✓ پژوهش و سازندگی، شماره ۵۱، تابستان ۱۳۸۰

بهینه سازی تولید آنزیم گلوکز اکسیداز توسط قارچ *Aspergillus niger*

● **عباس لطفی**، استادیار گروه بیوشیمی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس ● **محمدسعید هخامنش**، دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی دانشکده علوم‌پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
● **محمدحسین یادگاری**، عضو هیأت علمی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس ● **سیدعلیرضا مصباح‌نمین**، عضو هیأت علمی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
تاریخ دریافت: اردیبهشت ماه ۱۳۷۹ تاریخ پذیرش: خرداد ماه ۱۳۸۰

چکیده

امروزه قارچ *A. niger* جهت تولید گلوکونیک اسید و آنزیم گلوکزاکسیداز در مقیاس وسیع بکار می‌رود. این آنزیم برای موارد متعدد کشاورزی و صنعتی و غذایی از جمله: حذف اکسیژن از محصولات غذایی بویژه کنسروجات، در سیستم‌های لیگنینولیتیک جهت تجزیه چوب و خاک اره، نگهداری میوه‌جات برای مدت طولانی در سردخانه‌ها کاربرد دارد. از بین ۱۷ سوش وحشی و دوسوش استاندارد قارچ *A. niger* سوش NRRL-3 توسط روش رنگ آمیزی غیراختصاصی و اختصاصی کلونی‌های قارچی در محیط جامد، جهت کشت در محیط مایع انتخاب شد و سپس درمحیط کشت مایع حاوی نمکهای معدنی ،گلوکز و کربنات کلسیم، کشت داده شد و با تغییر غلظت یک عامل تشکیل دهنده محیط وثابت نگه داشتن سایر پارامترها، روش one at a time بهترین محیط کشت مایع از نظر تولید آنزیم گلوکزاکسیداز، با غلظت مشخص عناصر تشکیل دهنده محیط بدست آمد. مهمترین عامل در تولید آنزیم در محیط کشت مایع طبق بررسی های به عمل آمده، غلظت گلوکزوکربنات کلسیم است. در انتهای کارسوش NRRL-3 توانست درمحیط بهینه شده، آنزیم گلوکز اکسیداز را بافعالیت ۲/۲ IU/ml تولید کند.

کلمات کلیدی: گلوکز اکسیداز، *A. niger*

✓ **Pajouhesh & Sazandegi, No 51 PP:6-7**

Optimization of glucose oxidase production by *Aspergillus niger*.

By: Lotfi A. Dept. of Biochemistry, Hakhamenesh M.S. Dept. of Biochemistry, Yadegari M.H. Dept. of Mycology, Mesbahyamin S.A.R., Dept. of Biochemistry School of Medical Sciences, Tarbiat Modarres University, Tehran, I.R. Iran.

Recently *Aspergillus niger* is the major source for gluconic acid and glucose oxidase production on large scale. Glucose oxidase may be used in industrial, agricultural and nutritional manner. It can be applied for the deletion of oxygen from the nutritional products, especially in conserves, in ligninolytic system for wood degredation, and for the fruits storage for a long time in refrigreator. From 17 wild and 2 standard strain of A.n. NRRL-3 was selected by nonspecific and specific colony staining method. Then the best strain in this step was cultured in liquid medium. The recent medium was contained glucose and calcium carbonate as main nutrients. In this medium it has been changed the concentration speed of shaking, temperature and pH. It has been concluded that the most important factor for glucose oxidase production is the concentration of glucose and calcium carbonate. After optimization other culture medium variables, finally NRRL-3 strain produced 2.2 IU/ml glucose oxidase in condition culture medium.

Keywords: Glucose oxidase, *Aspergillus niger*.

