

تولید و تعیین خصوصیت اویسیلاز باکتریایی گرمادوست

فاطمه آزادیان¹، ارسطو بدویی دلفارد^{2*}، عبدالحمید نمکی شوشتری³، مهدی حسن شاهیان⁴

1- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان

2- دانشیار بیوشیمی، گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان

3- دانشیار ژنتیک، گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان

4- دانشیار میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان

* کرمان، صندوق پستی 133-76169

Badoei@uk.ac.ir

(دریافت مقاله: 94/8/30 پذیرش مقاله: 94/10/12)

چکیده- امروزه توسعه فرایندهای تبدیل مؤثر ضایعات کشاورزی برای تولید مواد شیمیایی با ارزش بالا توجه زیادی را به خود جلب کرده است. اویسیلازها یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های صنعتی برای بیشتر فرایندهای تبدیل زیستی هستند. در این مطالعه، برای جداسازی باکتری مولد اویسیلاز، نمونه‌ها به محیط مایع اختصاصی AVI براث تلقیح و به مدت یک هفته در دمای 50 درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. باکتری‌های ترموفیل و دارای هاله شفاف (نشان دهنده اویسیلاز خارج سلولی) خالص‌سازی و جداسازی شدند. باکتری AV8 که بیشترین میزان هاله شفاف را نشان داد، برای مطالعات بعدی انتخاب شد. نتایج مطالعات بیوشیمیایی و آنالیز ژن 16S rRNA نشان داد که این سویه متعلق به جنس باسیلوس می‌باشد. تولید اویسیلاز تحت پارامترهای محیطی مختلف مورد بررسی قرار گرفت. منبع بهینه کربن و نیتروژن، جهت تولید آنزیم اویسیلاز به ترتیب شامل ساکارز (0/5 درصد) و عصاره مخمر (0/25 درصد) به دست آمد. سپس آنزیم اویسیلاز با استفاده از سولفات آمونیوم، دیالیز و ستون کروماتوگرافی تبادل یونی Q-سفراز به طور نسبی خالص‌سازی شد. نتایج نشان داد که آنزیم در محدوده دمایی 30-70 درجه سانتی‌گراد پایدار بوده و در 70 درجه سانتی‌گراد بیش‌ترین فعالیت را داشت. فعالیت و پایداری بهینه اویسیلاز در pH 6 مشاهده شد. این ویژگی‌ها نشان می‌دهد که این آنزیم یک اویسیلاز ترموفیل و اسیدوفیل است. علاوه بر این، فعالیت اویسیلاز به وسیله متانول (138 درصد) و کلروفرم (107 درصد) نسبت به نمونه فاقد حلال افزایش پیدا کرد. این نتایج خاطر نشان می‌سازد که اویسیلاز AV8 کاربردهای بالقوه‌ای برای استفاده در صنایع مختلف را دارا می‌باشد.

کلید واژگان: اویسیلاز، باسیلوس، ترموفیل، تعیین خصوصیت.

برای تولید محصولات زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرد

[1]. اولین و ضروری‌ترین مرحله برای کاربرد صنعتی

سلولز هیدرولیز آن است که هم از نظر شیمیایی و آنزیمی

انجام می‌شود. هیدرولیز آنزیمی، روشی سازگار با محیط

1- مقدمه

سلولز به عنوان فراوان‌ترین پلی‌ساکارید طبیعی است که

به طور بالقوه به عنوان منبع کربوهیدراتی قابل تجدید

سویه *Bacillus licheniformis* که قادر است روی اویسل به عنوان سوبسترا رشد کند و آنزیم اویسلاز را تولید کند از چشمه آب گرم گروه در شهرستان جیرفت جداسازی شده و پس از بهینه‌سازی شرایط تولید، ویژگی‌های بیوشیمیایی اویسلاز در دماهای مختلف، pHهای مختلف، یون‌ها و حلال‌های آلی مورد بررسی قرار گرفت.

2- مواد و روش‌ها

2-1- نمونه‌برداری و غربالگری باکتری مولد اویسلاز

در این پژوهش برای جداسازی باکتری‌های ترموفیل و مولد آنزیم اویسلاز از چشمه آب گرم گروه در شهرستان جیرفت در استان کرمان با مختصات جغرافیایی 57 درجه و 56 دقیقه طول شرقی و 29 درجه و 5 دقیقه عرض شمالی با دمای 72 درجه سانتی‌گراد نمونه‌برداری صورت گرفت. ترکیبات محیط کشت برای جداسازی باکتری‌های مولد اویسلاز شامل Avicel, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.2 (g/l); yeast extract, 0.5; $(NH_4)_2SO_4$, 2; $CaCl_2$, 0.1; K_2HPO_4 , 2; KH_2PO_4 , 0.6; می‌باشد [12].

برای تعیین بهترین سویه تولیدکننده آنزیم اویسلاز از 10 نوع باکتری تولیدکننده آنزیم که در ابتدا دارای هاله در اطراف کلنی خود بودند استفاده شد. این باکتری‌ها در AVI برات در دمای 50 درجه سانتی‌گراد و دور rpm 150 کشت داده شدند و در زمان‌های 48 و 72 ساعت فعالیت آن‌ها با روش میلر [13] اندازه‌گیری شد و باکتری که بیش‌ترین غلظت گلوکز را در محیط تولید کرده بود به عنوان سویه برتر در نظر گرفته شد و بررسی‌های بعدی روی آن انجام گرفت.

2-2- شناسایی باکتری‌های تولیدکننده آنزیم اویسلاز

برای شناسایی باکتری‌های سلولایتیک به لحاظ مورفولوژیکی و بیوشیمیایی از رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز، تست SIM، تست TSI، تست سیمون سیترات،

زیست است که به وسیله آنزیم‌های سلولاز انجام می‌شود. این آنزیم‌ها هیدرولیز سلولز به قندهای محلول و گلوکز را کاتالیز می‌کنند. سلولازها را می‌توان حداقل به سه گروه طبقه‌بندی کرد. اندو بتا (1-4) گلوکانازها، آگزو بتا (1-4) گلوکانازها (اویسلازها) و بتاگلوکوزیدازها. اندوگلوکانازها به طور تصادفی پیوندهای بتا گلیکوزیدی داخل مولکولی از زنجیره سلولز را برای تولید شاخه‌های جدید قابل دسترس برای حمله آگزوگلوکانازها هیدرولیز می‌کنند. آگزوگلوکانازها که شامل سلوبیوهیدرولازها هستند، سلوبیوز و در برخی موارد گلوکز را از انتهای احیا و غیر احیا از زنجیره سلولز آزاد می‌کنند. بتاگلوکوزیدازها گلوکز را از سلوبیوز ایجاد می‌کنند [2,3]. مقادیر زیادی از زیست توده گیاهی که در طی پردازش صنعتی و فرایندهای کشاورزی تولید می‌شوند یک مشکل اقتصادی و زیست محیطی هستند. از این ضایعات می‌توان به عنوان مواد اولیه ارزان قیمت برای تولید محصولات زیستی از جمله تولید سلولاز استفاده کرد [4]. اویسلازها کاربردهای بالقوه‌ای در تبدیل زیستی ضایعات کشاورزی به محصولات مفید مثل پروتئین تک یاخته و سوخت زیستی دارند [5,6]. اویسلازهای ترموفیل در بسیاری از صنایع ارزشمند هستند، چون هیدرولیز سوبستراهای سلولزی در دماهای بالاتر بسیار سریع‌تر انجام می‌شود. گونه‌های باسیلوس قادر به ترشح مقادیر زیادی از آنزیم‌های خارج سلولی هستند [7]. دو فعالیت اویسلازی مجزا در *Bacillus circulans* مشاهده شده است [8]. سایر سویه‌های باسیلوس، *Bacillus sphaericus* و *Bacillus subtilis* فعالیت تجزیه سلولز بالایی نشان داده‌اند [9,10]. به تازگی یک باکتری هوازی ترموفیل که قادر به تولید اویسلاز است *Caldibacillus cellulovorans* جداسازی شده است [11]. باوجود کاربردهای بسیار اویسلاز در صنایع به ویژه صنعت سوخت زیستی مطالعات اندکی بر روی این آنزیم صورت گرفته است. در این مطالعه

