بهینه سازی آماری تولید سلولاز به وسیله *باسیلوس آرئوس* سویه AV10 با روش تخمیر حالت جامد ضایعات سلولزی و تعیین خصوصیت نسبی آن

فاطمه آزادیان خرنجانی[۱و۲]، ارسطو بدویی دلفارد[۱]* و زهرا کرمی[۱]

[۱] کرمان، دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

[۲] کرمان، دانشگاه شهید باهنر کرمان، انجمن پژوهشگران جوان

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۲/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۵/۸/۸

چکیده

سلولازها یکی از مهم‌ترین آنزیمهای صنعتی برای اکثر فرآیندهای تبدیل زیستی هستند. در این مطالعه *باسیلوس آرئوس* به عنوان بهترین باکتری ترموفیل تجزیه‌کننده سلولز از چشمه آبگرم گروه در کرمان جداسازی و شناسایی شد. این باکتری بر اساس تستهای میکروبی- بیوشیمیایی و توالی‌یابی ژن ۱۶S rRNA به عنوان *باسیلوس آرئوس* شناخته شد. شرایط تولید آنزیم سلولاز توسط این باکتری در تخمیر حالت جامد مورد بررسی قرار گرفت. pH، رطوبت، عصاره‌مخمر و $MgSO_4$ به عنوان عوامل قابل توجه در فعالیت اندوگلوکاناز، اگزوگوکاناز و Fpase به وسیله طراحی پلاکت- برمن مشخص شدند. روش سطح- پاسخ (RSM) و طرح ترکیبی مرکزی (CCD) با ۴ عامل و ۵ سطح جهت بهینه‌سازی تولید آنزیم مورد استفاده قرار گرفت که نتایج محدوده بهینه pH، $MgSO_4$، رطوبت و عصاره‌مخمر را به ترتیب ۶/۲، ۰/۲۹، ۶۱/۴، ۱/۶۵ درصد نشان داد. در حالت بهینه بیشترین مقدار تولید CMCase، (U/ml) ۵۶۱/۱۲۰۳ به دست آمد. pH و دمای بهینه آنزیم در هیدرولیز کاه گندم به ترتیب ۷ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به دست آمد.

واژه های کلیدی: طرح پلاکت-برمن، ترموفیل، تخمیر حالت جامد، کاه گندم

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۴۳۳۲۲۲۰۳۲، پست الکترونیکی: badoei@uk.ac.ir

مقدمه

سلولازها یکی از مهم‌ترین آنزیمهای صنعتی هستند که شامل سه نوع مختلف سلوبیوهیدرولازها (EC:3.2.1.91)، اندوگلوکانازها یا CMCase (EC:3.2.1.4) و بتا-گلوکوزیدازها (EC:3.2.1.21) می‌باشند (۲۲). اندوگلوکانازها به طور تصادفی باندهای β(1-4) را در مولکول سلولز هیدرولیز می‌کنند. برای اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم از سوبسترای کربوکسی‌متیل‌سلولز استفاده می‌شود، به همین دلیل به آن CMCase نیز گفته می‌شود. اگزوسلوبیوهیدرولازها در بیشتر موارد یک واحد سلوبیوز را آزاد می‌کنند که جهت اندازه‌گیری آن از Avicel به عنوان سوبسترا استفاده می‌شود و در آخر سلوبیوز به وسیله بتاگلوکوزیداز به گلوکز تبدیل می‌شود. همچنین فعالیت هر سه آنزیم به طور همزمان با استفاده از کاغذ صافی اندازه-گیری می‌شود که به این روش FPase می‌گویند (۱۰، ۲۳ و ۳۰). سلولازها مهم‌ترین آنزیمهای تجاری هستند که در صنعت غذا، نساجی، پالپ و کاغذسازی، تخمیر الکلی، غلات، داروسازی، صنایع آبجوسازی و مالت سازی استفاده می‌شوند (۲۷). یک مانع مهم در کاربرد سلولازها هزینه بالای تولید آن است که بیشتر از ۵۰ درصد از هزینه های کلی هیدرولیز را شامل می‌شود و استفاده تجاری از این آنزیمها را محدود می‌کند (۳۸). تخمیر حالت جامد رشد میکروارگانیسم‌ها روی ذرات جامد در غیاب یا کمبود

آب تعریف می‌شود و برای تولید محصولات مختلف از جمله آنزیمها استفاده می‌شود (۷، ۲۹). محتوای آب در تخمیر حالت جامد بین ۸۰-۴۰ درصد متفاوت است. محتوای آب در تخمیر غوطه‌وری بیش از ۹۵ درصد است (۳۳). اگرچه معایبی در تخمیر حالت جامد وجود دارد، مانند کشت طولانی و دشوار بودن شناسایی پارامترهای تخمیری، اما تخمیر حالت جامد فرآیندی بسیار جذاب و جایگزین است. چون با استفاده از ضایعات کشاورزی و غذایی به عنوان سوبسترا هزینه‌های فرآیند پایین می آید (۶). بهینه‌سازی شرایط تخمیر مشکل اصلی در توسعه فرآیند است. برخی از پارامترها که با توجه به تأثیر اقتصادی آنها بر فرآیند باید بهینه‌سازی شوند شامل شرایط محیط کشت مثل (رطوبت، pH، دما و زمان کشت) و ترکیبات محیط کشت (به ویژه منابع کربنی و نیتروژنی) می‌باشد. روش بهینه‌سازی سطح- پاسخ امروزه در دنیا کاربرد فراوانی دارد. این روش در واقع مجموعه‌ای از روشهای تجربی، ریاضی و استنتاج آماری است که به طور فزآینده‌ای برای بهینه‌سازی در روند مطالعات فناوری زیستی به کار برده می‌شود (۳۹). این روش می تواند چند عامل را در چند سطح همزمان با در نظر گرفتن اثرات متقابل آنها بررسی کند و ناحیه‌ای که نتایج در محدوده آن قرار دارند را به شکل یک سطح سه‌بعدی نشان دهد. در این مطالعه تولید آنزیم سلولاز توسط سویه *Bacillus aerius* با استفاده از ضایعات کشاورزی در فاز تخمیری حالت جامد مورد مطالعه قرار گرفت و تأثیر سطوح مختلف pH، رطوبت، عصاره مخمر و $MgSO_4$ به عنوان فاکتورهای مؤثر بر روی تولید آنزیم با روش طراحی آزمایش به شیوه سطح-پاسخ مورد آزمایش قرار گرفت.

