



Scan online to view this article

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

Reyhaneh Javanshir<sup>1</sup>, Mehrdad Azin<sup>2</sup>, Mohaddeseh Larypoor<sup>\*1</sup>

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.

### Corresponding author:

Department of Biotechnology, Faculty of Biological Science, Tehran North Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Email: m.larypoor@iaiu-tnb.ac.ir



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<sup>۱\*</sup>، ریحانه جوانشیر<sup>۱</sup>، مهرداد آذین<sup>۲</sup>

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 و کاربردی در صنایع مختلف هستند. معرفی یک سویه نمک دوست اختیاری مولد آنزیم سلولاز و لیپاز و پکتیناز و بهینه‌سازی تولید آنزیم با استفاده از روش 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 بیش‌ترین 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 جدا شده، *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، به مقدار 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، به دلیل 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،

### نویسنده مسئول:

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

پست الکترونیکی: m.larypoor@iau-tnb.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۰۴

میکروارگانسیم‌ها هستند. از بین میکروارگانسیم‌ها باکتری-ها و قارچ‌ها بسیار اهمیت دارند. قارچ‌ها به دلیل ساختمان رشته‌ای 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 مقرون به صرفه و ارزان باشد (۱-۳). قارچ‌های موجود در هوا و خاک به دلیل بومی بودن همیشه در دسترس هستند و چنانچه سویه بومی خصوصیت‌های خود را در تانک تخمیر جهت تولید آنزیم بعد از مدتی از دست بدهد، دوباره

لحظه اراده شود می توان از آن منبع خاص، سویه را دوباره جداسازی نمود و یا در بانک های میکروبی داخلی از آن به- نحو احسن نگه داری کرد و به عنوان یک سویه صنعتی به بانک های میکروبی سپرده شود. بنابراین نیاز هر جامعه ای به وجود سویه های تولید کننده آنزیم که در شرایط تولید صنعتی آنزیم پایدار باشد آشکار است. بنابراین ضرورت شناسایی سویه های بومی، در دسترس، ارزان قیمت تولید کننده آنزیم های مهم صنعتی مانند آنزیم سلولاز، لیپاز و پکتیناز به شدت احساس می شود (۱۳-۱۰). در این پژوهش از هوا و خاک پارک های جنگلی تهران نمونه برداری شد. سپس تولید آنزیم های صنعتی پکتیناز، لیپاز و سلولاز به- صورت کمی و کیفی در یک سویه شناسایی شده و میزان تولید آنزیم پکتیناز بررسی شد و در نهایت تولید آنزیم های لیپاز و سلولاز تحت برنامه تاگوچی بهینه سازی شد.

## مواد و روش ها

### نمونه برداری

از بین پارک های جنگلی تهران هفت پارک انتخاب شد (پارک های جنگلی چیتگر، خجیر، پردیسان، لویزان، یاس فاطمی، سرخه حصار و سوهانک) و نمونه برداری از هوا و خاک این پارک ها صورت گرفت. برای نمونه برداری از خاک بدین صورت عمل شد که ابتدا سطح خاک را کنار زده، سپس با قاشق استریل از عمق ۵ تا ۱۰ سانتی متر خاک برداشت شد. این نمونه برداری از نقاط مختلف پارک انجام شد. نمونه برداری از هوا نیز با روش غیرفعال یا رسوب گذاری بر روی پلیت ها انجام شد (۹، ۱۹).

### غربالگری و جداسازی و خالص سازی قارچ های هالوفیل

#### اختیاری

در این مرحله پلیت های حاوی نمونه های هوا را در انکوباتور در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت یک تا دو هفته برای رشد ساپروفیت های شفاف و ۲ تا ۴ هفته برای رشد ساپروفیت های رنگی قرار داده شد و کلنی ها با پاساژ مجدد خالص سازی شد. در مرحله بعدی برای کشت خاک ابتدا رقت های سریال از خاک تهیه شد و سپس به دو صورت خاک ها کشت داده شد. اضافه کردن یک میلی لیتر محلول رقیق شده به محیط های کشت ۴٪ SDA، ۳٪ SDA و SDA CMA و پخش نمودن نمونه در سطح پلیت توسط سوآپ استریل (۲۶، ۲۵).

