مجله پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۲۰/۳ شماره ۲/ سال ۱۳۸۹

بهینه سازی تولید پکتین لیاز از تفاله خرما توسط آسپرژیلوس نایجر با کار برد روش سطح پاسخ

فاطمه فربه[۱]، محمود رضازاد باری[۲]* و محمد علیزاده خالداباد[۲]

تاریخ دریافت: ۸۹/۱/۱۹ تاریخ پذیرش: ۸۹/٤/۱۵

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم وصنایع غذایی دانشگاه ارومیه

۲- استادیار گروه علوم وصنایع غذایی دانشگاه ارومیه

*مسئول مکاتبه: E mail: mahmoud114@hotmail.com

چکیده

در این تحقیق اثر هفت فاکتور، غلظت آمونیوم سولفات، پتاسیم دی هیدروژن فسفات، غلظت تفاله خرما، pH، اندازه تلقیح، سرعت بهمزدن و زمان تخمیر بر تولید پکتین لیاز توسط *آسپرژیلوس نایجر* در دو مرحله مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله اول اثر این فاکتور ها با کاربرد طرح فاکتوریل ناقص مورد مطالعه قرار گرفت. بر پایه نتایج این مرحله سه فاکتور، pH ، غلظت آمونیوم سولفات و زمان تخمیر برای مطالعات بیشتر در نظر گرفته شدند. مرحله دوم با استفاده از طرح کامپوزیت مرکزی برای یافتن شرایط بهینه pH، غلظت آمونیوم سولفات و زمان تخمیر انجام شد. بعد از تجزیه طرح کامپوزیت مرکزی ، بهترین شرایط برای تولید حد اکثر آنزیم پکتین لیاز به ترتیب زیر تعیین گردید: غلظت آمونیوم سولفات ۰/۳۵ ٪، زمان تخمیر ۷۳/۹۳ ساعت و pH ٤/۸۲. فعالیت آنزیم در این شرایط بهینه شده $1/38\ U.ml^{-1}$ بود.

واژه های کلیدی: پکتین لیاز، آسپرژیلوس نایجر، شرایط بهینه، تفاله خرما

Optimization of Pectinlyase Production from Date Pulp by *Aspergillus niger* Using Response Surface Methodology

F Farbeh[1], M Rezazad Bari[2*] and M Alizadeh Khaledabad[2]

Received: 8 April, 2010 Accepted: 6 July, 2010

[1] MSc Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Iran

[2]Assistant Prof., Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Iran

*Corresponding author: E mail: mahmoud114@hotmail.com

Abstract

In this study a two-step approach was applied in order to investigate the effect of seven factors including: concentration of ammonium sulphate, potassium dihydrogen phosphate, date pulp, pH, inoculums size, agitation speed and fermentation time on the pectinlyase production by *Aspergillus niger*. At first step, the effects of these variables were studied using fractional factorial design. According to obtained results three factors, pH, ammonium sulphate concentration and fermentation time were considered for further study. Second step was carried out by using central composite design (CCD) in order to find optimum conditions of pH, ammonium sulphate concentration and fermentation time. After analysis of CCD, optimum condition for maximization of pectinlyase activity determined as follow: ammonium sulphate concentration 0.35%, fermentation time, 73.93 hours and pH, 4.82. Enzyme activity at this optimum condition was 1.38 U. ml^{-1}.

Key words: Pectinlyase, *Aspergillus niger*, Optimization, Date pulp

مقدمه

مواد پکتیکی، پلی ساکارید هایی هستند که در لایه میانی و دیواره اولیه سلولهای گیاهان یافت میشود(شرما و ساتیانارایانان ۲۰۰٦). آنزیمهای تجزیه کننده پکتین گروهی از آنزیم ها هستند که مواد پکتیکی را تجزیه می کنند. بر اساس نوع عملکرد، آنها را می توان بدین قرار تقسیم بندی نمود: استراز، دپلی مراز الیمیناتیو (لیاز ها) و دپلی مراز هیدرولیز کننده (کاوالیتو و همکاران ۱۹۹٦). آنزیم ها ی(تجزیه کننده پکتین بطور معمول در فرآوری میوه ها و سبزیجات برای تولید آبمیوه و کنسانتره استفاده می شوند. پکتین لیاز(PL) آنزیمی است که بطور ویژه در این خصوص مورد استفاده قرار میگیرد برای اینکه تمایل زیادی به پکتین های بلند زنجیر و زیاد متیله شده دارد. بعلاوه آنزیم های تجاری با فعالیت پکتین لیازی بالاتر در صنعت آبمیوه از تقاضای بالایی بر خوردار است. این آنزیم ها در صنایع دیگر مانند تخمیر چای و قهوه، استخراج روغن نیز مورد استفاده قرار می گیرند(پاتیل و همکاران۲۰۰٦،پاسیلی- والی و همکاران ۲۰۰۳،کاستیلهوو همکاران ۲۰۰۰).

