بررسی و بهینه سازی تولید آنزیمهای آمیلولیتیک توسط قارچ *Trichoderma longibrachiatum* با استفاده از روش آماری تاگوچی

رویا مروج[۱،*] و مهرداد آذین[۲]

[۱]سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سنندج، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

[۲]تهران، سازمان پژوهشهای علمی صنعتی ایران، پژوهشکده بیوتکنولوژی

تاریخ دریافت: ۸۸/۹/۹ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۲/۹

چکیده

فرآیند تخمیر میکروبی در بستر جامد پتانسیل تولید آنزیمها با هزینه کم در حجمهای وسیع صنعتی را داراست. در این بررسی از قارچ *Trichoderma longibrachiatum* به منظور تولید آنزیمهای آمیلولیتیک بر روی بستر جامد کاه و سبوس گندم استفاده شد و جهت بهینه سازی شرایط کشت و تولید، از روش آماری تاگوچی استفاده شد. با این طراحی اثر پنج فاکتور شامل دما، میزان تلقیح، نوع منبع نیتروژنی، pH و رطوبت روی میزان تولید آنزیم مورد بررسی قرار گرفت. بالاترین مقدار آنزیم تولید شده در شرایط بهینه (رطوبت ۵۵ درصد، pH ۶/۵، دما ۲۵ درجه سانتی گراد، میزان تلقیح 10^6 و منبع نیتروژنی $(NH_4)_2SO_4$) U/g ۳۶۳/۸ به دست آمد که نسبت به مقادیر حاصل از آزمایشهای قبل از بهینه سازی، ۷/۱ درصد افزایش نشان می‌دهد.

واژه های کلیدی: بهینه سازی، آمیلاز، روش آماری تاگوچی، بستر جامد، *تریکودرما لانگی براکیاتوم*

* نویسنده مسئول، تلفن : ۲۲۲۴۴۲۱۹ پست الکترونیکی: microbiology.m@gmail.com

مقدمه

حدود نود درصد از کل آنزیمهای صنعتی توسط میکروارگانیسم ها تولید می شود. آمیلازها آنزیمهایی هستند که نشاسته را هیدرولیز می کنند و شامل آلفا آمیلازها و گلوکوآمیلازها می باشند. اکثر باکتریها، مخمرها و قارچها قادر به تولید آمیلاز می باشند (۴ و ۶). *Aspergillus oryzae* و *Rhizopus sp.* از جمله قارچهای مهم تولید کننده آنزیمهای آمیلولیتیک می باشد. این آنزیمها در صنایع غذایی به خصوص نانوایی برای ساکاریفیکاسیون نشاسته و ور آمدن خمیر نان، در صنعت کاغذ سازی جهت افزایش درجه خشک کردن کاغذ، در نساجی، جهت نرم شدن فیبرهای کتانی ثانویه، در شوینده ها و پاک کننده ها برای افزایش قدرت پاک کنندگی، همچنین در تولید غذای دام و طیور به عنوان مکمل غذایی کاربرد دارد (۴). قارچ تریکودرما از کلاس هیفومیست ها یکی از شاخص ترین تولید کنندگان آنزیمهای صنعتی محسوب می شود. میسلیومهای این قارچ به راحتی در داخل بستر جامد نفوذ کرده و در رطوبتهای پایین و فشار اسمزی بالا نسبتاً پایدارند (۱۴ و ۲۲). در حال حاضر اطلاعات کمی مربوط به تولید و فعالیت آنزیم آمیلاز گونه های تریکودرما وجود دارد و بیشتر تحقیقات انجام شده در رابطه با تولید آنزیمهای سلولاز و همی سلولاز این قارچ می باشد(۱۸). S. Nagai و همکارانش (۱۹۶۷) بر روی تولید آمیلاز و سلولاز در محیط کشت مایع حاوی محلول نشاسته از گونه ای تریکودرما بررسی انجام دادند (۱۶). S. Rahman و همکارش در گزارش تحقیقی خود بالاترین مقدار فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز حاصل از *T.viridae* را در محیط حاوی نشاسته محلول، ۰/۵۱ U/ml عنوان کردند(۲۱). از مهم ترین عواملی که روی سنتز آنزیمهای میکروبی در طی