مقدمه

آنزیم گلوکزاکسیداز (EC 1.1.3.4, β-D-glucose oxygen 1-oxidoreductase) که گلوکز را در حضور اکسیژن به گلوکونیک اسید و آب اکسیژنه تبدیل می‌کند، از اهمیت بسزایی به خاطر وسعت کاربردش برخوردار می‌باشد. این آنزیم یک فلاووپروتئین است که بسته به منبع تهیه آن ساختمان آن از دو زیر واحد مشابه یا چهار زیر واحد دوبه دو مشابه تشکیل می‌شود و به ازاء هر ملکول آنزیم فعال دو ملکول FAD وجود دارد. این آنزیم از دستهٔ گلیکوپروتئین‌ها می‌باشد که محتوای قندی آن ۱۶ درصد وزنی - وزنی می‌باشد و رشته‌های قندی با پیوندهای N و O گلیکوزیدی به ریشه‌های سرین، آسپارژین و ترئونین موجود در ساختمان آنزیم متصل می‌شود (۱۲). گلوکز اکسیداز برای حذف اکسیژن ازمحصولات غذایی، بالابردن بازده فرآیند تخمیر آرد، استفاده در سیستمهای لیگنینولیتیک جهت تجزیه چوب و خاک اره، تولید گلوکونیک اسید، حذف گلوکز از مواد غذایی و غذای کودک، نگهداری میوه‌جات برای مدت طولانی در سردخانه و تعیین مقدار کمی D-گلوکز در مایعات صنعتی و بیولوژیکی به کار می‌رود. فعالیت گلوکز اکسیداز در تعدادی از گونه‌های قارچی به اثبات به رسیده ولی قارچ *A. niger* عنوان بهترین منبع تولید این آنزیم در مقیاس صنعتی شناخته شده است (۲). در این تحقیق از ۱۷ سوش وحشی و دو سوش استاندارد NRRL-3 و *A. niger* N400 استفاده گردید و سپس برای بالابردن بازده تولید آنزیم انواع محیط کشت مایع با شرایط متغیر بکار برده شد تا بهترین شرایط تولید آنزیم بدست آید.

مواد و روشها

تعیین غیراختصاصی سوشهای قارچی با قدرت تولید بالای آنزیم

۱۹ سوش موجودبه صورت تریپلت در پلیت‌های حاوی محیط کشت جامد که ترکیب آن شامل ۰/۵ گرم ، کلرید پتاسیم، ۰/۰۱ گرم سولفات آهن II، ۳گرم نیترات سدیم - ۱گرم فسفات هیدروژن دی پتاسیم، ۰/۵ گرم سولفات منیزیم، ۱۸ گرم گلوکز، ۱۵ گرم آگار و ۱۰ میلی‌گرم متیل رد به عنوان معرف عمومی باشد برای مدت ۵ روز در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد کشت داده شد (۲).

جدول شماره ۱- مقایسه میزان تولید آنزیم گلوکزاکسیداز در چند محیط کشت و انتخاب محیط A جهت طی مراحل بهینه‌سازی

نام محیط کشت	pH محیط کشت	وزن میسلیوم (mg/ml)	فعالیت گلوکزاکسیداز (unit/ml)
محیط A:	۵/۷	۵/۹	۱/۸
٪۸ = G و ٪۳/۵ = Cc	۵/۷	۱۰/۲	۲
٪۸ = G و ٪۳/۵=Cc و٪۳/۵=P			
چاپکس Czapek	۲/۳	۳/۵	۰/۱
معمولی	۵/۶	۱۳/۲	۱/۳
Cc = ٪۳/۵			
مولر (muller)	۲	۶/۴	۰/۱
معمولی	۵/۸	۲۰/۲	۰/۱
Cc = ٪۳/۵			
محیط Munk:	۲/۲	۶/۴	۰/۱
معمولی	۶/۱	۱۱/۳	۰/۱
Cc = ٪۳/۵			
محیط Nakamatsu	۲/۸	۱۲/۴	۰/۱
معمولی	۵/۳	۱۶/۸	۱/۸
Cc = ٪۳/۵	۵/۳	۱۶/۷	۱/۸
P = ٪۳ و Cc = ٪۳/۵ و G = ٪۸			
Nikolskaya	۲/۲	۴/۲	۰/۱
معمولی	۵/۴	۱۸/۷	۱/۲
Cc = ٪۳/۵			

پپتون = P گلوکز = G کربنات کلسیم = Cc

جدول شماره ۲- محیط کشت پیشنهادی حاصل از مراحل بهینه‌سازی

فعالیت محیط unit/ml	$CaCo_3$	پپتون	گلوکز	$FeSo_4$	KCl	K_2HPo_4	$MgSo_4.7H_2O$	$NaNO_3$
۲/۲	٪۳/۵	٪۰/۲	٪۸	٪۰/۰۰۱	٪۰/۰۵	٪۰/۱	٪۰/۰۵	٪۰/۱

(درجه سانتیگراد) ۳۰ = دما، RRM ۲۰۰ = دور شیکر، ساعت ۸۰ = زمان، ۵/۷ =pH

تعیین اختصاصی سوشهای با قدرت تولید بالای آنزیم

سوشهای انتخاب شده از مرحله قبل را در محیط تشخیصی اختصاصی که شامل ۳گرم نیترات سدیم، ۱ گرم فسفات هیدروژن دی پتاسیم، ۰/۵گرم سولفات منیزیم، ۰/۱گرم سولفات آهن، ۳۰میلی گرم اورتودیانیزیدین، ۱۰۰میلی گرم آنزیم پراکسیداز و ۱۵ گرم آگار بود، در یک لیتر محیط کشت داده شد (۳). به عبارت دیگر همان مواد محیط غیراختصاصی با جایگزینی معرفهای اختصاصی اورتو دیانیزیدین و پراکسیداز بجای معرف عمومی متیل رد بکار رفت.