این آنزیم ها توسط باکتریها، مخمر ها و قارچها تولید می شوند اما در حد صنعتی بطور وسیع توسط قارچها بویژه *آسپرژیلوس نایجر* تولید می شود(مالدونادو همکاران۱۹۸٦ ،بگ و همکاران ۲۰۰۰، فاوللاتورس وهمکاران ۲۰۰٦). پکتینازها به روش تخمیر غوطه وری

و حالت جامد تولید می شوند. روش حالت جامد، به نوع غوطه وری بدلیل غلظت بالای آنزیم های خام و بوجود آمدن مواد زاید مایع پایین ترجیح داده می شود(پاندی ۱۹۹٤) ، اما اغلب آنزیمها توسط روش غوطه وری تولید می شوند(سوزان ۲۰۰۳). روشهای تولید پکتیناز ها توسط قارچ های رشته ای بر اساس سویه قارچ، ترکیب محیط کشت و شرایط کشت (pH، دما، هوادهی و زمان گرما خانه گذاری) متفاوتند.

استفاده از منابع کربن با ارزش اقتصادی پایین مانند مواد جانبی صنایع کشاورزی، باعث کاهش ارزش پکتیناز می گردد. خیلی از مطالعات روی تولید پکتیناز از منابعی مانند تفاله چغندر قند ، باگاس نیشکر ، تفاله لیمو، تفاله انگور، تفاله سیب و سبوس گندم انجام یافته است (بگلیس ۱۹۹۳،بوتللا و همکاران۲۰۰۷،ریو و همکاران ۱۹۹۹،کشایاپ و همکاران ۲۰۰۱،مالدونادو و همکاران ۱۹۸٦،مادونادو و همکاران ۱۹۸٦،پاندی ۱۹۹٤،سینگ وهمکاران ۱۹۹۹). در این مقاله تولید پکتیناز از تفاله خرما (محصول جانبی تولید شربت خرما) با استفاده از *آسپرژیلوس نایجر* در کشت غوطه وری مورد بررسی قرار گرفته است. اثر پارامتر های تخمیر و ترکیب محیط کشت بر روی تولید پکتین لیاز با بکار گیری طرح فاکتوریل و طرح کامپوزیت مرکزی مورد تحقیق قرار گرفته است.

مواد و روش ها

میکرو ارگانیسم

آسپر ژیلوس نایجر از انگور در حال فساد در آزمایشگاه میکروبیولوژی گروه صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه جداسازی گردید. میکرو ارگانیسم ها بر روی محیط کشت PDA اسلنت شده در٤ درجه سانتیگراد نگهداری و هر سه ماه یکبار تجدید کشت گردید. تعیین نوع قارچ بر اساس مشخصات ریخت شناسی انجام گردید.

ماده اولیه

تفاله خرمای تهیه شده از شرکت خرما بن جنوب (بندر عباس) که یک ماده جانبی صنعت شیره خرما می باشد بعنوان ماده اولیه تولید آنزیم مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه ماده تلقیح

برای تهیه ماده تلقیحی، آب مقطر استریل به کشت اسلنت پنج روزه افزوده شده و سوسپانسیون حاصل به 10^{5} تا 10^{7} اسپور در میلی لیتر رسانده شد.

محیط کشت و تخمیر

محیط کشت برای تولید انزیم از تفاله خرما، سولفات آمونیوم و فسفات دی هیدروژن پتاسیم تشکیل شده بود. تمام فلاکس های محیط کشت بر اساس طرح فاکتوریل و طرح کامپوزیت مرکزی تهیه گردید(جدول ۲-۱). تخمیر در فلاکس های ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتر دارای ۱۰۰ میلی لیتر از محیط کشت مورد نظر در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد روی شیکر انجام گردید.

تهیه نمونه های آنزیم

بعد از تخمیر، نمونه های مایع بدست آمده از تخمیر غوطه وری با استفاده از صافی کاغذی SS No.595 صاف شده و در دمای ٤ درجه سانتیگراد برای ارزیابی های بیشتر نگهداری شد.

