فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال پنجم، شماره ۱۷، بهار ۱۳۹۵، صفحه ۱۴۰- ۱۲۱
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۹/۱۶ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۲۹

جداسازی و بهینه‌سازی تولید آنزیم پکتیناز یک آنزیم مفید صنعتی از قارچ‌های *آسپرژیلوس نایجر*، *ریزوپوس اوریزه* و *پنی‌سیلیوم کریزوژنوم*

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 جداسازی می‌شود. این آنزیم استفاده‌های زیادی در صنایع آبمیوه‌سازی، نساجی و غیره دارد. در این پژوهش، جداسازی و بهینه‌سازی قارچ‌های تولید کننده آنزیم پکتیناز از میوه‌های پوسیده سیب و پرتقال بررسی شد.

مواد و روش‌ها: جداسازی قارچ‌های تولید کننده آنزیم پکتیناز با استفاده از محیط کشت پکتین‌دار و با رنگ آمیزی لگول انجام شد. ۳ گونه از بهترین سویه‌ها توسط روش مولکولی توالی ITS1,4 شناسایی شد و بهینه‌سازی تولید آنزیم از این قارچ توسط طرح فاکتوریل 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 توسط ۳ سویه برتر به نام *آسپرژیلوس نایجر*، *پنی‌سیلیوم کریزوژنوم* و *ریزوپوس اوریزه* در دمای ۳۲ درجه، اسیدیته ۶، غلظت ۳ گرم بر لیتر سولفات منگنز، ۷۵/ ۲ گرم 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 گلوکز با میزان ۱/۳۲۸میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای *آسپرژیلوس نایجر* و ۱/۲۸۴ و ۱/۰۳۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در حضور آب پنیر برای *ریزوپوس اوریزه* و *پنی‌سیلیوم کریزوژنوم* مشاهده شد. وزن مولکولی این آنزیم مطابق روش SDS-Page ۴۰ و ۳۷ کیلودالتون به‌دست آمد.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج پژوهش حاضر نشان داد که ۳ سویه قادر به تولید آنزیم در حضور منابع مختلف کربن و دامنه وسیعی از اسیدیته و دماست. همچنین، نتایج پژوهش نشان داد که این سویه‌ها کاندید مناسبی برای کاربرد در صنعت می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: آنزیم پکتیناز، *آسپرژیلوس نایجر*، *پنی‌سیلیوم کریزوژنوم*، *ریزوپوس اوریزه*، بهینه‌سازی، روش طراحی فاکتوریل

---

* نویسنده مسؤول مکاتبات

Copyright © 2016, 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

آنزیم‌ها بیوکاتالیست‌هایی هستند که توسط سلول‌های زنده سنتز می‌شوند. آنزیم‌ها سرعت واکنش‌های شیمیایی را افزایش می‌دهند. بسیاری از باکتری‌ها، قارچ‌ها و گیاهان عالی توانایی تولید آنزیم پکتیناز را دارند (۱). آنزیم پکتیناز یک آنزیم پکتینولیتیک است که ماده پکتین را که یک سوبسترای پلی ساکاریدی است، در دیواره سلولی گیاهان می‌شکند. پکتین نخستین بار توسط هنری براکونوت در سال ۱۸۲۵ جداسازی و شرح داده شد. آنزیم پکتیناز نخستین بار در سال ۱۹۳۰ با آزمایش‌های بسیاری که در فرآیند تولید آبمیوه انجام شد، کشف شد. در واقع نخستین بار از آنزیم پکتیناز استخراج شده از قارچ‌ها، برای شفافیت و کیفیت بهتر آبمیوه‌ها در صنعت استفاده شد (۲). پکتیناز کاربردهای بسیاری از قبیل موارد زیر دارد: استخراج آبمیوه، استخراج روغن، تیمار کردن ضایعات آبی، غذای دام، بهبود در رنگ و پایداری شراب‌های قرمز، خالص‌سازی ویروس‌های گیاهی، استفاده در صنعت کاغذسازی، تخمیر چای و قهوه، خیساندن و نرم کردن فیبرهای گیاهی، بدون صمغ کردن فیبرهای گیاهی و پاک کردن زیستی فیبرهای پنبه در فرآیندهای نساجی (۳).

یکی از مهم‌ترین انواع آنزیم پکتیناز که استفاده گسترده‌ای نیز در صنعت دارد پلی‌گالاکتورونیاز است.آنزیم‌های پلی گالاکتورونیک اسید دپلیمریزه شده به ۲ نوع پلی‌گالاکتورونازهای هیدرولیزکننده و پلی‌گالاکتورونات لیازها طبقه‌بندی می‌شود. با گسترش استفاده از پکتیناز دانشمندان در صدد بهینه کردن تولید این آنزیم برآمدند (۴). آن‌ها برای بهینه‌سازی، شرایط محیط کشت را بهبود می‌بخشیدند و یا از سویه‌های قارچی استفاده می‌کردند که بیش‌ترین مقدار تولید را داشته باشد که *آسپرژیلوس‌ها* چنین ویژگی‌هایی دارند. دانشمندان قارچ‌ها را بر روی محیط کشت‌های ویژه قارچ کشت داده و با اضافه کردن مواد حاوی پکتین به محیط تولید آنزیم را القا می‌کردند و سپس، آنزیم تولید شده را توسط رسوب دادن و یا فیلتراسیون جداسازی می‌کردند. امروزه برای اندازه‌گیری مقدار و فعالیت آنزیم از معرف‌ها استفاده می‌کنند و با تغییرات در شرایط فیزیکی و شیمیایی کشت قارچ، بهترین امکان را برای تولید زیاد آن فراهم می‌کنند (۵). در پژوهش حاضر، ۷ سویه از میوه‌های در حال پوسیدن سیب و پرتقال جداسازی شد که پس از یک غربال‌گری از نظر رشدی و تولید آنزیم پکتیناز ۳ سویه که بهترین عملکرد را داشتن جداسازی شد (۶). بیشتر قارچ‌های رشته‌ای مانندگونه‌های *آسپرژیلوس*، *پنی‌سیلیوم* و *ریزوپوس* که در پژوهش حاضر بررسی شده‌اند توانایی تولید این نوع آنزیم را دارند. این ۳ گونه قارچی از گونه‌هایی هستند که به فراوانی در طبیعت یافت می‌شوند. این ۳ گونه از قارچ‌های اصلی آلوده کننده مواد غذایی و محصولات کشاورزی هستند که از علت‌های آن توانایی آن‌ها در ترشح آنزیم پکتیناز است. هدف از پژوهش حاضر، پیدا کردن سویه‌ای است که آنزیمی با دامنه تحملی بالا در اسیدیته‌های مختلف، دماهای بالا و منابع کربنی مختلف را تولید کند.

مواد و روش‌ها

جداسازی نمونه‌های قارچی از میوه و سبزیجات پوسیده: مقداری میوه‌جات از قبیل 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 و 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 جامد پکتین‌دار (پکتین ۱۰گرم، فسفات پتاسیم ۱گرم، سدیم نیترات ۲گرم، پتاسیم کلراید ۰/۵گرم، منزیم سولفات ۷ آبه ۰/۵گرم، سولفات آهن ۷ آبه ۰/۰۱گرم، آگار ۲۰ گرم، پپتون ۳گرم، سولفات آمونیوم ۲گرم، سولفات منگنز ۰/۰۱گرم، قند ۳گرم، عصاره مخمر ۲گرم، سولفات مس ۵ آبه ۰/۰۰۱گرم و اسیدیته ۶-۷) استفاده شد.

محیط کشت در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در اتوکلاو استریل شد. سپس، تلقیح نمونه‌ها بر روی 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 ریخت‌شناختی، قارچ‌ها را می‌توان بر اساس 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[1] و CYA[2] به همراه کلید شناسایی پیت و هاکینگ[3] (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 و با استفاده از پرایمرهای مربوط به ناحیه ریبوزومی ITS rDNA (ITS1 به عنوان پرایمر رفت با توالی 5TCCGTAGGTGAACCTGCGG3 و ITS4 به‌عنوان پرایمر برگشت با توالی 5TCCTCCGCTTATTGATATGC3)تکثیر شد.

سپس، ژن مربوطه را PCR کرده و سپس الکتروفورز شد و در صورت مثبت بودن و عدم آلودگی DNA قارچ، قطعه مورد نظر تعیین توالی شده و 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 قارچ‌ها استفاده شد. سپس، دوره زمانی که قارچ‌ها بالاترین میزان رشد را دارند مشخص شد (۶).

در ابتدا از لام نئوبار برای شمارش اسپورهای تلقیحی قارچ‌ها استفاده شد. تعداد اسپورهایی که برای تلقیح پس از ۵ روز به کار برده شد به طور تقریبی حدود ۱۳۰ اسپور بر میلی‌لیتر در نظر گرفته شد.

عامل‌های مورد بررسی برای بهینه‌سازی تولید آنزیم عبارتند از: دما (۵ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد)، اسیدیته (۳ و ۹)، منبع کربنی (گلوکز، آب پنیر و استویا[4])، سولفات آمونیوم (۰/۵ و ۵ گرم بر لیتر) و سولفات منگنز (۱ و ۵ گرم بر لیتر) که اثر منفرد و متقابل آن‌ها بر تولید آنزیم پکتیناز بررسی شد. علت به‌کارگیری این عامل‌ها تاثیر چشمگیر آن‌ها بر تولید آنزیم پکتیناز در مطالعات قبلی بوده است.

