Archive of SID

سومین همایش ملی مباحث نوین در کشاورزی
3rd National Conference on New Concepts in Agriculture
دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه
دانشکده کشاورزی
پنج شنبه ۲۶ آذرماه ۱۳۹۴

بهینه سازی تولید آنزیم پکتیناز از قارچ آسپرژیلوس اوریزه

مریم آقاخانی
گروه زیست شناسی،واحد علوم تحقیقات ،دانشگاه آزاد اسلامی،ساوه،ایران
Maryam-21167@yahoo.com

چکیده

با توجه به نیاز روز افزون به آنزیم ها،پژوهش در مورد تولید مقرونبه صرفه آنهاضروری است.قارچ آسپرژیلوس اوریزه یکی از قارچ‌های رشته‌ای ناقص ازرده آس‌کومیست‌ها وراسته‌ی اوراشیال‌ها می‌باشد که از میان آنزیم‌های خارج سلولی تولید شده توسط این قارچ ،آنزیم پکتیناز از اهمیت ویژه‌ای برخورداراست(در این پژوهش ازقارچ آسپرژیلوس اوریزه Aspergillus Oryzae PTCC 5164 استفاده شده است). بررسی شرایط بهینه تولید باروش آماری تاگوچی و تعیین فعالیت آنزیم با روش DNSانجام شد. بیشترین میزان تولید آنزیم پکتیناز با استفاده از پکتین مرکبات و آرد نشاسته ذرت بعنوان ماده اولیه سوبسترا حاصل شد. دو نسبت غلظت مضاعف و معمولی برای محیط کشتو توئین های ۰,۲و ۰,٤ بههمراه بررسی اثر زمان بر استخراج آنزیم در روش انجام آزمایش طراحی شدند.،که بالاترین میزان پکتیناز بدست آمده مربوط به غلظت مضاعف با توئین ۰,۲و۰,٤ بوده است . نتایج نشان داد جهت بهینه سازی و افزایش تولید آنزیم ،استفاده از روش آماری با تلفیق شرایط متفاوت تولید در پروسه‌های میکروبی و بیوتکنولوژی بسیار مناسب است ،زیرا دسترسی به نتیجه مطلوب با تعداد آزمایش‌های کمتر امکان‌پذیر است .

واژه‌های کلیدی :پکتیناز ،بهینه‌سازی ،آسپرژیلوس اوریزه

مقدمه

آنزیم پکتیناز یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های کاربردی در صنعت می‌باشد که توسط انواع مختلفی از میکروارگانیسم‌ها و نیز گیاهان سنتز می‌شود.از این آنزیم در صنایع مختلفی همچون صنعت آبمیوه‌سازیو نساجی استفاده می‌شود.با توجه به اینکه امروزه تعداد قابل توجهی از آنزیم‌ها در صنایع شیمیایی-دارویی،غذایی،نساجی،مواد شیمیایی و ....در حد بسیار بالا مطرح می‌باشد،لذا تولید بهینه آنهااز موارد قابل نوجه است .از جمله میکروارگانیسم‌های تولید کننده آنزیم پکتیناز قارچ‌ها (جنس آسپرژیلوس)هستند.کاربرد سایر قارچ‌ها همچون تریکوتردما،پنی‌سیلیوم‌ها،آگاریکوس کامپتریس،کانترلوس سیباروس‌نیز برای بهینه‌سازی تولید آنزیم مورد توجه می‌باشد(Belali, et al., 2007).

درپژوهش حاضر تاثیر سوبستراهای مختلف با دسترسی آسان ،همچون آرد نشاسته ذرت و سبوس گندم بعنوان منبع کربنی، و سایر شرایط مثل استریلیزاسیون و زمان برای انتخاب سطوح بهینه عوامل مورد استفاده در تولید آنزیم پکتیناز مورد بررسی قرار گرفت .ازریابی تولید آنزیم پکتیناز از قارچ آسپرژیلوس اوریزه توسط Meneghel et al.t(2014) بر محیط رشد مایع و Chen and Yang (2014) برای بیان آزاد پکتین از قارچ آسپرژیلوس اوریزه از طریق بررسی سه متغیر دما، غلظت و $NONO_3$ ،انجام شد .

www.SID.ir

Archive of SID

قابل ذکراست که تاکنون در رابطه با اثر زمان و میزان توئین بکار رفته در این پژوهش ،تحقیقی صورت نپذیرفته و در این پژوهش این عوامل مهم اثر گذار بر جداسازی آنزیم‌ها برای اولین بار مور تحقیق و گزارش قرار می‌گیرد .