سنجش فعالیت آنزیم

فعالیت پکتین لیازی با افزایش جذب نوری در ۲۳۵ نانومتر طبق روش آلبرشیم با استفاده از ضریب خاموشی ۵۵۰۰ $cm^{-1}mol^{-1}$ تعیین گردید(البرشیم۱۹۹۵). یک واحد از (U) آنزیم بدین صورت تعریف شد: مقدار آنزیم هایی که یک میکرو مول یوریدین غیر اشباع را در یک دقیقه افزایش می دهند. فعالیت آنزیمی بصورت واحد بر میلی لیتر از صاف شده محیط کشت بیان گردید.

طرح آزمایش و تجزیه داده ها

طرح فاکتوریل برای بررسی اثر هفت فاکتور غلظت سولفات آمونیوم، پتاسیم دی هیدروژن فسفات ، تفاله خرما، pH، مقدار ماده تلقیحی، سرعت همزدن و زمان تخمیر بر میزان تولید پکتین لیاز بوسیله *آسپرژیلوس*

نایجر مورد استفاده قرار گرفت. در این طرح ۳۲ تیمار برای مطالعه اثرات عمده (Main effects) و متقابل این هفت فاکتور بکار گرفته شد(جدول ۱). داده ها با استفاده از منحنی نیمه نرمال تجزیه وتحلیل شدند. در مرحله دوم اثر سه فاکتور pH، سولفات آمونیوم و زمان تخمیر بر میزان تولید پکتین لیاز بعنوان پاسخ مورد تحقیق قرار گرفت. پنج سطح از هر فاکتور در یک طرح مرکب(طرح کامپوزیت مرکزی) انتخاب و سه فاکتور در قالب ۲٤ تیمار بررسی گردید (جدول ۲) . بعد از انجام آزمایش و سنجش سطوح فعالیت پکتین لیازی، از یک مدل درجه دوم برای ارتباط بین فاکتور های تخمیر و میزان پکتین لیاز تولید شده استفاده گردید:

$$Y = \beta_{\circ} + \sum_{j=1}^{K} \beta_j X_j + \sum_{i<j}\sum \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{j=1}^{k} \beta_{jj} X_j^2 \quad [۱]$$

در این معادله Yپاسخ پیشبینی شده، β_o ثابت مدل، β_j ضریب خطی ، X_i و X_j متغییر های فاکتور در شکل کد شده، β_{ij} ضریب برهمکنش و β_{jj} ضریب درجه دوم می باشد. مدل ها از نظر عدم تطابق و کارایی در پیش بینی پاسخ مورد ارزیابی قرار گرفتند. همه ی سطوح پاسخ سه بعدی و کانتور پلات های دو بعدی با کاربرد نرم افزار SAS V.9 انجام پذیرفت.

جدول ۱ : طرح فاکتوریل غربالی مورد استفاده برای شناسایی فاکتورهای موثر در تولید آنزیم پکتین لیاز