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 ۱۰گرم، فسفات پتاسیم ۱گرم، سدیم نیترات ۲گرم، پتاسیم کلراید ۰/۵گرم، منزیم سولفات ۷ آبه ۰/۵گرم، سولفات آهن ۷ آبه ۰/۰۱گرم، آگار ۲۰ گرم، سولفات آمونیوم ۲گرم، سولفات منگنز ۰/۰۱گرم، سولفات مس ۵ آبه ۰/۰۰۱گرم، عصاره مخمر ۰/۱گرم، پپتون ۰/۲گرم و قند ۱گرم 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 کرده برای ۳۰ دقیقه در ۱۹ درجه سانتی‌گراد و دور شیکر ۱۴۰ rpm بر روی شیکر چرخان قرار داده شد. مخلوط را از طریق کاغذ صافی واتمن فیلتر کرده محلول به‌دست آمده در دور g ۸۰۰۰ در ۴ درجه سانتی‌گراد 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 دی نیتروسالیسیلیک 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 توسط دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۴۰ اندازه‌گیری شد. هر واحد فعالیت پکتیناز به عنوان مقدار آنزیمی که ۱ماکرومول گلوکز را در هر دقیقه آزاد می‌کند، تعیین می‌شود (۸).

الکتروفورز سدیم دو دسیل سولفات (SDS- PAGE): برای انجام الکتروفورز نیاز به محلولی کمابیش خالص از لحاظ آنزیم مورد نظر است که پس از القای فعالیت و تولید آنزیم در محیط کشت از سانتریکون برای تغلیظ آنزیم استفاده شد. سپس، برای به‌دست آوردن وزن مولکولی آنزیم از روش SDS-PAGE 12% استفاده شد. رنگ آمیزی ژل توسط کوماسی بلو R-250 برای ظاهر شدن باندها انجام شد.

طراحی آزمایش و تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل آماری براساس 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 فاکتوریل در نرم‌افزار مینی‌تب یک سری آزمایش طراحی شد (۹). در ابتدا با استفاده از طراحی آزمایش فاکتوریل کسری ۸ آزمایش طراحی شد تا عامل‌های موثر شناسایی شوند؛ سپس، با به کارگیری عامل‌های موثر طراحی آزمایش فاکتوریل کامل انجام شد (جدول‌های ۱، ۲ و ۳).

جدول ۱- آزمایشات طراحی شده با روش کسری فاکتوریل برای ۳ قارچ غربال‌گری شده در حضور منبع کربنی گلوکز

شماره آزمایش	دما	اسیدیته	غلظت گلوکز (گرم بر لیتر)	سولفات آمونیوم (گرم بر لیتر)	سولفات منگنز (گرم بر لیتر)
۱	۵	۳	۱۵	۵	۱
۲	۵	۳	۵	۵	۵
۳	۶۰	۳	۱۵	۰/۵	۵
۴	۵	۹	۱۵	۰/۵	۱
۵	۶۰	۹	۵	۵	۱
۶	۶۰	۳	۵	۰/۵	۱
۷	۵	۹	۵	۰/۵	۵
۸	۶۰	۹	۱۵	۵	۵

جدول ۲- آزمایشات طراحی شده با روش کسری فاکتوریل برای ۳ قارچ غربال‌گری شده در حضور منبع کربنی استویا

شماره آزمایش	دما	اسیدیته	غلظت استویا (گرم بر لیتر)	سولفات آمونیوم (گرم بر لیتر)	سولفات منگنز (گرم بر لیتر)
۱	۵	۳	۱۵	۵	۱
۲	۵	۹	۱۵	۰/۵	۱
۳	۵	۳	۵	۵	۵
۴	۶۰	۳	۵	۰/۵	۱
۵	۶۰	۹	۵	۵	۱
۶	۶۰	۹	۱۵	۵	۵
۷	۵	۹	۵	۰/۵	۵
۸	۶۰	۳	۱۵	۰/۵	۵

جدول ۳- آزمایشات طراحی شده با روش کسری فاکتوریل برای ۳ قارچ غربال‌گری شده در حضور منبع کربنی آب پنیر

شماره آزمایش	دما	اسیدیته	غلظت آب پنیر (گرم بر لیتر)	سولفات آمونیوم (گرم بر لیتر)	سولفات منگنز (گرم بر لیتر)
۱	۶۰	۹	۱۵	۵	۵
۲	۵	۹	۱۵	۰/۵	۱
۳	۶۰	۹	۵	۵	۱
۴	۶۰	۳	۵	۰/۵	۱
۵	۵	۳	۵	۵	۵
۶	۶۰	۳	۱۵	۰/۵	۵
۷	۵	۳	۱۵	۵	۱
۸	۵	۹	۵	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 در نظر گرفته شد. ۳ سویه‌ای که در این آزمایش بهترین عملکرد را نشان دادند با شناسایی ریخت‌شناختی توسط کلید شناسایی پیت و با استفاده از ویژگی‌های میکروسکوپی و ماکروسکوپی بررسی شدند. نتایج این بررسی به شرح زیر است:

سویه ۲، در کشت مورد نظر وزیکول‌ها بیشتر دو ردیفه، با قطر میانگین ۵۰ میکرومتر متولا تمامی سطح وزیکول را می‌پوشاند، اندازه متولا ۱۲×۶ و اندازه فیالیدها ۳×۷ میکرومتر کنیدی‌ها گرد، بیشتر بسیار زبر و با قطر میانگین ۳/۹ -۳/۵ میکرومتر بود، بنابراین، *آسپرژیلوس نایجر*[8] معرفی شد (شکل ۱).

سویه ۳، دارای هیف‌های عریض و پهنی بود که از یک نقطه روی هیف اسپورانژیوفور خارج می‌شود و ممکن است این اسپورانژیوفور در قسمت فوقانی منشعب شود. در انتهای اسپورانژیوفور عضو برجسته‌ای به نام کلوملا[9] وجود دارد. از دیگر اجزای این قارچ کیسه متورمی است که اسپورانژیوم نام دارد. در داخل اسپورانژیوم تعداد زیادی کنیدیوسپور با بالغ شدن اسپورانژیوم دیواره آن شکسته و کنیدیوسپورها آزاد می‌شوند؛ با توجه به این ویژگی‌ها این سویه، *ریزوپوس اوریزه*[10] معرفی شد (شکل ۲).

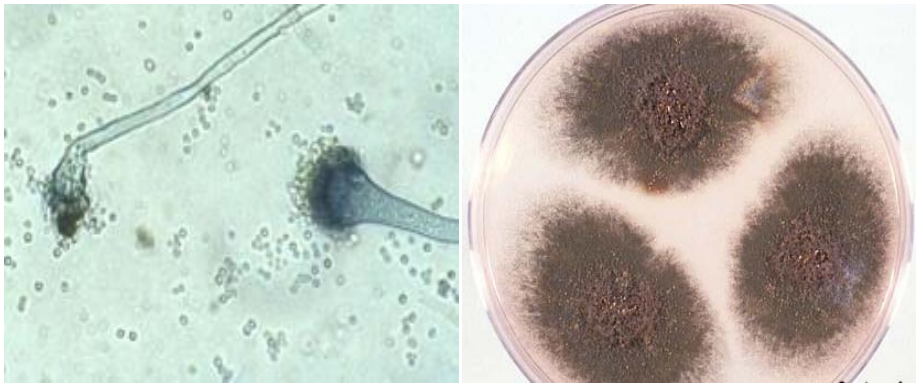
سویه ۵ نیز با توجه به ویژگی‌های میکروسکوپی شامل: هیف‌های شفاف و واجد تیغه میانی، کونیدی‌های دارای دیواره عرضی (تیغه میانی) و کونیدیوفورهایی که منشعب می‌شوند و بخشی به نام متولا را ایجاد می‌کنند. روی هر متولا یک یا چند استریگما یا فیلالید وجود دارد و روی هر فیالید یک ردیف کونیدیوسپور کروی شکل به رنگ آبی یا سبز با دیواره صاف یا خاردار وجود دارد؛ بنابراین، این سویه *پنی‌سیلیوم کریزوژنوم*[11] معرفی شد (شکل ۳).

بر اساس میزان تولید آنزیم پکتیناز در محیط کشت مایع پکتین‌دار، مقایسه‌ای بین سویه‌های استاندارد به‌دست آمده انجام شد. درصد تولید آنزیم با توجه به حجم معینی از اسپورها که توسط لام نئوبار بین ۱۲۰ تا ۱۳۰ اسپور شمارش شد، پس از ۷ روزه محاسبه شد.

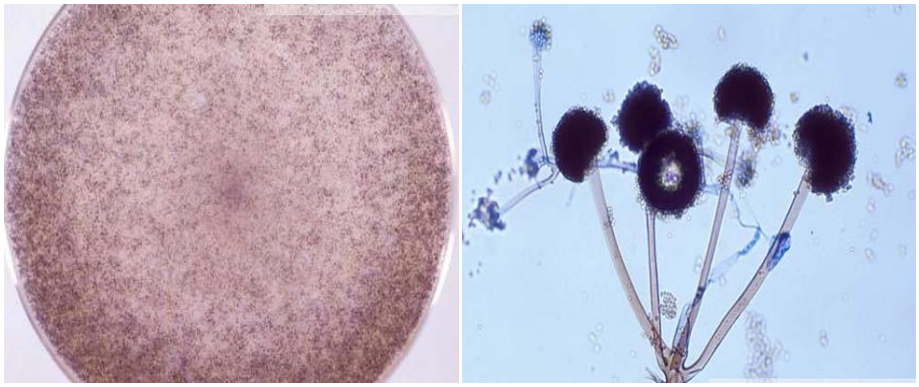
همان‌طور که مشاهده می‌شود (جدول ۴) پس از ۷ روز بیش‌ترین تولید آنزیم و بیش‌ترین رشد مشاهده شده مربوط به سویه ۲، ۳ و ۵ است. بدین ترتیب که سویه ۲ بالاترین میزان تولید آنزیم (۰/۵۶۷) را نشان داد و پس از آن سویه ۳ و ۵ میزان تولید آنزیم بالایی را نشان دادند.

