

# بررسی تأثیر میزان رطوبت سوبسترا و املاح فسفره، بر تولید سلولاز توسط سویه‌ی جهش یافته‌ی جدید تریکودرما ریزئی در سامانه تخمیر حالت جامد

نازنین داراب‌زاده<sup>۱</sup>، زهره حمیدی اصفهانی\*، پریسا حجازی<sup>۲</sup>

۱- گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی شیمی، نفت و گاز، دانشگاه علم و صنعت ایران، تهران، ایران

## چکیده

سامانه‌ی تخمیر حالت جامد به دلیل توانایی تولید محصولات با ارزش افزوده با استفاده از محصولات جانبی ارزان قیمت کشاورزی، در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت. تولید سلولاز با استفاده از سویه‌ی جهش یافته‌ی جدیدی از تریکودرما ریزئی، که دارای توانایی تولید سلولاز با فعالیت آنزیمی بیشتر و ویژگی‌های مناسب‌تر نسبت به سویه‌ی مادر می‌باشد، و با کاربرد محصولات جانبی برنج (سبوس، پوست و کاه) انجام شد. از آن جایی که سلولاز یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های صنعتی می‌باشد و نظر به اهمیت افزایش تولید آن در این سامانه، میزان رطوبت بهینه‌ی سوبسترای جامد مرطوب، تعیین شد. همچنین با توجه به نقش املاح فسفره در تولید سلولاز، میزان دی‌پتاسیم‌هیدروژن فسفات، بهینه‌سازی شد. رطوبت در مقادیر ۶۵، ۶۸، ۷۱، ۷۴ و ۷۷ درصد مورد مطالعه قرار گرفت. برای انجام این آزمایشها، دمای گرمخانه‌گذاری ۳۵°C، مدت زمان ۳ روز و سوسپانسیون اسپوری با غلظت ۱۰<sup>۷</sup> اسپور در میلی لیتر استفاده شد. بعد از هر بار انجام آزمون میزان فعالیت آنزیمی از طریق اندازه‌گیری تجزیه Filter Paper محاسبه و مقایسه شد و میزان رطوبت بهینه سوبسترا ۷۴ درصد تعیین شد. در مورد دی‌پتاسیم‌هیدروژن فسفات مقادیر ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ گرم در لیتر مورد آزمون قرار گرفت که بیشترین میزان فعالیت سلولازی در تیمار حاوی ۲ گرم در لیتر دی‌پتاسیم‌هیدروژن فسفات مشاهده شد.

**واژه‌های کلیدی:** تخمیر حالت جامد، سلولاز، تریکودرما ریزئی، رطوبت بهینه، فسفر بهینه

## ۱- مقدمه

تخمیر صنعتی فرایندی است که طی آن سوبستراهای جامد یا مایع از طریق تیمار با میکروارگانیسم ها تبدیل به محصولات با ارزش افزوده می شوند که این فرایند منجر به تولید آنزیم ها و متابولیت های ثانویه می گردد. تخمیر حالت جامد و تخمیر غوطه وری دو نوع فناوریهستند که در سرتاسر دنیا برای تولید محصولات مهم استفاده می شوند. میکروارگانیسم هایی مانند باکتری ها، قارچ ها و جلبک ها نقش مهمی در استخراج محصول مورد نظر دارند اما در این میان قارچ ها به دلیل سازگاری بالایی که با محیط طبیعی رشد خود دارند برای تخمیر حالت جامد مناسب تر هستند (۷). عمده ی تولید آنزیم به صورت صنعتی با استفاده از تخمیر غوطه وری انجام می گیرد اما تحقیقات اخیر نشان داده است که تولید آنزیم در سامانه ی تخمیر حالت جامد باعث بهبود بازده شده و به لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه تر است (۲۸، ۲۳، ۱۰، ۹). همچنین سامانه ی تخمیر حالت جامد دارای یک مزیت مهم به تخمیر غوطه وری است و آن این که ضایعات باقی مانده از تخمیر حالت جامد قابل استفاده به عنوان سوخت برای دیگر فرایندها هستند (۸). به هر حال به دلیل مزایای زیاد این سامانه، اخیراً تخمیر حالت جامد مورد توجه واقع شده است. سامانه ی تخمیر حالت جامد عبارت است از کشت میکروارگانیسم روی سوبسترای جامد بدون حضور آب آزاد (۱۱). سامانه ی تخمیر حالت جامد به شدت غیریکنواختی باشد زیرا شامل سه فاز مایع، جامد و گاز است. فاز مایع میزان رطوبت موجود در سوبسترا است، فاز جامد که همان سوبسترای جامد بوده و فاز گازی هوایی است که در میان ذرات وجود دارد و اکسیژن سامانه را تامین می نماید (۷). سلولازها آنزیم های مرکبی هستند که از یک سیستم سه آنزیمی شامل اندوگلوکاناز، آگزوگلوکاناز و بتاگلوکوزیداز تشکیل شده اند. آنها از مهم ترین آنزیم های صنعتی هستند که در صنایع غذایی، نساجی، کاغذ سازی و پالپ، تخمیر الکلی، آبجوسازی و مالت مورد استفاده قرار می گیرند. این آنزیم ها نسبتاً

