زیست‌فناوری دانشگاه تربیت مدرس
دورهٔ 4، شمارهٔ 1، بهار و تابستان 1392

بهینه‌سازی اثر یون‌های فلزی روی، مس و منگنز بر فعالیت آنزیم‌های لیگنیناز برای پیش‌فراوری ساقه برنج در تبدیل به اتانول زیستی

فاطمه قربانی[1*]، داود بی‌ریا[2]، حمیدرضا کریمی‌نیا[3]

1- دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی شیمی- بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
2- استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
3- دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی و نفت، دانشگاه صنعتی شریف، تهران، ایران

***کدپستی 1659733771 اصفهان، ایران**
fatemeghorbani@hotmail.com
(دریافت مقاله: 91/5/11، پذیرش: 91/12/22)

چکیده- تبدیل زیست‌توده لیگنوسلولزی (مانند ضایعات کشاورزی) به سوخت‌های زیستی مانند اتانول، گزینه‌ای مناسب و اقتصادی برای بهبود امنیت انرژی است. اجزا اصلی سازنده لیگنوسلولز، شامل سلولز، همی‌سلولز و لیگنین است. وجود لیگنین، از هیدرولیز سلولز و تبدیل آن به قند و در نهایت، سوخت زیستی جلوگیری می‌کند. برای از بین بردن این مشکل، روش‌های مختلف شیمیایی، فیزیکی، فیزیکی- شیمیایی و زیستی پیشنهاد شده است. به‌دلیل وجود شرایط ملایم عملیاتی، جلوگیری از ایجاد ترکیبات سمی و پسماندهای خطرناک و نداشتن آثار مخرب جانبی، روش زیستی اهمیت ویژه‌ای دارد. مشکل اصلی روش‌های زیستی، بازدهی کمتر آن‌ها نسبت به سایر روش‌ها است. برای رفع این مشکل، در این پژوهش، تجزیه آنزیمی لیگنین موجود در ساقه برنج با آنزیم‌های پراکسیداز تولیدشده (منگنز پراکسیداز، لیگنین پراکسیداز) از یک سویه قارچ پوسیدگی سفید، بررسی شد. برای اندازه‌گیری غلظت لیگنین و تعیین فعالیت آنزیم‌های تولید شده به‌وسیله‌ی قارچ، به ترتیب از روش اندازه‌گیری جذب نوری لیگنین محلول در استیل بروماید و روش جذب نوری با معرف‌های اختصاصی استفاده شد. نتایج نشان داد که تیمار آنزیمی می‌تواند حداقل 30 درصد لیگنین موجود در زیست‌توده‌ی لیگنوسلولزی را حذف کند. ترکیب شیمیایی محیط کشت از نظر غلظت یون‌های فلزی مؤثر در تولید آنزیم‌های پراکسیداز مانند منگنز، مس و روی به روش رویه سطح پاسخ باکس بنکن بهینه شد. فعالیت آنزیمی در شرایط بهینه برای آنزیم‌های منگنز پراکسیداز و لیگنین پراکسیداز نسبت به نمونه شاهد، چهار برابر افزایش یافت.

واژگان کلیدی: زیست‌توده لیگنوسلولزی، هیدرولیز آنزیمی، قارچ پوسیدگی سفید، سوخت زیستی.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-04]

1- مقدمه

نگرانی‌های درازمدت زیست محیطی و اقتصادی، باعث انجام تحقیقات گسترده‌ای روی منابع تجدیدپذیر سوخت‌های زیستی به‌عنوان جایگزینی برای سوخت‌های فسیلی شده است. تبدیل زیست‌توده لیگنوسلولزی به سوخت‌های زیستی همچون اتانول گزینه‌ای مناسب و اقتصادی برای بهبود امنیت انرژی و کاهش انتشار گازهای گلخانه‌ای است.

اجزا اصلی سازنده لیگنوسلولز، سلولز، همی‌سلولز و لیگنین است. وجود لیگنین از تجزیه سلولز و تبدیل آن به قند و در نهایت، سوخت زیستی جلوگیری می‌کند. برای از بین بردن این مشکل، روش‌های مختلف شیمیایی، فیزیکی، فیزیکی- شیمیایی (انفجار فیبر آمونیاک [AFEX]، انفجار کربن‌دی‌اکسید) و زیستی پیشنهاد شده است [1، 2]. اشکال این روش‌ها شرایط عملیاتی دشوار، مانند فشار بالا، دما و pH، ایجاد ترکیبات بازدارنده و آثار مخرب جانبی است [3]. در مقابل، به‌دلیل وجود شرایط ملایم عملیاتی، ایجاد نکردن ترکیبات سمی و پسماندهای خطرناک و نداشتن آثار مخرب جانبی، روش زیستی اهمیت ویژه‌ای دارد. اشکال اصلی روش‌های آنزیمی، بازدهی کمتر آن‌ها نسبت به سایر روش‌ها و کند بودن آن‌ها است [4]. در روش زیستی، برای افزایش دسترسی به ساختار دیواره سلولی زیست‌توده لیگنوسلولزی، از کمپلکس‌های آنزیمی میکرواورگانیسم‌های تخریب‌کننده مانند قارچ‌ها (از جمله قارچ پوسیدگی سفید) استفاده می‌شود؛ به‌گونه‌ای که زیست‌توده اصلاح‌شده تمایل بیشتری به هضم آنزیمی دارد [5،6،7]. قارچ‌ها ویژگی‌های تخریب‌کننده متمایزی روی زیست‌توده لیگنوسلولزی دارند. قارچ پوسیدگی سفید مؤثرترین باسیدیومایست برای پیش‌تیماری بیولوژیکی مواد لیگنوسلولزی است.

