Archive of SID

جداسازی و شناسایی قارچهای تجزیه کننده باگاس

فاطمه تابنده[1*]، محمد رعایایی[2]، بیژن بمبئی[1]، منیر ملایی[2] و فهیمه قاسمی[1]

[1] تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، پژوهشکده بیوتکنولوژی صنعت و محیط زیست

[2] اهواز، دانشگاه شهید چمران، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۸٦/۱۰/۲٤ تاریخ پذیرش: ۸۸/۲/۱

چکیده

در تحقیق حاضر ۱۵ نمونه قارچی از باگاس نیشکر جدا شد که فقط ۳ جدایه توانایی رشد بر روی محیط کشت حاوی باگاس به عنوان منبع کربن اصلی را داشت. آزمایشهای میکروبیولوژیکی و مرفولوژیکی نشان داد که هر سه جدایه متعلق به جنس *آسپرژیلوس* است. آزمایشهای مربوط به تجزیه لیگنین توسط این میکروارگانیسمها در شرایط مناسب نشان داد که *آسپرژیلوس نایجر*، *آسپرژیلوس ترئوس* و *آسپرژیلوس فومیگاتوس* به ترتیب ۱۲/۵٤، ۹/۸۵ و ۳/٤۸ درصد لیگنین را (نسبت به وزن خشک باگاس) تجزیه کردند و همچنین آنزیم لیگنین پراکسیداز را به ترتیب با مقادیر U/L ۱۰/۰۲، ۹/۸۹ و ۵/۵٦ در روز ۲۱ گرماگذاری در حضور وراتریل الکل به عنوان محرک تولید این آنزیم تولید نمودند. آنزیم سلولاز نیز به میزان U/L ٤۷، ۵۸ و ۳۹ توسط *آسپرژیلوس نایجر*، *آسپرژیلوس ترئوس* و *آسپرژیلوس فومیگاتوس* تولید و اندازه گیری شد. بیشترین میزان تجزیه لیگنین توسط *آسپرژیلوس نایجر* و حداکثر فعالیت سلولازی توسط *آسپرژیلوس ترئوس* به دست آمد. بنابراین قارچهای مورد نظر توانایی استفاده مؤثر از باگاس را به عنوان ماده اولیه برای تولید آنزیم داشتند.

واژه های کلیدی: باگاس، تجزیه زیستی، سلولاز، لیگنیناز، *آسپرژیلوس*.

*نویسنده مسئول، تلفن تماس ٤٤۵۸۰۳۵۹ ، پست الکترونیکی taban_f@nigeb.ac.ir

مقدمه

عمده‌ترین ترکیب زیست توده لیگنوسلولز می‌باشد. این ترکیبات حدود نیمی از مواد تولید شده توسط فتوسنتز را تشکیل می‌دهند (۲۳). در حال حاضر تحقیقات وسیعی در کشورهای مختلف به منظور تولید غذا، انرژی و فرآورده‌هایی نظیر آنزیمها بر روی ضایعات لیگنوسلولزی کشاورزی در حال انجام است تا به نوعی مورد استفاده قرار گرفته و در محیط انباشته نشوند (۱۹ و ۲۵). لیگنوسلولز از سه نوع پلیمر سلولز، همی‌سلولز و لیگنین تشکیل شده که توسط پیوندهای غیرکووالانسی و پیوندهای عرضی کووالانسی به یکدیگر متصل شده‌اند (۱۲). سلولز و همی‌سلولز ماکرومولکول‌هایی از قندهای مختلف هستند، در حالی‌که لیگنین یک پلیمر پیچیده شامل واحدهای فنیل پروپان است که توسط اتصالات عرضی به هم باند شده‌اند به طوری که انواع پیوندهای شیمیایی بین واحدها دیده می‌شود به دلیل این پیچیدگی، مقاومت آن نسبت به تخریب زیستی توسط میکروبها زیاد است (۱۲ و ۲٦). با این حال برخی میکروارگانیسمها خصوصاً انواع قارچها، سیستمهای آنزیمی خاصی را توسعه داده‌اند تا توانایی تخریب لیگنین را به دست آورند (۱٤ ، ۱٦ و ۲۰). واکنشهایی که توسط قارچها، بالاخص قارچهای پوسیدگی سفید برای تأثیر بر لیگنین انجام می‌شود غالباً توسط آنزیمهای پراکسیداز خارج سلولی نظیر لیگنین پراکسیداز و منگنز پراکسیداز آغاز می‌شود (۸ ، ۱٤ ، ۱٦ و ۲۰).

www.SID.ir

Archive of SID

یکی از ضایعات لیگنوسلولزی باگاس است. باگاس مواد باقیمانده از خرد کردن ساقهٔ نیشکر به منظور استخراج شیرهٔ نیشکر است. در باگاس مقدار ترکیب سلولز/ همی سلولز ۷۰-۶۰ درصد و محتوای لیگنین بین ۲۵-۵ درصد متغیر است.

