جهت تهيه فايل WORD اين مقاله به سايت DaneshResan.com مراجعه نماييد و عنوان مقاله را جستجو كنيد
بيش از ۲ ميليون مقاله فارسی در اين سايت موجود ميباشد

چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران
کرمان مردادماه ۱۳۸٤

International Center For Science & high Technology and Environmental Sciences

The 4th National Biotechnology congress
Islamic Republic of Iran
Kerman august 2005

مقايسه آنزيم های پکتينوليتيک توليد شده توسط سويه بهينه قارچ Aspergillus sp. در سيستم های تخميری مختلف

علی شيخی نژاد* - نسرين معظمی - سيد محمد حيدريان - فرداد هرمزی - سيد جلال ميرحسيني
پژوهشکده بيوتکنولوژی - سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ايران – مجتمع تحقيقاتی عصر انقلاب
تهران- خيابان انقلاب، خيابان فرصت، شماره ۷۱
تلفن و دورنگار: ۰۲۱-۸۸۳۸۳۵۰
E-Mail: sheykhi99@yahoo.com

آنزيمهای پکتينوليتيک (پکتيناز ها) دسته اي از آنزيمهاي هيدروليتيك تجزيه کننده پکتين مي باشند که قادرند مواد و ترکيبات پکتيني را که عمدتا در ديواره سلول گياهي قرار دارند تجزيه نمايند. اين آنزيمها در صنعت توليد آبميوه، داراي اهميت بوده و به منظور کمك به صاف کردن، شفاف کردن و افزايش بازدهي، مورد استفاده قرار مي گيرند. استفاده از اين آنزيمها کارآيي عمل استخراج را بالا مي برد و با کاهش ويسکوزيته و حذف مواد جامد و معلق در مراحل پرس کردن و فيلتراسيون باعث افزايش بازده مي گردند. ميکروارگانيسم ها از جمله قارچها توليد کننده صنعتی اين آنزيم ها هستند.
در اين تحقيق، سويه M153 که با بکارگيري روش هاي Mutation & Selection از سويه قارچ Aspergillus sp. ATHUM-3482 حاصل گرديده بعنوان توليد کننده مورد استفاده قرار گرفت.
انواع محيطهاي کشت در سيستمهای تخميري متفاوت پس از بهينه سازی شرايط مورد استفاده قرار گرفت و ميزان توليد انواع آنزيمهاي پکتينوليتيك شامل پلي گالاكتوروناز (PG)، پکتين لياز (PL) و پکتين استراز (PL) مورد بررسي قرار گرفت. با توجه به نتايج بدست آمده مشخص مي شود که در محيط کشت نيمه جامد نسبت به محيط کشت مايع، کمپلکس آنزيم بيشتري توليد مي گردد و همچنين حداکثر ميزان توليد آنزيم در اين محيط نسبت به سيستم بستر جامد در زمان کوتاهتري انجام مي پذيرد. در اين محيط با بکارگيري ذرات جامد در يك سوبستراي محلول سعي شده است تا از مزاياي محيط تخميري بستر جامد و محيط کشت مايع، در کنترل فرآيند توليد آنزيم و نيز سهولت در استحصال آنزيم توليدي استفاده شود. علاوه بر اين، از آنجا که در محيط کشت نيمه جامد، از تفاله چغندر قند بعنوان تنها منبع کربن استفاده مي شود، مي توان از اين محيط که از نظر اقتصادي مقرون به صرفه تر است، براي توليد آنزيم در مقياس صنعتي استفاده نمود.
واژه هاي کليدي؛ آنزيمهای پکتينوليتيک، تخمير، آسپرژيلوس

Comparison of Pectinolytic enzymes Produced by *Aspergillus sp.* in different fermentation systems

Sheykhinejad A.*, Moazami N., Heydarian M. Hormozi F., Mirhoseini J.

Department of Biotechnology, Asr-e Enghelab Research Complex,
Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST),
No. 71, Forsat St. Enghelab Ave. Tehran, Iran
Tel/Fax No.: 0098-21-8838350
E-Mail: Sheykhi99@yahoo.com

Abstract.

Pectinases are enzymes with wide range of application in the food industries. They are used for maceration and liquefaction of fruits and vegetables and also in fruit juice technology to facilitate juice extraction and clarification.
Fermentation of M153, a new mutant of Aspergillus sp. AHUM-3482 for Pectinolytic complex enzymes production contains polygalacturonase (PG), pectin esterase (PE) and pectin lyase (PL) was studied, due to its high application in food industries.
Results exhibited significantly different PG activity, and different PG/PE quotient as well as different PL activity.
The highest production was obtained for improved strain 32 unit/ml with solid state fermentation over 6 days; but in submerged fermentation was 18.8 unit/ml over 4 days fermentation.
A new medium named "Semi Solid" was defined for Pectinolytic enzymes production. Highest production in this medium was 28 unit/ml over 5 days fermentation; and so, sugar-beet pulp was used as sole carbon source in this medium that makes it useable for Pectinolytic enzymes production at industrial level.

