

بررسی تأثیر انواع سوبستراهای لیگنوسلولزی در میزان تولید آنزیم سلولاز به روش تخمیر حالت جامد در مقیاس ارلن و بیوراکتور بستر آکنده

ساناز نوری¹، پریسا حجازی^{2*}

- 1- کارشناسی ارشد، آزمایشگاه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، نفت و گاز، دانشگاه علم و صنعت ایران
 2- دانشیار، آزمایشگاه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، نفت و گاز، دانشگاه علم و صنعت ایران

تاریخ پذیرش: 99/10/10

تاریخ دریافت: 98/10/11

*نویسنده مسئول: phejazi@iust.ac.ir

صندوق پستی 16846-13114

چکیده:

در این پژوهش تولید آنزیم سلولاز به کمک قارچ تریکودرما ریزی 5142 PTCC بر سه نوع سوبسترای لیگنوسلولزی (سبوس ذرت، خاک اره و سبوس گندم) و درصد ترکیب‌های مختلف دو سوبسترای خاک اره و سبوس گندم به روش تخمیر حالت جامد به مدت 6 روز در مقیاس ارلن بررسی شد. سپس، در شرایط بهینه نسبت ترکیبات سوبسترای به دست آمده از مقیاس ارلن، تأثیر هوادهی در سه سطح 0/5، 1 و 1/5 لیتر بر ساعت بر گرم سوبسترای خشک اولیه (l/h.gds) بر تولید این آنزیم در بیوراکتور بستر آکنده 0/5 لیتری مطالعه شد. رطوبت اولیه سوبسترا و pH به ترتیب 70% و 5 و دمای گرماگذاری به ترتیب در مقیاس ارلن و بیوراکتور 30 و 28 °C در نظر گرفته شد. میزان تولید آنزیم سلولاز براساس فعالیت دو آنزیم اندوگلوکاناز و آگزوگلوکاناز بررسی شد. بیشترین مقدار فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز و آگزوگلوکاناز در مقیاس ارلن به ترتیب در روز ششم و سوم 13 و 6/4 U/gds و در بیوراکتور در روز سوم به ترتیب 36 و 10 U/gds در شدت هوادهی 1/5 l/h.gds با استفاده از سوبسترا با ترکیب 75% سبوس گندم و 25% خاک اره بود.

کلید واژگان: آنزیم سلولاز، تخمیر حالت جامد، تریکودرما ریزی، سوبسترای لیگنوسلولزی، بیوراکتور بستر آکنده

مقدمه

زیست پایدار نقش اساسی بازی کنند. در صورت تولید آنزیم‌ها از ضایعات کشاورزی، علاوه بر حفظ محیط زیست (جلوگیری از تجمع ضایعات و به هم خوردن

آنزیم‌ها با مجموعه وسیعی از فعالیت‌های کاتالیستی می-توانند در افزایش کیفیت زندگی و همچنین حفظ محیط

تحقیقات مختلف شناخته شده است [4-6]. چندین عامل از قبیل pH، میزان رطوبت اولیه سوبسترا، دمای فرایند تخمیر، مقدار مایه تلقیح، نوع و مقدار منبع کربنی و نیتروژنی، ترکیب سوبسترا و هوادهی و اختلاط در تولید آنزیم سلولاز توسط این گونه تأثیرگذار هستند [7].

تخمیر حالت جامد²، فرایندی مهم برای تولید سلولاز است، چراکه به سرمایه و هزینه عملیاتی کمتری از تخمیر حالت غوطه‌ور نیاز دارد و از سوبستراهای ارزان قیمت و معمولاً در دسترس (که بیشتر از ضایعات کشاورزی و پسماند صنایع هستند) استفاده می‌شود. انتخاب سوبسترای مناسب یکی از جنبه‌های کلیدی تخمیر حالت جامد است. سوبسترای جامد نه تنها منبع مغذی و محرک است، بلکه پایه‌ای برای رشد میکروارگانیسم نیز محسوب می‌شود. در کشت حالت جامد قارچ‌های میسیلیومی، هیف‌ها به دو صورت هوایی و غذایی (هیف نفوذی) بر و داخل سوبسترا رشد می‌کنند. هیف‌های غذایی با تولید آنزیم‌های هیدرولیزکننده، قندهای مونومری مورد نیاز برای رشد و تولید محصول را در اختیار هیف‌های هوایی قرار می‌دهند.

مطالعات متعدد نشان داده‌اند که منبع کربن مورد استفاده برای کشت یکی از عوامل تأثیرگذار در هزینه و بازده تولید آنزیم سلولاز است [8، 9]. زیست‌توده لیگنوسلولزی مانند سبوس گندم، جوانه ذرت، خاک اره، فضولات حیوانی و ضایعات فرایندهای تولیدکننده غذا بهترین منبع کربن برای تولید آنزیم میکروبی سلولاز هستند. در تحقیقات دیگر نیز، ضایعات مختلف کشاورزی برای تولید سلولاز به روش تخمیر حالت جامد با موفقیت استفاده شده‌اند [10]. ترکیب درصد کمپلکس آنزیمی تولیدشده به ترکیب شیمیایی سوبسترا

جمعیت میکروبی محیط) امکان تولید محصولات با ارزش با حداقل هزینه در بخش بالادستی تولید آنزیم برای استفاده در صنایع مختلف وجود دارد.

سلولازها آنزیم‌هایی هستند که پیوندهای 1-4-گلوکوزیدی سلولز را هیدرولیز و محصولات اولیه‌ای چون گلوکز، سلوبیوز و سلو-الیگوساکاریدها را تولید می‌کنند. سلولازها در صنعت تولید آنزیم‌ها در رتبه سوم قرار دارند. آنها بیشتر در صنایع غذایی، فرآوری کتان، بازیافت کاغذ، آنزیم‌های شوینده و افزودنی‌های خوراک دام کاربرد دارند. با افزایش استقبال عمومی برای استفاده از اتانول زیستی به‌عنوان سوخت پاک، میزان تولید سلولاز برای هیدرولیز سوبستراهای لیگنوسلولزی افزایش یافته است [1]. یکی از دلایل مهم به‌کارنگرفتن سلولاز در صنعت، هزینه زیاد تولید آن است. با استفاده از میکروارگانیسم‌های با قابلیت تولید بالای آنزیم‌های سلولولیتیک و سوبستراهای مناسب، کاهش هزینه تبدیل سلولز امکان‌پذیر است. بنابراین، تعیین میکروارگانیسم‌هایی که توانایی زیادی در تولید سلولاز دارند همراه سوبسترای ارزان قیمت مناسب برای آنها امری ضروری است [2].

انواع میکروارگانیسم‌ها، آنزیم‌های سلولولیتیک را تولید می‌کنند، ولی تعدادی از باکتری‌ها و قارچ‌ها فقط می‌توانند آنزیم اندوگلوکاناز تولید و سلولز را به‌طور ناقص هیدرولیز کنند [3]. تعداد کمی از قارچ‌ها می‌توانند هر سه گروه آنزیم سلولاز (اندو بتا 1 و 4 گلوکاناز، آگزو بتا 1 و 4 گلوکاناز و بتا گلوکوزیداز) را تولید کنند که به‌عنوان قارچ‌های سلولولیتیک کارآمد معرفی می‌شوند. از مهم‌ترین قارچ‌های سلولولیتیک، قارچ تریکودرما ریزی است که به‌عنوان یکی از برترین تولیدکنندگان کمپلکس سلولازی به‌صورت تراریخته یا بدون تغییرات ژنتیکی¹ در

به‌طور کلی، دو دسته مهم سوبستراهای گیاهی و چوبی در تخمیر حالت جامد قارچی اهمیت دارند. سوبستراهای گیاهی مانند کاه گندم، سبوس گندم، کاه برنج و ساقه ذرت، به علت فراوانی، در دسترس بودن و ارزان بودن به سوبستراهای چوبی ترجیح داده می‌شوند. غیر از ترکیب شیمیایی، مشخصات فیزیکی سوبسترا مانند کریستالی بودن، اندازه ذرات، سطح مقطع، تخلخل، قابلیت جذب آب و تمایل به متراکم شدن در حالت مرطوب، از مهم‌ترین جنبه‌هایی است که هنگام انتخاب سوبسترا در تخمیر حالت جامد باید در نظر گرفته شود. سوبستراهایی که در تحقیقات دیگر استفاده شده است و بیشترین راندمان تولید و فعالیت را داشته‌اند، معمولاً نسبت سلولز به لیگنین آن‌ها بین 3 تا 5 بوده است [13]. با توجه به این نتایج می‌توان گفت، با افزایش مقدار سلولز سوبسترا به‌عنوان محرک در تولید آنزیم سلولاز، راندمان تولید و فعالیت آنزیم بالا می‌رود. در جدول 1 ترکیب درصد تعدادی از سوبستراهای لیگنوسلولزی آورده شده است.

