مجله علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی، (JSIAU)
جلد ۱۸ شماره ۷۰/۱ زمستان ۸۷

بهینه سازی تولید همزمان آمیلاز، پکتیناز بوسیله قارچ آسپرژیلوس اوریزه

زهره جعفری، فتح ا...فلاحیان
گروه علوم گیاهی، واحد علوم وتحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
احمد مجد
گروه زیست شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
مهرداد آذین*
پژوهشکده بیوتکنولوژی، پژوهشگاه فناوریهای نوین، سازمان پژوهش های علمی وصنعتی ایران، تهران، ایران

Archive of SID

چکیده

تاکنون روشهای تولید آنزیمها بخوبی موردبررسی قرار گرفته است اما تولید همزمان دو یا چند آنزیم و تلاش برای ایجاد شرایط واحدی برای تولید بهینه آنها بخوبی در متون علمی موردتوجه قرار نگرفته است. به منظور بهینه سازی تولید همزمان آنزیمِ آمیلاز و پکتیناز که واجد اهمیت اقتصادی هستند از قارچ آسپرژیلوس اوریزه *Aspergillus oryzae* PTCC 5164 به عنوان منبع تولید کنندهِ قارچی این آنزیم ها و روش آماری تاگوچی استفاده شد.تعیین فعالیت آنزیم ها بوسیله روش DNS انجام شد. در آزمایشهای اولیه، بیشترین میزان تولید آنزیم های پکتیناز و آمیلاز به ترتیب با استفاده از پکتین مرکبات، آرد نشاسته ذرت بعنوان ماده اولیه سوبسترا حاصل شد. محیطهایی با منابع کربنی مخلوط، شامل نسبت های مختلفی از سبوس گندم، پکتین مرکبات و آرد نشاسته ذرت طراحی شد و بهترین شرایط برای بالاترین میزان تولید این آنزیمها مشخص گردید. در نتیجه بعد از اجرای روش تاگوچی، به ترتیب افزایش۱۹۰/۵۳٪ و ۲۲۲/۵٪برای مقادیر تولیدی آمیلاز و پکتیناز نشان داده شد. در مرحله بعدی، در نقطه بهینه ترکیبی، که نقطه میانگین موردمحاسبه نقاط قبلی بود، با توجه به شرایط آغازی، تولید آنزیمهای مذکور به ترتیب افزایش ۱۹۶/۲۲٪ و ۲۲۰٪ را برای آمیلاز و پکتیناز داشت. نتایج نشان داد که استفاده از روش آماری برای پروسه های میکروبی و بیوتکنولوژی بسیار مناسب است، زیرا با تعداد آزمایشهای کمتر می توان به نتیجه مطلوب رسید.

واژه های کلیدی: آمیلاز، بهینه سازی، پکتیناز، آسپرژیلوس اوریزه

* عهده دار مکاتبات

www.SID.ir

مقدمه

از بین مهمترین آنزیمهای صنعتی می توان به آمیلاز و پکتیناز اشاره کرد.[۱-۴] از جمله موارد استفاده این آنزیمها می توان به کاربرد بی نظیرشان در صنعت تولید گلوکز از نشاسته و آبمیوه گیری [۵]،تهیه انواع خمیرهای نانوایی [۴،۶]،تخمیر چای [۷] و صنایع چوب و کاغذ [۸] اشاره کرد. با توجه به نیاز روزافزون به این آنزیمها، پژوهش درمورد تولید مقرون به صرفه آنها ضروری می باشد. انتخاب ارگانیسم مناسب نقش کلیدی در تولید بالای آنزیمهای تجاری دارد. یکی از این میکروارگانیسمها که در این تحقیق مورد توجه قرار گرفته است جنس آسپرژیلوس می باشد که از قارچهای ناقص و دارای تنوع گونه ای فراوان است که کاربردهای مفیدی درداز جمله می توان به استفاده از گونه های مختلف این قارچ در صنایع غذایی و آب میوه، چوب، کاغذ و نساجی، اشاره کرد.[۱،۹] گونه های این جنس تولید آنزیمهای خارج سلولی متنوعی می نمایند که از میا ن آنها آنزیمهای پکتیناز و آمیلاز دارای اهمیت اقتصادی ویژه ای هستند.[۴،۱۰،۶] کاربرد سایر قارچها همچون پنی سیلیوم، [۱۱] تریکودرما و حتی اکتومایکوریزه ها [۱۲] یا باکتریهایی چون باسیلوس [۱۳]، کلوستریدیوم، [۱۴]نیز برای بهینه‌سازی تولید آنزیمها مورد توجه می باشد.

در پژوهش حاضر، تاثیرسوبستراهای متفاوت با دسترسی آسان ، همچون آرد نشاسته ذرت و سبوس گندم بعنوان منابع کربنی، و سایر شرایط مثل pH برای انتخاب سطوح بهینه عوامل مورد استفاده در تولید آنزیمهای پکتیناز وآمیلاز توسط *Aspergillus oryzae* با روش تاگوچی مورد بررسی قرار گرفته است.

این روش کاری نسبت به دست کاری ژنتیکی کم خرج تر می باشد.در این پژوهش از روشهای طراحی آزمایش آماری استفاده شد،روشهای یاد شده بسیار متنوع می باشند اما در این بررسی از روش تاگوچی سود برده شد حسن این روش قابلیت استفاده همزمان از فاکتورهای پیوسته(مانند pH) و گسسته(مانند نوع منبع کربن)بود. نوآوری این کار تحقیقی در این بوده است که بدون دستکاریهای ژنتیکی و تنها با تغییرات شرایط فیزیکوشیمیائی (pH-سوبستراها) بکمک روش تاگوچی ،محصول بیشتری بدست آمد پیش از این نیز تولید آنزیمهای مذکور در قارچ آسپرژیلوس و استفاده از روش تاگوچی مورد توجه قرار گرفته است از جمله می توان به تحقیقات Yamane[۱۵] برای تولید سلولاز از *Aspergillus oryzae* و Zeta[۱۶] برای تولید پکتیناز در گونه های آسپرژیلوس و Azin [۱۷]برای تولید گزیلاناز در *Trichoderma longibrachiatum* اشاره نمود، قابل ذکر است که تاکنون در رابطه با این مخلوط آنزیمی توسط این قارچ روی محیط ترکیبی در حد مرجع شناسی وسیعی که انجام شد، گزارشی داده نشده و این اولین تحقیق و گزارش در این رابطه است.