نیشکر برداشت شده از مزارع، در کارخانه طی فرآیند های مختلفی تبدیل به شکر شده و بقایایی چون باگاس و ملاس از آن بر جای می ماند. اکثر عناصر غذایی کم مصرف و پر مصرف مورد نیاز برای رشد گیاه نیشکر در این بقایا وجود دارد. با توجه به اینکه این عناصر غذایی توسط گیاه در طی دوره رشد از خاک جذب شده اند برای ادامه رشد نیشکر در سالهای بعدی مجدداً باید این عناصر طی فرآیندی به خاک برگردانده شوند تا خاک فقیر نشده و یا از باروری آن کاسته نشود. افزودن مستقیم این مواد زائد به خاک علاوه بر صرف هزینه های زیاد حمل و نقل، انتشار آفات و بیماریها، ایجاد رقابت بین گیاه و میکروبهای تجزیه کننده این مواد زائد مشکلاتی را نیز برای آبیاری در پی خواهد داشت، لذا قبل از افزودن این مواد به خاک ضروری است طی فرآیندهایی این بقایا تجزیه شده و به صورت کود آلی میکروبی در آید تا عوارض جانبی این بقایا بر طرف شود. باگاس تازه شامل ۳۳/٤ درصد سلولز، ۳۰ درصد همی سلولز و ۱۸/۹ درصد لیگنین می باشد. شرکت توسعهٔ نیشکر و صنایع جانبی علاوه بر آن که سالانه ۷۰۰ هزار تن شکر تولید می‌کند ضایعات و پسماندهای زیادی مانند باگاس، برگ و شاخه‌های نیشکر و ملاس دارد. در حال حاضر تولید سالانهٔ باگاس بالغ بر یک میلیون تن است که مقداری از آن برای تولید کاغذ، نئوپان و M.D.F (medium density fiber) یا بهمراه سایر پسماندها برای تهیهٔ کمپوست و یا افزودنی به خوراک دام اضافه می‌شود، با این وجود همچنان حجم عظیمی از باگاس به مصرف نمی‌رسد و یکی از معضلات شرکت صرف هزینه‌های زیاد برای معدوم نمودن باگاس است (۳ و ۱۱). با توجه به اهمیت کشت نیشکر و تولید بالای باگاس حاصل از واحدهای استحصال شکر در کشور، استفاده از آن به عنوان یک منبع تجدیدپذیر و سوبسترای فرآیندهای بیولوژیکی کاملاً اقتصادی و مقرون به صرفه است. لذا باگاس همچنان به عنوان یک نقطهٔ تمرکز برای محققان می‌باشد تا روشها و فنون نوین را برای استفادهٔ بهینه از آن ثروت ملی به کارگیرند.

در این مطالعه باگاس به دلیل دارا بودن درصد بالایی از کربوهیدراتها و نیز ارزان، فراوان و در دسترس بودن جهت تجزیه و بازگشت مؤثر به خاک مورد توجه قرار گرفت. جداسازی قارچهای تجزیه کننده لیگنین از باگاس و بررسی قدرت آنزیمی آنها برای تجزیه ترکیبات لیگنوسلولزی از اهداف اصلی این تحقیق می باشد.

مواد و روشها

نمونه برداری: نمونه‌برداری از باگاسهای طرح Trash blanket و نیز باگاسهای انبار شده در کنار کارخانه در واحد کشت و صنعت امیرکبیر انجام شد (٤).

جداسازی قارچها: جهت جداسازی میکروارگانیسمها از باگاس، ابتدا ۱ گرم باگاس در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر استریل در یک لوله آزمایش اضافه شده و چندین بار ورتکس شد تا میکروارگانیسمها بتوانند از فیبرهای باگاس جدا شوند. سپس از سوسپانسیون حاصل سریال رقتهای 10^{-1} الی 10^{-10} تهیه شد. از هریک از رقتهای حاصل به اندازهٔ ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و بر روی پلیتهای حاوی محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar) کشت گسترده تهیه و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت گرماگذاری شد. نهایتاً از هر یک از کلنیهای حاصل کشت خالص تهیه گردید.

جداسازی قارچهای تجزیه کننده باگاس: به منظور جداسازی قارچهای تجزیه کننده باگاس، کلیه قارچهای رشد کرده بر روی محیط PDA به محیط کشت معین با مقادیر مختلف باگاس به عنوان منبع کربن اصلی انتقال داده

www.SID.ir

Archive of SID

شدند. برای تهیه محیطهای کشت حاوی باگاس، لازم بود که در ابتدا باگاسها طی چند مرحله تیمار شوند. تیمار ضایعات لیگنوسلولزی از جمله باگاس به منظور حذف مواد زائد قابل حل در حلالهای آبی و آلی و نیز نرم شدن بافت گیاهی و هیدرولیز نسبی لیگنوسلولز ضروری است و در این زمینه گزارشهای متعددی ارائه شده است (۲۱ ، ۲۲ و ۲۳). در این تحقیق از روش زیر استفاده شد: ابتدا باگاسها با آب مقطر شسته شده و در دمای ۳± ۱۰۵ درجه سانتی گراد خشک شدند. سپس با آسیاب خرد و با مش۴۰ الک شدند و پس از آن با حلال الکل- بنزن به نسبت ۵۰- ۵۰ در دستگاه سوکسله شستشو داده و نهایتاً در بخار آب در دمای۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت یکساعت تیمار شدند.

