دوفصلنامهٔ علمی - پژوهشی تحقیقات علوم چوب و کاغذ ایران
جلد ۲۵، شمارهٔ ۲، صفحهٔ ۲۹۰-۲۷۵، (۱۳۸۹)

بررسی تاثیر مواد مغذی و زمان تیمار بر فعالیت‌های آنزیمی قارچ *Phanerochaete chrysosporium*

معراج شرری[۱]، احمد جهان لتیباری*[۲]، غلامرضا رفیعی[۳] و احمد میرشکرایی[٤]

۱- دانشجوی دکتری رشته علوم و صنایع چوب و کاغذ، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران

۲*- نویسنده مسئول، دانشیار، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج پست الکترونیک: Latibari_24@yahoo.com

۳- دانشیار- گروه شیلات و محیط زیست، دانشگاه تهران

٤- استاد- گروه علوم پایه، دانشگاه پیام نور

تاریخ دریافت : مهر ۱۳۸۸ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۸۹

چکیده

در فناوری تخریب‌زیستی تسهیل شده، توسط افزودن مواد مغذی (منابع کربن، نیتروژن، فسفر...)، سوبستراها، گیرنده‌های الکترون و ویتامین‌ها (تیامین، ...)، همراه با افزایش فعالیت‌های متابولیکی، می‌توان ترشح آنزیم‌ها را تحت تاثیر قرار داده و میزان تخریب آلاینده‌ها را افزایش داد. به همین منظور، با استفاده از (V/V) ٪۱ ترکیبات مختلف مواد مغذی شامل نمک‌های معدنی، منابع کربن و نیتروژن (گلوکز، مالت و کازئین پپتون یست اکسترکت) و محرک‌های ترشح آنزیم نظیر وراتریل الکل و تیامین هیدروکلراید اثر این مواد بر فعالیت‌های آنزیم‌های لاکاز، پراکسیداز و زایلاناز ترشح شده توسط قارچ *Phanerochaete chrysosporium* در محیط پساب آماده‌سازی باگاس بررسی شده است. نتایج نشان می‌دهند که MSB+MCTV موثرترین ترکیب افزودنی است که در حداکثر فعالیت لیگنولیتیکی این قارچ (روزهای پنجم تا هفتم تیمار برای آنزیم‌های لاکاز و پراکسیداز و روز سوم برای آنزیم زایلاناز) ترشح این آنزیم‌ها را افزایش می‌دهد. به طوری که مقادیر این آنزیم‌ها به ترتیب تا معادل ۷۸، ۱۹۳ و ٦۰U/l خواهد شد. در حالی که، بدون افزودن مواد مغذی به محیط پساب، این مقادیر در حد ۲٦، ٥٤ و ۱٦ U/l بوده‌اند. رابطه فازهای مختلف رشد قارچ و میزان ترشح آنزیم و همچنین تغییر میزان لیگنین و کربوهیدرات‌های موجود در پساب در طی تیمار ۹ روزه مورد بررسی قرار گرفته است.

واژه‌های کلیدی: مواد مغذی، لاکاز، پراکسیداز، زایلاناز، *Phanerochaete chrysosporium*، پساب آماده‌سازی باگاس، تصفیه زیستی

مقدمه

در سال‌های اخیر، یکی از حوزه‌های مهم که توجه جهانی را به خود معطوف کرده است، کاربرد زیست فناوری[۱] برای حذف آلاینده‌ها توسط میکروارگانیسم‌ها در حالت طبیعی و یا از طریق تغییر ژنتیکی آنها بوده است [Anjaneyulu, Y., Chary 2005]. در این روش که به تخریب‌زیستی[۲] معروف است، از میکروارگانیسم‌هایی نظیر قارچ‌های مولد پوسیدگی سفید[۳] استفاده شده و از طریق تخریب دامنه وسیعی از آلاینده‌ها و تبدیل آنها به ترکیبات بی‌ضرر نظیر دی‌اکسیدکربن، متان، آب، نمک‌های معدنی و زیست‌توده، متابولیت‌هایی با ارزش افزوده زیاد، نظیر پروتئین‌ها و آنزیم‌ها نیز تولید می‌شوند [Lacina, C.,

1 - Biotechnology

2 - Bioremediation

3 - White rot fungus

[Germain, G., Spiros, A. N., 2003]. در فناوری تخریب‌زیستی تسهیل شده، با افزودن مواد مغذی (منابع کربن، نیتروژن، فسفر...)، سوبستراها، گیرنده‌های الکترون و ویتامین‌ها (تیامین، ...)، همراه با افزایش فعالیت‌های متابولیکی، می‌توان ترشح آنزیم‌ها را تحت تاثیر قرار داده و میزان تخریب آلاینده‌ها را افزایش داد [Meysami, P., 2001]. *Phanerochaete chrysosporium* یکی از متداول‌ترین قارچ‌های مورد مطالعه در این زمینه است که با ترشح آنزیم‌هایی نظیر لیگنین پراکسیداز، لاکاز و زایلاناز [Perez, J., Mun, J. Dorado, O., 2002]، قادر به تخریب بیولوژیکی پسماندهای کشاورزی، به خصوص پساب‌های ناشی از صنایع نیشکر می‌باشد. این پساب‌ها حاوی مقادیر زیادی اسید تانیک، ملانوئیدین، قندها و لیگنین هستند و انتظار می‌رود با استفاده از این قارچ و ایجاد شرایط بهینه محیطی، نظیر پتانسیل اکسایش- کاهش و فراهم کردن مواد مغذی، فرایند تخریب‌زیستی به طور موفقیت‌آمیز انجام گیرد [Meysami, P., 2001].

در این تحقیق با افزودن انواع مواد مغذی شامل گلوکز، مالت، کازئین، پپتون، مالت اکستراکت و مجموعه تیامین + هیدروکلراید + وراتریل الکل، به محیط پساب آماده‌سازی باگاس و ملحوظ کردن سایر فاکتورهای محیطی به عنوان عوامل ثابت، کارایی تخریب‌زیستی در کاهش کربوهیدرات‌ها و لیگنین پساب و سطح فعالیت آنزیم‌های لیگنولیتیک بررسی شده است.

مواد و روشها

پساب

پساب بخش ذخیره‌سازی تر یا شستشوی باگاس کارخانه کاغذسازی پارس در هفت‌تپه خوزستان، به عنوان محیط فعالیت لیگنولیتیکی قارچ مورد استفاده قرار گرفته است. در مرحله ذخیره‌سازی تر باگاس، انتقال آن به توده ذخیره‌سازی، توسط سوسپانسیونی با میزان خشکی ۲ درصد انجام گرفته و توده به طور پیوسته آب پاشی می‌شود. آب در جریان، موسوم به بیولیکور[1]، حاوی ۲ تا ٪۳ از مواد محلول باگاس و قندهای آزاد بوده و رنگ قهوه‌ای مایل به سبز تیره به همراه بوی بسیار بد است. میزان BOD_5[2]، COD[3] و TDS[4] این پساب به ترتیب ۲۷۸۰، ۵۸۶۰ و ۳۹۰۰ میلی‌گرم در لیتر، pH آن بین ۵/۱ تا ۵/۳ و میزان رنگ آن (mg/l PtCo) ۵۶۰ است. نمونه‌برداری از این پساب با استفاده از یک ظرف پلاستیکی از عمقی بین کف و سطح استخر و به میزان ۴۰ لیتر انجام شد و برای جلوگیری از تغییر خواص پساب، در ظروف سربسته در دمای زیر $4^{o}C$ به آزمایشگاه EFPG[5] کشور فرانسه انتقال یافته و تا انجام آزمایش تحت شرایط مذکور نگهداری شد [Bocchini, D. A. , 2005].

