مجله دنیای میکروب‌ها
سال هشتم شماره اول (پیاپی۲۲) بهار ۱۳۹۴
صفحات ۱۷-۶

Original Article

شناسایی و بهینه سازی قارچ های مولد پکتیناز جدا شده در مرحله غربالگری به منظور استفاده در صنعت آب میوه

اعظم نوری گوشکی[۱]، محمد کارگر[*۲]، جاوید امینی[۳] ، محمد مهدی متقی[۴]

[۱]کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروب شناسی، [۲]دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، دانشکده علوم، گروه میکروب شناسی، [۳]دانشجوی دکتری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرمان، گروه میکروب شناسی، [۴]استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرمان، دانشکده علوم، گروه میکروب شناسی

چکیده

سابقه و هدف: آنزیم های پکتینولیتیک یا پکتینازها یک گروه هتروژن از آنزیم های مربوط به تجزیه مواد پکتیکی هستند. اصلی ترین کاربرد صنعتی پکتینازها، استخراج و شفاف سازی آب های میوه و سیزیجات می باشد. این مطالعه با هدف شناسایی و بهینه سازی قارچ های مولد پکتیناز جداسازی شده از پساب کارخانجات کنسانتره آب میوه انجام شد.

مواد و روش ها: این پژوهش به صورت مقطعی و تصادفی بر روی ۵۰ نمونه تهیه شده از سیب های در حال فساد، خاک و پساب کارخانجات کنسانتره آب میوه استان های مختلف ایران انجام شد. در ابتدا قارچ های جداسازی شده از نظر فعالیت آنزیمی توسط اندازه گیری هاله شفاف بر روی محیط پکتین (برآورد کیفی) و مقدار آنزیم تولید شده در محیط غوطه ور (برآورد کمی) بررسی شدند. سپس ویژگی های کینتیکی سویه برتر مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: از مجموع ۸۰ قارچ، ۱۳ مورد (۱۶ درصد) ویژگی تولید آنزیم پکتیناز با ایجاد هاله شفاف در اطراف کلنی را داشتند. مناسب ترین فعالیت پکتیناز (۰/٤ U/ml) مربوط به سویه *آسپرژیلوس نایجر* AN64 بود. بیشترین میزان تولید آنزیم پس از ۷۲ ساعت به دست آمد. مناسب ترین دما و pH بهینه برای فعالیت و پایداری پکتیناز به ترتیب ۳۰ درجه سیلیسیوس و ۵ pH بود. یون های Ag^{1+}، Mg^{2+} Mn^{2+} و درجنت های فعال سطحی مانند سولفات آمونیوم، عصاره مخمر، EDTA و اسید سیتریک اثر القایی مناسبی در افزایش فعالیت پکتیناز داشتند.

نتیجه گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که *آسپرژیلوس نایجر* AN64 به دلیل تحمل pH اسیدی و پایداری در دامنه گسترده pH و حرارت های مختلف می تواند در صنعت آب میوه مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: پکتیناز، تخمیر غوطه ور، صنعت آب میوه، *آسپرژیلوس نایجر*.

دریافت مقاله: آذر ماه ۹۳ پذیرش برای چاپ: بهمن ماه ۹۳

مقدمه

مواد پکتیکی، کمپلکس ماکرومولکول های گلیکوزیدی با جرم مولکولی بالا هستند که در گیاهان عالی یافت می شوند. این ترکیبات با ایجاد یک لایه چسبناک خارج سلولی نازک بین دیواره های سلول های جوان مجاور، مسئول تمامیت ساختاری و انسجام بافت گیاه را به عهده دارند (۱و۲). پکتینازها ۲۵ درصد از سهم فروش جهانی آنزیم های غذایی را تشکیل می دهند. پکتینازها یکی از مهمترین آنزیم هایی می باشد که به طور گسترده ای در باکتری ها، قارچ ها و گیاهان توزیع شده است (۳). در شرایط تجاری، ترکیبی از سه فعالیت آنزیمی: پلی گالاکتوروناز (PG)، پکتین استراز (PE) و پکتین لیاز (PL)

*) آدرس برای مکاتبه: جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروب شناسی.
تلفن: ۰۹۱۷۳۱٤۹۲۰۳ پست الکترونیک: microkargar@gmail.com

Archive of SID
www.SID.ir

مورد استفاده قرار می گیرد (٤). پلی گالاکتوروناز‌ها، هیدرولیز تصادفی باندهای ۱و٤- α -D گالاکتورونیک اسید را در ناحیه صاف پکتین کاتالیز می نمایند (٥ و ٦).

به طور تقریبی تمامی آماده سازی های تجاری پکتینازها از منابع قارچی تولید می شوند (۷). *آسپرژیلوس نایجر* (*Aspergills niger*)، متداول ترین گونه قارچی است که برای تولید صنعتی آنزیم های پکتینولیتیکی مورد استفاده قرار گرفته است (۱۰-۸). تخمیر غوطه ور (SMF) و تخمیر در بستر جامد (SSF) به طور موفقیت آمیزی در تولید پکتیناز به وسیله ی قارچ ها (۱٤-۱۱) و باکتری ها (۱۹-۱٥) مورد استفاده قرار گرفته اند. تخمیر غوطه ور یک سیستم توسعه یافته است که در مقیاس صنعتی برای تولید انواع زیادی از متابولیت های میکروبی استفاده می گردد. این روش از نظر تکنیکی نسبت به تخمیر در بستر جامد ساده تر است و پس از سال ۱۹٤۰ برای تولید آنتی بیوتیک ها در مقیاس بزرگ توسعه یافته است (۲۰).

در طول سال ها، پکتینازها در بسیاری از فرآیندهای متداول صنعتی مانند نساجی، فرآوری فیبر گیاهی، چای، قهوه، استخراج روغن، تصفیه فاضلاب صنعتی حاوی مواد پکتینی و غیره به کار رفته اند. همچنین از آنها برای تصفیه ویروس ها (۲۱) و در ساخت کاغذ (۲۲ و ۲۳) نیز استفاده شده است.

