تولید اقتصادی آنزیم زایلاناز از سبوس برنج توسط *باسیلوس سرئوس* جداسازی شده از رسوبات آبی دریای خزر

مهسا یوسفی نیارکی[۱]، شکوفه غازی*[۲]، سروناز فلسفی[۳]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۳. استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: آنزیم زایلانازکه یکی از اجزاء ساختمانی دیواره سلولی گیاهان به شمار می‌رود.تولید این آنزیم توسط قارچها، باکتریها، جلبک‌های دریایی، گزارش شده است. در تولید کاغذ، صنایع نساجی، و مواد غذایی استفاده می شوند. هدف ازاین تحقیق، جداسازی بهترین گونه های جنس باسیلوس از رسوبات آبی دریای خزر و بهینه سازی تولید بیشترین مقدار آنزیم زایلاناز است.

مواد و روش ها: در این تحقیق، ۱۰ نمونه از رسوبات آبی دریای خزر در منطقه نوشهر جمع آوری شد. هر نمونه در محیط مایع لوریا برتانی کشت داده شد. سپس از تکنیک تیمار حرارتی استفاده گردید. رقت سازی سریالی و روش پورپلیت انجام شد. به منظور غربالگری اولیه روی محیط اختصاصی زایلان آگار به صورت نقطه ای کشت داده شد. به دنبال مشاهده هاله، روش چاهک گذاری انجام گردید. رنگ آمیزی گرم،اسپور و دیگر تست های بیوشیمیایی انجام شد. همچنین با نمونه منتخب، بهینه سازی میزان تولید آنزیم زایلاناز انجام شد.

یافته ها: در این تحقیق، از میان ۱۰۰ گونه باسیلوس، ۳۰ گونه در مرحله غربالگری اولیه ۱۰گونه در مرحله ثانویه دارای بیشترین قطر هاله انتخاب شدند. یک گونه باسیلوس با قطر هاله ۲۴میلی متربه عنوان بهترین تولید کننده آنزیم انتخاب گردید. نتایج سنجش میزان فعالیت آنزیمی به روش DNS این نمونه در دمای ۴۵ درجه ی سانتی گراد با اسیدیته ۹، بیشترین میزان فعالیت تولید آنزیم زایلاناز (۷۶/۶IU/ml) را نشان داد. در بهینه سازی سبوس برنج فعالیت آنزیمی(۱۱۰/۵IU/ml) را نشان داد. جدایه مجهول با ۹۹٪ تشابه مربوط به *باسیلوس سرئوس*است.

نتیجه گیری: نتایج به دست آمده جداسازی گونه های *باسیلوس* مولد آنزیم زایلاناز حاکی از آن است که زیست بوم دریای خزر قابلیت مناسب جهت دستیابی به جدایه های توانمند در تولید آنزیم زایلاناز را داراست که می توان از این جدایه ها طی فرایند بهینه سازی ارزان قیمت انزیم به بهره اقتصادی دست یافت.

واژگان کلیدی: آنزیم زایلاناز،رسوبات آبی دریای خزر، *باسیلوس*، تکنیک دی نیترو سالیسلیک اسید(DNS)، *باسیلوس سرئوس*

Economic production of xylanase enzyme from rice bran by *Bacillus cereus* isolated from Caspian sea sediments

Mahsa Yousefiniaraki[1], Shokoofeh Ghazi[2*], Sarvnaz Falsafi[3]

1. Master student, Department of microbiology, TeMS.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Departmentof microbiology,TeMS.C. , Islamic Azad University, Tehran, Iran
3. Department of microbiology, TeMS.C. , Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Introduction: Xylanase enzyme is one of the structural components of the plan cell wall. The production of this enzyme by fungi, bacteria, and seaweed has been reported. They are used in paper production, the textile industry, and food. The purpose of this research is to isolate the best *Bacillus* species from the water sediments of the Caspian Sea and to optimize the production of the highest amount of xylanase enzyme.

Methods: this research aims, 10 samples of Caspian sea sediments were collected in Nowshahr region. Each sample was cultured in Luria-Bertani liquid medium. The heat treatment technique was used. Serial dilution and the pour plate method were performed. For initial screening, it was cultured on the special Xylan Agar medium. After observing the aura, the drilling method was performed. Gram staining, spores and other biochemical tests were performed. Also, with the selected sample, optimization of xylanase enzyme production was done.

Results: In this research, among 100 Bacillus species, 30 species were selected in the primary screening stage and 10 species in the secondary stage had the largest halo diameter. A bacillus species with a halo diameter of 24 mm was selected as the best enzyme producer. The results of measuring the amount of enzyme activity by the DNS method of this sample showed the highest amount of xylanase enzyme production activity (76.6 IU/ml) at a temperature of 45°C with an acidity of 9. Enzyme activity (110.5 IU/ml) was improved in rice bran optimization. The unknown isolate is related to *Bacillus cereus* with 99% similarity.

Conclusion: The results of the isolation of *Bacillus* species producing xylanase enzyme indicate that the Caspian Sea ecosystem has the appropriate ability to obtain isolates capable of producing xylanase enzyme, which can be obtained from these isolates through a cheap optimization process. The enzyme achieved economic benefits.

