Isolation and screening of pectinase producing *Aspergillus niger* and use of whey to optimize enzyme production

Pouya M.[1], Ghazi Sh.[1 *], Tukmechi A.[2]

1.Department of Microbiology, Faculty of New Science, Tehran Medical sciences, Islamic Azad university, Tehran, Shokoofeh.ghazi@gmail.com

2. Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

Abstract

Aims and Background: Pectinase that can break down pectin in plant cell walls is one of the most important industrial enzymes in the world, which can be isolated from a wide range of microorganisms such as bacteria and fungi. Therefore, considering the importance and applications of this enzyme in food processing, agriculture, the purpose of this research is isolating and screening pectinase-producing fungi from some of rotten fruits and vegetables, as well as optimizing the enzyme production condition.

Materials and methods: Isolation and identification of pectinase producing fungi from rotten fruits (peach, plum and apple) and vegetables (onion) were done. Isolation and screening the most capable fungal strains producing pectinase was used by cultivation on specific Pectin Agar medium, staining with lactophenol cotton blue and slide culture method. In order to identify the isolated fungi more accurately, the molecular technique like 18S rRNA sequencing was used. Optimizing the production rate of pectinase enzyme carried out using pectin substrate accompanied by different Lactic Whey and Permeate whey under different temperatures and pH levels, and the activity of enzyme was measured by the standard DNS method.

Results: one *Aspergillus niger* fungus producing pectinase enzyme was isolated from onion. Results for optimization conditions shows that the identified strain, shows an enzyme activity equal to 103/018 (IU/ml) in the presence of permeate whey and pectin substrate, under incubation at 25 C° ,140 rpm, and pH 6.5. While, pectinase production with only pure pectin substrate was lower equal to 92.717 (IU/ml) when incubation at 25 C° , same rpm and pH 7.

Conclusions: Potent native fungal strains isolated from our country are suitable candidates for the production of important industrial enzymes such as pectinase. Also using cost effective substrates like Whey can be replaced by expensive pure substrates in production industry for the important enzymes production process.

Key words: *Aspergillus niger*, Pectinase enzyme, DNS method, Whey

جداسازی و غربالگری آسپرژیلوس‌نایجر تولید کننده پکتیناز و استفاده از آب‌پنیر در بهینه‌سازی تولید آنزیم

مهسا پویا[1]، شکوفه غازی[*1]، امیر توکمه‌چی[2]

۱. دانشکده علوم نوین، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، واحد علوم پزشکی، تهران، ایران

۲. دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

چکیده

سابقه و هدف : پکتیناز، ضمن تجزیه ی پکتین موجود در دیواره سلولی گیاهان از مهم‌ترین آنزیم‌های صنعتی جهان است که قابل جداسازی از طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها مانند باکتری‌ها و قارچ‌ها است. با توجه به کاربردهای فراوان این آنزیم در فرآوری غذایی، کشاورزی ، هدف از این پژوهش، جداسازی و غربالگری قارچ‌های تولید کننده پکتیناز از انواع میوه‌ها و سبزیجات پوسیده و بهینه‌سازی شرایط تولید آنزیم می‌باشد.

مواد و روش ها : جداسازی و شناسایی قارچ تولید کننده پکتیناز از میوه‌ها (هلو، آلو و سیب) و سبزیجات (پیاز) پوسیده انجام شد. از روش‌هایی مانند کشت بر روی محیط‌های اختصاصی حاوی پکتین، رنگ‌آمیزی با لاکتوفنل‌کاتن‌بلو و روش اسلاید کالچر جهت شناسایی و غربالگری توانمندترین سویه‌های قارچی تولید کننده آنزیم استفاده گردید. جهت تشخیص دقیق‌تر قارچ‌های جداسازی شده، تکنیک مولکولی توالی‌یابی 18S rRNA انجام شد. بهینه‌سازی تولید پکتیناز، در حضور سوبسترای پکتین به همراه انواع آب‌پنیر لاکتیکی و پرمیت در محیط کشت پایه تحت دماها و pH های مختلف انجام و میزان فعالیت آنزیم با روش استاندارد DNS اندازه‌گیری گردید.

یافته‌ها : یک سویه قارچ آسپرژیلوس نایجر تولید کننده پکتیناز از پیاز جداسازی گردید. نتایج شرایط بهینه سازی تولید آنزیم نشان داد که سویه شناسایی شده، در حضور آب پنیر پرمیت (به عنوان ترکیب محیط پایه) به همراه سوبسترای پکتین در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد با دور ۱۴۰ rpm و pH۶/۵ ، بالاترین میزان تولید آنزیم معادل ۱۰۳/۰۱۸IU/ml را دارد. درحالیکه، کشت قارچ در مجاورت سوبسترای پکتین خالص و انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد با همان دور و pH۷ ، میزان تولید پکتینازی معادل (IU/ml) ۹۲/ ۷۱۷ را نشان داد.

نتیجه‌گیری : از پتانسیل سویه های قارچی جداسازی شده بومی کشورمان در جهت تولید آنزیم های صنعتی مهم نظیر پکنیناز بهره جست که در کنار استفاده از ترکیبیات ارزان قیمت نظیر آب پنیر میتوان به میزان مناسبی از تولید آنزیم دست یافت و دستاوردی باشد جهت جایگزینی آن با سوبستراهای گران قیمت در صنعت تولید آنزیم های مهم و پرکاربرد.

