بهینه سازی و تولید آنزیمی آلفاآمیلاز از منابع کشاورزی ارزان قیمت توسط باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس به روش سطح پاسخ

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

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

چکیده

آلفاآمیلاز از مهمترین آنزیم‌های صنعتی محسوب می‌شود که می‌توان از گیاهان، حیوانات و میکروارگانیسم‌ها بدست آورد. با این حال، آنزیم‌های از منابع قارچی و باکتریایی کاربردهای مهمی در بخش‌های صنعتی دارند. برای این منظور در این پژوهش، از پوسته سیب زمینی که توسط محلول اسیدی رقیق هیدرولیز شده است به عنوان منبع کربنی جهت رشد باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس برای تولید آنزیم آلفاآمیلاز استفاده شدند. بهینه سازی تولید آلفا آمیلاز با تغییر پارامترهای (دما، زمان، pH، غلظت سوبسترا) توسط طرح نرم افزار Design Expert بدست آمد . هدف از انجام آزمایش بهینه سازی و تولید آنزیمی آلفاآمیلاز از منابع کشاورزی ارزان قیمت توسط باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس به روش سطح پاسخ بود. پس از تولید این آنزیم توسط باکتری یاد شده تاثیر عوامل چون دما، زمان، غلظت سوبسترا، pH و حجم مایع تلقیح بر رشد و قابلیت تولید آنزیم توسط این باکتری مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از بهینه سازی فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز در واکنش سنجش آنزیمی نشان می‌دهدکه بیشترین فعالیت آنزیم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، pH برابر با ۷، زمان ٤٨ ساعت و غلظت اولیه سوبسترا ۷ g/l که مقدار آن برابر با ۵۰/۳۲ u/ml می باشد.

کلمات کلیدی:

آلفاآمیلاز، باسیلوس لیکنی فورمیس، ضایعات سیب زمینی، فعالیت آنزیمی

*مرتضی یعقوبی محمودآبادی

بهینه سازی و تولید آنزیم آلفاآمیلاز از ضایعات سیب زمینی به روش بیولوژیکی

مقدمه

سیب زمینی از جمله محصولات بسیار مهم و استراتژیک کشاورزی است که نقش قابل توجهی در تأمین انرژی مورد نیاز ساکنین این کره خاکی را دارد. سطح زیر کشت جهانی سیب زمینی در حدود ۱۹ میلیون هکتار و تولید سالانه این محصول نزدیک به ۳۲۷ میلیون تن می باشد. میزان انرژی موجود در هر کیلو گرم آن در مقایسه با انرژی همین میزان گندم ۲ برابر است. این وضعیت سبب اجرای سیاست‌های حمایتی دولت‌ها از افزایش تولید سیب زمینی و آگاه نمودن افکار عمومی در مورد ویژگی‌های آن شده است، به طوریکه تولید این محصول در ایران از ۱۰۰ هزار تن در سال ۱۳۳۹ به بیش از ۵ میلیون تن در سال ۱۳۸۹ افزایش یافته است[۱].

در حال حاضر در ۲۲ استان کشور محصول سیب زمینی کشت می شود که استان‌های همدانی اردبیل و اصفهان در ردیف تولید کنندگان عمده این محصول در کشور قرار دارند. حدود ۱۹۰ هزار هکتار از کل اراضی کشاورزی کشور به کشت این محصول اختصاص دارد. این میزان سطح زیر کشت ۱/۲۶ درصد از کل اراضی و ۳/۷ درصد از اراضی آبی کشور را در بر می گیرد[۲].

آلفاآمیلازحاصل از هیدرولیز نشاسته در طیف وسیعی از محصولات مانند گلوکز و مالتوز یا مالتو الیگوساکارید خاص یا مالتو الیگوساکاریدهای مختلط حاصل می شود. آنها در صنایع برای اهداف مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند. گلوکز و مالتوز یک آمیلاز در تخمیر الکل و فرمولاسیون شربت قند و یک آمیلاز تشکیل دهنده مالتو الیگوساکارید در فرآوری مواد غذایی است. اگرچه آلفاآمیلاز می تواند از منابع مختلفی از جمله گیاهان، حیوانات و میکروارگانیسم‌ها حاصل شود، هنگامی که توسط میکروارگانیسم‌ها تولید می شود به طور کلی نیازهای صنعتی را برآورده می کند. در حال حاضر، تعداد زیادی آمیلاز میکروبی از نظر تجاری در دسترس است که تقریباً کاملاً جایگزین هیدرولیز شیمیا یی نشاسته در صنعت فرآوری نشاسته شده است[۳]. به طور سنتی، آلفاآمیلازتوسط تخمیر غوطه‌وری (SMF) تولید می شود. در سال های اخیر، فرآیندهای تخمیر حالت جامد (SSF) بیشتر و بیشتر برای تولید این آنزیم مورد استفاده قرار گرفته است. SSF نسبت به SMF از مزایای بسیاری برخوردار است، مانند تکنیک ساده، بهره وری برتر، سرمایه گذاری کم، نیاز کم انرژی و تولید کمتر آب، بازیابی بهتر محصول و عدم ایجاد فوم گزارش شده که مناسب‌ترین فرآیند برای کشورهای در حال توسعه است. منابع کربن تجاری مانند گلوکز و نشاسته از تولید بسیار بالایی برای تولید آلفاآمیلازبرخوردار نیستند زیرا آن‌ها بسیار گران هستند. بنابراین، محققان متعددی استفاده از باقیمانده‌های کشاورزی ارزان که به راحتی در دسترس هستند مانند نی گندم، سبوس گندم، زباله های قهوه، زباله‌های موز، پوست سیب زمینی و باگاس قند را به عنوان منبع کربن در SSF برای تولید آلفاآمیلازتوصیف کرده‌اند[۶].

