# جداسازی ریز سازواره های تولیدکننده سلولاز از خاک و بهینه سازی فعالیت Filter Paperase بهترین سویه

مریم محمدی زاده[۱]، زهره حمیدی اصفهانی[۲*]، سلیمان عباسی[۲]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی.
۲- دانشیار، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی.
**(تاریخ دریافت: ۸۹/۱۱/۶ تاریخ پذیرش: ۹۰/۸/۱۶)**

## چکیده

در این تحقیق جداسازی ریزسازواره های تولید کننده سلولاز از خاک درختان انار، انگور، خرمالو و گردو صورت پذیرفت. در این بین خاک درخت خرمالو به دلیل دارا بودن تعداد قارچ های سلولولیتیک بیشتر، انتخاب گردید. تعداد ۷ نوع کپک از این خاک جداسازی گردید که ۳ مورد از این کپک ها دارای فعالیت سلولازی مناسبتری نسبت به بقیه بودند. این سه قارچ که با روش 18srRNA تعیین هویت شدند به ترتیب فعالیت سلولازی *Aspergillus niger MZM 89-a2*، *Penicillium decumbens ZHE 89-p3*، *Penicillium decumbens MMH 89-p1* می باشند. میزان فعالیت سلولازی این قارچ ها به ترتیب بدین قرار می باشد (U/g) : FPA ۳/۱۶۷۱، ۳/۵۷۴۰، ۳/۱۸۱۲ و Avicelase ۱/۶۶۰۵، ۳/۳۸۶۹ ، ۱/۱۴۵۱ و CMCase ۲/۹۵۰، ۰/۲۶۴۴۰، ۰/۴۶۰۴. همچنین Response surface methodology (RSM) جهت ارزیابی اثر عوامل مختلف مانند محتوای رطوبتی، دما و اندازه ذرات، بر روی میزان فعالیت FPA *Aspergillus niger MZM 89-a2* مورد بررسی قرار گرفت. مقادیر تولید سلولاز بهینه در دما (A)، محتوای رطوبتی (B) و اندازه ذرات (C) به ترتیب ۲۸/۴۹، ٪ ۶۶/۶۲ و ۱/۲۸ می باشد. در این حالت میزان فعالیت سلولاز ۴/۳۵ (U/g) می باشد. برای تایید مدل، آزمایشی در شرایط مقادیر بهینه پیش بینی شده برای هر عامل انجام گرفت. میزان فعالیت آنزیم در شرایط آزمایش ۴/۴۲ (U/g) شد. که مقایسه آن با مقدار پیش بینی شده، کارایی مدل ارائه شده را تایید می کند.

**کلید واژگان:** قارچ، خاک، سلولاز، جداسازی، بهینه سازی، FPA.

* مسئول مکاتبات: Hamidi_z@modares.ac.ir



Archive of SID
www.SID.ir

## ۱- مقدمه

لیگنوسلولزها به عنوان یکی ازمنابع عمده بیولوژیکی قابل تجدید هستند که به طور مداوم به وسیله فتوسنتز به وجود می آیند[۱]. سالیانه مقدار زیادی باقی مانده محصولات کشاورزی مثل کاه گندم، کاه برنج، ساقه ذرت و پوست بادام زمینی تولید می شود. اما این مواد به طور معمول در مزارع سوزانده می شوند که نتیجه آن بهره برداری پایین از انرژی و آلودگی محیط زیست است. از طرف دیگر کمبود غذا، بحران انرژی و آلودگی محیط زیست در حال حاضر مشکلات عمده همه دنیاست که بهره برداری از سلولز را ضروری می سازد [۲]. سلولز، بسپار بدون شاخه از گلوکز است که از واحدهای آنهیدرو-D-گلوکز که به وسیله باندهای ۱و۴-β-D-گلوکوزید به هم مرتبط شده اند تشکیل شده است [۳]، که می تواند به وسیله آنزیم های تجزیه کننده سلولز آبکافت شود [۴].

راههای متداول شکستن سلولز برای تبدیل آن به گلوکز تیمار اسیدی و آبکافت آنزیمی است که در مقایسه با تیمار اسیدی آبکافت آنزیمی انرژی کمتری را مصرف می کند و با محیط سازگارتر است [۵] . آبکافت آنزیمی کامل مواد سلولزی به انواع مختلفی از سلولازها نیاز دارد:

اندوگلوکاناز (۱و۴-β-D-گلوکان-۴-گلوکانوهیدرولاز)، اگزوسلوبیوهیدرولازها (۱و۴-β-D-گلوکان گلوکوهیدرولاز) و گلوکوزیدها (β-D-گلوکوزیداز گلوکانوهیدرولاز).

اندوگلوکانازها به طور تصادفی باندهای β-۱و۴ را در مولکول سلولز آبکافت می کند، برای اندازه گیری این آنزیم از کربوکسی متیل سلولاز به عنوان سوبسترا استفاده می شود که به همین دلیل آن را CMCase می نامند. اگزوسلوبیوهیدرولازها در بیشتر موارد یک واحد سلوبیوز را آزاد می کند که جهت اندازه گیری آن از Avicel به عنوان سوبسترا استفاده می شود و در آخر سلوبیوز به وسیله کاربرد β-گلوکزیداز به گلوکز تبدیل می شود، همچنین میزان فعالیت هر سه آنزیم را به طور همزمان با استفاده از کاغذ صافی اندازه گیری می کنند که به این روش FPAse گویند [۴،۶،۷].