مواد و روش‌ها

میکروارگانیسم

در این پژوهش از قارچ Aspergillus Oryzae PTCC 5164 استفاده شده که از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. تهیه کشت ذخیره با استفاده از محیط کشت Potato Dextrose Agar(PDA)(به مدت ٤ روز)و نگهداری در دمای 4°cانجام پذیرفت. جهت استفاده اززیر کشت‌های تازه ،این عمل بصورت ماهیانه تکرار می‌شد .

کشت اولیه وشرایط تولید

در این مرحله از منابع کربنی پکتین سیب و پکتین مرکبات (هردواز شرکت Sigmaو به میزان 0.5w/v درصد تهیه شد و هم چنین از محلول نمکی شامل ترکیبات نیترات سدیم،منیزین سولفات ،سولفات آهن و پتاسیم دی هیدروژن فسفات(g/l) استفاده شده است . $NONO_3$, 3;KH_2PO_4,1;$FeSO_4$,0.01;$MgSO_4$.$7H_2O$,0.5

تهیه سوسپانسیون کندیوسپوری و استفاده از لام نئوبار جهت شمارش کندیوسپورها

در شرایط استریل و با کمک پیپت پاستور استریل ،آب استریل دارای مقدار ۰,۲و ۰,٤درصد توئین ۲۰را به لوله های کشت حاوی کنیدیوسپوراضافه نموده تا کنیدیوسپورها جدا شوند. برای جداسازی میسلیوم‌ها سوسپانسیون را از چند لایه پشم شیشه که درون قیف استریل قرار داده شده اند،رد کنیم . پس از آن مایع رویی حاصل را بخوبی ورتکس کرده و مقدار بسیار جزئی از آن را بین لام ولامل نئوبار قرار داده می‌شودو کنیدیوسپورها در یک مربع ١٦ خانه‌ای شمرده می‌شوندو تداد بدست آمده را در ۲۵۰۰۰۰ ضرب می‌شود. بدین ترتیب مقادیر کنیدیوسپوردر تمامی نمونه‌ها بدست می‌آید .

تهیه پلیت‌های برف آبی

در این مرحله جهت بررسی تاثیر غلظت بر میزان انزیم استخراج شده از غلظت مضاعف محیط PDBنیز استفاده شده‌است. پس از انجام مراحل شرحداده شده ،مقدار ۳,۵ میلی لیتر از سوسپانسیون کنیدیوسپوری به فلاسک‌های ارلن مایر ۲۵۰میلی لیتری که حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط مایع PDB(PDA بدون آگار)بود، اضافه شد وانکوباسیون آنهادر دمای 30°c به مدت ٤٨ ساعت انجام شدو نهایتا پلیت‌های برف آبی برای مراحل بعد آماده شد.(ترکیبات محیط کشت سیب زمینیدکستروز براث (PDB):سیب زمینی۳۰۰gr،گلوکز۲۰gr وآب مقطر1000cc)

محیط‌های تولید و مرحله آخر کشت میکروبی

v/v 7% پیش کشت با کشت‌های تولیدی،تهیه شده در فلاسک‌های ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری با میزان ۵۰ میلی‌لیتر،تلقیح شدند و در دمای 30°c به مدت ۹٦ ساعت انکوبه شدند .(دور $100rev.min^{-1}$) و محیط‌های کشت جهت استخراج محلول آنزیمی آماده شدند .

استخراج محلول آنزیمی

www.SID.ir

Archive of SID

این مرحله با استفاده از بافر استات (۵۰Mm و PH=4.8) و افزودن میزان ۱۰۰ میلی لیتر از آن به نمونه های کشت و قرار دادن بر روی شیکر(دور ۱۵۰rev.min^{-1})در دمای 30°cانجام شد . پس ازیک ساعت شیک شدن محلول ،جداسازی عصاره اززی توده و زواید محیط کشت با کمک کاغذ صافی واتمن (شماره یک)صورت پذیرفت .

