Archive of SID

بهینه‌سازی تولید پکتیناز *پریفورموسپورا ایندیکا* از ضایعات چغندرقند به روش تاگوچی

پریسا فتحی رضایی*، سمیه کیانی، فرشته تقوی و صالح شهابی وند

ایران، مراغه، دانشگاه مراغه، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۹۷/۸/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۸/۱/۱۹

چکیده

پکتینازها بهعنوان یک گروه بزرگ از آنزیم‌ها، پکتین را به مولکول‌های ساده‌تر نظیر اسیدگالاکتورونیک تجزیه می‌کنند و به‌طورگسترده توسط بسیاری از میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند. امروزه ضایعات فراوان صنایع کشاورزی و فرآوری میوه شامل تفاله چغندرقند، سیب و مرکبات به‌عنوان منابع غنی از پکتین برای القاء تولید پکتیناز توسط بسیاری از میکروارگانیسم‌ها بکار برده می‌شوند. هدف این پروژه بهینه‌سازی تولید پکتیناز قارچ *پریفورموسپورا ایندیکا* از تفاله چغندرقند به روش طراحی آزمایش تاگوچی بود. *پریفورموسپورا ایندیکا* در محیط کشت کافر حاوی تفاله چغندرقند کشت داده شد، سپس میزان زیست‌توده و تولید اسپور قارچ، فعالیت آنزیمی و پروتئین محلول به مدت ده روز اندازه‌گیری گردید. براساس نتایج، بیشینه تولید زیست‌توده و آنزیم در روز ششم پس از تلقیح به‌ترتیب ۶/۱۲۵ گرم در لیتر و ۳/۸ واحد در میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. علاوه بر این اثر غلظت-های مختلف پارامترهایی مانند گلوکز و سولفات آمونیوم به تنهایی و نیز اثر متقابل آنها مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج، با افزایش غلظت آنها به تنهایی فعالیت آنزیمی روند افزایشی نشان داد اما اثر متقابل آنها با تفاله چغندرقند موجب کاهش فعالیت آنزیمی شد. فعالیت آنزیمی با روش تاگوچی به ۸/۳۵ واحد در میلی‌لیتر رسید که ۲/۵ برابر شرایط غیر بهینه بود. در مجموع تولید پکتیناز توسط *پریفورموسپورا ایندیکا* از تفاله چغندرقند به‌عنوان سوبسترای مناسب و ارزان قیمت علاوه بر ارزش اقتصادی، موجب کاهش آلودگی زیست محیطی نیز می‌شود.

واژه‌های کلیدی: *پریفورموسپورا ایندیکا*، پکتیناز، تفاله چغندرقند، ضایعات کشاورزی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۴۱-۳۷۲۷۳۰۶۰، پست الکترونیکی: parisafathirezaei@gmail.com

مقدمه

ضایعات کشاورزی به مقدار انبوهی در سراسر جهان تولید می‌شوند و حاوی مواد لیگنوسلولزی هستند که می‌توانند در تولید اسیدهای آلی، متابولیت‌های ثانویه، سوخت‌های فسیلی و تولید آنزیم‌ها استفاده شوند. هم‌چنین به‌علت محتوای پکتین بالا می‌توانند به‌عنوان سوبسترای قابل دسترس و ارزان قیمت برای تولید پکتیناز به‌کار روند. بنابراین استفاده از ضایعات کشاورزی علاوه بر کاهش هزینه‌های تولید، باعث کاهش آلودگی محیط زیست نیز خواهد شد (۱۹).

چغندرقند همراه با نیشکر منبع اصلی تولید قند در سراسر دنیا به‌شمار می‌رود و به‌طورگسترده در اروپا، شمال و جنوب آمریکا، آسیا و بخش‌هایی از شمال آفریقا کشت می‌شود. پس از استخراج قند، تفاله باقیمانده دارای مقدار قند ناچیزی است، اما به‌عنوان یک منبع فیبر و انرژی در دسترس می‌باشد. تفاله از ۲۸/۷ درصد پکتین، ۲۰ درصد سلولز، ۱۷/۵ درصد همی سلولز، ۹ درصد پروتئین، ۴/۴ درصد لیگنین، ۱/۲ درصد چربی، ۵/۱ درصد خاکستر تشکیل شده است (۳ و۳۳). از آنجائی‌که محتوای پکتین تفاله بالا است می‌تواند برای تولید میکروبی آنزیم‌های تجزیه‌کننده پکتین بکار برده شود. بای و همکاران از تفاله چغندرقند به‌عنوان ماده خام برای القای تولید پکتیناز توسط *Aspergillus niger* استفاده کرده‌اند لی و همکاران تفاله

www.SID.ir

Archive of SID

چغندر قند را به‌عنوان منبع کربن و همچنین القاءکننده تولید پکتیناز قلیایی خارج سلولی بوسیله *Bacillus gibsoni* تحت شرایط تخمیر جامد به‌کار بردند (۶). تفاله چغندر قند عمدتاً در تهیه خوراک دام، تولید گازهای زیستی، پروتئین تک سلولی و وانیلین کاربرد دارد. اخیرا از تفاله چغندرقند برای جذب مواد رنگی از آب استفاده شده است. استفاده از این مواد جانبی صنایع تولید قند، به‌عنوان پیش ماده‌ای ارزان قیمت و قابل دسترس برای تولید مواد با ارزش افزوده بالا، باعث کاهش آلودگی محیط زیست نیز خواهد شد (۴، ۵، ۱۲، ۲۲، ۳۰).

پکتینازها یا آنزیم‌های تجزیه‌کننده پکتین یک گروه ناهمگون از آنزیم‌ها هستند که مواد پکتیکی را هیدرولیز می‌کنند و عمدتا در گیاهان وجود دارند. آنزیم‌های تجزیه کننده پکتین به‌طورگسترده درگیاهان آلی و میکروارگانیسم-ها توزیع شده‌اند. پکتین هوموپلی‌ساکارید ساختاری واقع در تیغه میانی و دیواره نخستین گیاهان، یک سوم وزن خشک بافت گیاهی را تشکیل می‌دهد. پکتین شامل زنجیره‌های اسیدگالاکتورونیک با میزان استرهای متیل متفاوت می‌باشد. تخمین زده شده است که پکتینازهای میکروبی حدود ۲۵ درصد از کل فروش جهانی آنزیم‌های غذایی را به‌خود اختصاص داده‌اند. پکتینازهای میکروبی می‌توانند به‌وسیله ارگانیسم‌های زیادی نظیر باکتری‌ها، اکتینومیست‌ها، مخمرها و قارچ‌ها تولید شوند. پکتیناز یکی از مهمترین آنزیم‌های مورد استفاده در صنعت آبمیوه و سبزیجات برای افزایش میزان بازده می‌باشد (۳۰). کاربرد آنزیم‌های تجزیه‌کننده پکتین با توجه به در دسترس بودن و شرایط فیزیکی متفاوت است. در طول سالیان متمادی پکتینازها در بسیاری از فرآیندهای صنعتی مرسوم مانند نساجی، فرآوری الیاف گیاهی، چای و قهوه، استخراج روغن، تیمار فاضلاب‌های صنعتی حاوی مواد پکتیکی و غیره مورد استفاده قرار گرفته‌اند. همچنین استفاده از آنها در تخلیص ویروس‌های گیاهی و کاغذسازی نیز گزارش شده است. اولین کاربرد صنعتی پکتینازها در سال۱۹۳۰ توسط Kertesz گزارش شد (۲۹).

استخراج پلی گالاکتوروناز از منابع قارچی، به علت بازدهی بالای تولید، کاربرد فراوان دارد (۲). قارچ *پریفورموسپورا ایندیکا* (***Piriformospora indica***) از ریزوسفر خاک درختچه‌های چوبی DC (Swartz) *Prosopis juliflora* و *Zizyphus nummularia* در بیابان شنی راجستان هندوستان جدا شده است. قارچ به‌آسانی قابل کشت و فاقد میزبان اختصاصی بوده و در ریشه بسیاری ازگیاهان عمدتاً با حالت اندوفیت ساکن می‌شود (۳۲).

روش طراحی آزمایش تاگوچی روش پرکاربرد از روش-های بهینه‌سازی کسری از فاکتوریل است که اجرای آن در صنایع مختلف با موفقیت‌های زیادی همراه بوده‌است. در روش کسری از فاکتوریل که روش آماری نیز خوانده می-شود، تعدادی از ترکیب‌های ممکن بین متغیرها انتخاب شده و پس از انجام آزمایش‌ها با ارزیابی آماری پاسخ‌های بدست آمده، بهترین شرایط که ممکن است در بین حالت-های آزمایش شده نیز موجود نباشد، تعیین می‌شود. در روش تاگوچی متغیرها یا فاکتورها در یک آرایه متعامد سازماندهی می‌شوند. این روش از طراحی‌های کسری از فاکتوریل دو، سه و سطح ترکیبی استفاده می‌کند. روش تاگوچی می‌تواند به سرعت و با دقت اطلاعات فنی به طراحی و تولید کم هزینه، محصولات و فرآیندهای قابل اعتماد منجر شود. این روش شامل مطالعه سیستم توسط مجموعه‌ای از متغیرهای مستقل مورد علاقه است و همزمان عامل‌های زیاد دیگری را بهینه می‌نماید که اطلاعات زیادی تنها با یکسری از آزمایشات محدود به دست می‌آید (۱ و ۲۷).