واژه‌های کلیدی : آب پنیر، آسپرژیلوس نایجر، آنزیم پکتیناز، روش DNS

مقدمه

آنزیم‌های صنعتی با منشای میکروبی، آنزیم‌هایی هستند که به صورت تجاری در انواع صنایع مانند استفاده دارویی، مواد شیمیایی، سوخت‌های زیستی، مواد غذایی و آشامیدنی و محصولات مصرفی مورد استفاده قرار می‌گیرند[۱]. پکتین‌ها خانواده‌ای از پروتئین‌ها هستند که اساساً از واحدهای پلی‌ساکاریدی دی‌گالاکتورونیک اسید تشکیل شده‌اند که به صورت کووالانسی به یکدیگر متصل شده‌اند. دی‌گالاکتورونیک اسید حدود ۷۰ درصد کل ساختار مولکولی پکتین‌ها را تشکیل می‌دهد[۲]. پکتیناز یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های صنعتی جهان محسوب می‌شود که از طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها مانند باکتری‌ها و قارچ‌ها جداسازی می‌شود و منجر به تجزیه پکتین در دیواره سلولی گیاهان می‌شود. [۳]. این آنزیم کاربردهای فراوانی در فرآوری غذایی، کشاورزی و صنعتی دارد. نیز نقش عمده‌ای در صنعت شفاف سازی آب میوه و سبزیجات دارد. یکی از مهم‌ترین پکتینازها که استفاده گسترده‌ای نیز در صنعت دارد پلی‌گالاکتوروناز است. پکتیناز به طور عمده توسط قارچ‌آسپرژیلوس نایجر به دلیل نقش بارز آن در صنایع غذایی، تولید می‌شوند[۴]. پکتیناز با فرآیند نرم کردن، پوست میوه‌ها را به راحتی از بین می‌برد و با کاهش ویسکوزیته بازه آبمیوه را افزایش می‌دهد و همچنین باعث تصفیه آب‌میوه‌ها، شفافیت، افزایش عطر و طعم و روند تولید را آسان می‌کند[۴]. با توجه به اهمیت کاربرد این آنزیم در صنایع مختلف، تحقیقات متعددی جهت یافتن سویه‌های تولید کننده آنزیم پکتیناز از منابع قارچی، باکتریایی و مخمری از سالیان بیش ادامه داشته است.

*آدرس نویسنده مسئول: دانشکده علوم نوین، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، واحد علوم پزشکی، تهران، ایران،
پست الکترونیک: Shokoofeh.ghazi@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۱۲/۱۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۴/۱۴در این راستا دانشمندان گونه‌های مختلف قارچی، باکتریایی و مخمری را به عنوان تولید کننده آنزیم پکتیناز معرفی نمودند و با استفاده از محیط کشت، منبع کربنی ارزان قیمت و منابع نیتروژنی مختلف در شرایط آزمایشگاهی در صدد افزایش تولید و بازده آنزیم پکتیناز شدند[۵]. در این مطالعه، هدف جداسازی یک گونه قارچی تولید کننده آنزیم پکتیناز از میوه‌ها و سبزیجات پوسیده و استفاده از ماده ی ارزان قیمت آب‌پنیر به همراه پکتین خالص می‌باشد که در این راستا قارچ آسپرژیلوس‌نایجر شناسایی گردید و وارد مراحل تولید آنزیم در شرایط اقتصاصی گردید.

مواد و روش ها

جداسازی نمونه‌های قارچی

۵۰ نمونه میوه‌جات و سبزیجات از قبیل پیاز، آلو، هلو و سیب پوسیده برای جداسازی قارچ‌های تولید کننده آنزیم پکتیناز از باغات ارومیه جمع‌آوری شد. سویه‌های قارچی که از بدنه‌ی میوه‌ها و سبزیجات در حال فساد جداسازی شدند، در ابتدا به جهت کیفی تولید آنزیم پکتیناز بررسی و غربال شدند.

شناسایی نمونه‌های قارچی

پس از جداسازی و غربال‌گری، تنها یک مورد قارچ آسپرژیلوس نایجر بر روی پیاز شناسایی شد. برای رشد و کشت سویه قارچ آسپرژیلوس نایجر موجود بر روی پیاز پوسیده از محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار استفاده شد. سوسپانسیون قارچی معادل ۰/۵ مک فارلند در محیط سابرودکستروز براث تهیه شد. به منظور جداسازی سویه‌ی تولید کننده آنزیم پکتیناز از یک محیط اختصاصی جامد حاوی پکتین آگار خالص (پکتین شرکت سیگما ۱۰ گرم، فسفات پتاسیم ۱گرم، سدیم نیترات ۲ گرم، پتاسیم کلراید ۰/۵ گرم، منیزیم سولفات ۷ آبه ۰/۵ گرم، سولفات آهن ۷ آبه ۰/۰۱ گرم، آگار ۲۰ گرم، پپتون ۳ گرم، سولفات آمونیوم ۲ گرم، سولفات منگنز ۰/۰۱ گرم، گلوکز ۳ گرم، عصاره مخمر ۲ گرم، سولفات مس ۵ آبه ۰/۰۰۱ گرم و ۷ pH) استفاده شد.. سپس، از سوسپانسیون قارچی به میزان ٪۲ (v/v) بر روی محیط کشت تلقیح داده شد و به مدت ۷ روز در دمای ۲۵ °C انکوباسیون شد. برای تشخیص و شناسایی دقیق‌تر نوع قارچ از روش اسلاید

کالچر و رنگ‌آمیزی لاکتوفنل‌کاتن‌بلو استفاده شد. [۲-۶-۷-۸].