در ابتدا لازم بود تا جدایه ها به رشد در بستر کشت جامد حاوی باگاس به عنوان منبع کربن اصلی سازگار شوند. بدین منظور ابتدا آنها را در محیط پیش کشت ۱ و سپس پیش کشت ۲ که محیط M9 تغییر داده شده و نسبت گلوکز به باگاس در آنها به ترتیب ۱ به ۲۰ و ۱ به ۳۰ بود، کشت داده شدند. مواد ثابت این دو محیط پیش کشت متشکل از ۱ گرم KH_2PO_4 ، ۰/۵ گرم $MgSO_4.7H_2O$، ۱ گرم $(NH_3)_2SO_4$ و ۱ میلی لیتر عناصر کمیاب در یک لیتر بود. در محیط پیش کشت ۱ از ۰/۱ گرم گلوکز و ۲ گرم باگاس (نسبت ۱ به ۲۰) و در محیط پیش کشت ۲ از ۰/۰۶ گرم گلوکز و ۲ گرم (نسبت ۱ به ۳۰) باگاس استفاده شد. pH هر دو محیط توسط HCl ۰/۱ نرمال بر روی ٤ تنظیم شد.

جدایه های قارچی که در محیط پیش کشت ۱ و سپس محیط پیش کشت ۲ رشد کرده بودند، به بستر جامد حاوی ۳ گرم KH_2PO_4 ، ۰/۵ گرم $MgSO_4.7H_2O$ ، ۱ گرم $(NH_3)_2SO_4$، ۱ میلی لیتر عناصر کمیاب و ۰/۱ گرم گلوکز و ۵ گرم باگاس (نسبت گلوکز به باگاس: ۱ به ۵۰) با رطوبت ۷۰-۷۵ درصد انتقال داده شدند.

بررسی فعالیت لیگنولیتیکی: برای مشاهده و اندازه گیری میزان تجزیه لیگنین و فعالیت سلولازی از محیط کشت مایع حاوی ۲ گرم KH_2PO_4، ۰/۵ گرم $CaCl_2$، ۰/۱ گرم $MgSO_4$، ۰/۵ گرم $(NH_3)_2SO_4$ و ۱۰ میلی لیتر عناصر کمیاب استفاده شد. نسبت گلوکز به باگاس در این محیط ۱ به ۵۰ بود (۰/۱ گرم گلوکز و ۵ گرم باگاس) و حجم نهایی به ۱ لیتر رسانده شد. (pHهای ٤ و ۵ و ٦ برای این محیط اعمال شد). برای تقویت فعالیت لیگنین پراکسیدازی از ماده محرک وراتریل الکل ۰/٤ مولار در محیط کشت مایع فوق در pH معادل ٤ استفاده شد (۷ و ۱۰).

سنجش فعالیت آنزیمهای تجزیه کننده باگاس: مقدار کمی آنزیم سلولاز با روش تأثیر روشناور محیط کشت بر کاغذ واتمن شماره ۱ و تعیین مقدار گلوکز توسط کیت آنزیمی انجام شد (٦ و ۱۳). میزان فعالیت لیگنین پر اکسیدازی با روش اکسیداسیون وراتریل الکل به وراتریل آلدئید و اندازه گیری جذب در طول موج ۳۱۰ نانومتر به دست آمد (۲٤). تجزیه شیمیایی باگاس و تعیین مقدار باقیمانده لیگنین قبل و بعد از تیمار میکروبی به روش Klason (H_2SO_4 72%) در محیط کشت مایع انجام شد (۹). در این روش ابتدا ۰/۱ گرم از نمونهٔ خشک باگاس که تحت عملیات پیش تیمار و استخراج قرار گرفته، در در دو شرایط قبل و پس از تیمار میکروبی به ظروف قابل اتوکلاو از قبل توزین شده (W1) اضافه می شود. پس از افزودن یک میلی‌لیتر H_2SO_4 72% و سایر مراحل مطابق دستورالعمل رفرنس مربوطه، نهایتاً وزن ظروف حاوی رسوب خشک تعیین می گردد (W2)، اختلاف مقادیر W1 و W2 مقدار لیگنین موجود در ۰/۱ گرم باگاس اولیه را نشان می دهد که به صورت درصد و تحت عنوان لیگنین Klason گزارش می شود.

وزن خشک لیگنین = W2 - W1

درصد لیگنین = (وزن خشک لیگنین × ۱۰۰) / وزن خشک نمونه اولیه

www.SID.ir

Archive of SID

شناسایی قارچهای تجزیه کننده باگاس: برای بررسی خصوصیات مورفولوژیکی ابتدا سوسپانسیون اسپور جدایه ها بر روی محیط کشت SDA (Sabouraud's dextrose agar) کشت داده شد. خصوصیات کلنی قارچها به مدت یک هفته به طور روزانه بررسی شد. همچنین خصوصیات میکروسکوپی نیز در این دوره بررسی شد. با توجه به اینکه هنگام تهیه لام از قارچهای رشته‌ایی ممکن است اندامهای رویشی وتولید مثلی از حالت طبیعی خود خارج شوند، برای بررسی دقیق این خصوصیات از روش کشت روی لام (Slide Culture) استفاده شد (۵).

نتایج

شناسایی جدایه ها با توانایی تجزیه لیگنین: در مرحله اول جداسازی، ۱۵ جدایه بر روی محیط کشت حاوی PDA رشد کرد. سپس جدایه ها به محیطهای پیش کشت و محیط کشت جامد منتقل شد. نتایج نشان داد تنها سه جدایه توانایی رشد بر روی محیط جامد حاوی باگاس به عنوان منبع اصلی کربن را دارد.

