



Molecular Detection and Optimization of Extracellular Alkaline Protease Production of *Bacillus pseudofirmus* MSB22 Using Response Surface Methodology

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Borhani M.S.¹ PhD,
Etemadifar Z.*¹ PhD,
Emtiazi G.¹ PhD,
Jorjani E.² PhD

How to cite this article

Borhani M S, Etemadifar Z, Emtiazi G, Jorjani E. Molecular Detection and Optimization of Extracellular Alkaline Protease Production of *Bacillus pseudofirmus* MSB22 Using Response Surface Methodology. Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(4):507-515.

ABSTRACT

Aims Alkaline protease is one of the most important groups of industrial enzymes with many applications. The aim of this study was to determine the physicochemical parameters affecting the production of alkaline protease enzyme produced by *Bacillus pseudofirmus* MSB22 by one-factor-at-a-time (OFAT) method and optimize the production of this enzyme by the response surface methodology (RSM) in the form of a rotatable central composite design.

Materials & Methods In the present experimental study, the isolation of microorganism producing alkaline protease from wastewater from sausage and lunch meat factories in Isfahan was carried out. The morphological and biochemical characteristics of the strain were performed according to the Bergey's book and amplification of 16S rRNA gene sequences. Detection of metalloproteinase gene and alkaline serine protease was done by polymerase chain reaction (PCR) reaction and enzyme activity measurement was performed by Folin reagent. Screening of variables effective in enzyme production was done, using the one-factor-at-a-time method and optimization was performed by response surface methodology. MEGA 6 software was used for phylogenetic analyses. To analyze the data, the Design Expert 7 software and the one-way analysis of variance were used.

Findings The maximum protease production, which was 1.85 times higher than that of OFAT method and 3.45 times higher than unoptimized conditions was obtained, using 1% w/v xylose, 3% w/v beef extract, 4% v/v inoculation size, pH 10, and 30°C. The established quadratic model had a great ability to predict responses to new observations due to a high value of the predicted determination coefficient.

Conclusion OFAT and RSM strategies are useful screening and optimization methods, respectively and sub I and sub II genes (alkaline serine protease genes) are detected in *Bacillus pseudofirmus* MSB22.

Keywords Alkaline Protease; *Bacillus pseudofirmus*; Polymerase Chain Reaction; One-factor-at-a-time method; Rotatable central composite design; Optimization

CITATION LINKS

[1] Characterisation of a detergent-stable alkaline protease from a novel thermophilic strain *Paenibacillus tezpurensis* sp. nov. AS-S24-II [2] Versatility of microbial proteases [3] Production of alkaline protease from *Cellulosimicrobium cellulans* [4] Production of alkaline protease from a newly isolated *Exiguobacterium profundum* BK-P23 evaluated using the response surface methodology [5] Comparative one-factor-at-a-time, response surface (statistical) and bench-scale bioreactor level optimization of thermoalkaline protease production from a psychrotrophic *Pseudomonas putida* SKG-1 isolate [6] A statistical approach for the enhanced production of thermostable alkaline protease showing detergent compatibility activity from *Bacillus circulans* [7] PCR primers and functional probes for amplification and detection of bacterial genes for extracellular peptidases in single strains and in soil [8] Sigma's non-specific protease activity assay-casein as a substrate [9] An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases [10] A review on production of serine alkaline protease by *Bacillus* spp [11] Optimization of medium and cultivation conditions for alkaline protease production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans* [12] Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp.: Production and optimization [13] Optimization of thermostable alkaline protease production from species of *Bacillus* using rice bran [14] Effect of physical parameters, carbon and nitrogen sources on the production of alkaline protease from a newly isolated *Bacillus pseudofirmus* SVB₁ [15] Optimization of environmental and nutritional conditions for the production of alkaline protease by a newly isolated bacterium *Bacillus cereus* strain 146 [16] Production of extracellular halo-alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp. isolated from seawater in Western India

¹Biology Department, Sciences Faculty, University of Isfahan, Isfahan, Iran

²Biology Department, Sciences Faculty, Gonbad Kavvous University, Golestan, Iran

*Correspondence

Address: University of Isfahan, Hezarjarib Street, Isfahan, Iran. Postal Code: 8174673441
Phone: +98 (31) 37932367
Fax: +98 (31) 37932456
z_etemadifar@yahoo.com

Article History

Received: August 30, 2016

Accepted: June 5, 2017

ePublished: December 21, 2018

شناسایی مولکولی و بهینه‌سازی تولید آنزیم پروتئاز قلیایی خارج سلولی باکتری *باسیلوس سودوفیرموس* MSB22 با استفاده از روش‌شناسی سطح پاسخ

ماتیاسادات برهانی PhD

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

زهره اعتمادی‌فر* PhD

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

گیتی امتیازی PhD

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

عیسی جرجانی PhD

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گنبد کاووس، گلستان، ایران

چکیده

اهداف: پروتئازهای قلیایی یکی از مهم‌ترین گروه از آنزیم‌های صنعتی هستند و کاربردهای فراوانی دارند. هدف مطالعه حاضر یافتن پارامترهای فیزیکیوشیمیایی موثر بر تولید آنزیم پروتئاز قلیایی تولیدشده توسط باکتری *باسیلوس سودوفیرموس* MSB22 (*Bacillus pseudofirmus*) به‌وسیله روش تک‌عاملی (OFAT) و سپس بهینه‌سازی تولید این آنزیم با روش سطح پاسخ در قالب طرح مرکب مرکزی چرخش‌پذیر بود.

مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر جداسازی میکروارگانیسم تولیدکننده پروتئاز قلیایی از نمونه‌های پساب کارخانه‌های سوسیس و کالباس اصفهان انجام شد. خصوصیات موفولوژیکی و بیوشیمیایی سویه طبق کتاب برگری و به‌وسیله تکثیر توالی ژن *16S rRNA* صورت پذیرفت. تشخیص ژن متالوپروتئاز و سرین‌پروتئاز قلیایی با واکنش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) و سنجش فعالیت آنزیم با معرف فولین انجام شد. غربالگری متغیرهای موثر در تولید آنزیم با روش تک‌عاملی و بهینه‌سازی تولید با روش سطح پاسخ و بررسی آماری صورت گرفت. نرم‌افزار MEGA 6 برای آنالیزهای فیلوژنتیکی به کار رفت. به‌منظور تحلیل داده‌ها نرم‌افزار Design Expert 7 و آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه به کار رفتند.

یافته‌ها: حداکثر تولید پروتئاز که به‌ترتیب ۱/۸۵ برابر و ۳/۴۵ برابر بیشتر از مقدار تولیدشده حاصل بهینه‌سازی روش تک‌عاملی و شرایط غیربهینه بود، با استفاده از ۱٪ قند زایلوز، ۳٪ عصاره گوشت، ۴٪ مایه تلقیح باکتریایی، در pH برابر ۱۰ و دمای ۳۰°C به دست آمد. مدل درجه دوم به‌دلیل بالا بودن مقدار ضریب تشخیص پیش‌بینی، توانایی زیادی در پیش‌بینی داده‌های جدید داشت.

نتیجه‌گیری: روش تک‌عاملی و سطح پاسخ به‌ترتیب در غربالگری متغیرهای موثر و بهینه‌سازی تولید آنزیم مفید هستند و ژن‌های *sub I* و *sub II* (ژن‌های سرین‌پروتئازهای قلیایی) در *باسیلوس سودوفیرموس* MSB22 وجود دارند.