وابسته است. به‌طور کلی، برای تولید سلولازها و همی سلولازها، سوبسترای دارای محرک در دسترس با مقدار قندهای مونومری کمتر ترجیح داده می‌شود [11]. بخش اصلی از پلی‌ساکارید گیاهان لیگنوسلولزی، سلولز است که 35 تا 40% را شامل می‌شود. سلولز یک ترکیب هموپلی ساکارید خطی از D- گلوکز متصل شده به وسیله پیوند β -1 و 4 گلوکوزیدی است. فیبرهای سلولز در یک ماتریس همراه ساختارهای دیگر چون لیگنین و همی سلولز هستند. همی سلولز 20 تا 35% و لیگنین 5 تا 30% وزن خشک گیاه را تشکیل می‌دهند. همی سلولز در فضای بین میکروفیبرهای سلولز در دیواره اولیه و ثانویه سلول یافت می‌شود. مواد لیگنوسلولزی به دلیل پلیمرهای کربوهیدراتی (سلولز، همی سلولز و لیگنین) ساختاری منظم، کریستالی و بسیار مقاوم دارند. این ساختار کریستالی ویژه، مقاومت سلولز را در برابر فعالیت‌های شیمیایی و زیستی و همچنین نفوذ ناپذیری آب افزایش می‌دهد [12].

جدول 1 ترکیب درصد تعدادی از سوبستراهای لیگنوسلولزی

مرجع	سلولز لیگنین	همی سلولز لیگنین	همی سلولز سلولز	لیگنین (%)	همی سلولز (%)	سلولز (%)	سوبسترا
[14]	2/58	1/27	0/49	15/1	19/1	39	علوفه ذرت
[15]	3	2/33	0/8	15	35	45	چوب ذرت
[16]	5/36	4	0/75	7/7	30/8	41/3	کاه گندم
[17]	3/42	9/9	2/9	2/87	28/45	9/84	سبوس گندم
[18]	3/9	1/5	0/38	10	15	39	کاه برنج
[19]	2/2	1/1	0/5	11-13	12-14	24-29	پوست برنج
[20]	1/77	0/6	0/33	25/3	15/1	45	خاک اره
[21]	53/5	22/8	0/43	0/23	5/25	12/3	سبوس ذرت

پخش کردن بخار آب (تنظیم رطوبت) و پخش کردن ترکیبات فرار تولیدشده در طول فرایند. سرعت هوادهی به تخلخل محیط کشت بستگی دارد و مقدار اکسیژن و

به دلیل هوازی بودن تولید سلولازها و همی سلولازهای قارچی، هوادهی یکی از عوامل مهم است. هوادهی چند وظیفه را در سیستم برعهده دارد: نگه داشتن شرایط هوازی، حذف دی‌اکسیدکربن، پراکنده کردن گرما،

دی‌اکسیدکربن با توجه به نوع میکروارگانیزم، محیط کشت و فرایند باید بهینه شود [22].

در این تحقیق، تأثیر نوع و مقدار سوبسترا با ترکیب درصد‌های مختلف سلولز و همی‌سلولز در مقیاس ارلن و همچنین تأثیر هوادهی مستقیم در یک بیوراکتور آزمایشگاهی بستراکنده در میزان بهره‌وری تولید آنزیم سلولاز، میزان رشد قارچ و pH محیط در طول تخمیر بررسی شد. برای این منظور، سه نوع سوبسترای لیگنوسلولزی سبوس ذرت، خاک اره و سبوس گندم و ترکیب درصد‌های مختلف دو سوبسترای خاک اره و سبوس گندم در تولید آنزیم سلولاز با استفاده از قارچ تریکودرما ریزی به روش تخمیر حالت جامد به مدت 6 روز در مقیاس ارلن بررسی شد. سپس، هم‌زمان تأثیر سه سرعت هوادهی در بیوراکتور بستراکنده 0/5 لیتری در شرایط بهینه سوبسترا در مقیاس ارلن بر میزان تولید دو گروه آنزیم اندو و اگزو سلولاز و میزان رشد میکروارگانیزم مطالعه شد. می‌توان گفت این مسئله تاکنون از این منظر بررسی نشده است.

مواد و روش‌ها

میکروارگانیزم و مایه تلقیح

میکروارگانیزم استفاده‌شده در این تحقیق قارچ تریکودرما ریزی است که از کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران با کد PTCC 5142 به صورت لیوفیلیزه تهیه شد. بعد از کشت روی پلیت PDA و تکمیل اسپورزایی پس از 7 روز، اسپورهای تشکیل‌شده با غلظت 10^7 spore/ml در فریزر -80°C نگهداری شدند. مقدار (v/w) 20% از اسپور نگهداری‌شده در فریزر بر مبنای سوبسترای خشک اولیه (ml/gds) به‌عنوان مایه تلقیح به محیط کشت استریل اضافه شد.

سوبسترا

سبوس ذرت، خاک اره و سبوس گندم در آون در دمای 60 درجه سانتیگراد به مدت 24 ساعت خشک و سپس با متوسط اندازه 0/5 تا 2/3 میلی‌متر دانه‌بندی شدند. در مرحله اول به‌صورت مجزا و در مرحله دوم ترکیب‌های مختلف سبوس گندم و خاک اره به‌عنوان سوبسترا برای تولید آنزیم بررسی شدند. میزان pH سوبستراها با استفاده از هیدروکلریک اسید 0/5 مولار بر $5 \pm 0/2$ تنظیم شد. میزان رطوبت اولیه تمامی سوبستراها در تمام آزمایش‌ها پس از افزودن محیط کشت نمکی، تلقیح اسپور و تنظیم pH برابر با (v/w) 70% در نظر گرفته شد. برای تعیین بازده تولید آنزیم، مقدار قند احیا و قند کل سوبسترا قبل از تلقیح و قند احیا در طول تخمیر اندازه‌گیری شد.

محیط کشت نمکی

محیط کشت استفاده‌شده برای این فرایند در دو مقیاس ارلن و بیوراکتور بستراکنده شامل نمک‌های معدنی و عناصر کم‌مقدار است. ترکیب درصد نمک‌های معدنی بهینه استفاده‌شده، در مقیاس ارلن برای یک لیتر آب مقطر (g/l): $5 \text{ NH}_4\text{NO}_3$ ، $5 \text{ KH}_2\text{PO}_4$ ، 1 NaCl ، $1 \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ [23] و در مقیاس بیوراکتور $1/4 \text{ (NH}_4)_2\text{SO}_4$ ، $2 \text{ KH}_2\text{PO}_4$ ، $0/3 \text{ CaCl}_2$ ، $0/3 \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، اوره 0/3 [24] بود. ترکیب درصد عناصر کم‌مقدار برای هر دو مقیاس در یک لیتر آب مقطر عبارت بود از (g/l): $0/005 \text{ FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، $0/0016 \text{ MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ، $0/0035 \text{ ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ و $0/002 \text{ CoCl}_2$ [23]. بعد از استریل کردن نمک‌های معدنی و عناصر کم‌مقدار (1 میلی‌لیتر در هر لیتر محیط کشت) و ترکیب آنها و برای مرطوب کردن سوبسترا تا 70% استفاده شد.

شرایط انجام آزمایش‌ها

مقیاس ارلن: مقدار 5 گرم سوبسترای خشک مورد نظر پس از مرطوب شدن، در ارلن استریل و با اسپور تلقیح شد. تمام آزمایش‌ها در ارلن‌های 250 میلی‌لیتری به مدت 6 روز درون انکوباتور در دمای 30 درجه سانتیگراد انجام شدند. همچنین آزمایش‌ها با سه نوع سوبسترای مختلف سبوس ذرت، خاک اره و سبوس گندم و ترکیب سبوس گندم با خاک اره در سه نسبت مختلف 25، 50 و 75% سبوس گندم انجام گرفتند. برای نمونه‌گیری، هر 24 ساعت یکی از ارلن‌ها از سیستم خارج و پس از هم‌زدن کامل محتوای ارلن، نمونه‌گیری از سوبسترا انجام شد. تمام آزمایش‌ها دو بار تکرار شدند.

بیوراکتور بسترآکنده: آزمایش‌ها بر مبنای 60 گرم سوبسترای خشک اولیه در سه بیوراکتور پلی‌پروپیلنی، هریک به حجم 500 میلی‌لیتر (قطر 6 و ارتفاع 30 سانتی‌متر) به مدت 6 روز در انکوباتور در دمای 28 درجه سانتیگراد انجام شد. در آزمایش‌های بیوراکتور ترکیب 1:3 سبوس گندم به خاک اره به‌عنوان مقدار ترکیب سوبسترا انتخاب و میزان رطوبت اولیه سوبستراها روی (v/w) 70% تنظیم شد. همچنین تأثیر سه سرعت هوادهی مختلف 0/5، 1 و 1/5 لیتر بر ساعت بر گرم سوبسترای خشک اولیه (l/(h.gds)) بر میزان تولید آنزیم بررسی شد. برای نمونه‌گیری، هر 48 ساعت یکی از بیوراکتورها از سیستم خارج شد. قبل از انجام دادن نمونه‌گیری سوبسترای داخل بیوراکتور کاملاً هم‌زده و آنالیز شد.