میکروارگانیسم

کشت خالص قارچ پوسیدگی سفید *Phanerochaete chrysosporium* که از مرکز کلکسیون قارچی دانشکده بیولوژی دانشگاه*INPG* [6] فرانسه تهیه شده بود، به کار گرفته شد.

روشها

نحوه تهیه زیست‌توده

از کشت‌های ۱۰ روزه رشد یافته بر روی پلیت‌های

1- Bioliquor
2 - Biological Oxygen Demand
3 - Chemical Oxygen Demand
4 - Total Dissolved Solids
5 - Ecole Francaise de Papeterie et des Industries Graphiques
6 - Institute National Polytechnique de Grenoble

مالت اکستراکت آگار برای مایه‌کوبی محیط کشت مایع استفاده شد. بر اساس آزمایش‌های اولیه، محیط MSB-MCTV به عنوان محیط کشت مایع در نظر گرفته شد. ۱۰۰ml از آن در ارلن مایرهای با حجم ۲۵۰ml ریخته شده و مایه‌کوبی در شرایط استریل صورت گرفت. ارلن‌های دربسته همراه با گاز استریل، در حالت ایستا داخل انکوباتور در دمای ۳۰°C به مدت ۵ روز نگهداری شد تا توده نمدی میسلیوم بر سطح مایع تشکیل شود. توده حاصل پس از جمع‌آوری به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰rpm سانتریفیوژ شده و سپس ۲ بار با آب مقطر شسته شد. آنگاه با استفاده از مخلوط کن، به مدت ۱۰ ثانیه با سرعت کم به شکل سوسپانسیون همگن درآمد و در فرآوری پساب مورد استفاده قرار گرفت [Cho, N.S., Kim, D. H., Cho, H. Y., Ohga, S. & Leonowicz, A., 2006].

اندازه‌گیری میزان زیست‌توده

برای تعیین میزان زیست‌توده، حجم معینی از سوسپانسیون حاوی میسلیوم را ابتدا به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰rpm سانتریفیوژ کرده و سپس بخش جامد را جدا کرده، شستشو داده و با کاغذ فیلتر خشک از پیش وزن شده با تخلخل ۰/۴۵μm صاف شده است. آنگاه کاغذ صافی حاوی زیست‌توده را در اتوکلاوی با دمای ۷۰°C تا رسیدن به وزن ثابت خشک نموده و میزان زیست‌توده بر مبنای میلی‌گرم بر لیتر تعیین شد [Radha, K. L., Regupathi, I., 2005].

اندازه‌گیری کربوهیدرات‌ها

برای آنالیز کربوهیدرات‌ها از کروماتوگرافی تبادل یونی با کارایی بالا[1] (DX 500–Dionex) به همراه ردیاب (آشکارساز) تپشی آمپرومتری استفاده شد. اساس کروماتوگرافی یونی، انجام اکسایش ـ احیا توسط الکترودهای فعال طلا و الکترودهای مرجع Ag/AgCl است. ۹۸٪ آب دیونیزه شده به همراه ۲٪ NaOH (۲۰۰mM) به عنوان فاز حامل و با سرعت جریان ۱ ml/min استفاده شد و سیستم در دمای ۳۰°C به کار گرفته شد. برای اندازه‌گیری کربوهیدرات‌های پلیمری و الیگومری پساب (قندها و همی‌سلولزها)، ۱۰mg از ماده خشک پساب را با ۱۸۰μl اسید سولفوریک ۷۲٪ هیدرولیز کرده و از محلول قند فوکوز[2] به عنوان استاندارد داخلی استفاده شد و در نهایت مخلوط را با صافی ۰/۴۵μm صاف کرده و عمل تزریق انجام شد [Colombo, R., ,2006].

اندازه‌گیری لیگنین

برای اندازه‌گیری لیگنین پساب، لیگنین نامحلول در اسید سولفوریک ۷۲٪ به روش وزنی و لیگنین حل‌شده در اسید به روش طیف سنجی (UNICAM UV 500) تعیین شد. پس از هیدرولیز مواد جامد پساب توسط اسید سولفوریک ۷۲٪، نمونه را با آب مقطر تا غلظت اسید سولفوریک ۳٪ رقیق کرده و پس از ٤ ساعت جوشاندن و پس از آن یک روز، بدون همزدن، آن را صاف کرده و برای اندازه‌گیری لیگنین نامحلول، کاغذ صافی همراه مواد روی آن، در اتو الکتریکی با دمای ۱۰۳ ± ۲ °C قرار داده شد. میزان جذب با اشعه فرابنفش در طول موج ۲۰۵ nm در محلول حاصل از صافی، نشان دهنده لیگنین حل شده در اسید می‌باشد. لیگنین موجود در نمونه توسط رابطه

1 - Ion Exchange High Performance Liquid Chromatography
2 - Fucose

زیر قابل محاسبه است [official test method, 1983] :

$$L = L_{ns} + L_s$$

$$L_{ns} = \frac{M}{W} \times 100$$

$$L_s = \frac{A \times D \times V}{W \times ۱۱۰ \times ۱۰۰۰} \times ۱۰۰$$

L: درصد لیگنین، L_{ns}: درصد لیگنین نامحلول، Ls: درصد لیگنین حل‌شده، M: وزن لیگنین روی صافی (g)، W: وزن ماده خشک نمونه(g)، A: جذب، D: ضریب رقیق‌سازی،V:حجم محلول صاف شده (ml) .

اندازه‌گیری آنزیم‌ها

آنزیم لاکاز

یک واحد آنزیم لاکاز با حضور سرینگالدازین[1] (سوبسترا) در محیط، قادر به ایجاد جذبی معادل ۰/۰۰۱ در دقیقه در طول موج ۵۳۰nm ، pH =٦/٥ و دمای ۳۰°C در ۳ ml مخلوط واکنش است. مبنای سنجش ، میزان تغییرات جذب ناشی از اثر آنزیم لاکاز بر سوبسترای مورد نظر در شرایط مذکور در محدوده مورد بررسی خطی می‌باشد و از رابطه ذیل قابل محاسبه است [Ride, J.P., 1980].

آنزیم لاکاز، طول موج ۵۳۰nm، pH =٦/٥ و دما ۳۰°C

سرینگالدازین + O_2 ⟶ سرینگالدازین اکسید شده + ۲H_2O

$$\text{آنزیم لاکاز (U/ml)} = \frac{(\Delta A_{530nm}/\text{min آزمون} - \Delta A_{530}/\text{min شاهد}) \times (df)}{(۰/۰۰۱) \times (۰/۵)}$$

df: ضریب رقیق‌سازی، ۰/۰۰۱: تغییر جذب در هر دقیقه به ازای هر واحد لاکاز (طول موج ۵۳۰nm، pH =٦/٥ ، دمای ۳۰°c و ۳ml مخلوط واکنشی) و ۰/۵: حجم آنزیم، پساب یا آب یون‌زدایی شده (ml).

آنزیم پراکسیداز

یک واحد آنزیم پراکسیداز، قادر به تشکیل ۱ ml پورپوروگالین از پیروگالول[1] در۲۰ ثانیه، با pH =٦ و دمای ۲۰°C است. مبنای سنجش، میزان تغییرات جذب ناشی از اثر آنزیم پراکسیداز بر سوبسترای مورد نظر در شرایط فوق می‌باشد که تغییرات آن در محدوده مورد بررسی خطی است و از رابطه ذیل قابل محاسبه است.

آنزیم زایلاناز

یک واحد آنزیم زایلاناز، قادر به آزادسازی ۱µm زایلوز از زایلان در هر دقیقه در دمای ۳۰°c و pH= ٤/٥ می‌باشد. مبنای سنجش، تغییرات جذب ناشی از قند زایلوز آزاد شده در محیط، در شرایط فوق می‌باشد و از رابطه ذیل قابل محاسبه است [Chen, W. P., Matsuo, M., & Yasui, T., 1986].

