NCMBJ
Research article

New Cell Mol Biotech
j.12/47 , 2022

Scan online to view this article

Optimization of Penicillium halotolerans cellulase and lipase and pectinase production using Taguchi method

Reyhaneh Javanshir[1] ,Mehrdad Azin[2] ،Mohaddeseh Larypoor*[1]

1. Department of Biotechnology, Faculty of Biological Science, Tehran North Branch , Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. the Institute of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran.

Abstract

Aims and Background: Fungi are important sources of commercial and applied enzymes in various industries. The aim of this study is to introduce an optional salt-loving strain that produces cellulase, lipase and pectinase enzymes and optimize enzyme production using Taguchi method.

Materials and methods: In this study, more than 350 fungal samples were isolated from the soil and climate of Tehran Forest parks and identified. After qualitative and quantitative analysis, 19 strains that had the highest production of lipase, pectinase and cellulase were identified by molecular technique. Then, based on the amount of enzyme production, optimization and design of Taguchi statistical method were performed by 8 factors at three levels to produce two cellulase and lipase enzymes for the best strain.

Results: About 280 isolates were identified, including the genera Aspergillus sp., Penicillium sp., Fusarium sp., Mucor sp., Rizhopus sp. They secreted most of the enzyme's pectinase, lipase, protease, amylase and cellulase. Among the isolated samples, Penicillium halotolerans had the highest enzyme production, which was selected for optimization. The production of cellulase and lipase enzymes of this fungus increased before 0.0744 and 0.0233053 U / ml before optimization and after optimization, increased to 0.63872 and 0.192105 U / ml. The most effective factor in the production of both enzymes was temperature and nitrogen source. The production of pectinase enzyme in the initial absorption of 540 nm was 0.71 (U / ml) which was not included in the optimization.

Conclusion: Optional salt-loving fungi can be introduced as a commercial and industrial strain due to their stability in fermentation conditions, availability, cheapness and locality.

Keywords: Cellulase enzyme, Pectinase enzyme, Lipase enzyme, Penicillium halotolerans, Taguchi method, Iau Science .

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-01-30]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.1.8]

Corresponding author:
Department of Biotechnology, Faculty of Biological Science, Tehran North Branch , Islamic Azad University, Tehran, Iran.
Email: m.larypoor@iau-tnb.ac.ir

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی
دوره ۱۲ - شماره۴۷ - تابستان۱۴۰۱

NCMBJ
مقاله پژوهشی

برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

بهینه‌سازی تولید آنزیم‌های سلولاز و لیپاز و پکتیناز Penicillium halotolerans با استفاده از روش تاگوچی

محدثه لاری پور[1*]، ریحانه جوانشیر[1]، مهرداد آذین[2]

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲. گروه بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، شهریار،ایران

چکیده

سابقه و هدف: قارچ‌ها از منابع مهم تولید آنزیم‌های تجاری وکاربردی در صنایع مختلف هستند. معرفی یک سویه نمک دوست اختیاری مولد آنزیم سلولاز و لیپاز و پکتیناز و بهینه‌سازی تولید آنزیم با استفاده ازروش تاگوچی هدف این تحقیق است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش بیش از ۳۵۰ نمونه قارچ از خاک و هوای پارک‌های جنگلی تهران جداسازی و شناسایی شد. پس از بررسی کیفی و کمی، ۱۹ سویه که بیش-ترین میزان تولید آنزیم لیپاز، پکتیناز و سلولاز را داشت، با تکنیک مولکولی شناسایی شد. سپس براساس میزان تولید آنزیم، بهینه‌سازی و طراحی آزمایش به روش آماری تاگوچی توسط ۸ فاکتور در سه سطح برای تولید دو آنزیم سلولاز و لیپاز برای بهترین سویه انجام شد.

یافته‌ها: در حدود ۲۸۰ جدایه شناسایی شد که شامل جنس‌های *آسپرژیلوس، پنی‌سیلیوم، موکور، ریزوپوس* بودند و بیش‌تر آنزیم پکتیناز، لیپاز، پروتئاز و آمیلاز و سلولاز را ترشح کردند. از بین نمونه‌های جداشده، *پنی‌سیلیوم هالوتولرنس* بیش‌ترین میزان تولید آنزیم را داشت که برای بهینه‌سازی انتخاب شد. میزان تولید آنزیم سلولاز و لیپاز این قارچ پیش از بهینه‌سازی U/ml ۰/۰۷۷۴۴ و ۰/۰۲۳۳۰۵۳ و پس از بهینه‌سازی، به‌مقدار U/ml ۰/۶۳۸۷۲ و ۰/۱۹۲۱۰۵ افزایش یافت. مؤثرترین فاکتور در تولید هر دو آنزیم دما و منبع نیتروژن بود. میزان تولید آنزیم پکتیناز در جذب اولیه ۵۴۰ نانومتر (U/ml) ۰/۷۱ بود که در بهینه‌سازی وارد نشد.

نتیجه‌گیری: قارچ‌های نمک دوست اختیاری، به‌دلیل پایداری در شرایط تخمیر، در دسترس، ارزان و بومی بودن می‌توانند، به‌عنوان یک سویه تجاری و صنعتی معرفی شوند.

واژه‌های کلیدی: آنزیم سلولاز، آنزیم پکتیناز، آنزیم لیپاز، *پنی‌سیلیوم هالوتولرنس*، روش تاگوچی، Iau Science.

مقدمه

امروزه آنزیم‌های کاربردی در صنعت بسیار اهمیت دارند. مهم‌ترین منابع تولید کننده آنزیم‌های صنعتی، میکروارگانیسم‌ها هستند. از بین میکروارگانیسم-ها باکتری-ها و قارچ‌ها بسیار اهمیت دارند. قارچ‌ها به‌دلیل ساختمان رشته‌ایی خاص، افزایش سطح به حجم و هتروتروف بودن، منبع مناسبی برای تولید آنزیم‌ها در سراسر جهان هستند. از طرفی استفاده از سویه‌های بومی در تولید آنزیم‌های صنعتی می‌تواند مقرون‌به صرفه و ارزان باشد (۳-۱). قارچ‌های موجود در هوا وخاک به‌دلیل بومی بودن همیشه در دسترس هستند و چنانچه سویه بومی خصوصیت‌های خود را در تانک تخمیرجهت تولید آنزیم بعد از مدتی از دست بدهد، دوباره

نویسنده مسئول:
گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران‌شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
پست الکترونیکی: m.larypoor@iau-tnb.ac.ir
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۲۳
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۰۴

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-01-30]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.1.8]

قابل جداسازی از منبع طبیعی و بومی خود به‌طور مثال پارک جنگلی، است. امروزه برای خودکفایی کشور در امر تولید آنزیم‌های صنعتی جداسازی سویه‌های بومی با کارایی بالا و توان تولید واحدهای آنزیمی بالا، اهمیت زیادی دارد. از طرفی آنزیم‌های میکروبی که توسط قارچها تولید می‌شود در صنایع مختلف از جمله صنایع غذایی شوینده‌ها، آرایشی-بهداشتی، دارویی و غیره کاربرد فراوان دارد. هم‌چنین مهم-ترین کاربرد آنزیم‌های تولید شده توسط قارچها ،کاربرد آن-ها در تولید مکمل غذایی دام و طیور است که به هضم غذا و سهولت عبور غذا از دستگاه گوارشی این حیوانات کمک می-کند، لذا این حیوانات ترکیب‌های بسیار مهم را از منابع غذایی بیش‌تر دریافت کرده و رشد بهتری دارند و در نتیجه محصول‌های آن‌ها هم با کیفیت بهتری به دست افراد جامعه می‌رسد (۶-۴). عمده‌ترین مشکل تولید آنزیم در شرایط فرمانتور پایداری قارچ در تولید مقدار قابل توجهی از واحد آنزیمی است. علی‌رغم این‌که بسیاری از باکتری‌ها و قارچ‌ها، تولید کننده انواع و مقادیر زیادی از آنزیم‌ها هستند، اما با تغییر شرایط داخل فرمانتور از جمله تغییراسیدیته، دما، میزان اکسیژن، دور همزن و غیره خواص تولید آنزیم خود را به‌دلیل عدم پایداری از دست می‌دهند. بنابراین برای تولید مقادیر بهینه آنزیم‌های صنعتی میکروارگانیسم‌های سازگار با شرایط دما اسیدیته فرمانتور مورد نیاز هستند و قارچ‌های نمک دوست اختیاری که به‌صورت بومی از محیط جدا شوند، می‌توانند شرایط سخت را تحمل کنند. این قارچها در محدوده دمایی زیاد، محدودی اسیدیته زیاد وشرایط تانک تخمیر تحمل بالایی دارند .به‌دلیل مکانیسم‌های مقاومت این قارچها در برابر افزایش نمک محیط، فعال شدن پمپ سدیم پتاسیم و هم‌چنین تولید مایکوسپورین‌هایی مانند مانیتول وآرابینیتول که در سیتوپلاسم این قارچها تولید می‌شود و اتصال مولکول‌های آب به این مولکول‌ها، این موجودات در شرایط پر نمکی آب از دست نداده و می‌توانند در محیط پایدار بمانند. بنابراین برای شرایط تولید آنزیم می‌توانند گزینه بسیار مناسبی باشند سویه‌های صنعتی خریداری شده از کشورهای دیگر، هم قیمت بسیار بالایی را به کارخانه وکشور تحمیل می‌نماید و بعد از مدت زمانی خاص این سویه‌ها به‌طور معمول کارایی خود را از دست داده وکارخانه مجبور به خرید مجدد سویه از مراکز دیگر کشورها با قیمت بالا می‌شود. علت از کار افتادن سویه غیربومی، می‌تواند عدم سازگاری سویه با شرایط آب وهوایی باشد (۹-۷). اگر منبع سویه داخلی و بومی باشد علاوه‌بر ارزان بودن سویه، هر لحظه اراده شود می‌توان از آن منبع خاص، سویه را دوباره جداسازی نمود و یا در بانک‌های میکروبی داخلی از آن به-نحو احسنت نگهداری کرد و به‌عنوان یک سویه صنعتی به بانک‌های میکروبی سپرده شود. بنابراین نیاز هر جامعه‌ایی به وجود سویه‌های تولید کننده آنزیم که در شرایط تولید صنعتی آنزیم پایدار باشد آشکار است. بنابراین ضرورت شناسایی سویه‌های بومی، در دسترس، ارزان قیمت تولید کننده آنزیم‌های مهم صنعتی مانند آنزیم سلولاز، لیپاز و پکتیناز به‌شدت احساس می‌شود (۱۳-۱۰). در این پژوهش از هوا وخاک پارک‌های جنگلی تهران نمونه‌برداری شد. سپس تولید آنزیم‌های صنعتی پکتیناز، لیپاز و سلولاز به-صورت کمی وکیفی در یک سویه شناسایی شده و میزان تولید آنزیم پکتیناز بررسی شد ودر نهایت تولید آنزیم‌های لیپاز و سلولاز تحت برنامه تاگوچی بهینه‌سازی شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

