تولید آنزیم سلولاز توسط قارچ تریکودرما ریسئی با استفاده از کاه برنج

الهام قربانی توتکابنی[1*] ، دکتر غلام خیاطی [2] ، دکتر آیت‌اله نصرالهی [3]
۱)کارشناسی ارشد میکروبیولوژی،گروه زیست شناسی،دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، تنکابن، ایران
۲)استادیار بیوتکنولوژی ، گروه مهندسی شیمی ، دانشکده فنی، دانشگاه گیلان،گیلان، ایران
۳)استادیار قارچ شناسی ،دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، تنکابن ، ایران
*eghorbani22@yahoo.com

چکیده

باتوجه به کاربردهای فراوان آنزیم سلولاز در بسیاری صنایع ، در این پژوهش تصمیم به تولید سلولاز به کمک قارچ تریکودرما ریسئی بر روی سوبستراهای لیگنوسلولزی ارزان قیمت (کاه برنج وکاه گندم) به روش تخمیر حالت جامد گرفته شد .نتایج نشان داد که کاه برنج بستر مناسبی برای تولید آنزیم سلولاز بود . آنزیم سلولاز تولیدی در pH =۷ و دمای ۳۵ درجه سانتی گراد حداکثر فعالیت آنزیمی را نشان داد . همچنین یون کلسیم موجب افزایش فعالیت سلولاز و جیوه سبب کاهش فعالیت آنزیم شد .

کلمات کلیدی: آنزیم ، سلولاز ، قارچ تریکودرما ریسئی ، تخمیربسترهای جامد (کاه برنج و کاه گندم)

مقدمه

آمارهای نشان می دهد تقریباً نیمی از محصولات کشاورزی بدون اینکه به مصرف برسد در مراحل مختلف از بین می روند و صنایع تبدیلی موجود در کشور قادر نیست که از تمامی اجزاء محصولات کشاورزی بهره مناسب و کامل را برد (Nigam,1996). در بخش برنج ، از هر تن برنج برداشتی یک و نیم تن کاه و کلش در مزارع به صورت ضایعات تولید می شود . از ساختار سلولزیک این ضایعات می توان به عنوان یک سوبسترای مناسب و ارزان قیمت برای مصارف زیست فن آوری خصوصا تولید سلولاز استفاده کرد (Sun,2008 and Kim,2004) قارچها مهمترین گروه تولید کننده آنزیم سلولازهستند و مهمترین قارچهای تولید کننده این آنزیم متعلق به جنسهای *Trichoderma* و *Aspergillus* می باشد، که بطور گسترده مورد مطالعه قرارگرفته اند (Swapan,1994). گونه‌های تریکودما قارچ‌هایی فرصت طلب، بی‌آزار وهمزیست گیاه هستند. اینها قارچ هایی آزادزی هستند که معمولا در خاک و اکوسیستم اطراف ریشه قرار دارند (Zhang,2010).در حال حاضر، مهمترین بستر کشت جهت رشد قارچ‌های تولید کننده سلولز استفاده از فراورده های فرعی کشاورزی نظیر کاه و کلش غلات، ساقه ذرت، تفاله، پوسته یا دیگر سوبستراهای لیگنوسلولزی می‌باشد(FAOSTAT,2006).هدف از این مطالعه استفاده از بستر کاه برنج جهت تولید آنزیم‌های سلولاز با استفاده از قارچ تریکودرما رئیسی بود.

مواد و روش‌ها

قارچ *Trichoderma reesei* ، میکروارگانیسم مورد استفاده در این تحقیق از کلکسیون قارچ ها و باکتریهای سازمان پژوهش علمی و صنعتی ایران با کد PTCC 5142 به صورت آمپول لئوفیلیزه تهیه شد . برای تولید آنزیم از کاه برنج و گندم بعنوان بستر جامد استفاده شد. ۱۰ گرم از بسترهای فوق با ۳۰ میلی لیتر از محلول نمکی (برحسب گرم بر لیتر) حاوی دی هیدروژن پتاسیم فسفات۳/۵، آمونیوم سولفات ۲/۴۵، سولفات منیزیم ۷آبه۰/۵۲۵ ، کلرید کبالت ۰/۵۲۵ ، سولفات آهن۷آبه ۰/۰۰۸۷ ، سولفات منیزیم ۷آبه۰/۰۰۲۷، سولفات روی ۷آبه ۰/۰۰۲۵ و کلرید کلسیم۰/۰۰۳۵ مرطوب گردید. از پلیت حاوی قارچ تریکودرما بعنوان تلقیح به بستر کشت جامد استریل انتقال داده شد . سپس محیط های کشت گرمخانه گذاری شدند . استخراج آنزیم سلولاز تولیدی از بستر جامد توسط محلول های بافر صورت گرفت . فعالیت آنزیم سلولاز در قالب دو آنزیم اگزو بتا ۱و۴ گلوکاناز (FP activity) اندو بتا ۱و۴ گلوکاناز (CMCase) مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین pH و دمای بهینه فعالیت آنزیمی و اثرکاتیون ها مختلف بر فعالیت آنزیم تعیین گردید .