فرآیندهای صنعتی اهمیت دارد، نوع میکروارگانیسم و سوبسترای مصرفی جهت تولید آنزیم می باشد. یکی از روشهای صنعتی مورد استفاده جهت فرآیندهای تخمیری، روش کشت بر بستر جامد (Solid-state fermentation) یا SSF می باشد که در این حالت از ضایعات کشاورزی می توان به عنوان منبع کربنی استفاده نمود (۲، ۶ و ۸). Zambare در بررسی خود مقدار فعالیت آنزیم گلوکوآمیلاز حاصل از قارچ *Aspergillus oryzae* روی سبوس گندم را ۱۶۶۶U/g گزارش نمود (۳۰)، ولیکن در رابطه با فعالیت آمیلولیتیکی *T. longibrachiatum* بر بستر جامد اطلاعات مشابهی وجود ندارد. امروزه استفاده از روشهای آماری جهت طراحی آزمایشها بسیار مرسوم است. استفاده از روشهایی مانند Response surface Methodology (RSM) و Plackett-Burman در طراحی آزمایشهای فرآیندهای بیولوژیکی متداول است. از روش RSM برای تولید آمیلاز توسط *Bacillus brevis* استفاده شده است و بیشترین فعالیت آنزیم تا ۱۴/۷۵۲ U/g محاسبه گردیده است (۲۳). Gouda و همکارش بهینه سازی محیط کشت را برای تولید آمیلاز با استفاده از روش Plackett-Burman انجام داد (۱۰). روش آماری تاگوچی در مقایسه با سایر روشهای آماری نظیر فاکتوریل کامل و غیره نیاز به زمان کمتری دارد. بنابراین با صرف هزینه، وقت و تعداد آزمایشهای کمتر می توان به شرایط بهینه تولید دست یافت (۱، ۳، ۷، ۹ و ۲۶).

هدف از بررسی حاضر بهینه سازی محیط کشت قارچ *T. longibrachiatum* توسط روش آماری تاگوچی جهت تولید آنزیمهای آمیلولیتیک بود. در این تحقیق از مخلوط کاه و سبوس گندم به عنوان منبع کربن کشت قارچ استفاده شد و سایر عوامل دخیل بر تولید آنزیم، مانند دما، pH، میزان تلقیح، رطوبت و نوع منبع نیتروژنی در محیط کشت، مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روشها

میکرو ارگانیسم: در این بررسی از قارچ *T. longibrachiatum* PTCC 5140 استفاده گردید که از مرکز کلکسیون میکروبی سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران تهیه گردید. به منظور نگهداری و آماده سازی، قارچ تریکودرما روی محیط PDA به صورت شیبدار کشت داده شد و ۴ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری گردید. هر ماه یکبار از نمونه مادر کشت مجدد تهیه می شد (۲۲ و ۲۴).

اجزای محیط کشت: کاه گندم [Wheat straw (WS)] با مش ۴۰ و سبوس گندم [Wheat bran (WB)] با مش ۱۸ از منابع داخلی تهیه گردید. به عنوان منبع کربن، از ده گرم مخلوط کاه و سبوس گندم با نسبتهای مختلف، از ۹:۱ تا ۱:۹، در کنار شاهد (نسبت ۰:۱۰ و ۱۰:۰) استفاده شد. به عنوان منبع نیتروژنی، چهار منبع $(NH_4)_2SO_4$، $(NH_4)_2HPO_4$، پپتون (مرک) و پودر عصاره ذرت [PCSL] (توسط اسپری درای کردن corn steep liquor تهیه شده از کارخانه گلوکزان) به هر ارلن اضافه شد. مقدار ازت هر یک از منابع نیتروژنی مورد استفاده به روش کلدال محاسبه و با در نظر گرفتن مقدار یکسان نیتروژن به محیط کشت اضافه گردید (۱۸، ۲۵ و ۲۹). در این تحقیق از محلول نمکی تویاما (Toyama's mineral solution)، شامل مواد زیر (در لیتر): ۰.۵ گرم $MgSO_4.7H_2O$، ۰.۵ گرم CaCl2. 2H2O و۳ گرم H_2PO_4 استفاده شد (۲۲ و ۲۴).

شرایط کشت: برای تولید آنزیم ۱۰ گرم از هر یک از این مخلوطها در ارلنهای ۲۵۰ میلی لیتری ریخته شد. به منظور بررسی میزان مورد نیاز از نمکها، غلظتهای ×۱، ×۳، ×۵ و ×۷ از محلول نمکی ساخته شد. به عنوان شاهد، یک محیط با افزودن آب مقطر بدون املاح نیز تهیه گردید. محلولهای نمکی پس از سترون سازی و در شرایط استریل به ۱۰ گرم بستر جامد اضافه شد به نحوی که درصد رطوبت مورد انتظار در محیط نیز تأمین گردد.

تلقیح به وسیله شستشوی سطح کشت شیبدار PDA با ۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر حاوی ۰.۱ درصد توئین (Tween 80®) تهیه شد و تعداد کنید یوسپورها توسط لام نئوبار شمارش شد. تلقیح به طریقی انجام شد که برروی مقدار رطوبت در نظر گرفته شده برای بستر جامد تأثیری نداشته باشد. pH اولیه، در مایع اضافه شده به شکل مایه تلقیح و محلول نمکی، طبق طراحی آزمایشها، با کمک KH_2PO_4 یا K_2HPO_4 ۱۰۰ میلی مولار نرمال تنظیم شد. ارلنهای تلقیح شده در دماهای مورد نظر تا ۹۶ ساعت گرماگذاری گردید (۶ و ۱۹). تمام تیمارها به منظور کاهش خطای آزمایشها در ۴ تکرار صورت پذیرفت (۱۳).

