DOI: 10.22034/cmr.2025.2295 مقاله پژوهشی، صفحات ۱۴۲-۱۲۷

بهینه‌سازی محیط کشت *باسیلوس* سویه AGh1 جهت تولید آنزیم اندو-۱،۴-بتا- دی-گلوکاناز و تعیین ویژگی‌های آن

حسن دیبا[۱]، جعفر همت[۱*]، محسن واعظ[۱] و آرون گویال[۲]

[۱] ایران، تهران، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده زیست‌فناوری

[۲] هند، آسام، گواهاتی، موسسه فناوری گواهاتی هند، گروه علوم زیستی و مهندسی زیستی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۱۹

چکیده

آنزیم اندو-۱،۴-بتا-دی-گلوکاناز مقاوم به حرارت که به عنوان آنزیم چگالی‌انداز در تجزیه سلولز شناخته می‌شود، یکی از آنزیم-های پرکاربرد در صنعت به شمار می‌آید. در این پژوهش، پایداری حرارتی آنزیم اندو-۱،۴-بتا-دی-گلوکاناز حاصل از *باسیلوس* سویه AGh1 که از چشمه آبگرم استان اردبیل جداسازی شده بود، بررسی شد. سپس تولید آنزیم طی دو مرحله بهینه سازی گردید. نخست، سبوس برنج و عصاره مخمر به عنوان عوامل اثر گذار بر تولید آنزیم توسط آزمون پلکت- برمن، تعیین و سپس محیط کشت با روش سطح پاسخ بهینه‌سازی شد. مقدار بهینه این دو منبع اثر گذار بر تولید آنزیم شامل به‌ترتیب ۵۸/۸ و ۱۴/۸۷ گرم در لیتر مشخص شد. آنزیم در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و pH ۶ الی ۱۰ ، ۸۳ الی ۹۴ درصد پایداری خود را حفظ کرد. دما و pH بهینه برای فعالیت آنزیم به ترتیب ۷۰ درجه سانتی‌گراد و ۵/۶ بود. در این شرایط فعالیت آنزیم ۰/۱۲ ± ۱۰/۱۶ میکرومول در دقیقه در میلی‌لیتر بود. در این پژوهش مشخص شد که باکتری *باسیلوس* سویه AGh1 توان تولید آنزیم اندو-۱،۴-بتا-دی-گلوکاناز با فعالیت نسبتاً مناسب با استفاده از ماده اولیه سبوس برنج به عنوان پسماند صنایع کشاورزی و ارزان دارد. با توجه به فعالیت مطلوب و خصوصیت مقاومت حرارتی آنزیم در دامنه وسیع pH، آنزیم تولیدی به عنوان آنزیمی با پتانسیل کاربرد بالا معرفی شد که نیازمند مطالعات تکمیلی است.

کلمات کلیدی: *باسیلوس*، سلولاز، پایداری حرارتی، اندو-۱،۴-بتا-دی-گلوکاناز

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: j.hemmat@gmail.com

مقدمه

بیشترین مقدار پلی‌مر زیستی موجود روی زمین مربوط به ترکیبات سلولزی است (۱۲، ۲۱) که تولید تقریبی ۱۰۰ میلیارد تن در سال را به همراه دارند (۱۲). سلولز در طبیعت بین گیاهان، جلبک‌ها و قارچ‌ها دیده می شود (۱۳)، به‌طوریکه حدود ۴۰ درصد ترکیبات کربن دار را به عنوان عنصر ساختمانی و شکل دهنده دیواره سلولی در گیاهان به خود اختصاص داده است (۱۲). سلولازها که ترکیبات سلولزی را می شکنند، یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های صنعتی برای اکثر فرآیندهای تبدیل زیستی به شمار رفته (۱) و در صنایع مختلف نظیر غذا و نوشیدنی، غذای حیوانات، نساجی، چرم، کاغذ و خمیر کاغذ کاربرد وسیعی دارند. پلی‌مر سلولز را می‌توان به عنوان منبع ارزشمندی از گلوکز یا دیگر ترکیبات مونو و اولیگوساکاریدی قابل تخمیر در تولید حلال‌های اتانول، استون و بوتانول نیز دانست. آنزیم‌های سلولازی که فیبر سلولزی را می‌شکنند، به‌صورت خارج سلولی عمل کرده و برای این منظور فعالیت سه آنزیم اندو-۱،۴-بتا-دی-گلوکاناز (EC 3.2.1.4)(Endo-1,4-β-D-glucanase)، اگزو-۱،۴- بتا-دی- گلوکاناز (EC 3.2.1.91)(Exo-1,4-β-D-glucanase) و بتا-گلوکوزیداز (EC 3.2.1.21)(β-glucosidase) به صورت متوالی و به‌صورت

DOI: 10.22034/cmr.2025.2295

هم افزا (Synergistic action) عمل می‌کنند (۱۱، ۶). از آنجاییکه آنزیم اندو-۴،۱-بتا-دی-گلوکاناز به‌صورت تصادفی به بخش‌های داخلی بی‌شکل زنجیره سلولزی حمله کرده و زنجیره‌های جدید الیگوساکاریدی با طول‌های متفاوت ایجاد می‌کند، بین سلولازها به آنزیم چگالی انداز معروف بوده و بیشترین کاربرد را در صنایع دارد (۱۷).

با توجه به اینکه دمای بالا تأثیر به‌سزایی در کاهش ویسکوزیته و افزایش حلالیت بسیاری از ترکیبات، بالاخص ترکیبات خاص پلی‌مری دارد، بازدهی واکنش در دمای بالا بیشتر بوده و بسیاری از واکنش‌های صنعتی مرتبط با پلی‌مرها در دمای بالا انجام می شوند (۱۷، ۲۰). بسیاری از آنزیم‌هایی که در دمای بالا فعال هستند، از میکروارگانیسم‌های ترموفیل یا ترموتولرنت به دست آمده اند. چنین میکروارگانیسم‌هایی که بر شرایط سخت فایق می‌آیند، دارای ویژگی‌های خاص از جمله آنزیم‌های جدید و مسیرهای بیوشیمیایی ویژه هستند (۷، ۲۵) که احتمال داشتن ویژگی‌های متناسب با فرآیندهای صنعتی در آنزیم‌های حاصل از آنها را بالا می‌برد (۲۹).

مطالعاتی در زمینه دست‌یابی به آنزیم‌های پایدار در دمای بالا از میکروارگانیسم‌های ترموفیل یا ترموتولرنت حاصل از چشمه‌های آب‌گرم انجام شده است. موزدا و همکاران فعالیت سلولازی حاصل از دو سویه *باسیلوس* CH43 (*Bacillus* sp. CH43) و HR68 (*Bacillus* sp. HR68) جدا سازی شده از چشمه‌های آب‌گرم زیمباوه را بررسی کرده و بیان داشتند که بهینه این فعالیت در pH ۵ الی ۶/۵ و به ترتیب در دمای ۶۵ و ۷۰ درجه سانتی‌گراد بود. (۱۹). عزیزی و همکاران باکتری *ایزوپتریکولا واریابیلیس* IDAH9 (*Isoptericola variabilis*) را از چشمه‌های آب‌گرم دهلران در ایلام جداسازی کردند و به بهینه‌سازی محیط کشت این سویه جهت بهبود تولید آنزیم اندو-۴،۱-بتا-دی-گلوکاناز پرداختند و بیان کردند که این میکروارگانیسم بیشترین میزان تولید سلولاز را در غلظت ۹ گرم در لیتر CMC، ۵/۶ گرم در لیتر آمونیوم سولفات، ۰/۶ درصد توئین ۸۰ و ۲ درصد سوکروز دارد. همچنین بیان داشتند که آنزیم تولیدی پایداری ۱ ساعته در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد دارد (۴). آزاد یان و همکاران که سویه *باسیلوس لچینیفورمیس* AMF-07 (*Bacillus licheniformis*) را از یکی از چشمه‌های آب‌گرم استان کرمان جداسازی کرده اند، بیان نموده اند که آنزیم اندو-۴،۱-بتا-دی-گلوکاناز حاصل از این سویه در رنج وسیع دما و pH به ترتیب ۴۰ تا ۸۰ درجه سانتی گراد و ۶ الی ۱۰ فعال بوده و دما و pH بهینه به ترتیب ۷۰ درجه سانتی‌گراد و ۹ دارد (۳). شاجهان و همکاران باکتری ترموفیل *باسیلوس لچینیفورمیس* (*Bacillus licheniformis*) تولید کننده آنزیم سلولاز را از یکی از چشمه‌های آب‌گرم در هند جدا سازی کرده و پس از بهینه‌سازی محیط کشت با RSM میزان فعالیت آنزیم سلولاز را تا ۳ برابر افزایش دادند. (۲۶). ایرفان و همکاران سویه باکتریایی *باسیلوس آمیلولیکوئیفشیانس* AK9 (*Bacillus amyloliquefaciens*) را از چشمه آب گرم تاتاپانی در کشمیر پاکستان جداسازی کردند که اندو-۴،۱-بتا-دی-گلوکاناز حاصل از این سویه در رنج وسیع دما و pH به ترتیب ۵۰ تا ۷۰ درجه سانتی گراد و ۳ الی ۶ فعال بوده و حداکثر پایداری آن در دما و pH بهینه برای فعالیت آنزیم به ترتیب ۵۰ درجه سانتی‌گراد و ۵ گزارش کرده اند (۱۵). در این پژوهش جهت بررسی امکان استفاده از قابلیت‌های *باسیلوس* سویه AGh1 که از قبل جدا سازی شده بود (۸)، پایداری حرارتی آنزیم اندو-۴،۱-بتا-دی-گلوکاناز حاصل از آن در pHهای مختلف بررسی شد. سپس بهینه‌سازی محیط کشت باکتری با استفاده از پسماند صنایع کشاورزی به عنوان منابع ارزان قیمت جهت تولید اقتصادی و بیشتر آنزیم اندو-۴،۱-بتا-دی-گلوکاناز انجام شد. پس از آن، فعالیت های بتا-گلوکوزیدازی و بررسی فیلتر کاغذی حاصل از این سویه نیز مطالعه شد.

