فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال چهارم، شماره ۱۵، پاییز ۱۳۹۴، صفحه ۲۹- ۴۴
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۳/۱۰ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۲۹

بهینه‌سازی تولید آنزیم پکتیناز در قارچ *آسپرژیلوس فومیگاتوس* جداسازی شده از میوه‌های در حال پوسیدن

اکرم سنگل: دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، دانشگاه اصفهان، ایران، akramsongol@rocketmail.com
ماندانا بهبهانی*: دانشیار بیوتکنولوژی میکروبی، دانشگاه اصفهان، ایران، ma_behbahani@yahoo.com

چکیده

مقدمه: آنزیم پکتیناز یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های صنعتی جهان محسوب می‌شود که از طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها مانند باکتری‌ها و قارچ‌های رشته‌ای تولید می‌شود. این آنزیم استفاده‌های زیادی در صنایع آبمیوه‌سازی، نساجی، روغن‌کشی و غیره دارد. در این پژوهش، جداسازی و بهینه‌سازی قارچ تولید کننده آنزیم پکتیناز از میوه‌های سیب و پرتقال در حال پوسیدن بررسی شد.

مواد و روش‌ها: جداسازی قارچ‌های تولید کننده آنزیم پکتیناز با استفاده از محیط کشت پکتین‌دار و با رنگ‌آمیزی لگول انجام شد. سویه *آسپرژیلوس فومیگاتوس* (AF293) به‌وسیله روش پیت شناسایی شد. بهینه‌سازی تولید آنزیم از این قارچ توسط طرح عامل‌یل در حضور ۵ متغیر با ۳ سطح در نظر گرفته شد. این ۵ متغیر شامل منابع کربنی (آب پنیر، گلوکز و استویا) به همراه سولفات آمونیوم، سولفات منگنز، دما و اسیدیته) در ۳ آزمایش جداگانه انجام شد. اندازه‌گیری غلظت آنزیم پکتیناز با روش کلوریمتریک (میلر) انجام شد.

نتایج: نتایج نشان داد که شرایط بهینه تولید آنزیم در دمای ۳۲ درجه، اسیدیته ۶، غلظت ۳ گرم بر لیتر سولفات منگنز، ۲/۷۵گرم بر لیتر از سولفات آمونیوم و غلظت ۱۰ گرم بر لیتر منابع کربن آب پنیر، استویا و گلوکز است. بالاترین میزان تولید آنزیم در شرایط یاد شده در حضور ۱۰ گرم بر لیتر گلوکز با میزان ۱/۳۲۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد. وزن مولکولی این آنزیم مطابق روش الکتروفورز سدیم دودسیل سولفات ۴۰ کیلودالتون به دست آمد.

بحث و نتیجه‌گیری: این سویه قادر به تولید آنزیم در حضور منابع مختلف کربن و رنج وسیع اسیدیته و دماست. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که این سویه کاندید مناسبی برای کاربرد در صنعت است.

واژه‌های کلیدی: آنزیم پکتیناز، *آسپرژیلوس فومیگاتوس*، بهینه‌سازی، روش طراحی عامل‌یل

* نویسنده مسؤول مکاتبات

Copyright © 2015, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

آنزیم پکتیناز یک گروه از آنزیم‌های پکتیک است که پکتین موجود در بخش مرکزی دیواره سلولی گیاه را می‌شکند. کاربردهای تجاری این آنزیم برای نخستین بار در ۱۹۳۰ برای آماده‌سازی آبمیوه‌ها بود. امروزه پکتیناز یکی از آنزیم‌های پرکاربرد بخش صنعتی و بیوتکنولوژی محسوب می‌شود. گزارش‌های موجود نشان می‌دهد که فروش تجاری کل آنزیم‌های صنعتی در سال ۱۹۹۵ در حدود یک بیلیون دلار بود که پکتیناز حدود ۷۵ میلیون دلار از این سهم را شامل می‌شد. در سال ۲۰۰۵ کل فروش جهانی برای آنزیم‌های صنعتی تا حدود ۱/۷ تا ۲ بیلیون دلار بود (۱). پکتینازها به ۲ دسته اسیدی و قلیایی تقسیم می‌شوند (۲). قارچ‌ها و مخمرها به طور گسترده پکتینازهای اسیدی تولید می‌کنند در حالی‌که پکتینازهای قلیایی از باکتری‌ها تولید می‌شوند. با گسترش استفاده از پکتیناز دانشمندان درصدد بهینه کردن تولید این آنزیم برآمدند (۳). موارد متعددی از بهینه‌سازی این آنزیم از میکروارگانیسم‌ها توسط پژوهشگران انجام شده است. بهینه‌سازی آنزیم پکتیناز بیشتر در شرایط مختلف محیط کشت، دمایی و منابع مختلف کربن انجام می‌شود. جداسازی آنزیم پکتیناز از قارچ‌ها و باکتری‌ها بیشتر با روش رسوب‌دادن و فیلتراسیون انجام می‌شود. امروزه برای اندازه‌گیری مقدار و فعالیت آنزیم از معرف‌ها استفاده می‌شود و با تغییرات در شرایط فیزیکی و شیمیایی کشت قارچ بهترین امکان را برای تولید زیاد آن فراهم می‌کنند. *آسپرژیلوس*[1] از مهم‌ترین قارچ‌های تولیدکننده پکتیناز است که از خاک و میوه‌های در حال پوسیدن جداسازی می‌شود. تاکنون منابع مختلف کربنی از جمله سبوس گندم، گلوکز، میوه‌ها و گیاهان پکتین‌دار، تفاله نیشکر، چغندر قند، سبوس برنج و غیره برای بهینه‌سازی این آنزیم گزارش شده است. ولی تاکنون هیچ گزارشی در مورد آب پنیر و استویا انجام نشده است. در این آزمایش تولید پکتیناز در حضور ۳ منبع کربن، اسیدیته، دما و نمک‌های سولفات آمونیوم و سولفات منگنز بررسی شد (۴).

مواد و روش‌ها

جداسازی نمونه‌های قارچی از میوه و سبزیجات

پوسیده: یک سری میوه شامل: سیب و پرتقال پوسیده از مناطق اصفهان و جنوب کشور (از زمین‌های کشاورزی و سوپر میوه) جمع‌آوری شد. سپس، رقیق‌سازی نمونه‌ها در محیط حاوی PBS انجام شد. رقت‌های مختلف ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌لیتری از محلول PBS روی محیط کشت دکستروز آگار سیب زمینی رشد داده شد.

به منظور جداسازی سویه‌های تولیدکننده آنزیم پکتیناز از سایر سویه‌ها از یک محیط اختصاصی استفاده شد. از محیط کشت جامد پکتین‌دار (پکتین ۱۰ گرم، فسفات پتاسیم ۱ گرم، سدیم نیترات ۲ گرم، پتاسیم کلراید ۰/۵ گرم، منزیم سولفات ۷ آبه ۰/۵ گرم، سولفات آهن ۷ آبه ۰/۰۱ گرم، آگار ۲۰ گرم، پپتون ۳ گرم، سولفات آمونیوم ۲ گرم، سولفات منگنز ۰/۰۱ گرم، قند ۳ گرم، عصاره مخمر ۲ گرم، سولفات مس ۵ آبه ۰/۰۰۱ گرم، اسیدیته (۶- ۷) استفاده شد.

محیط کشت در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در اتوکلاو استریل شد. تلقیح نمونه‌ها در محیط کشت و انکوباسیون در ۳۰ درجه سانتی‌گراد برای ۵ روز انجام شد. پس از ۷ روز انکوباسیون پلیت‌ها با رنگ لگول (پتاسیم یدید یدین) به منظور شناسایی سویه‌های تولیدکننده آنزیم پکتیناز رنگ‌آمیزی شد. اگر هاله بنفش تیره اطراف کلونی مشاهده شود نشان‌دهنده

وجود آنزیم پکتیناز در این سویه‌هاست.

ریخت‌شناسی قارچ‌های تولیدکننده آنزیم پکتیناز: با توجه به ویژگی‌های ریخت‌شناسی، قارچ‌ها را می‌توان براساس شکل، حضور یا غیاب اسپورهای جنسی، ترتیب کنیدی‌ها، ساختارهای تناسلی و تولید مثلی و ویژگی‌های هیفی شناسایی کرد. برای ریخت‌شناسی گونه‌های قارچی از محیط کشت‌های اختصاصی MEA[۲] و CYA[۳] به همراه کلید شناسایی پیت و هاکینگ [۴] (رنگ‌آمیزی سویه و مشاهده آن زیر میکروسکوپ) استفاده شد (۵).