طراحی آزمایشها : روشهای یک فاکتور در زمان (one-factor-at-a-time)(۱۱) و تاگوچی (۲۶)، برای بهینه‌سازی شرایط کشت به کار گرفته شد. مقدار نیتروژن، نسبت نمکهای معدنی به بستر جامد و نسبت سبوس گندم به کاه گندم با روش یک فاکتور در زمان بهینه شد. بهینه‌سازی ۵ فاکتور دیگر شامل: درصد رطوبت، دما، pH، میزان تلقیح و نوع منبع نیتروژنی، طبق جدول ۱، با روش تاگوچی مورد مطالعه قرار گرفتند. در این روش با استفاده از آرایه متعامد L-16، شانزده تیمار مختلف طراحی و به اجرا درآمد (جدول ۲). بر اساس نتایج اولیه به دست آمده، یک آزمون تأییدی (verification test) نیز به منظور تأیید نقطه بهینه انجام شد (۹ و ۲۶). برروی نتایج به دست آمده آنالیز واریانس صورت پذیرفت. از نرم افزار Qualitek-4® (شرکت Nutek, Inc. آمریکا) برای طراحی آزمایشها و آنالیز نتایج استفاده شد

بر اساس جدول (۲) هر ۱۶ محیط تهیه و اتوکلاو شدند. برای هر مرحله تلقیح پس از تهیه سوسپانسیون اسپور در شرایط استریل، مقادیر تعیین شده اسپور به محیط مربوطه اضافه گردید. سپس همه نمونه ها به مدت ۷۲ ساعت در دماهای مربوطه گرمخانه گذاری شدند(۱۲).

جدول ۱- فاکتورها و سطوح مورد استفاده در طراحی آزمایشها با روش تاگوچی

فاکتورها	سطح ۱	سطح ۲	سطح ۳	سطح ۴
رطوبت (٪ وزنی)	۵۰	۵۵	۶۰	۶۵
دما	۲۵	۲۸	۳۱	۳۳
pH	۴/۵	۵/۵	۶/۵	۷
میزان تلقیح (spore/g substrate)	$۱۰^{۵}$	$۱۰^{۶}$	$۱۰^{۷}$	$۱۰^{۸}$
نوع منبع نیتروژنی	Peptone	PCSL	$(NH_4)_2SO_4$	$(NH_4)_2HPO_4$

جدول ۳- تحلیل واریانس نتایج

درصد سهم *(P%)	جمع خالص (S')	F-ratio (F)	واریانس (V)	مجموع مربعات (S)	درجه آزادی (F)	فاکتور
۹.۷۶	۲۸۳۰۳.۲	۵۰.۴۵	۹۶۲۵.۱۹	۲۸۸۷۵.۵۸	۳	رطوبت
۶۷.۴۴۲	۱۹۵۵۵۸.۳۴	۳۴۲.۶۵	۶۵۳۷۶.۹۱	۱۹۶۱۳۰.۷۳	۳	دما
۵.۶۹	۱۶۵۰۱.۱۶	۲۹.۸۳	۵۶۹۱.۱۸	۱۷۰۷۳.۵۵	۳	pH
۱.۹۵۵	۵۶۶۹.۰۷	۱۰.۹	۲۰۸۰.۴۸	۶۲۴۱.۴۵	۳	میزان تلقیح
۱۱.۰۰۵	۳۱۹۱۰.۶۳	۵۶.۷۵	۱۰۸۲۷.۶۷	۳۲۴۸۳.۰۲	۳	منبع نیتروژنی
۴.۱۴۸			۱۹۰.۷۹	۹۱۵۸.۱۸	۴۸	سایر/خطا
۱۰۰				۲۸۹۹۶۲.۵۲۴	۶۳	مجموع

سهم هر یک فاکتورها را در ایجاد تغییرات در نتایج نشان می دهد.