جدول ۴- نتایج حاصل از تولید آنزیم پکتیناز در محیط کشت مایع پکتین‌دار

سویه‌های قارچی	میزان تولید آنزیم پکتیناز پس از ۷ روز (میلی گرم/ میلی‌لیتر)
سویه۱	۰/۳۵۸
سویه۲	۰/۵۶۷
سویه۳	۰/۴۴۷
سویه۴	۰/۳۵۷
سویه۵	۰/۴۱۴
سویه۶	۰/۲۳۰
سویه۷	۰/۲۴۹



شکل ۱- تصاویر ماکروسکوپی و میکروسکوپی از قارچ *آسپرژیلوس نایجر* (بزرگنمایی ×۱۰۰۰)



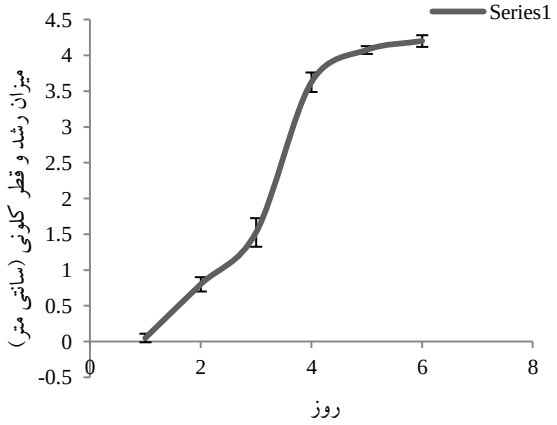
شکل ۲- تصاویر ماکروسکوپی و میکروسکوپی از قارچ *ریزوپوس اوریزه*

شکل ۳- تصاویر ماکروسکوپی و میکروسکوپی از قارچ *پنی‌سیلیوم کریزوژنوم* (برزگنمایی × ۱۰۰۰)

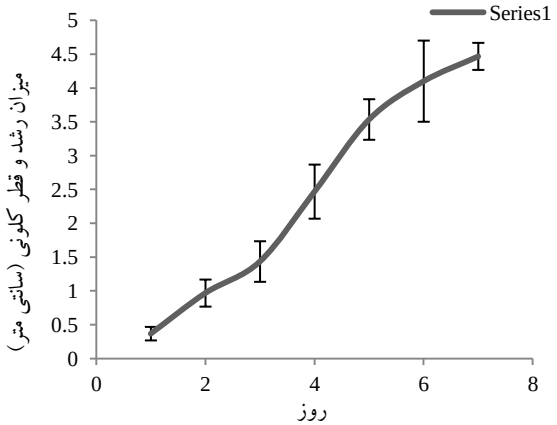
براساس میزان آنزیم تولید شده، از بین ۷ سویه، سویه‌های *آسپرژیلوس نایجر*، *پنی‌سیلیوم کریزوژنوم* و *ریزوپوس اوریزه* بهترین تولید کننده آنزیم پکتیناز بودند. در ابتدا قبل از انجام آزمایش‌های بهینه‌سازی توسط نرم افزار مینی‌تب یک دوره زمانی برای اینکه هر کدام از قارچ‌های مورد نظر ما در چه دوره زمانی بهترین رشد و بالاترین میزان تولید آنزیم را دارند انجام شد.

همچنین؛ یک سری بهینه‌سازی تک فاکتوره استفاده شد. پس از تعیین یک سری شرایط بهینه، بهترین سویه‌ها از نظر میزان تولید آنزیم پکتیناز شناسایی شد.

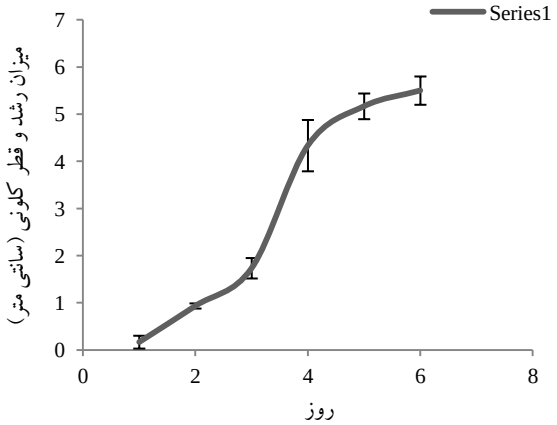
شکل‌های ۴، ۵ و ۶ در زیر به ترتیب منحنی‌های مربوط به رشد قارچ را نشان می‌دهند.



شکل ۴- نمودار رشدی قارچ *آسپرژیلوس نایجر* در یک دوره زمانی ۷ روزه در محیط کشت پکتین‌دار، دمای ۳۰ درجه



شکل ۵- منحنی رشدی *ریزوپوس اوریزه* در یک دوره زمانی ۷ روزه در محیط کشت پکتین‌دار، دمای ۳۰ درجه



شکل۶- منحنی رشد قارچ *پنی‌سیلیوم کریزوژنوم* در یک دوره زمانی ۷ روزه در محیط کشت پکتین‌دار، دمای ۳۰ درجه

نتایج نشان داد که با افزایش زمان، اندازه قطر کلونی افزایش می‌یابد. به‌طوری‌که بالاترین میزان رشد پس از ۶ روز به‌دست آمد و پس از آن رشد ثابت ماند.

شناسایی مولکولی سویه‌ها از طریق توالی ITS rDNA: ۳ سویه مورد نظر به شکل مولکولی و از طریق توالی ITS rDNA و پرایمرهای ITS1,4 (طول پرایمرها به ترتیب ۱۹ و ۲۰ نوکلئوتید بود) توالی‌یابی شدند. توالی‌های به‌دست آمده (سویه ۲ حدود ۹۰۰ نوکلئوتید و سویه ۳ و ۵ با ۱۱۰۰ نوکلئیک اسید) توسط پایگاه داده NCBI با توالی‌های مشابه بلاست شد. سویه ۲ و ۳ حدود ۱۰۰ درصد شباهت را به ترتیب با *آسپرژیلوس نایجر* سویه F207 و *ریزوپوس اوریزه* سویه ۳/ ۸ M نشان دادند. سویه ۵ به میزان ۸۶ درصد شباهت را با *پنی‌سیلیوم کریزوژنوم* ویسکونزین ۵۴-۱۲۵۵ نشان داد که این سویه به عنوان یک سویه جدید با شماره دسترسی KC862754 در سایت GeneBank ثبت شد.

نتایج بهینه‌سازی تولید آنزیم پکتیناز از قارچ *آسپرژیلوس نایجر*، *ریزوپوس اوریزه* و *پنی‌سیلیوم* به روش کسری از فاکتوریل: هدف استفاده از طراحی کسری از فاکتوریل، تشخیص عوامل موثر بر تولید آنزیم از قارچ‌های یاد شده بود.

نمودارهای مربوط به آزمایش‌های فاکتوریل کسری انجام شده بر قارچ‌های *آسپرژیلوس نایجر*، *ریزوپوس اوریزه* و *پنی‌سیلیوم کریزوژنوم* در حضور ۳ منبع کربنی مختلف گلوکز، آب پنیر و استویا انجام شد تا عوامل موثر بر تولید آنزیم پکتیناز شناسایی شود. سپس، انجام آزمایش‌های فاکتوریل کامل فقط در حضور عوامل موثر انجام شد. *P value* کوچکتر از ۰/۰۱ به این معناست که عامل مورد نظر بسیار مهم است و در صورتی که *P value* بین ۰/۰۱ تا ۰/۰۵ باشد، یعنی عامل