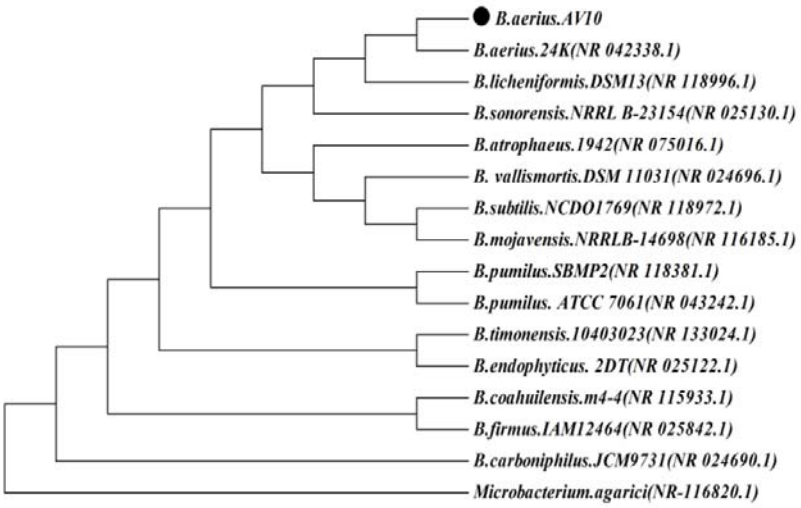
مواد و روشها

نمونه‌برداری و جداسازی باکتریهای مولد سلولاز: در این پژوهش برای جداسازی باکتریهای ترموفیل مولد آنزیم سلولاز از چشمه آبگرم گروه در شهرستان جیرفت در استان کرمان با مختصات جغرافیای ۵۷ درجه و ۵۶ دقیقه طول شرقی و ۲۹ درجه و ۵ دقیقه عرض شمالی با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد نمونه برداری صورت گرفت. بعد از تهیه محیط کشت حاوی CMC به عنوان منبع کربن از نمونه چشمه آبگرم به محیطهای مایع تلقیح شد و به مدت یک هفته در انکوباتور شیکردار در دمای ۵۰ درجه سانتی-گراد و دور ۱۵۰ rpm قرار گرفتند. ترکیبات محیط کشت در یک لیتر آب مقطر به شرح زیر است (۱۶):

carboxymethylcellulose, 0. 5; yeast extract, 0.05; $NaNO_3$, 0. 1, 1; K_2HPO_4, 0. 1; $MgSO_4$ 0.05

پلیتها در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. به وجود آمدن هاله شفاف در اطراف کلنیها در محیط حاوی CMC آگار نشانگر تولید آنزیم سلولاز است که سبب هیدرولیز کربوکسی متیل سلولز موجود در محیط شده و یک هاله شفاف ایجاد می‌نماید. برای تشخیص باکتریهای ایجادکننده هاله، پلیتها به مدت ۲۰ دقیقه در حضور معرف کنگورد ۰/۵ درصد قرار گرفته و پس از آن با NaCl یک مولار رنگبری شدند. باکتریهای ایجاد کننده هاله انتخاب و برای خالص‌سازی به محیطهای جدید منتقل شدند (۹).

شناسایی مولکولی: به منظور شناسایی مولکولی، ابتدا باکتری AV10 در محیط CMC آگار کشت داده شد. پس از رشد باکتریها جهت استخراج DNA ژنومی از روش فنل کلروفرم استفاده شد (۲۴، ۳۱). پس از انجام PCR و مشاهده نتایج بر روی ژل آگارز محصول واکنش PCR برای تعیین توالی و شناسایی مورد استفاده قرار گرفت. توالی DNA با استفاده از توالی یاب DNA توسط شرکت بیونیر (کره جنوبی) تعیین شد. سپس درخت فیلوژنی توالی سویه‌ها با توالی حاصل از جستجو در پایگاه اطلاعاتی بانک ژنی به کمک نرم افزار مگا ۴ با روش Neighbour joining رسم شد (۳۶).



شکل ۱- درخت فیلوژنی سویه *باسیلوس آرئوس* AV10 با استفاده از نرم افزار Mega4

تخمیر حالت جامد در تولید سلولاز: از سبوس گندم، سبوس برنج، کاه گندم، یونجه، ضایعات ذرت، به عنوان منبع کربنی (۱۰ درصد) استفاده شد که بعد از جمع آوری به طریق مکانیکی خرد شدند و به محیط کشت اضافه شدند. تخمیر حالت جامد در ارلنهای ۲۵۰ میلی لیتری انجام شد (۵). هر کدام از این ارلنها حاوی ۱۰ گرم سوبسترا بودند که شامل:

10.00 g, $(NH_4)_2SO_4$ 0.30 g, KH_2PO_4 0.06 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.03 g سوبسترا می‌باشد. پس از تلقیح از کشت شبانه باکتری مذکور در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ روز گرمخانه‌گذاری شدند.

استخراج آنزیم: به منظور استخراج آنزیم پس از اتمام مدت زمان موردنظر گرمخانه‌گذاری، ارلن حاوی سوبسترای تخمیر شده را توزین نموده و پس از کسر عدد به دست آمده از وزن خالی، وزن توده تخمیر شده به دست آمد. برای استخراج نمودن آنزیم ۵ برابر وزن توده تخمیر شده به ارلن آب مقطر اضافه کرده و به مدت یک ساعت در دور rpm ۱۳۰ مخلوط شد. پس از خاتمه این مدت به مدت ۱۵ دقیقه محتوای ارلن را با دور g ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ نموده و مایع موجود در ظروف سانتریفیوژ برای اندازه‌گیری میزان فعالیت سلولاز در یخچال نگهداری شد (۲۸).