کلیدواژه‌ها: پروتئاز قلیایی، *باسیلوس سودوفیرموس*، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، روش تک‌عاملی، طرح مرکب مرکزی چرخش‌پذیر، بهینه‌سازی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۶/۰۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۳/۱۵

*نویسنده مسئول: z_etemadifar@yahoo.com

مقدمه

پروتئازهای قلیایی یکی از مهم‌ترین گروه آنزیم‌های صنعتی هستند و کاربردهای فراوانی در صنایع شوینده، مواد پروتئینی، چرم، نساجی، صنایع غذایی و دارویی دارند^[1]. پروتئازهای قلیایی می‌توانند در تیمار پساب‌ها، تبدیل ضایعات پروتئینی به مواد ارزشمندی مانند اسیدهای آمینه و در سنتز مواد آلی به کار روند^[2]. با توجه به اهمیت تجاری این آنزیم‌ها، ضروری است که تولید آنها به‌منظور تامین نیازهای بخش صنعت بهینه‌سازی شود.

از آنجایی که تولید آنزیم‌ها تحت تاثیر شرایط فیزیکی و شیمیایی حاکم بر سیستم تولید است، به‌منظور بهینه‌سازی تولید آنزیم ابتدا

باید تمامی متغیرهای موثر در تولید آنزیم، غربالگری شوند و سپس مقادیر بهینه متغیرهای مورد نظر به دست می‌آیند. بدین منظور روش‌های آماری با به‌کارگیری اصول آماری، تکرارپذیری و تصادفی‌بودن در بهینه‌سازی سیستم‌ها رهیافتی ایده‌آل محسوب می‌شوند^[3]. با این وجود، هر یک از روش‌های آماری مزایا و معایبی دارد. به‌عنوان مثال در روش تک‌عاملی که در آن تمامی متغیرها در یک مقدار ثابت نگه داشته شده و فقط یک عامل تغییر می‌کند، سادگی روش یک مزیت بوده اما زمان‌بر بودن و صرف هزینه‌های بالا در مواردی که تعداد زیادی متغیر مورد بررسی قرار می‌گیرند، از معایب این روش محسوب می‌شوند. به همین دلیل معمولاً از این روش برای غربالگری تعداد محدودی از متغیرهای موثر بر بهینه‌سازی سیستم استفاده می‌شود. از طرف دیگر میان‌کنش موجود میان متغیرهای مورد بررسی در روش تک‌عاملی بررسی نمی‌شود، بنابراین این روش در بهینه‌سازی سیستم (که ناچاراً باید دید همه جانبه‌ای بر تاثیر متغیرهای موثر داشت) به‌طور ناکارآمد رفتار می‌کند، در حالی که روش‌شناسی سطح پاسخ محدودیت‌های ذکرشده را ندارد و در نتیجه روشی کارآمد برای بهینه‌سازی سیستم به شمار می‌آید^[4]، این روش از سه طرح متفاوت استفاده می‌کند که از میان آنها طرح مرکب مرکزی کامل‌ترین است.

رهیافت دومرحله‌ای به‌کارگرفته‌شده در مطالعه حاضر، قبلاً توسط محققان دیگر انجام شده و مفیدبودن آن به اثبات رسیده است^[5,6]. در مطالعه حاضر با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)، وجود ژن‌های سرین‌پروتئاز قلیایی و متالوپروتئاز قلیایی خارج سلولی در سویه مورد نظر بررسی شد.

هدف مطالعه حاضر، یافتن پارامترهای فیزیکیوشیمیایی موثر بر تولید آنزیم پروتئاز قلیایی تولیدشده توسط باکتری *باسیلوس سودوفیرموس* MSB22 (*Bacillus pseudofirmus*) به‌وسیله روش تک‌عاملی (OFAT) و سپس بهینه‌سازی تولید این آنزیم با استفاده از روش سطح پاسخ در قالب طرح مرکب مرکزی چرخش‌پذیر بود.

مواد و روش‌ها

در مطالعه تجربی حاضر جداسازی و غربالگری میکروارگانیسم تولیدکننده پروتئاز قلیایی از نمونه‌های پساب کارخانه‌های سوسیس و کالباس واقع در اصفهان انجام شد. از آنجایی که نمونه‌های پساب کارخانه‌های سوسیس و کالباس، علاوه بر دارا بودن مواد پروتئینی pH قلیایی نیز دارند، نمونه مناسبی برای جداسازی سویه‌های تولیدکننده پروتئاز قلیایی محسوب می‌شوند.

در ابتدا برای جداسازی سویه‌های قلیادوست، ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های پساب، به پلیت‌های حاوی محیط هوریکوشی آگار اضافه و به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰°C و ۳۷°C گرمخانه‌گذاری شدند. محیط هوریکوشی آگار ترکیبات زیر را داشت (گرم بر لیتر): گلوکز (۱۰ گرم)، پپتون (۵ گرم)، عصاره مخمر (۵ گرم)، مونوپتاسیم فسفات (یک گرم)، سولفات منیزیم (۲/۰ گرم) و آگار (۲۰ گرم).

مقدار pH محیط با افزودن ۵ گرم بر لیتر کربنات سدیم که به‌صورت جداگانه استریل شده بود، روی ۱۰ تنظیم شد.

به‌منظور غربالگری سویه‌های جداسازی‌شده، با هدف بررسی تولید پروتئاز خارج سلولی در آنها از محیط اسکیم‌میلک آگار (با pH برابر ۱۰) استفاده شد. ترکیبات این محیط شامل ۳٪ پودر شیر بدون

مختلف (۲۵-۵۰°C) مطالعه شد. به‌منظور بررسی اثر pH بر تولید آنزیم، pH محیط تولید اولیه با استفاده از غلظت‌های متفاوت هیدروکسیدسدیم در دامنه ۱۲-۷ تنظیم و با سویه مورد نظر تلقیح شد. منابع کربنی (گلوز، نشاسته، زایلوز، مانیتول، فروکتوز و سوکروز) و منابع نیتروژنی مختلف (عصاره مخمر، پپتون، عصاره گوشت، اوره، نیترات سدیم و کلرید آمونیوم) در غلظت ۰/۱ گرم بر لیتر و غلظت‌های متفاوت کلریدسدیم (۱ تا ۵٪) به محیط تولید اولیه اضافه و تاثیر هر کدام ارزیابی شد. همچنین اثر میزان تلقیح اولیه (۱ تا ۵٪) بر تولید آنزیم مورد بررسی قرار گرفت.

بهینه‌سازی تولید با استفاده از روش سطح پاسخ و بررسی آمار: متغیرهای موثر بر تولید آنزیم پروتئاز قلیایی سویه MSB22، براساس نتایج روش تک‌عاملی (غلظت منبع کربن، غلظت منبع نیتروژن، میزان تلقیح اولیه، دمای انکوباسیون و pH محیط تولید) انتخاب و سپس به‌منظور بهینه‌سازی تولید آنزیم، روش‌شناسی سطح پاسخ در قالب طرح مرکب مرکزی چرخش‌پذیر، با شش تکرار در نقطه مرکزی به کار گرفته شد. هر متغیر در پنج سطح مختلف (۲، +۱، صفر، -۱، -۲) مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱). تعداد کل تیمارها ۳۲ عدد بود که به‌صورت دو تکرار و در کل ۶۴ آزمایش انجام شد.

جدول ۱) سطوح متغیرهای مستقل مورد استفاده در آزمایش به‌صورت مقادیر واقعی و کدبندی شده

فاکتور	متغیرها	-۲	-۱	صفر	۱	۲
X1	زایلوز (درصد وزنی/حجمی)	صفر	۱	۲	۳	۴
X2	عصاره گوشت (درصد وزنی/حجمی)	صفر	۱	۲	۳	۴
X3	میزان تلقیح (درصد حجمی/حجمی)	۱	۲	۳	۴	۵
X4	pH	۷	۸	۹	۱۰	۱۱
X5	دما (°C)	۲۳	۳۰	۳۷	۴۴	۵۱

سویه باکتری به هر کدام از آزمایش‌ها تلقیح و میزان تولید آنزیم بعد از گذشت ۴۸ ساعت ارزیابی شد. به‌منظور تجزیه و تحلیل داده‌های به‌دست‌آمده و رسم نمودارهای سه‌بعدی مربوطه از نرم‌افزار Design Expert 7 استفاده شد.