شناسایی قارچهای مورد نظر با روشهای میکروبیولوژی و مقایسه اندامهای رویشی و زایشی آنها نشان داد که سه جدایه متعلق به جنس آسپرژیلوس بوده و احتمالاً شامل: *آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس ترئوس و آسپرژیلوس فومیگاتوس* می باشد.

بررسی اثر عوامل مختلف در تجزیه لیگنین در محیط کشت مایع: جهت تعیین شرایط مناسب برای تجزیه لیگنین از رشد قارچها در محیط کشت مایع استفاده شد و تأثیر عوامل مختلف بر افزایش تجزیه لیگنین با روش یک فاکتور در هر زمان بررسی شد. هر آزمایش حداقل دو بار و هر آنالیز حداقل سه بار تکرار گردید و نتایج به صورت میانگین و انحراف از معیار پاسخها ارائه شد.

بررسی اثر دما بر تجزیه لیگنین: دماهای ۲۷ و ۳۰ و ۳۷ و ۴۰ درجه سانتی گراد جهت بررسی تجزیه لیگنین توسط ۳ گونه غربال شده در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد که با افزایش دما از ۲۷ تا ۳۷ درجه سانتی گراد زمان و مقدار رشد ظاهری نمونه های قارچی افزایش یافته ولی میزان تجزیه لیگنین کم شد. در دمای ۴۰ درجه رشد نمونه ها کاملاً متوقف گردید. بنابراین دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۳ روز برای رشد جدایه ها در نظر گرفته شد و سپس برای افزایش درصد تجزیه لیگنین نمونه ها به دمای ۳۰ درجه منتقل گردید (جدول ۱).

جدول ۱- درصد تجزیه لیگنین در شرایط دمایی مختلف.

دما (درجه سانتی گراد) / اسم گونه	۴۰	۳۷	۳۰	۲۷	سه روز در دمای۳۷ و سپس در ۳۰
آسپرژیلوس نایجر	۰	۵/۰۰±۰/۱۵	۶/۶۶±۰/۳۰	۴/۷۱±۰/۰۸	۷/۷۱±۰/۲۵
آسپرژیلوس ترئوس	۰	۴/۰۰±۰/۲۰	۴/۰۰±۰/۱۷	۲/۵۸±۰/۰۷	۵/۶۶±۰/۲۰
آسپرژیلوس فومیگاتوس	۰	۱/۴۹±۰/۰۵	۱/۹۳±۰/۰۶	۰/۳۲±۰/۰۴	۲/۵۱±۰/۴۷

بررسی اثر pH بر تجزیه لیگنین: به منظور بررسی تأثیر pH بر میزان تجزیه لیگنین، هر یک از قارچها در محیط مایع تحت دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت سه روز و سپس دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و pH های ۴ و ۵ و ۶ کشت داده شده و میزان تجزیه لیگنین در هر یک از شرایط بررسی شد. نتایج به دست آمده در pHهای مورد بررسی نشان داد که درصد لیگنین‌زدایی تمام نمونه‌های قارچی درpH برابر ۴ نسبت به pHهای ۵ و ۶ بیشتر است (جدول

www.SID.ir

Archive of SID

۲). به نظر می رسد pH ٤ برای رشد گونه ها در حضور باگاس مناسب تر است.

بررسی اثر میزان تلقیح تودهٔ هموژن میسلیومی بر تجزیه لیگنین: پس از گذشت ۵ روز قارچها در محیط PDB تشکیل توده میسلیومی دادند. سپس با دستگاه هموژنایزر توده میسلیومی هموژن شد و ابتدا به میزان ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد (حجم سوسپانسیون میسلیومی/وزن سوبسترا) به محیط کشت مایع حاوی باگاس تلقیح گردید (به طور مثال برای ۱۰ درصد تلقیح، ۰/۵ میلی لیتر سوسپانسیون میسلیومی به محیط کشت حاوی ۵ گرم باگاس اضافه شد). نتایج نشان داد با افزایش درصد تلقیح، میزان تجزیه لیگنین توسط قارچها افزایش می یابد (جدول ۳). احتمالاً افزایش توده سلول موجب می‌شود که ذرات باگاس تیمار شده بیشتر توسط میسلیوم قارچها احاطه شده و تجزیه لیگنین بیشتر انجام شود.

جدول ۲- درصد تجزیه لیگنین در pHهای مختلف.

pH / اسم گونه	٤	٥	٦
آسپرژیلوس نایجر	۹/۸٦±۰/٤۰	۷/٥±۰/۲٥	٥/۷۸±۰/۱٤
آسپرژیلوس ترئوس	۷/۷۸±۰/۱۳	٦/۳۲±۰/۳۰	٤/۳۳±۰/۱۷
آسپرژیلوس فومیگاتوس	۲/٤٥±۰/۰۷	۱/۱۱±۰/۰۸	۰/۹۸±۰/۰٤

جدول ۳- درصد تجزیه لیگنین در مقادیر مختلف تلقیح توده سلولی.