استخراج DNA از گونه قارچی مورد نظر

ابتدا نمونه قارچی مورد نظر را با ازت مایع پودر شد. ۵۰ تا ۷۰ میلی‌گرم از پودر به میکروتیوب منتقل شده و ۶۰۰ میکرولیتر بافر استخراج گرم شده (SDS ۲ درصد- Tris-HCl ۱۰۰ میلی‌مول EDTA-(pH۸) ۲۰ میلی‌مول-NaCl ۱/۴ مول) به آن اضافه شد. سپس در ۶۲ °C به مدت ۳۰ دقیقه حرارت داده شد. سپس ۶۰۰ میکرولیتر کلروفوم- ایزوآمیل‌الکل به نسبت ۲۴ به۱ اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه با چرخاندن تیوپ مخلوط شد. مخلوط حاصل را به مدت ۱۰ دقیقه با سانتریفیوژ با دور ۱۳۰۰۰ rpm در ۴ °C سانتریفیوژ گردید. ۳۰۰ میکرولیتر از فاز رویی را برداشته و به تیوب جدید منتقل شد ۲ میکرولیتر کلوفوم-ایزوآمیل‌الکل اضافه شده و ۵ دقیقه چرخانده شد سپس مخلوط حاصل را به مدت ۱۰ دقیقه با سانتریفیوژ با دور ۱۳۰۰۰ rpm در ۴ °C سانتریفیوژ شد و حدود ۲۵۰ میکرولیتر از فاز رویی برداشته و به تیوب جدید منتقل شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد یا اتانول ۱۰۰ درصد به آن اضافه شده و در دمای ۲۰°C- نگه‌داری شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با سانتریفیوژ با دور ۱۳۰۰۰ rpm در °C ۴ سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت دور ریخته و ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد اضافه گردید و ۲۰ بارچرخانده و به انتهای تیوب ضربه وارد کرده تا حل شود سپس به مدت ۱۰ دقیقه با سانتریفیوژ با دور ۱۳۰۰۰ rpm در ۴ °C سانتریفیوژ شد. اتانول را دور ریخته و به مدت ۳۰ دقیقه تیوب را خشک گردید سپس به آن ۲۵ میکرولیتر آب تزریقی اضافه شد و به مدت یک شب در ۴ °C نگهداری شد. با گذشت ۲۴ ساعت، الکتروفورز گردید و DNA قارچ آسپرژیلوس نایجر استخراج شد. و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده توسط شرکت سیناکلون با توالی 18S rRNA(پرایمر رفت با توالی 5GATTTCGACAGCATTT(CT/TC)CAGAA3 و پرایمر برگشت با توالی 5AAAGTCAATCACAATCCAGCCC3) تکثیر شد. توالی‌های رفت و برگشت ابتدا در سایت NCBIدر قسمت Primer Blast، Blast شده و پس از تایید توالی‌های آسپرژیلوس‌نایجر برای طراحی پرایمرهای اختصاصی به شرکت سیناکلون فرستاده شد سپس ژن مربوطه را PCR و سپس الکتروفورز شد[۹-۱۰].

محاسبه فعالیت آنزیم پکتیناز

جهت استخراج آنزیم پکتیناز از سویه‌ی قارچی آسپرژیلوس نایجر از محیط کشت پکتین براث (پکتین شرکت سیگما ۱۰ گرم ، فسفات پتاسیم ۱گرم، سدیم نیترات ۲ گرم ، پتاسیم کلراید ۰/۵ گرم، منیزیم سولفات ۷ آبه ۰/۵ گرم، سولفات آهن ۷ آبه ۰/۰۱ گرم، سولفات آمونیوم ۲ گرم، سولفات منگنز ۰/۰۱ گرم، عصاره مخمر ۰/۱گرم، سولفات مس ۵ آبه ۰/۰۰۱ گرم، پپتون ۰/۲ گرم،گلوکز ۱گرم در ۱۰۰ میلی لیتر است و pH ۷) استفاده شد. پس از اتوکلاو، از سوسپانسیون قارچی به میزان ۲٪ (v/v) را بر روی محیط کشت تلقیح داده شد و به مدت ۱۰روز در دمایC ° ۲۵ انکوباسیون شد. بعد از گذشت روز چهارم، فعالیت آنزیم پکتیناز به مدت ۱۰ روز با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر بکمن اندازه‌گیری شد. در این روش دستگاه ابتدا با لوله کنترل صفر گردید و لوله تست در طول موج ۵۴۰ نانومترخوانده شد. نتایج به دست آمده بر اساس میزان جذب نوری قرائت شده توسط اسپکتوفتومتری، بر طبق منحنی استاندارد دی‌گالاکترونیک اسید محاسبه و سپس طبق روش استاندارد DNS فعالیت آنزیمی محاسبه شد. تمامی آزمایشات با سه تکرار انجام شدند و میانگین یافته ها در قسمت نتایج اعمال شدند [۲-۱۱-۱۲].