قابل جداسازی از منبع طبیعی و بومی خود به طور مثال پارک جنگلی، است. امروزه برای خودکفایی کشور در امر تولید آنزیم های صنعتی جداسازی سویه های بومی با کارایی بالا و توان تولید واحدهای آنزیمی بالا، اهمیت زیادی دارد. از طرفی آنزیم های میکروبی که توسط قارچ ها تولید می شود در صنایع مختلف از جمله صنایع غذایی شوینده ها، آرایشی- بهداشتی، دارویی و غیره کاربرد فراوان دارد. هم چنین مهم- ترین کاربرد آنزیم های تولید شده توسط قارچ ها، 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 ترکیب های بسیار مهم را از منابع غذایی بیش تر دریافت کرده و رشد بهتری دارند و در نتیجه محصول های آن ها هم با کیفیت بهتری به دست افراد جامعه می رسد (۶-۴). عمده ترین مشکل تولید آنزیم در شرایط فرمانتور پایداری قارچ در تولید مقدار قابل توجهی از واحد آنزیمی است. علی رغم این که بسیاری از باکتری ها و قارچ ها، تولید کننده انواع و مقادیر زیادی از آنزیم ها هستند، اما با تغییر شرایط داخل فرمانتور از جمله تغییر اسیدیته، دما، میزان اکسیژن، دور همزن و غیره خواص تولید آنزیم خود را به دلیل عدم پایداری از دست می دهند. بنابراین برای تولید مقادیر بهینه آنزیم های صنعتی میکروارگانیسم های سازگار با شرایط دما اسیدیته فرمانتور مورد نیاز هستند و قارچ های نمک دوست اختیاری که به صورت بومی از محیط جدا شوند، می توانند شرایط سخت را تحمل کنند. این قارچ ها در محدوده دمایی زیاد، محدودی اسیدیته زیاد و شرایط تانک تخمیر تحمل بالایی دارند. به دلیل مکانیسم های مقاومت این قارچ ها در برابر افزایش نمک محیط، فعال شدن پمپ سدیم پتاسیم و هم چنین تولید مایکوسپورین هایی مانند مانیتول و آرابینیتول که در سیتوپلاسم این قارچ ها تولید می شود و اتصال مولکول های آب به این مولکول ها، این موجودات در شرایط پر نمکی آب از دست نداده و می توانند در محیط پایدار بمانند. بنابراین برای شرایط تولید آنزیم می توانند گزینه بسیار مناسبی باشند سویه های صنعتی خریداری شده از کشورهای دیگر، هم قیمت بسیار بالایی را به کارخانه و کشور تحمیل می نماید و بعد از مدت زمانی خاص این سویه ها به طور معمول کارایی خود را از دست داده و کارخانه مجبور به خرید مجدد سویه از مراکز دیگر کشورها با قیمت بالا می شود. علت از کار افتادن سویه غیربومی، می تواند عدم سازگاری سویه با شرایط آب و هوایی باشد (۹-۷). اگر منبع سویه داخلی و بومی باشد علاوه بر ارزان بودن سویه، هر

### پور پلیت کردن نمونه‌ها

سانتریفیوژ تغلیظ نموده تا تعداد اسپورها به حد استاندارد نزدیک شود. بر حسب فرمول  $5 \times 10^4 \times (R_1+R_2+R_3+R_4+R_5)$  تعداد اسپور در هر میلی‌لیتر از سوسپانسیون محاسبه گردید. سوسپانسیون اسپور استاندارد برای *آسپرژیلوس* (*Aspergillus sp.*)  $1 \times 10^6$  تا  $5 \times 10^6$  و برای *موکور* (*Mucor sp.*) ( $1 \times 10^5$  تا  $5 \times 10^5$ ) و برای *ریزوپوس* (*Rhizopus sp.*)  $9 \times 10^5$  تا  $4 \times 10^5$  در نظر گرفته شد (۹).

### بررسی کیفی تولید آنزیم‌ها

در تمامی آزمایش‌ها ابتدا جدایه‌های قارچ‌ها بر روی محیط SDA به صورت سوسپانسیون استاندارد، کشت تازه تهیه شد (به‌عنوان محیط پیش کشت) و سپس بر روی محیط‌های جامد واجد سوبسترای آنزیمی به صورت 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 به مدت دو تا پنج روز در دمای  $30^\circ\text{C} - 25^\circ\text{C}$  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 سلولز کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت سه تا پنج روز در دمای  $30^\circ\text{C}$  - ۲۵ گرماگذاری شد پس از این مدت به هر پلیت محلول کنگو رد ۲٪ و بعد از آن برای لکه‌زدایی از  $\text{NaOH}$  ۱ مولار به مدت ۱۵ دقیقه اضافه شد. در اطراف جدایه‌های تولید کننده سلولاز، مناطق شفاف تشکیل می‌شود (۱۸-۱۶).

برای بررسی کیفی تولید آنزیم پکتیناز از کشت تازه قارچ بر روی محیط واجد سوبسترای پکتین کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت سه تا پنج روز در دمای  $30^\circ\text{C}$  گرماگذاری شد پس از این مدت به هر پلیت محلول پتاسیم یدید اضافه شد. در اطراف جدایه‌های تولید کننده پکتیناز، مناطق شفاف تشکیل می‌شود. ترکیب محیط برای بررسی وجود آنزیم پکتیناز عبارتند از: (۲۰، ۲۱)

### بررسی کمی تولید آنزیم‌ها

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 ۵ ml محلول رینگر به علاوه ۱ ml نمونه خاک رقیق شده و ۱۵ ml محیط کشت SDA ریخته شده و بلافاصله با چرخش & شکل محتویات داخل پلیت را مخلوط کرده و پلیت به انکوباتور منتقل می‌شود.