برای دستیابی به بیشینه‌ی بازده هیدرولیز آنزیمی، لازم است شرایط محیط کشت برای تولید بیشینه آنزیم‌های موجود در محیط و مؤثر بر تجزیه لیگنین، بهینه شود. افزون بر منبع کربن و نیتروژن، یون‌های فلزی بر تولید و فعالیت آنزیم‌ها تأثیر دارند و بهینه شدن غلظت آن‌ها می‌تواند به بهبود کلی فرایند کمک شایانی کند [8]. شرایط محیط کشت، مانند استفاده از یون‌های فلزی متفاوت، می‌تواند رشد قارچ، تولید آنزیم و توانایی تخریب سریع سوبسترا را افزایش یا کاهش دهد و باعث تغییرات فیزیولوژیک و مورفولوژیک شود [8]. قارچ پوسیدگی سفید، به فلزات ضروری مانند Mg^{2+}، Ca^{2+}، Mn^{2+}، Zn^{2+} و Cu^{2+} به‌عنوان کوفاکتورهای آنزیم‌های متابولیکی، نیاز دارد ولی وجود بیش از اندازه این فلزات در محیط کشت، سمی است [9]. گزارش شده که Mn^{2+} نقش مهمی در تولید آنزیم لیگنین پراکسیداز، منگنز پراکسیداز و تخریب زیستی لیگنین دارد [10] و به‌عنوان اثرکننده فیزیولوژیکی در محیط کشت قارچ پوسیدگی سفید عمل می‌کند [11]. نقش تنظیمی سنتز زیستی آنزیم منگنز پراکسیداز به یون‌های منگنز نسبت داده می‌شود [12]. پژوهشگران، اثر یون منگنز را بر تولید آنزیم منگنز پراکسیداز بررسی کردند و بیشینه فعالیت این آنزیم در گونه‌ی *P. chrysosporium* را در غلظت 174 میکرومولار Mn^{2+} یافتند [13]. در بررسی دیگری، اثر یون Zn^{2+} و Cu^{2+} بر روی تولید آنزیم‌های منگنز پراکسیداز و لیگنین پراکسیداز آزمایش شد [14]؛ بیشینه فعالیت آنزیم لیگنین پراکسیداز و منگنز پراکسیداز به‌ترتیب در غلظت 18

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-04]

میکرومولار Zn^{2+} و 1/2 میکرومولار Cu^{2+}، دیده می‌شود. تغییر غلظت Zn^{2+} از 0/6 به 18 میکرومولار، به‌ترتیب فعالیت آنزیم لیگنین‌پراکسیداز و منگنز پراکسیداز را 1/5 و 1/2 برابر افزایش می‌دهد. همچنین تغییر غلظت Cu^{2+} از 0/04 به 1/2 میکرومولار، افزایش 1/4 برابری فعالیت آنزیم لیگنین پراکسیداز و افزایش 1/2 برابری فعالیت آنزیم منگنز پراکسیداز را در پی داشت.

در این پژوهش، تجزیه آنزیمی لیگنین موجود در ساقه برنج با آنزیم‌های پراکسیداز تولیدشده از یک سویه قارچ پوسیدگی سفید بررسی شد و با توجه به اهمیت غلظت یون‌های فلزی در تولید و فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، مقدار بهینه آن‌ها در محیط کشت به‌روش رویه سطح پاسخ تعیین شد.

2- مواد و روش‌ها

استیل بروماید و ABTS [2،2- آمینوبیس (3-اتیل بنزوتیازولین-6-سولفونات)] از شرکت Sigma و بقیه مواد از شرکت مرک آلمان تهیه شد. از دستگاه جذب نوری Biocrom (ساخت انگلستان) و خشک‌کن انجمادی Zirbus (ساخت آلمان) استفاده شد.

2-1- میکروارگانیسم و محیط‌های کشت

برای فراهم کردن عصاره آنزیمی، از دو گونه قارچ پوسیدگی سفید متعلق به زیرشاخه بازیدیومیست‌ها به رنگ سبز و سیاه که از مجموعه میکروبی مرکز تحقیقات بیوشیمی و محیط زیست دانشگاه صنعتی شریف تهیه شده بود، استفاده شد. این سویه‌ها در این مرکز، به ترتیب با شماره‌های 9070 و 9071 ثبت شده است. به‌دلیل فعالیت بیشتر سویه سبز، این سویه برای ادامه کار در نظر گرفته شد. این میکرواورگانیسم از ضایعات چوبی مرطوب جداسازی شده است و رشد میسیلومی دارد. در محیط کشت مایع، به رشد توده‌ای و متصل شدن به جداره ظرف تمایل دارد. پوسیدگی حاصل از قارچ، موجب سفید شدن زیست‌توده لیگنوسلولزی گشته و به آن قوام رشته‌ای یا اسفنجی می‌دهد. این قارچ در دمای 37 درجه سانتیگراد به مدت 5 روز در محیط پیش کشت PDA رشد کرد و تا زمان استفاده، در 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