جدول۲- تیمارهای انجام شده و نتایج به دست آمده

تیمار	سطوح هریک از فاکتورها					نتایج
	درصد رطوبت (w/w)	دما (°C)	pH	میزان تلقیح (spore/g substrate)	منبع نیتروژنی	فعالیت آنزیمی*(U/g)
۱	۵۰	۲۵	۴/۵	10^5	Peptone	۲۹۹/۳۳± ۱۱/۹۲
۲	۵۵	۲۵	۵/۵	10^7	$(NH_4)_2HPO_4$	۲۲۱/۷۲± ۱۵/۸۶
۳	۶۰	۲۵	۶/۵	10^8	PCSL	۲۰۵/۰۶± ۹/۹۹
۴	۶۵	۲۵	۷	10^6	$(NH_4)_2SO_4$	۱۱۸/۳۸± ۷/۰۸
۵	۵۰	۲۸	۵/۵	10^6	PCSL	۳۶۱/۳۰± ۲۰/۵۷
۶	۵۵	۲۸	۴/۵	10^8	$(NH_4)_2SO_4$	۲۴۷/۶۰± ۲۵/۲۵
۷	۶۰	۲۸	۷	10^7	Peptone	۱۹۵/۷۸± ۶/۳۹
۸	۶۵	۲۸	۶/۵	10^5	$(NH_4)_2HPO_4$	۱۹۸/۷۹± ۲۲/۲۷
۹	۵۰	۳۱	۶/۵	10^7	$(NH_4)_2SO_4$	۳۱۷/۰۹± ۲/۶۹
۱۰	۵۵	۳۱	۷	10^5	PCSL	۱۶۰/۴۱± ۸/۸۳
۱۱	۶۰	۳۱	۴/۵	10^6	Peptone	۱۷۶/۳۶± ۸/۸۱
۱۲	۶۵	۳۱	۵/۵	10^8	$(NH_4)_2HPO_4$	۱۸۸/۳۸± ۱۹/۳۲
۱۳	۵۰	۳۳	۷	10^8	$(NH_4)_2HPO_4$	۳۱۷/۰۷± ۶/۴۶
۱۴	۵۵	۳۳	۶/۵	10^6	Peptone	۲۳۲/۰۲± ۱۲/۹
۱۵	۶۰	۳۳	۵/۵	10^5	$(NH_4)_2SO_4$	۱۲۶/۳۵±۷/۵۰
۱۶	۶۵	۳۳	۴/۵	10^7	PCSL	۱۵۷/۹۲±۱۰/۵۵

* نتایج ذکر شده میانگین ۴ تکرار± انحراف معیار است

استخراج آنزیم: در مرحله استخراج آنزیم ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر به همراه ۰/۱ درصد توئین، به محیطها اضافه و با دور $rev.min^{-1}$ ۲۰۰ همزده شد. سپس با فیلتر پارچه ای محیطها صاف شد و مایع رویی آن با دور $rev.min^{-1}$ ۷۰۰۰ به مدت نیم ساعت سانتریفیوژ گردید (۶ و ۸).

سنجش آنزیم: میزان فعالیت آمیلولیتیکی با استفاده از محلول (w/v) ۱ درصد نشاسته در بافر سیترات–فسفات، ۵۰ میلی مولار، pH ۵، و منحنی استاندارد قند گلوکز به روش دی نیترو سالیسیلیک اسید (DNS) بر حسب واحد بین المللی اندازه گیری شد. هر واحد فعالیت آمیلازی (U) مقدار فعالیت آنزیمی تعریف شد که قادر باشد یک میکرومول قند احیاء کننده را در یک دقیقه آزاد کند (۱۷ و ۱۹). فعالیت آنزیم به ازای گرم وزن خشک سوبسترا یا بستر جامد نشان داده شده است.

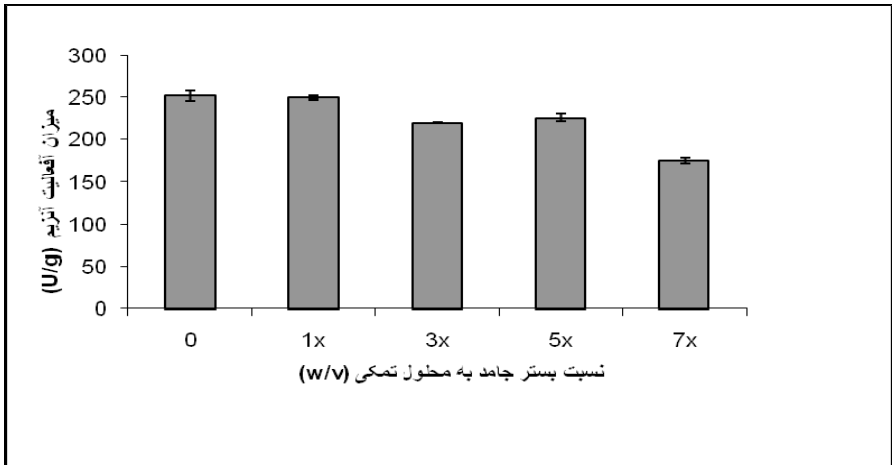
نتایج و بحث

شکل ۱ نشان می دهد در غلظتهای بالای محلول نمکی میزان تولید آنزیم کاهش می یابد و به همین علت در آزمایشهای بعد از محلول نمکی استفاده نشد، Kathiresan در بررسی خود نشان دادند که اضافه نمودن املاح به محیط کشت قارچ *پنی سیلیوم* موجب کاهش مقدار فعالیت آنزیم آمیلاز می گردد (۵ و ۱۲) تولید این آنزیم در نسبتهای ۱۰:۰، ۹:۱ و ۷:۳ سبوس به کاه تقریباً یکسان به دست آمد (فاقد اختلاف معنی دار) . مقدار فعالیت آنزیم در محیط حاوی تنها ۱۰ گرم سبوس، معادل U/g ۳۹۹/۷۳