بر اساس میزان گلوکز تولید شده طبق روش میلر اندازه گیری شد. وزن خشک باکتری های رسوب داده شده در هر فالكون بر حسب میلی گرم در حجم 10 میلی لیتر در پایان 48 ساعت محاسبه شد.

2-3-2- منابع مختلف نیترژن

منبع نیترژن مورد استفاده از عوامل مورد توجه در رشد و تولید محصولات میکروبی می باشد. در بهینه سازی منبع نیترژن جهت تولید آنزیم اویسلاز 6 نوع ترکیب متفاوت شامل آمونیوم سولفات، آمونیوم کلراید، نترات سدیم، عصاره مخمر، تربیتون و پپتون با غلظت 0/25 درصد استفاده شدند [15]. فعالیت آنزیمی سوپرناتانت بر اساس میزان گلوکز تولید شده طبق روش میلر اندازه گیری شد [13]. وزن خشک باکتری های رسوب داده شده در هر فالكون بر حسب میلی گرم در حجم 10 میلی لیتر در پایان 48 ساعت محاسبه شد.

2-3-3- منابع یونی مختلف

باکتری AV8 در محیط نوترینت برات به مدت 18 ساعت کشت داده و سپس به میزان مساوی از محیط نوترینت برات به محیط های AVI برات با منابع یونی مختلف شامل $MgSO_4$, $MnSO_4$, $ZnSO_4$, $CaCl_2$, KCl با غلظت یونی 0/5 گرم بر لیتر انتقال داده شدند [15]. فعالیت آنزیمی سوپرناتانت بر اساس میزان گلوکز تولید شده طبق روش میلر اندازه گیری شد.

2-3-4- pH های مختلف

جهت بررسی تأثیر pH محیط، باکتری جداسازی شده در محیط نوترینت برات به مدت 16-18 ساعت کشت داده شده و سپس در محیط های AVI برات با 6 مقدار pH متفاوت (4، 5، 6، 7، 8، 9) تلقیح شدند [15]. برای سنجش گلوکز در محیط از روش میلر استفاده شد. در این

تست هیدرولیز ژلاتین، تست متیل رد و تست وگس-پروسکوئر استفاده شد. به منظور شناسایی مولکولی ابتدا باکتری AV8 در محیط آگار کشت داده شد. پس از رشد باکتری ها جهت استخراج DNA از روش فنل کلروفرم استفاده شد [14]. برای انجام واکنش PCR در ابتدا درون ویال 200 میکرولیتری به میزان 18/8 میکرولیتر از آب مقطر دیونیزه ریخته شد. سپس به ترتیب 2/5 میکرولیتر Buffer 10x، 0/5 میکرولیتر dNTP (10 میلی مولار)، 1 میکرولیتر $MgCl_2$ (20 میلی مولار)، اضافه و به آرامی با کمک سمپلر محتویات ویال مخلوط شد. در این مرحله از آنزیم Taq DNA Polymerase به میزان 0/2 میکرولیتر به ویال اضافه و بلافاصله از استوک 20 پیکومول پرایمرها (Forward, Reverse) هر کدام به اندازه 1 میکرولیتر به آن افزوده و مخلوط شد. در نهایت 0/5 میکرولیتر از نمونه DNA الگو (استخراج شده از باکتری) به ویال اضافه شد. برای مشاهده DNA ژنومی، از ژل آگارز با غلظت 0/7 درصد استفاده شد. توالی DNA با استفاده از توالی یاب DNA توسط شرکت بیونیر (کره جنوبی) تعیین شد.

2-3-3- بهینه سازی شرایط تولید آنزیم در حضور منابع مختلف

2-3-1- منابع مختلف کربن

منبع کربن به عنوان فاکتور مهم و مؤثر در رشد و متابولیسم میکروبی می باشد. استفاده از منبع کربن مناسب اهمیت زیادی از نظر هزینه ها و تولید آنزیم دارد. در این بررسی، 6 نوع منبع کربن گلوکز، گالاکتوز، سوکرز، نشاسته، (cellulose Avicel، Microcrystalin) CMC به عنوان منبع انرژی استفاده شدند [15]. در زمان 48 ساعت 10 میلی لیتر از محتوای ارلن ها را به فالكون 15 منتقل کرده و بعد از سانتریفیوژ در 5000 rpm به مدت 5 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی گراد، فعالیت آنزیمی سوپرناتانت

آنزیمی هستند. زیرا آنزیم اویسلایز با ویژگی‌های مطلوب، شامل توانایی تجزیه اویسل حتی در دمای اتاق، پایداری در دمای بالا و فعالیت مناسب در محدوده pH وسیع، در فرایندهای مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد.

2-5-1- بررسی میزان فعالیت و پایداری دمایی

میزان فعالیت آنزیم باکتری AV8 در دماهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه، به 500 میکرولیتر سوستر (AVI یک درصد) که در بافر سدیم فسفات 50 میلی مولار آماده شده است، 500 میکرولیتر آنزیم اضافه شده و در محدوده دمایی 90-30 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 دقیقه گرم‌گذاری شدند. در بررسی پایداری دمایی آنزیم اویسلایز، 500 میکرولیتر آنزیم را به مدت 30 دقیقه در دماهای مورد بررسی قرار داده وقتی همه لوله‌ها در دمای تعیین شده قرار گرفتند به همه آن‌ها به طور هم زمان 500 میکرولیتر سوستر افزوده و در دمای 50 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 دقیقه انکوبه شدند. پس از آن 1 ml معرف DNS (Dinitro-salicylic acid) به همه لوله‌ها افزوده و همه لوله‌ها به مدت 10 دقیقه در حمام آب‌گرم قرار داده شدند. بعد از خنک شدن لوله‌ها جذب آن‌ها در طول موج 540 نانومتر تعیین گردید [13].