### شناسایی ماکروسکوپی و میکروسکوپی کلنی

**بررسی ماکروسکوپی:** 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 (۱۴، ۱۵).

**بررسی میکروسکوپی:** ابتدا نمونه‌برداری از کلنی‌ها صورت گرفت بدین ترتیب که روی یک لام تمیز قطره‌ای از محلول لاکتو فنل کاتن بلو ریخته شد و سپس با استفاده از سوزن سرکچ پلاتینی مقدار کمی از کلنی مورد نظر برداشته و روی آن قرار داده و با رنگ به‌طور کامل مخلوط گردید سپس یک لام 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  $\times 40$  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

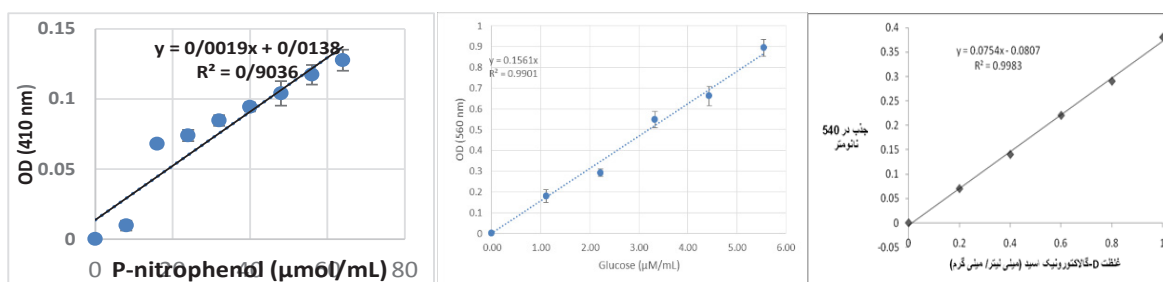
مقدار آنزیمی تولیدی برحسب (U/ml) با استفاده از فرمول زیر به دست می‌آید (۲۴).

$$U = \frac{2 \times \text{میکرومول گلوکز}}{\text{دقیقه ml}}$$

برای تعیین فعالیت آنزیم سلولاز از محلول کربوکسی متیل سلولز استفاده می‌شود. از معرف دی نیترو سالیسیلیک 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 ۲۲ 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.

$$U = \frac{2 \times \text{میکرومول پارا نیتروفنل}}{\text{دقیقه ml}}$$



شکل ۱. منحنی استاندارد گالاکتورونیک اسید، گلوکز و پارانیتروفنل

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

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 ۱۰<sup>۶</sup> 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).

$$U = \frac{\text{گالاکتورونیک اسید (میلی گرم)}}{\text{وزن مولکولی گالاکتورونیک اسید} \times \text{زمان (دقیقه)}} \times \text{مقدار آنزیم}$$

$$\text{ml (میلی لیتر)}$$

برای تعیین فعالیت آنزیم سلولاز معرف دی نیتروسالیسیلیک اسید استفاده شد و سپس منحنی استاندارد گلوکز رسم شد. در نمودار شکل 2b منحنی استاندارد گلوکز رسم شده است.

شناسایی مولکولی سویه برتر تولید کننده آنزیم به- صورت کیفی و کمی با تکنیک PCR

می‌کند. مقادیر این تأثیر متقابل بر اساس شاخص دقت توسط برنامه نرم‌افزاری محاسبه و اندازه‌گیری می‌شود. 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 و 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 و خاک 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 نمونه‌ای 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.

نسبی داخلی نوکلئوتیدی نسبی (ITS) بودند. (Amutha and Godavari, 2014)  
پرایمر فوروارد (ITS1)  
(5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3')  
پرایمر معکوس (ITS4)

(5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3').  
در واکنش فوق از شرایط زیر استفاده شده است: ۲ دقیقه در  $96^{\circ}\text{C}$  برای دناتوراسیون، ۳۵-۲۵ سیکل هر یک از ۶۰ ثانیه در  $96^{\circ}\text{C}$  برای دناتوراسیون، ۱ دقیقه در  $55^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد برای بازپخت، ۲ دقیقه در  $72^{\circ}\text{C}$  برای گسترش به دنبال آن پسوند نهایی در  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۰ دقیقه. (تمام مواد شیمیایی مولکولی از سیگما آلد ریچ خریداری شده است). (Amutha and Godavari, 2014).  
محصولات PCR با استفاده از مینی ستون‌ها ( PCR Preps پروتکل ویلند خالص شدند. واکنش با استفاده از یک ترموسایکلر T-۱۰۰ انجام شد. (Weiland, J. J. 2002).