Keywords: Xylanase enzyme, Caspian Sea sediments, *Bacillus*, Dinitrosalicylic acid technique(DNS), *Bacillus cereus*

مقدمه

زایلانازها جزو آنزیم های هیدرولیتیک همی سلولزی اند که زایلان و زایلو-الیگوساکاریدها را تجزیه کنند. زایلان، جزء اصلی همی سلولز در سلول های گیاهی، یکی از فراوان ترین منابع طبیعی زیست توده تجدید پذیر است و دومین پلی ساکارید طبیعی تجدیدپذیر موجود روی زمین است که ۳۳درصد از کل زیست توده لیگنوسلولزی موجود در کره زمین را پوشش می دهد. امروزه زایلاناز نقش مهمی در بهبود کیفیت محصولات صنعتی، اعم از صنایع مواد غذایی، سفید شویی زیستی خمیر کاغذ، نرمتر کردن پارچه در صنایع نساجی، بهبود دهنده خوراک دام و از جمله فراورده های کاربردی در سوخت زیستی ایفا می کند. ترکیب زایلاناز با گلوکاناز، آمیلاز، سلولز و پکتیناز کاربردهای بالقوه ای در تولید انواع فراورده های نان های صنعتی حجیم و نیمه حجیم ، بیسکویت و ...به لحاظ ایجاد ساختاری نرم و سبک، قابل هضم و با ماندگاری طولانی مدت تر را دارند. زایلانازها می توانند کارایی استفاده از لیگنوسلولز را افزایش دهند و آلودگی محیط زیست را کاهش دهند . طیف وسیعی از زایلانازهای تولید شده توسط میکروارگانیسم ها به گروه عمده ای از آنزیم های صنعتی تبدیل می شوند که قادر به تجزیه زایلان به سوخت های تجدید پذیر و مواد شیمیایی هستند. (۱، ۲، ۳). درمیان باکتری ها و سیانوباکتری های محیط های دریایی نیز زایلاناز تولیدمی شوند (۵). اطلاعاتی نیز در مورد زایلاناز گیاهان وجود دارد که اندوکسیلاناز میوه‌های گلابی ژاپنی در طول دوره بلوغ است و حیوانات دیگری مانند نرم تنان نیز قادر به تولید زایلاناز هستند(۶). همچنین گزارش های مربوط به جداسازی زایلاناز از منابع مختلف دیگر مانند باکتری بی هوازی *کلستریدیوم استوبوتیلیکوم*، بذر خیار نارس و جو جوانه زده وجود دارد(۷). لذا در تحقیق حاضر نشان دادن پتانسیل و توانمندی جدایه های بومی کشور در قابلیت تولید فراورده های ارزشمندی نظیر آنزیم زایلاناز از نقاط قوت این تحقیق به کار می رود اولا"با ارائه این کار بتوانیم به سویه های استانداردی دست یافته و در کشور ثبت کنیم و ثانیا"، از خروج ارز جلوگیری کنیم.همچنین محل جداسازی جدایه ها از زیست بوم جدید رسوبات آبی دریای خزردر منطقه ساحلی نوشهر انجام گرفت. در همین راستا هدف اصلی جداسازی بهترین جدایه های جنس *باسیلوس* از رسوبات دریای خزر جهت تولید آنزیم زایلاناز و بهینه سازی شرایط تولید آنزیم است.

مواد و روش ها

جداسازی جنس باسیلوس

به منظورجداسازی جنس *باسیلوس*، ۱۰ نمونه از رسوبات آبی (گل و لای) از کف دریای خزر در منطقه ساحلی نوشهر در شرایط استریل نمونه برداری انجام گردید. ابتدا ظروف فالکون درپیچ دار که از قبل استریل شده در داخل آب قرار داده در ظرف را داخل آب باز کرده و رسوبات آبی (گل ولای) همراه مقداری آب از عمق ۱۰-۱۵ سانتی متری برداشته شد. بلافاصله نمونه ها راتحت شرایط استریل دردما ۴درجه سانتی گراد جهت بررسی به آزمایشگاه منتقل شدند. ابتدا نمونه های آبی به صورت مجزا در محیط کشت مایع مغذی لوریا برتانی [1]جهت رشد و تقویت به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور شیکردار قرار گرفت. سپس برای هر کدام نمونه ها رقت سریالی ۹ لوله ای به روش پورپلیت انجام شد. تیمار حرارتی برای اولین رقت در هر یک از نمونه

نویسنده مسئول: استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
آدرس الکترونیک :
shokoofeh.ghazi@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۱۰/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۰۱

های آبی به منظور از بین رفتن سلول های رویشی و باقی ماندن بقاء اسپور ها به مدت۲۰ دقیقه در بن ماری ۸۰ درجه سانتی گراد انجام شد. از هر لوله به اندازه۱ سی سی با پیپت استریل وارد پلیت های استریل زیر هود میکروبیولوژیکی انجام گرفت. سپس محیط کشت مذاب پلیت کانت آگار اتوکلاو شده درون پلیت ها ریخته شد . به صورت عدد ۸ انگلیسی به منظور پخش شدن نمونه درون پلیت ها به طور یکنواخت چرخانده شد.و در دما۳۷درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ساعت انکوبه شد نا رشد کلنی ها حاصل شود.از هر کلنی کشت خالص تهیه شد. جهت تایید بیوشیمیایی اولیه جنس باسیلوس رنگ آمیزی گرم، اسپور، تست های کاتالاز، اکسیداز، حرکت، ژلاتیناز، آمیلاز،لستیناز انجام شد.