از بین پارک‌های جنگلی تهران هفت پارک انتخاب شد (پارک‌های جنگلی چیتگر ،خجیر ،پردیسان، لویزان، یاس فاطمی ،سرخه حصار و سوهانک) و نمونه‌برداری از هوا و خاک این پارک‌ها صورت گرفت. برای نمونه‌برداری از خاک بدین‌صورت عمل شد که ابتدا سطح خاک را کنار زده، سپس با قاشقک استریل از عمق ۵ تا ۱۰سانتی‌متر خاک برداشت شد. این نمونه‌برداری از نقاط مختلف پارک انجام شد. نمونه‌برداری از هوا نیز با روش غیرفعال یا رسوب‌گذاری بر روی پلیت‌ها انجام شد (۹،۱۹).

غربالگری و جداسازی وخالص‌سازی قارچ‌های هالوفیل اختیاری

در این مرحله پلیت‌های حاوی نمونه‌های هوا را در انکوباتور در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک تا دو هفته برای رشد ساپروفیت‌های شفاف و ۲ تا ۴ هفته برای رشد ساپروفیت‌های رنگی قرار داده شد وکلنی‌ها با پاساژ مجدد خالص‌سازی شد. در مرحله بعدی برای کشت خاک ابتدا رقت‌های سریال ازخاک تهیه شد و سپس به دو صورت خاک‌ها کشت داده شد. اضافه کردن یک میلی‌لیتر محلول رقیق شده به محیط‌های کشت ٪۴ SDA, SDA ٪۳ و SDA CMA و پخش نمودن نمونه در سطح پلیت توسط سوآپ استریل (۲۵،۲۶).

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-01-30]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.1.8]

پور پلیت کردن نمونه‌ها

برای جداسازی قارچ‌های نمک دوست از محلول‌های رینگر ۳٪ نمک و ۴٪ نمک استفاده شد. برای تهیه پورپلیت نمونه در ۳٪ SDA، در هر پلیت ml ۵ محلول رینگر به‌علاوه ml ۱ نمونه خاک رقیق شده و ml ۱۵ محیط کشت SDA ریخته شده و بلافاصله با چرخش & شکل محتویات داخل پلیت را مخلوط کرده و پلیت به انکوباتور منتقل می شود.

شناسایی ماکروسکوپی و میکروسکوپی کلنی

بررسی ماکروسکوپی: پس از رشد کلنی‌ها، در اولین مرحله کلنی‌ها در هر پلیت شماره‌گذاری شده و خصوصیت-های ظاهری هر کلنی را با ذکر شماره یاد داشت شده است. خصوصیت‌های ظاهری شامل قوام کلنی، شکل کلنی، حالت کلنی، رنگ سطح کلنی و رنگ پشت کلنی است (۱۴،۱۵).

بررسی میکروسکوپی: ابتدا نمونه‌برداری از کلنی‌ها صورت گرفت بدین‌ترتیب که روی یک لام تمیز قطره‌ای از محلول لاکتو فنل کاتن بلو ریخته شد و سپس با استفاده از سوزن سرکج پلاتینی مقدار کمی از کلنی مورد نظررا برداشته و روی آن قرار داده و با رنگ به‌طور کامل مخلوط گردید سپس یک لامل تمیز روی لام گذاشته شد و لام روی حرارت حرکت داده شد و زیر میکروسکوپ با عدسی با بزرگ‌نمایی ۱۰ و در صورت لزوم با عدسی با بزرگ‌نمایی ۴۰ قارچ‌ها مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی دقیق ساختار میکروسکوپی قارچ‌های رشته‌ایی، روش اسلاید کالچر برای هر قارچ انجام شد (۹).

تهیه سوسپانسیون استاندارد

به‌ازای هر ۱۰۰ میلی‌لیتر از سرم فیزیولوژی ۱ قطره توئین ۸۰ اضافه شد. پس از دو هفته انکوباسیون، سرم فیزیولوژی و توئین که از قبل اتوکلاو شده بودند بر روی پلیت حاوی *پنی‌سیلیوم هالوتولرنس* (Penicillium halotolerans) ریخته و با استفاده از پیپت پاستور استریل سطح محیط کشت خراش داده شد. سوسپانسیون اسپور تهیه شده را از دو لایه نازک گاز استریل عبور داده و سپس با دور rpm ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد و سپس از مایع سطحی آن که محتوی اسپور بود برداشته و با استفاده از لام نئوبار مقدار اسپور موجود در هر میلی‌لیتر با بزرگ‌نمایی ۴۰× شمارش شد. چنان‌چه تعداد اسپورها بیش از مقدار اسپور استاندارد باشد، با افزودن آب مقطر محلول را رقیق کرده و چنان‌چه تعداد اسپور کم‌تر از حد استاندارد بود، محلول حاصل را با سانتریفیوژ تغلیظ نموده تا تعداد اسپورها به حد استاندارد نزدیک شود. بر حسب فرمول $۵ \times ۱۰^{۴} \times (R_1+R_2+R_3+R_4+R_5)$ تعداد اسپور در هر میلی‌لیتر از سوسپانیسون محاسبه گردید. سوسپانسیون اسپور استاندارد برای *آسپرژیلوس* (Aspergillus sp.) ۱×۱۰^{۶} تا ۵×۱۰^{۶} و برای *موکور* (Mucor sp.) (۱×۱۰^{۵} تا ۵×۱۰^{۵}) و برای *ریزوپوس* (Rhizopus sp.) ۹×۱۰^{۵} تا ۴×۱۰^{۵} در نظر گرفته شد (۹).

بررسی کیفی تولید آنزیم‌ها

در تمامی آزمایش‌ها ابتدا جدایه‌های قارچها بر روی محیط SDA به‌صورت سوسپانسیون استاندارد، کشت تازه تهیه شد (به‌عنوان محیط پیش کشت) و سپس بر روی محیط‌های جامد واجد سوبسترای آنزیمی به‌صورت عمقی کشت داده شد.

برای بررسی کیفی تولید آنزیم لیپاز از کشت تازه قارچ بر روی محیط واجد سوبسترای توئین ۸۰ کشت داده شدند. پلیت‌ها به‌مدت دو تا پنج روز در دمای °C ۳۰ - ۲۵ گرماگذاری شدند. پس از این مدت مشاهده هاله شفاف در اطراف کلنی نشان دهنده حضور آنزیم لیپاز است (۲۶).

برای بررسی کیفی تولید آنزیم سلولاز از کشت تازه قارچ بر روی محیط واجد سوبسترای کربوکسی متیل سلولزکشت داده شد. پلیت‌ها به‌مدت سه تا پنج روز در دمای °C۳۰– ۲۵ گرماگذاری شد پس از این مدت به هر پلیت محلول کنگو رد ۲ ٪ و بعد از آن برای لکه‌زدایی از NAOH ۱ مولار به‌مدت ۱۵ دقیقه اضافه شد. در اطراف جدایه‌های تولید کننده سلولاز، مناطق شفافی تشکیل می‌شود (۱۸-۱۶).