سنجش آنزیمی: در سنجش آنزیمی اندوگلوکانازها (کربوکسی متیل سلولاز ، CMCase) مخلوط واکنش محتوی ۰/۵ ml محلول سوبسترا می باشد که در بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی مولار با pH ۷ آماده شده است و ml ۰/۵ محلول آنزیم که در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. بعد از انکوباسیون واکنش با اضافه‌کردن ml ۱ محلول دی نیتروسالیسیلیک اسید (DNS) متوقف شد. این نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آبگرم جوشانده می‌شوند و سپس در دمای اتاق خنک شدند (۲۶). فعالیت سلولاز کل (Fpase) با روش Ghose تعیین شد (۸). فعالیت اگزوگلوکاناز با استفاده از Avicel به عنوان سوبسترا تعیین شد. مخلوط واکنش محتوی ml ۰/۵ آنزیم و ml ۰/۵ محلول سوبستراست که در بافر سدیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار آماده شد (۲۶). یک واحد فعالیت آنزیمی عبارت است از مقدار آنزیمی که یک میکرومول گلوکز را در یک دقیقه تحت شرایط استاندارد واکنش آزاد می‌نماید.

بهینه سازی شرایط تولید آنزیم (طرح آزمایش پلاکت برمن): طرح آزمایش پلاکت برمن برای ۸ متغیر با استفاده از نرم افزار مینی تب (۱و۱۶) انجام شد. این ۸ متغیر با توجه به تحقیقات انجام شده در این زمینه شامل رطوبت،

pH، $MgSO_4$، KH_2PO_4، عصاره مخمر، سبوس برنج، کاه گندم، و ضایعات ذرت می‌باشد (۳۹). هر یک از این عوامل در دو سطح بالا (۱+) و پایین (۱-) مورد آزمایش قرار گرفتند. در مجموع ۱۲ آزمایش طراحی شد و فعالیت سلولازی اندازه‌گیری شد که در جدول ۱ نشان داده شده است. بر اساس نتایج حاصل از طراحی پلاکت برمن pH، رطوبت، $MgSO_4$ و عصاره مخمر به عنوان متغیر انتخاب شدند.

جدول ۱- سطوح متغیرهای مورد آزمایش در طرح پلاکت-برمن

Variables (%)	Low level (-1)	High level (+1)
(A) Wheat straw	5	10
(B) Corn stover	5	10
(C) Rice bran	5	10
(D) KH_2PO_4	0.04	0.08
(E) Yeast extract	0.5	2.5
(F) $MgSO_4$	0.1	0.04
(G) Moisture content	40	80
(H) pH	5	7

بهینه سازی متغیرهای انتخاب شده توسط روش سطح - پاسخ: ارزیابی و بهینه سازی شرایط کشت با استفاده از روش سطح- پاسخ (RSM) صورت گرفت. ۴ عامل و ۵ سطح مرکزی شامل ۳۰ آزمایش در مورد *باسیلوس آرئوس* مورد بررسی قرار گرفت. متغیرهای طراحی شده pH، رطوبت، $MgSO_4$ و عصاره مخمر بودند. متغیرها و سطوح آنها در جدول ۷ آورده شده است. داده‌های به دست آمده در این طرح با استفاده از نرم افزار مینی تب مدل ۱۶/۱ مدل‌سازی شده و شکلهای سه‌بعدی (منحنیهای سطح- پاسخ) جهت بررسی رابطه میان پاسخ و متغیرهای مستقل رسم شد. جهت تعیین نقطه بهینه از روش بهینه‌یابی عددی نرم‌افزار مذکور استفاده گردید. تابع پاسخ (Y) شامل تولید آنزیم با استفاده از مدل چند جمله ای درجه دوم زیر به دست آمد.

$$11.465+1205.78x_1+89.8733x_2+358.383x_3+585.625x_4-242.142x_1x_1-0.710354x_2x_2-31.9229x_3x_3-4622.29x_4x_4-1.47750x_1x_2-52.1250x_1x_3+51x_1x_4+0.24875x_2x_3-5.725x_2x_4$$

جدول ۷- طرح آزمایش و نتایج حاصل از روش سطح- پاسخ

Run	(X1) yeast extract (%)	(X2) Moisture content (%)	(X3) Initial culture pH	(X4) $MgSO_4.7H_2O$ (%)	Endoglucanase activity (U/ml)
1	1	1	1	-1	288.1
2	-1	1	-1	-1	417.9
3	-1	-1	-1	-1	334.8
4	0	0	0	0	547.3
5	0	0	0	0	547.3
6	1	1	1	1	363.7
7	-1	-1	1	1	338.3
8	1	-1	-1	-1	412.9
9	-1	1	-1	1	334.3
10	1	1	-1	-1	467.2
11	1	-1	1	1	331.8
12	0	0	0	0	547.3
13	1	1	-1	1	422.9
14	0	0	0	0	547.3
15	-1	1	1	-1	288.6
16	-1	-1	1	-1	224.9
17	-1	-1	-1	1	278.1
18	1	-1	-1	1	412.9
19	1	-1	1	-1	219.9
20	-1	1	1	1	417.9
21	0	0	-2	0	467.7

22	0	0	2	0	333.3
23	2	0	0	0	338.3
24	0	0	0	2	422.9
25	0	2	0	0	278.6
26	0	0	0	0	547.3
27	0	-2	0	0	209.5
28	-2	0	0	0	233.8
29	0	0	-2	-2	263.7
30	0	0	0	0	547.3

اثر pH و دما روی فعالیت و پایداری آنزیم سلولاز: در بررسی فعالیت دمایی آنزیم سلولاز، به ۵۰۰ میکرولیتر سوبسترا (CMC ۱ درصد) که در بافر سدیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار آماده شده است، ۵۰۰ میکرولیتر آنزیم اضافه شده و در محدوده دمایی ۹۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه گرماگذاری شدند. در بررسی پایداری دمایی آنزیم سلولاز، ۵۰۰ میکرولیتر آنزیم را به مدت ۳۰ دقیقه در دماهای مورد بررسی قرار داده وقتی همه لوله‌ها در دمای تعیین شده قرار گرفتند به همه آنها به طور همزمان ۵۰۰ میکرولیتر سوبسترا افزوده و فعالیت باقی‌مانده آنزیمی اندازه‌گیری شد (۱۶). میزان فعالیت و پایداری آنزیم سلولاز در محدوده ۱۲- ۳ pH مشابه با آنچه در بالا ذکر شد مورد بررسی قرار گرفت. بافرهای به کار رفته برای تهیه pH مختلف عبارت بودند از استات سدیم: ۵، ۴ pH (جرم‌مولکولی = ۸۲/۰۴) سدیم فسفات:۶، ۷، pH (جرم‌مولکولی= ۱۷۴/۱۸) تریس باز: ۸، ۹، ۱۰ pH (جرم‌مولکولی = ۱۲۱/۰۴)

نتایج و بحث

شناسایی مولکولی: بعد از تعیین توالی، برای محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز سویه در مقایسه با سایر ژنهای - 16S rRNA، موجود در مرکز ملی بیوتکنولوژی درخت فیلوژنتیکی رسم گردید. رسم درخت فیلوژنتیک با استفاده از نرم افزارمگا ۴ با روش Neighbour joining انجام شد (شکل۱). این سویه با جنس و گونه *باسیلوس آرئوس* همسانی بیش از ۹۸ درصد دارد. در مطالعات پیشین انواع متنوعی از جنسها برای تولید سلولاز از جمله *باسیلوس سوبتیلیس* (۱۸)، *مارینوباکتر* (۳۲) و *پنی سیلیوم* (۱۲) گزارش شد.