#### بانک قارچی پنی سیلیوم هالوتولنس

پنی سیلیوم هالوتولنس جدا شده از تحقیق لاری پور و همکاران، در شرایط کامل استریل در دو محیط پتیتو دکستروز آگار و ساپرو دکستروز آگار به همراه آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین در کنار شعله و به روش نقطه‌ای کشت داده شد و به مدت ۷ روز در دمای  $30^{\circ}\text{C}$  انکوبه شد (۲۶).

#### بهینه‌سازی تولید آنزیم سلولاز و لیپاز

برای طراحی آزمایش به روش تاگوچی از نرم‌افزار Minitab 17 استفاده شد. این نرم‌افزار می‌تواند آرایه‌های متعامد  $L_4$  تا  $L_{16}$  را به همراه 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

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

سطح ۳	سطح ۲	سطح ۱	عامل
۷	۶	۵	pH
$30^{\circ}\text{C}$	$25^{\circ}\text{C}$	$20^{\circ}\text{C}$	دما
٪۲۸	٪۲۲	٪۱۶	NaCl%
CSL	عصاره مخمر	پپتون	منبع نیتروژن
گلوکز	نشاسته هیدرولیز شده	گلیسرول	منبع کربن
۵۰ $\mu\text{l}$	۲۵ $\mu\text{l}$	۰ $\mu\text{l}$	محلول فلز*
۱	۰/۵	۰/۲	مقدار نیتروژن/٪
۲۰	۱۵	۱۰	مقدار کربن/٪

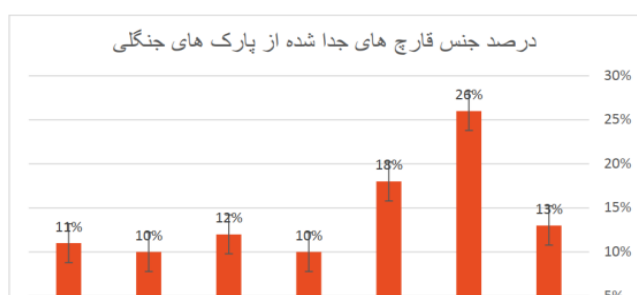
\*محلول فلز: منگنز کلرید و منیزیم کلرید ۰/۱ مولار

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



## 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.

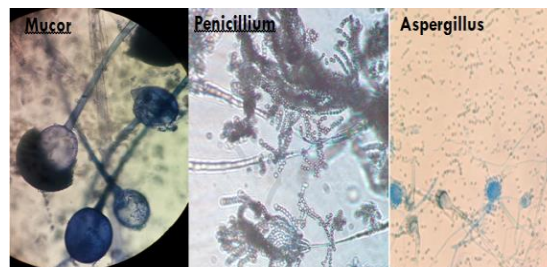


شکل ۴. پلیت کلنی‌های خالص‌سازی شده

## 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 از کلنی 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 سلیموم*، *فوزاریوم*، *تریکودرما*، *کلادوسپوروم*، *موکسور*، *ریزوپوس*، *اسکوپولاریوپسیس* و غیره بودند. از کلنی‌های شناسایی شده تعداد نوزده کلنی خالص‌سازی شده که برای آزمایش‌های بعدی از آن‌ها استوک تهیه شد. در پایان خصوصیت‌ها و شکل میکروسکوپی نمونه‌ها مانند شکل ۵ بررسی شد.



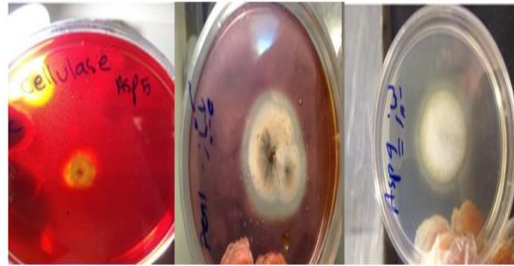
شکل ۵. مشاهده میکروسکوپی قارچ‌های ساپروفیت جداسازی شده

## 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

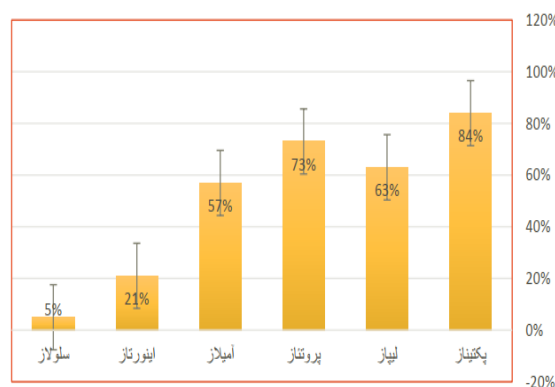
حاوی سلولاز بودند، همانند شکل 6C، هاله شفاف به وجود آمد.