در مطاله قبلی برای اولین بار تولید پکتیناز توسط قارچ *پریفورموسپورا ایندیکا* از پکتین خالص گزارش شد (۱۵)، برای اولین بار احتمال و بهینه‌سازی تولید پکتیناز از

www.SID.ir

Archive of SID

ضایعات چغندر قند توسط *پریفورموسپورا ایندیکا* در این تحقیق بررسی شده است.

مواد و روشها

تهیه پودر تفاله چغندرقند: تفاله چغندرقند ازکارخانه قند مغان به‌شکل مرطوب تهیه، در آون با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک، با آسیاب برقی پودر و سپس با مِش شماره ۳۵ (اندازه ذرات ۵۰۰ میکرومتر) غربالگری گردید. پودر آماده شده برای انجام ادامه آزمایش‌ها به دور از نور و رطوبت نگهداری شد.

میکروارگانیسم و شرایط محیط کشت: در این تحقیق، قارچ *پریفورموسپورا ایندیکا* (ATCC® 204458™) از گروه پاتولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس تهیه شد. جهت تکثیر این قارچ ابتدا محیط کشت جامد از محیط کشت تغییر یافته هیل–کافر (۱۶) به‌علاوه آگار ۰/۵ درصد تهیه و سپس در شرایط استریل قطعه‌ای به ابعاد ۱×۱ سانتی‌متر از محیط اولیه جدا و بر روی پلیت-های با قطر ۱۰ سانتی‌متر منتقل گردید. پلیت‌ها در انکوباتور با دمای ۲۹±۱ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. محیط کشت مایع، مشابه محیط کشت جامد بدون افزودن آگار تهیه و پس از تلقیح با ۵ درصد از محلول حاوی اسپور در انکوباتور شیکردار با دمای ۲۹±۱ درجه سانتی-گراد و دور ۲۰۰ rpm به‌مدت ده روز قرار داده شد که به-عنوان محیط پیش تولید نگهداری و مورد استفاده قرار گرفت.

برای تهیه یک لیتر محیط کشت کافر، ۱۰ گرم برلیتر پودر تفاله چغندرقند به محیط پایه افزوده و pH محیط کشت با پتاس ده نرمال به ۶/۵ رسانده شد. محیط‌های کشت بدون تفاله چغندرقند به‌عنوان کنترل تهیه و نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شدند. پس از رسیدن دمای نمونه‌ها به دمای ۵۰–۴۵ درجه سانتی‌گراد یک میلی‌لیتر از محلول ذخیره ویتامین فیلتر استریل شده به آنها اضافه شد (۱۶) و پس از تلقیح با ۵ درصد از محلول حاوی اسپور در انکوباتور شیکردار با دمای ۲۹±۱ درجه سانتی‌گراد و دور ۲۰۰ rpm به‌مدت ده روز قرار داده شدند. در ادامه جهت بررسی رشد قارچ و فعالیت پکتیناز یک روز در میان طی بازه زمانی ۱۰–۰ روز نمونه برداری انجام شد. در این تحقیق تمام آزمایش‌ها در ارلن‌های ۵۰ میلی لیتری حاوی ۲۰ میلی لیتر محیط کشت انجام شد.

بررسی میزان رشد قارچ

اندازه‌گیری وزن تر و خشک توده سلولی: در ادامه، بمنظور بررسی میزان رشد قارچ نمونه‌های با و بدون تفاله چغندرقند به‌صورت یک روز در میان طی بازه زمانی ۱۰–۰ روز پس از جداسازی توده سلولی از محیط کشت بوسیله کاغذ صافی واتمن شماره ۱، وزن تر با ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شد. در ادامه، توده‌های سلولی جدا شده در آون با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک و سپس توزین گردید. میزان بازده زیست توده ($Y_{X/S}$) و همچنین سرعت رشد ویژه (μ) طبق روابط مربوط محاسبه شدند (۱۸).

بررسی pH محیط کشت: به‌منظور بررسی تغییرات pH در طی بازه زمانی مورد نظر، pH محلول فیلتر شده با کاغذ صافی اندازه‌گیری شد.

شمارش اسپورهای قارچ: برای بررسی رشد قارچ، شمارش مستقیم اسپورهای گلابی شکل قارچ بر روی لام نئوبار انجام شد. بدین‌ترتیب که برای آزاد شدن اسپورهای انتهای هیف میکروویال‌های حاوی قارچ با استفاده از یک میله فلزی به‌هم زده شد و پس از ورتکس نمودن به مدت ۱۰ دقیقه، به اندازه حدود ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول با استفاده از لام نئوبار شمارش و تعداد اسپورها در یک میلی‌لیتر محاسبه گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

تهیه محلول رویی حاوی آنزیم: به‌منظور تعیین میزان پروتئین کل و سنجش فعالیت پکتیناز نمونه‌های مورد نظر، محلول فیلتر شده با کاغذ صافی در سانتریفیوژ با دور rcf ۱۲۸۸۰ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند.

تعیین غلظت پروتئین کل: میزان پروتئین کل نمونه‌ها در بازه زمانی ۱۰-۰ روز با روش بردفورد اندازه‌گیری شد (۷). غلظت‌های متفاوت سرم آلبومین گاوی (۰و ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸، ۱ و ۱/۲ میلی گرم در میلی لیتر) بعنوان نمودار استاندارد مورد استفاده قرار گرفت. میزان ۲۵ میکرولیتر از محلول آنزیمی با ۷۵۰ میکرولیتر معرف بردفورد (1X) مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر بوسیله اسپکتروفتومتر قرائت شد.

سنجش فعالیت آنزیم پکتیناز: جهت تعیین میزان و زمان بهینه تولید آنزیم پکتیناز نمونه‌های موجود در انکوباتور در بازه زمانی ۱۰-۰ روز از طریق سنجش فعالیت آنزیم به روش DNS انجام شد (۱۵). غلظت‌های متفاوت اسید گالاکتورونیک (۵، ۴، ۳، ۲، ۱ میلی گرم در میلی لیتر) بعنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور ۲۵ میکرولیتر از محلول رویی با ۲۵ میکرولیتر از پکتین ۱ درصد (محلول در بافر فسفات سدیم با pH ۷/۵) ترکیب و در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه گرماگذاری شد. پس از طی مدت زمان مذکور، به میزان ۱۲۵ میکرولیتر از محلول DNS به میکروویال‌ها افزوده و در بن ماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شدند. پس از خنک شدن نمونه‌ها، با افزودن ۱۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر به ۱۴۲۵ میلی‌لیتر رسانده و میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۳۰ نانومتر بوسیله دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. میزان فعالیت آنزیم برحسب واحد (U) مقدار آنزیمی که تشکیل یک میکرومول اسیدگالاکتورونیک را در مدت زمان یک دقیقه تحت شرایط آزمایش آزاد می‌کند، بیان شد (رابطه ۱) (۲۰).

(رابطه ۱)

$$\text{Enzyme activity} = \frac{\text{ES-EB-SB}}{\text{slope}}\ \text{mg/ml} \times \frac{\text{Supernatant (µl)}}{\text{Final volume (µl)}} \times \frac{1}{\text{t (min)}} \times \text{Dilution factor} \times \frac{1}{\text{MW GalA}}$$

ES= آنزیم و سوبسترا EB= بلانک آنزیم SB= سوبسترا بلانک GalA= وزن مولکولی اسید گالاکتورونیک

slope= شیب نمودار استاندارد اسید گالاکتورونیک

بهینه‌سازی تولید آنزیم پکتیناز: در این مطالعه از روش بهینه‌سازی، یک متغیر در یک زمان، طراحی آزمایش تاگوچی استفاده شد.

بررسی اثر غلظت گلوکز: برای بررسی اثر غلظت گلوکز به‌عنوان منبع کربنی بر رشد قارچ و تولید پکتیناز، به محیط کشت کافر، گلوکز با غلظت‌های (۱۰-۸-۶-۴-۲-۰ درصد) افزوده و از محیط‌های کشت بدون تفاله هم به‌عنوان نمونه‌های کنترل استفاده شد. نمونه‌های تهیه شده، پس از تلقیح اسپور قارچ، درون انکوباتور شیکردار با دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد و با دور گردش ۲۰۰ rpm به‌مدت ۶ روز قرار داده شدند. پس از طی این بازه زمانی نمونه‌ها مورد ارزیابی قرارگرفتند.