شناسایی مولکولی سویه‌ها با استفاده از توالی ITS rDNA: در این روش ابتدا DNA قارچ مورد نظر با استفاده از کیت خریداری شده از شرکت سیناژن استخراج شد. پرایمرهای مربوط به ناحیه rDNA ITS قارچ‌ها که به طور گسترده برای شناسایی و طبقه‌بندی یوکاریوت‌ها استفاده می‌شود در این پژوهش استفاده شد. ITS1 به عنوان پرایمر رفت با توالی 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' و ITS4 به عنوان پرایمر برگشت با توالی 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' از شرکت امینسان تهیه شد. قسمت ژن مربوطه PCR و سپس الکتروفورز شد و در صورت مثبت بودن و عدم آلودگی DNA قارچ، قطعه مورد نظر تعیین توالی شده و سپس، نتیجه حاصل در سایت NCBI، BLAST شد.

بررسی میزان رشد و شمارش میکروارگانیسم‌ها: برای بررسی میزان رشد میکروارگانیسم‌ها در حین فرآیند تولید آنزیم از روش‌های اسپکتروفتومتری و همچنین، اندازه‌گیری قطر کلونی میکروارگانیسم‌های قارچی استفاده شد تا دوره زمانی که قارچ‌ها بالاترین میزان رشد را دارند، شناسایی شود (۶).

به منظور این‌که میزان آنزیم پکتیناز از سویه‌های مختلف از یک حجم توده‌ای یکسانی از قارچ استفاده شود، از لام نئوبار برای شمارش اسپورهای تلقیحی استفاده شد. تعداد اسپورهایی که برای تلقیح بعد از ۵ روز به کار برده شد به طور تقریبی حدود۱۳۸ اسپور بر میلی‌لیتر در نظر گرفته شد.

عامل‌های به کار برده شده برای بهینه‌سازی تولید آنزیم: عامل‌های مورد نظر در این پژوهش دما (۵ و ۶۰)، اسیدیته (۳ و ۹)، منبع کربنی گلوکز (جدول ۱)، استویا (جدول۲) و آب پنیر (جدول ۳)، سولفات آمونیوم (۰/۵ و ۵) گرم بر لیتر و سولفات منگنز (۱ و ۵) گرم بر لیتر بود که اثر منفرد و متقابل آن‌ها بر تولید آنزیم پکتیناز از میکروارگانیسم بررسی شد.

استخراج آنزیم پکتیناز: برای استخراج آنزیم از سویه‌های قارچی تولید کننده محیط کشت مایع تهیه شد. محیط کشت مایع پکتین‌دار برای استخراج آنزیم حاوی (پکتین ۱۰ گرم، فسفات پتاسیم ۱ گرم، سدیم نیترات ۲ گرم، پتاسیم کلراید ۰/۵ گرم، منزیم سولفات ۷ آبه ۰/۵ گرم، سولفات آهن ۷ آبه ۰/۰۱ گرم، آگار ۲۰ گرم، سولفات آمونیوم ۲ گرم، سولفات منگنز ۰/۰۱ گرم، سولفات مس ۵ آبه ۰/۰۰۱ گرم، عصاره مخمر ۰/۱ گرم، پپتون ۰/۲ گرم و قند ۱ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر) است (۷). پس از ۷ روز انکوباسیون نمونه‌ها در محیط کشت مایع ۲۲ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار با اسیدیته ۶/۵ به محیط کشت اضافه شده برای ۳۰ دقیقه در ۱۹ درجه سانتی‌گراد و دور شیکر ۱۴۰ rpm برای شیکر چرخان قرار داده شد. مخلوط را از طریق کاغذ صافی واتمن فیلتر کرده محلول به دست امده در دور ۸۰۰۰ g در ۴ درجه سانتی گراد برای ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد (۷).

فعالیت آنزیم پکتیناز با روش کلوریمتریک میلر [۵] اندازه‌گیری شد. در این روش ۰/۵ میلی‌لیتر از سوپرناتانت سلول‌های آزاد در ۰/۵ میلی‌لیتر پکتین به همراه بافر استات ۰/۱ مولار با اسیدیته ۶ مخلوط و در شرایط ثابت برای ۱۰ دقیقه در ۴۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس، ۱ میلی‌لیتر از معرف دی‌نیتروسالیسیلیک اسید (DNSA) به مخلوط اضافه و برای ۵ دقیقه در ۹۰ درجه سانتی گراد جوشانده شد. واکنش با اضافه کردن ۱ میلی‌لیتر نمک راچل [۶] متوقف شد. سپس، جذب با دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۴۰ اندازه‌گیری شد. هر واحد فعالیت پکتیناز به عنوان مقدار آنزیمی که ۱ ماکرومول گلوکز را در هر دقیقه آزاد می‌کند تعیین می‌شود (۸).

الکتروفورز سدیم دو دسیل سولفات (SDS- PAGE): خلوص و وزن مولکولی آنزیم با روش SDS-PAGE ۱۲ درصد تعیین شد. رنگ آمیزی ژل با کوماسی بلو R-250 برای ظاهر شدن باندها انجام شد.

طراحی آزمایش و تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل آماری با نرم افزار مینی‌تب [۷] و روش طراحی آزمایش انجام شد. روش طراحی آزمایش یکی از روش‌های بهبود کیفیت است که در دهه‌های ۱۹۸۰ و ۱۹۹۰ به عنوان یک مزیت رقابتی در کشورهای غربی و ژاپن مطرح شد. استفاده صحیح از روش‌های طراحی آزمایش‌های آماری می‌تواند باعث سهولت در انجام مراحل کار، تولید محصولات جدید و بهبود محصولات موجود شود. در این آزمایش با استفاده از روش و روش عامل‌یل در نرم‌افزار مینی‌تب یک سری آزمایش طراحی شد (۹). در ابتدا با استفاده از طراحی آزمایش عامل‌یل کسری ۸ آزمایش طراحی شد تا عامل‌های مؤثر شناسایی شوند سپس، با به کارگیری عامل‌های مؤثر طراحی آزمایش عامل‌یل کامل انجام شد (جدول ۱).

جدول ۱- آزمایش‌های مربوط به منبع کربنی گلوکز

ردیف	دما	اسیدیته	گلوکز (گرم بر لیتر)	سولفات منگنز (گرم بر لیتر)
۱	۶۰	۹	۱۵	۵
۲	۵	۹	۱۵	۱
۳	۵	۳	۵	۱
۴	۵	۹	۵	۵
۵	۶۰	۹	۵	۵
۶	۶۰	۹	۱۵	۱
۷	۶۰	۳	۱۵	۵
۸	۵	۹	۵	۱
۹	۶۰	۳	۵	۱
۱۰	۶۰	۳	۱۵	۱
۱۱	۵	۳	۱۵	۱
۱۲	۵	۳	۵	۵
۱۳	۳۲	۶	۱۰	۳
۱۴	۶۰	۹	۵	۱
۱۵	۵	۳	۱۵	۵
۱۶	۵	۹	۱۵	۵

