جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری‌های *باسیلوس سرئوس* و *باسیلوس سوبتیلیس* به عنوان تولیدکنندهٔ آنزیم پکتیناز از مناطق مختلف استان گستان

رسول محمدی[۱]، تینا دادگر[۲]، حمیدرضا پردلی[۲]، سجاد یزدان ستاد[۳]*، رضا نجف‌پور[۴] و الیکا فرج تبریزی[۴]

[۱] دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

[۲] گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

[۳] گرگان، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، کمیته تحقیقات دانشجویی

[۴] قم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۹۵/۱/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۵/۷/۱۱

چکیده

پکتینازها گروهی از آنزیم‌های پکتولیتیک هستند که باعث هیدرولیز پکتین موجود در بافت‌های گیاهی می‌شوند. این آنزیم‌ها از مهمترین آنزیم‌های مورد استفاده در صنایع غذایی جهت فرآوری آبمیوه، چای، قهوه و روغن هستند. یک منبع کارآمد جهت تولید صنعتی آنزیم، باکتری‌ها هستند. مطالعهٔ حاضر با هدف جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری‌های تولیدکنندهٔ آنزیم پکتیناز از خاک حاوی ضایعات انجام گرفت. در این مطالعه از خاک حاوی ضایعات مرکبات در چندین منطقهٔ استان گلستان نمونه-برداری شد. جهت جداسازی باکتری‌های مولد پکتیناز، از محیط تغییر یافتهٔ پکتین استفاده شد. فعالیت پکتیناری باکتری‌ها بر اساس تشکیل هالهٔ شفاف در اطراف کلنی‌ها پس از اضافه کردن محلول لوگل مشخص گردید. جدایه‌ها با فعالیت پکتینازی مطلوب، با استفاده از روش تعیین توالی قطعهٔ 16S rRNA شناسایی شدند. از ۵۰ نمونه خاک، تعداد ۲۰ باکتری با فعالیت پکتینازی جداسازی شد که تمامی آنها تا سطح جنس و گونه شناسایی گردید. از این بین، ۲ جدایه با توجه به بزرگتر بودن قطر هالهٔ اطراف کلنی، فعالیت پکتینازی بیشتری را نسبت به بقیه داشتند. بررسی مولکولی نشان داد که این جدایه ها منسوب به دو گونهٔ *باسیلوس سرئوس* و *باسیلوس سوبتیلیس* می‌باشند. در مطالعهٔ حاضر دو گونهٔ باکتری با توانایی مطلوب در تولید پکتیناز، جداسازی و معرفی شد. تحقیقات بیشتری برای دستیابی به شرایط بهینه تولید و کینتیک موثر این آنزیم توسط جدایه‌های مذکور مورد نیاز است.

واژه‌های کلیدی: پکتیناز، پکتین، محیط پکتین آگار، *باسیلوس*

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۳۳۲۳۴۲۰۲۷ ، پست الکترونیکی: sajjad.yazdansetad@gmail.com

مقدمه

پکتین، پلیمر ناهمگون متشکل از واحدهای اسید گالاکترونیک است که با گروه‌های متیل استریفیه شده و به فرم زنجیره‌های خطی با پیوندهای گلیکوزیدی آلفا [1-4] در کنار هم قرار گرفته است. پکتین در ساختار جدار سلولی و فضای بین سلولی گیاهان عالی وجود دارد و تعیین کنندهٔ استحکام و شکل ظاهری آنها است (۳).

پکتین با تغییر چارچوب اصلی به ۴ فرم پروتوپکتین (Protopectin)، اسید پکتیک (Pectic acid)، اسید پکتینیک (Pectinic acid) و پلی متیل اسید گالاکترونیک (Poly-D-methyl ester galacturonic acid) دیده می‌شود.

پروتوپکتین، فرم نامحلول پکتین است و در میوه‌های نارس وجود دارد و با اتصال به سلولز موجب استحکام بافت گیاه

می‌شود. با رسیدن میوه و ترشح آنزیم پکتیناز، پروتوپکتین تبدیل به اسید پکتیک می‌شود. اسید پکتیک، پلیمر محلول متشکل از گالاکتورونان با تعداد کمی از گروه متوکسیل است. اسید پکتینیک، گالاکتورونان‌هایی با میزان متغیر متوکسیل که متیلاسیون اسید گالاکتورونیک در آن از صفر تا ۷۵ درصد است. پلی متیل گالاکتورونات، پکتین حاوی پلی گالاکتورونیک اسید با متیل استرهای موضعی و نمک‌های سدیم، آمونیوم و پتاسیم است (۵ و۱۴).