گران قیمت هستند که کاهش قیمت تولید آنها در کاربردهای تجاری مهم خواهد بود. پس تلاش برای یافتن سویه ای مناسب که هم سبب کاهش قیمت آنزیم شده و نیز میزان فعالیت سلولازی بیشتری را منجر شود، ادامه دارد (۱۲، ۴). سلولازها به وسیله ی باکتری ها و قارچ های مختلفی تولید می شوند که در این میان جنس تریکودرما شناخته شده تر می باشد. همچنین تریکودرما ریزئی یکی از بهترین سویه های تولید کننده ی سلولاز می باشد (۲۶، ۱۴). یکی از راه های افزایش میزان تولید سلولازها در سامانه ی تخمیر حالت جامد، اعمال جهش است. در مطالعات متعددی تأثیر جهش بر میزان فعالیت سلولازی بررسی شده است. هدف از اعمال جهش بدست آوردن سلولاز بیشتر و با کیفیت بالاتر می باشد (۲۴). هزینه ی سوبسترا بخش مهمی از هزینه های تولید سلولاز را تشکیل می دهد، لذا کاربرد سوبسترای ارزان قیمت می تواند به کاهش قیمت سلولاز تولیدی کمک نماید (۱۸). با توجه به این که سالانه مقادیر زیادی ضایعات کشاورزی ایجاد می شود می توان از ساختار سلولزی این ضایعات می توان به عنوان سوبسترای ارزان قیمت برای تولید محصولات تخمیری خصوصاً "سلولاز استفاده نمود (۳). در سال ۲۰۱۲ موریانو همکاران شرایط تخمیر حالت جامد برای تولید سلولاز با استفاده از تریکودرما ریزئی NCIM 992 را بهینه سازی نمودند. در این مطالعه تأثیر پارامترهایی مانند pH، دما، میزان رطوبت، اندازه ذرات سوبسترا و عوامل مرطوب کننده روی تولید آنزیم بررسی شدند. در این مطالعه سه سوبسترای متفاوت مورد بررسی قرار گرفتند که بیشترین میزان فعالیت آنزیمی روی سبوس گندم حاصل شد. شرایط بهینه برای تولید سلولاز روی سبوس گندم بدین صورت تخمین زده شد: میزان رطوبت اولیه ی ۷۰٪، میزان pH اولیه ی ۵، دمای ۳۰°C، عامل مرطوب کننده و اندازه ذرات سوبسترا ۵۰۰ میکرومتر. زمان بهینه گرمخانه گذاری ۶ روز بود (۲۱). در مطالعه ای دیگر ارزیابی شرایط کشت برای تولید سلولاز در سامانه ی تخمیر حالت جامد به وسیله ی دو سویه ی

(۲). سویه‌ی تریکودرما ریزئی QM9414 و MCG77 انجام گرفت. در این پژوهش لطیفیان<sup>۳</sup> و همکاران (۲۰۰۷) با استفاده از روش سطح پاسخ<sup>۴</sup> تأثیر پارامترهای تخمیر بر تولید سلولاز را مورد بررسی قرار دادند. سوبسترای مورد استفاده سبوس برنج بود، و پارامترهای pH، میزان رطوبت و دما بهینه‌سازی شدند. در مورد تریکودرما ریزئی QM9414 نتایج نشان داد که تنها میزان رطوبت بر فعالیت سلولازی تأثیر معنی‌دار داشت که این تأثیر خطی بود و حداکثر فعالیت آنزیمی در ۷۰٪ رطوبت حاصل شد. در مورد تریکودرما ریزئی MCG77 دما و میزان رطوبت فاکتورهای تأثیرگذار بودند و بیشترین میزان فعالیت آنزیمی در دمای ۲۵-۳۰ °C و رطوبت ۷۰-۵۵٪ بدست آمد (۱۹). سینگهانیا<sup>۵</sup> و همکاران در سال ۲۰۰۷ تأثیر پارامترهای دما، زمان و میزان رطوبت را در تولید سلولاز با استفاده از تریکودرما ریزئی RUTC30 مورد بررسی قرار دادند. در این پژوهش سوبسترای مورد مطالعه سبوس گندم بود. بهینه‌سازی منجر به بهبود فعالیت سلولازی از  $U\ g^{-1}\ dry\ solid^{۱}$  به ۳/۵۳ شد (۲۷). هدف از این مطالعه بهینه‌سازی دو پارامتر مهم مؤثر بر میزان فعالیت سلولازی یعنی میزان رطوبت سوبسترا و میزان فسفر از طریق فسفات‌هیدروژن‌دی‌پتاسیم بود. بدین منظور تولید سلولاز در سامانه‌ی تخمیر حالت جامد روی ضایعات برنج (سبوس)، پوست و کاه برنج) و با استفاده از سویه‌ی جدید جهش‌یافته‌ی تریکودرما ریزئی B انجام گرفت. مقادیر رطوبت و فسفر در ۵ سطح مختلف مورد بررسی قرار گرفته و میزان فعالیت سلولازی اندازه‌گیری و در نهایت میزان بهینه‌ی رطوبت و نمک فسفره تعیین شد.

## ۲- مواد و روش‌ها

سبوس، پوست و کاه برنج از شمال ایران تهیه شد. مقدار مورد نیاز برای انجام آزمایشها، آسیابشده و با مش‌سایز ۱۴-۱۸ الک شدند

<sup>3</sup>Latifian

<sup>4</sup>RSM

<sup>5</sup>Singhania

<sup>6</sup>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

## ۱-۲- فعال‌سازی تریکودرما ریزئی

سویه‌ی جهش‌یافته‌ی تریکودرما ریزئی B یک سویه‌ی جدید حاصل از جهش تریکودرما ریزئی ۲۴۱۴ است که در اثر در معرض گرفتن با اشعه‌ی گاما بدست آمده و در مقالات قبلی به آن اشاره شده است (۱۳). سویه‌ی جهش‌یافته‌ی تریکودرما ریزئی B بر PDA، پاساژ داده شده و در دمای ۲۵°C به مدت زمان ۸ روز گرمخانه‌گذاری شدند تا اسپور تولید کنند (۱).