محیط کشت به‌کاررفته برای ارزیابی توانایی سویه‌ها (m1) در تجزیه لیگنین، شامل 30gr/lit گلوکز، 10gr/litپپتون، 5 gr/lit عصاره مخمر و 0/1 میلی‌مولار $MnSo_4$-H_2O است که pH آن، برابر 4 تنظیم شد.

محیط کشت استفاده شده برای بررسی اثر یون‌های فلزی (ml)، شامل 0/1gr/lit $CaCl_2$، 1gr/lit KH_2Po_4، 0/5gr/lit $MgSo_4.7H_2O$، 5mg/lit $FeSo_4.7H_2O$، 10gr/lit گلوکز، 0/2gr/lit آمونیوم تارتارات، در بافر سیترات 50 میلی‌مولار و pH برابر 4/5 است. یون‌های فلزی منگنز، مس و روی با توجه به مقدار تعیین‌شده در طراحی آزمایش‌ها به این محیط افزوده می‌شود.

2-2- اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز

برای تعیین فعالیت آنزیم‌های تولید شده به‌وسیله‌ی قارچ، از معرف‌های ویژه و روش جذب نوری در دمای 25 درجه سانتی‌گراد استفاده شد. فعالیت آنزیم لیگنین پراکسیداز با روش تین و کرک [15] با استفاده از 0/1 میلی‌لیتر نمونه در حجم کل 3 میلی‌لیتر و فعالیت آنزیم منگنز پراکسیداز با روش پاسچینسکی [16] با استفاده از 0/1 میلی‌لیتر نمونه در حجم کل 3 میلی‌لیتر، اندازه‌گیری شد.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-04]

2-3- اندازه‌گیری غلظت لیگنین

برای اندازه‌گیری لیگنین باقی‌مانده در زیست‌توده لیگنوسلولزی از روش اسپکتروفتومتری لیگنین محلول استیل بروماید استفاده شد [17]. بنابراین منحنی استاندارد برای لیگنین استخراج شده از همان نمونه ساقه برنج بر پایه‌ی روشی که فوکوشیما [18] پیشنهاد کرده است، رسم شد. برای هر فلاسک، مقدار لیگنین باقی‌مانده پس از استخراج به کمک این منحنی کالیبراسیون با در نظر گرفتن جذب نمونه شاهد در 280 نانومتر، تعیین شد.

2-4- ارزیابی توانایی میکروارگانیسم در تجزیه لیگنین موجود در زیست‌توده ساقه برنج

کارکرد سامانه آنزیمی قارچ در حذف لیگنین ساقه‌های برنج در مرحله نخست ارزیابی شد. ابتدا ساقه برنج‌های جمع‌آوری شده با آب مقطر شسته، خشک و سپس آسیاب و خرد شد. 4/5 گرم از ساقه برنج آماده‌شده به ارلن‌های 250 میلی‌لیتری حاوی 75 میلی‌لیتر محیط کشت مایع اضافه شد. سپس محیط‌ها در دمای 121درجه سانتی‌گراد، 20 دقیقه استریل شدند و بعد از سرد شدن، هر ارلن به‌وسیله‌ی یک پلاگ (دایره‌ای به قطر 1 سانتی‌متر) با قارچ رشدیافته در محیط PDA تلقیح داده شد و 1 ماه در انکوباتور شیکردار در دمای 32 درجه سانتی‌گراد و دور 160rpm قرار داده شد. نمونه‌گیری برای تعیین فعالیت آنزیم‌های موجود در محیط و اندازه‌گیری غلظت لیگنین، هر 7 روز به مدت 30 روز انجام شد.

2-5- بررسی اثر یون‌های فلزی بر میزان تولید آنزیم

محیط کشت مایع ml به حجم 100 میلی‌لیتر همراه یون منگنز در غلظت‌های 0/01، 0/05 و 0/1 میلی‌مولار، یون روی در غلظت‌های 5، 15 و 25 میکرومولار و یون مس در غلظت‌های 1، 2/5 و 4 میکرومولار تهیه شد. سپس محیط‌ها در دمای 121درجه سانتی‌گراد، به‌مدت 20 دقیقه استریل شدند و پس از سرد شدن، هر ارلن به‌وسیله‌ی دو پلاگ (دایره‌ای به قطر 1 سانتی‌متر) قارچ رشدیافته در محیط PDA، تلقیح داده شد و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد و دور 150rpm قرار داده شد؛ بدون وجود ساقه برنج، فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز به‌روش اسپکتروفوتومتری هر 3 روز یک‌بار برای 12 روز، بررسی شد. یک نمونه شاهد بدون یون‌های روی و مس و تنها با یون منگنز با غلظت 1 میکرومولار برای مقایسه فعالیت آنزیم‌های تولید شده، استفاده شد.