2-5-2- بررسی غیر فعال شدن حرارتی برگشت ناپذیر

غیرفعال شدن حرارتی برگشت ناپذیر¹ (0) به وسیله انکوبه کردن محلول آنزیمی در دماهای مختلف (50، 60، 70 درجه سانتی‌گراد) انجام می‌شود. 500 میکرولیتر از محلول آنزیمی در بازه‌های زمانی مختلف (0، 20، 30، 40، 50، 60 دقیقه) در دماهای 50، 60، 70 درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و سپس میزان فعالیت آنزیمی به روش میلر اندازه‌گیری شد.

مرحله باید توجه داشت که رشد متابولیت‌های میکروبی در مدت 48 ساعت باعث تغییر pH اولیه محیط کشت می‌شود، بنابراین بر خلاف دیگر فاکتورهای مؤثر جهت بهینه سازی تولید آنزیم (مانند منبع کربن و نیتروژن)، میزان اسیدیته محیط متغیر می‌باشد. بعد از 48 ساعت فعالیت آنزیمی سوپرناتانت و وزن خشک آن‌ها اندازه‌گیری شد.

2-4- خالص‌سازی آنزیم اویسلایز

از باکتری AV8 برای سنتز آنزیم اویسلایز استفاده شد. 20ml از محیط نوترینت براث واجد باکتری رشد یافته به ارلن‌های حاوی 200 ml محیط مایع اختصاصی (AVI براث) جهت سنتز آنزیم اویسلایز برده (10 درصد محیط) و به مدت 48 ساعت در دمای 50 درجه سانتی‌گراد و 150rpm انکوبه شدند. در این شرایط باکتری‌ها در محیط آنزیم اویسلایز تولید و ترشح می‌کنند. در مرحله بعدی جهت رسوب آنزیم، ارلن حاوی محلول رویی را در همان شرایط (درون ظرف حاوی یخ) بر روی هم زن مغناطیسی قرار داده و به تدریج سولفات آمونیوم درون محلول ریخته شد. به طور کلی برای هر 100 ml محیط 56 گرم سولفات آمونیوم استفاده می‌شود (85 درصد). محلول به دست آمده درون کیسه دیالیز ریخته شد. دیالیز با استفاده از کیسه جهت حذف نمک سولفات آمونیوم از رسوب پروتئینی انجام می‌شود. برای تخلیص آنزیم از کروماتوگرافی تعویض یونی Q- سفارز (1/5×24 cm) استفاده گردید. پس از انجام این فرایند و خوانش جذب لوله‌ها در 280 نانومتر و رسم نمودار مربوطه، فعالیت آنزیم در فراکشن‌های هر پیک سنجدیده شد و نمودار آن همراه با شیب غلظت نمک رسم گردید.

2-5- بررسی خصوصیات آنزیمی

مقادیر pH و دما از فاکتورهای مهم و تعیین کننده فعالیت

¹ Irreversible thermal inactivation

(KCl)، سولفات منگنز ($MnSO_4$)، سولفات آهن ($FeSO_4$)، سولفات منیزیم ($MgSO_4$)، کلرید کلسیم ($CaCl_2$)، کلرید جیوه (Hg_2Cl_2)، سولفات روی ($ZnSO_4$)، کلرید کبالت ($CoCl_2$) بودند. همچنین فعالیت اویسلازی در حضور اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA)، سدیم دو دسیل سولفات (SDS)، بتامرکاپتواتانول (B-Mercaptoethanol)، Triton X-100، پراکسید هیدروژن Tween 20 و (H_2O_2) نیز بررسی شد. این ترکیبات دارای غلظت 15 mM بوده و در بافر استات سدیم با pH 6 حل شده‌اند.

2-6- تعیین خصوصیت سیستیکی آنزیم

برای به دست آوردن پارامترهای مربوط به معادله سرعت واکنش آنزیمی، آنزیم اویسلاز در معرض غلظت‌های مختلف اویسل به عنوان سوبسترا قرار گرفت. پس از انجام واکنش آنزیمی و تعیین میزان فعالیت آنزیم در حضور غلظت‌های مختلف سوبسترا منحنی میکائلیس منتن و نمودار لاین ویر-برگ، رسم شد.

3- نتایج و بحث

3-1- غربالگری باکتری‌های مولد اویسلاز

میزان تجزیه اویسل توسط سویه‌ها با اندازه‌گیری قطر هاله در محیط اختصاصی انجام شد. در محیط اختصاصی چنانچه باکتری مولد اویسلاز رشد کند در اطراف کلنی‌ها هاله شفاف ایجاد می‌شود. سویه AV8 بعد از 48 ساعت بیش‌ترین میزان هاله شفاف را در محیط اختصاصی ایجاد کرد علاوه بر این 10 باکتری تولید کننده آنزیم در محیط AVI براث کشت داده شدند و در زمان‌های 48 ساعت و 72 ساعت فعالیت آن‌ها با روش میلر اندازه‌گیری شد. سویه AV8 بعد از 48 ساعت و 72 ساعت بیش‌ترین غلظت گلوکز را در محیط تولید کرد و به عنوان سویه برتر در نظر گرفته شد و بررسی‌های بعدی روی آن انجام گرفت (شکل 1).

2-5-3- بررسی میزان فعالیت و پایداری در pHهای مختلف

میزان فعالیت آنزیم اویسلاز باکتری AV8 در محدوده pH 3-12 مورد بررسی قرار گرفت. بافرهای به کار رفته برای تهیه pH مختلف عبارت بودند از: استات سدیم: 5، pH 4 (جرم مولکولی برابر با 82/04) فسفات: 6، pH 7 (جرم مولکولی برابر با 174/18) تریس: 8، 9، pH 10 (جرم مولکولی برابر با 121/04). فعالیت آنزیمی نمونه‌ها با استفاده از سوبسترای اویسل یک درصد و در شرایط استاندارد انجام شد و منحنی فعالیت آنزیمی بر حسب pH رسم گردید. در بررسی پایداری به 500 میکرولیتر بافر با pH مورد نظر، 500 میکرولیتر آنزیم اضافه کرده و به مدت یک ساعت در دمای محیط قرار گرفتند و سپس میزان فعالیت باقی مانده بر اساس شرایط استاندارد اندازه‌گیری شد.

2-5-4- بررسی میزان فعالیت آنزیمی در حضور حلال‌های آلی

حلال‌های آلی به کار رفته برای تعیین میزان فعالیت آنزیم اویسلاز شامل بوتانول، ایزوپروپانول، دی‌اتیل‌تر، تولوئن، کلروفرم، متانول، سیکلوهگزان، دی‌متیل سولفوکساید، دی‌متیل فرم امید بودند. با توجه به اینکه استفاده از حلال‌های آلی قابل امتزاج با آب به عنوان محیط واکنش برای آنزیم‌ها از نظر صنعتی بسیار حائز اهمیت‌اند، برای بررسی فعالیت آنزیم در حضور حلال‌های آلی در ابتدا 600 میکرولیتر از محلول حلال‌های آلی مورد بررسی و 500 میکرولیتر سوبسترا، به همه لوله‌ها افزوده شد، سپس به همه لوله‌ها 900 میکرولیتر آنزیم اضافه شد. فعالیت آنزیمی نمونه فاقد حلال به عنوان 100 درصد در نظر گرفته شد و فعالیت سایر حلال‌ها نسبت به آن سنجیده شد.

