

بهینه‌سازی استفاده از شربت ذرت برای تولید اندوگلوکاناز II نوترکیب در مخمر متیل دوست

سید مجتبی جعفری منش^۱، حمید راشدی^۲، ساره ارجمند^۳، سیدامید رعنائی سیادت^{۴*}

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی شیمی-بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، پردیس دانشکده‌های فنی، دانشگاه تهران، تهران

۲- دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، پردیس دانشکده‌های فنی، دانشگاه تهران، تهران

۳و۴- استادیار مرکز تحقیقات پروتئین، پردیس عمومی دانشگاه شهید بهشتی، تهران

۴- دانشیار مرکز تحقیقات پروتئین، پردیس عمومی دانشگاه شهید بهشتی، تهران

* تهران، پردیس عمومی دانشگاه شهید بهشتی، مرکز تحقیقات پروتئین

o_ranaei@sbu.ac.ir

چکیده- سلولاز یکی از آنزیم‌های صنعتی است که با اقبال جهانی به تولید بیواتانول نسل دوم، تولید و استفاده از آن بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته است. سلولاز توسط ارگانسیم‌های متعددی همچون قارچ‌ها، باکتری‌ها، حشرات و گیاهان تولید می‌شود. با افزایش در مصرف این آنزیم و لزوم کاهش قیمت آنزیم برای تولید بیواتانول نسل دوم، تولید نوترکیب این آنزیم مورد توجه قرار گرفته است. در این مطالعه با بررسی شربت ذرت به عنوان منبع نیتروژن اصلی و همچنین منبع کربن دوم پس از گلیسرول، محیط کشت نیمه معینی برمبنای محیط کشت نمکی SYN6 طراحی شده است. سپس تولید زیست‌توده و تولید یکی از انواع پرکاربرد از آنزیم‌های سلولاز به نام اندوگلوکاناز II در مخمر متیل‌دوست هاسنولا پلیمورفا^۱ (ه. پلیمورفا) بهینه شده است. طراحی آزمایش‌ها با روش یک فاکتوری انجام شده است و بهینه‌سازی با روش‌شناسی رویه‌پاسخ صورت پذیرفته است. نتایج آزمایش‌ها نشان داده است که شربت ذرت در درصد وزنی - حجمی ۵/۵ و ۶/۱۵ درصد به ترتیب نقاط بهینه تولید زیست توده و تولید آنزیم اندوگلوکاناز هستند. شرایط بهینه محیط جدید در مقایسه با محیط SYN6 تولید زیست توده را ۴۱/۴ درصد و تولید آنزیم نوترکیب را ۶۹/۷ درصد افزایش داده است.

کلیدواژگان: بهینه‌سازی، اندوگلوکاناز II، شربت ذرت، مخمر هاسنولا پلیمورفا، روش‌شناسی رویه پاسخ.

۱- مقدمه

تولید آنزیم‌های صنعتی شده است. بازار جهانی آنزیم‌های صنعتی در سال ۲۰۱۴ در حدود ۴/۵ میلیارد دلار ارزش گذاری شده است و پیش‌بینی شده است که با رشد سالانه ۸/۲ درصد تا سال ۲۰۱۸، ارزش این بازار به ۷/۱ میلیارد دلار افزایش می‌یابد [۱]. آنزیم‌های هیدرولازی بیشترین

رشد روز افزون تقاضا برای آنزیم‌های مورد استفاده در صنایع مختلف، موجب پیشرفت‌هایی در فن‌آوری‌های

^۱Hansenula polymorpha

حجم از بازار آنزیم‌های صنعتی را تشکیل می‌دهند که در این میان آنزیم‌های تأثیرگذار بر کربوهیدرات‌ها پس از پروتئازها پرمصرف‌ترین زیرمجموعه هیدرولازها هستند [۲].

سلولاز آنزیمی است که در صنایع مختلفی همچون نساجی [۳، ۴]، کاغذسازی [۵، ۶]، فرآوری مواد غذایی [۷، ۸]، استخراج روغن زیتون [۹، ۱۰] و تولید بیواتانول نسل دوم [۱۱، ۱۲] کاربرد دارد. سلولاز توسط ارگانسیم‌های مختلفی همچون قارچ‌ها [۱۳-۱۵]، باکتری‌ها [۱۶-۱۸] و حشرات [۱۹] تولید می‌شود. آنزیم‌های سلولاز مختلف از ارگانسیم‌های متفاوت و یا حتی یکسان می‌توانند خصوصیات ویژه‌ای داشته باشند که آن‌ها را برای کاربردهای معینی مناسب می‌کنند. به عنوان مثال سیستم سلولازی قارچ *تریکودرما ریسه‌ای*^۱ (ت. ریسه‌ای) از سه نوع آنزیم تشکیل شده است که شامل بتا-گلوکوسیداز (EC 3.2.1.21)، اگزوگلوکاناز (EC 3.2.1.4) و اندوگلوکاناز (EC 3.2.1.91) و اندوگلوکاناز پیوندهای بتا-۱ و ۴-گلیکوزیدی را از سر احیاکننده زنجیره سلولز شکسته و سلوبیوز تولید می‌کند. بتا-گلوکوسیداز نیز سلوبیوز را به دو گلوکز جدا از هم تبدیل می‌کند. اندوگلوکاناز پیوندهای داخلی بتا-۱ و ۴-گلیکوزیدی را شکسته و زنجیره سلولزی را کوتاه می‌کند. فعالیت اندوگلوکاناز موجب کوتاه شدن زنجیره‌های سلولز و افزایش سر احیاکننده زنجیره سلولز می‌شود. از این ویژگی در فرایندهای صنعتی مختلفی همچون مرحله قندسازی برای تولید بیواتانول، سنگ‌شویی پارچه‌های جین، بازیافت کاغذ و غیره استفاده می‌شود [۲۰، ۲۱].