2-6- طراحی آزمایش و آنالیز آماری

روش رویه پاسخ، مجموعه‌ای از تکنیک‌های آماری و ریاضی مفید برای گسترش، بهبود و بهینه‌سازی فرایندهایی است که در آن‌ها، پاسخ، تحت تأثیر چندین متغیر قرار دارد و هدف، بهینه‌سازی این پاسخ است. در این پژوهش برای طراحی آزمایش‌ها و بهینه‌سازی یون‌های فلزی محیط کشت، از روش رویه پاسخ باکس بنکن استفاده شد. روش رویه پاسخ باکس بنکن تنها سه سطح دارد و نسبت به سایر روش‌های طراحی، نیاز به آزمایش‌های کمتری دارد. افزون‌بر این، این روش برای آرایش و تحلیل آزمایش‌ها مؤثرتر و آسان‌تر است و بسیاری از پژوهشگران از آن استفاده کرده‌اند. پس اثر سه یون روی، مس و منگنز در سه غلظت متفاوت برای تولید آنزیم‌های پراکسیداز بررسی شد. برپایه بررسی‌های انجام شده، سه یون فلزی منگنز، روی و مس، نسبت به سایر یون‌ها اثر بیشتری فلزی در تولید آنزیم‌های پراکسیداز داشته است [14]. از آن‌جا که نقش اصلی

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-04]

آنزیم منگنز پراکسیداز در اکسیداسیون ترکیبات فنولی، تبدیل Mn^{2+} به Mn^{3+} است و در پژوهش‌ها تأثیر وجود یون منگنز در بهبود تولید و پایداری آنزیم منگنز پراکسیداز بررسی شده است، گمان می‌شود این یون بتواند نقش تنظیمی در سنتز زیستی آنزیم منگنز پراکسیداز، لیگنین پراکسیداز و تخریب لیگنین داشته باشد [13،10]. در پژوهش دیگری تأثیر وجود یون روی در تولید آنزیم‌های منگنز پراکسیداز و لیگنین پراکسیداز بررسی شده است [14].

متغیرهای مستقل، غلظت یون‌های فلزی و پاسخ سامانه، فعالیت آنزیم‌های لیگنین پراکسیداز و منگنز پراکسیداز است. یون منگنز در غلظت‌های 0/01، 0/05 و 0/1 میلی‌مولار، یون روی در غلظت‌های 5، 15و 25 میکرومولار و یون مس در غلظت‌های 1، 2/5 و 4 میکرومولار بررسی شد. پژوهش‌های مختلفی روی غلظت‌های متفاوت این یون‌ها انجام شده است [13، 14]. برپایه‌ی این بررسی‌ها، به‌نظر می‌رسد که غلظت یون‌های فلزی در بازه‌ای که به آن اشاره شد، بهینه باشد و بیش ازاندازه‌های گفته شده، تاثیر بازدارنده در تولید آنزیم‌های پراکسیداز داشته باشد. برای بررسی تأثیر این سه یون فلزی، روش سطح پاسخ باکس بنکن، آزمایشی با 15 نمونه با غلظت‌های متفاوت از عناصر پیشنهاد کرد. مقادیر متغیرهای آنالیزشده و پاسخ‌های اندازه‌گیری شده در روز دهم رشد با روش طراحی باکس بنکن، در جدول 1 نشان داده شده است. طراحی آزمایش با 12 نمونه و 3 نقطه مرکزی، و با تکرار و برای کمینه اثر متغیرهای غیرقابل پیش‌بینی در پاسخ‌ها دیده شده به صورت تصادفی انجام شد.

جدول 1 طراحی آزمایش برای آنزیم‌های پراکسیداز در روز دهم رشد با روش رویه پاسخ باکس بنکن برای بهینه‌سازی یون‌های فلزی محیط کشت

Sample	Mn (mM)	Zn (µM)	Cu (µM)	Mnp_{act} (U/ml)	Lip_{act} (U/ml)
1	0/01	5	2/5	6/99	2/26
2	0/1	5	2/5	15/53	11/61
3	0/01	25	2/5	10/35	10/65
4	0/1	25	2/5	10/61	10
5	0/01	15	1	1/55	1/94
6	0/1	15	1	11/13	9/36
7	0/01	15	4	9/32	9/68
8	0/1	15	1	9/06	8/07
9	0/05	5	1	10/35	7/1
10	0/05	25	4	6/47	9/03
11	0/05	5	4	10/61	7/42
12	0/05	25	4	8/54	7/1
13	0/05	15	2/5	8/8	7/42
14	0/05	15	2/5	8/54	10/97
15	0/05	15	2/5	11/65	10/32

3- بحث و نتیجه‌گیری

3-1- نتیجه آنالیز

نتایج به دست آمده از محیط کشت پایه نشان داد که پس از 30 روز زمان ماند، تیمار آنزیمی می‌تواند حداقل 30 درصد لیگنین موجود در زیست‌توده‌ی لیگنوسلولزی را حذف کند. به دلیل مناسب بودن نتیجه و توانایی بالای میکرواورگانیسم استفاده شده در حذف لیگنین، محیط کشت دیگری حاوی یون‌های فلزی، تهیه و غلظت یون‌های فلزی در این محیط بهینه شد.