روش‌های آنالیز

پس از پایان فرایند تخمیر در هر دو مقیاس، سوبسترای تخمیرشده برای اندازه‌گیری فعالیت اندوگلوکاناز،

اگزوگلوکاناز، قند احیا، رطوبت و pH سوبسترا استفاده شد. استخراج محصولات از سوبسترای تخمیرشده به‌منظور انجام دادن عملیات فروشویی، بخشی از سوبسترای تخمیرشده با مقدار مناسب آب مقطر به مدت 2 ساعت در همزن با دور 150 rpm قرار داده شد تا آنزیم‌های تولیدی و قندهای محلول وارد فاز مایع شوند. سپس، مواد جامد با فیلتر پارچه‌ای از فاز جامد جدا و بعد از سانتریفیوژ، مایع به‌دست‌آمده برای سنجش میزان فعالیت آنزیم، قندهای احیا و اندازه‌گیری pH استفاده شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم: برای اندازه‌گیری فعالیت اگزوگلوکاناز (FPase) از کاغذ صافی واتمن به‌عنوان سوبسترا استفاده شده است. یک نوار (6 در 1 سانتیمتر) کاغذ صافی به 1 میلی‌لیتر بافر سیترات 0/05 مولار و سپس 0/5 میلی‌لیتر محلول آنزیمی به این مخلوط اضافه شد. این مخلوط به مدت 60 دقیقه دمای 50 درجه سانتیگراد گرماگذاری شد و سپس 3 میلی‌لیتر معرف DNS اضافه و به مدت 15 دقیقه جوشانده شد. پس از رقیق‌سازی مناسب، میزان جذب در 540 نانومتر اندازه‌گیری شد [25]. فعالیت آنزیم به صورت واحد فعالیت بر گرم سوبسترای خشک اولیه (U/gds) گزارش شد.

برای اندازه‌گیری فعالیت اندوگلوکاناز (CMCase) نیز همین روش به‌کارگرفته شد. با این تفاوت که جای کاغذ صافی از کربوکسی متیل سلولز 1% به‌عنوان سوبسترا استفاده و مخلوط آنزیم و سوبسترا به مدت 30 دقیقه در دمای 50°C گرماگذاری شد.

اندازه‌گیری قند احیا و قند کل: برای تعیین قند احیا در هر زمان تخمیر، به نسبت 1 به 2 به مایع حاصل از فروشویی سوبسترای تخمیرشده معرف DNS اضافه شد. سپس نمونه‌ها به مدت 15 دقیقه درون حمام آب با دمای

تغییرات قند احیا سوبستراها در طول تخمیر: قند کل و قند احیای اولیه سوبستراها قبل از تلقیح بررسی شدند که اندازه‌های آنها در جدول 2 آورده شده است. میزان قند در سبوس ذرت بیشتر از سوبستراهای دیگر است. میزان قند کل و احیای سبوس گندم به دست آمده به ترتیب با مقدار 98 و 20 mg/gds ارائه شده در مرجع [28] هم‌خوانی دارد.

جدول 2 میزان قند کل و احیای اولیه سوبستراها

سوبسترا	قند کل (mg/gds)	قند احیا (mg/gds)
سبوس ذرت	98,8	29,1
سبوس گندم	92,6	18,9
خاک اره	61,7	7,9

شکل 1 نشان می‌دهد، در ابتدا میزان قند احیاء در محیط کم است که این میزان هم به دلیل هیدرولیز حرارتی آزاد شده است. با شروع رشد و فعالیت قارچ و تجزیه کردن محیط، میزان قند احیاء افزایش و در ادامه با رشد قارچ و مصرف قند توسط آن، میزان قند احیاء کاهش یافت. افزایش قند احیاء در روزهای آخر هم به دلیل توقف رشد قارچ و مصرف نشدن قند بود و هم به دلیل افزایش تولید آنزیم سلولاز و تجزیه سلولز اتفاق افتاد. همان‌طور که در نمودارها نشان داده می‌شود، میزان قند احیاء در محیط حاوی سبوس ذرت زیاد است.

100 درجه جوشانده شدند. پس از خنک شدن، میزان جذب با اسپکتروفتومتر در طول موج 540 نانومتر اندازه‌گیری شد.

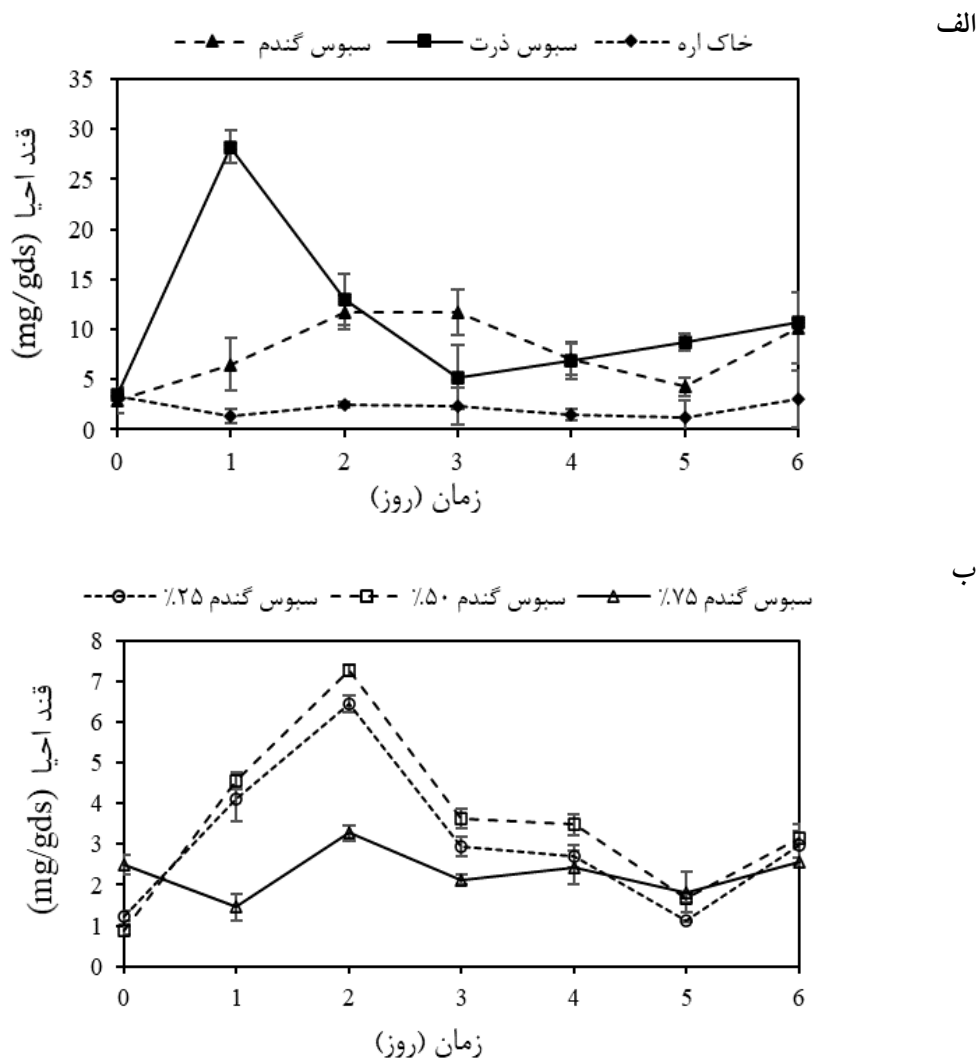
برای اندازه‌گیری قند کل سوبسترا قبل از تلقیح، مایع حاصل از فروشویی با اسید کلریدیک 1 مولار به pH برابر یک رسانده و در دمای 80 درجه به مدت 1 ساعت هیدرولیز اسیدی انجام شد. پس از تنظیم pH، قند کل به روش قند احیا اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری میزان رشد قارچ: به دلیل آنکه میسل‌های قارچ در سوبسترای جامد نفوذ می‌کنند و امکان اندازه‌گیری زیست توده حاصل به عنوان معیاری از رشد وجود ندارد، در روش تخمیر حالت جامد معمولاً از روش‌های غیرمستقیم برای اندازه‌گیری میزان رشد قارچ استفاده می‌شود. یکی از این روش‌ها در مقیاس ارلن، تعیین تغییرات وزن خشک سوبسترا [26] و در مقیاس بیوراکتور اندازه‌گیری میزان دی-اکسیدکربن حاصل از تنفس سلولی قارچ است [27]. به این دلیل از یک سنسور دی‌اکسیدکربن (Biosense، ساخت سوئیس، مونتاژ ایران) در هوای خروجی از بیوراکتور استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج به دست آمده از مقیاس ارلن

تغییرات pH، قند احیای سوبسترای تخمیر شده و فعالیت آنزیم‌ها در طول تخمیر با سه نوع سوبسترای مختلف سبوس ذرت، خاک اره و سبوس گندم و ترکیب سبوس گندم با خاک اره در سه نسبت مختلف 25، 50 و 75% سبوس گندم به مدت 6 روز بررسی شد.



