

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

سید مجتبی جعفری منش¹، حمید راشدی²، ساره ارجمند³، سیدامید رعنائی سیادت^{4*}

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

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

3- 4- استادیار مرکز تحقیقات پروتئین، پردیس عمومی دانشگاه شهید بهشتی، تهران

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

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

o_ranaei@sbu.ac.ir

(دریافت مقاله: 94/10/9 پذیرش مقاله: 95/9/17)

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 متیل دوست هانسولا پلیمورفا¹ (ه. پلیمورفا) بهینه شده است. طراحی آزمایش‌ها با روش یک فاکتوری انجام شده است و بهینه‌سازی با روش شناسی رویه‌پاسخ صورت پذیرفته است. نتایج آزمایش‌ها نشان داده است که شربت ذرت در درصد وزنی - حجمی 5/5 و 6/15 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 41/4 درصد و تولید آنزیم نوترکیب را 69/7 درصد افزایش داده است.

کلیدواژگان: بهینه‌سازی، اندوگلوکاناز II، شربت ذرت، مخمر هانسولا پلیمورفا، روش شناسی رویه پاسخ.

1- مقدمه

صنعتی در سال 2014 در حدود 4/5 میلیارد دلار ارزش گذاری شده است و پیش‌بینی شده است که با رشد سالانه 8/2 درصد تا سال 2018، ارزش این بازار به 7/1 میلیارد دلار افزایش می‌یابد [1]. آنزیم‌های هیدرولازی بیشترین حجم از بازار آنزیم‌های صنعتی را تشکیل می‌دهند که در

رشد روز افزون تقاضا برای آنزیم‌های مورد استفاده در صنایع مختلف، موجب پیشرفت‌هایی در فن‌آوری‌های تولید آنزیم‌های صنعتی شده است. بازار جهانی آنزیم‌های

¹ *Hansenula polymorpha*

این میان آنزیم‌های تأثیرگذار بر کربوهیدرات‌ها پس از پروتئازها پرمصرف‌ترین زیرمجموعه هیدرولازها هستند [2].

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 [11،12] کاربرد دارد. سلولاز توسط ارگانسیم‌های مختلفی همچون قارچ‌ها [13-15]، باکتری‌ها [16-18] و حشرات [19] 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*¹ (ت. ریسه‌ای) از سه نوع آنزیم تشکیل شده است که شامل بتا-گلوکوسیداز (EC 3.2.1.21)، اگزوگلوکاناز (EC 3.2.1.91) و اندوگلوکاناز (EC 3.2.1.4) می‌شود. اگزوگلوکاناز پیوندهای بتا-1 و 4-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-1 و 4-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 [22]، باکتری [23] و مخمر [24] برای تولید اندوگلوکاناز با موفقیت مورد استفاده قرار گرفته‌اند. مخمرهای متیل‌دوست مانند *پیکیا پاستوریس*²

(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 سنتتاز (DHAS) و فرمات دهیدروژناز (FMD) می‌شود. پیش‌برهای³ این ژن‌ها، پیش‌برهای قدرتمندی هستند که می‌توانند باعث بیان بالا در تولید پروتئین نوترکیب شوند [25].

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 پنیر، عصاره مخمر، عصاره گوشت، پودر ماهی، پودر ذرت و غیره که بعضاً

¹ *Trichoderma reesei*² *Pichia pastoris*³ promoters

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

Y پاسخ مجموعه (دانسیته نوری در طول موج 600 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، 5 سطح از یک فاکتور به علاوه 2 تکرار سطوح ابتدا و انتها که برای تعیین خطای خالص و عدم تطابق الزامی است، در نظر گرفته شد.

بازه‌ی منطقی 1 تا 10 درصد (وزنی - حجمی) از شربت ذرت در نظر گرفته شده است و آزمایشات مطابق با جدول 1 اجرا شده‌اند.

جدول 1 طراحی آزمایش یک فاکتوری برای بهینه‌سازی غلظت شربت ذرت

شماره آزمایش	غلظت شربت ذرت
1	10/00
2	1/00
3	5/50
4	3/25
5	1/00
6	10/00
7	7/75

2-2- 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 5 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 همراه با ذرات با چگالی کمتر از محلول میانی جدا شده و

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 [26]. 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 آمونیوم دی‌هیدروژن فسفات از محیط کشت معین نمکی سنتزی شماره 6 (SYN6) [27] 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.