تولید آنزیم پکتیناز در حضور آب‌پنیر

به منظور بهینه نمودن ترکیبات محیط کشت و تولید ارزان قیمت پکتیناز از آب‌پنیر به همراه سایر ترکیبات پایه‌ی محیط کشت تولیدی استفاده شد. در این پژوهش ۲ نوع آب پنیر، پرمیت و لاکتیکی از کارخانه لبنیات پگاه ارومیه تهیه شده و با حجم ۲۵۰ سی‌سی به عنوان محیط کشت پایه‌ی تولیدی آنزیم در حضور پکتین خالص با حجم ۲٪ (v/v) استفاده شد و محیط کشت آب پنیر

همراه با پکتین تهیه شد. سوسپانسیون قارچی معادل۰/۵ مک‌فارلند به صورت تازه تهیه و در حجم ۴ سی‌سی وارد محیط‌های کشت پایه‌ی تولیدی در حضور آب‌پنیر گردید. ارلن‌های تلقیح شده در دمای C ° ۲۵، دور شیکر rpm ۱۴۰ به مدت ۱۰ روز در انکوباتور شیکردار شرکت کروک قرار داده شد. سپس فعالیت آنزیم پکتیناز با روش استاندارد DNS به مدت ۱۰ روز و هر ۲۴ ساعت یک‌بار با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر بکمن اندازه‌گیری شد. نتایج به دست آمده از میزان تولید آنزیم، طبق واحد استاندارد بین المللی فعالیت آنزیمی محاسبه شد[۱۲-۱۳].

بهینه سازی pH محیط تولید آنزیم توسط آسپرژیلوس‌نایجر

پس از تهیه محیط کشت پایه تولید آنزیم، pH محیطهای کشت تولیدی در محدوده‌ای از اسیدیته ی ۹/۵-۵/۵ با بافر سدیم فسفات مقرر و تاثیر این متغییر بر میزان تولید آنزیم بررسی گردید[۱۴-۱۵].

بهینه سازی دمای انکوباسیون محیط کشت پایه در تولید پکتیناز توسط آسپرژیلوس‌نایجر

پس از تهیه محیط های کشت، تاثیردمای انکوباسیون محیط کشت تولید در محدوده‌ای از دمای ۵۵-۱۵ درجه سانتی‌گراد بر میزان تولید آنزیم بررسی شد. [۱۵-۱۷]

تاثیر متغیر دور شیکر (هوادهی) در محیط کشت آب‌پنیر پرمیت همراه پکتین در تولید آنزیم توسط آسپرژیلوس‌نایجر

پس از تهیه محیط کشت پایه تولید آنزیم با شرایط بهینه از مراحل قبلی، تاثیر متغیر دور شیکر در محدوده‌ای از rpm ۱۸۰-۱۲۰ بر میزان تولید آنزیم در شرایط بهینه دمای انکوباسون و بهینه اسیدیته ی محیط کشت تولیدی بررسی شد[۱۷-۱۸-۱۹].

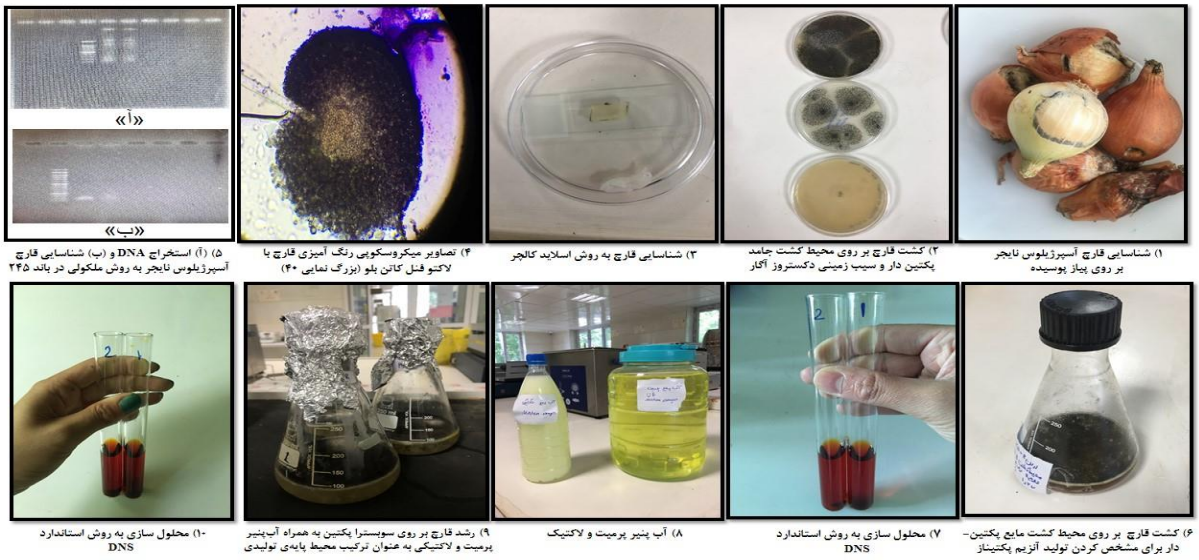
یافته ها

نتایج رنگ‌آمیزی قارچ آسپرژیلوس‌نایجر

بعد از جداسازی یک گونه آسپرژیلوس‌نایجر از پیاز پوسیده، نتایج به دست آمده از اسلاید کالچر و رنگ‌آمیزی در تصویر ۴ شکل ۱، یک ردیف کونیدی کروی سیاه رنگ است که نشان دهنده قارچ آسپرژیلوس‌نایجر می‌باشد.