آزمون	زمان (ساعت)	سرعت همزدن (rpm)	pH	$(NH4)_2SO_4$ (gr/۱۰۰ml)	KH_2PO_4 (gr/۱۰۰ml)	تفاله خرما (gr/۱۰۰ml)	مقدار اسپور (اسپورها/۱۰۰ml)
۱	۲۴	۱۵۰	۳.۵	۰.۱	۰.۴	۴	۱۰۰۰۰۰۰۰
۲	۲۴	۱۵۰	۳.۵	۰.۱	۰.۸	۴	۱۰۰۰۰۰
۳	۲۴	۱۵۰	۳.۵	۰.۳	۰.۴	۸	۱۰۰۰۰۰۰۰
۴	۲۴	۱۵۰	۳.۵	۰.۳	۰.۸	۸	۱۰۰۰۰۰
۵	۲۴	۱۵۰	۵	۰.۱	۰.۴	۸	۱۰۰۰۰۰
۶	۲۴	۱۵۰	۵	۰.۱	۰.۸	۸	۱۰۰۰۰۰۰۰
۷	۲۴	۱۵۰	۵	۰.۳	۰.۴	۴	۱۰۰۰۰۰
۸	۲۴	۱۵۰	۵	۰.۳	۰.۸	۴	۱۰۰۰۰۰۰۰
۹	۲۴	۲۵۰	۳.۵	۰.۱	۰.۴	۸	۱۰۰۰۰۰
۱۰	۲۴	۲۵۰	۳.۵	۰.۱	۰.۸	۸	۱۰۰۰۰۰۰۰
۱۱	۲۴	۲۵۰	۳.۵	۰.۳	۰.۴	۴	۱۰۰۰۰۰
۱۲	۲۴	۲۵۰	۳.۵	۰.۳	۰.۸	۴	۱۰۰۰۰۰۰۰
۱۳	۲۴	۲۵۰	۵	۰.۱	۰.۴	۴	۱۰۰۰۰۰۰۰
۱۴	۲۴	۲۵۰	۵	۰.۱	۰.۸	۴	۱۰۰۰۰۰
۱۵	۲۴	۲۵۰	۵	۰.۳	۰.۴	۸	۱۰۰۰۰۰۰۰
۱۶	۲۴	۲۵۰	۵	۰.۳	۰.۸	۸	۱۰۰۰۰۰
۱۷	۴۸	۱۵۰	۳.۵	۰.۱	۰.۴	۸	۱۰۰۰۰۰
۱۸	۴۸	۱۵۰	۳.۵	۰.۱	۰.۸	۸	۱۰۰۰۰۰۰۰
۱۹	۴۸	۱۵۰	۳.۵	۰.۳	۰.۴	۴	۱۰۰۰۰۰
۲۰	۴۸	۱۵۰	۳.۵	۰.۳	۰.۸	۴	۱۰۰۰۰۰۰۰
۲۱	۴۸	۱۵۰	۵	۰.۱	۰.۴	۴	۱۰۰۰۰۰۰۰
۲۲	۴۸	۱۵۰	۵	۰.۱	۰.۸	۴	۱۰۰۰۰۰
۲۳	۴۸	۱۵۰	۵	۰.۳	۰.۴	۸	۱۰۰۰۰۰۰۰
۲۴	۴۸	۱۵۰	۵	۰.۳	۰.۸	۸	۱۰۰۰۰۰
۲۵	۴۸	۲۵۰	۳.۵	۰.۱	۰.۴	۴	۱۰۰۰۰۰۰۰
۲۶	۴۸	۲۵۰	۳.۵	۰.۱	۰.۸	۴	۱۰۰۰۰۰
۲۷	۴۸	۲۵۰	۳.۵	۰.۳	۰.۴	۸	۱۰۰۰۰۰۰۰
۲۸	۴۸	۲۵۰	۳/۵	۰.۳	۰.۸	۸	۱۰۰۰۰۰
۲۹	۴۸	۲۵۰	۵	۰.۱	۰.۴	۸	۱۰۰۰۰۰
۳۰	۴۸	۲۵۰	۵	۰.۱	۰.۸	۸	۱۰۰۰۰۰۰۰
۳۱	۴۸	۲۵۰	۵	۰.۳	۰.۴	۴	۱۰۰۰۰۰
۳۲	۴۸	۲۵۰	۵	۰.۳	۰.۸	۴	۱۰۰۰۰۰۰۰

جدول ۲ : طرح CCD بکار رفته برای بهینه سازی شرایط تولید پکتین لیاز

آزمون	بلوك	زمان (ساعت)	pH	$(NH_4)_2 SO_4$ (g/100ml)
۱	بلوك۱	۵۴	۴.۸	۰.۲۵
۲	بلوك۱	۷۸	۴.۸	۰.۴۵
۳	بلوك۱	۵۴	۶.۲	۰.۴۵
۴	بلوك۱	۶۹	۵.۵	۰.۳۵
۵	بلوك۱	۷۸	۶.۲	۰.۲۵
۶	بلوك۱	۶۹	۵.۵	۰.۳۵
۷	بلوك۲	۶۹	۵.۵	۰.۳۵
۸	بلوك۲	۵۴	۴.۸	۰.۴۵
۹	بلوك۲	۷۸	۴.۸	۰.۲۵
۱۰	بلوك۲	۶۹	۵.۵	۰.۳۵
۱۱	بلوك۲	۵۴	۶.۲	۰.۲۵
۱۲	بلوك۲	۷۸	۶.۲	۰.۴۵
۱۳	بلوك۳	۶۹	۵.۵	۰.۵۲
۱۴	بلوك۳	۶۹	۵.۵	۰.۱۸
۱۵	بلوك۳	۶۹	۴.۳	۰.۳۵
۱۶	بلوك۳	۶۹	۶.۸	۰.۳۵
۱۷	بلوك۳	۶۹	۵.۵	۰.۳۵
۱۸	بلوك۳	۴۸	۵.۵	۰.۳۵
۱۹	بلوك۳	۶۹	۵.۵	۰.۳۵
۲۰	بلوك۳	۹۰	۵.۵	۰.۳۵
۲۱	بلوك۲	۹۰	۵.۵	۰.۳۵
۲۲	بلوك۱	۹۰	۵.۵	۰.۳۵
۲۳	بلوك۲	۹۰	۵.۵	۰.۳۵
۲۴	بلوك۱	۹۰	۵.۵	۰.۳۵