برای بررسی کیفی تولید آنزیم پکتیناز از کشت تازه قارچ بر روی محیط واجد سوبسترای پکتین کشت داده شد. پلیت‌ها به‌مدت سه تا پنج روز در دمای °C ۳۰ گرماگذاری شد پس از این مدت به هر پلیت محلول پتاسیم یدید اضافه شد. در اطراف جدایه‌های تولید کننده پکتیناز، مناطق شفافی تشکیل می‌شود. ترکیب محیط برای بررسی وجود آنزیم پکتیناز عبارتند از: (۲۰،۲۱)

بررسی کمی تولید آنزیم ها

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-01-30]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.1.8]

واحد آنزیمی که بیانگر فعالیت کمی قارچ در تولید آنزیم است، با انجام روش کشت غوطه‌ور بر روی قارچ‌هایی که در مرحله قبل دارای هاله شفاف آنزیم بودند، تعیین شد. در نهایت بهترین سویه دارای بیش‌ترین فعالیت آنزیمی انتخاب شد (۲۶). برای تعیین فعالیت آنزیم پکتیناز ۰/۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون اسپور (دارای 10^6 اسپور در هر میلی‌لیتر) قارچ به محیط کشت غوطه‌ور تلقیح شد. پس از ۵ روز، محیط تخمیر برای انجام آزمایش‌ها فعالیت پکتیناز، با استفاده از کاغذ واتمن شماره ۱، خالص‌سازی شد. برای تعیین فعالیت آنزیم پکتیناز جذب‌های نوری غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰ میکرولیتر از محلول پایه حاوی D-گالاکتورونیک اسید خوانده شد و منحنی کالیبراسیون رسم شد. در شکل ۲a منحنی استاندارد گالاکتورونیک اسید رسم شده است. فعالیت آنزیم پکتیناز با اندازه‌گیری گروه‌های قند آزاد شده از پکتین، با استفاده از معرف ۳، ۵ دی نیتروسالیسیلیک اسید تعیین شد (۲۲،۲۳). یک واحد فعالیت آنزیمی پکتیناز، مقدار آنزیمی است که توانایی آزادسازی یک میکرو مول گالاکتورونیک اسید بر واحد حجم آنزیم در مخلوط واکنش بر واحد زمان در شرایط استاندارد آزمایش را داشته باشد. (وزن مولکولی گالاکتورونیک اسید برابر با ۲۱۲/۱۶ میلی‌گرم بر مول است.)

$$U = \frac{\text{گالاکتورنیک اسید (میلی گرم)}}{\text{وزن مولکولی گالاکتورونیک اسید×زمان (دقیقه)×مقدار آنزیم (میلی‌لیتر)}} \quad ml$$

برای تعیین فعالیت آنزیم سلولاز معرف دی نیتروسالسیلیک اسیداستفاده شد و سپس منحنی استاندارد گلوکزرسم شد. در نمودار شکل 2b منحنی استاندارد گلوکز رسم شده است.

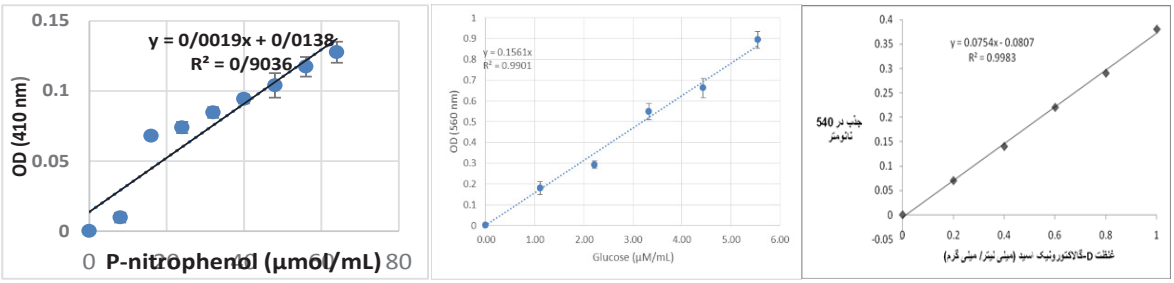
مقدار آنزیم تولیدی برحسب (U/ml) با استفاده از فرمول زیر به دست می‌آید (۲۴).

$$U = \frac{\text{۲ × میکرومول گلوکز}}{\text{دقیقه ml}}$$

برای تعیین فعالیت آنزیم سلولاز از محلول کربوکسی متیل سلولز استفاده می‌شود. از معرف دی نیترو سالسیلیک اسید برای سنجش آنزیم سلولز استفاده شد و با طول موج ۵۵۰ نانومتر جذب نوری نمونه‌ها خوانده شد. یک واحد آنزیمی سلولاز مقدار آنزیمی است که برای آزاد شدن یک میکرومول قند احیاء شده به‌صورت گلوکز در مدت یک دقیقه لازم است.

برای تعیین فعالیت آنزیم لیپاز منحنی استاندارد از محلول پارانیتروفنل رسم شد. در نمودار شکل c۲ منحنی استاندارد پارانیتروفنل نشان داده شده است (۲۵). برای تعیین فعالیت آنزیم لیپاز از پارانیتروفنیل پالمیتات به‌عنوان سوبسترا استفاده شد. سپس توسط دستگاه اسپکتروفتومتر جذب محلول نمونه و شاهد در ۴۱۰ نانومتر خوانده شد. یک واحد آنزیمی لیپاز برابر است با مقدار آنزیمی که یک میکرومول پارانیتروفنل را در یک دقیقه تحت شرایط مشخص شده آزاد نماید (۲۶). در شکل ۱ منحنی‌های استاندارد برای تعیین فعالیت کمی آنزیم‌های سلولاز، پکتیناز و لیپاز نشان داده شده است.

$$U = \frac{\text{۲×میکرومول پارا نیتروفنل}}{\text{دقیقه} \qquad ml}$$



شکل ۱ . منحنی استاندارد گالاکتورونیک اسید، گلوکز و پارانیتروفنل

شناسایی مولکولی سویه برتر تولید کننده آنزیم به‌صورت کیفی وکمی با تکنیک PCR

استخراج DNA طبق روش ویلند انجام شد (Weiland, J. J. 2002). پرایمرهای به‌کار برده شده از نوع ناحیه اسپیسر

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-01-30]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.1.8]

نسبی داخلی نوکلئوتیدی نسبی (ITS) بودند. (Amutha and Godavari, 2014)
پرایمر فوروارد (ITS1)
(5′ TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3′)
پرایمرمعکوس (ITS4)
(5′ TCCTCCGCTTATTGATATGC 3′).
در واکنش فوق از شرایط زیر استفاده شده است: ۲ دقیقه در ۹۶ °C برای دناتوراسیون، ۳۵-۲۵ سیکل هر یک از ۶۰ ثانیه در ۹۶ °C برای دناتوراسیون، ۱ دقیقه در ۵۵ °C درجه سانتی‌گراد برای بازپخت، ۲ دقیقه در ۷۲ °C برای گسترش به‌دنبال آن پسوند نهایی در ۷۲ °C به‌مدت ۱۰ دقیقه. (تمام مواد شیمیایی مولکولی از سیگما آلدریچ خریداری شده است). (Amutha and Godavari، 2014) محصولات PCR با استفاده از مینی ستون‌ها (PCR Preps DNA system purification System، Sigma) مطابق پروتکل ویلند خالص شدند. واکنش با استفاده از یک ترموسایکلر T-۱۰۰ انجام شد.(Weiland, J. J. 2002)

بانک قارچی *پنی سیلیوم هالوتولرنس*

پنی سیلیوم هالوتولرنس جدا شده از تحقیق لاری پور و همکاران، در شرایط کامل استریل در دو محیط پتیتو دکستروز آگار و سابرو دکستروز آگار به‌همراه آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین در کنار شعله و به‌روش نقطه‌ای کشت داده شد و به‌مدت ۷ روز در دمای ۳۰ °C انکوبه شد (۲۶).

بهینه‌سازی تولید آنزیم سلولاز و لیپاز

برای طراحی آزمایش به روش تاگوچی از نرم‌افزار Minitab 17 استفاده شد. این نرم‌افزار می-تواند آرایه‌های متعامد L_4 تا L_{16} را به‌همراه ۲ تا ۶۳ فاکتور در دو، سه و چهار سطح برای هر عامل ارائه داد. تخمین شاخص دقت (SI) فاکتورهای مورد مطالعه در آزمایش‌ها، به آگاهی از تأثیر دو فاکتور منحصر به فرد در سطوح مختلف تأثیر متقابل کمک می‌کند. مقادیر این تأثیر متقابل بر اساس شاخص دقت توسط برنامه نرم‌افزاری محاسبه و اندازه‌گیری می شود. این نرم‌افزار به ازای n فاکتور، $n(n+1)/2$ تأثیر متقابل را در نظر می‌گیرد. در روش تاگوچی از آنالیز واریانس (ANOVA) برای تجزیه و تحلیل نتایج آزمایش‌ها و هم‌چنین جهت تعیین این‌که چه مقدار از تغییر هر عامل در فرآیند سهیم است، استفاده می‌شود. برای بهینه‌سازی آنزیم لیپاز و سلولاز شش فاکتور در سه سطح، شامل: دما، pH، منبع کربن مقدار آن، منبع نیتروژن و مقدار آن، محلول فلزات سنگین و نمک NaCl تحت بررسی قرار گرفتند. جدول ۱ فاکتورها و سطوح بررسی شده آن‌ها در بهینه‌سازی تولید آنزیم‌های لیپاز و سلولاز به روش تاگوچی را نشان می‌دهد (۲۷،۲۸).