تعیین بهترین منبع کربن در تولید آنزیم: همان‌طور که در جدول ۲ دیده می‌شود، از بین ضایعات کشاورزی مورد مطالعه محیط حاوی کاه گندم بیشترین تولید آنزیم را نشان داد که در مرحله بعدی به عنوان سوبسترا مورد استفاده قرار گرفت. با توجه کشت انبوه گندم در کشور و فراوانی این محصول فرعی کشاورزی در کشور، استفاده از آن به عنوان یک سوبسترا ارزان و در دسترس برای تولید آنزیم سلولاز بسیار قابل‌توجه می‌باشد. لی و همکاران دریافتند که سبوس برنج بهترین منبع کربن برای رشد سلول و تولید سلولاز به وسیله *باسیلوس سوبتیلیس* A-5 است (۲۰). جو و همکاران، مایند و همکاران گزارش کردند که پوسته برنج و سبوس برنج بهترین زیست‌توده کشاورزی برای تولید CMCase به وسیله *باسیلوس آمیلولیکوفاسیئنس* DL3 (۱۳) و *باسیلوس* sp (۲۵) است.

جدول ۲- اثر منابع کربنی در تولید آنزیم

Substrate	Activity (%)	Dry cell mass ($mg.ml^{-1}$)
Alfalfa straw	57 ± 0.9	66
Corn stover	79 ± 0.8	80
Wheat straw	100 ± 1.2	34
Rice bran	80 ± 1.2	37
Wheat bran	53 ± 1.1	34

طرح آزمایش پلاکت برمن: بر اساس داده‌های موجود در جدول ۳ تنوع گسترده‌ای در فعالیت آنزیم سلولاز در ۱۲ آزمایش طراحی شده وجود دارد. این متغیرها اهمیت بهینه-سازی پارامترهای تخمیری برای رسیدن به تولید بالاتر را

نشان می‌دهند. همان‌طور که در جدول ۴، ۵ و ۶ مشاهده می‌کنید این فاکتورها شامل pH، رطوبت، $MgSO_4$ و عصاره مخمر می‌باشند که با *P* values کمتر از ۰/۰۵ اثرات مثبت قابل توجهی بر فعالیت هر سه نوع سلولاز نشان می-دهند. بهینه‌سازی ترکیبات محیط کشت (سبوس برنج، عصاره مخمر، سولفات منیزیم و پتاسیم فسفات) با استفاده از پلاکت برمن و طرح ترکیبی مرکزی از *باسیلوس کربنیفیلوس* CAS1 گزارش شده است (۱). بازده CMCase تولید شده در این مطالعه بسیار بیشتر از CMCase تولید شده به وسیله سایر باکتریهاست. گزارشهای قبلی نشان داده‌اند که رطوبت و دما اثر قابل توجهی روی فعالیت آنزیم *تریکودرمارسی* ATCC 26921 و *آسپرژیلوس اوریزا* ATCC 12892 داشته است (۴). علاوه بر این رطوبت و دما به عنوان پارامتر مؤثر به وسیله *تریکودرما رسی* MCG77 گزارش شده است (۱۹).

جدول ۳- طرح آزمایش پلاکت-برمن برای ۸ متغیر و نتایج فعالیت سلولازها در تخمیر حالت جامد

Run	A	B	C	D	E	F	G	H	Endoglucanase activity (U/ml)	FPA (U/ml)	Exoglucanase activity (U/ml)
1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	126.4	51.7	76.6
2	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	49.8	5.0	24.9
3	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	101.5	26.9	51.7
4	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	204.0	124.4	149.3
5	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	223.9	120.0	149.3
6	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	194.0	119.4	144.3
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	104.5	29.9	54.7
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	84.6	10.0	34.8
9	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	139.3	114.4	139.3
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	117.9	43.3	68.2
11	1	1	1	-1	1	1	-1	1	217.9	143.3	168.2
12	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	84.6	14.4	39.3

جدول ۴- طرح آزمایش پلاکت-برمن برای فعالیت اندوگلوکاناز

Term	Effect	Coef	SE Coef	T	P
Constant		137.35	3.084	44.54	0.000
(A) W.S	-16.17	-8.08	3.084	-2.62	0.079
(B) C.S	-5.72	-2.86	3.084	-0.93	0.422
(C) R.B	-5.72	-2.86	3.084	-0.93	0.422
(D) KH_2PO_4	29.44	14.72	3.084	4.77	0.017
(E) Yeast extract	51.16	25.58	3.084	8.30	0.004
(F) $MgSO_4$	46.85	23.42	3.084	7.6	0.005
(G) Moisture content	-50.00	-25	3.084	-8.11	0.004
(H) pH	62.94	31.47	3.084	10.21	0.002

جدول ۵- طرح آزمایش پلاکت-برمن برای فعالیت اگزوگلوکاناز

Term	Effect	Coef	SE Coef	T	P
Constant		66.88	5.513	12.13	0.001
(A) W.S	-14.69	-7.35	5.513	-1.33	0.275
(B) C.S	-12.34	-6.7	5.513	-1.12	0.345
(C) R.B	12.5	6.25	5.513	1.13	0.339

