بهینـــه سازی ترکیب و شرایـط محیط کشت تولید آنزیم گلوکو آمیلاز

آزاده خیرالعموم
دانشیار

فرهاد خراشه
دانشیار

دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی شریف

سیّد کیان سیّد
کارشناسی ارشد

خشایار نیلچی
کارشناسی ارشد

واحد علوم و تحقیقات، گروه بیوتکنولوژی،
دانشگاه آزاد اسلامی

چکیده

در این تحقیق تولید آنزیم گلوکوآمیلاز (آمیلوگلوکوسیداز، EC3.2.1.3) از کپك A.niger به شماره شناسایی ATCC5103 در یك محیط کشت طبیعی و طی فرایند تخمیر غوطه‌ور مورد بررسی قرار گرفته است. بهینه سازی ترکیب محیط کشت بکار برده شده، از نظر نوع محیط کشت و ترکیب درصد اجزاء اصلی یعنی منبع کربن و منبع نیتروژن و شرایط رشد نظیر pH محیط، در فلاسك انجام شده و در نهایت محیطی حاوی صد میلی لیتر پساب نشاسته دارای ۶ / ۳ درصد وزنی نشاسته نامحلول به عنوان منبع کربن و جزء اصلی تشکیل دهنده محیط و پساب خیسانده ذرت (CSL) به میزان ۸ درصد حجمی به عنوان منبع ازت آلی انتخاب شده است. فرایند تخمیر در فلاسك با pH اولیه ۶ و دمای ۳۰ درجه سانتیگراد برای مدت ۹۶ ساعت انجام گردید. حداکثر فعالیت آنزیمی تحت این شرایط برابر U/ml ۶۰ به دست آمد. بررسی های انجام شده نشان می دهد که مدل سینتیکی مونود (Monod) برای فرایند رشد کپك در این شرایط صادق است. جهت بررسی اثر شدت هوادهی و دور همزن بر رشد این کپك و تولید آنزیم گلوکوآمیلاز و تعیین مقادیر مناسب پارامترهای مذکور، از این محیط کشت در یك فرمانتور ۵ لیتری همزن‌دار، طی یك فرایند تخمیر ناپیوسته تحت همان شرایط بکار برده شده در فلاسك (pH، دما و طول مدت تخمیر) استفاده شد و پس از آزمایش های مختلف، دور همزن rpm ۴۰۰ و شدت هوادهی ثابت ۵vvm / ۲ مناسب تشخیص داده شدند.

Optimization of Growth Medium Composition and Operating Conditions in the Production of Glucoamylase

A. Kheirolomoom
Associate Professor

F. Khorasheh
Associate Professor

Department of Chemical Engineering,
Sharif University of Technology

S. K. Seyed
M. Sc.

K. Nilchi
M. Sc.

Biotechnology Group, Science and Research
Campus, Islamic Azad University

Abstract

In this study, the biosynthesis of glucoamylase (amyloglucosidase-EC 3.2.1.3) by : A. niger ATCC 5103 in submerged cultures using a natural medium is reported. Optimum values of the major consitituents of the medium, i.e. carbon and nitrogen sources, and also the growth conditions were obtained from experiments in shake flaskes. The most suitable medium was 100 ml of liquid waste from a starch recovery unit containing 3.6 %w/v imsoluble starch as carbon source plus 8 %v/v corn steep liquor (CSL) as nirogen source. The optimum conditions were initial pH of 6, temperature of 30°C, and growth time of 96 hours. The rotation speed of the shaker was about 230 rpm. Under the above conditions, a maximum enzyme activity of 96 U/ml was obtained. The experimental results indicated that the cell growth could be well represented by Monod kinetic model. In order to study the effect of aeration and agitation rates on cell growth and enzyme production, several experiments were carried out in a 5 liter batch fermentor with the same optimum conditions which were obtained in shake flasks. The highest enzyme activity was obtained with an aeration rate of 2.5 vvm and agitator speed of 400 rpm.

مقدمه

آنزیم گلوکوآمیلاز (EC3.2.1.3) که به نام‌های آمیلوگلوکوسیداز، گاماآمیلاز و آلفا ـ ۱ و ۴ ـ گلوکان گلوکوهیدرولاز نیز نامیده می‌شود، در طبقه‌بندی آنزیمی در گروه هیدرولازها قرار می‌گیرد. این آنزیم که یک آنزیم خارج سلولی می باشد، از انتهای غیراحیای زنجیره مولکول های پلی ساکاریدهایی چون آمیلوز و آمیلوپکتین (اجزاء اصلی تشکیل دهنده مولکول نشاسته)، گلیکوژن و مالتواولیگوساکاریدها به طور مستقیم واحدهای گلوکز را جدا می‌کند. باتوجه به این توانایی مهم، استفاده از این آنزیم در صنعت هیدرولیز نشاسته و تولید شربت های گلوکز با DE بالای ۹۵ درصد اهمیت فراوانی دارد. این آنزیم پیوندهای گلیکوزیدی α ـ ۱ و ۴ را با سرعت بالایی هیدرولیز می‌کند ولی سرعت اثر آن روی پیوندهای α ـ ۱ و ۶ در محل های انشعابات موجود در مولکول آمیلوپکتین کمتر می باشد [3, 2, 1].