آنزیم‌های تجزیه کنندهٔ پکتین (پکتولیتیک) شامل سه گروه آنزیمی پکتین استراز، پلی گالاکتوروناز و پکتین لیاز است که به مجموعهٔ آنها، پکتیناز گفته می‌شود. پکتین استراز (پکتین متیل هیدرولاز) با جدا کردن گروه متوکسیل از پکتین و آزادسازی اسید پکتیک و متانول، باعث هیدرولیز پیوندهای استری می‌گردد. پلی‌گالاکتوروناز پیوندهای گلیکوزیدی آلفا [1-4] واحدهای D-گالاکتورونیک اسید را هیدرولیز می‌کند. پلی‌گالاکتوروناز دو فرم هیدولیز دارد: یک نوع آنزیم، پیوند گلیکوزیدی را در یک زنجیره مولکولی عاری از گروه متوکسیل می‌شکند و نوع دیگر، اتصال‌های گلیکوزیدی در زنجیره‌های حاوی گروه متوکسیل را هیدرولیز می‌کند. پکتین لیاز با جدا کردن دو اتم هیدروژن از کربن‌های شماره چهار و پنج و ایجاد یک پیوند دوگانه میان این دو اتم کربن، باعث شکستن پیوندهای گلیکوزیدی می‌شود (۱۶).

پکتیناز یکی از اولین آنزیم‌هایی است که در صنعت مورد استفاده قرار گرفت. امروزه، تقریباً ۱۰٪ از کل فروش آنزیمی جهان به پکتینازها اختصاص دارد. کاربرد تجاری این آنزیم اولین بار در سال ۱۹۳۰ جهت تهیهٔ سرکه و آبمیوه بود. پکتیناز پرکاربردترین آنزیم مورد استفاده در صنایع غذایی جهت فرآوری آبمیوه، چای، قهوه و روغن است. در فرآوری آبمیوه، اضافه کردن این آنزیم قبل از فرایند پرس کردن میوه، اثرات نامطلوب کدورت و ویسکوزیته ناشی از وجود پکتین را رفع و موجب شفاف سازی آبمیوه می‌شود (۱۱). این آنزیم در صنایع دارویی جهت فرآوری و استحصال دارو و در صنایع چوب و نساجی جهت استخراج کنف و کتان از چوب نیز استعمال دارد (۱۰).

آنزیم‌های پکتولیتیک در طبیعت توسط باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها تولید می‌شوند (۳). پکتینازهای اسیدی عمدتاً منشا قارچی و پکتینازهای قلیایی منشا باکتریایی دارند. باکتری-های جنس *سودوموناس* (*Pseudomonas*)، *فلاوباکتریوم* (*Flovobacterium*)، *اروینیا* (*Erwinia*) و *زانتوموناس* (*Xanthomonas*) مهمترین تجزیه کنندگان پکتین هستند. تعدادی از باکتری‌های بی‌هوازی نیز معمولاً قندها و اسیدهای قندی پکتین را به الکل و اسیدهای ضعیف تبدیل می‌کنند که مهمترین آنها *کلستریدیوم پکتینووروم* (*Clostridium pectinovorom*) و *کلستریدیوم فلسی‌نئوم* (*Clostridium felsineum*) هستند. فعال‌ترین تجزیه کنندگان پکتین باسیلوس‌های اسپوردار مانند *باسیلوس پلی‌میگزا* (*Bacillus polymyxa*) و *باسیلوس ماسرانس* (*Bacillus macerans*) می‌باشند (۱).

با توجه به کاربردهای تجاری پکتیناز، سالانه هزینه‌های زیادی صرف خرید و واردات این آنزیم در کشور می‌شود. بومی‌سازی تولید آنزیم از منابع موجود نیازمند مطالعات راهبردی است. در این راستا، مطالعه حاضر با هدف جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری‌های *باسیلوس سرئوس* و *باسیلوس سوبتیلیس* به عنوان تولید کنندهٔ آنزیم پکتینازی از مناطق مختلف استان گلستان انجام گرفت.

مواد و روشها

نمونه‌برداری و جداسازی باکتری‌ها: نمونه‌برداری از اعماق ۳۰-۰ سانتی‌متری خاک مناطق آزادشهر، دلند، خان-بین و گرگان در استان گلستان که عموماً حاوی ضایعات مرکبات بود، انجام گرفت. برای جداسازی باکتری‌های مولد پکتیناز، ۵۰ نمونهٔ خاک بررسی شد. از نمونه‌های