مواد و روشها

میکروارگانیسم:

میکروارگانیسم مورد استفاده در این تحقیق،*Aspergillus oryzae* PTCC5164 بود که، ازمرکز کلکسیون سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران، فراهم شد. کشت ذخیره پس از رشد، که در کشت های

Archive of SID

www.SID.ir

شیبدار(slants) حاوی محیط کشت(Potato Dextrose Agar (PDA و به مدت ۴ روز صورت پذیرفت، در دمای ۴ ^{o}C نگهداری شد و زیرکشت‌ها ماهانه تهیه شدند.

محیطهای کشت تولید و شرایط رشد:

محیط کشت حاوی یک منبع کربنی و محیط مایع[۱۵] بود:

محیط مایع متشکل از محلول نمکی زیر بود(g/l):

$NaNO_3$,3 ; KH_2PO_4 ,1 ; $FeSO_4$,0.01; $MgSO_4.7H_2O$,0.5.

۱.درآزمایشهای مقدماتی که بوسیله روش تک عاملی انجام شد، بعنوان منبع کربنی، (w/v) 0.5 ٪ از هریک از مواد زیر استفاده شد:

منابع کربنی برای آمیلاز:ز) آرد نشاسته ذرت (که از تولیدکنندگان محلی بدست آمده بود)،ح)آرد گندم (که از تولیدکنندگان محلی بدست آمده بود) و ط)مالتوز(.Sigma Co).

منابع کربنی برای پکتیناز[۱۸]: ی) پکتین سیب، س) پکتین مرکبات (هر دو از شرکت NOVO) و ل) تفاله چغندرقند خشک شده (از کارخانه چغندرقند شاهزند اراک)

۲. مرحله دوم بهینه سازی بوسیله روش تاگوچی انجام شد.[۱۹] این روش، که یکی از انواع مرسوم طراحی آماری آزمایشها به طریق فاکتوریل جزیی (Fractional Factorial) است[۲۰]، قبلا به منظور مشابه بکار گرفته شده است [۱۷].با توجه به نتایج مرحله اول ونتایج سایر مقالات[۱۷،۱۹،۱۱] در این طراحی، ۶ عامل: میزان همزن، نوع منبع کربن، درصد $CaCl_2$ (w/v)، درصد منبع کربن (w/v)، درصد منبع نیتروژن (w/v) (CSP) و pH اولیه محیط کشت به منظور بهینه سازی شرایط تولید انتخاب گردید (جدول ۱). عامل اول در دو سطح و بقیه در سه سطح مختلف در تیمارهای ۱۸ گانه (L-18 Orthogonal array) طبق جدول ۳، هر یک در سه تکرار تهیه و پس از تلقیح برروی شیکر انکوباتور در ۳۰^{o}C گرماگذاری شدند.

تهیه سوسپانسیون کنیدیوسپوری و شمارش بالام نئوبار

جهت تهیه سوسپانسیون کنیدیوسپوری آب استریل دارای مقدار۱در هزار((w/v) Tween 80 ® را به لوله های کشت حاوی کنیدیوسپور اضافه نموده سپس با کمک پیپت پاستور استریل به خوبی مخلوط کردیم تا کنیدیوسپور ها جدا شوند. برای شمارش کنیدیوسپور ها و دست یافتن به پیش کشتی مناسب برای استفاده در محیط تولید، سوسپانسیون را از چند لایه پشم شیشه که درون قیفی قرار داشت، رد کردیم تا میسلیوم ها جدا شوند. محلول صاف شده به خوبی ورتکس شد و با پیپت مقدار بسیار جزئی از آن بین لام ولامل نئوبار قرار داده شد. تمام مراحل در شرایط استریل انجام گردید.

لام نئوبار با عدسی شیئ ۲۵× بررسی شد که کنیدیوسپور ها در یک مربع ۱۶ خانه ای لام، شمرده شدند و تعداد بدست آمده، در ۲۵۰۰۰۰ ضرب گردید. عدد حاصل تعداد کنیدیوسپور ها را در یک میلی لیتر سوسپانسیون نشان می‌دهد و می توان با داشتن آن مقدار مناسبی از کنیدیوسپور را وارد محیط پیش کشت نمود.

پیش کشت

Archive of SID

www.SID.ir

بعد از شستن کنیدیوسپورها از سطح کشت ٤ روزهٔ اسلنت PDA، پس از افزودن ۲۵ میلی لیتر آب مقطر واجد ۰/۱٪ توئین ۸۰ مقدار ۳/۵ میلی لیتر از سوسپانسیون کنیدیوسپوری به فلاسک ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری که دارای ۵۰ میلی لیتر محیط مایع PDB (محیط PDA بدون آگار) بود، اضافه شد.

فلاسکها در دمای $30C^{\circ}$ برای ٤۸ ساعت در دور 150 $rev.min^{-1}$خوابانیده(انکوبه) شدند که در پایان پلت های برف آبی بدست آمد.