در بین میکروارگانیزم های تولید کننده این آنزیم قارچ های آسپرژیلوس و رایزوپوس عمده ترین منابع تولید صنعتی این آنزیم می باشند که کپک آسپرژیلوس نایجر از بقیه کپک ها و گونه های مورد استفاده مهمتر و رایجتر است [4]. برای تولید این آنزیم هم از کشت غوطه ور و هم از کشت سطحی (کشت روی بستر جامد یا SSF) استفاده شده است، ولی در مقیاس صنعتی، روش کشت غوطه ور یعنی رشد سلول ها در محیط کشت مایع درون یک بیوراکتور، به دلیل این که در کشت سطحی کنترل تخمیر و حفظ شرایط استریل دشوارتر است و محفظه تخمیر برای تولید بیشتر فضای بیشتری را نیز اشغال می نماید، کاربرد بیشتری دارد. البته تحقیقات زیادی در این زمینه صورت گرفته و در حال انجام است [5]. نکته مهمی که در مورد ترکیب محیط کشت مورد استفاده برای تولید این آنزیم وجود دارد آن است که نشاسته و دکسترینها (پلی ساکاریدها و الیگوساکاریدهای با وزن مولکولی بالا) تولید این آنزیم را القا می‌کنند. بنابر این محیط های کشت مورد استفاده در تولید این آنزیم به طور عمده حاوی نشاسته و دیگر پلی ساکاریدها و الیگوساکاریدها به عنوان منبع کربن می باشند. در چنین فرایندهایی که در آنها از کپک ها (میکرواگانیزم های رشته ای) برای تولید محصول استفاده می شود، در صورتی که رشد سلولی غالب از نظر ریخت شناسی (مورفولوژیکی) به فرم رشته ای یا فیلامنتوسی (رشته های آزاد ودرهم پیچیده) باشد، محیط کشت یک سیال غیر نیوتنی و به طور عمده از نوع شبه پلاستیک خواهد بود . در این حالت ویسکوزیته محیط کشت با افزایش غلظت توده سلولی افزایش می یابد. این امر بر پارامترهای فرایندی نظیر حلالیت اکسیژن در محیط، اختلاط مناسب محیط (به دلیل ناهمگن شدن آن) و ضریب حجمی انتقال جرم اکسیژن (K_La) اثر می گذارد، به خصوص که در فرایندهای هوازی، اکسیژن محلول، خود به عنوان یک ماده مغذی مصرف شود و حلالیت اندک آن در محیط های کشت، مسأله محدود شدن رشد توسط اکسیژن را پدید

می‌آورد. حال با افزایش ویسکوزیته محیط کشت و کاهش حلالیت اکسیژن به تبع کاهش ضریب حجمی انتقال اکسیژن (K_La)، این مسأله محدود کنندگی تشدید خواهد شد که می تواند هم بر رشد سلولی و هم بر تولید محصول اثر کند [7, 6].

مواد و روش‌ها

میکروارگانیزم و مواد مورد استفاده

میکروارگانیزم مورد استفاده در این تحقیق، کپک A.niger به شماره شناسایی ATCC5103 موجود در مرکز تحقیقات مهندسی بیوشیمی و کنترل محیط زیست دانشگاه صنعتی شریف می‌باشد که از کلکسیون مؤسسه سرم‌سازی رازی (حصارک کرج) به این مرکز انتقال یافته است، جهت تکثیر و نگهداری این سوش از محیط جامد PDA به صورت اسلنت استفاده شده است. برای تلقیح محیط های تهیه شده در فلاسک (چه برای بررسی ترکیب‌های مختلف محیط کشت و چه برای محیط پیش کشت مورد نیاز جهت تلقیح در فرمانتور) ابتدا با افزودن ۱۰ میلی لیتر آب مقطر استریل به یک اسلنت حاوی اسپورهای سیاه رنگ آسپرژیلوس نایجر در مجاورت شعله، سوسپانسیونی از اسپور تهیه شده و ۵ میلی لیتر از این مخلوط اسپور جهت تلقیح به محیط کشت درون فلاسک، اضافه شده است. شرایط رشد به کار رفته برای آزمایش‌های انجام شده در فلاسک دمای ۳۰ درجه سانتی گراد، سرعت ۲۳۰ دور در دقیقه برای دستگاه تکان دهنده (Shaker) برای ۹۶ ساعت بوده است. ستریلیزاسیون محیط کشت قبل از تلقیح و پس از تنظیم pH مورد نظر، در اتوکلاو و در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد برای ۲۰ دقیقه صورت گرفته است. پساب نشاسته و پساب خیسانده ذرت (CSL) مورد استفاده در محیط های کشت به ترتیب از کارخانه نشاسته و گلوکز ایران (تهران) و کارخانه گلوکوزان (قزوین) تهیه شده‌اند.