طراحی آزمایش با استفاده از برنامه تاگوچی

پس از وارد نمودن این اطلاعات به نرم‌افزار، طبق جدول ۲ نرم‌افزار ۲۷ آزمایش برای انجام پیشنهاد نمود.

نتایج

نتایج نمونه‌برداری از هوا وخاک پارک-های جنگلی

پس از نمونه‌برداری پلیت‌ها به انکوباتور منتقل شد و پس از دو تا چهار هفته کلنی قارچ‌های ساپروفیت بر روی محیط کشت پدیدار شد. در شکل ۲ نمونه‌ایی از پلیت‌ها نمایش داده شده است.

نمونه‌برداری از هفت پارک جنگلی تهران انجام شد (پارک-های جنگلی چیتگر، خوجیر، پردیسان، لویزان، یاس فاطمی، سرخه حصار و سوهانک) و نمونه‌برداری از هوا و خاک این پارک‌ها صورت گرفت. در جدول ۳ نیز پارک‌های منتخب نشان داده شده است .در نمودار شکل ۳ زیر درصد جنس قارچ‌های جدا شده از پارک‌های جنگلی سطح تهران نشان داده شده است.

جدول ۱. فاکتورها و سطوح بررسی شده آن‌ها در بهینه‌سازی تولید آنزیم‌های لیپاز و سلولاز به روش تاگوچی

	عامل	سطح ۱	سطح ۲	سطح ۳
A	pH	۵	۶	۷
B	دما	۲۰°C	۲۵°C	۳۰°C
C	NaCl%	٪۱۶	٪۲۲	٪۲۸
D	منبع نیتروژن	پپتون	عصاره مخمر	CSL
E	منبع کربن	گلیسرول	نشاسته هیدرولیز شده	گلوکز
F	محلول فلز*	۰µl	۲۵µl	۵۰µl
G	مقدار نیتروژن٪	۰/۲	۰/۵	۱
H	مقدار کربن٪	۱۰	۱۵	۲۰

*محلول فلز: منگنز کلرید و منیزیم کلرید ۰/۱ مولار

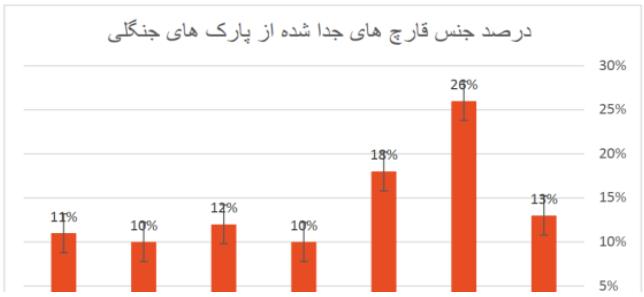
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-01-30]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.1.8]

جدول ۲. تعداد آزمایش‌های طراحی شده توسط نرم‌افزار تاگوچی

شماره آزمایش	دما °C	منبع کربن	منبع نیتروژن	محلول فلز	NaCl %	مقدار کربن ٪	مقدار نیتروژن٪	pH
۱	۲۰	گلیسرول	پپتون	۰	۱۶	۱۰	۰/۲	۵
۲	۲۵	گلوکز	پپتون	۰	۱۶	۱۵	۵/۰	۵
۳	۳۰	نشاسته	پپتون	۰	۱۶	۲۰	۱	۵
۴	۲۵	گلیسرول	عصاره مخمر	۲۵	۲۲	۱۰	۰/۲	۵
۵	۳۰	گلوکز	عصاره مخمر	۲۵	۲۲	۱۵	۰/۵	۵
۶	۲۰	نشاسته	عصاره مخمر	۲۵	۲۲	۲۰	۱	۵
۷	۳۰	گلیسرول	CSL	۵۰	۲۸	۱۰	۰/۲	۵
۸	۲۰	گلوکز	CSL	۵۰	۲۸	۱۵	۰/۵	۵
۹	۲۵	نشاسته	CSL	۵۰	۲۸	۲۰	۱	۵
۱۰	۲۰	گلیسرول	CSL	۲۵	۱۶	۱۵	۱	۶
۱۱	۲۵	گلوکز	CSL	۲۵	۱۶	۲۰	۰/۲	۶
۱۲	۳۰	نشاسته	CSL	۲۵	۱۶	۱۰	۰/۵	۶
۱۳	۲۵	گلیسرول	پپتون	۵۰	۲۲	۱۵	۱	۶
۱۴	۳۰	گلوکز	پپتون	۵۰	۲۲	۲۰	۰/۲	۶
۱۵	۲۰	نشاسته	پپتون	۵۰	۲۲	۱۰	۰/۵	۶
۱۶	۳۰	گلیسرول	عصاره مخمر	۰	۲۸	۱۵	۱	۶
۱۷	۲۰	گلوکز	عصاره مخمر	۰	۲۸	۲۰	۰/۲	۶
۱۸	۲۵	نشاسته	عصاره مخمر	۰	۲۸	۱۰	۰/۵	۶
۱۹	۲۰	گلیسرول	عصاره مخمر	۵۰	۱۶	۲۰	۰/۵	۷
۲۰	۲۵	گلوکز	عصاره مخمر	۵۰	۱۶	۱۰	۱	۷
۲۱	۳۰	نشاسته	عصاره مخمر	۵۰	۱۶	۱۵	۰/۲	۷
۲۲	۲۵	گلیسرول	CSL	۰	۲۲	۲۰	۰/۵	۷
۲۳	۳۰	گلوکز	CSL	۰	۲۲	۱۰	۱	۷
۲۴	۲۰	نشاسته	CSL	۰	۲۲	۱۵	۰/۲	۷
۲۵	۳۰	گلیسرول	پپتون	۲۵	۲۸	۲۰	۰/۵	۷
۲۶	۲۰	گلوکز	پپتون	۲۵	۲۸	۱۰	۱	۷
۲۷	۲۵	نشاسته	پپتون	۲۵	۲۸	۱۵	۰/۲	۷

شکل ۲. نمونه‌ایی از پلیت‌های حاوی قارچ‌های جداسازی شده

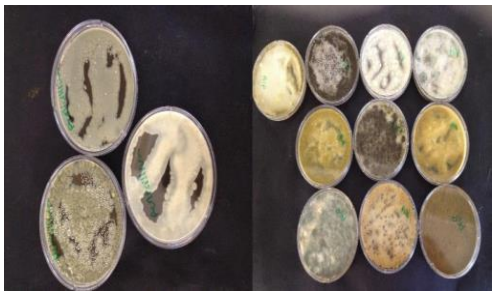


[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-01-30]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.1.8]

نتایج تهیه پورپلیت، غربالگری و جداسازی وخالص-سازی قارچ‌های هالوفیل اختیاری

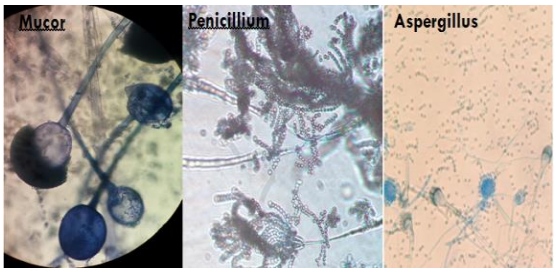
همان‌طور که در قبل توضیح داده شد برای تهیه پور پلیت از مقدار مشخصی نمونه به‌علاوه محیط کشت مایع استفاده می‌شود که با حرکت & مانند آن‌ها را مخلوط شد و بعد از بسته شدن آگار آن را در انکوباتور قرار داده و پلیت انکوبه شد.کلنی‌های جداسازی شده با انجام چندین بار پاساژ مکرر، خالص‌سازی شد. نمونه‌ایی از این کلنی‌ها در شکل ۴ دیده می‌شود.



شکل ۴. پلیت کلنی‌های خالص‌سازی شده

شناسایی ماکروسکوپی و میکروسکوپی کلنی‌ها

پس از رشد کلنی‌ها، در اولین مرحله کلنی‌ها در هر پلیت شماره‌گذاری شده و خصوصیت‌های ظاهری هر کلنی را با ذکر شماره یاد داشت شده است. خصوصیت‌های ظاهری شامل قوام کلنی، شکل کلنی، حالت کلنی، رنگ سطح کلنی و رنگ پشت کلنی است. برای بررسی خصوصیت‌های میکروسکوپی ازکلنی مورد نظر لام مستقیم میکروسکوپی تهیه شد و زیر میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی ۴۰ قارچها مورد بررسی قرار گرفت. در پلیت‌های نمونه هوا ۲۱۱ کلنی شماره‌گذاری شد که از این تعداد ۱۵۹ کلنی به‌صورت ماکروسکوپی و میکروسکوپی در سطح جنس شناسایی شد. در پلیت‌های نمونه خاک ۱۳۹ کلنی شماره‌گذاری شد که از این تعداد ۱۱۳ کلنی به‌صورت ماکروسکوپی و میکروسکوپی در سطح جنس شناسایی شد. بیش‌ترین جدایه‌های شناسایی شده از جنس *آسپرژیلوس*، *پنی سلیوم*، *فوزاریوم*، *تریکودرما*، *کلادوسپوروم*، *موکور*، *ریزوپوس*، *اسکوپولاریوپسیس* و غیره بودند. از کلنی‌های شناسایی شده تعداد نوزده کلنی خالص‌سازی شدکه برای آزمایش‌های بعدی از آن‌ها استوک تهیه شد. در پایان خصوصیت‌ها و شکل میکروسکوپی نمونه‌ها مانند شکل ۵ بررسی شد.