برای مشاهده بهتر اثر میان‌کنش متغیرهای مستقل بر تولید آنزیم، نمودارهای سطح پاسخ با قراردادن متغیر وابسته (تولید آنزیم) روی محور Z و دو متغیر مستقل روی محورهای X و Y رسم شدند. در حالی که متغیرهای مستقل دیگر در نقطه بهینه خود ثابت نگه داشته شدند (نمودار ۱).

پراکندگی‌های اطراف خط در نمودار ۲ نشان داد که باقی‌مانده‌ها از توزیع نرمال پیروی کردند.

متغیر پاسخ (تولید آنزیم) در قالب مدل رگرسیون چندجمله‌ای، به‌صورت تابعی از متغیرهای مستقل در زیر ارایه شده است:

$$Y = K + AX_1 + BX_2 + CX_3 + DX_4 + EX_5 + ABX_1X_2 + ACX_1X_3 + ADX_1X_4 + AEX_1X_5 + BCX_2X_3 + BDX_2X_4 + BEX_2X_5 + CDX_3X_4 + CEX_3X_5 + DEX_4X_5 + A_2X_1^2 + B_2X_2^2 + C_2X_3^2 + D_2X_4^2 + E_2X_5^2$$

در این معادله، Y متغیر پاسخ یا مقدار پیش‌بینی‌شده تولید پروتئاز قلیایی، K عدد ثابت (مقدار پاسخ در حالتی که متغیرهای مستقل در نقطه مرکزی یعنی صفر قرار دارند)، X_1 غلظت زایلوز، X_2 غلظت عصاره گوشت، X_3 میزان تلقیح، X_4 بیانگر pH محیط تولید و X_5 معرف دمای انکوباسیون است. A-E اثرات خطی، A_2-E_2 اثرات درجه دوم و سایر ضرایب موجود اثرات متقابل را نشان می‌دهند. در

چربی و ۱/۵٪ آگار بودند. ایزوله‌های قلیادوست، به‌صورت نقطه‌ای در این محیط کشت و به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰°C و ۳۷°C گرمخانه‌گذاری شدند. نسبت قطر هاله ایجادشده در اطراف کلونی که نشان‌دهنده هیدرولیز پروتئین شیر بود، به قطر کلونی مورد نظر به‌عنوان شاخصی در غربالگری سویه‌ها به کار رفت.

شناسایی میکروارگانیزم: خصوصیات موفولوژیکی و بیوشیمیایی سویه جداشده طبق روش‌های پیشنهادی در کتاب برگ‌تالیف سال ۱۹۸۶ بررسی شدند. سپس با استفاده از تکثیر توالی ژن $16S$ rRNA با پرایمرهای عمومی 27F و 1492R و تعیین توالی قطعه ژنی به‌دست‌آمده، سویه شناسایی شد. آنالیزهای فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار MEGA 6 صورت پذیرفت.

تشخیص ژن متالوپروتئاز و سرین‌پروتئاز قلیایی: به‌منظور شناسایی ژن‌های اختصاصی پروتئازهای قلیایی باکتریایی، از پرایمرهای *apr* و *sub* استفاده شد^[7]. واکنش PCR با اندکی تغییرات شامل ۵ دقیقه و اشهرست ابتدایی در دمای ۹۵°C و در ادامه ۳۰ چرخه شامل و اشهرسته‌شدن در دمای ۹۴°C (۳۰ ثانیه)، اتصال در دمای ۵۳°C (۳۰ ثانیه) و گسترش در دمای ۷۲°C (۲۰ ثانیه) بوده و نهایتاً ۵ دقیقه در دمای ۷۲°C برای گسترش نهایی انجام شد. در نهایت قطعه تکثیر یافته، روی ژل آگار ۱٪ و به‌وسیله رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید مشاهده شد.

سنجش فعالیت آنزیم: برای اندازه‌گیری فعالیت پروتئاز از روش معرف فولین استفاده شد^[8]. در این روش، ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره آنزیم به ۲/۵ میلی‌لیتر محلول سوبسترا شامل کازئین (۰/۶۵٪) و بافر کربنات-بی‌کربنات ۲۰ میلی‌مولار (با میزان pH برابر ۱۰) اضافه شد. واکنش آنزیمی در دمای ۳۷°C به‌مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. سپس با افزودن ۲/۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۱۰٪ (به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷°C) واکنش آنزیمی متوقف شد. پروتئین هضم‌نشده با سانتریفیوژ در دور ۱۰۰۰۰rpm به‌مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده شد، سپس ۲/۵ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۰/۵ مولار و ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین-سیوکالتو ۱۰٪ به یک میلی‌لیتر سوپرناتانت حاصله اضافه و مخلوط حاصله به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷°C قرار داده شد. میزان تیروزین آزادشده ناشی از هضم آنزیمی کازئین، با خواندن جذب نوری در طول موج ۶۶۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت.

یک واحد فعالیت آنزیمی (U/ml) به مقداری از آنزیم که باعث آزادسازی یک میکروگرم تیروزین در دقیقه تحت شرایط واکنش شده، گفته می‌شود.

تمامی آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شدند.

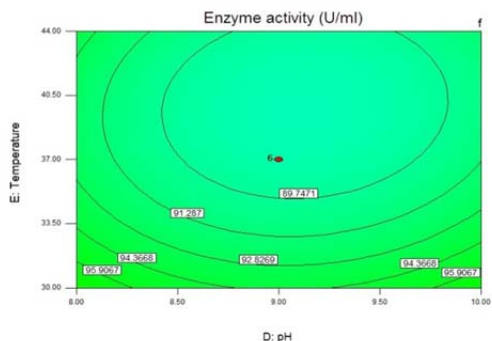
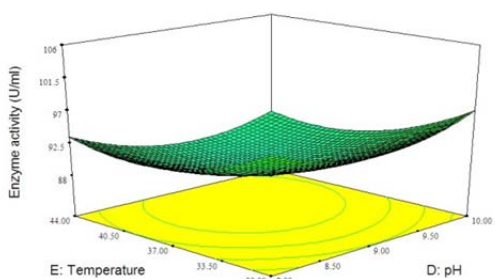
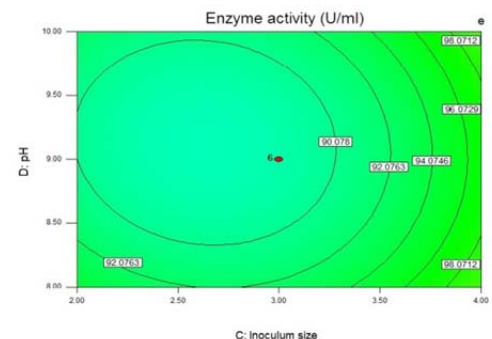
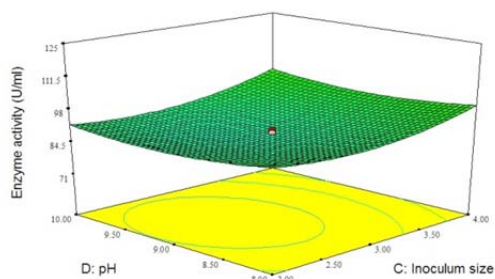
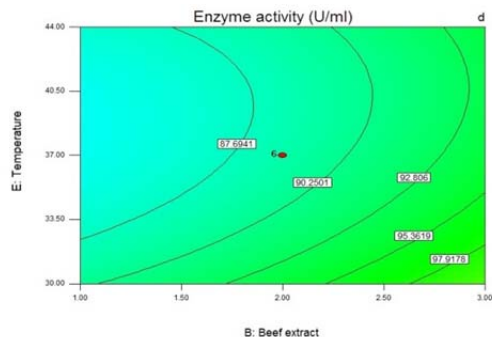
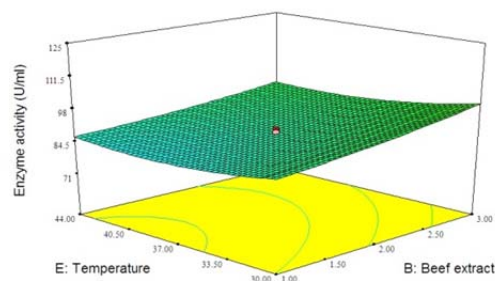
تولید پروتئاز با استفاده از محیط کشت اولیه: سویه مورد نظر در محیط مایع هوریکوشی (با میزان pH برابر ۱۰) به‌صورت شبانه در ۳۷°C گرمخانه‌گذاری شد تا به کدورتی معادل نیم‌مک‌فارلند برسد. به میزان ۱٪ از این کشت به محیط تولید اولیه، شامل ۱٪ شیر بدون چربی دارای pH برابر ۱۰ اضافه و به‌مدت ۴۸ ساعت در ۳۷°C گرمخانه‌گذاری شد. سپس برای به‌دست‌آوردن عصاره خام آنزیم، کشت باکتریایی در دور ۴۰۰۰rpm به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴°C سانتریفیوژ شد.