سلولازها مهمترین آنزیم های تجاری هستند که به طور وسیعی در صنعت غذا، نساجی، پالپ و کاغذسازی، تخمیر الکلی غلات، داروسازی، صنایع آبجوسازی و مالت سازی استفاده می شوند[۸].

اما بزرگترین مشکل در راه کاربرد صنعتی این آنزیم ها قیمت بالا و راندمان کم تولید آن هاست[۹]. سلولازها آنزیم های نسبتا گرانی هستند و هر کاهش قابل ملاحظه در قیمت آنها برای استفاده های تجاری مهم خواهد بود. پس به طور خلاصه از طرفی بهبود اقتصادی در تولید سلولاز برای کاهش قیمت آن و از طرف دیگر به منظور نقش آنزیمی سلولاز برای رسیدن به سطح آبکافت بالاتر، با میزان سلولاز مورد استفاده کمتر، باعث شده است که هنوز مطالعات و تحقیقات بر روی سلولاز و یافتن سویه ای با تولید سلولاز بالاتر ادامه یابد [۷]. برای مثال در سال ۲۰۰۶ Chang و همکاران از چوب ذرت کپک زده، قارچ هایی با فعالیت بالای سلولازی جداسازی نمودند که به وسیله آنالیز مورفولوژیکی و توالی یابی ژن ۱۸S rRNA یکی از قارچ ها با بالاترین فعالیت سلولاز، به عنوان *Aspergillus glaucus* XC9 نامگذاری شد. همچنین طی مطالعات بعدی، بالاترین فعالیت کربوکسی متیل سلولاز (۶/۸۱۲ U/g dry)، FPA (۱۷۲U/g dry) در pH=۶-۵/۵ ، دمای ۳۰°C و دوره کشت ۴-۳ روز حاصل شد [۲].

در سال ۲۰۰۶، شرایط کشت برای تولید سلولاز به وسیله دو سویه جهش یافته *Trichoderma reesei* تحت شرایط تخمیر حالت جامد مورد بررسی قرار گرفت، که در آن از سبوس برنج به عنوان سوبسترای قارچ *تریکودرما* برای تولید سلولاز استفاده شد. بررسی ها نشان داد میزان محتوای رطوبتی، روی فعالیت سلولازی *T. reesei* QM9414 و میزان محتوای رطوبتی و دما، روی فعالیت سلولازی *T. reesei* MCG77 موثر بود [۱۰].

اثر شرایط کشت روی فعالیت سلولاز به وسیله *Trichoderma reesei* رشد کرده روی سبوس برنج، به عنوان محیط کشت مورد ارزیابی قرار گرفت. این شرایط کشت مورد تحقیق شامل اندازه ذرات، سرعت هوادهی و زمان برداشت بود که اثر آن بر فعالیت Filter paperase (FPA)، (CMCase) کربوکسی متیل سلولاز و Avicelase مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که سرعت هوادهی و اندازه ذرات اثر معنی داری روی فعالیت سلولاز بر FPA و اندازه ذرات و زمان برداشت اثر



Archive of SID

www.SID.ir

معنی داری روی فعالیت CMCase و Avicelase داشت [۱۱].

در تحقیق دیگری که توسط صارم نژاد و همکاران در سال ۱۳۸۴ انجام شد، امکان تولید سلولاز با استفاده از قارچ *نوروسپورا اینترمدیا* به روش تخمیر حالت جامد نیز به اثبات رسید که در این تحقیق از کاه برنج و باگاس نیشکر به عنوان سوبسترا استفاده شد. داده های حاصل از این تحقیق نشان داد که بهترین شرایط برای تولید آنزیم سلولاز توسط *نوروسپورا اینترمدیا* کشت ۶ روزه قارچ مذکور روی سوبسترای کاه برنج تیمار شده با قلیا بود [۱۲]. تاکنون در کشور تحقیقات زیادی بر روی سلولاز انجام شده و میزان تولید سلولاز ریزسازواره های مختلفی بر روی محیط کشت های متفاوت مورد بررسی و همچنین بهینه سازی شرایط کشت این ریز سازواره ها برای تولید بالاتر سلولاز مورد توجه قرار گرفته است. ولی جداسازی ریزسازواره های بومی تولید کننده سلولاز از یک ماده حاوی سلولز، کمتر مورد توجه بوده است. بنابراین با توجه به اهمیت سلولازها در صنایع مختلف از جمله صنایع غذایی، ضروری است ریزسازواره های بومی که قادر به آبکافت لیگنوسلولازها باشند شناسایی و مورد بهره قرار گیرند.

در این راستا سویه هایی از ریزسازواره هایی که سلولاز بیشتری تولید می کنند از نمونه های خاک جداسازی شده تا اطلاعات مفیدی در اختیار محققینی که در این زمینه علاقه مند به کار هستند قرار گرفته و همچنین زمینه مساعدی برای تولید این آنزیم ها فراهم گردد.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- تهیه سوبسترا

در این تحقیق از پوسته گندم به عنوان سوبسترا استفاده شد که از کارخانه آردسازی مرشدی تهران تهیه گردید.