میزان تلقیح (درصد) / اسم گونه	۱۰	۲۰	۳۰
آسپرژیلوس نایجر	٤/٤۳±۰/۱٥	٥/۰۰±۰/۲٤	۸/۷۸±۰/٦۰
آسپرژیلوس ترئوس	۳/۲۱±۰/۲۰	٤/۲۱±۰/۱۹	٦/٤۲±۰/٥۰
آسپرژیلوس فومیگاتوس	۲/۰۰±۰/۱٥	۲/۰۱±۰/۰۷	٤/٤٦±۰/۱۰

بررسی اثر همزدن بر تجزیه لیگنین: به منظور در دسترس قرار گرفتن ذرات باگاس که به صورت رسوب درته ارلن محیط کشت قرار داشتند، محیط کشت بر روی شیکر با دور ۱۵۰rpm قرار گرفت. نتایج حاصل از تجزیه لیگنین در این شرایط در جدول ٤ نشان داده شده است. گزارشهایی مبنی بر تأثیر منفی همزدن و ایجاد اغتشاش در پایداری آنزیم لیگنین پراکسیداز وجود داشت (۱۵). لذا کشتها به صورت ثابت نیز گرماگذاری شدند و میزان تجزیه لیگنین در آنها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد درصد تجزیه لیگنین در کشتهای ثابت بیشتر است.

جدول ٤- درصد تجزیه لیگنین در شرایط با همزدن و بدون همزدن

شرایط همزدن / اسم گونه	همزدن با دور ۱۵۰rpm	کشت در شرایط ثابت
آسپرژیلوس نایجر	٥/٤٥±۰/٦۰	۷/۷٦±۰/۹۰
آسپرژیلوس ترئوس	٤/٤٤±۰/۳۰	٥/٤٥±۰/۳٦
آسپرژیلوس فومیگاتوس	۱/۲۱±۰/۱۸	۲/۳۹±۰/۲۰

بررسی اثر زمان کشت بر تجزیه لیگنین: نمونه‌ها بعد از ۱، ۲ و ۳ هفته از نظر میزان تجزیه لیگنین مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۵). نتایج نشان داد که با گذشت زمان درصد تجزیه لیگنین توسط هر یک از قارچها افزایش می یابد. *آسپرژیلوس نایجر* توانایی بالایی در تجزیه لیگنین نشان داد به طوری که در شرایط کشت مناسب ۱۲/٥٤ درصد لیگنین نسبت به وزن خشک باگاس توسط این قارچ تجزیه شد. *آسپرژیلوس ترئوس و آسپرژیلوس فومیگاتوس* به ترتیب ۹/۸٥ و ۳/٤۸ درصد لیگنین را تجزیه کردند.

جدول۵- درصد تجزیه لیگنین در زمانهای مختلف کشت.

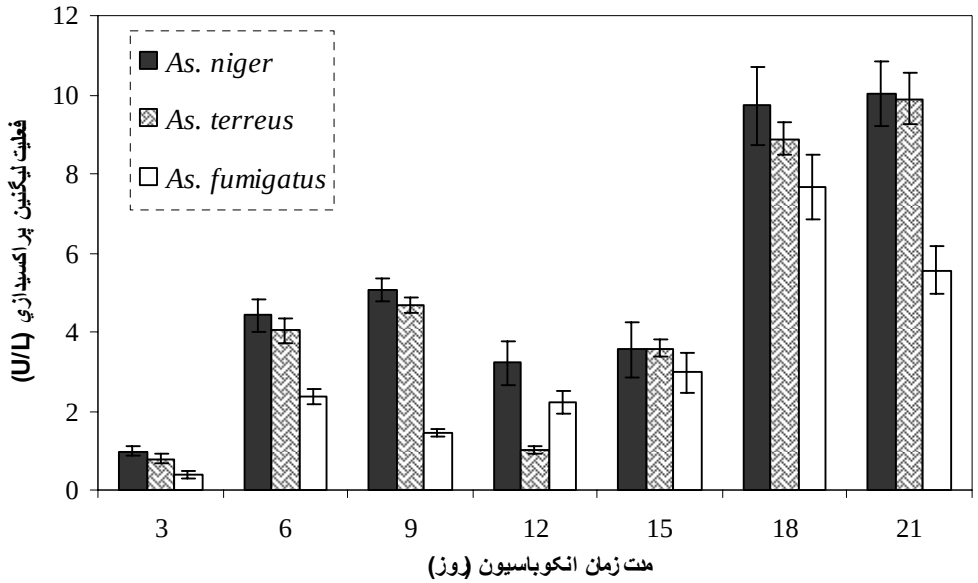
زمان انکوباسیون / اسم گونه	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم
آسپرژیلوس نایجر	٤/۷۱±۰/٤۰	٦/۹۷±۰/٥۰	۱۲/٥٤±۰/۸۷
آسپرژیلوس ترئوس	۲/۷۹±۰/۱۰	٤/۹۱±۰/٤۰	۹/۸٥±۰/۹٥
آسپرژیلوس فومیگاتوس	۰/٦۸±۰/۰٦	۱/٥۰±۰/٤٦	٤/٤۸±۰/۳۲