2- مواد و روش‌ها

2-1- طراحی آزمایش

به منظور بهینه‌سازی غلظت شربت ذرت برای دستیابی به حداکثر رشد سلولی میکروارگانیسم 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 7.0.0 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 (1) برای یک فاکتور عددی صورت پذیرفته است.

2 درصد، دی-گلوکز 2 درصد، آگار 2 درصد، امپی سیلین 100 میکروگرم در میلی‌لیتر) منتقل شده و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت انکوبه شده است. کلنی‌های رشد کرده به ارلن مایر با حجم 500 میلی‌لیتر حاوی 100 میلی‌لیتر محیط YPD (عصاره مخمر 1 درصد، پپتون 2 درصد، دی-گلوکز 2 درصد) منتقل شده‌اند و به مدت 20 ساعت در انکوباتور لرزان با دور 200rpm در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شده‌اند. این محیط به عنوان پیش‌کشت مورد استفاده قرار خواهد گرفت.

تخمیر در ارلن مایرهای با حجم 500 میلی‌لیتر حاوی 100 میلی‌لیتر محیط کشت نیمه معین SYN6 اجرا شده است. این فرایند در فاز تولید زیست توده در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 72 ساعت و در فاز تولید آنزیم در دمای 30 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت و در هر دو فاز در دور 200rpm 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 1 ذکر شده‌اند.

محیط SYN6 حاوی 6 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 121 درجه سانتی‌گراد و فشار 15 psi به مدت 20 دقیقه و دیگر محلول‌ها با استفاده از فیلتر 0/2 میکرومتر استریل شده‌اند؛ سپس پیش‌کشت بدون تغلیظ به صورت 1 درصد حجمی - حجمی تلقیح شده است.

القای تولید محصول با افزودن 2 درصد حجمی - حجمی از متانول خالص استریل شده با استفاده از فیلتر 0/2 میکرومتر صورت پذیرفته و دمای انکوباتور به 30 درجه

محلول شفاف کهربایی رنگ به دست آمده، جمع آوری شد. برای نگهداری از شربت ذرت، این محلول به وسیله اتوکلاو در دمای 121 درجه سانتی‌گراد و فشار 15 psi به مدت 15 دقیقه استریل شده است. رنگ محلول پس از استریل شدن به قهوه‌ای سوخته تغییر کرد. محلول تا زمان استفاده در یخچال و در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شده است.

برای سنجش پروتئین کل شربت ذرت از روش لوری¹ بهینه شده و سرم آلبومین گاوی² (BSA) به عنوان استاندارد سنجش استفاده شده است [28]. میزان قند این محلول نیز با استفاده از روش میلر برای سنجش قندهای احیا کننده، اندازه‌گیری شده است [29]. بر اساس این روش معرف دی‌نیتروسالیسیلیک اسید به نمونه‌های استاندارد گلوکز و همچنین به نمونه‌های محلول شربت ذرت افزوده شده سپس به مدت 5 دقیقه در آب جوش قرار داده شد. سپس جذب نور در طول موج 540 نانومتر اندازه‌گیری شد. جدول 2 خصوصیات شربت ذرت مورد استفاده در این مطالعه را نشان می‌دهد.

جدول 2 خصوصیات شربت ذرت

توضیح	خاصیت مورد اندازه‌گیری برای گلوتن مایع
	رنگ
قهوه‌ای سوخته	
1/183 گرم بر میلی‌لیتر	چگالی
11/878 cp (μ)	ویسکوزیته دینامیک
10/0397 cst (v)	ویسکوزیته سینماتیک
93/96 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	غلظت قند
289/83 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	غلظت پروتئین
0/3243 گرم وزن خشک در هر گرم محلول	وزن خشک

2-3- کشت سلول

مخمر متیل دوست از بانک سلولی 80- درجه سانتی‌گراد به پلیت کاری YPD-Amp (عصاره مخمر 1 درصد، پپتون

¹ Lowry method

² Bovine Serum Albumin

سانتی گراد کاهش یافته است.

