بهینه سازی و تولید آنزیم سلولاز از ضایعات سیب زمینی توسط قارچ آسپرژیلوس نایجر

حسن رضائی[1*]، مرتضی یعقوبی[2]، قاسم نجف پور[3]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی شیمی- بیوتکنولوژی، موسسه صنعتی مازندران (Hassan30690613@gmail.com)
۲. دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی شیمی- بیوتکنولوژی، موسسه صنعتی مازندران (Mortezayaghoby2019@gmail.com)
۳. استاد مهندسی شیمی- بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل (najafpour@gmail.com)

چکیده

سلولاز آنزیمی مرکب شامل اندوگلوکاناز، اگزوگلوکاناز و بتاگلوکوزیداز است، که برای آبکافت نمودن سلولز و تبدیل آن به واحدهای گلوکز عمل می کنند. این آنزیم سومین آنزیم عمده‌ی صنعتی در جهان می‌باشد. عمل کرد آنزیم‌های سلولازی و هزینه زیاد تولید آنها، دو چالش اصلی در کاربرد صنعتی آنها به شمار می‌رود. از همین رو، روش‌های متعددی برای ارتقای فعالیت سلولازی، خصوصا در قارچ آسپرژیلوس نایجر به کار گرفته می‌شود. بهینه سازی تولید آنزیم سلولاز با تغییر پارامترهای (دما، زمان، pH، غلظت سوبسترا) توسط طرح نرم افزار Design Expert بدست آمد . هدف از انجام آزمایش بهینه سازی و تولید آنزیم سلولاز از ضایعات سیب زمینی توسط قارچ آسپرژیلوس نایجر بود. پس از تولید این آنزیم توسط قارچ آسپرژیلوس نایجر و تاثیر عوامل چون دما، زمان، غلظت سوبسترا و pH بر رشد و قابلیت تولید آنزیم توسط این باکتری مورد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از بهینه سازی فعالیت سلولاز در واکنش سنجش فعالیت آنزیمی نشان می‌دهدکه بیشترین فعالیت آنزیمی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، pH برابر با ۷، زمان ٤٨ ساعت و غلظت اولیه سوبسترا ١٤ g/l که مقدار آن برابر با ۳۹/٤٨ U/ml می‌باشد.

کلمات کلیدی:
سلولاز، آسپرژیلوس نایجر، ضایعات سیب زمینی، فعالیت آنزیمی

*حسن رضائی

بهینه سازی و تولید آنزیم سلولاز از ضایعات کشاورزی به روش بیولوژیکی

مقدمه

استفاده از ضایعات لیگنوسلولزی برای تولید سوخت‌های زیستی به دلیل فراوانی، دسترسی آسان، قیمت پایین و تجدیدپذیری طی چند دهه گذشته افزایش یافته است. سلولز از اجزاء اصلی زیست توده‌های لیگنوسلولزی است که به دلیل برخورداری از ظرفیت مناسب برای تولید سوخت سبز و پاک در سرتاسر جهان مورد توجه می‌باشد. موانع متعددی برای تولید سوخت زیستی از ضایعات سلولزی وجود دارد از جمله این موانع می‌توان به ساختار پایدار سلولز همراه با هزینه بالا و عملکرد پایین آنزیم‌های سلولازی اشاره کرد. ساختار پایدار سلولز می‌تواند به وسیله پیش تیمارهای فیزیکی و شیمیایی برداشته شود، درحالی که عملکرد آنزیم را می‌توان از طریق ایجاد محیط‌های مناسب رشد برای میکروارگانیسم‌های طبیعی یا دستکاری شده افزایش داد [۱].

سلولازها مهم‌ترین آنزیم‌های تجاری هستند که در صنعت غذا، نساجی، پالپ و کاغذسازی، تخمیر الکلی، غلات، داروسازی، صنایع آبجوسازی و مالت سازی استفاده می‌شوند. یک مانع مهم در کاربرد سلولازها هزینه بالای تولید آن است که بیشتر از ۵۰ درصد از هزینه های کلی هیدرولیز را شامل می‌شود و استفاده تجاری از این آنزیم‌ها را محدود می‌کند. هیدرولیز سلولز ، به عمل سینرژیستی حداقل سه گروه از آنزیم‌ها، اندو β(۱→۴) گلوکاناز (EC.3.2.1.4)، اگزو β(۱→۴) گلوکاناز (EC.3.2.1.91) و β – گلوکوزیداز نیاز (EC.3.2.1.21) دارد که در ویژگی سوبسترایی با یکدیگر متفاوت می‌باشند. در تجزیه آنزیمی سلولز، ابتدا آنزیم اندو β(۱→۴) گلوکاناز روی نواحی بی‌شکل رشته‌های سلولز اثر کرده و انتهاهای غیر احیاکننده برای فعالیت اگزو β(۱→۴) گلوکاناز فراهم می‌کند. در مرحله بعد، اگزو β(۱→۴) گلوکاناز با جداسازی واحدهای سلوبیوز از انتهاهای غیر احیاکننده، نواحی کریستالی را تجزیه می‌کند. سپس آنزیم β – گلوکوزیداز، سلوبیوز را به واحدهای گلوکز هیرولیز می‌کند [۱ و ۲].

