بسم الله الرحمن الرحیم

دانشکده فنی مهندسی

گروه مهندسی شیمی

پایان نامه تحصیلی برای دریافت درجه کارشناسی ارشد رشته مهندسی شیمی گرایش

بیوتکنولوژی

مقایسه دو روش بهینه سازی تاگوچی و سطح پاسخ در تولید پکتیناز

مؤلف:

مهدیه مصطفوی

استاد راهنما:

دکتر محمدحسن فضائلی پور

استاد مشاور:

دکتر سید احمد عطایی

بهمن ماه 1390

این پایان نامه به عنوان یکی از شرایط احراز درجه کارشناسی ارشد به

گروه مهندسی شیمی

دانشکده فنی مهندسی

دانشگاه شهید باهنر کرمان

تسلیم شده است و هیچگونه مدرکی به عنوان فراغت از تحصیل دوره مزبور شناخته نمی شود.

دانشجو : مهدیه مصطفوی

استاد راهنما : دکتر محمدحسن فضائلی پور

استادمشاور: دکتر سید احمد عطایی

داور 1 :دکتر فرشته بختیاری

داور2 :دکتر احمد غضنفری مقدم

نماینده‌ی تحصیلات تکمیلی در جلسه دفاع:

معاونت پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشکده :

حق چاپ محفوظ ومخصوص به دانشگاه شهید باهنر کرمان است

تقدیم به مهربان فرشتگانی که:

لحظات ناب باور بودن، لذت و غرور دانستن، جسارت خواستن، عظمت رسیدن و تمام تجربه های یکتا و زیبای زندگیم مدیون حضور سبز آنهاست، پدر و مادر عزیزم

و تقدیم به :

همسر همیشه مهربانم و گل نازم(فاطمه زهرا)

تشکر وقدردانی

با سپاس بیکران از خدای بزرگ که در سایه مهربانی بیکران او هر کار دشواری آسان می گردد. با سپاس فراوان از استاد گرانقدر، جناب آقای دکتر محمدحسن فضائلی پور که با راهنمایی بی دریغ و صمیمانه خویش در تمامی مراحل این پژوهش مرا یاری رساندند و همچنین از زحمات استاد مشاور محترم جناب آقای دکتر سید احمد عطایی نیز بسیار سپاسگزارم.

چکیده

پکتینازها گروهی از آنزیم های هیدرولیتیک هستند که مواد پکتیکی را تجزیه می کنند و از مهمترین آنزیم های کاربردی در صنعت می باشند. پکتینازها توسط انواع مختلفی از میکروارگانیسم ها و گیاهان سنتز می شوند. اگزوپلی گالاکتوروناز یکی از آنزیم های این گروه است که باعث هیدرولیز پیوندهای آلفا 1 4 گلیکوزیدی موجود در پلیمر پکتین شده که نتیجه آن آزاد سازی واحد های گالاکتورونیک اسید از این پلیمر به محیط می باشد. هدف از این پژوهش مقایسه دو روش آماری سطح پاسخ و تاگوچی در بهینه سازی تولید آنزیم اگزوپلی گالاکتوروناز می باشد. به این منظور ابتدا قارچ آسپرژیلوس نایجر که مهمترین منبع تولید این آنزیم می باشد از محیط جداسازی و سپس بهینه سازی تولید آنزیم اگزوپلی گالاکتوروناز با روش های طراحی آزمایش سطح پاسخ (روش طرح مرکب) و تاگوچی با استفاده از سوبسترای تفاله چغندر قند انجام شد. در هر دو روش فاکتوره ای رطوبت در سطوح 50٪ و 80٪، دما در سطوح 30 و 40 درجه سانتی گراد، زمان در سطوح 3 و 10 روز و pH در سطوح 5 و 9 مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که بیشترین اثر در تولید آنزیم مربوط به فاکتور رطوبت و دمای محیط تخمیر بوده است. مقایسه روش سطح پاسخ با 31 تیمار و تاگوچی با 32 تیمار نشان داد که نقطه بهینه ارائه شده توسط دو روش تقریباً یکسان است. این دو روش فقط pH متفاوتی را پیشنهاد کرده اند که آن هم به این دلیل است که مبنای پیشنهاد RSM مدل رگرسیون می باشد که می تواند با درونیابی مقادیر دقیق تری را ارائه دهد. نقطه بهینه ارائه شده توسط روش سطح پاسخ در رطوبت 50٪، دمای 40°C، زمان تخمیر 3 روز و pH 6/22 و حداکثر تولید آن زیم در این شرایط 1025U/gr پیش بینی گردید. نقطه بهینه در روش تاگوچی در رطوبت 50٪، دمای 40°C، زمان تخمیر 3 روز و pH 5 بدست آمد وحداکثر تولید در نقطه بهینه ارائه شده 1014U/gr پیش بینی شده است.

