Archive of SID

امکان تولید سلولاز با استفاده از قارچ *نوروسپورا اینترمدیا* به روش تخمیر حالت جامد

سولماز صارم نژاد[1] ، زهره حمیدی اصفهانی*[2] و محمد حسین عزیزی[3]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

۲- استادیار گروه صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

۳- استادیار گروه صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

چکیده

با توجه به کاربردهای فراوان آنزیم سلولاز در بسیاری از صنایع، بویژه در صنایع غذایی و اختصاص سالیانه مبالغ هنگفتی جهت واردات این آنزیم، در این پژوهش تصمیم به تولید سلولاز به کمک قارچ *نوروسپورا اینترمدیا* بر روی دو سوبسترای لیگنوسلولزی (کاه برنج و باگاس نیشکر) به روش تخمیر حالت جامد گرفته شد. قارچ *نوروسپورا اینترمدیا* بر روی دو سوبسترای کاه برنج و باگاس نیشکر که با استفاده از بخار یا قلیا تیمار شده بودند به مدت ۲، ٤ و ٦ روز کشت داده شد و پس از اتمام زمان کشت، آنزیم سلولاز استخراج و میزان فعالیت سلولازی آن اندازه گیری گردید.

بررسی آماری دادههای حاصل از آزمایشها بهترین شرایط برای تولید آنزیم سلولاز توسط *نوروسپورا اینترمدیا* را کشت ٦ روزه قارچ مذکور روی سوبسترای کاه برنج تیمار شده با قلیا نشان می دهد.

کلید واژگان : آنزیم، سلولاز، *نوروسپورا اینترمدیا*، تخمیر حالت جامد

۱- مقدمه

تخمیر حالت جامد به رشد میکروارگانیسمها روی سوبسترای جامد در عدم حضور آب آزاد اطلاق می شود [۱] و از دیر باز به طور گسترده ای بویژه در کشورهای آسیای شرقی برای تخمیر غذاهای سنتی مثل کوجی، تمپه و یا تولید پنیرهای قارچی مورد استفاده بوده است. این روش تخمیر به لحاظ دارا بودن ویژگیهایی مثل نیاز داشتن به فرمانتورهای کم حجم و ارزان، عدم نیاز به اختلاط حین تخمیر و یا اختلاط متناوب، مصرف کم انرژی و ... از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه بوده و امروزه توجه جهانی را برای تولید محصولاتی مانند آنزیم، آنتی بیوتیک، اسید آلی، آفت کش، خوراک دام و ... جلب نموده است [۲].

تحقیقات بسیاری روی تولید آنزیمهای گوناگون به روش تخمیر حالت جامد و با استفاده از میکروارگانیسمهای مختلف انجام شده است. یکی از این آنزیمها سلولاز می باشد که دارای کاربردهای فراوانی در صنایع مختلف مثل نساجی، تولید کاغذ، تولید پودرهای شستشو و بویژه در صنایع غذایی است. از جمله کاربردهای آن در صنایع غذایی می توان به کمک در استخراج روغن از دانههای روغنی، استخراج نشاسته از منابع نشاسته ای یا

* نویسنده عهدهدار مکاتبات: Hamidy_Z@modares.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

استخراج اسانسهای روغنی و مواد طعم دهنده از میوهها و سبزیها، تولید مربا و غذای کودک، افزایش قدرت جذب آب محصولات خشک شده، جداسازی سبوس از غلات وموارد دیگر اشاره نمود [۳]. لذا در این پژوهش تصمیم به تولید این آنزیم به روش تخمیر حالت جامد و با استفاده از قارچ *نوروسپورا اینترمدیا* روی سوبستراهای لیگنوسلولزی ارزان قیمت مثل کاه برنج و باگاس نیشکر که به ترتیب از ضایعات کشاورزی و صنایع غذایی می باشند.