باکتری‌های باسیلوس سوبتیلیس[1]، باسیلوس لیکنی فورمیس، باسیلوس استئارو ترموفیلوس و باسیلوس آمیلو لیکوئیفشینس میکروارگانیسم های مناسبی برای تولید آلفاآمیلازهای مقاوم به حرارت به شمار می آیند و به طور گسترده در تولید تجاری این آنزیم مورد استفاده قرار می گیرند. آمیلاز مقاوم به حرارت از چندین سویه باکتریایی گزارش شده و با استفاده از تخمیر غوطه‌ور[2] و همچنین تخمیر در بستر جامد تولید شده‌اند. با این وجود استفاده از تخمیر در بستر جامد مزیت‌های بیشتری نسبت به تخمیر غوطه‌ور دارد و هزینه تولید آنزیم را کاهش می‌دهد.

[1] - Bacillus subtilis
[2] - Submerged Fermentation (SmF)

تولید آلفاآمیلاز با استفاده از تخمیر در بستر جامد محدود به باکتری‌های جنس باسیلوس مانند: باسیلوس سوبتیلیس، باسیلوس وولگاروس[۳]، باسیلوس مسنتریکوس[۴]، باسیلوس پلی میکسیا[۵]، باسیلوس مگاتریوم[۶] و باسیلوس لیکنی فورمیس می‌باشد.

آلفاآمیلازهای باکتریایی بیشترین تنوع را در خواص فیزیکوشیمیایی نشان می‌دهند pH مطلوب برای فعالیت آن‌ها بین ۲-۱۰/۵ و یا ۴ -۱۱ متغییر است. بسیاری از آلفاآمیلازها در طیف وسیعی از pH فعالیت دارند و منحنی های فعالیت pH برای آنها به صورت سر صاف است. دمای بهینه فعالیت آلفاآمیلازها از ۲۵ درجه سانتی گراد تا ۱۰۰ درجه سانتی گراد (آلتروموناس هالوپلانکتیک) متغییر است. که معمولاً با دمای رشد آنها مرتبط است. آلفاآمیلازها باید در دمای بالای ژلاتینه شدن (۱۰۰-۱۱۰ درجه سانتی گراد) و مایع شدن (۸۰-۹۰ درجه سانتی گراد) فعال و پایدار باشند. بنابراین در فرآیندهای صنعتی نیاز به آنزیم‌های آلفاآمیلاز ترموفیل و پایدار در برابر حرارت است[۷].Z. Al – Qodah و همکاران در سال ۲۰۰۷ به وسیله اثر pH و دما بر آنزیم آمیلاز تولید شده به وسیله باکتری ترموفیل B.sphaericus مورد بررسی قرار گرفت گرفت و مشخص که ماکزیمم فعالیت آنزیم در pH= ۷ می‌باشد و دمای بهینه نیز برای فعالیت ۶۵ درجه سانتی گراد تعیین شد[۴].بایسل و همکاران در سال ۲۰۰۳ نیز با جدا سازی سویه باسیلوس از چشمه آبگرمی در ترکیه که دمای فصلی آن در دامنه ۶۲ تا ۸۵ درجه سانتی گراد است، دریافتند که دمای بهینه رشد این باکتری ۳۷ درجه سانتی گراد می‌باشد. این تفاوت می‌تواند ناشی از آن باشد که هر چند ارگانیسم قادر به رشد و تولید آنزیم در دماهای بالا می‌باشد، اما بهینه دمایی سایر فرآیندهای دخیل در رشد، متابولیسم و بیوسنتز آنزیم‌ها در دمای پایین‌تری اتفاق می‌افتد[۵]. هدف از جمع آوری این اطلاعات بررسی تحقیقات سایر پژوهشگران بود که با وجود تلاش محققین برای فراهم کردن شرایط بهینه برای تولیدآنزیم آلفاآمیلاز، اثر برخی از عوامل موثر بر غلظت پروتئین وفعالیت آنزیم آلفاآمیلاز 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 باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس و تولید آنزیم آلفاآمیلاز به کار ببریم.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق باکتری مورد مطالعه سویه باسیلوس لیکنی فورمیس مولد آلفاآمیلاز هست که از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران به صورت لیوفیلیزه تهیه می‌شود 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 قسمت‌هایی 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 زمینی‌ها (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

[3] - Bacillus vulgarus
[4] - Bacillus mesentericus
[5] - Bacillus polymyxia
[6] - Bacillus megaterium

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 سانتی‌گراد تا رسیدن نمونه به وزن ثابت)، خاکستر(وزاندن ۲ گرم نمونه روی شعله و سپس استفاده از کوره الکتریکی با دمای ۵۰۰ درجه سانتی گراد تا خاکستر شدن نمونه ها)، چربی (به روش سوکسله) و پروتئین (به روش کلدال) نمونه ضایعات سیب زمینی مطابق روش‌های آزمون‌های اندازه گیری ترکیبات شیمیایی انجام می‌شود.

تعیین فعالیت آنزیمی آلفاآمیلاز:

فعالیت آنزیمی آلفاآمیلاز 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 آلفاآمیلاز 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 می‌گردد و برای ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار داده می‌شود و بعد ۰/۵ میلی لیتر سدیم پتاسیم تاتارات ۴٪ به آن اضافه می-شود 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 شده‌ی حاصل از فعالیت آنزیم به دست آورده می‌شود. [۹].

تاثیر pH های مختلف بر فعالیت آنزیمی آلفاآمیلاز

برای تعیین pH بهینه، بافر سیترات – فسفات با pH های 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 pH های مختلف استفاده می‌گردد. دمای فعالیت آنزیم در همه‌ی موارد ذکر شده، ثابت و و در ۳۵ درجه سانتی‌گراد تنظیم می‌گردد.

