بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده مهندسی شیمی

بررسی متغیرهای موثر بر تولید آنزیم پکتیناز در تخمیر حالت جامد

دانشجو:

فائزه فرامرزی

پایان‌نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد

در رشته مهندسی شیمی گرایش بیوتکنولوژی

اساتید راهنما:

دکتر فرشته نعیم‌پور

دکتر پریسا حجازی

تیر ماه ۱۳۸۷

تقدیم به:

باران بی‌منت عشق، پدر و مادرم

رنگین‌کمان مهربانی، گذشت، صبر، امید، ایمان، بخشش و تلاش ، همسرم

طراوت گلهای بهارم، خواهر و برادرم

دو سپیدار که ریشه‌ام در عمق وجودشان تنیده شده، پدربزگ و مادربزرگ عزیزم

خانواده مهربان و دلسوز همسرم

بازوی توانای الهی در آستین بشر، پروفسور کلانی

با تشکر فراوان از راهنمائی‌های بی‌بدیل سرکار خانم دکتر فرشته نعیم‌پور

با تشکر ویژه از سرکار خانم دکتر پریسا حجازی

با سپاس فراوان از آقای مهندس جلیل‌نژاد مسئول آزمایشگاه کارخانه تکدانه

با تشکر از مشاوره مفید سرکار خانم دکتر مژگان حیدری

با تشکر از راهنمائی سرکار خانم دکتر مریم هاشمی

با تشکر از لطف آقای مهندس پیام اسکندری

با تشکر از کمک آزمایشگاه دیرگداز مواد

با تشکر از راهنمائی‌های آقای دکتر سعید مقصودی

با تشکر از آقای مهندس مصیب ذوالفقاری

با تشکر از دانشجویان محترم آزمایشگاه جداسازی

با تشکر از دوستان عزیز آزمایشگاه شیمی فیزیک

با تشکر از مساعدت آقای دکتر تورج محمدی

با تشکر از مساعدت آقای مهندس امید بختیاری

با تشکر از مسئولین محترم آزمایشگاه آنالیز دستگاهی، آقای مهندس منتهایی و خانم مهندس انواری

و با تشکر از دوستان عزیز در آزمایشگاه بیوتکنولوژی خانم‌ها سارا خاکباز- سرور جوان- فاطمه موید و آقایان علی پرتوی‌نیا- جعفر فرضی- سعید سید ذولفقار

پروردگارا بر علم و دانش من بیفزا

به بند دانش، بر تواضعم در پیشگاه خود بیفزا

پروردگارا دانش را مایه نخوت و غرور من قرار مده

کمکم کن میوه درخت دانش اندکم، بندگی تو و خدمت

به خلق تو باشد

چکیده

برای اولین بار تولید آنزیم‌های اگزوپلی‌گالاکتروناز[1]، اندوپلی‌گالاکتروناز[2]، پکتین‌لیاز[3] و آلفا- آمیلاز [4] *توسط آسپرژیلوس فوئیتیدوس* [5] *PTCC۵۰۹۹* با استفاده از مخلوط سوبسترای تفاله‌سیب و سبوس- گندم مورد بررسی قرار گرفت. پنج متغیر تاثیرگذار بر فرآیند شامل، نسبت ترکیب دو سوبسترا، رطوبت اولیه سوبسترا، میزان منبع نیتروژنی، دما و pH در چهار سطح با استفاده از روش طراحی آماری تاگوچی مورد مطالعه قرار گرفت. از روش دی‌نیتروسالیسیلیک اسید (DNS) برای اندازه‌گیری فعالیت اگزوپلی‌گالاکتروناز و آلفا- آمیلاز استفاده شد. فعالیت اندوپلی‌گالاکتروناز توسط ویسکومتر سنجیده شد و فعالیت پکتین‌لیاز توسط افزایش جذب در طول موج ۲۳۵nm بدست آمد. بمنظور یافتن بهترین زمان تولید، نمونه‌گیری در روزهای دوم، سوم و چهارم انجام شد. در نهایت نتایج با استفاده از نرم‌افزار Qulitek 4 تجزیه و تحلیل شد. بر اساس نتایج حاصل از بهینه سازی شرایط فرآیند، تولید اگزوپلی‌گالاکتروناز و پکتین‌لیاز در روز سوم و تولید آمیلاز در روز چهارم بیشترین مقدار را نشان می دهد. تولید اگزوپلی‌گالاکتروناز در روز سوم و نسبت تفاله سیب به سبوس گندم (۴۰٪)، رطوبت وزنی (۷۰٪)، منبع نیتروژنی به ازاء ۱۰g جامد خشک (۰/۳g)، دما (۳۶°C) و pH= ۵/۳۷ بعنوان شرایط بهینه با تولید آنزیم ۱۰۲۲U/g بدست آمد. در روز سوم نسبت تفاله سیب به سبوس گندم (۶۰٪)، رطوبت (۶۰٪)، میزان منبع نیتروژنی (۰/۵g)، دما (۳۶°C) و pH=۴/۵ بعنوان شرایط بهینه برای تولید آنزیم پکتین‌لیاز، با تولیدی معادل ۹۵۳/۳۳U/g بدست آمد. تولید آنزیم آلفا- آمیلاز در روز چهارم با نسبت تفاله سیب به سبوس گندم (۲۰٪)، رطوبت (۶۵٪)، منبع نیتروژنی (۰/۴g)، دما (۳۳°C) و pH=۵ بعنوان نقطه بهینه با تولید آنزیم ۶۶U/g معرفی شدند. تولید اندوپلی‌گالاکتروناز حساسیتی را نسبت به طراحی آزمایش اشاره شده از خود نشان نداد و تمام نمونه‌ها بمیزان ۱۶٪ ویسکوزیته سوبسترای پکتینی را کاهش دادند.