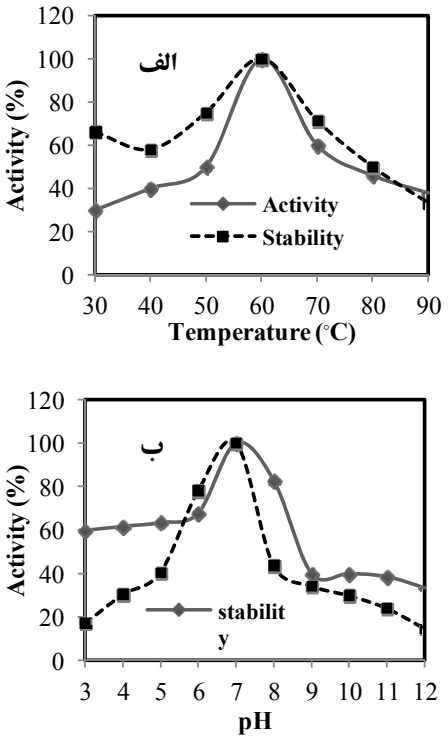
(D) KH_2PO_4	11.21	5.61	5.513	1.02	0.384
(E) Yeast extract	51.18	25.59	5.513	4.64	0.019
(F) $MgSO_4$	36.88	18.44	5.513	3.34	0.044
(G) Moisture content	-40.23	-20.12	5.513	-3.65	0.036
(H) pH	59.80	29.90	5.513	5.42	0.012

جدول ۶- طرح آزمایش پلاکت-برمن در تعیین فعالیت Fpase

Term	Effect	Coef	SE Coef	T	P
Constant		91.71	5.307	17.28	0.000
(A) W.S	-16.25	-8.13	5.307	-1.53	0.223
(B) C.S	-12.44	-6.22	5.307	-1.17	0.326
(C) R.B	10.95	5.47	5.307	1.03	0.378
(D) KH_2PO_4	12.77	6.38	5.307	1.2	0.315
(E) Yeast extract	52.74	26.37	5.307	4.97	0.016
(F) $MgSO_4$	36.98	18.49	5.307	3.48	0.04
(G) Moisture content	-40.13	-20.07	5.307	-3.78	0.032
(H) pH	61.36	30.68	5.307	5.78	0.01

بهینه سازی متغیرهای انتخاب شده توسط روش سطح - پاسخ: بر اساس نتایج حاصل از طراحی پلاکت برمن (جدول های ۲، ۳، ۴ و ۵) pH، رطوبت، $MgSO_4$ و عصاره مخمر به عنوان متغیرهای تأثیرگذار در فعالیت آنزیم انتخاب شدند. روش سطح- پاسخ برای بهینه‌سازی متغیرهای انتخاب شده انجام شد. شرایط بهینه برای تولید آنزیم با استفاده از pH، رطوبت، عصاره مخمر و $MgSO_4$ بر روی پارامتر تولید آنزیم با استفاده از تکنیک بهینه‌سازی عددی نرم افزار مینی‌تب انجام شد. در حالت بهینه بیشترین مقدار تولید آنزیم ۵۶۱/۱۲۰۳ به دست آمد. مقادیر متغیرهای مستقل در شرایط بهینه تولید آنزیم برای رطوبت، عصاره مخمر و $MgSO_4$ و pH به ترتیب ۶۱/۴۱۴۱، ۱/۶۵۱۵، ۰/۲۹۸۰ و ۶/۲۹۲۹ (unit/ml) به دست آمد.

بهینه‌سازی سطوح پاسخ چندگانه: یکی از اهداف عمده تحقیقات سلولازی کاهش هزینه‌های تولید آنزیم به وسیله بهینه‌سازی پارامترهای فرآیند است. این روش یک روش ریاضی طراحی آزمایشها، ساخت مدلها، تعیین تأثیر چندین عامل و جستجوی شرایط بهینه برای پاسخهای مورد نیاز است. بر طبق مطالعات پیشین، بهینه‌سازی ترکیبات محیط کشت برای محاسبه اثر بر همکنش گزیلوز، عصاره گوشت، سدیم کلراید، pH و دما در تولید سلولاز به وسیله *باسیلوس* VITRKHB مورد مطالعه قرار گرفته است (۳۴). نمودارهای سه بعدی پاسخ وقتی دو تا از متغیرها در سطح مرکزی ثابت و دو تای دیگر تغییر می‌کند در شکل ۲ نشان داده شده است.