جدول 3 طراحی آزمایش و نتایج تولید زیست توده و

محصول

شماره آزمایش	غلظت شربت ذرت	OD ₆₀₀	OD ₄₅₀
1	10/00	12/834	0/36663
2	1/00	13/548	0/2098
3	5/50	14/436	0/468467
4	3/25	13/879	0/439467
5	1/00	13/047	0/2856
6	10/00	12/464	0/407367
7	7/75	14/658	0/437967
8	SYN6	10/34	0/276033
9	کنترل منفی	3/28	0/0143

2-4- سنجش آنزیم اندوگلوکاناز

سنجش فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز با استفاده از روش گوس با استفاده از کربوکسی متیل سلولز¹ (CMC) به عنوان سوبسترا و معرف دی نیتروسالیسیلیک اسید² (DNS) به عنوان معرف گلوکز انجام شده است [30]. برای اندازه گیری فعالیت آنزیم، اندوگلوکاناز نوترکیب به محلول 1 درصد وزنی - حجمی CMC-Na در بافر سدیم استات 50 میلی مولار در pH 4/8 افزوده شده و مخلوط (250 میکرولیتر) به مدت 30 دقیقه در دمای 50 درجه سانتی گراد انکوبه شده است. واکنش آنزیمی با افزودن سدیم هیدروکسید 6N متوقف شده است و پس از آن 750 میکرولیتر از معرف DNS به آن افزوده می شود و به مدت 5 دقیقه در آب جوش نگه داشته سپس جذب نوری در طول موج 540 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.

3- نتایج

میزان رشد و تولید زیست توده با استفاده از اندازه گیری دانسیته نوری در طول موج 600 نانومتر و میزان فعالیت نسبی آنزیم های نوترکیب تولید شده با استفاده از روش گوس بدست آمده است. نتایج این آزمایش ها در جدول 3 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 شده اند، در قالب دو معادله چند جمله ای بیان شده اند.

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.

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

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 99 درصد ($p \leq 0/05$) معنی دار است. نتایج آنالیز واریانس مدل ذکر شده و ضرایب آن در جدول 4 قابل مشاهده است.

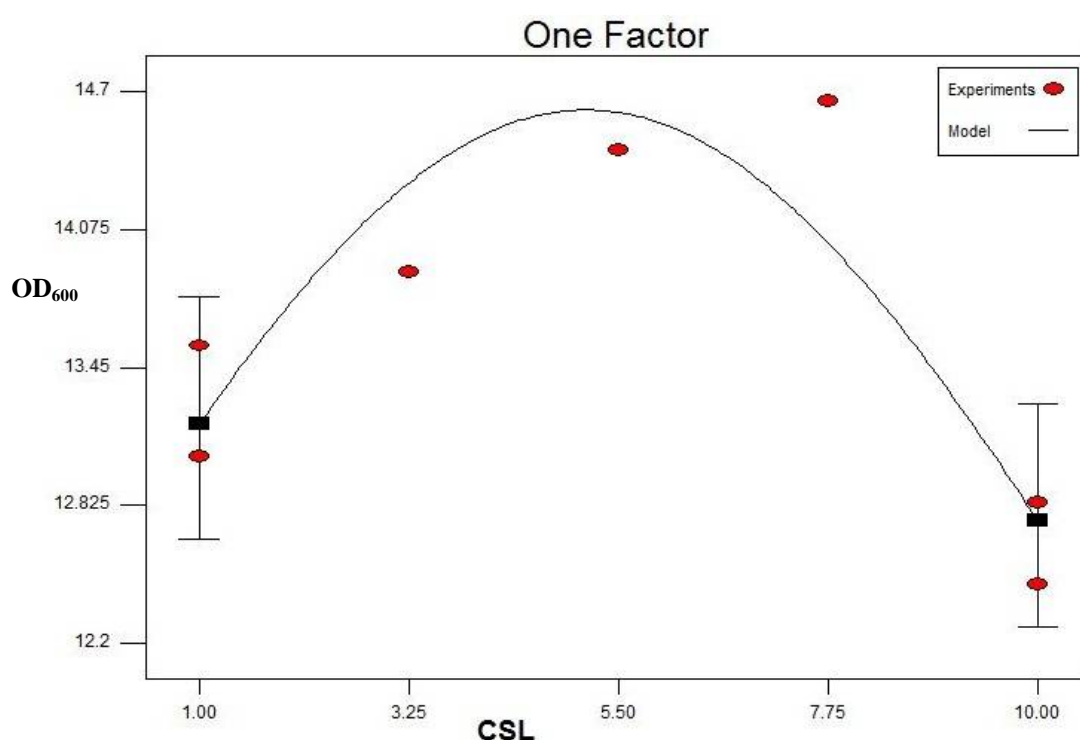
ضریب تشخیص (R^2) برای نتایج بدست آمده و مدل پیش بینی شده برابر با 0/8140 بوده است. بهینه سازی غلظت وزنی - حجمی شربت با استفاده از روش شناسی رویه پاسخ صورت گرفته و براساس مدل پیش بینی شده، در غلظت 5/5 درصد شربت ذرت، حداکثر زیست توده تولید می شود که برابر با 14/62 می باشد (نمودار 1).