شکل ۵. مشاهده میکروسکوپی قارچ‌های ساپروفیت جداسازی شده

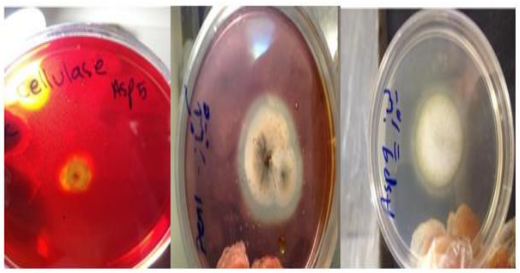
نتایج بررسی تولید کیفی آنزیم‌ها

در مورد آنزیم لیپاز، در صورت وجود آنزیم، چربی (شامل اسیدهای چرب اشباع مانند پالمئیک اسید، میرستیک اسید، استئاریک اسید، پنتادکانوئیک اسید و اسیدهای چرب غیراشباع مانند اولئیک اسید، پالمیتولئیک اسید و لینولئیک اسید است.) موجود در محیط هیدرولیز شد و در صورت تولید اسیدهای چرب آزاد و به‌دنبال آن کاهش، pH همانند شکل 6a اطراف کشت جدایه‌ها نقاط شیری رنگی ایجاد شد. در بررسی آنزیم پکتیناز، پکتین موجود در محیط کشت نیز به‌دلیل حضور آنزیم پکتیناز تجزیه شده و هاله شفافی در اطراف کشت قارچ، همانند شکل 6b، بعد از اضافه کردن معرف یدید پتاسیم به‌وجود آمد. در بررسی آنزیم سلولاز، از کربوکسی متیل سلولز به‌عنوان سوبسترا استفاده شد پس از رشد قارچها و اضافه کردن معرف کنگورد در جدایه‌هایی که

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-01-30]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.1.8]

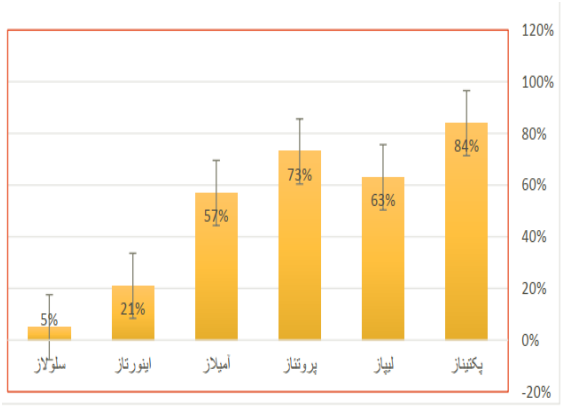
حاوی سلولاز بودند، همانند شکل 6C، هاله شفاف بـه‌وجـود آمد.



شکل۶. مشاهده هاله شیری وشفاف آنزیم‌های لیپاز، پکتیناز و سلولاز اطراف جدایه‌های تولید کننده آنزیم

درصد فراوانی تولید آنزیم‌ها به‌صورت کیفی

بعد از انجام آزمایش تولید آنـزیم بـه‌صـورت کیفـی، درصـد فراوانی آنزیم‌ها در جدایه‌های مورد بررسی قرار گرفت که در شکل ۷ نمودار آن مشاهده می‌شود.



شکل ۷. درصد فراوانی آنزیم‌ها در جدایه‌ها

بررسی تولید کمی آنزیم پکتیناز

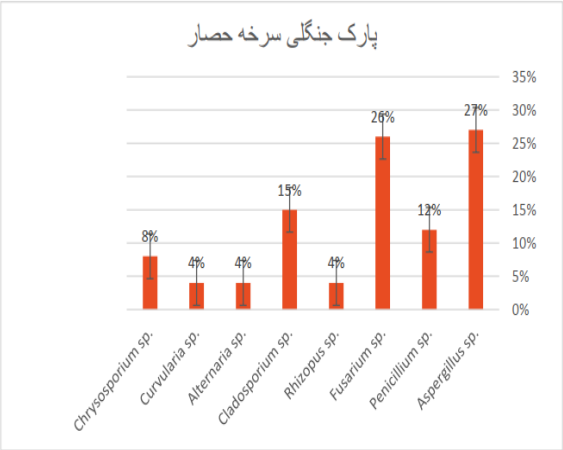
در قارچهایی که در مرحله تولیـد کیفـی، دارای هالـه تولیـد آنزیم بودند، فعالیت کمی تولید آنزیمی توسط تخمیر غوطه-ور بررسی شد. در نهایت بهترین سویه‌های دارای بیش‌تـرین فعالیت آنزیمی انتخاب شدند و برای تعیین مقادیر کمی هـر یک از آنزیم‌ها منحنی استاندارد رسم شـده ومقـادیر جـذب برای قارچهای تولید کننده آنزیم با دسـتگاه اسـپکتروفتومتر خوانـده شـد. بـیش‌تـرین میـزان تولیـد آنـزیم لیپـاز U/ml ۰/۰۲۳۳۰۵۳، آنـــزیم ســـلولاز U/ml ۰/۰۷۷۴۴ و آنـــزیم پکتیناز U/ml ۰/۷۱ بود. پس از بررسی کمی و کیفی تولیـد هر سه آنزیم، مشخص شد که یک گونه پنـی‌سـیلیوم تولیـد کننده بیش‌ترین مقدار آنزیمی است.

انتخاب جدایه تولید کننده هرسه آنزیم

برای انجام بهینه‌سازی در مرحله بعد، از بهترین جنس‌های تولید کننده هر سه آنزیم استفاده شد. ۹ جنس از قارچها تولید آنزیم به‌صورت کیفی وکمی را داشتند اما جنس پنی-سلیوم که از پارک جنگلی سرخه حصار جداسازی شده بود، بیش‌ترین مقدار تولید هر سه آنزیم را داشت. بهترین جنس از پارک جنگلی سرخه حصار جداسازی شد. در شکل ۸ و جدول ۳ میزان توزیع جنس قارچهای جداسازی شده نشان داده شده است.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-01-30]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.1.8]



شکل ۸. میزان توزیع قارچ‌های تولید کننده آنزیم در پارک جنگلی سرخه حصار

جدول ۳. درصد جنس‌های جدا شده از پارک جنگلی سرخه حصار

تشخیص میکروسکوپی	تعداد جنس‌های جدا شده	درصد جنس‌های جدا شده
Aspergillus sp.	۷	۲۷٪
Penicillium sp.	۳	۱۲٪
Fusarium Sp.	۷	۲۶٪
Cladosporium Sp.	۴	۱۵٪
Alternaria Sp.	۱	۴٪
Chrysosporium sp.	۲	۸٪
Curvularia sp.	۱	۴٪
Rhizopus sp.	۱	۴٪

نتایج شناسایی مولکولی سویه برتر تولید کننده آنزیم به‌صورت کیفی وکمی با تکنیک PCR

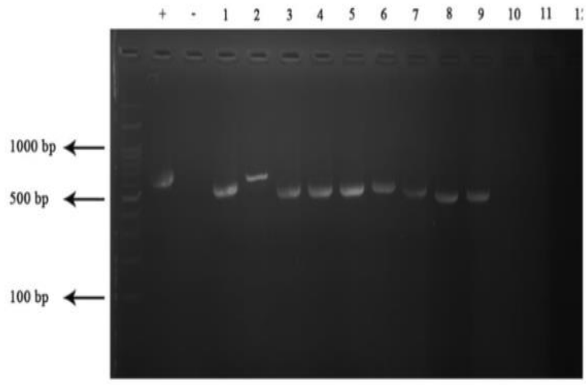
برای شناسایی قارچ‌های تولید کننده بیش‌ترین آنزیم‌ها از تکنیک PCR استفاده شد. نتایج در شکل ۹ نشان داده شده است. برطبق نتایج PCR گونه‌های زیر شناسایی شد:

چاتومیوم استراماریوم (Chaetomium strumarium)، *آسپرژیلوس تمپلیکولا* (Aspergillus templicola) ، *اسکوپولاریوپسیس فلاوا* (Scopolariopsis flava) *پنی‌سلیوم کرایزوژنوم* (Penicillium chrysogenum)، *موکور سیرسینلیودس* (Mucor circinelloide)، *فوزاریوم سوبلاناتوم* (Fusarium sublunatum)، *آسپرژیلوس سابرامانیانی* (Aspergillus subramaniani)، *پنی‌سیلیوم هالوتولرانس* (Penicillium halotolerns) و *پوورسیلیوم لیالسینوم* (Purpurrecillium lilacinum)