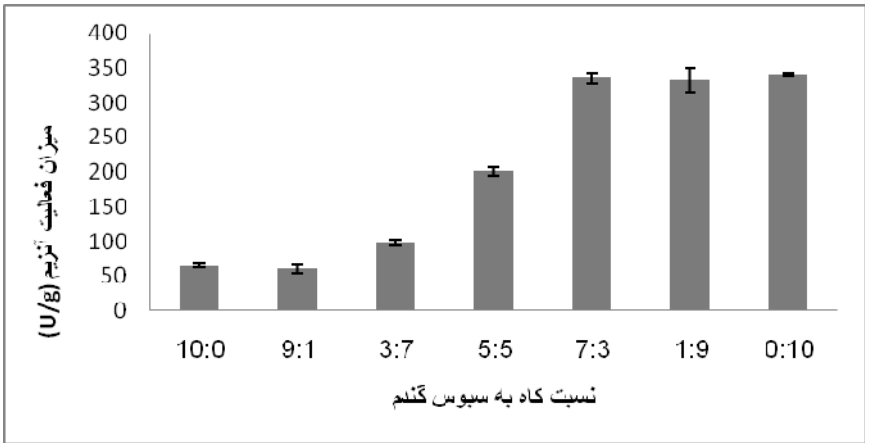
محاسبه گردید. با توجه به شکل ۲ مشخص گردید که با افزایش میزان سبوس نسبت به کاه میزان تولید آمیلاز افزایش می یابد، مقدار گلوکز موجود در سبوس نسبت به کاه بیشتر است و بنابراین سوبسترای مورد نیاز برای تولید آنزیم آمیلاز در سبوس قابل توجه است، گزارشهای متعددی در رابطه با تأثیر سبوس گندم بر افزایش تولید آمیلاز های قارچی وجود دارد، Kunamneni و همکارانش در بررسی انجام شده بر روی تولید آمیلاز یک گونه قارچی، از میان محیطهای سبوس گندم ، سبوس برنج و سبوس جو ، سبوس گندم را مناسب ترین محیط جهت افزایش تولید آنزیم دانستند (۱۵)، همچنین در تحقیقی مشابه (R. Singh، سال ۲۰۰۹) که برای بهینه سازی شرایط تولید آمیلاز توسط *Humicola sp.* بر بستر جامد صورت گرفت، از میان سایر محیطهای کشت، سبوس گندم بهترین محیط گزارش شده است(۲۸).

بنابراین با توجه به نتایج به دست آمده از این دو آزمایش، محیط اولیه ای که برای آزمایشهای تاگوچی استفاده شد حاوی ۱۰ گرم سبوس و فاقد محلول نمکی بود.

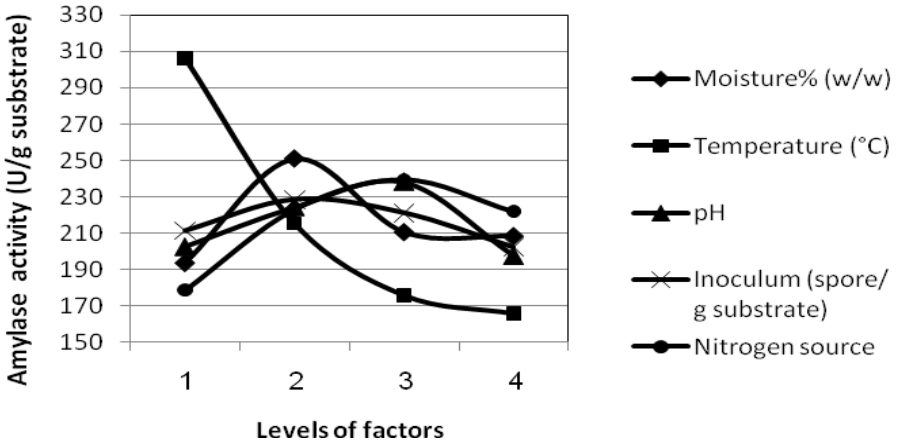
بررسی تاثیر هر یک از عوامل بر تولید آنزیم: نتایج این تحقیق مشخص نمود، رطوبت بالای ۵۵ درصد، تأثیر منفی در تولید آنزیم دارد. احتمالاً رطوبت زیاد موجب کاهش خلل و فرج سوبسترا شده و مانع انتشار اکسیژن و نفوذ آن در درون سوبسترا می گردد. رطوبت مناسب در فرآیند های تخمیر بستر جامد (SSF) حدودا بین ۸۵-۳۰ درصد متغیر است و به محیط کشت (سوبسترای مصرفی و اندازه ذرات تشکیل دهنده) و نوع میکروارگانیسم بستگی دارد (۶، ۲۰ و ۲۸). در محیطهای کشت مایع دمای ۵۰-۳۰ درجه سانتی گراد برای رشد قارچ و تولید آنزیم مناسب است، ولی در محیط کشت جامد ، دماهای بالاتر از۴۰ درجه موجب کاهش رطوبت نسبی و کاهش تولید محصول می شود (۸ و ۲۷).