1- Syringaldazine

آنزیم پراکسیداز، طول موج ٤٢٠nm ، pH= ٦ و دمای ٢٠°C

H_2O_2+ پیروگالول ⟶ $2H_2O$ + پورپوروگالین[1]

$$\text{آنزیم پراکسیداز (U/ml)} = \frac{(\Delta A_{420nm}/20\ S\ \text{آزمون} - \Delta A_{420nm}/20\ S\ \text{شاهد}) \times (3) \times (df)}{(12) \times (0/1)}$$

df:ضریب رقیق سازی، s: ثانیه، ۳: حجم (ml) کل مخلوط، ۱۲: ضریب تخریب mg/ml ۱ پورپوروگالین در طول موج ٤٢٠nm و ۰/۱: حجم آنزیم(ml)، پساب یا بافر فسفات پتاسیم [Chance, B. & Maehly, A. C., 1955].

آنزیم زایلاناز ، طول موج ٥٤٠nm ، pH= ٤/٥ و دمای ٣٠°C

زایلان + H_2O ⟶ قندهای احیا شده (زایلوز)

$$\text{آنزیم زایلاناز (U/ml)} = \frac{(\text{زایلوز آزاد شده}) \times (df)}{(10) \times (0/1)}$$

df: ضریب رقیق‌سازی،۱۰: زمان سنجش واحد آنزیم (دقیقه)، ۰/۱: حجم آنزیم، پساب یا رقیق کننده

شرایط تیمارها

اثر زمان تیمار و انواع مواد مغذی حاوی منابع کربنی، نیتروژنی و برخی افزودنی‌های محرک رشد، به عنوان متغیر و فاکتورهایی نظیر دور شیکر(۱۸۰rpm)، دما (۳۵0C)، pH=٦ و میزان زیست‌توده (۵۵۲mg/l) به عنوان فاکتورهای ثابت در نظر قرار گرفتند. تیمارهای حاصل از تغییر مواد مغذی، مطابق جدول ۱ است و تیمارهای ناشی از تغییر زمان به صورت D0, D۲، D۳ D، ۵ D، ۷ D، ۹ انتخاب شده‌اند که از اثر متقابل آنها، ۳٦ تیمار حاصل شده است. آزمایش هر تیمار، در ۳ تکرار انجام گرفته است.

محیط‌های کشت مایع و محلول مغذی را پس از عبور از صافی ۱/۵µm، به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲٤0C–۱۲۱ استریل کرده و سپس آنتی‌بیوتیک کلورام فنیکول۱ به میزان ۰/۱ تا ۰/۲ g/l به آن افزوده شده و در محیط پساب، به میزان (V/V) ٪۱ استفاده شد تا تاثیر نوع مواد مغذی افزودنی بر فعالیت لیگنولیتیکی قارچ مورد نظر درمحیط پساب مشخص گردد.

1- Pyrogallol
2 -Purpurogallin

جدول۱- تیمارهای مربوط به انواع مواد مغذی

تیمارهای مواد مغذی	علامت اختصاری	نمک‌های معدنی (MSB*)[۲]	ترکیبات مغذی: منبع کربن (g/l)		منبع نیتروژن (g/l)	منابع انرژی و محرک ترشح آنزیم (mM)	
			گلوکز (G)	مالت (M)	کازئین پپتون یست اکستراکت[۳] (C)	تیامین هیدروکلراید (T)	+ وراتریل الکل (V)
۱	بدون مواد غذایی (Bio)	-	-	-	-	-	
۲	MSB	+	-	-	-	-	
۳	MSB+G	+	+	-	-	-	
٤	MSB+M	+	-	+	-	-	
٥	MSB+GCTV	+	+	-	+	+	
٦	MSB+MCTV	+	-	+	+	+	
	مقدار		۱۰	۱۰	۵	۰/۰۱	+ ۰/٤

* $MgSO_4.\ 7H_2O$ (۰/۵)، NH_4Cl (۰/۱)، K_2HPO_4(۰/۵)، $FeSO_4.\ 7H_2O$ (۰/۰۵)، $CaCl_2.\ 2H_2O$ (۰/۱)، KH_2PO_4 (۲ g/l)

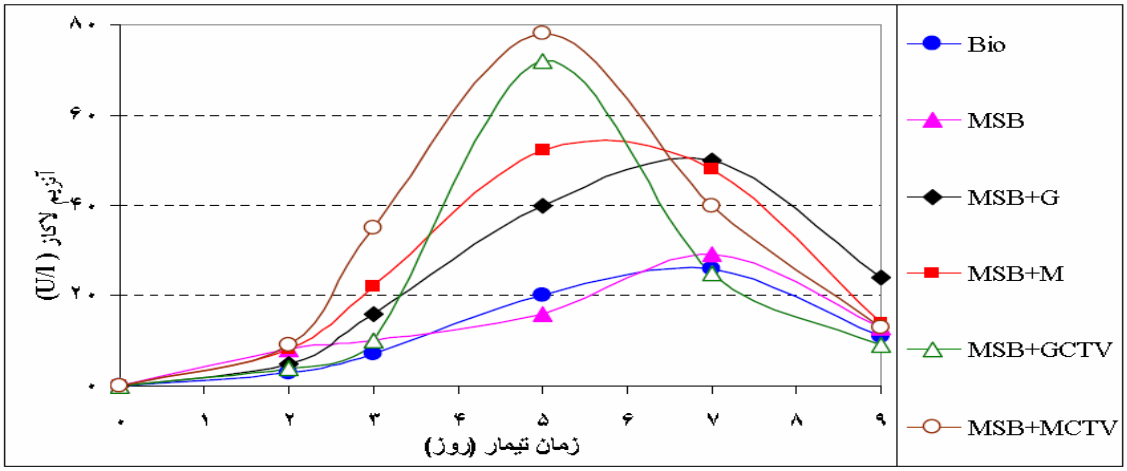
تحلیل آماری

آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی (RCBD)[۱] انجام شده و اثر متغیرها توسط تجزیه واریانس بررسی شد. اثر شرایط مختلف هر تیمار بر میزان ترشح آنزیم‌ها و تاثیر هر تیمار بر میزان ترشح آنزیم به عنوان بلوک در نظر گرفته شده است. پس از تجزیه واریانس، در صورت معنی‌دار بودن اثرات تیمار، مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون دانکن و به کمک نرم افزار SPSS انجام شد.

نتایج

اثر مواد مغذی و زمان تیمار بر ترشح آنزیم لاکاز: Cho و همکاران (۲۰۰٦) و Asamudo و همکاران (۲۰۰۵) معتقدند که معمولا" قارچ‌ها مقادیر کمی لاکاز تولید می‌کنند ولی با افزودن مکمل‌های غذایی، غلظت آن را می‌توان افزایش داد [۳و۷]. در این بررسی نیز، تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر انواع مواد مغذی بر ترشح لاکاز معنی‌دار است و نتایج گروه‌بندی دانکن ۵ گروه مجزا را نشان داده است که به جز تیمار بدون مواد غذایی (Bio) و MSB، بقیه تیمارها در گروه‌های جداگانه قرار گرفتند. یکی از دلایلی که این دو تیمار در یک گروه قرار گرفتند، وجود گلوکز و سایر قندهای همی‌سلولزها در محیط پساب است که به قارچ کمک می‌کند تا در صورت عدم استفاده از نمک‌های معدنی، بتواند فاز اولیه رشد را طی کند و نتایجی تقریباً مشابه آنچه در تیمار MSB رخ داد، به دست آید. البته عنوان این نکته نیز ضروری است که میزان لاکاز ترشح شده توسط هر دو تیمار اندک می‌باشد (شکل ۱).