۲- مواد و روشها

۲-۱- تهیه سوبسترا

باگاس نیشکر از کارخانه تولید قند نیشکر هفت تپه خوزستان و کاه برنج از مزارع شمال کشور تهیه شده و بصورت بسته بندی شده در کیسههای کنفی به آزمایشگاه منتقل شدند.

۲-۲- تهیه میکروارگانیسم و روش کشت

سوش وحشی قارچ *نوروسپورا اینترمدیا* (PTCC 5291) بصورت لیوفیلیزه از کلکسیون قارچها و باکتریهای عفونی ایران وابسته به سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران خریداری شد. پس از خریداری در زیر هود میکروبیولوژی (JAHL, JLBV120RS) و روی محیطی با ترکیب زیر کشت داده شد: مالتوز ۴۰ g/l، آگار ۱۵ g/l، پروتئوز پپتون ۵ g/l، عصاره مخمر ۵ g/l سپس محیطهای حاصله در ۲۶-۳۰°C به مدت ٤ روز گرمخانه گذاری گردید.

۲-۳- تهیه بانک سوسپانسیون اسپور

یک سوسپانسیون اسپور از پلیتهای کشت داده شده و حاوی اسپور تهیه شده و پس از شمارش آنها توسط لام توما مقدار معینی اسپور (۲۰ گرم سوبسترای خشک/ 10^8 اسپور) درون ویالها ریخته شده و به هر ویال ۲۳٪ w/v گلیسرول (جهت محافظت سرمایی) افزوده و ویالها تا زمان استفاده در فریزر ۸۰°C- نگهداری شدند.

۲-٤- پیش تیمار سوبسترا

در سوبستراهای تیماردهی نشده سلولز اغلب به شکل کریستالی است که قابلیت دسترسی آنزیم به آنرا محدود می کند. سلولز توسط لیگنین نیز محافظت می شود که ماده ای مقاوم در برابر آنزیمهای سلولولیتیک می باشد.

پیش تیمار سبب زیاد شدن سطح داخلی ذرات سوبسترا و حلالیت جزیی و یا تجزیه همی سلولز و لیگنین می گردد [۱]. لذا پیش تیمار سوبستراهای لیگنوسلولزی برای تسهیل قرار گیری آنها در دسترس میکروارگانیسمها لازم است.

از آنجا که آسیاب نمودن سوبسترا، درجه پلیمریزاسیون سلولز و لیگنین را کاهش داده و سبب کاهش میزان سلولز کریستالی می‌شود [٤]، لذا در ابتدا باگاس نیشکر و کاه برنج آسیاب و اندازه آنها تا مش ٤٠ کاهش داده شد، سپس دو نوع پیش تیمار به شرح زیر روی آنها صورت پذیرفت:

الف- تیمار با بخار

سوبسترا به مدت یک ساعت تحت بخار با فشار psi ۱۵ و دمای °C ۱۲۱ قرار داده شد.

ب- تیمار با قلیا

مقدار معینی از سوبسترا توزین شده و ۱۰ برابر وزن سوبسترا محلول سود با غلظت معین به آن افزوده شد. مخلوط حاصل به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار گرفته و پس از پایان این مدت با آب مقطر شستشو داده شد. سوبسترای شسته شده برای هیدرولیز بیشتر لیگنوسلولز به مدت ۲۰ دقیقه نیز در اتوکلاو در معرض بخار با فشار psi ۱۵ و دمای °C ۱۲۱ قرار گرفت، و سپس بخوبی با آب شستشو داده شد و در آون °C ۸۰ خشک شد.