مواد و روشها

دست‌یابی به سویه باکتریایی: سویه باکتریایی *باسیلوس*

DOI: 10.22034/cmr.2025.2295

AGh1 که از قبل جداسازی شده بود و محیط مندل و گلیسرول ۱۵ در صد در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی گراد نگهداری می‌شد (۸)، در این پژوهش استفاده شد.

سنجش فعالیت آنزیم اندو-۴،۱-بتا-دی-گلوکناز با روش CMC/DNS : بررسی فعالیت آنزیم اندو-۴،۱-بتا-دی-گلوکاناز با روش CMC/DNS (Carboxymethyl cellulose/Dinitrosalicylic) انجام شد. بدین‌منظور، محلول CMC-Na در بافر ۰/۰۵ مولار مختص به pH مورد آزمون تهیه شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از سوبسترا در لوله آزمایش ریخته شد سپس ۰/۵ میلی‌لیتر محلول حاوی آنزیم به سوبسترا اضافه و ۳۰ دقیقه در دمای مورد آزمون قرار گرفت. ۳ میلی‌لیتر محلول DNS به لوله آزمایش اضافه شده و ۵ دقیقه در آب جوش قرار داده شد و سریعاً به یخ در حال ذوب منتقل شد. پس از افزودن ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر به لوله آزمایش و صفر کردن اسپکتروفتومتر، جذب نوری در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد. پس از محاسبه مقدار قند آزاد شده فعالیت آنزیم روی سوبسترای CMC-Na بر مبنای واحد بین المللی در هر میلی لیتر (میکرومول در دقیقه در میلی‌لیتر ($\mu mol\ min^{-1}\ mL^{-1}$)) محاسبه شد(۸، ۹).

بررسی پایداری حرارتی آنزیم اندو-۴،۱-بتا-دی-گلوکاناز در pHهای مختلف: پایداری حرارتی فعالیت آنزیم اندو-۴،۱-بتا-دی-گلوکاناز در زمان‌های صفر، ۲، ۴، ۶ و ۸ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد با روش CMC/DNS در pHهای ۶، ۸ و ۱۰ سنجش شد. در این مرحله فعالیت آنزیمی در زمان صفر ۱۰۰ درصد در نظر گرفته و با گذشت زمان، میزان فعالیت آنزیم باقیمانده به عنوان پایداری حرارتی در pH های مورد آزمون بررسی شد.

بهینه‌سازی محیط کشت: رسم منحنی رگرسیون خطی واحد تشکیل دهنده کلنی در هر میلی‌لیتر بر پایه جذب نوری: به‌منظور تلقیح یکسان ماده تلقیح در محیط‌های کشت مورد بررسی، ابتدا از باکتری *باسیلوس* AGh1 در محیط کشت لوریا-برتانی (Luria-Bertani) آگار کشت خطی شبانه تهیه و یک کلنی در محیط کشت لوریا-برتانی براث با حجم ۲۰ میلی‌لیتر در فالکون با ظرفیت اسمی ۵۰ میلی‌لیتر تلقیح شد. بلافاصله پس از تلقیح و سپس هر ۲ ساعت یکبار جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر و چگالی سلولی با روش شمارش کلنی با تکنیک پور پلیت انجام شد. شرایط کشت دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با سرعت شیکر ۱۵۰ دور در دقیقه (RPM) بود. با توجه به معادله به دست آمده، هنگامی‌که جذب نوری برابر با ضریبی از 10^8 واحد تشکیل دهنده کلنی در هر میلی‌لیتر ($CFU\ mL^{-1}$)(Colony Forming Unit per milliliter) بود، به میزان ۱ درصد حجمی/حجمی در محیط‌های کشت مورد بررسی تلقیح می‌شد.

بررسی امکان استفاده

باکتری از پسماندهای کشاورزی به عنوان ماده اولیه: سبوس برنج، سبوس گندم و کاه برنج به عنوان پسماندهای کشاورزی جهت امکان استفاده باکتری برای تولید اندو-۴،۱-بتا-دی-گلوکاناز بررسی شدند. وجود عناصر ضروری موجود در محیط کشت مندل (۱۸) برای تولید آنزیم اندو-۴،۱-بتا-دی-گلوکاناز نیز ارزیابی شد(۸).. بدین منظور هشت محیط کشت مختلف (جدول ۱) با استفاده از کربوکسی متیل سلولز-سدیم (CMC-Na)(Sodium-carboxymethyl cellulose)، سبوس برنج، سبوس گندم، کاه برنج، ترکیبات پایه محیط کشت مندل و عناصر ضروری (جدول ۲) تهیه شد. مقدار استفاده از CMC-Na به میزان ۱۰ گرم در لیتر و مقدار استفاده از سبوس برنج، سبوس گندم و کاه برنج به میزان ۲۵ گرم در لیتر بود. برای استفاده از سبوس‌ها و کاه، ابتدا آنها را با استفاده از دستگاه آسیاب کن، آسیاب کرده و از الک با مش ۵۰ (۰/۲۹۷ میلی‌متر) عبور داده شدند. pH، دما، حجم محیط کشت و دور همزن در زمان بهینه‌سازی به ترتیب برابر با ۶، ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۱۰۰ میلی‌لیتر و ۱۵۰ دور در دقیقه بودند. بررسی‌ها در ارلن‌مایر بافل‌دار با ظرفیت اسمی ۲۵۰ میلی‌لیتر انجام می‌شد. محیط-های کشت پس از تلقیح در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با

DOI: 10.22034/cmr.2025.2295 مقاله پژوهشی، صفحات ۱۴۲-۱۲۷

۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. پس از گذشت زمان انکوباسیون، محیط‌های کشت با ۵۰۰۰ ×g سانتریفیوژ شده و سنجش فعالیت آنزیم اندو-۴،۱-بتا-دی-گلوکاناز حاصل از سوپرناتانت انجام شد. محیط کشتی که بیشترین فعالیت آنزیمی در آن مشاهده شد برای بهینه‌سازی تولید آنزیم اندو-۴،۱-بتا-دی-گلوکاناز انتخاب شد.

جدول ۱- ترکیبات پایه و عناصر ضروری محیط کشت مندل

ترکیبات پایه			عناصر ضروری		
ردیف	ترکیب	مقدار (گرم در لیتر)	ردیف	ترکیب	مقدار (میلی‌گرم در لیتر)
۱	$(NH_4)_2SO_4$	۱/۴	۱	$ZnSO_4.7H_2O$	۱/۴
۲	KH_2PO_4	۲	۲	$CoCl_2$	۲
۳	$CaCl_2$	۰/۳	۳	$FeSO_4.7H_2O$	۵
۴	$MgSO_4.7H_2O$	۰/۳	۴	$MnSO_4.H_2O$	۱/۵۶
۵	Tween 80	۰/۳			

جدول ۲- محیط‌های کشت مختلف ساخته شده برای بررسی امکان استفاده از پسماند شکاورزی و ضرورت وجود عناصر ضروری معرفی شده در محیط کشت مندل جهت تولید آنزیم اندو-۴،۱-بتا-دی-گلوکاناز از *باسیلوس* سویه AGh1

شماره محیط کشت	مشخصات
۱	ترکیبات پایه محیط کشت مندل به همراه CMC-Na و عناصر ضروری
۲	ترکیبات پایه محیط کشت مندل به همراه CMC-Na
۳	ترکیبات پایه محیط کشت مندل به همراه سبوس گندم و عناصر ضروری
۴	ترکیبات پایه محیط کشت مندل به همراه سبوس گندم
۵	ترکیبات پایه محیط کشت مندل به همراه سبوس برنج و عناصر ضروری
۶	ترکیبات پایه محیط کشت مندل به همراه سبوس برنج
۷	ترکیبات پایه محیط کشت مندل به همراه کاه برنج و عناصر ضروری
۸	ترکیبات پایه محیط کشت مندل به همراه کاه برنج

بهینه‌سازی محیط کشت با استفاده از آزمون‌های آماری: ابزارهای آماری نظیر پلکت-برمن و سطح پاسخ (RSM)(Response Surface Methodology) به ترتیب برای مشخص کردن فاکتورهای اثرگذار و بهینه‌سازی شرایط برای تولید متابولیت‌ها از میکروارگانیسم‌ها، به‌طور گسترده استفاده می-شوند (۲۹،۱۶،۲). بین آزمون‌های آماری، استپ-سایزینگ برای مشخص کردن جهت اثر فاکتورها بر یکدیگر و دست-یابی سریع‌تر و اقتصادی‌تر به نقطه هدف با استفاده از اثر متقابل فاکتورها بر یکدیگر کاربرد دارد (۵). برای بهینه‌سازی محیط کشت از نسخه ۱۸ نرم افزار مینی‌تب استفاده شد. pH، دما، حجم محیط کشت و دور همزن در زمان بهینه‌سازی به ترتیب برابر با ۶، ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۱۰۰ میلی‌لیتر و ۱۵۰ دور در دقیقه بودند. بررسی‌ها در ارلن‌مایر بافل‌دار با ظرفیت اسمی ۲۵۰ میلی‌لیتر انجام شد. ابتدا جهت تعیین فاکتورهای اثرگذار بر تولید اندو-۴،۱-بتا-دی-گلوکاناز سویه *باسیلوس* AGh1 از طراحی فاکتوریل با طراحی پلکت- برمن (Plackett-Burman) استفاده شد. پس از تعیین ضرایب اثر متقابل بین فاکتورهای اثرگذار، بهبود شرایط کشت با تکنیک استپ-سایزینگ انجام شد. بهینه‌سازی نهایی با RSM انجام و صحت نتایج آزمون با استفاده از آزمون یک نمونه‌ای t برای میانگین با شش تکرار بررسی شد. در این پژوهش میزان فعالیت آنزیم اندو-۴،۱-بتا-دی-گلوکاناز در فرآیند بهینه‌سازی محیط کشت به عنوان شاخصی بر میزان تولید این آنزیم در نظر گرفته شد.