ترکیبات PDB:سیب زمینی ۳۰۰gr، گلوکز ۲۰gr و آب مقطر ۱۰۰۰cc

محیط تولید

کشت های تولیدی به حجم ۵۰ میلی لیتر درفلاسک های ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری تهیه وبا (7%(v/v از پیش کشت تلقیح شدند و در دمای $30C^{\circ}$ برای ۹٦ ساعت در دور 150 $rev.min^{-1}$ پیش از استخراج محلول آنزیمی، خوابانیده(انکوبه) شدند.

استخراج محلول آنزیمی

محلول آنزیمی با اضافه کردن ۱۰۰ میلی لیتر بافر استات(۵۰ mM، pH 4.8) به نمونه های کشت و قرار دادن آن بر روی شیکر در دور ۱۵۰ $rev.min^{-1}$ به مدت ۱ ساعت در دمای $30^{o}C$ استخراج گردید. عصاره بکمک کاغذ صافی واتمن (شماره یک) از زی توده و زواید محیط کشت جداسازی شد. ذرات معلق توسط سانتریفو در g × ۶۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه رسوب دهی شد و بخش رو شناور حاصل برای تعیین فعالیت آنزیم مورد استفاده قرار گرفت.

سنجش فعالیت آنزیمها

سنجش فعالیت پکتینولیتیکی

فعالیت این آنزیم با استفاده از روش Pretel [۲۱]مورد سنجش قرار گرفت. در لوله های آزمایش ابتدا ml 0/5 محلول آنزیمی خالص(در مورد لوله شاهد محلول آنزیمی ۱۵ دقیقه در آبجوش به منظور غیرفعال شدن آنزیم جوشانده شد (ازمحلول استات پکتین ۰/۵ ٪(مربوط به پکتین سیب، شرکت sigma) بعنوان سوبسترای آنزیم در دمای $37\ C^{\circ}$ برای ۱۰ دقیقه در بن ماری شیکردار استفاده شد، بعد از این زمان لوله ها خنک شدند و به لوله ها cc 0/5 محلول سود۲نرمال وDNS 0.5cc اضافه شد و بلافاصله در آبجوش به مدت ۵دقیقه قرار گرفتند بعد از این زمان بلافاصله لوله هادر آب یخ قرار گرفتند سپس به محتوی لوله ها ۵ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد وبعد از ورتکس هر لوله، فعالیت آنزیمی با روش DNS (λ=550) مورد سنجش قرار گرفت.

سنجش فعالیت آمیلولیتیکی

فعالیت این آنزیم با استفاده از روش Bernfeld ، [۲۲] تمامی مراحل مشابه روش سنجش پکتیناز بود بجز اینکه از محلول۱٪ نشاسته محلول (شرکت Merck) در بافراستات بعنوان سوبسترا در $40\ C^{\circ}$ برای ۵ دقیقه در بن ماری شیکردار استفاده شد. آنزیم با روش DNS (λ=540) مورد سنجش قرار گرفت. سوپرناتانت (مایع رویی) حاصل از مرحله استخراج و سانتریفو برای بررسی آمیلاز بسیار غلیظ می باشد به همین دلیل برای سنجش قدرت آمیلولیتیکی محیط کشت، عصاره آنزیمی به میزان ۱ به ۱۰۰ با بافر استات رقیق شد. قندهای احیا شده حاصل در

Archive of SID

www.SID.ir

آزمایش های مذکور به کمک روش DNS مورد سنجش قرار گرفتند.[۲۳] یک واحد فعالیت آنزیمی به مقدار فعالیتی اطلاق می شود که بتواند 1µmol قند احیاکننده بر حسب اکی والان را در هر دقیقه تولید نماید. در مورد آنزیم آمیلاز قند مورد نظر گلوکز و در مورد پکتیناز گالاکتورونیک اسید است.

طراحی آزمایش و تجزیه و تحلیل آماری

روشهای تک عاملی[۱۷] و تاگوچی[۱۹] برای بهینه سازی شرایط کشت مورد استفاده قرار گرفتند.بهترین منابع برای هر آنزیم، بکمک روش تک عاملی شناخته شد. بهینه سازی شش عامل، که در جدول۱ نشان داده شده،توسط روش تاگوچی در طراحی آرایه L18 مورد بررسی قرار گرفتند.

عامل	سطح ۱	سطح ۲	سطح ۳
دور همزن	150	180	-
نوع منبع کربن[۱]	BPF	PBF	FBP
$CaCl_2$(%)	0.05	0.1	0.2
% مقدار منبع کربن	2	4	6
CSP %[۲]	1	2	3
pH	4	4.5	5

جدول ۱- عوامل و سطوح انتخاب شده در طراحی به روش تاگوچی

BPF[1] شامل مخلوطی از: ۷۰٪ سبوس گندم، ۱۵٪ پکتین و ۱۵٪آرد نشاسته ذرت؛ PBF شامل مخلوطی از:۷۰٪ پکتین، ۱۵٪ سبوس گندم و ۱۵٪ آرد نشاسته ذرت؛ FBP شامل مخلوطی از: ۷۰٪آرد نشاسته ذرت، ۱۵٪سبوس گندم و ۱۵٪ پکتین بود.[۲]

بعد از انجام تیمارها و کسب نتایج،آزمون آماری ANOVAبرای هر یک از آنزیمها انجام شد و با توجه به این نتایج،آزمایش تاییدی حاصل شد. این آزمایش شرایط بهینه ای بود که بکمک محاسبات آماری پیشنهاد شده بود. در نتیجه دو گروه شرایط تولید متفاوت برای هریک از آنزیمها مورد محاسبه قرار گرفت.

ترکیب شرایط بهینه در یک شرایط

با توجه به نتایج کسب شده،یک شرایط تولیدی بکمک میانگین مورد محاسبه به روش ریاضی از نقاط بهینه ای که قبلاً کسب شده بود،انتخاب شد که در زیر آمده است:

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۲ -شرایط محیط ترکیبی

آرد نشاسته ذرت	سبوس گندم	پکتین مرکبات	٪CSP	٪$CaCl_2$	pH	دور همزن
٤/۲g/100ml	۰/۹g/100ml	۰/۹g/100ml	۱g/100ml	g/100ml ۰/۱۲۵	٤,۲۵	۱۵۰rev.min^{-1}

.