کلمات کلیدی: پکتیناز، بهینه سازی، روش سطح پاسخ، روش تاگوچی

فهرست

عنوان.....صفحه

فصل اول:مقدمه.....1

فصل دوم: ادبیات نظری و مروری بر پژوهش های گذشته.....5

2-1- پکتیناز.....6

2-2- عمل پکتینازها.....6

2-2-1- پکتین استراز.....6

2-2-2- پلی گالاکتوروناز.....6

2-2-3- پکتین لیاز.....7

2-2-4- پکتات لیاز.....7

2-3- عملکرد پلی گالاکتوروناز.....7

2-4- پکتین.....7

2-4-1 کاربردهای پکتین.....8

2-5- انتخاب منابع آنزیم.....10

2-5-1 کاربرد آسپرژیلوس نایجر.....10

2-6 به کار گیری پلی گالاکتوروناز در صنعت.....10

2-6-1صنعت آبمیوه سازی.....10

2-6-2- صنعت نساجی.....11

2-6-3- صنعت استخراج روغن..... 12

2-7-روش ه‌ای تولید آنزیم..... 13

2-7-1- کشت سطحی..... 13

2-7-2-کشت غوطه ور..... 14

2-7-3- کشت در محیط جامد..... 15

2-8- کلیات طرح‌های طراحی آزمایش..... 17

2-8-1-مقدمه ای بر طراحی آزمایش ها..... 17

2-8-2تعاریف اولیه..... 18

2-9- انواع روش های طراحی آزمایش..... 20

2-9-1- طراحی آزمایش به روش تاگوچی..... 20

2-9-1-1- فلسفه تاگوچی..... 20

2-9-1-2- آرایه های متعامد..... 21

2-9-2- طراحی آزمایش به روش سطح پاسخ..... 23

2-9-2-1- معرفی RSM..... 23

2-9-2-2- شرح رویکرد RSM..... 23

2-9-2-3-تخمین تابع هدف با استفاده از چند جمله ای های درجه اول..... 24

2-9-2-4- تخمین تابع هدف با استفاده از چند جمله ای های مرتبه دوم..... 24

2-10- مروری بر پژوه‌ش های گذشته..... 26

فصل سوم: روش تحقیق..... 32

3-1- جداسازی میکروارگانیسم..... 33
3-2- ترکیب محیط کشت..... 33
3-3- عملیات تخمیر..... 34
3-3-1- سوبسترا..... 34
3-3-2- رطوبت زنی..... 35
3-3-3- روش تلقیح..... 35
3-3-4- محیط تخمیر..... 35
3-4-آماده سازی محیط تخمیر برای اندازه گیری فعالیت آنزیم..... 35
3-5- سنجش فعالیت آنزیم اگزوپلی گالاکتوروناز..... 36
3-6- طراحی آزمایش..... 36
3-6-1- انتخاب فاکتور و سطوح مورد بررسی..... 36
3-6-2- روش سطح پاسخ..... 37
3-6-3- روش تاگوچی..... 39
فصل چهارم: نتایج و بحث..... 41
4-1- تحلیل نتایج روش طراحی آزمایش سطح پاسخ..... 42
4-1-1- تخمین تابع هدف با استفاده از مدل مرتبه اول..... 43
4-1-2- برازش مدل خطی – برهمکنش..... 45
4-1-3- تخمین تابع هدف با استفاده از مدل مرتبه دوم..... 47
4-1-4- تاثیر متغیرهای فرآیند بر روی تولید آنزیم اگزوپلی گالاکتوروناز..... 49