تعیین دمای بهینه بر فعالیت آنزیمی آلفاآمیلاز

به منظور تعیین دمای بهینه، فعالیت آنزیمی آلفاآمیلاز با استفاده از محیط تولید پایه با pH=۷ در دماهای انکوباسیون مختلف از ۲۷ تا ۴۷ درجه سانتی‌گراد با فواصل دمایی ۱۰ درجه سانتی‌گراد به ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت.

تعیین زمان بهینه بر فعالیت آنزیمی آلفاآمیلاز :

برای تعیین بهترین زمان تولید آنزیم توسط باکتری، چند محیط القایی تهیه می‌شود و هر کدام برای زمان‌های متفاوت در انکوباتور شیکردار با ۱۲۰ rpm قرار داده می‌شود. محیط‌های 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 آلفاآمیلاز

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

مدل سازی و بهینه سازی آزمایش‌ها

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 می باشد، علاوه بر اینکه روشی زمان بر است، به علت عدم در نظر گرفتن تاثیرات متقابل بین پارامترها قادر به تعیین مقادیر بهینه متغیرها نمی باشد. این محدودیت را می‌توان با استفاده از روش پاسخ سطحی حذف کرد. روش پاسخ سطحی مجموعه ای 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. [۸].

تحلیل نتایج

ترکیبات شیمیایی پوسته سیب زمینی

اندازه گیری ترکیبات شیمیایی 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	۴/۷۵	۳/۲	۴/۷۵	ضایعات سیب زمینی

بهینه سازی تولید آنزیمی آلفاآمیلاز از ضایعات سیب زمینی

به منظور بهینه سازی غلظت پروتئین و فعالیت آنزیمی آلفاآمیلاز از ضایعات سیب زمینی، دامنه و سطوح چهار متغیر مستقل به همراه کدهای متناظرشان توسط نرم افزار Design Expert طراحی انتخاب شد انجام شدکه درجدول (۲) ارائه شده است. با توجه به تعداد و سطوح پارامترهای انتخابی، ۳۰ آزمایش توسط نرم افزار برای بهینه سازی فعالیت آنزیم طراحی شد. فعالیت آنزیمی به عنوان متغیر وابسته یا پاسخ در نظر گرفته شد.

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

بازه و سطح		نماد	متغیرها
۱	-۱		
۷۲	۲۴	ساعت	زمان

۴۷	۲۷	سانتی گراد	دما
۹	۵	-	pH
۲۱	۷	گرم بر لیتر	غلظت سوبسترا

تجزیه تحلیل جدول ANOVA بدست آمده مربوط به فعالیت آنزیمی آلفاآمیلاز برای ضایعات سیب زمینی

نتایج مدل پاسخ سطح درجه ۲ که با استفاده از تحلیل واریانس انطباق یافته است. تحلیل واریانس، اهمیت و کارآمد بودن مدل را ارزیابی قرار می‌دهد. علاو بر این اهمیت آماری مدل کوادرتیک توسط جدول ANOVA تخمین زده می‌شود. اهمیت هر ضریب توسط F-value و P-value تعیین می‌شود. مقادیر P-value کوچکتر از ۰/۰۵ نشان می‌دهد که عبارت مدل قابل توجه هستند.

جدول (۳) تحلیل واریانس را برای مدل پاسخ سطح درجه ۲ نشان می‌دهد. مقدار بالای F-value و مقدار بسیار پایین P-value نشان می‌دهد که مدل ارائه شده قابلیت بالای پیش بینی نتایج آزمایشگاهی را دارد در این مورد، F-value و P-value به ترتیب ۱۳۴/۶۰ و ۰/۰۰۰۱< می‌باشند و صحت مدل ارائه شده برای فعالیت آنزیمی آلفاآمیلاز را تایید می‌کنند. همچنین مدل ارئه شده قابلیت بالای پیش بینی نتایج آزمایشگاهی را دارد. میانگین مربعات با تقسیم مجموع مربعات مدل و واریانس خطا و با در نظر گرفتن در جه آزادی (d.f) به دست آمد. به علاوه، غیر قابل اهمیت بودن مقدار Lack of fit (بیشتر از ۰/۰۵) نشان داد که مدل درجه ۲ برای بیشینه فعالیت آنزیمی توسط سوبسترای سیب زمینی معتبر است.

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

Source	SS [a]	DF [b]	MS [C]	F-value	P-value
Model	۴۱۹۰/۱۰	۱۴	۲۹۹/۲۹	۱۳۴/۶۰	<۰/۰۰۰۱
A-Time	۲۹۹/۵۵	۱	۲۹۹/۵۵	۱۳۴/۷۲	<۰/۰۰۰۱
B-Temperature	۳۴۰/۶۹	۱	۳۴۰/۶۹	۱۵۳/۲۲	۰/۰۰۰۱
C-pH	۳۶۹/۶۵	۱	۳۶۹/۶۵	۱۶۶/۲۴	۰/۰۰۰۱
D-density	۲۴۸/۱۲	۱	۲۴۸/۱۲	۱۱۱/۵۹	۰/۰۰۰۱
AB	۰/۳۱	۱	۰/۳۱	۰/۱۴	۰/۷۱۶۲
AC	۵/۲۵	۱	۵/۲۵	۲/۳۶	۰/۹۶۱۹
AD	۱/۹۸	۱	۱/۹۸	۰/۸۹	۰/۳۶۰۲
BC	۳/۱۴	۱	۳/۱۴	۱/۴۱	۰/۲۵۳۱
BD	۰/۲۹	۱	۰/۲۹	۰/۱۳	۰/۷۲۱۱
CD	۱/۱۲	۱	۱/۱۲	۰/۵۰	۰/۴۸۹۱