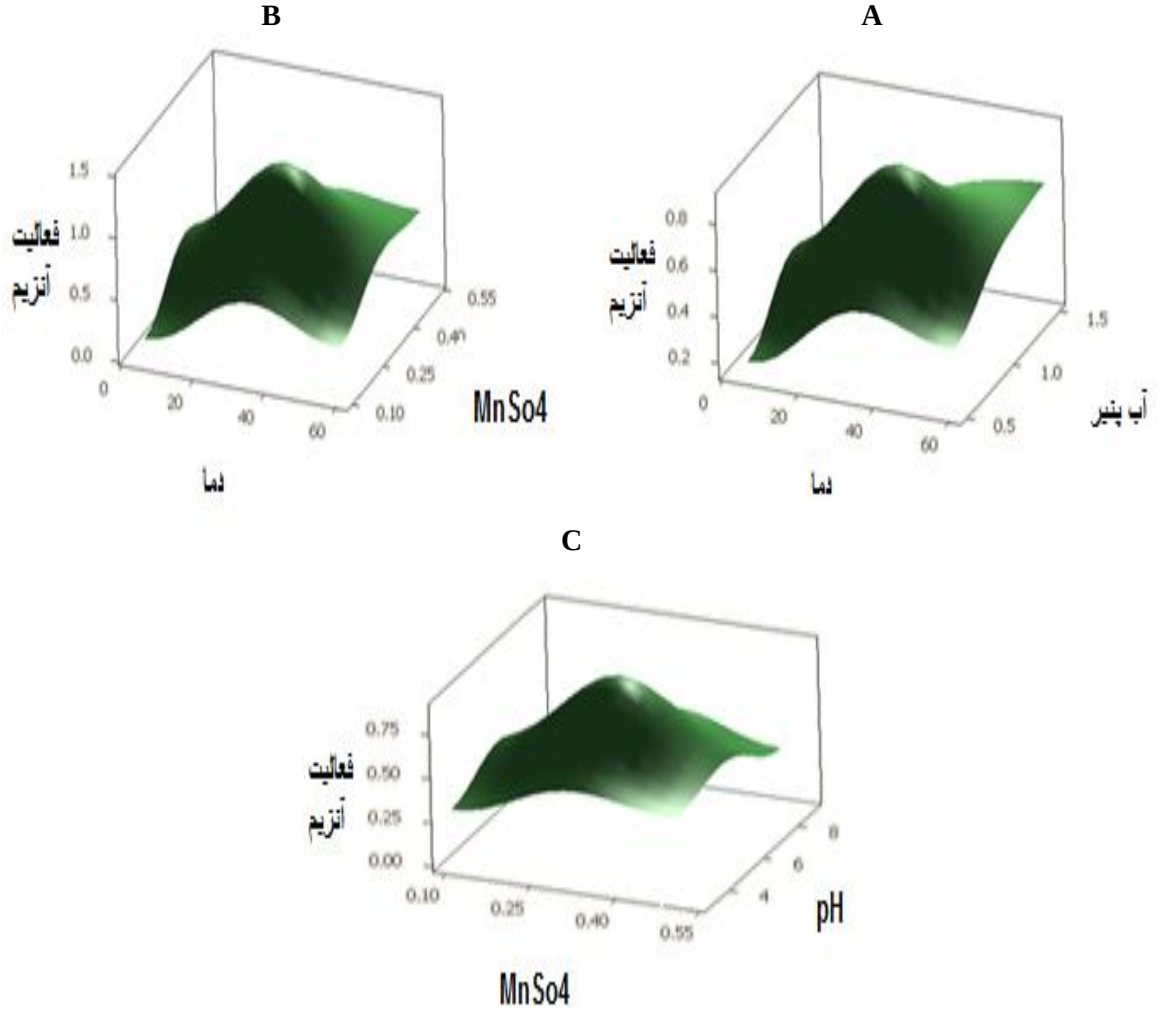
مورد نظر اثر مهمی در پاسخ دارد. اما *P value* بیشتر از ۰/۱ احتمال خطا را نشان می‌دهد و نشان دهنده بی‌اثر بودن عامل است. در بین ۵ متغیر ارایه شده در این فرآیند، متغیرهایی که دارای P بیشتر از ۰/۰۵ هستند اهمیت کمتری داشته و در مدل ارایه شده نقش کمتری دارند. عوامل موثر در آزمایش‌های فاکتوریل کسری انجام شده برای ۳ سویه مورد نظر در جدول ۵ آورده شده است.

نتایج بهینه‌سازی تولید آنزیم پکتیناز از قارچ *آسپرژیلوس نایجر* به روش فاکتوریل کامل: برای *آسپرژیلوس نایجر* در آزمایشی که با منبع کربنی استویا انجام شد، با انجام آزمایش فاکتوریل کامل برای ۵ عامل موثر نتایج بدست آمده نشان داد که نقطه مرکزی مقدارهای استفاده شده برای فاکتورهای مورد نظر بالاترین میزان تولید آنزیم (۰/۸۷۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) را خود نشان داد. همچنین، در این آزمایش مشاهده شد که قارچ *آسپرژیلوس نایجر* 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. همچنین، میزان تولید آنزیم پکتیناز در این آزمایش که در حضور منبع کربنی استویا در کنار منبع کربنی پکتین انجام شد نسبت به نمونه شاهد افزایش یافت. آزمایش فاکتوریل کسری که با منبع گلوکز برای *آسپرژیلوس نایجر* انجام شد، ۴ عامل و همچنین، برهمکنش متقابل بین غلظت گلوکز-pH و MnSo4 -pH موثر معرفی شد. با طراحی آزمایش فاکتوریل کامل برای این ۴ عامل موثر نتایجی که بدست آمد نشان دهنده تولید بالای آنزیم پکتیناز (۱/۳۲۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در نقطه مرکزی عامل‌های به‌کار 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 نشان داد. این آزمایش نسبت به نمونه شاهد که فقط حاوی منبع کربنی پکتین بود میزان رشد و تولید آنزیم بالاتری را نشان داد.

جدول ۵- عامل‌های موثر برای ۳ سویه مورد نظر توسط روش طراحی آزمایش فاکتوریل کسری

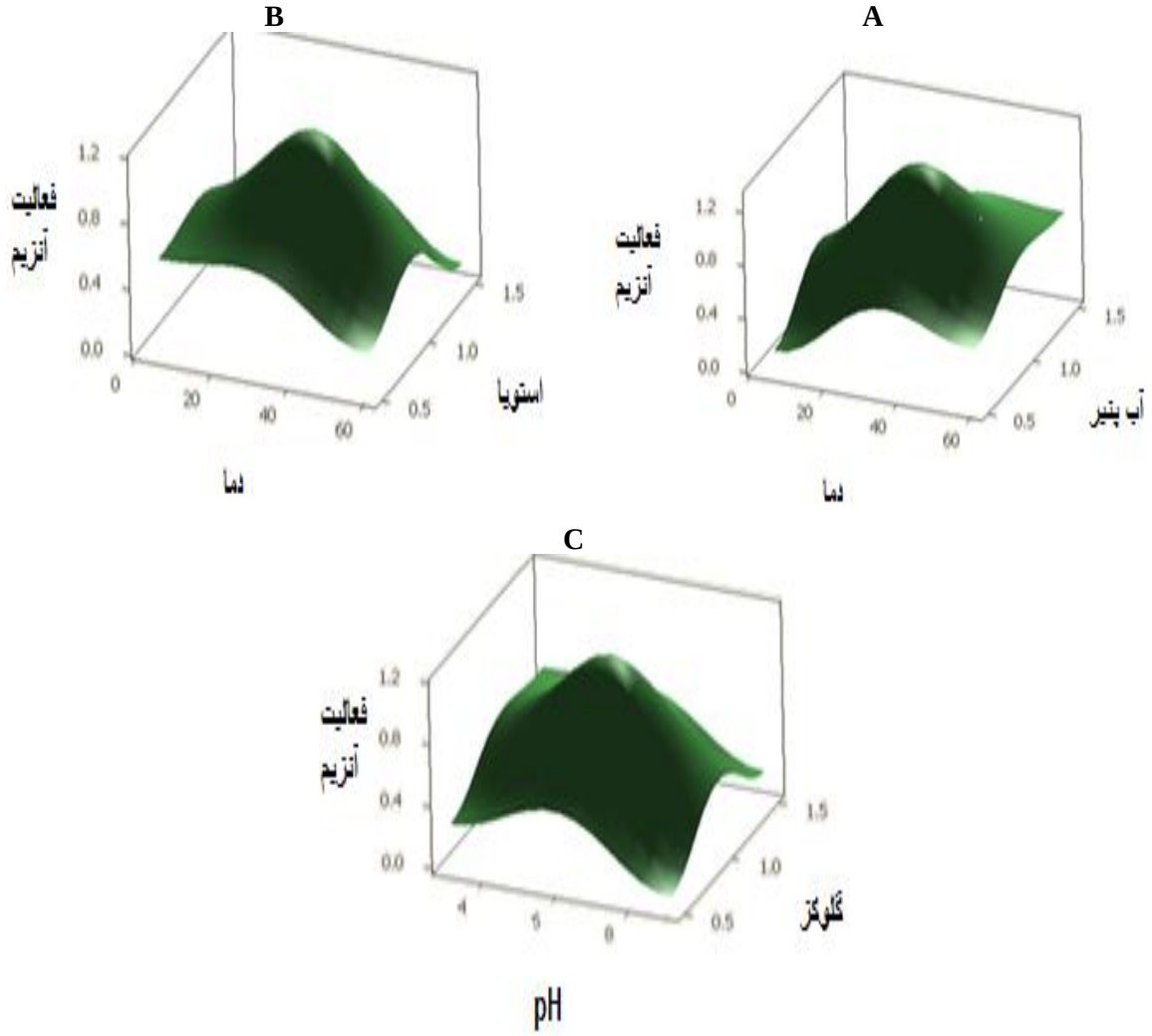
میکروارگانیسم	منبع کربن	عامل‌های موثر	*P-Value*
آسپرژیلوس نایجر	گلوکز	دما، غلظت گلوکز و سولفات منگنز و اسیدیته	۰/۰۰۲>
	استویا	۵ عامل	۰/۰۱>
	آب پنیر	دما، غلظت آب پنیر و سولفات منگنز و اسیدیته	۰/۰۰۱>
ریزوپوس اوریزه	گلوکز	اسیدیته غلظت گلوکز و	۰/۰۳>
	استویا	دما، غلظت سولفات منگنز و سولفات آمونیوم	۰/۰۱>
	آب پنیر	۵ عامل	۰/۰۰۰۱
پنی‌سیلیوم کریزوژنوم	گلوکز	دما	۰/۰۰۰۱
	استویا	دما، غلظت استویا واسیدیته	۰/۰۰۰۱
	آب پنیر	دما، غلظت آب پنیر و سولفات منگنز	۰/۰۱>

در مورد منبع کربنی آب پنیر نیز با انجام طراحی آزمایش فاکتوریل کامل با ۴ عامل موثر 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. نکته مهمی که در این آزمایش بدست آمد، رشد قارچ *آسپرژیلوس نایجر* 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. در این آزمایش نیز میزان تولید آنزیم نسبت به نمونه شاهد بالاتر بود (شکل ۷).