۲-۵- تهیه محلول مواد معدنی

برای رشد بهتر قارچ محلولی حاوی مواد معدنی و مغذی با ترکیب زیر تهیه شد:

www.SID.ir

Archive of SID

Urea 0.3g/l, $(NH_4)_2SO_4$ 1.4 g/l, KH_2PO_4 2g/l, $CaCl_2.2H_2O$ 0.4g/l, $MgSO_4.4H_2O$ 0.3 g/l, Tween 80 2 g/l, Peptone 0.75 g/l, Yeast extract 0.25 g/l, $FeSO_4.7H_2O$ 5 mg/l, $MnSO_4.H_2O$ 1.2g/l, $ZnSO_4.7H_2O$ 1.4mg/l, $CoCl_2$ 0.02 g/l

۲-٦- تخمیر

تخمیر در ارلنهای ۱۰۰۰ میلی لیتری انجام شد. ارلنهای حاوی ۲۰ گرم سوبسترا با محلول مواد معدنی مرطوب شد بطوریکه پس از تلقیح سوسپانسیون اسپور، pH و رطوبت سوبسترا بترتیب ۵ و ۷۵٪ بود. ارلنهای حاوی میکروارگانیسم در دمای ۲۸ ^oC گرمخانه گذاری شدند و در زمانهای ۲، ٤ و ٦ روز پس از کشت، عملیات استخراج آنزیم از توده تخمیر شده انجام شد.

۲-۷- استخراج آنزیم

به منظور استخراج سلولاز، توده تخمیر شده را توزین نموده و ۵ برابر وزن توده تخمیر شده به آن آب مقطر افزوده شد. مخلوط حاصل به مدت یک ساعت با دور ۱۳۰ rpm همزده شد سپس به مدت ۱۵ دقیقه نیز با دور ۱۰۰۰۰ × g سانتریفوژ شد. مایع رویی حاصل از سانتریفوژ حاوی عصاره آنزیمی بوده که برای اندازه گیری فعالیت سلولاز مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۸- اندازه گیری میزان فعالیت سلولاز

اندازه گیری فعالیت سلولاز توسط متد Ghose از طریق اندازه گیری میزان قندهای احیا کننده صورت پذیرفت [۵].

۳- نتایج و بحث

با توجه به اینکه تیمار نمودن سوبستراهای لیگنوسلولزی به روشهای گوناگون سبب هیدرولیز نسبی و سهولت قرار گیری این سوبستراها در معرض میکروارگانیسم می گردد، لذا دو نوع تیمار بخار یا قلیا بر روی سوبستراها صورت گرفت و سپس تلقیح میکروارگانیسم بر روی آنها انجام شد و کشتهای ۲، ٤ و ٦ روزه از نظر میزان فعالیت سلولازی سنجیده شدند.

به منظور تعیین اثر سوبسترای تیمار شده و زمان کشت روی فعالیت سلولازی *نوروسپورا اینترمدیا* تجزیه واریانس انجام شد. نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان دهنده معنا دار بودن اثر نوع سوبسترای تیمار شده و زمان کشت بر فعالیت سلولازی در سطح ۹۵٪ می باشد. با توجه به نتایج این جدول به منظور بررسی دقیق تر اثر نوع سوبسترای تیمار شده و زمان کشت مقایسه میانگین دادهها به روش دانکن انجام شد. اشکال ۱، ۲ و ۳ نشان دهنده نتایج این آزمون می باشند. همان طور که شکل ۱ نشان می دهد بالاترین فعالیت سلولازی مربوط به سوبسترای کاه برنج تیمار شده با قلیا و کمترین فعالیت مربوط به کشت این قارچ روی باگاس تیمار شده با قلیا می باشد و تمامی سوبستراها در سطح اطمینان ۹۵٪ با یکدیگر اختلاف معنا دار دارند.

با توجه به شکل ۲ نیز مناسبترین زمان کشت برای قارچ *نوروسپورا اینترمدیا* ٦ روز بوده و میان زمانهای کشت ۲ و ٤ روز اختلاف معنا داری (در سطح ۹۵٪) مشاهده نشد.