واژه‌های کلیدی: تخمیر حالت جامد، اگزوپلی‌گالاکتروناز، اندوپلی‌گالاکتروناز، پکتین‌لیاز، پکتین- استراز، آمیلاز، فعالیت آنزیمی

[1] Exopolygalacturonase
[2] Endopolygalacturonase
[3] Pectin lyase
[4] Alpha amylase
[5] *Aspergillus foetidus*

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل۱ ۱

مقدمه ۱

۱-۱. مقدمه ۲

فصل۲ ۴

مروری بر منابع مطالعاتی ۴

۲-۱. مقدمه ۵

۲-۲. پکتین ۵

۲-۳. پکتیناز ۶

۲-۳-۲. انواع پکتیناز با توجه به کاربرد در صنایع ۸

۲-۳-۳. روشهای تخمیر ۱۲

۲-۴. اساس اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی ۱۶

۲-۴-۲. دسته‌بندی روشهای اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی ۱۸

۲-۴-۳. نرخ واکنش آنزیمی ۱۹

۲-۴-۴. فعالیت آنزیمی ۱۹

۲-۵. روشهای استفاده شده برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیمهای پکتیناز ۲۰

۲-۵-۱. اگزوپکتیناز ۲۰

۲-۵-۲. اندوپکتیناز ۲۰

۲-۵-۳. پکتین‌لیاز ۲۱

۲-۵-۴. پکتین‌استراز ۲۱

۲-۶. عوامل موثر در تولید پکتیناز در تخمیر حالت جامد ۲۲

۲-۶-۱. سویه مورد استفاده ۲۲

۲-۶-۲. منبع کربنی ۲۳

۲-۶-۳. منبع نیتروژنی ۲۸

۲-۶-۴. اندازه ذرات سوبسترا ۳۰

۲-۶-۵. رطوبت ۳۱

۲-۶-۶. دما ۳۲

۲-۶-۷.pH ۳۳

۲-۶-۸. میزان تلقیح ۳۴

۲-۶-۹. سن اسپور ۳۵

۲-۶-۱۰. زمان تخمیر ۳۵

۲-۷. روش استخراج آنزیم پکتیناز ۳۷

فصل۳ ۳۹

مواد و روشها ۳۹
۳-۱. مواد و تجهیزات مورد نیاز ۴۰
۳-۱-۱. مواد ۴۰
۳-۱-۲. دستگاهها ۴۰
۳-۲. سوبسترا ۴۰
۳-۲-۱. آماده‌سازی سوبسترا ۴۰
۳-۲-۲. تهیه مایه تلقیح ۴۱
۳-۳. افزودنیهای محیط کشت ۴۲
۳-۳-۱. اسید و باز ۴۲
۳-۳-۲. منبع نیتروژن ۴۲
۳-۳-۳. نمک ۴۲
۳-۴. آزمایشهای تخمیری ۴۲
۳-۵. روش استخراج ۴۳
۳-۶. روش اندازه‌گیری pH ۴۳
۳-۷. روش اندازه‌گیری فعالیت آنزیم اگزوپلی‌گالاکترونار ۴۳
۳-۸. روش اندازه‌گیری فعالیت آنزیم اندوپلی‌گالاکترونار ۴۵
۳-۹. روش اندازه‌گیری فعالیت پکتین‌لیاز ۴۷
۳-۱۰. روش تاگوچی در طراحی آزمایشها ۴۸
۳-۱۱. متغیرها و سطوح بررسی شده در روش آماری تاگوچی ۵۰