اندوگلوکاناز برای استفاده‌های صنعتی از منابع مختلفی به صورت نوترکیب تولید شده است. میزبان‌ها و سیستم‌های بیانی مختلفی مانند قارچ [۲۲]، باکتری [۲۳] و مخمر [۲۴] برای تولید اندوگلوکاناز با موفقیت مورد استفاده قرار

گرفته‌اند. مخمرهای متیل دوست مانند *پیکیا پاستوریس*^۲ (پ. پاستوریس) و *ه. پلیمورفا* توجه بسیاری را به عنوان میزبان برای تولید پروتئین‌های نوترکیب به خود جلب کرده‌اند. این مخمرها سیستم جایگزین بیان مناسبی را برای بسیاری از پروتئین‌های نوترکیب مخصوصاً آنزیم‌های صنعتی مهیا می‌کنند. اکبرزاده و همکاران با انتقال ژن اندوگلوکاناز II از قارچ *ت. ریسه‌ای* به مخمرهای پ. پاستوریس و *ه. پلیمورفا* این آنزیم را به صورت نوترکیب تولید کرده مشخصات بیوشیمیایی آنزیم را با نمونه طبیعی مقایسه کرده‌اند. در این مطالعه این دو مخمر میزبان‌های مناسبی برای تولید نوترکیب اندوگلوکاناز معرفی شده‌اند. این مخمرها توانایی رشد تا غلظت‌های بالای سلولی با سرعت رشد بالا را در محیط‌های ساده و ارزان معدنی دارند درحالی‌که می‌توان از متانول به عنوان منبع کربن این میکروارگانسیم استفاده کرد. استفاده از متانول به عنوان منبع کربن باعث بیان بیش‌ازحد آنزیم‌های استفاده‌کننده متانول یعنی متانول اکسیداز (MOX)، دی‌هیدروکسی استون ستتاز (DHAS) و فرمات دهیدروژناز (FMD) می‌شود. پیش‌برهای آاین ژن‌ها، پیش‌برهای قدرتمندی هستند که می‌توانند باعث بیان بالا در تولید پروتئین نوترکیب شوند [۲۵].

برای تولید آنزیم‌ها در مقیاس عظیم به جهت پاسخگویی به نیاز فزاینده‌ی بازار جهانی آنزیم‌های صنعتی از جمله اندوگلوکاناز، افزایش تولید و کاهش هزینه تولید امری الزامی است. عوامل مختلفی هستند که بر تولید و هزینه فرایند تأثیر می‌گذارند. محیط کشت تخمیر یکی از مهم‌ترین عوامل در تولید آنزیم‌های صنعتی است که می‌تواند با تغییر در منابع کربن، نیتروژن و ارزان‌تر و یا دردسترس‌تر نمودن منابع، موجب افزایش تولید و کاهش هزینه تمام شده تولید آنزیم شود. منابع کربن و نیتروژن طبیعی مانند ملاس، شربت ذرت، آب پنی، عصاره مخمر،

^۲*Pichia pastoris*
promoters

^۱*Trichoderma reesei*

فاکتور عددی صورت پذیرفته است.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_i + \beta_2 x_i^2 \quad (1)$$

Y پاسخ مجموعه (دانسیته نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر و یا فعالیت نسبی آنزیم)، β_0 عرض از مبدا مدل، β_1 ضریب درجه اول (خطی) و β_2 ضریب درجه دوم معادله است. x_i نیز غلظت شربت ذرت به صورت درصد وزنی - حجمی به عنوان متغیر مستقل معادله است. براساس طراحی یک فاکتوری برای مدل درجه دوم، ۵ سطح از یک فاکتور به علاوه ۲ تکرار سطوح ابتدا و انتها که برای تعیین خطای خالص و عدم تطابق الزامی است، در نظر گرفته شد.

بازه‌ی منطقی ۱ تا ۱۰ درصد (وزنی - حجمی) از شربت ذرت در نظر گرفته شده است و آزمایشات مطابق با جدول ۱ اجرا شده‌اند.

جدول ۱ طراحی آزمایش یک فاکتوری برای بهینه‌سازی غلظت شربت ذرت

شماره آزمایش	غلظت شربت ذرت
۱	۱۰/۰۰
۲	۱/۰۰
۳	۵/۵۰
۴	۳/۲۵
۵	۱/۰۰
۶	۱۰/۰۰
۷	۷/۷۵

۲-۲- آنالیز شربت ذرت

شربت ذرت مورد استفاده در این مطالعه از شرکت گلوکوزان تهیه شده است. شربت ذرت خام و غلیظ ابتدا برای ته‌نشین شدن ذرات جامد سانتریفیوژ شده است ($1800 \times g$ برای ۵ دقیقه). جداسازی ذرات جامد برای کاهش خطا در اندازه‌گیری دانسیته نوری و همچنین افزایش دقت و همگونی شرایط فرایند الزامی است. ذرات جامد ته‌نشین شده زیرین و همچنین لایه روغنی رویین