روش تعیین غلظت توده سلولی و فعالیت آنزیمی

برای تعیین جرم خشک توده سلولی حاصله از رشد، نمونه‌ای از محیط کشت حاوی سلول با حجم معین به کمک قیف بوخنر از کاغذ صافی (واتمن) عبور داده شده، توده سلولی باقی مانده روی کاغذ در آون با دمای ۱۰۵ درجه سانتی گراد برای مدت ۲ ساعت خشک و سپس وزن شده است. محلول حاصل از صاف کردن محیط کشت یا محلول آنزیمی، سپس جهت تعیین فعالیت آنزیم تولید شده، با روش جذب سنجی به کار رفته است. ۰/۲ میلی لیتر از محلول فوق با ۳ میلی لیتر محلول نشاسته ۲/۵ درصد و ۰/۸ میلی لیتر بافر استات با p H= ۴/۸ مخلوط شده در حمام آب گرم با دمای ۶۰ درجه سانتی گراد برای مدت ۱۰ دقیقه قرار داده می‌شود. سپس ۰/۵ میلی لیتر از این محلول با ۳ میلی لیتر معرف DNS [۸] مخلوط شده برای مدت ۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شده و پس از این مدت، ۱۷ میلی لیتر آب مقطر به مخلوط اضافه شده است. پس از خنک شدن، جذب محلول با دستگاه اسپکتروفتومتر (اسپکترونیک تک پرتویی) در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده می‌شود. پس از کسر میزان جذب مربوط به قند احیای همراه محلول آنزیمی (باقیمانده از هیدرولیز نشاسته در محیط کشت) قند حاصل از فعالیت آنزیم، از منحنی استاندارد به دست می‌آید. روش تعیین قند احیای محیط کشت، مانند فوق است ولی مرحله اثر آنزیم بر سوبسترای نشاسته (در حمام ۶۰ درجه سانتیگراد) حذف می‌گردد. واحد فعالیت آنزیمی به صورت میکرومول قند (گلوکز) تولیدی بر دقیقه به ازای واحد حجم محلول آنزیمی (U/ml) می‌باشد. میزان کربوهیدرات کل (نشاسته) موجود در پساب نشاسته به روش آنترون [۹] ، تعیین شده است.

فرمانتور و شرایط مربوطه

آزمایش‌های مربوط به تعیین شدت هوادهی و دور همزن، در یک فرمانتور ۵ لیتری ساخت شرکت Chemap مجهز به بافل، همزن از نوع توربینی با ۴ تیغه مسطح، کنترل کننده های دما و pH و الکترود DO انجام گرفته است. پس از افزودن محیط کشت مورد نظر به درون فرمانتور و تنظیم pH محیط با سود ۲ نرمال به حدود ۶، عمل استریل کردن محیط به صورت غیرمستقیم با بخار ۱۲۰ درجه سانتیگراد برای مدت ۲۰ دقیقه صورت گرفته است. پس از خنک شدن محیط تا دمای ۳۰ درجه سانتیگراد، کالیبراسیون الکترود DO به کمک عبور گاز N_2 و سپس هوا از درون محیط برای تنظیم صفر و صد دستگاه، انجام شده است. حجم محیط پیش کشت مورد استفاده برای تلقیح فرمانتور، ۳۰۰ میلی لیتر (حدود ۹ درصد حجم محیط کشت درون فرمانتور) با سنی بین ۲۴ تا ۳۰ ساعت بوده است. مدت زمان فرایند تخمیر در فرمانتور همان ۹۶ ساعت در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