A^2	۵۶/۵۸	۱	۵۶/۵۸	۲۵/۴۵	۰/۰۰۰۱
B^2	۴۵۱/۶۶	۱	۴۵۱/۶۶	۲۰۳/۱۲	<۰/۰۰۰۱
C^2	۳۰/۸۹	۱	۳۰/۸۹	۱۳/۸۹	۰/۰۰۲۰
D^2	۱/۰۴	۱	۱/۰۴	۰/۴۷	۰/۵۰۴۷
Residual	۳۳/۳۵	۱۵	۲/۲۲		
Lack of fit	۳۳/۳۵	۱۰	۳/۳۴		
Pure error	۰/۰۰۰	۵	۰/۰۰۰		
Total	۴۲۲۳/۴۵	۲۹			

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

صحت برازش داده‌های تجربی با مدل توسط ضریب همبستگی (R^2) بررسی شده و در جدول (۴) ارئه شده است . مقدار R^2 از ۰ تا ۱ تغییر می‌کند R^2 بیان می‌کند که بین مقادیر پاسخ‌های مشاهده شده و مقادیر پاسخ‌های پیش بینی شده توسط مدل چه مقدار انحراف وجود دارد. هر چه مقدار R^2 به یک نزدیک باشد، مدل قوی‌تر خواهد بود و می‌تواند پاسخ سطح را بهتر پیش بینی کند. همچنین صحت مدل ارائه شده با ضریب همبستگی (R^2) بررسی می‌شود. در این مورد، مقدار ضریب همبستگی ۰/۹۹۲۱ نشان می‌دهد که مدل از لحاظ آماری معنی دار بوده و تنها ۰/۱ ٪ کل تغییرات با معادله به دست آمده تعریف نمی‌شود. مقدار ضریب همبستگی پیش بینی شده توسط نرم افزار (۰/۹۶۶۵= Pred R-Squared) تطابق قابل قبولی با مقدار ضریب همبستگی تنظیم شده (۰/۹۸۴۷= Adj R-Squared) دارد. همچنین، ضریب واریانس پایین (٪ ۴/۶۲= CV) نشان دهنده دقت بالای مدل می‌باشد. با توجه به جدول (۴) دقت کافی برابر با ۳۹/۲۱۲ می‌باشد که نشان می‌دهد دقت کافی و اعتماد پذیری برای آزمایش‌ها صورت گرفته است.

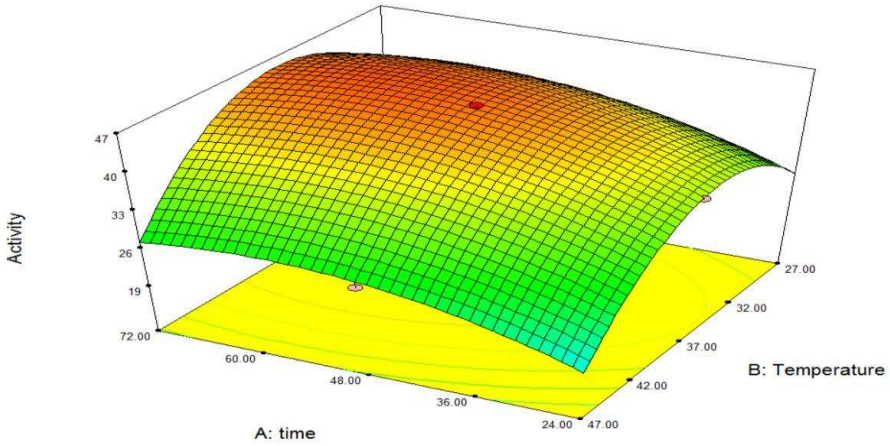
جدول (٤) نتایج تحلیل واریانس برای پارامترهای پاسخ مربوط به فعالیت آنزیمی آلفاآمیلاز

SD[a]	۱/۴۹	R^2	۰/۹۹۲۱
Mean	۳۲/۲۸	Adj R-Squared	۰/۹۸۴۷
CV,%	۴/۶۲	Pred R-Squared	۰/۹۶۶۵
PRESS [b]	۱۴۱/۶۳	Adeq Precision	۳۹/۲۱۲

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

تأثیر دو متغیر دما و زمان بر فعالیت آنزیمی آلفاآمیلاز

اثر دو متغیر تأثیر گذار بر فعالیت آنزیمی آلفاآمیلاز در شکل (۱)، نشان داده شده است. این منحنی تأثیر زمان و دما را بر فعالیت آنزیمی آلفاآمیلاز نشان می‌دهد.