بررسی اثر سولفات آمونیوم: به‌منظور بررسی اثر سولفات آمونیوم به‌عنوان منبع نیتروژنی، بر رشد قارچ و تولید آنزیم، به محیط‌کشت کافر، سولفات آمونیوم با غلظت‌های (۰/۵-۰/۴-۰/۳-۰/۲-۰/۱ درصد) اضافه گردید. نمونه‌های تهیه شده، پس از تلقیح اسپور قارچ، درون انکوباتور شیکردار با دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد و با دور گردش۲۰۰ rpm به-

www.SID.ir

Archive of SID

مدت ۶ روز قرار داده شدند. پس از طی این بازه زمانی نمونه‌ها مورد ارزیابی قرارگرفتند.

بهینه‌سازی به روش تاگوچی: بهینه‌سازی به روش تاگوچی با استفاده از نرم افزار Qualitek-4 انجام گرفت. بر اساس عوامل و سطوح تعیین شده ۹ آزمایش بوسیله نرم افزار طراحی و سپس داده‌های حاصل از اجرای آزمایش‌ها (آرایه‌ها) برای تجزیه و تحلیل و تعیین سطوح بهینه به نرم افزار وارد شد. در بررسی حاضر سه عامل اصلی تفاله چغندرقند، گلوکز و سولفات آمونیوم در سه سطح مختلف تعیین شدند. آرایه‌های پیشنهاد شده بوسیله نرم افزار در جدول۱ آورده شده است.

براساس این سطوح، ۹ آرایه پیشنهادی نرم افزار در جدول ۲ آمده است. در این جدول سطوح با اعداد یک تا سه مشخص می‌شود که مقادیر واقعی آن‌ها در جدول نشان داده شده است.

جدول ۱- عوامل و سطوح منتخب در طراحی آزمایش تاگوچی.

عامل	سطح ۱	سطح ۲	سطح ۳
گلوکز	۴۰	۶۰	۸۰
سولفات آمونیوم	۲	۴	۶
تفاله چغندرقند	۵	۱۰	۱۵

مقادیر بر حسب گرم بر لیتر می‌باشند.

بمنظور انجام آزمایش‌های پیشنهادی محیط کشت طبق جدول فوق تهیه، استریل، تلقیح و در انکوباتور شیکردار در دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد با دورگردش ۲۰۰ rpm به مدت ۶ روز قرار داده شدند. داده‌های حاصل از سنجش جهت تجزیه وتحلیل به نرم افزار وارد شد تا نرم افزار سطوح بهینه را پیشنهاد دهد.

جدول ۲ – آرایه‌های پیشنهادی توسط نرم افزار Qualitek-4.

شماره آزمایش	گلوکز	سولفات آمونیوم	تفاله چغندرقند
۱	۴۰	۲	۵
۲	۴۰	۴	۱۰
۳	۴۰	۶	۱۵
۴	۶۰	۲	۱۰
۵	**۶۰**	**۴**	**۱۵**
۶	۶۰	۶	۵
۷	۸۰	۲	۱۵
۸	۸۰	۲	۱۰
۹	۸۰	۶	۱۰

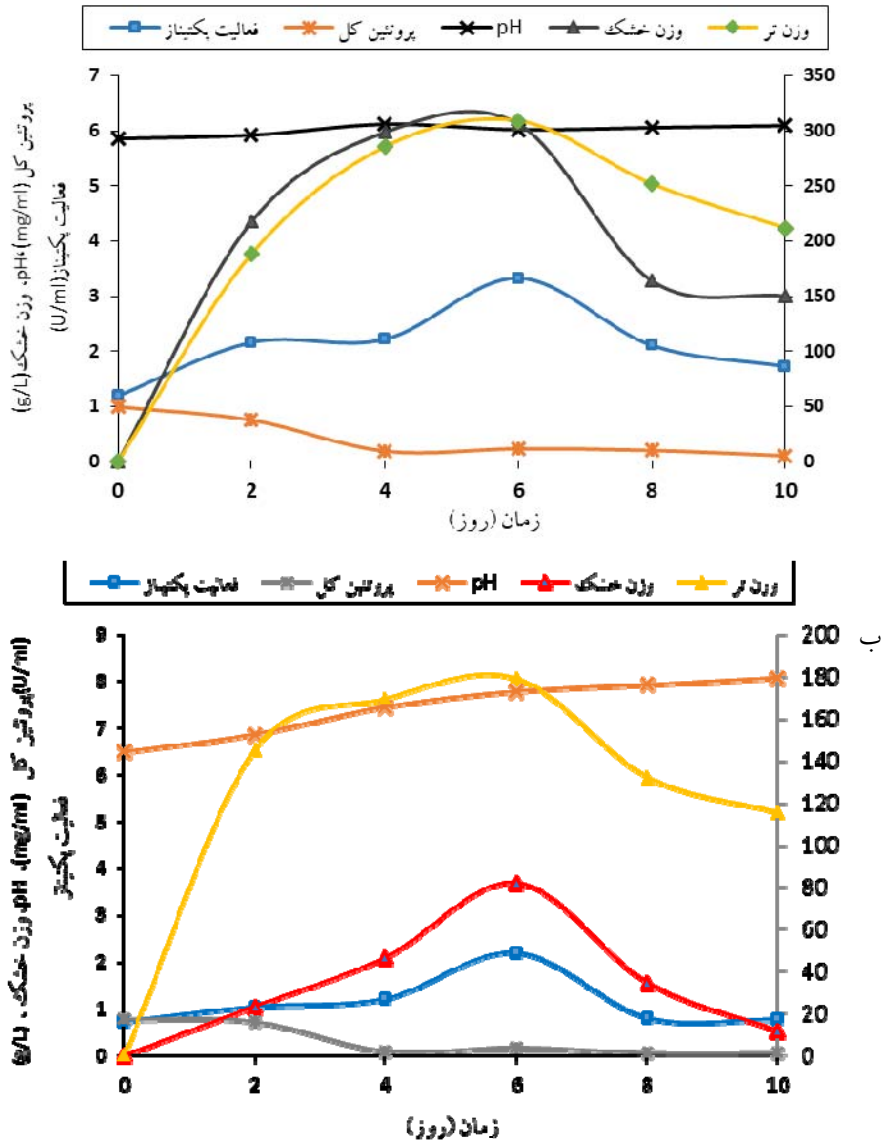
مقادیر برحسب گرم در لیتر می‌باشند.

نتایج

بررسی میزان رشد قارچ *P. indica* : با توجه به نتایج بدست آمده، میزان رشد قارچ *P.indica* براساس وزن تر در محیط کشت دارای تفاله چغندرقند در مقایسه با محیط کشت بدون تفاله چغندر قند دارای بیشترین مقدار بود. در هر دو نوع محیط بیشترین میزان رشد در روز ششم پس از تلقیح مشاهده شد. براساس یافته‌ها، میزان رشد براساس وزن خشک قارچ *P.indica* در محیط کشت حاوی تفاله بیشتر از رشد آن در محیط فاقد تفاله بود. همچنین بیشترین میزان رشد قارچ در هر دو محیط در روز ششم پس از تلقیح مشاهده شد (جدول ۳ و شکل ۱).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- نمایه زمانی پروفایل *P. Indica* در محیط کشت کافر با تفاله چغندرقند (الف) و بدون تفاله چغندرقند (ب). داده های نمایش داده شده میانگین داده های حاصل از حداقل از سه بار آزمایش مجزا می‌باشد.

جدول ۳ مقایسه ویژگی‌های رشد قارچ *P.indica* در محیط‌های کشت کافر حاوی و فاقد تفاله.

محیط کشت	حداکثر وزن خشک (g/L)	بازده زیست توده $Y_{X/S}$ (g g^{-1})	سرعت رشد ویژه μ (d^{-1})	زمان رسیدن به حداکثر رشد (روز)	زمان رسیدن به حداکثر مقدار اسپور(روز)
واجد تفاله	۶/۱۲۵	۰/۶۱	۰/۳۰	۶	۸
فاقد تفاله	۳/۷	–	–	۶	۱۰

تعیین تعداد اسپورهای قارچ: تحت شرایط، اندازه تلقیح ۵ درصد، سرعت همزنی rpm ۲۰۰، حجم کاری ۳۰ درصد، pH اولیه ۶/۵، دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، بیشینه وزن خشک توده سلولی پس از گذشت ۵ روز بدست آمده است. اسپورزایی پس از ۶ روز شروع شده و بیشینه مقدار تولید اسپور بعد از ۸ روز بدست آمد. در این مطالعه، تعداد

www.SID.ir

Archive of SID

اسپورهای موجود در محیط‌های حاوی قارچ در طی بازه زمانی معین شمارش گردید. براساس بررسی‌های انجام شده، اسپورها در محیط حاوی تفاله در روز ششم و در محیط فاقد تفاله در روز هشتم مشاهده شد و در روز دهم به حداکثر مقدار رسید. تعداد اسپورهای مشاهده شده در حجم یک میلی لیتر از محیط کشت حاوی ۱ درصد تفاله و در محیط فاقد تفاله در جدول ۴ نشان داده شده است.