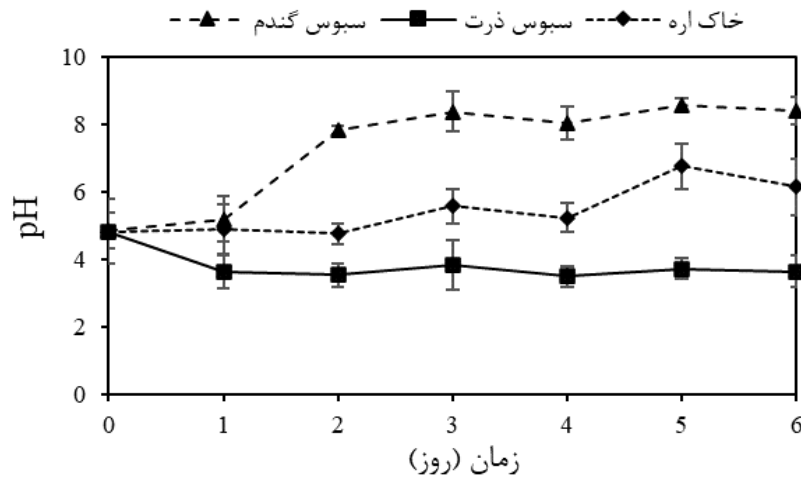
شکل 1 تغییرات قند احیاء در الف- سه نوع سوبسترای خالص ب- ترکیب‌های مختلف سبوس گندم و خاک اره در طول تخمیر

در ابتدا با رشد قارچ، pH کمی کاهش و سپس تا 7 افزایش یافت که با گزارش لیمینگ و همکارش در سال 2004 مطابقت دارد. آنها تولید آنزیم سلولاز توسط قارچ تریکودرما ریزی را با استفاده از ضایعات چوب ذرت به‌عنوان سوبسترا بررسی کرده‌اند. تغییرات pH در محیط مخلوط سبوس گندم و خاک اره مشابه تغییرات pH در محیط آنهاست [30]. به نظر می‌رسد افزایش pH با کم شدن مواد مغذی و تجزیه پروتئین‌ها و تولید یون آمونیوم یا استفاده از اسیدهای

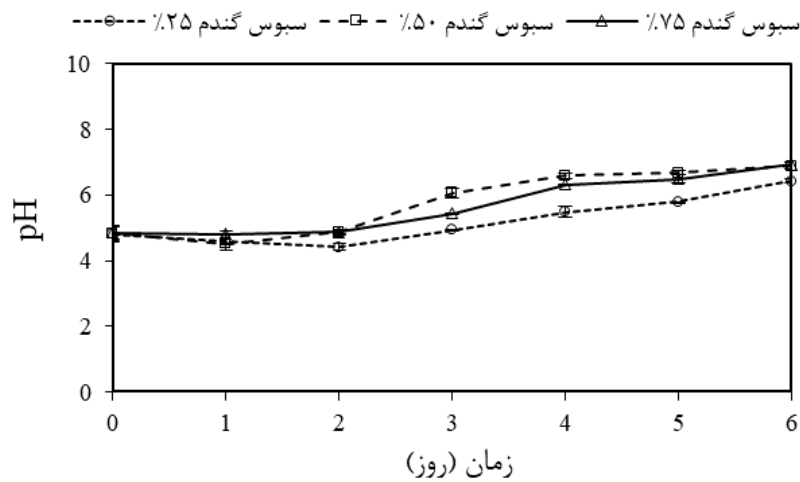
تغییرات pH و وزن خشک سوبسترا در طول تخمیر: با توجه به شکل 2، pH سوبسترا در محیط‌های مختلف رفتار متفاوتی دارد. pH در محیط کشت حاوی سبوس ذرت افت بیشتری داشت که این امر می‌تواند نشان‌دهنده تبدیل زیستی سوبسترا به محصولات جانبی اسیدی و تولید یون آمونیوم باشد [13 و 29]. احتمال هم دارد حاصل آن میزان رشد بیشتر میکروب و تولید کمتر آنزیم باشد. در محیط حاوی مخلوط سبوس گندم و خاک اره

آلی توسط میکروارگانیزم‌ها روی می‌دهد. پارامتر کنترل‌پذیر در تخمیر حالت جامد نیست [29]. به‌طور طبیعی تغییرات pH به‌وسیله ویژگی‌های بافری زیست‌توده لیگنوسلولزی کنترل می‌شود و pH یک

الف



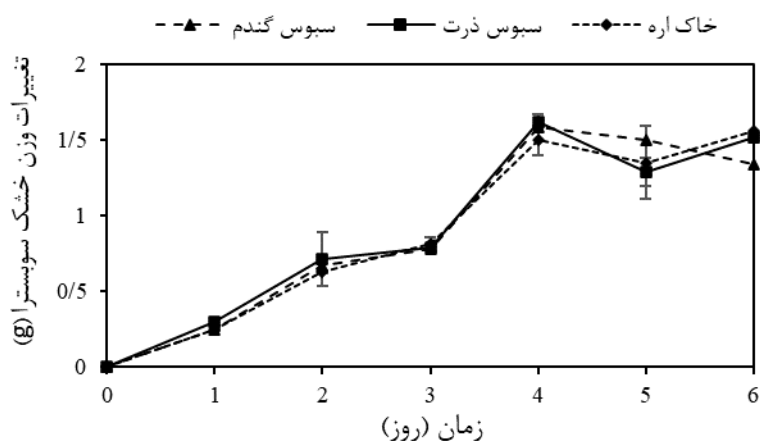
ب



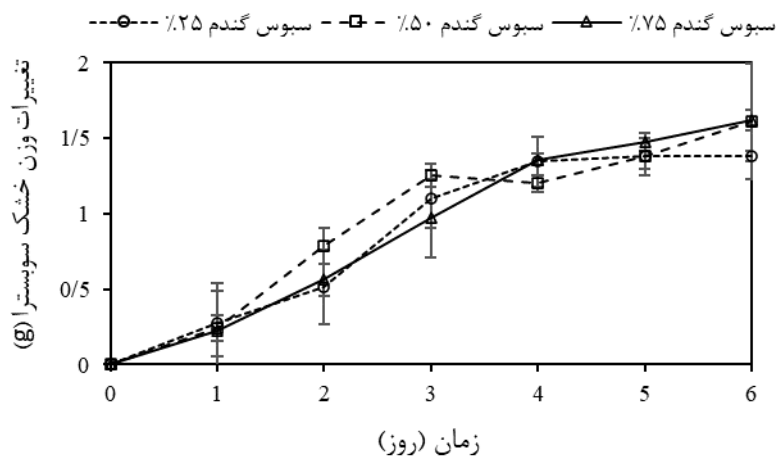
شکل 2 تغییرات pH سوبسترا در الف - سه نوع سوبسترای مختلف خالص ب - ترکیب‌های مختلف سبوس گندم و خاک اره در طول تخمیر

براساس نمودار شکل (3-الف) فاز نمایی رشد میکروارگانیزم در محیط کشت خالص تا روز چهارم ادامه دارد، اما با ترکیب سوبستراها، زمان رسیدن به فاز سکون به تأخیر می‌افتد (شکل 3-ب).

الف



ب



شکل 3 تغییرات وزن خشک سوبسترا الف- سه نوع سوبسترای خالص ب- ترکیب‌های مختلف سبوس گندم و خاک اره در طول تخمیر

حاصل شد. بیشترین مقدار فعالیت آنزیم با استفاده از نسبت‌های مختلف سبوس گندم به خاک اره، 1:3، 1:1 و 3:1 به ترتیب 13، 11/6 و 12/7 U/gds به دست آمد.

با توجه به نمودارهای به‌دست‌آمده از سوبستراهای خالص، در ابتدای تخمیر به دلیل طولانی‌بودن فاز تأخیر در محیط جامد، تولید آنزیم تقریباً صفر است و از روز دوم به بعد تولید آنزیم مشاهده می‌شود. با گذشت زمان و رشد قارچ تولید آنزیم در روزهای چهارم و پنجم به بیشترین مقدار خود می‌رسد و بعد از آن با کم‌شدن مواد مغذی در محیط و ورود قارچ به فاز سکون کاهش می‌یابد. این در حالی است که در شرایط استفاده از ترکیب سوبستراها، علاوه بر کاهش فاز تأخیر، افزایش

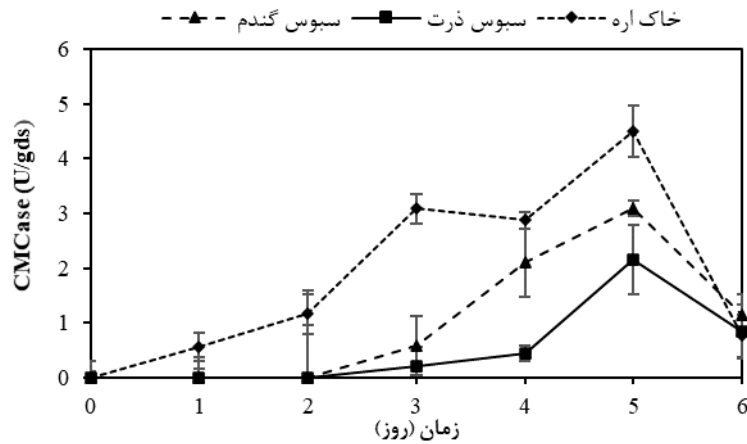
میزان تغییرات فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز در طول

تخمیر: نتایج فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز حاصل از رشد قارچ تریکودرما ریزی بر هر یک از سه سوبسترای سبوس ذرت، خاک اره سبوس گندم و ترکیب سبوس گندم و خاک اره با سه نسبت به ترتیب در شکل (4- الف و ب) آورده شده است.