## ۲-۲- تهیه‌ی سوسپانسیون اسپوری با غلظت مشخص

برای تهیه‌ی سوسپانسیون اسپوری با غلظت اسپور مشخص، ابتدا روی محیط PDA قارچ مورد نظر کشت داده شده و به مدت زمان ۸ روز در دمای ۲۵°C گرمخانه‌گذاری شد. سپس محلول نمکی که حاوی ۰/۹٪ کلرید سدیم می باشد تهیه شده و در اتوکلاو سترون شد. پس از خنک شدن محلول سیلین (در صورت داغ بودن موجب از بین رفتن اسپورهای قارچی می‌شود) با استفاده از پیپت سترون شده، از محلول سیلین مقداری از آن را روی پلیت حاوی تریکودرما ریزئی اضافه کرده و با استفاده از میله‌ی شیشه‌ای L شکل سترون، به آرامی محلول سیلین را روی سطح محیط کشت پخش کرده و در واقع اسپورهای قارچی در محلول سیلین پخش شدند. سپس مقداری پنبه‌ی سترون را در دهانه‌ی قیف سترون قرار داده و با پیپت سترون از روی سطح پلیت، سیلین حاوی اسپورها برداشته شده و در قیف ریخته شد. پس از جمع‌آوری مقدار کافی و مناسبی از سوسپانسیون اسپوری صاف شده، شمارش با استفاده از لام توما انجام گرفت. بدین صورت که اول سوسپانسیون را روی ورتکس خوب بهم زده تا غلظت اسپور در همه‌ی قسمت‌های آن یکنواخت شود و سپس زیر میکروسکوپ شمارش انجام شد. بعد از انجام شمارش با

استفاده از تناسب، رقیق سازی به نحوی انجام شد که با یک سوسپانسیون اسپوری با غلظت  $10^7 \times 2/5$  اسپور در میلی لیتر بدست آید.

### ۲-۳- تلفیح سوبسترای جامد مرطوب با سوسپانسیون اسپوری

از مطالعات قبلی مشخص شد که در میان ضایعات برنج ترکیبی از هر سه سوبسترای کاه، سبوس و پوست برنج بهترین نوع سوبسترا بوده اند لذا در این مطالعه از آن‌ها استفاده شد (۲). مقدار ۵ گرم از سوبسترا (سبوس، کاه و پوست برنج) در ارلن دهان گشاد توزین شده و میزان آب لازم به آن افزوده و خوب به هم زده شد. سپس سوبسترای مرطوب وارد اتوکلاو شده و در دمای  $121^\circ\text{C}$  به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد تا علاوه بر سترون شدن، در واقع به نوعی پیش تیمار حرارتی تحت فشار بخار نیز روی سوبستراها انجام گیرد و شرایط برای رشد قارچ مناسب تر گردد، زیرا با استفاده از دمای بالا و بخار آب داغ مواد مغذی مورد نیاز برای قارچ‌ها در مرحله رشد، بیشتر در دسترسشان قرار می‌گیرد. پس از آن تلفیح با ۱ میلی لیتر سوسپانسیون اسپوری با غلظت  $10^7 \times 2/5$  اسپور در میلی لیتر انجام شده و پس از آن که به خوبی مخلوط شد تا غلظت اسپور در تمام قسمت‌های سوبسترا یکسان باشد، به مدت ۶ روز در انکوباتور با دمای  $25^\circ\text{C}$  گرمخانه گذاری شد (۱۹، ۲۵).

### ۲-۴- استخراج و اندازه گیری فعالیت آنزیمی سلولاز تولیدی

پس از طی مدت زمان گرمخانه گذاری لازم، ابتدا وزن توده ی تخمیر شده محاسبه شده و ۵ برابر وزن آن، آب مقطر به ارلن‌ها اضافه شد و سپس روی دستگاه همزن مغناطیسی (MR 3001 k Heidolph Germany) با سرعت ۷۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه به هم زده شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شده (3-30K sigma Germany) و مایع

شفاف رویی به عنوان آنزیم استخراج شده، جداسازی شد (۱۹). برای اندازه گیری فعالیت آنزیمی محلول آنزیمی استخراج شده به روش (Filter Paper Activity (FPase)، از معرف دی نیترو سالیسیلیک اسید<sup>۹</sup> استفاده شد (۲۲، ۱۶). فعالیت آنزیمی یا فعالیت سلولازی همان FPase می‌باشد که میزان فعالیت مجموعه ی آنزیم سلولاز را نشان می‌دهد. میزان فعالیت آنزیمی با واحد  $\text{U g}^{-1} \text{ dry solid}$  بیان می‌شود و یک واحد فعالیت آنزیمی عبارت است از مقدار آنزیم لازم برای آزاد نمودن ۱ میکرومول محصول (گلوکز) در دقیقه در دمای  $50^\circ\text{C}$ . برای انجام این آزمون بایستی از قبل یکسری محلول‌ها تهیه می‌شد که دستور تهیه ی آن‌ها به شرح زیر می‌باشد:

#### ۱-۴-۲- تهیه ی بافر سترات ۵۰ mM

۲۱۰ گرم اسید سیتریک با یک ملکول آب در ۷۵۰ میلی لیتر آب دو بار تقطیر حل شده و حدود ۵۰ تا ۶۰ گرم سود به آن اضافه شد. محلول حاصل را به حجم یک لیتر رسانده و pH اندازه گیری گردید. در این مرحله بافر سترات حاصل غلظت ۱ M داشته و pH آن حدود ۴/۵ می‌باشد. از محلول حاصل، ۵۰ ml برداشته و به حجم ۱ لیتر رسانده شد. در این مرحله بافر سترات بدست آمده pH ۴/۸ داشته و غلظت آن ۵۰ mM بود (۶).