بهینه سازی محیط کشت در فلاسک، رسم منحنی رشد وتعیین پارامترهای سینتیکی

هدف از این بررسی دستیابی به ترکیبی مناسب، ارزان و طبیعی برای محیط کشت مورد استفاده در تولید آنزیم گلوکوآمیلاز به روش کشت غوطه ور می باشد. همان طور که اشاره شد، برای تولید این آنزیم، محیط کشت باید حاوی پلی ساکاریدها به عنوان القاکننده و تنها منبع کربن برای استفاده میکروارگانیزم باشد. به همین دلیل پساب واحد تولید نشاسته از آرد گندم که حاوی مقادیری نشاسته نامحلول است، به عنوان جزء اصلی تشکیل دهنده محیط کشت انتخاب شد. مقدار نشاسته موجود درا ین پساب که مایعی است سفید رنگ، به کمک روش تعیین کربوهیدرات کل با معرف آنترون و پس از کسر مقدار قندهای ساده موجود در آن (تعیین شده به روش DNS)حدود ۳۶ گرم بر لیتر (۳/۶ درصد وزنی) می باشد. با انجام آزمایش تعیین ازت آلی و معدنی با روش کجلدال [۱۰]، مشخص شد که پساب نشاسته حاوی مقادیر قابل ملاحظه ای از نیتروژن آلی و معدنی نیست. به همین دلیل ابتدا از گلوتن به عنوان منبع نیتروژن آلی استفاده شدو بر این اساس محیط های مختلفی مطابق جدول ۱ تهیه شده و مورد بررسی قرار گرفت. همان گونه که از نتایج به دست آمده مشخص است محیط کشت حاوی پساب نشاسته ۳/۶ درصد وزنی و گلوتن به میزان ۰/۸ درصد وزنی، بالاترین فعالیت آنزیمی را حاصل نموده است. از این محیط ، یک بار در فرمانتور استفاده شد که نتایج حاصل برای غلظت توده سلولی ، فعالیت آنزیمی و غلظت قند احیای باقیمانده پس از ۹۶ ساعت درشکل ۱ نشان داده شده است. شدت هوادهی ۰/۵vvm و دور همزن فرمانتور ۴۰۰ rpm بوده است. مشاهده می شود که فعالیت آنزیمی به دست آمده در فرمانتور در مقایسه با فلاسک (با همین محیط کشت)، بسیار کمتر است. این امر از آنجا ناشی می شود که گلوتن در آب نامحلول است ودر اثر حرارت دیدن (هنگام استریل کردن محیط) حالت کشسانی پیدا می کند. باتوجه به این که نشاسته نامحلول موجود در محیط نیز در اثر حرارت دیدن، متورم شده و محیط را به حالت ژل در می‌آورد و در نتیجه ویسکوزیته محیط افزایش می یابد، وجود حالت کشسانی گلوتن نیز به این افزایش ویسکوزیته کمک می کند. متعاقباً به دلیل کاهش حلالیت اکسیژن در چنین محیطی رشد سلولی دچار مشکل می شود. به همین دلیل، پساب خیسانده ذرت (CSL) به عنوان منبع نیتروژن انتخاب شد که هم غنی از انواع اسیدهای آمینه است و هم این که به صورت مایع بوده و به خوبی با پساب ممزوج می گردد. قابلیت دسترسی و مصرف آن نیز برای میکروارگانیزم بهتر و بیشتر است (نسبت به گلوتن نامحلول) . از طرف دیگر کاهش در ویسکوزیته محیط کشت نیز وجود خواهد داشت. بنابر این اجزای اصلی محیط کشت ، پساب نشاسته به عنوان منبع کربن و CSL به عنوان منبع نیتروژن در نظر گرفته شد. برای بهینه سازی میزان CSL، ۵ محیط کشت با درصدهای حجمی مختلفی از CSL تهیه شد. نتایج حاصل از رشد سلولی و تولید آنزیم در این محیط ها، در جدول ۲ ارائه شده است. علیرغم این که محیط کشت شماره ۴ بیشترین فعالیت آنزیمی را حاصل نموده است، ولی به دلیل تشکیل کف بیشتر و پایدارتر در اثر وجود درصد بالایی از CSL (و در نتیجه اسیدهای آمینه که عامل بوجود آمدن کف در هنگام هوادهی محیط در فرمانتور می باشند) محیط کشت حاوی ۸ درصد حجمی پساب خیسانده ذرت که از نظر فعالیت آنزیمی به دست آمده نیز تقریباً با محیط حاوی گلوتن (۰/۸ درصد وزنی) برابری می کند، به عنوان مقدار مناسب CSL انتخاب شد.

در مرحله بعد برای تعیین مقدار مناسب نشاسته موجود در محیط کشت، محیط هایی با درصدهای وزنی ۰/۵ ، ۲، ۲/۵، ۳/۶ و ۴/۶ از نشاسته تهیه شد. نتایج حاصل از رشد سلولی و تولید آنزیم در این محیط ها در شکل ۲ ارائه شده است. محیطی که حاوی ۴/۶ درصد وزنی نشاسته بوده است، در اثر حرارت دیدن در اتوکلاو (هنگام استریلیزاسیون) به صورت دلمه ای نیمه جامد درآمد که امکان رشد برای کپک در این محیط وجود نداشته است. بنابر این پساب نشاسته در همان حالت طبیعی خود یعنی حاوی ۳/۶ درصد وزنی نشاسته نامحلول، به همراه CSL به میزان ۸ درصد حجمی، به عنوان محیط کشت مناسب برای تولید آنزیم گلوکوآمیلاز انتخاب گردید.

برای تعیین pH اولیه مناسب برای رشد سلولی براساس ترکیب بهینه فوق، ۳ محیط کشت با pH اولیه ۵، ۶ و ۷ مورد بررسی قرار گرفتند. فعالیت آنزیمی

حاصل پس از ۹۶ ساعت مطابق شکل ۳ می باشد. همان گونه که مشاهده می شود حداکثر فعالیت آنزیمی در pH اولیه ۶ به دست آمد. در pH بالاتر احتمالاً به دلیل واکنش اسید و باز، مقداری از اسیدهای آمینه موجود از دسترس سلول ها خارج شده و لذا رشد سلولی و تولید آنزیم کاهش می یابد.