### ۲-۲- جداسازی ریزسازواره

**نمونه ها:** نمونه های خاک مورد نظر، از اطراف درختان خرمالو، انگور، انار، واقع در باغی در دانشکده کشاورزی تربیت مدرس برداشته شدند.

**جداسازی کپک ها:** برای جداسازی ریزسازواره های تولید کننده سلولاز، ۲ گرم از نمونه های خاک به ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل منتقل و به خوبی همزده شد. ۰/۵ میلی لیتر از این محلول به پلیت های حاوی Potato Dextrose Agar (PDA) منتقل و به مدت ۱۴ روز در دمای ۲۵°C گرمخانه گزاری شدند. سپس هر یک از قارچ های رشد کرده روی پلیت های قبلی، به منظور خالص سازی بر روی پلیت های جداگانه حاوی PDA کشت داده شدند و این کشت ها تا رسیدن به جداسازی خالص ادامه یافت [۱۳].

**تعیین کپک های سلولولیتیک:** برای جداسازی کپک های تجزیه کننده سلولز، از محیط کشت انتخاب شده Mandel 's agar استفاده شد. قارچ های سلولولیتیک بر روی این محیط کشت ایجاد ناحیه روشن در اطراف کلنی خود می کنند (Kadel *et al.*, 1999). محیط کشت انتخاب شده Mandel 's agar حاوی (g/L): $KH_2PO_4$، ۲؛ $(NH_4)SO_4$، ۱/۴؛ اوره، ۰/۳؛ $MgSO_4.7H_2O$، ۰/۳؛ $CaCl_2$، ۰/۱؛ پپتون، ۱؛ Tween ۸۰، ۲؛ $FeSO_4.7H_2O$، ۰/۰۰۵؛ $MnSO_4.H_2O$، ۰/۰۰۱۶؛ $ZnSO_4.7H_2O$، ۰/۰۰۱۴ و $CoCl_2.7H_2O$، ۲/۹ است، که توسط ۱٪ (W/V) کربوکسی متیل سلولز به عنوان منبع کربن غنی سازی شده است [۱۴].

### ۲-۳- تهیه بانک و سوسپانسیون اسپور

به منظور تکرار پذیری آزمون ها از نظر تعداد اسپور تلقیح شده در دفعات متعدد، لازم است که قبل از آزمون ها، ویال هایی با تعداد اسپور یکسان (۲۰ گرم سوبسترای خشک / $10^8$ اسپور) برای هر بار تلقیح تهیه شود و سپس در شرایط برودت ۸۰°C- تا زمان تلقیح حفظ شود.

### ۲-۴- تهیه محلول مواد معدنی

به منظور رشد بهتر قارچ ها، مواد معدنی مورد نیاز این ریزسازواره ها به صورت محلول تهیه می شود. در این تحقیق از محلول مواد معدنی تحت عنوان محلول مندل (Mandel) استفاده گردید[ ۱۵].



Archive of SID

www.SID.ir

### ۲-۵- تخمیر

تخمیر در ارلن های ۱۰۰۰ میلی لیتری انجام شد. هر کدام از این ارلن ها حاوی ۲۰ گرم سوبسترا با مش ۳۰-۱۰ بودند که توسط محلول مواد معدنی محتوای رطوبتی آن ها در سطح ۷۰ درصد تنظیم گردید. پس از تلقیح سوسپانسیون اسپور ارلن های مذکور در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۶ روز گرمخانه گذاری شدند.

### ۲-۶- استخراج آنزیم

به منظور استخراج آنزیم پس از اتمام مدت زمان مورد نظر گرمخانه گذاری ارلن حاوی سوبسترای تخمیر شده را توزین نموده و پس از کسر عدد به دست آمده از وزن خالی وزن توده تخمیر شده به دست آمد. برای استخراج نمودن آنزیم ۵ برابر وزن توده تخمیر شده به ارلن آب مقطر اضافه کرده و به مدت یک ساعت و دور ۱۳۰ rpm برای مرحله اول و به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۵۰۰ rpm مخلوط شد. پس از خاتمه این مدت محتوای ارلن را با دور ۱۰۰۰۰ × g و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ نموده و مایع موجود در ظروف سانتریفیوژ برای اندازه گیری میزان فعالیت سلولاز در یخچال نگه داری شد [ ۱۶].

### ۲-۷- اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم

اندازه گیری میزان فعالیت سلولاز از روش Ghose با اندازه گیری میزان قندهای احیاکننده صورت پذیرفت [۱۷].

### ۲-۸- تعیین هویت و شناسایی ریزسازواره ها

**تجزیه ریخت شناسی:** نمونه کوچکی از کلنی از پلیت برداشته شده و با یک قطره آب مخلوط، سپس بر روی یک لام شیشه ای قرار داده و نمونه ها با میکروسکوپ مشاهده می شوند [۲]. آنالیز 18srRNA توالی ژنی توسط پژوهشکده مهندسی ژنتیک صورت پذیرفت.