با توجه‌به آزمایش‌های قبلی به‌دست آمده در این مطالعه بیش‌ترین میزان تولید هر ۳ آنزیم مربوز توسط جدایه نمک دوست شماره ۲ یا *پنی‌سیلیوم هالوتولرنس* انجام شد. کلنی این قارچ در شکل ۱۰ نشان داده شده است. بهینه‌سازی بر روی این گونه انجام گرفت. به‌دلیل تولید مقدار زیاد آنزیم پکتیناز توسط قارچ بهینه‌سازی فقط برای تولید آنزیم لیپاز و سلولاز انجام شد.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-01-30]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.1.8]

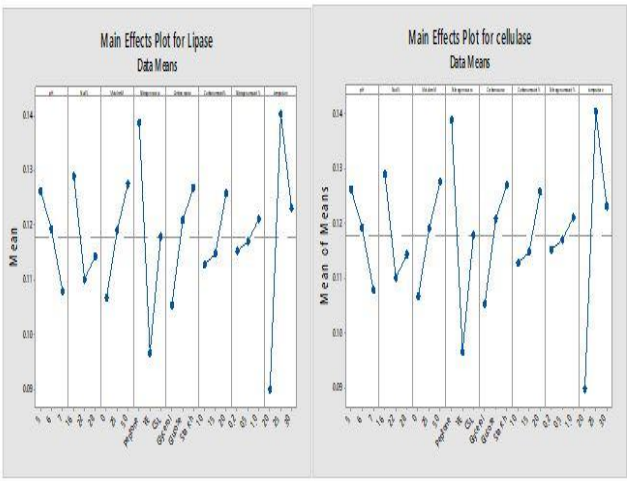


شکل ۹. شناسایی قارچ‌های تولید کننده هر سه آنزیم

شکل ۱۰.کلنی خالص Penicillium halotolerns

نتایج تأثیر پارامترها بر تولید آنزیم‌ها

در بخش بهینه‌سازی تأثیر فاکتورهای مختلف بر روی تولید آنزیم سلولاز ولیپاز قارچ *پنی‌سیلیوم هالوتولرنس* بر حسب آزمایش‌های مختلف برطبق نرم‌افزار تاگوچی بررسی شد که نتایج آنالیز واریانس آن در نمودار شکل ۱۱ بیان شده است.



شکل ۱۱. اثرات اصلی فاکتورهای تولید آنزیم سلولاز و آنزیم لیپاز

همان‌طور که در نمودارهای شکل ۱۱مشاهده می‌شود، مؤثرین سطح در هر فاکتور مشخص شده که شامل pH معادل ۵، محلول NaCl با غلظت ۱۶٪، مقدار ۵۰ میکرولیتر از محلول فلز، پپتون به‌عنوان منبع نیتروژن با مقدار ۱٪، نشاسته به‌عنوان منبع کربن با مقدار ۲۰٪ و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد است.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-01-30]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.1.8]

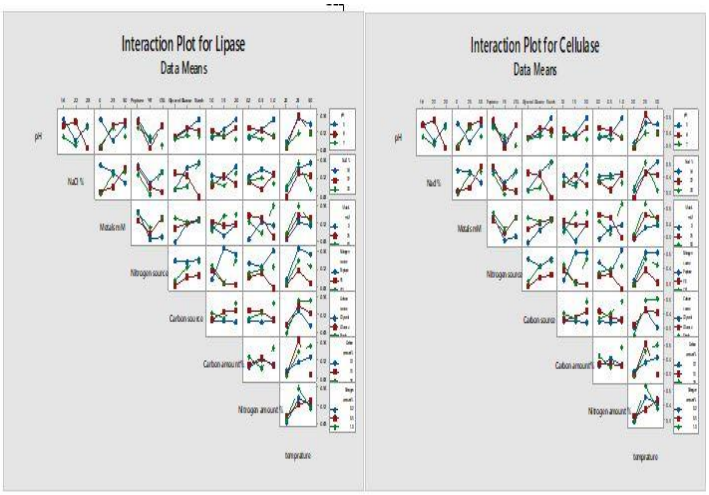
جدول ۴. مقدار بهینه هر فاکتور برای پیش‌بینی بیش‌ترین میزان تولید آنزیم لیپاز وآنزیم سلولاز

دما	مقدار کربن٪	مقدار نیتروژن٪	pH	NaCl٪	محلول فلز (µl)	منبع کربن	منبع نیتروژن	مقدارتولید آنزیم سلولاز U/ml	مقدارتولید آنزیم لیپاز U/ml
۲۵	۲۰	۱	۵	۱۶	۵۰	نشاسته	پپتون	۰/۶۸۱۲۰۰	
۲۵	۱۰	۱	۵	۱۶	۵۰	نشاسته	پپتون		۰/۱۹۸۶۹۴

در جدول ۴ مقدار بهینه هر فاکتور برای پیش‌بینی بیش-ترین مقدار تولید واحد آنزیم سلولاز و لیپاز بر اساس محاسبات نرم‌افزار، با در نظر گرفتن اثر اصلی هر فاکتور بدون در نظر گرفتن میان‌کنش آن‌ها نشان داده شده است.

با توجه‌به نمودارهای شکل ۱۲ و با استفاده از روش آماری تاگوچی بیش‌ترین میزان تولید آنزیم لیپاز و سلولاز توسط توسط *پنی‌سیلیوم هالوتولرنس* ومؤثرترین سطح هر فاکتور پیش‌بینی شده است. در این نمودار اثر میان‌کنش pH و محلول NaCl نشان داده شده است. این نمودار نشان می-دهد که pH معادل ۵ با افزایش غلظت NaCl تا ۲۲٪ باعث افزایش تولید آنزیم سلولاز می‌شود اما افزایش غلظت NaCl به ۲۸٪ منجر به افت شدید تولید آنزیم سلولاز می‌شود که این میان‌کنش برای pH معادل ۶ و ۷ به‌طور کامل بر عکس عمل می‌کند بدین‌صورت که افزایش غلظت NaCl تا ۲۲٪ منجر به کاهش تولید آنزیم و افزایش غلظت NaCl تا ۲۸٪ باعث افزایش تولید آنزیم می‌گردد. اما بیش‌ترین میزان تولید آنزیم سلولاز در میان‌کنش pH معادل ۵ و NaCl با غلظت ۲۲٪ نشان داده شده است. هم‌چنین بیش‌ترین آنزیم لیپاز تولید شده در این نمودار‌در نتیجه میان‌کنش pH معادل ۵ و محلول NaCl با غلظت ۱۶٪ است. غلظت محلول NaCl بر pH معادل ۵ و ۷ به‌طور تقریبی اثری یکسان گذاشته و موجب کاهش و افزایش تولید آنزیم لیپاز در این دو سطح از pH می‌گردد ولی تأثیر غلظت محلول NaCl بر pH برابر ۶ به‌طور کامل بر عکس بوده است.

آنالیز واریانس میانگین فاکتورها در تولید آنزیم سلولاز و لیپاز توسط قارچ *پنی‌سیلیوم هالوتولرنس* به‌ترتیب در جدول ۵ نشان داده است. در این جدول F (میزان اهمیت فاکتور موردنظر) و P (درصد تأثیر هر فاکتور در تولید آنزیم) محاسبه شد. $P < ۰/۰۵$ به معنی مؤثر و معنی‌دار بودن آن فاکتور در تولید آنزیم سلولاز است. مؤثرترین فاکتور در تولید آنزیم سلولاز و لیپاز دما و بعد از آن منبع نیتروژن است. برطبق نتایج آماری هر فاکتوری که تأثیر بیش‌تری در تولید آنزیم داشت، F-value بیش‌تری نیز داشت.



شکل ۱۲. نمودار اثر میان کنش فاکتورهای تولید آنزیم سلولاز و لیپازتوسط قارچ *پنی‌سیلیوم هالوتولرنس*

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-01-30]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.1.8]

جدول ۵. آنالیز واریانس میانگین فاکتورها در تولید آنزیم سلولاز و آنزیم لیپاز

فاکتورها	P-value Cellulas	F-value Cellulas	F-value Lipase	P-value Lipase
pH	۰/۵۶۳	۰/۶۱	۱/۱۱	۰/۳۶۸
NaCl%	۰/۵۴۹	۰/۶۴	۱/۲۹	۰/۳۱۷
محلول فلز	۰/۲۲۷	۱/۷۲	۱/۴۲	۰/۲۸۶
منبع نیتروژن	۰/۰۵۴	۳/۹۶	۵/۸۱	۰/۰۲۱
منبع کربن	۰/۳۲۴	۱/۲۶	۱/۶۲	۰/۲۴۶
مقدار نیتروژن	۰/۸۳۰	۰/۱۹	۸/۶۶	۰/۰۰۷
مقدار کربن	۰/۵۰۹	۰/۷۲	۰/۶۴	۰/۵۴۷
دما	۰/۰۱۸	۶/۲۳	۰/۱۲	۰/۸۹۱

بحث

قارچ‌ها یکی از بزرگ‌ترین سلسله موجودات زنده هتروتروف هستند. امروزه قارچ‌های رشته‌ای منبع اصلی تولید آنزیم-های تجاری ومهم‌ترین بازیافت کنندگان ترکیب‌های آلی در طبیعت هستند. در این پژوهش تلاش برای جداسازی قارچ-های هالوفیل اختیاری از خاک و هوای پارک‌های جنگلی تهران و غربالگری آن‌ها برای تولید بعضی از آنزیم‌های هیدرولیتیک کاربردی در صنعت مانند آمیلاز، لیپاز، سلولاز، پروتئاز، پکتیناز و اینورتاز صورت گرفته است (۲،۱). سلولاز از جمله آنزیم‌های مهم صنعتی است که برای شفاف‌سازی نوشیدنی‌ها کاربرد دارد. لیپاز می‌توانند بر روی انواع مختلفی از سوبستراها، از جمله روغن‌های طبیعی و تری-گلیسیریدهای مصنوعی اثر بگذارد. پکتیناز مهم‌ترین آنزیم-های کاربردی در تولید ترکیب‌های غذایی بالاخص آب‌میوه-های صنعتی در سطح جهان است. هر سه آنزیم فوق در تولید مکمل غذای دام و طیور به وسعت استفاده می‌شوند.