بررسی تولید آنزیمهای خارج سلولی تجزیه کننده باگاس: آنزیمهای لیگنین پراکسیداز و سلولاز در محیط کشت مایع در شرایط مناسب آزمایشهای قبلی برای تجزیه

www.SID.ir

Archive of SID

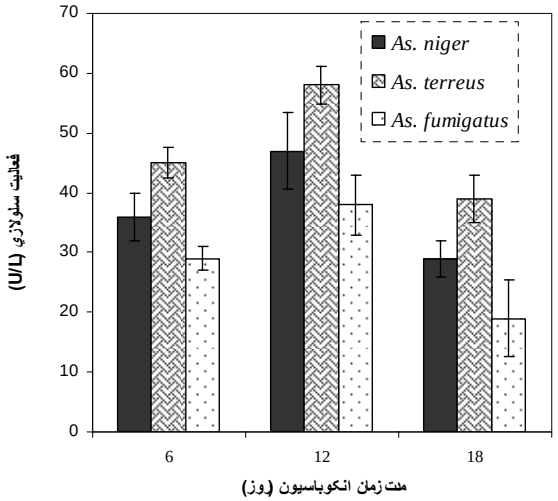
لیگنین (تحت دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت سه روز و سپس دمای ۳۰ درجه سانتی گراد، pH برابر ٤ و نیز میزان تلقیح ۳۰ درصد به محیط کشت مایع و در شرایط ثابت گرماگذاری به مدت ۳ هفته)، به ترتیب با استفاده از روشهای کمی اکسیداسیون وراتریل الکل و تجزیه فیلتر کاغذی اندازه گیری شدند.



شکل ۱- مقایسه فعالیت آنزیم لیگنین پراکسیداز در محیط کشت مایع در شرایط مناسب برای گونه های قارچی در طی سه هفته.

نتایج نشان داد بیشترین مقدار آنزیم لیگنین پراکسیداز توسط *آسپرژیلوس نایجر* تولید می‌شود. منحنی تغییرات تولید آنزیم لیگنین پراکسیداز در هر سه گونه تقریباً مشابه است به طوری که در حوالی روز ۱۲ کاهشی در مقدار فعالیت آنزیم مشاهده شده و سپس افزایش مجدد مقدار آنزیم دیده می‌شود (شکل ۱).

همانگونه که در شکل ۲ مشاهده می‌شود تولید آنزیم سلولاز روند متفاوتی را نشان می دهد به طوریکه حداکثر تولید آنزیم در روز ۱۲ برای هر سه قارچ می باشد و سپس تا روز هجدهم از فعالیت آنزیم سلولاز کاسته می‌شود. نتایج نشان داد تولید آنزیم سلولاز در *آسپرژیلوس ترئوس* در روز ۱۲ بیشتر از سایرین بوده و به ۵۸ واحد در لیتر می‌رسد.



شکل ۲- مقایسه فعالیت آنزیم سلولاز درمحیط کشت مایع بهینه برای گونه های قارچی. مدت زمان انکوباسیون ٦، ۱۲ و ۱۸ روز در نظر گرفته شد.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث و نتیجه گیری

در مرحله اول غربالگری مشخص شد که از ۱۵ نمونه قارچی، تنها ۳ نمونه توانایی رشد بر روی بستر جامد حاوی باگاس به عنوان منبع اصلی کربن را داشتند و در روشناور حاصل از کشت مایع آنها پروتئینهای خارج سلولی مشاهده شد. قارچها پس از آنکه در بستر جامد حاوی باگاس رشد داده شدند، با وجود مشاهده تجزیه شیمیایی لیگنین، فعالیت آنزیمی آنها به راحتی قابل اندازه گیری نبود. علت این پدیده احتمالاً اتصال پروتئینهای خارج سلولی به سطح ذرات باگاس می باشد. این مشکل در کشت غوطه ور در محیط مایع مرتفع شد، لذا با تغییر فاکتورهای دما، pH ، میزان تلقیح، همزدن و زمان کشت در محیط مایع سعی شد تا شرایط مناسب برای بررسی آنزیمهای خارج سلولی فراهم شود.

نتایج حاصل از بررسی تأثیر دما بر میزان تجزیه لیگنین توسط این سه قارچ نشان داد که با افزایش دما از ۲۷ به ۳۷ درجه سانتی گراد رشد میسلیومهای قارچی افزایش یافته و بالعکس میزان تجزیه لیگنین کاهش می‌یابد و در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد رشد نمونه‌ها کاملاً متوقف می‌شود. بنابراین دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت سه روز برای رشد قارچها در نظر گرفته شد و سپس برای افزایش درصد تجزیه لیگنین نمونه‌ها به دمای ۳۰ درجه سانتی گراد منتقل شدند. نتایج تحقیقات دیگر که با قارچ *فانروکیت کریزوسپوریوم* انجام شده، نشان داده است که دمای بهینه برای رشد قارچ و تولید لیگنین پراکسیداز متفاوت است به طوری که دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد برای رشد میسلیومها بهینه است و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد بهترین دما برای تولید لیگنین پراکسیداز می باشد (۱۷).

نتایج به دست آمده از بررسی تأثیر pH نشان داد که درصد لیگنین‌زدایی درpH برابر ٤ در تمامی نمونه‌های قارچی نسبت به pHهای ۵ و ٦ بیشتر است. آقا محسنی در سال ۱۳۸٤ جهت بررسی عملکرد لیگنین‌زدایی از ضایعات جامد حاصل از استخراج روغن از میوهٔ زیتون توسط *فانروکیت کریزوسپوریوم* از pHهای ٤/۵ ،۵/۵ و ٦ استفاده نموده و بیشترین لیگنین‌زدایی را درpH برابر ٤/۵ مشاهده کرد (۱).

