BT4 was identified as belonging to the *Trichoderma harzianum* species complex, with the ITS sequence returning equally high-scoring matches 100% identity. The acquired MS/MS spectra were searched against the *Trichoderma* reference protein database, resulting in 1,088 predicted secreted proteins. The updated CAZy annotation identified 391 protein-family assignments, comprising 204 GT, 135 GH, 37 AA, 13 CE, one CBM, and one PL. GTs and GHs were the most represented CAZy classes, indicating substantial potential for glycan biosynthesis and polysaccharide degradation. The diverse GH repertoire further suggests the involvement of BT4 in lignocellulose degradation. The low number of CBM annotations should be interpreted cautiously, as reference-database-dependent peptide matching may underestimate divergent CAZy domains. Overall, these findings indicate that BT4 secretes a diverse CAZyme repertoire under submerged fermentation, supporting its potential for lignocellulose bioconversion.

Keywords: *Trichoderma*, cellulase, glycoside hydrolases, secretome profiling, lignocellulose, submerged fermentation, CAZymes

INTISARI

Limbah pertanian lignoselulosa, khususnya jerami padi, merepresentasikan sumber daya biomassa yang melimpah namun belum dimanfaatkan secara optimal, padahal memiliki potensi besar untuk divalorisasi secara enzimatik menjadi senyawa-senyawa penting di bidang pangan dan bioteknologi. Dekonstruksi lignoselulosa yang efisien utamanya dimediasi oleh *glycoside hydrolases* (GHs), sebuah kelas *carbohydrate-active enzymes* (CAZymes) yang beragam, di mana sekresinya oleh jamur selulolitik diatur secara dinamis sebagai respons terhadap substrat penginduksi. Terlepas dari signifikansi bioteknologi *Trichoderma* sebagai produsen sistem enzim selulolitik, keanekaragaman sekretom dari isolat tipe liar yang diperoleh dari biomassa tropis lokal belum banyak dikarakterisasi. Penelitian ini mengkaji potensi selulolitik dari isolat *Trichoderma* sp. yang diperoleh dari jerami padi lapuk melalui penapisan biokimia secara komprehensif, diikuti dengan profil sekretom menggunakan LC-MS/MS pada isolat yang paling aktif. Dari dua belas galur yang dievaluasi, terdiri atas sebelas isolat tipe liar dan satu galur acuan *Trichoderma asperellum* PK1J2 (PRJNA699105), isolat BT4 secara konsisten menunjukkan aktivitas selulase tertinggi di seluruh tingkatan penapisan, dengan puncak produksi enzim terjadi pada hari ke-3 fermentasi terendam. Pengujian Congo Red-CMC pada supernatan pekat hari ke-3 mengonfirmasi adanya aktivitas endoglukanase autentik pada BT4, sementara analisis zimogram native-PAGE menampilkan pita protein spesifik yang terlokalisasi bersama dengan zona bening hidrolisis CMC, yang memberikan bukti langsung aktivitas selulolitik pada tingkat protein. Berdasarkan identifikasi molekuler menggunakan daerah internal transcribed spacer (ITS), isolat BT4 diidentifikasi termasuk dalam kompleks spesies *Trichoderma harzianum*, dengan sekuens ITS menunjukkan kecocokan dengan skor tertinggi yang sama dan tingkat identitas sebesar 100%. Spektrum MS/MS yang diperoleh kemudian dicari terhadap basis data protein *Trichoderma* sehingga diperoleh 1.088 protein yang diprediksi disekresikan. Anotasi CAZy yang diperbarui mengidentifikasi 391 protein-family assignments, yang terdiri atas 204 GT, 135 GH, 37 AA, 13 CE, satu CBM, dan satu PL. GT dan GH merupakan kelas CAZy yang paling banyak teridentifikasi, menunjukkan potensi yang cukup besar dalam biosintesis glikan dan degradasi polisakarida. Keragaman keluarga GH juga menunjukkan kemungkinan keterlibatan BT4 dalam degradasi lignoselulosa. Rendahnya jumlah anotasi CBM perlu diinterpretasikan secara hati-hati karena pencocokan peptida yang bergantung pada basis data referensi dapat menyebabkan domain CAZy yang berbeda atau belum teranotasi secara lengkap tidak terdeteksi. Secara keseluruhan, hasil ini menunjukkan bahwa BT4 mensekresikan repertoar CAZyme yang beragam selama fermentasi terendam, yang mendukung potensinya dalam biokonversi lignoselulosa.

Kata kunci: *Trichoderma*, selulase, *glycoside hydrolase*, pemrofilan sekretom, lignoselulosa, fermentasi sistem cair, CAZyme