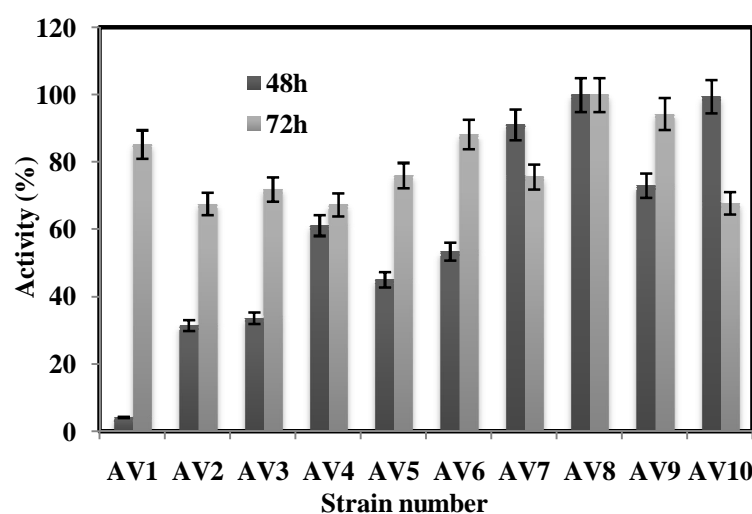
2-5-5- بررسی میزان فعالیت در حضور یون‌ها و ترکیبات مختلف

یون‌های به کار رفته برای تعیین میزان فعالیت آنزیم اویسلاز شامل، سولفات مس ($CuSO_4$)، کلرید پتاسیم

2-3- شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی

باکتری‌های تولید کننده آنزیم حاصل براساس رنگ آمیزی گرم و بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی به نظر می‌رسید مربوط به جنس باسیلوس باشد. نتایج حاصل در جدول 1 آورده شده است. بعد از تعیین توالی، برای محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراس سویه در مقایسه با سایر ژن‌های

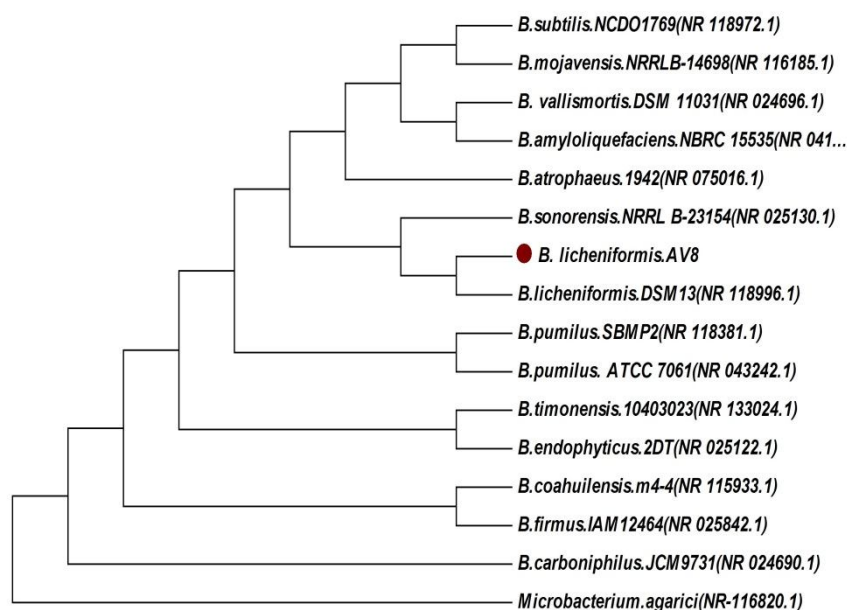
16S rRNA موجود در مرکز ملی بیوتکنولوژی درخت فیلوژنتیکی رسم گردید. رسم درخت فیلوژنتیک با استفاده از نرم افزار مگا 4 با روش Neighbour joining انجام شد و نشان داد که این سویه با جنس و گونه *Bacillus licheniformis* همسانی بیش از 98 درصد دارد (شکل 2).



شکل 1 فعالیت اویسلازی 10 باکتری جداسازی شده در محیط مایع بعد از 48 و 72 ساعت

جدول 1 تست‌های بیوشیمیایی

نام سویه	سیمون سیترات	تست TSI	هیدرولیز ژلاتین	تولید ایندول	تولید H ₂ S	کاتالاز	حرکت	MR/VP
HSA1	+	قلیا/ اسید	-	-	-	+	-	+/+
HSA2	+	قلیا/ اسید	-	-	-	+	+	+/+
HSA3	-	قلیا/ اسید	-	-	-	+	+	+/+
HSA4	-	قلیا/ اسید	-	-	-	+	-	+/+
HSA5	+	قلیا / اسید	-	-	-	+	-	+/+
HSA6	+	قلیا/ اسید	-	-	-	+	+	+/+
HSA7	+	قلیا/ اسید	-	-	-	+	-	+/+
HSA8	+	قلیا/ اسید	+	-	+	+	-	+/+
HSA9	+	قلیا/ اسید	-	-	-	+	-	-/+
HSA10	-	قلیا/ اسید	-	-	-	+	-	-/+



شکل 2 درخت فیلوژنی سویه باسیلوس لیکنی فورمیس AV8 با استفاده از نرم افزار Mega4

آمونیم سولفات به دست آمد (شکل 3-ب). بر اساس داده‌های حاصل می‌توان نتیجه گرفت که محیط واجد عصاره مخمر تأثیر بسزایی در تولید آنزیم و تجزیه اویسل داشته است. عصاره مخمر به عنوان منبع نیتروژنی مناسب به وسیله *Bacillus cereus* [18] و *Paenibacillus barcinonensis* MG7 [19] پیشنهاد شده است.

3-3-3 pHهای مختلف

باکتری AV8 بعد از 48 ساعت در محیط با pH 6 بیشترین میزان تولید آنزیم را نشان داد. در pHهای 7، 8 و 9 کاهش تولید آنزیم دیده می‌شود (شکل 3-ج). بنابراین این باکتری در محیط دارای pH اسیدی واجد بیشترین میزان گلوکز آزاد شده بود. در آزمایشاتی که بر روی بهینه‌سازی تولید آنزیم سلولاز در باسیلوس sp. صورت گرفت بیشترین تولید آنزیم در pH 6 مشاهده شد [20]. در بررسی که بر روی *Paenibacillus barcinonensis* MG7 صورت گرفت تولید آنزیم سلولاز در محدوده 8- pH 6 افزایش قابل توجهی نشان داد و بیشترین تولید آن در pH 7 مشاهده شد [19].