نتایج و بحث

مرحلهٔ اول بهینه سازی منابع کربنی متفاوت در تولید آنزیمها:

تعیین منبع بهینه کربن محیط برای آنزیم آمیلاز

در مقایسهٔ بین آرد نشاسته ذرت، آرد گندم و مالتوز بعنوان منبع کربنی مناسب برای تولید آنزیم آمیلاز در شرایط یکسان کشت بعد از ۹٦ ساعت و دمای 30 C° و دور همزن ۱۵۰ rev.min-1 بالاترین مقدار تولید آنزیم آمیلاز مربوط به آرد نشاسته ذرت با مقدار ٤٦۸/۵۷ U/ml بدست آمد که نتایج در نمودار۱مشخص شده است.

نمودار ۱: تأثیر منابع مختلف کربن دارای نشاسته بر تولید آمیلاز

این یافته مشابه یافته های Fogarty [۲٤] است که برای تعیین منبع کربنی مناسب از بین نشاسته محلول، آرد نشاسته ذرت، مالتوز، گلوکز و لاکتوز، مناسبترین منبع کربنی را به ترتیب نشاسته محلول و آرد نشاسته ذرت معرفی نموده است. در ارتباط با اثر اندک مالتوز بر تولید آمیلاز می‌توان به تأثیر بازخورد منفی (فیدبک) آن بعنوان سوبسترای این آنزیم بر تولید آن اشاره نمود. لازم به ذکر است که Demain [۲۵] مالتوز را بعنوان منبع کربنی مهارکنندهٔ آنزیم معرفی کرده است ولیکن آرد نشاسته ذرت قدرت القای این آنزیم را به خوبی نشان داده است و راحتتر توسط آنزیم به قند تجزیه می‌گردد، چرا که آرد نشاسته ذرت واجد جایگاه اتصال اختصاصی برای این آنزیم می‌باشد و در ارتباط با اثر کمتر آرد گندم به نظر می رسدکه این منبع کربنی قادر نمی باشد بعنوان سوبسترای

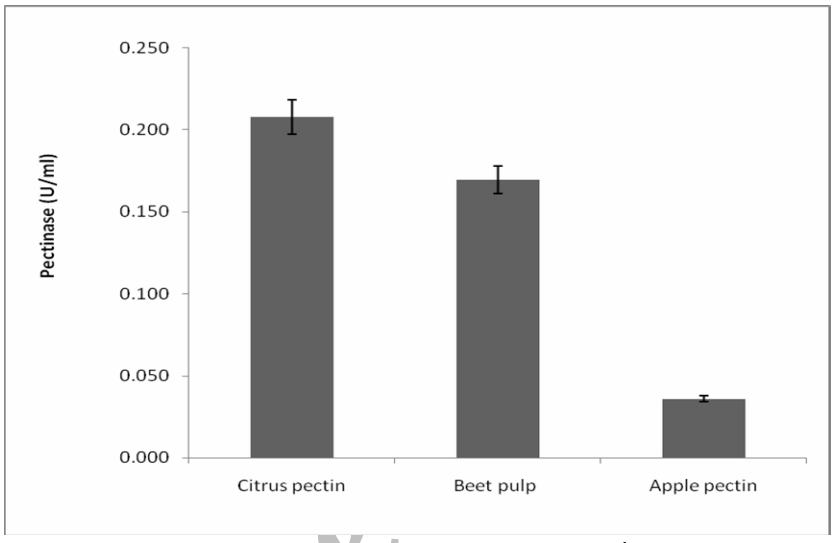
Archive of SID

www.SID.ir

اختصاصی آمیلاز ،همچون آرد نشاسته ذرت موجب القای تولید آنزیم آمیلاز گردد. Fogarty [۲۶] و مرادی[۳] در مورد اثر بیشتر نشاسته نسبت به مالتوز معتقد هستندکه منوساکاریدها به اندازهٔ دی ساکاریدها و دی‌ساکاریدها (مالتوز) به اندازهٔ پلی ساکاریدها (نشاسته) باعث تولید آلفا آمیلاز نمی شوند.

تعیین منبع بهینه کربن محیط برای آنزیم پکتیناز

در مقایسه بین تفالهٔ چغندر قند، پکتین مرکبات و پکتین سیب بعنوان منبع کربنی مناسب برای تولید آنزیم پکتیناز در شرایط یکسان کشت، بهترین فعالیت پکتیناز مربوط به پکتین مرکبات با مقدار U/ml ۰/۲۰۸ بدست آمد که نتایج در نمودار۲نشان داده شده است.



نمودار ۲: تأثیر منابع مختلف کربن دارای پکتین بر تولیدپکتیناز

در ارتباط با افزایش میزان تولید آنزیم پکتیناز در حضور پکتین مرکبات می‌توان به مشابهت این یافته با یافته Malvessi [۱۸] اشاره کرد، وی به وضوح به تأثیر مثبت پکتین مرکبات بر افزایش تولید آنزیم endo – PG (اندوپلی گا لاکتوروناز)در قارچ آسپرژیلوس اوریزه در شرایط کشت غوطه ور اشاره نموده است. همچنین بلالی[۱] نیز توانست از پکتین مرکبات بعنوان تنها منبع کربن برای القای ترشح آنزیم خارج سلولی پکتیناز (پلی گالاکتوروناز) برای قارچهای *A.flavus* , *A. niger* (خویشاوند نزدیک *A. oryzae*) استفاده نماید.