غربالگری متغیرهای موثر در تولید آنزیم با استفاده از روش تک‌عاملی: به‌منظور مطالعه اثر زمان انکوباسیون بر تولید آنزیم، سویه MSB22 در محیط تولید اولیه تلقیح و به‌مدت ۴ روز در دمای ۳۷°C گرمخانه‌گذاری شد. تولید آنزیم و رشد باکتری در فواصل زمانی معین مورد بررسی قرار گرفت. تاثیر دمای انکوباسیون بر تولید آنزیم، با گرمخانه‌گذاری محیط تولید اولیه در دماهای

نهایت شش آزمایش براساس شرایط پیش‌بینی مدل به‌منظور تایید صحت محاسبات ریاضی انجام شد. از میان ۵۲ سویه جداسازی شده از نمونه‌های پساب، یکی از سویه‌ها براساس نتایج آزمون غربالگری به‌منظور مطالعات بیشتر انتخاب شد و میزان شباهت توالی *16s rRNA* سویه مورد نظر (حدود ۱۴۱۸ جفت‌باز) در پایگاه داده‌ای اطلاعات ژنی (NCBI) مورد

جست‌وجو قرار گرفت.

از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه برای بررسی معنی‌داری (در سطح ۹۵٪) معادله و اثر متغیرها و پیش‌بینی تناسب استفاده شد و آزمون رگرسیون به‌منظور تعیین یک مدل سطح پاسخ، براساس برآیند پاسخ‌های خطی، درجه دوم و اثرات متقابل متغیرهای مستقل به کار رفت.



نمودار ۱) منحنی‌های سطح پاسخ سه‌بعدی اثر متقابل متغیرهای مستقل بر تولید پروتئاز قلیایی خارج سلولی تولید شده توسط باکتری *باسیلوس سودوفیرموس*

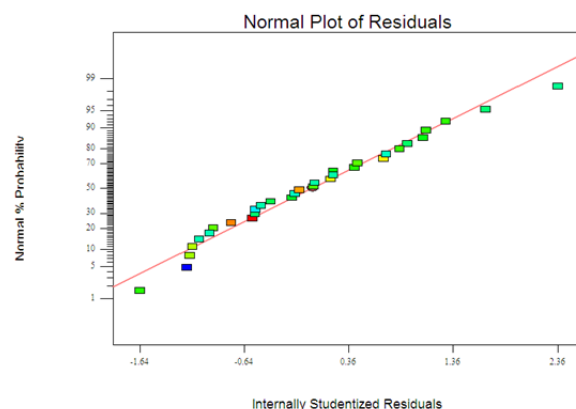
یافته‌ها

سویه مورد مطالعه شباهت نزدیکی با گونه *باسیلوس سودوفیرموس* داشت.

توالی ژن *16s rRNA* سویه مورد مطالعه تحت شماره دستیابی KT006759 در پایگاه داده‌ای بانک ژن در دسترس است.

آنالیز فیلوژنتیکی سویه در شکل ۱ نشان داده شده است. ژن متالوپروتئاز (*apr*) در سویه MSB22 شناسایی نشد، در حالی که قطعات ژنی با سایز مورد نظر (۳۱۹ و ۴۸۶ جفت‌باز) نشان‌دهنده وجود ژن سرین‌پروتئاز قلیایی (*sub*) در سویه مورد مطالعه بودند (شکل ۲).

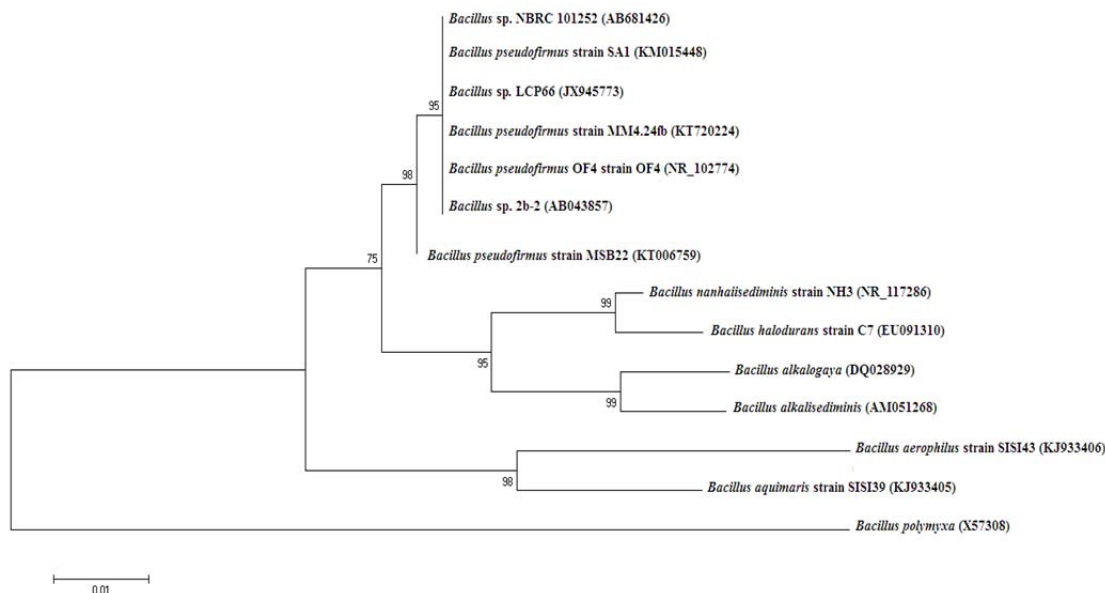
تولید آنزیم در سویه MSB22 بعد از گذشت ۴۸ ساعت به حداکثر میزان خود رسید (۳۵/۵ U/ml)، در این زمان سویه در فاز سکون



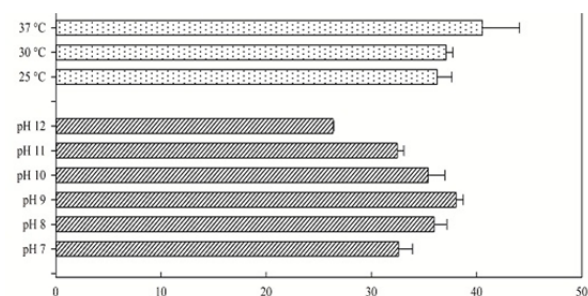
نمودار ۲) منحنی توزیع نرمال مقادیر باقی‌مانده‌های داخلی

افزودن ۱٪ زایلوز و ۱٪ عصاره گوشت به محیط تولید اولیه، میزان تولید آنزیم را به ترتیب ۴۰/۵٪ و ۶۸/۹٪ افزایش داد. سویه مورد مطالعه، در حضور غلظت های ۱٪ و ۵٪ توانست پروتئاز تولید کند اما غلظت‌های بالاتر به شدت باعث مهار تولید آنزیم شد. تلقیح اولیه در غلظت ۲٪ (حجمی/حجمی) بیش از دیگر غلظت‌های بررسی شده، بر تولید آنزیم موثر بود.