جدول ۴ – تعداد اسپورهای موجود در یک میلی لیتر محیط کشت.

روز	ششم	هشتم	دهم
محیط دارای تفاله	$۰/۷\times۱۰^{۷}$	$۱/۲\times۱۰^{۷}$	$۱/۷\times۱۰^{۷}$
محیط فاقد تفاله	–	$۱/۱\times۱۰^{۷}$	$۱/۵\times۱۰^{۷}$

بررسی pH محیط کشت: براساس بررسی‌های انجام شده، میزان pH محیط تا روز ششم در محیط حاوی تفاله روند کاهشی داشت. اما در محیط فاقد تفاله، تغییرات pH تا پایان بازه زمانی مورد مطالعه روند صعودی مشاهده شد (شکل ۱).

تعیین پروتئین محلول کل: میزان غلظت پروتئین کل محلول با استفاده از منحنی استاندارد سرم آلبومین-گاوی (BSA) تعیین شد. براساس نتایج بدست آمده، بیشترین میزان تولید پروتئین در محیط واجد و فاقد تفاله در روز ششم پس از تلقیح مشاهده شد. نمونه‌برداری به‌صورت یک روز در میان در بازه زمانی۱۰ روزه و با سه تکرار انجام شد (شکل ۱).

سنجش فعالیت آنزیم پکتیناز: تولید آنزیم پکتیناز، با استفاده از روش میلر سنجش شد. با توجه به نتایج بدست آمده، تولید آنزیم و فعالیت در هر دو نوع محیط کشت در روز ششم از تلقیح بیشینه مقدار را نشان داد (شکل ۱). میزان فعالیت آنزیم در محیط کشت حاوی تفاله تقریبا ۱/۵ برابر محیط فاقد تفاله بود.

اثرمنبع کربن (گلوکز) بر رشد قارچ و تولید پکتیناز: در تحقیق حاضر، گلوکز به‌عنوان منبع کربنی اضافه به محیط کشت حاوی تفاله چغندرقند اضافه و از محیط بدون تفاله و با گلوکز هم به‌عنوان کنترل استفاده شد. بر اساس نتایج بدست آمده گلوکز با غلظت ۶ درصد باعث بیشینه تولید پکتیناز در هر دو نوع محیط شد به‌طوری‌که میزان تولید آنزیم در محیط حاوی تفاله ۳/۶۶ برابر نسبت به محیط فاقد تفاله و ۱/۴۵ برابر نسبت به محیط غیر بهینه افزایش داشت (شکل ۲). مقایسه ویژگی‌های رشدی قارچ در محیط با تفاله وگلوکز و در محیط بدون تفاله با گلوکز در جدول ۵ آورده شده است.

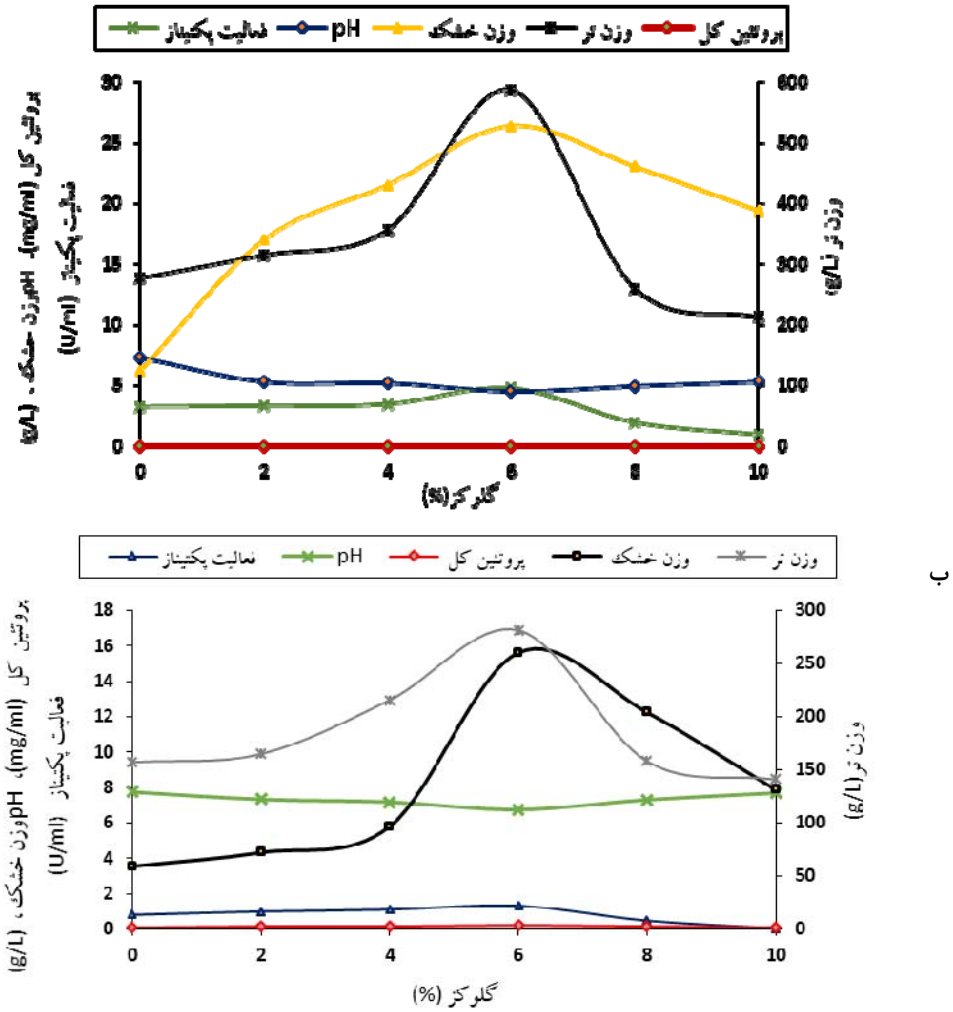
جدول۵ – مقایسه ویژگی‌های رشدی قارچ در محیط کشت حاوی گلوکز.

محیط کشت	حداکثر وزن خشک (g/L)	بازده زیست توده $Y_{X/S}$ (g g^{-1})	سرعت رشد ویژه μ (d^{-1})
تفاله + گلوکز	۲۶/۴۵	۰/۴۴	۰/۵۴
گلوکز	۱۵/۶۲۵	۰/۲۶	۰/۴۵

www.SID.ir

Archive of SID

اثر سولفات آمونیوم بر رشد قارچ و تولید پکتیناز: در این مطالعه علاوه بر اینکه محیط کافر دارای سه منبع نیتروژنی آلی شامل عصاره مخمر، پپتون و کازئین هیدرولیزات می‌باشد از منبع نیتروژنی غیرآلی سولفات آمونیوم نیز بمنظور تحریک و القای رشد و افزایش تولید آنزیم استفاده شد (شکل۳). مقایسه ویژگی‌های رشدی قارچ در محیط با تفاله و سولفات آمونیوم و در محیط بدون تفاله با سولفات آمونیوم در جدول ۶ آورده شده است.