فعالیت آنزیمی در شرایط بهینه و 10 روز پس از شروع رشد قارچ‌ها در محیط کشت حاوی یون‌های فلزی، برای آنزیم‌های منگنز پراکسیداز و لیگنین پراکسیداز نسبت به نمونه شاهد، چهار برابر افزایش یافت.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-04]

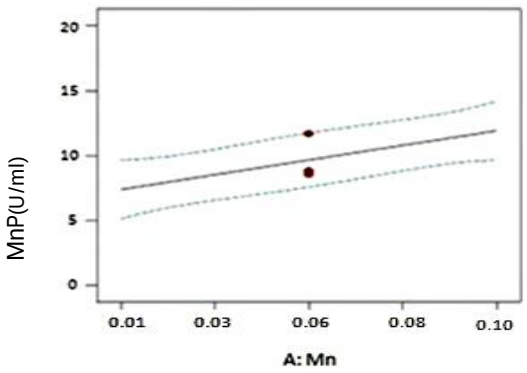
3-2- آنزیم منگنز پراکسیداز

آنالیز آماری مدل، بـه روش آنـالیز واریـانس (ANOVA) انجام شد و برای ارزیابی غلظـت بهینـه یـون‌هـای فلـزی مؤثر در محیط کشت، رویه پاسخ سه‌بعدی و نمودارهـای کانتر دوبعدی ارائه شد. نتایج آنالیز واریانس نشان می‌دهد که مدل درجه دوم برای آنالیز پاسخ مناسب اسـت. مـدل درجه دوم مناسب برای فعالیت آنزیم منگنز پراکسیداز، در متغیرهای کدشده در معادله 1 مشخص شده است.

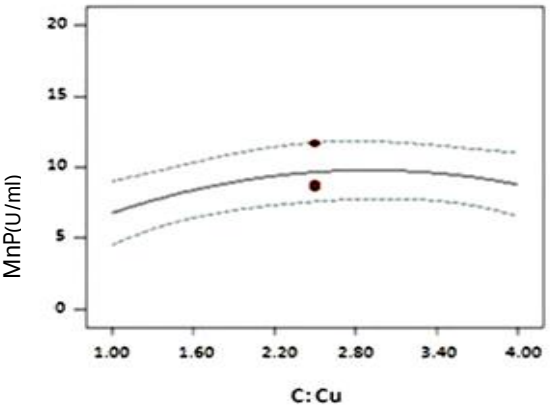
$$MnP= 9.66+ 2.26Mn- 0.94Zn+ 1.003Cu- 0.010Mn^2+ 1.218Zn^2- 1.89Cu^2- 2.07Mn*Zn- 2.46Mn*Cu+ 0.45Zn*Cu \quad (1)$$