منحنی رشد خود قرار داشت (نمودار ۳). سویه مورد مطالعه در دامنه وسیعی از pH (۷-۱۲) آنزیم تولید کرد و در pH برابر ۹ تولید آنزیم به حداکثر مقدار خود رسید. بهترین دمای تولید آنزیم دمای ۳۷°C بود (نمودار ۴). از میان منابع کربنی و نیتروژنی بررسی شده، زایلوز و عصاره گوشت اثرات مطلوب‌تری در تولید آنزیم داشتند (نمودار ۵). در واقع،

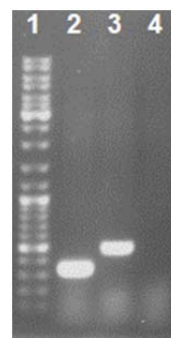


شکل ۱) آنالیز فیلوژنتیکی باکتری *باسیلیوس سودوفیرموس* MSB22 با استفاده از نرم‌افزار Mega 6 (اعداد داخل پرانتز نشان‌دهنده شماره دستیابی ژن *16s rRNA* باکتری‌های موجود در درخت فیلوژنی را نشان می‌دهند)

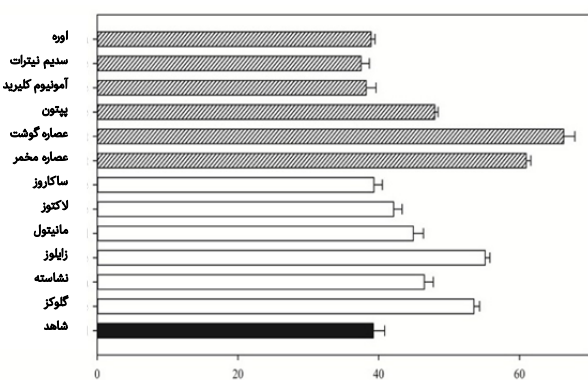


فعالیت آنزیمی (Uml⁻¹)

نمودار ۴) اثر pH و دمای انکوباسیون بر تولید پروتئاز قلیایی خارج سلولی تولیدشده توسط باکتری *باسیلیوس سودوفیرموس* MSB22

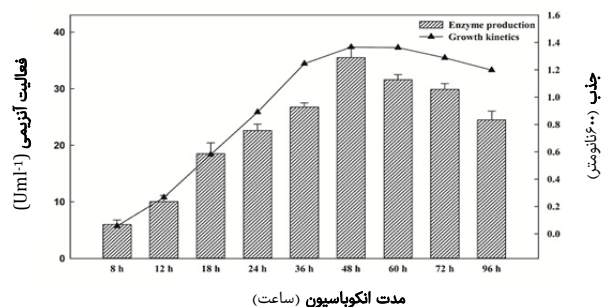


شکل ۲) نتایج PCR به منظور شناسایی ژن‌های متالوپروتئاز (*apr*) و سرین‌پروتئاز (*sub*) قلیایی خارج سلولی در باکتری *باسیلیوس سودوفیرموس* MSB22: ستون ۱: مارکر ژنی ۱۰۰ جفت‌باز، ستون ۲: محصول تکثیر یافته براساس پرایمر *subI* با سایزی حدود ۳۱۹ جفت‌باز، ستون ۳: محصول تکثیر یافته براساس پرایمر *subII* با سایزی حدود ۴۸۶ جفت‌باز، ستون ۴: انجام PCR با استفاده از پرایمر *apr*



فعالیت آنزیمی (Uml⁻¹)

نمودار ۵) اثر منابع کربنی و نیتروژنی مختلف در غلظت ۱٪ (گرم بر لیتر) بر تولید پروتئاز قلیایی خارج سلولی تولیدشده توسط باکتری *باسیلیوس سودوفیرموس* MSB22



مدت انکوباسیون (ساعت)

نمودار ۳) مطالعه سینتیک رشد و اثر زمان انکوباسیون بر تولید پروتئاز قلیایی خارج سلولی تولیدشده توسط باکتری *باسیلیوس سودوفیرموس* MSB22

اثر تمامی متغیرهای مورد مطالعه روی تولید آنزیم به صورت آماری معنی‌دار بود ($p < 0.05$).

از میان مدل‌های پیشنهادی مدل درجه دوم برای متغیر پاسخ مورد مطالعه مناسب در نظر گرفته شد.

نتایج میزان تولید آنزیم پروتئاز قلیایی به عنوان متغیر مستقل در جدول شماره ۲ ذکر شده است.

ضرایب رگرسیونی محاسبه و مدل رگرسیونی تنها براساس عبارت‌های معنی‌دار آماری به صورت زیر به دست آمد:

$$Y = 427.90231 + (8.37305 * X_1) + (11.08740 * X_2) - (20.70472 * X_3) - (54.86148 * X_4) - (4.01816 * X_5) - (0.88313 * X_1 X_2) - (3.87188 * X_1 X_3) - (0.44563 * X_2 X_4) - (0.12098 * X_2 X_5) + (0.56812 * X_3 X_4) - (0.066875 * X_4 X_5) - (0.76693 * X_1^2) + (1.01057 * X_2^2) + (4.76307 * X_3^2) + (3.10432 * X_4^2) + (0.061823 * X_5^2)$$

اثرات خطی تمامی متغیرهای مورد مطالعه، از نظر آماری معنی‌دار بود (جدول ۳). این نتایج، با نتایج تجزیه و تحلیل واریانس روش

تک‌عاملی، مطابقت داشت.

اثرات ترکیبی برخی از متغیرها مانند اثر زایلوز و عصاره گوشت (< 0.0001)، زایلوز و میزان تلقیح اولیه (< 0.0001)، عصاره گوشت و pH (0.001)، عصاره گوشت و دما (< 0.0001)، میزان تلقیح اولیه و pH (0.0017) و همچنین اثر pH و دما (0.0061) از نظر آماری معنی‌دار بود ($p < 0.05$ ؛ جدول ۳).

مقدار F و p مدل به ترتیب $555/20$ و < 0.0001 بود که معنی‌دار بودن مدل به دست آمده را نشان داد.

بالا بودن ضریب تشخیص ($R^2 = 0.999$) و غیرمعنی‌دار بودن آزمون عدم برازش (0.7618) صحت مدل به دست آمده را نشان داد.

مدل به دست آمده توانایی پیش‌بینی بسیار خوبی داشت ($\text{pred } R^2 = 0.9887$).

متغیر پاسخ به تمامی متغیرها تحت مطالعه حساس بود و متغیرهای غلظت منبع کربن (A) و غلظت منبع نیتروژن (B) شیب و انحنای بیشتری داشتند (نمودار ۶).

به طور کلی نتایج به دست آمده آزمایشگاهی در سطح اطمینان ۹۵٪ با مقدار پیش‌بینی شده مدل هم‌خوانی داشتند (جدول ۴).