غربالگری اولیه

در مرحله غربالگری اولیه،جدایه ها در کشت خالص در محیط اختصاصی زایلان آگار با ترکیبات موجود(beech wood xylan ۱۰g/L, peptone ۵g/L, yeast extract ۵g/L, CaCO3 ۰/۲g/L, MgSO4.7H2O ۰/۲g/L, K2HPO4 ۱g/L, agar ۱۵g/L, Distilled water ۱L) به صورت کشت نقطه ای از کلنی ها داده شد. جدایه هایی که توانایی تولید آنزیم را داشتند با ظهور یک هاله شفاف شیری رنگ در اطراف کلنی روی محیط کشت بررسی شدند(۸).

غربالگری ثانویه (چاهک گذاری)

از تعداد جدایه هایی که در مرحله غربالگری اولیه بیشترین قطر هاله را داشتند کشت خالص تهیه و نگهداری شدند. سپس برای نتایج دقیق تر از روش چاهک گذاری استفاده شد. در این روش محیط اختصاصی زایلان آگار پس از اتوکلاو تهیه شد. با انتهای پیپت پاستور استریل چاهک هایی در مرکز پلیت ها حفر شد. در ادامه جدایه هایی که از مرحله اول غربال شدند به صورت جدا در محیط زایلان براث پایه تولیدی با ترکیبات ذکر شده (beech wood xylan ۱۰g/L, peptone ۵g/L, yeast extract ۵g/L, CaCO3 ۰/۲g/L, MgSO4.7H2O ۰/۲g/L, K2HPO4 ۱g/L, Distilled water ۱L)تلقیح گردید. در نهایت پس از گذشت۲۴ تا ۴۸ساعت از اتوکلاو شیکردار بیرون آورده و نمونه گیری انجام شد.بدین صورت که، میزان ۱تا ۲سی سی نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال دار با۹۰۰۰rpm در۴ درجه سانتی گراد قرار گرفتند . پس از سانتریفیوژ مایع رویی(سوپر ناتانت) حاوی آنزیم خام به دست آمد. در ادامه از سوپرناتانت در چاهک های حفر شده بر روی محیط زایلان براث ریخته و پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ساعت در انکوباتور قرار گرفت. جدایه هایی که توانایی مناسبی در تولید آنزیم داشتند هاله هایی دراطراف چاهک تشکیل دادند و قطر هاله اندازه گیری شد(۸).

سنجش کمی فعالیت آنزیمی جدایه های غربال شده

جهت سنجش کمی میزان تولید آنزیم زایلاناز، جدایه هایی که بالاترین میزان قطر هاله را داشتند انتخاب گردیدند.ابتدا سوسپانسیون تازه از باکتری ها تهیه شد.بعد از ۲۰ ساعت از انکوباتور شیکر دار بیرون آورده و بادستگاه اسپکتوفتومتری ۰/۵ مک فارلند اندازه گیری شد.سپس به میزان (V/V) ٪۲باکتری به محیط زایلان براث تلقیح شد.در فواصل زمانی، ۲۴، ۴۸، ۷۲ساعت جهت سنجش فعالیت کمی زایلاناز از روش استاندارد دی نیترو سالیسیلیک اسید(DNS)طبق پروتکل Baily&miller استفاده شد.جهت سنجش میزان قند آزاد شده ضمن عملکرد آنزیم زایلاناز منحنی استاندارد قندی D_xylose طبق پروتکل رسم شد.میزان فعالیت آنزیمی با واحد استاندارد بین المللی IU/ml گزارش گردید(۱۰، ۹).

تولید اقتصادی آنزیم توسط جدایه شناسایی شده

بدین منظور جهت تولید اقتصادی و با صرفه آنزیم توسط باکتری شناسایی شده،از ضایعات کشاورزی ارزان قیمت جهت تولید آنزیم زایلاناز استفاده شد.به عنوان منبع کربن در تولید اقتصادی آنزیم از ضایعات کشاورزی،سبوس برنج،سبوس گندم،سبوس جو،ملاس استفاده شد.ضایعات کشاورزی استفاده شده جهت اتوکلاو هریک جداگانه وزن شده وبه ترکیبات محیط کشت پایه تولیدی آنزیم که در قسمت ۳ـ۲ اشاره شده اضافه شدند.آزمایش با ۳ تکرار برای منبع کربن در ارلن های ۲۵۰سی سی که حاوی ۵۰ سی سی محیط کشت پایه تولیدی بودند انجام شد.