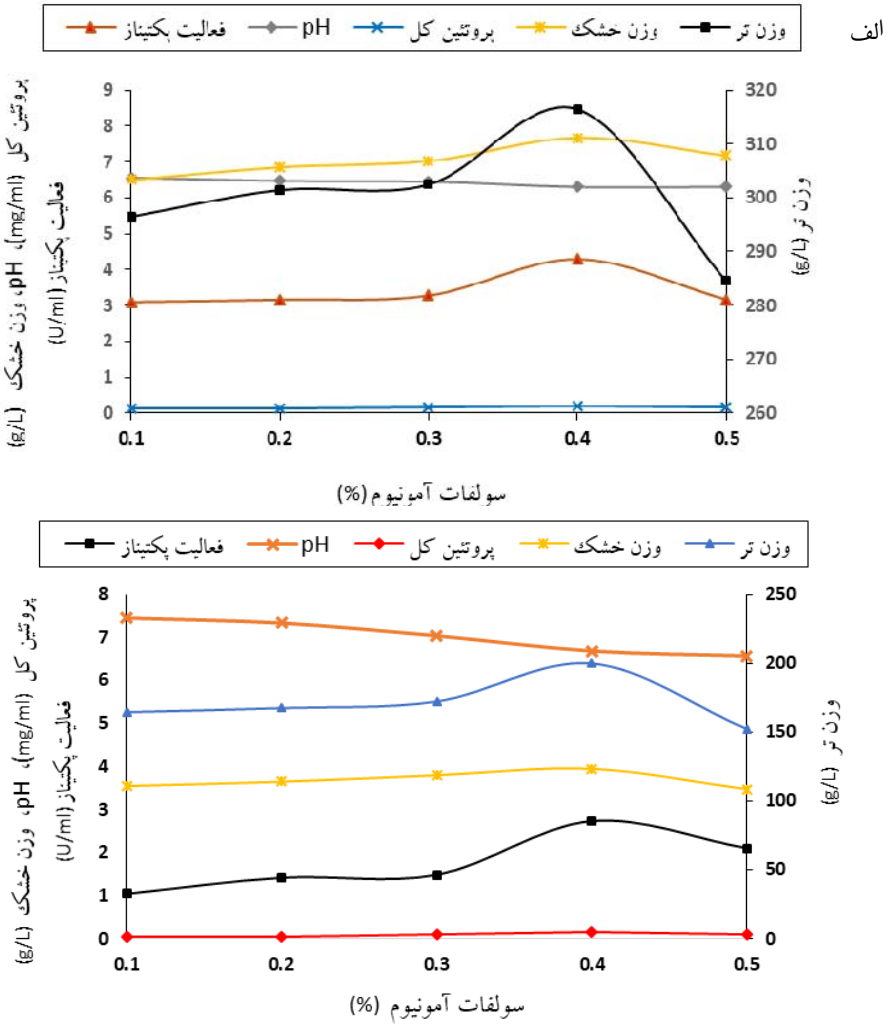


شکل۲ اثرگلوکز بر رشد و تولید پکتیناز در محیط واجد تفاله (الف) و فاقد تفاله (ب) در روز ششم. داده های نمایش داده شده میانگین داده های حاصل از حداقل از سه بار آزمایش مجزا می‌باشد.

بهینه‌سازی تولید آنزیم پکتیناز در محیط حاوی تفاله چغندرقند به روش تاگوچی: با استفاده از روش تاگوچی و نرم‌افزار Qualitek-4 بهینه‌سازی تولید آنزیم پکتیناز در محیط حاوی تفاله چغندرقند توسط *پریفورموسپورا ایندیکا* انجام گرفت. نتایج ۹ آزمایش طراحی شده با سطوح مختلف بوسیله نرم افزار برای عوامل تفاله چغندرقند، گلوکز و سولفات آمونیوم در شکل ۴ نشان داده شده است. بیشینه میزان تولید آنزیم در آزمایش شماره ۵ (گلوکز ۶۰ گرم در لیتر، سولفات آمونیوم ۴ گرم در لیتر و تفاله چغندر قند ۱۵ گرم در لیتر) مشاهده شد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳ – اثر سولفات آمونیوم بر رشد و تولید پکتیناز در محیط واجد تفاله (الف) و فاقد تفاله (ب) در روز ششم. داده های نمایش داده شده میانگین داده های حاصل از حداقل از سه بار آزمایش مجزا می‌باشد.

جدول ۶ – مقایسه ویژگی‌های رشدی قارچ در محیط کشت حاوی سولفات آمونیوم.

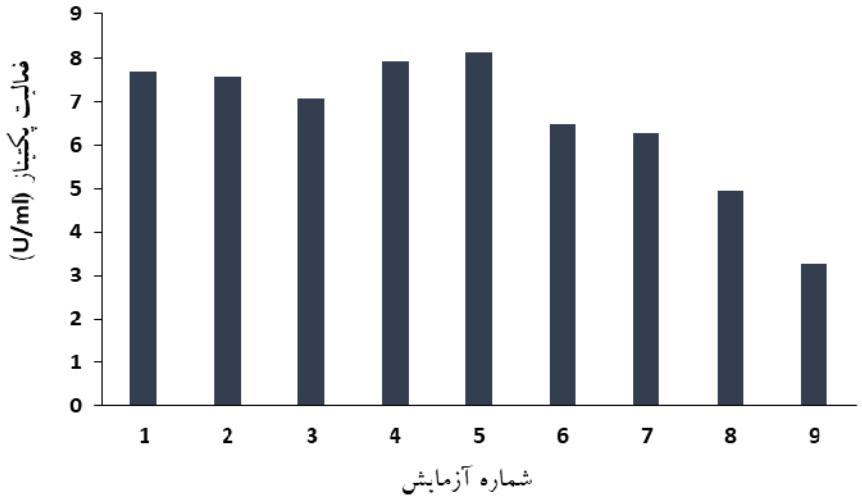
محیط کشت	حداکثر وزن خشک (g/L)	بازده زیست توده $Y_{X/S}$ (g g^{-1})	سرعت رشد ویژه μ (d^{-1})
تفاله + سولفات آمونیوم	۷/۶۷۵	۰/۵۴	۰/۶۱
سولفات آمونیوم	۳/۹۵	۰/۲۸	۱/۲۷

چغندرقند و گلوکز با افزایش سطح، تاثیر آنها در تولید پکتیناز نیز افزایش می‌یابد. در مورد عامل سولفات آمونیوم کاهش سطح اثر افزایشی بر روند فعالیت پکتیناز دارد.

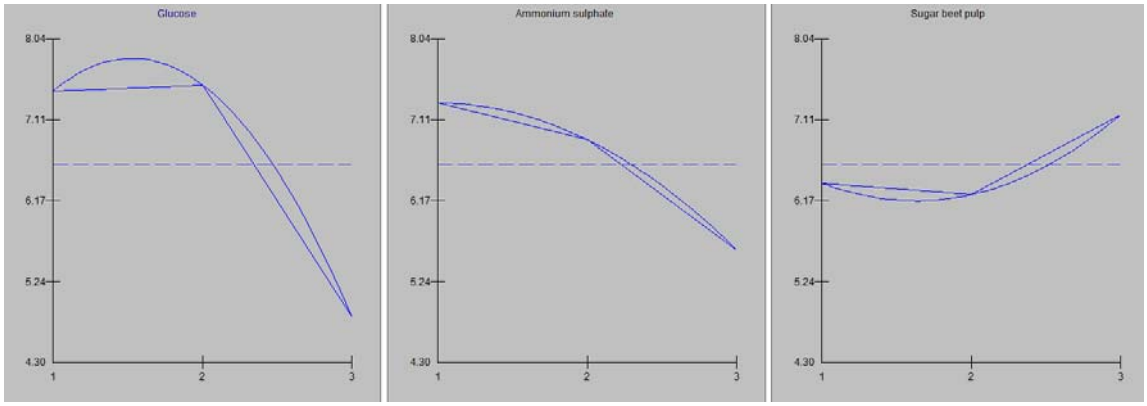
در بخش دیگری از تجزیه وتحلیل داده‌ها توسط نرم افزار، تاثیر برهمکنش عوامل منتخب انجام شد که نتایج آنها در جدول ۷ آورده شده است.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴- نتایج بدست آمده از روش تاگوچی در محیط حاوی تفاله چغندر قند برای بهینه‌سازی تولید آنزیم پکتیناز *پریفورموسپورا ایندیکا*. داده های نمایش داده شده میانگین داده های حاصل از حداقل از سه بار آزمایش مجزا می‌باشد.



شکل ۵ تاثیر عوامل تفاله چغندرقند، گلوکز و سولفات آمونیوم بر تولید پکتیناز *پریفورموسپورا ایندیکا*.

جدول ۷ – تاثیر برهمکنش عوامل منتخب (تفاله چغندر قند، گلوکز و سولفات آمونیوم) برتولید پکتیناز توسط *پریفورموسپورا ایندیکا*.

شماره	عوامل برهمکنش دهنده	ستون‌ها	درصد اهمیت
۱	سولفات آمونیوم × تفاله چغندرقند	۳×۲	۲۴/۵۳
۲	تفاله چغندرقند × گلوکز	۳×۱	۱۶/۲
۳	گلوکز × سولفات آمونیوم	۲×۱	۳/۶۹

www.SID.ir

Archive of SID

در ادامه تجزیه تحلیل آماری داده‌ها، درصد اهمیت هریک از عوامل منتخب در جدول ۸ به صورت جداگانه آورده شده است.

جدول ۸ –درصد اهمیت عوامل در تولید پکتیناز توسط *پریفورموسپورا ایندیکا*.