فصل۴ ۵۲

نتایج و بحث ۵۲
۴-۱. مقدمه ۵۳
۴-۲. تاثیر عوامل موثر بر فعالیت اگزوپلی‌گالاکترونار در طراحی تاگوچی ۵۴
۴-۲-۱. اثر ترکیب‌درصد تفاله‌سیب به سبوس‌گندم بر تولید اگزوپلی‌گالاکترونار ۵۴
۴-۲-۲. اثر رطوبت بر فعالیت اگزوپلی‌گالاکترونار ۵۷
۴-۲-۳. اثر منبع نیتروژنی بر فعالیت اگزوپلی‌گالاکترونار ۵۸
۴-۲-۴. اثر دما بر فعالیت اگزوپلی‌گالاکترونار ۶۰
۴-۲-۵. اثر pH بر فعالیت اگزوپلی‌گالاکترونار ۶۲
۴-۳. آنالیز واریانس و پیش‌بینی شرایط بهینه تولید اگزوپلی‌گالاکترونار ۶۴
۴-۴. اثر عوامل موثر بر فعالیت پکتین‌لیاز ۶۹
۴-۴-۱. اثر ترکیب درصد تفاله‌سیب و سبوس‌گندم برفعالیت پکتین‌لیاز ۶۹
۴-۴-۲. اثر رطوبت بر فعالیت پکتین‌لیاز ۷۱
۴-۴-۳. اثر منبع نیتروژنی بر فعالیت پکتین‌لیاز ۷۳
۴-۴-۴. اثر دما بر فعالیت پکتین‌لیاز ۷۵

۴-۴-۵. اثر pH بر فعالیت پکتین‌لیاز ۷۷
۴-۵. آنالیز واریانس و پیش‌بینی شرایط بهینه تولید پکتین‌لیاز ۷۹
۴-۶. اثر عوامل موثر بر فعالیت اندوپلی‌گالاکتروناز ۸۴
۴-۷. اثر عوامل موثر بر فعالیت آمیلاز ۸۴
۴-۷-۱. اثر ترکیب درصد تفاله‌سیب و سبوس گندم بر فعالیت آمیلاز ۸۴
۴-۷-۲. اثر رطوبت بر فعالیت آمیلاز ۸۵
۴-۷-۳. اثر میزان منبع نیتروژنی بر فعالیت آمیلاز ۸۶
۴-۷-۴. اثر دما برفعالیت آمیلاز ۸۷
۴-۷-۵. اثر pH بر فعالیت آمیلاز ۸۸
۴-۸. آنالیز واریانس و پیش‌بینی شرایط بهینه تولید آمیلاز ۸۹
۴-۹. روند تغییر pH در اثر گذشت زمان ۹۳
۴-۱۰. اثر زمان بر فعالیت آنزیمهای مختلف ۹۶

فصل۵ ۱۰۴

جمع‌بندی و پیشنهادات ۱۰۴
۵-۱-۱. آنزیم اگزوپلی‌گالاکتروناز ۱۰۵
۵-۱-۲. آنزیم اندوپلی‌گالاکتروناز ۱۰۶
۵-۱-۳. آنزیم پکتین‌لیاز ۱۰۶
۵-۱-۴. آنزیم آمیلاز ۱۰۶

پیوست الف
نمونه محاسبه فعالیت آنزیم‌های مختلف
الف-۱. نمونه محاسبه فعالیت اگزوپلی‌گالاکتروناز ۱۱۱
الف-۲. نمونه محاسبه فعالیت اندوپلی‌گالاکتروناز ۱۱۲
الف-۳. نمونه محاسبه فعالیت پکتین‌لیاز ۱۱۳

پیوست ب
نتایج عددی فعالیت آنزیم‌های مختلف
ب-۱. فعالیت اگزوپلی‌گالاکتروناز در روزهای مختلف ۱۱۵
ب-۲. فعالیت پکتین‌لیاز در روزهای مختلف ۱۱۶
ب-۳. فعالیت آلفا- آمیلاز در روزهای مختلف ۱۱۷