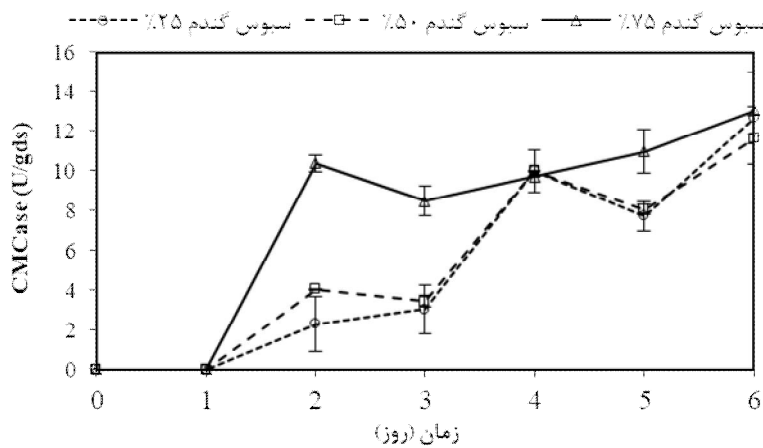
با توجه به شکل (4- الف) بیشترین مقدار آنزیم اندوگلوکاناز در روز پنجم با خاک اره حاصل شده است. بیشترین مقدار فعالیت آنزیم با استفاده از خاک اره، سبوس گندم و سبوس ذرت به ترتیب 4/6، 3/10 و 2/2 U/gds بود. با توجه به شکل (4- ب) بیشترین مقدار آنزیم اندوگلوکاناز در ترکیب سوبستراها نیز در روز ششم

میزان تولید و به تأخیر افتادن فاز سکون به ویژه در حضور 75% از سیوس کاملاً مشهود است.

الف



ب



شکل 4 میزان فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز تولیدی با الف- سه نوع سوبسترای خالص ب- ترکیب‌های مختلف سیوس گندم و خاک اره در طول تخمیر

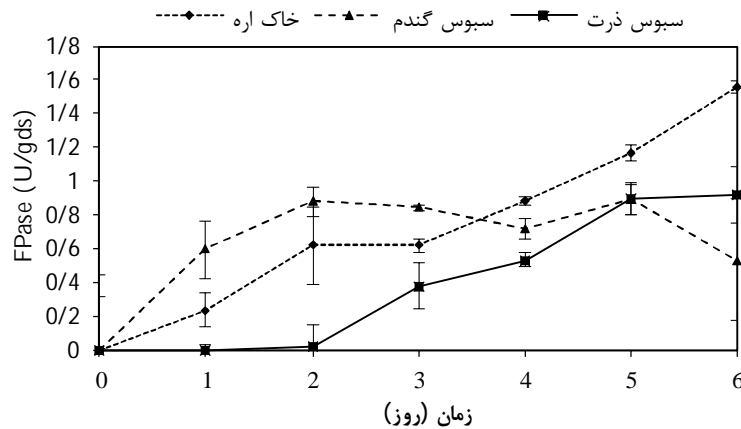
سیوس گندم و سیوس ذرت به ترتیب 1/6، 0/9 و 0/8 به دست آمد. با توجه به شکل (5-ب) بیشترین مقدار آنزیم اگزوگلوکاناز با استفاده از نسبت‌های مختلف سیوس گندم به خاک اره، 1:3، 1:1 و 3:1 به ترتیب در روز سوم، پنجم و چهارم با مقدارهای 6/4، 2/7 و 4/9 به دست آمد که نسبت به سوبسترای خالص، افزایش زیادی را نشان می‌دهد.

میزان تغییرات فعالیت آنزیم اگزوگلوکاناز در طول

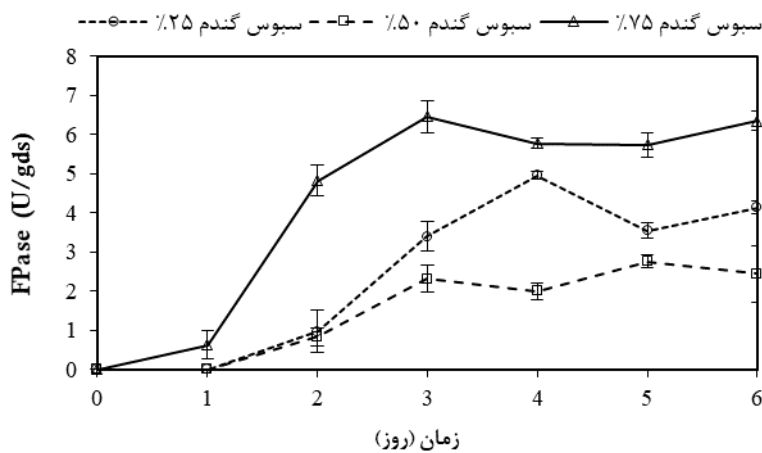
تخمیر: میزان فعالیت آنزیم اگزوگلوکاناز حاصل از رشد قارچ تریکودرما ریسی طی 6 روز در هر یک از سه نوع سوبسترا و ترکیب درصدهای مختلف سیوس گندم و خاک اره به ترتیب در شکل (5-الف و ب) آورده شده است.

با توجه به شکل (5-الف) بیشترین مقدار آنزیم اگزوگلوکاناز در روز ششم با خاک اره حاصل شد. بیشترین مقدار فعالیت آنزیم با استفاده از خاک اره،

الف



ب



شکل 5 میزان فعالیت آگزوگلوکاناز با الف- سه نوع سوبسترای مختلف خالص ب- ترکیب‌های مختلف سیبوس گندم و خاک اره در طول تخمیر

از این دو تحقیق، با نتایج به‌دست آمده از این تحقیق هم‌خوانی دارد.

در اکثر مقالات، میزان فعالیت آنزیم در ترکیب سوبستراها افزایش یافته است. در آزمایش نیگو و همکاران [31] میزان فعالیت حاصل از آگزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز تولیدشده با استفاده از سیبوس گندم به ترتیب 0/5 و 1/5 U/gds بود، اما در آزمایش زیا و همکاران [33] با استفاده از ترکیب سیبوس گندم و چوب ذرت به‌عنوان سوبسترا میزان فعالیت آگزوگلوکاناز 158 U/gds تولید به دست آمد. نتایج این

در آزمایش نیگو و همکاران [31] تولید سلولاز با سیبوس گندم و خاک اره به‌عنوان سوبسترا به مدت 7 روز بررسی شده است. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد، میزان فعالیت اندوگلوکاناز از آگزوگلوکاناز بیشتر و میزان تولید هر دو آنزیم در خاک اره بیشتر از سیبوس گندم است. آزمایش یان سان و همکاران [32] (تولید سلولاز با استفاده از پوست موز به‌عنوان سوبسترا به مدت 8 روز) نشان می‌دهد، میزان فعالیت اندوگلوکاناز از میزان فعالیت آگزوگلوکاناز بیشتر است. نتیجه حاصل

تحقیق و مقالات دیگر نشان می‌دهد که با ترکیب سوبستراها میزان تولید آنزیم افزایش می‌یابد و این امر به این دلیل است که میزان سلولز به لیگنین افزایش می‌یابد.

جدول 3 مقایسه میزان تولید آنزیم سلولاز با استفاده از قارچ تریکودرما در مقیاس ارلن با منابع دیگر

مرجع	اگزوگلوکاناز $(\frac{U}{gds})$	اندوگلوکاناز $(\frac{U}{gds})$	زمان تخمیر (h)	سوبسترا
[12]	-	0/71	240	تفاله سیب
[13]	6/2	9/91	144	پوسته سویا
[31]	1/4	1/971	168	سبوس گندم و خاک اره
[32]	5/56	10/31	192	پوست موز
[34]	0/46	-	96-144	تفاله چغندر قند
[35]	2/314	-	192	سبوس برنج
[36]	15	90/5	336	تراشه‌های چوب
تحقیق حاضر	6/4	13	144	سبوس گندم و خاک اره با نسبت 1:3