کشت در محیط مایع و بهینه سازی آن

محیط کشت مایع اولیه واجد مواد محیط کشت عمومی به همراه پپتون و کربنات کلسیم بود (۴) که کاربر روی بهینه‌سازی این محیط با تغییر میزان مواد تشکیل دهندهٔ آن انجام شد. مدت زمان کشت ۸۰ ساعت، pH محیط ۵/۷، دور شیکر جهت هوادهی ۲۰۰ RPM، دما ۳۰ درجه سانتیگراد و تعداد اسپور کشت شده ۲×۱۰^{۷} در هر ۵۰ میلی لیتر محیط بود.

تعیین فعالیت آنزیمی در محیط کشت مایع

میزان فعالیت آنزیمی گلوکز اکسیداز با استفاده از روش اسپکتروسکوپی و سوبسترای اورتودیانیزیدین در طول موج ۴۵۰ nm تعیین شد (۵). طبق تعریف هر واحد فعالیت سبب اکسیداسیون یک میکرومول اورتودیانیزیدین در دقیقه در ۲۵ درجه سانتیگراد و pH=۶ می‌شود (۶). میزان پروتئین نیز به روش برادفورد اندازه‌گیری شد (۸) فعالیت و نیز فعالیت ویژهٔ آنزیم گلوکز اکسیداز طبق فرمولهای زیر محاسبه گردید:

$$\text{فعالیت ویژه} = \frac{\Delta A.\ 460/min}{\text{مقدار پروتئین تام برحسب میلی گرم} \times ۱/۱۳}$$

$$\text{فعالیت (IU/Ml)} = \frac{460.}{\Delta A.۱/۱۳}$$

نتایج

۱۷ سوش وحشی و ۲ سوش استاندارد که بر روی محیط کشت تشخیصی غیراختصاصی کشت داده شده بودند (حدود ۱۰۰ اسپور در هر چاهک وسط پلیت) پس از ۵ روز انکوبه کردن در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد از نظر بزرگی حلقه قرمز رنگ دریک زمینه زرد رنگ در اطراف میسلیوم قارچها که معرف اسیدی شدن محیط می‌باشد، مورد بررسی واقع شدند و ۵ سوش شامل ۳ سوش وحشی و دو سوش استاندارد که بزرگترین حلقه قرمز را ایجاد نموده بودند برای کشت در محیط کشت تشخیصی اختصاصی از نظر تولید آنزیم گلوکز اکسیداز انتخاب شده و پس از کشت تعداد اسپور یکسان در وسط پلیتها در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و مدت انکوباسیون ۵ روز، سوش NRRL-3 که بیشترین میزان رنگ قهوه‌ای را در اطراف میسلیوم قارچ ایجاد کرده بود، جهت ادامه کار و کشت در محیط کشت مایع انتخاب شد. کشت در محیط مایع در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد، pH=۵/۷ زمان ۸۰ ساعت و دور شیکر ۲۰۰RPM با تغییر دادن غلظت یک عامل تشکیل دهند محیط و ثابت نگه داشتن سایر عوامل انجام شد، نتیجه نهایی در جداول ۱ و ۲ نشان داده شده است.

لازم به ذکر است که در مرحله بهینه‌سازی محیط کشت مایع، برای بررسی هر عامل نیز، کشتها به صورت سه‌گانه انجام شد. شکل شماره ۱ به ترتیب تولید آنزیم را در محیط کشت عمومی (الف) و محیط کشت اختصاصی (ب) را نشان می‌دهد.