1- Chloramphenicol
2 - Mineral salt broth
3 - Casein peptone yeast extract



شکل ۱- اثر انواع مواد مغذی و زمان تیمار بر ترشح آنزیم لاکاز

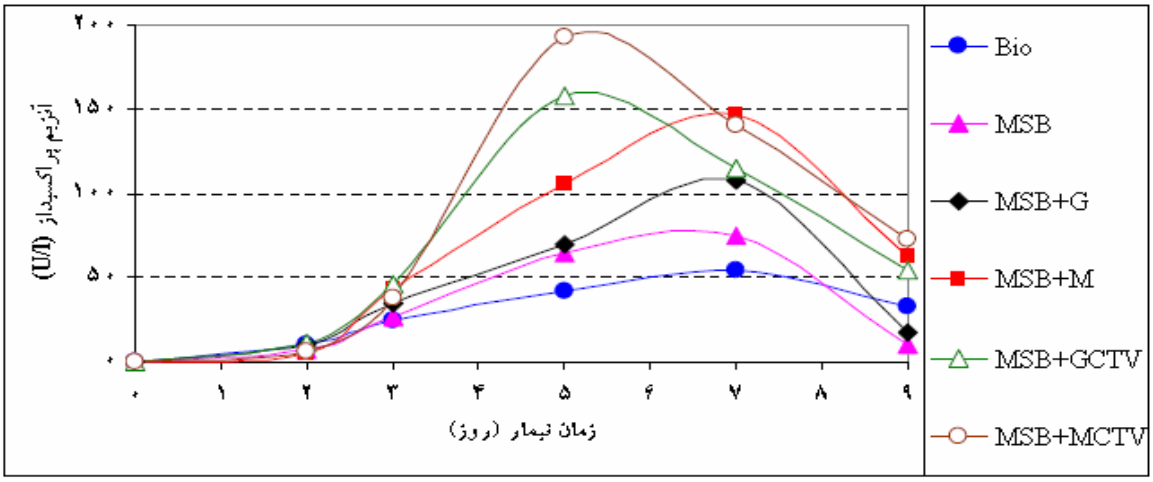
میانگین تولید آنزیم لاکاز در روزهای مختلف تیمار تفاوت معنی‌داری داشته و نتایج گروه‌بندی دانکن، ٤ گروه مجزا را نشان می دهد. از آنجا که قارچ در روزهای اول و دوم تیمار در فاز اولیه متابولیسم خود قرار دارد، بنابراین فعالیت‌های متابولیکی آن در حداقل مقدار بوده و به همین جهت میزان آنزیم لاکاز در روزهای اول و دوم تیمار در یک گروه قرار گرفتند. گروه دوم مربوط به روزهای ۳ و ۹ تیمار است که روز سوم، شروع فاز ثانویه و روز ۹ به نوعی پایان این فاز می‌باشد. بنابراین یکی نقطه اوج‌گیری و دیگری نقطه افول ترشح این آنزیم است و در نهایت تیمارهای روزهای ۵ و ۷ نیز در گروه جداگانه قرار گرفتند. نکته حائز اهمیت، انتقال نقطه حداکثر (اوج) فعالیت این آنزیم به جای روز هفتم تیمار در روز پنجم بوده است که علت آن می‌تواند استفاده از وراتریل الکل و تیامین باشد. حداکثر فعالیت این آنزیم به میزان ۷۸ U/l در روز پنجم تیمار با استفاده از ترکیب MSB+MCTV به دست آمد (شکل ۱).

اثر مواد مغذی و زمان تیمار بر ترشح آنزیم پراکسیداز: تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر انواع مواد مغذی بر میزان ترشح آنزیم پراکسیداز معنی‌دار است و نتایج گروه‌بندی دانکن، ٦ گروه مجزا را برای ٦ تیمار غذایی نشان داد. کمترین تاثیر مربوط به تیمار بدون ماده غذایی (Bio) بود. موید این مساله نظر Kunz و همکاران (۲۰۰۱) است که معتقدند، کم بودن سطح فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، مربوط به مواردی است که مواد مغذی به محیط پساب افزوده نشده باشد. زیرا توده قارچ، فاز اولیه رشد را به خوبی طی نکرده و تکثیر به میزان کافی اتفاق نیفتاده و در نتیجه جذب و تخریب آلاینده‌ها نیز در حد لازم اتفاق نمی‌افتد. نمونه‌های MSB، MSB+G و MSB+M حاوی حداقل نمک‌های معدنی، قند گلوکز یا مالت بودند. بنابراین در فاز اولیه رشد با نمونه‌های MSB+GCTV و MSB+MCTV دارای عملکرد تقریباً یکسانی بودند. ولی تا حدی وجود منابع نیتروژنی و مهمتر از آن، افزودن منابع انرژی و تحریک کننده‌های تولید آنزیم، نظیر تیامین و وراتریل الکل در نمونه‌های اخیر، عامل کمکی برای تحریک ترشح آنزیم‌های لیگنولیتیک و در نتیجه تسریع تخریب آلاینده‌ها در فاز دوم رشد قارچ هستند.

1- Randomized Complete Block Desigen

تاثیر زمان تیمارها بر میزان ترشح این آنزیم معنی‌دار بوده و گروه‌بندی دانکن، ۳ گروه مجزا را نشان داد. به طوری که آنزیم حاصل از تیمار روز اول و روز دوم در یک گروه قرار داشتند. دلیل آن، فاز اولیه رشد قارچ است که فعالیت آنزیمی قارچ در آن در حداقل مقدار خود قرار دارد. به طریقی مشابه با آنزیم لاکاز، در اینجا هم وضعیت ترشح آنزیم در روزهای ۳ و ۹ در یک گروه قرار دارند. ولی برخلاف لاکاز، سیر نزولی ترشح آنزیم پراکسیداز در اواخر فاز ثانویه، شدید نبوده و از این‌رو میزان ترشح این آنزیم در روزهای ۵ و ۷ تیمار از نظر گروه‌بندی دانکن در یک گروه قرار گرفته و دارای شرایط مناسبی بودند. دلیل آن را باید در حداقل بودن کربن و نیتروژن محیط جستجو کرد [Meysami, P., 2001 و Sheldon, M.S., 2007].

در مجموع، بهترین تیمار از نظر مواد مغذی و زمان، در القای ترشح آنزیم پراکسیداز، تیمار با ماده مغذی MSB+MCTV در روز پنجم با ۱۹۲/۵ U/l و ضعیف‌ترین آنها، تیمار بدون ماده مغذی و در روز هفتم (در بهترین حالت) معادل ٥٤U/l است (شکل ۲).