منابع و مراجع ۱۱۹

فهرست اشکال

عنوان صفحه

فصل۱ ۱

مقدمه ۱

فصل۲ ۴

مروری بر منابع مطالعاتی ۴

شکل۲-۱. پکتین میوه‌جات و آنزیمهای تجزیه‌کننده پکتین..... ۷

شکل۲-۲. مراحل آبگیری از سیب ۹

شکل۲-۳. مراحل آبگیری از انگور ۱۰

شکل۲-۴. کاربرد پکتیناز در استخراج روغن ۱۲

شکل۲-۵. طرح کلی از مراحل اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی ۱۷

شکل۲-۶. تولید پکتیناز در بستر جامد ۲۴

شکل۲-۷. ارزیابی تولید اگزو و اندوپلی‌گالاکتروناز توسط *آسپرژیلوس آواموری* روی تفاله انگور ۲۶

شکل۲-۸. اثر میزان رطوبت بر تولید اگزوپلی‌گالاکتروناز(بالا) و اندوپلی‌گالاکتروناز (پائین) ۳۲

شکل۲-۹. اثر pH بر تولید پکتین استراز از تفاله سیب در کشت جامد و غوطه‌ور ۳۴

شکل۲-۱۰. اثر زمان روی تولید پکتیناز بر مخلوط سبوس گندم و باگاس پرتقال در ارلن مایر ۳۶

شکل۲-۱۱. اثر زمان روی تولید پکتیناز بر مخلوط سبوس گندم و باگاس پرتقال در ستون پرشده ۳۶

شکل۲-۱۲. ثر زمان تخمیر بر تولید پکتین استراز از تفاله سیب در کشت جامد و غوطه‌ور ۳۷