عامل	درصد اهمیت
گلوکز	۶۷/۲۶۴
سولفات آمونیوم	۲۱/۵۵۶
تفاله چغندرقند	۵/۹۴

همانطورکه در جدول ۸ مشاهده می‌شود گلوکز به‌عنوان منبع کربنی دارای بیشترین تأثیر بر تولید پکتیناز می‌باشد. اثرگذاری سولفات آمونیوم به‌عنوان منبع نیتروژنی غیرآلی به‌میزان ۲۱/۵۵۶ درصد در درجه دوم بوده و سپس تفاله چغندرقند با اثرگذاری ۵/۹۴ درصد در القاء تولید پکتیناز در درجه بعدی قرار می‌گیرد. برطبق این نتایج می‌توان گفت علاوه بر اهمیت عوامل به‌طور انفرادی بر تولید پکتیناز، برهمکنش بین عوامل در تولید پکتیناز نیز از اهمیت زیادی برخوردار است. بنابراین طبق جدول ۷ برهمکنش بین سولفات آمونیوم و تفاله چغندرقند بیشترین تأثیر را در تولید پکتیناز دارا می‌باشد. نرم افزار همچنین آزمایشی را به‌عنوان آزمایش بهینه پیشنهاد می‌دهد که با انجام آن می‌توان بیشترین تولید را بدست آورد.

جدول ۹ – شرایط بهینه پیشنهادی توسط نرم افزار Qualitek-4.

عامل	توصیف سطح	سطح	سهم
گلوکز	۶۰	۲	۰/۹۱۴
سولفات آمونیوم	۴	۱	۰/۷۰۵
تفاله چغندرقند	۱۵	۳	۰/۵۶۶
نتیجه مورد انتظار در شرایط بهینه (واحد بر میلی لیتر)			۸/۷۸

طبق نتایج بدست آمده، مقدار پکتیناز تولیدی به روش تاگوچی ۸/۳۵ واحد بر میلی لیترتقریباً حدود ۲/۵ برابر بیشتر از شرایط غیر بهینه می‌باشد. براساس سطوح پیشنهادی بوسیله نرم افزار آزمایش تائیدی انجام شد و مقدار آنزیم تولید شده مورد سنجش قرار گرفت. با انجام سطوح پیشنهادی میزان فعالیت پکتینازی به ۸/۴۵ واحد در میلی‌لیتر رسید (جدول ۹).

بحث

براساس یافته‌ها، میزان رشد بر اساس وزن خشک قارچ *P.indica* در محیط کشت حاوی تفاله بیشتر از رشد آن در محیط فاقد تفاله بود. همچنین بیشترین میزان رشد قارچ در هر دو محیط در روز ششم پس از تلقیح مشاهده شد. کومار و همکاران (۲۰۱۱)، نیز بیشترین میزان رشد قارچ را در محیط کشت کافر در روز ششم گزارش کردند (۱۸).

در مطالعه کومار و همکاران با استفاده از پوسته سویا در محیط کشت کافر به عنوان محصول جانبی، میزان بیشتری از اسپور *پریفورموسپورا ایندیکا* تولید شد که به فرض آنها با مصرف آهسته منابع کربن و نیتروژن موجود در محیط کشت و دسترسی مداوم به این منابع، زمان رسیدن به حداکثر میزان اسپورزایی کاهش می‌یابد (۱۸). در تحقیق حاضر از تفاله چغندرقند در محیط کشت کافر استفاده شد. زمان شروع اسپورزایی قارچ در روز ششم و بیشینه مقدار اسپورزایی در روز هشتم تعیین شد.

دلیل احتمالی کاهش pH و اسیدی شدن محیط می‌تواند با افزایش رشد قارچ و تولید اسید گالاکتورونیک از پکتین تفاله مرتبط باشد. بنابراین پس از نقطه اوج رشد، به‌علت کاهش رشد و متابولیسم، میزان pH روندی صعودی نشان می‌دهد و یا به‌علت تغییر در فرایند متابولیتی قارچ و یا تولید محصولات خنثی‌کننده باشد. همچنین افزایش pH همراه با بازی شدن محیط می‌تواند با آزاد شدن آمونیاک از متابولیسم پروتئین مرتبط باشد. احتمال دیگر می‌تواند به‌علت واکنش‌های متابولیکی که منجر به جذب نیترات از محیط کشت و یا متابولیسم اسیدهای آلی باشد (۱۵).

www.SID.ir

Archive of SID

با توجه به این‌که میزان رشد زیست‌توده هم در روز ششم از تلقیح می‌باشد می‌توان گفت که افزایش رشد با افزایش تولید پروتئین توأم شده است. میزان بالای پروتئین موجود در محیط کشت در شروع بازه زمانی رشد به‌علت رشد ناکافی میکروارگانیسم و عدم مصرف پروتئین موجود در محیط کشت می‌باشد.

با توجه به نتایج بدست آمده، تولید آنزیم و فعالیت در هر دو نوع محیط کشت در روز ششم از تلقیح بیشینه مقدار را نشان داد. کاهش تولید آنزیم پس از نقطه اوج می‌تواند به‌علت مصرف ترکیب اصلی یا تولید و فعال شدن مهارکننده‌های بیوسنتز آنزیم مرتبط باشد. بای و همکاران (۲۰۰۴)، با استفاده از تفاله چغندرقند برای القاء تولید پکتیناز توسط قارچ *Aspergillus niger* بیشترین میزان فعالیت پکتینازی را بعد از چهار روز گزارش نمودند (۶). گلدیال و همکاران در سال ۱۹۸۱، گزارش کرده‌اندکه زمان انکوباسیون به سرعت رشد میکروارگانیسم و الگوی تولید آنزیم بستگی دارد و بیشینه تولید آنزیم‌های پکتیکی از کپک‌ها بین ۶-۱ روز متغیر است (۱۴). در تحقیقی راماچاندرا و همکاران در سال ۲۰۰۳، به بررسی تولید و تخلیص پکتیناز با استفاده از تفاله چغندرقند بوسیله قارچ *Mucor flavus* پرداختند، تولید پکتیناز در این بررسی در روز پنجم بیشترین مقدار را نشان داد (۱۱). اولسان و همکاران در سال ۲۰۰۳، در مطالعه‌ای با استفاده از تفاله چغندرقند بوسیله *Trichoderma reesei* Rut C-30 به روش تخمیر جامد پکتیناز تولیدکردند. درطی دوره کشت ۶ روزه، محتوای پروتئین در روز سوم به میزان ۰/۴۳گرم برلیتر رسید که همزمان با بیشترین میزان اسپورزایی و همچنین بیشترین فعالیت پکتیناز (۰/۸۱ واحد بر میلی لیتر) بود (۲۳). راموس و همکاران در سال ۲۰۱۰، بالاترین میزان فعالیت پکتینازی قارچ *Colletotrichum truncatum* در محیط کشت مایع حاوی پکتین گزارش کردندکه متعاقباً مقدار زیست‌توده هم بیشترین مقدار را داشت (۲۶). تیم پژوهشی محمد و همکاران در سال ۲۰۰۲، با هدف تولید پکتیناز جدید بوسیله *Trichoderma reesei* با استفاده از مدل‌های مختلف پکتین در میزان درجه متیلاسیون و استیلاسیون، تفاله چغندرقند و لیموترش مطالعه‌ای را انجام دادند. براساس نتایج بدست آمده، بیشترین مقدار تولید پکتیناز با استفاده از پکتین تفاله چغندرقند به‌عنوان سوبسترا بوده است (۲۱). در تحقیق حاضر، از تفاله چغندرقند برای القای تولید پکتیناز بوسیله *Piriformospora indica* استفاده شد. نتایج بدست آمده نشان داد که بیشینه مقدار تولید پکتیناز، میزان اسپورزایی، محتوای پروتئین کل و مقدار بیشینه زیست توده به طور همزمان در روز ششم از دوره کشت می‌باشد (شکل ۱).

به‌طور کلی رشد میکروارگانیسم و تولید پکتیناز به نوع سویه و ترکیب محیط کشت بستگی دارد. استفاده از منابع کربنی و نیتروژنی در ترکیب با ضایعات کشاورزی باعث افزایش تولید پکتیناز می‌شود. نوع و غلظت موادکربنی و نیتروژنی در ترکیب محیط کشت حائز اهمیت است. در این تحقیق بهینه‌سازی غلظت این ترکیبات درآزمایش‌های اولیه با روش بهینه‌سازی یک متغیر در یک زمان برای افزایش تولید پکتیناز انجام شد. از سطوح بهینه شده در روش تاگوچی استفاده گردید.

در تحقیق حاضر، گلوکز به‌عنوان منبع کربنی به محیط کشت حاوی تفاله چغندرقند اضافه و از محیط بدون تفاله و با گلوکز هم به‌عنوان کنترل استفاده شد. بر اساس نتایج بدست آمده گلوکز با غلظت ۶ درصد باعث بیشینه تولید پکتیناز در هر دو نوع محیط شد. به‌طوری‌که میزان تولید آنزیم در محیط حاوی تفاله ۳/۶۶ برابر نسبت به محیط فاقد تفاله و ۱/۴۵ برابر نسبت به محیط غیر بهینه افزایش داشت (شکل ۲). مقایسه ویژگی‌های رشدی قارچ در محیط با تفاله وگلوکز و در محیط بدون تفاله با گلوکز در جدول ۵ آمده است.