نتایج و بحث

نتایج حاصل از میزان تولید آنزیم در دو بستر کاه گندم و کاه برنج نشان داد که میزان تولید هر دو آنزیم سلولاز در بستر جامد کاه برنج بیشتر از کاه گندم بود (جدول۱) همچنین نتایج نشان داد که میزان تولید آنزیم FP activity بیش از سه برابر تولید CMCase در بستر کاه برنج می باشد .

جدول۱ : اثر بسترهای کاه برنج و کاه گندم بر تولید آنزیم FPase و CMCase (means±S. E)

	FPactivity	CMCase
کاه برنج	۸۸۹/۳۵±۷/۸	۱۶۲/۲۹±۵/۱
کاه گندم	۸۰۸/۷۱±۷/۸	۹۴/۴۳±۵/۱

Kimو همکارانش در سال۲۰۰۴ آنزیم سلولاز را توسط قارچ آسپرژیلوس نایجر در بسترهای جامد کاه برنج وگندم بررسی کردند، آنها نشان دادند که میزان آنزیم تولیدی در کاه برنج نسبت به گندم بیشتر بود (Kim,2004) . Pandey و همکارانش درسال2006 میزان تولید سلولاز را توسط همین سوش بر روی کلش برنج بررسی نمودند (Pandey,2006) . همچنین صارم نژاد و همکارانش در سال۱۳۸۳ با استفاده از قارچ نوروسپورا اینترمدیا تولید آنزیم بیشتری را درکاه برنج نسبت به گندم گزارش نمودند(صارم نژاد،۱۳۸۳).

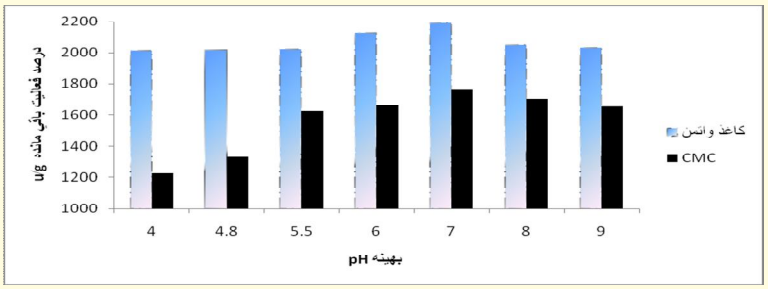
اثر محلولهای نمکی و بافر های مختلف بر استخراج آنزیم سلولاز نشان داد که محلول نمک سولفات آمونیوم یک درصد برای استخراج آنزیم FP activity از سایر محلول ها ارجح بوده در صورتیکه برای استخراج آنزیم CMCase محلول بافر فسفات با pH =۷ مناسب تشخیص داده شد بطوریکه استفاده از این محلول ها ۴۰ – ۳۰ درصد نسبت به آب مقطر استخراج آنزیم ها را افزایش دادند (جدول ۲).

جدول ۲ : اثر محلول های مختلف بر استخراج آنزیم های FPase و CMCase از بستر جامد (means±S. E)

محلول استخراج	بافرفسفات pH = 7	آب مقطر	بافر سیترات سدیم pH = 6	نمک سولفات آمونیوم 1%	بافرسیترات فسفات pH = 6	آب نمک Nacl 8/1000	بافر استات pH = 5
FPactivity	۱۰۵/۵±/۴۷ ۲۷۵۹۲	۸۹/۲±/۴۹ ۲۲۷۳۱	۹۵/۸±/۹۸ ۲۲۷۲۰	۱۳۰/۲±/۰۵ ۲۸۴۰۴	۱۰۳/۴±۲۲۶۷۵/۹ 	۸۱/۹±/۰۱ ۲۱۱۹۱	۱۱۲/۱±/۷۵ ۲۰۶۵۸
CMCase	۱۰۵/۵±/۴۴ ۲۷۴۰۰	۸۹/۲±/۴۴ ۲۳۲۶۸	۹۵/۸±۲۳۰۹۵/۲ 	۱۳۰/۲±/۰۸ ۲۱۷۷۲	۱۰۳/۴±/۵۹ ۲۰۱۸۹	۸۱/۹±/۹۶ ۱۹۱۶۱	۱۱۲/۱±/۶۱ ۱۷۳۸۳