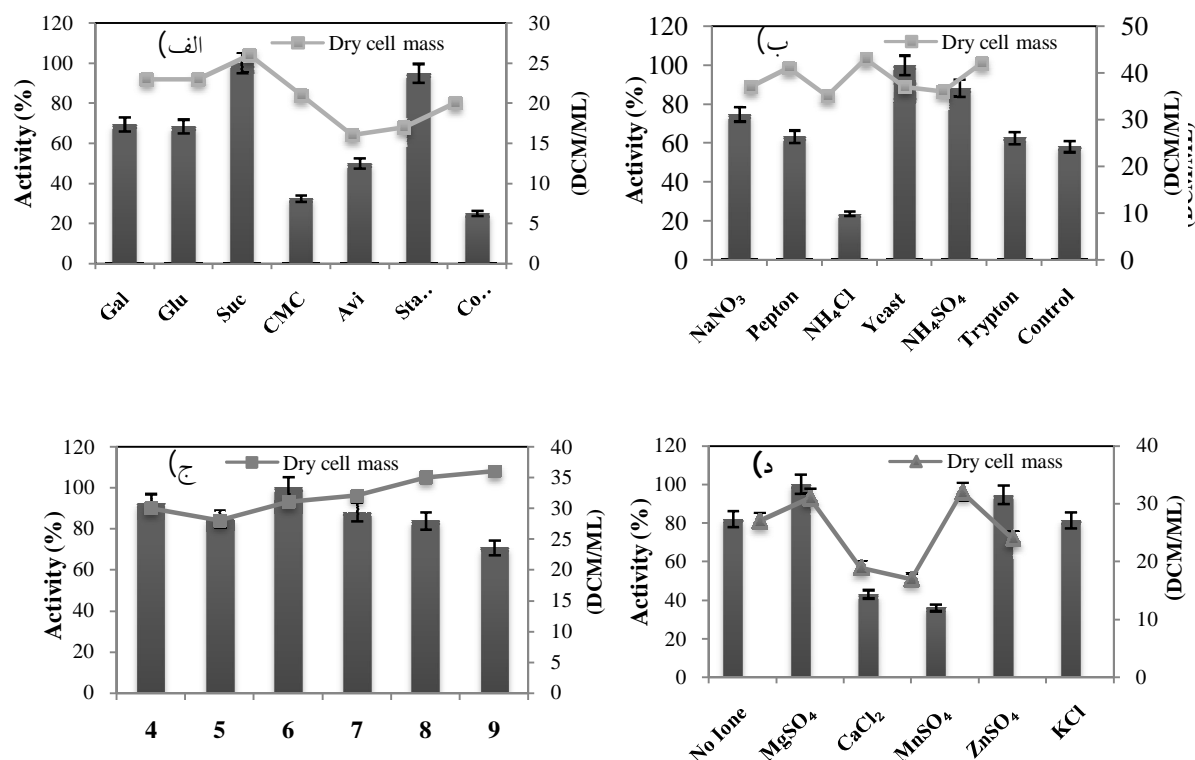
3-3-3-3 بهینه سازی شرایط تولید در حضور منابع مختلف

3-3-3-1-1-3 منابع مختلف کربن

در این بررسی از 6 نوع منبع کربن گلوکز، گالاکتوز، سوکرز، نشاسته، Avicel، CMC به عنوان منبع انرژی استفاده شد. بر اساس داده‌های به دست آمده مشخص شد که در باکتری AV8 در محیط دارای ترکیب ساکارز به میزان قابل توجهی میزان تولید آنزیم اویسلاز بیش‌تر از محیط‌های دیگر (محیط دارای نشاسته، گلوکز، گالاکتوز، CMC، Avicel) می‌باشد (شکل 3-الف). در آزمایشاتی که بر روی بهینه‌سازی تولید سلولاز در *Trichoderma viride* صورت گرفت ساکارز به عنوان منبع بهینه سنتز آنزیم سلولاز پیشنهاد شد [16]. در مطالعه دیگری بر روی *Acetobacter xylinum* مشاهده شد سوکرز، گلوکز و مانیتول به طور قابل توجهی سطح تولید آنزیم را در باکتری افزایش می‌دهند [17].

3-3-3-2-2-3 منابع مختلف نیتروژن

نتایج نشان می‌دهد در باکتری AV8 پس از 48 ساعت بهترین فعالیت در محیط واجد عصاره مخمر و بعد



شکل 3 بهینه سازی شرایط تولید در حضور منابع مختلف کربن، نیتروژن، یون و pH

4-3-4- خالص سازی آنزیم اویسیلاز

ستون کروماتوگرافی با بافر سدیم- فسفات (40 میلی مولار) به تعادل رسانده شد. ابتدا پروتئین‌های متصل نشده جمع آوری شدند. با اعمال شیب غلظت نمکی (0-90 درصد) پروتئین‌های متصل شده که بار منفی داشتند جدا شدند. پس از انجام کروماتوگرافی، غلظت پروتئین و فعالیت آنزیم در فراکشن‌های هر پیک سنجیده شد. بر اساس نتایج فراکشن فعال آنزیم AV8 در شیب نمکی 25 درصد از ستون خارج می‌شود (شکل 4).

5-3-5- بررسی خصوصیات آنزیمی

5-3-5-1- بررسی میزان فعالیت و پایداری دمایی

همان طور که نمودار نشان می‌دهد در باکتری AV8 بالاترین فعالیت آنزیم در دمای 70 درجه سانتی‌گراد مشاهده شد، به طوری که از دمای 30 تا 60 درجه

3-3-4- یون‌های مختلف

همان طور که در شکل 3-د دیده می‌شود، باکتری AV8 در حضور یون MgSO₄ بیش‌ترین میزان تولید را نشان داده است. به طوری که در عدم حضور این یون در محیط میزان تولید آنزیم به طور قابل توجهی کاهش یافته است. باکتری در محیط واجد یون ZnSO₄ نیز دارای تولید قابل توجهی بوده است در حالی که در سایر محیط‌های دارای یون، CaCl₂ و KCl میزان گلوکز آزاد شده در محیط به تدریج کاهش پیدا می‌کند. در محیط حاوی یون MnSO₄ کاهش قابل توجهی در میزان تولید آنزیم مشاهده شد. در آزمایشاتی که بر روی بهینه سازی تولید آنزیم سلولاز صورت گرفت، منیزیم سولفات (MgSO₄) در غلظت 1 gL⁻¹ و کلرید کلسیم در غلظت 0.001 gL⁻¹ به عنوان یک عنصر ضروری در سنتز آنزیم می‌باشند و تولید بتاگلوکاناز را افزایش می‌دهند [21].

pH مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از اندازه گیری فعالیت و پایداری آنزیم باکتری AV8 در شکل 6 آمده است. اویسلاز به دست آمده از باکتری AV8 بیشترین فعالیت را در pH 6 نشان داد. در pH 7 فعالیت آنزیم به میزان قابل توجهی کاهش یافت و در بازه pH 11-12 کم تر از 50 درصد فعالیت بهینه آنزیم مشاهده شد. در مطالعه فعالیت آنزیم اویسلاز باکتری *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1، حداکثر فعالیت آنزیم در pH 4/8 مشاهده شد [22]. pH بهینه اویسلاز تولید شده به وسیله باکتری *Paenibacillus champinasensis* BL11 8/5 گزارش شد [25]. علاوه بر این اویسلاز تولید شده به وسیله *Geobacillus stearothermophilus* تحت شرایط قلیایی عملکرد مطلوبی دارد [26]. در بررسی سلولاز جدا شده از باکتری *Bacillus pumilus* EB3 مشخص شد که فعالیت بهینه آنزیم در pH 6 بوده است [23] و در *Bacillus subtilis* LFS3 در pH 6/5 مشاهده شد [27].