در نهایت بررسی اثر توام نوع سوبسترای تیمار شده و زمان کشت روی فعالیت سلولازی (شکل ۳) نیز نشان دهنده مناسبتر بودن سوبسترای کاه برنج تیمار شده با قلیا در کشت ٦ روزه می باشد. مناسبتر بودن کاه برنج نسبت به باگاس برای تولید سلولاز توسط *نوروسپورا اینترمدیا* را می توان به دلیل ساختار شیمیایی این دو سوبسترا دانست. مقایسه ساختار شیمیایی کاه برنج و باگاس نیشکر نشان دهنده بالاتر بودن میزان مواد معدنی و سلولز در کاه برنج و لیگنین و قند آزاد در باگاس می باشد [۷،٦]. علیرغم هیدرولیز نسبی لیگنینها توسط پیش تیمار نمودن سوبسترا، لیگنین بیشتر باگاس موجب محصور نمودن زنجیره سلولزی و کاهش دسترسی قارچ به سلولز می گردد، از سوی دیگر بالاتر بودن میزان مواد معدنی و سلولز در کاه برنج می تواند دلیلی برای توجیه مناسبتر بودن این سوبسترا برای رشد قارچ و تولید آنزیم باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

تحقیقات بسیاری روی تولید آنزیم سلولاز توسط میکروارگانیسمهای گوناگون صورت گرفته است. در اغلب این تحقیقات از سویه‌های جهش یافته میکروبی که مناسب برای تولید سلولاز می باشند استفاده شده است. در بررسی منابع برای تولید آنزیم سلولاز هیچ گونه کار تحقیقاتی در زمینه تولید این آنزیم بوسیله قارچ *نوروسپورا اینترمدیا* مشاهده نگردید لیکن در مطالعه ای که رومرو و همکاران در سال ۱۹۹۹ روی *نوروسپورا کراسا* (موتان cell-1) انجام دادند موفق به تولید سلولاز از این قارچ بر روی سوبسترای کاه گندم و بروش تخمیر حالت جامد شدند. آنها فعالیت سلولازی را ۱/۳۳Iu/ml بدست آوردند. همچنین در مطالعه دیگری که توسط کوری و همکاران در سال ۲۰۰۰ صورت گرفت، آنها موفق به تولید سلولاز از سویه جهش یافته 3T5B8 *آسپرژیلوس نایجر* بر روی سوبسترای سبوس گندم و بروش تخمیر حالت جامد شدند. میزان فعالیت سلولاز این قارچ در صورت استفاده از قند سلوبیوز به همراه سوبسترای سبوس گندم ۱/۰٤Iu/ml و در صورت عدم استفاده از این قند کمتر از Iu/ml ۱ بدست آمد که این تحقیق موثر بودن افزودن یک محرک تولید آنزیم به محیط کشت میکروارگانیسم را در افزایش فعالیت سلولاز نشان می دهد. لذا با توجه به اینکه در تحقیق حاضر بالاترین میزان فعالیت سلولازی سویه وحشی *نوروسپورا اینترمدیا* بدون حضور ماده محرک به همراه سوبسترا ۰/۰۵۷Iu/ml بدست آمده است، بنابراین میزان فعالیت سلولازی کمتر از ۱ قابل انتظار می باشد.