ترکیب آمیلاز و پکتیناز برای شفاف سازی آب میوه ها استفاده می شود. این مخلوط آنزیمی زمان فیلتراسیون را تا ٥۰ درصد کاهش می دهد (۲٤). در مورد آب میوه، استخراج با روش خیساندن آنزیماتیکی می تواند محصول را به بیشتر از ۹۰ درصد در مقایسه با آب میوه گیری متداول مکانیکی افزایش دهد. علاوه بر این، مشخصات ارگانولپتیک (رنگ، بو) و مواد مغذی (ویتامین ها) و اثرات تکنولوژیکی (سهولت فیلتراسیون) را بهبود می بخشد (۱). هم اکنون حجم بالایی از واردات این آنزیم در کشور ما انجام می شود. امروزه در ایران این آنزیم در صنعت آب میوه سازی مورد استفاده قرار می گیرد. با وجود کارایی و کفایت قابل توجه این آنزیم، اما به دلیل قیمت زیاد (۳۸۰-۱۰ دلار به ازای هر کیلوگرم) مصرف آن در صنعت تولید آب میوه با محدودیت هایی مواجه شده است. از مهم ترین خسارت های ناشی از استفاده نکردن این آنزیم می توان به کاهش کیفیت و بازده صنعت آب میوه، کاهش مصرف آب میوه، کمبود ویتامین ها و مواد معدنی اشاره نمود (۲٥).

هدف از این پژوهش، غربالگری قارچ های بومی تولید کننده پکتیناز از پساب کارخانجات کنسانتره آب میوه، انتخاب بهترین سویه برای آزمایشات کینتیک پکتیناز و بهینه سازی شرایط کشت از نظر زمان گرماگذاری، دما، pH، منابع کربن، منابع نیتروژن، یون های فلزی و مواد شیمیایی بود.

مواد و روش ها

الف) جمع آوری نمونه ها: این پژوهش به صورت مقطعی بر روی ٥۰ نمونه سیب درختی در حال فساد، خاک و پساب کارخانجات کنسانتره آب میوه جمع آوری شده از استان های کرمان، البرز، گیلان و ارومیه انجام شد.

ب) جداسازی قارچ ها: ابتدا یک گرم از نمونه در ۹ میلی لیتر آب مقطر استریل مخلوط گردید. این محلول تا رقت 10^{-4} رقیق سازی شد. ۱ میلی لیتر از هر رقت بر روی محیط YGC (شرکت Liofilchem) کشت داده شد. پلیت ها در دمای ۳۰ درجه سیلیسیوس به مدت ٥ روز گرماگذاری شدند. کشت ها برای به دست آمدن کلنی های خالص، چندین بار بر روی محیط YGC کشت مجدد داده شدند. در این مرحله، قارچ ها بر اساس تفاوت های مورفولوژیکی (اندازه کلنی، رنگ کلنی، ...)، جداسازی شدند.

ج) جداسازی قارچ های تولید کننده پکتیناز: جدایه ها برای سنجش توانایی تولید پکتیناز به محیط کشت آگاردار واجد پکتین استریل شده (۱ درصد پکتین سیب، ۰/۱٤ درصد سولفات آمونیوم، ۰/۲ درصد دی پتاسیم فسفات، ۰/۰۲ درصد سولفات منیزیم، ۰/۱ درصد محلول نوترینت، ۳ درصد آگار و pH ٥) توسط اسپور تلقیح و برای ۳ تا ٥ روز در دمای ۳۰ درجه سیلیسیوس گرماگذاری شدند. در ادامه پلیت ها با محلول ید-یدید پتاسیم رنگ آمیزی شدند.

Archive of SID

www.SID.ir

در اطراف جدایه های تولید کننده پکتیناز، مناطق شفافی تشکیل می شود. سپس هاله شفاف گونه های مختلف قارچی با خط کش اندازه گیری گردید (۲٦).

د) تولید پکتینیاز: ۰/۵ میلی لیتر از سوسپانسیون اسپور قارچ هایی که در مرحله قبل دارای هاله شفاف بودند به محیط کشت غوطه ور استریل (۱ درصد پکتین سیب (مرک، آلمان)، ۱ درصد تفاله سیب، ۰/٦ درصد سولفات آمونیوم، ۰/٦ درصد دی پتاسیم فسفات، ۰/٦ درصد مونوپتاسیم فسفات، ۰/۰۱ درصد سولفات منیزیم و pH ۵/۵) تلقیح شد. محیط تخمیر در دمای ۳۰ درجه سیلیسیوس، درون انکوباتور شیکردار در دور g ۱٦۰ به مدت ۵ روز مخلوط گردید.

آزمایه ها در ظرف های ۱۲۰ میلی لیتری با حجم ۳۰ میلی لیتر محیط کشت انجام شدند. پس از ۵ روز، محیط تخمیر برای انجام آزمایشات فعالیت پلی گالاکتوروناز، با استفاده از کاغذ واتمن شماره ۱ خالص سازی گردید.

ه) سنجش فعالیت پکتینازی: فعالیت پکتینازی به کمک اندازه گیری گروه های قند آزاد شده از پکتین سیب، با استفاده از معرف ۳ و ۵ دی نیتروسالیسیلیک اسید (DNS) (مرک، آلمان) تعیین گردید (۲۷). مخلوط واکنش حاوی ۲ میلی لیتر پکتین سیب ۱ درصد در بافر فسفات سیترات ۰/۲ مولار (pH ۵/۵) و ۰/۵ میلی لیتر محلول آنزیم خام در ٤۰ درجه سیلیسیوس به مدت ۱۰ دقیقه گرماگذاری شد. سپس با افزودن ۳ میلی لیتر معرف DNS، به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب گرم جوشانده شد. پس از سرد شدن، جذب نوری در طول موج ۵٤۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر (UV-Visible مدل Cary 50 استرالیا) خوانده شد.

یک واحد فعالیت آنزیمی، مقدار آنزیمی است که توانایی آزادسازی ۱ میکرومول گالاکتورونیک اسید بر واحد حجم آنزیم در مخلوط واکنش بر واحد زمان در شرایط استاندارد آزمایش را داشته باشد (۲۸).

و) انتخاب سویه برتر: قارچ هایی که در مرحله قبل دارای فعالیت آنزیمی بودند از لحاظ مورفولوژیکی بررسی شدند. در نهایت قارچی که دارای فعالیت پکتینازی بیشتری بود برای ارزیابی ویژگی های کینتیکی استفاده گردید.