برای رسم منحنی رشد A.niger در این محیط کشت و شرایط بکار برده شده، ۴ محیط کشت با ترکیب بهینه به دست آمده، تهیه و شدت داده شد. هر ۲۴ ساعت یک محیط مورد بررسی قرار گرفت و فعالیت آنزیمی و غلظت توده سلولی اندازه گیری گردید. نتایج حاصله در شکل ۴ ارائه شده است. جهت بررسی تطابق رشد با مدل مونود چهار محیط با درصدهای وزنی ۰/۵، ۲، ۲/۵ و ۳/۶ برای نشاسته و ۸ درصد حجمی CSL تهیه و جرم خشک سلولی حاصل پس از ۹۶ ساعت اندازه گیری شد، سرعت ویژه رشد (μ) از رابطه زیر برای هر حالت محاسبه گردید که مقادیر حاصل در جدول ۳ ارائه شده است.

$$\mu = \frac{1}{\bar{x}} \times \frac{\Delta X}{\Delta t} \qquad (۱)$$

که در این رابطه، $\bar{X}$ وزن خشک سلولی متوسط (گرم بر لیتر)، ΔX اختلاف وزن خشک سلولی و Δt، اختلاف زمان (بر ساعت) می باشند. باتوجه به این که از معادله سینتیک مونود می توان رابطه زیر را که به منحنی Lineweaver - Burk معروف است، به دست آورد:

$$\mu = \frac{\mu_{max} \times S_0}{K_S + S_0} \Rightarrow \frac{1}{\mu} = \frac{K_S}{\mu_{max}} \times \frac{1}{S_0} + \frac{1}{\mu_{max}} \qquad (۲)$$

بنابراین براساس نتایج به دست آمده مطابق جدول ۳، برای هر μ در هر S_0، مقادیر $\frac{1}{\mu}$ بر حسب $\frac{1}{S_0}$ محاسبه و رسم گردید (شکل ۵). بهترین خط عبور داده شده از میان نقاط دارای معادله

$$\frac{1}{\mu} = 7.0372 + 1.0283 \times (\frac{1}{S_0}) \qquad (۳)$$

می باشد. این تطابق خطی خود نشان دهنده پیروی رشد سلولی تحت شرایط مورد بررسی، از مدل سینتیکی مونود می باشد. عرض از مبدأ و شیب خط فوق، مقادیر پارامترهای سینتیکی را به شرح زیر به دست می دهند:

$\mu_{max} = 0.142\ (hr^{-1})$

$K_S = 146\ (mg/L)$

تعیین شدت هوادهی و دور همزن مناسب در فرمانتور

از آنجایی که انتقال جرم اکسیژن در محیط های تخمیری حاوی میکروارگانیزم های رشته ای نظیر A.niger که رشد میکروارگانیزم در آنها به فرم رشته ای (فیلامنتوسی) باشد، اهمیت فراوانی در رشد سلولی و تولید محصول دارد، محیط کشت بهینه ای که در مرحله قبل مورد بررسی قرار گرفت، برای تعیین شدت هوادهی و دور همزن مناسب جهت فرایند تخمیر در فرمانتور مورد استفاده واقع شد. بدین منظور آزمایش هایی با شدت های هوادهی ثابت (vvm) ۱/۵ و ۲/۵ در دور ۴۰۰ rpm برای همزن ترتیب داده شد که نتایج حاصل برای غلظت توده سلولی و فعالیت آنزیمی در طول فرایند تخمیر در شکل های ۶ و ۷ نشان داده شده اند. همانگونه که ملاحظه می شود، غلظت توده سلولی و فعالیت آنزیمی به دست آمده در انتهای فرایند برای شدت هوادهی ۲/۵ vvm بیش از شدت هوادهی ۱/۵ vvm بوده است. از طرف دیگر میزان اختلاف با نتایج حاصل شده در فلاسک به دست آمده یکسان است). این امر خود نشان دهنده افزایش حلالیت اکسیژن در اثر افزایش شدت هوادهی و اثر مثبت آن بر رشد سلولی و به تبع آن تولید آنزیم می باشد. باتوجه به وجود CSL در محیط و ایجاد کف زیاد در ابتدای فرایند که با افزایش شدت هوادهی شدت تشکیل کف نیز بالاتر خواهد بود و خود متعاقباً نیاز به افزودن ضد کف بیشتری را ایجاب خواهد کرد، شدت های هوادهی بالاتر از ۲/۵ vvm به کار برده نشد زیرا که افزایش ضد کف زیاد خصوصاً در ابتدای فرایند اثر منفی بر حلالیت اکسیژن در محیط خواهد گذارد. بنابراین در این مرحله شدت هوادهی ۲/۵vvm به عنوان هوادهی مناسب تحت این شرایط انتخاب گردید. در مرحله بعدی، تغییر دور همزن برای افزایش حلالیت اکسیژن در شدت هوادهی به دست آمده، در نظر گرفته شد. نتایج حاصل از غلظت توده سلولی و فعالیت آنزیمی به دست آمده در مقایسه با مرحله قبل یعنی دور ۴۰۰ rpm بسیار کمتر است، ضمن این که غلظت توده سلولی نیز کاهش یافته است. در حالی که انتظار می رود با افزایش دور همزن، حلالیت اکسیژن در محیط کشت به دلیل ریز شدن حباب های هوا افزایش یابد. دلیل این کاهش در رشد سلولی و تولید آنزیم می تواند مسئله اثر منفی افزایش شدت تنش برشی وارده بر سلول ها در اثر افزایش دور همزن باشد. به عبارت دیگر راندمان عمل به