شناسایی مولکولی جدایه برتر

به منظور شناسایی مولکولی جنس و گونه دقیق باکتری جداسازی شده و توانمند در تولید آنزیم زایلاناز پس ازتکمیل فرایند غربالگری،ازگونه برتر و مجهول کشت خالص انجام گرفت و کشت خالص باکتری جهت تعیین توالی به شرکت ژن ایران تحویل گردید تا مراحل مربوط به شناسایی دقیق جنس و گونه ی باکتریایی انجام گردد.

یافته ها

غربالگری اولیه

در این تحقیق بررسی روی ۱۰۰ جدایه باکتری های گرم مثبت هوازی اسپوردار و کاتالاز مثبت جداسازی شده از رسوبات دریای خزر انجام شد. با انجام مرحله غربالگری اولیه در محیط اختصاصی زایلان آگار،کشت نقطه ای برای هر۱۰۰جدایه انجام شد. نتایج به دست آمده نشان داد که ۳۰جدایه توانایی تولید آنزیم زایلاناز را در محدوده ضعیف تا عالی با مشاهده بررسی و اندازه گیری قطر هاله دارا هستند.همانطور که در جدول (۱) اشاره شده،۳۰جدایه با نشان دادن محدوده ای از قطر هاله از (۱۰تا ۲۴ میلی متر)از سایر کلنی ها غربال شدند .و در جدول (۱)، نتایج غربالگری اولیه جدایه هایی که بالاترین هاله ی تجزیه ی آنزیمی را از خود نشان دادند ضمن اندازه گیری قطر هاله به میلی متر ذکر شده اند. برای هر جدایه آزمایشات با ۳ تکرار انجام شد.جدول(۱)

جدول ۱ـجدایه هایی که در مرحله غربالگری اولیه قطر هاله از (۱۰تا۲۴میلی متر)داشتند

شماره جدایه های غربال شده	قطرهاله (میلی متر)	شماره جدایه های غربال شده	قطرهاله (میلی متر)	شماره جدایه های غربال شده	قطرهاله (میلی متر)	شماره جدایه های غربال شده	قطرهاله (میلی متر)	شماره جدایه های غربال شده	قطرهاله (میلی متر)
۱	۲۰	۷	۲۰	۱۳	۱۵	۱۹	۱۸	۲۵	۱۸
۲	۲۰	۸	۲۰	۱۴	۱۵	۲۰	۱۳	۲۶	۱۰
۳	۲۳	۹	۱۵	۱۵	۱۷	۲۱	۱۶	۲۷	۱۵

۴	۲۴	۱۰	۱۶	۱۳	۱۶	۲۲	۱۳	۲۸	۱۴
۵	۲۴	۱۱	۱۵	۱۷	۱۵	۲۳	۱۳	۲۹	۱۸
۶	۱۵	۱۲	۱۴	۱۸	۱۷	۲۴	۱۷	۳۰	۱۰

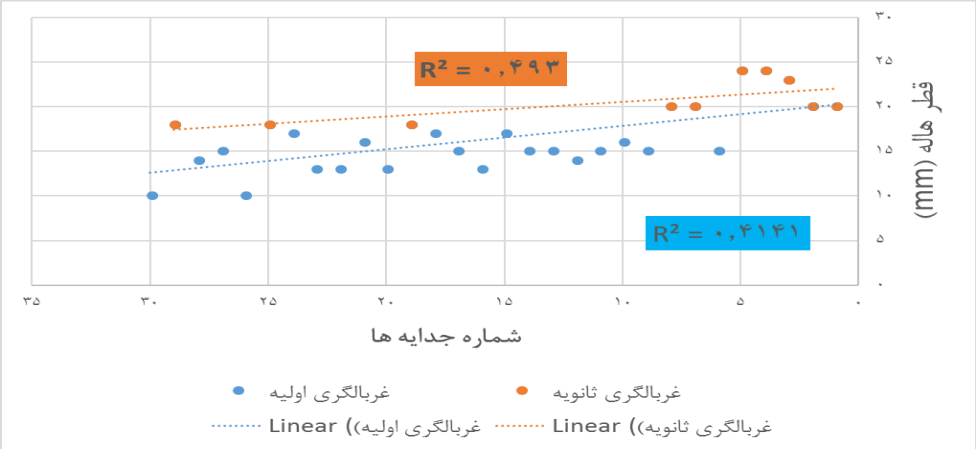
غربالگری ثانویه(چاهک گذاری)

برای بررسی دقیق تر۱۰جدایه که قطر هاله بالاتر بین(۱۸تا۲۴ میلی متر)را نشان دادند در مرحله غربالگری ثانویه به روش چاهک گذاری انتخاب شد. همانگونه که در جدول(۲) نشان داده شده است،طی انجام مراحل غربالگری ثانویه سوپرناتانت شفاف حاوی آنزیم خام در انکوباسیون ۱۶۰ rpm در دما۳۷درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ساعت بیشترین قطر هاله درمرحله چاهک گذاری مربوط به جدایه(۴) با عددی معادل ۲۴میلی متر نشان داده شد. آزمایشات برای هر جدایه با ۳تکرار انجام شد.جدول(۲)

جدول ۲_جدایه هایی منتخب در مرحله غربالگری ثانویه (چاهک گذاری) با قطر هاله (۱۸تا۲۴میلی متر)