ز) تاثیر زمان بر تولید پکتینیاز: به محیط مایع حاوی نمک های معدنی، ۱ درصد پکتین سیب و ۱ درصد تفاله سیب، ۰/۵ میلی لیتر سوسپانسیون اسپور، تلقیح شد. سپس این محیط های تخمیری در دمای ۳۰ درجه سیلیسیوس به مدت ۲٤، ٤۸، ۷۲، ۹٦ و ۱۲۰ ساعت گرما گذاری شدند. در نهایت عصاره های شفاف فیلتر شده از نظر فعالیت آنزیمی مورد بررسی قرار گرفتند.

ح) اثر دما بر تولید پکتینیاز: به فلاسک های حاوی ۱ درصد پکتین سیب، ۱ درصد تفاله سیب، نمک های معدنی، ۰/۵ میلی لیتر سوسپانسیون اسپور تلقیح گردید. فلاسک ها، به منظور بررسی اثرات دما بر روی فعالیت آنزیم، به ترتیب در دمای ۲۰، ۳۰، ٤۰ و ۵۰ درجه سیلیسیوس به مدت ۷۲ ساعت در pH ۵ و در شرایط یکسان گرماگذاری شدند.

ط) اثر pH بر تولید پکتینیاز: به فلاسک های حاوی ۱ درصد پکتین سیب، ۱ درصد تفاله سیب، نمک های معدنی، ۰/۵ میلی لیتر سوسپانسیون اسپور تلقیح شد. این محیط، در دامنه ها ی مختلف pH (۳، ٤، ۵، ٦ و ۷) در دمای ۳۰ درجه سیلیسیوس به مدت ۷۲ ساعت به منظور بررسی اثرات pH بر روی فعالیت آنزیمی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

ی) اثر دما بر پکتینیاز خام: به منظور بررسی اثر دما بر روی فعالیت پکتیناز، آنزیم خام در دماهای مختلف (۲۰، ۳۰، ٤۰ و ۵۰ درجه سیلیسیوس)، در بافر استات (pH ۵، ۰/۱ مولار)، به مدت ۳۰ دقیقه گرماگذاری گردید. سپس فعالیت پلی گالاکتوروناز مورد بررسی قرار گرفت.

ک) اثر pH بر پکتینیاز خام: آنزیم خام در دامنه های مختلف pH (۳، ٤، ۵، ٦ و ۷) توسط بافرهای زیر در دمای ۳۰ درجه سیلیسیوس به مدت ۲ ساعت گرما گذاری شد (۰/۱ مولار): از بافر سیترات برای pH ۳ ، بافر استات برای pH ۵/٤ و بافر فسفات برای pH ٦/۷ استفاده گردید. سپس فعالیت پلی گالاکتوروناز مورد بررسی قرار گرفت.

ل) اثر منابع کربن بر تولید پکتینیاز: به منظور ارزیابی اثر منابع کربن بر فعالیت آنزیمی، از محیط حاوی نمک های معدنی،

Archive of SID

www.SID.ir

۱ درصد پکتین سیب، ۱ درصد تفاله سیب و ۱ درصد منابع کربن استفاده شد. سپس فلاسک ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سیلیسیوس گرماگذاری شدند. روماند به منظور ارزیابی فعالیت پکتینازی مورد بررسی قرار گرفت.

از محیط حاوی پلی گالاکتورونیک اسید به عنوان کنترل استفاده شد. قبل از اندازه گیری فعالیت آنزیمی، فلاسک ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سیلیسیوس گرما گذاری شدند.

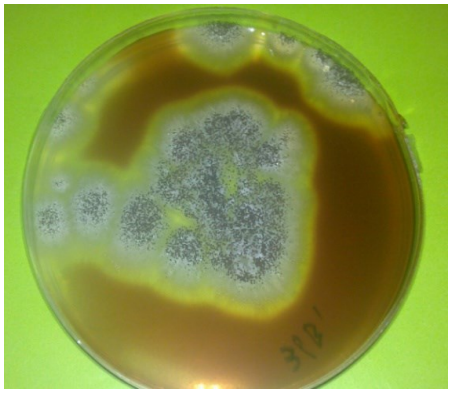
م) اثر منابع نیتروژن بر تولید پکتیناز: به منظور بررسی اثر منابع نیتروژن بر روی فعالیت آنزیمی از محیط حاوی نمک های معدنی، ۱ درصد پکتین سیب، ۱ درصد تفاله سیب و ۱ درصد منابع نیتروژن استفاده شد. همچنین از محیط بدون منبع نیتروژن به عنوان کنترل استفاده گردید. قبل از اندازه گیری فعالیت آنزیمی، فلاسک ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سیلیسیوس گرما گذاری شدند.

ن) اثر یون های فلزی بر تولید پکتیناز: به منظور تعیین اثر یون های فلزی بر روی فعالیت پکتیناز، یون های فلزی و مواد شیمیایی (۱ میلی مولار) به مخلوط واکنش اضافه شدند. سپس محیط های تهیه شده در دمای ۳۰ درجه سیلیسیوس به مدت ۷۲ ساعت گرما گذاری و فعالیت آنزیمی آن ها اندازه گیری گردید.

س) اثر مواد شیمیایی بر تولید پکتیناز: برای تعیین اثر مواد شیمیایی بر روی فعالیت پکتیناز، مواد شیمیایی (۱ مولار) به مخلوط واکنش اضافه شدند. سپس محیط های تهیه شده در دمای ۳۰ درجه سیلیسیوس به مدت ۷۲ ساعت گرما گذاری و فعالیت آنزیمی آن ها اندازه گیری شد.

یافته ها

الف) *جداسازی و شناسایی سویه های برترتولید کننده پکتیناز:* در این مطالعه از مجموع ۵۰ نمونه، تعداد ۸۰ جدایه قارچی جداسازی گردید. از این میان، ۱۳ قارچ فعالیت پکتینازی را با ایجاد هاله شفاف بر روی محیط جامد حاوی پکتین و نمک های معدنی نشان دادند. در نهایت *آسپرژیلوس نایجر* AN64

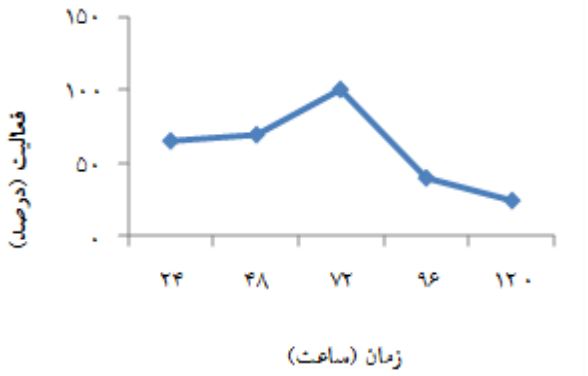


شکل ۱: هاله شفاف *آسپرژیلوس نایجر* AN64.