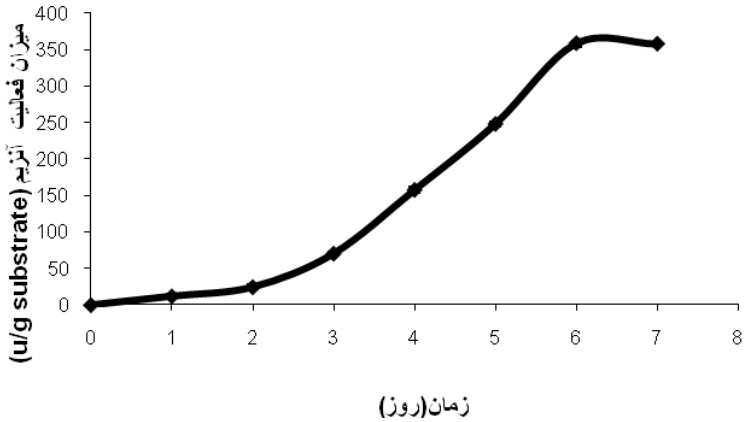
شکل ۱-تأثیر غلظتهای مختلف محلول نمکی روی تولید آمیلاز. نتایج ، میانگین چهار تکرارو انحراف معیار نیز نمایش داده شده است



شکل ۲- تأثیر نسبتهای مختلف سبوس به کاه گندم بر تولید آمیلاز. نتایج میانگین چهار تکرار است که انحراف معیار آنها نیز نمایش داده شده است



شکل ۳ - اثرات اصلی فاکتورها



شکل ۴- روند تولید آمیلاز در بستر جامد در شرایط بهینه شده

Rahman و همکارش نیز در بررسی مشابه دمای بهینه برای تولید آمیلاز از *تریکودرما* را ۳۰ درجه سانتی گراد تعیین کردند و نشان دادند با افزایش دما از مقدار آنزیم کاسته می شود (۲۱). این بررسی نشان داد که دامنه مناسب pH اولیه بین۵/۵ تا ۶/۵ متغیر می باشد. هرچند در سیستم کشت بر بستر جامد به دلیل غیر یکنواخت بودن ترکیبات

و ساختمان فیزیکی شیمیایی سوبسترای جامد تنظیم دقیق pH بسیار مشکل و تا حدی ناممکن است، اما می‌توان با استفاده از بافرهای سیترات و سیترات- فسفات تا حدی بر این موضوع فائق آمد. نتایج نشان داده است که pH شروع جهت تولید آمیلاز توسط قارچ *تریکودرما* محدوده ۷-۵ می باشد (۱۸). در کشتهای جامد برای تلقیح از اسپور قارچ بیشتر استفاده می گردد زیرا اسپورها در محیط کشت پراکنده شده و قادرند به درون ذرات سوبسترا انتقال یابند و در نتیجه رشد در کل محیط یکنواخت صورت می گیرد (۱۹،۵ و۳۱). در این تحقیق از سوسپانسیون اسپور قارچ با غلظتهای مختلف استفاده شد و نتایج نشان داد در شرایطی که به مقدار زیاد (بیش از$۱۰^{۶}$ اسپور در هر گرم سوبسترا) تلقیح انجام می شد، تنها به دلیل مصرف سریع سوبسترا توده سلولی افزایش می یافت. به علاوه، نوع منبع نیتروژنی چندان تأثیری در تولید آنزیم نداشت. عموماً در فرآیندهای صنعتی از منابع نیتروژنی که توجیه اقتصادی بهتری دارد استفاده می شود (۶، ۱۰، ۲۷ و۳۱).

شکل ۲ اثرات اصلی فاکتورها را نشان می‌دهد. همان گونه که در شکل دیده می‌شود رطوبت در سطح ۲، دما در سطح ۱، pH در سطح ۳، تلقیح در سطح ۲ و منبع نیتروژن در سطح ۳ بالاترین پاسخ را باعث شده‌اند. جدول ۳، آنالیز واریانس نتایج را نشان می دهد. طبق شکل ۳ و جدول ۳، دما با درصد مشارکت (participation) ۶۷/۴۴۲ درصد، مؤثرترین فاکتور در افزایش پاسخ بوده است، و در مقابل، میزان تلقیح کم تأثیرترین آنها بوده است.

با توجه به داده های به دست آمده، شرایط بهینه پیشنهادی برای تولید بهینه آنزیم (که معادل U/g ۳۹۹/۹۹برآورد گردید) طبق جدول ۴ نشان داده شده است. تولید آنزیم در این شرایط منتج به اخذ فعالیتی برابر U/g ۳۶۳/۸۰ گردید که نشان دهنده تنها ۹ درصد انحراف از نقطه بهینه محاسبه شده است.