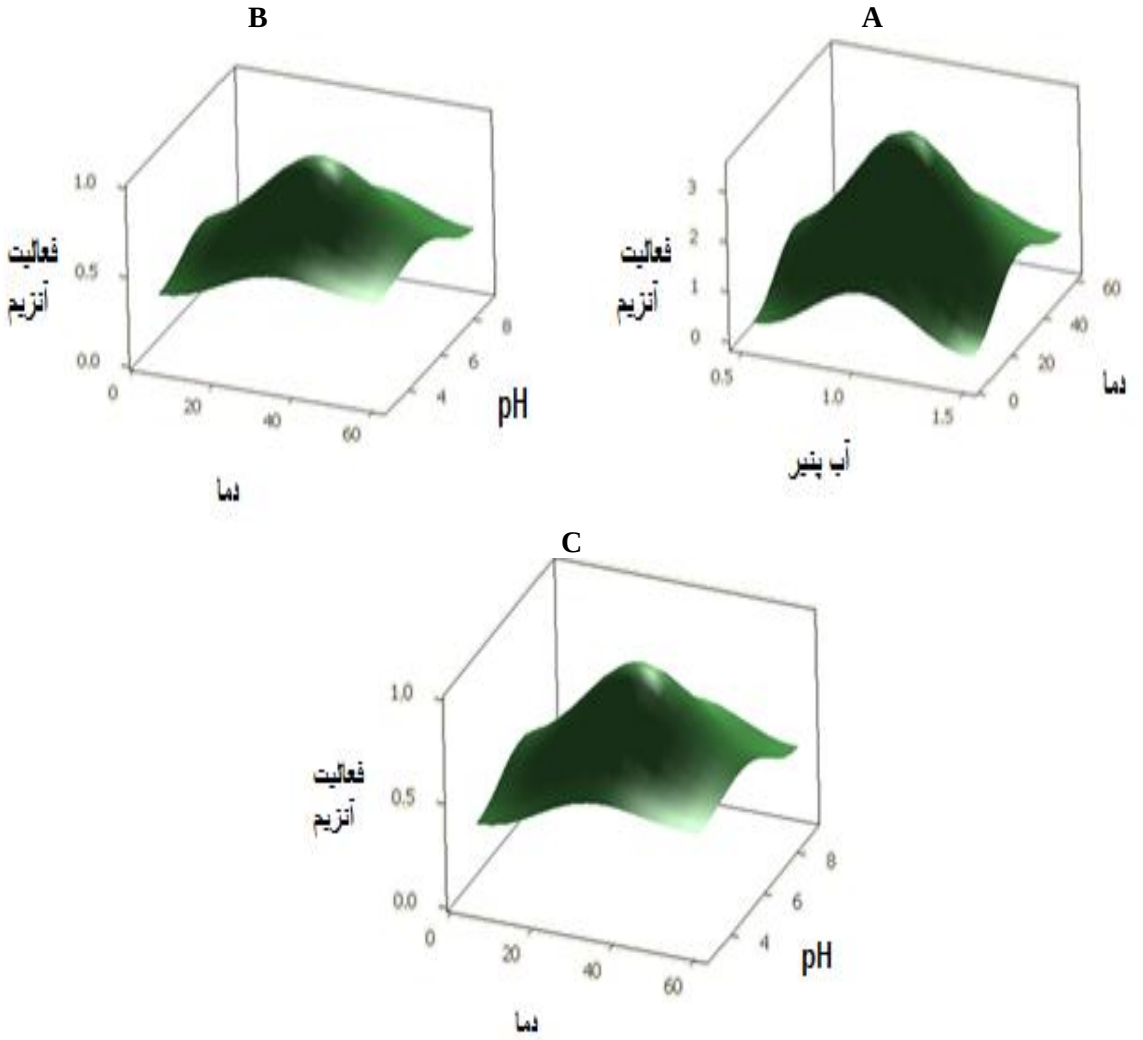


شکل ۷- منحنی ۳ بعدی سطحی تولید آنزیم پکتیناز در حضور منبع کربنی آب پنیر (**A**)، گلوکز (**B**) و استویا (**C**) مربوط به قارچ *آسپرژیلوس نایجر*

نتایج بهینه‌سازی تولید آنزیم پکتیناز از قارچ *ریزوپوس اوریزه* به روش فاکتوریل کامل: بر اساس آزمایشاتی که برای قارچ *ریزوپوس اوریزه* با منبع گلوکز انجام شد، ۲ عامل اسیدیته و غلظت گلوکز مؤثر معرفی شد. آزمایش دوباره با این ۲ عامل مؤثر تکرار شد. تعداد آزمایشاتی که باید انجام می‌شد $۲^۲ =۴$ بود. نتایج به‌دست آمده نشان داد که بهترین شرایط برای تولید بیشتر آنزیم پکتیناز (۰/۸۹۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) نقطه مرکزی فاکتورهای مورد نظر (اسیدیته و غلظت گلوکز)در آزمایشات کسری و کامل معرفی شد. البته در اسیدیته ۳، دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، غلظت ۱۵ گرم بر لیتر گلوکز، غلظت ۰/۵ گرم بر لیتر سولفات آمونیوم و غلظت ۵ گرم بر لیتر سولفات منگنز نیز تولید بالای آنزیم پکتیناز توسط سویه ریزوپوس اوریزه در آزمایش‌های فاکتوریل کسری مشاهده شد (شکل ۸).



شکل ۸- منحنی ۳ بعدی سطحی تولید آنزیم پکتیناز در حضور منبع کربنی آب پنیر (**A**)، استویا (**B**) و گلوکز (**C**) مربوط به قارچ *ریزوپوس اوریزه*

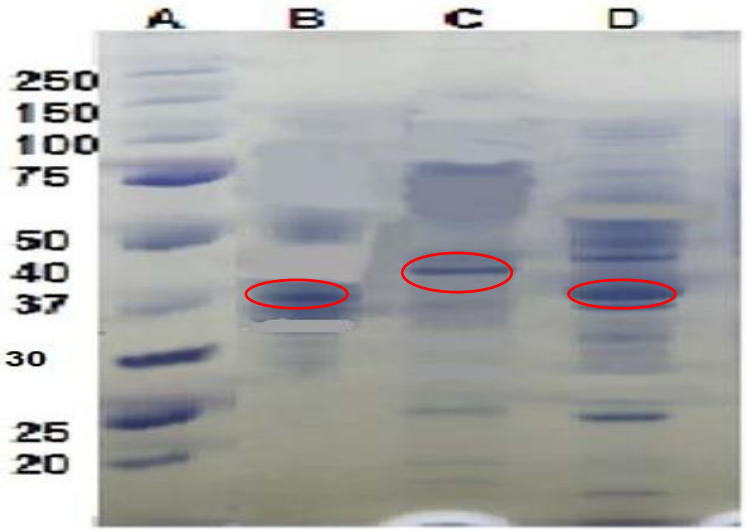


شکل ۹- منحنی ۳ بعدی سطحی تولید آنزیم پکتیناز در حضور منبع کربنی آب پنیر (**A**)، استویا (**B**) و گلوکز (**C**) مربوط به قارچ *پنی‌سیلیوم کریزوژنوم*

نتایج بهینه‌سازی تولید آنزیم پکتیناز از قارچ *پنی‌سیلیوم کریزوژنوم* به روش فاکتوریل کامل: در مورد قارچ *پنی‌سیلیوم*، آزمایشاتی که با منبع کربنی آب پنیر توسط طراحی فاکتوریل کسری انجام شد ۳ عامل موثر را به ما معرفی کرد. با استفاده از این ۳ عامل دوباره طراحی آزمایش با فاکتوریل کامل انجام شد. بهترین شرایط برای تولید بالای آنزیم پکتیناز با غلظت ۱/۰۳۹ در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد، غلظت ۱۰ گرم بر لیتر آب پنیر و غلظت ۳ گرم بر لیتر سولفات منگنز بود. در این آزمایش تولید و فعالیت آنزیم پکتیناز در دمای ۶۰ درجه، غلظت ۵گرم بر لیتر سولفات منگنز و غلظت ۱۵ گرم بر لیتر آب پنیر نیز به طور مناسبی دیده شد. طراحی آزمایش فاکتوریل کسری که برای منبع کربنی استویا انجام شد ۳ عامل مورد نظر موثر معرفی شد. با انجام یک آزمایش فاکتوریل کامل نتایج تولید بهینه آنزیم با غلظت ۰/۹۶۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر را در دمای ۳۲ درجه، اسیدیته ۶، غلظت ۳ گرم بر لیتر سولفات منگنز و ۲/۷۵ گرم بر لیتر سولفات آمونیوم و غلظت ۱۰ گرم بر لیتر استویا معرفی شد. البته نتایج نشان دادند که در دمای ۶۰ درجه، اسیدیته ۳، غلظت ۵ گرم بر لیتر استویا، غلظت

۵ گرم بر لیتر سولفات آمونیوم و غلظت ۱۰ گرم بر لیتر سولفات منگنز نیز تولید آنزیم پکتیناز وجود دارد. در آزمایش‌هایی که با منبع گلوکز انجام شد تنها عامل موثر دما معرفی شد و بهینه تولید آنزیم در نقطه مرکزی میزان عامل‌های تعیین شده با غلظت ۱/۱۶۰ بود که نسبت به نمونه شاهد تولید آنزیم افزایش در خور توجهی نشان داد. با توجه به نتایج بدست آمده در بالا می‌توان گفت که برای هر ۳ نوع منبع کربنی بهترین شرایط برای تولید بالای آنزیم پکتیناز نقطه مرکزی مقدارهای تعیین شده بود (شکل ۹).