که دارای هاله شفاف کوچکی بود اما فعالیت پکتینازی بیشتری در محیط غوطه ور نشان داد، به منظور بررسی ویژگی های کینتیکی انتخاب گردید (شکل ۱). در این مطالعه سویه برتر از نمونه سیب تهیه شده از استان کرمان جداسازی گردید.

ب) اثر مدت زمان بر تولید پکتیناز: بیشترین فعالیت پکتیناز خارج سلولی پس از ۷۲ ساعت تخمیر مشاهده شد. در زمان های ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت فعالیت آنزیمی به تدریج افزایش داشت. اما پس از ۷۲ ساعت فعالیت آنزیمی (۱۰۰ درصد) مشاهده گردید. همچنین در زمان های ۷۲، ۹٦ و ۱۲۰ ساعت فعالیت آنزیمی سریع کاهش یافت. آنزیم پکتیناز در زمان های ۲٤، ٤۸، ۷۲، ۹٦ و ۱۲۰ ساعت نیز فعال بود. اما پس از ۱۲۰ ساعت فعالیت آن به ۲۵ درصد رسید (نمودار ۱).

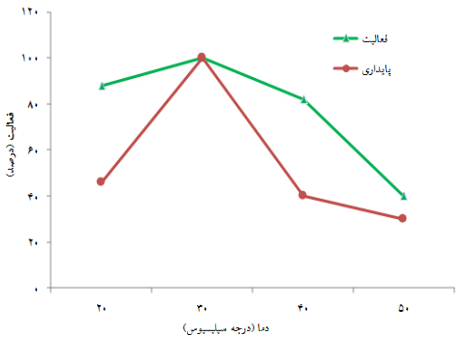
ج) اثر دما بر تولید پکتیناز: آنزیم پکتیناز در دمای ۲۰ درجه



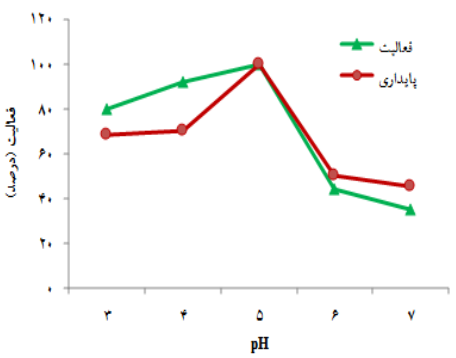
نمودار ۱: اثر مدت زمان انکوباسیون بر تولید پکتیناز. تولید پکتیناز توسط *آسپرژلوس نایجر* AN64 پس از ۳ روز در محیط مایع در حرارت ۳۰ درجه سیلیسیوس و pH ۵ افزایش یافت.

Archive of SID

www.SID.ir



نمودار ۲: اثر دما بر فعالیت و پایداری پکتینازی *آسپرژیلوس نایجر* AN64 در pH ۵ در دماهای مختلف ۲۰، ۳۰، ٤۰ و ۵۰ درجه سیلیسیوس.



نمودار ۳: اثر pH های مختلف (۳، ٤، ۵، ٦ و ۷) بر فعالیت و پایداری پکتینازی *آسپرژیلوس نایجر* AN64 در ۳۰ درجه سیلیسیوس.

سیلیسیوس، ۸۸ درصد فعالیت نشان داد. بیشترین تولید پکتیناز توسط *آسپرژیلوس نایجر* AN64، در دمای ۳۰ درجه سیلیسیوس مشاهده گردید. در بالاتر از این دما، تولید پکتیناز کاهش یافت و در دمای ۵۰ درجه سیلیسیوس به ٤۰ درصد رسید. فعالیت پکتینار در محدوده های دمایی ۲۰، ۳۰، ٤۰ و ۵۰ درجه سیلیسیوس فعال باقی ماند (نمودار ۲).

د) اثر pH بر تولید پکتیناز: فعالیت پکتیناز در ۳ pH، معادل ۸۸ درصد بود. در گستره های مختلف pH (۳، ٤ و ۵) به تدریج فعالیت افزایش یافت. نتایج نشان داد که pH بهینه برای تولید پکتیناز *آسپرژلوس نایجر* AN64، معادل ۵ می باشد. اما در بالاتر از این pH تولید پکتیناز کاهش یافت و در ۷ pH به ۳۳ درصد رسید. فعالیت پکتیناز در محدوده های مختلف pH (۳، ٤، ۵، ٦ و ۷) فعال باقی ماند (نمودار ۳).

ه) اثر دما بر پکتیناز خام: پایداری پکتیناز در ۲۰ درجه سیلیسیوس برابر با ٤٦ درصد بود. آنزیم در گستره دمایی ۲۰ تا ۵۰ درجه سیلیسیوس پایداری داشت. دمای مناسب برای پایداری پکتیناز *آسپرژیلوس نایجر* AN64، ۳۰ درجه سیلیسیوس بود. در بالاتر از این دما پایداری آنزیم کاهش سریعی داشت و در ۵۰ درجه سیلیسیوس به ۳۰ درصد رسید (نمودار ۲).

و) اثر pH بر پکتیناز خام: پایداری پکتیناز در ۳ pH، معادل ٦۸ درصد بود. پکتیناز *آسپرژیلوس نایجر* AN64 در محدوده های pH اسیدی و خنثی (۳، ٤، ۵، ٦ و ۷) پایدار بود، اما مناسب ترین pH برابر با ۵ بود.پایداری آنزیم در بالاتر از این pH کاهش سریعی داشت و در ۷ pH به ٤۵ درصد رسید (نمودار ۳).

ز) اثر منابع کربن بر تولید پکتیناز: فعالیت پکتیناز قند مانوز ۵۲ درصد بود. فعالیت پکتینازی لاکتوز، مالتوز، سوکروز، نشاسته، گلوکز حدود ۳۰ درصد بودند. فعالیت آنزیمی فروکتوز ۵۲ درصد به دست آمد. کمترین فعالیت آنزیمی مربوط به مانوز و بیشترین فعالیت آنزیمی مربوط به فروکتوز بود. بیوسنتز پکتیناز توسط پلی گالاکتوروناز القا و توسط موارد دیگر ممانعت شد. ممانعت بیوسنتز پکتیناز در ترکیباتی مانند فروکتوز و گلوکز در مقایسه با مانوز و لاکتوز کمتر رخ داد (جدول ۱).