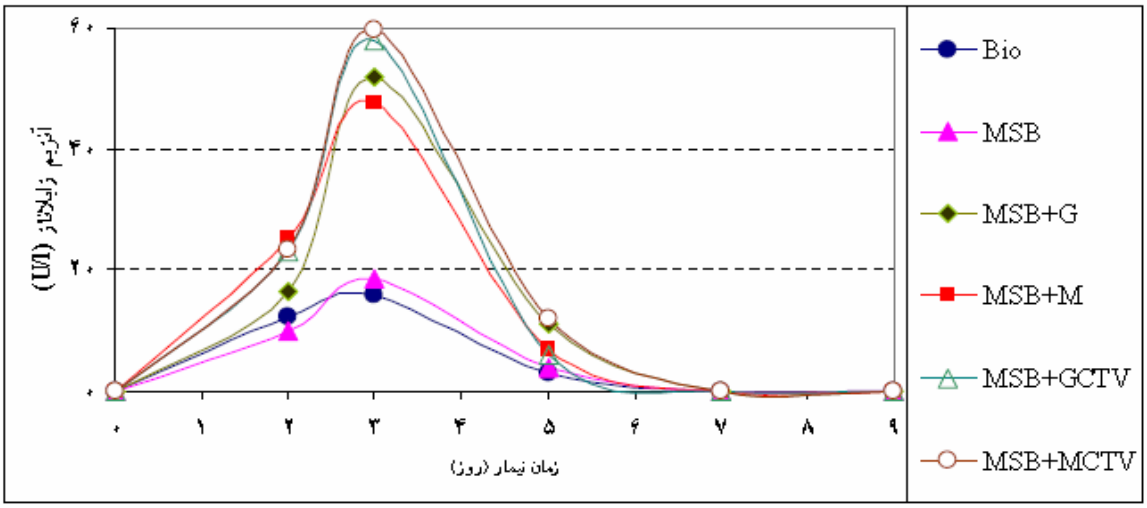


شکل۲- اثر انواع مواد مغذی و زمان تیمار بر ترشح آنزیم پراکسیداز

اثر مواد مغذی و زمان در القای ترشح آنزیم زایلاناز

بخش مهمی از همی‌سلولزهای دیواره سلولی از زایلان‌ها تشکیل شده‌اند که مولکولی ناهمگن دارند. در بین تمام آنزیم‌های همی‌سلولاز، زایلاناز بیشترین تحقیقات را به خود اختصاص داده و *P.chrysosporium* نشان داده است که توانایی تولید انواع اندوزایلانازها را دارد [Gomes, E. F., & Silva, A. & El-Said., 2001 و R. D., 2005]. تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر انواع مواد مغذی بر میزان ترشح آنزیم زایلاناز معنی‌دار بوده و نتایج آزمون دانکن، ۵ گروه مجزا را نشان داد. بجز تیمارهای ۳ و ۵ (MSB+G و MSB+GCTV) بقیه تیمارهای مرتبط با مواد مغذی در گروه‌های جداگانه قرار گرفتند. هم‌گروهی این دو تیمار حاکی از آن است که منابع نیتروژن و محرک‌هایی نظیر وراتریل الکل و تیامین نقش کمتری در القای ترشح آنزیم زایلاناز دارند. از آنجا که تجزیه سلولز و همی‌سلولز، فرآیند اصلی متابولیسم اولیه این قارچ را تشکیل می‌دهند، بنابراین ترشح آنزیم زایلاناز در فاز اولیه رشد قارچ منطقی به نظر می‌رسد. اوج

فعالیت این آنزیم روز سوم فرآوری است که بعد از آن از شدت فعالیت این آنزیم کاسته می‌شود. دلیل آن به حداقل رسیدن مقدار زایلوز در محیط پساب است. تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر زمان تیمار بر ترشح این آنزیم معنی‌دار بوده و گروه‌بندی دانکن، ٤ گروه زمانی را نشان داد. تیمار زمانی روز اول، هفتم و نهم با حداقل مقدار آنزیم در یک گروه قرار داشته است. روز اول مربوط به فاز اول متابولیسم بوده و از این نظر کم بودن میزان آنزیم زایلاناز در آن منطقی است. در مورد روزهای ۷ و ۹ همان طوری که اشاره شد به دلیل حضور اندک زایلوز در محیط پساب، ترشح این آنزیم هم پس از مقدار حداکثر در روز سوم، سیر شدید نزولی دارد. موثرترین ماده مغذی بر زایلاناز، MSB+GCTV در روز سوم، معادل ۵۹/۷ U/l و ضعیف‌ترین آن، تیمار بدون ماده مغذی در روز سوم (در بهترین حالت) معادل ١٦U/l است (شکل ۳).



شکل۳: اثر انواع مواد مغذی و زمان تیمار بر ترشح آنزیم زایلاناز

رابطه تغییر در قندها و لیگنین پساب با فعالیت آنزیم‌ها: مطالعات نشان داده است که لاکاز فقط در مراحل اولیه تخریب لیگنین موثر است و پراکسیدازها بعداً وارد عمل می‌شوند. به علاوه شروع فاز ثانویه رشد قارچ همراه با ترشح آنزیم‌های لاکاز و پراکسیداز و آغاز تخریب لیگنین است (شکل۵). لاکازها و همه پراکسیدازهای برون سلولی، توانایی کاتالیز اکسایش و تشکیل رادیکال‌ها را داشته و در نتیجه آن، واکنش‌های خود انگیخته زیادی شکل گرفته و عمل گسستن حلقه‌های آروماتیک اتفاق می‌افتد [Turpeinen, B. K., 2007].

Wu و همکاران (۲۰۰۵) طی تحقیقی با استفاده از قارچ *P.chrysosporium* بیش از ٪۷۱ از لیگنین پساب مایع پخت سیاه خمیرکاغذ را در طی۷ روز حذف کردند. حذف لیگنین تا روز چهارم با سرعت بیشتری (٪۴۳) اتفاق افتاد، ولی با گذشت زمان سرعت تخریب کم شد. به طوری که تا ۷ روز میزان آن به ٪٦١ رسید. نتایج نشان داد که با گذشت زمان تخریب لیگنین با سرعت کمتری انجام می‌شود که دلیل احتمالی آن، اتولیز سلولی یا کاهش میزان گلوکز در محیط می‌باشد [Wu, J., Xiao, Y. & Yu, H., 2005].

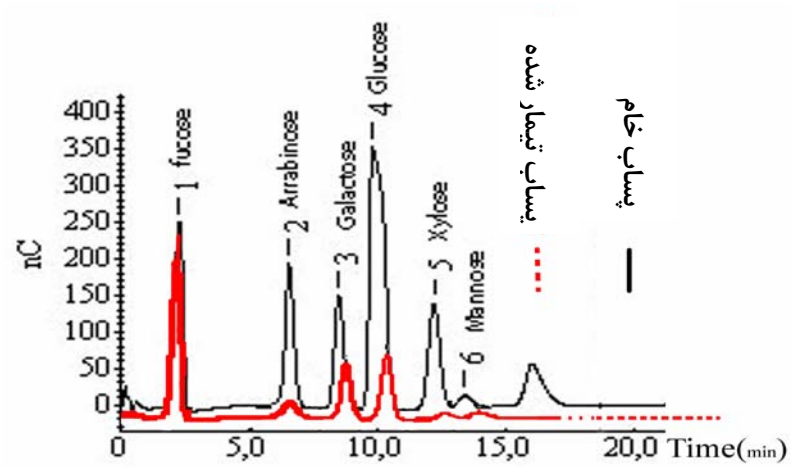
بررسی نتایج حاصل از اندازه‌گیری کربوهیدرات‌ها توسط کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) و اندازه‌گیری لیگنین نشان داد که مقدار کلیه کربوهیدرات‌ها و لیگنین پس از انجام فرآوری قارچی، کاهش محسوس داشته است (جدول ۲ و شکل ٤).

تخریب لیگنین در اوایل دوره (بعد از فاز اول رشد) سریع و با گذشت زمان با سرعت کمتری انجام می‌شود که احتمالاً دلیل آن، اتولیز سلولی یا کاهش میزان گلوکز در محیط می‌باشد. البته اخیراً رابطه موقتی نیز بین کاهش فعالیت لیگنین پراکسیداز و افزایش فعالیت پروتئازهای برون سلولی در مراحل پایانی مرحله دوم رشد (٦ تا ۱۱ روز) پیدا شده است [Dahiya, J., Singh, D. & Nigam, P., 2001 و Wu, J., Xiao, Y. & Yu, H., 2005].