شماره جدایه های غربال شده	قطرهاله (میلی متر)	شماره جدایه های غربال شده	قطرهاله (میلی متر)
۱	۲۰	۷	۲۰
۲	۲۰	۸	۲۰
۳	۲۳	۱۹	۱۸
۴	۲۴	۲۵	۱۸
۵	۲۴	۲۹	۱۸

طبق نتایج آنالیز ضریب تعیین در شکل (۱) اندازه قطر هاله در غربالگری اولیه(R^2=۰/۴۱۴)ودرغربالگری ثانویه (R^2=۰/۴۹۳)محاسبه شد.همچنین ضریب همبستگی در غربالگری اولیه و ثانویه (۰/۹۲۱)یعنی (۹۲.۱۱٪)گزارش شد و رگرسیون خطی رسم شد.

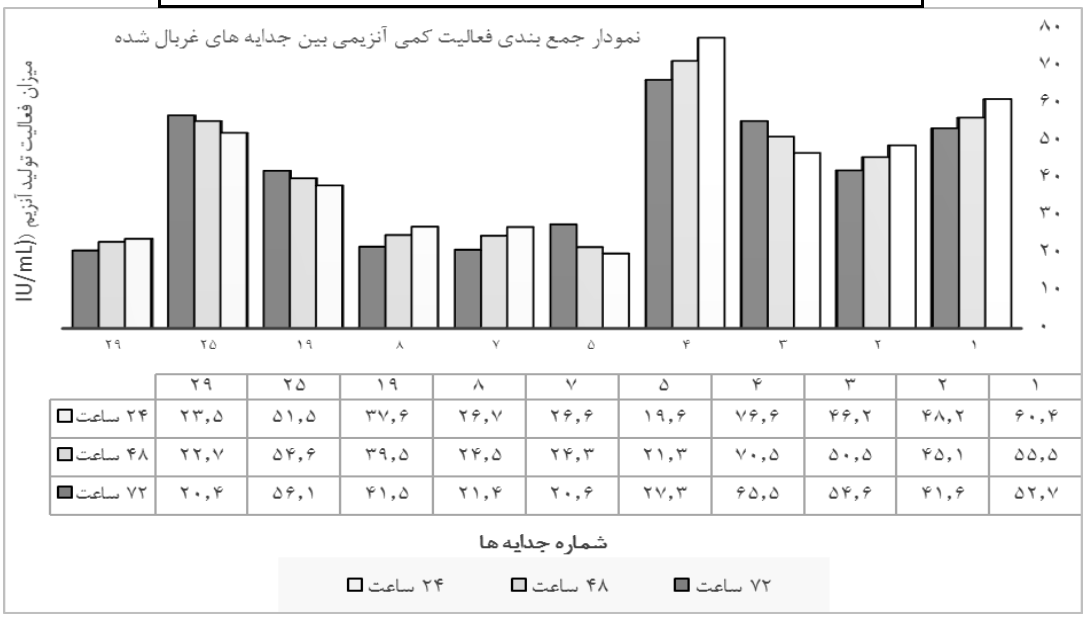


شکل۱. نتایج آنالیز ضریب تعیین (R^2)اندازه قطر هاله غربالگری اولیه و ثانویه ورسم نمودار رگرسیون خطی

سنجش کمی فعالیت آنزیمی جدایه های غربال شده

نتایج حاصل از سنجش میزان تولید کمی آنزیم برای جدایه های غربال شده که در فواصل زمانی، ۲۴، ۴۸، ۷۲ساعت ساعت بررسی گردید.طبق نمودار(۲) همانگونه که نشان داده شده است طی نتایج کمی و کیفی به روش استاندارد دی نیترو سالیسیلیک اسید(DNS) ،جدایه(۴) در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد و جذب نوری(OD:۰/۱۲۷) بیشترین میزان فعالیت تولید آنزیم زایلاناز(ml/۷۶/۶IU)در روز اول و یا به عبارتی پس از گذشت ۲۴ ساعت از فرایند تولید از خود نشان داد. در ادامه روند تولید آنزیم در۴۸ ساعت با میزانی معادل(۷۰/۵IU/ml)روند کاهشی نشان داد. همچنین با بررسی میزان تولید۷۲ ساعته برای این جدایه نیز میزان تولید آنزیم با عددی معادل(۶۵/۵IU/ml)روند نزولی داشت. لذا مشخص گردید سویه ی شماره ۴بالاترین توانایی تولید آنزیم را در بازه ی زمانی معادل ۲۴ساعت دارا است. در ادامه،جدایه های شماره (۱)و(۲۵)نیز با قدرت تولید آنزیمی معادل(IU/ml ۶۰/۴)و(IU/m ۵۶/۱) سویه های توانمندی جهت تولید آنزیم نیز به شمار می روند و تولید مناسبی در بازه ی زمانی به ترتیب ۲۴ ساعته و ۷۲ ساعته داشتند. بررسی نتایج برای هر جدایه با۳تکرار انجام شد.نمودار(۲)