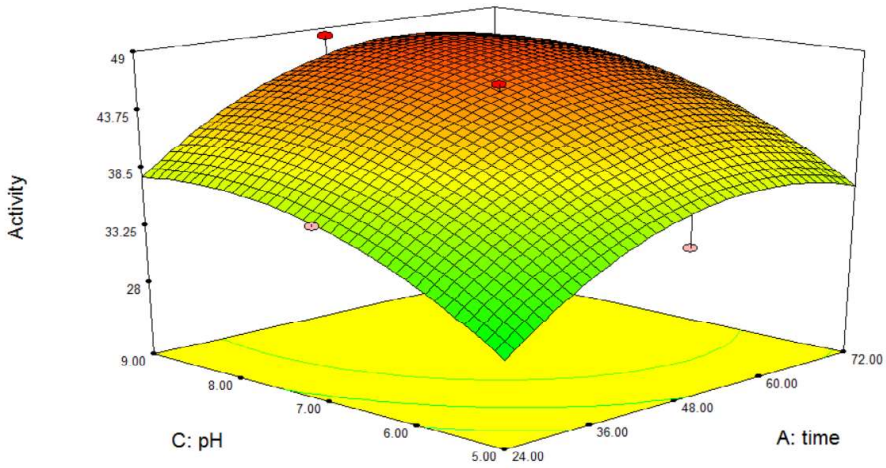


شکل (۱) تأثیر دو متغیر دما و زمان بر فعالیت آنزیمی آلفاآمیلاز

شکل (۱) برهم کنش دما و زمان تخمیر را نشان می‌دهد که مقدار بهینه فعالیت آنزیمی در زمان ۴۸ ساعت و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و کمترین مقدار فعالیت در زمان ۲۴ ساعت و دمای ۴۷ درجه سانتی گراد می باشد.مقدار بالای P-value (۰/۷۱۶۲) برای برهم کنش این دو پارامتر (دما، زمان) بیان گر اثر ضعیف این دو متغیر می‌باشد. فعالیت آنزیمی در دماهای مختلف نشان می‌دهد که میزان فعالیت آنزیمی درابتدا با افزایش دما از ۲۷ تا ۳۷ درجه سانتی گراد افزایش سپس با افزایش بیشتر دما تا ۴۷ درجه سانتی گراد، مقدار آن کاهش می‌یابد و با توجه به نمودار حداکثر فعالیت آنزیمی برابر با u/ml ۴۶/۰۸ بوده که در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و زمان ۴۸ می-باشد. همچنین سویه باکتریایی باسیلوس لیکنی فورمیس نوعی میکروارگانیزم گرما دوست است ولی بیشینه مقدار دمایی که این سویه باکتریایی قادر به فعالیت حداکثر آنزیمی می‌باشد که در ۳۷ درجه سانتی گرا د بوده و از این دما بالاتر میزان فعالیت آنزیمی کاهش می‌یابد که می‌تواند به دلیل تغییر در ساختار آنزیمی یا دناتوره شدن آنزیمی باشد. در زمان‌های طولانی مقدار فعالیت آنزیمی بیشینه می‌باشد. با توجه به این نکته که گلوکز نقش بازدارندگی در فعالیت آنزیمی آلفاآمیلاز دارد و در زمان‌های طولانی مولکول‌های نشاسته بیشتری به پلیمرهای کوچک تر که از واحدهای گلوکز تشکیل شده‌اند هیدرولیز می‌شود پس با کاهش مقدار گلوکز در محیط با افزایش فعالیت آنزیم مواجه هستیم.

تأثیر زمان و pH بر فعالیت آنزیمی آلفاآمیلاز

تأثیر زمان و pH بر فعالیت آنزیمی آلفاآمیلاز در شکل (۲)، به نمایش درآمده است. یکی از مهم ترین فاکتورpH است که تعیین کننده‌ی رشد و مورفولوژی میرکروارگانیسم‌ها می‌باشد چرا که برخی از میکروارگانیسم‌ها به غلظت بالای یون هیدروژن حساس می‌باشند. مطالعات نشان داده است که سویه باسیوس لیکنی فورمیس برای رشد متابولیسم و فعالیت آنزیمی آلفاآمیلاز به pH های قلیایی نیاز دارند از طرف دیگر pH سنتز و ترشح آنزیمی آلفاآمیلاز و همچنین ثبات آن را تحت تأثیر قرار می‌دهد. مقادیر بهینه pH برای باکتری‌ها مقدار ۷ است.

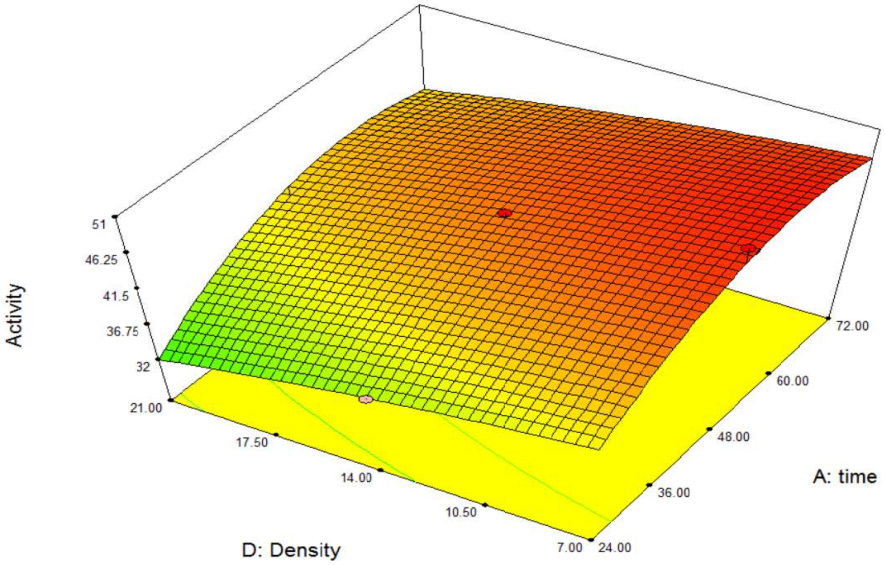


شکل (۲) تأثیر دو متغیر زمان و pH بر فعالیت آنزیمی آلفاآمیلاز

در شکل (۲) برهم کنش pH و زمان تخمیر را نشان می‌دهد. مقدار تخمین زده F-value برای برهم کنش این دو پارامتر (زمان وpH) ۲/۳۶ می‌باشد. مقدار بهینه زمان و pH به ترتیب ۴۸ ساعت و۷ می‌باشد. که مقدار فعالیت آنزیمی بدست آمده در مقدار بهینه pH و زمان برابر با ۴۶/۰۸ u/ml است. حداکثر میزان فعالیت آنزیمی در۹ = pH و زمان ۴۸ ساعت که مقدار فعالیت آنزیم برابر با۴۸/۲۵ u/ml است. میزان فعالیت آنزیمی در شرایط قلیایی بیشتر از شرایط اسیدی بوده که این مسئله به علت رشد بیشتر باکتری‌ها در pH های قلیایی می‌باشد. در بین پارامترهای فیزیکی، pH محیط کشت نقش مهمی را در تغییرات مورفولوژیکی ارگانیسم و فعالیت آنزیمی آلفاآمیلاز ایفا می‌کند. تغییر pH در طی رشد ارگانیسم بر روی پایداری آنزیمی آلفاآمیلاز موثر است. معلوم شده است که ترکیب دیواره سلولی و غشاء پلاسمایی میکرو ارگانیسم‌ها تحت تأثیر pH قرار می‌گیرد. و تغییر در طبیعت دیواره سلولی و غشاء سلولی ممکن است دامنه دمای رشد میکرو ارگانیسم‌ها را تحت تأثیر قرار دهد [۱۰]. با مقایسه سطوح فعالیت برای دو متغیر نشان داده شد که متغیر زمان تأثیر بیشتری نسبت به pH برای فعالیت آنزیمی آلفاآمیلاز دارد.