3-5-4- بررسی میزان فعالیت آنزیم در حضور یونها و ترکیبات مختلف

همانطور که در جدول 2 مشاهده می شود، اویسلاز حاصل از باکتری AV8 در حضور ترکیباتی از قبیل H_2O_2 ، CaCl_2 ، EDTA، و MnSO_4 فعالیت آن به میزان قابل توجهی افزایش پیدا می کند.

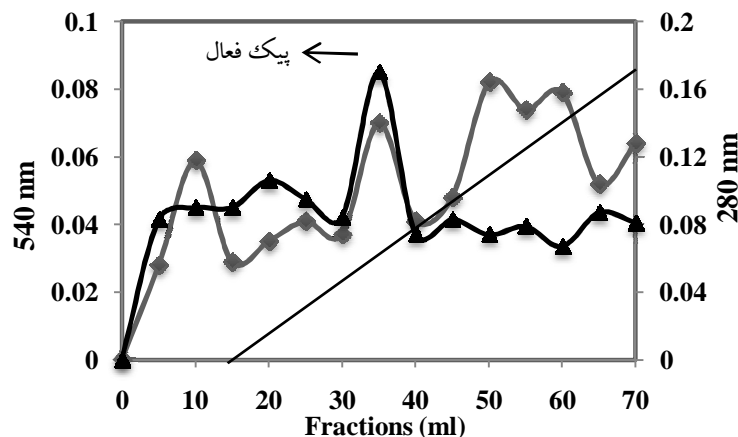
سانتی گراد، روند افزایش فعالیت آنزیم دیده شد (شکل 5- الف). با توجه به این که باکتری ترموفیل می باشد (از شرایط دمایی بالا جداسازی شده است) این نتیجه قابل پیش بینی بود. آنزیم اویسلاز در دمای 80 درجه سانتی گراد 24 درصد کاهش فعالیت داشت. روند کاهش فعالیت آنزیمی در دماهای بالاتر ادامه داشته به طوری که در دمای 90 درجه سانتی گراد 70 درصد فعالیت بهینه آنزیمی مشاهده شد. در بررسی اویسلاز جداسازی شده از باکتری *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1 فعالیت بهینه آنزیم در دمای 80 درجه سانتی گراد گزارش شد [22]. در مطالعه ای بر روی سلولاز خالص سازی شده از *Bacillus pumilus* EB3 [23] و *Bacillus sp.* L1 [24] ماکزیمم فعالیت آنزیم در دمای 60 درجه سانتی گراد مشاهده شد.

3-5-2- بررسی غیر فعال شدن حرارتی برگشت ناپذیر

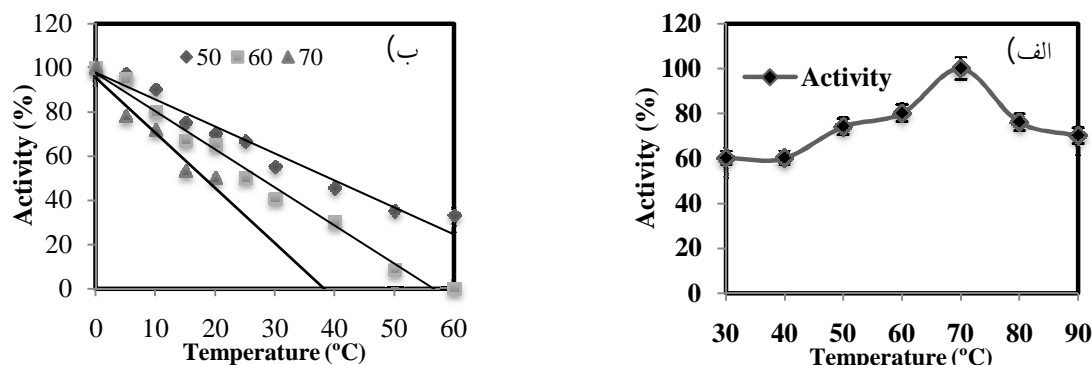
نتایج غیرفعال شدن حرارتی غیرقابل برگشت نشان داد که اویسلاز AV8 در دمای 50 درجه سانتی گراد بعد از 60 دقیقه حدود 70 درصد کاهش فعالیت داشت. نیمه عمر این آنزیم حدود 20 دقیقه در دمای 70 درجه سانتی گراد است (شکل 5- ب).

3-5-3- بررسی میزان فعالیت و پایداری در حضور pH های مختلف

میزان فعالیت اویسلازی باکتری AV8 در محدوده 3-12



شکل 4 منحنی کروماتوگرام حاصل از ستون Q- سفارز آنزیم اویسلاز



شکل 5 تاثیر دما بر روی فعالیت و پایداری آنزیم باکتری AV8

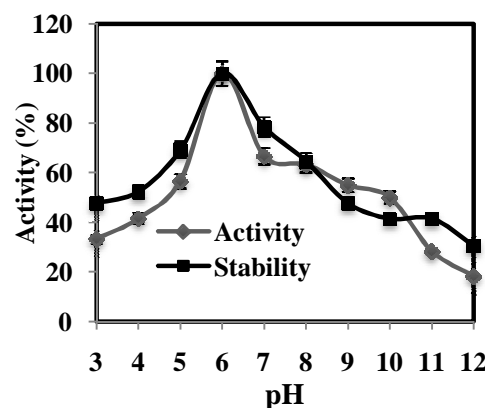
آنزیم اویسلایز در حضور ترکیب بتا مرکاپتواتانول 80 درصد از فعالیت اولیه را دارا بود. این آنزیم در حضور یون $MgSO_4$ 77 درصد فعالیت اویسلایز نشان داد که این موضوع بیانگر فعال بودن آنزیم در حضور یونها و ترکیبات مختلف می‌باشد.

یونهای $FeSO_4$ و Hg_2Cl_2 و ترکیباتی از قبیل Tx100 و SDS بیش‌تر از سایر یونها و ترکیبات فعالیت آنزیم را ممانعت کرده بود. در مطالعه‌ای که بر روی آنزیم سلولاز باکتری باسیلوس سوبتیلیس صورت گرفت در حضور یون منیزیم افزایش فعالیت آنزیم مشاهده شد [27]. ممانعت کامل فعالیت آنزیم در حضور یون Hg^{2+} در آنزیم سلولاز جداسازی شده از *Paenibacillus barcinonensis* و MG7 و *Bacillus subtilis* LFS3 گزارش شده است [19,27]. ممانعت فعالیت آنزیم به وسیله Hg^{2+} ممکن است با اتصال به گروه تیول مرتبط باشد که به برهم کنش با اسید آمینه تریپتوفان یا گروه کربوکسیل آمینواسیدها در آنزیم منجر می‌شود [27].