جدول۲- میانگین مقدار ترکیبات موجود در پساب شستشو و آماده سازی باگاس، قبل و پس از تیمار*

	ترکیبات (mg/l)					
	لیگنین	گلوکز	آرابینوز	زایلوز	گالاکتوز	مانوز
قبل از تیمار	۹۹٤/۹٦	۳٤۱/۲	۱۰۰/۵۵	۷۸/۸٦	۷۵/۲٤	۲۰/۷۹
*پس از تیمار	۷/۹۹	۲/۹۵	۳/۳۵	۱/۷۲	٤/۷۹	۱/۷٦

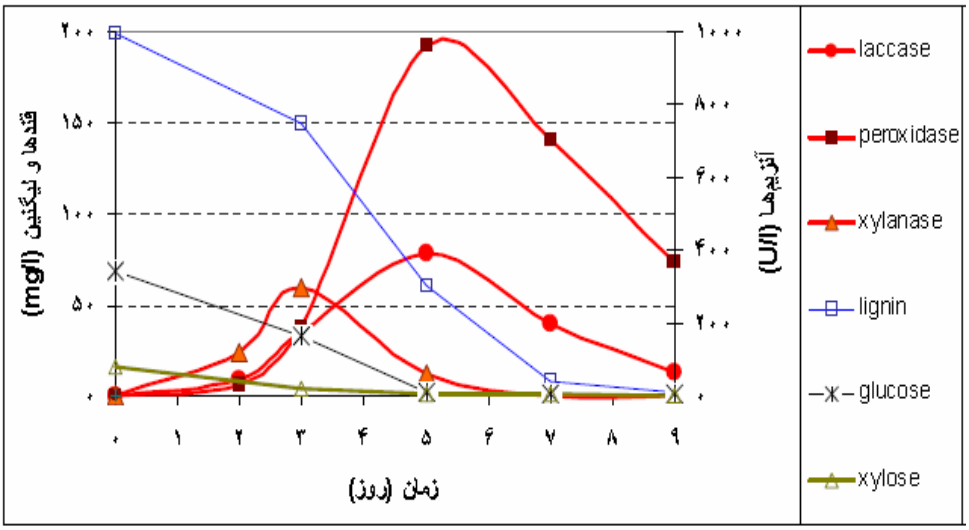
* شرایط تیمار: زمان ۹ روز، زیست‌توده ۵۵۲mg/l، دمای ۳۵°C، pH =٦ و (V/V) ۱٪ از ماده غذایی MSB-MCTV



شکل ٤- مقایسه تغییرات کربوهیدرات‌ها در پساب خام و فرآوری شده

[۹ روز، زیست‌توده ۵۵۲mg/l، دمای ۳۵°C، pH =٦ و (V/V) ۱٪ ماده غذایی MSB-MCTV]

[۱- فوکوز ۲- آرابینوز ۳- گالاکتوز ٤- گلوکز ۵- زایلوز ٦- مانوز]



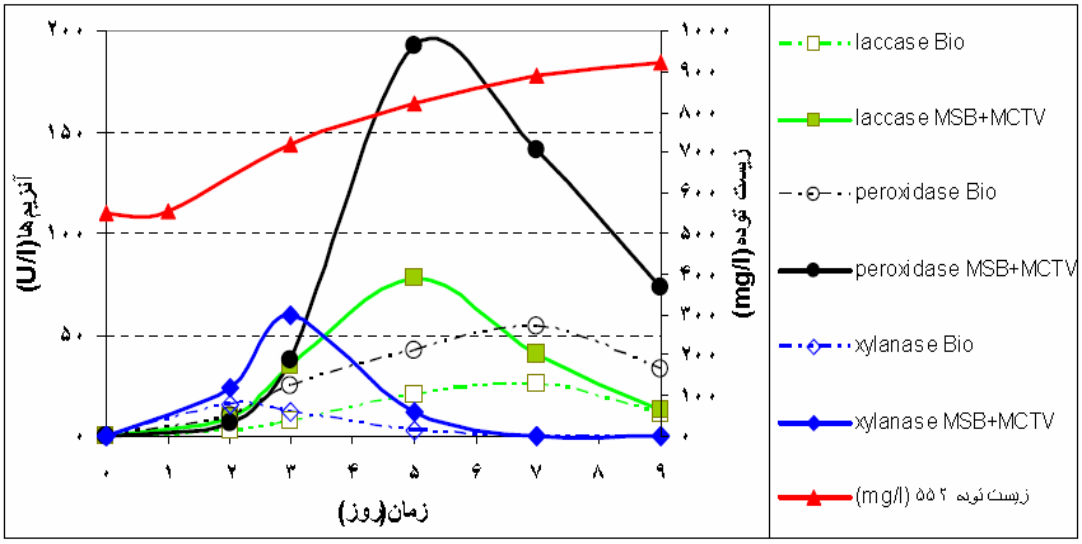
شکل۵ : روند تغییر مقدار آنزیم‌های لاکاز، پراکسیداز و زایلاناز به همراه تغییرات لیگنین، گلوکز و زایلوز

[pH =٦ ، زیست‌توده ۵۵۲ mg/l، دما ۳۵ ^{0}C و (V/V) ۱٪ ماده غذایی MSB-MCTV]

رابطه تغییر در آنزیم‌ها با فازهای مختلف رشد قارچ:

اگر قارچی را در یک محیط مایع مناسب کشت دهیم، در فاز اول، رشد آن کند است (زمان تاخیر[1]). رشد اولیه زمانی متوقف می‌شود که نیتروژن محیط تقلیل یافته و بعد از دوره تاخیر، فعالیت لیگنولیتیکی بروز می‌کند. دوره جدید، معروف به فاز ثانویه[2] است که سرعت رشد در آن رو به افزایش می‌گذارد تا به حداکثر خود برسد. تخریب لیگنین متعلق به دوره متابولیسم ثانویه می‌باشد که همزمان با تولید وراتریل الکل، وراتریل گلیسرول و حضور نیتروژن اندک در محیط کشت می‌باشد. در بررسی روند تغییرات آنزیم‌های لاکاز و پراکسیداز، نکته حائز اهمیت، تقارن زمانی پایان فاز اولیه رشد قارچ و شروع ترشح این آنزیم‌ها می‌باشد. بعد از مدتی دوباره سرعت رشد به تدریج کاهش یافته و متوقف می‌شود (شکل ٦) زیرا احتمال دارد در اثر مصرف مواد غذایی و در نتیجه اتمام ترکیبات مورد نیاز و یا در اثر افزایش مواد زاید (در نتیجه اعمال متابولیکی قارچ در محیط کشت) رشد متوقف شود. در یک محیط کشت، بعد از مدتی ممکن است وزن خشک میسلیوم قارچ شروع به کاهش نماید و این بدان سبب است که در اثر اتولیزه شدن رشته‌های ریسه قارچ، محتویات آن شروع به خارج شدن می‌نماید و در نتیجه وزن میسلیوم کاهش پیدا می‌کند [Jeffries, T. W., Choi, S. 1981 و Radha, K. L., Regupathi, I., 2005].