٤-۷-۳- تأثیر زمان و غلظت سوبسترا بر فعالیت آنزیمی آلفاآمیلاز

تأثیر زمان و غلظت بر فعالیت آنزیمی آلفاآمیلاز با توجه به این که محیط همواره از میکروارگانیسم غنی است. فعالیت آنزیمی در خور توجهی از آنزیم آلفاآمیلاز در مقادیر بالا تولید شده است.

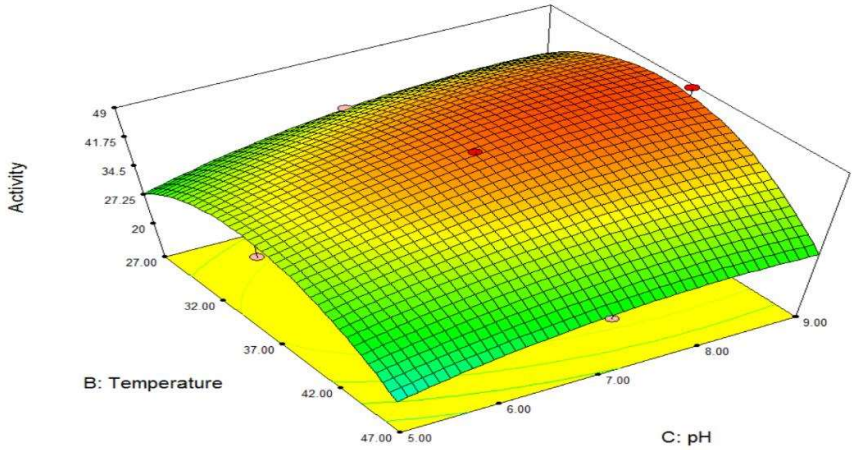


شکل (۳) تأثیر دو متغیر زمان و غلظت بر فعالیت آنزیمی آلفاآمیلاز

در شکل (۳) رابطه بین غلظت سوبسترا و زمان تخمیر و اثر آن‌ها روی فعالیت آنزیمی را نشان می‌دهد که بر طبق نمودار با افزایش غلظت سوبسترا فعالیت آنزیمی کاهش می‌یابد. مقدار فعالیت آنزیمی در غلظت g/l ۷ سوبسترا، بیشترین میزان فعالیت آنزیمی را داشته و با افزایش غلظت سوبسترا تا g/l ۲۱ کمترین میزان فعالیت آنزیمی را دارد. سنتز آنزیم‌های تجزیه کننده کربوهیدرات ها در بیشتر گونه‌های باسیلوس لیکنی فورمیس به مهار کاتابولیک توسط پیش ماده‌هایی که به راحتی قابل متابولیزه شدن هستند، می شود احتمال می‌رود که کاهش فعالیت آنزیمی آلفاآمیلازدر غلظت‌های بالای ضایعات سیب زمینی به دلیل مهار کاتابولیکی سوبسترا‌های متابولیزه شده باشد. مقادیر بهینه غلظت سوبسترا و زمان برای فعالیت آنزیمی آلفاآمیلاز به ترتیب g/l ۱۴ و۴۸ ساعت می‌باشند. با افزایش زمان تا ۷۲ ساعت فعالیت آنزیمی آلفاآمیلاز رو به افزایش می‌باشد. با توجه به نمودار، بالاترین میزان فعالیت آنزیمی برابر u/ml ۵۰/۳۲ بوده که در غلظت g/l ۷ از سوبستر و زمان ۴۸ ساعت می‌باشد.

٤-۷-٤- تأثیر دما و pH بر فعالیت آنزیمی آلفاآمیلاز

تأثیر دما و pH بر فعالیت آنزیمی آلفاآمیلاز در شکل (۴) 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 ۴۷ درجه سانتی‌گراد کمترین میزان فعالیت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بیشترین مقدار فعالیت آنزیمی را داشتیم.