### ۲-۹- بهینه سازی متغیرهای انتخاب شده توسط روش سطح پاسخ

ارزیابی و بهینه سازی شرایط کشت با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM) Response surface methodology صورت گرفت. ۳ عامل و ۳ سطح مرکزی شامل ۱۸ آزمایش، در مورد *Aspergillus niger MZM 89-a2* مورد بررسی قرار گرفت. متغیرهای طراحی شده، دما (°C)، محتوای رطوبتی (w/w٪) و اندازه ذرات (mm) و متغیر پاسخ، FPA (U/g) بود. متغیرها و سطوح آن ها، در جدول ۱ آورده شده اند.

**جدول ۱** متغیرها و سطوح آن ها

| متغیرها | سطوح متغیر | | |
|---|---|---|---|
| | -۱ | ۰ | +۱ |
| دما (°C) | ۲۵ | ۳۰ | ۳۵ |
| محتوای رطوبتی (% w/w) | ۵۵ | ۶۲/۵ | ۷۰ |
| اندازه ذرات (mm) | ۰/۵[a] | ۱[b] | ۱/۵[c] |

a= اندازه ذرات ۱ - ۰/۵ (mm)، b= اندازه ذرات ۱/۵- ۱ (mm)، c= اندازه ذرات ۲- ۱/۵ (mm).

## ۳- نتایج و بحث

### ۳-۱- جداسازی ریزسازواره های تجزیه کننده سلولز

در بین خاک درختان مختلف مورد بررسی، خاک درخت خرمالو به دلیل دارا بودن تعداد کپک تجزیه کننده بیشتر مورد انتخاب و بررسی قرار گرفت. از این خاک تعداد ۷ کپک که در اطراف کلنی خود بر روی محیط کشت Mandel agar حاوی ۱۰٪ کربوکسی متیل سلولز، ایجاد منطقه روشن کرده بودند، جداسازی گردید. این کپک ها از B تا H نامگذاری گردیدند. سپس هر کدام از این ریزسازواره ها طبق روش Ghose از نظر میزان فعالیت سلولازی مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین از طریق بررسی مورفولوژیکی از نظر جنس تعیین هویت شدند (جدول۲).



Archive of SID
www.SID.ir

**جدول ۲** اندازه گیری میزان فعالیت سلولاز

| ریزسازواره | نوع ریزسازواره | Avicelase (U/g) | CMCase (U/g) | FPA (U/g) | ریزسازواره |
|---|---|---|---|---|---|
| B | Penicillium | ۰/۳۱۲۶ | ۰/۹۴۱۹ | ۲/۳۵۸۳ | |
| C | Penicillium | ۰/۳۸۶۹ | ۰/۲۶۴۴ | ۳/۵۷۴۰ | |
| D | Penicillium | ۱/۱۴۵۱ | ۰/۴۶۰۴ | ۳/۱۸۱۲ | |
| E | Penicillium | ۰/۲۱۴۱ | ۰/۲۶۶۵ | ۳/۱۰۶۹ | |
| F | Penicillium | ۰ /۲۱۱۰ | ۰/۳۶۱۹ | ۰/۸۵۴۴ | |
| G | Penicillium | ۰/۲۸۹۲ | ۰/۰۴۹۲ | ۱/۴۶۴۰ | |
| H | Aspergillus | ۱/۶۶۰۵ | ۲/۹۵۰ | ۳/۱۶۷۱ | |

فعالیت ها بر حسب واحد بر گرم سوبسترای خشک ( U/g dry substrate) بیان شد. یک واحد فعالیت آنزیمی (U) عبارت است از مقدار آنزیم لازم برای آزاد کردن یک میکرومول محصول (گلوکز) در دقیقه در دمای ۵۰°c [۱۸].

## ۳-۲- تعیین ریزسازواره های با فعالیت سلولازی مناسب

از بین ۷ سویه مورد بررسی در مرحله قبل ۳ سویه به عنوان بهترین تولید کننده های سلولاز انتخاب شدند و با استفاده از روش آنالیز 18srRNA توالی ژنی تعیین هویت شده و پس از نام گذاری در EMBL databank ثبت گردیده و شماره های پذیرش آن ها به ترتیب فعالیت سلولازی FR774047 FR774045 و FR774046 می باشند. این سه قارچ به ترتیب فعالیت سلولازی *Aspergillus niger MZM 89-a2* (H) ، *Penicillium decumbens ZHE 89-p3* (C) ، *Penicillium decumbens* MMH 89-p1 (D) می باشند. میزان فعالیت سلولازی این قارچ ها به ترتیب بدین قرار بود (U/g) : FPA ۳/۱۶۷۱، ۳/۵۷۴۰، ۳/۱۸۱۲ و Avicelase ۱/۶۶۰۵، ۰/۳۸۶۹ ، ۱/۱۴۵۱ و CMcase /۹۵۰ ۲، ۰/۲۶۴۴، ۰/۴۶۰۴.

## ۳-۳- نتایج بهینه سازی متغیرهای موثر بر تولید سلولاز توسط روش سطح پاسخ

مقادیر پاسخ به دست آمده از انجام آزمایش و همچنین مقادیر پاسخ پیش بینی شده توسط مدل در جدول ۳ نشان داده شده است. میزان فعالیت آنزیم در محدوده ۴/۳-۰/۷ (U/gds) متغیر بود.