ح) اثر منابع نیتروژن بر تولید پکتیناز: در مورد ارزیابی اثر منابع نیتروژن، کمترین فعالیت آنزیمی مربوط به کلرید آمونیوم و بیشترین فعالیت آنزیمی مربوط به سولفات آمونیوم به ترتیب ۱۳۷ با و ۱۷۰ درصد بود. فعالیت پکتینازی پپتون واتر و عصاره مخمر به ترتیب ۱٤۱ و ۱۵۵ درصد بود. میزان بالای فعالیت پکتیناز در مقایسه با کنترل، در محیط واجد سولفات آمونیوم و عصاره مخمر مشاهده گردید. سولفات آمونیوم مناسب ترین منبع نیتروژن برای تولید پکتیناز به وسیله *آسپرژیلوس نایجر* AN64 بود.

ط) اثر یون های فلزی بر تولید پکتیناز: Ag^{1+} و Co^{2+} با ۱۲۳ و ۳۳ درصد به ترتیب بیشترین و کمترین تاثیر را در فعالیت آنزیمی داشتند. با استفاده از یون های فلزی Cu^{2+} و Fe^{3+} فعالیت

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱: اثر منابع کربن بر فعالیت پکتینازی *آسپرژلوس نایجر* AN64.

منابع کربن	فعالیت آنزیمی (٪)
گلوکز	٤٥
مانوز	۲۳
فروکتوز	٥۲
لاکتوز	۳٥
سوکروز	۳۸
مالتوز	۳۷
نشاسته	٤۰
پلی گالاکتورونیک اسید (کنترل)	۱۰۰

جدول ۲: اثر یون های فلزی بر فعالیت پکتینازی *آسپرژیلوس نایجر* AN64.

یون فلزی	فعالیت آنزیمی (٪)
Ag^{1+}	۱۲۳
Ba^{2+}	٦۸
Ca^{2+}	٥٥
Co^{2+}	۳۳
Cu^{2+}	٤۰
Fe^{3+}	٤۲
Ni^{2+}	٦٥
Mg^{2+}	۱۱٥
Mn^{2+}	۱۰۱
کنترل	۱۰۰

پکتینازی در حدود ٤۰ درصد محاسبه گردید. فعالیت پکتینازی با افزودن یون های فلزی Ni^{2+} و Ba^{2+} حدود ٦۰ درصد و یون های فلزی Mn^{2+}، Mg^{2+} حدود ۱۰۰ درصد بودند. اما با استفاده از Ca^{2+} فعالیت آنزیمی ٥٥ درصد محاسبه گردید. یون های فلزی، Ag^{1+}، Mg^{2+} و Mn^{2+} به ترتیب با ۱۲۳، ۱۱٥ و ۱۰۱ درصد بیشترین اثر را بر روی تولید پکتیناز داشتند. در حالی که بقیه فلزات به طور ویژه از فعالیت آنزیمی ممانعت کردند (جدول ۲).

ی) اثر مواد شیمیایی بر تولید پکتیناز: EDTA با ۱۳٤ درصد و سدیم دودسیل سولفات (SDS) با ٥٤ درصد به ترتیب بیشترین و کمترین فعالیت پکتینازی را داشتند. فعالیت آنزیمی در حضور توئین ۸۰ و اسید سیتریک به ترتیب ۱۰۲ و ۱۱۳ درصد محاسبه گردید. EDTA، اسید سیتریک و توئین ۸۰ برای افزایش تولید پکتیناز بررسی شدند. از این میان EDTA بیشترین اثر را بر روی تولید پکتیناز داشت. همچنین پکتیناز *آسپرژیلوس نایجر* AN64 توسط SDS، ممانعت گردید.

بحث

پکتین ها ممکن است با افزایش کدورت و ویسکوزیته در طول استخراج، فیلتراسیون و شفاف سازی آب میوه ها مشکلاتی را در صنایع غذایی ایجاد نمایند (۲۹). ترکیبی از پکتینازها و سلولاز ها بازده آب میوه را به ۱۰۰ درصد می رسانند (۳۰).

فوتلا (Phutela) و همکاران در سال ۲۰۰٥ در هندوستان، تولید پکتیناز و پلی گالاکتوروناز توسط *آسپرژیلوس فومیگاتوس* جدا شده از پوست های در حال فساد پرتقال را مورد بررسی قرار دادند. نتایج آنها نشان دهنده حداکثر رشد در محیط حاوی سبوس گندم، سوکروز، عصاره مخمر و سولفات آمونیوم بود (۳۱). در مطالعه حاضر قارچ *آسپرژیلوس نایجر* از سیب در حال فساد جداسازی گردید. سولفات آمونیوم و عصاره مخمر دارای حداکثر فعالیت آنزیمی بودند. این یافته با نتیجه مطالعه یاد شده هم خوانی دارد.

پاتیل (Patil) و دایاناند (Dayanand) در سال ۲۰۰٦ در هندوستان، ضایعات کشاورزی منطقه ای را با هدف تولید پکتیناز توسط *آسپرژیلوس نایجر* مورد بررسی قرار دادند. این محققین از گل آفتابگردان، پوست لیمو و ساقه سورگوم در محیط تخمیر استفاده نمودند. نتایج آنها نشان داد که گلوکز نسبت به سوکروز موجب افزایش بازده پکتیناز در محیط غوطه ور می شود (۳۲).

در پژوهش حاضر با وجود استفاده از تفاله و پکتین سیب برای محیط تخمیر، اما مانند این مطالعه گلوکز نسبت به سوکروز فعالیت آنزیمی بیشتری را نشان داد. امین زاده (Aminzadeh) و همکاران در سال ۲۰۰۷ تعداد ۳٥ سویه قارچ جدا شده از زباله های گیاهی (تفاله های سبزیجات و کشاورزی) به عنوان منبع کربن استفاده شدند. محققین یاد شده ۲٥ سویه توسط سنجش منطقه شفاف هیدرولیزشده در کاپ-پلیت از نظر فعالیت پلی گالاکتوروناز شناسایی نمودند. *تتراکوکوسپوریوم* به

Archive of SID

www.SID.ir

عنوان بیشترین گونه قارچی پکتینولیتیکی با توجه به خصوصیات مورفولوژیکی شناسایی گردید. فعالیت مطلوب آنزیم در pH ۵ و دمای ۳۵ درجه سیلیسیوس به دست آمد. در بین منابع کربن، سلولز و در بین منابع نیتروژن، سولفات آمونیوم، در میان یون های فلزی Ag^{1+} و Mn^{2+} در میان مواد شیمیایی، EDTA بیشترین فعالیت آنزیمی را نشان دادند (۳۳).