با توجه به احتمال به دست آمده از آنالیز واریـانس یـون منگنز و مس ($p<0/1$)، این دو یـون، نسـبت بـه یـون روی، تأثیر چشم‌گیـری در تولیـد آنـزیم منگنـز پراکسـیداز دارنـد. ضرایب مثبت برای یون منگنز و مس نشان می‌دهد کـه آثـار خطی باعث افزایش پاسخ می‌شود؛ همچنین با مقدار احتمـال یون منگنز ($p<0/05$) می‌توان به این نتیجه رسید کـه وجـود این یون مؤثرترین نقش را در تولید آنـزیم منگنـز پراکسـیداز دارد. در شکل 1 و 2 به‌ترتیب اثر اصلی و برهم‌کنش دو یون منگنز و مس بر فعالیت آنزیم منگنز پراکسیداز نشان داده شده است. همان‌طـور کـه در شـکل 1 - الـف مشـخص اسـت، افزایش غلظت یون منگنز منجـر بـه افـزایش فعالیـت آنـزیم منگنز پراکسیداز می‌شـود و در بیشـینه غلظـت یـون منگنـز، افزایش 1/8 برابری فعالیت آنزیم منگنـز پراکسـیداز مشـاهده شده است. افزایش غلظت یون مس تا 2/5 میکرومولار سبب افزایش 1/5 برابری فعالیت آنزیم منگنز پراکسیداز و افـزایش غلظت بیش از این میزان، سبب کاهش پاسخ سامانه می‌شـود (شکل 1-ب). با مشاهده شکل 2 می‌توان دریافت که غلظت 2/5 و 4 میکرومولار مس در موقعیت 0/05 میلی‌مولار منگنز برهمکنش دارد؛ همچنین فعالیت آنزیم منگنـز پراکسـیداز در حالت بهینه ذکر شده (2/5 میکرومولار مس و 0/1 میلی‌مولار منگنز) نسبت به کمینه غلظت دو یون منگنز و مس، افـزایش 1/3 برابری داشته است. اثر یون‌های مس و منگنز بر فعالیـت آنزیم منگنـز پراکسـیداز در حالـت دوبعـدی و سـه بعـدی، به‌ترتیب اثر خطی و درجه دوم این فاکتورها را نشان می‌دهـد (شکل 3). رسم‌های دوبعدی و سه بعـدی رویـه ایـن آنـزیم نشان می‌دهد که فعالیـت بهینـه آنـزیم منگنـز پراکسـیداز در بیشینه غلظت یـون منگنـز (0/1 میلـی‌مـولار) و غلظـت 2/5 میکرومولار یون مس ایجـاد مـی‌شـود کـه در ایـن شـرایط، فعالیـت آنـزیم نسـبت بـه کمتـرین فعالیـت آن در شـرایط آزمایش، 4 برابر شده است (شکل3). در پژوهش انجام شـده به‌وسیله‌ی سـیگنال و راتـور [14]، غلظـت 1/2 میکرومـولار یون مس، فعالیت آنزیم منگنز پراکسیداز را 1/2 برابر افـزایش می‌دهـد در حـالی کـه در ایـن بررسـی، غلظـت بهینـه 2/5 میکرومولار یون مس، فعالیت این آنزیم را 1/6 برابر افـزایش داد. برازندگی مدل با ضریب R^2 تعیین مـی‌شـود. مقـدار R^2 نشـان‌دهنـده تناسـب تغییـر در پاسـخ اسـت کـه مـی‌توانـد به‌وسیله‌ی مدل مورد بررسی، توصیف شـود. ضـریب تعیـین R^2مدل پیش‌بینی شده برای پاسخ 92/35 درصـد و احتمـال رگراسیون 0/025 بیانگر آن است که مدل رگراسـیون درجـه دو تعریف شده، مدلی مناسب و منطقی است. ضریب تعیـین R^2نشان می‌دهد که 92/35 درصد از آزمایش‌ها با خط مـدل رگراسیون تطابق دارد و خطای میان مدل و آزمایش کم بـوده است. نمودار باقی‌مانده که بیانگر پراکنـدگی خطـا اسـت، از الگوی ویژه‌ای پیروی نمی‌کند و نشان مـی‌دهـد کـه خطـای آزمایش به‌گونه‌ای تصادفی پخش شده اسـت. پخـش نرمـال پاسخ‌ها که بیانگر پیروی خطا از جامعه‌ی نرمال اسـت نیـز از الگوی ویژه‌ای پیروی نمی‌کنـد و دلالـت بـر مناسـب بـودن داده‌های به‌دست آمده دارد.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-04]

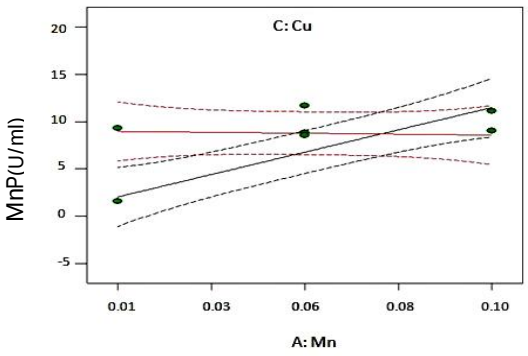


(الف)

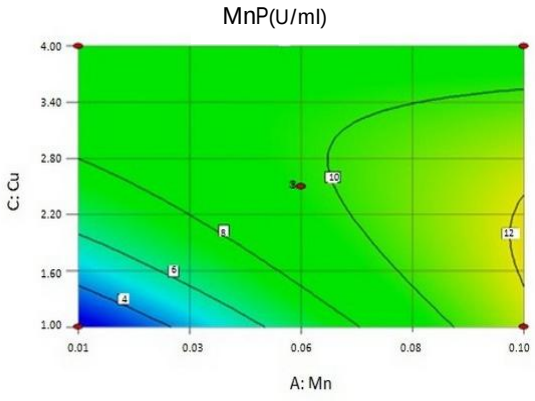


(ب)

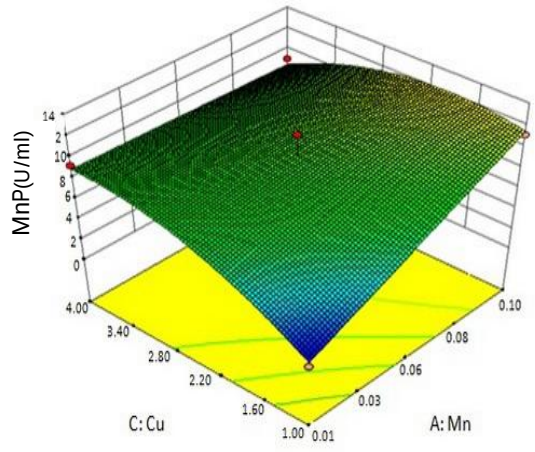
شکل 1 الف) اثر اصلی یون منگنز بر فعالیت آنزیم منگنز پراکسیداز ب) اثر اصلی یون مس روی فعالیت آنزیم منگنز پراکسیداز



شکل 2 اثر برهم‌کنش یون مس و منگنز بر فعالیت آنزیم منگنز پراکسیداز



(الف)



(ب)

شکل 3 الف) رسم دوبعدی معادله رگراسیون درجه دوم به‌دست آمده از روش باکس بنکن برای آنزیم منگنز پراکسیداز ب) رسم سه بعدی معادله رگراسیون درجه دوم به‌دست آمده از روش باکس بنکن برای آنزیم منگنز پراکسیداز