آنزیم‌های سلولولیتیک توسط میکروارگانیسم‌های مختلفی از دسته پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها تولید می‌شود. باکتری‌ها و تعدادی از قارچ‌ها تنها قادر به تولید آنزیم اندوگلوکاناز بوده و سلولز را به طور ناقص هیدرولیز می‌نمایند. تنها تعداد کمی از قارچ‌ها قادر به تولید هر سه کلاس آنزیم سلولاز بوده و به عنوان قارچ‌های سلولولیتیک کارآمد معرفی می‌گردند. یکی از مهم‌ترین قارچ‌های سلولولیتیک قارچ آسپرژیلوس نایجر است؛ که به عنوان یکی از برترین تولید کنندگان کمپلکس سلولازی در تحقیقات مختلف شناخته شده است. سیستم آنزیم‌های سلولولیتیک در این قارچ به صورت خارج سلولی بوده و واجد حداقل سه نوع اندو β(۱→۴) گلوکاناز (EG IP-III)، دو نوع اگزو β(۱→۴) گلوکاناز (CBH I , CBH II) و همچنین β – گلوکوزیداز می‌باشد که به طور مؤثر کریستال سلولز را با همکاری یکدگیر تجزیه می نمایند [۳]. بنسال و همکارانش در سال ۲۰۱۲ میزان تولید سلولاز توسط آسپرژیلوس نایجر را بررسی کردند. آنها مواد مختلفی چون کاه گندم، سبوس گندم، ذرت، سبوس برنج، علف، باگاس نیشکر، سیب زمینی، پوست پرتقال، پوست سیب و غیره را خرد کردند و از آنها در سه حالت بدون پیش تیمار، پیش تیمار با اسید سولفوریک و پیش تیمار با سدیم هیدروکسید برای تولید سلولاز استفاده کردند. بیشترین میزان تولید سلولاز برای سبوس گندم بدون پیش تیمار، ۳۱۰/۶ U/g وکمترین میزان تولید سلولاز برای پوست پرتقال بدون پیش تیمار، ۱ U/g بدست آمد. میزان تولید سلولاز برای کاه گندم در سه حالت بدون پیش تیمار، پیش تیمار با اسید سولفوریک و پیش تیمار با سدیم هیدروکسید به ترتیب ۱۱/۲ U/g، ۱۰۰/۹ U/g و ۱۲۷/۵U/g بدست آمد. بنابراین آنها از سبوس گندم برای تعیین نقطه بهینه‌ی تولید سلولاز استفاده کردند و در دمای ۳۰ درجه ۷ pH بعد از ۴ روز بیش ترین میزان تولید آنزیم سلولاز را بدست آوردند [۶]. هدف از جمع آوری این اطلاعات بررسی تحقیقات سایر پژوهشگران بود که با وجود تلاش محققین برای فراهم کردن شرایط بهینه برای تولیدآنزیم

سلولاز، اثر عوامل موثر بر فعالیت آنزیمی سلولاز از ضایعات سیب زمینی هنوز کاملا مشخص نشده است و این دلیل باعث شد که ما از ضایعات سیب به عنوان منبع کربنی برای رشد قارچ آسپرژیلوس نایجر و تولید آنزیم سلولاز به کار ببریم.

مواد و روشها

در این تحقیق باکتری مورد مطالعه سویه آسپرژیلوس نایجر مولد سلولاز هست که از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران به صورت لیوفیلیزه تهیه می شود فراهم گردید. ضایعات سیب زمینی در فصل زمستان از سرد خانه های اطراف شهر بابل تهیه می گردد و جهت هیدرولیز به آزمایشگاه منتقل می گردد. ابتدا سیب زمینی‌ها به منظور حذف آلودگی‌ها به دقت با آب شهری شستشو داده شدند. سپس پوست قسمت-هایی از غده که دچار پوسیدگی، گندیدگی و آسیب دیدگی ناشی از حشرات بودند، جدا گردید.

مواد قندی موجود در پوسته سیب زمینی به روش هیدرولیز اسیدی استخراج شدند. برای استخراج مواد قندی در مقایس آزمایشگاهی ، ۲۰۰ گرم از ضایعات سیب زمینی ها (پوسته سیب زمینی) به قسمت‌های کوچکتر تکه تکه شدند و سپس در آون در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت خشک گردید. ۴۰ گرم از ضایعات سیب زمینی خرد شده در ۳۰۰ میلی لیتر اسید سولفوریک ۱ درصد خیسانده شده و در دمای محیط به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. پس از پایان مدت زمان در نظر گرفته شده، pH محلول با استفاده از اسید و باز روی ۷ تنظیم گردید. محلول تفاله هیدرولیز شده جهت جداکردن فاز مایع فشار داده شد و در نهایت ذرات جامد باقیمانده با استفاده از کاغذ صافی حذف شدند. محلول حاصل از هیدرولیز ضایعات نشاسته در یخچال و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

محاسبات ترکیبات شیمیایی سوبسترا‌ها:

محاسبات میزان رطوبت (استفاده از آون با دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد تا رسیدن نمونه به وزن ثات)، خاکستر(وزاندن ۲ گرم نمونه روی شعله و سپس استفاده از کوره الکتریکی با دمای ۵۰۰ درجه سانتی گراد تا خاکستر شدن نمونه‌ها)، چربی (به روش سوکسله) و پروتئین (به روش کلدال) نمونه ضایعات سیب زمینی مطابق روش های آزمون‌های اندازه گیری ترکیبات شیمیایی انجام می‌شود.

تعیین فعالیت آنزیم سلولاز:

فعالیت آنزیم سلولاز با استفاده از روش DNS و کاغذ واتمن تعیین می‌شود.

۳ و ۵ دی نیترو سالیسیلیک اسید(DNS) یک ترکیب حلقوی می‌باشد که با قندها و دیگر مولکول‌های احیا کننده واکنش می‌دهد و قادر است ۳ – آمینو – ۵ – نیتروسالیسلیک اسید ایجاد کند که نور را در طول موج ۵۴۰ نانومتر به شدت جذب می کند و از آن برای شناسایی میزان فعالیت سلولاز استفاده می‌شود. برای این منظور از محیط کشت القایی تلقیح شده استفاده می‌شود و یک میلی لیتر از سوپرناتانت حاصل پس از تیمار شدن با سوبسترا، در لوله‌ی آزمایش ریخته می‌شود و به ترتیب ۱/۵ میلی لیتر بافر سیترات با pH برابر با ۵ ، ۱ میلی لیتر آب مقطر و ۱ میلی لیتر معرف DNS به آن اضافه می گردد و برای ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار داده می‌شود و بعد ۰/۵ میلی لیتر سدیم پتاسیم تاتارات ۴٪ به آن اضافه می‌شود و جذب آن در ۵۴۰ نانومتر خوانده می‌شود و با جای گذاری عدد حاصل به جای Y در نمودار استاندارد میزان میلی مول قند آزاد شده ی حاصل از فعالیت آنزیم به دست آورده می‌شود [۳].