الکتروفورز سدیم دو دسیل سولفات: آنزیم پکتینازی که در این پژوهش از *آسپرژیلوس نایجر*، *ریزوپوس اوریزه* و *پنی‌سیلیوم* استخراج شد، طبق نتایج الکتروفورز سدیم دودسیل سولفات به ترتیب دارای وزن مولکولی ۴۰، ۳۷ و ۳۷ کیلودالتون بود که در شکل ۱۰ مشاهده می‌شود. با بررسی مطالعات قبلی و نتایج بدست آمده وزن مولکولی کمابیش مشابهی برای ۳ سویه مورد نظر گزارش شده است. در نتیجه با توجه به وزن مولکولی گزارش شده در منابع احتمالا نقاط مشخص شده مربوط به آنزیم پکتیناز است.



شکل ۱۰- باندهای بدست آمده از آنزیم پکتیناز بر روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE برای *ریزوپوس اوریزه* باند (**B**)، برای *آسپرژیلوس نایجر* باند (**C**) و برای پنی سیلیوم باند (**D**).

بحث و نتیجه‌گیری

تولید آنزیم پکتیناز برای ۳ سویه قارچی در شرایط دمایی مختلف: آنزیم‌ها در دماهای مختلف فعالیت آنزیمی متفاوتی از خود نشان می‌دهند. در دماهای بالا آنزیم‌ها ناپایدار بوده و فعالیت خود را از دست می‌دهند. دمای غیر فعال شدن آنزیم تقریبا همیشه به تجزیه شدن ساختار پروتئینی آنزیم نسبت داده می‌شود (۱۰). نتایج این پژوهش نشان داد که ۳ سویه قارچی *آسپرژیلوس نایجر*، *پنی‌سیلیوم کریزوژنوم* و *ریزوپوس اوریزه* در دامنه دمایی ۵ تا ۶۰ درجه توانایی رشد و تولید آنزیم پکتیناز را داشتند. البته بالاترین میزان رشد و تولید آنزیم پکتیناز در دمای ۳۰ درجه گزارش شد که دمایی بهینه برای قارچ‌ها و فعالیت آنزیم پکتیناز است. از آنجا که تحمل دماهای بالا برای فعالیت آنزیم در صنعت از

اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، می‌توان نتیجه گرفت که این ۳ سویه گزینه‌های مناسبی برای استفاده در صنعت هستند. مطالعات قبلی نیز نشان می‌دهد که سویه‌های *آسپرژیلوس نایجر*، *پنی‌سیلیوم کریزوژنوم* و *ریزوپوس اوریزه* دارای بالاترین میزان رشد و فعالیت آنزیم پکتیناز در دامنه دمایی ۲۸ تا ۳۵ درجه سانتی‌گراد هستند. همچنین، گزارشاتی نیز وجود دارد که آنزیم پکتیناز جداسازی شده از *ریزوپوس اوریزه* توانایی فعالیت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد را برای ۴۵ دقیقه داراست؛ ولی گزارشاتی از تحمل دمای بالای ۵۰ درجه برای *آسپرژیلوس نایجر* و *پنی‌سیلیوم* وجود ندارد. مارتین[۱۲] و همکارانش در سال ۲۰۰۴ گزارش کردند که پلی‌گالاکتورونازِ حاصل از *پنی‌سیلیوم کریزوژنوم* حدود ۷۰ درصد از فعالیت خود را در دمای ۵۰ درجه حفظ می‌کند (۱۱). بالدوین[۱۳] در سال ۱۹۹۰ گزارش کرد که اثر دما بر روی فعالیت پکتین لیاز حاصل از *پنی‌سیلیوم ایتالیکوم* یک افزایشی را تا ۵۰ درجه نیز نشان می‌دهد. پکتین لیاز حاصل از *پنی‌سیلیوم ایتالیکوم* پایداری گرمایی بالاتری نسبت به پکتین لیازهای حاصل از سویه‌های *پنی‌سیلیومی* دیگر دارد (۱۲).

تولید آنزیم پکتیناز برای ۳ سویه قارچی در اسیدیته‌های مختلف: فعالیت آنزیم به نحو در خور توجهی از اسیدیته تاثیر می‌پذیرد. این امر به این علت است که اتصال سوبسترا و کاتالیزور بیشتر به توزیع بار، هم بر روی سوبسترا و هم مولکول آنزیم بستگی دارد. توزیع بار بر پروتئین‌ها توسط حالت زنجیره‌های قابل یونیزه در اسیدآمینه‌های تشکیل دهنده آن‌ها تعیین می‌شود که این امر خود به اسیدیته بستگی دارد و می‌تواند به طور مستقیم بر اتصال سوبسترا و خاصیت کاتالیزوری تاثیر بگذارد. بیش‌ترین فعالیت آنزیم پکتیناز برای سویه‌های قارچی در اسیدیته اسیدیک رو به خنثی است و می‌توان گفت به علت اسید دوست بودن قارچ‌ها بوده و اینکه تحمل آن‌ها به اسیدیته اسیدیک نسبت به باکتری‌ها بیشتر است. طی پژوهشی که توسط هوانگ[۱۴] انجام شد یک پلی گالاکتورونازِ اسیدی توسط *ریزوپوس اوریزه* سویه MTCC-1987 در شرایط تخمیر غوطه‌ور جداسازی شد (۱۳).

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که این ۳ سویه قارچی دارای توانایی لازم برای فعالیت در دامنه اسیدیته بین ۳ تا ۹ هستند. بالاترین میزان رشد و فعالیت آنزیم پکتیناز در این آزمایش‌ها در اسیدیته ۶ مشاهده شد. همچنین، تولید آنزیم پکتیناز حاصل از این ۳ سویه توانایی لازم برای فعالیت در اسیدیته ۳ را نیز دارا بود که این یک مزیت برای استفاده آنزیم پکتیناز حاصل از این سویه‌ها در صنایع مختلف به ویژه در صنعت آبمیوه‌سازی است. مطالعات قبلی نیز نشان می‌دهد که بالاترین میزان فعالیت آنزیم پکتیناز حاصل از این سویه‌ها در اسیدیته بین ۵ تا ۶/۵ بوده است. پیکولی[۱۵] در سال ۲۰۰۷ از *آسپرژیلوس نایجر* برای بهینه‌سازی تولید آنزیم پکتیناز استفاده کرد که بهترین شرایط بهینه برای تولید آنزیم منبع کربن پکتین مرکبات و سبوس گندم، کلسیم کلراید ۰/۲ درصد و اسیدیته حدود ۴/۵ بدست آمد. (۱۴). هووا و هانگ[۱۶] در سال ۲۰۱۳ با استفاده از روش آماری طراحی باکس بنکن به همراه ۴ عامل رطوبت، اسیدیته، دما و زمان تخمیر در ۳ سطح استفاده شده است. شرایط بهینه برای *آسپرژیلوس اوریزه* برای تولید بالای فعالیت آنزیم پکتیناز و سلولاز، ۶۷ درصد رطوبت، اسیدیته ۵/۹ اسیدیته، دمای ۳۳ درجه سانتی‌گراد و ۷۲ ساعت زمان تخمیر برآورد شد. پیکولی[۱۷] در سال ۲۰۰۱ نشان داد که میزان بالای تولید

پلی گالاکتوروناز و پکتین استراز توسط *پنی‌سیلیوم گریسئوروسئوم* در اسیدیته‌های بیشتر اسیدی ۴ تا ۵ و پکتین لیاز در اسیدیته‌های خنثی ۵ تا ۷ بهترین فعالیت آنزیمی را دارند. بانو[18] در سال ۲۰۰۳ نشان داد که *پنی‌سیلیوم ویریدیکاتوم* ماکزیمم تولید پلی گالاکتوروناز و پکتین لیاز را در اسیدیته ۴/۵ تا ۵ اسیدیته نشان می‌دهد (۱۵). بانو و همکارانش در سال ۲۰۱۰ نشان دادند که *پنی‌سیلیوم کریزوژنوم* ماکزیمم تولید پلی گالاکتوروناز را در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و اسیدیته ۶/۵ دارد. مارسیا[19] و همکارانش در سال ۱۹۹۹ پایداری پلی‌گالاکتوروناز را در مقابل اسیدیته بررسی کردند. نتایج پژوهش ایشان نشان داد که این آنزیم در دامنه اسیدیته ۶ تا ۸ پایدار و بیش‌ترین فعالیت را دارد (۱۶). مارتین و همکارانش در سال ۲۰۰۴ نیز گزارش کردند که پلی گالاکتوروناز حاصل از *پنی‌سیلیوم کریزوژنوم* در اسیدیته ۳ تا ۸ پایدار بوده و حدود ۷۰ درصد از فعالیت خود را در دمای ۷۰ درجه حفظ می‌کند. پکتین لیاز تولید شده توسط این میکروارگانیسم در اسیدیته ۴ تا ۸ اسیدیته (اسیدیک تا خنثی) پایدار است. مطالعات انجام شده نشان می‌دهد پلی گالاکتوروناز تولید شده توسط *پنی‌سیلیوم ویریدیکاتوم* بالاترین فعالیت خود را در اسیدیته ۵ تا ۸ دارد و ۸۰ درصد از فعالیت خود را دراسیدیته ۹ نشان می‌دهد. پکتین لیاز بیشترین پایداری را در اسیدیته ۳/۵ تا ۴/۵ دارد ولی در اسیدیته ۵ و ۶ به ترتیب ۶۰ تا ۸۰ درصد از فعالیت خود را حفظ می‌کند (۱۷).