در مطالعه حاضر، از بین ۵۰ سویه، ۱۳ سویه منطقه شفاف نشان دادند و *آسپرژیلوس نایجر* بیشترین فعالیت آنزیمی را داشت. این نتایج با مطالعه ما، همخوانی ندارند که امکان دارد به دلیل منطقه نمونه گیری یا نوع نمونه باشد. فعالیت مطلوب آنزیم در pH ۵، دمای ۳۰ درجه سیلیسیوس، سولفات آمونیوم، Ag^{1+} و EDTA مشابه تحقیق یاد شده بود.

حنان (Hannan) و همکاران در سال ۲۰۰۹ در پاکستان، پتانسیل گونه های *آسپرژیلوس نایجر* در تولید پکتینازها را مورد بررسی قرار دادند. ۵۲ گونه *آسپرژیلوس نایجر* از منابع مختلف مانند آب، خاک، هوا، مرکبات، سیب، نان بیات، بقایای میوه، میوه فاسد شده، میوه خشک شده و ... جداسازی گردید. از روش پلیت، برای غربالگری اولیه و از روش سنجش آنزیم (تخمیر غوطه ور با پکتین)، برای جداسازی نهایی استفاده شد. حداکثر فعالیت آنزیم در ۲ سویه *آسپرژیلوس نایجر* H12 (مرکبات فاسد شده) و *آسپرژیلوس نایجر* H51 (سیب فاسد شده)، با بیش از ۰/۷ واحد پس از ۹٦ ساعت گرماگذاری مشاهده شد (۳٤). اما در مطالعه حاضر، حداکثر فعالیت آنزیم ۰/٤ U/ml پس از ۷۲ ساعت مشاهده گردید. میزان فعالیت آنزیمی با مطالعه حاضر هم خوانی ندارد. کمتر بودن فعالیت آنزیمی سویه مورد نظر در مطالعه حاضر می تواند به دلیل نوع نمونه یا منطقه نمونه گیری باشد.

استفاده از روش پلیت به منظور غربالگری اولیه و روش سنجش آنزیم توسط تخمیر غوطه ور با پکتین، همچنین نشان دادن حداکثر فعالیت آنزیمی توسط *آسپرژیلوس نایجر* از سیب فاسد شده در مرحله تخمیر غوطه ور، با مطالعه یاد شده هم خوانی دارند.

جاوید (Javed) و همکاران در سال ۲۰۱۰ در پاکستان بهینه سازی تولید آنزیم پکتیناز به وسیله پوست پرتقال ترش سیتروس آرانتیوم L به سوبسترا توسط تخمیر غوطه ور را مورد ارزیابی قرار دادند. محققین یاد شده از دکستروزآگار سیب زمینی (PDA)، برای جداسازی اسپورهای *آسپرژیلوس نایجر*، استفاده نمودند. دما و pH مطلوب به ترتیب ۳۰ درجه سیلیسیوس و ۵ بود (۳۵). اما در پژوهش حاضر از تفاله و پکتین سیب به منظور تخمیر غوطه ور و از محیط YGC، برای جداسازی *آسپرژیلوس نایجر* استفاده شد. نتایج دما و pH مطلوب مطالعه یاد شده با نتایج پژوهش حاضر هم خوانی دارد.

بلادهاندایوتام (Baladhandayutham) و تانگاولو (Thangavelu) در سال ۲۰۱۱ در هندوستان، بهینه سازی و کینتیک تولید پکتیناز در بستر تخمیر جامد توسط *آسپرژیلوس آواموری* را مورد بررسی قرار دادند. سوبستراهای مخلوط شده حاوی ۸۵ درصد سبوس برنج و ۱۵ درصد باگاس نیشکر، حداکثر بازده پکتیناز ۱۰۳/۳۳ U/ml در طول ۷۲ ساعت تخمیر را ایجاد کردند. در پژوهش یاد شده، دما و pH مناسب به ترتیب ۳۵ درجه سیلیسیوس و ۵ بود (۳٦). اما در مطالعه حاضر، با استفاده از *آسپرژیلوس نایجر*، روش تخمیر غوطه ور، با استفاده از سوبسترای پکتین و تفاله سیب، میزان فعالیت آنزیمی ۰/٤ U/ml بود.

یکی از اصلی ترین دلایل اختلاف تولید آنزیم در این دو پژوهش می تواند حجم محدود مقیاس تخمیر مورد مطالعه ما باشد. اما در هر دو پژوهش حداکثر زمان تولید، دما و pH یکسان بودند.

عباسی (Abbasi) و مرتضوی پور (Mortazavipur) در سال ۲۰۱۱ به بررسی تولید پلی گالاکتوروناز از آرد گندم توسط *آسپرژیلوس آواموری* در تخمیر غوطه ور و کشت سطحی پرداختند. بیشترین میزان تولید آنزیم درتخمیر غوطه ور پس از ۷۲ ساعت به دست آمد. اگزوپلی گالاکتوروناز به دست آمده توسط *آسپرژیلوس آواموری*، فعالیت مناسب را در pH ۵ برای تخمیر غوطه ور داشت (۳۷). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که

Archive of SID

www.SID.ir

مناسب ترین pH و زمان برای تولید آنزیم به وسیله *آسپرژیلوس نایجر* به ترتیب ۵ و ۷۲ ساعت می باشد. این مساله می تواند تایید کننده ویژگی اسید دوستی قارچ *آسپرژیلوس نایجر* در تولید آنزیم پکتیناز باشد. واسنتی (Vasanthi) و میناکشیسوندارام (Meenakshisundaram) در سال ۲۰۱۲ در هندوستان، بهینه سازی تولید آنزیم پکتیناز با استفاده از پوست پرتقال ترش به عنوان سوبسترا توسط *آسپرژیلوس نایجر* در تخمیر بستر جامد را بررسی کردند. شرایط مطلوب شامل دما ۳۰ درجه سیلیسیوس، pH ۵، منبع نیتروژن سولفات آمونیوم به دست آمد (۳۸). اما در تحقیق حاضر از پکتین و تفاله سیب به عنوان سوبسترا در تخمیر غوطه ور استفاده شد. شرایط مطلوب مطالعه یادشده با پژوهش حاضر همخوانی دارد.