Yamane [۱۵] توانست با استفاده از پوست و ضایعات پرتقال (orange peel) به تولید بالائی از پکتیناز برای *A.oryzae* در محیط نیمه جامد (غوطه ور) دست یابد.

در ارتباط با تأثیر بیشتر پکتین مرکبات بر تولید پکتیناز نسبت به چغندر قند می‌توان به درصد ترکیبات پکتینی بالاتر موجود در پکتین مرکبات نسبت به تفاله چغندر قند Nigam [۲۷] اشاره نمود که طی آن میزان بیشتر پکتین باعث القاء زیادتر آنزیم پکتیناز گشته است.

آزمایشهای طراحی شده توسط روش تاگوچی

تا این مرحله بکمک روش تک عاملی تاثیر منبع کربنی مورد بررسی قرار گرفت تا نوع منبع کربنی مناسب در محیط کشت مشخص شود اما برای بهینه سازی همزمان تولید این آنزیمها نیاز به بررسی عوامل مختلفی

Archive

www.SID.ir

آنهم بطور همزمان بود.در این مورد نیاز به انتخاب روش آماری مناسبی بود.در روش چند عاملی چند فاکتور همزمان تغییر داده می‌شوند و نتیجه بررسی می‌شود و در روش full factorial همه حالتهای ممکن در نظر گرفته می‌شود و جواب بدست آمده قابل اطمینان است ولی تعداد آزمایشها بسیار زیاد است. ولی در روش تاگوچی با بکارگیری فنونی، تعداد آزمایشهای لازم برای بهینه سازی یک کیفیت، کاهش یافته است، علاوه بر این دقت تا حد زیادی افزایش یافته است.بنابراین در ادامه تحقیق از روش تاگوچی استفاده شد.

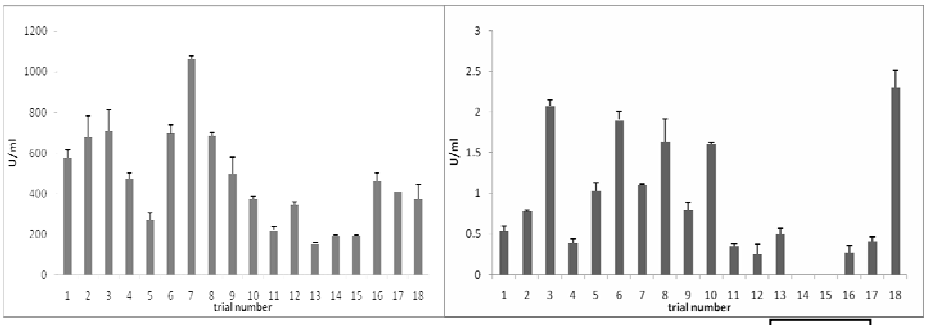
نتایج تولید هردوآنزیم در ۱۸ محیط تاگوچی پس از ۹٦ ساعت خوابانیده (انکوبه)کردن به ترتیب در نمودار٤ آمده است. شرایط کشت براساس سطوح ۱۸-Lدر جدول۳ مشخص شده است.بعد از تحلیل نتایج توسط نرم افزار مشخص شد که بیشترین میزان محصول بدست آمده برای آمیلاز، پکتیناز با استفاده از ۷۰٪ آرد نشاسته ذرت، ۱۵٪ سبوس گندم و ۱۵٪ پکتین بعنوان گوهرمایه (سوبسترا) حاصل شده است.

جدول۳-تیمارهای ۱۸ گانه عوامل و سطوح آنها

تیمارها	Agitation	Carbon source	$CaCl_2$ %	Carbon %	CSP %	pH
۱	1	1	1	1	1	1
۲	1	1	2	2	2	2
۳	1	1	3	3	3	3
٤	1	2	1	1	2	2
٥	1	2	2	2	3	3
٦	1	2	3	3	1	1
۷	1	3	1	2	1	3
۸	1	3	2	3	2	1
۹	1	3	3	1	3	2
۱۰	2	1	1	3	3	2
۱۱	2	1	2	1	1	3
۱۲	2	1	3	2	2	1
۱۳	2	2	1	2	3	1
۱٤	2	2	2	3	1	2
۱٥	2	2	3	1	2	3
۱٦	2	3	1	3	2	3
۱۷	2	3	2	1	3	1
۱۸	2	3	3	2	1	2

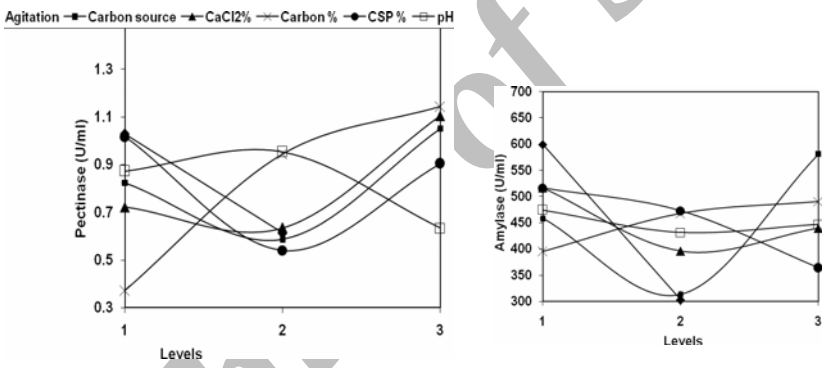
Archive of SID

www.SID.ir



نمودار٤-تولید آنزیم های پکتیناز آمیلازدر ۱۸ محیط طراحی شده به روش تاگوچی

طبق جدولهای ANOVA (داده ها نشان داده نشده)مهمترین عامل ایجاد تفاوت در نتایج حاصل، منبع کربنی بوده است.نمودار (۵) اثرات اصلی فاکتورهای مختلف را نشان می دهد، میزان شدت همزن در rev.min-1 ۱۵۰ و مقادیر (w/v 6%) منبع کربنی محیط تولید برای همهٔ آنزیمها مشابه بودند در حالیکه سطوح سایر عوامل برای این آنزیمها متفاوت بود.