جدول ۳- آزمایش‌های مربوط به منبع کربنی آب پنیر

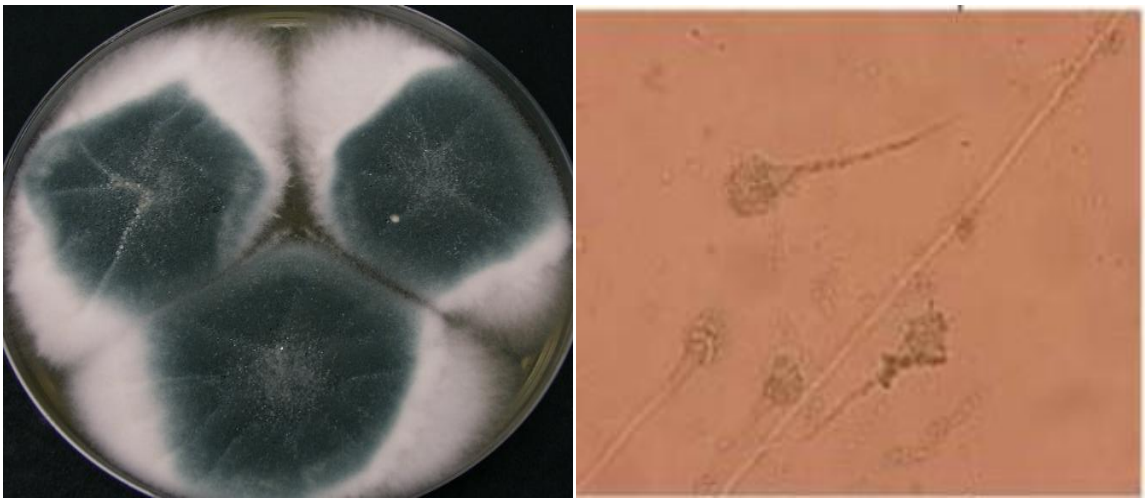
ردیف	دما	اسیدیته	آب پنیر (گرم بر لیتر)	سولفات آمونیوم (گرم بر لیتر)
۱	۶۰	۳	۱۵	۰/۵
۲	۳۲	۶	۱۰	۰/۲۷۵
۳	۶۰	۳	۵	۰/۵
۴	۵	۹	۵	۵
۵	۵	۹	۱۵	۰/۵
۶	۶۰	۹	۵	۵
۷	۵	۹	۵	۰/۵
۸	۵	۳	۵	۵
۹	۶۰	۹	۱۵	۵
۱۰	۵	۳	۱۵	۰/۵
۱۱	۵	۳	۵	۰/۵
۱۲	۶۰	۳	۵	۵
۱۳	۵	۳	۱۵	۵
۱۴	۵	۹	۱۵	۵
۱۵	۶۰	۹	۵	۰/۵
۱۶	۶۰	۳	۱۵	۵
۱۷	۶۰	۹	۱۵	۰/۵

جدول ۲- آزمایش‌های طراحی شده با روش طراحی عامل‌یل کامل مربوط به منبع کربنی استویا

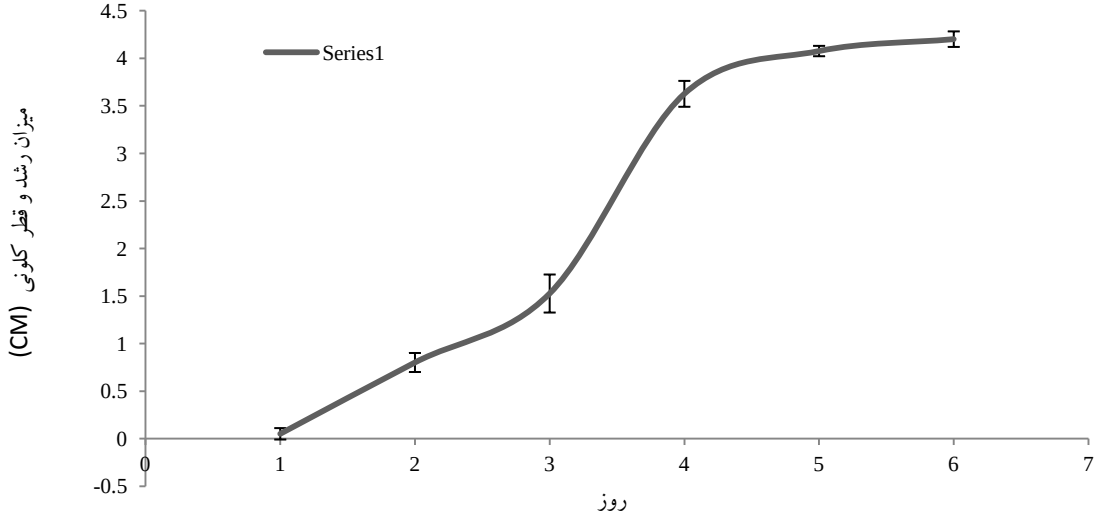
ردیف	دما	اسیدیته	استویا (گرم بر لیتر)	سولفات آمونیوم (گرم بر لیتر)	سولفات منگنز (گرم بر لیتر)
۱	۶۰	۳	۱۵	۵	۵
۲	۶۰	۳	۵	۰/۵	۵
۳	۵	۹	۵	۰/۵	۵
۴	۶۰	۹	۵	۰/۵	۵
۵	۵	۳	۵	۵	۵
۶	۶۰	۹	۱۵	۰/۵	۱
۷	۵	۳	۵	۰/۵	۵
۸	۶۰	۹	۱۵	۵	۵
۹	۶۰	۹	۱۵	۵	۱
۱۰	۶۰	۳	۵	۰/۵	۱
۱۱	۵	۹	۵	۵	۵
۱۲	۵	۳	۵	۰/۵	۱
۱۳	۶۰	۹	۵	۵	۵
۱۴	۵	۹	۱۵	۵	۵
۱۵	۵	۳	۱۵	۵	۱
۱۶	۶۰	۳	۱۵	۰/۵	۱
۱۷	۵	۳	۵	۵	۱
۱۸	۵	۳	۱۵	۵	۵
۱۹	۵	۹	۵	۵	۱
۲۰	۳۲	۶	۱۰	۰/۲۷۵	۳
۲۱	۵	۹	۱۵	۰/۵	۱
۲۲	۵	۹	۱۵	۰/۵	۵
۲۳	۵	۳	۱۵	۰/۵	۵
۲۴	۶۰	۳	۱۵	۵	۱
۲۵	۶۰	۳	۵	۵	۵
۲۶	۵	۹	۱۵	۵	۱
۲۷	۶۰	۹	۵	۰/۵	۱
۲۸	۶۰	۹	۵	۵	۱
۲۹	۵	۹	۵	۰/۵	۱
۳۰	۶۰	۳	۵	۵	۱
۳۱	۵	۳	۱۵	۰/۵	۱
۳۲	۶۰	۹	۱۵	۰/۵	۵
۳۳	۶۰	۳	۱۵	۰/۵	۵

نتایج

رشد میکروارگانیسم‌های قارچی در فرآیند تولید آنزیم: قارچ‌های تولید کننده آنزیم پکتیناز با رنگ‌آمیزی لگول از بین سویه‌های مختلف با دیدن هاله بنفش رنگ جداسازی شد. با بررسی رشد و میزان تولید آنزیم پکتیناز در سویه‌های انتخابی، سویه‌ای که بالاترین میزان رشد و تولید آنزیم را داشت برای بهینه‌سازی تولید آنزیم انتخاب شد. سویه‌ای که در این آزمایش بهترین عملکرد را نشان داد توسط کلید شناسایی پیت و هاکینگ به عنوان *آسپرژیلوس فومیگاتوس* (AF293) مشخص شد. این سویه دارای رنگ کلونی فیروزه‌ای تیره، کلونی کرکی و میسلیوم دارای دیواره عرضی و کونیدیفور بر روی کونیدیوفور، وزیکول کشیده و تقریبا گرد است. روی وزیکول استریگمای یک ردیفی قرار دارد و بر روی استریگما کونیدی قرار دارد. نتایج نشان داد که با افزایش زمان اندازه و قطر کلونی افزایش می‌یابد. به‌طوری‌که بالاترین میزان رشد پس از ۷ روز به‌دست آمد و پس از آن رشد ثابت ماند (جدول ۴).



شکل ۱- ریخت‌شناسی ظاهری و میکروسکوپی قارچ *آسپرژیلوس فومیگاتوس*



شکل ۲- نمودار رشدی قارچ *آسپرژیلوس فومیگاتوس* در یک دوره زمانی ۷ روزه

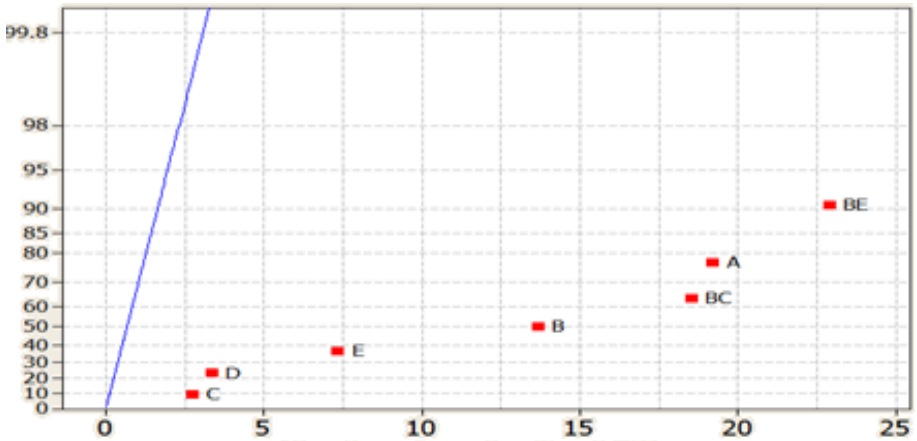
جدول ۴- اندازه‌گیری قطر کلونی و جذب نوری رشد قارچ‌ها در دوره زمانی ۶ روزه