اویلک (Oyeleke) و همکاران در سال ۲۰۱۲ در نیجریه، پتانسیل تولید پکتیناز *آسپرژیلوس نایجر* را از چوب ذرت با استفاده از پکتین به عنوان سوبسترا در تخمیر غوطه ور مورد بررسی قرار دادند. بیشترین فعالیت پکتیناز در روزهای چهارم و پنجم به دست آمد. pH مناسب برای فعالیت پکتیناز ٦ و دمای مناسب ٦٠ درجه سیلیسیوس بود (۳۹). استفاده از *آسپرژیلوس نایجر*، پکتین و تخمیر غوطه ور برای تولید پکتیناز با تحقیق حاضر مشابهت دارد.

آسپرژیلوس نایجر در مطالعه حاضر، از سیب در حال فساد جداسازی گردید، اما در مطالعه یاد شده از چوب ذرت به دست آمد. بیشترین فعالیت آنزیمی در پژوهش حاضر در روز ۳ به دست آمد که نسبت به روزهای ٤ و ۵ مطالعه یاد شده سریع تر می باشد.

در پژوهش حاضر، pH مطلوب برای فعالیت پکتیناز ۵ به دست آمد که نسبت به pH ٦ مطالعه یاد شده، اسیدی تر و برای صنعت آب میوه مناسب تر می باشد. همچنین دمای مناسب برای فعالیت پکتیناز ۳۰ درجه سیلیسیوس به دست آمد که نسبت به دمای مناسب ٦٠ درجه سیلیسیوس مطالعه یاد شده، کمتر می باشد. پائین بودن دمای مناسب برای فعالیت پکتیناز می تواند به دلیل نوع سویه مورد استفاده می باشد.

نتیجه گیری

آسپرژیلوس نایجر به دلیل مورد تایید بودن توسط FDA، قابلیت کشت بر روی سوبستراهای ارزان، بازیافت آسان آنزیم از محیط کشت، می تواند به منظور تولید گسترده تر آنزیم مورد استفاده قرار گیرد. همچنین به دلیل پایداری در حرارت های بالا (۵۰ درجه سیلیسیوس) و تحمل محیط اسیدی (دامنه pH ۳ تا ۷)، ارزیابی بیشتر پتانسیل کاربردی سویه جدا شده در این پژوهش در صنعت آب میوه پیشنهاد می گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم و پژوهشکده تعلیم و تربیت کرمان به دلیل حمایت های اجرایی از این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Rombouts FM, Pilnik W. Pectic enzymes. In: Rose AH. Economic microbiology, microbial enzymes and bioconversions. 5nd ed. London: Academic Press; 1980: 227-282.
2. Alkorta I, Garbisu C, Llama MJ and Serra JL. Industrial applications of pectic enzymes: a review. Process Biochem. 1998; 33: 21-28.
3. Miller GL. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Analytic Chem. 1959; 31: 426-429
4. Semenova MV, Grishutin SG, Gusakov AV, Okunev ON, Sinitsyn AP. Isolation and properties of pectinases from the fungus *Aspergillus japonicas*. Biochem (Moscow). 2003;

Archive of SID

www.SID.ir

68 (5): 559-569.

5. Torres EF, Sepulveda TV, Gonzalez GV. Production of hydrolytic depolymerising pectinases. Food Technol Biotechnol. 2006; 44(2): 221-227.

6. Parenicova L, Benen JAE, Kester HCM, and Visser J. Studies on polygalacturonase of certain yeasts. Biochem J. 2000; 259: 577-585.

7. Singh SA, Ramakrishna M, Rao AGA. Optimization of downstream processing parameters for the recovery of pectinase from the fermented broth of *Aspergillus carbonarious*. Process Biochem. 1999; 35: 411-417.

8. Kotzekidov P. Production of polygalacturonases by *Byssachlamys fulva*. J Ind Microbiol. 1991; 7: 53-56.

9. Barnby FM, Morpeth FF, Pyle DL. Endopolygalacturonase production from *Kluyveromyces marxianus*. I. Resolution, purification and partial characterization of the enzyme. Enzyme Microbial Technol. 1990; 12: 891-897.

10. Naidu GSN, Panda T. Production of pectolytic enzymes-a review. Bioprocess Eng. 1998; 19: 355-361.

11. Dinu D, Nechifor MT, Stoian G, Costache M, Dinischiotu A. Enzymes with new biochemical properties in the pectinolytic complex produced by *Aspergillus niger* MIUG 16. J Biotechnol. 2007; 131: 128-137.

12. Castilho LR, Medronho RA, Alves TLM. Production and extration of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. Bioresour Technol. 2000; 71: 45-50.

13. Silva D, Martins ES, Silva R, Gomes E. Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by products. Braz J Microbiol. 2002; 33: 318-324.

14. Pedrolli DB, Gomes E, Monti R, Carmona EC. Studies on productivity and characterization of polygalacturonase from *Aspergillus giganteus* submerged culture using citrus pectin and orange waste. Appl Biochem Biotechnol. 2008; 144(2): 191-200.

15. Jacob N, Poorna AC, Prema P. Purification and partial characterization of polygalacturonase from *Streptomyces lydicus*. Bioresour Technol. 2008; 99: 6697-6701.

16. Klug-Santner BG, Schnitzhofer W, Vrsanská M. Purification and characterization of a new bioscouring pectate lyase from *Bacillus pumilus* BK2. J Biotechnol. 2006; 121: 390-401.

17. Kashyap DR, Chandra S, Kaul A, Tewari R. Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp. DT7. World J Microbiol Biotechnol. 2000; 16: 277-282.

18. Soriano M, Diaz P, Pastor FIJ. Pectinolytic systems of two aerobic sporogenous bacterial strains with high activity on pectin. Curr Microbiol. 2006; 50: 114-118.

19. Gummadi SN, Kumar DS. Optimization of chemical and physical parameters affecting the activity of pectin lyase and pectate lyase from *Debaryomyces nepalensis*: a statistical approach. Biochem Eng J. 2006; 30: 130-137.

Archive of SID

www.SID.ir

20. Sunnotel O, Nigam P. Pectinolytic activity of bacteria isolated from soil and two fungal strains during submerged fermentation. World J Microbiol Biotechnol. 2002; 18: 835-9.