4-1-5- بهینه سازی پارامترهای فرآیند به روش سطح پاسخ..... 53

4-2- بررسی نتایج طراحی آزمایش به روش تاگوچی..... 54

4-2-1- تحلیل نتایج اثر فاکتورها و ارائه شرایط بهینه..... 56

4-2-2- آثار تداخل در شرایط بهینه..... 58

4-2-3-آزمایش اطمینان شرایط بهینه..... 62

4-3- مقایسه دو روش آماری سطح پاسخ و تاگوچی..... 63

فصل پنجم: نتیجه گیری وپیشنهادات..... 64

5-1- نتیجه گیری..... 65

5-2- پیشنهادات..... 66

مراجع..... 67

فهرست جداول

عنوان..... .....صفحه

جدول 2-1. آرایه های متعامد استاندارد.....22

جدول 3-1. نمک های مورد استفاده در عناصر اصلی.....34

جدول 3-2. نمک های مورد استفاده در عناصر جزئی.....34

جدول 3-3. فاکتورهاو سطوح مورد بررسی..... 37

جدول3-4. طراحی آزمایش انجام شده به روشCCD.....37

جدول 3-5. فاکتورها و محدوده مورد بررسی متغیرها جهت بهینه سازی.....39

جدول3-6. طراحی آزمایش انجام شده به وش تاگوچی از آرایه متعامدL32.....39

جدول 4-1. نتایج بدست آمده پس از انجام آزمایشات به روش CCD.....41

جدول 4-2. ضرایب رگرسیونی تخمین زده شده برای مدل مرتبه اول.....43

جدول4-3. نتایج آنالیز واریانس با سطح اطمینان95 درصد برای مدل مرتبه اول.....43

جدول4-4. ضرایب رگرسیونی تخمین زده شده برای مدل مرتبه اول- برهمکنش.....45

جدول4-5. نتایج آنالیز واریانس با سطح95 درصد برای مدل مرتبه اول- برهمکنش.....46

جدول4-6. ضرایب رگرسیونی تخمین زده شده برای مدل مرتبه دوم.....47

جدول4-7. نتایج آنالیز واریانس با سطح اطمینان95 درصد برای مدل مرتبهدوم.....48

جدول4-8.شرایط بهینه برای تولید آنزیم در روش CCD.....53

جدول4-9.نتایج بدست آمده پس از انجام آزمایشات بهینه سازی توسط روش تاگوچی.....54

جدول 4-10. میانگین سطوح فاکتورها.....56

جدول4-11. نتایج آنالیز واریانس با سطح اطمینان95درصد..... 57

جدول4-12. شرایط بهینه پیشنهادی برای تولید آنزیم در روش تاگوچی..... 58

جدول 4-13. شرایط بهینه اصلاح شده برای تولید آنزیم در روش تاگوچی..... 60

فهرست شکل ها

عنوان..... ...صفحه

شکل2-1.ساختار شیمیایی پلی ساکارید پکتین..... 8

شکل 2-2. پکتین با متیلاسیون بالا..... 9

شکل 2-3. پکتین با متیلاسیون پایین..... 9

شکل 4-1. نمایش نمودارکنتور تاثیر تغییرات دما و رطوبت بر تولید آنزیم.....49

شکل4-2. نمایش نمودارکنتور تاثیر تغییرات دما و زمان بر تولید آنزیم.....50

شکل 4-3. نمایش نمودارکنتور تاثیر تغییرات pH و دما بر تولید آنزیم.....51

شکل4-4. نمایش نمودارکنتور تاثیر تغییرات رطوبت و زمان بر تولید آنزیم.....52

شکل 4-5. نمایش نمودارکنتور تاثیر تغییرات pH و رطوبت بر تولید آنزیم.....52