دلیل آسیب دیدن و خرد شدن رشته های کپک به خصوص در مناطق نزدیکتر به پره همزن پایین آمده است. بنابر این در نهایت، شدت هوادهی ۲/۵ vvm و دور همزن ۴۰۰rpm باتوجه به آزمایش ها و نتایج فوق الذکر و محیط کشت و امکانات موجود، به عنوان بهترین نتیجه برای شدت ثابت هوادهی پیشنهاد می گردد.

باتوجه به این که در شدت هوادهی ثابت، حداکثر فعالیت آنزیمی به دست آمده در مقایسه با آنچه که در فلاسک نتیجه شد، کمتر است و از طرف دیگر رشد سلولی در هر دو مورد تقریباً یکسان است، این احتمال داده شد که بالا بودن شدت هوادهی و در نتیجه افزایش غلظت اکسیژن محلول در محیط کشت به نوعی بر آنزیم تولیدی اثر نامطلوب داشته و در عمل مقداری از آن را غیر فعال نموده است.

نتیجه گیری

باتوجه به آنچه ارائه گردید می توان چنین نتیجه گرفت که محیط کشت مورد بررسی در این تحقیق با شرایط و ترکیب بهینه شده فوق الذکر، برای تولید آنزیم گلوکوآمیلاز که از نظر صنعتی آنزیم بسیار مهمی در فرایند تولید شربت های قندی با درصد گلوکز بالا است، محیطی ارزان، در دسترس و مناسب می باشد. به خصوص که هر دو جزء مورد استفاده در آن عملاً پساب های واحدهای صنعتی تولید نشاسته از آرد گندم و ذرت بوده و آلودگی محیط زیست اطراف این واحدها را به دنبال دارند. این بررسی نشان داد که می توان استفاده ای بهینه همراه با ارزش افزوده بالا از این محیط باتوجه به امکانات موجود به عمل آورد. برای رفع پاره ای مشکلات در فرمانتور می توان در بررسی های آتی موارد زیر را مدّ نظر قرار داد.

۱ ـ روان سازی آنزیمی (کاهش ویسکوزیته به کمک آنزیم) محلول نشاسته اولیه، به کمک استفاده از آنزیم آلفا ـ آمیلاز مقاوم به حرارت همراه محیط کشت در هنگام فرایند استریلیزاسیون محیط.

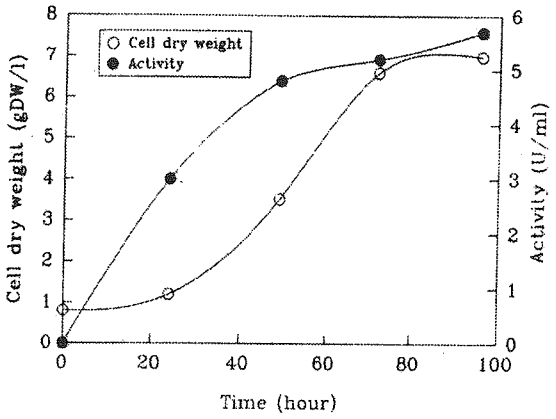
۲ ـ فراهم نمودن شرایط برای رشد سلولی به صورت دانه ای (به فرم Pellet).

۳ ـ بررسی سایر الگوهای هوادهی مناسب باتوجه به امکانات موجود.

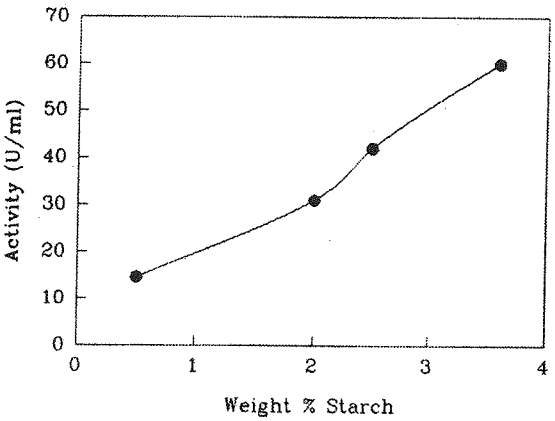
۴ ـ استفاده از سیستم های فرمانتوری دیگر مثل فرمانتورهای Airlift.