عصاره گوشت، پودر ماهی، پودر ذرت و غیره که بعضاً محصول جانبی و یا دور ریز صنایع دیگر هستند، می‌توانند منابع ارزان قیمت و در دسترس برای فرایند تخمیر باشند. ملاس، آب پنیر و پودر ذرت منابع کربن طبیعی و شربت ذرت، پودر ماهی، عصاره مخمر و عصاره گوشت منابع نیتروژن طبیعی مرسوم برای فرایند تخمیر در مقیاس‌های عظیم هستند [۲۶]. شربت ذرت محصول جانبی آسیاب مرطوب ذرت است. این محصول غنی از پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و نوکلئوتیدها است و کاربرد عمده آن در تخمیر به عنوان منبع نیتروژن و همچنین به عنوان خوراک دام است. در این مطالعه با حذف نمک پرمصرف آمونیم دی‌هیدروژن فسفات از محیط کشت معین نمکی سنتزی شماره ۶ (SYN6) [۲۷] و استفاده از شربت ذرت به عنوان منبع نیتروژن و همچنین منبع کربن دوم پس از گلیسرول، تأثیر این ماده در رشد سلولی و تولید آنزیم نوترکیب اندوگلوکاناز در مخمر متیل‌دوست با استفاده از روش شناسی رویه پاسخ بررسی شده است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- طراحی آزمایش

به منظور بهینه‌سازی غلظت شربت ذرت برای دستیابی به حداکثر رشد سلولی میکروارگانیزم و نیز حداکثر فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز II، از روش شناسی رویه پاسخ استفاده شده است. این مرحله شامل سه مرحله مهم است: اجرای آزمایش‌های طراحی شده با استفاده از روش‌های آماری، تخمین ضرایب در مدل ریاضی و نهایتاً پیش‌بینی پاسخ و بررسی انطباق پذیری مدل. طراحی آزمایش یک فاکتوری از مجموعه روش شناسی رویه پاسخ توسعه یافته توسط بسته نرم‌افزاری آماری Design Expert® نسخه ۷,۰,۰ برای بهینه‌سازی غلظت شربت ذرت در مطالعه پیش‌رو مورد استفاده قرار گرفته است. در این روش طراحی اولیه بر مبنای مدل درجه دوم همانند معادله (۱) برای یک

به پلیت کاری YPD-Amp (عصاره مخمر ۱ درصد، پیتون ۲ درصد، دی-گلوکز ۲ درصد، آگار ۲ درصد، امپی‌سیلین ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) منتقل شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شده است. کلنی‌های رشد کرده به ارلن مایر با حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط YPD (عصاره مخمر ۱ درصد، پیتون ۲ درصد، دی-گلوکز ۲ درصد) منتقل شده‌اند و به مدت ۲۰ ساعت در انکوباتور لرزان با دور ۲۰۰rpm در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده‌اند. این محیط به عنوان پیش‌کشت مورد استفاده قرار خواهد گرفت.

تخمیر در ارلن مایرهای با حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت نیمه معین SYN6 اجرا شده است. این فرایند در فاز تولید زیست توده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت و در فاز تولید آنزیم در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت و در هر دو فاز در دور ۲۰۰rpm در انکوباتور لرزان انجام شده است. محیط نیمه معین از ترکیب یک یا چند ماده مغذی طبیعی با یک محیط معین زمینه به دست می‌آید. همانگونه که پیش‌تر ذکر شد در این مطالعه شربت ذرت جایگزین نمک آمونیوم دی‌هیدروژن فسفات در محیط کشت SYN6 شده است. غلظت‌های مورد آزمایش در جدول ۱ ذکر شده‌اند.

محیط SYN6 حاوی ۶ محلول (محلول‌های نمکی، کلسیم کلرید، ویتامین، عناصر خرد، عناصر جزئی و گلیسرول) و آب است. در این مطالعه محلول نمکی، گلیسرول، شربت ذرت و آب با استفاده از اتوکلاو دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱۵ psi به مدت ۲۰ دقیقه و دیگر محلول‌ها با استفاده از فیلتر ۰/۲ میکرومتر استریل شده‌اند؛ سپس پیش‌کشت بدون تغلیظ به صورت ۱ درصد حجمی - حجمی تلقیح شده است.

القای تولید محصول با افزودن ۲ درصد حجمی - حجمی از متانول خالص استریل شده با استفاده از فیلتر ۰/۲

همراه با ذرات با چگالی کمتر از محلول میانی جدا شده و محلول شفاف کهربایی رنگ به دست آمده، جمع‌آوری شد. برای نگهداری از شربت ذرت، این محلول به وسیله اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱۵ psi به مدت ۱۵ دقیقه استریل شده است. رنگ محلول پس از استریل شدن به قهوه‌ای سوخته تغییر کرد. محلول تا زمان استفاده در یخچال و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده است.

برای سنجش پروتئین کل شربت ذرت از روش لوری^۱ بهینه شده و سرم آلبومین گاوی^۲ (BSA) به عنوان استاندارد سنجش استفاده شده است [۲۸]. میزان قند این محلول نیز با استفاده از روش میلر برای سنجش قندهای احیا کننده، اندازه‌گیری شده است [۲۹]. بر اساس این روش معرف دی‌نیتروسالیسیلیک اسید به نمونه‌های استاندارد گلوکز و همچنین به نمونه‌های محلول شربت ذرت افزوده شده سپس به مدت ۵ دقیقه در آب جوش قرار داده شد. سپس جذب نور در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. جدول ۲ خصوصیات شربت ذرت مورد استفاده در این مطالعه را نشان می‌دهد.