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۴۲-۱۲۷
DOI: 10.22034/cmr.2025.2295

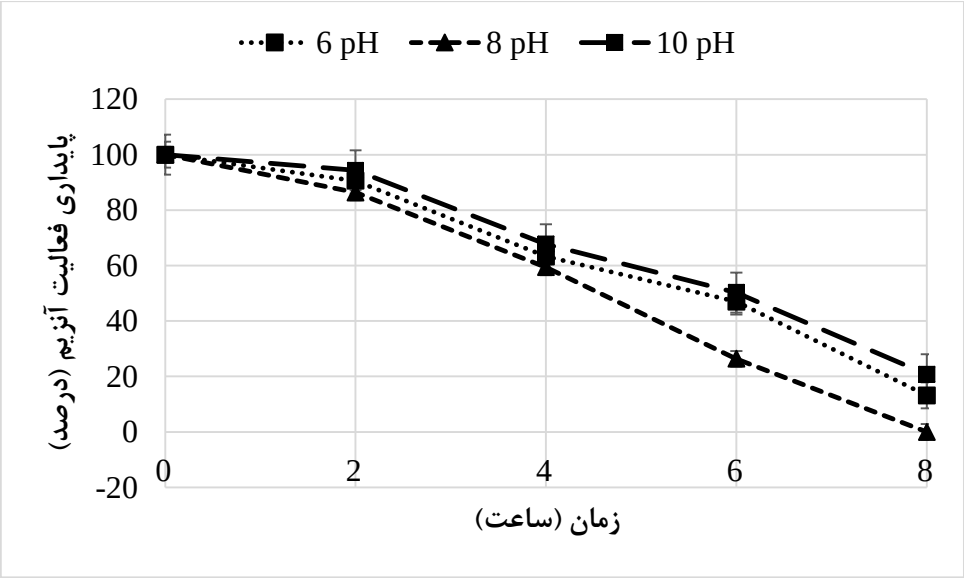
بررسی pH و دمای بهینه فعالیت آنزیم اندو-۱،۴-بتا-دی-گلوکاناز: سویه *باسیلوس* AGh1 در محیط کشت بهینه در حجم ۲۰۰ میلی‌لیتر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در ارلن-مایر بافل‌دار با ظرفیت اسمی ۵۰۰ میلی‌لیتر و ۱۵۰ دور در دقیقه کشت داده شد. نمونه‌برداری در زمانی که بیشترین فعالیت آنزیمی در کشت میکروارگانسیم مشاهده شده بود، انجام شد. بررسی بهینه فعالیت آنزیمی در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد در pHهای ۴ الی ۱۰ با فواصل ۰/۲ و بررسی دمای بهینه فعالیت در دمای ۴۰ الی ۹۰ با فواصل ۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

بررسی فعالیت

بتا-گلوکوزیداز و بررسی فعالیت اثر بر فیلتر کاغذی: سویه *باسیلوس* AGh1 در محیط کشت بهینه در حجم ۲۰۰ میلی‌لیتر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۱۵۰ دور در دقیقه در ارلن‌مایر بافل‌دار با ظرفیت اسمی ۵۰۰ میلی‌لیتر کشت داده شد. نمونه‌برداری در زمانی که بیشترین فعالیت آنزیمی در کشت میکروارگانسیم مشاهده شده بود، انجام شد. بررسی فعالیت بتا-گلوکوزیداز (β-glucosidase) و بررسی فعالیت اثر بر فیلتر کاغذی (FPase)(Filter paper assay) جهت سنجش قدرت تولید قند (۱۲) در pH و دمای بهینه فعالیت اندو-۱،۴-بتا-دی-گلوکاناز ارزیابی شدند.

نتایج

بررسی پایداری حرارتی آنزیم اندو-۱،۴-بتا-دی-گلوکاناز در pHهای مختلف: پایداری حرارتی فعالیت آنزیم اندو-۱،۴-بتا-دی-گلوکاناز طی زمان‌های صفر، ۲، ۴، ۶ و ۸ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد در سیستم بافری مختص به pH های ۶، ۸ و ۱۰ در شکل ۱ نشان داده شده است. آنزیم در pH ۶ در زمان‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ ساعت به ترتیب ۳/۸۹ ± ۹۰/۵۹، ۳/۷۳ ± ۶۳/۲۶، ۵/۵۲ ± ۴۷ و ۱/۷۸ ± ۱۳/۱۸ درصد فعالیت خود را حفظ کرده بود. در pH ۸ در زمان‌های ۲، ۴ و ۶ ساعت به ترتیب ۲/۵۷ ± ۸۳/۳۶، ۴/۱۶ ± ۵۹/۳۹ و ۲/۴۳ ± ۲۶/۳۶ درصد از فعالیت خود را حفظ کرده بود و در ساعت هشتم غیر فعال شده بود. در pH ۱۰ در زمان‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ ساعت به ترتیب ۱۳/۵۸ ± ۹۴/۳۵، ۱۰/۶ ± ۶۷/۶۹، ۲/۱۴ ± ۵۰/۲۵ و ۳/۱۱ ± ۲۰/۷۶ درصد فعالیت خود را حفظ کرده بود. با توجه به نتایج، رفتار مقاومت حرارتی آنزیم در pHهای ۶ و ۱۰ بیشتر از مقاومت حرارتی در pH ۸ بود.



شکل ۱- پایداری حرارتی آنزیم اندو-۱،۴-بتا-دی-گلوکاناز در pH های ۶، ۸ و ۱۰

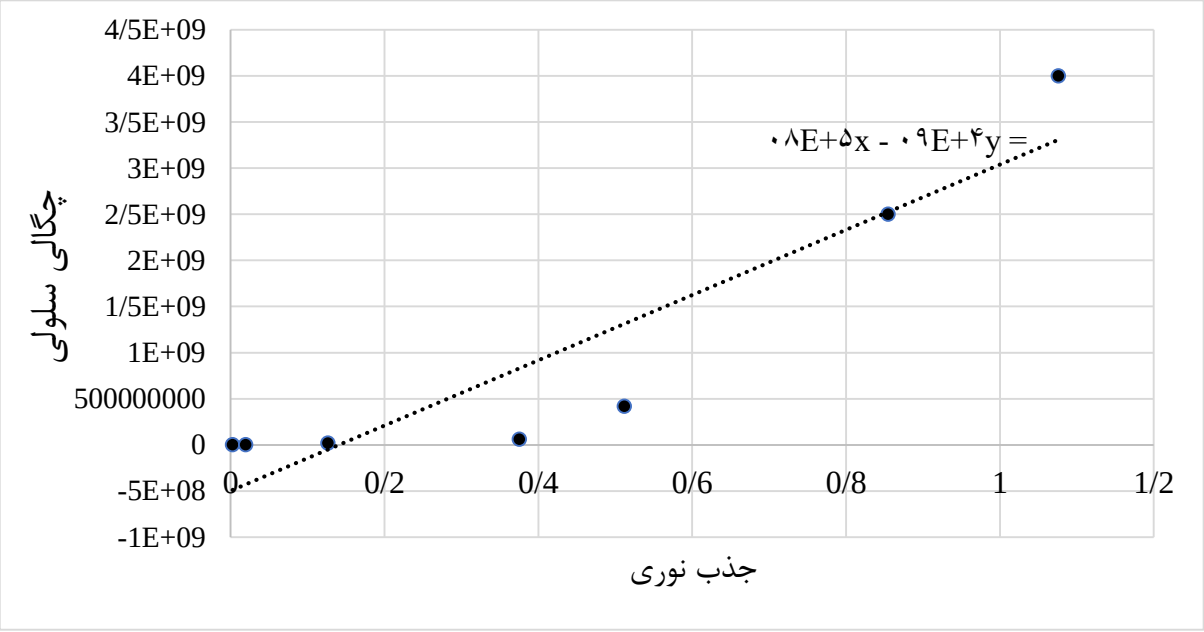
مقاله پژوهشی، صفحات ۱۴۲-۱۲۷
DOI: 10.22034/cmr.2025.2295

بهینه‌سازی محیط کشت:

رسم منحنی رگرسیون خطی واحد تشکیل دهنده کلنی در هر میلی‌لیتر بر پایه جذب نوری: با استفاده از نرم افزار اکسل ۲۰۱۹ منحنی رگرسیون خطی واحد تشکیل دهنده کلنی در هر میلی‌لیتر بر پایه جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر رسم و معادله مربوطه محاسبه شد (شکل ۲). با توجه به منحنی مشخص شد هنگامی‌که جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر بین ۰/۱۵ تا ۰/۳۷ بود، تعداد باکتری ضریبی از 10^8 واحد تشکیل دهنده کلنی در هر میلی‌لیتر بود. از این رو جهت تلقیح یکسان باکتری در محیط‌های کشت، هنگامی که جذب نوری در محیط کشت لوریا-برتانی براث بین دو عدد مذکور می‌رسید، تلقیح به میزان ۱ درصدحجمی/حجمی در محیط‌های کشت مورد بررسی انجام می‌شد.