3-3-آنزیم لیگنین پراکسیداز

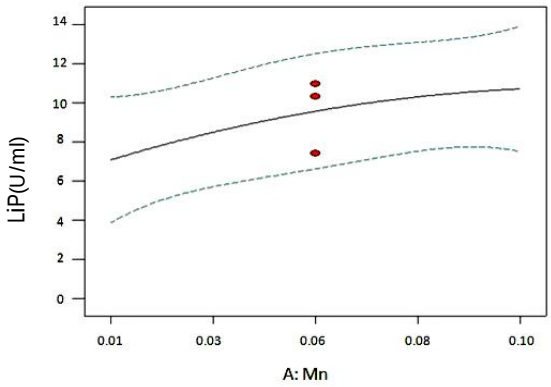
نتایج به دست آمده از آنالیز واریانس آنزیم لیگنین پراکسیداز نشان می‌دهد که مدل درجه دوم برای آنالیز پاسخ مناسب است. مدل درجه دوم مناسب برای فعالیت آنزیم لیگنین پراکسیداز، در متغیرهای کدشده در معادله 2 مشخص شده است.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-04]

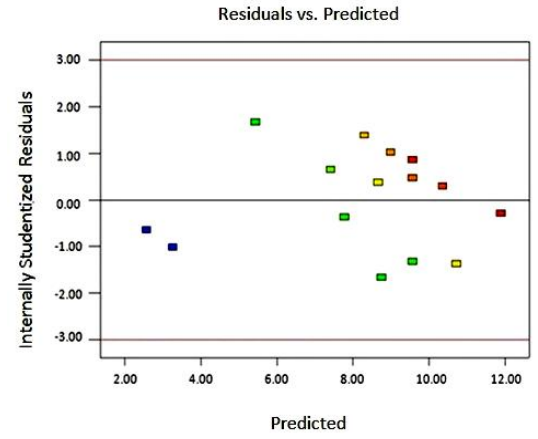
$$LiP=9.57+1.81Mn+1.05Zn+0.604Cu-0.673Mn^2-0.27Zn^2-1.64Cu^2-2.50Mn*Zn-2.26Mn*Cu+0.56Zn*Cu \quad (2)$$

مقدار احتمال یون منگنز ($p<0/05$) بیانگر آن است که این یون نسبت به سایر یون‌ها در تولید آنزیم لیگنین پراکسیداز تأثیر بیشتری دارد و ضریب رگراسیون مثبت و بزرگ‌تر این یون (معادله2) نیز تصدیق‌کننده است. در شکل 4، اثر اصلی یون منگنز در فعالیت آنزیم لیگنین پراکسیداز نشان داده شده است. بنابر این نمودار، افزایش غلظت منگنز سبب افزایش فعالیت آنزیم لیگنین پراکسیداز می‌شود و فعالیت آنزیم لیگنین پراکسیداز در بیشینه غلظت یون منگنز (0/1 میلی‌مولار)، نسبت به کمینه آن، افزایش 1/7 برابری دارد.

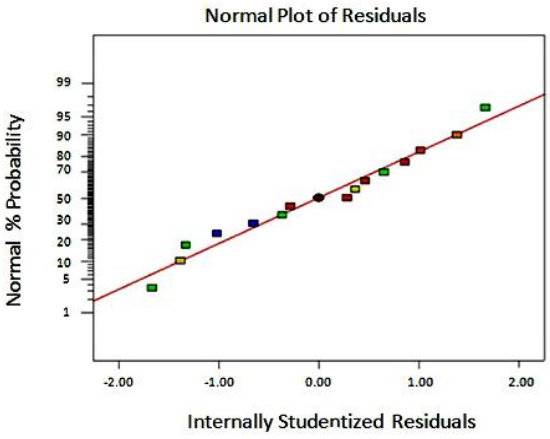
ضریب تعیین R^2 برابر 82/97 درصد نشان می‌دهد که مدل رگراسیون درجه دو تعریف شده، مناسب و منطقی است. پراکندگی داده‌ها در نمودار باقی‌مانده، بیانگر تصادفی بودن خطای آزمایش و مناسب بودن مدل رگراسیون پیشنهاد شده است و از الگوی ویژه‌ای پیروی نمی‌کند (شکل 5 الف). شکل 5 ب پخش نرمال پاسخ‌ها است و تراکم مناسب داده‌ها و انسجام را نشان می‌دهد.