1- Lag Time
2- Log Time



شکل٦: مقایسه تغییرات آنزیم‌های لاکاز، پراکسیداز و زایلاناز و زیست توده در محیط پساب

در دو حالت فرآوری بدون مواد مغذی (Bio) و ماده مغذی MSB+MCTV

[pH =٦ ، زیست‌توده ۵۵۲ mg/l و دما ^{0}C ۳۵]

بحث

Kumar و همکاران (۱۹۹۸) دریافتند که پساب ملاس نیشکر، حاوی مقادیر زیادی قند است. ولی به دلیل در دسترس نبودن این قندها، فعالیت تخریب‌زیستی قارچ *P.chrysosporium* منوط به افزودن کربوهیدرات‌هایی نظیر گلوکز و ساکارز ۳٪(w/v) می‌باشد. به‌علاوه در صورت عدم وجود منبع کربن حتی در حضور منابع نیتروژن و نمک‌های معدنی، کارایی تخریب لیگنین کم می‌شود [Wu, J., Xiao, Y. & Yu, H., 2005]. علاوه بر وجود منبع کربنی و مواد دیگری نظیر منابع نیتروژنی، نمک‌های معدنی، مواد مغذی خاص، به مقداری اکسیژن مناسب و وراتریل الکل، نیز نیاز است [Kanaly, R. A., Hur, H., 2006]. وجود مواد معدنی عاملی برای کاهش لیگنین پساب است. زیرا بیشتر انرژی لازم برای رشد میکروارگانیسم‌ها در حین انتقال الکترون‌ها از سوبستراهای آلی به گیرنده‌های معدنی آن‌ها تامین می‌شود [Meysami, P., 2001].

نتایج تحقیقات Kirk و Cullen (۱۹۹۸) نشان داده است که پارامترهای محیط کشت بر تخریب موثر لیگنین با وجود ساده بودن، تعیین کننده است. محیط کشت باید حاوی مواد معدنی، تیامین، سوبستراهای رشد و مقدار محدودی از نیتروژن باشد. زیرا لیگنین به تنهایی باعث رشد میکروارگانیسم‌ها نمی‌شود. سیستم لیگنولیتیکی قارچ *P.chrysosporium* در غیاب لیگنین و در صورت کمبود نیتروژن در محیط فعال شده و برای تخریب لیگنین، الزاما"به سوبسترای مکمل رشد نیاز دارد.

نتایج این بررسی نشان داد که بهترین ماده غذایی برای فرآوری پساب شستشوی باگاس(V/V) ۱٪ از MSB-MCTV (با استفاده از ۵۵۲ mg/l توده قارچ *P.chrysosporium* ، pH =٦ ، دمای ^{0}C ۳۵) می‌باشد. در این شرایط میزان آنزیم‌های لاکاز، پراکسدازها و زایلاناز به ترتیب ۷۸، ۱۹۳ و ٦۰U/l خواهند بود.

در بررسی کارایی ترکیبات مختلف در فرآیند متابولیکی قارچ، کمترین تاثیر مربوط به تیمار بدون ماده

غـذایی (Bio) و مـوثرترین آنهـا، MSB+MCTV اسـت. نمونـه‌هـای MSB، MSB+G و MSB+M دارای حـداقل نمک‌های معدنی، قند گلوکز یا مالت بودند که در فاز اولیه رشـد بـا نمونـه‌هـای MSB+GCTV و MSB+MCTV عملکرد تقریبا" یکسانی داشتند. ولی تـا حـدودی وجـود منابع نیتروژنـی و مهـم‌تـر از آن، افـزودن منـابع انـرژی و تحریک کننده‌های تولید آنـزیم، نظیـر تیـامین و وراتریـل الکل در نمونه‌های اخیر، عامل کمکی برای تحریک ترشح آنزیم‌های لیگنولیتیک و در نتیجه تسریع تخریب آلاینده‌ها در فاز دوم رشد قارچ هستند. Kunz و همکـاران (۲۰۰۱) و Asamudo و همکـاران (۲۰۰۵) معتقدنـد کـه افـزودن وراتریل الکل نقش مهمی در القـای تولیـد آنـزیم لیگنـین پراکسیداز دارد. این الکل، محصول متابولیت ثانویـه قـارچ بوده و از طریق جلوگیری از تغییـر ماهیـت آنـزیم، نقـش مهمی در چرخه کاتالیزوری آن دارد. به خصوص در مورد لاکاز و پراکسیداز، باعث تسریع در رسیدن به اوج فعالیت آنزیمی می‌شود.

نتایج تاثیر زمان تیمارها بر میزان ترشح ایـن آنـزیم‌هـا نشان داد که آنزیم حاصل از تیمار روز اول و روز دوم در یک گروه قرار داشتند. دلیل آن فاز اولیه رشد قارچ اسـت که فعالیت آنزیمی قارچ در آن فاز در حداقل مقـدار خـود قرار دارد. وضعیت ترشح آنزیم در روزهای ۳ و ۹ (لاکاز و زایلاناز) تقریبا" مـشابه بـوده و روز سـوم، شـروع فـاز ثانویه و روز نهم به نوعی پایان این فاز می‌باشـد. بنـابراین یکی نقطه اوج‌گیری و دیگری نقطه افول ترشح این آنزیم است و در نهایت تیمارهای روزهای ۵ و ۷ نیـز در گـروه جداگانه قرار گرفتند. نکته حائز اهمیت، انتقـال نقطـه اوج فعالیت این آنزیم‌ها از روز هفتم تیمـار بـه روز پـنجم، در صـورت اسـتفاده از وراتریـل الکـل و تیـامین مـی‌باشـد.

برخلاف لاکاز، سـیر نزولـی ترشـح آنـزیم پراکـسیداز در اواخر فاز ثانویـه، شـدید نیـست. Dosortetz و همکـاران (۱۹۹۰) اوج فعالیت آنـزیم لیگنـین پراکـسیداز در محـیط کشت مایع را در ٦ روز اعلام کردند، که پس از آن با افت شدید مواجه می‌شود. البته دلیل این افت مـشخص نـشده است. شـاید دلیـل اصـلی بـرای غیرفعـال شـدن لیگنـین پراکـسیداز، وجـود H_2O_2 درمحـیط باشـد. از آنجـا کـه وراتریل الکل قادر به محافظـت از لیگنـین پراکـسیداز در برابر H_2O_2 است، در کشت‌های مسن، این محافظت موثر واقع نشده و این آنزیم غیرفعال مـی‌شـود. بنـابراین، دلیـل اصلی غیرفعال شدن لیگنین پراکـسیداز، نمـی‌توانـد H_2O_2 باشد. زیرا اخیرا" به رابطه مقطعی بین کاهش فعالیت ایـن آنـزیم و افـزایش فعالیـت پروتئازهـای بـرون سـلولی در مراحل پایانی مرحله دوم رشد (٦ تا ۱۱ روز) رسیده‌اند.

در مورد آنزیم زایلاناز می‌توان گفت که منابع نیتـروژن و محرک‌هایی نظیر وراتریل الکل و تیامین نقـش کمتـری در القـای ترشـح آن دارنـد. از آنجـا کـه تجزیـه سـلولز، همی‌سلولز و پلی‌ساکاریدها، فرآیند اصلی متابولیسم اولیـه این قارچ‌ها را تـشکیل مـی‌دهنـد، بنـابراین ترشـح آنـزیم زایلاناز در فاز اولیه رشد قارچ منطقی به نظر می‌رسد. اوج فعالیت این آنزیم روز سوم فرآوری است که بعـد از آن از شدت فعالیت این آنزیم به‌دلیل به حـداقل رسـیدن مقـدار زایلوز در محیط پساب، کاسته شده و بـه حـداقل رسـیده است.

تقارن زمـانی پایـان فـاز اولیـه رشـد قـارچ و شـروع ترشـحات ایـن آنـزیم‌هـا مویـد نظـر Radha و همکـاران (۲۰۰۵) است که معتقدند ترشح آنزیم‌های برون سلولی ۲ تا ۳ روز پس از رشد قارچ اتفاق می‌افتد. تخریب لیگنـین در اوایل دوره (بعـد از فـاز اول رشـد) سـریع بـوده و بـا

گذشت زمان، تخریب لیگنین با سرعت کمتری انجام می‌شود. احتمالا" دلیل آن، اتولیز سلولی یا کاهش میزان گلوکز در محیط می‌باشد. البته اخیرا" رابطه‌ای نیز بین کاهش فعالیت لیگنین پراکسیداز و افزایش فعالیت پروتئازهای برون سلولی در مراحل پایانی مرحله دوم رشد (٦ تا ١١ روز) پیدا شده است

[Wu, J., Xiao, Y. & Dahiya, J., Singh, 2001 و Yu, H., 2005].