جدول ۴- شرایط بهینه پیشنهاد شده جهت تولید آنزیم آمیلاز (جهت انجام آزمون تأییدی)

فاکتور	سطح پیشنهادی
رطوبت(٪)	۵۵
pH	۶/۵
دما(درجه سانتیگراد)	۲۵
میزان تلقیح اسپور	$۱۰^{۶}$
منبع نیتروژنی	$(NH_4)_2SO_4$

مقایسه تولید آنزیم آمیلاز در شرایط بهینه شده (U/g ۳۶۳.۸۰) با بالاترین میزان تولید شده (U/g ۳۳۹/۷۳) در محیط کشت اولیه (۱۰ گرم سبوس ،رطوبت ۵۰ درصد ، دما ۲۵ درجه سانتی گراد، میزان تلقیح $۱۰^{۵}$و بدون افزودن منبع ازت و تنظیمpH) نشان می دهد که با بهینه‌سازی به روش تاگوچی، به میزان تولید آنزیم ۷/۱ درصد افزوده شده است. در بررسی که توسط آقای زارع و همکارانش صورت گرفت مشخص گردید، روش آماری تاگوچی جهت بهینه سازی تولید آلفا آمیلاز توسط *آسپرژیلوس اوریزه* با روش فاکتوریل کامل مطابقت داشته وهر دو روش سطوح یکسانی را برای فاکتورهای انتخاب شده پیشنهاد نموده اند(۱).

به منظور دستیابی به بهترین زمان برای تولید آمیلاز، جهت کشت از شرایط بهینه(جدول ۴) استفاده شد و درفواصل زمانی بین ۲ الی ۷ روز گرمخانه گذاری نمونه برداری و سنجش آنزیم صورت گرفت. با توجه به نتایج، بالاترین میزان تولید آمیلاز پس از گذشت زمان شش روز گرمخانه گذاری به دست آمد (شکل ۴). این تحقیق نشان می دهد که بهترین مدت گرمخانه گذاری برای تولید ۶-۴ روز می باشد و از روز ششم به بعد میزان تولید کاهش می یابد، در بررسیهای انجام شده به منظور بهینه سازی شرایط جهت افزایش تولید آمیلاز های قارچی این مسئله تأیید شده است که معمولا بسته به نوع قارچ پس از ۱۴۴ -۹۴ ساعت گرما گذاری میزان تولید آنزیم کاهش می یابد(۱۸، ۲۰، ۲۵ و ۲۷).

منابع

۱- زارع، د.، آذین، م.،اسد،ص.،دستغیب،م.، اصغریان،ح. وکبیری،م.،۱۳۸۸،بررسی قابلیت بکارگیری روش تاگوچی در طراحی محیط کشت،بهینه سازی تولید آلفا آمیلاز توسط طراحی آماری آزمایشها،مجله زیست شناسی ایران،جلد ۲۳،صفحات۳۳۲-۳۲۱

2- Abdullah, A.L., Tengerdy, R.F. and Murphy, V.G. 1985. Optimization of solid-state fermentation of wheat straw. Biotechnol. Bioeng. 27:20-27

3- Abou-Elela G.M., Nermeen A. and Wefky, S.H. 2009. Statistical optimization of cold adapted α-amylase production by free and immobilized cells of *Nocardiopsis aegyptia*. J. App. Sci. Research. 5(3): 286-292

4- Acamovic, T. 2001. Commercial application of enzyme technology, Current applictions of dietary enzymes in poultry feeding. 456-467

5- Alva, S., Anupama, J., Savla, J., Chiu, Y., Vyshali, P., Shruti, M., Yogeetha, B. S. 2008. Production and characterization of fungal amylase enzyme isolated from Aspergillus sp. JGI 12 in solid state culture. Afr. J. Biotech. 6: 576-581

6- Balkan, B. and Ertan, F. 2007. Production of a-Amylase from *Penicillium chrysogenum* under Solid-State Fermentation by Using Some Agricultural By-Products. Food .Technol. Biotechnol. 45: (4) 439–442

7- Banerjee, R.,Negi, S. 2006. Optimization of Amylase and Protease Production from *Aspergillus awamori* in Single Bioreactor through EVOP Factorial Design technique Food Technol. Biotechnol. 44 :257–261

8- Channel, E. and Young, M. 1980. Solid-state fermentation system. Process Biochem. 15:2- 7, 24-28

9- Fraley, S., Oom, M., Terrien, B., Zalewski, J. 2007. Design of experiments via taguchi methods: orthogonal arrays. The Michigan chemical process dynamics and control open textbook

10- Gouda, M. and Elbahloul, Y. 2008. Statistical Optimization and Partial Characterization of Amylases Produced by Halotolerant Penicillium Sp. World Journal of Agricultural Sciences 4 (3): 359-368

11-Haaland, D.P. Experimental design in biotechnology. New York:Marcel Dekker Inc,, 1989, ISBN 0-8247-7881-2

12-Haq, I., Mukhtar, H. 2006. Consortia of Aspergillus niger and Trichoderma viride and Bio-Synthesis of Gluco-Amylase. J. Appli. Sci. Res., 2(9): 553-558