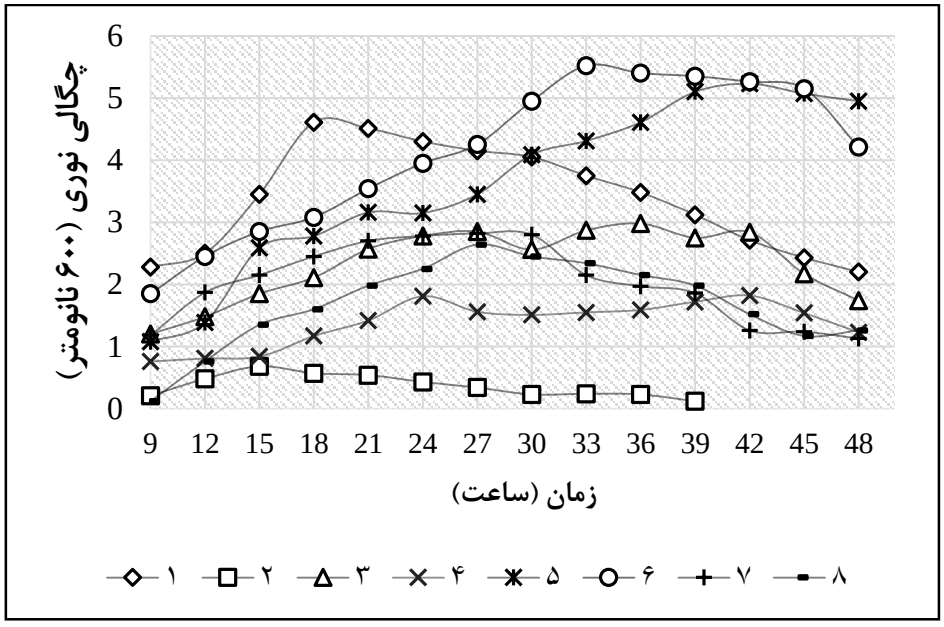
بررسی امکان استفاده باکتری از سبوس برنج، سبوس گندم و کاه برنج در تولید آنزیم: با توجه به نتایج در شکل ۳ مشخص شد که محیط کشت حاوی سبوس برنج و فاقد عناصر ضروری (محیط کشت شماره ۶) نسبت به سایر محیط‌های کشت تهیه شده فعالیت آنزیمی بالاتری داشت، به‌طوریکه در ساعت ۳۳ فرآیند تخمیر بیشترین فعالیت آنزیمی را در محیط کشت نشان داد. از این رو برای ادامه روند بهینه‌سازی محیط کشت، سبوس برنج به عنوان منبع سلولزی انتخاب و عناصر ضروری از ترکیبات محیط کشت حذف شدند. برای بهینه‌سازی محیط کشت از این مرحله به بعد نمونه‌ها در ساعت ۳۳ فرآیند تخمیر بررسی می‌شدند.

تعیین فاکتورهای اثرگذار بر تولید آنزیم: بررسی‌ها در آزمون پلکت- برمن با ضریب اطمینان ۹۰ (Confidence level) نشان دهنده اثرگذاری معنی دار فاکتورهای سبوس برنج و عصاره مخمر بر میزان فعالیت آنزیم اندو-۴،۱-بتا-دی-گلوکاناز در محیط کشت بودند. جدول ۳ نتایج مربوط به فعالیت آنزیم در محیط‌های کشت طراحی شده در آزمون پلکت- برمن و شکل ۴ نمودار پرتو (Pareto) حاصل از تحلیل داده‌ها را نشان می‌دهند.

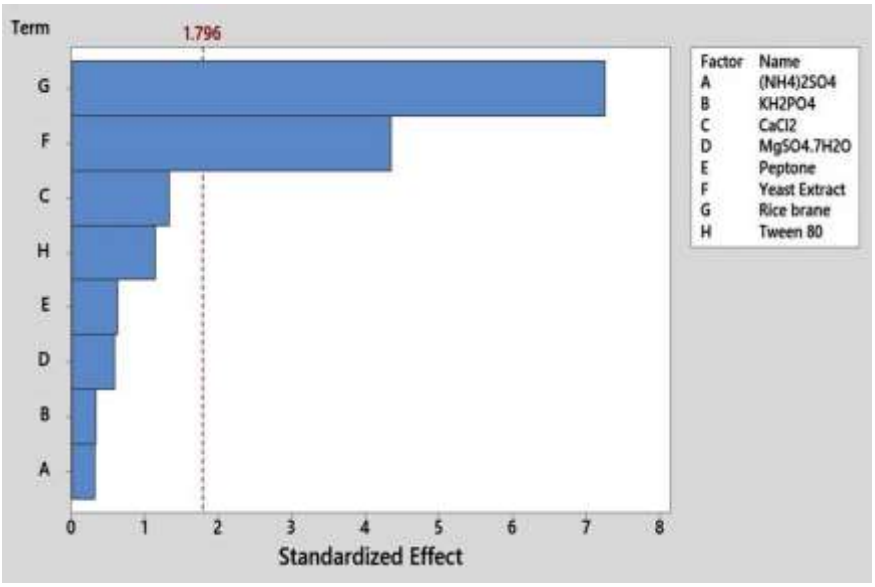


شکل ۲- منحنی رگرسیون خطی چگالی سلولی (واحد تشکیل دهنده کلنی در هر میلی‌لیتر) بر پایه جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۴۲-۱۲۷
DOI: 10.22034/cmr.2025.2295



شکل ۳- روند تغییرات فعالیت آنزیمی (میکرومول در دقیقه در میلی‌لیتر) در محیط‌های کشت مورد بررسی طی ۴۸ ساعت اول فرآیند



شکل ۴- نمودار پرتو حاصل از تحلیل داده‌ها در آزمون پلکت- برمن

بهینه سازی شرایط تولید آنزیم: برای بهبود شرایط آنزیم از تکنیک استپ-سایزینگ استفاده شد، به‌طوریکه برای تعیین ضرایب دو فاکتور مؤثر بر تولید اندو-۴،۱-بتا-دی-گلوکاناز یعنی سبوس برنج و عصاره مخمر و همچنین از بین بردن اثر بالقوه فاکتورهای غیر مؤثر بر ضرایب این دو فاکتور، آزمون طراحی فاکتوریل دو سطحی (2-Level Factorial Design) با ۵ نقطه مرکزی (5 center points) با استفاده از نسخه ۱۸ نرم افزار مینی‌تب به‌صورت مولد پیش فرض (Default generator) طراحی شد. مقادیر حد پایین و حد بالا برای سبوس برنج به ترتیب ۵ و ۱۲/۵ گرم در لیتر، مقادیر حد پایین و حد بالا برای عصاره مخمر به ترتیب ۳ و ۶ گرم در لیتر و مقادیر سایر فاکتورها برابر با محیط کشتی بود که بیشترین فعالیت آنزیمی در آزمون پلکت- برمن دیده شده بود (محیط کشت شماره ۱۵ در جدول ۳). نتیجه طراحی

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۴۲-۱۲۷ DOI: 10.22034/cmr.2025.2295

آزمایش ۹ محیط کشت بود که به همراه نتایج حاصل در جدول ۴ آمده اند. نتایج فعالیت آنزیمی محیط‌های کشت با ضریب اطمینان ۹۵ و به‌صورت دو طرفه تحلیل شدند. با توجه به تحلیل داده‌ها، ضرایب برای سبوس برنج و عصاره مخمر به ترتیب برابر با ۰/۶۴ و ۰/۷۴ بود.

جدول ۴- محیط‌های کشت تهیه شده برای آزمون طراحی فاکتوریل دو سطحی (مقادیر به‌صورت گرم در لیتر و واحد فعالیت آنزیمی در ستون نتایج میکرومول در دقیقه در میلی‌لیتر است.)

StdOrder	RunOrder	CenterPt	Blocks	سبوس برنج	عصاره مخمر	نتایج
۳	۱	۱	۱	۵	۶	۳/۶۸
۲	۲	۱	۱	۱۲/۵	۳	۰/۴۸
۱	۳	۱	۱	۵	۳	۲/۹۸
۵	۴	۰	۱	۸/۷۵	۴/۵	۴/۴۵
۸	۵	۰	۱	۸/۷۵	۴/۵	۴/۷۶
۴	۶	۱	۱	۱۲/۵	۶	۵/۷۴
۶	۷	۰	۱	۸/۷۵	۴/۵	۴/۱۲
۹	۸	۰	۱	۸/۷۵	۴/۵	۴/۲۶
۷	۹	۰	۱	۸/۷۵	۴/۵	۴/۳۴

از آنجاییکه که ضرایب برای سبوس برنج برابر با ۰/۶۴ و برای عصاره مخمر برابر با ۰/۷۴ بود، محاسبه ارزش‌های کدگذاری شده (Coded value) جهت تهیه محیط‌های کشت مختلف برای بهبود شرایط کشت به‌صورت ذیل انجام شد: با استفاده از فرمول ۴، ارزش کدگذاری شده مربوط به عصاره مخمر محاسبه شد:

$$Coded\ value\ of\ Yeast\ Extract = \frac{Step\ size\ in\ actual\ value\ for\ Yeast\ Extract}{Half\ of\ the\ range\ of\ Rice\ bran} \quad (۴)$$

بنابراین:

$$Coded\ value\ of\ Yeasr\ Extract = \frac{6-3}{3.75} = 0.8$$

با استفاده از فرمول ۵، متغیر کدگذاری (Coded variable) شده مربوط به عصاره مخمر محاسبه شد:

$$Coded\ variable\ for\ Yeast\ Extract = \frac{Coef.of\ Yeast\ Extract}{Coef.\ of\ Rice\ bran} \times Coded\ value\ of\ Yeast\ Extract \quad (۵)$$

بنابراین:

$$Coded\ vlue\ for\ Yeast\ Extract = \frac{0.74}{0.64} \times 0.8 = 0.925$$

با استفاده از فرمول ۶، استپ سایز مربوط به مقدار عصاره مخمر محاسبه شد:

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۴۲-۱۲۷ DOI: 10.22034/cmr.2025.2295

$$Coded\ value\ for\ Yeast\ Extract = \frac{Step\ size\ in\ actual\ value\ for\ Yeast\ Extract}{Half\ of\ the\ range\ of\ Yeast\ Extract} \quad (۶)$$

بنابراین:

$$0.914 = \frac{Step\ size\ in\ actual\ value\ for\ Yeast\ Extract}{1.5}$$

و در نهایت: ۱/۴ ≈ استپ سایز مربوط به مقدار سبوس برنج

با توجه به نتایج حاصل از معادلات ۳ الی ۶، به ازای هر واحد از سبوس برنج، ۱/۴ واحد از عصاره مخمر تغییر کرد. از این رو محیط‌های کشت جدول ۵ ساخته شده و فعالیت آنزیم اندو-۴،۱-بتا-دی-گلوکاناز در آنها بررسی شد. با توجه به نتایج حاصل از ۱۶ محیط کشت مختلف تهیه شده، مشخص شد که فعالیت آنزیم اندو-۴،۱-بتا-دی-گلوکاناز توسط سویه *باسیلوس* AGh1 هنگامی بیشترین بازدهی را دارد که سبوس برنج به میزان ۵۷ گرم در لیتر و عصاره مخمر به میزان ۲۲/۸ گرم در لیتر باشد. با توجه به اینکه مقدار به دست آمده عصاره مخمر عدد بالایی بود و این احتمال وجود داشت که طی استپ-سایزینگ فاکتور عصاره مخمر از حد بهینه عبور کرده باشد، فاکتور سبوس برنج به میزان ۵۷ گرم در لیتر، ثابت و فاکتور عصاره مخمر در جهت معکوس استپ-سایزینگ تغییر داده شد تا اثر این تغییر بر میزان فعالیت اندو-۴،۱-بتا-دی-گلوکاناز بررسی شود.

جدول ۵- محیط‌های کشت ساخته شده از روی استپ-سایزینگ و نتایج مربوطه (مقادیر به‌صورت گرم در لیتر و واحد فعالیت آنزیمی در ستون نتایج میکرومول در دقیقه در میلی‌لیتر است.)

نتایج	سطوح فاکتورها				Step
	واقعی		کدگذاری شده		
	عصاره مخمر	سبوس برنج	عصاره مخمر	سبوس برنج	
۵/۱۵	۶	۱۲/۵	۰	۰	مقادیر کنونی
۵/۲۹	۷/۴	۱۶/۲۵	۰/۹۲۵	۰/۸	۱
۵/۳۸	۸/۸	۲۰	۱/۸۵	۱/۶	۲
۵/۴۳	۱۰/۲	۲۳/۷۵	۲/۷۷۵	۲/۴	۳
۵/۵۷	۱۱/۶	۲۷	۳/۷	۴	۴
۵/۶۸	۱۳	۳۰/۷۵	۴/۶۲۵	۵/۶	۵
۵/۸۷	۱۴/۴	۳۴/۵	۵/۵۵	۷/۲	۶
۵/۹۵	۱۵/۸	۸/۲۵	۶/۴۷۵	۸	۷
۶/۱۸	۱۷/۲	۴۲	۷/۵	۸/۸	۸
۶/۲۷	۱۸/۶	۴۵/۷۵	۸/۴۲۵	۹/۶	۹
۶/۳۹	۲۰	۴۹/۵	۹/۹۳۱	۱۰/۴	۱۰
۶/۵۴	۲۱/۴	۵۳/۲۵	۱۰/۲۷۵	۱۱/۲	۱۱
۶/۷۱	**۲۲/۸**	**۵۷**	**۱۱/۲**	**۱۲**	**۱۲**
۶/۶۲	۲۴/۲	۶۰/۷۵	۱۲/۱۲۵	۱۲/۸	۱۳
۶/۵۲	۲۵/۶	۶۴/۵	۱۳/۰۵	۱۳/۶	۱۴
۶/۳۴	۲۷	۶۸/۲۵	۱۳/۹۷۵	۱۴/۴	۱۵

DOI: 10.22034/cmr.2025.2295 مقاله پژوهشی، صفحات ۱۴۲-۱۲۷

بدین منظور، محیط‌های کشت جدول ۶ تهیه و فعالیت آنزیمی در آنها بررسی شد.

جدول ۶- محیط‌های کشت تهیه شده با ثابت نگه‌داشتن سبوس برنج و تغییر در فاکتور عصاره مخمر (مقادیر به‌صورت گرم در لیتر و واحد فعالیت آنزیمی در ستون نتایج میکرومول در دقیقه در میلی‌لیتر است).

ردیف	مقدار عصاره مخمر	میزان فعالیت
۱	۲۲/۸	۶/۵۷
۲	۲۱/۴	۶/۶۱
۳	۲۰	۶/۶۵
۴	۱۸/۶	۶/۶۲
۵	۱۷/۲	۶/۵۴
۶	۱۵/۸	۶/۶۷
۷	**۱۴/۴**	**۶/۷۸**
۸	۱۳	۵/۸۴
۹	۱۱/۶	۵/۴۹
۱۰	۱۰/۲	۴/۹۸
۱۱	۸/۸	۴/۷۹
۱۲	۷/۴	۴/۷۵
۱۳	۶	۴/۶۴

با توجه به داده‌های جدول ۶ مشخص شد که افزایش عصاره مخمر از ۶ تا ۱۴/۴ گرم در لیتر در محیط کشت، افزایش فعالیت آنزیم را به همراه داشت. از این رو، محدوده بین حد پایین و حد بالا در آزمون RSM جهت بهینه‌سازی تولید آنزیم اندو-۴،۱-بتا-دی-گلوکاناز توسط سویه *باسیلوس* AGh1 به صورت ذیل در نظر گرفت شد:

مقادیر برای سبوس برنج: ۵۳/۲۵ و ۶۰/۷۵ گرم در لیتر

مقادیر برای عصاره مخمر: ۱۳ و ۱۵/۸ گرم در لیتر

بهینه‌سازی محیط کشت جهت تولید آنزیم با استفاده از آزمون RSM : آزمون RSM با تکنیک طراحی مرکب مرکزی (Central Composite Design) (CCD) با دو فاکتور متغیر سبوس برنج با مقادیر به ترتیب حد پایین و حد بالا ۵۳/۲۵ و ۶۰/۷۵ گرم در لیتر و عصاره مخمر با مقادیر به ترتیب حد پایین و حد بالا ۱۳ و ۱۵/۸ گرم در لیتر با استفاده از ۱۸ نرم افزار مینی‌تب طراحی شد. در این آزمون ۱۳ محیط کشت توسط نرم افزار معرفی شد که در جدول ۷ به همراه نتایج آمده اند. نتایج فعالیت آنزیمی محیط‌های کشت طراحی شده با ضریب اطمینان ۹۵ و به‌صورت دو طرفه تحلیل شدند که حاکی از بی معنی بودن عدم برازش (Lack-of-fit) بود، در نتیجه بهینه‌سازی پیش از مرحله RSM به اتمام رسیده بود. شکل ۵ نمودارهای طرح کانتور (Contour plot) و طرح سطحی (Surface Plot) را مبنی بر اثر متقابل دو فاکتور سبوس برنج و عصاره مخمر بر میزان فعالیت آنزیم اندو-۴،۱-بتا-دی-گلوکاناز در محیط کشت نشان می‌دهد. نمودارها نشان می دهند هنگامی که مقادیر دو فاکتور سبوس برنج و عصاره مخمر در حد بهینه باشند، آنزیم فعالیت بیشتر از ۷/۲ میکرومول در دقیقه در میلی‌لیتر خواهد داشت. از این رو شش محیط کشت با مقادیر میانگین (سبوس برنج برابر با ۵۸/۵ گرم در لیتر و عصاره مخمر برابر با ۱۴/۸۷ گرم در لیتر) تهیه و صحت نتایج آزمون با استفاده از آزمون یک نمونه‌ای t برای میانگین بررسی شد که تحلیل نتایج مبنی بر صحت پیش‌بینی نرم افزار بود. در نهایت فرمول محیط کشت بهینه شده شامل ۱/۴ گرم در لیتر $(NH_4)_2SO_4$، ۰/۶ گرم در لیتر KH_2PO_4، ۰/۳ گرم در لیتر $CaCl_2$، ۰/۳ گرم در لیتر $MgSO_4.7H_2O$، ۴ گرم در لیتر پپتون، ۱۴/۸۷ گرم در لیتر عصاره مخمر، ۵۸/۸ گرم در لیتر سبوس برنج و ۰/۲ میلی‌لیتر Tween 80 بود.

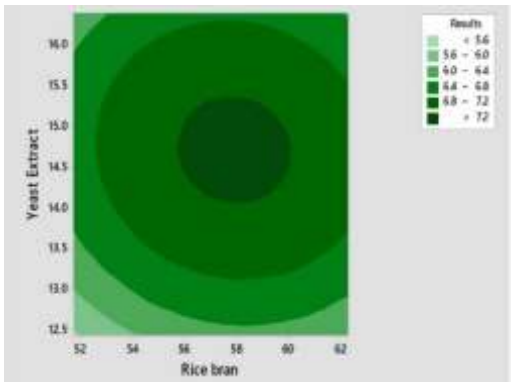
بررسی pH و دمای بهینه فعالیت آنزیم اندو-۴،۱-بتا-دی-گلوکاناز : فعالیت اندو-۴،۱-بتا-دی-گلوکاناز در pH ۴ الی ۱۰ با فواصل ۰/۲ در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. نتایج بیانگر pH بهینه ۵/۶ برای فعالیت آنزیمی بود. همچنین فعالیت آنزیم در دمای ۴۰ الی ۹۰ با فواصل ۵ درجه سانتی-گراد بررسی شد که نتایج بیانگر بهینه فعالیت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد بود (شکل ۶). فعالیت آنزیم در pH و دمای بهینه برابر با ۰/۱۲ ± ۱۰ میکرومول در دقیقه در میلی‌لیتر بود.