خاک با روش رقیق‌سازی سریالی، رقت‌های متوالی از 10^{-1} تا 10^{-6} تهیه شد. از محتویات لوله‌ها بصورت جداگانه در محیط کشت اختصاصی پکتین آگار بهینه شده (پکتین مرکبات ۱ درصد، سولفات آمونیوم ۰/۱۴ درصد، پتاسیم هیدروژن فسفات ۰/۲ درصد، سولفات منیزیم ۷ آبه ۰/۰۲ درصد، محلول مغزی ۱۰ درصد، سولفات آهن ۷ آبه ۵ میلی‌گرم بر لیتر، سولفات منگنز یک آبه ۱/۶ میلی‌گرم بر لیتر، سولفات منگنز ۷ آبه ۱/۴ میلی‌گرم بر لیتر، کلرید کلسیم ۲ میلی‌گرم بر لیتر و آگار ۲ درصد) کشت داده شد و در ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه-گذاری گردید. تولید پکتین توسط باکتری‌ها، با اضافه کردن محلول لوگول ۲ درصد (ید و یدید پتاسیم) به محیط کشت و تشکیل هالهٔ شفاف در اطراف کلنی‌ها مشخص گردید. در مرحلهٔ بعد، باکتری‌ها با کشت مجدد خالص سازی شدند. جهت بررسی سویه‌های برتر تولید کنندهٔ آنزیم پکتیناز از روش ایجاد چاهک در محیط پکتین آگار استفاده شد. با انتهای پیپت پاستور شیشه‌ای استریل در محیط جامد چاهک‌هایی به قطر ۴ میلی‌متر ایجاد شد. از جدایه‌های باکتریایی سوسپانسیون معادل نیم مک فارلند تهیه شد و ۲۵ میکرولیتر از آن در چاهک بارگذاری و در ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۳ روز گرمخانه‌گذاری شد. فعالیت پکتینازی باکتری‌ها با اضافه کردن محلول لوگول به محیط و تشکیل هالهٔ شفاف در اطراف چاهک معلوم گردید (۴).

شناسایی باکتری‌ها: شناسایی جدایه‌های باکتری با استفاده از آزمون‌های ماکروسکوپی، میکروسکوپی، واکنش گرم و آزمون‌های بیوشیمیایی شامل کاتالاز، SIM= Sulfide, Indole, Motility ، مصرف سیترات، اکسیداسیون و تخمیر قند (OF)، متیل رد–ووگس پروسکائر (MR-VP=Methyl Red-Voges Proskauer)، هیدرولیز نشاسته، هیدرولیز کازئین و ذوب ژلاتین انجام گرفت. نهایتاً، جدایه‌ها با روش مولکولی تکثیر قطعهٔ ژنی 16S rRNA و تعیین توالی آن تایید شدند (۶).

استخراج DNA و تکثیر قطعهٔ 16S rRNA باکتری‌ها با استفاده از PCR : استخراج DNA باکتری‌ها با استفاده از کیت استخراج DNA کیاژن (کیاژن، آلمان QIAamp DNA mini kit; Qiagen, Germany) انجام گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: ۱۰ نانوگرم بر میکرولیتر DNA الگو، ۰/۴ میکرومولار از هر پرایمر فوروارد و ریورس، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP، ۲ میلی-مولار $MgCl_2$، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR و ۱ واحد آنزیم *Taq* DNA Polymerase انجام گردید. واکنش PCR با روش استاندارد و با استفاده از پرایمرهای عمومی (F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', R: 5'-GACGGGCGGTGTGTACAA-3') در دستگاه ترمال سایکلر (اپندورف، آلمان(Mastercycler® nexus; Eppendorf, Germany)) تحت شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن اولیه در دمای ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۴۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت (۱۳). در نهایت، قطعهٔ تکثیر شده جهت تعیین توالی به شرکت ماکروژن، کره جنوبی (MacroGen, Korea- http://www.macrogen.com) ارسال گردید.

نتایج

جداسازی باکتری‌های تولیدکنندهٔ پکتیناز: از مجموع ۵۰ نمونهٔ خاک حاوی ضایعات مرکبات، ۲۰ جدایه با توانایی مطلوب از نظر تولید پکتیناز جداسازی و خالص سازی شدند. جدایه‌ها و محل نمونه برداری در جدول ۱ آورده شده است. همهٔ جدایه‌ها بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی تا سطح جنس و گونه تفکیک و گروه بندی شدند (جدول ۲).

جدول ۱- نام جدایه‌ها و منطقهٔ نمونه‌برداری

جدایه باکتری	منطقه آزادشهر	منطقه دلند	منطقه خان ببین	منطقه گرگان	تعداد کل
B. cereus	۲	۲	۰	۲	۶
B. subtilis	۱	۰	۱	۰	۲
B. brevis	۱	۱	۱	۰	۳
B. circulans	۱	۱	۰	۰	۲
B. polymixa	۰	۱	۱	۱	۳
B. firmus	۰	۱	۰	۱	۲
B. pumilus	۰	۰	۱	۱	۲

جدول ۲- نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی برای جدایه‌ها

جنس و گونه احتمالی	آزمون کاتالاز	آزمون کازئین	آزمون ژلاتین	آزمون نشاسته	آزمون سیترات	آزمون اندول	آزمون حرکت	آزمون MR	آزمون VP	مورفولوژی
B. cereus	+	+	+	+	+	−	+	−	+	باسیلی
B. subtilis	+	+	+	+	+	−	+	−	+	باسیلی
B. brevis	+	−	−	+	−	−	+	+	−	باسیلی
B. circulans	+	+	+	+	−	−	−	+	−	باسیلی
B. polymixa	+	+	+	+	−	−	+	−	+	باسیلی
B. firmus	+	+	+	+	−	متغیر	متغیر	+	−	باسیلی
B. pumilus	+	+	+	−	+	−	+	+	−	باسیلی