تاثیر pHهای مختلف بر فعالیت آنزیمی سلولاز:

برای تعیین pH بهینه، بافر سیترات – فسفات با pHهای ۳ تا ۶، بافر گلایسن با pH های ۷ تا ۱۱ و بافر فسفات با pH برابر با ۱۲ تهیه و به هر کدام ۰/۵٪ نشاسته‌ی محلول به عنوان سوبسترا اضافه می گردد. سپس از محیط کشت القایی تلقیح می‌شودکه به مدت سه روز گرما گذاری

می‌شود و به مقدار کافی آنزیم تولید می‌شود جهت سنجش فعالت آنزیم استفاده می گردد ولی این بار از بافرهای ساخته می‌شود که با pHهای مختلف استفاده می گردد. دمای فعالیت آنزیم در همه‌ی موارد ذکر شده ، ثابت و و در ۳۵ درجه سانتی گراد تنظیم می گردد.

تعیین دمای بهینه بر فعالیت آنزیمی سلولاز

به منظور تعیین دمای بهینه، فعالیت آنزیمی سلولاز با استفاده از محیط تولید پایه با pH=۷ در دماهای انکوباسیون مختلف از ۲۵ تا ۴۵ درجه سانتی گراد با فواصل دمایی ۱۰ درجه سانتی گراد به ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت.

تعیین زمان بهینه برای تولید آنزیم :

برای تعیین بهترین زمان تولید آنزیم توسط باکتری، چند محیط القایی تهیه می‌شود و هر کدام برای زمان های متفاوت در انکوباتور شیکردار با ۱۲۰ rpm قرار داده می شود. محیط های حاصل بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از انکوباتور خارج و میزان فعالیت در دما و pH بهینه سنجش می‌شود.

تاثیر غلظت‌های مختلف سوبسترا بر فعالیت آنزیمی سلولاز

تاثیر غلظت‌های مختلف سوبسترا در غلظت‌های ۷، ۱۴و ۲۱ درصد (وزنی/حجمی) به محیط پایه تولید آنزیم اضافه شد و تاثیر فعالیت آنزیمی سلولاز مورد بررسی قرار گرفت.

مدل سازی و بهینه سازی آزمایش ها

در این پروژه از روش پاسخ سطحی (RSM) جهت تعیین شرایط بهینه آزمایش‌ها استفاده شد. بهینه سازی با روش سنتی که شامل تغییر۱ متغیر مستقل با ثابت نگه داشتن سایر پارامترها می‌باشد، علاوه بر اینکه روشی زمان بر است، به علت عدم در نظر گرفتن تاثیرات متقابل بین پارامترها قادر به تعیین مقادیر بهینه متغیرها نمی‌باشد. این محدودیت را می‌توان با استفاده از روش پاسخ سطحی حذف کرد. روش پاسخ سطحی مجموعه‌ای از تکنیک‌های آماری و ریاضی می‌باشد که با ارائه ۱ مدل ریاضی روابط بین متغیرهای مستقل و وابسته را توصیف می کند. همچنین با ترسیم منحنی های ۳ بعدی به فهم بهتر این روابط کمک می کند.

تحلیل نتایج

ترکیبات شیمیایی پوسته سیب زمینی

اندازه گیری ترکیبات شیمیا یی ضایعات سیب زمینی قبل از هیدولیز انجام شده و نتایج در جدول (۱) آورده شده است. در این رابطه باید گفت نتایج به دست آمده با نتایج گزارش شده توسط سایر پژوهشگران قابل مقایسه است که البته تفاوت‌های موجود، طبیعی و به دلیل تفاوت در نوع سیب زمینی مورد استفاده در تولید ضایعات کاربردی، زمان برداشت و شرایط محیطی می‌باشد.

جدول (۱) ترکیبات شیمیایی ضایعات سیب زمینی قبل از هیدرولیز

رطوبت (٪)	قند	پروتئین (٪)	چربی (٪)	خاکستر (٪)	نمونه
۵۲/۳	۲۱/۸	۴/۸۴	۳/۲	۴/۷۵	ضایعات سیب زمینی

مدل سازی تولید آنزیم سلولاز در نرم افزار Design Expert

با توجه با نتایج حاصل از فصل سوم، متغیر تأثیر گذار در فرآیند تولید آنزیم سلولاز ازضایعات سیب زمینی در فرآیند مدل سازی انتخاب می‌گردند. با استفاده از روش طرح مرکب مرکزی[1] به عنوان یک روش آماری موجود در نرم افزار Design Expert انجام شد. در این روش میزان تأثیر هر یک از متغیرهای بیان شده بر تولید آنزیم و نیز تأثیر آنها به صورت دوبه دو بر یکدیگر طرح و برنامه ریزی می‌شود. در جدول (۲) بازه مقادیر در نظر گرفته شده برای هر متغیر به همراه کدهای متناظر قابل مشاهده است [۸].

جدول (۲) بازه مقادیر در نظر گرفته شده برای هر متغیر

متغیرها	نماد	بازه و سطح		
		۱	-۱	
زمان	ساعت	۷۲	۲۴	
دما	سانتی گراد	۴۷	۲۷	
pH	-	۹	۵	
غلظت سوبسترا	گرم بر لیتر	۲۱	۷	

تجزیه تحلیل جدول ANOVA بدست آمده مربوط به فعالیت آنزیم سلولاز برای ضایعات سیب زمینی

نتایج حاصل از آنالیز واریانس فعالیت آنزیم سلولاز در جدول (۳) نشان داده شده است. با توجه به اینکه برای هر چهار پارامتر اندازه گیری شده P-Value <۰/۰۵ است. پس هر چهار پارامتر بر روی فعالیت آنزیم سلولاز اثر معناداری داشته‌اند. با توجه به مقادیر P-Value اثر برهم کنش‌های دوتایی اندازه زمان و دما، زمان و pH، دما و غلظت، pH و دما، غلظت و دما، غلظت و pH اثر معنادار نداشته‌اند.