Anova: Single Factor				
SUMMARY				
Groups	Count	Sum	Average	Variance
شماره جدایه	۱۰	۱۰۳	۱۰/۳	۱۰۳/۷۸۸۹
۲۴ساعت	۱۰	۴۱۶/۹	۴۱/۶۹	۳۳۵/۰۷۸۸
۴۸ساعت	۱۰	۴۰۸/۵	۴۰/۸۵	۲۹۴/۲۹۶۱
۷۲ساعت	۱۰	۴۰۱/۷	۴۰/۱۷	۲۸۴/۰۲۲۳
مقدار آلفا ۰.۰۵				



شکل۲.نمودار جمع بندی فعالیت کمی آنزیمی بین جدایه های غربال شده در بازه زمانی، ۲۴، ۴۸، ۷۲ساعت

نتایج حاصل ازآنالیز آماری واریانس نشان داد مقدار p_value: ۰/۰۰۰۱۱۶ و ۰/۰۵مقدار آلفا است. اگر مقدار p_value از مقدار آلفا کمتر باشد رابطه معنی داری بین داده ها وجود دارد.در این آنالیز مقدار p_value کمتر از مقدار آلفا است در نتیجه رابطه معنی داری وجود دارد.بررسی نتایج انالیز واریانس در جدول (۳)ونتایج ضریب همبستگی در فواصل زمانی، ۲۴، ۴۸، ۷۲در جدول (۴) نشان داده شده است.

F crit	P-value	F	MS	df	SS	Source of Variation
۲.۸۶۶۲۶۶	۰.۰۰۰۱۱۶	۹.۲۲۲۵۹۹	۲۳۴۵.۲۷۵	۳	۷۰۳۵.۸۲۵	Between Groups
			۲۵۴.۲۹۶۵	۳۶	۹۱۵۴.۶۷۵	Within Groups
				۳۹	۱۶۱۹۰.۵	Total

جدول۳. نتایج آنالیز واریانس فعالیت کمی آنزیمی بین جدایه های غربال شده در بازه زمانی، ۲۴، ۴۸، ۷۲ساعت

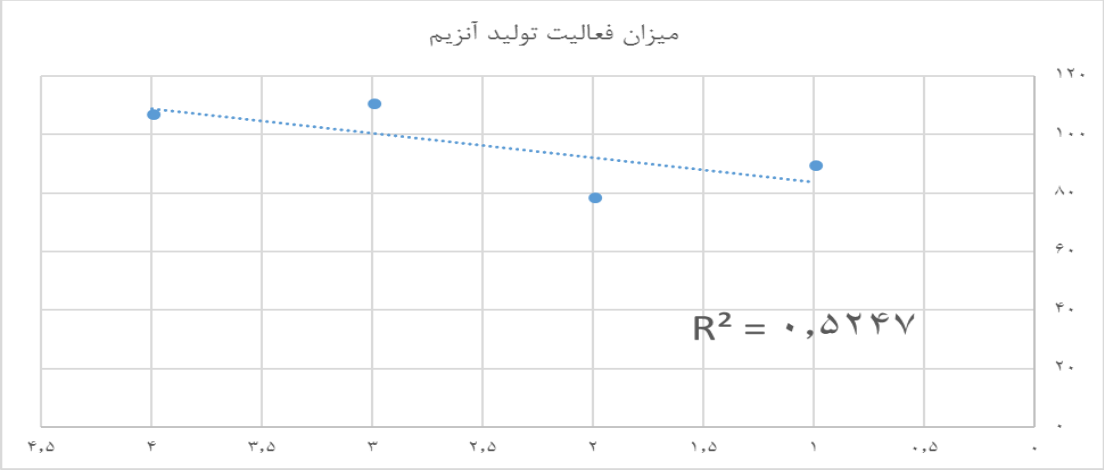
همبستگی بین ساعت۲۴ و ۴۸ساعت	۰.۹۸۲۷۹۶۹۸۷	۹۸.۲۸
همبستگی بین ۲۴ و ۷۲ساعت	۰.۹۲۳۶۶۶۲۶۱۵	۹۲.۳۷
همبستگی بین ۴۸و ۷۲ساعت	۰.۹۷۵۵۳۹۲۹	۹۷.۵۵

جدول۴. نتایج همبستگی فعالیت کمی آنزیمی بین جدایه های غربال شده در بازه زمانی، ۲۴، ۴۸، ۷۲ساعت

تولید اقتصادی آنزیم توسط جدایه شناسایی شده

نتایج حاصل از تولید اقتصادی جدایه شماره ۴ که بیشترین تولید آنزیم را در بازه زمانی ۲۴ ساعت از ضایعات کشاورزی، سبوس برنج ، سبوس گندم، سبوس جو،ملاس استفاده شد طبق شکل(۳) نشان داده شده است .طی این نتایج با استفاده ازسبوس برنج با فعالیت آنزیمی معادل(۱۱۰/۵IU/ml)و همچنین بعد از آن ملاس با فعالیت آنزیمی معادل(۱۰۶/۷IU/ml)تولید آنزیم بالاتر نشان داده شد.نتایج تولید اقتصادی آنزیم با ضریب تعیین(R^2=۰/۵۲۴۷)محاسبه شد. رگرسیون خطی در شکل(۴) نشان داده شد.