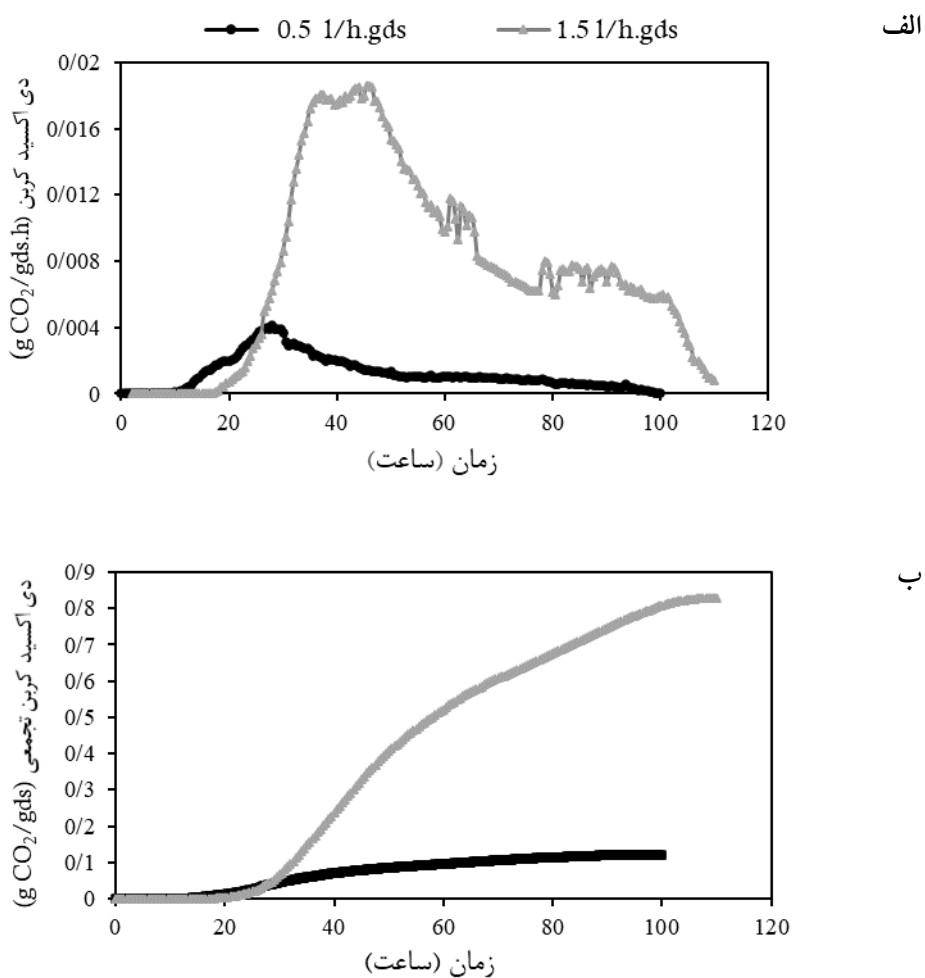
تأثیر سرعت هوادهی در میزان رشد میکروارگانسیم و مصرف سوبسترا: در شکل (6-الف) نمودار شدت دی‌اکسیدکربن لحظه‌ای هوای خروجی از بیوراکتور در دو شدت هوادهی مختلف نشان داده شده است. در سرعت هوادهی 0/5 l/h.gds، سرعت تولید دی‌اکسیدکربن بسیار پایین است که رشد کم میکروارگانسیم را نشان می‌دهد. این مسئله را میزان کم تولید آنزیم در ادامه بررسی‌ها تأیید خواهد کرد.

مشخص است در سرعت هوادهی 1/5 l/h.gds فاز تأخیر تقریباً 20 ساعت طول کشیده است که این امر به دلیل تلقیح اسپور به محیط است؛ چون اسپور حالت غیرفعال میکروارگانسیم است و زمان زیادی طول می‌کشد تا فعال شود. فاز لگاریتمی تقریباً از اواخر روز اول شروع و از اواسط روز دوم به بعد قارچ تریکودرما وارد فاز سکون شد.

براساس نتایج آزمایش‌ها در مقیاس ارلن بهترین نتیجه از ترکیب سبوس گندم با خاک اره با نسبت 1:3 حاصل شد و به همین دلیل آزمایش‌های انجام‌شده در بیوراکتور بسترآکنده با ترکیب این دو سوبسترا با نسبت مذکور انجام شد. همچنین، برای کنترل pH سوبسترا هنگام فرایند تخمیر (براساس آنچه در بخش مواد و روش‌ها ذکر شده است) مقدار نمک سولفات آمونیوم استفاده‌شده در محیط کشت نمکی کاهش یافت و مقداری اوره به محیط کشت اضافه شد.

بررسی نتایج در بیوراکتور بسترآکنده

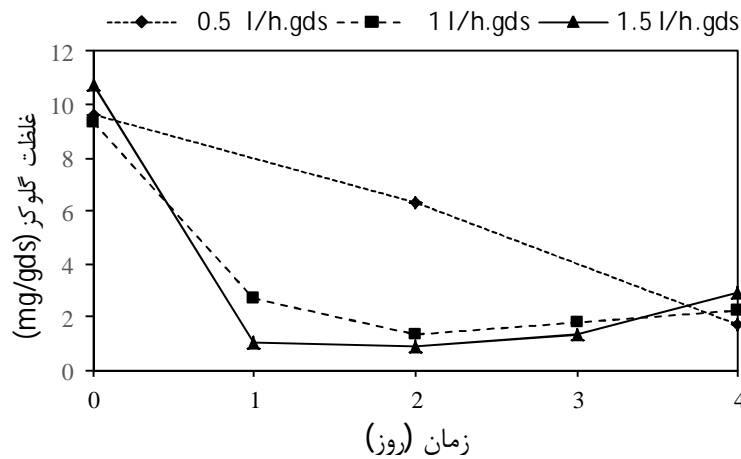
برای بررسی اثر هوادهی بر میزان تولید آنزیم، فرایند تولید درون بیوراکتور بسترآکنده آزمایشگاهی طی چهار روز انجام شد.



شکل 6 الف- شدت جریان لحظه‌ای ب- مقدار تجمعی دی اکسید کربن هوای خروجی از بیوراکتور

میزان شدت هوادهی، میزان رشد قارچ نیز افزایش می‌یابد. نمودارهای مصرف قند احیای سوبسترا در شکل 7 نیز این مطلب را تأیید می‌کنند.

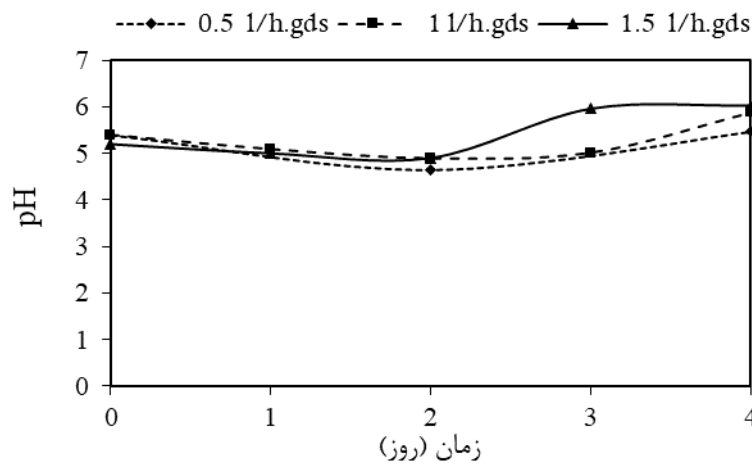
با توجه به نمودارهای میزان رشد و فعالیت آنزیم در ارلن و بیوراکتور بستر آکنده (در ادامه) مشخص می‌شود که عمدتاً از اواخر فاز نمایی، تولید آنزیم افزایش زیادی یافته است. همچنین نمودارها نشان می‌دهد که با افزایش



شکل 7 میزان تغییرات قند احیای سویسترا در سرعت‌های مختلف هوادهی در بیوراکتور در طول تخمیر

طول تخمیر تقریباً ثابت است و با لحظه صفر فرآیند تفاوت زیادی مشاهده نمی‌شود. این امر همراه هوادهی موجب شده است، میزان تولید آنزیم افزایش زیادی داشته باشد.

براساس شکل 8 با توجه به تغییرات محیط کشت نمکی در سویسترای استفاده‌شده در مقیاس بیوراکتور و کاهش مقدار نمک سولفات آمونیوم (همانند محیط کشت مایع تولید آنزیم مندل)، تغییرات pH محیط کشت در



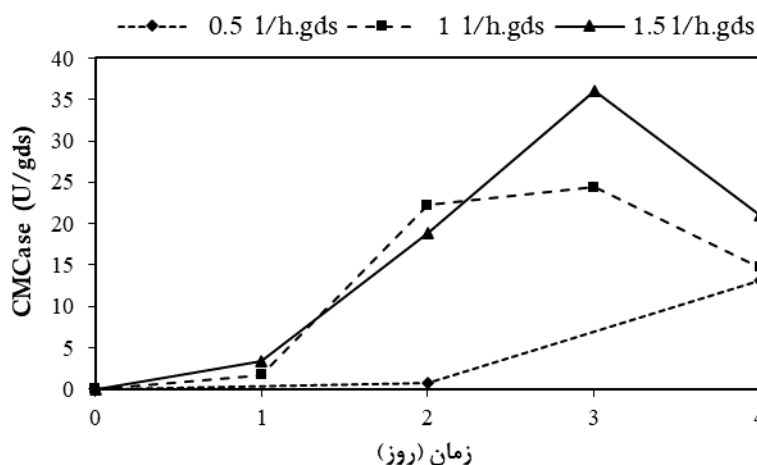
شکل 8 تغییرات pH سویسترا در سرعت‌های مختلف هوادهی در بیوراکتور در طول تخمیر

تأثیر سرعت هوادهی در میزان تولید آنزیم اندوگلوکاناز: در شکل 9 میزان فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز در بیوراکتور بسترآکنده با سه شدت هوادهی مختلف در طول فرایند تخمیر نشان داده شده است. با توجه به این شکل تولید آنزیم با شدت هوادهی 1.0/5 و

به ترتیب در روز دوم و روز اول آغاز شده است. در آزمایش‌های انجام‌شده در ارلن بیشترین میزان فعالیت در روز ششم مشاهده شد، اما با توجه به نمودارهای شکل مذکور مشخص است که با اعمال هوادهی بیشترین مقدار فعالیت آنزیم در روز چهارم و

تولید آنزیم در روز دوم و سوم وجود ندارد. بنابراین، بیشترین بهره‌وری (حاصل از تقسیم مقدار فعالیت بر زمان) مربوط به میزان هوادهی 1 و 1/5 l/h.gds به ترتیب برای روز دوم و سوم حدود 12 U/day.gds حاصل شد.