نتایج استخراج DNA و PCR آسپرژیلوس‌نایجر

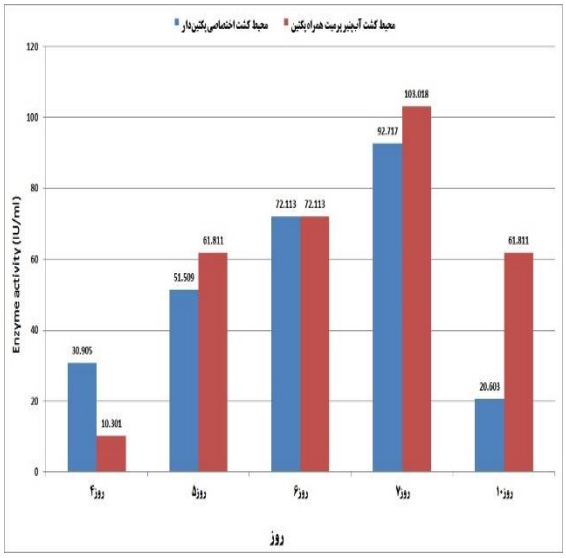
در تصویر ۵-آ شکل ۱، پس از انجام دادن مراحل استخراج DNA، میکروتیوب حاوی DNA را الکتروفورز کرده اما به علت نبود Rnase، همراه DNA، RNA هم استخراج شد. سپس برای شناسایی مولکولی با استفاده از توالی‌های رفت و برگشت آسپرژیلوس‌نایجر طراحی شده توسط شرکت سیناکلون (PCR) شد. در تصویر ۵-ب شکل ۱، نتایج به دست آمده از این روش شناسایی سویه‌ی آسپرژیلوس نایجر در باند ۲۴۵ می‌باشد.



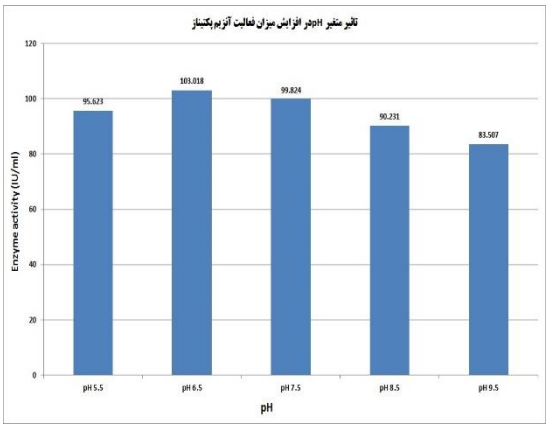
شکل ۱- مراحل کشت، شناسایی ، و تولید و اندازه گیری آنزیم پکتینیاز با آب پنیر – در مرحله های ۷ و ۱۰، جذب نوری با دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر به ترتیب برای سوبسترا پکتین خالص و ب*رای محیط کشت آب پنیر خوانده شد.*

نتایج فعالیت آنزیمی پکتیناز

طبق آزمایش‌های انجام شده و استفاده از دو نوع آب‌پنیر در این پژوهش تنها آب‌پنیر پرمیت به عنوان ترکیب محیط پایه، توانسته نتیجه مطلوبی داشته باشد. شکل۲ میزان فعالیت آنزیمی سویه‌ی آسپرزیلوس نایجر در حضور محیط کشت اختصاصی پکتین‌دار و آب پنیر را نشان می‌دهد. بررسی نتایج حاکی از آن است که قدرت تولید در نمودارهای ۲-۳-۴ به ترتیب عملکرد آنزیم پکتیناز شده است. لذا آب پنیر پرمیت توانسته به نوبه‌ی خود شرایط محیطی مناسبی را تحت شرایط بهینه، عملکرد و تولید آنزیم پکتیناز را القا نماید. تحت شرایط بهینه pH، دما و دور شیکر (هوادهی) بررسی آنزیم پکتیناز در حضور آب پنیر پرمیت، بیشتر از میزان تولید آنزیم توسط این سویه ی قارچی و در حضور فقط سوبسترای اختصاصی و خالص پکتین می‌باشد. سپس با بهینه‌سازی شرایط فعالیت آنزیم پکتیناز عملکرد تولید آنزیم افزایش یافت. آنزیم مورد مطالعه در این تحقیق در دما و pH عملکرد بهینه داشته و نیز با تغییر هوادهی میزان تولید آنزیم پکتیناز افزایش یافته است که نتایج به دست آمده اجمالی بدین شرح میباشد:



شکل۲- منحنی مقاسیه‌ی فعالیت آنزیمی پکتیناز تولید شده از قارچ آسپرژیلوس‌نایجر در حضور محیط کشت اختصاصی پکتین‌دار و محیط کشت آب‌پنیر پرمیت همراه پکتین

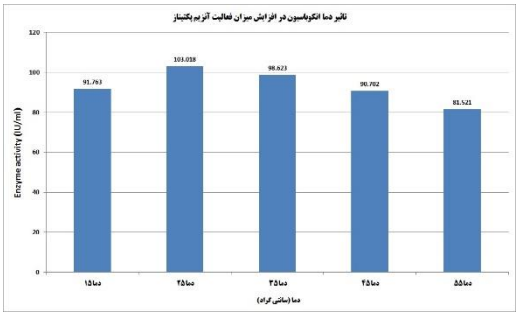


شکل۳ : بهینه pH فعالیت آنزیم پکتیناز تولید شده از آسپرژیلوس نایجر

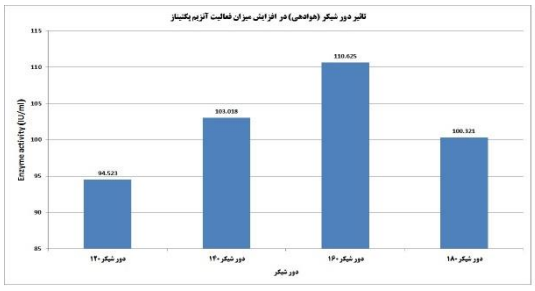
در شکل۲ بالاترین میزان فعالیت آنزیمی پکتیناز در روز هفتم برای محیط کشت آب‌پنیر همراه پکتین توسط قارچ تحت شرایط بهینه pH، دما و دور شیکر (هوادهی) بررسی آنزیم پکتیناز در حضور آب پنیر پرمیت، بیشتر از میزان تولید آنزیم توسط این سویه ی قارچی و در حضور فقط سوبسترای اختصاصی و خالص پکتین می‌باشد. سپس با بهینه‌سازی شرایط فعالیت آنزیم پکتیناز عملکرد تولید آنزیم افزایش یافت. آنزیم مورد مطالعه در این تحقیق در دما و pH عملکرد بهینه داشته و نیز با تغییر هوادهی میزان تولید آنزیم پکتیناز افزایش یافته است که نتایج به دست آمده اجمالی بدین شرح میباشد:

در شکل ۳، pH ۶/۵ بامیزان تولیدی معادل IU/ml ۱۰۳/۰۱۸ به عنوان بهینه pH گزارش شد. تولید آنزیم در محیط کشت تهیه شده با اسیدیته ۵/۵ شروع شده و این میزان در اسیدیته ۶/۵ به بیشینه خود رسید. در ۷/۵-۸/۵ pH میزان تولید آنزیم متوسط و در pH ۹/۵ تولید آنزیم مهار شده است.

آسپرژیلوس نایجر به مقدار IU/ml ۱۰۳/۰۱۸ محاسبه شد. و برای سوبسترای خالص پکتین در روز هفتم ۹۲/۷۱۷ محاسبه شد.



شکل۴- بهینه دما فعالیت پکتیناز آسپرژیلوس نایجر



شکل۵-بهینه دور شیکر فعالیت آنزیم پکتیناز آسپرژیلوس نایجر

در شکل ۴، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بامیزان تولیدی معادل IU/ml ۱۰۳/۰۱۸ به عنوان بهینه دما گزارش شد. تولید آنزیم در محیط کشت تهیه شده با دما ۱۵ درجه تولید آنزیم مهار شده است. در شکل۵ در دور شیکر rpm ۱۶۰ با میزان تولیدی معادل IU/ml ۱۱۰/۶۲۵ به عنوان بهینه دور شیکر مشاهده شد. تولید آنزیم در محیط کشت تهیه شده با دور شیکر rpm ۱۲۰ شروع شده و این سانتی بیشینه خود رسید.

میزان تولید آنزیم در دما ی ۴۵-۳۵ درجه سانتی‌گراد متوسط و در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد

گراد میزان تولید آنزیم در دور شیکر rpm ۱۶۰ به بیشینه خود رسید. در دور شیکر rpm ۱۴۰ میزان تولید آنزیم متوسط و در دور شیکر rpm ۱۸۰ تولید به بیشینه خود رسید.

بحث

با توجه به کاربرد وسیع آنزیم پکتیناز در صنایع مختلف، امروزه توجه چشمگیری به دانش کنونی تولید ارزان قیمت پکتیناز معطوف شده و تحقیقات گسترده‌ای در زمینه تولید اقتصادی این آنزیم پکتیناز به ویژه با هدف بهینه نمودن فرآیند تولید آنزیم و کاربرد آن در صنایع مختلف مورد توجه قرار گرفته است. و در این خصوص می‌توان به مواردی اشاره داشت. در تحقیقاتی که توسط ساینی و همکارانش در سال ۲۰۱۵ در زمینه‌ی جداسازی، غربال‌گری و بهینه‌سازی سویه قارچی تولید کننده پکتیناز برای شفاف‌سازی آب‌میوه انجام شد، جداسازی و بهینه‌سازی قارچ‌های تولید کننده آنزیم پکتیناز را از میوه‌ها و سبزیجات پوسیده انجام شد و با استفاده از منابع کربنی نیشکر، پکتین، گلوکز و سبوس‌گندم به تولید آنزیم پکتیناز دست یافتند بالاترین میزان فعالیت آنزیمی در حضور منبع کربنی گلوکز با سویه قارچی آسپرژیلوس نایجر در بهترین شرایط عمل بهینه پکتیناز در دمای $^{\circ}C$ ۳۰ و۴ pH به میزان IU/ml ۷۰ است.[۱۴].

در همین راستا دیگر محققان با استفاده از سویه‌ی استرپتومایسس به تولید آنزیم پکتیناز پرداختند. آن‌ها با استفاده از منابع کربنی مختلف از جمله سبوس برنج، چوب توس، دانه پنبه و پکتین به تولید آنزیم پکتیناز پرداختند. بالاترین میزان فعالیت آنزیمی در بهترین شرایط عمکرد بهینه در دما $^{\circ}C$ ۶۰ و pH ۵/۴ و با استفاده از منابع کربنی سبوس برنج با میزان فعالیت آنزیمی IU/ml ۸۲، چوب توسIU/ml ۸۱، دانه پنبه و پکتین IU/ml ۳۴ محاسبه گردید[۱۵].

در تحقیقات دیگر دانشمندان با استفاده از سویه‌ی آسپرژیلوس‌نایجر در حضور پوست پرتقال به عنوان سوبسترای اصلی محیط کشت به تولید آنزیم پکتیناز پرداختند. بالاترین میزان فعالیت آنزیمی IU/ml ۵۷۵/۵۸ و پایین‌ترین میزان IU/ml ۵۲/۸ محاسبه گردید[۱۶].