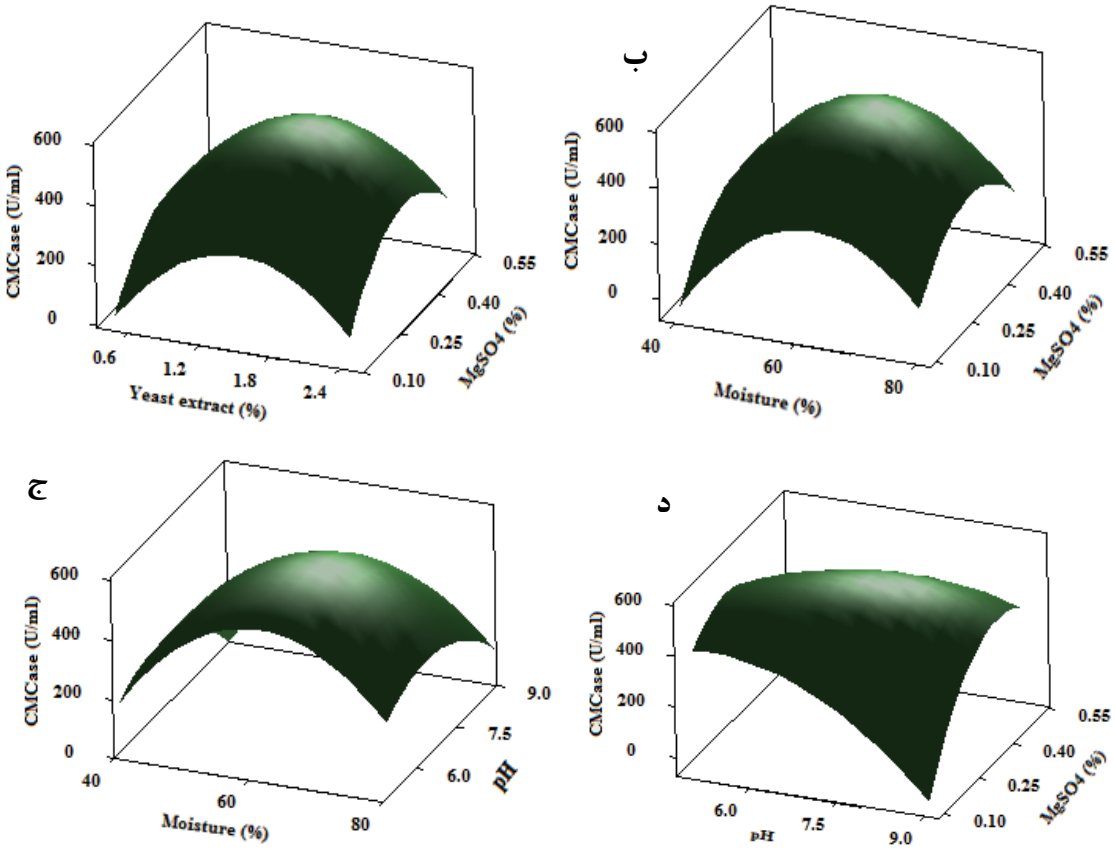


شکل ۲- اثر دما و pH بر فعالیت و پایداری آنزیم سلولاز

این نمودارها نشان می‌دهند که pH، رطوبت، $MgSO_4$ و عصاره مخمر تولید آنزیم را تحت تأثیر قرار می‌دهند. نمودارهای سه بعدی حاصله در این آزمایش از نوع نمودارهای حداکثر است و می‌تواند میزان حداکثر پاسخ را در محدوده انتخابی نشان دهد.

رابطه متغیرها در تولید آنزیم: در شکل ۲-الف نمودار سه بعدی مرتبط به دو عامل $MgSO_4$ و رطوبت نشان داده شده است. با افزایش محتوای رطوبت تا ۶۰ درصد و $MgSO_4$ تا ۰/۲۹ میزان تولید CMCase افزایش می‌یابد. در تحقیقی که توسط لطیفیان ارائه شده است، نتایج نشان می‌دهد که بیشترین فعالیت سلولاز عمدتاً در بیشترین سطح محتوای رطوبتی (۷۰ درصد) می‌باشد (۱۹) که این نتایج بسیار به نتایج گزارش شده توسط سلولازهای قارچی شباهت دارد (۱۱، ۱۴ و ۲۸). در شکل ۲-ب نمودار سه بعدی مربوط به دو عامل عصاره مخمر و $MgSO_4$ نشان داده شده است. با افزایش میزان عصاره مخمر و $MgSO_4$ میزان تولید CMCase در نقطه مرکزی به حداکثر میزان خود می‌رسد. در شکل ۲-ج نمودار سه بعدی مربوط به دو عامل pH و رطوبت نشان داده شده است. با افزایش میزان رطوبت تا ۶۰ درصد و تأثیر گذاری کمتر pH میزان تولید CMCase در نقطه مرکزی افزایش قابل توجهی نشان داده است. سانی و همکاران با استفاده از کاه برنج به عنوان سوبسترا و محتوای رطوبتی ۷۵ درصد به بیشترین میزان تولید اندوگلوکاناز (۲۴۰/۲) با استفاده از قارچ آسپرژیلوس فومیگاتوس رسیدند (۳۵). در شکل ۲-د نمودار سه بعدی مربوط به دو عامل pH و $MgSO_4$ نشان داده شده است با کاهش میزان pH و افزایش غلظت $MgSO_4$ میزان تولید CMCaseدر نقطه مرکزی به حداکثر مقدار خود می‌رسد. در تحقیقی که توسط کانگ و همکارانش با استفاده از کاه برنج به عنوان سوبستر ارائه شد، بیشترین میزان تولید CMCase (۱۲۹ درصد) عمدتاً در محتوای رطوبتی ۶۵ درصد و pH ۷ مشاهده شد (۱۵). ضریب تعیین کلی ۹۸/- ۹۷ نشان می‌دهد که مدل رگرسیونی واکنش را به خوبی توصیف می‌کند و می‌تواند تغییرات کلی را در درون محدوده مقادیر مورد مطالعه توضیح دهد. هر چه قدر این مقدار به یک نزدیک‌تر باشد، مدل بهتر پاسخ را پیش‌بینی می‌کند. مقایسه تولید آنزیم سلولاز در شرایط بهینه شده با بالاترین میزان تولید شده (۵۶۱/۱۲۰۳) نشان می‌دهد که با بهینه سازی به روش سطح- پاسخ میزان تولید آنزیم ۸/۲ افزایش می‌یابد.

اثر pH و دما روی فعالیت و پایداری آنزیم سلولاز: همان‌طور که در شکل ۳- الف نشان داده شده است بهینه فعالیت و پایداری آنزیمی در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، برای هیدرولیز کاه گندم مشاهده شد. به طوری که از دمای ۳۰ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد روند افزایش فعالیت آنزیم مشاهده شد. آنزیم سلولاز در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد ۴۰ درصد کاهش فعالیت داشت. روند کاهش فعالیت آنزیم در دماهای بالاتر ادامه داشت به طوری که در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد ۴۶ درصد فعالیت بهینه آنزیمی مشاهده شد. این دمای بهینه بیشتر از CMCase تولید شده به وسیله *باسیلوس* sp بود (۳۷) و مشابه سلولاز تولید شده به وسیله *باسیلوس مگاتریوم* بود (۱۷). در مطالعه‌ای بر روی سلولاز خالص‌سازی شده از *باسیلوس پومیلوس*EB3 (۳) و *باسیلوس* L1 (۲۱) ماکزیمم فعالیت آنزیم در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد. همان‌طور که در شکل ۳-ب نشان داده شده است بیشترین فعالیت و پایداری آنزیم در ۷-pH مشاهده شد در ۹ pH فعالیت آنزیم به میزان قابل توجهی کاهش یافت و در بازه ۱۲-۹ تقریبا ۳۰ درصد از فعالیت بهینه آنزیم مشاهده شد. این pH بهینه پایین‌تر از CMCase گزارش شده از *باسیلوس هالودورانس* است (۲). در بررسی سلولاز جدا شده از باکتری *باسیلوس پومیلوس*EB3 مشخص شد که فعالیت بهینه آنزیم در ۶ pH بوده است (۳) و در *باسیلوس آمیلولیکوفاسیئنس* DL3 در ۷ pH مشاهده شد (۱۱).