CCD : Central Composite Design

نتایج وبحث

غربال متغیر

در روش کلاسیک برای بهینه سازی تولید آنزیم معمولا از طرح " یک متغیر در یک زمان " استفاده می شود که مستلزم تغییر تنها یک فاکتور و ثابت نگه داشتن سایر فاکتورها میباشد. این روش تک بعدی بخصوص برای مواردی که تعداد متغیر ها زیاد باشد وقت گیر بوده و بر همکنش بین متغیر ها را نادیده می گیرد که ممکن است منجر به نتایج و تفاسیر نادرست گردد(مارتین و همکاران ۲۰۰٤). در روش فاکتوریل همه فاکتورها بطور همزمان مورد مطالعه قرار می گیرند و برهمکنش بین فاکتورها در صورت وجود تشخیص داده میشود.روش سطح پاسخ(RSM) برای تعداد اندکی از متغیر ها (تا ٥) قابل استفاده است برای اینکه با افزایش تعداد فاکتورها تعداد آزمایشها بصورت نمایی افزایش می یابد. بنابراین برای غربال هفت فاکتور غلظت آمونیوم سولفات، پتاسیم دی هیدروزن فسفات و تفاله خرما، pH مقدار ماده تلقیحی، سرعت بهمزدن و زمان تخمیر از طرح فاکتوریل با ۳۲ آزمایش استفاده شد.

تجزیه واریانس ثابت نمود که تغییرات pH ، سرعت بهمزدن و مقدار ماده تلقیحی در دامنه مطالعه شده تاثیر معنی داری بر تولید بکتین لیاز نداشت (۰/۰۵ >P). زمان تخمیر، بتاسیم دی هیدروژن فسفات ، آمونیوم سولفات و غلظت تفاله خرما در تولید آنزیم اثر داشت. اثر کوادراتیک متغیر ها قابل توجه نبود و تمام متغیر های موثر در بازه ها ی مورد مطالعه اثر

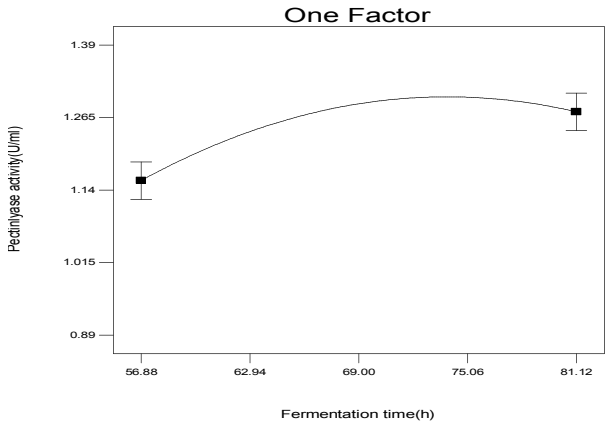
خطی نشان دادند. بهینه سازی برای مدل سازی میزان پکتین لیاز تولید شده بعنوان تابعی از فاکتور های تخمیر و بیشینه کردن آن از طرحکامپوزیت مرکزی استفاده گردید و سه فاکتور غلظت سولفات آمونیوم، pH و زمان تخمیربعنوان فاکتور های مستقل مورد مطالعه قرار گرفتند. در این مرحله سطوح جدید برای غلظت سولفات آمونیوم (X_1)، pH (X_2) و زمان تخمیر (X_3) در نظر گرفته شده و چهار فاکتور دیگر تحت شرایط زیر تثبیت گردید: غلظت پتاسیم دی هیدروژن فسفات ۰/۸ ٪ و تفاله خرما ٦٪، مقدار اسپور $۱۰^{۷}$، سرعت بهمزدن ۲۵۰ دور در دقیقه.

تجزیه واریانس (جدول شماره ۳) نشان داد که زمان تخمیر هم بصورت خطی هم بصورت درجه دوم تاثیر معنی داری بر تولید پکتین لیاز داشت در حالیکه سولفات آمونیوم در شکل خطی اثر معنی دار نداشت ولی در شکل درجه دوم اثر ان معنی دار بود. pH تنها در شکل خطی بر تولید پکتین لیاز اثر معنی دار داشت (α= ۰/۰۵). معادله ۲ رابطه بین سه فاکتور تخمیر و میزان پکتین لیاز تولید شده را نشان می دهد:

Pectinlyase activity=1.288709+0.059261 * A-0.08043 * B+0.00702 * C-0.07308 * A^2-0.07779 * C^2 [2]

در این معادله A ؛ B و C به ترتیب زمان تخمیر ؛ pH و غلظت سولفات آمونیوم می باشد. همانطور که در جدول شماره ۳ نشان داده شده ؛ R^2 مدل برابر ۸۵/٦ درصد و عدم تطابق آن غیر معنی دار می باشد.