جدول ۲) نتایج مشاهده شده و پیش‌بینی شده متغیر پاسخ با به کارگیری طرح مرکب مرکزی

شماره آزمایش	زایلوز X1	عصاره گوشت X2	میزان تلقیح X3	pH، X4	دما X5	تولید آنزیم مشاهده شده (واحد در میلی‌لیتر)	تولید آنزیم پیش‌بینی شده (واحد در میلی‌لیتر)
۱	۱	۱	۲	۸	۴۴	۹۳/۵۸	۹۳/۵۱
۲	۳	۱	۲	۸	۳۰	۹۱/۲۳	۹۱/۵۵
۳	۱	۳	۲	۸	۳۰	۱۰۹/۱۶	۱۰۹/۲
۴	۳	۳	۲	۸	۴۴	۹۶/۵۶	۹۶/۶
۵	۱	۱	۴	۸	۳۰	۱۱۰/۰۲	۱۱۰/۱۵
۶	۳	۱	۴	۸	۴۴	۸۷/۷	۸۷/۸۴
۷	۱	۳	۴	۸	۴۴	۱۱۶/۲۵	۱۱۶/۱
۸	۳	۳	۴	۸	۳۰	۹۹/۴	۹۹/۶۵
۹	۱	۱	۲	۱۰	۳۰	۹۵/۱۳	۹۵/۰۹
۱۰	۳	۱	۲	۱۰	۴۴	۸۷/۶۵	۸۷/۶۲
۱۱	۱	۳	۲	۱۰	۴۴	۹۹/۴۷	۹۹/۱۵
۱۲	۳	۳	۲	۱۰	۳۰	۹۸/۹۲	۹۹
۱۳	۱	۱	۴	۱۰	۴۴	۱۰۶/۶۲	۱۰۶/۴
۱۴	۳	۱	۴	۱۰	۳۰	۹۱/۸۷	۹۲/۰۵
۱۵	۱	۳	۴	۱۰	۳۰	۱۲۲/۸۱	۱۲۲/۷
۱۶	۳	۳	۴	۱۰	۴۴	۹۱/۷۸	۹۱/۶۸
۱۷	۰	۲	۳	۹	۳۷	۹۹/۱۷	۹۹/۵۵
۱۸	۴	۲	۳	۹	۳۷	۷۲/۱۹	۷۱/۷۷
۱۹	۲	۰	۳	۹	۳۷	۸۳/۹۷	۸۳/۷۸
۲۰	۲	۴	۳	۹	۳۷	۱۰۱/۶۱	۱۰۱/۷۶
۲۱	۲	۲	۱	۹	۳۷	۱۰۰/۹۵	۱۰۰/۹۶
۲۲	۲	۲	۵	۹	۳۷	۱۱۴/۶۴	۱۱۴/۶
۲۳	۲	۲	۳	۷	۳۷	۱۰۲/۳۷	۱۰۲/۰۴
۲۴	۲	۲	۳	۱۱	۳۷	۹۹/۹۵	۱۰۰/۲۵
۲۵	۲	۲	۳	۹	۲۳	۱۰۵/۷۳	۱۰۵/۳۲
۲۶	۲	۲	۳	۹	۵۱	۹۶	۹۶/۳۷
۲۷	۲	۲	۳	۹	۳۷	۸۸/۷۴	۸۸/۷۶
۲۸	۲	۲	۳	۹	۳۷	۸۸/۷۴	۸۸/۲
۲۹	۲	۲	۳	۹	۳۷	۸۸/۷۴	۸۸/۲۵
۳۰	۲	۲	۳	۹	۳۷	۸۸/۷۴	۸۹/۹۴
۳۱	۲	۲	۳	۹	۳۷	۸۸/۷۴	۸۸/۸۵
۳۲	۲	۲	۳	۹	۳۷	۸۸/۷۴	۸۸/۵

جدول ۳) نتایج آنالیز واریانس تولید آنزیم پروتئاز قلیایی توسط *باسیلوس سودوفیرموس* MSB22 تحت تاثیر متغیرهای مستقل در طول آزمایش بهینه‌سازی

عامل	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	سطح معنی‌داری	ضرایب رگرسیون
مدل ^a	۳۳۹۹/۶۹	۲۰	۱۶۹/۹۸	۵۵۵/۲۰	>۰/۰۰۰۱*	
عدد ثابت						
زایلوز (X ₁)	۱۰۹۱/۷۵	۱	۱۰۹۱/۷۵	۳۵۶۵/۸۷	>۰/۰۰۰۱	+۸۸/۷۴
عصاره گوشت (X ₂)	۴۶۶/۶۷	۱	۴۶۶/۶۷	۱۵۲۴/۲۳	>۰/۰۰۰۱	-۶/۷۴
میزان تلقیح (X ₃)	۲۸۱/۰۶	۱	۲۸۱/۰۶	۹۱۷/۹۹	>۰/۰۰۰۱	+۳/۴۲
pH (X ₄)	۸/۷۵	۱	۸/۷۵	۲۸/۵۷	>۰/۰۰۰۲	-۰/۶۰
دما (X ₅)	۱۴۲/۰۶	۱	۱۴۲/۰۶	۴۶۳/۹۹	>۰/۰۰۰۱	-۲/۴۳
X ₁ X ₂	۱۲/۴۸	۱	۱۲/۴۸	۴۰/۷۶	>۰/۰۰۰۱	-۰/۸۸
X ₁ X ₃	۲۳۹/۸۶	۱	۲۳۹/۸۶	۷۸۳/۴۴	>۰/۰۰۰۱	-۳/۸۷
X ₁ X ₄	۰۰۳۲-۶/۸۰۶	۱	۰۰۳۲-۶/۸۰۶	۰/۰۲۲	>۰/۸۸۴۲	+۰/۰۲۱
X ₁ X ₅	۰/۷۵	۱	۰/۷۵	۲/۴۶	>۰/۱۴۵۲	+۰/۲۲
X ₂ X ₃	۰/۳۹	۱	۰/۳۹	۱/۲۷	>۰/۲۸۴۵	-۰/۱۶
X ₂ X ₄	۳/۱۸	۱	۳/۱۸	۱۰/۳۸	>۰/۰۰۸۱	-۰/۴۵
X ₂ X ₅	۱۱/۴۸	۱	۱۱/۴۸	۳۷/۴۸	>۰/۰۰۰۱	-۰/۸۵
X ₃ X ₄	۵/۱۶	۱	۵/۱۶	۱۶/۸۷	>۰/۰۰۱۷	+۰/۵۷
X ₃ X ₅	۱/۳۱	۱	۱/۳۱	۴/۲۶	>۰/۰۶۳۳	-۰/۲۹
X ₄ X ₅	۳/۵۱	۱	۳/۵۱	۱۱/۴۵	>۰/۰۰۶۱	-۰/۴۷
X ₁ ²	۱۷/۲۵	۱	۱۷/۲۵	۵۶/۳۵	>۰/۰۰۰۱	-۰/۷۷
X ₂ ²	۲۹/۹۶	۱	۲۹/۹۶	۹۷/۸۴	>۰/۰۰۰۱	+۱/۰۱
X ₃ ²	۶۶۵/۴۸	۱	۶۶۵/۴۸	۲۱۷۳/۶۰	>۰/۰۰۰۱	+۴/۷۶
X ₄ ²	۲۸۲/۶۸	۱	۲۸۲/۶۸	۹۲۳/۲۹	>۰/۰۰۰۱	+۳/۱۰
X ₅ ²	۲۶۹/۱۹	۱	۲۶۹/۱۹	۸۷۹/۲۱	>۰/۰۰۰۱	+۳/۰۳
باقی‌مانده	۳/۳۷	۱۱	۰/۳۱			
فقدان تناسب	۱/۳۳	۶	۰/۲۲	۰/۵۴	>۰/۷۶۱۸	
خطای خالص	۲/۰۴	۵	۰/۴۱			
تصحیح کلی	۳۴۰۳/۰۶	۳۱				

جدول ۴) نتایج آزمایشات تایید و بررسی صحت مدل درجه دوم

شماره	زایلوز (درصد وزنی/حجمی)	عصاره گوشت (درصد وزنی/حجمی)	میزان تلقیح	pH	دما	تولید تجربی آنزیم (واحد در میلی‌لیتر)	مقدار پیش‌بینی‌شده (واحد در میلی‌لیتر)	درصد خطای پیش‌بینی ^a
۱	۳	۳	۲	۸/۰۹	۳۰/۷۸	۹۸/۱۲	۹۹/۶۷	۱/۵۶
۲	۲/۸۵	۳	۴	۸	۳۰/۳۵	۹۹/۴۳	۱۰۰/۹۹	۱/۵۴
۳	۳	۳	۲	۹/۷۱	۳۰	۹۵/۵	۹۷/۷۱	۲/۲۶
۴	۲/۹۶	۳	۴	۸	۳۶/۴۹	۹۱/۶۹	۹۴/۲۸	۲/۷۵
۵	۳	۲/۰۴	۲	۸	۴۴	۹۰/۸۳	۹۲/۴	۱/۷۰
۶	۳	۳	۴	۹/۷۷	۳۰/۳۶	۹۴/۱۶	۹۷/۶۵	۳/۵۷