شکل ۳-الف) نمودار سه بعدی اثر متقابل محتوای رطوبتی و غلظت‌های مختلف $MgSO_4$ بر میزان تولید CMCase. شکل ۳-ب) نمودار سه بعدی اثر متقابل عصاره مخمر و $MgSO_4$ بر میزان تولید CMCase شکل ۳-ج) نمودار سه بعدی اثر متقابل $MgSO_4$ و pH بر میزان تولید CMCase شکل ۳- د نمودار سه بعدی اثر متقابل محتوای رطوبت و pH بر میزان تولید CMCase. در شرایطی که دو متغیر در نقطه مرکزی ثابت نگه داشته شدند

نتیجه‌گیری کلی

استفاده از ضایعات کشاورزی برای تولید آنزیم سلولاز در فاز تخمیری حالت جامد امروزه توجه زیادی را به خود جلب کرده است که نشان می‌دهد این مواد حاوی ترکیبات با ارزشی است و می‌تواند به تولید مواد با ارزش افزوده بیانجامد. در طی این تحقیق یک سویه بومی که دارای فعالیت سلولازی مناسب می‌باشد از چشمه آبگرم جداسازی گردیده و بعد از تعیین توالی ژن ۱۶S rRNA *باسیلوس آرئوس* AV10 نامگذاری گردید. نتایج حاصل از این تحقیق بیانگر کارآیی مفید روش سطح-پاسخ در بهینه-سازی شرایط تولید آنزیم سلولاز گرما دوست می‌باشد. از میان شرایطی که برای تولید آنزیم اعمال شد pH (۶/۲ درصد)، $MgSO_4$ (۰/۲۹ درصد)، رطوبت (۶۱/۴ درصد) و عصاره مخمر (۱/۶۵ درصد) نسبت به سایر فاکتورها تأثیر زیادی بر تولید آنزیم داشته به طوری‌که میزان تولید تا ۸/۲ برابر افزایش پیدا کرد. سوبسترای مورد استفاده در این مطالعه کاه گندم می‌باشد که با توجه به هزینه بالای تولید آنزیم اقتصادی بودن فرآیند تولید را توجیه می‌کند.

جدول ۸- نتایج جدول آنالیز واریانس (ANOVA) مدل سطح-پاسخ معادله درجه دوم

Source	*df*	SS	MS	F	P
Model	14	344764	246226	48/04	0.000
Linear	4	69693	17423	33/99	0.000
Square	4	238979	59745	116/56	0.000
Intraction	6	36092	6015	11/74	0.000
Residual error	14	7176	513	-	-
Lack of fit	10	7176	718	-	-
Pure error	4	0	0	-	-
TOTAL	29	355445	45	-	-

جدول ۹- نتایج جدول آنالیز واریانس (ANOVA) مدل سطح-پاسخ معادله درجه دوم

	Response	Optimal	High	Low	Variables
561.1203	CMCase maximum	1.6515	2.5	0.5	Yeast extract
		61.4141	80	40	Moisture
		6.2929	9	5	pH
		0.2980	0.5	0.1	$MgSO_4$

منابع

1-Annamalai N, Rajeswari MV, Balasubramanian T. (2014) Enzymatic saccharification of pretreated rice straw by cellulase produced from *Bacillus carboniphilus* CAS 3 utilizing lignocellulosic wastes through statistical optimization. Biomass Bioenerg. 68: 151–160.

2-Annamalai N, Rajeswari MV, Elayaraja S, Balasubramanian T. (2013) Thermostable, haloalkaline cellulase from *Bacillus halodurans* CAS 1 by conversion of lignocellulosic wastes. Carbohy. Polym. 94: 409–415.

3-Ariffin H, Abdullah N, Umi-Kalsom MS, Shirai Y, Hassan MA. (2006) Production and characterization of cellulase by *Bacillus pumilus* EB3. Eng technol. 3: 47-53.

4-Brijwani K, Oberoi HS, Vadlani PV. (2010) Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. Process Biochem. 45(1):120–128

5-Asha-Poorna C, Prema P. (2007) Production of cellulase-free endoxylanase from novel alkalophilic thermotolerent *Bacillus pumilus* by solid-state fermentation and its application in wastepaper recycling. Bioresour. Technol. 98:485–490.

6-Cen PL, Xia LM. (1999) Production of cellulase by solid-state fermentation. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 65: 68–92.

7-El-Bakry M, Abraham J, Cerda A, Barrena R, Ponsá S, Gea T, Sánchez T. (2015) From wastes to high value added products: novel aspects of SSF in the production of enzymes. Crit. Review. Environ. Sci. Technol. 45 (18): 1999–2042.

8-Ghose TK. (1987) Measurement of cellulose activities. Pure Appl. Chem. 59(2):257-268

9-Hart TD, Leij DF, Kinsey G, Kelley J, Lynch JM. (2002) Strategies for the isolation of cellulolytic fungi for composting of wheat straw. World J. Microbiol. Biotechnol. 18: 471–480.

10-Ibrahim ASS, El-Diwany AI. (2007) Isolation and identification of new cellulases. Astrralian Aust. J. basic appl. sci. 1: 473-478.

11-Jecu L. (2000) Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. Ind. Crop. Prod. 11: 1- 5.

12-Jeya M, Joo AR, Lee KM, Sim WI. Oh DK, Kim YS. (2010) Characterization of endo-b-1,4-glucanase from a novel strain of *Penicillium pinophilum* KMJ601. Appl. Microbiol. Biotechnol. 85:1005–1014.

13-Jo KI, Lee YJ, Kim BK, Lee BH, Jung CH, Nam SW. (2008) Pilot-scale production of carboxymethylcellulase from rice hull by *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3. Biotechnol. Bioprocess. Bioen. 13: 182-88.

14-Kalogeris E, Iniotak F, Topakas E, Christakopoulos P, Kekos D, Macris BJ. (2003) Performance of intermittent agitation rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw. Bioresour. Technol. 86: 207-213.

15-Kang SW, Park YS, Lee JS, Hong SI, Kim SW. (2004) Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. Bioresour. Technol. 91(2):153–156.

16-Kasana RC, Salwan R, Dhar H, Dutt S, Gulati A. (2008) A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on Agar plates using gram's iodine. Curr. Microbiol. 55: 503–507.