در این پژوهش بیش از ۳۵۰ قارچ از پارک‌های جنگلی تهران شامل پارک جنگلی لویزان، چیتگر، سرخه حصار و غیره جداسازی شد که در حدود ۲۸۰ جدایه شناسایی شد. اکثر این جدایه‌ها متعلق‌به گونه‌های *آسپرژیلوس، پنی-سیلیوم، فوزاریوم، موکور و ریزوپوس* بودند. از این تعداد جدایه‌های شناسایی شده ۱۹ جدایه با انجام تست اولیه تولید آنزیم‌ها به‌صورت کیفی ،برای بررسی تولید آنزیم‌های خارج سلولی در نظرگرفته شد. در ابتدا قارچ‌های جداسازی شده چهت تولید آنزیم به‌صورت کیفی مورد ارزیابی قرار گرفت و اکثر جدایه‌ها آنزیم پکتیناز، لیپاز، پروتئاز و آمیلاز و بعضی سلولاز را ترشح کردند. سپس از بین گونه‌های جداسازی شده تولید کمی آنزیم‌های سلولاز، لیپاز و پکتیناز بررسی شد.

لاری پور و همکاران تعدادی از قارچ‌های ساپروفیت را از خاک و هوای پارک‌های جنگلی تهران جداسازی کردند و تولید آنزیم‌های مختلف این قارچ‌ها را بررسی کردند (۲۶). جهت افزایش تولید آنزیم سلولاز و لیپاز توسط قارچ *پنی-سیلیوم هالوتولرنس* از طراحی آزمایش بهینه‌سازی با استفاده از روش تاگوچی استفاده شد. نتایج به‌دست آمده نشان‌دهنده افزایش تولید آنزیم سلولاز و لیپاز بوده و هم-چنین انتخاب فاکتور دما، منبع نیتروژن به‌عنوان مؤثرترین عامل برای افزایش تولید هر دو آنزیم توسط این قارچ نشان داده شد. آنزیم لیپاز در ابتدا ۰/۰۲۳۳۰۵۳ U/ml و پس از انجام بهینه‌سازی در بهترین شرایط ۰/۱۹۲۱۰۵ U/ml تولید شده و آنزیم سلولاز در ابتدا ۰/۰۷۷۴۴ U/ml و پس از انجام بهینه‌سازی در بهترین شرایط ۰/۶۳۸۷۲ U/ml تولید شده است. مقایسه میزان تولید هر دو آنزیم در شرایط یکسان توسط قارچ *پنی‌سیلیوم هالوتولرنس* نشان می‌دهد که این قارچ در تولید آنزیم سلولاز موفق‌تر بوده است و هم-چنین علاوه‌بر افزایش چشم‌گیر تولید سلولاز پس از بهینه-سازی، تولید سلولاز این قارچ پیش از بهینه‌سازی نیز به-نسبت بیش‌تر از آنزیم لیپاز بوده است. از طرفی این قارچ توانایی تولید آنزیم پکتیناز را در مقدار بسیار بسیار زیاد، ۰/۷۱ U/ml، بدون نیاز به بهینه‌سازی دارد. بنابراین این سویه برای تولید آنزیم‌های صنعتی به‌دلیل بومی بودن و تولید مقادیر زیاد آنزیم در محیط کشت غنی نشده وکارایی بسیار بالای صنعتی بر سویه‌های مشابه مزیت دارد. لاری پور و همکاران از پساب کارخانجات چرم مخمر رودوتروولا

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-01-30]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.1.8]

جداسازی نمودند که به‌شدت تولید کننده آنتی‌اکسیدان است و توانایی تولید آنزیم را دارد (۱۹).

مهم‌ترین و مؤثرترین فاکتور در تولید هر دو آنزیم دما، اسیدیته و منبع نیتروژن بیان شده است. از طرفی این قارچ تولید کننده قوی آنزیم پکتیناز است و تولید آنزیم پکتیناز بدون شرایط بهینه‌سازی توسط سویه *پنی‌سیلیوم هالوتولرنس* در ۵۴۰ nm، ۰/۷۱ U/ml محاسبه شد، که مقادیر بالایی از تولید آنزیم نسبت‌به سویه استاندارد است. سویه مطرح شده در این تحقیق سویه *پنی‌سیلیوم هالوتولرنس* به‌طور مشخص از پارک جنگلی سرخه حصار جداسازی شده است و با توجه رشد مناسب این قارچ در محیط نمکی، به‌عنوان یک قارچ نمک دوست اختیاری جهت تولید آنزیم‌های صنعتی نسبت‌به قارچ‌های رشته‌ایی دیگر مزیت دارد (۲۶).

Chamekh و همکاران در سال ۲۰۱۹ بر روی یک تالاب آب شور تحقیق کردند. در این پژوهش تعدادی قارچ نمک دوست از این تالاب جداسازی شد و نتایج این تحقیق با این پژوهش شباهت دارد اما گونه *پنی‌سیلیوم هالوتولرنس* جداشده در تحقیق ما در مطالعه‌های قبلی محققان شناسایی نشده است. با نگاهی به مقاله فوق مشخص می‌شود که این محققان از تالاب نمکی گونه‌ها را جداسازی کرده‌اند که امکان حضور و جداسازی این گونه‌ها پیش‌بینی می‌شد. از طرفی این‌که آیا این گونه‌ها می‌توانند در شرایط اسیدی و شرایط معمولی هم زندگی کنند هرگز در مقاله مورد پژوهش قرار نگرفته است (۱).

در این پژوهش ابتدا گونه *پنی‌سیلیوم هالوتولرنس* برای اولین بار در سطح جهان از محیط غیرنمکی جداسازی شده است. هم‌چنین این جداسازی از خاک پارک جنگلی انجام شده است، که شرایط بسیارمعمولی زیست برای میکروارگانیسم‌ها را دارد و بعد از بررسی مولکولی این سویه بومی شناسایی شده است. پس از بررسی این گونه در آزمایشگاه در محیط کشت معمولی پتیتودکستروزآگار در قیاس با محیط کشت نمکی رشد مناسبی داشته و تولید کننده قوی آنزیم لیپاز و سلولاز بوده است که این امر از مزایای ارزشمند این قارچ است و در این تحقیق برای اولین بار بیان شده است. لاری پور و همکاران بر روی گونه‌های *پنی‌سلیوم وآسپرژیلوس* نایجر بومی کار کردند و اثبات کردند که این گونه‌ها می‌توانند با ترشح انواع آنزیم‌ها لیتیوم را از قطعه‌های کامپیوتری جداسازی نمایند (۹).

Richa و همکاران در سال ۲۰۱۷ در تحقیقی *پنی‌سیلیوم هالوتولرنس* را از مناطق سرد جداسازی کرد واز این قارچ به‌عنوان یک قارچ سرما دوست و تولید کننده لینولئیک اسید یاد کرد. میکروب‌های جدا شده از نمونه خاک Dras، ارتفاع زیاد (حدود ۱۶۰۰۰ فوت) و دمای زیر صفر منطقه در تپه‌های شیوالیک در شمال غربی هیمالیا، هند جدا شده است. نتایج این تحقیق سازگاری این قارچ را برای تولید آنزیم لیپاز برای تجزیه چربی‌ها در دمای پایین نشان می‌دهد. طبق بررسی‌های این تحقیق هم سازگاری قارچ و تولید لیپاز نشان داده شده است که از این جهت نتایج هر دو تحقیق با هم شباهت دارد (۱۳).