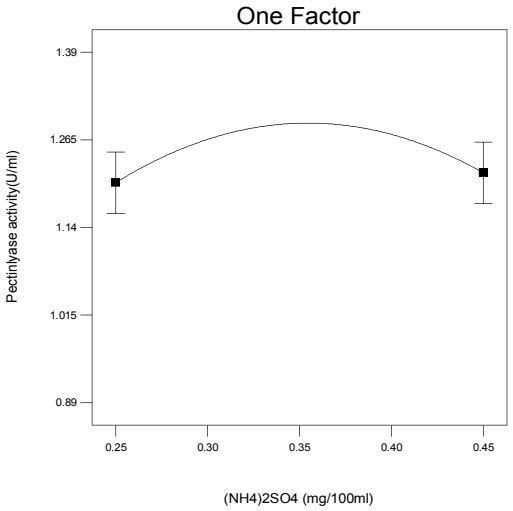
افزایش زمان تخمیر به ۷۲ ساعت باعث افزایش فعالیت آنزیم گردید و سپس با افزایش زمان تخمیر فعالیت آنزیم رو به کاهش نهاد. عبدالحنان و همکاران گزارش کردند که تولید آنزیمهای پکتولیتیک تا زمان تخمیر ۷۲ ساعت افزایش می یابد و با افزایش زمان تخمیر تا ۹٦ ساعت تولید این آنزیمها کاهش می یابد (البرشیم۱۹۹۵). کاهش میزان تولید آنزیم با طولانی شدن زمان تخمیر را می توان به کاهش مواد مغذی و یا تولید متابولیت های مهار کننده نسبت داد.



شکل ۱: تاثیر زمان تخمیر بر فعالیت پکتین لیاز تولید شده توسط *آسپرژیلوس نایجر*

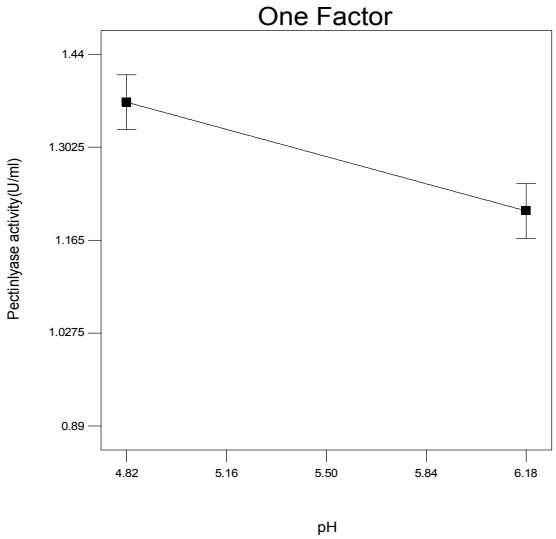
اثر غلظت سولفات آمونیوم در روی تولید آنزیم بصورت کوادراتیک بود. افزایش غلظت سولفات آمونیوم به ۰/۳۵٪ باعث افزایش فعالیت آنزیم شده و بعد با افزایش غلظت آن فعالیت آنزیم کاهش یافت .

ریو و همکاران(۱۹۹۹) در یک مطالعه مشابه اثر مثبت سولفات آمونیم بر تولید پکتیناز را گزارش نمودند.



شکل ۲: اثر غلظت سولفات آمونیوم روی فعالیت پکتین لیاز تولید شده توسط *آسپرژیلوس نایجر*

افزایش pH در بازه ۴/۸۲-۶/۱۸ در تولید پکتین لیاز اثر منفی داشت. pH با زمان تخمیر و غلظت سولفات آمونیوم بر همکنش نداشت (شکل ۳). همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده تولید پکتین لیاز با کاهش pH افزایش می یابد. ساتیا و همکاران(۱۹۹۸) با کاربرد روش سطح پاسخ pH ۳/۹ را به عنوان pH بهینه برای تولید پکتین لیاز گزارش کردند(حاج طیب و همکاران ۲۰۰۲).



شکل ۳: اثر pH روی فعالیت پکتین لیاز تولید شده توسط *آسپرژیلوس نایجر*

برای بهینه سازی شرایط بمنظور بیشینه کردن میزان پکتین لیاز تولید شده از روش تابع مطلوبیت (Desirability function) استفاده و شرایط بهینه بصورت زیر تعیین گردید.