تولید آنزیم پکتیناز برای ۳ سویه قارچی در حضور منابع کربنی مختلف: منابع کربن که اصولا قندها می‌باشند برای رشد میکروارگانیسم بسیار حیاتی هستند و در نبود آن‌ها میکروارگانیسم‌ها نمی‌توانند رشدی داشته و آنزیم تولید کنند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که ۳ سویه مورد آزمایش در حضور هر ۳ منبع کربن گلوکز، آب پنیر و استویا قابلیت رشد و تولید آنزیم را دارند. بالاترین میزان تولید آنزیم پکتیناز برای قارچ *آسپرژیلوس نایجر* در حضور منبع کربنی گلوکز و برای قارچ‌های *پنی‌سیلیوم* و *ریزوپوس* منبع کربنی آب پنیر بود.

نتایج مشابهی نیز توسط پژوهشگران دریگر گزارش شده است که سویه‌های *آسپرژیلوس نایجر*، *پنی‌سیلیوم* و *ریزوپوس* توانایی تولید آنزیم پکتیناز در حضور منابع کربن (سبوس گندم، پکتین، گلوکز، میوه‌های سیب، پرتقال و غیره) و اسیدیته پایین را دارند. ولی تاکنون هیچ گزارشی از تولید آنزیم پکتیناز توسط این سویه در حضور منبع کربنی آب پنیر و استویا در اسیدیته های بالا ارایه نشده است. آب پنیر یک سوبسترای ارزان قیمت و یک منبع کربنی و نیتروژنی غنی برای رشد میکروارگانیسم‌ها و تولید آنزیم است.

موهد[20] در سال ۲۰۱۲ فعالیت‌های آنزیماتیکی بین ۱۵۳ تا ۴۸۰ IU/g در تخمیر حالت جامد توسط سویه‌های *آسپرژیلوس* که از پوسته گندم یا سویا به عنوان منبع کربن استفاده کرده بود به‌دست آورد. همچنین، طبق مطالعاتی که توسط مالوسی[21] انجام شد وی به وضوح به تاثیر مثبت پکتین مرکبات بر افزایش تولید آنزیم اندو پلی‌گالاکتوروناز در قارچ *آسپرژیلوس اوریزه* در کشت غوطه ور اشاره نمود (۱۸). همچنین، بلالی[22] توانست از پکتین مرکبات به عنوان تنها منبع کربن برای القای ترشح آنزیم پکتیناز خارج سلولی برای قارچ‌های *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلوس فلاووس* استفاده کند (۱۹). او توانست با استفاده از پوست و ضایعات پرتقال به تولید بالایی از پکتیناز از *آسپرژیلوس*

اوریزه در محیط کشت غوطه‌ور برسد (۱۹).

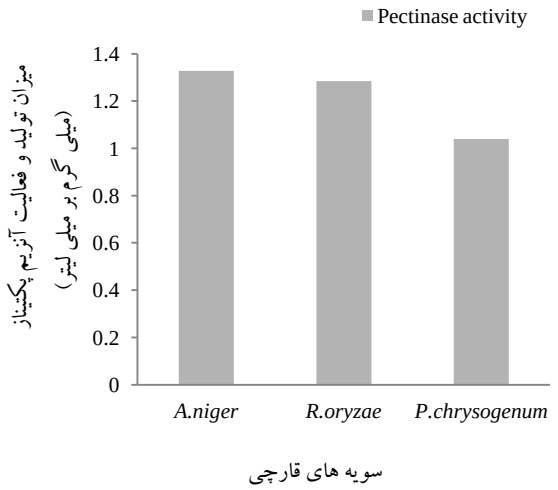
در محیط کشت به‌کار برده شده در این پژوهش برای ۳ سویه قارچی از ۳ منبع کربنی در کنار منبع کربنی پکتین استفاده شد. بدین صورت که قارچ ابتدا از منبع کربنی گلوکز، استویا و یا آب پنیر برای رشد خود استفاده می‌کند تا زمانی که این منبع کربن تمام شود. قارچ که در مرحله ساکن رشد خود رسیده است برای ادامه بقا از پکتینی که در محیط است به عنوان منبع کربن استفاده می‌کند. برای تجزیه پکتین نیاز به آزاد کردن آنزیم پکتیناز دارد. در مقایسه با این ۳ منبع کربنی که استفاده شد گلوکز میزان بالاتری از تولید آنزیم پکتیناز را نشان داد، پس می‌توان نتیجه گرفت که قارچ آسانتر از گلوکز برای رشد خود استفاده کرده درنتیجه با رشد بهتر میسلیوم‌ها آنزیم بیشتری نسبت به نمونه شاهد که فقط از منبع کربنی پکتین استفاده شده بود در محیط تولید می‌شود. همچنین، با مقایسه بین میزان عامل‌های بکار برده شده برای منبع کربنی گلوکز و آب پنیر شرایط یکسانی برای تولید بالای پکتیناز نشان داده شد ولی شرایط برای تولید بالای پکتیناز در استفاده با منبع کرنبی استویا شرایط بهینه متفاوتی را نشان داد که این شاید به ساختار مولکولی استویا برگردد که قارچ در یک شرایط متفاوتی نسبت به منابع کربنی دیگر از آن استفاده می‌کند. مطالعات قبلی نشان داد که *آسپرژیلوس اوریزه* در شرایط تخمیر حالت جامد با سوبستراهای جامد مختلف مانند پوست برنج، باقیمانده‌های سویا، ساقه نیشکر و تفاله انگور، سلولاز و پکتیناز تولید می‌کند. نتایج نشان داد که باقیمانده سویا بهترین سوبسترا برای *آسپرژیلوس اوریزه* برای تولید و بالا بردن فعالیت آنزیم*های* پکتیناز و سلولاز است (۲۰).

تولید آنزیم پکتیناز برای ۳ سویه قارچی در حضور نمک‌های سولفات آمونیوم و سولفات منگنز: وجود نمک‌ها و فلزات مختلف در محیط می‌تواند اثرات متفاوتی بر تولید و فعالیت آنزیم‌ها داشته باشد. طبق مشاهداتی که وجود دارد برخی از یون‌ها مانند منگنز فعالیت پلی‌گالاکتوروناز را افزایش می‌دهند. در مورد نمک آمونیوم سولفات و اثر آن بر فعالیت آنزیمی، مطالعات نشان داده که نمک‌های سولفات و فسفات در غلظت‌های مناسب باعث افزایش تولید آنزیمی از میکروارگانیسم‌ها می‌شود. طبق مشاهداتی که در این پژوهش انجام شد نمک‌های سولفات منگنز و سولفات آمونیوم از عوامل موثر بر تولید آنزیم معرفی شدند. در گزارشات مشابهی نیز توسط پژوهشگران دیگر ارایه شده 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 (۲۱).

مطالعات دیگر نشان می‌دهند که فسفات آمونیوم، آمونیوم سولفات، سدیم نیترات، نیترات آمونیوم بهترین منبع نیتروژن برای تولید پکتیناز توسط *آسپرژیلوس نایجر* (۲۱) و *آسپرژیلوس نایجر* *Y L 128* هستند. اثر منابع فلزی در تولید هر ۲ آنزیم پکتیناز و سلولاز توسط *آسپرژیلوس نایجر* نشان می‌دهد که منگنز سولفات ۵ آبه بهترین منبع فلز برای فعالیت بالای پکتیناز است (۲۲). سوهل[۲۳] در سال ۲۰۰۷ گزارش کرد که در میان یون‌های فلزی آزمایش شده، اضافه کردن ۵ میلی‌مولار کلسیم کلراید فعالیت پکتیناز حاصل از *پنی‌سیلیوم کریزوژنوم* را تا ۳/۵۶ درصد افزایش می‌دهد. منیزیم کلراید و روی کلراید فعالیت آنزیم را تا سطح ۲۱/۲ و ۱۴/۸ درصد مهار می‌کنند. فلزاتی مانند جیوه کلراید و

کبالت کلراید و مس سولفات نیز گزارش شده است که فعالیت آنزیم پکتیناز را حدود ۶۰ درصد کاهش می‌دهند. سوهل[۲۴] در سال ۲۰۰۶ نشان داد که اضافه کردن نیترات آمونیوم و آمونیوم کلراید به محیط کشت حالت جامد قارچ *ریزوپوس اوریزه* می‌تواند میزان تولید آنزیم پکتیناز را افزایش دهد (۲۳).

مقایسه ۳ سویه قارچی مورد استفاده در این پژوهش از نظر تولید آنزیم پکتیناز: مقایسه میزان تولید آنزیم پکتیناز توسط این ۳ سویه مورد آزمایش نشان می‌دهد که سویه *آسپرژیلوس نایجر* نسبت به ۲ سویه دیگر در حضور منبع کربنی گلوکز بالاترین میزان تولید و فعالیت انزیم پکتیناز نشان می‌دهد (شکل ۱۱).