میکروارگانیسم		روز اول	روز دوم	روز سوم	روز چهارم	روز پنجم	روز ششم
سویه ۱	قطر کلونی (سانتی‌متر)	۲	۳/۵	۴/۵	مرحله زایشی و اسپوردهی	مرحله سکون	سکون
	جذب نوری	۰/۸۹۵	۱/۳۴۷	۱/۴۸۶	۲/۱۰۲	۲/۵۴۲	.....
سویه ۲	قطر کلونی (سانتی‌متر)	۰/۴	۱	۲/۵	۳/۲	۳/۵	۴/۵
	جذب نوری	۱/۲۵۲	۱/۵۵۰	۱/۷۵۲	۱/۹۹۶	۲/۲۸۳	۲/۴۲۲
سویه ۳	قطر کلونی (سانتی‌متر)	۰/۲	۱	۱/۵	۲/۵	۳/۵	۴/۵
	جذب نوری	۰/۷۰۰	۱/۳۵۲	۱/۵۸۵	۱/۷۰۹	۲/۴۱۲	۲/۵۸۰
سویه ۴	قطر کلونی (سانتی‌متر)	۰/۱	۰/۵	۱	۱/۵	۲	۳
	جذب نوری	۰/۷۲۶	۰/۷۸۳	۱/۰۱۴	۱/۲۵۹	۱/۷۴۹	۲/۳۰۱
سویه ۵	قطر کلونی (سانتی‌متر)	۱/۵	۲	۲/۵	۲/۹	۳/۵	سکون
	جذب نوری	۰/۹۲۴	۱/۲۸۹	۱/۳۴۳	۱/۵۴۸	۱/۹۸۳	.....
سویه ۶	قطر کلونی (سانتی‌متر)	۰/۸	۱/۲	۱/۸	۲/۵	۳	سکون
	جذب نوری	۰/۳۰۶	۰/۸۲۲	۱/۱۵۸	۱/۶۸۷	۲/۱۴۵	.....
سویه ۷	قطر کلونی (سانتی‌متر)	بدون رشد	۱	۲	۳/۵	۴/۵	سکون
	جذب نوری	۰/۲۸۵	۱/۱۳۹	۱/۳۷۳	۲/۱۴۹	۲/۵۲۳	.....

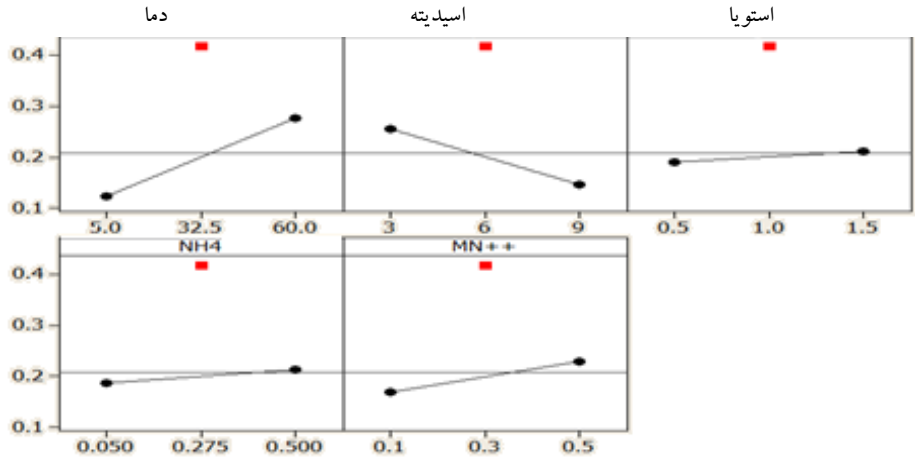
جدول ۵- میزان تولید آنزیم پکتیناز (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) توسط قارچ‌های جداسازی شده

میکروارگانیسم	۵۴۰=λ
سویه ۱	۰/۳۵۸
سویه ۲	۰/۴۱۴
سویه ۳	۰/۵۶۷
سویه ۴	۰/۳۵۷
سویه ۵	۰/۴۴۷
سویه ۶	۰/۲۳۰
سویه ۷	۰/۲۴۹

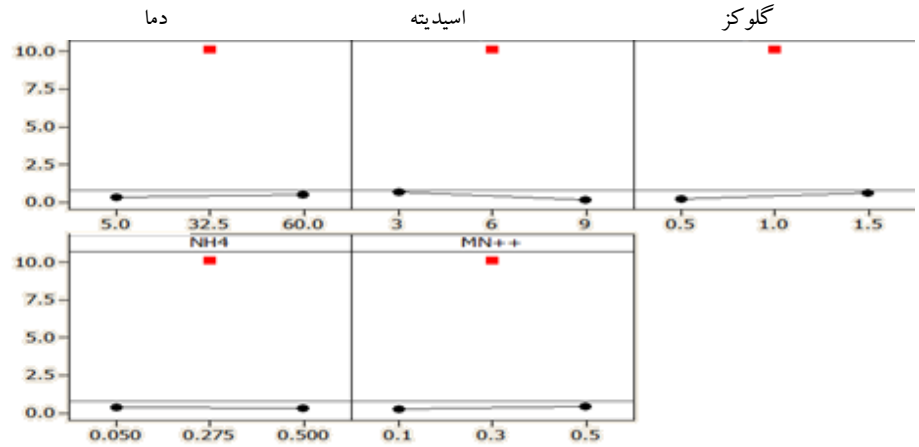
همان‌طور که در جداول مشاهده شد قارچ *آسپرژیلوس فومیگاتوس* [۸] (سویه ۳) دارای بالاترین میزان رشد و تولید آنزیم پکتیناز نسبت به بقیه سویه‌ها بود (جدول ۵، شکل ۱). همچنین، مشاهده شد که با شروع فرآیند تولید آنزیم، میزان کدورت محیط نیز افزایش یافته و همزمان با تولیدات پروتئینی و آنزیمی در محیط، رشد میکروارگانیسم نیز وجود دارد. این افزایش کدورت تا پایان دوره تولید آنزیم به شکل صعودی ادامه پیدا می‌کند(شکل ۲). نمودارهای مربوط به آزمایش‌های عامل‌یل کسری انجام شده بر روی قارچ *آسپرژیلوس فومیگاتوس* در ۳ منبع کربنی مختلف گلوکز، آب پنیر و استویا در زیر نشان داده شده است (شکل‌های ۳، ۴ و ۵).



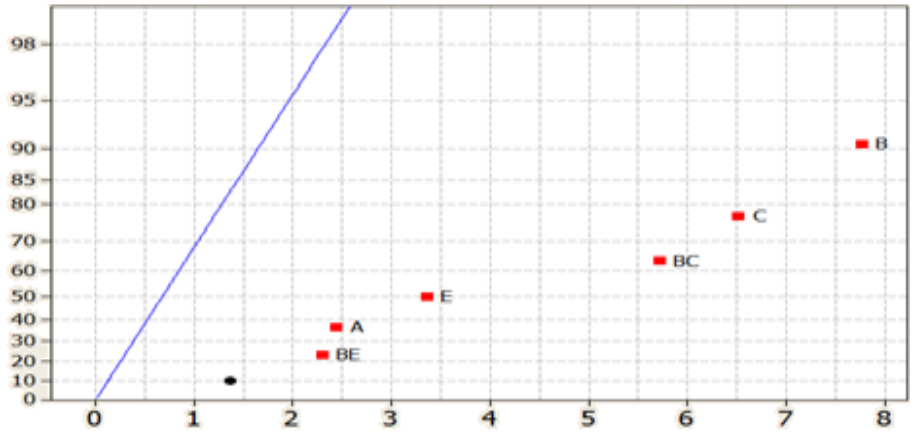
شکل ۳- توزیع احتمال نیمه نرمال عامل‌های مؤثر بر تولید آنزیم پکتیناز با منبع کربنی استویا نوع اثر: بی اثر (دایره مشکی)، مؤثر (مربع قرمز)
عامل‌ها: دما (A)، اسیدیته (B)، آب پنیر (C)، سولفات آمونیوم (D) و سولفات منگنز (E)



شکل ۴- تأثیر عامل‌های مؤثر بر تولید آنزیم پکتیناز با روش عامل‌یل کسری با منبع کربنی استویا
نقطه بالایی و پایینی (دایره مشکی) نقطه مرکزی (مربع قرمز)