13- Hu, X., Lanping, S., Daqing, Z., , Bin, Z., Yazhong, S., Yahua W. 2008. Production of α-amylase by *Aspergillus oryzae* As 3951 in solid state fermentation using spent brewing grains as substrate. J. Sc. Food and Agriculture. 88:529-535

14- Kathiresan, K. and Manivann, S. 2006**.** Amylase production by *Penicillium fellutanum* isolated from mangrove rhizosphere soil . African Journal of Biotechnology 5 : 829-832

15-Kunamneni, A., Permaul, K., Sing, S. 2005. Amylase production in solid state fermentation by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* . J. Biosc. Bioeng.,100:168-171

16-Nagai S., Onodera M., Aiba S. 1976. Kinetics of extracellular cellulase and amylase production from Trichoderma sp. Eur. J. Appl. Microbiol., 3: 9-18.

17- Miller, G. (1959) Use of dinitrosalicylicacid reagent for determination of reducing sugar, Anal. Chem. 31:426-428

18-Pacheo Chavez, R.A., Carvalho, J.V.M., Converti, A.,Perego, P., 2004. Production of α-amylase and glucoamylase from different starches by a new Trichoderma sp. Isolate, Annals of Microbiol. 54(2):169-180

19- Pitt, J.I. and Hoking, A.D. 1999. Fungi and Food Spoilage. Aspen publication.165-167

20- Pushpa S., Murthy , M., Madhava Naidu, Pullabhatla S.,2009. Production of Ɑ-amylase under solid-state fermentation utilizing coffee waste.J. Chem. Tech. Biotech.84:1246-1249

21-Rahman, S.R., Mohamad, S., 2008. Production and Partial Characterization of Extracellular α-Amylase by *T.viridae*. Bangoladesh. J. Microbiol. 5:99-103

22- Rarai, M.A. 1969. Aversion of the genus *Trichoderma*. Mycology paper C.M.I 116. 1-56

23- Ray, R. c., Kar, S. 2009. Statistical optimization of α-amylase production by *Bacillus brevis* MTCC 7521 in solid-state fermentation using cassava bagasse. Biologia. 64(5): 864-870

24- Ridder, E.R, NoKes, S.E., Knutson, B.L. 1998. Optimizotion of solid - state fermentation parameters for the production of xylanase by *T.longibrachiatum* on wheat bran, Transaction of the ASAE. 41: 1453-1459

25- Rosés, R., and Guerra N. 2009. Optimization of amylase production by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation using sugarcane bagasse as solid support,World. J. Microb. Biotech. orginal paper online.

26- Roy, R.K. (1990) A primer on the Taguchi method , Nostrand reinhold, P: 1-28, 100-118

27- Sindhu, R., Suprabha, G.N. and Shashidhar, S. 2009. Optimization of process parameters for the production of a- amylase from Penicillium janthinellum (NCIM 4960) under solid state fermentation. Afric. J. Microbiol. Reaserch. 3(9):498-503

28- Singh, R.K., Kumar, S. 2009. Production of α-amylase from agricultural byproducts by Humicola lanuginose in solid state fermentation. Current trends in Biotech and Pharma,3(2)

29- Smits, J.P, Rinzema, A, Tramper, J. and Vansons beek H.M. (1996) Solid – statefermentation of wheat bran by *T. reesei* 6M9414, Substrate composition changes, C balance, enzyme production, growth and Kinetic . Appl. Microbiol. Biotechnol. 46: 489-496

30- Zambera, V. 2010. Solid State Fermentation of *Aspergillus oryzae* for Glucoamylase Production on Agro residues. Int. J. Life Sci. 4:16-25

31- Yang, S.S., Yi Wang, J. 1999. Protease and Amylase production of *Streptomyces rimosus* in submerged and solid- state fermentation cultivation. Bot. Bull. Acad. Sin.40:259-265

Production of amylase by *T. longibrachiatum* on solid-state fermentation:optimization of culture by Taguchi method

Moravej R.[1] and Azin M.[2]

[1] Biology Dept., Science Faculty, Sanandaj branch, Islamic Azad University, Sanandaj , I.R. of IRAN

[2] Biotechnology Research Center, Iranian Research Organization for Science & Technology, Tehran, I.R. of IRAN

Abstract

Solid-state fermentation has the potential to produce inexpensive enzymes for use in high volume industrial application. In this study, *T. longibrachiatum* was used for production of amylolytic enzyme on wheat straw and wheat bran as solid substrate. Optimization of culture condition was performed by using statistical design of experiments on Taguchi method basis. Effect of temperature, moisture, pH, inoculum size and nitrogen source were studied. Maximum amylase activity was obtained 363. 82 U/g, which was 7.1% higher than primary condition (moisture 55%,pH 6.5, temperature 25°C, inoculums, 10^6 nitrogen source $(NH_4)_2SO_4$).

Keywords: Optimization, Amylase, Solid state fermetarion, Taguchi method. *T. longibrachiatum*