DOI: 10.22034/cmr.2025.2295 مقاله پژوهشی، صفحات ۱۴۲-۱۲۷

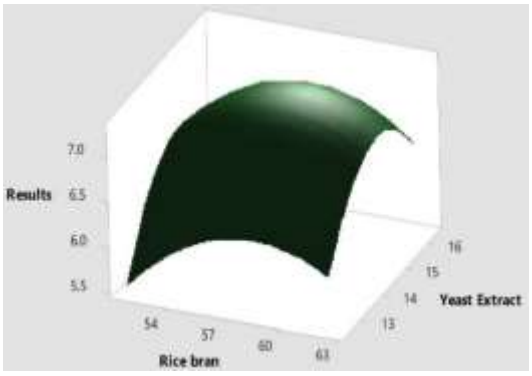
جدول ۷- آزمون RSM طراحی شده با تکنیک CCD (مقادیر به‌صورت گرم در لیتر و واحد فعالیت آنزیمی در ستون نتایج میکرومول در دقیقه در میلی‌لیتر است.)

فعالیت آنزیمی	عصاره مخمر	سبوس برنج	Blocks	PtType	RunOrder	StdOrder
۶/۶۸	۱۶/۳۷۹۹	۵۷	۱	- ۱	۱	۸
۶/۴۲	۱۳	۵۳	۱	۱	۲	۱
۷/۱۵	۱۴/۴	۵۷	۱	۰	۳	۱۱
۷/۳۷	۱۴/۴	۵۷	۱	۰	۴	۱۰
۶/۹۷	۱۵/۸	۶۰/۷۵	۱	۱	۵	۴
۶/۷۵	۱۳	۶۰/۷۵	۱	۱	۶	۲
۷/۱۹	۱۴/۴	۵۷	۱	۰	۷	۹
۷/۲۸	۱۴/۴	۵۷	۱	۰	۸	۱۳
۶/۵۱	۱۴/۴	۵۱/۶۹۶۷	۱	- ۱	۹	۵
۶/۱۴	۱۲/۴۲۰۱	۵۷	۱	- ۱	۱۰	۷
۷/۲۵	۱۴/۴	۵۷	۱	2	۱۱	۱۲
۶/۸۵	۱۴/۴	۶۲/۳۰۳۳	۱	- ۱	۱۲	۶
۶/۷۸	۱۵/۸	۵۳/۲۵	۱	- ۱	۱۳	۳

الف)



ب)



شکل ۵- نمودار طرح کانتور (الف) و طرح سطحی (ب) بیانگر اثر متقابل دو فاکتور سبوس برنج و عصاره مخمر بر میزان فعالیت آنزیم اندو-۴،۱-بتا-دی-گلوکاناز

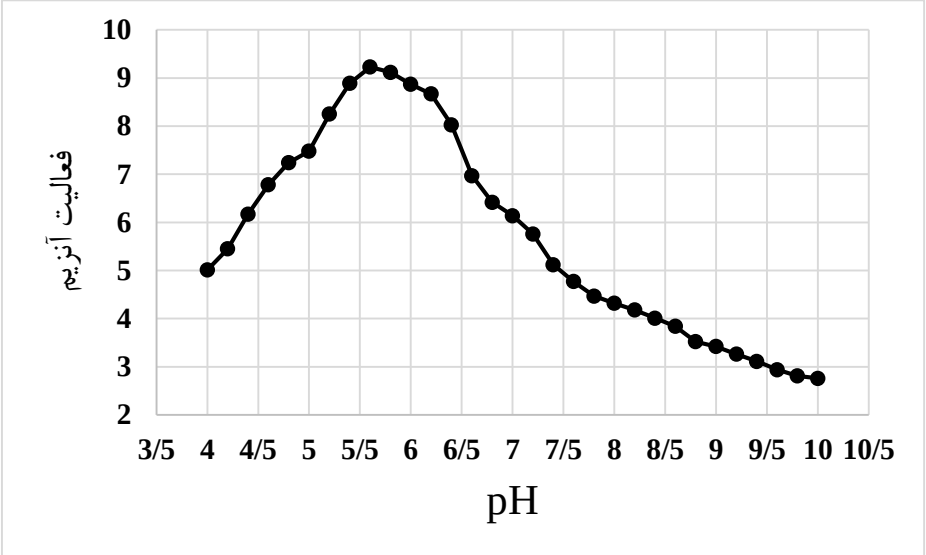
سنجش فعالیت های بتا-گلوکوزیدازی و بررسی فیلتر کاغذی: با سنجش فعالیت های بتا-گلوکوزیداز و بررسی فیلتر کاغذی در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و pH ۵/۶، مشخص شد که محلول حاصل از محیط کشت باکتری فعالیت بتاگلوکوزیداز برابر با ۰/۱۲ ± ۴/۱۶ میکرومول در دقیقه در میلی‌لیتر و فعالیت FPase برابر با ۰۹ ± ۲/۴۵ میکرومول در دقیقه در میلی‌لیتر داشت.

بحث

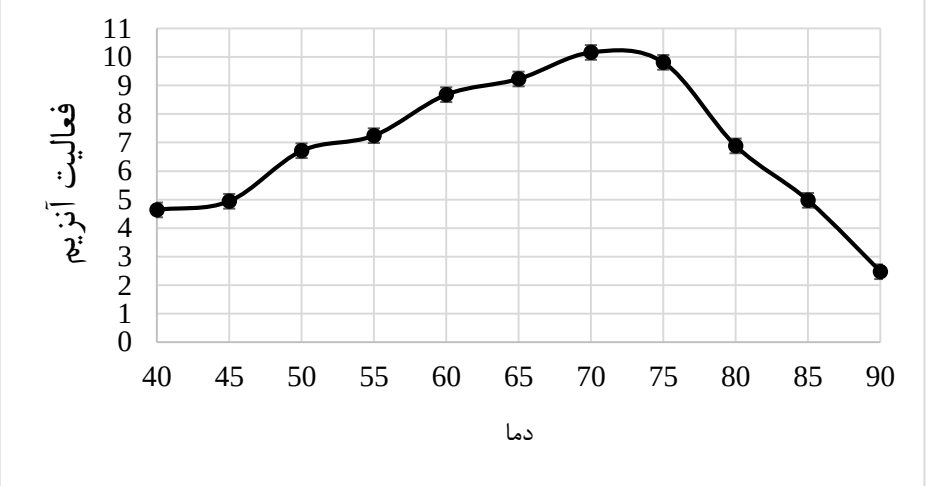
مطالعات بسیاری در زمینه دست‌یابی به آنزیم‌های پایدار در دمای بالا از میکروارگانیسم‌های ترموفیل یا ترموتولرنت انجام شده است. موزدا و همکاران دو سویه *باسیلوس* CH43 (*Bacillus* sp. CH43) و HR68 (*Bacillus* sp. HR68) مولد سلولاز را از چشمه‌های آب‌گرم زیمباوه جداسازی کردند. سلولاز حاصل از هر دو سویه pH بهینه فعالیت ۵ الی ۶/۵ را داشتند. دمای بهینه فعالیت برای آنزیم حاصل از سویه *باسیلوس* HR68 برابر با ۶۵ درجه سانتی‌گراد و در مورد سویه *باسیلوس* CH43 برابر با ۷۰ درجه سانتی‌گراد بود. آنزیم حاصل از سویه *باسیلوس* CH43 در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد در بازه pH ۶ الی ۱۰ و حاصل از سویه *باسیلوس* HR68 در بازه ۶ الی ۸ فعالیت داشتند (۱۳).

DOI: 10.22034/cmr.2025.2295

الف)



ب)



شکل ۶ – pH بهینه (الف) و دمای بهینه (درجه سانتی‌گراد) (ب) فعالیت اندو-۴،۱-بتا-دی-گلوکاناز (میکرومول در دقیقه در میلی‌لیتر) حاصل از محیط کشت بهینه سویه *باسیلوس* AGh1

تای و همکاران سویه باکتریایی *ژئوباسیلوس ترمولورانس* (*Geobacillus thermoleovorans* T4) T4 را از پساب کارخانه نیشکر در تایوان جداسازی کردند که توانایی ترشح آنزیم اندو-۴،۱-بتا-دی-گلوکاناز پایدار در حرارات داشت، به‌طوریکه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و pH ۷ بیش از ۱۰ درصد از فعالیت اولیه خود را حفظ کرده بود (۲۸). سوکوماران و همکاران در پژوهشی مروری به بررسی سلولازهای باکتریایی و نقش آنها در صنایع مختلف و همچنین بهترین شیوه تولید آنزیم سلولاز از آنها پرداخته و خاطرنشان کردند که تولید سلولازهای باکتریایی و استفاده از آنها در صنایع از نظر اقتصادی بسیار مقرون به صرفه است. در این پژوهش بهترین روش برای تولید آنزیم اندو-۴،۱-بتا-دی-گلوکاناز از سویه‌های باکتریایی، تخمیر غوطه ور (Submerged Fermentation) بیان شده است (۲۷). ابراهیم و