بحث

گلوکزاکسیداز قارچی واکنش اکسیداسیون D-گلوکز و تبدیل آن به گلوکونولاکتون و آب اکسیژنه را در حضور اکسیژن ملکولی کاتالیز می‌کند در مرحله بعد گلوکونولاکتون بطور خودبخودی به گلوکونیک اسید تبدیل می‌شود پس تولید اسید گلوکونیک که توسط معرف عمومی و غیراختصاصی متیل رد انجام می‌شود، می‌تواند دلیلی بر وجود آنزیم بوده و بعنوان غربال در تعداد زیادی از گونه‌ها بکار برده شود. در سومین مرحله که نمونه‌های واجد آنزیم از مرحله اول انتخاب شوند این نمونه‌ها در محیط کشت واجد پراکسیداز و اورتودیانیزیدین به عنوان دو معرف اختصاصی کشت داده شوند. این معرفها اختصاصی هستند و از NRRL-3 one به عنوان بهترین روش برای کشت در محیط مایع انتخاب شد. نتایج بهینه‌سازی به روش در at a time محیط کشت مایع فعالیت آنزیم را در شیرهٔ سلولی با ۶۹٪ افزایش از ۰/۱۳ به حدود ۰/۲۲ معین ساخت که در مقایسه با پژوهشهای سایر محققین که از روشهای قارچی موتانت استفاده کردند زیاد نیست ولی برای روشهای معمول قابل قبول است (۱۳).

تولید آنزیم مذکور توسط قارچ *A. niger* شدیدا تحت تاثیر غلظت گلوکز- پپتون و کربنات کلسیم می‌باشد و با تغییر غلظت این مواد و رسیدن به یک غلظت اپتیمم طبق جدول (۲) بیشتر قند به تحت تاثیر آنزیم به اسید گلوکونیک تبدیل شود (۹، ۱۰) تولید آنزیم ظرف سه روز حداکثر میرسد و سپس با افزایش بسیار کمی ادامه می‌یابد لذا ۳ روز کشت به عنوان زمان اپتیمم کشت با توجه به گزارشهای متعدد در این زمینه انتخاب گردید (۱۴، ۱۵) ضمنا میزان فعالیت آنزیم ۴۵ درصد در میلی‌لیتر محیط کشت نسبت به کارهای قبلی افزایش نشان می‌دهد (۱۱).

شکل ۱ـ تعیین غیر اختصاصی نمونه‌های قارچی *A. niger* از نظر تولید آنزیم گلوکزاکسیداز

شکل ۲- تعیین اختصاصی نمونه‌های قارچی با قدرت تولید بالای آنزیم گلوکزاکسیداز

1- Min Kim J. and Schmid R., 1991.Comparison of *Penicillium amagasakiense* glucose oxidase purified as glyco - and aglyco - proteins. FEMS Microbiology letters 78: 221--226.

2- Markwell J., Frakes L.G., Brott E.C. and Wagner F.W., 1989. *Aspergillus niger* mutants with increased glucose oxidase production. Appl. Microbiol Biotechnol 30: 166-169.

3- Sharif F.A. and Alaeddinoglu N.G., 1992. Expression and overproduction of glucose oxidase in *Aspergillus niger*. Appl. Microbiol Biotechnol. 38: 115-116.

4- Hellmuth K., Pluschkell S., Jung J-K. and Ruttkowski E., 1995. Optimization of glucose oxidase production by *Aspergillus niger* using genetic and process - engineering techniques. Appl Microbiol Biotechnol. 43: 978-984.

5- Fiedurek J., Rogalski J., Ilczuk Z. and Leonowicz A., 1986. Screening and mutagenesis of moulds for the improvement of glucose oxidase production. Enzyme Microb. Technol. 8: 734-736.

6- Wothingtan C.S. and Teller J.D., 1972. Worthington Enzyme manual. Pub: Freehold, NJ, Glucose oxidase section.

7- Shomburg D., 1990. Enzyme Hand book, vol. 11 Pub: Springer Verlag. Glucose oxidase section.

8- Bradford M.M., 1976. Fast method for protein quntitation. Anal. Biochem. 72: 248-254.

9- Muller H.M., 1985. Utilization of gluconate by *Aspergillus niger* I. Zentrabl Microbiol. 140: 475-484.

10- Muller H.M., 1986. Utilization of gluconate by *Aspergillus niger* II. Zentrabl Microbiol. 141: 461-469.

11- Rogalshi J., Fiedurek J., Szczordrak J. and Kapusta K., 1988. Enzyme Microb. Technol. 10: 508-511.

12- Kalisz H.M., Hecht H.J., Schomburg D. and R.D. Schmid, 1990. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of a Deglycosylated glucose oxidase from *Aspergillus niger* J. Mol. Biol. 213: 207-209.

13- Gromada A. and Fiedurek J., 1997. Selective isolation of *Aspergillus niger* mutants with enhenced glucose oxidase production. J.Appl.Microb.82:648-652.

14- Kelley R.L., 1988. Glucese oxidase of *Phanerochaete chrysosporium* methods in enzymology. 161:307-316.

15- Katherine R., 1990. Glucose oxidase from *Aspergillus niger*. J.Biol.chem. 266(7):3793-3802.