برای جداسازی رسوب از مایع رویی،ذرات معلق توسط سانتریوفوژg ۶۰۰۰به مدت ۱۵دقیقه رسوب دهی شد و مایع رویی جهت سنجش فعالیت آنزیمی درفاصله‌های زمانی ۲ دقیقه یک‌بار مورد استفاده قرار کرفت .

سنجش فعالیت پکتینولیتیکی

به لوله‌های آزمایش۰,۵میلی لیترمحلول آنزیمی خالص و محلول سوبسترای آنزیم که محلول استات پکتین ۰,۵%می‌باشد،اضافه شدو دردمای 37°cبه مدت ۱۰دقیقه در بن ماری شیکردار قرار داده شد.برای لوله شاهد نیز لازم است محلول آنزیمی به مدت ۱۵ دقیقه در آب جوش،حرارت داده شود . (دمای بالا به منظور غیر فعال شدن آنزیم به‌کار گرفته میشود .)

پس از خنک شدن لوله‌ها 0.5ccمحلول سود ۲ نرمال و 0.5ccDNSاضافه شد . بلافاصله در آب جوش به مدت ۵ دقیقه قرار داده شدند سپس بدون اتلاف وقت لوله‌ها در آب یخ قرار داده‌شدند .در قسمت آخر این مرحله ۵ میلی لیتر آب مقطر به محتوای لوله‌ها افزوده شد و ورتکس بادور بالا صورت گرفت. برای سنجش فعالیت آنزیمی از روش DNSبا طول موج ۵۵۰ استفاده می‌شود .

استفاده از روش تاگوچی

اثر عوامل غلظت محیط کشت ومیزان توئین و اثر استریلیزاسیون بر عملکرد آن و نیز فاکتور زمان در استخراج بهینه آنزیم پکتیناز در تمامی نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. بطوریکه نمونه‌ها هم با غلظت معمولی و هم با غلظت مضاعف و نیز با ٤ نوع توئین ۰,۲(استریل شده و استریل نشده) ،۰,٤ (استریل شده و استریل نشده)در ۸ دقیقه اول استخراج مورد بررسی قرار گرفتند.روش تاگوچی براساس آرایه متعامد است با وجود کاهش زیاد در واریانس ، آزمایشی با بهینه‌سازی پارامترهای کنترلی برای بدست آوردن بهترین نتایج طراحی می‌کند.

نتایج و بحث

در بین منابع کربنی (پکتین سیب و مرکبات)بیشترین فعالیت آنزیمی پکتیناز مربوط به پکتین مرکبات با مقدار OD= (0.398)با بررسی جذب نوری (λ=۵۵۰)حاصل شد . در بررسی اثر میزان غلظت محیط کشت برجداسازی این آنزیم ،نمونه‌های تهیه شده با غلظت مضاعف نسبت به غلظت معمولی دارای مقدار بیشتری آنزیم جداسازی شده، بودند .

در ارتباط با تاثیر درصدهای توئین بکاررفته و نیز استریل بودن یا نبودن آن ، مشخص گردید درصد توئین (۰,۲– ۰,٤)اثر قابل توجهی در میزان جداسازی آنزیم فوق ندارد . هم چنین استریل شدن توئین هیچ تاثیری برنقش آن در تلخیص آنزیم ندارد

www.SID.ir

Archive of SID

میزان آنزیم استخراج شده در فاصله های ۲ دقیقه این مهم را مشخص کرد که مقدار آنزیم بدست آمده در این فواصل زمانی تفاوت چندانی باهم ندارند.(به شرط ثابت بودن دمای محیط)

پکتین مرکبات به‌عنوان تنها منبع کربن جهت القای ترشح آنزیم خارج سلولی (پلی گالاکتوروناز)برای قارچ‌های A.niger و A.flavus (خویشاوند نزدیک A.oryzae)توسط بلالی و همکاران (۲۰۰۷) مورد استفاده قرار گرفت.