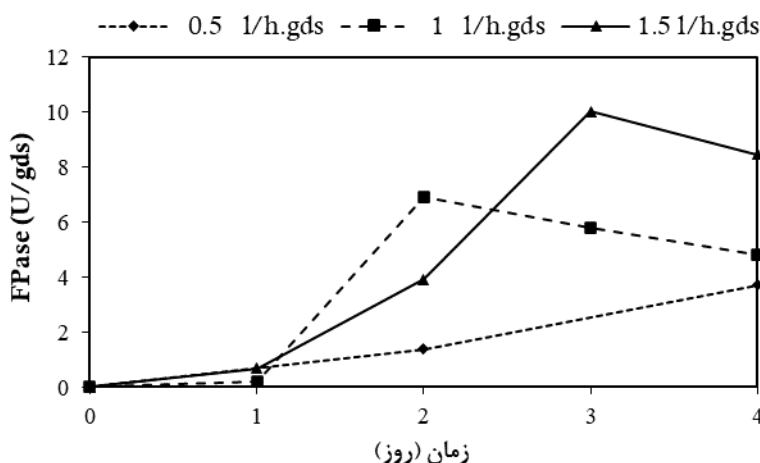
سوم حاصل شده و میزان تولید آنزیم افزایش یافته است. بیشترین مقدار فعالیت با شدت هوادهی 0/5، 1 و 1/h.gds به ترتیب 24/4، 13/2 و 36 U/gds مشاهده شده است. در سرعت هوادهی 1 l/h.gds، تفاوت معنادار در میزان



شکل 9 میزان فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز در بیوراکتور بستر آکنده در سرعت‌های مختلف هوادهی

تأثیر سرعت هوادهی بر میزان تولید آنزیم
 اگزوگلوکاناز: در شکل 10 میزان فعالیت آنزیم اگزوگلوکاناز در بیوراکتور بستر آکنده با سه شدت هوادهی مختلف نشان داده شده است. با توجه به شکل، هوادهی در تولید اگزوگلوکاناز هم تأثیر مثبت دارد و با افزایش شدت هوادهی از 0/5 به 1 و 1/5 l/h.gds بیشترین مقدار فعالیت از روز چهارم به روز دوم و سوم رسیده است. بیشترین مقدار فعالیت با شدت هوادهی 0/5، 1 و 1/5 l/h.gds به ترتیب 6/9، 3/7 و 10 U/gds مشاهده شد. بیشترین بهره‌وری مربوط به میزان هوادهی 1 و 1/5 l/h.gds به ترتیب برای روز دوم و سوم حدود 3/5 U/day.gds حاصل شد.

لیمینگ و همکاران در سال 2004 تولید آنزیم سلولاز را در فرمانتور همزن‌دار بررسی کردند که بیشترین میزان فعالیت در کار آنها 5/5 U/g حاصل شد [30]. دیلون و همکاران در سال 2011 تولید آنزیم سلولاز را با ترکیب سوبستراهای مختلف و مخلوط گونه‌های تریکودرما ریزی و اسپرژیلوس نایجر به‌عنوان میکروارگانیسم در فرمانتور سینی‌دار بررسی کردند. در کار آنها بیشترین میزان فعالیت اندوگلوکاناز از ترکیب سبوس گندم با کاه برنج با نسبت 3:2 به دست آمده است. بیشترین میزان فعالیت در روز پنجم با مقدار 120 U/gds و با بهره‌وری 24 U/day.gds مشاهده شد [37]. نتایج نشان می‌دهد هوادهی در رشد قارچ تریکودرما ریزی و تولید آنزیم تأثیر مثبت دارد.



شکل 10 میزان فعالیت آنزیم اگزوگلوکاناز در بیوراکتور بستر آکنده در سرعت‌های مختلف هوادهی

به تدریج کاهش یابد. در سرعت هوادهی 1/5 l/h.gds، به‌رغم آنکه سرعت بیشتر هوادهی باعث می‌شود رطوبت و دمای بستر و سرعت رشد قارچ را نسبت به 1 l/h.gds کاهش یابد، اما تا روز سوم رشد قارچ (شکل 6) و تولید آنزیم (شکل 9 و 10) ادامه می‌یابد و از آن پس کاهش تدریجی مشاهده می‌شود.

نتیجه‌گیری

نتایج نشان می‌دهد، قارچ تریکودرما ریزی توانایی زیادی در تولید آنزیم سلولاز دارد. ترکیب سوبستراهای لیگنوسلولزی، به‌عنوان سوبسترای مناسب برای تولید آنزیم سلولاز با استفاده از تخمیر حالت جامد به دست آمد که مطمئناً غلظت مناسب یون‌ها در محیط کشت و همچنین میزان هوادهی در افزایش میزان تولید آنزیم مؤثر هستند. در بین سوبستراهای استفاده‌شده در این تحقیق استفاده از ترکیب 75% سبوس گندم با 25% خاک اره باعث شد میزان آنزیم سلولاز تا بیشترین حد تولید یابد. همچنین، می‌توان نتیجه گرفت هرچه میزان سلولز از لیگنین سوبسترا بیشتر باشد، راندمان تولید و فعالیت آنزیم سلولاز افزایش می‌یابد و سرعت هوادهی در افزایش میزان تولید این آنزیم تأثیر مثبت دارد. بیشترین میزان

در کار دیلون و همکاران بیشترین میزان فعالیت اگزوگلوکاناز از ترکیب سبوس گندم با کاه برنج با نسبت 3:2 با ترکیب دو قارچ تریکودرما ریزی و آسپرژیلوس نایجر در بیوراکتور سینی‌دار به دست آمد. بیشترین میزان فعالیت در روز چهارم با مقدار 30 U/gds مشاهده شد [37]. در کار موسوی‌نسب و همکاران نیز بیشترین میزان فعالیت اگزوگلوکاناز با استفاده از ضایعات چغندر قند به‌عنوان سوبسترا و قارچ تریکودرما ریزی (PTCC 5142) در روز پنجم با مقدار 0/5 U/g مشاهده شد [34] که در مقایسه با نتایج این تحقیق حدود 20 برابر کمتر تولید شده است که احتمالاً دلیل آن وجود قندهای آزاد در سوبسترا است.

نمودارهای شکل 6 نشان می‌دهد تا روز اول قارچ در فاز تأخیر رشد بوده است. به‌همین دلیل فعالیت آنزیم مشاهده نشده است. از روز اول به بعد با شروع رشد و فعالیت قارچ و تجزیه سلولز میزان تولید سلولاز افزایش و همچنین در روزهای آخر به دلیل کاهش فعالیت قارچ و شروع فاز مرگ میزان فعالیت آنزیم کاهش یافته است. احتمالاً به دلیل سرعت رشد بیشتر در سرعت هوادهی 1 l/h.gds، از روز دوم به بعد حرارت ایجادشده در سیستم تجمع یافته و باعث شده میزان رشد و تولید آنزیم

8. Beg QK, Bhushan B, Kapoor M, Hoondal GS. Enhanced production of a thermostable xylanase from *Streptomyces sp.* QG-11-3 and its application in biobleaching of eucalyptus kraft pulp. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000;27(7):459-66.

9. Senthilkumar SR, Ashokkumar B, Raj KC, Gunasekaran P. Optimization of medium composition for alkali-stable xylanase production by *Aspergillus fischeri* Fxn 1 in solid-state fermentation using central composite rotary design. *Bioresource Technology*, 2005;96(12):1380-6.

10. Yang SQ, Yan QJ, Jiang ZQ, Li LT, Tian HM, Wang YZ. High-level of xylanase production by the *thermophilic Paecilomyces themophila* J18 on wheat straw in solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 2006;97(15):1794-1800.