گلوکز یک منبع مناسب کربن به‌عنوان منبع انرژی برای رشد مطلوب و مؤثر بر متابولیسم میکروارگانیسم ضروری

www.SID.ir

Archive of SID

است. تولید آنزیم‌های پکتینولیتیکی از بسیاری از قارچ‌ها در حضور مواد پکتیکی در محیط کشت افزایش می‌یابد. فاوول و همکاران در سال ۲۰۰۳، در بررسی که انجام دادند به این نتیجه رسیدند که پکتین و اسید پلی‌گالاکتورونیک تولید آنزیم‌های پکتینولیتیکی را بهبود می‌بخشند و در محیط‌هایی که گلوکز به عنوان تنها منبع کربن استفاده شده بود این آنزیم‌ها تولید نشدند و این نتایج طبیعت القایی آنزیم‌های پکتینولیتیکی قارچ *A. niger* را منعکس می‌کند (۹). از آنجائی‌که پکتین نمی‌تواند وارد سلول شود پیشنهاد شده است این ترکیبات تولید آنزیم‌های پکتینولیتیکی بوسیله میکروارگانیسم‌ها را القاء می‌کنند. پلی‌گالاکتوروناز و پکتین لیاز در محیط فاقد مواد پکتیکی تولید نمی‌شوند و تولید آنها القایی می‌باشد. استفاده از قندهای ساده و ارزان به ویژه گلوکز به همراه منابع کربنی پیچیده ضایعات صنعتی وکشاورزی به دلیل سهولت استفاده به رشد سلولی در مراحل اولیه تخمیر کمک می‌کند. درحالی‌که منابع کربنی پیچیده غنی از پکتین می‌توانند باعث القای تولید پکتیناز شوند، زمانی که هر دو ترکیب همزمان در محیط کشت حضور دارند. در تحقیقی اثر پکتین و گلوکز به‌عنوان منبع کربنی بر تولید آنزیم پکتیناز در محیط کشت حاوی سبوس گندم را مورد بررسی قرار دادند. طبق نتایج آنها اضافه شدن گلوکز و پکتین به ترتیب با غلظت‌های ۱۰ درصد و ۶ درصد به محیط کشت، تولید پکتیناز و رشد زیست توده را به مقدار قابل توجهی افزایش داد (۱۰). بعلاوه پاتیل و همکاران در سال ۲۰۰۶، تولید پکتیناز با استفاده از طَبَق آفتابگردان بدون دانه به‌عنوان سوبسترا توسط *Aspergillus niger* مورد بررسی قرار دادند. براساس یافته‌های آنها گلوکز با غلظت ۶-۴ درصد به‌عنوان منبع کربنی در سیستم تخمیر غوطه‌ور باعث افزایش تولید پکتیناز شد (۲۴).

اثر منابع نیتروژنی آلی و غیرآلی بر رشد و تولید پکتیناز به‌طور وسیعی مطالعه شده است. در بیشتر میکروارگانیسم‌ها هر دو نوع منابع نیتروژنی به اسیدهای آمینه، اسید نوکلئیک، پروتئین‌ها و ترکیبات دیواره سلولی متابولیزه می‌شوند. مطابق با یافته‌های کاشیاپ و همکاران در سال ۲۰۰۳، عصاره مخمر، پپتون وکلرید آمونیوم باعث افزایش تولید آنزیم تا ۲۴ درصد شده و اضافه کردن نیترات آمونیوم، اوره وگلایسین باعث مهار تولید آنزیم می‌شوند که این ممکن است به‌علت رشد ضعیف میکروارگانیسم باشد (۱۷). ساپنوا و همکاران در سال ۱۹۹۷، مشاهده کردند که سولفات آمونیوم سنتز پکتیناز را تحریک می‌کند، چنانچه در نبود آن قارچ اندکی فعالیت پروتئولیتکی (پروتئازی) دارد و پکتیناز خارج سلولی تولید نمی‌شود (۲۸). بعلاوه نتایج بدست آمده از مطالعات تیم پژوهشی پاتولا و همکاران در سال ۲۰۰۵، نشان داد که محیط حاوی عصاره مخمر و سولفات آمونیوم منبع خوبی برای تولید آنزیم‌های پکتینولیتیکی می‌باشند (۲۵). براساس یافته‌های هائورس و همکاران در سال ۱۹۸۸، منابع نیتروژنی سولفات آمونیوم با غلظت ۰/۱۶ درصد در محیط کشت، تأثیری بر تولید پکتیناز نداشته است (۸). در این مطالعه، اثر منبع نیتروژنی غیرآلی سولفات آمونیوم در محیط حاوی و فاقد تفاله چغندرقند بر رشد میکروارگانیسم و تولید پکتیناز توسط *P. indica* بررسی شد. براساس نتایج به‌دست آمده (شکل۳) بیشینه فعالیت آنزیم در غلظت ۰/۴ درصد سولفات آمونیوم به میزان ۴/۲۹ واحد بر میلی‌لیترکه تقریباً ۱/۵۷ برابر تولید در محیط فاقد تفاله و ۱/۲۹ برابر نسبت به محیط بدون سولفات آمونیوم بود. بای و همکاران در سال ۲۰۰۴، از تفاله چغندرقند به‌عنوان سوبسترا برای تولید آنزیم پکتیناز استفاده نمودند، که از منابع نیتروژنی مختلف به‌کار برده شده سولفات آمونیوم، پودر عصاره مخمر، پپتون سویا، پودر تفاله لوبیا و مونوسدیم گلوتامات فاضلاب، بیشترین فعالیت پکتیناز در محیط کشت حاوی تفاله چغندرقند مشاهده شد (۶). همچنین تاکور و همکاران (۲۰۱۰)، گزارش کرده‌اند که بیشینه مقدار تولید پکتیناز زمانی است که کازئین هیدرولیزات و عصاره مخمر هر دو باهم استفاده شوند (۳ و ۳۱).

www.SID.ir

Archive of SID

براساس سطوح پیشنهادی بوسیله نرم افزار آزمایش تأییدی انجام شد و مقدار آنزیم تولید شده مورد سنجش قرار گرفت. با انجام سطوح پیشنهادی میزان فعالیت پکتینازی به ۸/۴۵ واحد در میلی‌لیتر رسید. هر چندکه در مورد سوبسترای مورد بررسی گزارشی برای روش تاگوچی مشاهده نشده اما در این راستا، کومار و همکاران درسال ۲۰۱۰، به‌منظور تولید پکتیناز با استفاده از پوست انبه توسط *Fusarium moniliforme* با این روش به بررسی اثر عوامل و تعیین سطوح بهینه آنها پرداختند و هشت عامل مختلف را در سه سطح ارزیابی کردند. در این بررسی دمای انکوباسیون بیشترین تأثیر را با مقدار ۳۲/۱۲ درصد و متعاقب آن سولفات روی، فسفات هیدروژن پتاسیم، مایع تلقیح به ترتیب با ۱۴/۶۲ درصد، ۱۲/۷۹ درصد و۱۱/۴۲ درصد بیشترین و سولفات منیزیم کمترین سهم را داشتند. با اجرای آزمایش پیشنهادی توسط نرم افزار مقدار تولید آنزیم ۴۳/۲ واحد بر گرم سوبسترا بدست آمد. تولید پکتیناز بعد از بهینه‌سازی بوسیله روش تاگوچی به میزان ۳/۳۲ برابر افزایش داشت (۱۹). آیمن و همکاران در سال ۲۰۱۵، در بخشی از مطالعه انجام شده بمنظور تولید پکتیناز از پوست هویج توسط *Bacillus mojavensis* روش آماری تاگوچی را به‌کار بردند و اثر ده عامل مختلف را در سه سطح بررسی کردند و سطوح بهینه تعیین شده با انجام آزمایش در سطوح بهینه همه فاکتورها، مقدار تولید آنزیم ۳۰/۵ واحد برمیلی‌لیتر بدست آمد که افزایش ۲/۹ برابری نسبت به بهینه‌سازی به روش یک فاکتور در یک زمان حاصل شد (۱۳). در مطالعه حال حاضر، با استفاده از بهینه‌سازی به روش تاگوچی مقدار تولید پکتیناز ۸/۴۵ واحد برمیلی‌لیتر بدست آمد که افزایش ۲/۵ برابری نسبت به حالت غیربهینه شده نشان داد. برطبق این مطالعه و همچنین بررسی‌های قبلی انجام شده می‌توان با استفاده از روش تاگوچی میزان تولید را افزایش داد و استفاده از تفاله چغندرقند یک سوبسترای مناسب برای القای تولید آنزیم می‌باشد.

در مجموع، بر اساس نتایج بدست آمده می‌توان گفت که قارچ *پریفورموسپورا ایندیکا* می‌تواند در حضور تفاله چغندر قند برای القای تولید آنزیم، بعنوان منبعی در دسترس و مطمئن برای تولید آنزیم پکتیناز با ارزش تجاری و صنعتی مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

۱- فتوحی چاهکوهی، ف.، امین زاده، س.، جعفریان، و.، تابنده، ف. و تابنده، م. (۱۳۹۷). مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی، ۳۱.