شکل۲-۱۳. اثر زمان تماس بر فعالیت پلی گالاکتروناز..... ۳۸

شکل۲-۱۴. اثر زمان تماس بر کاهش ویسکوزیته توسط آنزیم..... ۳۸

فصل۳ ۳۹

مواد و روشها ۳۹

شکل۳-۱. نمودار استاندارد بدست آمده برای اسید گالاکترونیک..... ۴۴

شکل۳-۲. ویسکومتر استوالد..... ۴۷

فصل۴ ۵۲

نتایج و بحث ۵۲

شکل۴-۱. اثر زمان بر تولید اگزوپکتیناز در آزمایش ۱ ..... ۹۹

شکل۴-۲. اثر زمان بر تولید اگزوپکتیناز در آزمایش ۲ ..... ۹۹

شکل۴-۳. اثر زمان بر تولید اگزوپکتیناز در آزمایش ۳ ..... ۹۹

شکل۴-۴. اثر زمان بر تولید اگزوپکتیناز در آزمایش ۴ ..... ۹۹

شکل۴-۵. اثر زمان بر تولید اگزوپکتیناز در آزمایش ۵ ..... ۹۹

شکل۴-۶. اثر زمان بر تولید اگزوپکتیناز در آزمایش ۶ ..... ۹۹

شکل۴-۷. اثر زمان بر تولید اگزوپکتیناز در آزمایش ۷ ..... ۹۹

شکل۴-۸. اثر زمان بر تولید اگزوپکتیناز در آزمایش ۸ ..... ۹۹
شکل۴-۹. اثر زمان بر تولید اگزوپکتیناز در آزمایش ۹ ..... ۱۰۰
شکل۴-۱۰. اثر زمان بر تولید اگزوپکتیناز در آزمایش ۱۰ ..... ۱۰۰
شکل۴-۱۱. اثر زمان بر تولید اگزوپکتیناز در آزمایش ۱۱ ..... ۱۰۰
شکل۴-۱۲. اثر زمان بر تولید اگزوپکتیناز در آزمایش ۱۲ ..... ۱۰۰
شکل۴-۱۳. اثر زمان بر تولید اگزوپکتیناز در آزمایش ۱۳ ..... ۱۰۰
شکل۴-۱۴. اثر زمان بر تولید اگزوپکتیناز در آزمایش ۱۴ ..... ۱۰۰
شکل۴-۱۵. اثر زمان بر تولید اگزوپکتیناز در آزمایش ۱۵ ..... ۱۰۰
شکل۴-۱۶. اثر زمان بر تولید اگزوپکتیناز در آزمایش ۱۶ ..... ۱۰۰
شکل۴-۱۷. اثر نسبت تفاله‌سیب به سبوس گندم بر فعالیت اگزوپلی‌گالاکتروناز ۵۶
شکل۴-۱۸. اثر رطوبت بر فعالیت اگزوپلی‌گالاکتروناز در روزهای (الف) دوم؛ (ب) سوم؛ (ج) چهارم..... ۵۸
شکل۴-۱۹. اثر میزان منبع نیتروژنی بر فعالیت اگزوپلی‌گالاکتروناز در روزهای (الف) دوم؛ (ب) سوم؛ (ج) چهارم..... ۵۹
شکل۴-۲۰. اثر دما بر فعالیت اگزوپلی‌گالاکتروناز در روزهای (الف) دوم؛ (ب) سوم؛ (ج) چهارم ۶۱
شکل۴-۲۱. اثر pH بر فعالیت اگزوپلی‌گالاکتروناز در روزهای (الف) دوم؛ (ب) سوم؛ (ج) چهارم ۶۳
شکل۴-۲۲. اثر ترکیب درصد تفاله سیب و سبوس گندم بر تولید پکتین‌لیاز در روزهای مختلف ۷۰
شکل۴-۲۳. اثر رطوبت بر تولید پکتین‌لیاز در روزهای (الف) دوم؛ (ب) سوم؛ (ج) چهارم..... ۷۲
شکل۴-۲۴. اثر میزان منبع نیتروژنی بر تولید پکتین‌لیاز در روزهای (الف) دوم؛ (ب) سوم؛ (ج) چهارم ۷۴
شکل۴-۲۵. اثر دما بر تولید پکتین‌لیاز در روزهای (الف) دوم؛ (ب) سوم؛ (ج) چهارم ۷۶
شکل۴-۲۶. اثر pH بر تولید پکتین‌لیاز در روزهای (الف) دوم؛ (ب) سوم؛ (ج) چهارم..... ۷۸
شکل۴-۲۷. اثر ترکیب‌درصد تفاله‌سیب و سبوس‌گندم بر تولید آمیلاز در روزهای: (الف) دوم ؛ (ب) چهارم. ۸۵
شکل۴-۲۸. اثر رطوبت بر تولید آمیلاز در روزهای (الف) دوم؛ (ب) چهارم..... ۸۶
شکل۴-۲۹. اثر میزان منبع نیتروژنی بر تولید آمیلاز در روزهای (الف) دوم؛ (ب) چهارم..... ۸۷
شکل۴-۳۰. اثر دما بر تولید آمیلاز در روزهای (الف) دوم؛ (ب) چهارم ۸۸
شکل۴-۳۱. اثر pH بر تولید آمیلاز در روزهای (الف) دوم؛ (ب) چهارم..... ۸۹
شکل۴-۳۲. روند تغییر pH در آزمایش ۱..... ۹۴
شکل۴-۳۳. روند تغییر pH در آزمایش ۲..... ۹۴
شکل۴-۳۴. روند تغییر pH در آزمایش ۳..... ۹۴
شکل۴-۳۵. روند تغییر pH در آزمایش ۴..... ۹۴
شکل۴-۳۶. روند تغییر pH در آزمایش ۵..... ۹۴
شکل۴-۳۷. روند تغییر pH در آزمایش ۶..... ۹۴
شکل۴-۳۸. روند تغییر pH در آزمایش ۷..... ۹۴
شکل۴-۳۹. روند تغییر pH در آزمایش ۸..... ۹۴
شکل۴-۴۰. روند تغییر pH در آزمایش ۱..... ۹۵
شکل۴-۴۱. روند تغییر pH در آزمایش ۱..... ۹۵
شکل۴-۴۲. روند تغییر pH در آزمایش ۱۱ ..... ۹۵
شکل۴-۴۳. روند تغییر pH در آزمایش ۱۲ ..... ۹۵
شکل۴-۴۴. روند تغییر pH در آزمایش ۱۳ ..... ۹۵
شکل۴-۴۵. روند تغییر pH در آزمایش ۱۴ ..... ۹۵
شکل۴-۴۶. روند تغییر pH در آزمایش ۱۵ ..... ۹۵
شکل۴-۴۷. روند تغییر pH در آزمایش ۱۶ ..... ۹۵