نمودار ۵-نمودارهای چندگانه تاثیرات اصلی(میانگین اثرات)در بهینه سازی آمیلاز(راست بالا)،پکتیناز(چپ بالا).

هرچند که در مورد قارچ مورد پژوهش گزارشی برای روش تاگوچی کسب نشده اما در این راستا، Lee [۲۸] برای تولید کلسترول اکسیداز توسط باکتری*Rhodococcus equi* از روش تاگوچی برای بهینه سازی محیط کشت استفاده نمود و تولید خود را تا ٤ برابر افزایش داد. Azin [۱۷]، برای تولید آنزیم گزیلاناز توسط *Trichoderma longibrachiatum* نیز از روش تاگوچی به منظور بهینه سازی محیط کشت استفاده نمود و تولید آنزیم تا حدود ۲ برابر افزایش یافت در پژوهش حاضر نیز بکمک روش تاگوچی، تولیدآمیلاز،پکتیناز به ترتیب به میزان ۱۹٦/۲٪،۱۹۵/٤٤٪ افزایش یافت.در واقع در روش تاگوچی با در نظر گرفتن تاثیرات مختلف عوامل و شرایط مختلف به محیط بهینه ای دست یافتیم که شاید با روش های دیگر بدلیل کثرت آزمایشها کسب این نتیجه مقدور نبود.

Archive of SID

www.SID.ir

بررسی میزان تولیدآنزیمها درشرایط اُپتیمم تأییدی verification

بعد از انجام تیمارها، شرایط بهینه برای تولید و نتایج مورد پیش بینی برای هر آنزیم، که در جدول٤ نشان داده شده، مورد محاسبه قرار گرفت. طی اجرای آزمایشها در شرایط مذکور، نتایج حاصله بسیار به موارد پیش بینی شده نزدیک بودند.

جدول ٤- شرایط بهینه پیشنهادی بدست آمده توسط محاسبات آماری و میزان آنزیم مورد انتظار در شرایط یاد شده(BPF شامل مخلوطی از: ۷۰٪ سبوس گندم، ۱۵٪ پکتین و ۱۵٪آرد نشاسته ذرت؛ PBF شامل مخلوطی از:۷۰٪ پکتین، ۱۵٪ سبوس گندم و ۱۵٪ آرد نشاسته ذرت؛ FBP شامل مخلوطی از: ۷۰٪آرد نشاسته ذرت، ۱۵٪سبوس گندم و ۱۵٪ پکتین است.)

آنزیم	آمیلاز	پکتیناز
دور همزن	150	150
منبع کربن	FBP	FBP
$CaCl_{2\%}$ (w/v)	0.05	0.2
درصد کربن (w/v)	6	6
(w/v) CSP %	1	1
pH	4	4.5
مقدار آنزیم مورد انتظار U/ml	923.39	2.19

جدول ۵ نتایج کسب شده بعد از آزمایشها تائیدی verification و مقایسه آن با میانگین بدست آمده در آزمایشهای هیجده گانه (طبق آرایه L-18)

الف	ب	ج	د	ه
آنزیمها	میانگین نتایج کسب شده بعد از ۱۸ تیمار(U/ml)	نتایج کسب شده بعد از انجام آزمایشهای تائیدی(U/ml)	نسبت افزایش مقادیرج/ب(٪)	نسبت ستون ج به شرایط مورد انتظار(٪)
آمیلاز	452.11	861.43	190.53	93.29
پکتیناز	0.8	1.82	222.5	83.1

بررسی شرایط ترکیبی

همانطور که اشاره شد ،هدف نهائی این تحقیق کسب شرایط واحد مناسبی برای تولید همزمان آمیلاز و پکتیناز بوده است.به همین دلیل،میانگین همه سطوح عوامل به صورت زیر محاسبه شد :

دور همزن:از آنجا که هر دو آنزیم در دور همزن $150\ rev.min^{-1}$ تولید شدند ،دور همزن هم در شرایط ترکیبی بر روی $150\ rev.min^{-1}$ تنظیم شد.

تولیدات هردو آنزیم در دور۱۵۰rpm بالاتر از ۱۸۰ rpm بود، Fogarty [۲۴] وهمکاران معتقدند تکان دادن زیاد محیط پس از کشت نیز موجب شکسته شدن میسلیومهای قارچی می گردد، رشد سلولی به تعویق می افتد،

Archive of SID

www.SID.ir

حفظ شرایط استریل نیز با مشکل مواجه می‌شود و همچنین بعضی از اسپورها در این حالت قادر به جوانه زدن نمی باشند. بطور مشابه حق وردی[۲] نیز از دور همزن ۱۵۰ rpm برای بهینه سازی تولید آمیلاز استفاده نموده است،برای بهینه سازی حتی Yamane [۱۵] دور پائین تر همزن (rpm)۱۰۰ را در مورد آنزیم های سلولولیتیک،گزیلاناز،آمیلاز و پکتیناز در *A.oryzae* پیشنهاد کرده است.

منبع کربن: از آنجا که بهینه تولید هر دو آنزیم در محیط FBP شامل مخلوطی از: ۷۰٪آرد نشاسته ذرت، ۱۵٪ سبوس گندم و ۱۵٪ پکتین مرکبات بود ، شرایط جدید نیز مشابه مقادیر قبل فراهم شد. دو آنزیم، یعنی: آمیلاز و پکتیناز بهترین تولید را داشتند.

کربن (w/v)(%): از آنجا که هر دو آنزیم در محیط حاوی (٪) ٦(w/v)منبع کربن بهترین تولید را داشتند، شرایط جدید نیز مشابه مقادیر منبع کربنی قبل فراهم شد.