فهرست علائم

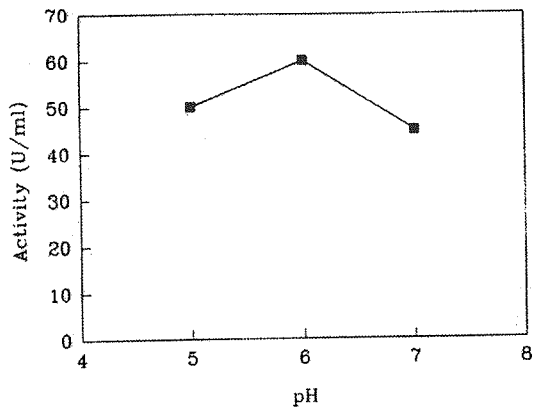
K_S	ثابت مونود، g/1
S_0	غلظت اولیه سوبسترا، g/1
Δt	اختلاف زمان، hour
ΔX	اختلاف وزن خشک سلولی، g/1
$\overline{X}$	وزن خشک سلولی متوسط، g/1
μ	سرعت رشد ویژه، $hour^{-1}$
μ_{max}	حداکثر سرعت رشد ویژه، $hour^{-1}$



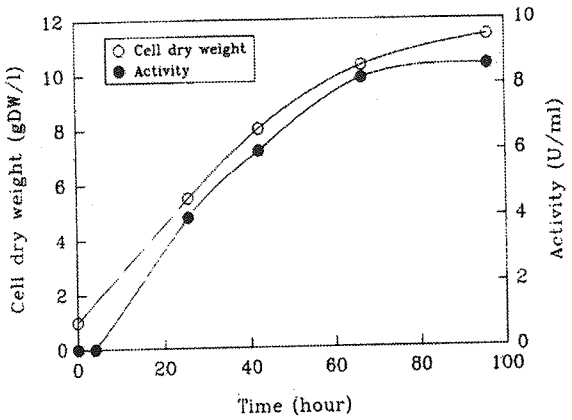
شکل (۱) روند تغییرات زمانی رشد سلول و تولید آنزیم برای محیط کشت حاوی پساب نشاسته و گلوتن (۸ / ۰ %) در دو همزن ۴۰۰ rpm و هوادهی ۰/۵vvm .



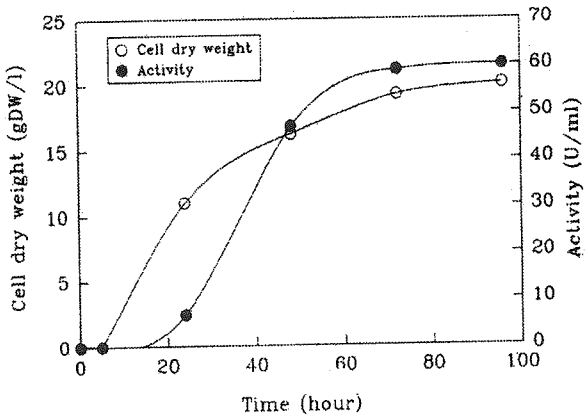
شکل (۲) مقایسه فعالیت آنزیم در محیط های با درصدهای وزنی مختلف نشاسته.



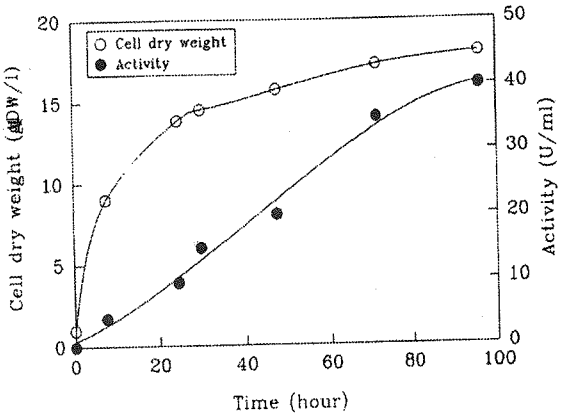
شکل (۳) تأثیر pH اولیه محیط کشت در فعالیت آنزیم.



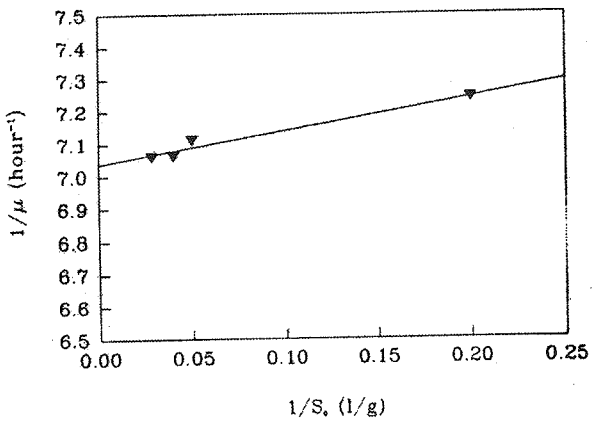
شکل (۶) تغییرات غلظت توده سلولی و فعالیت آنزیمی با زمان فرآیند در دور ۴۰۰ rpm و هوادهی ۱/۵ vvm.