در خصوص افزایش میزان تولید آنزیم پکتیناز در حضور پکتین (سیب و مرکبات)یافته‌ی Meneghel et al.,(2014)مبنی بر اثر مثبت پکتین مرکبات بر افزایش تولید آنزیم اندوپلی‌گالاکتوروناز توسط قارچ آسپرژیلوس اوریزه در شرایط کشت غوطه‌ور می‌باشد . هم‌چنین در محیط نیمه جامد(غوطه‌ور)تولید بالایی از آنزیم پکتیناز توسط Yamane et al.,(2011)صورت گرفت.

مقایسه متغیرها بین نمونه‌های آماده‌شده با جذب نوری بالا بر حسب زمان

۲دقیقه چهارم	۲دقیقه سوم	۲دقیقه دوم	۲دقیقه اول	
۰,۱٤۸	۰,۲۹٤	۰,۱۹٤	۰,۳۹۸	مضاعف،۰,۲ ، مرکبات
۰,۳۹۸	۰,۳۱۱	۰,۳٦۰	۰,۲٤٤	مضاعف،۰,٤ ، مرکبات
۰,۲٥٥	۰,٤۰۳	۰,٦٤۲	۰,۷٥۹	مضاعف،۰,۲ ، سیب
۰,٥۸۳	۰,٥۹۳	۰,٤۱۹	۰,۳۱۷	مضاعف،۰,۲ ،سیب

مقایسه متغیرها بین نمونه‌های آماده‌شده با محیط کشت معمولی و مضاعف

توئین ۰,٤		توئین ۰,۲		
معمولی	مضاعف	معمولی	مضاعف	
۰,۱٥٤	۰,۳۹۸	۰,۱۸۲	۰,۲۹٤	پکتین مرکبات
۰,۳۱٦	۰,٥۸٦	۰,۷٥۹	۰,۲٥٥	پکتین سیب

مقایسه متغیرها بین نمونه‌هایی که اختلاف در میزان توئین (۰,۲-۰,٤ درصد)دارند.

معمولی	مضاعف		
۰,۱۸۲	۰,۲۹٤	توئین ۰,۲	پکتین مرکبات
۰,٤۷۹	۰,۳۹۸	توئین ۰,٤	

www.SID.ir

Archive of SID

معمولی	مضاعف		
۰,۱۱۱	۰,۲۵۵	توئین ۰,۲	پکتین سیب
۰,۳۱۲	۰,۳۱۷	توئین ۰,٤	

نتیجه‌گیری کلی

تولید آنزیم پکتیناز از قارچ آسپرژیلوس اوریزه در صورت استفاده از سوش مناسب و تنظیم شرایط بهینه تولید به میزان بالاتر از نصف مقدار بدست آمده از نمونه شاهد (خالص) امکان‌پذیر است .

تشکر وقدردانی

با تقدیر از کلیه همکاران آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه که با مساعدت‌های بی شائبه خود در انجام هرچه بهتر مراحل تحقیق اینجانب را یاری کردند .

منابع

۱.جعفری، ز . فلاحیان، ف . مجد،الف.آذین،م.۱۳۸۷.بهینه‌سازی تولید همزمان آمیلاز و پکتیناز بوسیله قارچ آسپرژیلوس اوریزه،JSIAUجلد۱۸،شماره۷۰/۱: ۲۳-۱۸.

2. Belali,G.Minae far, A.Sharifnasab,B. 2007.Biology of Iran.1:2.
3.Chen,J.Yang,R.2014.Production optimization and exoression of pectin releasing enzyme from Aspergillus Oryzaepo. Carbohydrate polymers .101.89-95.
4.Meneghel ,L. Reis ,G . Reginatto,C. 2014. Assessment of pectinase production by Aspergillus Oryzae in growth-limiying liquid medium under limitedand non-limited oxygen supply, process Biochomistry . PRBL. 10208:8.
5.Malvessi,E.Silverira,2004. M.BrazilianArchevees of Bioligy and Technology ,47(5):693.
6. Yamane ,Y,etal,J.2002.biosc.Bioneng.:93(1).

www.SID.ir