جدول (۳) نتایج تحلیل واریانس برای مدل کوادرتیک پاسخ سطح مربوط به فعالیت آنزیم سلولاز

Source	SS [a]	DF [b]	MS [C]	F-value	P-value
Model	۲۸۸۴/۴۳	۱۴	۲۰۶/۰۳	۳۴/۵۲	<۰/۰۰۱
A-Time	۱۷۸/۲۹	۱	۱۷۸/۲۹	۲۹/۸۷	<۰/۰۰۱
B-Temperature	۶۰/۵۷	۱	۶۰/۵۷	۱۰/۱۵	۰/۰۶۱
C-pH	۱۴۰/۹۵	۱	۱۴۰/۹۵	۲۳/۶۲	۰/۰۰۲
D-density	۱۴۷/۹۸	۱	۱۴۷/۹۸	۲۴/۷۹	۰/۰۰۲
AB	۰/۴۲	۱	۰/۴۲	۰/۰۷۱	۰/۷۹۳۸
AC	۱/۴۵	۱	۱/۴۵	۰/۲۴	۰/۶۲۹۰
AD	۰/۳۹	۱	۰/۳۹	۰/۰۶۵	۰/۸۰۱۶
BC	۱/۲۷	۱	۱/۲۷	۰/۲۱	۰/۶۵۱۸
BD	۱/۰۹	۱	۱/۰۹	۰/۱۸	۰/۶۷۴۹
CD	۱۲/۳۹	۱	۱۲/۳۹	۲/۰۸	۰/۱۷۰۲
A^2	۹۱/۲۵	۱	۹۱/۲۵	۱۵/۲۹	۰/۰۰۱۴
B^2	۳۲۳/۸۲	۱	۳۲۳/۸۲	۵۴/۲۶	<۰/۰۰۱
C^2	۴/۴۱	۱	۴/۴۱	۰/۷۴	۰/۴۰۳۵
D^2	۴/۰۸	۱	۴/۰۸	۰/۶۸	۰/۴۲۱۴

[1] -Central composite design

Residual	۸۹/۵۲	۱۵	۵/۹۷		
Lack of fit	۸۹/۵۲	۱۰	۸/۹۵		
Pure error	۰/۰۰۰	۵	۰/۰۰۰		
Total	۲۹۷۳/۹۵	۲۹			

D,C,B,A اثرات اصلی، AB CD,BD,BC,AD,AC اثرات متقابل و A^2,B^2,C^2,D^2 اثرات مجذوری هستند.

[a] SS: مجموع مربعات، [b] DF: درجه آزادی، [c] MS: میانگین مربعات

R-sq (adj) معیاری برای معنادار بودن ثوابت رگرسیون و R-sq معیاری برای اختلاف مقادیر پیش بینی شده و آزمایشگاهی است. اختلاف کم بین مقادیر این دو R نشان می‌دهد که مدل به خوبی پیش بینی شده است. همان‌طور که در جدول (۴) مشاهده می‌شود، شرایط بهینه تولید آنزیم سلولاز در این طراحی آزمایش می‌باشد.

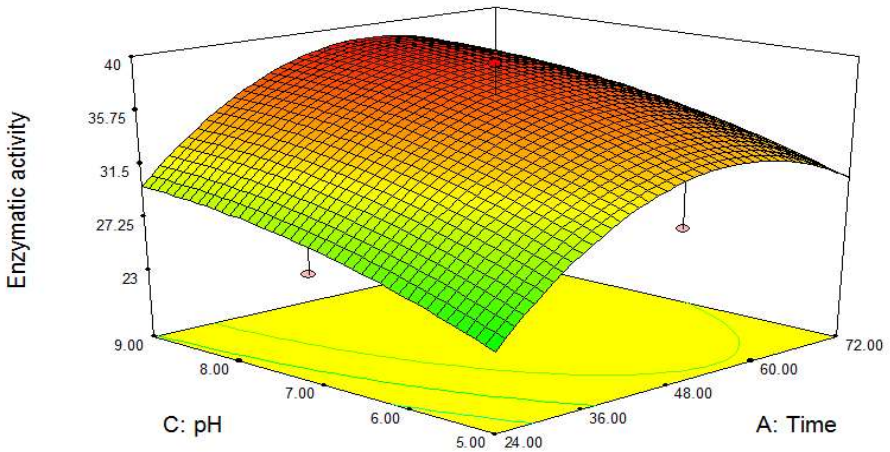
جدول (٤) نتایج تحلیل واریانس برای پارامترهای پاسخ مربوط به فعالیت آنزیم سلولاز

R^2	Mean	Adjusted R^2	Predicted R^2	Adequate Precision	SD [a]	CV,%	PRESS [b]
۰/۹۶۹۹	۲۵/۳۱	۰/۹۴۱۸	۰/۹۰۶۴	۱۸/۹۹۷	۲/۴۴	۹/۶۵	**۲۷۸/٤۷**

[a] SD: نحراف استاندارد، [b] PRESS: Predicted residual error sum of squares

تأثیر دو متغیر زمان و pH بر فعالیت آنزیمی سلولاز

تأثیر زمان و pH بر فعالیت آنزیمی سلولاز در شکل (۱) به نمایش در آمده است. pH یکی از مهم‌ترین فاکتورهایی است که تعیین کننده‌ی رشد و مورفولوژی میکروارگانیسم‌ها می‌باشد چرا که برخی از میکروارگانیسم‌ها به غلظت بالای یون هیدروژن حساس می‌باشند. مطالعات نشان داده است که قارچ‌ها به pHهای نزدیک به خنثی برای رشد نیاز دارند از طرف دیگر pH سنتز و ترشح آنزیم سلولاز و همچنین ثبات آن را تحت تأثیر قرار می‌دهد مقادیر بهینه pH برای قارچ‌ها مقدار ۷ است. مقدار تخمین زده P-value برای بر هم کنش این دو پارامتر (زمان و pH) ۰/۶۲۹۰ می‌باشد که بیان گر اثر متقابل ضعیف این دو متغیر می‌باشد.