#### ۲-۴-۲- تهیه ی معرف دی نیترو سالیسیلیک اسید

۱۰/۶ گرم ماده ی ۳ و ۵ دی نیترو سالیسیلیک اسید توزین شده به همراه ۱۹/۸ گرم هیدروکسید سدیم در ۱۴۱۶ میلی لیتر آب مقطر حل شد. سپس ۳۰۶ گرم سدیم پتاسیم تارتارات و ۸/۳ گرم متابی سولفیت سدیم به آن افزوده شد. پس از افزودن تمام این مواد و حل کردن آن‌ها، ۳ میلی لیتر برداشته و پس از افزودن معرف فنل فتالین با محلول اسید کلریدریک ۰/۱ N تیترا شد. عمل تیتراسیون باید با مصرف حدود ۵ تا ۶ میلی لیتر اسید کلریدریک خاتمه یابد. اگر حجم بیشتری اسید مصرف

<sup>۸</sup>FPase

<sup>۹</sup>DNS

<sup>۷</sup>RPM

گلوکز تهیه شوند. ابتدا یک گرم گلوکز بدون آب در یک بالن حجمی ۱۰۰ میلی‌لیتری ریخته شد و با بافر سیترات mM ۵۰ به حجم رسانده شد. این محلول استاندارد گلوکز است که با استفاده از بافر سیترات رقت‌های مختلف از آن تهیه شد. این رقت‌ها به نحوی تهیه شدند که در نهایت جذب آن‌ها در محدوده‌ی ۰/۸-۰/۲ باشد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از هر کدام از رقت‌های تهیه شده، در لوله‌ی درپیچ‌دار ریخته شده و ۱ ml بافر سیترات mM ۵۰ به آن اضافه شد.

**۲-۴-۷- اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیمی FPase**  
پس از تهیه‌ی محلول‌های لازم، نوارباریکی از کاغذ صافیواتمن (حدود ۵۰ mg) را بریده و لوله کرده و آن را در لوله آزمایش درپیچ‌دار گذاشته و سپس میزان ۱ ml محلول بافر سیترات mM ۵۰ به همراه ۰/۵ ml محلول آنزیمی استخراج شده به آن افزوده شد. همزمان نمونه‌ی کنترل آنزیم، نمونه‌ی کنترل سوبسترا، نمونه‌ی شاهد و نمونه‌های محلول استاندارد گلوکز در غلظت‌های مختلف نیز در لوله‌های درپیچ‌دار تهیه شدند. درب لوله‌های آزمایش بسته شد و تمام نمونه‌ها به مدت زمان ۱ ساعت در دمای ۵۰°C قرار گرفتند. سپس ۳ ml معرف DNS به آن‌ها افزوده شده و به مدت ۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شدند. پس از آن در حمام آب و یخ خنک شده، به میزان مناسب رقیق شده و بخوبی مخلوط شدند و سپس با اسپکتروفوتومتر (Agilent Technologies Cary 60 UV-vis) جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت شد. با توجه به اعداد بدست آمده برای محلول‌ها استاندارد گلوکز، منحنی استاندارد با دو محور جذب در مقابل غلظت گلوکز (mg/0.5 ml)، رسم شد و با استفاده از معادله‌ی حاصله از آن، غلظت گلوکز تولید شده طی واکنش آنزیمی برای سایر نمونه‌های مورد آزمایش محاسبه شد.

پس از محاسبه غلظت آنزیم (mg/0.5 ml)، محاسبه فعالیت آنزیم با استفاده از فرمول انجام شد:

$$\text{فعالیت آنزیمی} = A \times (a + b) / 0.5 \times C \times t \times 0.18$$

شد، می‌توان به آن سود اضافه نمود تا تیتراسیون با همان مقدار اسید ذکر شده، به نقطه‌ی پایانی برسد. هر ۲ گرم سود معادل است با مصرف ۱ ml اسید کلریدریک ۰/۱ N است (۶).

### ۲-۴-۳- نمونه‌ی کنترل سوبسترا

در این نمونه، همه‌ی ترکیبات، حاضر هستند بجز محلول آنزیمی استخراج شده و هدف از آن کنترل خطای ناشی از سوبسترای مورد استفاده یعنی کاغذ صافی واتمن است. در واقع میزان قند احیای موجود در کاغذ صافی واتمن را نشان می‌دهد. برای تهیه‌ی این نمونه، ۱/۵ ml بافر سیترات mM ۵۰ در لوله‌ی آزمایش درپیچ‌دار ریخته شد و ۵۰ mg کاغذ صافیواتمن لوله شده و درون بافر قرار داده شد.

### ۲-۴-۴- نمونه‌ی کنترل آنزیم

در این نمونه، تمام ترکیبات آزمایش اصلی، حاضر هستند بجز کاغذ صافی واتمن و هدف از آن، کنترل خطای ناشی از خود محلول آنزیمی استخراج شده است. بدین معنی که با این آزمون میزان قندهای احیای موجود در محلول آنزیمی استخراج شده اندازه‌گیری شده و از میزان قند احیای تولید شده طی اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی کم می‌شود و بدین ترتیب تأثیر خطای ناشی از حضور قند احیا در محلول آنزیمی استخراج شده از بین برده می‌شود. نمونه‌کنترل آنزیم شامل ۱ ml بافر سیترات mM ۵۰ و ۰/۵ ml محلول آنزیمی بود.

### ۲-۴-۵- نمونه‌ی شاهد

نمونه‌ی شاهد برای از بین بردن تأثیر خطای ناشی از بافر سیترات استفاده شد. این نمونه شامل ۱/۵ ml بافر سیترات mM ۵۰ بود که در لوله‌ی آزمایش درپیچ‌دار ریخته شد. بعد از انجام آزمایش، عدد مربوط به این نمونه نیز از عدد اصلی کم شد تا تأثیر آن از بین رود.