Keywords: Pectinolytic enzymes, Fermentation, Aspergillus

مقدمه

آنزيمهاي توليد شده توسط ميکروارگانيسمها حدود ۹۰ درصد از کل آنزيمهاي مورد استفاده صنايع را تامين مي کنند. در بين ميکروارگانيسم ها، قارچها و بخصوص قارچ آسپرژيلوس بيشترين سهم را در توليد آنزيمي دارا مي باشند.
آنزيمهاي تجاري پکتيکي يا پکتينازها در صنعت توليد آبميوه بمنظور پکتين زدائي و برطرف نمودن کدورت و حفظ حالت ابري پايدار در عصاره بکار گرفته مي شوند. از آنجا که باغداري و توليد ميوه در بخش وسيعي از مناطق کشور رايج بوده

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

در تولید آنزیمهاي پکتیناز از تخمیر بستر جامد و کشت غوطه ور استفاده مي شود و نوع محیط کشت بکار گرفته شده در صنعت، بستگي به ویژگیها و قابلیتهاي محل تولید آنزیم دارد، بطوریکه بتوان از مواد اولیه ارزان قیمت در محیط استفاده نمود. در این تحقیق مواد اولیه مختلفي در سیستمهاي تخمیري متفاوتي مورد بررسي قرار گرفتند که استفاده از تفاله چغندر قند بعنوان منبع کربن پکتین دار مورد توجه قرار گرفت و در نهایت محیطي تحت عنوان نیمه جامد بکار گرفته شد که اقتصادي تر بوده و از مزایای تخمیرهای غوطه ور در صنعت نیز برخوردار مي باشد.

مواد و روش ها؛

میکروارگانیسم مورد استفاده، موتانت M153 حاصل از سویه قارچ *Aspergillus sp. ATHUM-3482* مي باشد که توسط تیم متخصص پژوهشکده بیوتکنولوژي سازمان پژوهشهاي علمي و صنعتي ایران و با بکارگیري روش هاي Mutation & Selection بهینه سازي گردید. پس از آن محیط هاي کشت و شرایط تخمیري براي سویه بهبود یافته بهینه گردید و مورد استفاده قرار گرفت. ترکیبات و شرایط تخمیري محیط هاي کشت به شرح زیر مي باشد:

محیط کشت تخمیري مایع: شامل پکتین سیب (۱۰)، پودر خیسانده ذرت (Corn Steep Powder) ۲۰ گرم در لیتر و نیز فسفات هیدروژن آمونیوم ۷ و املاح فسفات هیدروژن دي سدیم، کلرید کلسیم و سولفات منیزیم هر کدام به میزان یک گرم در لیتر مي باشد.

محیط کشت تخمیري بستر جامد: شامل سولفات آمونیوم (۷)، کلرید آمونیوم (۵)، فسفات هیدروژن پتاسیم (۲)، سولفات منیزیم (۱) و سولفات آهن (۰/۲ گرم در لیتر) به ازای۱۰۰ گرم تفاله چغندر قند خشك و خرد شده می باشد.

محیط کشت تخمیري نیمه جامد: شامل فسفات هیدروژن آمونیوم ۹ ، کلرید آمونیم ۵ و املاح سولفات منیزیم، فسفات هیدروژن دي سدیم و کلرید کلسیم هر کدام ۱ گرم در لیتر به ازای۵۰ گرم تفاله چغندر خرد شده می باشد.

جهت تلقیح به مقدار $۱۰^{۸}$ - $۱۰^{۷}$ اسپور از سوسپانسیون اسپوری به فلاسکها افزوده و در دمای ۳۰ درجه سانتي گراد و دور ۱۸۰ rpm قرار داده شد.

جهت سنجش آنزیمهای تجزیه کننده پکتین از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد. بطوریکه برای سنجش آنزیم پلی گالاکتوروناز (PG) تولید شده روش اسید دي نیترو سالیسیلیك (آزمون DNS) بكار گرفته شد. در این روش با بكارگیري ماده فوق، قندها و گروههاي احیا کننده اي که در اثر فعالیت آنزیم آزاد مي شوند، اندازه گیري مي گردند. هرچه فعالیت آنزیمي بیشتر باشد، قندها و گروههاي احیا کننده اي که از تجزیه پکتین سوبسترا تولید مي شوند بیشتر بوده و سبب تغییر رنگ بیشتر ماده DNS از زرد روشن به خرمایي رنگ مي شود در نهایت جذب نوري آنها در اسپکتروفوتومتري بیشتر خواهد بود. در اثر فعالیت آنزیم پکتین استراز (PE)، و واکنش آن با سوبستراي مربوطه، مولکول پکتین دي استریفیه شده و گروههاي کربوکسیل آزاد مي شوند که این باعث ایجاد حالت اسیدي مي گردد. علاوه بر روش تیتراسیون که می تواند عملکرد آنزیم را برآورد کند با بکارگیري اندیکاتورهاي pH از قبیل Bromothymolblue و بررسی تغییر رنگ از زرد تا سبز و اسپکتروفتومتري مي توان به میزان فعالیت آنزیم پی برد.