شکل 4-6. نمایش نمودارکنتور تاثیر تغییرات pH و زمان بر تولید آنزیم.....53

شکل 4-7. نمودار اثرات اصلی فاکتورها بر میزان تولید آنزیم به روش تاگوچی.....57

شکل 4-8. نمودار تداخل فاکتورهای pH و رطوبت 58

شکل 4-9.نمودار اثرات تداخل فاکتورهای زمان و pH.....59

شکل4-10. نمودار اثر تداخل فاکتورهای زمان و دما.....60

شکل 4-11. نمودار تداخل فاکتورهای دما و رطوبت.....61

شکل 4-12. نمودار اثر تداخلpHو زمان.....61

شکل 4-13. نمودار اثر تداخل فاکتورهای رطوبت و زمان.....62

فصل اول

مقدمه

آنزیم ها، کاتالیزورهای زیستی با ماهیت پروتئینی هستند که توسط موجودات زنده (حیوان، گیاه و میکروارگانیسم) تولید می شوند. انجام تمامی واکنش ها در سلول زنده نیازمند آنزیم است . نقش عمده آنزیم ها در موجودات زنده، کاتالیزورهای واکنش های تجزیه و ترکیب است . آنزیم ها موجب افزایش سرعت واکنش های زیستی می شوند و در معرض تغییرات فیزیکی و شیمیایی قرار می گیرند. فعالیت کاتالیزوری آنزیم ها معلول ساختمان پروتئینی آنها است و عمل کاتالیزوری آنها در جای مشخصی از آنزیم به نام جایگاه کاتالیزوری انجام می شود. کشف آنزیم ها در واقع به پژوهشهای وسیع پا یِن[1] و پرسوز[2] وابسته بود. آنان در سال1833 موفق شدند از جو سبز شده ترکیبی را به نام مالت کشف کنند که نشاسته را به قند مبدل می ساخت و این ترکیب را دیاستاز[3] نامیدند که امروزه به نام آنزیم آمیلاز معروف است.

چند سال بعد شوان[4] برای نخستین بار آنزیم پپسین را که موجب گوارش گوشت می شد، کشف کرد. سامنر[5] در سال1926 آنزیم آبکافت کننده اوره ، یعنی آنزیم اوره آز، را به صورت متبلور بدست آورد. به دنبال آن نورتروپ نیز آنزیم کیموتریپسین و آنزیم تریپسین را جداسازی کرد. بدین ترتیب صدها نوع آنزیم شناسایی و مشخص شدند. کوئِن[6] نخستین کسی بود که نام آنزیم را به جای *دیاستاز* بکار برد.

امروزه آنزیم ها به عنوان مناسبترین و جدیدترین ماده در تغییر و تبدیل ترکیبات در صنایع کاربرد پیدا کرده اند . نقش بیولوژیکی آنها در بهبود کیفیت محصولات تولیدی در صنایع بسیار مورد توجه قرار گرفته است.

آنزیمها را از نظر فعالیت کاتالیزوری به شش گروه اصلی تقسیم می‌کنند:

- اکسید و ردوکتازها:

واکنشهای اکسید و احیا (اکسایش – کاهش) را کاتالیز می‌کنند مانند دهیدروژناز.

[1] payen
[2] persoz
[3] Dystase
[4] Shoan
[5] Sumner
[6] Kuhne

- ترانسفرازها : انتقال عوامل ویژه‌ای مانند آمین ، فسفات و غیره را از مولکولی به مولکول دیگر به عهده دارند مانند آمینو ترانسفرازها که در انتقال گروه آمین فعال هستند.

- هیدرولازها : واکنشهای آبکافتی را کاتالیز می‌کنند. مانند پپتیدازها که موجب شکسته شدن پیوند پپتیدی می‌شوند.