شکل 4 اثر اصلی یون منگنز بر فعالیت آنزیم لیگنین پراکسیداز



(الف)



(ب)

شکل 5 الف) نمودار باقی‌مانده برای آنزیم لیگنین پراکسیداز و ب) پخش احتمال نرمال برای آنزیم لیگنین پراکسیداز

4- نتیجه‌گیری

در این پژوهش، حذف لیگنین در محیط کشت پایه و اثر یون‌های فلزی بر تولید بیشینه آنزیم‌های پراکسیداز مفید در حذف لیگنین بررسی شد. در محیط کشت پایه، سویه مربوطه، توانست 30 درصد لیگنین را حذف کند و اثر دو یون منگنز و مس در محیط کشت دارای یون‌های فلزی به‌گونه‌ای بود که در روز دهم رشد قارچ، تولید آنزیم‌های

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-04]

پراکسیداز نسبت به نمونه شاهد، به چهار برابر افزایش یافت. در حالی که برپایه بررسی‌های مشابه انجام شده، پژوهشگران توانسته‌اند این آنزیم را حداکثر 1/5 برابرافزایش دهند. بر پایه نتایج، به‌نظر می‌رسد با تغییر محیط کشت و وجود یون‌های نام برده در غلظت بهینه، بتوان تولید آنزیم‌های پراکسیداز مؤثر در حذف لیگنین و درصد حذف لیگنین از ساقه برنج را از 30 درصد افزایش داد. نتیجه این پژوهش برای حذف بیشینه لیگنین و تسهیل هر چه بیشتر تبدیل بافت لیگنوسلولزی ساقه برنج به اتانول زیستی قابل استفاده است.

5- مراجع

[1] Helal, G. A. (2006) Bioconversion of Straw into Improved Fodder: Preliminary Treatment of Rice Straw Using Mechanical, Chemical and/or Gamma Irradiation. 34(1), 14-21.

[2] Sanjust, E. Curreli, N. Pisu, B. Rescigno, A. Rinaldi, A. Agelli, M. (2002) Complete and efficient enzymic hydrolysis of pretreated wheat straw. *Process Biochemistry*. 37, 937–941.

[3] Iranmahboob, J. Nadim, F. Monemi, S. (2002) Optimizing acid hydrolysis: A critical step for production of ethanol from mixed wood chips. *Biomass Bioenergy*. 22, 401-404.

[4] Chandra, R. P. Bura, R. Mabee, W. E. (2007) Substrate pretreatment: the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics. *Adv Biochem Engin/Biotechnol*. 108, 67−93.

[5] Kurakake, M. Ide, N. Komaki, T. (2007) Biological pretreatment with two bacterial strains for enzymatic hydrolysis of office paper. *Curr Microbiol*. 54, 424−428.

[6] Singh, P. Suman, A. Tiwari P, et al. (2008) Biological pretreatment of sugarcane trash for its conversion to fermentable sugars. *World J Microbiol Biotechnol*. 24, 667−673.

[7] Schurz, J. (1978) Bioconversion of Cellulosic Substances into Energy Chemicals and Microbial Protein. Symp. Proc.; Ghose, T. K.; Ed.; New Delhi, IIT: Delhi; 37.

[8] [8] Baldrian, P. Der Weische, CW. Gabriel, J. Nerud, F. Zadrazil, F. (2000) Influence of Cadmium and Mercury on Activities of Ligninolytic Enzymes and Degration of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Pleurotus ostreatus* in Soil. *Appl. Environ. Microbiol*. 66, 2471 – 2478.

[9] Srinivasan SV.; Murthy DVS. (2000) Removal color from waste water using *Trametes versicolor*, J. IAEM. 27, 260-264.

[10] Perie, F.H.; & Gold, M.H. (1991) Manganese regulation of manganese peroxidase expression and lignin degradation by the white-rot fungus *Dichomitus squalens*. *Applied and Environmental Microbiology*. 57, 2240-2245.

[11] Moilanen AM.; Lundel T.; Vares T.; Hatakka A. (1996) Manganese and Melonate and individual Regulators for the Production of Lignin and Manganese Peroxidase isozymes and in the Degradation of Lignin by *Phlebia radiata*. *Appl. Microb. Biotechnol*. 45,722 - 799.

[12] Perez, J. & Jeffries, T.W. (1992) Roles of manganese and organic acid chelators in regulating lignin degradation and biosynthesis of peroxidases by phanerochaete

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-04]

chrysosporium. *Appllied and Environmental Microbiology*. 58, 2402-2409.

[13] Urek RO.; Pzarlioglu NK. (2007) Enhanced production of manganese peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*. *Braz. Arch. Boil. Technol*. 50, 522-528

[14] Singhal, V.; & Rathor, V.S. (2001) Effect of Zn^{2+} and Cu^{2+} on growth, lignin degradation and ligninolytic enzymes in *phanerochaete chrysosporium. World Journal of Microbialogy & Biotechnology*, 17,235-240.

[15] Tien, M.; Kirk, T.K. (1988) Methods in Enzymology. 161, 238–249.

[16] Paszczynski, A., V. B. Huynh, and R. Crawford. (1985) Enzymatic activities of an extracellular manganese dependent peroxidase from *phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbial*. 29, 37-41.

[17] Fukushima, R.S.; Hatfield, R.D., (2001) Extraction and isolation of lignin for utilization as a standard to determine lignin concentration using the acetyl bromide spectrophotometric method. J. Agric. *Food Chem*. 49, 3133-3139.

[18] Fukushima, R. S.; Dehority, B. A., (2000) Feasibility of using lignin isolated from forages by solubilization in acetyl bromide as a standard for lignin analyses. *J. Anim. Sci*. 78, 3135-3143.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-04]