3-5-5- بررسی فعالیت و پایداری آنزیم در حضور حلال-

های آلی

حلال‌های آلی بر روی فعالیت آنزیم‌ها تأثیرگذار هستند و برای بررسی این تأثیر آنزیم اویسلایز در مدت زمان



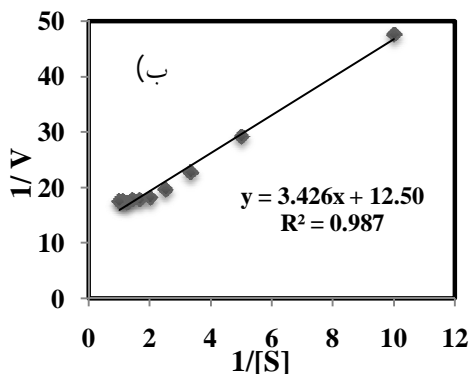
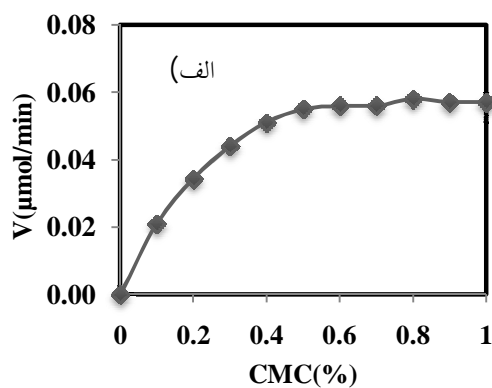
شکل 6 تاثیر pH بر فعالیت و پایداری آنزیم اویسلایز باکتری AV8

جدول 2 اثر یون‌های فلزی و ترکیبات مختلف روی فعالیت آنزیم اویسلایز

یون‌های فلزی	فعالیت (%)
Control	100
ZnSO ₄	69 ± 2.2
MgSO ₄	77 ± 1.8
FeSO ₄	37 ± 2.5
CoCl ₂	46 ± 2.2
CuSO ₄	51 ± 1.8
Hg ₂ Cl ₂	29 ± 3.5
CaCl ₂	106 ± 2.5
MnSO ₄	103 ± 3.0
KCl	40 ± 2.5
Mercaptoethanol	80 ± 2.1
EDTA	126 ± 1.9
Tx100	37 ± 2.0
H ₂ O ₂	126 ± 1.8
SDS	10 ± 2.3

رسم شد. بر اساس نتایج K_m برابر با $0/27 \text{ mg/ml}$ و V_{max} برابر با $0/079 \mu\text{mol min}^{-1}$ برای آنزیم اویسلاز به دست آمد. در مطالعه دیگری که بر روی باکتری *Salinnivbrio* NTU-05 صورت گرفت مقادیر K_m و V_{max} آنزیم به ترتیب $3/03 \text{ mg/ml}$ و $142/86 \mu\text{mol min}^{-1}$ محاسبه شد [31].

علاوه بر این K_m و V_{max} در *Bacillus subtilis* LFS3 با استفاده از CMC به عنوان سوبسترا به ترتیب $2/2 \text{ mg/ml}$ و $0/699 \text{ U/ml}$ گزارش شد [27]. شماری از مقالات در مورد CMC، K_m را در محدوده $0/6-2/7$ گزارش کرده‌اند [31] که این نتایج نشان دهنده این است که آنزیم اویسلاز حاصل از *Bacillus licheniformis* تمایل بالایی به سوبسترا دارد.



شکل 7 منحنی میکائیلیس-متن و لاین ویور-برگ در غلظت های مختلف اویسل آنزیم AV8

برای تبدیل میکروبی مستقیم ضایعات کشاورزی به

واکنش در مجاورت حلال‌های آلی مختلف قرار داده شد. نتایج حاصل از فعالیت و پایداری آنزیم باکتری AV8 در جدول 3 آمده است. فعالیت آنزیم اویسلاز در باکتری AV8 در حضور حلال‌های آلی مثل متانول (138 درصد)، کلروفرم (107 درصد)، به میزان قابل توجهی افزایش پیدا می‌کند. اما فعالیت آنزیم در حضور دی متیل فرماید به طور قابل توجهی کاهش پیدا کرد به طوری که در حضور این ترکیب حدود 17 درصد از فعالیت آنزیم باقیمانده است. در بررسی دیگری بر روی آنزیم سلولاز جداسازی شده از *Bacillus aquimaris* حدود 85 درصد از فعالیت خود را در حضور متانول حفظ می‌کند [28]. در مطالعه‌ای که بر روی آنزیم سلولاز *Bacillus flexus* صورت گرفت فعالیت آنزیم در حضور اتانول و ایزوپروپانول به طور قابل توجهی افزایش پیدا می‌کند در حالی که در حضور تولوئن (87 درصد)، DMSO (82 درصد) و متانول (85 درصد) به طور نسبی مهار می‌شود [29]. در *Bacillus halodurans* CAS 1 فعالیت آنزیم در حضور استون، هگزان و استونیتریل به طور قابل توجهی افزایش پیدا می‌کند [30].

جدول 3 اثر حلال های آلی مختلف روی فعالیت آنزیم اویسلاز

حلال‌های آلی	فعالیت (%)
Control	100 ± 2.3
Methanol	138 ± 1.6
Chloroform	107 ± 1.6
Toluene	57 ± 2.2
DMF	17 ± 2.5
Isopropanol	87 ± 2.3
Butanol	55 ± 1.7
DMSO	33 ± 1.6
Cyclohexane	93 ± 2.2

3-6- تعیین خصوصیت سینتیکی آنزیم

پس از انجام واکنش آنزیمی و تعیین میزان فعالیت آنزیم در حضور غلظت‌های مختلف سوبسترا منحنی میکائیلیس-متن و نمودار لاین ویور-برگ (شکل 7)

of the genome of an alkalophilic *Bacillus* strain from an industrial point of view. *Extremophiles*. 4, 99-108.