۲- فهیمی بایرامی، ا، فرخی، ن. و امین زاده، س. (۱۳۹۵). استخراج و بررسی پایداری و پارامترهای ترمودینامیکی یکی از پلی‌گالاکتورونازهای قارچ *Macrophomiona phaseolinaooo*. مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی، ۲۹، ۲۳۴-۲۴۳.

۳- نجف پور، ذ.ا. (۱۳۹۲). نگاهی به بازار شکردر ایران طی سال-های (۱۳۹۱-۱۳۸۰). مجله اقتصادی، ۱۳۱-۱۴۲.

4- Aarabi, A., Mizani, M. and Honarvar, M. (2017) The use of sugar beet pulp lignin for the production of vanillin. International Journal of Biological Macromolecules, 94, 345-354.

5- Aksu, Z. and Isoglu, I. A. (2006) Use of agricultural waste sugar beet pulp for the removal of Gemazol turquoise blue-G reactive dye from aqueous solution. Journal of hazardous materials, 137, 418-430.

6- Bai, Z., Zhang, H., Qi, H., Peng, X. and Li, B. (2004) Pectinase production by *Aspergillus niger* using wastewater in solid state fermentation for eliciting plant disease resistance. Bioresource Technology, 95, 49-52.

7- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding .Analytical biochemistry, 72, 248-254.

8- Cavalitto, S. F., Areas, J. A. and Hours, R. A. (1996) Pectinase production profile of Aspergillus foetidus in solid state cultures at different acidities. Biotechnology Letters, 18, 251-256.

www.SID.ir

Archive of SID

9- Fawole, O. and Odunfa, S. (2003) Some factors affecting production of pectic enzymes by Aspergillus niger. International Biodeterioration & Biodegradation, 52, 223-227.

10- Fontana, R. C., Salvador, S. and Da Silveira, M. M. (2005) Influence of pectin and glucose on growth and polygalacturonase production by Aspergillus niger in solid-state cultivation. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 32, 371-377.

11- Gadre, R. V., Van Driessche, G., Van Beeumen, J. and Bhat, M. K. (2003) Purification, characterisation and mode of action of an endo-polygalacturonase from the psychrophilic fungus Mucor flavus. Enzyme and Microbial Technology, 32, 321-330.

12- Gailing, M., Guibert, A. and Combes, D. (2000) Fractional factorial designs applied to enzymatic sugar beet pulps pressing improvement. Bioprocess and Biosystems Engineering, 22, 69-74.

13- Ghazala, I., Sayari, N., Romdhane, M. B., Ellouz-Chaabouni, S. and Haddar, A. (2015) Assessment of pectinase production by Bacillus mojavensis I4 using an economical substrate and its potential application in oil sesame extraction. Journal of food science and technology, 52, 7710-7722.

14- Ghildyal, N., Ramakrishna, S., Nirmala Devi, P., Lonsane, B. and Asthana, H. (1981) Large scale production of pectolytic enzyme by solid state fermentation. Journal of Food Science and Technology, 18, 248-251.

15- Heidarizadeh, M., Rezaei, P. F. and Shahabivand, S. Novel pectinase from *Piriformospora indica*, optimization of growth parameters and enzyme production in submerged culture condition. Turkish Journal of Biochemistry, 43, 289-295.

16- Käfer, E. (1977) Meiotic and mitotic recombination in Aspergillus and its chromosomal aberrations. Advances in genetics, 19, 33-131.

17- Kashyap, D. R., Soni, S. K. and Tewari, R. (2003) Enhanced production of pectinase by Bacillus sp. DT7 using solid state fermentation. Bioresource Technology, 88, 251-254.

18- Kumar, V ,.Sahai, V. and Bisaria, V. (2011) High-density spore production of *Piriformospora indica*, a plant growth-promoting endophyte, by optimization of nutritional and cultural parameters. Bioresource technology, 102, 3169-3175.

19- Kumar, Y. S., Varakumar, S. and Reddy, O. (2010) Production and optimization of polygalacturonase from mango (*Mangifera indica* L.) peel using Fusarium moniliforme in solid state fermentation. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 26, 1973-1980.

20- Kuvvet, C. (2016). Pectinase production using apple pomace as carbon source by mixed culture fermentation. Thesis.

21- Mohamed, S. A., Christensen, T. M. and Mikkelsen, J. D. (2003) New polygalacturonases from Trichoderma reesei: characterization and their specificities to partially methylated and acetylated pectins. Carbohydrate Research, 338, 515-524.

22- Nigam, P. and Vogel, M. (1991) Bioconversion of sugar industry by-products—molasses and sugar beet pulp for single cell protein production by yeasts. Biomass and Bioenergy, 1, 339-345.

23- Olsson, L., Christensen, T. M., 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 and Microbial Technology, 33, 612-619.

24- Patil, S. R. and Dayanand, A. (2006) Production of pectinase from deseeded sunflower head by Aspergillus niger in submerged and solid-state conditions. Bioresource technology, 97, 2054-2058.

25- Phutela, U., Dhuna, V., Sandhu, S. and Chadha, B. (2005) Pectinase and polygalacturonase production by a thermophilic Aspergillus fumigatus isolated from decomposting orange peels. Brazilian Journal of Microbiology, 36, 63-69.

26- Ramos, A. M., Gally, M., García, M. C. and Levin, L. (2010) Pectinolytic enzyme production by Colletotrichum truncatum, causal agent of soybean anthracnose. Revista iberoamericana de micologia, 27, 186-190.

27- Rao, R. S., Kumar, C. G., Prakasham, R. S. and Hobbs, P. J. (2008) The Taguchi methodology as a statistical tool for biotechnological applications: a critical appraisal. Biotechnology journal, 3, 510-523.

28- Sapunova, L., Lobanok, A. and Mikhailova, R. (1997) Conditions of synthesis of pectinases and proteases by Aspergillus alliaceus and production of a complex macerating preparation. Applied Biochemistry and Microbiology, 33, 257-260.

www.SID.ir

Archive of SID

29- Sharma, N., Rathore, M. and Sharma, M. (2013) Microbial pectinase: sources, characterization and applications. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 12, 45-60.

30- Silva, D., Martins, E. d. S., Silva, R. d. and Gomes, E. (2002) Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by-products. Brazilian Journal of Microbiology, 33, 318-324.

31- Thakur, A., Pahwa, R., Singh, S. and Gupta, R. (2010) Production, purification, and characterization of polygalacturonase from Mucor circinelloides ITCC 6025. Enzyme research, 2010.

32- Verma, S., Varma, A., Rexer, K.-H., Hassel, A., Kost, G., Sarbhoy, A., Bisen, P., Bütehorn, B. and Franken, P. (1998) *Piriformospora indica*, gen. et sp. nov., a new root-colonizing fungus. Mycologia, 896-903.

33- Xue, M., Liu, D., Zhang, H., Qi, H. and Lei, Z. (1992) A pilot process of solid state fermentation from sugar beet pulp for the production of microbial protein. Journal of fermentation and bioengineering, 73, 203-205.

Optimization of *Piriformospora indica* pectinase production from sugar beet pulp by Taguchi method

Fathi Rezaei P., Kiani S., Taghavi F. and Shahabivand S.

Dept. of Biology, Faculty of Science, University of Maragheh, Maragheh, I.R. of Iran

Abstract

Pectinases, as a large group of enzymes, catalysis break down of pectin to smaller molecules including galacturonic acid, and they are widely produced by many microorganisms. Nowadays, abundant waste from agriculture and fruit processing industries including sugar beet pulp, apple and citrus pomace as rich source of pectin are employing to induce pectinase production by many microorganisms. The aim of this study was optimization of *Piriformospora indica* pectinase production by using sugar beet pulp (SBP) by Taguchi method. First, *P. indica* was cultured on Kaefer medium supplemented with SBP, then biomass and spore production, enzyme activity and total protein content were measured for ten days. According to the results, maximum biomass production and pectinase activity were detected, 6.125 g/l and 3.2 U/ml in the presence of SBP at 6^{th} day, respectively. Furthermore the effect of different concentrations of glucose and ammonium sulphate and their interaction on enzyme activity was investigated. Based on the results by increasing the amount of them alone the activity was increased but in the case of their interaction with sugar beet pulp the activity was decreased. Next, enzyme production was optimized by Taguchi method to 8.35 U/ml which was 2.5 times more than non-optimized condition. In conclusion, because of pectinase production of *P. indica* by using sugar beet pulp as a suitable and cheap substrate, economically is valuable and moreover cause to decrease environmental pollution.

Key words: Agricultural waste, Pectinase, Piriformospora indica, Sugar beet pulp

www.SID.ir