اصفهانی و همکاران درسال ۱۳۸۳ و Kim در سال ۲۰۰۴ برای استخراج آنزیم سلولاز تولیدی توسط قارچ تریکودرما ریسئی نشان دادند که آب مقطر بیشترین میزان استخراج آنزیم تولیدی را از بستر دارد(and Kim,2004 اصفهانی، ۱۳۸۳) . Krishna در سال۱۹۹۹ و Prema درسال ۲۰۰۷ برای استخراج آنزیم سلولاز تولیدی توسط باکتری باسیلوس از بستر جامد از بافر فسفات pH =۷ استفاده کردند (Krishna,1999 and Prema,2007). Ncube و همکاران در سال۲۰۱۲ با استفاده از بافر استات pH =۶ بیشترین استخراج آنزیم سلولاز را گزارش کرده اند (Ncube,2012).

به منظور بررسی شرایط بهینه عملکرد آنزیم پارامترهایی چون اثر pH و دما بر میزان فعالیت آنزیم و همچنین اثر کاتیون فلزات مختلف بر فعالیت آنزیم، مورد سنجش قرار گرفت . نتایج اثر pH بر میزان فعالیت آنزیم سلولاز نشان داد که بهترین فعالیت آنزیمی در pH =۷ بدست آمد بطوریکه میزان فعالیت آنزیم از pH ۴ تا ۷ سیر صعودی و سپس سیر نزولی داشت را نشان داد (شکل ۱).



شکل۱ : اثرpH های مختلف بر میزان فعالیت آنزیم سلولاز (FPase و CMCase)

Krishna در سال۱۹۹۹ و همچنینPandey و همکاران در سال۲۰۰۶ حداکثر میزان فعالیت و پایداری برای آنزیم سلولاز تولیدی در بستر لیگنوسلولزی را در pH =۷ گزارش کردندکه از این نظر کاملا مشابه نتایج ما بود (Pandey,2006 and Krishna,1999). آراسته و همکاران در سال۱۳۹۰ با بررسی اثر سلولاز جداسازی شده از قارچ آسپرژیلوس نایجر مشاهده کردند که بیشترین فعالیت و پایداری آنزیم در pH =۷ داشت (آراسته،۱۳۹۰).

نتایج اثر فلزات مختلف بر فعالیت آنزیم سلولاز نشان داد که بیشترین میزان فعالیت آنزیم سلولازی برای هر دو آنزیم تولیدی FPase و CMCase در حضور یون کلسیم بدست آمد و جیوه اثر ممانعت کنندگی بر فعالیت آنزیمی نشان داد (جدول۳).

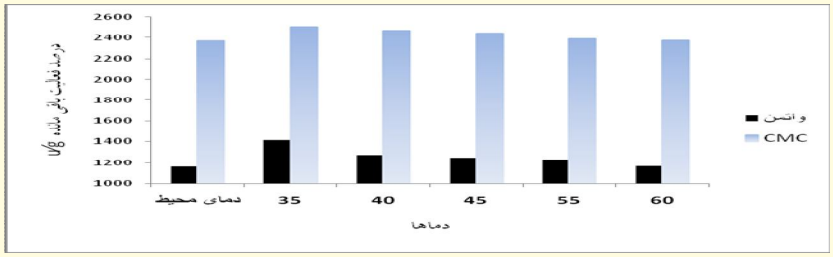
جدول ۳ : اثر فلزات مختلف بر فعالیت آنزیم FPase و CMCase* (means±S. E)

فلزات	FPase	CMCase
کلسیم	۱۲۲/۴۱	۱۱۳/۹۶
پتاسیم	۱۰۹/۳۲	۱۱۳/۳۶
منیزیم	۹۷/۱۵	۱۰۴/۷۶
نقره	۸۳/۸۳	۱۰۲/۳۷
آهن	۷۶/۸۵	۱۰۳/۴۲
باریم	۶۹/۰۴	۹۹/۶۴
سرب	۶۴/۱۹	۹۲/۲۹
جیوه	۶۳/۲۰	۹۲
S. E	۱/۵	۱/۳