**جدول ۳** مقادیر پاسخ به دست آمده از انجام آزمایش

| $X_1$ (°C) | $X_2$ (٪) | $X_3$ (mm) | FPA (U/g) مقادیر واقعی | FPA (U/g) مقادیر پیش بینی |
|---|---|---|---|---|
| ۲۵ | ۵۵ | ۰/۵ [a] | ۰/۸۲۸۶ | ۰/۷۵ |
| ۳۵ | ۵۵ | ۰/۵ [a] | ۰/۷۵۷۲ | ۱/۴۵ |
| ۲۵ | ۷۰ | ۰/۵ [a] | ۱/۰۲۶۲ | ۱/۲۸ |
| ۳۵ | ۷۰ | ۰/۵ [a] | ۰/۸۶۸۸ | ۰/۶۹ |
| ۲۵ | ۵۵ | ۱/۵ [c] | ۰/۳۹۵۶ | ۰/۶۹ |
| ۳۵ | ۵۵ | ۱/۵ [c] | ۰/۷۴۷۴ | ۰/۶۱ |
| ۲۵ | ۷۰ | ۱/۵ [c] | ۴/۱۵۳۷ | ۳/۵۸ |
| ۳۵ | ۷۰ | ۱/۵ [c] | ۲/۰۲۱۵ | ۲/۲۱ |
| ۲۵ | ۶۲/۵ | ۱ [b] | ۱/۰۴۸۸ | ۱/۱۶ |
| ۳۵ | ۶۲/۵ | ۱ [b] | ۱/۴۰۱۸ | ۰/۸۳ |
| ۳۰ | ۵۵ | ۱ [b] | ۴/۲۴۸۵ | ۳/۴۷ |
| ۳۰ | ۷۰ | ۱ [b] | ۴/۲۲۷۲ | ۴/۵۴ |
| ۳۰ | ۶۲/۵ | ۰/۵ [a] | ۴/۰۶۴۱ | ۴/۱۰ |
| ۳۰ | ۶۲/۵ | ۱/۵ [c] | ۳/۸۷۶۳ | ۳/۶۶ |
| ۳۰ | ۶۲/۵ | ۱ [b] | ۳/۲۴۶ | ۳/۶۶ |
| ۳۰ | ۶۲/۵ | ۱ [b] | ۴/۳۳۰۱ | ۳/۶۶ |
| ۳۰ | ۶۲/۵ | ۱ [b] | ۳/۲۷۷۶ | ۳/۶۶ |
| ۳۰ | ۶۲/۵ | ۱ [b] | ۲/۸۷۷۶ | ۳/۶۶ |

a= اندازه ذرات ۱ – ۰/۵ (mm)، b= اندازه ذرات ۱/۵– ۱ (mm)، c= اندازه ذرات ۲– ۱/۵ (mm).

معادله ۱ مدل عمومی چند جمله ای درجه دوم رابر اساس کد، برای تولید آنزیم FPA نشان می دهد.

معادله (۱)

$$\text{filterase} = +3.66 - 0.17A + 0.53B + 0.36C - 0.32AB - 0.19AC + 0.59BC - 2.67A^2 + 0.34B^2 + 0.073C^2$$

A، B و C به ترتیب، دما، رطوبت و اندازه ذرات می باشند. AB، AC و BC به ترتیب اثر متقابل دما و رطوبت، دما و



Archive of SID

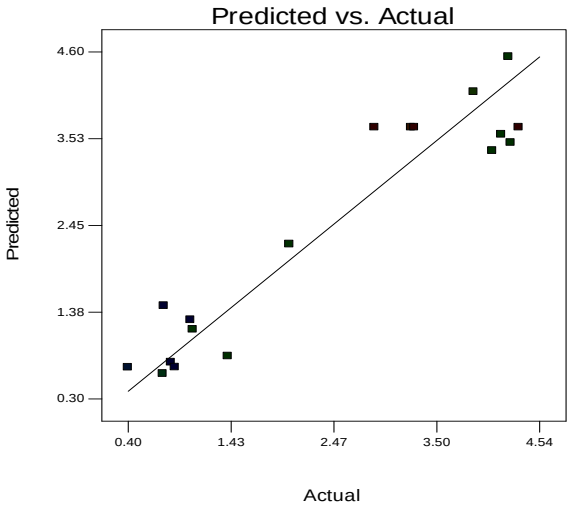
www.SID.ir

اندازه ذرات و رطوبت و اندازه ذرات می باشد. $A^2$، $B^2$ و $C^2$ به ترتیب اثر درجه دوم دما، رطوبت و اندازه ذرات می باشد.

بر اساس معادله بالا مشاهده می شود که، افزایش محتوای رطوبتی و اندازه ذرات باعث افزایش میزان فعالیت FPA می شود که در این بین محتوای رطوبتی نسبت به اندازه ذرات، حدودا دو برابر اثر گذارتر می باشد، در حالی که با افزایش دما میزان فعالیت FPA کاهش می یابد.

سطح معنی داری معادله ۱ به وسیله تجزیه واریانس (ANOVA) بررسی شد (جدول ۴). ANOVA از تجزیه آماری Fisher استفاده می کند. مقدار بالای عدد F (۷/۸۳) برای FPA دلالت بر معنی داری مدل است (P=۰/۰۰۰۱). همچنین مدل نهایی دارای عدم تطابق( Lack of (fit غیر معنی دار، ضریب تبیین $R^2$= ۰/۸۹ است که این بیانگر ضریب همبستگی خوب، مناسب و معنی دار بودن مدل است.