منابع مورد استفاده

- Abdel-Satera, M. A. & El-Said, A. H. M., 2001, Xylan-decomposing fungi and xylanolytic activity in agricultural and industrial wastes, International Biodeterioration & Biodegradation, 47: 15-21.
- Anjaneyulu, Y., Chary, N. S. & Raj, D. S. S., 2005, Decolourization of Industrial Effluents – Available Methods and Emerging Technologies– A Review, Environmental Science and Biotechnology, 4 (4).
- Asamudo, N. U., Daba, A. S. & Ezeronye, O. U., 2005, Bioremediation of textile effluent using Phanerochaete chrysosporium, African Journal of Biotechnology, 4 (13): 1548-1553.
- Bocchini, D. A. , Oliveira, O. M. M. F, Gomes, E. F., & Silva, R. D., 2005, Use of sugarcane bagasse and grass hydrolysates as carbon sources for xylanase production by Bacillus circulans in submerged fermentation, Process Biochemistry, 40: 3653–3659.
- Chance, B. & Maehly, A. C., 1955, Method in Enzymology II, 773-775
- Chen, W. P., Matsuo, M., & Yasui, T., 1986, Purification and characterization of a neutral endoxylanase from Aspergillus nidulans, Agriculture Biology Chemistry, 50: 118
- Cho, N.S., Kim, D. H., Cho, H. Y., Ohga, S. & Leonowicz, A., 2006, Effect of Various Compounds on the Activity of Laccases from Basidiomycetes and Their Oxidative and Demethoxylating Activities J. Fac. Agr., Kyushu Univ, 51 (2): 211–218 .
- Colombo, R., Lanc¸ F., Yariwake, M. J. H., 2006, Determination of flavonoids in cultivated sugarcane leaves, bagasse, juice and in transgenic sugarcane by liquid chromatography-UV detection, Journal of Chromatography, 1103: 118–124.
- Dahiya, J., Singh, D. & Nigam, P., 2001, Decolourization of synthetic and spentwash melanoidins using the white- rot fungus Phanerochaete chrysosporium JAG-40, Bioresource Technology, 78 (1): 95-98.
- Dosoretz, C. G., Dass, S. B., Reddy, C. A.& Grethlein, H. E., 1990, Protease-Mediated Degradation of Lignin Peroxidase in Liquid Cultures of Phanerochaete chrysosporium ,Applied and environmental microbiology, 56 (11): 3429-3434.
- Driessel, B. V., 2003, Bioremediation of a bleach plant effluent from the pulp and paper industry, In the Department of Microbial, Biochemical and Food Biotechnology, Faculty of Natural and Agricultural Sciences, University of the Free State, Bloemfontein.
- Jeffries, T. W., Choi, S. & Kent K. T., 1981, Nutritional Regulation of Lignin Degradation by Phanerochaete chrysosporium, Applied and environmental microbiology, 42 (2): 290-296.
- Kanaly, R. A., Hur, H., 2006, Growth of Phanerochaete chrysosporium on diesel fuel hydrocarbons at neutral pH, Chemosphere, 63: 202–211
- Kumar, V., Wati, L., Nigam, P., Banat, I. M., Yadav, B. S., Singh D. & Marchan, R., 1998, Decolorization and biodegradation of anaerobically digested sugarcane molasses spent wash effluent from biomethanation plants by white-rot fungi, Process Biochemistry, 33 (1): 83-88.
- Kunz, A., Reginatto, V., Duran, N., 2001, Combined treatment of textile effluent using the sequence Phanerochaete chrysosporium – ozone, Chemosphere, 44: 281-287.
- Lacina, C., Germain, G., Spiros, A. N., 2003, Utilization of fungi for biotreatment of raw wastewaters, African Journal of Biotechnology, 2 (12): 620-630 .
- Meysami, P., 2001, Feasibility Study of Fungal Bioremediation of a Flare Pit Soil Using White Rot Fungi, Department of chemical and petroleum engineering, The university Calgary, Alberta.
- official test method, 1983, Acid soluble and insoluble lignin in wood and pulp, TAPPI, T 222 om-83.
- Perez, J., Mun, J. Dorado, O., Rubia, T. & Martnez, J., 2002, Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview, Int Microbiol 5: 53–63.
- Radha, K. L., Regupathi, I., Arunagiri, A., Murugesan, T., 2005, Decolorization studies of synthetic dyes using Phanerochaete chrysosporium and their kinetics; process Biochemistry, 40: 3337 – 3345.
- Ride, J.P., 1980, Physiological Plant pathology, 16: 187- 196.
- Sheldon, M.S., Mohammed, K., Ntwampe, S. K. O., 2007, An investigation of biphasic growth kinetics for Phanerochaete chrysosporium (BKMF-1767)

immobilized in a membrane gradostat reactor using flow-cells, Enzyme and Microbial Technology .
- Shirish., 2007, Bioremediation of pulp and paper mill effluent by Phanerochaete chrysosporium, Shirish's Environmental Portal.
- Travis, G. R., 2007, An overview of sugar culture in Morocco, particularly within a Berber community in Rastabouda, School of Biological Sciences ,University of Canterbury.
- Turpeinen, B. K., 2007, Lignocellulose degradation and humus modification by the fungus Paecilomyces inflatus, Division of Microbiology Department of Applied Chemistry and Microbiology, University of Helsinki.
- Vicuna, R., 2000, Ligninolysis: A very peculiar microbial process. Molecular Biotechnology, 14: 173 -176.
- What Is Bioremediation, 2005, Transgalactic Ltd, manufacturer of Bioscreen C software.
- Wu, J., Xiao, Y. & Yu, H., 2005, Degradation of lignin in pulp mill wastewaters by white-rot fungi on biofilm, Bioresource Technology, 96 (12): 1357-1363 .

Investigation on the influence of nutrients and treatment period on enzyme activities of *Phanerochaete chrysosporium*.

Sharari, M.[1], Latibari, A.J.[2]*, Rafeiee, S.A.[3] and Mirshokraei, A.[4]

1-Ph.D. Candidate, College of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
2*-Associate Prof., Agriculture Research Center Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, Iran
3-Associate Prof. College on Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
4-Professor, Payam-e-Nor University, Tehran, Iran

Received: Sep. 2009 Accepted: May 2010

Abstract

In the course of enhanced bioremediation, addition of nutrients such as carbon, nitrogen, phosphorous, substrates, electron acceptors as well as vitamins (Thiamin, etc) and veratryl alcohol, increased metabolic activities will influence the production of enzymes and enhances the deterioration of pollutants. In this study, the effect of 1% (V/V) of nutrients containing various mineral salts, carbon (glucose and malt), nitrogen (casein peptone yeast extract) and some enzyme inducer such as veratryl alcohol and thiamin hydrochloride on production of laccase, peroxidase and xylanase enzymes by *Phanerochaete chrysosporium* in bagasse preparation effluent was investigated. The results showed that MSB+MCTV is the most effective additive which causes the highest lignolitic activity of this fungus after 5 to 7 days in the case of laccase and peroxidase and 3 days for xylanase, and maximizes the production of the enzymes. The production of these enzymes is measured at 78, 193 and 60 U/l respectively. However, in conditions no additive, the relevant values are 26, 54 and 16 U/l respectively. The relation between different stages of fungus growth and enzyme production as well as changes in lignin and carbohydrate of effluent after the period of nine days is also investigated.

Keywords: nutrients, laccase, peroxidase, xylanase, phanerochaete chrysosporium, bagasse preparation effluent