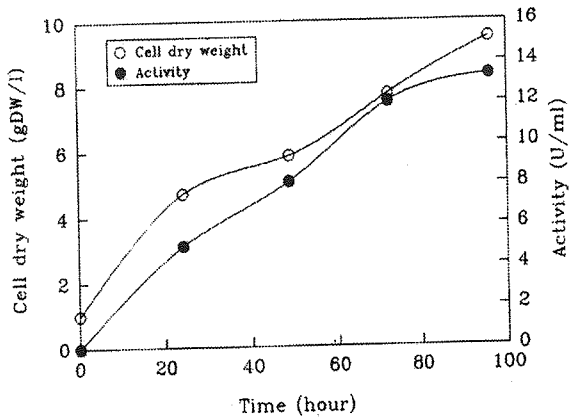
شکل (۴) منحنی رشد A-niger و تولید آنزیم در محیط کشت انتخابی بهینه (در فلاسک).



شکل (۷) تغییرات غلظت توده سلولی و فعالیت آنزیمی با زمان فرآیند در دور ۴۰۰ rpm و هوادهی ۲/۵ vvm.



شکل (۵) منحنی Lineeweaver-Burk برای تعیین پارامترهای K_S و μ_{max}.



شکل (۸) تغییرات غلظت توده سلولی و فعالیت آنزیمی با زمان فرآیند در دور ۵۰۰ rpm و هوادهی ۲/۵ vvm.

جدول (۱) مقایسه نتایج حاصل از چند محیط کشت ترکیب اجزاء مختلف.

محیط کشت	فعالیت (U/m1)	قد احیاء (g/1)	غلظت توده سلولی (gDW/1)
گلوتن ۰/۸ گرم پساب ۳/۶ درصد وزنی، ۱۰۰ ml	۵۷	۴	۲۰
آرد ۳ گرم، گلوتن ۰/۴ گرم پساب ۱/۳ درصد وزنی، ۱۰۰ ml	۲۷	۳	۱۸/۱۵
آرد ۴/۸۶ گرم، گلوتن ۰/۱۷ گرم آب شیر، ۱۰۰ ml	۵/۶	۳	۹/۳
آرد ۳ گرم، گلوتن ۰/۴ گرم آب شیر، ۱۰۰ ml	۱۰	۳	۱۱/۵
آرد ۳ گرم، گلوتن ۰/۴ گرم آب مقطر، ۱۰۰ ml	۵/۶	۲/۵	۹/۳

جدول (۲) مقایسه وزن خشک، میزان فقند احیاء و فعالیت چند محیط کشت با ترکیب درصدهای مختلف CSL.

(% v/v) (CSL)	قند احیاء (g/1)	فعالیت (U/m1)	غلظت توده سلولی (gDW/1)	(pH)
۴	۴	۴۴/۵	۱۷	۳/۵
۸	۳	۶۰	۲۱	۳/۴
۱۰	۳	۶۸	۲۲	۳/۳۵
۱۶	۳	۷۳	۲۲/۵	۳/۳
۲۵	۳/۵	۴۱/۵	۱۴/۵	۳/۴

مراجع

[1] J. H. Pazar and T. Ando, The Hydrolysis of Glucosyl Oligosaccharides With D- (1, 4) and D - (1, 6) Bonds by Fungal Amyloglucosidase, J. Biol. Chem., Vol. 235, 297-302, (1960).

[2] G. Tegg, Glucose Syrups: The Raw Material, in "Glucose Syrups: Science and Technology" , Eds: Dziedzic and Kearsley, (1984).

[3] Whistler and Bemiller, Hydrolysis of Starch with Glucoamylase, in "Methods in Carbohydrate Chemistry", Vol. 4, (1964).

[4] W. M. Fogarty and C. J. Kelly, Microbial Enzymes and Biotechnology, 83-105, (1990).

[5] A. Pandy, Recent Process Developments in Solid State Fermentation, Proc. Biochem., Vol. 27, 109-117, (1972).

[6] Y. Q. Cui, et. al., Effects of Dissolve Oxygen Tension and Mechanical Forces on Fungal Morphology in Submerged Fermentation, Biotechnol. Bioeng., Vol. 57, 409-419, (1998).

[7] A. Mitard and J. P. Riba, Morphology and Growth of A. niger ATCC 26036 Cultivated at Several Shear Rates, Biotechnol. Bioeng., Vol. 32, 835-840, (1988).

[۸] راضیه یزدان پرست، راهنمای آزمایشگاه بیوشیمی، نشر دانش آمروز، ۱۳۷۱.

[۹] دیوید توماس پلامر، مقدمه ای بر بیوشیمی کاربردی، ترجمه دکتر اسماعیل علمی آخونی، انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۷۰.

[۱۰] اخترالملوک کاظمی و ویدا مقصودی، راه های آزمایشگاه کنترل کیفی مواد غذایی، مرکز تحقیقات مهندسی بیوشیمی و کنترل محیط زیست دانشگاه صنعتی شریف، ۱۳۷۶.