¹ Carboxymethyl cellulose

² Dinitrosalicylic acid

جدول 4 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 E-6	8/75	0/0346
A-شربت ذرت	1/058 E-6	1/43	0/2980
A^2	1/190 E-5	16/08	0/0160
عدم تطابق	1/021 E-6	2/22	0/3103



نمودار 1 نتایج آزمایش‌ها و مدل بیانگر نتایج برای تعریف رشد و تولید زیست توده. نتایج مربوط به رشد مخمر متیل دوست طی 72 ساعت در دمای 37 درجه سانتیگراد و دور 200rpm 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.

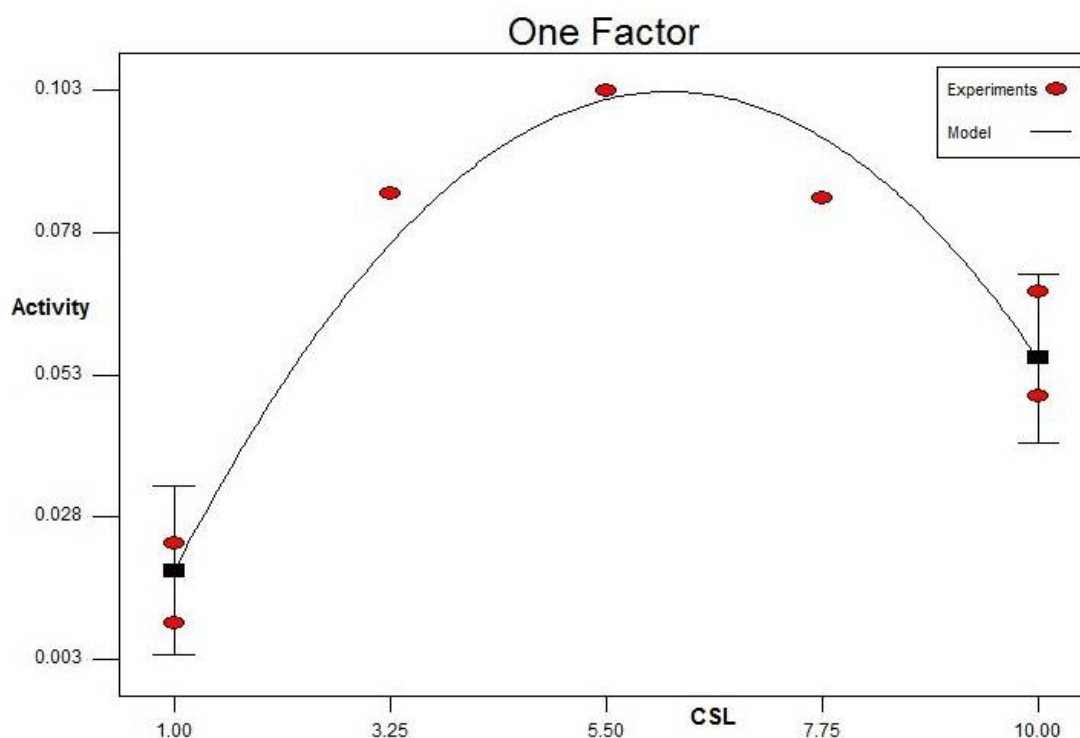
معنی دار بودن آماری مدل همانند مدل قبل از طریق آنالیز واریانس (ANOVA) مورد ارزیابی قرار گرفته است. نتایج آنالیز واریانس مدل فوق الذکر و ضرایب آن در جدول 5 قابل مشاهده است. ضریب تشخیص (R^2) برای نتایج بدست آمده و مدل پیش‌بینی شده برابر با 0/9320 بوده است.