بررسی تولید پکتیناز توسط باکتری‌ها: قطر هالهٔ شفاف ناشی از تولید پکتیناز توسط ۲۰ جدایهٔ باکتری در اطراف چاهک موجود در محیط کشت پکتین آگار به مدت ۳ روز و با ۳ تکرار اندازه‌گیری و میانگین این سه تکرار ثبت گردید (نمودار ۱). از این ۲۰ جدایه با توانایی تولید پکتیناز، تنها ۲ جدایه با توجه به بیشتر بودن قطر هاله، توانایی بالایی را در تولید آنزیم داشتند و به عنوان جدایه-های برتر انتخاب شدند (شکل۱).

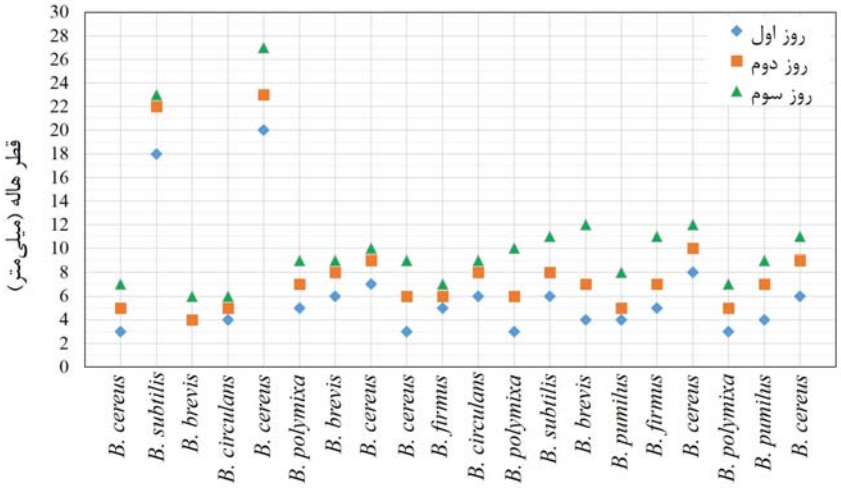
تکثیر قطعهٔ 16S rRNA باکتری‌ها با استفاده از واکنش PCR : تکثیر قطعهٔ ژنی 16S rRNA جدایه‌ها باندهای مناسب در اندازهٔ تقریبی ۱۵۰۰ جفت باز را نشان داد (شکل۲). توالی تعیین شدهٔ قطعهٔ ژنی با نرم‌افزار آنلاین BLAST موجود در وب سایت NCBI بررسی شد و درصد شباهت جدایه‌ها با دیگر باکتری‌های موجود در بانک اطلاعاتی مقایسه گردید (جدول ۳).

بحث

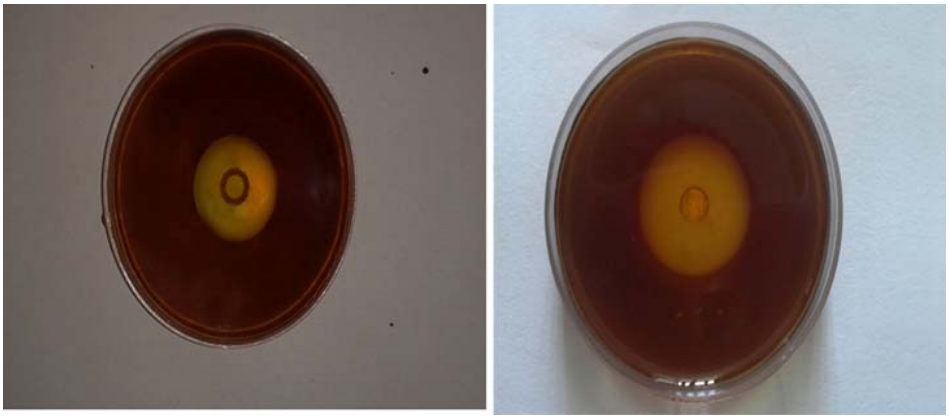
بکارگیری آنزیم‌ها و متابولیت‌های میکروبی در فرآوری و تولید مواد غذایی راهبردی ارزان و مقرون به صرفه است که این امر، شناسایی و معرفی میکروارگانیسم‌هایی با ظرفیت بالای تولید را می‌طلبد (۱۱).