همچنین شکل ۱ نمودار داده های تجربی را در برابر پاسخ پیش بینی شده توسط مدل نشان می دهد. همان طور که مشاهده می شود داده های تجربی در نزدیکی خط رسم شده قرار گرفته اند که نشان دهنده این است که داده های پیش بینی شده توسط مدل به داده های به دست آمده از آزمایش (داده های تجربی) نزدیک تر هستند.




**شکل ۱** نمودار داده های تجربی در برابر داده های پیش بینی شده توسط مدل.

همان طور که از جدول ۴ مشخص است، در بین اثرات خطی اثرات متقابل رطوبت (B) و اندازه ذرات (C)، در سطح احتمال ۹۵٪ و در مورد اثرات درجه دوم، ($A^2$) در سطح احتمال ۹۹٪، معنی دار می باشد.

## ۴-۳- مقادیر پیش بینی شده توسط مدل درجه دوم برای متغیرها

مقادیر پیش بینی شده توسط نرم افزار Design Expert برای متغیرهای دما (A)، محتوای رطوبتی (B) و اندازه ذرات (C) به ترتیب $^{\circ}$C ۲۸/۴۹، ٪ ۶۶/۶۲ و ۲- ۱/۵ (mm) می باشد. در این حالت میزان فعالیت سلولاز ۴/۳۵ (U/gds) می باشد. برای تایید مدل، آزمایشی در شرایط مقادیر بهینه پیش بینی شده برای هر عامل انجام گرفت. میزان فعالیت آنزیم در شرایط آزمایش ۴/۴۲ (U/gds) شد. که مقایسه آن با مقدار پیش بینی شده، کارایی مدل ارائه شده را تایید می کند.

## ۵-۳- اثر متقابل محتوای رطوبتی و اندازه ذرات

در شکل ۲ نمودار سه بعدی مربوط به دو عامل محتوای رطوبتی و اندازه ذرات نشان داده شده است.

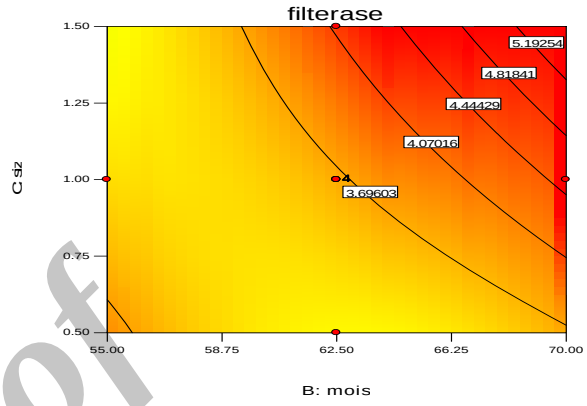
**جدول ۴** تجزیه واریانس نتایج آزمایش های بهینه سازی فعالیت FPA

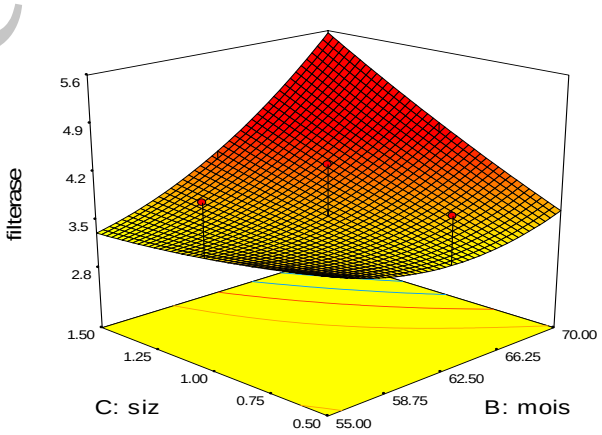
| | مجموع مربعات | درجه آزادی | میانگین مربع | F | P |
|---|---|---|---|---|---|
| مدل | ۳۵/۳۲ | ۹ | ۳/۹۲ | ۷/۸۳ | ۰/۰۰۰۱ |
| A | ۰/۲۷ | ۱ | ۰/۲۷ | ۰/۵۵ | ۰/۴۸۰۷ |
| B | ۲/۸۳ | ۱ | ۲/۸۳ | ۵/۶۴ | ۰/۴۸۰۷ |
| C | ۱/۳۳ | ۱ | ۱/۳۳ | ۲/۶۶ | ۰/۱۴۱۸ |
| AB | ۰/۸۳ | ۱ | ۰/۸۳ | ۱/۶۵ | ۰/۲۳۵۴ |
| AC | ۰/۳۰ | ۱ | ۰/۳۰ | ۰/۶۰ | ۰/۴۶۰۸ |
| BC | ۲/۷۹ | ۱ | ۲/۷۹ | ۵/۵۶ | ۰/۰۴۶۱ |
| $A^2$ | ۱۹/۳۴ | ۱ | ۱۹/۳۴ | ۳۸/۵۷ | ۰/۰۰۰۳ |
| $B^2$ | ۰/۳۲ | ۱ | ۰/۳۲ | ۰/۶۳ | ۰/۴۵۰۷ |
| $C^2$ | ۰/۰۱۵ | ۱ | ۰/۰۱۵ | ۰/۰۲۹ | ۰/۸۶۸۶ |
| باقی مانده | ۴/۰۱ | ۸ | ۰/۵۰ | | |
| عدم تطابق | ۰/۸۴ | ۵ | ۰/۵۷ | ۱/۴۵ | ۰/۴۰۳۰ |
| خطای خالص | ۱/۱۷ | ۳ | ۰/۳۹ | | |
| همبستگی کل | ۳۹/۳۳ | ۱۷ | | | |