### ۲-۴-۶- نمونه‌های محلول استاندارد گلوکز

برای تعیین میزان فعالیت آنزیمی باید منحنی استاندارد گلوکز رسم شود. برای این کار در ابتدا باید محلول‌های استاندارد

### ۲-۶- بهینه‌سازی میزان فسفر محیط کشت

برای بهینه‌سازی میزان فسفر محیط از فسفات هیدروژن دی‌پتاسیم ( $K_2HPO_4$ ) استفاده شد. برای این کار از فسفات هیدروژن دی‌پتاسیم در محدوده‌ی ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ گرم در لیتر استفاده شد. رطوبت محیط همان رطوبت بهینه‌ای بود که از مرحله‌ی قبل به دست آمد و سایر شرایط مانند قسمت قبل ثابت بود که به شرح زیر می‌باشد: دمای  $35^{\circ}C$ ، مدت زمان گرمخانه‌گذاری ۳ روز، تلقیح با میزان اسپور  $10^7$  اسپور در میلی‌لیتر (۲۰). میزان فسفر بهینه در این مرحله تعیین شد.

### ۲-۷- تجزیه و تحلیل داده‌ها

تمام آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شده و جهت مطالعه وجود اختلاف آماری معنی‌دار بین تیمارهای مختلف، از تجزیه واریانس (ANOVA) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد. در تمام مراحل تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS 18 صورت گرفت. بهینه‌سازی شرایط کشت در ۵ سطح و با روش بررسی یک متغیر در هر زمان انجام گرفت.

### ۳- نتایج و بحث

تولید سلولاز با استفاده از سامانه‌ی تخمیر حالت جامد و توسط قارچ تریکودرما ریزئی در این مطالعه بررسی شد. سویی جدید جهش‌یافته‌ی این قارچ با نام تریکودرما ریزئی B روی ضایعات برنج که مخلوطی از هر سه سوبسترای کاه برنج، سبوس برنج و پوست برنج به نسبت مساوی بود، کشت داده شد. با توجه به اهمیت فراوان میزان رطوبت سوبسترا در سامانه‌ی تخمیر حالت جامد، این پارامتر بهینه‌سازی شد. میزان رطوبت بهینه تعیین شد. همانطور که در جدول ۱ نشان داده شده است، از مقدار رطوبت ۶۵ درصد با افزایش مقدار رطوبت میزان فعالیت سلولازی افزایش یافت تا این که در رطوبت ۷۴ درصد بیشترین میزان فعالیت آنزیمی حاصل شد و

که در آن A غلظت آنزیم محاسبه شده از منحنی استاندارد، a میزان آب سوبسترا، b میزان آب افزوده شده طی استخراج، C وزن ماده خشک سوبسترا و t زمان ۶۰ دقیقه می‌باشد (۲۲، ۱۶، ۶). باید توجه کرد که غلظت به دست آمده از منحنی استاندارد گلوکز برای میزان قند احیای تولید شده طی واکنش، پس از کسر شدن مقادیر محاسبه شده مربوط به نمونه‌های شاهد، کنترل سوبسترا و کنترل آنزیم در فرمول بالا قرار گرفته و در محاسبات تعیین میزان فعالیت آنزیمی استفاده شد. بدین ترتیب غلظت گلوکز آزاد شده در اثر فعالیت آنزیمی سلولاز بر کاغذ صافی واتمن در مدت ۱ ساعت در دمای  $50^{\circ}C$  به دست آمد.

### ۲-۵- بهینه‌سازی میزان رطوبت محیط کشت

برای بهینه‌سازی میزان رطوبت محیط کشت، از یک بازه‌ی رطوبتی در محدوده‌ی ۶۵، ۶۸، ۷۱، ۷۴ و ۷۷ درصد استفاده شد. سایر شرایط ثابت در نظر گرفته شد. شرایط عبارت بودند از دمای  $35^{\circ}C$ ، مدت زمان گرمخانه‌گذاری ۳ روز، حضور فسفر در محیط، تلقیح با میزان اسپور  $10^7$  اسپور در میلی‌لیتر (۱۹). ابتدا ۵ گرم سوبسترای (سبوس، پوست و کاه برنج) در ارلن توزین شد. سپس میزان آب لازم برای رسیدن به رطوبت‌های ذکر شده به آن افزوده شده و به خوبی به هم زده شد. پس از آن در اتوکلاو سترون شد و پس از سرد شدن، سوسپانسیون اسپوری با غلظت  $10^7$  اسپور در میلی‌لیتر به آن افزوده شد و به خوبی به هم زده شد تا غلظت اسپور در کل سوبسترا یکنواخت باشد. سپس به مدت ۳ روز در دمای  $35^{\circ}C$  گرمخانه‌گذاری شد. پس از آن استخراج و اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم سلولاز تولیدی مطابق آنچه در بخش قبل شرح داده شد انجام گرفت. پس از به دست آوردن نتایج مربوط به ۵ درصد مختلف رطوبت، آنالیز آماری برای تعیین میزان رطوبت بهینه انجام گرفت و پس از تعیین میزان رطوبت بهینه، در مرحله‌ی بعدی کار که هدف بهینه‌سازی میزان فسفر در محیط کشت بود، از رطوبت بهینه استفاده شد.

آنزیمی را نشان داد لذا میزان رطوبت بهینه برای داشتن حداکثر ۷۷٪ افت فعالیت سلولازی مشاهده شد. نتایج پژوهش‌های دیگر نیز میزان رطوبت بهینه در محدوده‌ی ۷۰٪ را مورد تأیید قرار می‌دهند. برای مثال لطیفیانو همکاران (۲۰۰۷) نتایجی گزارش نمودند که بانتهای حاضر مطابقت دارد (۱۹). علت را می‌توان این‌طور تفسیر نمود که با افزایش رطوبت تا حد خاصی، شرایط برای رشد قارچ و تولید آنزیم مناسب‌تر می‌گردد لذا افزایش فعالیت سلولازی مشاهده شد اما افزایش بیش از حد رطوبت منجر به پر شدن خلل و فرج سوبسترا در سامانه تخمیر حالت جامد شده و چون هوا در این خلل و فرج حضور دارد و اکسیژن مورد نیاز قارچ را تأمین می‌نماید، پر شدن آن مکان‌ها از آب، موجب کمبود اکسیژن در سامانه شده لذا فعالیت سلولازی کاهش می‌یابد.