در تحقیقاتی که توسط گوفان و همکارانش در سال ۲۰۲۱ در زمینه‌ی فعالیت پکتیناز خارج از سلولی از باسیلوس سرئوس و جداسازی و بهینه‌سازی آن انجام شد. در این تحقیق با استفاده از پودر پوست پرتقال و سبوس گندم به عنوان سوبسترا استفاده شده است. سویه‌ی باسیلوس سرئوس به استفاده از سوبسترا در دمای بهینه $^{\circ}C$ ۳۷ و ۷ pH با فعالیت آنزیمی IU/ml ۸۰۴ بالاترین میزان تولید آنزیم پکتیناز محاسبه گردید[۱۷].

در موردی مشابه نیز ، محققین با استفاده از سویه‌ی قارچی آسپرژیلوس فومیگاتوس در حضور منابع کربنی آرد گندم، گلوکز و نیترات آمونیوم به تولید آنزیم پکتیناز پرداختند. بالاترین میزان تولید آنزیم پکتیناز در حضور منبع کربنی آرد گندم IU/ml ۱۵ محاسبه شد [۱۸].

در تحقیقاتی که توسط کووِت و همکارانش در سال ۲۰۱۹ در زمینه بهبود تولید پکتیناز با استفاده از باسیلوس و منبع کربنی تفاله سیب انجام شد، آن‌ها با استفاده از

باسیلوس سوبتیلیس، تولید کننده آنزیم پکتیناز در حضور منبع کربنی تفاله سیب در دمای C ° ۳۰ و ۹ pH و میزان فعالیت آنزیمی IU/ml ۱۱/۲۵ دست یافتند[۱۹].
در این راستا و همسو با پژوهش های قبلی انجام شده، در این مطالعه غربالگری قارچهای تولید کننده آنزیم پکتیناز از سبزی و میوه جات پوسیده مورد ارزیابی قرار داده شد. ضمن غربالگری به شناسایی یک سویه‌ی قارچی توانمند در تولید آنزیم پکتیناز با عنوان سویه‌ی قارچی آسپرژیلوس نایجر جداسازی شده از پیاز پوسیده دسترسی یافته و در ادامه فرآیند تولید و بهینه‌سازی میزان تولید آنزیم پکتیناز را درحضور محیط ارزان قیمت آب‌پنیر (به عنوان ترکیبات بهینه و القا کننده تولید آنزیم) با میزان فعالیت آنزیمی IU/ml ۱۰۳/۰۱۸ در دمای C° ۲۵ و pH ۶.۵ و دور شیکر rpm ۱۴۰ محاسبه شد. نتایج به دست آمده حاکی از آن است که افزودن ۲۰۰ سی‌سی آب پنیر پرمیت تاثیر به سزایی در بهینه نمودن ترکیبات تنفس هوازی قارچها ذکر کرد. نیز مشاهده شد که متغیر دمای انکوباسیون و تغییر اسیدیته ی محیط کشت تولیدی تاثیر چندانی در افزایش میزان تولید نداشته و همچنان دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و اسیدیته‌ی ۶.۵ که محدوده ی دما و pH مناسب رشد اکثر گونه های آسپرژیلوس می‌باشند در مورد گونه‌ی نایجر جداسازی شده نیز مشخص شدند. در بررسی اجمالی نتایج به دست آمده با کارهای مشابه دانشمندان که در بالا ذکر شد هم سو می‌باشد. و نیز توانستیم از منابع زیستی موجود در کشود و اکوسیستم‌های در دسترسی نظیر سبزیجات و صیفیجات گونه‌های قارچی و بومی توانمندی در تولید محیط کشت پایه ی تولید داشته و توانسته ترکیب بهبود دهنده ی مناسب و باصرفه ای در افزایش میزان تولید پکتیناز باشد . نتایج نشان داد که حضور آب پنیر با میزان فعالیت آنزیمی IU/ml ۱۰۳/۰۱۸، در مقایسه با حضور القا کننده ی تنها پکتین در تولید آنزیم بالاتر بوده، لذا نقطه عطف این پژوهش را می‌توان اینگونه تفسیر نمود که استفاده از آب پنیر به عنوان یک ماده ی در دسترس و باصرفه در صنعت می‌تواند تولید آنزیم در حجم وسیع و انبوه آنگونه که نیاز صنایع را بر طرف سازد، بسیار کاربردی و اقتصادی باشد. در ادامه‌ی روند بهینه سازی در این پژوهش نمایان شد که فاکتورهایی نظیر دور شیکر توانستند با میزان IU/ml ۱۱۰/۶۲۵ تولید آنزیم، القا کننده‌ی مناسبی در جهت بالاتر بردن میزان تولید آنزیم در محیط کشت پایه ی تولیدی و موثر باشند و علت آن را می‌توان به بهتر نمودن اکسیژن رسانی به محیط تولید و بهتر نمودن ترکیبات زیستی موثر نظیر آنزیم پکتیناز داشته باشیم. امید است بتوان با تکمیل فرایند های مربوط به خالص سازی آنزیم پکتیناز و یا جداسازی دیگر گونه های قارچی توانمند در تولید آنزیم از اکوسیستم‌های بومی کشور ایران که منابع زیستی بی‌نظیری محسوب می‌شوند بتوان قدم‌هایی را در جهت تجاری نمودن و صنعتی کردن فرایند تولید آنزیم پکتیناز در کشور برداشت. و نیاز به خرید و واردات گونه های میکروبی و قارچی تولید کننده‌ی ترکیبات زیستی اعم از آنزیم‌ها و حتی سایر فرآورده‌ها با منشا میکروبی مرتفع شود.