شکل ۱۱- مقایسه بالاترین میزان تولید آنزیم پکتیناز در بین ۳ سویه مطالعه شده در شرایط بهینه شده

البته ۲ سویه *ریزوپوس اوریزه* و *پنی‌سیلیوم* نیز در حضور منبع کربنی آب پنیر که در واقع یک زباله زیستی است به عنوان یک سوبسترای ارزان قیمت محسوب می‌شود، توانایی قابل توجهی از تولید آنزیم پکتیناز را نشان دادند. همچنین، هر ۳ سویه توانایی تولید آنزیم پکتیناز را در دمای ۶۰ و اسیدیته‌های ۳ و ۹ دارند که این یک مزیت برای استفاده در صنایع آبمیوه و نساجی محسوب می‌شود.

در آزمایشات مشابهی، اوکافور[۲۵] در سال ۲۰۱۰، ۵ قارچ رشته‌ای به نام‌های *آسپرژیلوس کلاواتوس*، *آسپرژیلوس نایجر*، *فوزاریوم*، *پنی‌سیلیوم کریزوژنوم* و *تریکودرما* را از نمونه‌های مواد زاید کشاورزی جداسازی کرد و با کشت دادن آنها روی محیط کشت پایه حاوی پکتین بهترین فعالیت تجزیه پکتین را در سویه *آسپرژیلوس نایجر* و *پنی‌سیلیوم کریزوژنوم* مشاهده کرد (۲۴).

پلاکشمینارا سیمها[۲۶] در سال ۲۰۱۲ با جداسازی و غربال‌گری قارچ‌های تولید کننده آنزیم پکتیناز از خاک‌های کشاورزی و غیرکشاورزی مختلف، ۴۴ سویه قارچی را جداسازی کرد که ۴ تا از این قارچ‌ها آنزیم تجزیه‌کننده پکتین بیشتری تولید می‌کنند. ۴ سویه *آسپرژیلوس فلاووس*، *آسپرژیلوس نایجر*، *آسپرژیلوس ژاپونیکوس* و *کیتومیوم گلوبوسوم* بودند که 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 و بالاترین میزات تولید آنزیم مربوط به *آسپرژیلوس نایجر* بود (۲۵).

موهد[۲۷] 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*، *پنی‌سیلیوم*، *ریزوپوس* و *تریکودرما* بود که از بین این‌ها *ریزوپوس* 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 داد. اسیدیته مناسب

برای خالص‌سازی پلی‌گالاکتوروناز از این قارچ حدود ۵ و بهترین دما برای آن ۵۵ درجه سانتی‌گراد به دست آمد (۲۶).

تشکر و قدردانی

در پایان از حمایت‌های دانشکده علوم و فناوری نوین دانشگاه اصفهان و کمیته فراورده‌های طبیعی تشکر و قدردانی می‌شود.

References

(1) Acuna-Arguelles ME., Gutierrez-Rajas M., Viniegra-Gonzalez G., Favela-Toress E. Production and properties of three pectinolytic activities produced by A. niger in submerged and solid state fermentaion. *Apply Microbiology Biotechnology* 1995; 43 (56): 808- 14.

(2) Ahmed M. Study on jute retting bacteria. *Journal Apply Bacteriology* 1963; 26 (7): 117-126.

(3) Alana A., Alkorta I., Dominguez JB., Llama M.J., Serra JL. Pectin lyase activity in a *Penicillium italicum* strain. *Apply Environment Microbiol*ogy 1990; 56 (12): 3755- 59.

(4) Alkorta I., Garbisu C., Llama M.J., Serra JL. Industrial applications of pectic enzymes: A review. *Process. Biochemistry* 1998; 33 (1): 21- 8.

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

(6) 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 (7): 234- 41.

(7) Alammorshed 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.

(8) Alvarez G. Intraspecific ITS variability in the kingdom fungi as expressed in the international sequence database and its implication for molecular species identification. *Evolutionary bioinformatics* 2003; 4 (5): 193- 201.

(9) Angayarkanni J., Palaniswamy M., Murugesan S and Swaminathan K. Improvement of tea leaves fermentation with Aspergillus spp. pectinase. *Journal Bioscience Bioengginering* 2002; 94 (6): 299-303.

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

(11) 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.

(12) Baldwin A. Intragenomic variation in the ITS rDNA region obscures phylogenetic relationships and inflates estimates of operational taxonomic units in genus Laetiporus. *Mycologia* 1995; 103 (4): 731-740.

(13) Huwang F., Kim KS., Zimmerman W., Fiechter A. Pectinolytic enzymes from actinomycetes for the degumming of ramie bast fibers. *Apply Environment. Microbiology* 1994; 60 (7): 2107- 12.

(14) Picolli PG., Queiroz M.V., Pereira OL., Araújo EF. Morphological and molecular differentiation of the pectinase producing fungi *Penicillium* expansum and *Penicillium* griseoroseum. *Brazilian Journal Microbiology* 2007; 38 (9): 71- 7.

(15) Banu R., Kumbhar BK., Sarkar BC. Enzymatic hydrolysis of carrot for increased juice recovery. *Journal. Food Science. Technology* 2003; 40 (4): 35- 9.

(16) Marssia MASC., Fonseca MJV., Said S. Purification and partial characterization of exopolygalacturonase I from *Penicillium* frequentans. *Microbiology Research* 2002; 157 (5): 19- 24.

(17) Martini D. Description of the phylogenetic analysis of utilized Gonium pectorale strains. *Mycology* 2003; 3 (4): 276- 83.

(18) Malussi V. Quasi-random maximum simulated likelihood estimation of the mixed multinomial logit model. *Transportation Research Part B: Methodological* 2001; 35 (7): 677- 93.

(19) Balali G. ITS1., ITS4 for identified fungi. *Mycology* 1993; 5 (4): 432- 40.

(20) Delcheva G., Pishtiyski G., Dobrev A., Krusteva S. Immobilization of *Aspergillus niger* pectinase on polyacrylonitrile copolymer membrane. *Trends Applied Science Researh* 2007; 2 (5): 419- 25.

(21) Dalal S., Sharma A., Gupta MN. Enzymatic pretreatment to enhance oil extraction from fruits. *A multipurpose immobilized* 2007; 16 (4): 1- 5.

(22) Fawole OB., Odunfa SA. Pectolytic moulds in Nigeria. *Letter Apply Microbiology* 1992; 15 (7): 266-268.

(23) Sohel D. Plant or fungal sequences? An alternative optimized PCR protocol to avoid ITS (nrDNA) misamplification. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 2001; 53 (1): 346- 52.

(24) Okafur F. Impact of DNA sequence-data on the taxonomy of anamorphic fungi. *Fungal Diversity* 2005; 5 (7): 365- 72.

(25) Plakshimnara T. Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants. *Mycology* 2007; 4 (7): 134-43.

(26) Mohed E., Asadi A., Akbari M. Effective factors in agricultural apple waste in Islamic Republic of Iran: A comparative study. *Journal Humman Ecology* 2010; 32 (6): 47-53.

---

[1]- Malt Yeast Agar
[2]- Czapek Yeast Extract Agar
[3]- *Pitt and Hocking*
[4]- *Stevia*
[5]- *Miller*
[6]- *Rochell*
[7]- *Minitab Software*
[8]- *Aspergillus niger*
[9]- *columella*
[10]- *Rhizopus Oryzae*
[11]- *Penicilium chrysogenum*
[12]- Martin
[13]- Baldwin
[14]- Huwang
[15]- Picolli
[16]- Hoa and Hung
[17]- Piccoli
[18]- Banu
[19]- Marssia
[20]- Mohed
[21]- Malussi
[22]- Balali
[23]- Sohel
[24]- Sohel
[25]- Okafor
[26]- Plakshimnara
[27]- Mohd

Isolation and optimization of pectinase enzyme production one of useful industrial enzyme in *Aspergillus niger, Rhizopus oryzae, Penicilium chrysogenum*

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

Abstract

Introduction: Pectinase enzyme is one of the most important industrial enzymes which isolated from a wide variety of microorganisms such as bacteria and filamentous fungi. This enzyme has been usually used in the fruit 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 performed through plate culture on pectin medium and staining with Lugol's iodine solution. The best strains were identified by ITS1, 4 sequencing as *Aspergillus fumigatus, Rhizopus oryzae, Penicilium chrysogenum*. The enzyme production was optimized by application of the five factorial design, each at three levels. These factors are carbon sources (whey, glucose and stevia), ammonium sulfate, manganese sulfate, temperature, and pH. Pectinase concentration was measured by the Miller method.

Results: The results indicate that optimum condition for enzyme production for three fungi strains was obtained at 32 °C, pH = 6, 3g / L manganese sulfate, 2.75g / L of ammonium sulfate and 10g / L of each carbon source. The best experiment in obtaining the optimum enzyme contained 1.328 mg / ml of glucose for *Aspergillus niger* 1.284 and 1.039 mg / ml of whey for *Rhizopus oryzae* and *Penicilium chrysogenum*. Molecular weight of enzyme was about 40 and 37 kDa which was obtained by SDS- PAGE.

Discussion and conclusion: The results indicate that three strains could grow in a wide range of carbon source, pH and temperature, which could be a good candidate for industrial application.

Key words: Pectinase enzyme, *Aspergillus fumigatus*, *Rhizopus oryzae*, *Penicilium chrysogenum*, Optimization, Factorial design method

* Corresponding author
Received: December 7, 2014 / **Accepted:** February 18, 2015