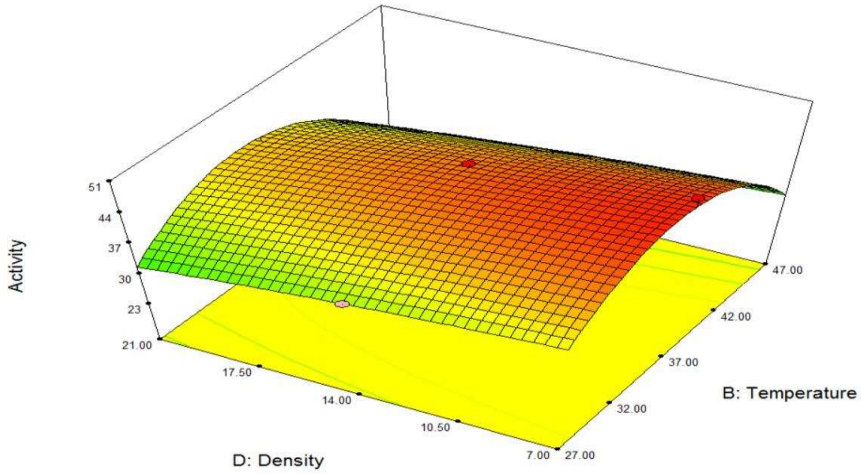


شکل (٤) تأثیر دو متغیر دما و pH بر فعالیت آنزیمی آلفاآمیلاز

در شکل (۴) برهم کنش pHو دما را نشان می‌دهد. مقدار تخمین زده P-value برای برهم کنش این دو پارامتر (دما و pH) ۰/۲۵۳۱ می‌باشد که بیان گر اثر متقابل ضعیف این دومتغیر می‌باشد. مقدار بهینه دما و pH به ترتیب ۳۷ درجه سانتی گراد و۷ می‌باشد. با توجه به نمودار کمترین فعالیت آنزیمی در دمای ۴۷درجه سانتی گراد و pH برابر با ۵ می‌باشد. با افزایش دما بیشتر از دمای بهینه فعالیت آنزیمی به شدت کاهش می یابد. به طوری که میزان فعالیت آنزیمی در۷ = pH و دمای۴۷ درجه سانتی گراد برابر با u/ml ۲۶/۷۴ است . با مقایسه سطوح فعالیت برای دو متغیر نشان داده شد که متغیردما تأثیر بیشتری نسبت به pH برای فعالیت آنزیمی آلفاآمیلاز دارد. با توجه به رشد این باکتری در غلظت‌های بالای نمک و خصوصیات نمک دوستی نسبی که این باکتری از خود نشان داده است می‌توان پذیرفت که این ارگانیسم در pH های کمی قلیایی رشد و در نتیجه فعالیت آنزیمی بهتری داشته باشد pH ۷ قبلاً به عنوان pH بهینه در باسیلوس لیکنی فورمیس نیز گزارش شده است . این باکتری در pHهای پایین تر از ۵ و بالاتر از ۱۰ رشد رضایت بخشی نداشت و در نتیجه آن فعالیت آنزیمی به طور معنی داری در این pH ها کاهش یافت.

٤-۷-۵- تأثیر دما و غلظت سوبسترا بر فعالیت آنزیمی آلفاآمیلاز

تأثیر دما و غلظت سوبسترا بر فعالیت آنزیمی آلفاآمیلاز در شکل (۵) بررسی شده است. برای تشخیص میزان اثر گذاری دو متغیر دما و غلظت از آن‌ها در رنج های متفاوتی آزمایش به عمل آمد. در این خصوص در دمای ۴۷ درجه سانتی گراد کمترین میزان فعالیت و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد بیشترین مقدار فعالیت آنزیمی را داشتیم.

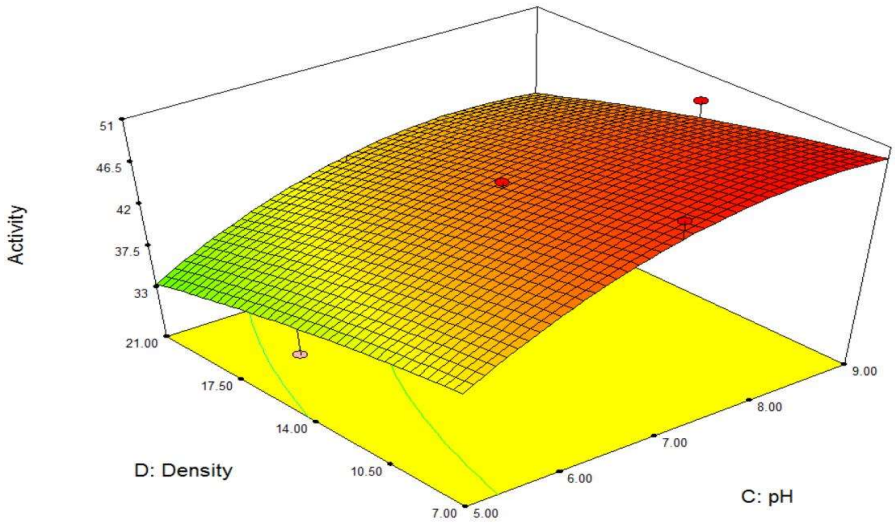


شکل (۵) تأثیر دما و غلظت بر فعالیت آنزیمی آلفاآمیلاز

شکل (۵) برهم کنش دما و غلظت سوبسترا را نشان می‌دهد مقدار بهینه دما و غلظت به ترتیب در ۳۷ درجه سانتی گراد و ۱۴ g/l برابر با ۴۶/۰۸ u/ml می‌باشد. مقدار بالای P-value (۰/۷۲۱۱) برای برهم کنش این دو پارامتر (دما، غلظت سوبسترا) بیان گر اثر متقابل ضعیف این دو متغیر می‌باشد. با توجه به منحنی نشان داده شده در شکل هر دو مقدار غلظت سوبسترا و دما با افزایش در مقدار عددی خودشان دارای کمترین سطح فعالیت آنزیمی می‌باشند. با مقایسه سطوح فعالیت برای دو متغیر نشان داده شد که متغیردما تأثیر بیشتری نسبت به غلظت سوبسترا بر روی فعالیت آنزیمی آلفاآمیلاز دارد. در باسیل ها لایه پروتئینی سطحی (لایه- S) کنترل آزاد سازی آنزیم‌های خارج سلولی را دربر دارد. تغییر در این لایه سطحی می تواند با تفاوتی در سطح اکسیژن القاء شده باشد. بنابراین، دمای انکوباسیون ممکن است با تحت تأثیر قرار دادن ساختارهای ماورائی غشاء سلولی و یا لایه-S با تغییر در سطح اکسیژن حل شده و در نتیجه باعث تفاوت‌هایی در بهینه‌های دما برای رشد و فعالیت آنزیمی آلفاآمیلاز شود.