- [10] Singh, J., Batra N. and Sobti, RC. (2004) Purification and characterization of alkaline cellulose produced by a novel isolate, *Bacillus sphaericus* JS1. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 31, 51-56.
- [11] Huang, X.P. and C. Monk. (2004) Purification and characterization of cellulase (CMCase) from a newly isolated thermophilic aerobic bacterium *Caldibacillus cellulovorans* gen. nov., sp. nov. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 20, 85-92.
- [12] Malfait, M., Godden, B. and Penninckx, M. (1984) Growth and cellulase production of *Mieromonospora chalcae* and *Pseudomonocardia thermophila*. *Annales de Microbiol.* 135, 79-89.
- [13] Miller, G.L., Blum, R., Glennon, W. and Burton, A.L. (1960) Measurement of carboxymethyl cellulase activity. *Anal. Biochem.* 1, 127-32.
- [14] Sambrook, J., MacCallum, P. and Russell D. (2001) Molecular Cloning: A laboratory manual. *J Biosci Med.* 2, 16-9.
- [15] Irfan M., Safdar A., Syed Q. and Nadeem M. (2012) Isolation and screening of cellulolytic bacteria from soil and optimization of cellulase production and activity. *Turk J Biochem.* 37 (3), 287-293.
- [16] Gautam, S.P., Bundela, P.S., Pandey, A.K., Awasthi, M.K. and Sarsaiya S. (2010) Optimization of the medium for the production of the cellulase by the *Trichoderma viride* using submerged fermentation. *Environment.* 1, 656-665.
- [17] Ramana, K.V., Tomar, A. and Singh L. (2000) Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter xylinum*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 16, 248-54.
- [18] Mukesh-Kumar, D.J., Poovai, P.D., Kumar, C.L., Sushma-Saroja, Y., Manimaran, A. and Kalaichelvan, P.T. (2012) Optimization of *Bacillus cereus* MRK1 cellulase production and its biostoning activity. *Der Pharmacia Lettre J.* 4, 881-88.
- [19] Asha, B.M., Revathi, M., Yadav, A. and Sakthivel, N. (2012) Purification and characterization of a thermophilic cellulase from a novel cellulolytic strain, *Paenibacillus*

بیواتانول ارائه کاتالیزورهایی با پایداری در حرارت‌های بالا و pH اسیدی که قادر به تحمل ممانعت کننده‌های تخمیری هستند ضروری است. این نتایج پتانسیل قابل توجه این آنزیم را در صنعت بیواتانول نشان می‌دهد.

4- تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید باهنر کرمان کمال تشکر و قدردانی را دارند.

5- منابع

- [1] Rubin, E.M. (2008) Genomics of cellulosic biofuels. *Nature.* 454, 841-845.
- [2] Zhang, Y.H.P., Himmel, M.E. and Mielenz, J.R. (2006) Outlook for cellulase improvement, screening and selection strategies. *Biotechnol. Adv.* 24, 452- 481.
- [3] Buckeridge, M.S. and Goldman, G.H. (2011) Routes to Cellulosic Ethanol. *Springer Science and Business Media.* New York. 135-151.
- [4] Assareh, R., Shahbani-Zahiri, H., Akbari Noghabi. and K., Aminzadeh, S. (2012) Characterization of the newly isolated *Geobacillus* sp. T1, the efficient cellulaseproducer on untreated barley and wheat straws. *Bioresour. Technol.* 120, 99-105.
- [5] Kari, A., Flengsrud, R., Lindahl, V. and Tronsmo, A. (1994) Characterization of production and enzyme properties of an endo- β -1,4-glucanase from *Bacillus subtilis* ek-2 isolated from compost soil. *Anton. Leeuw. Int. J.* 66, 319-326.
- [6] Nikolay, S.A., Robson, K. and Wilson, DB. (1998) Regulation of biosynthesis of individual cellulases in *Thermomonospora fusca*. *J. Bacteriol.* 180, 3529-3532.
- [7] Schallmeyer, M., Singh, A. and Ward, OP. (2004) Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol.* 50, 1-17.
- [8] Kim, C.H. (1995) Characterization and substrate specificity of an endo- β -1,4-glucanase I (Avicelase I) from an extracellular multienzyme complex of *Bacillus circulans*. *Applied Environ. Microbiol.* 61, 959-965.
- [9] Takami, H. and K. Horokoshi. (2000) Analysis

- bacterial strain isolated from black liquor. *Bioresour. Technol.* 98, 2727-2733.
- [26] Makky, E. (2009) Avicelase production by a thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* isolated from soil using sugarcane bagasse. *World Acad. Sci. Eng. Technol.* 57, 87-92.
- [27] Rawat, R. and Tewari, L. (2012) Purification and characterization of an acidothermophilic cellulase enzyme produced by *Bacillus subtilis* strain LFS3. *Extremophiles.* 16, 637-44.
- [28] Trivedi, N., Gupta, V., Kumar, M., Kumari, P., Reddy, C.R.K. and Jha B. (2011) Solvent tolerant marine bacterium *Bacillus aquimaris* secreting organic solvent stable alkaline cellulase. *Chemosphere.* 83(5), 706-12.
- [29] Trivedi, N., Gupta, V., Kumar, M., Kumari, P., Reddy, C.R.K. and Jha, B. (2011) The alkali-halotolerant cellulase from *Bacillus flexus* isolated from green seaweed *Ulva lactuca*. *Carbohydr Polym.*, 83, 891-897.
- [30] Annamalai, N., Rajeswari, MV., Elayaraja, S. and Baklasubramanian, T. (2013) Thermostable haloalkaline cellulase from *Bacillus halodurans* CAS1 by conversion of lignocellulosic wastes. *Carbohydr Polym.*, 94, 409-15.
- [31] Wang, C., Hsieh, Y.R., Chan, C.C., Lin, H.T. and Tzeng, W.S. (2009) Purification and characterization of a novel halostable cellulase from *Salinivibrio* sp. strain NTU-05. *Enzyme Microb Technol.* 44, 373-79.
- barcinonensis*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 22(11), 1501-509.
- [20] Gomathi, D., Muthulakshmi, C., Kumar, D.G., Ravikumar, G., Kalaiselvi, M. and Uma C. (2012) Submerged fermentation of wheat bran by *Aspergillus flavus* for production and characterization of carboxy methyl cellulase. *Asian. Pac. J. Trop. Biomed.* 2, 567-73.
- [21] Karim, A., Nawaz, M.A., Aman A. and Qader S.A.U. (2014) Hyper production of cellulose degrading endo (1, 4) b-D-glucanase from *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB2. *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* 7(4).
- [22] Mihajlovski, K.R, Carevi, M.B., Marija Lj. Devi M.L.J., Siler-Marinkovi, S., Rajilic-Stojanovi, M.D. and Dimitrijevi_ Brankovi, S. (2015) Lignocellulosic waste material as substrate for Avicelase production by a new strain of *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1. *Int Biodeterior Biodegradation.* 104, 426-434.
- [23] Ariffin, H., Abdullah, N., Umi-Kalsom, M.S., Shirai, Y. and Hassan, M.A. (2006) Production and characterization of cellulase by *Bacillus pumilus* EB3. *Eng technol.* 3, 47-53.
- [24] Li, X. and Yu, H.Y. (2012) Purification and characterization of an organic-solvent-tolerant cellulase from a halotolerant isolate, *Bacillus* sp. L1. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 39, 1117-124.
- [25] Ko, C. H., Chen, W. L., Tsai, C. H., Jane, W. N., Liu, C. C. and Tu, J. (2007). *Paenibacillus campinasensis* BL11: a wood material-utilizing