پس از آن در میزان رطوبت ۷۷ درصد نتایج کاهش فعالیت سلولازی همان ۷۴ درصد محاسبه شد. نتایج در جدول ۲ ارتباط میان میزان فسفر (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) و فعالیت سلولازی را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که در میزان ۲ گرم در لیتر K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> بیشترین فعالیت سلولازی وجود داشت. البته در مقدار ۱ گرم در لیتر نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد اما در مقادیر ۳ و ۴ گرم در لیتر میزان فعالیت آنزیمی کم‌تر شد و در مقدار ۵ گرم در لیتر K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> میزان فعالیت سلولازی در کمترین مقدار خود قرار گرفت. لذا با توجه به این موضوع مقدار ۲ گرم در لیتر K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> به عنوان مقدار بهینه‌ی املاح فسفره انتخاب شد. نتایج نشان داد با افزایش درصد رطوبت از ۶۵٪ به تدریج میزان فعالیت سلولازی نیز افزایش یافت تا جایی که در ۷۴٪ به حداکثر فعالیت آنزیمی رسید و بعد از آن در

جدول ۱: ارتباط میزان درصد رطوبت سوبسترا و فعالیت سلولازی

میزان رطوبت (%)	FPase (U-1 g dry solid) میزان فعالیت آنزیمی
۶۵	$\pm 206/0.0/06^c$
۶۸	$\pm 155/0.0/05^c$
۷۱	$\pm 747/0.0/01^b$
۷۴	$\pm 881/0.0/02^a$
۷۷	$\pm 713/0.0/07^b$

میانگین‌های دارای حروف کوچک متفاوت در سطح  $\alpha = 0.05$ ، دارای اختلاف معنی‌دار هستند.

جدول ۲: ارتباط میزان املاح فسفره (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) در سوبسترا و فعالیت سلولازی

میزان K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g l <sup>-1</sup> )	FPase (U <sup>-1</sup> g dry solid) میزان فعالیت آنزیمی
۱	$\pm 82/0.0/07^{ab}$
۲	$\pm 98/0.0/01^a$
۳	$\pm 70/0.0/01^b$
۴	$\pm 66/0.0/18^b$
۵	$\pm 39/0.0/04^c$

میانگین‌های دارای حروف کوچک متفاوت در سطح  $\alpha = 0.05$ ، دارای اختلاف معنی‌دار هستند.

موضوع تأثیر معنی داری بر فعالیت آبی (aw) دارد (۲۷). در رابطه با تأثیر فسفر بر میزان فعالیت سلولازی، در مقدار ۲ گرم در لیتر  $K_2HPO_4$  بیشترین میزان فعالیت آنزیمی حاصل شد. البته همانطور که از نتایج مشخص است میزان تأثیر نمک فسفره به اندازه ی میزان رطوبت نیست و رطوبت عامل تأثیر گذار مهم تری در میزان فعالیت سلولازی می باشد. دز سایر پژوهش ها تأثیر مجموعه ی مواد معدنی تحت عنوان محلول مندل مورد بررسی قرار گرفته است (۲۰). همچنین در پژوهشی که توسط هائو<sup>۱</sup> و همکاران در ۲۰۰۶ انجام شد محیط برای تولید سلولاز توسط جهش یافته ی تریکودرما ریزئی-WX 112 با استفاده از روش سطح پاسخ بهینه سازی شد. سبوس گندم سوبسترای مورد استفاده بود که با  $KH_2PO_4$  و پاره ای مواد دیگر غنی سازی شده بود که در مقایسه با تیمار شاهد افزایش فعالیت سلولازی را موجب شد (۱۷). برخی پژوهشگران تأثیر مثبت منبع فسفر بر فعالیت سلولازی را گزارش کردند. آن ها از منابع فسفر مختلف استفاده کردند. برای مثال در مطالعه ی دوت و کومار در سال ۲۰۱۴ با میزان ۲ گرم در لیتر فسفات دی هیدروژن پتاسیم بیشترین میزان فعالیت سلولازی در مقایسه با سایر منابع فسفر حاصل شد که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد (۱۵). در مطالعه ای که توسط عبدالله و همکاران در سال ۲۰۱۶ انجام شد مواد معدنی در قالب محلول به سوبسترای جامد اضافه شدند. فسفات هیدروژن دی پتاسیم نیز در این محلول وجود داشت. نتایج حاصل از پژوهش آنان نشان داد افزودن مواد معدنی تأثیر معنی داری بر افزایش میزان سلولاز نداشت که تفسیر آنان، کافی بودن میزان مواد معدنی در سوبسترای مورد استفاده (ضایعات جامد شهری) بود که نیازی به اضافه کردن مواد معدنی جدید وجود نداشت (۵). در پایان با توجه به تأثیر مثبت بهینه سازی بر میزان فعالیت سلولازی، پیشنهاد می شود سایر پارامترهای مؤثر بر فعالیت سلولازی نیز بهینه سازی گردند.