غلظت سولفات آمونیوم : ۰/۳۵٪، pH : ٤/۸۲ و زمان تخمیر ۷۳/۹۳ ساعت. بنابر این با در نظر گرفتن نتایج بدست آمده در مرحله اول، بیشترین فعالیت آنزیم(۱/۳۸ واحد بر میلی لیتر) طبق شرایط زیر قابل دسترسی بود:

غلظت سولفات آمونیوم:۰/۳۵٪، pH : ٤/۸۲ و زمان تخمیر: ۷۳/۹۳ ساعت، غلظت تفاله خرما : ٦٪، فسفات دی هیدروزن پتاسیم : ۸٪، مقدار ماده تلقیحی: $۱۰^{۷}$، سرعت بهمزنی : ۲۵۰ دور در دقیقه، بعد از بهینه سازی مقدار فعالیت آنزیمی ۱/۳۸ واحد بر میلی لیتر بود.

جدول ۳: نتایج تجزیه واریانس(ANOVA) داده های آزمایش تولید پکتین لیاز

	مجموع مربعات	درجه آزادي	میانگین مربعات	عدد F	احتمال
منبع تغییرات					
بلوك	۰.۰۰۰۸۹۶	۲	۰.۰۰۰۴۴۸		
مدل	۰.۳۴۲۰۹۵	۵	۰.۰۶۸۴۱۹	۱۷.۸۹۸	< ۰.۰۰۰۱
A- زمان	۰.۰۷۴۸۴۷	۱	۰.۰۷۴۸۴۷	۱۹.۵۷۹	۰.۰۰۰۵
B-pH	۰.۰۹۰۵۷۲	۱	۰.۰۹۰۵۷۲	۲۳.۶۹۳	۰.۰۰۰۲
$C-(NH_4)_2SO_4$	۰.۰۰۰۴۳۱	۱	۰.۰۰۰۴۳۱	۰.۱۱۳	۰.۷۴۱۶
A^2	۰.۱۵۹۷	۱	۰.۱۵۹۷	۴۱.۷۷۷	< ۰.۰۰۰۱
C^2	۰.۰۵۳۶۹۲	۱	۰.۰۵۳۶۹۲	۱۴.۰۴۵	۰.۰۰۱۹
خطا	۰.۰۵۷۳۴۱	۱۵	۰.۰۰۳۸۲۳		
عدم برازش	۰.۰۳۱۱۲۷	۱۰	۰.۰۰۳۱۱۳	۰.۵۹۴	۰.۷۷۴۳
خطاي محض	۰.۰۲۶۲۱۴	۵	۰.۰۰۵۲۴۳		
کل	۰.۴۰۰۳۳۲	۲۲			
ضریب تبیین	۰.۸۵۶				

منابع مورد استفاده

Albershim P, 1995. Pectinlyase from fungi. In: Neufeld ES, Gisburg V, editors. Method in Enzymology, New York: Academic press, pp: 628-35.

Bajrachayra R and Mudyett RE, 1980. Effect of controlled gas environments in solid-substrate fermentation. Biotechnology Bioengineering, 22: 2219-2235.

Beg QK, Bhushan B, Kapoor M and Hoonda GS, 2000. Effect of amino acid on production of xylanase and pectinase from *Streptomyces* sp.QG-11-3. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 16: 211-213.

Begelis R, 1993. Carbohydrates. In: Enzymes in food process, Nagodawithand T, Reed G, Taylor S, (Eds), Academic Press, London, UK, pp: 121-158.

Botella C, Diaz A, De Ory I, Webb C and Blandino A, 2007. Xylanase and pectinase production by Asprgillus awamori on grape pomeca in solid state fermentation. Process Biochemistry, 42: 98-101.

Castilho LR, Medronho RA and Alves TLM, 2000. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindastrial residues with *Aspergillus niger*. Bioresource Technology, 71: 45-50.

Cavalitto SF, Arcas JA and Hours RA, 1996. Pectinase production profile of *Aspergillus foetidus* in solid state cultures at different acidities. Biotechnology Letters, 18: 251-256.

Favela-Torres E, Volke-Sepulveda T and Vinigra-Gonzalez G, 2006. Production of hydrolytic depolymerising pectinases. Food Technology and Biotechnology 44: 222-227.

Gummadi SN and Panda T, 2006. Purification and biochemical properties of pectinases. Process Biochemistry 38: 987-996.

Hadj-Taieb N, Ayadi M, Triguis Bouabdallah F and Gargouri A, 2002. Hyper production of pectinase activities by a fully constitutive mutant (CT1) of *Penicillium occitanis*. Enzyme and Microbial Technology, 30: 662-666.

Jacob N and Perma P, 2006. Influence of Mode fermentation on Production of Polygalactoronase by a novel of *Streptomyces lydicus*. Food Technology, 44: 263-267.

Jaya RS, Saxena S and Gupta R, 2005. Microbial pectinolytic enzymes. Process Biochemistry, 40: 2931-2944.