شکل 6. مشاهده هاله شیری و شفاف آنزیم‌های لیپاز، پکتیناز و سلولاز اطراف جدایه‌های تولید کننده آنزیم

### درصد فراوانی تولید آنزیم‌ها به صورت کیفی

بعد از انجام آزمایش تولید آنزیم به صورت کیفی، درصد فراوانی آنزیم‌ها در جدایه‌های مورد بررسی قرار گرفت که در شکل 7 نمودار آن مشاهده می‌شود.



شکل 7. درصد فراوانی آنزیم‌ها در جدایه‌ها

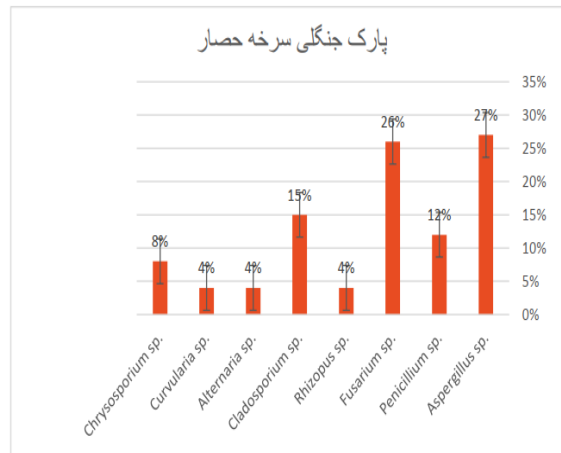
هر سه آنزیم، مشخص شد که یک گونه پنی‌سیلیوم تولید کننده بیش‌ترین مقدار آنزیمی است.

### انتخاب جدایه تولید کننده هر سه آنزیم

برای انجام بهینه‌سازی در مرحله بعد، از بهترین جنس‌های تولید کننده هر سه آنزیم استفاده شد. ۹ جنس از قارچ‌ها تولید آنزیم به صورت کیفی و کمی را داشتند اما جنس پنی-سلیموم 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.

### بررسی تولید کمی آنزیم پکتیناز

در قارچ‌هایی که در مرحله تولید کیفی، دارای هاله تولید آنزیم بودند، فعالیت کمی تولید آنزیمی توسط تخمیر غوطه-ور بررسی شد. در نهایت بهترین سویه‌های دارای بیش‌ترین فعالیت آنزیمی انتخاب شدند و برای تعیین مقادیر کمی هر یک از آنزیم‌ها منحنی استاندارد رسم شده و مقادیر جذب برای قارچ‌های تولید کننده آنزیم با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. بیش‌ترین میزان تولید آنزیم لیپاز U/ml ۰/۲۳۳۰۵۳، آنزیم سلولاز U/ml ۰/۰۷۷۴۴ و آنزیم پکتیناز U/ml ۰/۷۱ بود. پس از بررسی کمی و کیفی تولید



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

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

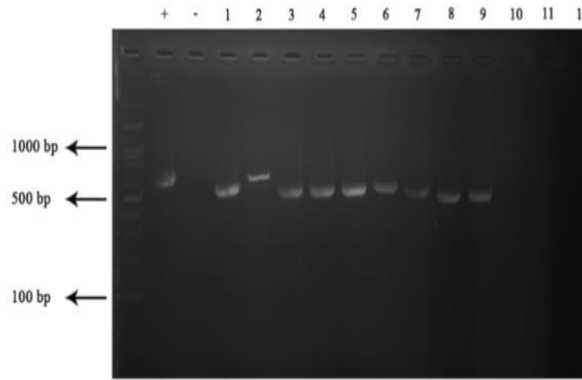
تشخیص میکروسکوپی	تعداد جنس‌های جدا شده	درصد جنس‌های جدا شده
Aspergillus sp.	۷	۲۷٪
Penicillium sp.	۳	۱۲٪
Fusarium Sp.	۷	۲۶٪
Cladosporium Sp.	۴	۱۵٪
Alternaria Sp.	۱	۴٪
Chrysosporium sp.	۲	۸٪
Curvularia sp.	۱	۴٪
Rhizopus sp.	۱	۴٪

سابرمانیانی (*Aspergillus subramaniani*)، پنی‌سیلیوم هالوتولرانس (*Penicillium halotolerans*) و پوروسیلیوم لیلالسینوم (*Purpureocillium lilacinum*)

با توجه به آزمایش‌های قبلی به دست آمده در این مطالعه بیشترین میزان تولید هر ۳ آنزیم مربوط توسط جدایه نمک دوست شماره ۲ یا پنی‌سیلیوم هالوتولرانس انجام شد. کلنی این قارچ در شکل ۱۰ نشان داده شده است. بهینه‌سازی بر روی این گونه انجام گرفت. به دلیل تولید مقدار زیاد آنزیم پکتیناز توسط قارچ بهینه‌سازی فقط برای تولید آنزیم لیپاز و سلولاز انجام شد.