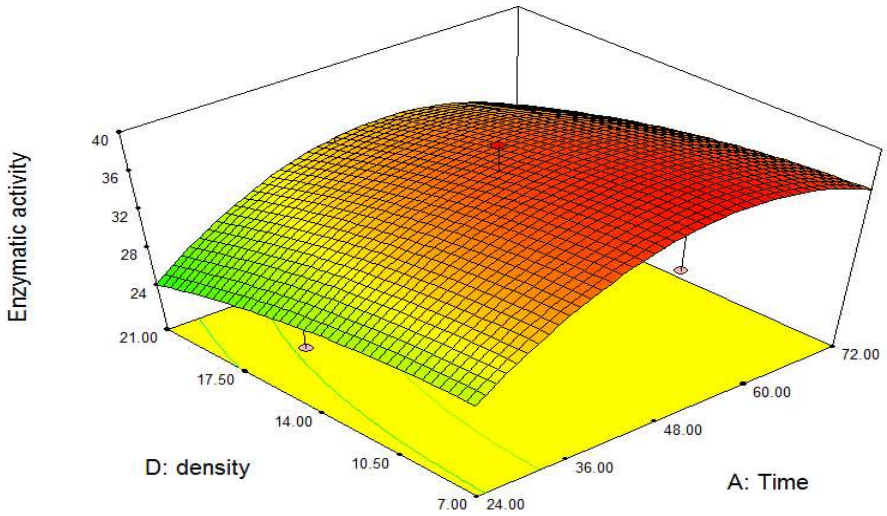
شکل (۱) تأثیر دو متغیر زمان و pH بر فعالیت آنزیمی سلولاز

در شکل (۱) مقادیر بهینه pH و زمان برای فعالیت آنزیمی سلولاز به ترتیب ۷ و ۴۸ ساعت می‌باشند. با افزایش زمان تا ۴۸ ساعت فعالیت آنزیمی رو به افزایش می‌باشد. که مقدار فعالیت آنزیمی بدست آمده در مقدار بهینه از pH و زمان برابر با ۳۹/۴۸ U/ml است. با مقایسه

سطوح فعالیت برای دو متغیر نشان داده شد که متغیر زمان دارای بیشترین تأثیر بر فعالیت آنزیمی می-باشد چرا که در زمان ۷۲ ساعت حداکثر میزان فعالیت آنزیمی ۳۹/۴۸U/ml است. آسپرژیلوس نایجر قادر به تولید اسید سیتریک می‌باشد [۴]. زمان طولانی تخمیر منجر به تولید میزان بالای اسید سیتریک و در نتیجه کاهش pH محیط کشت می شود که اثر منفی بر تولید آنزیم سلولاز دارد. بنابراین برای فرآیندی با زمان تخمیر بالا، می بایست مقدار اولیه pH را خنثی انتخاب کرد. زمان انکوباسیون نیز از دیگر عوامل موثر بر فعالیت سلولازی است. بررسی انجام شده توسط Kang و همکارانش نشان داد که بیشترین فعالیت آسپرژیلوس نایجر در روز ۵-۶ از انکوباسیون حاصل می‌شود.

تأثیر زمان و غلظت بر فعالیت آنزیمی سلولاز

مقدار تخمین زده P-value برای بر هم کنش این دو پارامتر (زمان و غلظت) ۰/۸۰۱۶ می‌باشد که بیان گر اثر متقابل ضعیف این دو متغیر می‌باشد. همان‌طور که از شکل پیداست، در محیط کشت‌های حاوی غلظت‌های بالا و پایین غلظت سوبسترا باعث کاهش فعالیت آنزیمی سلولاز می‌شود. در مقادیر پایین سوبسترا، حتی غلظت بهینه سوبسترا نیز منجر به ترشح بالای آنزیم نگردید. با افزایش غلظت سوبسترا تا، g/l ۱۴ تولید آنزیم افزایش یافت. اما در غلظت‌های بیشتر از g/l ۱۴ فعالیت آنزیمی کاهش یافت که احتمالا نتیجه بازدارندگی ناشی از غلظت بالای سوبسترا می‌باشد.