در تحقیقات مختلف بسیاری از میکروارگانیسم‌ها جهت تولید آنزیم معرفی شده‌اند، اما گونه معرفی شده در این تحقیق *پنی‌سیلیوم هالوتولرنس* که برای اولین بار از پارک جنگلی در ایران جداشده و برای اولین بار تولید و بهینه‌سازی تولید آنزیم در سطح دنیا بر روی آن انجام شده است، یک گونه نمک‌دوست اختیاری است که می‌تواند در غلظت‌های بالای نمک و در pH قلیایی در شرایط تولید آنزیم پایداری خود را حفظ نماید و حتی میزان آنزیم بیش‌تری تولید نماید. نتایج آزمایشگاهی نشان می‌دهد این قارچ با شرایط فرمانتور بسیار سازگاری دارد و مکانیسم‌های سازگاری این قارچ با محیط‌های نمکی به پایداری قارچ کمک شایانی می‌نماید. این قارچ نمک دوست اختیاری، به‌دلیل نمک‌دوست بودن مقاومت زیادی در شرایط صنعتی در تانک تخمیر جهت تولید آنزیم دارد و به سبب نمک‌دوست بودن، رنج حرارتی و اسیدیته زیادی را تحمل کرده و پایدار می‌ماند که مهم‌ترین خصوصیت یک قارچ صنعتی است. از طرفی قارچی نمک‌دوست به‌طور عمده از محیط‌هایی با غلظت بالای ۲۰ درصد نمک جداسازی می‌شوند ولی در این تحقیق جداسازی این قارچ از خاک پارک‌های جنگلی سطح تهران انجام شد که موفقیت بزرگی محسوب می‌شود.

نتیجه‌گیری

بومی بودن، در دسترس بودن، سهولت کشت، سازگاری با شرایط آب و هوایی ایران، سازگاری با شرایط هایپر تولید آنزیم در تانک تخمیر (تحمل نمک، دمای پایین و...) و پایداری آنزیم، تولید مقادیر زیاد آنزیم از مزایای انجام این

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-01-30]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.1.8]

طرح است. توان کشت مناسب قارچ *پنی‌سیلیوم هالوتولرنس* در محیط کشت معمولی پتیتودکستروزبراث و لیوفلیزه کردن قارچ به‌منظور نگهداری طولانی مدت قارچ به‌عنوان یک منبع مهم تولید کننده آنزیم، تولید آنزیم سلولاز بر روی سوبستراهای بلا استفاده مانند ضایعات لیگنوسلولوزی، تولید آنزیم پکتیناز بر روی ضایعات پوست میوه شامل پوست مرکبات دریافتی از کارخانجات مواد غذایی و تولید آنزیم لیپاز بر روی سوبستراهای تفاله‌های روغنی کارخانجات روغن‌کشی شده مثل تفاله روغن زیتون می‌توانند بسیار ارزان تمام شود که از مزایای دیگر این طرح است. آنزیم پکتیناز و سلولاز در صنایع غذایی و آنزیم لیپاز در تولید شوینده‌ها، داروها ومواد آرایشی کاربرد دارد. در نتیجه شناسایی منابع بومی قارچها و بهینه‌سازی تولید آن‌ها کمک شایانی به اقتصاد و خودکفایی کشور دارد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله مراتب قدرانی خود را از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال اعلام می‌دارند.

میزان مشارکت و همکاری

دکتر محدثه لاری پور ایده و پروتکل اصلی، آنالیز داده‌ها و مطالعه مفهوم و طراحی و نگارش مقاله و بازنگری مقاله را ارائه داد و خانم ریحانه جوانشیرکارهای آزمایشگاهی را انجام داد و دکتر مهرداد آذین در پیشبرد نرم‌افزار تاگوچی کمک کرد.

تضاد منافع

هیچ گونه تضاد منافعی در این تحقیق وجود ندارد.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-01-30]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.1.8]

منابع

1. activity of halotolerant and halophilic fungi from the Great Sebkha of Oran in Northwestern of Algeria. Mycobiology. 2019 Apr 3;47(2):230-41.

2. Souza PM, Magalhães PD. Application of microbial α-amylase in industry-A review. Brazilian journal of microbiology. 2010; 41:850-61.

3. Mishra BK, Dadhich SK. Production of amylase and xylanase enzymes from soil fungi of Rajasthan. J. Adv. Dev. Res. 2010;1(1):21-3.

4. Mishra RK, Verma DK, Pandey BK, Pathak N, Zeeshan M. Direct Colony Nested-PCR for the Detection of Fusarium oxysporum f. sp. 2014:2.

5. Mueller GM, Schmit JP. Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? Biodiversity and conservation. 2007 Jan;16(1):1-5.

6. Mukunda S, Onkarappa R, Prashith KT. Isolation and screening of industrially important fungi from the soils of western ghats of Agumbe and Koppa, Karnataka, India. Science, Technology and Arts Research Journal. 2012;1(4):27-32.

7. Oyeleke SB, Oduwole AA. Production of amylase by bacteria isolated from a cassava waste dumpsite in Minna, Niger State, Nigeria. African Journal of Microbiology Research. 2009 Apr 1;3(4):14 .

8. Rajan A, Kumar DS, Nair AJ. Isolation of a novel alkaline lipase producing fungus Aspergillus fumigatus MTCC 9657 from aged and crude rice bran oil and quantification by HPTLC. International journal of biological chemistry. 2011;5(2):116-26.

9. Kazemian Z, Larypoor M, Marandi R. Evaluation of myco-leaching potential of valuable metals from spent lithium battery by Penicillium chrysogenum and Aspergillus niger. International Journal of Environmental Analytical Chemistry. 2020 Dec 25:1-4.

10. Vega K, Villena GK, Sarmiento VH, Ludena Y, Vera N, Gutiérrez-Correa M. Production of alkaline cellulase by fungi isolated from an undisturbed rain forest of Peru. Biotechnology Research International. 2012;2012.

11. Kuhad RC, Gupta R, Khasa YP, Singh A. Bioethanol production from Lantana camara (red sage): pretreatment, saccharification and fermentation. Bioresource technology. 2010 Nov 1;101(21):8348-54.

12. Mesa L, Salvador CA, Herrera M, Carrazana DI, González E. Cellulases by Penicillium sp. in different culture conditions. Bioethanol. 2016 Jan 29;2(1).

13. Sharma R, Yusuf F, Chaubey a. Penicillium halotolerans ACR-D24: a Psychrotroph with Potential for PUFA Production. International Journal of Engineering Technology Science and Research. 2017;4(11): 1119-11130.

14. Binod P, Palkhiwala P, Gaikaiwari R, Nampoothiri KM, Duggal A, Dey K, Pandey A. Industrial enzymes-present status and future perspectives for India.

15. Gudynaite-Savitch L, White TC. Fungal biotechnology for industrial enzyme production: focus on (Hemi) cellulase production strategies, advances and challenges. InGene expression systems in fungi: advancements and applications 2016 (pp. 395-439). Springer, Cham.

16. Cunha AG, Fernández-Lorente G, Gutarra ML, Bevilaqua JV, Almeida RV, Paiva LM, Fernández-Lafuente R, Guisán JM, Freire DM. Separation and immobilization of lipase from Penicillium simplicissimum by selective adsorption on hydrophobic supports. Applied biochemistry and biotechnology. 2009 May;156(1):133-45.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-01-30]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.1.8]

17. Borkar PS, Bodade RG, Rao SR, Khobragade CN. Purification and characterization of extracellular lipase from a new strain: Pseudomonas aeruginosa SRT 9. Brazilian Journal of Microbiology. 2009; 40:358-66.
18. Kapoor M, Gupta MN. Lipase promiscuity and its biochemical applications. Process Biochemistry. 2012 Apr 1;47(4):555-69.
19. Beiranvand S, Larypoor M, Norozi J. Optimization of beta-carotene production of Rhodotorula mucilaginosa isolated from the waste leather factory. Journal of Microbial World. 2019 May 22;12(1):39-52.
20. Fariq, A. 2016. Microbial cellulase: production and applications, Journal of biotechnology sceince research (JBSR), 3: 122-127.

21. Beckham GT, Bomble YJ, Bayer EA, Himmel ME, Crowley MF. Applications of computational science for understanding enzymatic deconstruction of cellulose. Current opinion in biotechnology. 2011 Apr 1;22(2):231-8.

22. Liu D, Chen X, Yue Y, Chen M, Wu Q. Structure and rheology of nanocrystalline cellulose. Carbohydrate polymers. 2011 Feb 11;84(1):316-22.

23. Goukanapalle PK, Kanderi DK, Rajoji G, Shanthi Kumari BS, Bontha RR. Optimization of cellulase production by a novel endophytic fungus Pestalotiopsis microspora TKBRR isolated from Thalakona forest. Cellulose. 2020 Jul; 27:6299-316.

24. Li N, Zong MH. Lipases from the genus Penicillium: production, purification, characterization and applications. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 2010 Sep 1;66(1-2):43-54.

25. Gostincar, G, Lenansi, M, Gunde-cimerman, N, Plemenitas, A. Fungal adaption to extremely high salt concentrations, Advances in applied microbiology, 2011;77: 71-96.

26. Larypoor M, Kargarfaragheh E, Movahedi M. Evaluation of the enzymatic activity of halotolerant fungi isolated from Tehran's forest parks. Progress in Biological Sciences. 2020 Jun 26.

27. Banakar SP, Thippeswamy B, Naveenkumar KJ, Thirumalesh BV. Isolation and Partial Purification of Fungal Cellulases from Forest Soils of Bhadra Wildlife Sanctuary, Western Ghats of Southern India. International Journal of Current Research. 2012; 4:076-82.

28. Dheeman DS, Antony-Babu S, Frías JM, Henehan GT. Purification and characterization of an extracellular lipase from a novel strain Penicillium sp. DS-39 (DSM 23773). Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 2011 Nov 1;72(3-4):256-62.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-01-30]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.1.8]

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-01-30]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.1.8]