فصل۵ ۱۰۴

جمع‌بندی و پیشنهادات ۱۰۴

فهرست جداول

عنوان صفحه

فصل۱ ۱

مقدمه ۱

فصل۲ ۴

مروری بر منابع مطالعاتی ۴

جدول۲-۱. تقسیم‌بندی مواد پکتیکی بر اساس درجه استری ۶

جدول۲-۲. مقایسه تخمیر حالت جامد و غوطه‌ور ۱۳

جدول۲-۳. دسته‌بندی کاربردهای تخمیر حالت جامد ۱۴

جدول۲-۴. مقایسه انواع آنزیمهای تولید شده در SSF و SmF توسط *آسپرژیلوس نایجر* ۱۶

جدول۲-۵. میکروارگانیسم‌های استفاده شده برای تولید پکتیناز در مراجع ۲۲

جدول۲-۶. تولید پکتیناز توسط *ترموآسکاس آرانتی‌آکاس* ۲۵

جدول۲-۷. اثر منبع کربنی طبیعی بر تولید پکتیناز ۲۷

جدول۲-۸. اثر منبع کربنی سنتزی بر تولید پکتیناز ۲۷

جدول۲-۹. تولید پکتیناز روی سبوس گندم با استفاده از منابع نیتروژنی مختلف ۲۹

جدول۲-۱۱. اثر منابع نیتروژنی مختلف بر تولید پکتین استراز در تخمیر غوطه‌ور و جامد توسط ۳۰

فصل۳ ۳۹

مواد و روشها ۳۹

جدول۳-۱. عوامل مورد مطالعه و سطوح آنها در طراحی آزمایش ها به روش آماری تاگوچی ۵۰

جدول۳-۲. آرایه متعامد M_{16} در طراحی آماری تاگوچی برای ۵ عامل ۴ سطحی ۵۱

فصل۴ ۵۲

نتایج و بحث ۵۲

جدول۴-۱. آنالیز واریانس طراحی تاگوچی در تولید اگزوپلی‌گالاکتروناز برای روز دوم ۶۴

جدول۴-۲. شرایط و نقطه بهینه پیشبینی شده در تولید اگزوپلی‌گالاکتروناز در روز دوم ۶۵

جدول۴-۳. آنالیز واریانس طراحی تاگوچی در تولید اگزوپلی‌گالاکتروناز برای روز سوم ۶۵

جدول۴-۴. شرایط و نقطه بهینه پیش‌بینی شده در تولید اگزوپلی‌گالاکتروناز در روز سوم ۶۶

جدول۴-۵. آنالیز واریانس طراحی تاگوچی در تولید اگزوپلی‌گالاکتروناز برای روز چهارم ۶۶

جدول۴-۶. شرایط و نقطه بهینه پیش‌بینی شده در تولید اگزوپلی‌گالاکتروناز در روز چهارم ۶۷

جدول۴-۷. مقایسه سطوح بهینه برای تولید اگزوپلی‌گالاکتروناز در روزهای مختلف ۶۸

جدول۴-۸. تولید بهینه اگزوپلی‌گالاکتروناز در روزهای مختلف ۶۸

جدول۴-۹. آنالیز واریانس برای تولید پکتین‌لیاز در روز دوم ۸۰
جدول۴-۱۰. شرایط و نقطه پیش‌بینی شده برای تولید پکتین‌لیاز در روز دوم ۸۰
جدول۴-۱۱. آنالیز واریانس برای تولید پکتین‌لیاز در روز سوم ۸۱
جدول۴-۱۲. شرایط و نقطه پیش‌بینی شده برای تولید پکتین‌لیاز در روز سوم ۸۱
جدول۴-۱۳. آنالیز واریانس برای تولید پکتین‌لیاز در روز چهارم ۸۲
جدول۴-۱۴. شرایط و نقطه پیش‌بینی شده برای تولید پکتین‌لیاز در روز چهارم ۸۲
جدول۴-۱۵. مقایسه سطوح بهینه برای تولیدپکتین‌لیاز در روزهای مختلف ۸۳
جدول۴-۱۶. تولید بهینه پکتین‌لیاز در روزهای مختلف ۸۳
جدول۴-۱۷. آنالیز واریانس برای تولید آمیلاز در روز دوم ۹۰
جدول۴-۱۸. شرایط و نقطه بهینه پیش‌بینی شده برای تولید آمیلاز در روز دوم ۹۰
جدول۴-۱۹. آنالیز واریانس برای تولید آمیلاز در روز چهارم ۹۱
جدول۴-۲۰. شرایط و نقطه بهینه پیش‌بینی شده برای تولید آمیلاز در روز چهارم ۹۱
جدول۴-۲۱. مقایسه سطوح بهینه برای تولیدپکتین‌لیاز در روزهای مختلف ۹۲
جدول۴-۲۲. تولید بهینه پکتین‌لیاز در روزهای مختلف ۹۲