شکل۳. تولید اقتصادی آنزیم در بازه زمانی ۲۴ ساعت



شکل۴.رگرسیون خطی میزان فعالیت اقتصادی آنزیم

آزمون های بیوشیمیایی مربوط به جنس باسیلوس

نتایج حاصل جهت تایید بیوشیمیایی جنس *باسیلوس* رنگ آمیزی گرم، اسپور، تست های کاتالاز، اکسیداز، حرکت، ژلاتیناز، آمیلاز،لستیناز برای جدایه منتخب شماره (۴)انجام شده به صورت جدول زیر است. .جدول(۵).

جدول۵.تست های بیو شیمیایی

رنگ آمیزی گرم	اسپور	اکسیداز	کاتالاز	حرکت	ژلاتیناز	آمیلاز	لستیناز
+	+	−	+	+	+	+	+

شناسایی مولکولی جدایه برتر

بر طبق نتایج به دست آمده به دنبال توالی یابی ژنوم گونه غربال شده نتایج دردرگاه NCBI پس از بلاستینگ به شرح زیر می باشد .بر طبق نتایج مشخص گردید که جدایه ی مجهول با ۱۰۰٪ تشابه SrRNA ۱۶ مربوط به جنس باسیلوس و گونه *سرئوس* تحت نام علمی *Bacillus cereus* می باشد .

نتیجه گیری

تاکنون تحقیقات زیادی در ارتباط با انواع زایلانازها صورت گرفته است.با توجه به اهمیت زایلاناز و کاربرد های صنعتی آن دانشمندان و محققان همیشه درصدد تولید این آنزیم بوده لذا جستجو برای منابع میکروبی تولید کننده آنزیم اعم از باکتری ها و قارچ های توانمند در تولید آنزیم در اولویت می باشد. همسو با تحقیقات انجام شده می توان به مناطق جداسازی شده باکتری های توانمند در تولید آنزیم اشاره داشت به عنوان مثال جداسازی از خاک مزارع پنبه توسط اخوان سپهی و همکارانش در سال ۲۰۱۰ انجام شد و در ادامه با جداسازی سویه مناسب باسیلوس از خاک

مزارع پنبه فرایند بهینه سازی تولید آنزیم را تکمیل نموده که در نهایت باسیلوس موجاونسیس غربال شده را به عنوان سویه برتر جهت تولید زایلانازدر شرایط غیر بهینه با تولیدی معادل(IU/ml ۱۹۴/۶۸) ومیزان شرایط بهینه تولید آنزیم(IU/ml ۳۰۲/۴۶۶)گزارش دادند (۸). سنتیل کومار و همکارانش در سال ۲۰۱۸ بر روی نمونه های مربوط به رسوبات دریایی از سواحل کوالام در کشور هند مطالعاتی انجام دادند. در مطالعات انجام شده به وسیله آن ها نمونه های جمع آوری شده ابتدا عمل جداسازی بر روی آن ها انجام شد و فعالیت آنزیم زایلاناز با روش DNS مورد سنجش قرار گرفت و در نتایج اعلام شده شرایط بهینه فعالیت و عملکرد آنزیم در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد به صورت فعال گزارش شد (۱۱). خنده پاکار و بوهسله در سال۲۰۰۶ جهت استخراج آنزیم که عمل سانتریفیوژ باعث رسوب مواد جامد و معلق موجود در محیط کشت می شود و در نتیجه عصاره شفاف رویی به عنوان منبع آنزیم گزیلاناز خارج سلولی و خام جهت سنجش فعالیت آنزیمی استفاده می شود (۱۲). در این راستا و همسو با پژوهش های قبلی انجام شده در این مطالعه جداسازی و غربالگری از رسوبات دریای خزر از یک اکوسیستم جدید و کمتر دیده شده انجام شد. به گونه ای که اکوسیستم های بکر و جدیدی در پژوهش انجام شده جدایه باسیلوس (شماره ۴)جداسازی شده از رسوبات آبی دریای خزر در دمای ۴۵درجه سانتی گراد، میزان فعالیت آنزیم(IU/ml ۷۶/۶) بالاترین میزان تولید آنزیم زایلاناز تحت شرایط آزمایشگاهی به دست آمد. توجه به تولید اقتصادی و ارزان قیمت آنزیم زایلاناز درحضور سوبسترای سبوس برنج با میزان تولیدی معادل(IU/ml ۱۱۰/۵)از دیگر دستاورد های ارزشمند به عنوان پیش زمینه ای در جهت تولید اقتصادی آنزیم است. ضمن اینکه موضوع تولید آنزیم زایلاناز توسط گونه های بومی در کشور و طراحی و اجرای یک پروسه ی ازران تر و مقرون به صرفه اقتصادی نسبت به سایر موضوعات با هزینه و امکانات مشابه در این رشته در اولویت است . به لحاظ گران بودن مانند دریای خزر میتواند قابلیت های بیشماری را نه تنها برای گونه های میکروبی تولید کننده آنزیم زایلاناز داشته باشد بلکه قطعا برای سایر تولیدات میکروبی نیز اکوسیستم بکر و مستعدی است لذا نوید بخش است که منابع میکروبی تولیدکننده آنزیم های مختلف و سایر ترکیبات بیولوژیکی موثر در آن جست و جو شود. همچنین تکنیک غنی سازی اکوسیستم آبی به علت ضعیف بودن نمونه های آبی به صورت جدا نمونه ها در محیط کشت مایع مغذی لوریا برتانی به مدت ۴۸ ساعت تقویت و رشد داده شد سپس مراحل دیگر طبق پروتکل انجام شد. طی غربالگری ثانویه (چاهک گذاری) سوپرناتانت مایع رویی شفاف طی سانتریفوژ در دور ۹۰۰۰ rpmدر مدت۱۰ دقیقه در دما۴درجه سانتی گراد باعث تولید آنزیم زایلاناز شد. همچنین همسو با مطالعات دیگر فعالیت آنزیم زایلاناز با روش DNS مورد سنجش قرار گرفت وشرایط بهینه فعالیت و عملکرد آنزیم در دما۴۵درجه سانتی گراد گزارش شد.سپس جذب نوری(OD:۰/۱۲۷)و بیشترین میزان فعالیت تولید آنزیم زایلاناز(IU/ml۷۶/۶) را نشان داد. هچنین استفاده از سبوس برنج با فعالیت آنزیمی معادل (IU/ml۱۱۰/۵)تولید آنزیم بالاتر گزارش شد.