جدول ۲ خصوصیات شربت ذرت

توضیح	خاصیت مورد اندازه‌گیری برای گلوتن مایع
رنگ	قهوه‌ای سوخته
چگالی	۱/۱۸۳ گرم بر میلی‌لیتر
ویسکوزیته دینامیک (μ)	۱۱/۸۷۸ cp
ویسکوزیته سینماتیک (U)	۱۰/۰۳۹۷ cst
غلظت قند	۹۳/۹۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر
غلظت پروتئین	۲۸۹/۸۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر
وزن خشک	۰/۳۲۴۳ گرم وزن خشک در هر گرم محلول

۲-۳- کشت سلول

مخمر متیل‌دوست از بانک سلولی ۸۰- درجه سانتی‌گراد

^۱Lowry method
^۲Bovine Serum Albumin

میکرومتر صورت پذیرفته و دمای انکوباتور به ۳۰ درجه سانتی گراد کاهش یافته است.

شده‌اند، در قالب دو معادله چندجمله‌ای بیان شده‌اند.

جدول ۳ طراحی آزمایش و نتایج تولید زیست توده و

محصول

شماره آزمایش	غلظت شربت ذرت	OD _{۶۰۰}	OD _{۴۵۰}
۱	۱۰/۰۰	۱۲/۸۳۴	۰/۳۶۶۶۳
۲	۱/۰۰	۱۳/۵۴۸	۰/۲۰۹۸
۳	۵/۵۰	۱۴/۴۳۶	۰/۴۶۸۴۶۷
۴	۳/۲۵	۱۳/۸۷۹	۰/۴۳۹۴۶۷
۵	۱/۰۰	۱۳/۰۴۷	۰/۲۸۵۶
۶	۱۰/۰۰	۱۲/۴۶۴	۰/۴۰۷۳۶۷
۷	۷/۷۵	۱۴/۶۵۸	۰/۴۳۷۹۶۷
۸	SYN6	۱۰/۳۴	۰/۲۷۶۰۳۳
۹	کنترل منفی	۳/۲۸	۰/۰۱۴۳

۴-۲- سنجش آنزیم اندوگلوکاناز

سنجش فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز با استفاده از روش گوس با استفاده از کربوکسی متیل سلولز (CMC) به عنوان سوبسترا و معرف دی نیتروسالیسیلیک اسید (DNS) به عنوان معرف گلوکز انجام شده است [۳۰]. برای اندازه گیری فعالیت آنزیم، اندوگلوکاناز نوترکیب به محلول ۱ درصد وزنی - حجمی CMC-Na در بافر سدیم استات ۵۰ میلی مولار در pH ۴/۸ افزوده شده و مخلوط (۲۵۰ میکرولیتر) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد انکوبه شده است. واکنش آنزیمی با افزودن سدیم هیدروکسید ۶N متوقف شده است و پس از آن ۷۵۰ میکرولیتر از معرف DNS به آن افزوده می شود و به مدت ۵ دقیقه در آب جوش نگه داشته سپس جذب نوری در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه گیری شده است. مقایسه فعالیت آنزیم های نوترکیب تولید شده به صورت نسبی با نمونه های کنترل مثبت (محیط SYN6) و منفی (محیط نمکی پایه) انجام شده است.

مدل زیر برای انطباق بر نتایج بدست آمده از اندازه گیری تولید زیست توده معرفی شده است. فاکتور A بیانگر درصد وزنی - حجمی از شربت ذرت است. معادله به وسیله نرم افزار آماری Design Expert کدگذاری شده است.

$$(OD) - 1.56 = 0.015 + 4.848E-4(A) + 3.108E-3(A^2)$$

(۲)

معنی دار بودن آماری برای مدل به طور عام و ضرایب آن به طور خاص با استفاده از آزمون مقدار F آنالیز واریانس (ANOVA) ارزیابی شده است که نتیجه آن رگرسیون نتایج حاصله از نظر آماری تا ۹۹ درصد ($p \leq 0.05$) معنی دار است. نتایج آنالیز واریانس مدل ذکر شده و ضرایب آن در جدول ۴ قابل مشاهده است.

ضریب تشخیص (R^2) برای نتایج بدست آمده و مدل پیش بینی شده برابر با ۰/۸۱۴۰ بوده است.

بهینه سازی غلظت وزنی - حجمی شربت با استفاده از روش شناسی رویه پاسخ صورت گرفته و براساس مدل پیش بینی شده، در غلظت ۵/۵ درصد شربت ذرت، حداکثر زیست توده تولید می شود که برابر با ۱۴/۶۲

۳- نتایج

میزان رشد و تولید زیست توده با استفاده از اندازه گیری دانسیته نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر و میزان فعالیت نسبی آنزیم های نوترکیب تولید شده با استفاده از روش گوس بدست آمده است. نتایج این آزمایش ها در جدول ۳ قابل مشاهده است.