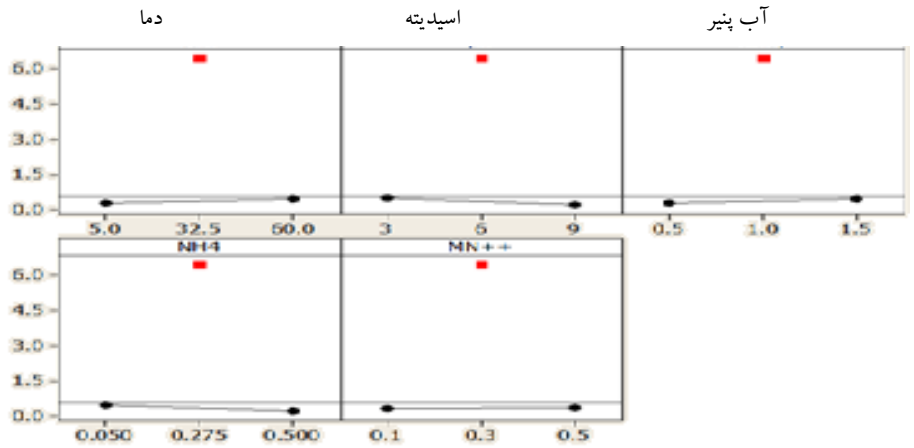
شکل ۵- تأثیر عامل‌های مؤثر بر تولید آنزیم پکتیناز با روش عامل‌یل کسری با منبع کربنی گلوکز
نقطه بالایی و پایینی (دایره مشکی) نقطه مرکزی (مربع قرمز)



شکل ۶-توزیع احتمال نیمه نرمال عامل‌های مؤثر بر تولید آنزیم پکتیناز با منبع کربنی گلوکز

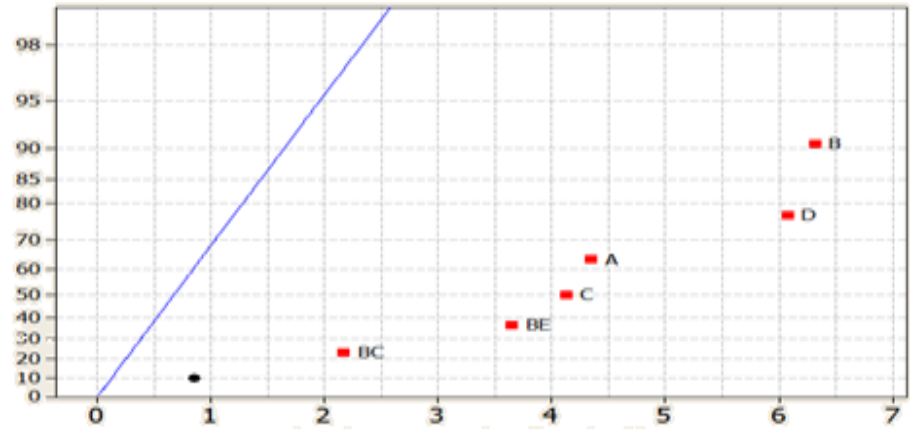
نوع اثر: بی اثر (دایره مشکی)، مؤثر (مربع قرمز)

عامل‌ها: دما (A)، اسیدیته (B)، آب پنیر (C)، سولفات آمونیوم (D) و سولفات منگنز (E)



شکل ۷- تأثیر عامل‌های مؤثر بر تولید آنزیم پکتیناز با روش عامل‌یل کسری با منبع کربنی آب پنیر

نقطه بالایی و پایینی (دایره مشکی) نقطه مرکزی (مربع قرمز)



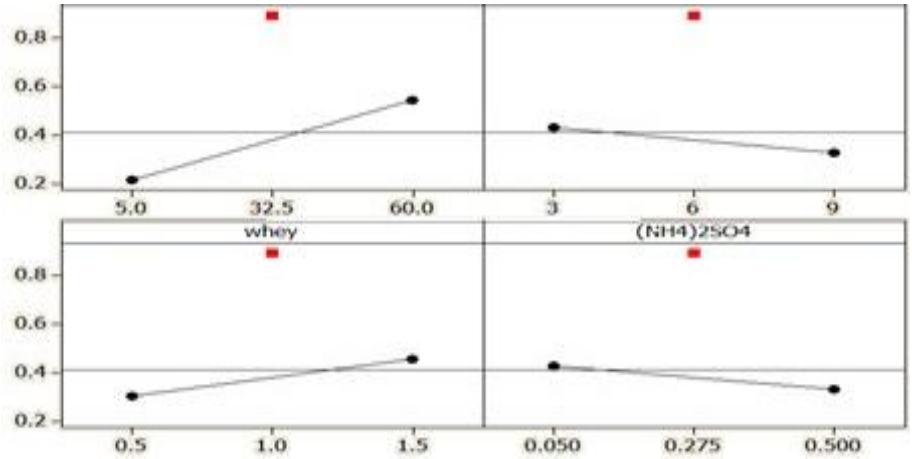
شکل ۸- توزیع احتمال نیمه نرمال عامل‌های مؤثر بر تولید آنزیم پکتیناز با منبع کربنی آب پنیر

نوع اثر: بی اثر (دایره مشکی)، مؤثر (مربع قرمز) عامل‌ها: دما (A)، اسیدیته (B)، آب پنیر (C)، سولفات آمونیوم (D)، سولفات منگنز (E)

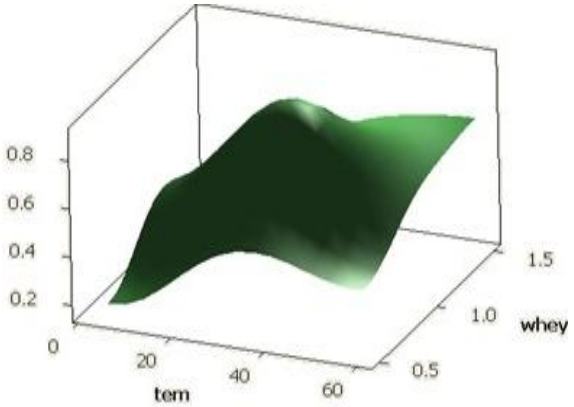
همان‌طور که بیان شد، در این آزمایش، از ۳ منبع کربن مختلف برای بررسی تولید آنزیم پکتیناز در کنار ۴ عامل دیگر که بهینه‌سازی آنها مد نظر است، استفاده شد. در آزمایشی که با منبع کربنی استویا انجام شد عامل‌هایی که با انجام طراحی آزمایش عامل‌یل کسری مؤثر معرفی شد (شکل ۳ و ۴)، شامل: دما، اسیدیته، غلظت استویا، غلظت سولفات آمونیوم و سولفات منگنز بود. همچنین، اثر متقابل بین غلظت استویا- اسیدیته و غلظت MNSO4-pH نیز نشان داده شد. با انجام آزمایش عامل‌یل کامل برای این ۵ عامل مؤثر نتایج به دست آمده نشان داد (شکل ۳ و ۴) که نقطه مرکزی مقدارهای استفاده شده برای عامل‌های مورد نظر بالاترین میزان تولید آنزیم (۰/۸۷۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) را از خود نشان داد. همچنین، در این آزمایش مشاهده شد که قارچ *آسپرژیلوس فومیگاتوس* در دمای ۶۰ درجه، اسیدیته ۳، غلظت ۱۵ گرم بر لیتر استویا، ۵ گرم بر لیتر سولفات آمونیوم و غلظت ۵ گرم بر لیتر سولفات منگنز نیز توانایی تولید آنزیم را به طور قابل توجهی دارد. آزمایش‌های عامل‌یل کسری که با منبع گلوکز برای *آسپرژیلوس فومیگاتوس* انجام شد (شکل ۵ و ۶) ۴ عامل دما، اسیدیته، غلظت گلوکز و غلظت سولفات منگنز را مؤثر معرفی کرد. برهمکنش متقابل بین غلظت گلوکز-pH و MNSO4 -pH را نیز نشان داد. با طراحی آزمایش عامل‌یل کامل برای این ۴ عامل مؤثر نتایجی که بدست آمد نشان دهنده تولید بالای آنزیم پکتیناز (۱/۳۲۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در نقطه مرکزی عامل‌های به کار رفته بود . همچنین، این قارچ با استفاده از گلوکز با غلظت ۱۵ گرم بر لیتر، دمای ۶۰ درجه، اسیدیته ۳ و غلظت ۵ گرم بر لیتر سولفات منگنز نیز رشد مناسب و تولید و فعالیت خوبی از آنزیم پکتیناز را از خود نشان داد. در مورد منبع کربنی آب پنیر نیز ۴ عامل دما، اسیدیته، غلظت آب پنیر و غلظت سولفات آمونیوم مؤثر معرفی شد؛ که با انجام طراحی آزمایش عامل‌یل کامل با این ۴ عامل مؤثر نتایجی که بدست آمد نشان دهنده بالاترین میزان تولید آنزیم (۰/۸۹۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در شرایط میانی مقدار مورد استفاده برای عامل‌های مورد نظر بود (شکل ۷ ، ۸، ۹ و ۱۰). تأثیر عوامل مؤثر بر تولید آنزیم پکتیناز به شکل جداگانه درشکل ۱۱ تا ۱۴ نشان داده شد.یک نکته مهمی که در این آزمایش بدست آمد رشد قارچ *آسپرژیلوس فومیگاتوس* در دمای ۶۰ درجه، اسیدیته ۳، غلظت ۱۵ گرم بر لیتر آب پنیر، ۰/۵ گرم بر لیتر سولفات آمونیوم بود که آنزیم پکتیناز با این شرایط نیز فعالیت قابل توجهی از خود نشان داد.