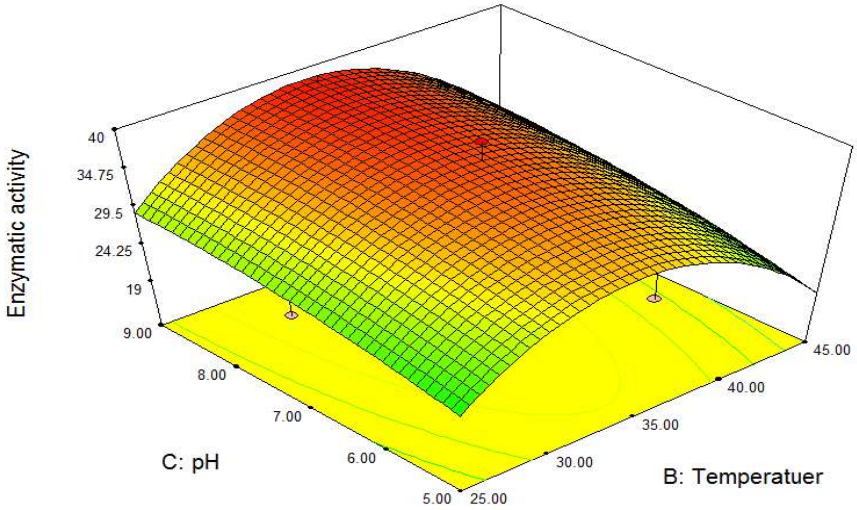


شکل (۲) تأثیر دو متغیر زمان و غلظت بر فعالیت آنزیم سلولاز

در شکل (۲) مقادیر بهینه غلظت و زمان برای فعالیت آنزیمی به ترتیب g/l ۱۴و ۴۸ ساعت می‌باشند. با مقایسه سطوح فعالیت برای دو متغیر نشان داده شد که متغیر زمان دارای بیشترین تأثیر بر فعالیت آنزیمی سلولاز دارد. با افزایش زمان تا ۴۸ ساعت فعالیت آنزیمی رو به افزایش می‌باشد. چرا که در زمان ۴۸ حداکثر میزان فعالیت آنزیمی U/ml ۳۹/۴۸ است. با افزایش مقدار غلظت سوبسترای ضایعات سیب زمینی از g/l ۷ تا g/l ۱۴ میزان فعالیت آنزیمی سلولاز نیز افزایش یافت. سوکوماران و همکارانش در سال (۲۰۱۰) گزارش کردند حداکثر تولید آنزیم در سویه آسپرژیلوس نایجر ۹۶ ساعت پس از تلقیح و به میزان U/ml ۳۶ تحت شرایط تخمیر غوطه‌ور بدست آمد. پازور و همکاران (۱۹۷۱) نیز گزارش کردند سویه آسپرژیلوس نایجر تحت شرایط تخمیر غوطه‌ور ۸۵ ساعت پس از تلقیح بیشترن رشد و تولید گلوکوآمیلاز را خواهد داشت [۶].

۳-۹-٤- تأثیر دما و *pH* بر فعالیت آنزیمی سلولاز

تأثیر دما و pH بر فعالیت آنزیمی سلولاز در شکل (۳) بررسی شده است. برای تشخیص میزان اثر گذاری دو متغیر دما و pH از آنها در رنج‌های متفاوتی آزمایش به عمل آمد. در این خصوص در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد کمترین میزان فعالیت و در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد بیشترین مقدار فعالیت آنزیمی را داشتیم.

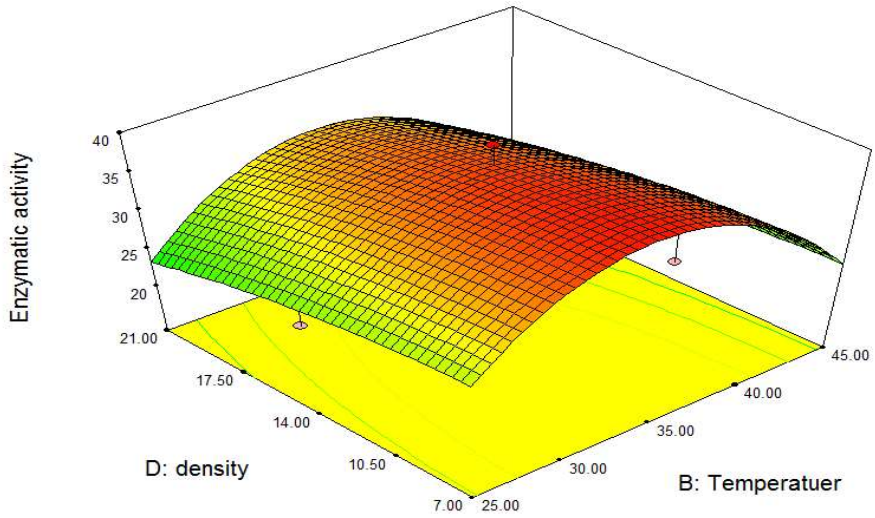


شکل (۳) تأثیر دو متغیر دما و pH بر فعالیت آنزیم سلولاز

مقدار بهینه تأثیر دما و pH بر فعالیت آنزیمی سلولاز نیز به ترتیب ۳۵ درجه سانتی گراد و pH=۷ بود. با افزایش pH تا مقدار۷ فعالیت آنزیم رو به افزایش می‌باشد. چنانکه مقدار فعالیت آنزیمی بدست آمده در مقدار بهینه pH و دما برابر با ۳۹/۴۸ U/ml است. با مقایسه سطوح فعالیت برای دو متغیر نشان داده شد که متغیر pH دارای بیشترین تأثیر بر فعالیت آنزیمی سلولاز می‌باشد چرا که در pH ۷ حداکثر میزان فعالیت آنزیمی ۳۹/۴۸ U/ ml است. بررسی‌ها نشان داد که آنزیم سلولاز در دامنه pH ۵ تا ۹ فعالیت دارد ولی بیشترین فعالیت آن در pH ۷ می‌باشد. این نتیجه با گزارش جاکوبسکی و همکاران (۲۰۰۰) کاملا منطبق است. نکته جالب توجه در این تحقیق وجود اختلاف زیاد pH ۷ نسبت به سا یر pH ها می باشد در صورتی که در دیگر گزارشات دامنه تحمل به pH با چنین اختلاف زیادی گزارش نشده است. این اختلاف احتمالاً به دلیل وجود تفاوت در اسید آمینه های سطح آبگریز آنزیم نسبت به آنزیم های مشابه مقاوم به pH های پایین تر است [۵].

٤-۹-٤- تأثیر دما و غلظت بر فعالیت آنزیمی سلولاز

تأثیر دما و غلظت بر فعالیت آنزیمی سلولاز در شکل (۴) بررسی شده است. برای تشخیص میزان اثر گذاری دو متغیر دما و غلظت از آنها در رنج‌های متفاوتی آزمایش به عمل آمد. در این خصوص در غلظت سوبسترا ۲۱ g/l کمترین میزان فعالیت آنزیمی را دارد. در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد بیشترین مقدار فعالیت آنزیمی سلولاز را داشتیم.