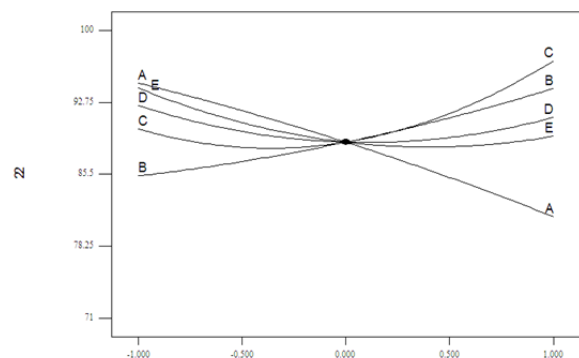
درصد خطای پیش‌بینی^a = (مقدار پیش‌بینی‌شده - مقدار تجربی) / مقدار تجربی * ۱۰۰٪

تولید آنزیم پروتئاز قلیایی تولیدشده توسط باکتری *باسیلوس سودوفیرموس* MSB22 به‌وسیله روش تک‌عاملی و سپس بهینه‌سازی تولید این آنزیم با استفاده از روش سطح پاسخ در قالب طرح مرکب مرکزی چرخش‌پذیر بود.

جستجوی شباهت توالی 16s rRNA سویه مورد نظر (حدود ۱۴۱۸ جفت‌باز) در پایگاه داده‌ای اطلاعات ژنی (NCBI) نشان داد که سویه مورد مطالعه شباهت نزدیکی با گونه *باسیلوس سودوفیرموس* داشت (با شماره دستیابی KT006759).

حضور ژن متالوپروتئاز قلیایی و سرین‌پروتئاز قلیایی خارج سلولی، در این مطالعه مورد ارزیابی قرار گرفت. ژن *apr* در سویه MSB22 شناسایی نشد، در حالی که قطعات ژنی با سایز مورد نظر نشان‌دهنده حضور ژن سرین‌پروتئاز قلیایی در سویه مورد مطالعه بود.

تولید آنزیم در سویه MSB22 بعد از گذشت ۴۸ ساعت به حداکثر میزان خود رسید. در این زمان سویه، در فاز سکون منحنی رشد خود قرار داشت. مطالعات قبلی نشان داده است در بسیاری از گونه‌های



انحراف از نقطه مرجع

نمودار ۶) منحنی پیش‌بینی به‌منظور مقایسه اثر تمام متغیرهای مستقل در نقطه مرکزی (صفر)

بحث

هدف مطالعه حاضر، یافتن پارامترهای فیزیکوشیمیایی موثر بر

نتایج آنالیز واریانس نشان داد که اثرات خطی تمامی متغیرهای مورد مطالعه از نظر آماری معنی‌دار بود. به علاوه، اثرات ترکیبی برخی از متغیرها مانند اثر زایلوز و عصاره گوشت، زایلوز و میزان تلقیح اولیه، عصاره گوشت و pH، عصاره گوشت و دما، میزان تلقیح اولیه و pH و همچنین اثر pH و دما معنی‌دار بود.

برای بررسی صحت مدل، از ضریب تشخیص و آزمون عدم برازش استفاده شد. در مطالعه حاضر بالابودن ضریب تشخیص و غیرمعنی‌داربودن آزمون عدم برازش نشان‌دهنده صحت مدل به‌دست‌آمده بود. به عبارت دیگر در ۹۹/۹٪ موارد، تغییرات پاسخ به‌خوبی با مدل توضیح داده شد. در مدل به‌دست‌آمده در مطالعه حاضر، مقدار ضریب تشخیص تنظیم شده (۰/۹۹۷۲) تنها به‌صورت جزئی با مقدار ضریب تشخیص تفاوت داشت که نشان داد یک رابطه ایده‌آل بین متغیرهای مستقل و مدل برازش‌شده وجود داشت. ضریب تشخیص پیش‌بینی که از بیش‌برازش مدل جلوگیری می‌کند، می‌تواند مفیدتر از ضریب تشخیص تنظیم‌شده باشد.

در مطالعه حاضر با توجه به مقدار ضریب تشخیص پیش‌بینی، مدل به‌دست‌آمده توانایی پیش‌بینی بسیار خوبی داشت. میزان اندک ضریب تغییرات (C.V) معادل ۰/۵۷٪ دقت و قابل اعتمادبودن داده‌های به‌دست‌آمده را نشان داد.

نمودار پرشیدگی به‌منظور مقایسه اثر تمام متغیرهای مستقل در نقطه مرکزی (صفر) مفید است. شیب تند یا انحنای مشاهده‌شده در هر یک از متغیرهای مستقل در نمودار، نشان داد که متغیر پاسخ به آن متغیر مستقل حساس بود.

در نهایت باید توجه شود که تفاوت مشاهده‌شده در مقدار بهینه pH و دمای انکوباسیون، در دو روش تک‌عاملی (میزان PH برابر ۹ و دمای ۳۷°C) و سطح پاسخ PH برابر ۱۰ و دمای ۳۰°C، به این دلیل است که اولاً سویه در دامنه وسیعی از pH و دمای انکوباسیون آنزیم تولید کرد و ثانیاً این اختلاف به درنظرگرفته‌نشدن اثر متقابل متغیرهای مستقل در روش تک‌عاملی مربوط می‌شد.

از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به عدم غربالگری متغیرهای موثر دیگر در افزایش تولید آنزیم پروتئاز قلیایی سویه MSB22 اشاره کرد. پیشنهاد می‌شود به‌منظور بررسی بیشتر متغیرهای دخیل در افزایش تولید آنزیم پروتئاز قلیایی این باکتری، غربالگری اولیه توسط روش پلاکت-برمن استفاده شود.

نتیجه‌گیری

سویه MSB22 ژن‌های سرین پروتئاز قلیایی خارج سلولی (*sub I*) و (*sub II*) را دارد. غلظت زایلوز، غلظت عصاره گوشت، میزان تلقیح اولیه، دمای انکوباسیون و pH محیط تولید، اثرات معنی‌داری روی تولید آنزیم دارند. حداکثر تولید آنزیم با استفاده از ۱٪ قند زایلوز، ۳٪ عصاره گوشت، ۴٪ مایه تلقیح باکتریایی و در PH برابر ۱۰ و دمای ۳۰°C به دست می‌آید که به‌ترتیب ۱/۸۵ برابر و ۳/۴۵ برابر بیش از مقدار تولیدشده حاصل بهینه‌سازی روش تک‌عاملی و شرایط غیربهینه است. با توجه به مقدار بالای ضریب تشخیص پیش‌بینی و ضریب تشخیص تنظیم‌شده، مدل به‌دست‌آمده به‌ترتیب توانایی زیادی در پیش‌بینی داده‌های جدید و سازگاری زیادی با نتایج آزمایشگاهی دارد.

تشکر و قدردانی: نویسندگان از دانشگاه اصفهان برای فراهم‌آوردن امکانات این مطالعه تشکر و قدردانی می‌کنند.