DOI: 10.22034/cmr.2025.2295 مقاله پژوهشی، صفحات ۱۴۲-۱۲۷

ال-دیوانی باکتری‌های ترموفیل *انوکسیباسیلوس فلاویترموس* EFP1 (*Anoxybacillus flavithermus* EFP1)، *جئوباسیلوس ترمودنیتریفیکانس* EFP2 (*Geobacillus thermodenitrificans* EFP2) و *جئوباسیلوس استئاروترموفیلوس* EHP3 (*Geobacillus stearothermophilus* EFP3) با قابلیت تجزیه CMC را از چشمه‌های آب‌گرم مصر جداسازی کردند. بهینه فعالیت آنزیم حاصل از این سویه‌ها در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد و pH ۷/۵ گزارش شده است (۱۴). راستگی و همکاران سویه-هایی را از نمونه‌های کمپوست جداسازی کردند که قادر به تجزیه CMC و سبوس بودند. از میان سویه‌های جداسازی شده، سویه‌ی *جئوباسیلوس* WSUCF1 به دلیل دارا بودن بالاترین میزان تولید و فعالیّت سلولازی در محیط کشت مایع نسبت به دیگر سویه‌ها، انتخاب و دمای بهینه برای فعالیّت آنزیم اندو-۴،۱-بتا-دی-گلوکاناز حاصل از آن ۷۰ درجه سانتی‌گراد و pH بهینه آن را ۵ گزارش کردند (۲۴). پودوسوکورسکایا و همکاران به بررسی سویه‌ی ترموفیل *فرویدوباکتریوم ریپاریوم* (*Fervidobacterium riparium*) سلولولیتیک هوازی جداسازی شده از چشمه‌ی آب گرم پرداخته و دمای بهینه‌ی فعالیت آنزیم را ۶۵ درجه سانتی‌گراد گزارش شده کردند (۲۲). گوآر و تیواری موفق به جداسازی و تولید اندو-۴،۱-بتا-دی-گلوکاناز ترموفیل و قلیادوست از باکتری *باسیلوس والیسمورتیس* RG-07 (*Bacillus vallismortis* RG-07) شدند. آنها دما و pH بهینه برای فعالیّت آنزیم را به ترتیب ۶۵ درجه سانتی‌گراد و ۷ گزارش کردند. این آنزیم ۷۵ درصد فعالیّتش را در دمای ۹۵ درجه سانتی-گراد با pH ۹ حفظ می‌کرد (۱۰). عزیزی و همکاران طی پژوهشی موفق به جداسازی باکتری‌های سلولوتیک از چشمه‌های آب گرم دهلران در ایلام شدند. در این پژوهش به غربالگری میکروارگانیسم‌های تولید کننده سلولاز پرداخته شد، سپس محیط کشت باکتری که از قدرت بالاتر سلولوتیک برخوردار بود را بهینه کرده و پس از شناسایی سویه جداسازی شده را *ایزوپتریکولا واریابیلیس* IDAH9 (*Isoptericola variabilis* IDAH9) نامگذاری کردند. این میکروارگانیسم بیشترین میزان تولید سلولاز را در غلظت ۹ گرم در لیتر CMC، ۵/۶ گرم در لیتر آمونیوم سولفات، ۰/۶ درصد توئین ۸۰ و ۲ درصد سوکروز داشت. آنزیم تولیدی پایداری ۱ ساعته در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد داشت (۴). آزادیان و همکاران سویه *باسیلوس لچینیفورمیس* AMF-07 (*Bacillus licheniformis*) را از یکی از چشمه‌های آب گرم استان کرمان جداسازی کرند. اندو-۴،۱-بتا-دی-گلوکاناز حاصل از این سویه در رنج وسیع دما و pH به ترتیب ۴۰ تا ۸۰ درجه سانتی گراد و ۶ الی ۱۰ فعال بوده و دما و pH بهینه به ترتیب ۷۰ درجه سانتی‌گراد و ۹ داشت (۳). شاجهان و همکاران باکتری ترموفیل *باسیلوس لچینیفورمیس* تولید کننده آنزیم سلولاز را از یکی از چشمه‌های آب‌گرم در هند جداسازی کرده و پس از بهینه‌سازی محیط کشت با RSM میزان فعالیت آنزیم سلولاز را تا ۳ برابر افزایش دادند. مقدار مواد مورد بررسی در محیط کشت پس از بهینه‌سازی شامل ۱۹/۲۱ گرم در لیتر CMC، ۲۵/۰۶ میلی‌گرم در لیتر $CaCl_2.6H_2O$ و ۲/۹۶ میلی‌لیتر در لیتر Tween 20 بودند (۲۶). ایرفان و همکاران سویه باکتریایی *باسیلوس آمیلولیکوئیفشیانس* AK9 (*Bacillus amyloliquefaciens*) را از چشمه آب گرم تاتاپانی (Tatta Pani) در کشمیر پاکستان جداسازی کردند که اندو-۴،۱-بتا-دی-گلوکاناز حاصل از این سویه در رنج وسیع دما و pH به ترتیب ۵۰ تا ۷۰ درجه سانتی گراد و ۳ الی ۶ فعال بوده و حداکثر پایداری آن در دما و pH بهینه برای فعالیت آنزیم به ترتیب ۵۰ درجه سانتی-گراد و ۵ بود (۱۵). در این پژوهش پایداری حرارتی آنزیم اندو-۴،۱-بتا-دی-گلوکاناز حاصل از سویه باکتریایی *باسیلوس* AGh1 که از قبل جداسازی شده بود در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد در pHهای ۶، ۸ و ۱۰ ارزیابی شد. آنزیم در pH ۶ در زمان‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ ساعت به ترتیب ۳/۸۹ ± ۹۰/۵۹، ۳/۷۳ ± ۶۳/۲۶، ۵/۵۲ ± ۴۷ و ۱/۷۸ ± ۱۳/۱۸ درصد فعالیت خود را حفظ کرده بود. در pH ۸ در زمان‌های ۲، ۴ و ۶ ساعت به ترتیب ۲/۵۷ ± ۸۳/۳۶، ۴/۱۶ ± ۵۹/۳۹

DOI: 10.22034/cmr.2025.2295

و ۲/۴۳ ± ۲۶/۳۶ درصد از فعالیت خود را حفظ کرده بود. در pH ۱۰ در زمان‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ ساعت به ترتیب ۱۳/۵۸ ± ۹۴/۳۵، ۱۰/۶ ± ۶۷/۶۹، ۲/۱۴ ± ۵۰/۲۵ و ۳/۱۱ ± ۲۰/۷۶ درصد فعالیت خود را حفظ کرده بود. نتایج حاکی از ان است که آنزیم اندو-۴،۱-بتا-دی-گلوکاناز حاصل از سویه باکتریایی *باسیلوس* AGh1 علاوه بر پایداری حرارتی بالا، توان فعالیت در محدوده وسیع pH داشت. با توجه به نتایج این پژوهش و مطالعه قبلی که آنزیم در pH ۴ در زمان‌های ۲ و ۴ ساعت به ترتیب ۵/۴ ± ۸۶/۶۹، ۳/۷۵ ± ۷۱ درصد فعالیت خود را حفظ کرده بود (۸)، به نظر می‌رسد سویه حاضر قابلیت عملکردی مناسبی در طیف وسیع pH داشت باشد.

توجه روزافزونی برای استفاده از ضایعات و پسماندهای کشاورزی به عنوان منابع اولیه بالقوه برای کشت میکروارگانیسم‌ها و تولید ترکیبات با ارزش افزوده بالا وجود دارد (۱، ۲۳). سلولازها کمپلکسی آنزیمی از سه گروه هستند که به‌طور هم‌افزایی عمل کرده و می‌توانند پیوندهای گلوکوزیدی ß(1→4) را هیدرولیز نمایند. این گروه‌ها شامل بتا ۱و۴- اندوگلوکاناز، سلوبیوهیدرولاز و بتا گلوکوزیداز هستند (۳۰). در این پژوهش امکان استفاده از سبوس برنج، سبوس گندم و کاه برنج به عنوان پسماند صنایع کشاورزی و ماده اولیه ارزان جهت تولید آنزیم اندو-۴،۱-بتا-دی-گلوکاناز از سویه *باسیلوس* AGh1 بررسی شد. با توجه به نتایج مشخص شد که فعالیت آنزیم در محیط‌های کشت حاوی سبوس برنج، چه در حضور عناصر ضروری معرفی شده در محیط کشت مندل (۱۸) به عنوان محیط کشت پر کاربرد در جداسازی میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده سلولاز و چه فاقد این عناصر ضروری، نسبت به سایر محیط‌های کشت تهیه شده فعالیت آنزیمی بالاتری داشت (محیط‌های کشت شماره ۵ و ۶ در جدول ۲). بین این دو محیط، محیط کشت فاقد عناصر ضروری دو مزیت جهت انتخاب برای ادامه روند پژوهش داشت، اول اینکه بیشترین فعالیت آنزیمی در محیط کشت زودتر مشاهده شده بود و دیگری اینکه نیازی به عناصر ضروری به عنوان ماده اولیه برای فرآیند تخمیر نبود.

در این پژوهش بهینه‌سازی محیط کشت جهت تولید اندو-۴،۱-بتا-دی-گلوکاناز حاصل از سویه *باسیلوس* AGh1 انجام و مشخص شد که فاکتورهای سبوس برنج و عصاره مخمر اثر معنی‌دار بر تولید آنزیم اندو-۴،۱-بتا-دی-گلوکاناز از سویه *باسیلوس* AGh1 دارند. به‌طوریکه پس از اتمام مراحل بهینه‌سازی محیط کشت فعالیت آنزیم بیشتر از ۷/۲ میکرومول در دقیقه در میلی‌لیتر شد که ۱/۳ برابر بیشتر از فعالیت در محیط کشت اولیه حاوی سبوس برنج بود. با توجه به نتایج این پژوهش می‌توان استنباط کرد که آنزیم معرفی شده به عنوان آنزیمی پایدار در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد و محدوده وسیع pH (۴ الی ۱۰)، با بهینه دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و بهینه pH برابر با ۵/۶، قابلیت توسعه مطالعات و به‌کارگیری دارد.