نتیجه‌گیری

در پژوهش انجام شده قارچ آسپرژیلوس نایجر جداسازی شده از پیاز با استفاده از آب‌پنیر به عنوان بهبود دهنده‌ی با صرفه و ارزان قیمت ترکیب محیط پایه، با بهترین شرایط عمکرد در دمای C° ۲۵ و pH ۶.۵ و دور شیکر rpm ۱۴۰ میزان فعالیت آنزیمی IU/mL ۱۰۳/۰۱۸، بالاترین میزان تولید آنزیم پکتیناز تحت شرایط آزمایشگاهی به دست آمد. امید است در ادامه‌ی راه بتوان با انجام پژوهش‌های تکمیلی تر بتوان از این سویه‌ی قارچی بومی کشور در تولید اقتصادی و با صرفه‌ی آنزیم در آینده بهره‌گیری بیشتری نمود و نتایج حاصله پلی باشد جهت تولید و تخلیص آنزیم در مقیاس صنعتی .

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله مراتب قدرانی خود را از دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی و تهران شمال اعلام می دارند.

منابع

1. Sandri IG, Lorenzoni CM, Fontana RC, da Silveira MM. Use of pectinases produced by a new strain of Aspergillus niger for the enzymatic treatment of apple and blueberry juice. LWT-Food Science and Technology. 2013 May 1;51(2):469-75.
2. Songol, A., Behbahani, M. Isolation and optimization of pectinase enzyme production one of useful industrial enzyme in Aspergillus niger, Rhizopus oryzae, Penicilium chrysogenum. *Biological Journal of Microorganism*, 2016; 5(17): 121-140. doi: 10.22108/bjm.2016.20374.
3. Singh R, Kumar M, Mittal A, Mehta PK. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. 3 Biotech. 2016 Dec;6(2):1-5.
4. KC S, Upadhyaya J, Joshi DR, Lekhak B, Kumar Chaudhary D, Raj Pant B, Raj Bajgai T, Dhital R, Khanal S, Koirala N, Raghavan V. Production, characterization, and industrial application of pectinase enzyme isolated from fungal strains. Fermentation. 2020 Jun 9;6(2):59.
5. Jayani RS, Saxena S, Gupta R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. Process Biochemistry. 2005 Sep 1;40(9):2931-44.
6. Borszcz V, Boscato TR, Cenci K, Zeni J, Cansian RL, Backes GT, Valduga E. Extraction conditions evaluation of pectin methylesterase produced by solid state culture of Aspergillus niger. Czech Journal of Food Sciences. 2019 Jan 7;36(6):476-9.
7. Rosana Y, Matsuzawa T, Gonoi T, Karuniawati A. Modified slide culture method for faster and easier identification of dermatophytes. Microbiology indonesia. 2014 Sep 5;8(3):7-.
8. Sutradhar P, Saha I, Chakravarty A. Evaluation of pomegranate peel as a substrate for citric acid production by Aspergillus niger. International Journal of Current Pharmaceutical Research. 2020 May 15:61-5.
9. Karazhyan R., Habibi Najafi M.H., Yavarmanesh M., Edalatian Dovom M.R., Pourianfar H.R. Comparison of optimized DNA extraction from mold Aspergillus, Penicillium and Rhizopus of tomato paste. Iranian Journal of Food Sience and Technology. 2017 [cited 2022September05];14(67):1-9.
10. Susca A, Stea G, Mulé G, Perrone G. Polymerase chain reaction (PCR) identification of Aspergillus niger and Aspergillus tubingensis based on the calmodulin gene. Food Additives and Contaminants. 2007 Oct 1;24(10):1154-60.
11. Oumer OJ, Abate D. Screening and molecular identification of pectinase producing microbes from coffee pulp. BioMed research international. 2018 Apr 3;2018.
12. Chowdhury TI, Jubayer MF, Uddin MB, Aziz MG. Production and characterization of pectinase enzyme from rhizopus oryzae. Potravinarstvo. 2017.
13. El-Holi MA, Al-Delaimy S. Citric acid production from whey with sugars and additives by Aspergillus niger. African Journal of Biotechnology. 2003;2(10):356-9.

14. Preeti S, Abhishek T, Deeja K, Suresh S. Isolation, screening and optimization of novel pectinase producing fungal strain for fruit juice clarification and extraction. World Journal of Pharmaceutical Research. 2015;4(6):2114-26.
15. Beg QK, Bhushan B, Kapoor M, Hoondal GS. Production and characterization of thermostable xylanase and pectinase from Streptomyces sp. QG-11-3. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2000 Jun;24(6):396-402.
16. Mahesh NA, Vivek RA, Arunkumar MA, Balakumar SR. Statistical designing of enriched pectin extract medium for the enhanced production of pectinase by Aspergillus niger. Inter. J. Pharm. Pharm. Sci. 2014 Feb;6(SUPPL 2):666-72.
17. Gophanea SR, Khobragadea CN, Jayebhayea SG. Extracellular pectinase activity from Bacillus Cereus GC subgroup a: isolation, production, optimization and partial characterisation. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. 2021 Jan 6; 2021:767-72.
18. Palaniyappan M, Vijayagopal V, Viswanathan R, Viruthagiri T. Statistical optimization of substrate, carbon and nitrogen source by response surface methodology for pectinase production using Aspergillus fumigatus MTCC 870 in submerged fermentation. African Journal of Biotechnology. 2009;8(22).
19. Kuvvet C, Uzuner S, Cekmecelioglu D. Improvement of pectinase production by co-culture of Bacillus spp. using apple pomace as a carbon source. Waste and Biomass Valorization. 2019 May;10(5):1241-9.