نتایج شناسایی مولکولی سوبه برتر تولید کننده آنزیم به صورت کیفی و کمی 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 (*Scopulariopsis flava*)، پنی‌سیلیوم کرایزژنوم (*Penicillium chrysogenum*)، موکور سیرسینلیودس (*Mucor circinelloide*)، فوزاریوم سولاناتوم (*Fusarium sublunatum*)، آسپرژیلوس



شکل ۹. شناسایی قارچ‌های تولید کننده هر سه آنزیم

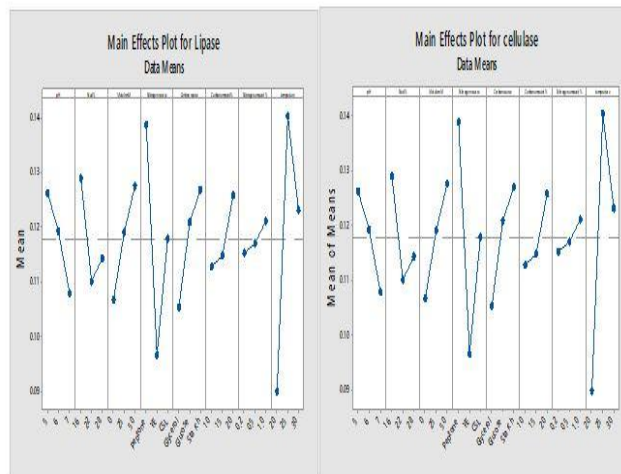


شکل ۱۰. کلنی خالص *Penicillium halotolerans*

آزمایش‌های مختلف بر طبق نرم‌افزار تاگوچی بررسی شد که نتایج آنالیز واریانس آن در نمودار شکل ۱۱ بیان شده است.

### نتایج تأثیر پارامترها بر تولید آنزیم‌ها

در بخش بهینه‌سازی تأثیر فاکتورهای مختلف بر روی تولید آنزیم سلولاز و لیپاز قارچ *پنی‌سیلیوم هالوتولرنس* بر حسب



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

از محلول فلز، پیتون به‌عنوان منبع نیتروژن با مقدار ۱٪، نشاسته به‌عنوان منبع کربن با مقدار ۲۰٪ و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد است.

همان‌طور که در نمودارهای شکل ۱۱ مشاهده می‌شود، مؤثرین سطح در هر فاکتور مشخص شده که شامل pH معادل ۵، محلول NaCl با غلظت ۱۶٪، مقدار ۵۰ میکرولیتر

جدول ۴. مقدار بهینه هر فاکتور برای پیش بینی بیشترین میزان تولید آنزیم لیپاز و آنزیم سلولاز

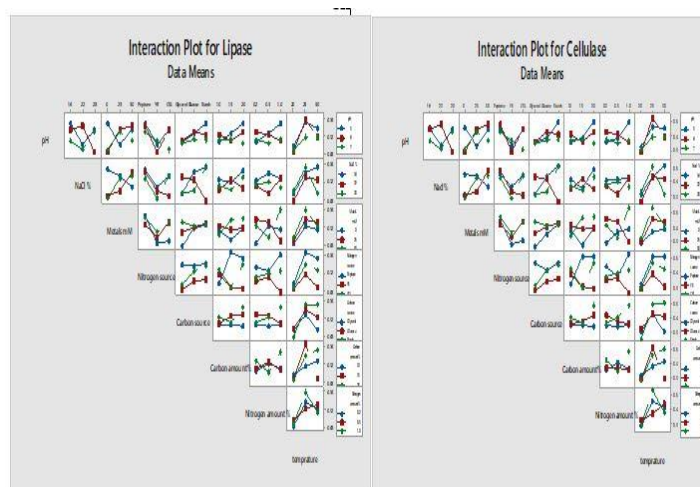
دما	مقدار کربن %	مقدار نیتروژن %	pH	%NaCl	محلول فلز (µl)	منبع کربن	منبع نیتروژن	مقدار تولید آنزیم سلولاز U/ml	مقدار تولید آنزیم لیپاز U/ml
۲۵	۲۰	۱	۵	۱۶	۵۰	نشاسته	پپتون	۰/۶۸۱۲۰۰	
۲۵	۱۰	۱	۵	۱۶	۵۰	نشاسته	پپتون		۰/۱۹۸۶۹۴

۲۲٪ نشان داده شده است. همچنین بیشترین آنزیم لیپاز تولید شده در این نمودار در نتیجه میان کنش pH معادل ۵ و محلول NaCl با غلظت ۱۶٪ است. غلظت محلول NaCl بر pH معادل ۵ و ۷ به طور تقریبی اثری یکسان گذاشته و موجب کاهش و افزایش تولید آنزیم لیپاز در این دو سطح از pH می گردد ولی تأثیر غلظت محلول NaCl بر pH برابر ۶ به طور کامل بر عکس بوده است.