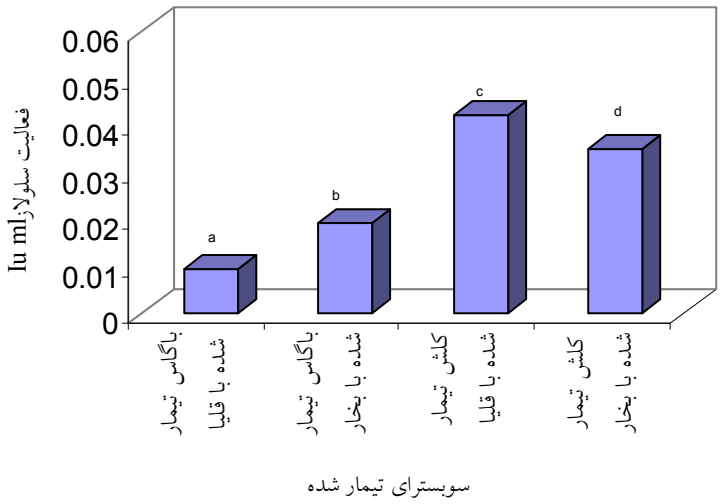
ویکتور و همکاران وی نیز در سال ۲۰۰۳ آنزیم سلولاز را بروش تخمیر حالت جامد و با استفاده از قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* (*Aspergillus flavous Linn* isolate NSPR 101) و سوبستراهای خاک اره، باگاس و چوب ذرت بدست آوردند که بالاترین فعالیت سلولازی از رشد قارچ روی خاک اره و با میزان Iu/ml ۰/۰۷٤ بدست آمد در حالیکه فعالیت سلولازی حاصل از کشت این قارچ روی باگاس و چوب ذرت به ترتیب ۰/۰۵۷۳Iu/ml و ۰/۰۵۰۲ بدست آمد، که این اعداد نشانگر موثر بودن نوع سوبسترای مصرفی روی فعالیت آنزیم سلولاز بدست آمده می باشد. در تحقیق ما نیز حداکثر فعالیت سلولازی در صورت استفاده از سوبسترای کاه برنج و حداقل فعالیت بر روی سوبسترای باگاس بدست آمده است که نتایج حاصل از آزمایشات ویکتور تأییدکننده نتایج آزمایشهای تحقیق حاضر می‌باشد و اثر نوع سوبسترا بر فعالیت سلولازی را ثابت می کند.

جدول ۱ جدول آنالیز واریانس برای تعیین اثر نوع سوبسترای تیمار شده و زمان کشت روی فعالیت سلولازی *نوروسپورا اینترمدیا*

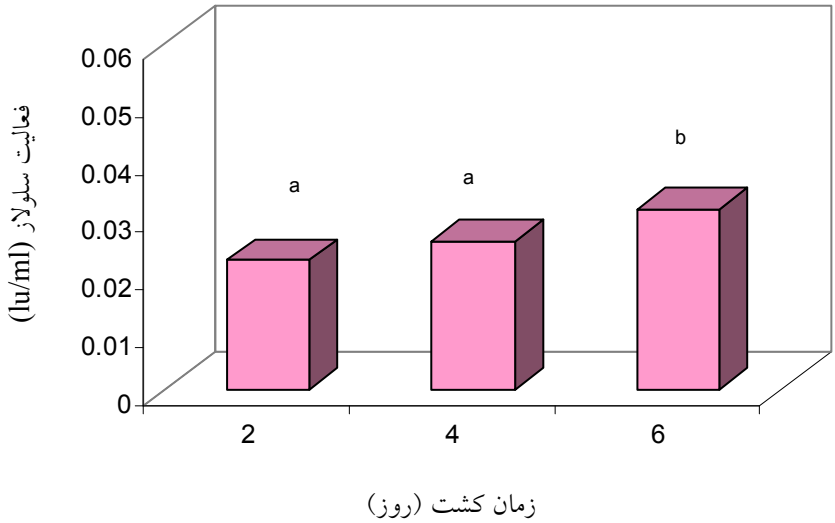
منبع	مجموع مربعات نوع ۳	درجه آزادی	مربع میانگین	F	میزان معنا داری
مدل تصحیح شده	۵/۰٦٤ × ۱۰$^{-۳}$	۱۱	٤/٦۰٤ × ۱۰$^{-٤}$	۲۷/٤۱۹	۰/۰۰۰
سوبسترا	٤/۰۲٤ × ۱۰$^{-۳}$	۳	۱/۳٤۱ × ۱۰$^{-۳}$	۷۹/۸۷۷	۰/۰۰۰
روز	۳/۳۲۳ × ۱۰$^{-٤}$	۲	۱/٦٦۲ × ۱۰$^{-٤}$	۹/۸۹٦	۰/۰۰۳
سوبسترا × روز	۷/۰۸۳ × ۱۰$^{-٤}$	٦	۱/۱۸۱ × ۱۰$^{-٤}$	۷/۰۳۱	۰/۰۰۲
خطا	۲/۰۱۵ × ۱۰$^{-٤}$	۱۲	۱/٦۷۹ × ۱۰$^{-۵}$		
مجموع	۲/۲۰۷ × ۱۰$^{-۲}$	۲٤			
مجموع تصحیح شده	۵/۲٦٦ × ۱۰$^{-۳}$	۲۳			