جدول۳- اطلاعات مقایسهٔ توالی قطعهٔ ژنی 16S rDNA جدایه‌ها با بانک اطلاعاتی NCBI

Isolate	Bacteria	Similarity	Accession number
PPB 1	*Bacillus cereus*	98%	KF150501
PPB 2	*Bacillus subtilis*	98%	KF790812



نمودار ۱- اندازهٔ قطر هالهٔ شفاف در اطراف چاهک موجود در محیط کشت پکتین آگار

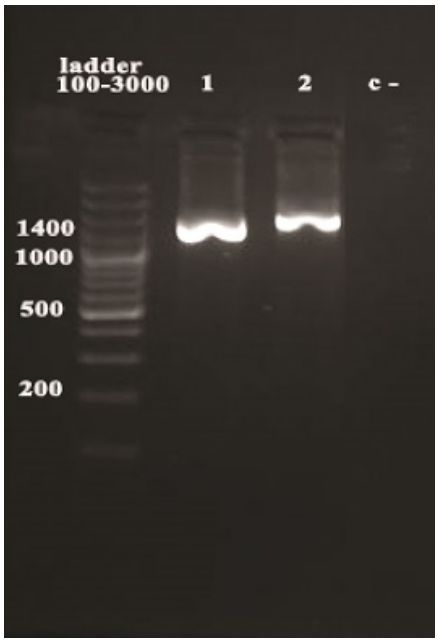


شکل ۱- سمت راست، هالهٔ شفاف ایجاد شده توسط جدایهٔ *باسیلوس سرئوس* در محیط پکتین آگار و سمت چپ، هالهٔ شفاف ایجاد شده توسط جدایهٔ *باسیلوس سوبتیلیس* در محیط پکتین آگار در روز سوم

در مطالعهٔ حاضر، تعداد ۲۰ جدایهٔ تولید کنندهٔ آنزیم پکتیناز از خاک حاوی ضایعات مرکبات جداسازی و شناسایی شد. غربال‌گری جدایه‌ها بر اساس توانایی حل‌کنندگی پکتین در محیط پکتین آگار و اضافه کردن معرف لوگول انجام گرفت.

موکش کومار و همکاران مطالعه‌ای را روی تولید و بهینه سازی پکتیناز توسط *باسیلوس* MFW7 جدا شده از ضایعات تجاری میوه انجام دادند. در مطالعهٔ ما نیز گونه-های *باسیلوس* فعالیت پکتینولیتیک بهتری را نشان دادند. در مطالعهٔ کومار و همکاران بیشترین میزان پکتیناز تولید شده پس از ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد بود. در مطالعهٔ ما نیز بهترین فعالیت پکتینازی جدایه‌ها در همین شرایط بود. منبع جداسازی باکتری‌ها در مطالعهٔ کومار و همکاران ضایعات نشاسته و در مطالعهٔ ما ضایعات میوه بود. در مطالعهٔ کومار و همکاران، جهت بررسی تولید پکتیناز از محلول ستیل تری متیل آمونیوم بروماید (CTAB= Cetyltrimethyl ammonium bromide)٪۱ متعاقب ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری جدایه‌ها استفاده شد. در حالیکه در مطالعهٔ ما از محیط پایه پکتین آگار تغییر یافته و با اسفاده از محلول لوگول برای بررسی تولید پکتیناز استفاده شد. در مطالعهٔ کومار و همکاران، تولید پکتیناز توسط جدایه‌ها در مدت ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸،

۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت گرمخانه‌گذاری در دماهای ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۵، ۵۰ و ۵۵ درجهٔ سانتی‌گراد و در غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵، ۳ و ۳/۵ درصد سوبسترا و در pH های ۳/۵، ۴/۵، ۵/۵، ۶/۵، ۷/۵، ۸/۵ و ۹/۵ مورد آزمایش قرار گرفت. بیشترین میزان تولید پکتیناز بعد از ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری، در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، pH ۶/۵ و غلظت ۱٪ سوبسترا بود. در مطالعه ما تولید پکتیناز جدایه-ها در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، غلظت ۱ درصد سوبسترا و pH ۵ بود. در مطالعهٔ کومار و همکاران، تاثیر منابع کربن مثل گلوکز، مالتوز، لاکتوز، نشاسته، گزیلوز و سوکروز و منابع نیتروژن مثل پپتون، اوره و عصاره مخمر نیز روی تولید پکتیناز مورد آزمایش قرار گرفت که لاکتوز در ترکیب با پپتون بیشترین تاثیر را روی تولید پکتیناز داشت. در حالیکه در مطالعهٔ ما تاثیر منابع مختلف کربن و نیتروژن روی تولید پکتیناز مورد بررسی قرار نگرفت (۷).