11. Portnoy T, Margeot A, Seidl-Seiboth V, Crom SL, Chaabane FB, Linke R, Seiboth B, Kubicek CP. Differential regulation of the cellulase transcription factors XYR1, ACE2, and ACE1 in *Trichoderma reesei* strains producing high and low levels of cellulase. *Eukaryot Cell*, 2011;10(2):262-71.

12. Lins SADS, and Conrado LDS. Cellulase Production under Solid State Fermentation in Cashew Apple Bagasse by *Trichoderma reesei* LCB 48. *Defect and Diffusion Forum*, 2015;365:323-8.

13. Salihu A, Abbas O, Sallau AB, Alam MZ. Agricultural residues for cellulolytic enzyme production by *Aspergillus niger*: effects of pretreatment. *3 Biotech*, 2015;5(6):1101-1106.

14. Lee J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal of Biotechnology*, 1997;(56):1-24.

15. Howard RL, Abotsi E, Van Rensburg EJ, Howard S. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology*, 2003;2(12):602-19.

16. Bridgeman TG, Jones JM, Shield I, Williams PT. Torrefaction of reed canary grass, wheat straw and willow to enhance solid fuel qualities and combustion properties. *Fuel*, 2008;87(6):844-56.

17. Anderson NE, and Cl Ydesdale FM. An analysis of the dietary fiber, content of a standard wheat bran. *Journal of Food Science*, 1980;45(2):336-40.

بهره‌وری فعالیت آنزیم در دو سرعت هوادهی 1 و 1,5 l/h.gds تفاوت معناداری در بیوراکتور بستراکنده ندارد و برای آنزیم‌های اندوگلوکاناز و آگزوگلوکاناز به ترتیب برابر 12 و 3/5 U/day gds حاصل شد.

تشکر و قدردانی: از معاونت پژوهشی دانشگاه علم و صنعت ایران به دلیل حمایت از انجام پژوهش حاضر تشکر و قدردانی می‌شود.

مراجع

1. Singhanian RR, Sukumaran RK, Patel AK, Larroche C, Pandey A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, 2010;46(7):541-9
2. Kotchoni SO, and Shonukan OO. Regulatory mutations affecting the synthesis of cellulase in *Bacillus pumilus*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2002;18:487-491.
3. Yazdi MT, Radford A, Keens JN, Woodward JR. Cellulase production by *Neurospora crassa*: Purification and characterization of cellulolytic enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, 1990;12(2):120-3.
4. Nouri H, Sajadi T, Azin M. Comparative production of cellulases by mutants of *Trichoderma parceramosume* PTCC5140". *Biological Journal of Microorganism*, 2017;6(22):1-13.
5. Darabzadeh N, Hamidi-Esfahani Z, Hejazi P. Optimization of cellulase production under solid-state fermentation by a new mutant strain of *Trichoderma reesei*. *Food Science and Nutrition*, 2019;7:572-8.
6. Darabzadeh N, Hamidi-Esfahani Z, Hejazi P. Improvement of cellulase production and its characteristics by inducing mutation on *Trichoderma reesei* 2414 under solid state fermentation on rice by-products. *Applied Food Biotechnology*, 2018;5(1):1-17.
7. Juhasz T, Szengyel Z, Szijarto N, Reczey K. Effect of pH on cellulase production of *Trichoderma reesei* RUT C30. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2004;4(113):201-11.

- fermentation of wheat bran for hydrolytic enzymes production and saccharification content by a local isolate *Bacillus megatherium*. *BMC Biotechnology*, 2014;14(29):2-8.
29. Shah A, Patel H, Narra M. Bioproduction of fungal cellulases and hemicellulases through solid state fermentation. In: Mérillon JM, and Ramawat KG, editors. *Fungal Metabolites*. Switzerland: Springer; 2017. pp. 349-393.
30. Liming X, Xueliang S. High-yield cellulase production by *Trichoderma reesei* ZU-02 on corn cob residue. *Bioresource Technology*, 2004;91(3):259-62.
31. Neagu DA, Destain J, Thonart P., Socaciu C. *Trichoderma Reesei* Cellulase Produced by Submerged Versus Solid State Fermentations. *Bulletin of UASVM Agriculture*, 2012;69(2):320-6.
32. Sun HY, Li J, Zhao P, Peng M. Banana peel-A novel substrate for cellulase production under solid-state fermentation. *African Journal of Biotechnology*, 2011;10(77):17887-890.
33. Xia L, and Cen P. Cellulase production by solid state fermentation on lignocellulosic waste from the xylose industry. *Process Biochemistry*, 1999;34(9):909-12.
34. Moosavi-Nasab M, and Majdi-Nasab M. Cellulase Production by *Trichoderma reesei* using Sugar Beet Pulp. *Iran Agricultural Research*, 2007;25.26(1.2):107-16.
35. Latifian M, Hamidi-Esfahani Z, Barzegar M. Evaluation of culture conditions for cellulase production by two *Trichoderma reesei* mutants under solid-state fermentation conditions. *Bioresource Technology*, 2007;98(18):3634-7.
36. Xin F, and Geng A. Horticultural waste as the substrate for cellulase and hemicellulase production by *Trichoderma reesei* under solid-state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2010;162(1):295-306.
37. Dhillon GS, Oberoi HS, Kaur S, Bansal S, Brar SK. Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. *Industrial Crops and Products*, 2011;34(1):1160-7.
18. Merino ST, Cherry J. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. *Biofuels*, 2007;108:95-120.
19. Okeke BC, and Obi SKC. Lignocellulose and sugar compositions of some agro-waste materials. *Bioresource Technology*, 1994;47(3):283-4.
20. Dijkerman R, Bhansing DCP, Op den Camp HJM, van der Drift C, Vogels GD. Degradation of structural polysaccharides by the plant cell-wall degrading enzyme system from anaerobic fungi: An application study. *Enzyme and Microbial Technology*, 1997;21(2):130-6.
21. Anderson NE, and Clydesdale FM. Dietary Fiber Content of Corn Bran. *Journal of Food Protection*, 1980;43(10):760-2.
22. Chahal DS. (1983) Growth characteristics of microorganisms in solid state fermentation for upgrading of protein values of lignocelluloses and cellulase production. *Foundations of Biochemical Engineering*, American Chemical Society, Chapter 20, pp. 421-42.
23. Lee CK, Ibrahim D, Omar IC. Production and Optimization of Cellulase Enzyme Using *Aspergillus niger* USM AI 1 and Comparison with *Trichoderma reesei* via Solid State Fermentation System. *Biotechnology Research International*, 2011; 658493:1-6.
24. Mandels M, Weber J. The Production of Cellulases. *Advances of Chemistry Series*, 1969;95:391-414.
25. Ghose TK. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, 1987;59(2):257-68.
26. Abdul Manan M, and Webb C. Estimation of growth in solid state fermentation: A review, *Malaysian Journal of Microbiology*, 2018;14(1):61-69.
27. Zolfaghari-Esmaeelabadi M, and Hejazi P. A new kinetic model for growth based on simultaneous substrate and biomass limitation in solid-state fermentation using agar spheres as the model substrate. *Biochemical Engineering Journal*, 2018;136:88-101.
28. El-Shishtawy RM, Mohamed SA, Asiri AM, Gomaa AB, Ibrahim IH., Al-Talhi HA. Solid

Evaluation of various lignocellulosic substrates effect on cellulase enzyme production by solid-state fermentation method in Erlenmeyer-scale and packed-bed bioreactor

Sanaz Noori¹, Parisa Hejazi^{2*}

1. MSc, Biotechnology Research Laboratory, School of Chemical, Petroleum and Gas Engineering, Iran University of Science and Technology, Tehran, Iran
2. Associate Professor, Biotechnology Research Laboratory, School of Chemical, Petroleum and Gas Engineering, Iran University of Science and Technology, Tehran, Iran

Received: 2020/1/1 Accepted: 2020/12/30

*Corresponding Author: phejazi@iust.ac.ir

Abstract

This study examined cellulase enzyme production by *Trichoderma reesei* PTCC 5142 on three lignocellulosic substrates (corn bran, sawdust and wheat bran) and percentage of different combinations of sawdust and wheat bran by solid-state fermentation method for 6 days in Erlenmeyer-scale. Then, under optimal substrate component proportions obtained from Erlenmeyer-scale, the effect of aeration at three levels of 0.5, 1 and 1.5 liters per hour of initial dry substrate (l/(h.gds)) on the production of this enzyme in 0.5-Liter packed-bed bioreactor was studied. The initial substrate moisture and pH were 70 % (w/w) and 5 respectively, and the heating temperature was set at Erlenmeyer-scale and bioreactor at 30 and 28 °C, respectively. Cellulase enzyme production was evaluated based on the activity of endoglucanase and exoglucanase enzymes. The highest amount of endoglucanase and exoglucanase activity at substrate combination of 75% wheat bran and 25% sawdust in Erlenmeyer-scale at days 6 and 3 were obtained 13 and 6.4 U/gds, respectively, and in bioreactor at aeration of 1.5 (l/(h.gds)) at day 3 were attained 36 and 10 U/gds, respectively.

Keywords: Cellulase enzyme, Solid-state fermentation, *Trichoderma reesei*, lignocellulosic substrates, Packed-bed bioreactor.