www.SID.ir

Archive of SID



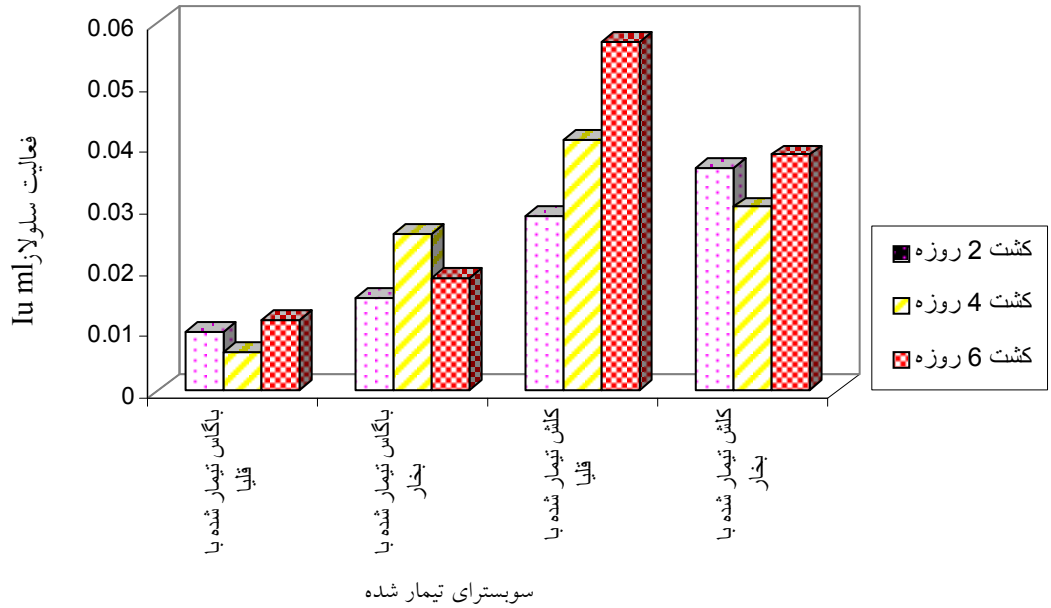
شکل ۱ اثر نوع سوبسترای تیمار شده بر فعالیت آنزیم سلولازتولید شده توسط *نوروسپورا اینترمدیا*



شکل ۲ اثر زمان کشت روی فعالیت آنزیم سلولازتولید شده توسط قارچ *نوروسپورا اینترمدی*

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳ اثر همزمان نوع سوبسترای تیمار شده و زمان کشت روی فعالیت آنزیم سلولازتولید شده توسط قارچ *نوروسپورا اینترمدی*

٤- نتیجه گیری

برای تولید آنزیم سلولاز سوش وحشی قارچ *نوروسپورا اینترمدیا* بر روی دو سوبسترای کاه برنج و باگاس نیشکر که به طور جداگانه توسط بخار و یا قلیا تحت هیدرولیز نسبی قرار گرفته بودند در مدت زمانهای ۲، ٤ و ٦ روز و به روش تخمیر حالت جامد کشت داده شد. نتایج تجزیه آماری نشان داد که کاه برنج تیمار شده با قلیا به عنوان بهترین سوبسترا و زمان ٦ روز به عنوان بهترین زمان کشت برای تولید سلولاز توسط *نوروسپورا اینترمدیا* بود.