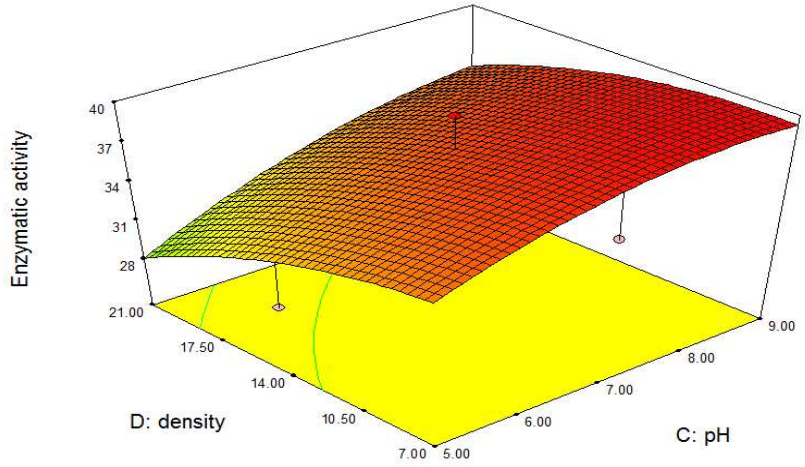


شکل (٤) تأثیر دما و غلظت بر فعالیت آنزیمی سلولاز

مقدار بهینه دما و غلظت به ترتیب در ۳۵ درجه سانتی گراد و ۱۴ g/l می باشد . با توجه به منحنی نشان داده شده در شکل هر دو مقدار غلظت و دما با افزایش در مقدار عددی خودشان دارای کمترین سطح فعالیت آنزیمی می‌باشند. گزارش شده که سنتز آنزیم های تجزیه کننده کربوهیدرات ها در بیشتر گونه های آسپرژیلوس نایجر به مهار کاتابولیک توسط پیش ماده هایی که براحتی قابل متابولیزه شدن هستند، می شود و احتمال می‌رود که کاهش فعالیت آنزیمی سلولاز در غلظت‌های بالای ضایعات سیب زمینی به دلیل مهار کاتابولیکی سوبستراهای متابولیزه شدنی می‌باشد [۶].

٥-٩-٤- تأثیر pH و غلظت بر فعالیت آنزیمی سلولاز

در شکل (۵) تأثیر pH و غلظت بر فعالیت آنزیمی سلولاز بررسی شده است. برای تشخیص میزان اثر گذاری دو متغیر pH و غلظت از آنها در رنج‌های متفاوتی آزمایش به عمل آمد. در این خصوص در غلظت های پایین از محیط کشت فعالیت آنزیمی سلولاز بیشتر و برای متغیر pHعکس این حالت صادق است.



شکل (٥) تأثیر pH و غلظت بر فعالیت آنزیمی سلولاز

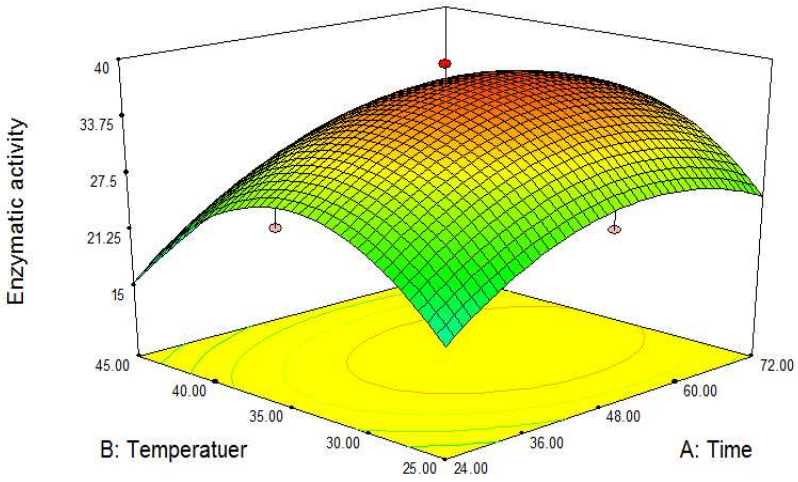
مقدار بهینه pH و غلظت به ترتیب در ۷ و ۱۴ g/l می‌باشد. با توجه به منحنی نشان داده شده در شکل مقدار pH با افزایش مقدار خود فعالیت آنزیمی رو به افزایش است چنانکه در pH ۷ مقدار فعالیت آنزیمی برابر ۳۹/۴۸ U/ml است.

افزایش غلظت سوبسترا از ۷ گرم بر لیتر تا ۱۴ گرم بر لیتر به ازای هر گرم ضایعات سیب زمینی باعث افزایش میزان تولید آنزیم سلولاز شد اما مقادیر بیشتر غلظت سوبسترا در محیط کشت می تواند باعث رسوب آنزیم در هنگام استخراج آنزیم شود.

سرعت اولیه واکنش های کاتالیز شده توسط آنزیم‌ها به غلظت سوبسترا بستگی دارد. زمانیکه غلظت سوبسترا کم است سرعت اولیه واکنش تقریباً با غلظت سوبسترا نسبت مستقیم دارد. اما بتدریج که بر غلظت سوبسترا افزوده می شود سرعت واکنش متناسب با غلظت سوبسترا نخواهد بود. چنانچه در این حالت بر غلظت سوبسترا افزوده شود سرعت واکنش مستقل از سوبسترا می شود. در این حالت تمام جایگاه‌های واقع در معرض اتصال اشباع می شوند و سرعت به حداکثر میزان خود می‌رسد.

تأثیر دو متغیر دما و زمان بر فعالیت آنزیمی سلولاز

اثر دو متغیر تأثیر گذار بر فعالیت آنزیمی سلولاز در شکل (۶) نشان داده شده است. این شکل تأثیر زمان و دما را بر فعالیت آنزیمی سلولاز نشان می‌دهد.