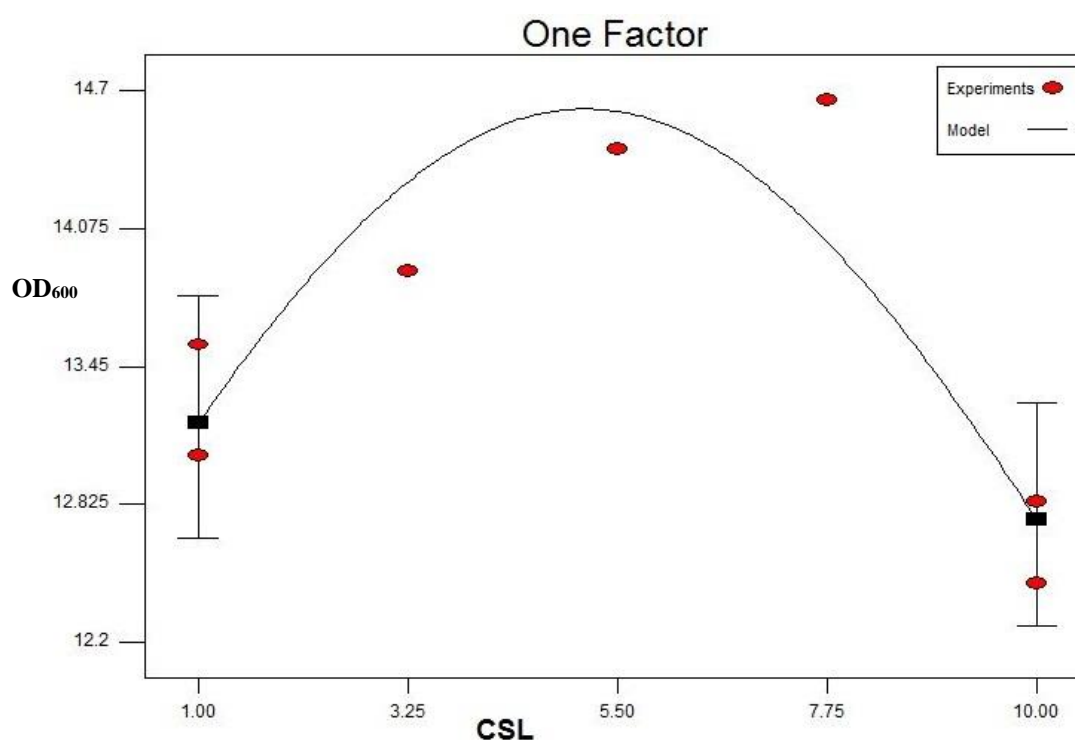
نتایج آزمایش های بررسی تأثیر شربت ذرت در رشد و تولید زیست توده مخمر و تولید آنزیم اندوگلوکاناز نوترکیب که با استفاده از روش یک فاکتوری با دو نقطه تکرار در ابتدا و انتهای بازه ی مورد بررسی طراحی

^۱Carboxymethyl cellulose
^۲Dinitrosalicylic acid

می باشد (نمودار ۱).

جدول ۴ آنالیز واریانس مدل بیانگر رشد و تولید زیست توده. مقدار P سطح معنی داری پارامتر مورد ارزیابی و مقدار F بیانگر نسبت تغییر پذیری بین گروه‌های آماری و درون این گروه‌ها است. مقادیر کم P و زیاد F باعث ایجاد پاسخ معنی دار آماری می‌شود.

مرجع	میانگین مربعات	مقدار F	مقدار P
مدل	$6.479 \text{ E}-6$	۸۷۵	۰/۰۳۴۶
A-شربت ذرت	$1.058 \text{ E}-6$	۱/۴۳	۰/۲۹۸۰
A^2	$1.190 \text{ E}-5$	۱۶/۰۸	۰/۰۱۶۰
عدم تطابق	$1.021 \text{ E}-6$	۲/۲۲	۰/۳۱۰۳



نمودار ۱ نتایج آزمایش‌ها و مدل بیانگر نتایج برای تعریف رشد و تولید زیست توده. نتایج مربوط به رشد مخمر متیل‌دوست طی ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و دور ۲۰۰ rpm در انکوباتور لرزان به صورت نقاط قرمز رنگ و مدل آماری چندجمله‌ای درجه دو به دست آمده از نتایج آزمایشات به صورت خط نشان داده شده است.