- لیازها : موجب برداشت گروه ویژه‌ای از مولکول می‌شوند. مانند دکربوکسیلازها که برداشت دی‌اکسید کربن را برعهده دارند.

- ایزومرازها : واکنشهای تشکیل ایزومری را کاتالیز می‌کنند. مانند راسه ماز که از L- آلانین ترکیب ایزومریD- آلانین را می‌سازد.

- لیگازها : آنزیمهایی هستند که باعث اتصال دو مولکول به یکدیگر و ایجاد پیوند کووالانسی بین آنها می شوند. مانند استیل کوآنزیم A سنتتاز که موجب سنتز استی ل کوآنزیم A می‌گردد.

پکتیناز[7]، آنزیم به دست آمده از بسیاری از میکروارگانیسم ها و گیاهان نقش های بسیار مهمی را در طبیعت و نیز زندگی بشر ایفا می کند. این آنزیم در نیمه دوم قرن نوزدهم شناسایی و در گروه هیدرولازها قرار می گیرد. پکتینازها معمولاً به روش میکروبی و به عنوان یک محصول برون سلولی توسط میکرو ارگانیسم تولید می شوند.

این آنزیم در صنایع مختلفی همچون صنایع غذایی، آبجوسازی، آبمیوه سازی، نساجی، دارویی - بهداشتی و غیره کاربردهای بسیار گسترده ای دارد[1].

پکتینازها معمولاً به سه روش تخمیر غوطه ور، کشت سطحی و تخمیرحالت جامد تولید می شوند. روش حالت جامد بدلیل مزایای زیادی که نسبت به دو روش دیگر دارد مورد توجه محققان می باشد. از مهمترین مزایای این روش می توان به غلظت بالای آنزیم های خام و بوجود آمدن مواد زاید مایع کم اشاره کرد[10].

استفاده از منابع کربنی با ارزش اقتصادی پایین مانند موادجانبی صنایع کشاورزی، باعث کاهش قیمت تمام شده پکتیناز می گردد. خیلی از مطالعات روی تولید پکتیناز از منابعی مانند تفاله چغندر قند، باگاس نیشکر، تفاله لیمو، تفاله انگور، تفاله سیب و سبوس گندم انجام یافته است[2&8].

[7] pectinases

با توجه به کاربرد گسترده آنزیم پکتیناز در صنایع مختلف، شناخت عملکرد این آنزیم و ارائه راهکاری که در آن تولید آنزیم به حداکثر مقدار برسد از اهمیت ویژه ای برخوردار می باشد . در این پژوهش برای بهینه سازی تولید از روشهای آماری طراحی آزمایش پاسخ سطح و تاگوچی استفاده شده است .

هدف دیگر از انجام این پژوهش مقایسه دو روش آماری تاگوچی و پاسخ سطح در بهینه سازی فرآیندهای بیو لوژیک می باشد.

.

فصل دوم

ادبیات نظری و مروری بر

پژوهش های گذشته

2-1 پکتیناز

پکتینازها یا آنزیمهای پکتینولیتیک از آنزیم های صنعتی هستند که پس از پروتئازها و آنزیم های آبکافنده نشاسته بیشترین استفاده را دارند. این آنزیم توسط تعدادی از مخمرها، قارچها، حشرات و گیاهان سنتز می شوند. لازم به ذکر است که هدف تجزیه پکتین در مخمرها، قارچ ها و حشرات کسب منبع کربن موجود در پکتین به عنوان ماده غذایی بوده، حال آنکه هدف تجزیه پکتین در گیاهان تغییر ساختار پکتین در جهت رشد گیاه یا نرم شدن میوه ها می باشد. به هر حال تمامی پکتینازها از مکانیسم شکست هیدرولیتیک جهت انجام فعالیت زیستی خود استفاده می کنند.

2-2 عمل پکتیناز ها

چهار نوع آنزیم پکتیکی وجود دارند که با توجه به اثر بر سوبستراهای مختلف متفاوتند:

2-2-1 پکتین استراز(پکتاز):

پکتین استراز[8] در گیاهان عالی، باکتریها و قارچ ها یافت می شود و به مقدار زیاد در مرکبات و گوجه فرنگی وجود دارد. گروههای متوکسیل را از پکتین با متوکسیل بالا برداشته و متانول بعلاوه پکتین با متوکسیل پایین تولید می کند.