شناسایی مولکولی سویه‌ها از طریق توالی ITS rDNA: سویه مورد نظر به شکل مولکولی و از طریق توالی ITS rDNA و پرایمرهای ITS1,4 توالی‌یابی شد. توالی به دست آمده از پایگاه داده NCBI با توالی‌های مشابه بلاست شد. سویه مورد نظر حدود ۱۰۰ درصد شباهت را با *آسپرژیلوس فومیگاتوس* سویه F207 نشان داد.

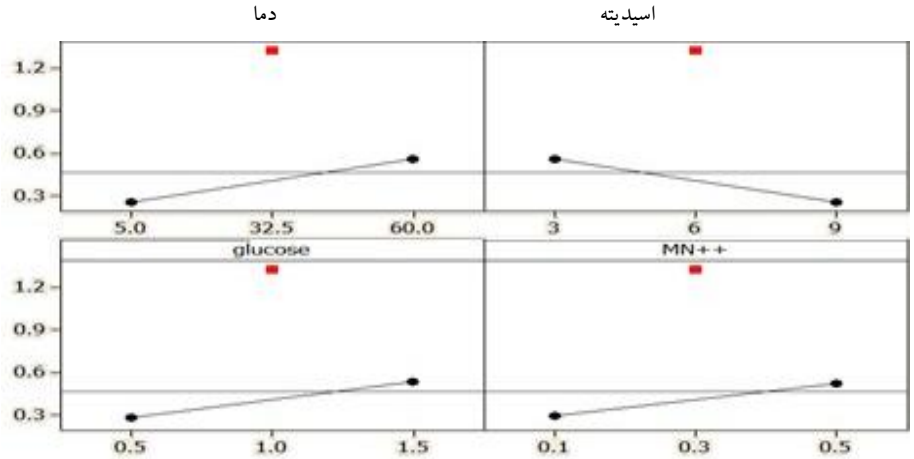
الکتروفورز سدیم دو دسیل سولفات: آنزیم پکتینازی که در این پژوهش از *آسپرژیلوس فومیگاتوس* استخراج شد طبق نتایج الکتروفورز سدیم دودسیل سولفات دارای وزن مولکولی ۴۰ کیلودالتون بود که در شکل ۱۵ مشاهده می‌شود.



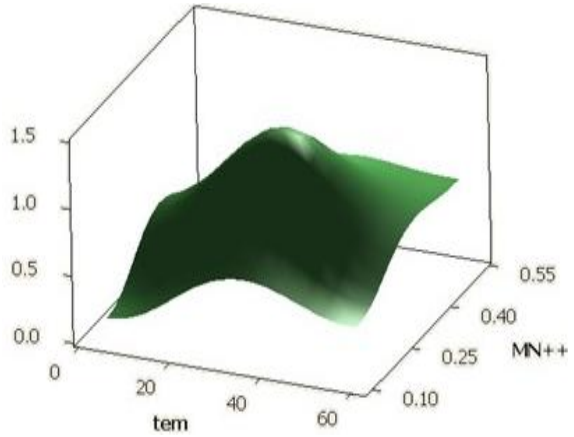
شکل ۹- تأثیر عوامل مؤثر بر تولید آنزیم پکتیناز به شکل جداگانه در آزمایش عامل‌یل کامل برای ۴ عامل مؤثر در حضور منبع کربن آب پنیر $۲^۴$=۱۶ آزمایش نقطه بالایی و پایینی (دایره مشکی) نقطه مرکزی (مربع قرمز)



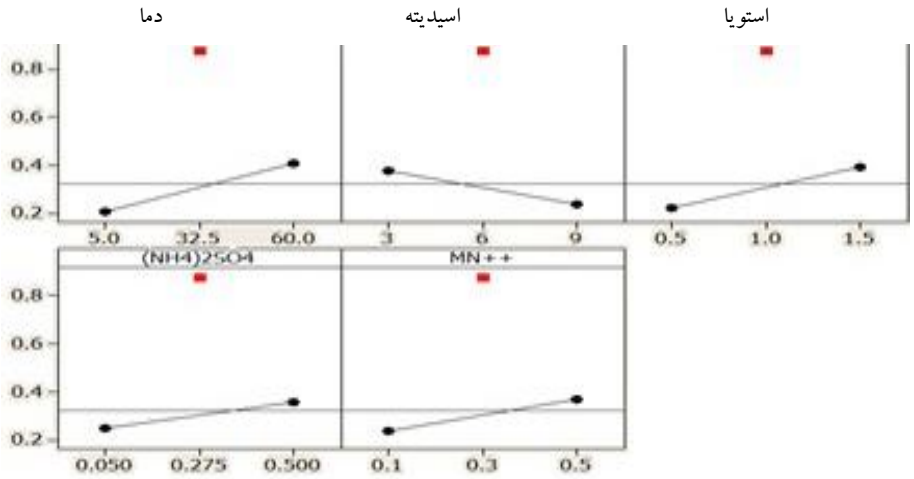
شکل ۱۰- منحنی ۳ بعدی سطحی تولید آنزیم در حضور منبع کربنی آب پنیر



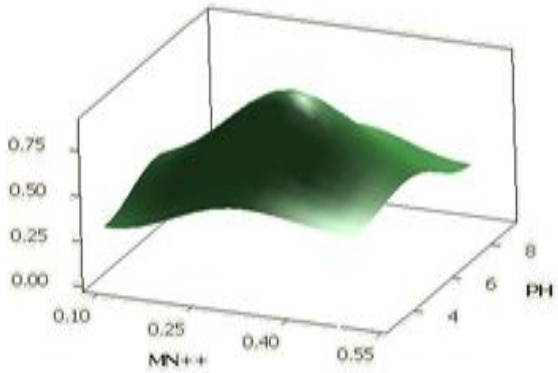
شکل ۱۱- تأثیر عوامل مؤثر بر تولید آنزیم پکتیناز به صورت جداگانه در آزمایش عامل‌یل کامل برای ۴ عامل مؤثر در حضور منبع کربن گلوکز $۲^۴$=۱۶ آزمایش نقطه بالایی و پایینی (دایره مشکی) نقطه مرکزی (مربع قرمز)



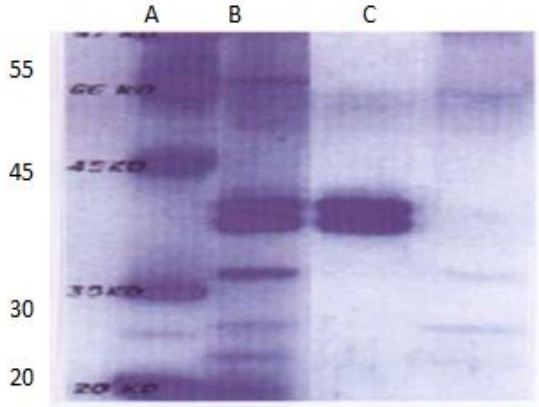
شکل ۱۲- منحنی ۳ بعدی سطحی تولید آنزیم در حضور منبع کربنی گلوکز



شکل ۱۳- تأثیر عوامل مؤثر بر تولید آنزیم پکتیناز به صورت جداگانه در آزمایش عامل‌یل کامل برای ۵ عامل مؤثر در حضور منبع کربن استویا $۲^۵$=۳۲ آزمایش نقطه بالایی و پایینی (دایره مشکی) نقطه مرکزی (مربع قرمز)