$$(Activity)^3 = 0.10 + 0.019(A) - 0.064(A^2) \quad (3)$$

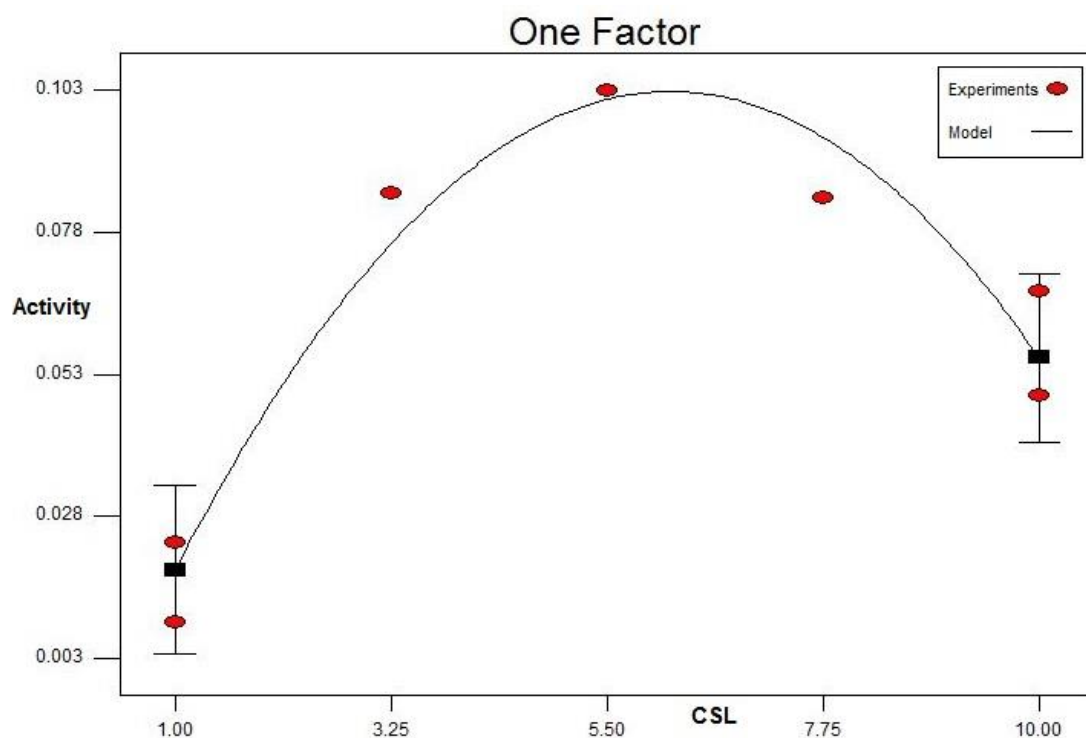
معنی دار بودن آماری مدل همانند مدل قبل از طریق آنالیز واریانس (ANOVA) مورد ارزیابی قرار گرفته است. نتایج آنالیز واریانس مدل فوق‌الذکر و ضرایب آن در جدول ۵ قابل مشاهده است.

دیگر مدل مورد مطالعه جهت تشریح فعالیت آنزیمی بوده است. A در این مدل همچون مدل تولید زیست توده بیانگر درصد وزنی - حجمی شربت ذرت است. معادله به وسیله نرم‌افزار آماری Design Expert کدگذاری شده است.

ضریب تشخیص (R^2) برای نتایج بدست آمده و مدل پیش‌بینی شده برابر با ۰/۹۳۲۰ بوده است.

جدول ۵ آنالیز واریانس مدل بیانگر تولید آنزیم اندوگلوکاناز نو ترکیب

مرجع	میانگین مربعات	مقدار F	مقدار P	معنی دار
مدل	$3/320 \text{ E-}3$	۲۷/۴۰	۰/۰۰۴۶	معنی دار
A-شربت ذرت	$1/565 \text{ E-}3$	۱۲/۹۲	۰/۰۲۲۹	معنی دار
A^2	$5/075 \text{ E-}3$	۴۱/۸۹	۰/۰۰۲۹	معنی دار
عدم تطابق	$1/090 \text{ E-}4$	۰/۸۲	۰/۵۵۰۳	بدون معنی



نمودار ۲ نتایج آزمایشات و مدل بیانگر نتایج برای تعریف تولید آنزیم اندوگلوکاناز نو ترکیب. نتایج مربوط به تولید آنزیم اندوگلوکاناز II نو ترکیب توسط مخمر متیل دوست طی ۷۲ ساعت رشد در دمای 37°C و ۲۴ ساعت القای تولید محصول به وسیله‌ای متانول در دمای 30°C درجه سانتی‌گراد و دور 200 rpm در انکوباتور لرزان به صورت نقاط قرمز رنگ و مدل آماری چند جمله‌ای درجه دو به دست آمده از نتایج آزمایش‌ها به صورت خط نشان داده شده است.

اولیه شربت ذرت برابر با $6/15$ درصد به میزان $0/4684$ خواهد بود (نمودار ۲).

۴- بحث و نتیجه‌گیری

بهینه‌سازی فرایندها از جمله فرایندهای زیستی، در ابتدا

بهینه‌سازی غلظت وزنی - حجمی شربت ذرت برای تولید آنزیم نو ترکیب اندوگلوکاناز همچون تولید زیست توده از روش‌شناسی رویه پاسخ بهره‌برداری شده است و مطابق با مدل معرفی شده حداکثر فعالیت آنزیم در محیط با غلظت

روش‌های رویه پاسخ است که برای بررسی موضوعاتی به کار می‌رود که طی آن فقط یک متغیر در فرایند تغییر می‌کند. در این نوع طراحی برای ساخت مدل خطی سه نقطه یا سه سطح مد نظر قرار می‌گیرد و برای مدل درجه دوم پنج نقطه یا پنج سطح مورد آزمایش قرار می‌گیرد. ویژگی این طراحی تکرار در نقاط ابتدایی و انتهایی است که برای مدل خطی نهایتاً با پنج آزمایش و برای مدل درجه دوم نهایتاً با هفت آزمایش این طراحی انجام می‌شود. نتایج این طراحی آزمایش در نرم‌افزار Design Expert® توسط روش رویه پاسخ مورد آنالیز قرار گرفته است و نقطه بهینه آزمایش مشخص شده است.