شکل ۲- تکثیر قطعهٔ ژنی 16S rRNA جدایه‌ها (ستون ۱: قطعهٔ تکثیر شده 16S rRNA جدایهٔ باسیلوس سرئوس، ستون ۲: قطعهٔ تکثیر شده 16S rRNA جدایهٔ باسیلوس سوبتیلیس، ستون ۳: کنترل منفی)

موتاز الاجلندی و همکاران فعالیت پکتینازی را بر روی چندین جدایهٔ وحشی *باسیلوس سوبتیلیس* انجام دادند. آنها ۵۰ گونهٔ باکتری را از خاک و فاضلاب‌های کارخانهٔ آبمیوه جداسازی کردند. برای سنجش فعالیت پکتینازی، جدایه‌ها در محیط پکتین آگار کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. پس از گرمخانه‌گذاری، روی کلنی‌های رشد یافته در پلیت، کلرید کلسیم یک مولار و محلول لوگل ریخته شد. از ۵۰ نمونهٔ باکتری، فقط ۴ باکتری هالهٔ شفاف وسیعتری را در اطرافشان تشکیل دادند که نشان دهندهٔ فعالیت پکتینازی بود. موتاز الاجلندی و همکاران برای ایجاد شرایط بهینهٔ تولید آنزیم، آزمایش را در شرایط گوناگون انجام دادند. رشد این گونه‌ها در شرایط هوازی و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در محیط‌های کشت مختلف همچون Landy broth، Yeast extract-pectin broth و M9-minimal salt medium جهت مطالعهٔ تاثیر نوع محیط کشت و منبع کربنی بر تولید پکتیناز انجام گرفت. پس از انجام آزمایشات بیوشیمیایی و مولکولی روی این ۴ نمونه مشخص شد که این باکتری‌ها از سویه‌های مختلف *باسیلوس سوبتیلیس* هستند که با مطالعهٔ ما مطابقت داشت. با این حال در مطالعهٔ ما شرایط تولید آنزیم بررسی نشد (۱).

جانانی و همکاران باکتری‌های تولید کنندهٔ پکتیناز را از خاک‌های ضایعات کشاورزی در مناطق مختلف جنوب هند جداسازی کردند. آنها جهت بررسی فعالیت پکتینازی باکتری‌ها از محیط کشت (YEP) Yeast extract-pectin broth استفاده کردند و پس از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد با افزودن لوگول و تشکیل هالهٔ شفاف در محیط کشت، باکتری‌های پکتینولیتیک را غربال‌گری کردند. علاوه بر این، جهت بهینه‌سازی تولید پکتیناز از دماهای ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد و pH ۷/۲ و گرمخانه‌گذاری به مدت ۷۲-۲۴ ساعت استفاده شد. تاثیر منابع مختلف نیتروژن و کربن از قبیل پکتین، پوست گندم و پوست برنج در غلظت ۱٪ محیط کشت پایه نیز بررسی

شد. در مطالعهٔ ما، آزمایش در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و pH ۷/۲ و بمدت ۷۲-۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری انجام شد ولی فقط از پکتین مرکبات به عنوان تنها منبع کربن برای تولید پکتیناز استفاده شد. در مطالعهٔ جانانی و همکاران، از ۱۰ گونهٔ باکتریایی جدا شده، ۳ گونه فعالیت پکتینازی نشان دادند. آنها دریافتند که تولید آنزیم در محیط کشت حاوی پوست گندم بیشتر از محیط کشت حاوی پوست برنج رخ می‌دهد. علاوه بر این، معلوم شد که دمای بهینه برای تولید آنزیم ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد است. آزمون‌های مولکولی، سویه‌های مختلف *باسیلوس* را تایید کرد. انتخاب سویه‌های برتر تولید کنندهٔ پکتیناز در مطالعهٔ جانانی و همکاران بر اساس اندازهٔ قطر هالهٔ شفاف اطراف کلنی‌های باکتری توصیف شد. بطوریکه، باکتری‌هایی که اندازهٔ قطر هالهٔ اطراف کلنی‌های آنها کمتر از ۱۵ میلی‌متر بود از لحاظ تولید پکتیناز در ردهٔ خیلی خوب، باکتری‌هایی که اندازهٔ قطر هالهٔ اطراف کلنی‌های آنها کمتر از ۱۰ میلی‌متر بود، در ردهٔ خوب، و باکتری‌هایی که اندازهٔ قطر هالهٔ اطراف کلنی آنها کمتر از ۵ میلی‌متر بود در ردهٔ ضعیف قرار گرفتند. باکتری‌هایی هم که در اطراف کلنی‌های آنها هاله‌ای مشاهده نشد، فاقد فعالیت پکتینازی بودند (۴). معیار انتخاب جدایه‌های برتر تولید کنندهٔ پکتیناز در مطالعهٔ ما نیز دقیقا با مطالعهٔ اخیر مطابقت داشت.