دیگر مدل مورد مطالعه جهت تشریح فعالیت آنزیمی بوده است. 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.

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

جدول 5 آنالیز واریانس مدل بیانگر تولید آنزیم اندوگلوکاناز نوترکیب

مرجع	میانگین مربعات	مقدار F	مقدار P
مدل	3/320 E-3	27/40	0/0046
A-شربت ذرت	1/565 E-3	12/92	0/0229
A^2	5/075 E-3	41/89	0/0029
عدم تطابق	1/090 E-4	0/82	0/5503



نمودار 2 نتایج آزمایشات و مدل بیانگر نتایج برای تعریف تولید آنزیم اندوگلوکاناز نوترکیب. نتایج مربوط به تولید آنزیم اندوگلوکاناز II نوترکیب توسط مخمر متیل دوست طی 72 ساعت رشد در دمای 37°C و 24 ساعت القای تولید محصول به وسیله ای متانول در دمای 30 درجه سانتی گراد و دور 200rpm در انکوباتور لرزان به صورت نقاط قرمز رنگ و مدل آماری چندجمله ای درجه دو به دست آمده از نتایج آزمایش ها به صورت خط نشان داده شده است.

4- بحث و نتیجه گیری

بهینه سازی فرایندها از جمله فرایندهای زیستی، در ابتدا نیازمند دستیابی به یک مدل ریاضی حقیقی، جامع و کامل برای تشریح رفتار سیستم می باشد که این امر نیازمند داده هایی از رفتار سیستم در شرایط مختلف و مقادیر متفاوت فاکتورهای تأثیرگذار مورد مطالعه است. این

بهینه سازی غلظت وزنی - حجمی شربت ذرت برای تولید آنزیم نوترکیب اندوگلوکاناز همچون تولید زیست توده از روش شناسی رویه پاسخ بهره برداری شده است و مطابق با مدل معرفی شده حداکثر فعالیت آنزیم در محیط با غلظت اولیه شربت ذرت برابر با 6/15 درصد به میزان 0/4684 خواهد بود (نمودار 2).

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 7.0.0 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 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 5/5 درصد شربت ذرت می‌توان به دانسیته نوری برابر با 14/62 دست یافت که این مقدار در مقایسه با نمونه کنترل مثبت محیط SYN6، 41/4 درصد افزایش را نشان می‌دهد. در مورد تولید آنزیم اندوگلوکاناز II نوترکیب نیز نقطه بهینه تعیین شده توسط مدل معرف فرایند با 6/15 درصد شربت ذرت در ابتدای تخمیر موجب فعالیت آنزیم برابر با 0/4684 می‌شود که در مقایسه با آنزیم تولید شده در محیط SYN6، 60/7 درصد افزایش را نشان می‌دهد.

غذای 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 می‌گردد. این امر نیز می‌تواند یکی دیگر از دلایل افزایش رشد و تولید محصول در محیط جدید در حضور شربت ذرت باشد.

5- منابع

- 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**, 1427–1437.
- [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 T and its Transglycosylase 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**, 153–164.
- [19] Shirley, D., Oppert, C., Reynolds, T. B., Miracle, B., Oppert, B., Klingeman, W. E., & Jurat-Fuentes, J. L. (2014). Expression of an 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.
- [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**, 183–187.
- [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**, 291–301.
- [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 retainment. *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., & Niranjana, K. (2015). Aqueous enzyme assisted oil extraction from oilseeds and emulsion de-emulsifying methods: A review. *Trends in Food Science & 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

- 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.
- [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,