Archive of SID
www.SID.ir

با افزایش میزان محتوای رطوبتی تا ٪ ۶۶/۶۲ و اندازه ذرات تا ۲-۱/۵ (mm) میزان FPA افزایش می یابد. همچنین این شکل تاییدی بر داده های جدول ۴ است که بیان می کند که اثر متقابل محتوای رطوبتی و اندازه ذرات در سطح ٪۹۵ معنی دار می باشد. در تحقیقی که توسط لطیفیان ارائه شد نیز نشان داده شد که بیشترین فعالیت سلولاز عمدتا در بیشترین سطح محتوای رطوبتی (٪۷۰) می باشد که این نتایج بسیار به نتایج گزارش شده توسط سلولازهای قارچی دیگر شباهت دارد [۱۶،۱۹،۲۰].




**شکل ۲** نمودار کنتور (الف) و سه بعدی (ب) اثر متقابل محتوای رطوبتی (B:mois) و اندازه ذرات (C:siz) بر میزان فعالیت FPA در شرایطی که دمای گرمخانه گذاری در نقطه مرکزی خود ثابت در نظر گرفته شده اند.

همچنین در سال ۲۰۰۹ اثر شرایط کشت روی فعالیت سلولاز به وسیله *Trichoderma reesei* رشد کرده روی سبوس برنج، به عنوان محیط کشت مورد ارزیابی قرار گرفت. یکی از شرایط کشت مورد تحقیق اندازه ذرات بود که اثر آن بر فعالیت Filter paperase (FPA) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که اندازه ذرات اثر معنی داری روی فعالیت سلولاز بر FPA داشت، در این تحقیق مشاهده شد که کاهش اندازه ذرات سوبسترا می تواند باعث کاهش درجه بسپاری شدن و حالت بلوری سوبسترا شود. همچنین نشان داده شد که کاهش اندازه ذرات تا میزان ۱-۱/۵ (mm) باعث افزایش میزان فعالیت سلولاز (FPA) می شود [۱۱]. اندازه ذرات به دلیل تعیین نسبت سطح به حجم ذرات در تخمیر حالت جامد عامل بسیار مهمی می باشد، زیرا در ابتدا سطح بیشتری از سوبسترا در دسترس ریزسازواره قرار می گیرد. سطح در دسترس سلولز بسیار مهم تر از مقدار سلولز می باشد. شایان ذکر است که در یک نسبت ثابت با افزایش نسبت سطح به حجم، اندازه ذره کاهش می یابد. همچنین اندازه ذرات، میزان فضای خالی که توسط هوا اشغال می شود را تعیین می کند. زیرا سرعت انتقال اکسیژن به فضای خالی، رشد ریزسازواره را تحت تاثیر قرار می دهد. در نتیجه ذرات کوچک تر رشد ریزسازواره را بیشتر تحریک می کند [۲۱].

## ۴- نتیجه گیری

در طی این تحقیق ۳ سویه بومی کشور که دارای فعالیت سلولازی مناسبی بودند از خاک جداسازی گردیده و بعد از تعیین هویت ژنتیکی (18S rRNA) نامگذاری گردیدند (*Aspergillus niger MZM 89-a2*، *Penicillium decumbens ZHE 89-p3*، *Penicillium MMH 89-p1*). نتایج بهینه سازی عددی *Aspergillus niger MZM 89-a2* نشان داد که به منظور تولید حداکثر آنزیم، دما (A)، محتوای رطوبتی (B) و اندازه ذرات (C) به ترتیب ˚C ۲۸/۴۹، ٪ ۶۶/۶۲ و ۲-۱/۵mm می باشد. برای تایید مدل، آزمایشی در شرایط مقادیر بهینه پیش بینی شده برای هر عامل انجام گرفت. میزان فعالیت آنزیم در شرایط آزمایش ۴/۴۲ (U/gds) شد. که مقایسه آن با مقدار پیش بینی شده، کارایی مدل ارائه شده را تایید می کند.

Archive of



www.SID.ir

## ۵- منابع


[1] Ragauskas, A. J., Williams, C. K., Davison, B. H., Britovsek, G., Cairney, J. and Eckert, C. (2006). The path forward for biofuels and biomaterials, Science. 311: 484-489.

[2] Chang, X., Minnan, L., Xiaobing, W., Huijuan, X., Zhangan, C. Fengzheng, Z., and Liangshu, X. (2006). Screening and characterization of the high-cellulase-producting strain *Aspergillus Glaucus* XC9. Biological China, 1: 35-40.

[3] Beguin, P. and Aubert, J.-P. (1994). The biological degradation of cellulose. FEMS Microbiology Review.13: 25-58.