تأثیر میزان تلقیح توده میسلیومی اولیه به این صورت بود که با افزایش نسبت تلقیح مقدار لیگنین حذف شده در نمونه‌های قارچی افزایش یافته به طوری که بیشترین مقدار لیگنین حذف شده در تلقیح ۳۰ درصد به دست آمد. به طور کلی افزایش توده میسلیومی در بسیاری از فرآیندهای زیستی در افزایش عملکرد فرآیند نقش مؤثری دارد (۱۸)، این پدیده می‌تواند به این دلیل باشد که از یک سو میسلیومهای قارچی در درصد تلقیح بالاتر رشد بیشتری داشته و به لحاظ فیزیکی دسترسی آنها به سوبسترا بیشتر و بهتر خواهد بود و از سوی دیگر در نسبتهای تلقیح پایین، مواد غذایی آسان هضم مانند گلوکز دیرتر تمام می‌شوند، در نتیجه تولید آنزیمهای لیگنولیتیک به تعویق می‌افتد. در نسبتهای تلقیح بالا از آنجا که جمعیت میکروارگانیسمها از همان ابتدا بالاست، گلوکز به سرعت تمام شده و فعالیت لیگنولیتیک قابل توجه خواهد بود.

نتایج فعالیت آنزیم لیگنین پراکسیداز طی ۲۱ روز انکوباسیون در محیط کشت مایع بهینه نشان می‌دهد که آنزیم مذکور در *آسپرژیلوس نایجر و آسپرژیلوس ترئوس* تا روز نهم افزایش یافته و در روز ۱۲ کاهش می‌یابد. سپس روند فعالیت آنزیمی مجدداً زیاد شده و در روز ۲۱ به مقدار ماکزیمم خود می‌رسد که این مقدار برای *آسپرژیلوس نایجر* ۱۰/۰۲ U/l و برای *آسپرژیلوس ترئوس* ۹/۸۹ U/l می‌باشد. در این راستا نتایج تحقیقات عباسی درسال ۱۳۸٤ جهت بررسی عملکرد لیگنین‌زدایی از پوسته پسته توسط *فانروکیت کریزوسپوریوم* نشان داد که آنزیم لیگنین پراکسیداز بیشترین فعالیت خود را در روز ۲۰ و به میزان ٦۰/۷۲ U/l داشته است (۲)، برای *آسپرژیلوس*

www.SID.ir

Archive of SID

فومیگاتوس نیز همین روند در فعالیت آنزیم ولی با سه روز تأخیر مشاهده می‌شود.

نتایج نشان داد که قارچهای جداسازی شده در این پژوهش توانایی تولید آنزیم سلولاز را دارند. روند تولید این آنزیم در هر سه گونه *آسپرژیلوس* در روز دوازدهم نسبت به روز ششم افزایش داشته، در حالی‌که در روز هیجدهم کمتر بوده است. به نظر می‌رسد در روز ششم به دلیل تجزیهٔ مقداری از لیگنین و دسترسی بیشتر قارچها به سلولز، فعالیت این آنزیم افزایش یافته و فعالیت بیشتری را در روز دوازدهم داشته است. کاهش فعالیت آنزیم در روز هیجدهم می‌تواند به دلیل حضور مواد آروماتیک محلول در آب در حین تجزیهٔ لیگنین باشد.

فعالیت آنزیم سلولاز در قارچ *آسپرژیلوس ترئوس* از سایر قارچها بیشتر بود، هرچند این مقدار به فعالیت آنزیم سلولاز در قارچ *آسپرژیلوس نایجر* نیز نزدیک است. فعالیت لیگنین پراکسیداز به عنوان مهمترین آنزیم در تجزیه لیگنین در *آسپرژیلوس نایجر* بالاترین مقدار را داشت. ازسوی دیگر نتایج تجزیه شیمیایی لیگنین نیز نشان داد قارچ *آسپرژیلوس نایجر* لیگنین را بیشتر از دو نمونه قارچی دیگر تجزیه می‌کند. فعالیت آنزیمی در تجزیه لیگنین نشان داد که به ترتیب *آسپرژیلوس نایجر* بیشترین و *آسپرژیلوس فومیگاتوس* کمترین فعالیت را دارد، تجزیه شیمیایی نیز بیشترین و کمترین میزان خود را برای این دو قارچ داشته است. بنابراین می‌توان *نتیجه* گرفت که ارتباط مستقیمی بین تولید این آنزیمها و تجزیه لیگنین در باگاس تیمار شده وجود دارد.

سپاسگزاری: این مقاله در قالب طرح ۲٦٦ با حمایت مالی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری انجام شده است. مؤلفین از همکاری جناب آقای مهندس گلستانه، شرکت توسعه نیشکر و صنایع جانبی تشکر و قدردانی می نمایند.

منابع

۱- آقا محسنی، هنگامه. ۱۳۸٤. پایان نامه کارشناسی ارشد مهندسی شیمی-بیوتکنولوژی دانشگاه صنعتی امیرکبیر.

۲- عباسی، سعید. ۱۳۸٤. پایان نامه کارشناسی ارشد مهندسی شیمی- بیوتکنولوژی دانشگاه صنعتی امیرکبیر.

۳-گلستانه، محمد باقر. ۱۳۸٤. سرمایه ملی که دود می شود. نشریه شکر شکن. ص ۱۸-۲۵.

٤- ملایی، م. ۱۳۸٦. پایان نامه کارشناسی ارشد. میکروبیولوژی دانشگاه شهید چمران اهواز.

۵- کچویی، ر.، گرامی شعار، م. ۱۳۸۵. قارچ شناسی پزشکی.