همان‌گونه که نتایج به دست آمده از آزمایش‌ها به منظور اندازه‌گیری رشد سلولی نشان می‌دهد، استفاده از شربت ذرت تأثیر بسزایی در افزایش رشد مخمر مورد مطالعه داشته است. براساس نتایج حاصل، استفاده از ۵/۵ درصد شربت ذرت می‌توان به دانسیته نوری برابر با ۱۴/۶۲ دست یافت که این مقدار در مقایسه با نمونه کنترل مثبت محیط SYN6، ۴۱/۴ درصد افزایش را نشان می‌دهد. در مورد تولید آنزیم اندوگلوکاناز II نوترکیب نیز نقطه بهینه تعیین شده توسط مدل معرف فرایند با ۶/۱۵ درصد شربت ذرت در ابتدای تخمیر موجب فعالیت آنزیم برابر با ۰/۶۸۴ می‌شود که در مقایسه با آنزیم تولید شده در محیط SYN6، ۶۰/۷ درصد افزایش را نشان می‌دهد.

غنای بالای شربت ذرت از پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و نوکلئوتیدها موجب دسترسی آسان‌تر سلول به مواد غذایی می‌شود درحالی‌که در محیط SYN6 مخمر باید تمامی اسیدهای آمینه و نوکلئوتیدهای مورد نیاز خود را از منابع معدنی تولید و تأمین کند که خود باعث مصرف انرژی بیشتر در مسیرهایی غیر از مسیر رشد سلول و تولید محصول می‌شود. استفاده از محیط نمکی و لزوم ساخت تمامی آمینواسیدها و نوکلئوتیدها در درون سلول موجب افزایش نیاز به اکسیژن در فرایند رشد و تولید محصول

نیازمند دستیابی به یک مدل ریاضی حقیقی، جامع و کامل برای تشریح رفتار سیستم می‌باشد که این امر نیازمند داده‌هایی از رفتار سیستم در شرایط مختلف و مقادیر متفاوت فاکتورهای تأثیرگذار مورد مطالعه است. این داده‌ها از طریق آزمایش‌های صورت گرفته و بررسی پاسخ سیستم به تغییرات در فاکتورها بدست می‌آیند. داده‌های مورد نیاز طراحی مدل به گونه‌ای انتخاب می‌شوند که روش‌های مختلف مدلسازی ریاضی، توانایی آنالیز آن‌ها و پیش‌گویی مدل رفتاری سیستم را داشته باشند، لذا نیازمند طراحی آزمایش منطقی و علمی برای رسیدن به داده‌های مطلوب است.

طراحی آزمایش روشی بر مبنای آمار کاربردی است که طی آن برخی نقاط بر مبنای نقاط دیگر از طریق روش‌های آماری به دست می‌آیند. کم شدن تعداد آزمایش‌ها و در نتیجه کاهش هزینه‌های آزمایش و همچنین زمان آزمایش‌ها از مهم‌ترین مزایای طراحی آزمایش است. از سوی دیگر با توجه به پیش‌بینی نقاط بیشتری از آزمایش با استفاده از علم آمار، افزایش دقت آزمایشات طراحی شده در مقایسه با آزمایش‌های انجام شده بدون طراحی با تعداد برابر آزمایش است.

در این مطالعه با طراحی آزمایش‌ها با روش‌های یک فاکتوری سعی در بهبود شرایط آزمایش، کاهش خطا و کاهش هزینه‌های آزمایش‌ها و در نتیجه دستیابی به نقطه بهینه صحیح شده است. در همین راستا مجموعه نرم‌افزاری Design Expert® نسخه ۷،۰،۰ محصول شرکت Stat-Ease آمریکا برای طراحی آزمایش‌ها و تحلیل و آنالیز آن‌ها مورد استفاده قرار گرفته است تا فرایند طراحی، مدلسازی، آنالیز مدل و انتخاب نقطه بهینه به صورت یکپارچه و با حداقل خطا اجرا شود. این نرم‌افزار یکی از پرستفاده‌ترین نرم‌افزارهای طراحی آزمایش و بهینه‌سازی در مطالعات علوم زیستی است. روش طراحی آزمایش یک فاکتوری از مجموعه