[4] Ibrahim, A. S. S., and El-Diwany, A. I. (2007). Isolation and identification of new cellulases. Astrralian Journal of Basic and Applied Sciences, 1: 473-478

[5] Sanjeev, K. S., Krishna, L. K. and Hermeet, S. G. (2002). Enzymatic saccharification of pretreated sunflower stalks. Biomass Bioenergy, 23: 237-243.

[6] Lin, Y. and Tanaka, S. (2006). Ethanol fermentation from biomass resources: Current state and prospects. Application Microbiology Biotechnology. 69: 627-642.

[7] Percival Zhang, Y.H., Himmel, M.E. and Mielenz, J.R. (2006). Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. Biotechnology Advances 24; 452–481

[8] Ahmad, A., and Vermette, P. (2007). Culture-based strategies to enhance cellulose enzyme production from *Trichorma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions. Biochemical Engineering Journal, 40: 399-407.

[9] Kang, S. W., Park, Y.S., Lee, J. S., Hong, S. I. and Kim, S. W. (2004). Production of celluloses and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. Bioresource Technology, 91: 153-156.

[10] Latifian, M., Hamidi-Esfahani, Z. and Barzegar, M. (2006). Evaluation of culture conditions for cellulase production by two *Trichoderma reesei* mutants under Solid-state fermentation condition. Bioresource Technology, 98: 3634-3637.

[11] Rocky-Salimi, K., and Hamidi-Esfahani, Z. (2009). Evaluation of the effect of particle size, aeration rate and harvest time on the production of cellulose by *Trichorma reesei* QM9414 using response surface methodology. Food and Bioproducts processing, 88 : 61–66.

[12] Saremnezhad, S. Hamidi-Esfahani, Z., and Azizi, M. H. (2004). Cellulose Enzyme Production by Neurospora intermedia Under Solid State Fermentation System. Iranian Journal of Food science and Technology, 1: 33-40.

[13] Kader, A. J., Omar, O. and Feng, L. S. (1999). Isolation of cellulolytic fungy from the BARIO HIGHLANDS, SARAWAK. ASEAN review of Biodiversity and Enviromental Conservation (ARBEC).

[14] Mandels, M. and Weber, J. (1969). The production of cellulases and their applications. Advance Chemistry, 95: 391-414.

[15] Olsson, L., Christensen, T., Hansen, K. P. and Palmqvist, E. A. (2003). Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. Enzyme Micriboilogy Technology, 33: 612-619.

[16] Panagiotou, G., Kekos, D., Macris, B. J. and christakopoulos, P. (2003). Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. Industrial Crop Production, 18: 37-45.

[17] Ghose, T. K. (1987). Measurement Of cellulase activities. Pure and Application Chemistry. 59: 257-268.

[18] Theodore, K. and Panda, T. (1995). Application of response surface methodology to evaluate the influence of temperature and initial pH on the production of β-1,3-glucanase and carboxymethylcellulase from *Trichoderma harzianum*. Enzyme and Microbial Technology, 17: 1043-1049.

[19] Jecu, L. (2000). Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. Industrial Crops and Products, 11: 1-5.

[20] Kalogeris, E., Iniotak, F., Topakas, E., Christakopoulos, P., Kekos, D., and Macris, B. J.(2003). Performance of intermittent agitation rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw. Bioresource Technology, 86: 207-213.

[21] Krishna, C. (1999). Production of bacterial cellulases by solid state bioprocessing of banana wastes Bioresource Technology, 69: 231-239.




Archive of SID

www.SID.ir

# Isolation the cellulolitic microorganisms from soil and optimization FPA by suitable strain

**Mohammadizadeh, M.[1], Hamidi-Esfahani, Z.[2*], Abbasy, S.[2]**

1. M.Sc. student of Faculty of Agriculture, Food Science and Technology Department, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2. Associat Professor, Faculty of Agriculture, Food Science and Technology Department, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

**(Received: 89/11/6 Accepted: 90/8/16)**

In this research, we studied isolation of the cellulolitic fungi from the persimmon tree, grapevine, pomegranate tree and walnut soils. Among of them, persimmon soil was selected because of maximum cellulolitic fungi. Seven fungi werw isolated from persimmon soil, which three of them had suitable cellulose activity and they were identificated by 18S rRNA and named: *Aspergillus niger MZM 89-a2*, *Penicillium decumbens ZHE 89-p3, Penicillium decumbens MMH 89-p1*. Cellulase activities of these fungi were respectively (U/d): FPA 3.1671, 3.5740, 3.1812 and Avicelase 1.6605, 0.3869, 1.1451 and CMCase 2.950, 0.2644, 0.4604. Response surface activity (RSM) was studied to evaluate the effects of temperature, moisture content and particle size for FPA by *Aspergillus niger MZM 89-a2*. The optimum FPA was in temperature, moisture content and particle size respectively: 28.49℃, 66.62٪ and 1.5-2 (mm).

The maximum predicted FPA was 4.35(U/g) and obtained FPA under this condition was 4.42 (U/g), which indicates the efficacy of the model for prediction of FPA activity under different conditions of the medium.

**Key words:** Fungi, Soil, Cellulose, Isolation, Optimization, FPA.

[*] Corresponding Author E-mail address: Hamidy_z@modares.ac.ir



Archive of SID

www.SID.ir