6. Adney, B., and Baker, J. 1996. Measurement of cellulose activity. Chemical analysis testing task: laboratory analytical procedure. National renewable energy laboratory publications. (sited at http://www.nrel.gov).

7. Barr, D.p., Shah, M.M., and Aust, S.D. 1993. Veratryl alcohol-dependent production of molecular oxygen by lignin peroxidase. *The Journal of Biological Chemistry*. 268:241-244.

8. Blanguez, P., Caminal, G., Sarra, M., Vicent, M. T., and Gabarrell, X. 2002. Olive oil mill waste water decolorization and detoxification in a bioreactor by the white rot fungus *Phanerochaete chrysospoium*. *Biotechnol. Prog*. 8:660-662.

9. Brauns, F.E., and Pettersen, R.C. 1988. Lignin determination. Methods in Enzymology, SanDiego, CA: Academi Press. 161:96-99.

10. Cancel, M.A., Orth, A. B. and Tien, M. 1993. Lignin and veratryl alcohol are inducers of the ligninolytic system of *Phanerochaet chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol*. 59:2909-2913.

11. De-paula, E.H., Ramos, L.P. and Azevedo, M.O.1999. The potential of *Humicola grisea* var. *thermoidea* for bioconversion of sugarcane baggase. *Bioresourse. Technol*. 68:35-41.

12. Donefer, E., and Latrille, L. 1979. Description of sugarcane feeds: Nomenclature and nutritional information. International Development Research Center, Canada.

www.SID.ir

Archive of SID

13. Ghose, T.K. 1987. "Measurement of cellulose activities". *Pure. Appl. Chem*. 59: 257-268.

14. Horikoshi, K. 1999. Alkaliphiles: some application of their products for biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 63:735-50.

15. keyser, P., Kirk, K., and Zeikus, J. 1978. Ligninolytic enzyme system of *Phanerochaete chrysosporium*: synthesized in the absence of lignin in response to nitrogen starvation. *J. Bacteriol*. 135: 790-797.

16. Kirk, K., and Cullen, D. 1998. Enzymology and Molecular genetics of wood degradation by white rot fungi. In: Young RA, Akhtar M (eds) Environmental friendly technology for pulp and paper industry. Wiley, New York. 273-307.

17. Kirk, K., and Farrell, R. 1987. Enzymatic combustion: the microbial degradation of lignin. *Ann. Rev. Microbiol*. 41:465-505.

18. Kulkarni, N., Shendye, A., and Rao, M. 1999. Molecular and biotechnological aspect of xylanase. *FEMS Microbiol. Rev*. 23:411-456.

19. Lee, J. 1997. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *J. Biotechnol.* 56:1-24.

20. Maheshwari, R., Bharadwaj, G., and Bhat, M. K. 2000. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. *Micrib. Mol. Biol. Rev*. 64:461-488.

21. Martin, C., Alriksson, B., Sjöde, A., Nilvebrant, N.O., Jönsson, L.J. 2007. Dilute sulfuric acid pretreatment of agricultural and agro-industrial residues for ethanol production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 137:339-352.

22. Martin, C., Galbe, M., Nilvebrant, N.O., Jönsson, L.J. 2002. Comparison of fermentability of enzymatic hydrolyzates of sugarcane bagasse pretreated by steam explosion using different impregnating agents. *Appl Biochem. Biotechnol.* 98:699-716.

23. Pate, M., and Findlay, M. 1982. Value of treating baggase with steam under pressure for cattle feed. *Trop. Agricul*. 59:293-297.

24. Tein, M and Kirk, K. Lignin Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium. Methods in Enzymology*. 161: 238-249, 1988.

25. Victor, O.T., Ogbe, S.B., Eriola, B., Kolawole, S., and Bamikole, A. 2003. Cellulose production by *Aspergillus Flavus* Linn isolate NSPR101 fermented in Sawdust, bagasse and corncob. *African. J. Biotechnol*. 2(6): 150-152.

26. Wariish, H., Valli, K., and Gold, M. 1992. Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* kinetic mechanism and role of chelators. *J. Biol. Chem.* 26:23688-95.

www.SID.ir

Archive of SID

Isolation and identification of the bagasse degrading microorganisms

Tabandeh F.[1], Roaiaie M.[2], Bambai B.[1], Molaie M.[2], and Ghasemi F.[1]

[1] Industrial and Environmental Biotechnology Dept., National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran

[2] Biology Group, Faculty of Science, Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Abstract

In the present study, 15 fungal samples were isolated from sugarcane bagasse which were able to grow on bagasse as the main carbon source. Morphological and microbiological studies showed that these three isolates were related to *Aspergillus* genus. Our experiments showed that the ability of *As. niger*, *As. terreus* and, *As. fumigatus* for bagasse degradation were 12.54, 9.85, 3.48 percent (in ratio to bagasse dry wight) and their lignin peroxidase activities were 10.02, 9.89 and 5.56 U/L in the presence of veratryl alcohol as an lignin peroxidase inducer after 21 days incubation, respectively. Cellulase activities of 47, 58 and 39 U/L were obtained by mentioned fungi, respectively. In this study the maximum lignin degradation activity was obtained for *As. niger* (12.54 percent) and maximum cellulase activity was measured for *As. terreu*s (58 U/L). It seems that these isolates are efficiently able to use bagasse as the main carbon source for production of lignolytic enzymes.

Keywords: bagasse, biodegradation, cellulase, ligninase, *Aspergillus*

www.SID.ir