شکل ۱۴- منحنی ۳ بعدی سطحی تولید آنزیم در حضور منبع کربنی استویا



شکل ۱۵- باندهای به دست آمده از آنزیم پکتیناز بر روی ژل SDS-PAGE (باند A مارکر)، (باند B و C انزیم پکتیناز حاصل از *آسپرژیلوس فومیگاتوس*)

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که گلوکز بهترین منبع برای قارچ *آسپرژیلوس فومیگاتوس* برای تولید آنزیم پکتیناز است. علت این بهتر بودن را می‌توان در دسترس بودن آسانتر و جذب راحتر گلوکز برای قارچ نسبت به ۲ منبع کربنی دیگر دانست؛ که این باعث رشد سریع‌تر و بیشتر قارچ می‌شود. همچنین، با توجه به نتایجی که در بالا یاد شد می‌توان نتیجه گرفت این قارچ در دمای ۶۰ درجه و اسیدیته ۳ در حضور هر ۳ منبع کربن قابلیت رشد و تولید آنزیم را دارد. از آنجا که این شرایط در صنعت آبمیوه‌سازی مناسب است می‌توان گفت قارچ *آسپرژیلوس فومیگاتوس* گزینه‌ای مناسب برای تولید آنزیم پکتیناز برای این صنایع است. همچنین، سویه *آسپرژیلوس فومیگاتوس* قادر به تولید مقادیر متفاوتی از آنزیم در حضور منابع مختلف کربن و رنج وسیع اسیدیته (۳ تا ۹) و دما (۵ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد) است. نتایج مشابهی نیز توسط پژوهشگران گزارش شده است که این سویه توانایی تولید آنزیم پکتیناز در حضور منابع کربن (سبوس گندم، پکتین، گلوکز، میوه‌های سیب، پرتقال و غیره) و اسیدیته پایین را دارد (۱۰). ولی تاکنون هیچ گزارشی از تولید آنزیم پکتیناز توسط این سویه در حضور منبع کربنی آب پنیر و استویا در اسیدیته‌های بالا ارایه نشده است. آب پنیر یک سوبسترای ارزان قیمت و یک منبع کربنی و نیتروژنی غنی برای رشد میکروارگانیسم‌ها و تولید آنزیم است. بر اساس مطالعاتی که برای تولید آنزیم پکتیناز انجام شد این آنزیم از آنجا که در مرحله ساکن رشد میکروارگانیسم تولید می‌شود، استفاده از یک منبع قندی ساده برای رشد توده‌ای میکروارگانیسم مناسب است. منبع کربنی آب پنیر که در این پژوهش استفاده شد علاوه بر اینکه با داشتن منبع قندی لاکتوز برای رشد میکروارگانیسم مناسب است برای تیمار ضایعات آب پنیر حاصل از کارخانجات پنیرسازی نیز مفید است. با مقایسه بین ۳ منبع کربنی مختلف، منبع کربنی گلوکز بالاترین میزان تولید آنزیم را نشان داد که این نشان دهنده استفاده آسان و راحت‌تر قارچ از این منبع کربنی برای رشد بهتر و سریع‌تر خود و در نتیجه تولید بیشتر آنزیم در مرحله سکون از رشد توده میسیلیومی است. به علت اینکه ابتدا قارچ از یک منبع کربنی غیر از پکتین برای رشد خود بهره می‌گیرد سپس، با اتمام آن منبع، قارچ به سراغ منبع کربنی پکتین خواهد رفت که لازمه استفاده از آن تولید آنزیم پکتیناز خواهد بود. مجد [۹] در سال ۱۳۸۷ از *آسپرژیلوس اوریزه* برای بهینه‌سازی تولید آنزیم پکتیناز استفاده کرد. وی در این روش از ۶ عامل مانند دور شیکر، نوع منبع کربن، درصد کلسیم کلراید، درصد منبع کربن و نیتروژن و اسیدیته محیط کشت استفاده کرد. بهترین شرایط بهینه برای تولید آنزیم دور همزن ۱۵۰، منبع کربن پکتین مرکبات و سبوس گندم، کلسیم کلراید ۰/۲ درصد، منبع کربن حدود ۶ درصد و اسیدیته حدود ۴/۵ به دست آمد. (۱۱). اوکافور [۱۰] در سال ۲۰۱۰، ۵ قارچ رشته‌ای به نام‌های *آسپرژیلوس کلاواتوس* [۱۱]، *آسپرژیلوس نایجر* [۱۲]، *فوزاریوم* [۱۳]، *پنی سیلیوم کریزوژنوم* [۱۴] و *تریکودرما* [۱۵] را از نمونه‌های مواد زاید کشاورزی جداسازی کرد و با کشت دادن آن‌ها بر روی محیط کشت پایه حاوی پکتین بهترین فعالیت تجزیه پکتین را در سویه *آسپرژیلوس نایجر* و پنی‌سیلیوم کریزوژنوم مشاهده کرد. زیرا مناطق شفاف بزرگتری اطراف این دو قارچ دیده شد. بهترین منبع کربن برای آن‌ها پوست گندم بود و تخمیر در حالت جامد نسبت به تخمیر در حالت غوطه‌ور برای هر دو قارچ سطح بالاتری از آنزیم پکتیناز را تولید

را نشان داد (۱۲).

پلاکشمینارا سیمها [۱۶] در سال ۲۰۱۲ با جداسازی و غربال‌گری قارچ‌های تولید کننده آنزیم پکتیناز از خاک‌های کشاورزی و غیرکشاورزی مختلف، ۴۴ سویه قارچی را جداسازی کرد و کشت داد. وی با استفاده از روش رنگ آمیزی رتینیوم قرمز مشاهده کرد که ۴ سویه *آسپرژیلوس فلاووس*، *آسپرژیلوس نایجر*، *آسپرژیلوس ژاپونیکوس* [۱۷] و *کیتومیوم گلوبوسوم* [۱۸] آنزیم تجزیه‌کننده پکتین بیشتری تولید می‌کنند. وی آن‌ها را در دما و اسیدیته‌های مختلف برای تولید پکتیناز آزمایش کرد دمای بهینه حدود ۳۰ درجه سانتی‌گراد و اسیدیته بهینه حدود ۶/۸ بود (۳).

موهد [۱۹] در سال ۲۰۱۲ قارچ‌های تولیدکننده پکتیناز را از محیط‌های مختلف خاک و میوه‌های پوسیده جداسازی و در محیط کشت آگار پکتین‌دار تغییر شکل یافته، رشد داد. سویه‌های به دست آمده شامل موکور، *آسپرژیلوس*، *پنی سیلیوم*، *ریزوپوس* و *تریکودرما* بود که از بین این‌ها ریزوموکور پاسیلوس با استفاده از پکتین ۱/۵ درصد به عنوان منبع کربن، اوره به عنوان منبع نیتروژن و منگنز سولفات در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد بیش‌ترین فعالیت را برای تولید پلی‌گالاکتوروناز نشان دادند. استخراج آنزیم خام با فیلتراسیون و سانتریفیوژ و خالص‌سازی آن با کروماتوگرافی انجام شد. اسیدیته مناسب برای خالص‌سازی پلی‌گالاکتوروناز از این قارچ حدود ۵ و بهترین دما برای آن ۵۵ درجه سانتی‌گراد به دست آمد (۱۳).

در این پژوهش، منبع کربنی گلوکز همان‌طور که در گزارشات قبلی نیز یاد شده بود، منبع مناسبی برای تولید بالای آنزیم پکتیناز معرفی شد. علاوه بر گلوکز قارچ *آسپرژیلوس فومیگاتوس* توانایی تولید آنزیم پکتیناز در حضور منبع کربنی استویا و آب پنیر را نیز به خوبی نشان داد. فعالیت‌های آنزیماتیکی بین ۱۵۳ تا ۴۸۰ IU/g در تخمیر حالت جامد توسط سویه‌های *آسپرژیلوسی* که از پوسته گندم یا سویا به عنوان منبع کربن استفاده کرده است به دست آمده است (۱۴). در حالی که فعالیت‌هایی از ۱۶۲ تا ۵۰۰ IU/g توسط چندین سویه میکروبی در تخمیر حالت غوطه‌ور بدست آمده است. با منابع کربنی و القا کننده مختلف (گلوکز، پکتین، گوشت میوه سیب، پکتین لیمو یا سلولز و پوسته گندم به همراه پکتین لیمو) با استفاده از استراتژی‌های ژنتیکی یا بهینه کردن شرایط محیط کشت و ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی فعالیت‌های بالایی بدست آمده است. همچنین، مالوسی [۲۰] در پژوهشی به وضوح به تأثیر مثبت پکتین مرکبات بر افزایش تولید آنزیم اندو پلی‌گالاکتوروناز در قارچ *آسپرژیلوس اوریزه* [۲۱] در کشت غوطه ور اشاره کرد (۱۵). بلالی [۲۲] نیز توانست از پکتین مرکبات به عنوان تنها منبع کربن برای القای ترشح آنزیم پکتیناز خارج سلولی برای قارچ‌های *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلوس فلاووس* [۲۳] استفاده کند (۱۶). یامان [۲۴] توانست با استفاده از پوست و ضایعات پرتقال به تولید بالایی از پکتیناز از *آسپرژیلوس اوریزه* در محیط کشت غوطه‌ور برسد (۱۷). بر اساس نتایج این پژوهش، نمک‌های سولفات منگنز و سولفات آمونیوم از عوامل مؤثر بر تولید آنزیم معرفی شدند. در گزارش‌های مشابهی نیز پژوهشگران نشان دادند که برخی از یون‌ها مانند منیزیم، جیوه و روی فعالیت آنزیم پکتیناز را به علت بلوکه کردن گروه‌های تیول که در جایگاه فعال آنزیم قرار دارند کاهش می‌دهند (۱۸). در حالی که یون‌هایی مانند منگنز فعالیت پلی گالاکتوروناز را افزایش می‌دهند (۱۹). در مورد نمک آمونیوم سولفات و اثر آن روی فعالیت آنزیمی،