Kashyap DR, Vohra PK, Chopra S and Tewari R, 2001. Application of pectinases in the commercial sector. Bioresorurce Technology, 77: 215-227.

Kaur G, Kumar S and Satyanarayana T, 2004. Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* Apinis. Bioresource Technology 94: 239-243.

Maldonado MC, Navarro A and Callieri DAS, 1986. Production of pectinase by *Aspergillus SP* using differently pretreated lemon peel as carbon source. Biotechnology, 8: 501-504.

Mandlado MCA and Saad MS, 1998. Production of pectin esterase and polygalactoronase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state system. Journal of Industrial Microbiology Biotechnology, 20: 34-38.

Martin ES, Silva D, Da Silva R and Gomes E, 2002. Solid state production of thermostable pectinase from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. Process Biochemistry, 37: 949-954.

Martin N, Regina de Soza S, de Silva R and Gomes E, 2004. Pectinase production by fungal strains in solid–state fermentation using agro-industrial byproduct. Brazilian Archives of Biology and Technology, 47: 813-819.

Pandy A, 1994. Solid-state fermentation: an overview. In: solid-state fermentation. Wiley Eastern Ltd. New Delhi, India, pp: 3-10.

Patil SR and Dayanand A, 2006. Exploration of regional agro waste for the production of pectinases by *Aspergillus niger*. Food Technology and Biotechnology, 44: 289-292.

Patil SR and Dayanand A, 2006. Production of pectinase from deseeded sunflower head by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state condition. Bioresuorce Technology, 97: 2054-2058.

Piccoli-Valle RH, Passos FJV, Brandi IV, Peternelli LA and Silva DO, 2003. Influence of different mixing and aeration regimens on pectin lyase production by *Penicillium griseoroseum*. Process Biochemistry, 38: 849-854.

Rheem OHS, Sim S, Kim J and Baek SY, 1995. Optimizing the conditions of *lactobacillus casei* YIT9018 in trypton yeast extract-glucose medium by using response surface methodology. Applied Environmental Microbiology, 61: 3809-3814.

Rukhsana Bajwa AH and Latif Z, 2008. Screening of *Aspergillus niger* strains for pectinases production potential. Journal of Biotechnology, 136: 290–S344.

Ryoo D, Murphy VG and Karim MN, 1999. Evaporative temperatures and moisture control in a rocking reactor for solid-state fermentation. Biotechnology, 5: 19–24.

SathyaNarayana Naidu G and Panda T, 1998. Application of response surface methodology to evaluate some aspects on stability of pectolytic enzymes from *Aspergillus niger*. Biochemical Engineering Journal, 2:71-78.

Sharma DC and Satyanarayanan T, 2006. A marked enhancement in the production of a highly alkaline and thermostable pectinase by *Bacillus pumilus* dcsr1 in submerged fermentation by using staticall method. Bioresource Technology 97:727-73.

Sidi A, Cochet N, Ghoes TK and Lebeault JM, 1984. Enzymatic hydrolysis of sugar beet pulp. Biotechnology Letters. 6:723-8.

Sing Jayani R, Saxena S and Guta R, 2005. Microbial pectinolitic enzymes: A review. Process Biochemistry, 40:2931-2944.

Singh SA, Ramakrishna M and Appu Rao AG, 1999. Optimization of downstream processing parameters for the recovery of pectinase from the fermented bran of *Aspergillus carbonarius*. Process Biochemistry. 35: 411-417.

Sozan JVB, Silva, ES, Maia MLS and Teixeiva MFS, 2003. Screening of pectinolytic activity: endopolygalactoronase production by *Peacilomyces clavisporus* 2A.VMIDA.1. Process Biochemistry 39: 455-458.

Spagnuol M, Crecchio C, Pizzigallo MRD and Ruggierro P, 1997. Synergistic effects of celluletic and pectinolytic enzymes in degrading sugar beet pulp. Bioresuorce Technology, 60:215-22.

Taragano V, Sanchez VE and Pilosof AMR, 1997. Combined effect of water activity depression and glucose addition on pectinase and protease production by *Aspergillus niger*. Biotechnology Letters, 19: 233-236.

Tari C, Gogus N and Tokatli F, 2007. Optimization of biomass pellet size and polygalacturonase production by *Aspergillus soaji* ATCC 20235 using response surface methodology. Enzyme Microbial Technology, 40:1108-1116.

Teixeira MFS, Lima Filho JL and Duran N, 2000. Carbone sources effect on pectinase production from. *Aspergillus Japonicus* 586. Brazilian Journal of Microbiology, 31: 286-290.