آنالیز واریانس میانگین فاکتورها در تولید آنزیم سلولاز و لیپاز توسط قارچ پنی سیلیوم هالوتولرنس به ترتیب در جدول ۵ نشان داده است. در این جدول F (میزان اهمیت فاکتور مورد نظر) و P ( درصد تأثیر هر فاکتور در تولید آنزیم) محاسبه شد.  $P < 0/05$  به معنی مؤثر و معنی دار بودن آن فاکتور در تولید آنزیم سلولاز است. مؤثرترین فاکتور در تولید آنزیم سلولاز و لیپاز دما و بعد از آن منبع نیتروژن است. بر طبق نتایج آماری هر فاکتوری که تأثیر بیشتری در تولید آنزیم داشت، F-value بیش تری نیز داشت.

در جدول ۴ مقدار بهینه هر فاکتور برای پیش بینی بیشترین مقدار تولید واحد آنزیم سلولاز و لیپاز بر اساس محاسبات نرم افزار، با در نظر گرفتن اثر اصلی هر فاکتور بدون در نظر گرفتن میان کنش آنها نشان داده شده است.

با توجه به نمودارهای شکل ۱۲ و با استفاده از روش آماری تاگوچی بیشترین میزان تولید آنزیم لیپاز و سلولاز توسط توسط پنی سیلیوم هالوتولرنس و مؤثرترین سطح هر فاکتور پیش بینی شده است. در این نمودار اثر میان کنش 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 می شود اما افزایش غلظت NaCl به ۲۸٪ منجر به افت شدید تولید آنزیم سلولاز می شود که این میان کنش برای pH معادل ۶ و ۷ به طور کامل بر عکس عمل می کند بدین صورت که افزایش غلظت NaCl تا ۲۲٪ منجر به کاهش تولید آنزیم و افزایش غلظت NaCl تا ۲۸٪ باعث افزایش تولید آنزیم می گردد. اما بیشترین میزان تولید آنزیم سلولاز در میان کنش pH معادل ۵ و NaCl با غلظت



شکل ۱۲. نمودار اثر میان کنش فاکتورهای تولید آنزیم سلولاز و لیپاز توسط قارچ پنی سیلیوم هالوتولرنس

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	۶/۳۳	۰/۱۲	۰/۸۹۱

## بحث

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 هالتوتولرنس 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  $0.0233053 \text{ U/ml}$  و پس از انجام بهینه‌سازی در بهترین شرایط  $0.192105 \text{ U/ml}$  تولید شده و آنزیم سلولاز در ابتدا  $0.07744 \text{ U/ml}$  و پس از انجام بهینه‌سازی در بهترین شرایط  $0.63872 \text{ U/ml}$  تولید شده است. مقایسه میزان تولید هر دو آنزیم در شرایط یکسان توسط قارچ پنی‌سیلیوم هالتوتولرنس نشان می‌دهد که این قارچ در تولید آنزیم سلولاز موفق‌تر بوده است و هم-چنین علاوه بر افزایش چشم‌گیر تولید سلولاز پس از بهینه‌سازی، 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 زیاد،  $0.71 \text{ U/ml}$ ، 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 و کارایی بسیار بالای صنعتی بر سویه‌های مشابه مزیت دارد. لاری پور و همکاران از پساب کارخانجات چرم مخمر رودوترولا

قارچ‌ها یکی از بزرگ‌ترین سلسله موجودات زنده هتروتروف هستند. امروزه قارچ‌های رشته‌ای منبع اصلی تولید آنزیم-های تجاری و مهم‌ترین بازیافت‌کنندگان 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 (۲۰۱). سلولاز از جمله آنزیم‌های مهم صنعتی است که برای شفاف‌سازی نوشیدنی‌ها کاربرد دارد. لیپاز می‌تواند 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 بالاحص 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 متعلق به 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 نظر گرفته شد. در ابتدا قارچ‌های جداسازی شده جهت 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 نمودند که به شدت تولید کننده آنتی اکسیدان است و توانایی تولید آنزیم را دارد (۱۹).

کردند که این گونه ها می توانند با ترشح انواع آنزیم ها لیتیوم را از قطعه های کامپیوتری جداسازی نمایند (۹).