میزان رطوبت در محیط تخمیر حالت جامد، رشد میکروبی و تولید زیستی محصول را تحت تأثیر قرار می دهد. نتایج تأثیر رطوبت بر میزان فعالیت سلولازی نشان می دهد که رطوبت امکان استفاده ی بهتر از سوبسترا توسط ریزاندامگان را افزایش می دهد و کارایی انتقال جرم در ذرات فاز جامد به خصوصیات سوبسترا و میزان رطوبت مناسب تحت شرایط رشد در سامانه ی تخمیر حالت جامد، وابسته است. اما افزایش بیش از حد میزان رطوبت بر تولید آنزیم تأثیر منفی دارد. زیرا آب زیادتر از حد بهینه، موجب کاهش سطح تماس ذرات شده و فیلم آب را ضخیم تر می کند که منجر به کاهش دسترسی هوا به ذرات می شود. میزان رطوبت زیر حد بهینه موجب کاهش حلالیت مواد مغذی سوبسترای جامد شده و جذب آب و تورم سوبسترا را نیز کاهش می دهد (۱۵). در مطالعه ی سینگهانیا و همکاران در سال ۲۰۰۷، بهینه سازی تولید سلولاز در سامانه تخمیر حالت جامد توسط تریکودرما ریزئی RUTC30 انجام گرفت. آن ها از سبوس گندم به عنوان سوبسترای ارزان قیمت استفاده نمودند. بهینه سازی پارامترهای رطوبت و دمای گرمخانه گذاری با استفاده از روش طراحی ترکیب مرکزی<sup>۲</sup> انجام شد. بدون در نظر گرفتن زمان گرمخانه گذاری، حداکثر میزان بازده سلولاز در میزان رطوبت بین ۳۷ و ۳۸ درصد به دست آمد و تغییر در میزان رطوبت سوبسترا، دمای بهینه ی مورد نظر را تغییر نداد که نشان دهنده ی عدم برهم کنش میان این دو پارامتر می باشد. نتایج حاصل از این پژوهش میزان کمتری از رطوبت را برای تولید بهینه گزارش کرده است که این تفاوت با نتایج پژوهش حاضر، به دلیل تفاوت در نوع سوبسترای به کار رفته می باشد. میزان رطوبت بهینه برای رشد ریزاندامگان در فرآیند تخمیر حالت جامد، با توجه به سوبسترای مورد استفاده متغیر است، زیرا ظرفیت نگهداری آب<sup>۳</sup> سوبستراها متفاوت است و این

<sup>1</sup> Biosynthesis	0
<sup>1</sup> Swelling	1
<sup>1</sup> Central composite design	2
<sup>1</sup> Water holding capacity	3



#### ۴- نتیجه‌گیری

در این مطالعه تولید سلولاز با استفاده از یک سویه‌ی جدید جهش‌یافته‌ی قارچی انجام شد. تریکودرماریزی B برای تولید سلولاز در سامانه‌ی تخمیر حالت جامد و با کاربرد ضایعات برنج (سبوس، پوست و کاه برنج) مورد استفاده قرار گرفت. کاربرد ضایعات ارزان‌قیمت کشاورزی در سامانه‌ی تخمیر حالت جامد منجر به ایجاد محصولات با ارزش افزوده مانند آنزیم‌های گران‌قیمت می‌شود. برای افزایش کارایی سامانه‌ی تخمیری و تولید بیشتر سلولاز باید متغیرهای موثر بر تولید مورد ارزیابی قرار گیرند. بدین منظور، دو فاکتور اصلی موثر بر میزان تولید سلولاز شامل میزان رطوبت سوبسترا و وجود املاح فسفره در محیط کشت با استفاده از روش طراحی یک متغیر در هر زمان، بهینه‌سازی شدند. با توجه به ویژگی‌های منحصر به فرد سامانه‌ی تخمیر حالت جامد و عدم حضور آب آزاد در این سامانه، اهمیت میزان رطوبت سوبسترا آشکار است. نتایج نشان داد در دامنه ۶۵ تا ۷۷ درصدی میزان رطوبت، بیشترین میزان فعالیت سلولازی حاصله مربوط به میزان رطوبت ۷۴٪ بود و در مقادیر کم‌تر و بیشتر از آن میزان فعالیت سلولازی کاهش یافت. در مقادیر رطوبت کم‌تر از بهینه، کارایی انتقال جرم کاهش یافته و رطوبت مورد نیاز برای رشد قارچ تامین نمی‌شود لذا میزان تولید آنزیم کاهش می‌یابد از سوی دیگر در مقادیر رطوبت بیش از حد بهینه، لایه‌ی رطوبتی ضخیم شده و با پر شدن خلل و فرج میزان دسترسی قارچ به اکسیژن کاهش می‌یابد و این امر تأثیر منفی بر کارایی دارد. همچنین نتایج نشان داد حضور املاح فسفره در محیط کشت بر میزان فعالیت سلولازی حاصله موثر بود و در حضور فسفات‌های پروژن‌دی‌پتاسیم در مقدار ۲ گرم در لیتر بیشترین میزان فعالیت سلولازی به دست آمد. در مقادیر بیشتر از آن، میزان فعالیت سلولازی کاهش یافت. میزان تأثیر فسفر بر فعالیت سلولازی به نوع سوبسترا بستگی دارد. نتایج سایر پژوهش‌ها نشان داد که چنانچه سوبسترای مورد استفاده غنی از املاح معدنی باشد افزودن آن‌ها در محیط کشت تأثیری بر

افزایش تولید آنزیم نخواهد داشت. با توجه به نتایج حاصله و تأثیر معنی‌دار متغیرهای محیط کشت بر میزان فعالیت سلولازی، پیشنهاد می‌شود سایر متغیرهای محیطی نیز مورد بررسی قرار گرفته و بهینه‌سازی شوند.