واردات آنزیم و برطرف کردن نیاز صنایع و کارخانجات تولیدو غذایی کشور میتواند گره گشای بخشی از مشکلات مربوط به واردات آنزیم و خروج ارز از کشور را تا حدی برطرف سازد و در آینده با ادامه موضوعات مشابه و خالص سازی آنزیم در مقیاس صنعتی نیاز کشور را تا حدی بر طرف کند . پتانسیل توانمندی سویه های بومی کشور حاکی از این مطلب می باشد که اکوسیستم هایی که نادیده گرفته شده اند می توانند برای تولید آنزیم یا حتی سایر تولیدات و فراورده های میکروبی ارزشمند باشند تا بتوانیم با پژوهش های تکمیلی تر در آینده به فرآیند تولید آنزیم در مقیاس صنعتی و تجاری دست پیدا کنیم.

منابع

1. ChávezR, Bull P, Eyzaguirre J. The xylanolytic enzyme system from the genus Penicillium. Journal of biotechnology. (2006)Jun 10;123(4):413-33.
2. Collins T, Gerday C, Feller G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. FEMS microbiology reviews. (2005) Jan 1;29(1):3-23.
3. Polizeli MD, Rizzatti AC, Monti R, Terenzi HF, Jorge JA, Amorim DD. Xylanases from fungi:properties and industrial applications. Applied microbiology and biotechnology.(2005)Jun;67:577-91.
4. Walia A, Guleria S, Mehta P, Chauhan A, Parkash J. Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review. 3 Biotech. (2017)May;7:1-2.
5. Annamalai N, Thavasi R, Jayalakshmi S, Balasubramanian T. Thermostable and alkaline tolerant xylanase production by Bacillus subtilis isolated form marine environment.(2009)
6. Yamaura I, Koga T, Matsumoto T, Kato T. Purification and some properties of endo-l, 4-β-d-xylanase from a fresh-water mollusc, Pomacea insularus (de Ordigny). Bioscience,biotechnology,and biochemistry. (1997) Jan 1;61(4):615-20.
7. Sizova MV, Izquierdo JA, Panikov NS, Lynd LR. Cellulose-and xylan-degrading thermophilic anaerobic bacteria from biocompost. Applied and environmental microbiology.(2011)Apr 1;77(7):2282-91.
8. Akhavan Sepahi A, Ghazi Sh, Jafariagdam J, Akhavan Sepahi M. The Usage of Agricultural Lignicellulosic Wastes in cost effective production and optimization of Alkaline Xylanase, by an indigenous strain of Bacillus Mojavensis through submerged fermentation. Journal of Biology (2010) ,Volume 24 Number 3.
9. salem S. salem ,mamdouh S. Elgamal Amr fouda and essam H. Abdel-ahakour isolation, optimization and purification of thermostable xylanase from egyptlan anoxybacilus contaminans wh20 isolate .Microbiology Al Azhar Bulletin of Science, (2012) p.173_183.
10. Nagar S, Mittal A, Kumar D, Gupta VK. Production of alkali tolerant cellulase free xylanase in high levels by Bacillus pumilus SV-205. International journal of biological macromolecules. (2012) Mar 1;50(2):414-20.
11. Kumar PS, Yaashikaa PR, Saravanan A. Isolation, characterization and purification of xylanase producing bacteria from sea sediment. Biocatalysis and agricultural biotechnology. (2018)Jan 1;13:299-303.
12. Khandeparkar RD, Bhosle NB. Isolation, purification and characterization of the xylanase produced by Arthrobacter sp. MTCC 5214 when grown in solid-state fermentation. Enzyme and Microbial Technology. (2006)Aug 2;39(4):732-42.