17-Kim H, Pack MY. (1988) Endo-b-1, 4-glucanase encoded by *Bacillus subtilis* gene cloned in *Bacillus megaterium*. Enz. Microb. Technol. 10: 347–351.

18-Kim BK, Lee BH, Lee YJ, Jin IH, Chung CH, Lee JW. (2009) Purification and characterization of carboxymethylcellulase isolated from a marine bacterium, *Bacillus subtilis* subsp. subtilis A-53. Enz. Microb. Technol. 44: 411-416.

19-Latifian M, Esfahani ZH, Barzegar M. (2007) Evaluation of culture conditions for cellulase production by two *Trichoderma reesei* mutants under solid-state fermentation conditions. Bioresour. Technol. 98(18):3634-3637

20-Lee BH, Kim BK, Lee YJ, Chung CH, Lee JW. (2010) Industrial scale of optimization for the production of carboxymethylcellulase from rice bran by a marine bacterium, *Bacillus subtilis* subsp. subtilis A-53. Enz. Microb. Technol. 46: 38-42.

21- Li X, Yu HY. (2012) Purification and characterization of an organic-solvent-tolerant cellulase from a halotolerant isolate, *Bacillus* sp. L1. J Ind Microbiol Biotechnol. 39:1117-124.

22-Li XH, Yang HJ, Roy B, Park EY, Jiang LJ, Wang D, Miao YG. (2010) Enhanced cellulase production of the *Trichoderma viride* mutated by microwave and ultraviolet. Microbiol Res. 165(3):190-198.

23-Lin Y, Tanaka S. (2006). Ethanol fermentation from biomass resources: Current state and prospects. Appl. Microbiol. Biotechnol. 69: 627-642.

24-Marmur JA. (1961) Procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. J. Mol. Biol. 3 (2): 208-218.

25-Mayende L, Wilhelmi BS, Pletschke BI. (2006) Cellulases (CMCases) and polyphenol oxidases from thermophilic *Bacillus* sp. isolated from compost. Soil. Biol. Biochem. 38: 2963-966.

26-Miller GL, Blum R, Glennon W, Burto AL. (1960) Measurement of carboxymethyl cellulase activity. Anal Biochem.1: 127-32.

27-Oksanen T, Pere J, Paavilainen L, Buchert J, Viikari L. (2000) Treatment of recycled Kraft pulps with *Trichoderma reesei* hemicellulases and cellulases. J. Biotechnol. 78(1):39-48.

28-Panagiotou, G., Kekos, D., Macris, B. J. and christakopoulos, P. (2003). Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. Ind. Crop. Prod.18: 37-45.

29-Pandey A, Soccol CR, Nigam P, Brand D, Mohan R, Roussos S. (2000) Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. Biochem. Eng. J. 6: 153–162.

30-Percival-Zhang YH, Himmel ME, Mielenz JR. (2006) Outlook for cellulose improvement: Screening and selection strategies. Biotechnol. Adv. 24: 452–481.

31-Sambrook J, MacCallum P, Russell D. (2001) Molecular Cloning: A laboratory manual. Bioscience and Medicine. 2:16-9.

32-Shanmughapriya S, Seghal-Kiran G, Selvin J, Thomas TA Rani C. (2010) Optimization, purification, and characterization of extracellular mesophilic alkaline cellulase from sponge associated *Marinobacter* sp. MSI032. Appl. Biochem. Biotechnol. 162: 625-640.

33-Shuler ML, Kargi F. (2002) Bioprocess Engineering: Basic principle, second ed. Prentice Hall PTR, USA.

34-Singh, K, Richa K, Bose H, Karthik L, Kumar G, Rao KVB. (2014) Statistical media optimization and cellulase production from marine Bacillus VITRKHB. 3 Biotech 4: 591–598.

35-Soni R, Nazir A, Chadha BS. (2010) Optimization of cellulase production by a

versatile *Aspergillus fumigatus* fresenius strain (AMA) capable of efficient deinking and enzymatic hydrolysis of Solka floc and bagasse. Ind. Crop. Prod. 31(2):277–283.

36-Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. (2007) MEGA4: molecular evolutionary. Genetics analysis (MEGA) software version 4.0, Mol. Biol. Evol. 24 (8): 1596-1599.

37-Vijayaraghavan P, Vincent SGP. (2012) Purification and characterization of carboxymethyl cellulase from a *Bacillus* sp. isolated from a paddy field. Polish J. Microbiol. 61 (1): 51–55.

38-Xia WS, Liu P, Liu J. (2008) Advance in chitosan hydrolysis by nonspecific cellulases. Bioresour. Technol. 99 (15):6751–6762.

39-Zhang H, Sang Q, Zhang W. (2012) Statistical optimization of cellulases production by *Aspergillus niger HQ-1* in solid-state fermentation and partial enzymatic characterization of cellulases on hydrolyzing chitosan. Ann Microbiol. 62:629‑645.

Statistical optimization of Cellulase production by *Bacillus aerius* AV10 in solid-state fermentation of cellulosic wastes and it,s partial characterization

Azadian-Kharanjani F.[1,2], Badoei-Dalfard A.[1] and Karami Z.[1]

[1] Biology Dept., Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, I.R. of Iran

[2] Young Researcher's Society, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, I.R. of Iran

Abstract

Cellulases are important industrial enzymes for the most bioconversion processes. In this study, *Bacillus aerius* isolated and identification as the best thermophilic cellulose degrading bacterium from Gorooh hot spring and was identified as *Bacillus aerius* AV10 based on 16S rRNA sequence homology and microbial-biochemical tests. Cultivation conditions of cellulase production by *Bacillus aerius* AV10 in solid-state fermentation (SSF) were investigated. The moisture content, yeast extract, $MgSO_4$ and initial culture pH were identified by Plackett-Burman design (PBD) as the significant factors for endoglucanase, exoglucanase and filter paper (FPA) activities. Response surface Methodology and central composite design by 5-level and 4-factor were used for the optimization of enzyme. The optimal ranges of moisture content, yeast extract, $MgSO_4$ and initial culture pH were 61.4%, 1.65%, 0.29% and 6.2, respectively. Under the optimized conditions, maximum CMCase production was 561.12 U/ml. The optimal pH and temperature of the enzyme for wheat straw hydrolysis were determined to be 7.0 and 60 °C.

Key words: Plackett-Burman design, Thermophilic, Solid-state fermentation, Wheat straw