- Technology*, **41**, 60–82.
- [11] Yu, H. Y., & Li, X. (2015). Alkali-stable cellulase from a halophilic isolate, *Gracilibacillus* sp. SK1 and its application in lignocellulosic saccharification for ethanol production. *Biomass and Bioenergy*, **81**, 19–25.
- [12] Visser, E. M., Leal, T. F., de Almeida, M. N., & Guimarães, V. M. (2015). Increased enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse from enzyme recycling. *Biotechnology for Biofuels*, **8**, 5.
- [13] Suwannarangsee, S., Arnthong, J., Eurwilaichitr, L., & Champreda, V. (2014). Production and Characterization of Multi-Polysaccharide Degrading Enzymes from *Aspergillus aculeatus* BCC199 for Saccharification of Agricultural Residues. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **24**, ۱۴۲۷–۱۴۳۷.
- [14] Adav, S. S., Ravindran, A., & Sze, S. K. (2015). Quantitative proteomic study of *Aspergillus Fumigatus* secretome revealed deamidation of secretory enzymes. *Journal of Proteomics*, **119**, 154–68.
- [15] Kubicek, C. P. (2013). Systems biological approaches towards understanding cellulase production by *Trichoderma reesei*. *Journal of Biotechnology*, **163**, 133–42.
- [16] Rosseto, F. R., Manzine, L. R., de Oliveira Neto, M., & Polikarpov, I. (2016). Biophysical and biochemical studies of a major endoglucanase secreted by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Enzyme and Microbial Technology*, **91**, 1–7.
- [17] Wang, D., Kim, D. H., Seo, N., Yun, E. J., An, H. J., Kim, J.-H., & Kim, K. H. (2016). A Novel Glycoside Hydrolase Family 5 β -1,3-1,6-Endoglucanase from *Saccharophagus degradans* 2-40. Activity. *Applied and Environmental Microbiology*, AEM.00635–16.
- [18] Li, H., Wu, S., Wirth, S., Hao, Y., Wang, W., Zou, H., Wang, G. (2016). Diversity and activity of cellulolytic bacteria, isolated from the gut contents of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) (Valenciennes) fed on Sudan grass (*Sorghum sudanense*) or artificial feedstuffs. *Aquaculture Research*, **47**, ۱۵۳–۱۶۴.
- [19] Shirley, D., Oppert, C., Reynolds, T. B., Miracle, B., Oppert, B., Klingeman, W. E., & Jurat-Fuentes, J. L. (2014). Expression of an می‌گردد. این امر نیز می‌تواند یکی دیگر از دلایل افزایش رشد و تولید محصول در محیط جدید در حضور شربت ذرت باشد.
- ۵- منابع**
- [1] Dewan, S. S. (2014). *Global Markets for Enzymes in Industrial Applications*. BCCReserach
- [2] Bhat, M. K. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, **18**, 355–383
- [3] Puranen, T., Alapuranen, M., & Vehmaanperä, J. (2014). *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Elsevier
- [4] Noreen, H., Zia, M. A., Ali, S., & Hussain, T. (2014). Optimization of bio-polishing of polyester/cotton blended fabrics with cellulases prepared from *Aspergillus niger*. *Indian Journal of Biotechnology*, **13**, 108–113.
- [5] Wang, H., Pang, B., Wu, K., Kong, F., Li, B., & Mu, X. (2014). Two stages of treatments for upgrading bleached softwood paper grade pulp to dissolving pulp for viscose production. *Biochemical Engineering Journal*, **82**, 183–۱۸۷.
- [6] Pathak, P., Bhardwaj, N. K., & Singh, A. K. (2014). Enzymatic deinking of photocopier waste papers using crude cellulase and xylanase of *Coprinopsis cinerea* PPHRI-4 NFCCI-3027. *Appita Journal*, **67**, 29۱–۳۰۱.
- [7] Madhu, H. N., Ramesh, P., Anand, M. V., Sathyanarayana, S., Sarjapuram, N., Chandrashekar, A., & Subramaniam, G. (2015). The potential of hydrolytic enzymes from *Phoma exigua* for fruit juice clarification. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, **7**, 750–757.
- [8] Singh, A., Karmakar, S., Jacob, B. S., Bhattacharya, P., Kumar, S. P. J., & Banerjee, R. (2015). Enzymatic polishing of cereal grains for improved nutrient retention. *Journal of Food Science and Technology*, **52**, 3147–57.
- [9] Hadj-Taieb, N., Grati, N., Ayadi, M., Attia, I., Bensalem, H., & Gargouri, A. (2012). Optimisation of olive oil extraction and minor compounds content of Tunisian olive oil using enzymatic formulations during malaxation. *Biochemical Engineering Journal*, **62**, 79–85.
- [10] Mat Yusoff, M., Gordon, M. H., & Niranjan, K. (2015). Aqueous enzyme assisted oil extraction from oilseeds and emulsion de-emulsifying methods: A review. *Trends in Food Science &*

- Weinheim, 111-112.
- [26] Watkinson, S. C., Boddy, L., & Money, N. (2015). *The Fungi*. Academic Press, Massachusetts, 401-424.
- [27] Gellissen, G. (2000) Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Applied microbiology and biotechnology*, **54**, 741-50
- [28] Hartree E. F., (1985) Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*, **48**, 422-427.
- [29] Waldhoff, H., & Spilker, R. (2016). *Handbook Of Detergents, Part C: Analysis*. CRC Press, New York, 481.
- [30] Kent, J. A. (2013). *Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology*. Springer Science, New York, 1278-9.
- endoglucanase from *Tribolium castaneum* (TcEG1) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Insect Science*, **21**, 609–618.
- [20] Bagewadi, Z. K., Mulla, S. I., & Ninnekar, H. Z. (2016). Purification and characterization of endo β -1,4-d-glucanase from *Trichoderma harzianum* strain HZN11 and its application in production of bioethanol from sweet sorghum bagasse. *3 Biotech*, **6**, 1–10.
- [21] Budihal, S. R., Agsar, D., & Patil, S. R. (2016). Enhanced production and application of acidothermophilic *Streptomyces* cellulase. *Bioresource Technology*, **200**, 706–712.
- [22] Yang, F., Gong, Y., Liu, G., Zhao, S., & Wang, J. (2015). Enhancing Cellulase Production in Thermophilic Fungus *Myceliophthora thermophila* ATCC42464 by RNA Interference of cre1 Gene Expression. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **25**, 1101–7.
- [23] Anusree, M., Wendisch, V. F., & Nampoothiri, K. M. (2016). Co-expression of endoglucanase and beta-glucosidase in *Corynebacterium glutamicum* DM1729 towards direct lysine fermentation from cellulose. *Bioresource Technology*, **213**, 239-44.
- [24] Gündüz Ergün, B., & Çalik, P. (2016). Lignocellulose degrading extremozymes produced by *Pichia pastoris*: current status and future prospects. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **39**, 1–36.
- [25] Gellissen, G. (2002). *Hansenula polymorpha: biology and application*, Wiley-VCH,