از سوی دیگر با توجه به این که در بررسی منابع مربوط به تولید سلولاز از میکروارگانیسمهای گوناگون مطالعه ای بر روی فعالیت سلولازی *نوروسپورا اینترمدیا* مشاهده نگردیده است می توان این قارچ را دارای پتانسیل تولید سلولاز معرفی نمود. با توجه به این که در این پژوهش از سوش وحشی *نوروسپورا اینترمدیا* استفاده شده است مطالعه بر روی ایجاد جهشهای ژنتیکی روی این قارچ به منظور بهینه نمودن آن برای تولید سلولاز در مقیاس صنعتی و همچنین مطالعه روی بهینه سازی عوامل مؤثر در فرایند تخمیر مثل میزان رطوبت، دما، انواع روشهای پیش تیمار سوبسترا و pH و... پیشنهاد می گردد.

٥- منابع

[1] Tao, S., Beihui, L., Zuohu, L. 1997. Enhanced cellulase production in fed batch solid state fermentation of Trichoderma viride SL-1. J. Chem. Tech. Biotechnol. 69 : 429-432.

[2] Moo-Young, M. and Blanch, H.W. 1985. Comprehensive Biotechnology. The principles, applications and regulations of biotechnology in industry. Vol. 3, Pergamon press.

[3] Esterbauer, H., Steiner, W., Labudova, I., Hermann, A. 1991. Production of Trichoderma cellulase in laboratory and pilot scale. Biores. Tech., 36 : 51-65.

www.SID.ir

Archive of SID

[4] Pandey, A., Soccol, C. R., Nigam, P. 2000. Biotechnological potential of agro industrial residues. Biores. Tech. 74 : 69-80.

[5] Ghose, T.K. 1987. Measurement of cellulase activities. Pure. Appl. Chem. 59(2) : 257-268.

[6] Khang, D.T. and Dan, C. X. 2001. Chemical composition of several crop by products as animal feeds in Vietnam. Available online at www. Siencedirect. com

[7] Tinh, N. T., Kien, D.D. and Linh, L.M. 2001. The chemical composition and in sacco degradability of some bedding materials from agricultural by products (Rice straw, Sugarcane bagasse and Rice husk). Available online at www. google.com

[8] Romero, M. D., Aguado, L. and Ladero, M. 1999. Cellulase production by *Neurospora crassa* on wheat straw. Enzym. microb. Tech. 25 : 244-250.

[9] Victor, O.T., Ogbe, B., Eriola, B., Layokun, S. 2003. Cellulase production by *Aspergillus flavous* Linn Isolate NSPR 101 fermented in sawdust, bagasse and corncob. African. J. Biotech. 2(6) : 150-152.

[10] Couri, S., Terzi, S., Saavedra, G. A., Freitas, S.P., Costa, A. 2000. Hydrolytic enzyme production in solid state fermentation by *Aspergillusa niger* 3T5B8. Process. Biochem. 36:255-261.

www.SID.ir

Archive of SID

Cellulase Enzyme Production by *Neurospora intermedia* Under Solid State Fermentation System

Saremnezhad, S.[1] , Hamidi Esfahani, Z.[2*] , Azizi, M. H.[3]

1- M.Sc. Graduate Student, Department of Food Science, Agriculture Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Assistant Professor, Department of Food Science, Agriculture Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3-Assistant Professor, Department of Food Science, Agriculture Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

With regard to different applications of cellulase in many industries, specially food industry ,as well as expending too much money for importing of it, we decided to produce cellulase by *Neurospora intermedia* on two lignocellulosic substrates (rice straw and sugarcane bagasse) under solid state fermentation system. *Neurospora intermedia* was cultivated on steam or alkali treated rice straw and sugarcane bagasse for 2, 4 and 6 days, then the enzyme was extracted and its cellulolytic activity was measured. Statistical analysis of data showed that the best conditions for cellulase enzyme production by *Neurospora intermedia* achieved by cultivating of this fungus on alkali treated rice straw for 6 days.

Key Words: Enzyme, cellulase, *Neurospora intermedia*, solid state fermentation

∗ Corresponding author E-mail address : Hamidy_Z@ modares.ac.ir

www.SID.ir