فصل۵ ۱۰۴

جمع‌بندی و پیشنهادات ۱۰۴

فصل۱

مقدمه

۱-۱. مقدمه

آنزیم‌ها کاتالیزورهای بیولوژیکی هستند و تولید آنها یکی از زمینه‌های رو به رشد در زیست‌فناوری بشمار می‌آید. بیشترین کاربرد آنزیم‌ها در صنایع آبمیوه، شوینده‌ها، نساجی، چرم، فراوری خوراک دام و مصارف آزمایشگاهی و تشخیصی است. در طبیعت حدود ۷۰۰۰ آنزیم وجود دارد که فقط ۱۰۰ تای آنها دارای کاربردهای صنعتی می‌باشد. درآمد سالیانه از تجارت آنزیم‌ها در حدود ۳-۲ بیلیون دلار گزارش شده است. این رقم با رشدی برابر ۱۰٪ در سال روبروست. کشورهای اروپایی با نیروی انسانی حدود ۵۰۰۰ نفر، ۷۰٪ صنایع مربوط به آنزیم را به خود اختصاص می‌دهند.

آنزیم‌هایی که هیدرولیز سوبستراهای حاوی پکتین را بعهده دارند بعنوان آنزیم‌های پکتیکی[1] یا پکتینازها [2] شناخته می‌شوند. با وجود اینکه این آنزیم‌ها از مصارف اجتناب‌ناپذیر صنایع آبمیوه بشمار می‌آیند و علی‌رغم صورت گرفتن تحقیقات داخلی در این زمینه، هنوز تولید صنعتی آن میسر نشده است، این در حالی است که متوسط مصرف این آنزیم در یک کارخانه بزرگ تولید آبمیوه در ایران حدود ۲۰۰۰kg در سال است. بنابراین صنعت آبمیوه با نیازی حدود ۲۰۰۰۰kg در سال مواجه است. در حال حاضر واردات این آنزیم از کشورهای آلمان و فرانسه صورت می‌گیرد. از سوی دیگر دفع صحیح ضایعات امروزه یکی از مسائل چالش برانگیز صنایع بشمار می‌آید. همچنین ارتقای ارزش ضایعات بروش زیستی[3] یکی از کاربردهای ارزشمند زیست‌فناوری محسوب می‌شود. محرز بودن تولید بالاتر آنزیم‌ها در کشت حالت جامد، زمینه‌ساز کاربردهای مکرر این روش بوده است. با توجه به خلا موجود در زمینه تولید آنزیم‌های مورد نیاز صنایع، تحقیق حاضر با رویکردی جدید، تلاش دیگری است در جهت تاکید بر لزوم تولید صنعتی آنزیم‌ها در کشور. در این تحقیق تولید همزمان تعدادی از آنزیم‌های هیدرولیتیکی (آنزیم‌های پکتیناز و آلفا- آمیلاز) بروش تخمیر حالت جامد با استفاده از مخلوط تفاله سیب و سبوس گندم به عنوان سوبسترای ارزان قیمت مورد مطالعه قرار گرفته است. بدین منظور اثر پنج عامل اثرگذار بر تولید (بنا بر منابع مورد مطالعه) در چهار سطح با استفاده از روش آماری تاگوچی بررسی و نتایج در روزهای مختلف آزمایش بهینه‌سازی شده است.

در فصل دوم مختصری درباره پکتین و تقسیم‌بندی آنزیم‌های پکتینولیتیکی و همچنین کاربرهای آن در صنایع مختلف آورده شده است. در ادامه روش‌های مختلف تولید پکتیناز ومقایسه آنها، اصول اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی، روشهای مختلف اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های پکتیناز و مروری بر مطالعات انجام‌گرفته در جهت تولید پکتیناز آمده است. پس از ارائه مواد و روشهای استفاده شده در

[1] Pectic enzymes
[2] Pectinase
[3] Bio-upgrading

فصل سوم، نتایج حاصل از آزمایشات در فصل چهارم آورده شده است. درنهایت فصل پنجم به نتیجه-گیری و ارائه پیشنهادات اختصاص یافته است.

فصل ۲

مروری بر منابع مطالعاتی

۲-۱. مقدمه

هدف این فصل آشنا شدن با کلیاتی درباره تعاریف گوناگون مرتبط با آنزیم پکتیناز و همچنین معرفی تحقیقاتی است که هریک از نقطه نظر خاص خود، تولید پکتیناز را مورد بررسی قرار داده‌اند. این فصل با تعریف پکتین، تقسیم‌بندی مواد پکتیکی، آنزیم‌های گروه پکتیناز و کاربرد آنها در صنایع مختلف، روشهای تولید و مقایسه آنها آغاز می‌شود. در ادامه مفاهیم اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی و روشهای استفاده شده برای سنجش فعالیت هریک از آنزیم‌ها آورده شده است. در نهایت به معرفی مطالعات انجام گرفته در راستای تولید پکتیناز پرداخته شده است.