سورز و همکاران، ۱۶۸ گونهٔ باکتری با فعالیت پکتینازی را از خاک و بقایای تجزیه شدهٔ سبزیجات جدا کردند. منبع کربنی مورد استفاده در محیط کشت باکتری‌ها، پکتین مرکبات بود. معرف مورد استفاده جهت غربال‌گری باکتری‌های مولد پکتیناز، لوگول بود. قطر هالهٔ شفاف ناشی از تجزیهٔ پکتین توسط گونه‌ها پس از ۷۲-۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد اندازه‌گیری شد و معلوم شده که گونه‌های مختلف *باسیلوس* بالاترین فعالیت پکتینازی را داشتند. فعالیت پکتینازی این گونه‌ها تحت شرایط مختلف pH و دما مورد ارزیابی قرار گرفت. بهترین فعالیت در ۷-۶ pH و دمای ۵۵-۴۵ درجه سانتی-گراد مشاهده شد. این مطالعه با مطالعهٔ ما مطابقت داشت با این تفاوت که بررسی‌های ما در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و pH خنثی انجام شد (۱۵).

آلتانا و همکاران، مطالعه‌ای را روی جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری‌های تولید کنندهٔ پکتیناز خارج سلولی از ضایعات کارخانجات روغن زیتون در ترکیه انجام دادند. آنها توانستند *باسیلوس*های ترموفیلیک تولید کنندهٔ لیپاز و پکتیناز خارج سلولی را جدا کنند. محیط کشت مورد استفاده در آن مطالعه، *باسیلوس اسیدوکالداریوس* آگار و Yeast extract starch agar (YSG) بود که باکتری‌ها در این دو محیط، در دمای ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۷۲-۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. برای بررسی باکتری‌ها با فعالیت پکتینازی، از محیط کشت حاوی پکتین مرکبات استفاده شد. بعد از ۴-۳ روز گرمخانه‌گذاری در دمای ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد، از محلول ۱٪ CTAB جهت شناسایی باکتری‌های مولد پکتیناز استفاده شد (۲).

کواتارا و همکاران مطالعه‌ای را روی تولید آنزیم پکتینولیتیک توسط گونه‌های *باسیلوس* در طول تخمیر قهوه انجام دادند. با این حال، نقش *باسیلوس*ها در تخمیر قهوه بخوبی شناخته شده نیست. در مطالعهٔ کواتارا و همکاران نیز از پکتین به عنوان منبع کربن استفاده گردید و باکتری‌ها در محیط حاوی ۱ درصد پکتین مرکبات کشت داده شد. بعد از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد، از محلول لوگل جهت غربال‌گری باکتری‌ها با فعالیت پکتینازی استفاده شد (۹).

ناگاراجو و همکاران، *باسیلوس لیکنی‌فرمیس* و *باسیلوس سوبتیلیس* با توانایی تولید پکتیناز را از خاک حاوی ضایعات سبزیجات جداسازی کردند. آنها از محیط کشت آگار غربال کنندهٔ پکتیناز (PSAM= Pectinase Screening Agar Medium) و گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت و از محلول یدین ۵۰ میلی-مولار استفاده کردند (۸).

روسدیانا و همکاران، مطالعه‌ای را روی تولید پکتیناز تولید شده توسط *باسیلوس فیرموس* (*Bacillus firmus*) انجام دادند. آنها این باکتری را از شیر گاو محلی جداسازی کردند. شرایط بهینه برای تولید پکتیناز توسط این باکتری با متغیرهای مختلف محیطی مانند pH، دما، زمان تخمیر و تاثیر یون‌های فلزی مورد بررسی قرار گرفت. محیط کشت باکتری محتوی ۱٪ پکتین بود. بهترین فعالیت پکتینازی این باکتری در pH ۷–۸، دمای ۵۰–۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد و زمان تخمیر ۱۸ ساعت بود. افزودن ۲ میلی‌مولار روی، ۸ میلی-مولار منیزیم و ۲ میلی‌مولار پتاسیم به محیط کشت نیز باعث بهتر شدن فعالیت پکتینازی باکتری گردید (۱۲).

نتیجه‌گیری

بی‌تردید، خاک منبع گسترده‌ای جهت جداسازی میکروارگانیسم‌های تولید کنندهٔ آنزیم‌های صنعتی است. کشور ما با توجه به تنوع اقلیمی از این موهبت بسیار غنی است. با جداسازی سویه‌های بومی برتر تولید کنندهٔ آنزیم پکتیناز و اِعمال روش‌های مهندسی زیستی، می‌توان در جهت بهینه‌سازی و بومی‌سازی تولید این آنزیم پرمصرف گام برداشت. در مطالعهٔ حاضر دو گونهٔ باکتری با توانایی مطلوب در تولید پکتیناز، جداسازی و معرفی شد. تحقیقات بیشتری برای دستیابی به شرایط بهینه تولید و کینتیک موثر این آنزیم توسط جدایه‌های مذکور مورد نیاز است که می‌تواند توسط سایر محققین به تفصیل مطالعه گردد.