تأثیر pH و غلظت سوبسترا بر فعالیت آنزیمی آلفاآمیلاز

در شکل (۶)، تأثیر pH و غلظت سوبسترا بر فعالیت آنزیمی آلفاآمیلاز بررسی شده است. برای تشخیص میزان اثر گذاری دو متغیر pH و غلظت سوبسترا از آنها در رنج‌های متفاوتی آزمایش به عمل آمد. در این خصوص در غلظت‌های پایین از محیط کشت فعالیت آنزیمی آلفاآمیلاز بیشتر و برای متغیر pH عکس این حالت صادق است.



شکل (٦) تأثیر pH و غلظت سوبسترا بر فعالیت آنزیمی آلفاآمیلاز

برهم کنش pH و غلظت سوبسترا و تاثیر آن‌ها بر فعالیت آنزیمی در شکل (۶) ارئه شده است . مقدار بهینه pH و غلظت سوبسترا به ترتیب در۷ و ۱۴ g/l می‌باشد. مقدار بالای P-value (۰/۴۸۹۱) برای برهم کنش این دو پارامتر (pH ، غلظت سوبسترا) بیان گر اثر ضعیف این دو متغیر می‌باشد. با توجه به منحنی با فزایش غلظت سوبسترا فعالیت آنزیمی کاهش می‌یابد. حداکثر فعالیت آنزیمی در pH =۹ و غلظت ۷ g/l که مقدار فعالیت آنزیمی برابر با ۵۰/۳۲ u/ml می‌باشد. با مقایسه سطوح فعالیت برای دو متغیر نشان داده شد که متغیرpH تأثیر بیشتری نسبت به غلظت سوبسترا برای فعالیت آنزیمی آلفاآمیلاز دارد.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق آنزیم آلفاآمیلاز توسط باسیلوس لیکنی فورمیس با استفاده از ضایعات سیب زمینی به عنوان سوبسترای ارزان قیمت تولید شد. شرایط بهینه تولید آنزیم آلفاآمیلاز نیز با استفاده از نرم افزار Design Expert و با بررسی اثر چهار پارامتر دما، زمان، غلظت سوبسترا و pH بر فعالیت آنزیمی آلفاآمیلاز و. 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 ۲۷-۴۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. نتایج نشان می‌دهد که دمای بهینه وبیشترین فعالیت آنزیمی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. و همچنین در۴۷ درجه سانتی‌گراد کمترین فعالیت آنزیمی را دارد.
- فعالیت آنزیمی، در محدوده pH ۹-۵ سنجش شد. فعالیت آنزیمی آلفاآمیلاز در محدوده pH ۹-۷ بیش ترین فعالیت را دار می‌باشد. 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 می دهد که زمان بهینه وبیشترین 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 (g/l) سنجیده شد. فعالیت آنزیمی آلفاآمیلاز در غلظت سوبسترا (g/l) ۷ دارای بیشترین فعالیت می‌باشد. همچنی مقدار بهینه فعالیت آنزیمی در غلظت سوبسترای (g/l) ۱۴ می‌باشد.

منابع

۱. بررسی سازوکارهای ارتقای توانمندی‌های مدیریتی کشاورزان در مدیریت ضایعات سیب زمینی در شهرستان رزن: م ۱۳۹۱. وزارت علوم، تحقیقات و فناوری - دانشگاه محقق اردبیلی - دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی.

۲. نواب د، م ۱۳۹۷. بررسی وضعیت تولید سیب زمینی در ایران. همایش بین المللی افق های نوین در علوم کشاورزی و منابع طبیعی و محیط زیست.

3. Akatın MYJTBD. 2010. An Overview of Amylase Production by Solid State Fermantation (SSF) since. 9(1):1-7.
4. Al-Qodah ZJAJoB. 2007. Determination of kinetic parameters of∝-amylase producing thermophile Bacillus sphaericus. 6.
5. Baysal Z, Uyar F, Aytekin ÇJAM. 2003. Production of a-amylase by thermotolerant Bacillus subtilis in the presence of some carbon, nitrogen containing compounds and surfactants. 53:32.
6. Bakri Y, Elkhouri S, Harba M, Akeed YJBS-P. 2020. Amylase Production by Bacillus subtilis SY134D Strain Under Submerged Fermentation. 63(2):18-13.
7. Dhital S, Warren FJ, Butterworth PJ, Ellis PR, Gidley MJJCrifs. 2017. nutrition Mechanisms of starch digestion by α-amylase—Structural basis for kinetic properties. 57(5):875-92.
8. 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.
9. Thomas, L.C. and Chamberlin, G.J. 1974. Colorimetric chemical analytical methods.
10. Najafpour, G. 2006. "Biochemicalengineeringandbiotechnology", ElsevierScience, FirstEdition,81-140.

Optimization and Production of Alpha-Amylase Enzyme from Potato Waste by Biological Methods

Morteza Yaghoubi[1], Hassan Rezaei[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

Alpha-amylase is one of the most important industrial enzymes; it can be obtained from plants, animals and microorganisms. However, enzymes that are extracted from fungal and bacterial sources have important applications in the industrial sector. In this study, therefore, potato peels which were hydrolyzed by dilute acidic solution were used as a carbon source for the growth of Bacillus licheniformis in order to produce alpha-amylase. Alpha-amylase production was optimized by changing the parameters (temperature, time, pH and substrate concentration) by Design Expert software design. The aim of the experiment was to optimize and produce alpha-amylase enzyme from inexpensive agricultural sources by B. licheniformis by the response surface method (RSM). After the enzyme was produced by the mentioned bacterium, the effects of some factors such as temperature, time, substrate concentration, and pH and inoculation fluid volume on the growth of B. licheniformis and its ability to produce alpha-amylase were investigated. The optimization results of alpha-amylase 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 7 g/l; it is equal to 50.32 U/ml.

Key words: Amylase, Bacillus licheniformis, Enzyme activity, Potato waste

* Morteza Yaghoubi Mahmoudabadi
Mortezayaghoby2019@gmail.com