سپاسگزاری

از مرکز مطالعات و همکاریهای علمی بین المللی به خاطر حمایت از این مطالعه در قالب طرح مصوب شماره ۴۰۰۰۱۵۲ ، سپاسگزاری می گردد.

منابع

۱- آزادیان ف، دلفارد الف ب، کرمی ز. بهینه سازی آماری تولید سلولاز به وسیله باسیلوس آرئوس سویه AV10 با روش تخمیر حالت جامد ضایعات سلولزی و تعیین خصوصیت نسبی آن. پژوهش‌های سلولی و مولکولی. ۱۳۹۷؛۳۱ : ۴۰۹ – ۴۲۰.

۳۰- تقی زاده ن، فارسی م، پاریزی ع پ، طریقی س. تعیین فعالیت سلولازی آکتینومیست‌های گرمادوست موجود در کمپوست قارچ خوراکی به روش ارزیابی با کاغذ صافی. پژوهش‌های سلولی و مولکولی. ۱۳۹۳؛۲۷ : ۲۶ – ۳۴.

2. Adinarayana A, Ellaiah P, Srinivasulu B, Devi RB, Adinarayana G. Response surface methodological approach to optimize the nutritional parameters for neomycin production by Streptomyces

DOI: 10.22034/cmr.2025.2295

marinensis under solid-state fermentation. Process Biochemistry. 2003;38:1565-72.

3. Azadian F, Dalfard AB, Shoushtari AN, Hassanshahian M. Purification and biochemical properties of a thermostable, haloalkaline cellulase from Bacillus licheniformis AMF-07 and its application for hydrolysis of different cellulosic substrates to bioethanol production. Molecular Biology Research Communications. 2016;5:143-55.

4. Azizi M, Hemmat J, Seifati SM, Torktaz I, Karimi S. Characterization of a thermostable endoglucanase produced by Isoptericola variabilis sp. IDAH9. Brazilian Journal of Microbiology. 2015;46:1225-34.

5. Chen H, Niu J, Qin T, Wang L, Shu G. Optimization of the medium for Lactobacillus acidophilus by Plackett-Burman and steepest ascent experiment. ACTA Scientiarum. 2015;14:227–32.

6. Dahpahlevan S, Khara J, Mousivand M, Hashemi M. Determination and modeling the optimum conditions of beta glucanase Bacillus subtilis B5d activity with potential used as feed additive. Biological Journal of Microorganism. 2016;17:1-14.

7. Demirjian DC, Morís-Varas F, Cassidy CS. Enzymes from extremophiles. Current Opinion in Chemical Biology. 2001;5(2):144-51.

8. Diba H, Hemmat J, Vaez M ,Amoozegar MA. Screening of Bacteria Producing Acid-stable and Thermostable Endo-1, 4-β-Glucanase from Hot Springs in the North and Northwest of Iran. Advanced Researches in Microbial Metabolites and Technology. 2018;1:23-30.

9. Ghose TK. Measurement of Cellulase Activities. Pure and Applied Chemistry. 1987;59:257-68.

10. Guar R, Tiwari S. Isolation, production, purification and characterization of an organic-solvent-thermostable alkalophilic cellulase from Bacillus vallismortis RG-07. BMC Biotechnology. 2015;15.

11. Guerriero G, Hausman JG, Strauss J, Ertan H, Siddiqui KS. Lignocellulosic biomass: Biosynthesis, degradation, and industrial utilization. Engineering in Life Sciences. 2016;16:1-16.

12. Han N, Li Z, Zhang X, Yu W, Chen X, Wang D, et al. Synthesis and characterization of cellulose-g-polyoxyethylene (2) hexadecyl ether solid–solid phase change materials. Cellulose. 2016.

13. Heinze T. Cellulose: Structure and Properties. Advances in Polymer Science. 2016;271:1-52.

14. Ibrahim ASS, El-diwany A. Isolation and Identification of New Cellulases Producing Thermophilic Bacteria from an Egyptian Hot Spring and Some Properties of the Crude Enzyme. Australian Journal of Basic and Applied Sciences. 2007;1: 473-8.

15. Irfan M, Tayyab A, Hasan F, Khan S, Badshah M, Shah AA. Production and Characterization of Organic Solvent-Tolerant Cellulase from Bacillus amyloliquefaciens AK9 Isolated from Hot Spring. Applied Biochemistry and Biotechnology. 2017;182:1390-402.

16. Kanmani P, Karthik S, Aravind J, Kumareson K. Research Article The Use of Response Surface Methodology as a Statistical Tool for Media Optimization in Lipase Production from the Dairy Effluent Isolate Fusarium solani. ISRN Biotechnology. 2013:Article ID 528708.

17. Lentzen G, Schwarz T. Extremolytes: natural compounds from extremophiles for versatile applications. Applied Microbiology and Biotechnology. 2006;72:623-34.

18. Mandels M, Weber J. The production of cellulases. Advances in Chemistry. 1969;95:391-414.

19. Mawazda C, Hatto-Kaul R, Zvauya R, Mattiasson B. Purification and characterization of cellulases produced by two Bacillus strains. Journal of Biotechnology. 2000;13:177-87.

20. Niehaus F, Bertoldo C, Mahler M, Antranikian G. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. Applied Microbiology and Biotechnology. 1999;51:711-29.

21. Nouri H, Sajadi T, Azin M. Comparative production of cellulases by mutants of Trichoderma parceramosume PTCC5140. Biological Journal of Microorganism. 2017;22:1-13.

22. Podosokorskaya OA, Merkel AY, Kolganova TV, Chernyh NA, Miroshnichenko ML, Bonch-Osmolovskaya EA, et al. Fervidobacterium riparium sp. nov., a thermophilic anaerobic

DOI: 10.22034/cmr.2025.2295

cellulolytic bacterium isolated from a hot spring. International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2011;61:2697-701.

23. Rasouli A, Aghaei SS, Zarfar M. Bio-production of Single-cell Oil by Rhodococcus Erythropolis PTCC 1767 Bacterial using Low-cost Carbon Sources. Biological Journal of Microorganism,. 2020;35:71-85.

24. Rastogi G, Bhalla A, Adhikari A, Bischoff KM, Hughes SR, Christopher LP, et al. Characterization of thermostable cellulases produced by Bacillus and Geobacillus strains. Bioresource technology. 2010;101:8798-806.

25. Schiraldi C, De-Rosa M. The production of biocatalysts and biomolecules from extremophiles. TRENDS in Biotechnology. 2002;20(12):515-21.

26. Shajahan S, Moorthy IG, Sivakumar N, Selvakumar G. Statistical modeling and optimization of cellulase production by Bacillus licheniformis NCIM 5556 isolated from the hot spring, Maharashtra, India. Journal of King Saud University- Science. 2016.

27. Sukumaran RK, Singhania RR, Pandey A. Microbial cellulase-Production, application and challenges. Journal of Scientific and Industrial Research. 2005;64:832-44.

28. Tai H, M., YIn L, Chen WC, Jiang ST. Overexpression of Escherichia coli Phytase in Pichia pastoris and Its Biochemical Properties. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2013;51:6007–15.

29. Tirawongsaroj P ,Sriptang R, Harnpicharnchai P, Thongaram T, Champreda V, Tanapongpipat S, et al. Novel thermophilic and thermostable lipolytic enzymes from a Thailand hot spring metagenomic library. Journal of Biotechnology. 2008;133:42-9.

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۴۲-۱۲۷ DOI: 10.22034/cmr.2025.2295

Culture medium optimization of *Bacillus* sp. AGh1 for production of Endo-1, 4-*β*-D-glucanase and its characterization

Diba H.[1], Hemmat J.[1], Vaez M.[1], and Goyal A.[2]

[1] Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, I.R. of Iran.

[2] Department of Biological Science and Bioengineering, Indian Institute of Technology Guwahati (IITG), Assam, India.

Abstract

Thermostable Endo-1,4-*β*-D-glucanase, known as a density reducer in cellulose degradation, is one of the most widely used enzymes in industries. In this study, the thermostability of Endo-1, 4-*β*-D-glucanase from *Bacillus* sp. AGh1 isolated from a hot spring in Ardabil province, Iran, was evaluated. Then, rice bran and yeast extract were determined as the effective factors for enzyme production by the Plackett-Burman, and optimization of the culture medium was performed by Response Surface Methodology. The amounts of two effective factors for producing the enzyme were 58.8 and 14.87 g L^{-1}, respectively. The optimum temperature and pH for enzyme activity were 70℃ and pH 5.6, respectively. Accordingly, *Bacillus* sp. AGh1 can produce endo-1,4-*β*-D-glucanase enzyme from rice bran as a cheap raw material with suitable activity. Consequently, the enzyme is functional over a wide range of pH and may be applied, which needs more studies. Thermostable Endo-1,4-β-D-glucanase, known as a density reducer in cellulose degradation, is one of the most widely used enzymes in industries. In this study, the thermostability of Endo-1, 4-β-D-glucanase produced by Bacillus sp. AGh1, which was isolated from a hot-spring in Ardabil province, Iran, was evaluated. The enzyme production was optimized through two steps. Rice bran and yeast extract were determined as the effective factors for enzyme production by the Plackett-Burman method, and optimization of the culture medium was performed by the Response Surface Methodology. The amounts of the mentioned effective factors for producing the enzyme were 58.8 and 14.87 g L-1, respectively. The optimum temperature and pH for the enzyme activity were 70℃ and pH 5.6, respectively. Accordingly, Bacillus sp. AGh1 can produce endo-1,4-β-D-glucanase enzyme from rice bran as cheap raw material with suitable activity. Consequently, the enzyme has functional at the wide range of pH and may be applied which needs more studies.

Keywords: *Bacillus*, Cellulase, thermostability, Endo-1, 4-*β*-D-glucanase