منابع

1. Al-Ajlani MM, Ahmad Z, Hasnain S. (2012). Pectinase activity of wild-type Bacillus subtilis isolated from Pakistan. Biotechnology Research, 1(2): 7-12.
2. Altana A. (2004). Isolation and molecular characterization of extracellular lipase and pectinase producing bacteria from olive oil mills. MSc thesis, Izmir institute of technology, Turkey.
3. Amande T, Adebayo-Tayo B, Ndubuisi-Nnaji U, Ado B. (2013). Production and partial characterization of pectinases from mango peels by Aspergillius tamari. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 3(1): 59-62.
4. Janani, Loganathan K, kumar G, Rao B. (2011). Screening of pectinase producing microorganisms from agricultural waste dump soil. Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research, 2(1): 329-337.
5. Jayani R, Saxena S, Gupta R. (2005). Microbial pectinolytic enzymes: A review. Process Biochemistry, 40(9): 2931-2944.
6. John GH, Noel RK, Peter H, James, TS, Stanley TW, 1997. Bergey´s Manual of Determinative Bacteriology (In Russian). 9th ed. Moscow: Mir Publishers 2.
7. Mukesh kumar DJ, Saraya GM, suresh K, Andal Priyadharshini D, Raja Kumar R, Kalaichelvan PT. (2012). Production and Optimization of Pectinase from Bacillus sp. MFW7 using Cassava Waste. Asian Journal of plant science and Research, 2(3): 369-375.
8. Naga raju V, Divakar G. (2013). Screeninig and isolation of pectinase pruducing bacteria from various regions in Bangalore. International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical sciences, 4(1): 151-154.
9. Ouattara HG, Koffi BL, Karou GT, Sangare A, Niamke SL, Diopoh JK. (2008). Implication of Bacillus sp. in the production of pectinolytic enzymes during cocoa fermentation. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 24(9): 1753-1760.
10. Panda SS, Sahoo K, Das R, Dhal NK. (2012). Pectinolytic and cellulolytic activity of soil fungal isolates from Similipal Bioreserve Forest. World Enviroment, 2(2): 1-3.
11. Rokade DD, Vaidya SL, Rehman Naziya MA, Dixit.PP. (2015). Screening of pectinase producing bacteria, isolated from Osmanabad fruit market soil. International Journal of Interdisciplinary and Multidisciplinary Studies (IJIMS), 2(6): 141-145.
12. Roosdiana A, Prasetyawan S, Mahdi K, Sutrisno S. (2013). Production and Characterization of Bacillus firmus Pectinase. The Journal of Pure and Applied Chemistry Research, 2(1): 35-41.
13. Sambrook J, Russell D, Irwa, 2001. Molecular Cloning, a Laboratory Manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

14. Semenova MV, Grishutin SG, Gusakov AV, Okunev ON, Sinitsyn AP. (2003). Isolation and properties of pectinases from the fungus Aspergillus japonicas. Biochemistry (Moscow), 68(5): 559-569.

15. Soares M, Silva RD, Gomes E. (1999). Screening of bacterial strains for pectinolytic activity: characterization of the polygalacturonase produced by Bacillus sp. Revista de Microbiologia, 30(4): 299-303.

16. Venkata naga raju E, Divakar G. (2013). Screeninig and Isolation of pectinase pruducing bacteria from various regions in Bangalore. International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical sciences, 4(1): 151-154.

Isolation and molecular identification of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* as pectinase-producing bacteria from various regions of Golestan province

Mohammadi R.[1], Dadgar T.[2], Pordeli H.R.[2], Yazdansetad S.[3], Najafpour R.[4], Faraj Tabrizi E.[4]

[1] Biology Dept., Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Damghan Branch, Semnan, Iran

[2] Biology Dept., Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Gorgan Branch, Golestan, Iran

[3] Student Research Committee, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, I.R. of Iran

[4] Biology Dept., Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Qom Branch, Qom, I.R. of Iran

Abstract

Pectinases belong to the pectolytic enzymes which breakdown pectin polysaccharide present in plant tissues. Pectinase enzymes are the most widely used in food industries to produce fruit juice, tea, coffee, and oil. Bacteria are interesting sources in production of industrial enzymes. The aim of the present study was to isolate and molecular identify pectinase enzyme producing bacteria from soil. In this study, soil samples containing citrus peels were collected from some regions of Golestan province. The optimized pectin agar medium was used to isolate pectinase producing bacteria. Pectinase activity was indicated by the diameter of clear, hydrolyzed zones on the medium plates containing citrus pectin by adding Lugol's iodine. Bacterial isolates with higher pectinase activity were identified by 16S rRNA sequencing method. 20 out of 30 bacterial isolates revealed pectinase activity. All of the isolates were identified based on biochemical tests. Among them, 2 isolates had higher pectinase activity with regard to increase in the diameter of clear zone. Molecular studies indicated that the isolates were Bacillus cereus and Bacillus subtilis. In this study, two species of bacteria were introduced with suitable ability in pectinase production. Further studies are needed to assay the enzyme kinetics under a set of several conditions.

Keywords: pectinase, pectin, pectin agar medium, *Bacillus*