$CaCl_2$(%)(w/v) , CSP(%)(w/v)و pH:

$CaCl_2$(%)(w/v :)میانگین مقادیر $CaCl_2$(%)(w/v)طبق جدول ٤،در زیر محاسبه شده است:

$$CaCl2(\%)(w/v) = \frac{0.2 + 0.05}{2} = 0.125$$

CSP(%)(W/V): از آنجا که هر دو آنزیم در محیط حاوی (٪) ۱ CSP (w/v) بهترین تولید را داشتند ،شرایط جدید نیز مشابه مقادیر قبل فراهم شد.

$$pH = \frac{4 + 4.5}{2} = 4.25$$

pH: pH بهینه در شرایط ترکیبی بر روی٤,۲۵ تنظیم شد:

در نتیجه، محیطی حاوی (g/100ml) ۷۰٪آرد نشاسته ذرت، ۱۵٪سبوس گندم و ۱۵٪ پکتین مرکبات؛ ; CSP, %1 0.125 % , $CaCl_2$؛ pH 4.25 فراهم شد و بعد از تلقیح در شیکر انکوباتور در ۱۵۰ $rev.min^{-1}$، برای ۹٦ ساعت در $30C^{\circ}$ انکوبه شد سپس مخلوط آنزیمی عصاره گیری شدواز نظر تولید آنزیمها مورد سنجش قرار گرفت.

جدول ٦: نتایج کسب شده در شرایط ترکیبی

آنزیمها	بالاترین میزان تولید آنزیمها در شرایط ترکیبی(U/ml)	افزایش مقادیر محیط ترکیبی نسبت به میانگین۱۸ تیمار(٪)	افزایش مقادیر محیط ترکیبی به شرایط مورد انتظار(٪)
آمیلاز	887.143	196.22	96.07
پکتیناز	1.76	220	80.3

Archive of SID

www.SID.ir

این نتایج نشان می دهد که اگرچه در شرایط ترکیبی میزان تولید دقیقاً همچون شرایط بهینه برای هر آنزیم نبوده، اما بیشتر از میانگین تولید هر یک از آنزیمها در تیمار L18 بود. در واقع در ابتدا برای تولید هر آنزیم به تنهائی شرایط بهینه ای فرض شد، سپس با ایجاد یک نقطه ترکیبی، که میانگین ریاضی نقاط قبلی بوده، یک نقطه بهینه جدید را می توان انتخاب کرد که در آن، همه آنزیمها در مقادیر بالایی تولید شوند. نتایج نشان داد که بهترین شرایط تولید هردو آنزیم در یک محیط واحد در شرایط اشاره شده در شرایط ترکیبی، کسب شد.

اثر منبع کربن، CSP٪و$CaCl_2$%

در رابطه با منبع کربن،کشت در حالت تک عاملی و تائیدی محیطی حاوی (g/100ml) ۷۰٪آرد نشاسته ذرت، ۱۵٪سبوس گندم و ۱۵٪ پکتین مرکبات ؛0.125 % , $CaCl_2$; CSP, %1؛ pH 4.25؛ بعنوان محیطی با بالاترین میزان تولید مشخص شد. در خصوص بالاتربودن میزان آرد نشاسته ذرت می توان به این نکته اشاره نمود که بیان ژن آمیلاز که بکمک سوبسترای اختصاصی خود یعنی آرد نشاسته ذرت القا و تحریک شده است احتمالاً موجب بیان سایر آنزیمها نیز گشته است در ارتباط با این مساله می توان به یافته های Kitamoto [۲۹] اشاره نمود که بیان بیشتر دو ژن celA و celB مربوط به آنزیم سلولولیتیک را تحت تنظیم پروموتور ژن Aآمیلاز در *A.oryzae* نشان داده است.

در رابطه با CSP٪(پودر خیسانده ذرت)،بطور کلی می توان گفت اضافه نمودن مقدار ناچیزی نیتروژن برای رشد و تولید محصول قارچ موثر است.در تحقیقاتی که توسط Dhillon [۳۰]، انجام شد مشخص گردید از بین منابع نیتروژنی پپتون، پودر خیسانده ذرت و عصاره مخمر ، پودر خیسانده ذرت با غلظت ۱٪بهترین منبع نیتروژنی برای تولید گزیلاناز است و از طرفی استفاده از این منبع نیتروژنی از نظر اقتصادی کم هزینه و مقرون به صرفه تر است.مروج[٤] در تحقیقات خود با استفاده از CSP با غلظت ۱٪ برای تولید بهینه Fpase وxylanase در قارچ تریکودرما به تولید بهینه رسیده است.در پژوهش حاضر از ۱٪ CSP در محیط کشت بهینه بعنوان منبع نیتروژن استفاده شد که مقدار آن به نتایج قبلی نزدیک است. در رابطه با مقدار کلرید کلسیم در این تحقیق از $CaCl_2$% = 0. 125؛در شرایط بهینه استفاده شد.Fogarty [۳۱] وهمکاران به منظور بهینه سازی تولید بتا گلوکوزیداز اشاره به لزوم استفاده از این ترکیب در محیط کشت *A.fumigatus* از $CaCl_2$=1.4gr/lit استفاده نمود. تاثیر مثبت ترکیبات کلسیمی در تولید آنزیم آمیلاز توسط مرادی[۳] با بکار بردن این ترکیب به میزان۰/۰۵٪ در تولید پکتیناز مشخص شده،این محققین به نقش مستقیم Ca^{+2}در ترکیب CaCl2،برای اتصال سوبسترا به جایگاههای اختصاصی اتصال در آنزیم به وضوح اشاره نموده اند.