۲-۲. پکتین

پکتین و سایر مواد پکتیکی، پلی‌ساکاریدهای پیچیده‌ای هستند که در استحکام ساختار بافت‌های گیاهی بعنوان لایه میانی نقش دارند. واحد اصلی در مواد پکتیکی، گالاکترونان (آلفا-دی-گالاکترونان) است. مواد پکتیکی به دو دسته تقسیم می‌شوند، هموگالاکترونان[1] و هتروگالاکترونان[2] (رامنوگالاکترونان). در هموگالاکترونان زنجیره اصلی از واحدهای آلفا- دی- گالاکترونان که توسط اتصال گلوکوزیدی α(۱→۴) تشکیل شده است، درحالیکه در رامنوگالاکترونان، زنجیره اصلی از اتصال α(۱→۴) واحدهای آلفا- دی- گالاکترونات بهمراه ۴-۲٪ ال- رامنوز که توسط اتصال β(۱→۴) و β(۱→۲) به دی- گالاکترونات متصل شده‌اند، تشکیل شده است. شاخه‌های جانبی رامنوگالاکترونان معمولا از واحدهای ال- آرابینوز یا دی-گالاکترونیک‌اسید تشکیل شده است.

در بافت‌های گیاهی ۷۰-۶۰٪ از واحدهای گالاکترونات، با متانول یا اتانول استری شده‌اند. بر اساس درجه استری شدن، مواد پکتیکی به پروتوپکتین، پکتینیک‌اسید و پلی‌گالاکترونیک اسید تقسیم می‌شوند (جدول۲-۱). اندازه مولکولی، درجه استری شدن و وزن باقیمانده‌های پلی‌گالاکترونیک‌اسید مهم بوده و در ناهمگنی مواد پکتیکی تاثیرگذار می‌باشد. جرم مولکولی نسبی مواد پکتیکی که از منابع مختلفی همچون مرکبات، سیب و خرما بدست آمده‌اند، ۲۵-۳۵۰kDa است (Gummadi et al. 2007).

[1] Homogalacturonan
[2] Hetrogalacturonan

جدول۲-۱. تقسیم‌بندی مواد پکتیکی بر اساس درجه استری (Gummadi et al. 2007)

Pectic substances	Structural description	Properties
Protopectin	Galacturonate units linked by α-1,4-glycosidic linkages. The carboxyl groups are highly esterified with methanol. Polymer is highly cross-linked with Ca^{2+} or with other polysaccharides	Insoluble in water. Degree of esterification > 90%
Pectin	Galacturonate units linked by α-1,4-glycosidic linkages. The carboxyl groups are esterified with methanol	Soluble in water. Degree of esterification at least 75%
Pectinic acid	Galacturonate units linked by α-1,4-glycosidic linkages. The carboxyl groups are slightly esterified with methanol	Soluble in water. Degree of esterification varies between 0 and 75%
Pectic acid	Galacturonate units linked by α-1,4-glycosidic linkages.	Soluble in water. Degree of esterification 0
Rhamnogalacturonan	Galacturonate units linked by α-1,4-glycosidic linkages with rhamnose units lined by β-1,2 and β-1,4 linkages. The side chains are homogeneous polymers of galacturonic acid and arabinose	Soluble in water.

۲-۳. پکتیناز

پکتینازها، انواعی از آنزیم‌های پیچیده هستند که تجزیه مواد پکتیکی را بعهده دارند. پکتینازها بر اساس ۳ اصل تقسیم‌بندی می‌شوند: ۱- سوبسترای مناسب آنها چه باشد. ۲- بر اساس مکانیسم هیدرولیز یا حذف ترانس[1] عمل کنند. ۳- شکست پیوندها بصورت اندو باشد یا اگزو (Kashyap et al. 2000).

پکتینازها با تجزیه مواد پکتیکی به گالاکترونان‌های اشباع و غیراشباع در طبیعت بعنوان عامل چرخش کربن عمل کرده و سپس به ۵- کتو- دئوکسی- اورونات و در نهایت به پیروات و ۳- فسفو-گیلیسیرآلدهید تجزیه می‌شوند. در شکل (۲-۱) آنزیم‌های مختلف پکتیناز بر اساس تاثیر بر قسمت-های مختلف پکتین نشان داده شده است.

[1] Trans-elimination