باسیلوس تولید پروتئاز در اوایل فاز سکون و همزمان با گذر از مرحله رشد رویشی به مرحله اسپورزایی رخ می‌دهد هر چند که این دو فرآیند به احتمال زیاد با هم مرتبط نیستند^[9]. سویه مورد مطالعه قادر بود در دامنه وسیعی از pH آنزیم تولید کند. در pH برابر ۹ تولید آنزیم به حداکثر مقدار خود رسید و بهترین دمای تولید آنزیم دمای ۳۷°C بود. از آنجایی که تولید پروتئازها به‌شدت به منابع کربنی و نیتروژنی محیط کشت وابسته است، تعیین نوع و مقدار این منابع غذایی در بهینه‌سازی تولید این آنزیم‌ها بسیار حیاتی است^[10]. از میان منابع کربنی و نیتروژنی بررسی‌شده در این مطالعه، زایلوز و عصاره گوشت اثرات مطلوب‌تری در تولید آنزیم نشان دادند. در واقع، افزودن ۱٪ زایلوز و ۱٪ عصاره گوشت به محیط تولید اولیه، میزان تولید آنزیم را افزایش داد. با وجود اینکه در برخی از مطالعات گذشته، گزارش شده که گلوکز اثر بازدارندگی کاتابولیتهی در تولید آنزیم می‌تواند داشته باشد، این اثر در مورد تولید پروتئاز سویه MSB22 مشاهده نشده است^[11, 12]. همچنین منابع نیتروژنی آلی نسبت به منابع نیتروژنی معدنی، به‌طور چشمگیری اثر بهتری در سنتز آنزیم دارند و تولید آنزیم با منابع نیتروژنی که به‌سرعت مورد مصرف قرار می‌گیرند مانند نمک‌های آمونیوم و اسیدهای آمینه مهار می‌شود^[13-15]. نتایج این مطالعه این موضوع را تایید کرد.

موضوع مهم این است که گونه‌های متفاوت میکروبی و حتی سویه‌های متفاوت یک گونه از نظر نیازمندی به منابع کربنی و نیتروژنی برای تولید آنزیم می‌توانند بسیار متفاوت باشند. برای مثال تولید پروتئاز توسط سویه Po2 باکتری *باسیلوس سودوفیرموس* با استفاده از ترکیب پپتون و عصاره مخمر افزایش می‌یابد در حالی که سویه Ve-1 این باکتری، بیشترین مقدار تولید پروتئاز خود را در حضور کارآمینواسید و ژلاتین نشان داد^[12, 16]. اثر پارامتر دیگری که در این مطالعه بر تولید آنزیم مورد بررسی قرار گرفت، غلظت‌های متفاوت نمک کلرید سدیم بود. یون‌های سدیم برای فرآیندهای متابولیکی میکروبی مانند سنتز ATP و متعادل‌سازی pH درون سلول نیاز هستند^[10].

سویه مورد مطالعه، در حضور غلظت‌های ۱٪ و ۵٪ توانست پروتئاز تولید کند، اما غلظت‌های بالاتر به‌شدت باعث مهار تولید آنزیم شد. این نتایج به‌وضوح نشان داد که سویه مورد مطالعه هالوفیل نبود و از آنجایی که کلرید سدیم اثر مثبت ناچیزی بر افزایش تولید پروتئاز داشت، در بررسی‌های بهینه‌سازی توسط روش سطح پاسخ، مورد مطالعه بیشتر قرار نگرفت.

عامل مهمی دیگری موثر بر تولید آنزیم میزان تلقیح اولیه محیط کشت بود. نتایج نشان داد که تلقیح اولیه در غلظت ۲٪ (حجم/حجم) بیش از دیگر غلظت‌های بررسی‌شده، موثر است. نتایج آنالیز واریانس داده‌های به‌دست‌آمده در روش تک‌عاملی، نشان داد که اثر تمامی متغیرهای مورد مطالعه روی تولید آنزیم به‌صورت آماری معنی‌دار بود.

در مطالعه حاضر، به‌منظور بهینه‌سازی تولید پروتئاز قلیایی سویه MSB22، از روش سطح پاسخ در قالب طرح مرکب مرکزی چرخش‌پذیر، با استفاده از ۵ متغیر در ۵ سطح مختلف استفاده شد. از میان مدل‌های پیشنهادی توسط نرم‌افزار Design Expert 7، با توجه به مقادیر R² مربوط به مدل‌های مختلف، مدل درجه دوم برای متغیر پاسخ مورد مطالعه مناسب در نظر گرفته شد.

در مطالعه حاضر از رگرسیون، به‌منظور تعیین یک مدل سطح پاسخ، براساس برآیند پاسخ‌های خطی، درجه دوم و اثرات متقابل متغیرهای مستقل استفاده شد.

7- Bach HJ, Hartmann A, Schlöter M, Munch JC. PCR primers and functional probes for amplification and detection of bacterial genes for extracellular peptidases in single strains and in soil. J Microbiol Methods. 2001;44(2):173-82.

8- Cupp-Enyard C. Sigma's non-specific protease activity assay-casein as a substrate. J Vis Exp. 2008;(19):e899.

9- Gupta R, Beg QK, Khan S, Chauhan B. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. Appl Microbiol Biotechnol. 2000;60(4):381-95.

10- Bhunia B, Basak B, Dey A. A review on production of serine alkaline protease by *Bacillus* spp. J Biochem Technol. 2012;3(4):448-57.

11- Chi Z, Ma C, Wang P, Li HF. Optimization of medium and cultivation conditions for alkaline protease production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans*. Bioresour Technol. 2007;98(3):534-8.

12- Patel R, Dodia M, Singh SP. Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp.: Production and optimization. Process Biochem. 2005;40(11):3569-75.

13- Naidu KSB, Devi KL. Optimization of thermostable alkaline protease production from species of *Bacillus* using rice bran. Afr J Biotechnol. 2005;4(7):724-6.

14- Sen Sh, Dasu Veeranki V, Mandal B. Effect of physical parameters, carbon and nitrogen sources on the production of alkaline protease from a newly isolated *Bacillus pseudofirmus* SVB₁. Ann Microbiol. 2009;59(3):531-8.

15- Shafee N, Norarati Aris S, Abd Rahman RNZ, Basir M, Salleh AB. Optimization of environmental and nutritional conditions for the production of alkaline protease by a newly isolated bacterium *Bacillus cereus* strain 146. J Appl Sci Res. 2005;1(1):1-8.

16- Patel RK, Dodia MS, Joshi RH, Singh SP. Production of extracellular halo-alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp. isolated from seawater in Western India. World J Microbiol Biotechnol. 2006;22(4):375-82.

تأییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان یافت نشد.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: ماتیا سادات برهانی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۲۵٪)؛ زهرا اعتمادی‌فر (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی (۲۵٪)؛ گیتی امتیازی (نویسنده سوم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی (۲۵٪)؛ عیسی جرجانی (نویسنده چهارم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی (۲۵٪)

منابع مالی: مطالعه حاضر با حمایت مالی دانشگاه اصفهان انجام شده است.

منابع

- 1- Rai SK, Roy JK, Mukherjee AK. Characterisation of a detergent-stable alkaline protease from a novel thermophilic strain *Paenibacillus tezpurensis* sp. nov. AS-S24-II. Appl Microbiol Biotechnol. 2010;85(5):1437-50.
- 2- Jisha VN, Smitha RB, Pradeep S, Sreevedi S, Unni KN, Sajith S, et al. Versatility of microbial proteases. Adv Enzym Res. 2013;1(3):39-51.
- 3- Ferracini-Santos L, H Sato H. Production of alkaline protease from *Cellulosimicrobium cellulans*. Braz J Microbiol. 2009;40(1):54-60.
- 4- Anbu P, Annadurai G, Hur BK. Production of alkaline protease from a newly isolated *Exiguobacterium profundum* BK-P₂₃ evaluated using the response surface methodology. Biologia. 2013;68(2):186-93.
- 5- Singh SK, Singh SK, Tripathi VR, Khare SK, Garg SK. Comparative one-factor-at-a-time, response surface (statistical) and bench-scale bioreactor level optimization of thermoalkaline protease production from a psychrotrophic *Pseudomonas putida* SKG-1 isolate. Microb Cell Fact. 2011;10:114.
- 6- Vaishnav D, Suthar J, Oza T, Dave G, Sheth N. A statistical approach for the enhanced production of thermostable alkaline protease showing detergent compatibility activity from *Bacillus circulans*. Biocatal