این آنزیم برای آغاز عمل خود به یک گروه کربوکسیل آزاد در مجاورت گروه استری شده نیاز دارد. بنابراین پلی گالاکتورونیک اسیدی که کاملاً متیله شده باشد تحت اثر آن قرار نمی گیرد. این آنزیم بصورت خطی در طول زنجیر حرکت می کند تا به مانعی برسد . وجود کاتیونهای دو ظرفیتی فعالیت این آنزیم را چندین مرتبه افزایش می دهد.

2-2-2 پلی گالاکتوروناز:

پلی گالاکتوروناز[9] یک دپلیمر از بوده و اتصالات گلیکوزیدی را در مواد پکتیکی هیدرولیز می کند و به دو صورت اندو و اگزو فعالیت می کند و حاصل عمل آن بر روی پکتین، اسیدگالاکتورونیک و استر متیله اسید گالاکتورونیک است. اندو پلی گالاکتوروناز بطور تصادفی در رشته فعالیت می کند و اگزو پیوندهای انتهائی زنجیر را می شکند.

[8] Pectinesterase
[9] Polygalacturonase

2-2-3 پکتین لیاز:

پکتین لیاز[10] مشابه با اندوپلی گالاکتوروناز عمل می کند با این تفاوت که بر روی باندهای میانی مولکول های متیله شده اثر می گذارد.

2-2-4 پکتات لیاز:

پکتات لیاز [11]بطور تصادفی در شکستن پیوندهای گلیکوزیدی بین مولکولهای اسید گالاکتورونیک متیله نشده در پکتین با متوکسیل پایین عمل می نماید.
عمل شکستن پیوند گلیکوزیدی به شکلی انجام می شود که با جدا شدن اتم هیدروژن از کربن های 4و5 و به دنبال آن تشکیل پیوند دوگانه میان این دو کربن همراه می باشد[25].

2-3 عملکرد پلی گالاکتوروناز

پلی گالاکتورونازها با نقش هیدرولیزی خود باعث تجزیه پلی مرهای پکتین موجود در دیواره سلولی گیاهان شده، و با این کار موجبات رشد بیشتر و نرم شدن گیاه را فراهم می آورد. از این آنزیم در صنایع مختلفی همچون صنعت آبمیوه سازی، صنعت نساجی و صنعت استخراج روغن استفاده می شود. به این صورت که باعث هیدرولیز پکتین موجود در آبمیوه شده که این امر باعث شفاف شدن آن گشته و یا اینکه با هیدرولیز پکتین بر جای مانده بر سطح پارچه های نخی باعث صیقلی دادن سطح آنها می گردد. این آنزیم تنها از یک زنجیره پلی پپتیدی تشکیل شده است و در قسمت بیرونی خود یک شکاف نسبتا بزرگ دارد که محل اتصال سوبسترای آن یعنی پلی مر پکتین می باشد. این آنزیم دارای فعالیت اگزوپلی گالاکتورونازی می باشد. که طی آن واحدهای گالاکتورونیک اسید را از انتهای غیر احیا کننده پکتین یا همان پلی گالاکتورونیک اسید مورد هیدرولیز و جدا شدن قرار می دهد و باعث آزاد سازی آنها به درون محیط می شود.

2-4 پکتین

پکتین یک پلی ساکارید طویل از واحدهای گالاکتورونیک اسید می باشد که در لایه های داخلی و دیواره سلولی گیاهان یافت می شود و در این مناطق به عنوان چسب عمل می کندکه سایر پلی ساکاریدهای دیواره سلولی همچون سلولز، همی سلولز و نیز پروتئین هایی همچون اکستنسین[12] که

[10] *Pectine lyase*
[11] *Pectate lyase*
[12] Extensin