#### ۵- منابع

۱. حمیدی اصفهانی، ز. ۱۳۸۱. راهبردهای کنترل دما و رطوبت در بیوراکتورهای بستراکنده حالت جامد، رساله دکتری رشته مهندسی شیمی (بیوتکنولوژی)، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده فنی و مهندسی.
۲. داراب‌زاده، ن.، حمیدی اصفهانی، ز. و حجازی، پ. ۱۳۹۷. بررسی تأثیر نوع سوبسترا و سویه قارچی تریکودرماریزی بر تولید سلولاز و اعمال جهش باهدف بهبود تولید آنزیم در سامانه تخمیر حالت جامد. نشریه ی نوآوری در علوم و فناوری غذایی، جلد ۱۰، شماره ۳، ۱۳-۱.
۳. قربانی تونکابنی، ا.، خیاطی، غ. و نصرالهی، آ. ۱۳۹۱. استفاده از پسماند کشاورزی توسط قارچ تریکودرما ریسئی به منظور افزایش تولید آنزیم سلولاز. مجله‌ی علمی پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی، جلد ۴، شماره ۱۵، ۳۹-۴۴.
۴. محمدی‌زاده، م.، حمیدی اصفهانی، ز. و عباسی، س. ۱۳۹۰. جداسازی ریزسازواره‌های تولیدکننده‌ی سلولاز از خاک و بهینه‌سازی فعالیت FilterPaperase بهترین سویه. فصلنامه‌ی علوم و صنایع غذایی، شماره ۴۰، جلد ۱۰، ۹۳-۱۰۱.

5. Abdullah, J.J., Greetham, D., Pensupa, N., Tucker, G.A. and Du, C. 2016. Optimizing cellulase production from municipal solid waste (MSW) using solid state fermentation (SSF). *Fundamentals of Renewable Energy and Applications*, 6(3): 1-10.
6. Adney, B. and Baker, J. 1996. Measurement of cellulase activity. *Chemical analysis and testing task: Laboratory Analytical Procedure*. National Renewable Energy Laboratory Publications. (sied at <http://www.NREL.gov>)

17. Hao, X-C., Yu, X-B. and Yan, Zh-L. 2006. Optimization of the medium for the production of cellulase by the mutant *Trichoderma reesei* WX-112 using response surface methodology. *Food Technology and Biotechnology*, (44)1: 89-94.
18. Kumar Mekala, N., Rani Singhania, R., Sukumaran, R.K. and Pandey, A. 2008. Cellulase production under solid-state fermentation by *Trichoderma reesei* RUT C30: Statistical optimization of process parameters. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 151: 122-131
19. Latifian, M., Hamidi-Esfahani, Z. and Barzegar, M. 2007. Evaluation of culture conditions for cellulase production by two *Trichoderma reesei* mutants under solid-state fermentation conditions. *Bioresource Technology*, 98: 3634-3637.
20. Mandels, M., and J. Weber. 1969. The production of cellulases. *Advances in Chemistry*, 95: 391-414.
21. Maurya, D.P., Singh, D., Pratap, D. and Maurya, J.P. 2012. Optimization of solid state fermentation conditions for the production of cellulase by *Trichoderma reesei*. *Journal of Environmental Biology*, 33: 5-8.
22. Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31: 426-429.
23. Mitchell, D.A., Krieger, N., Stuart, D.M. and Pandey, A. 2000. New developments in solid state fermentation II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. *Process Biochemistry*, 35: 1211-1225.
24. Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C.R. and Nigam, P. 1999. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science*, 77: 149-162.
25. Rocky-Salimi, K. and Hamidi-Esfahani, Z. 2010. Evaluation of the effect of particle size, aeration rate and harvest time on the production of cellulase by *Trichoderma reesei* QM9414 using response surface methodology. *Food Bioproducts Processing*, 88: 61-66.
26. Shathele, M.S. 2009. Effects of gamma irradiation on fungal growth and associated pathogens. *Research Journal of Environmental Toxicology*, 3: 94-100.
27. Singhania, R R., Sukumaran, R K. and Pandey, A. 2007. Improved cellulase production
7. Ashok, A., Doriya, K., Mohan Rao, D R. and Kumar, S. 2017. Design of solid state bioreactor for industrial applications: An overview to conventional bioreactors. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 9: 11-18.
8. Ballardo, C., Abraham, J., Barrena, R., Artola, A., Gea, T. and Sánchez, A. 2016. Valorization of soy waste through SSF for the production of compost enriched with *Bacillus thuringiensis* with biopesticide properties. *Journal of Environmental Management*, 169: 126-131.
9. Batool, T., Makky, E.A., Jalal, M. and Yusoff, M.M. 2015. A comprehensive review on L asparaginase and its applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 178: 900-923.
10. Behera, S.S. and Ray, R.C. 2016. Solid state fermentation for production of microbial cellulases: recent advances and improvement strategies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86: 656-669.
11. Bhargav, S., Panda, B.P., Ali, M. and Javed, S. 2008. Solid-state fermentation: An Overview. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 22(1): 49-70.
12. Brijwani, Kh., Singh, O.H. and Vadlani, P.V. 2010. Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. *Process Biochemistry*; 45: 120-128.
13. Darabzadeh, N., Hamidi-Esfahani, Z. and Hejazi, p. 2018. Improvement of cellulase production and its characteristics by inducing mutation on *Trichoderma reesei* 2414 under solid state fermentation on rice by-products. *Applied Food Biotechnology*, 5(1): 11-18.
14. Deschamps, F., Giuliano, C., Asther, M., Huet, M.C. and Roussos, S. 1985. Cellulase production by *Trichoderma reesei* static and mixed solid-state fermentation reactors under nonaseptic conditions. *Biotechnology Bioengineering*, 27: 1385-1388.
15. Dutt, D. and Kumar, A. 2014. Optimization of cellulase production under solid state fermentation by *Aspergillus flavus* (AT-2) and *Aspergillus niger* (AT-3) and its impact on stickies and ink particle size of sorted paper office paper. *Cellulose Chemistry and Technology*, 48(3-4): 285-298.
16. Ghose, T.K. 1987. Measurements of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, 59: 257-268.

by *Trichoderma reesei* RUT C30 under SSF through process optimization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 142: 60-70.

28. Yazid, N.A., Barrena, R. and Sánchez, A. 2016. Assessment of protease activity in hydrolyzed extracts from SSF of hair waste by and indigenous consortium of microorganisms. *Waste Management*, 49: 420–426.