* درصد فعالیت باقی مانده

Peng و همکاران در سال۲۰۱۰ و همچنین Kuhad و همکاران در سال۲۰۱۱ با مطالعه روی آنزیم سلولاز تولیدی توسط قارچ تریکودرما ریسئی در بستر جامد نشان دادندکه کلسیم با بالاترین فعالیت آنزیمی برابر با u/g ۲/٤۱، سپس پتاسیم ، منیزیم و آهن با u/g ۱/۲٤ ، u/g ۰/۹٦٦ و u/g ۰/۱۳٤ بترتیب و جیوه اثر ممانعتی بر فعالیت آنزیم داشتند (Kuhad,2011and Peng,2010).

نتایج اثر دما بر میزان فعالیت آنزیم سلولاز نیز نشان داد که دردمای 35 درجه آنزیم بیشترین فعالیت را داشت. همچنین میزان فعالیت آنزیمی از دمای محیط تا 35 درجه سانتی‌گراد سیر صعودی، و از 35 تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد به ترتیب با افزایش دما کاهش یافت (شکل۲) .



شکل ۲ : اثر دماهای مختلف بر میزان فعالیت آنزیم سلولاز

Krishna در سال ۱۹۹۹ با بررسی آنزیم سلولاز در بستر جامد گزارش کردند که در دمای °C ۳۵ دمای کاتالیتیکی بالاترین فعالیت آنزیمی را داشت (Krishna,1999). Nigam وهمکاران در سال۲۰۱۰ و همچنین Peng و همکاران در سال۲۰۱۰ دمای ۳۵ درجه سانتی گراد برای حداکثر فعالیت آنزیم سلولاز تولیدی از قارچ تریکودرما گزارش کردند که کاملا مشابه نتایج کار ما بود (Nigam,2010 and Peng,2010) .

منابع

صارم نژاد ، س ،. اصفهانی ، ز ،. عزیزی ، م ، (۱۳۸۳) . امکان تولید سلولاز با استفاده از قارچ نوروسپورا اینترمدیا به روش تخمیر حالت جامد . فصلنامه علوم و صنایع غذایی ایران . دوره ۱ . شماره ۷.

Sun, W., Hsien Cheng, C., Chien Lee, W,(2008). Protein expression and enzymatic activity of cellulases produced by Trichoderma reesei Rut C-30 on rice straw. Process Biochemistry . 43 : 1083–1087.

FAOSTAT, (2006). FAO statistical databases ,http://faostat.fao.org./

Kim, S.W., Hong, S.I., Lee, J.S., Park, Y.S., Kang, S.W,(2004). Production of cellulases and hemicellulases by Aspergillus niger KK2 from lignocellulosic biomass. Bioresource Technology . 91 : 153–156.

Krishna, C.(1999). Production of bacterial cellulases by solid state bioprocessing of banana wastes. Bioresource Technology . 69 : 231-239.

Kuhad, R., Khasa, Y., Deswal , D.(2011). Optimization of cellulase production by a brown rot fungus Fomitopsis sp. RCK2010 under solid state fermentation. Bioresource Technology .102 : 6065–6072.

Ncube, I., Howard, R., Emil K, H., et al.(2012). Jatropha curcas seed cake as substrate for production of xylanase and cellulase by Aspergillus niger FGSCA733 in solid-state fermentation. Industrial Crops and Products. 37 : 118– 123

Nigam ،P ،.Singh ،D,(1996). Processing of agricultural wastes in solid state fermentation for cellulolytic enzyme production. J Sci Ind Res .55:457–67.

Prema, P., Poorna, C. A.(2007). Production of cellulase-free endoxylanase from novel alkalophilic thermotolerent Bacillus pumilus by solid-state fermentation and its application in wastepaper recycling. Bioresource Technology . 98 : 485–490 .

Pandey ،A ،.Selvakumar ،P ،.Soccol ،CR ،.Nigam ،P.(2006). Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. Curr Sci,77:149–62.

Swapan,K.,Jana,K.,Vinay,G and Singh,A,(1994). Production and hydrolytic potential of cellulase enzymes from a mutant strain of Trichoderma.reesei. Biotechnol Appl Biochem . 20 : 233-239 .

Zhang ،Q ,. Lo ،M ،.Callow ،N. ،Ju L،K, (2010). Cellulase production by continuous culture of Trichoderma reesei Rut C30 using acid hydrolysate prepared to retain more oligosaccharides for induction. Bioresour Technol. 101(2):717–23.