شکل (٦) تأثیر دو متغیر دماو زمان بر فعالیت آنزیمی سلولاز

با توجه به شکل و بر اساس محدوده داده‌ها طرح شده مشخص می گردد که مقدار بهینه فعالیت آنزیمی در زمان ۴۸ ساعت و دمای ۳۵ درجه‌سانتیگراد و کمترین مقدار تولید نیز در زمان ۴۸ ساعت و دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. منحنی فعالیت آنزیمی در دماهای مختلف نشان می‌دهد که میزان فعالیت آنزیمی در دماهای بالاتر از ۲۵ درجه سانتی گراد رو به افزایش بوده و تا رسیدن به دمای ۳۵ درجه دارای حداکثر مقدار است. با توجه به این نکته که گلوکز نقش بازدارندگی در فعالیت آنزیمی سلولاز دارد و در زمان های طولانی مولکول‌های نشاسته بیشتری به پلیمرهای کوچکتر که از واحدهای گلوکز تشکیل شده اند هیدرولیز می‌شود پس با کاهش مقدار گلوکز در محیط با افزایش فعالیت آنزیمی مواجه هستیم.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق آنزیم سلولاز توسط آسپرژیلوس نایجر با استفاده از ضایعات سیب زمینی به عنوان سوبسترای ارزان قیمت تولید شد. شرایط بهینه تولید آنزیم سلولاز نیز با استفاده از نرم افزار Design Expert و با بررسی اثر چهار پارامتر دما، زمان، غلظت سوبسترا و pH بر فعالیت آنزیمی سلولاز انجام شد. خواص وکاربرد آنزیم تولید شده برای این تحقیق را می توان در مراحل زیر خلاصه نمود:

- به منظور تعیین دمای بهینه فعالیت آنزیم، سنجش فعالیت آنزیمی در گستره دمایی ۲۵-۴۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. نتایج نشان می‌دهد که دمای بهینه و بیشترین فعالیت آنزیمی در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد می‌باشد. و همچنین در۴۵ درجه سانتی‌گراد کمترین فعالیت آنزیمی را دارد.
- فعالیت آنزیمی، در محدوده۹-۵ = pH سنجش شد. فعالیت آنزیمی سلولاز در pH=۷ بیش ترین فعالیت را دار می باشد. و همچنین مقدار بهینه فعالیت آنزیمی در۷ = pH می‌باشد.
- برای تعیین زمان بهینه فعالیت آنزیم، سنجش فعالیت آنزیمی در گستره زمانی ۲۴-۷۲ ساعت انجام شد. نتایج نشان می‌دهد که زمان بهینه و بیشترین فعالیت آنزیمی در زمان ۴۸ ساعت می‌باشد. و همچنین در زمان ۲۴ ساعت کمترین فعالیت آنزیمی را دارد.
- فعالیت آنزیمی، غلظت سوبسترا در محدوده ۲۱-۷ (گرم بر لیتر) سنجیده شد. فعالیت آنزیمی سلولاز در غلظت سوبسترا ۱۴ گرم بر لیتر دارای بیشترین فعالیت می‌باشد. همچنی مقدار بهینه فعالیت آنزیمی در غلظت سوبسترای ۱۴ گرم بر لیتر می‌باشد.

منابع

۱. گلستانه، محمد باقر.۱۳۸۴.سرمایه ملی که دود می شود. نشریه شکر شکن. ص ۱۸-۲۵.

2. Beguin P and Aubert J (1994) The biological degradation of cellulose. FEMS Microbial Rev, 13:25-58.
3. Dey, G., Mitra, A., Banerjee, R., Maiti, B., (2001), Enhanced production of amylase by optimization of nutritional constituents using response surface methodology, Biochemical Engineering Journal, 7, 227-231.
4. G. K. Villena, N. N. Gamarra, M. Gutiérrez-Correa, (2010). Cellulase production by Aspergillus niger in biofilm, solid-state, and submerged fermentations. Application Microbiology Biotechnology, 87, 545–551.
5. Najafpour, G.D., (2007), Biochemical engineering and biotechnology, Elsevier Science.
6. N. Bansal, R. Tewari, R. Soni, S. K. Soni, (2012). Production of cellulases from Aspergillus niger NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. Waste Management, 32, 1341–1346.
7. Thomas, L.C. and Chamberlin, G.J. 1974. Colorimetric chemical analytical methods.
8. Swapan K, Vinay K and Singh A (1994) Production and hydrolytic potential of cellulose enzymes from a mutant strain of Trichoderma reesei. Biotechnol Appl Biochem, 20: 233-239.

Optimization and Production of Cellulase Enzyme from Agricultural Waste by Biological Methods

Hassan Rezaei[1], Morteza Yaghoubi[2], Ghasem Najafpour[3]

1. student of Master of Science in Chemical Engineering, Biotechnology, Mazandaran of Technology University, Qaemshahr, Iran
2. student of Master of Science in Chemical Engineering, Biotechnology, Mazandaran of Technology University, Qaemshahr, Iran
3. Professor of Biochemical Engineering, Faculty of Chemical Engineering, Babol Noshirvani University of Technology, Babol, Iran

Abstract

Cellulase is an enzyme complex that includes endoglucanase, exoglucanase and beta-glucosidase and works to hydrolyze cellulose and convert it to glucose units. This is the third major industrial enzyme in the world. The performance of cellulase enzymes and the high cost of their production are the two main challenges in their industrial application. Therefore, several methods are used to promote cellulase activity, especially in the fungus *Aspergillus niger*. Optimization of cellulase enzyme production by changing parameters (temperature, time, pH and substrate concentration) was achieved by Design Expert software design. The aim of the experiment was to optimize and produce cellulase enzyme from potato waste by *A. Niger*. After the enzyme was produced by *A. Niger*, the effects of some factors such as temperature, time, substrate concentration and pH on the growth of the fungus and its ability to produce this enzyme were investigated. The optimization results of cellulase activity in the enzyme assay show that the highest enzyme activity is observed after 48 hours at 37 °C, pH 7 and initial substrate concentration of 14 g/l; it is equal to 39.48 U/ml.

Key words: *Aspergillus niger*, Cellulase, Enzymatic activity, Potato waste

* Hassan Rezaei Sarpiri
Hasan30690613@gmail.com