Richa و همکاران در سال ۲۰۱۷ در تحقیقی پنی سیلیوم هالوتولرنس را از مناطق سرد جداسازی کرد و از این قارچ به عنوان یک قارچ سرما دوست و تولید کننده لینولئیک اسید یاد کرد. میکروب های جدا شده از نمونه خاک Dras، ارتفاع زیاد (حدود ۱۶۰۰۰ فوت) و دمای زیر صفر منطقه در تپه های شیوالیک در شمال غربی هیمالیا، هند جدا شده است. نتایج این تحقیق سازگاری این قارچ را برای تولید آنزیم لیپاز برای تجزیه چربی ها در دمای پایین نشان می دهد. طبق بررسی های 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).

مهم ترین 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 بهینه سازی توسط سویه پنی سیلیوم هالوتولرنس در ۵۴۰ nm، ۰/۷۱ U/ml محاسبه شد، که مقادیر بالایی از تولید آنزیم نسبت به سویه استاندارد است. سویه مطرح شده در این تحقیق سویه پنی سیلیوم هالوتولرنس به طور مشخص از پارک جنگلی سرخه حصار جداسازی شده است و با توجه رشد مناسب این قارچ در محیط نمکی، به عنوان یک قارچ نمک دوست اختیاری جهت تولید آنزیم های صنعتی نسبت به قارچ های رشته ایی دیگر مزیت دارد (۲۶).

در تحقیقات مختلف بسیاری از میکروارگانیسم ها جهت تولید آنزیم معرفی شده اند، اما گونه معرفی شده در این تحقیق پنی سیلیوم هالوتولرنس که برای اولین بار از پارک جنگلی در ایران جدا شده و برای اولین بار تولید و بهینه سازی تولید آنزیم در سطح دنیا بر روی آن انجام شده است، یک گونه نمک دوست اختیاری است که می تواند در غلظت های 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 می دهد این قارچ با شرایط فرمانتور بسیار سازگاری دارد و مکانیسم های سازگاری این قارچ با محیط های نمکی به پایداری قارچ کمک شایانی می نماید. این قارچ نمک دوست اختیاری، به دلیل نمک دوست بودن مقاومت زیادی در شرایط صنعتی در تانک تخمیر جهت تولید آنزیم دارد و به سبب نمک دوست بودن، رنج حرارتی و اسیدیته زیادی را تحمل کرده و پایدار می ماند که مهم ترین خصوصیت یک قارچ صنعتی است. از طرفی قارچی نمک دوست به طور عمده از محیط هایی با غلظت بالای ۲۰ درصد نمک جداسازی می شوند ولی در این تحقیق جداسازی این قارچ از خاک پارک های جنگلی سطح تهران انجام شد که موفقیت بزرگی محسوب می شود.

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 پنی سیلیوم هالوتولرنس جدا شده در تحقیق ما در مطالعه های قبلی محققان شناسایی نشده است. با نگاهی به مقاله فوق مشخص می شود که این محققان از تالاب نمکی گونه ها را جداسازی کرده اند که امکان حضور و جداسازی این گونه ها پیش بینی می شد. از طرفی این که آیا این گونه ها می توانند در شرایط اسیدی و شرایط معمولی هم زندگی کنند هرگز در مقاله مورد پژوهش قرار نگرفته است (۱).

در این پژوهش ابتدا گونه پنی سیلیوم هالوتولرنس برای اولین بار در سطح جهان از محیط غیر نمکی جداسازی شده است. هم چنین این جداسازی از خاک پارک جنگلی انجام شده است، که شرایط بسیار معمولی زیست برای میکروارگانیسم ها را دارد و بعد از بررسی مولکولی این سویه بومی شناسایی شده است. پس از بررسی این گونه در آزمایشگاه در محیط کشت معمولی پتیتودکستروز آگار 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 گونه های پنی سیلیوم و آسپیرژیلوس نایجر بومی کار کردند و اثبات

## نتیجه گیری

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

طرح است. توان کشت مناسب قارچ پنی سیلیوم *هالوتولرنس* در محیط کشت معمولی پتیتودکستروزبراث و لیوفلیزه کردن قارچ به منظور نگهداری طولانی مدت قارچ به عنوان 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 تفاله های روغنی کارخانجات روغن کشتی شده مثل تفاله روغن زیتون می تواند بسیار ارزان تمام شود که از مزایای دیگر این طرح است. آنزیم پکتیناز و سلولاز در صنایع غذایی و آنزیم لیپاز در تولید شوینده ها، داروها و مواد آرایشی کاربرد دارد. در نتیجه شناسایی منابع بومی قارچ ها و بهینه سازی تولید آن ها کمک شایانی به اقتصاد و خودکفایی کشور دارد.

## سپاسگزاری

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

## میزان مشارکت و همکاری

دکتر محدثه لاری پور ایده و پروتکل اصلی، آنالیز داده ها 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 نرم افزار تاگوچی کمک کرد.

## تضاد منافع

هیچ گونه تضاد منافی در این تحقیق وجود ندارد.

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  $\alpha$ -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, Gaikawai 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. In *Gene 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.

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 science 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.