تاثیرpH

تاثیرpH محیط بر روی فعالیت آنزیمها از اهمیت زیادی برخوردار است چراکه اغلب آنزیمها در یک pH مشخص دارای فعالیت حداکثر می باشند و در pH بالاتر و پائین تر از آن فعالیت کمتری از خود نشان می دهند یا غیر فعال می گردند. در این تحقیق pH بهینه در شرایط ترکیبی٤/۲۵ بوده است،گزارشهای مشابهی در همین محدوده pH وجود دارد.مروج[٤] pH بهینه برای تولید CMCase در تریکودرما رامعادل٤/۵بیان نموده حال آنکه

Archive of SID

www.SID.ir

Yamane[15] میزان pH مناسب برای تولید سه آنزیم سلولولیتیک، پکتیناز و گزیلاناز را در محیط کشت جامد ۵ و در محیط کشت غوطه ور ٦ پیشنهاد نموده است بطور جالب توجه Malvessi [۱۸] بهترین شرایط برای تولید و عملکرد اگزوپلی گالاکتوروناز ex-PG را در pH ٤,٥ و برای اندوپلی گالاکتوروناز endo-PG رادر pH 4.3 برای *A.oryzae* در نظر گرفته است.

تشکر و قدردانی

با تقدیر از کلیه همکارانی که درسازمان علمی صنعتی ایران –پژوهشکده بیوتکنولوژی در این پروژه سهیم بوده‌اند.

References:

1. Balali,G. R., Minaefar, A. and Sharifnabi, B., *Biology of Iran*, **1** (20), 5 (2007).
2. Haghverdi, A., *A Thesis of Master of Science Degree in Food Science and Technology*, Islamic Azad Universit Science and Reserch Branch (2000).
3. Moradi, S. B., Moazami, N. and Rostami, K., *The 2th National Biotechnology Congress, Iran*, 1649 (2002).
4. Moravej, R., *A thesis of Master of Science Degree in Microbilogy*, Islamic Azad Universit Jahrom Branch (2003).
5. Chang, T. S., Siddiq, M. N. K. Sinha, and Cash, J. N., *J. Food Sci*., **59**, 1065 (1994)
6. Carlsen, M., Spohr, A., Nielsen, J. and Villadsen, J., *Biotechnol and Bioengin*., **79**, 266 (1998).
7. Angayarkanni, J., Palaniswamy, M., Murugesan, S. and Swaminthan, K., *J. Biosci. Bioeng.*, **94**, 299 (2002).
8. Bajpai, P., *Biotechnology Progress*., **15**, 147 (1999).
9. Nakadai, T. and Nasuno, S., *Journal of Fermntation Technology*, **66**(5), 525 (1988).
10. Mellon, J. E. and Cotty, P. J., *Mycopathologia*., **157**, 333 (2004).
11. Ribon1, A. O. B., Coelho, J. L. C., de Barros, E. G. and Araújo, E. F., *Biotechnology Letters*, **21**, 395 (1999).
12. Redlak, K., Dahm, H., Ciesielska, A., and Strzelczyk, E., *Biol. Fertil. Soils*, **33**, 83 (2001).
13. Dosanjh, N. S. and Hoondal, G. S., *Biotechnology Letters*, **18**, 1435 (1996).
14. Pagès, S.,Valette, O., Abdou, L., Bèlaïch, A. and Bèlaïch, J., *Bacteriol.*, **185**, 4727 (2003).
15. Yamane, Y., etal, *J. Biosc. Bioneng.*, **93** (1), 9 (2002).
16. Zeta laki, K., *process Biochem*., **11**(7), 11 (1976).
17. Azin, M., Moravej, R., Zareh, D., *Enz. Microb. Technol.*, **40**, 801 (2007).
18. Malvessi, E., Silveira, M., *Brazilian Archives of Biology and Technology,* **47***(5),* 693 (2004).
19. Roy, R. K., *A primer on The Taguchi Method,* VNR. Nostrand Reinhold, New York, ISBN: 0-471-36101-1, 1& 100 (2001).
20. Taragano,V., Sanchez, V. E. and Pilosof, A. M. R., *Biotechnology Letters***, 19**(3), 233 (1997).
21. Pretel, M. T., Lozano, P., Riquelme, F. and Romozara, F., *Proc. Biochem.*, **32**, 43 (1997).
22. Bernfeld, P., *Amylases Alpha and Beta, In: Methods in Enzymology,* **1**., *Colowick , S. and Kaplan, N., Academic Press*, NY, 149.ISBN:12181801-2, (1955).

Archive of SID

www.SID.ir

23. Miller, G. L., *Anal Chem*., **31**, 426 (1995).
24. Fogarty, W., *Enzymes of the Genus Aspergillus, Department of Industrial Microbiology,* University College, Dublin 4, Ireland, 177 (1994).
25. Demain, A. L. and Solomon, N. A., *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology., 2th*. USA: American Society for Microbiology; 10: 122, ISBN: 1555811280(1999).
26. Fogarty, W. and Kelly, C., *Department of Industrial Microbiology* in: Fogarty, W., *Microbial enzymes and biotechnology,* 2nd edition,ed, Elsevier Applied Science Publishers, London ,ISBN 1-85166-486-6, **3**, 72 (1990).
27. Nigam, P., *Process Biochemistry*, **29**, 331 (1994).
28. Lee, M. T., Chen, C. W and Chou, W., *Process Biochem*., **32**, 697 (1997).
29. Kitamoto, E., *Appl. Microbiol. Biotechnol*., **50**, 85(1998).
30. Dhillon, A., Gupta, J. K. and khanna, S., *Process Biochem*, **35**, 840 (2000).
31. Fogarty, W. and Kelly, C., *Pectic Enzymes*, in: Fogarty, W, *Microbial Enzymes and Biotechnology,ed.,*Department of Industerial Mcrobiology University College, Dubblin , Ireland, 131 (1983).

Archive of SID

www.SID.ir