مطالعات نشان داده که نمک‌های سولفات و فسفات در غلظت‌های مناسب باعث افزایش تولید آنزیمی از میکروارگانیسم‌ها می‌شود (۲۰).

تشکر و قدردانی

از حمایت‌های دانشکده علوم و فناوری نوین دانشگاه اصفهان و کمیته فرآورده‌های طبیعی تشکر و قدردانی می‌شود.

References

(1) Akhter Asifsiddiqui M., Pande V., Arif M. Production,purification,and characterization of polygalacturonase from *rhizomucor pusillus* isolated from decomposting orange peels. *Hindawi Publishing Corporation Enzyme Research* 2012; 8 (4): 234- 41.

(2) Banu A., Kalpana M., Gnanaprabhal RG., Pradeep VB., Palaniswamy M. Production and characterization of pectinase enzyme from *penicillium chrysogenum*. *Indian Journal of Scienceand Technology* 2012; 3 (4): 377- 81.

(3) Plakshminarasimha SS., Kurokawa J., Suryani Kimura T., Ohmiya K and Sakka K. A novel thermophilic pectate lyase containing two catalytic modules of *Clostridium stercorarium*. *Bioscience. Biotechnol. Biochemistry* 2012; 69 (3): 2138- 45.

(4) Jacob N and Prema P. Influence of mode of fermentation on production of polygalacturonase by a novel strain of *Streptomyces lydicus*. *Food Technol. Biotechnol* 2006; 44 (8): 263- 7.

(5) Pitt DM., Madarev SZ., Radulovic LM and Skrinjar M. Production of exo-pectinase by *Penicillium roqueorti* using pumpkin oil cake. *Nature. Science* 2007; 113 (5): 313- 20.

(6) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227 (7): 680- 5.

(7) Lineweaver H and Burk D. The determination of enzyme dissociation constants. *Journal. American. Chemical. Soc*ial 1934; 56 (6): 658- 66.

(8) Miller GL. Use of Dinitrosalicylic acid for determination of reducing sugar. *Anallysis. Chemical* 1959; 31 (7): 426- 8.

(9) Joshi VK., Parmar M., Rana N. Purification and characterization of pectinase produced from apple pomace and evaluation of its efficacy in fruit juice extraction and clarification. *Indian Journal of Natural Products and Resources* 2011; 2 (9): 189- 97.

(10) Martiny N., Souza SR., Silva R and Gomes E. Pectinase production by fungal strains in solid state fermentation using agro-industrial bioproduct. *Brazilian. Archive. Biology. Technology* 2004; 47 (9): 813- 19.

(11) Majd M., Uddin A., Begum F., sultan T., Azad AK. Production of pectinase by *Aspergillus niger* cultured in solid state media. *International Journal of Biosciences* 2011; 1 (6): 33- 42.

(12) Okafor UA., Okachi VI., Chinedu SN., Ebuehi OAT., Onygemeokerenta BM. Pectinolytic activity of wild-type filamentous fungi fermented on agro-waste. *African Journal of Microbiology Research* 2014; 4 (7): 2729- 34.

(13) Mellon JE and Cotty PJ. Expression of pectinase activity among Aspergillus flavus isolates from southwestern and southeastern United States. *Mycopathologia* 2004; 157 (7): 333- 8.

(14) Mohd DR., Vohra PK., Chopra S and Tewari R. Applications of pectinases in the commercial sector: A review. *Bioresoure. Technology* 2012; 77 (5): 215- 27.

(15) Malvessi E and Silveira MM. Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. *Brazilian Archive Biology Technology* 2004; 47 (9): 693- 702.

(16) Balali A., Bajwa R., Latif Z. Status of *aspergillus niger* srains for pectinase production potential. *Institute of Mycology and Plant Pathology* 2009; 21 (7): 77- 82.

(17) Yaman M., Baumann A., Cruz N., Hours R., Garro O. Partial characterization of enzymatic activities produced by awild strain of *A. niger*. *Journal of Microbiology, Biotecnology and Food Sciences* 2013; 2 (3): 917- 32.

(18) Macedonia R. The apple pulp waste used as a nourishing `base by *aspergillus niger*. *International Conference Process Technology and Environmental Protection* 2011; 43 (5): 1529- 34.

(19) Mrudula S., Anitharaj R. Pectinase production in solid state fermentation by *Aspergillus niger* using orange peel as substrate. *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry* 2011; 6 (7): 64- 71.

(20) Wang XJ., Bai JG., Liang XY. Optimization of multienzyme production by two mixed strains in solid state fermentation. *International Research Journal of Microbiology* 2013; 73 (4): 533- 40.

---

[1]- *Aspergillus*
[2]- Malt Yeast Agar
[3]- Czapek Yeast Extract Agar
[4]- Pitt and Hocking
[5]- Miller
[6]- Rochell
[7]- Minitab Software
[8]- *Aspergillus fumigatus*
[9]- Majd
[10]- Okafor
[11]- *Aspergillus clavatus*
[12]- *Aspergillus niger*
[13]- *Fusarium*
[14]- *Penicilium chrysogenum*
[15]- *Tricoderma*
[16]- *plakshminarasimha*
[17]- *Aspergillus japanicum*
[18]- *Kitomicum glubosum*
[19]- Mohd
[20]- Malvessi
[21]- *Aspergillus oryzae*
[22]- Balali
[23]- *Aspergillus flavus*
[24]- Yamane

Optimization of pectinase enzyme production in *Aspergillus fumigatus* isolated from rotten fruits

Akram Songol
M.Sc. of Biotechnology, Isfahan university, Iran, akramsongol@rocketmail.com
Mandana Behbahani *
Associate professor of Biotechnology, Isfahan university, Iran, ma_behbahani@yahoo.com

Abstract

Introduction: Pectinase is one of the most important industrial enzymes which was isolated from a wide variety of microorganisms such as bacteria and filamentous fungi. This enzyme has been usually used in the juice and textile industry. In this study, the isolation and optimization of pectinase-producing fungi on decaying rotten fruits were studied.

Materials and methods: Isolation and screening of pectinase producing fungi have been done by plate culture on pectin medium and staining with Lugol's iodine solution. The best strain was identified by method of Pitt and Hocking as Aspergillus fumigates. The enzyme production was optimized by application of the factorial design which involves five factors, each at three levels. Five factors were carbon sources (whey, sugar, stevia) and ammonium sulfate, manganese sulfate, temperature, and pH). Pectinase concentration was measured by the Miller method.

Results: The results showed that the optimum condition for enzyme production was at 32 °C, PH = 6 , 3g / L manganese sulfate, 2.75g / L of ammonium sulfate, 10g / L of each carbon source (whey, stevia, and glucose). Optimum of enzyme production was observed in the presence of 1.328 mg / ml of glucose. Molecular weight of enzyme was obtained about 40 kDa by SDS-PAGE.

Discussion and conclusion: The results demonstrated that this strain could grow in a wide range of carbon sources, PH and temperature. This study indicates that this strain is a good candidate for use in industrial application.

Key words: Pectinase enzyme, *Aspergillus fumigatus*, Optimization, Factorial design method

* Corresponding author
Received: May 31, 2014 / **Accepted:** February 18, 2015