براي سنجش فعالیت آنزیم پکتین لیاز (PL)، از روش اسپکتروفوتومتري در طول موج ۲۳۵ نانومتر استفاده شد. در اثر فعالیت این آنزیم و واکنش با سوبسترا، میزان جذب نوري به دلیل ایجاد باند دوگانه در کربن هاي شماره ٤ و ٥ مولکول پکتین افزایش مي یابد.

نتایج و بحث؛

نمودار میزان تولید انواع آنزیمهای پکتینولیتیک در محیط هاي کشت مختلف در طول زمان رسم گردید.

نتایج نشان می دهد که حداکثر تولید در محیط کشت جامد بوده و مربوط به روز ششم مي باشد در حالیکه این زمان براي محیط هاي مایع روز چهارم و برای نیمه جامد روز پنجم است. با توجه به نتایج بدست آمده مشخص مي شود که در محیط کشت نیمه جامد نسبت به محیط کشت مایع، میزان کمپلکس آنزیم بیشتري تولید مي گردد و همچنین حداکثر میزان تولید آنزیم در این محیط نسبت به سیستم بستر جامد در زمان کوتاهتري انجام مي پذیرد.

در این محیط با بکارگیري ذرات جامد در یك سوبستراي محلول، سعي شده است تا از مزایاي محیط تخمیري بستر جامد و محیط کشت مایع، در کنترل فرآیند تولید آنزیم و نیز سهولت در استحصال آنزیم تولیدي استفاده شود. علاوه بر این، از آنجا که در محیط کشت نیمه جامد، تفاله چغندر قند تنها منبع کربن است، مي توان از این محیط که از نظر اقتصادي مقرون به صرفه است، براي تولید آنزیم در مقیاس صنعتي استفاده نمود.

حداکثر میزان تولید آنزیمهای پکتینولیتیک در هر یك از محیط هاي کشت، در جدول زیر نشان داده شده است:

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

	PG (unit/ml)	PE (unit/ml)	PL (unit/ml)	Total
Submerged Fermentation	21.2	6.8	2.4	18.8
Semi State Fermentation	25.6	6.5	2.8	28
Solid State Fermentation	29.8	5.2	1.95	32

پس از مناسب تشخیص داده شدن محیط تخمیری نیمه جامد، بررسی میزان آنزیم توليدي در بیوراکتورهای همزن دار و بیوراکتور ایرلیفت نشان داد که میزان تولید آنزیم در بیوراکتور ایرلیفت، بطور قابل ملاحظه اي از فلاسك و بیوراکتور همزن دار بیشتر است. علاوه بر موارد فوق، توان مصرفي بیوراكتور همزندار، حتي در پايين‌ترين دور بميزان قابل ملاحظه‌اي از توان مصرفي بیوراكتور ایرلیفت بیشتر است. با اين مقايسه مي‌توان با اطمينان گفت كه در شرايط مشابه از لحاظ توليد محصول مورد نظر، صرفه اقتصادي با بیوراکتور ایرلیفت است زيرا علاوه بر هزینه اولیه کمتر، با توجه به محاسبات اين قسمت، هزينه كاركرد آن نيز كمتر مي‌شود و در واقع اين امر يكي از دلايل مهم كاربرد روزافزون اين بیوراکتورها مي‌باشد كه می تواند جهت تولید صنعتی آنزیم های پکتیناز بکار آید.

تشكر و قدرداني:
لازم است تا بدينوسيله از كليه همكاراني كه در انجام اين تحقيق زحمات فراواني را متقبل شدند، سپاسگزاري شود.

منابع:

1- Allen, D. G., and Robinson, C. W., 1990, Measurement of reological properties of filamentous fermentation broths. Chem. Eng. Sci., 45: 37-48
2- Doran, Pauline M., 1995, Bioprocess Engineering Principles. Academic Press.
3- Galiotou-Panayotou, M., Kapantai, M. and Kalantzi, O.; 1997; Growth conditions of Aspergillus sp. ATHUM-3482 for Polygalacturonase production. Appl. Microbiol. Biotechnol. (47): 425-429
4- Gervais, P. and Bensoussan, M.; 1994; Solid-state Fermentation of the genus Aspergillus; Handbooks of Biotechnology, No.7; Aspergillus; Plenum Press Inc. (New York): 101-135
5- Godfrey, T. and West, Stuart; 1996; Industrial Enzymology; MC Millan Press LTD.: 84-129
6- Lea, A. G. H.; 1995; Enzymes in food Processing; Chapman & Hall: 223-247
7- Miller, Gail Lorenz; 1959; Use of di-nitrosalicylic acid Reagent for Determination of Reducing Sugar; Analytical Chmistry, 31(3); March: 426-428