21. Salazar L, Jayasinghe U. Fundamentals of purification of plant viruses. In: Techniques in plant, virology, CIP., Training Manual, J.O., Virus Purification. Peru: International Potato Centre: 1999; 1-10.

22. Viikari L, Tenakanen M, Suurnakki A. Biotechnology in the pulp and paper industry. In: Rehm HJ. Biotechnology. VCH-Wiley; 2001: 523-46.

23. Reid I, Richard M. Purified pectinase lowers cationic demand in peroxide-bleached mechanical pulp. Enzyme Microbial Technol. 2004; 34: 499-504.

24. Jayani R, Saxena S and Gupta R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. Process Biochemistry. 2005; 40: 2931-2944.

25. Report of Preliminary Feasibility Study (PFS). Production of pectin esterase enzyme for juice clarification in juice industry as well as other related consumptions in food industry. Company of Tehran's Industrial Parks. available at: www.tehraniec.ir (2011).

26. Martin N, De Souza SR, Da Silva R, Gomes E. Pectinase production by fungal strains in solid-state fermentation using agroindustrial bioproduct. Brazil Archeol Biol Technol. 2004; 47: 813-819.

27. Miller GL. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Analytic Chem. 1959; 31: 426-429.

28. Somogyi M. A new reagent for the determination of sugars. J Biol Chem. 1945; 160: 195-119.

29. Gonzales MF, Ubeda JF, Vasudevan TG, Cordero Otero RR, Briones AI. Evaluation of polygalacturonase activity in *Saccharomyces cerevisia* wine strains. FEMS Microbiol Letter. 2004; 237: 261-266.

30. Kashyap DR, Vohra PK, Chopra S and Tewari R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. Bioresource Technol. 2001; 77: 215-227.

31. Phutela U, Dhuna V, Sandhu S, Chadha BS. Pectinase and polygalacturonase production by thermophilic *Aspergillus fumigates* isolated from decomposting orange peels. Brazil J Microbiol. 2005; 36(1): 63-69.

32. Patil SR and Dayanand A. Exploration of regional agrowastes for the production of pectinase by *Aspergillus niger*. Food Technol Biotechnol. 2006; 44 (2): 289-292.

33. Aminzadeh S, Naderi-Manesh H, Khajeh Kh. Isolation and characterization of polygalacturonase produced by *Tetracoccosporium* sp. Iran J Chem Chem Eng. 2007; 26(1): 47-54.

34. Hannan A, Bajwa R and Latif Z. Status of *Aspergillus niger* strains for pectinases production potential. Pakistan J Phytopathol. 2009; 21(1): 77-82.

35. Javed A, Saghir AJ, Quratulain A, Arshad H, Hamida A, Farrah G. Optimization of pectinase enzyme production using sour oranges peel (*Citrus aurantium* L) as substrate.

Archive of SID

www.SID.ir

Pakistan J Biochem Mol Biol. 2010; 43(3): 126-130.

36. Baladhandayutham S, Thangavelu V. Optimization and kinetics of solid state fermentative production of pectinase by *Aspergillus awamori*. Int J Chem Technol Res. 2011; 3(4): 1758-1764.

37. Abbasi H, Mortazavipur SR. Production of exopolygalacturonase from wheat flour by *Aspergillus awamori* in submerged and surface culture fermentation. Afr J Plant Sci. 2011; 5(4): 226-232.

38. Vasanthi, Meenakshisundaram. Optimization of pectinase enzyme production by using sour orange peel as substrate in solid state fermentation. Asian J Biochem Pharmaceutical Res. 2012; 40(2): 216-224.

39. Oyeleke SB, Oyewole OA, Egwim EC, Dauda BEN, Ibeh EN. Cellulase and pectinase production potentials of *Aspergillus niger* isolated from corn cob. Bayero J Pure Appl Sci. 2012; 5(1): 78-83.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Microbial World
Volume 8, No. 1, April 2015

Original Article

Identification and optimization of fungal pectinase isolated in screening stage for fruit juice industry

Azam Nouri Goushki[1], Mohammad Kargar[2], Javid Amini[3], Mohammad Mehdi Motaghi[4]

[1]MS.c., Department of Microbiology, Jahrom branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.
[2]Associate Professor, Department of Microbiology, Jahrom branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.
[3]Ph.D Candidate, Department of Microbiology, Kerman branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran.
[4]Associate Professor, Department of Microbiology, Kerman branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Pectinolytic enzymes or pectinases are a heterogeneous group of related enzymes that hydrolyze the pectic substances. The main industrial application of pectinases is the extraction and clarification of fruit and vegetable juices. The aim of this present study was identification and optimization of fungal pectinase isolated in screening stage for fruit juice industry.

Materials & Methods: This study was performed on 50 samples of apple in decay, soil and juice concentrate factories wastewater that isolated from different provinces of Iran, periodic random. First, isolated fungi were investigated from enzyme activity by measuring the clear zone on pectin medium and enzyme production in submerged medium containing pulp and pectin apple as the sole carbon sources. The best strain was selected for enzyme activity. Then, were studied kinetic various factors of pectinase.

Results: 80 fungal were isolated from these sources that 13 of these fungi were positive pectinase activity with creation a clear zone around the colonies. The pectinase activity of the 13 (%16) isolates was assayed using apple pomace and pectin as the sole carbon sources in submerged culture fermentation. The most pectinase activity (0.4 U/ml) was related to the *Aspergillus niger* AN64 that was identified by morphological characterization. Giving the highest enzyme production rate in 72h. optimum temperate and PH for pectinase activity and stability were 30° C, pH 5. Temperature (20-50) and pH (3-7) ranges were obtained for pectinase stability. Ag^{1+}, Mg^{2+}, Mn^{2+} and surface active detergents such as ammonium sulphate, yeast extract, EDTA and citric acid enhanced the pectinase activity.

Conclusion: This strain of *A. niger* AN64 can be used in fruit juice industry because tolerance in a wide range of the acidic pH and various temperatures.

Keywords: Pectinase, Submerged culture fermentation, Juice industry, *Aspergillus niger*.

Correspondence to: Mohammad Kargar

Tel: +989173149203

E-mail: Microkargar@gmail.com

Journal of Microbial World 2015, 8(1): 6-17.

Archive of SID

www.SID.ir