بهینه سازی شرایط آزمایشگاهی محیط کشت غوطه ور تولید آنزیم کاتالاز توسط *Corynebacterium glutamicum* PTCC1532

سمیرا ساسانیان[۱]، محمد فائزی قاسمی[۲]، ناصر قائمی*[۳]، کتایون داستان[۴]

۱*، ۲و۴- دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان،دانشکده علوم،گروه میکروبیولوژی، لاهیجان، ایران، صندوق پستی:۱۶۱۶

۳*- دانشگاه تهران، پردیس علوم، گروه بیوتکنولوژی، تهران، ایران، صندوق پستی:۶۴۵۵-۱۴۱۵۵

N_ghaemi@yahoo.com

چکیده

در این تحقیق بهینه سازی مواد موجود در محیط کشت و شرایط آن به منظور بالا بردن تولید آنزیم کاتالازتوسط *C. glutamicum* PTCC 1532 با استفاده از روش تغییر یک فاکتور در یک زمان و طراحی آماری فاکتورهای محیط کشت انجام شد. روش یک فاکتور در یک زمان برای مطالعهٔ تأثیرات منابع کربنی، نیتروژنی، دما و pH بر تولید آنزیم کاتالاز استفاده شد. این نتایج نشان داده است که گلوکز و باکتوپپتون تأثیر ویژه ای بر تولید آنزیم کاتالاز بوسیلهٔ *C. glutamicum* PTCC 1532 دارند. دمای بهینه و pH اولیه برای تولید آنزیم کاتالاز به ترتیب ۴۰°C و ۸/۵ بود. غلظت بهینهٔ ترکیبات محیط کشت پس از انجام روش تاگوچی بر حسب گرم به ازای هر لیتر محیط کشت عبارت بود از:گلوکز(۴گرم)، باکتوپپتون(۰/۵گرم)، تری سدیم سیترات (۰/۲گرم)، کلرید پتاسیم (۰/۲گرم)، کربنات سدیم (۰/۳گرم)، سولفات سدیم (۰/۰۵گرم)، کلرید منگنز (۰/۰۰۰۰۱۲۵گرم). ماکزیمم میزان تولید در محیط کشت پایه و بهینه شده پس از انجام روش تاگوچی به ترتیب عبارت بود ۳/۳۳ و ۳۶/۱۵ یونیت به ازای میلی لیتر و مقایسه نتایج در محیط کشت پایه و بهینه نشان داد که میزان تولید آنزیم پس از بهینه سازی شرایط نسبت به محیط کشت پایه به میزان نزدیک به ۱۱ درصد افزایش یافته است.

کلمات کلیدی: کاتالاز، *C. glutamicum* PTCC 1532 ، ترکیبات محیط کشت، بهینه سازی، روش سنجش تاگوچی.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

آنـزیم کاتـالاز (EC ۱.۱۱.۱.۶) تقریبـاً در همـه سلولهای هوازی در داخل پراکسیزوم ها وجـود دارد، و برای حفظ سلول از تأثیرات سمی پراکسید هیدروژن از طریق کاتالیز کردن ترکیبات آن به اکسیژن مولکـولی و آب بدون تولید رادیکالهای آزاد بـه کـار مـی رود (۷). این مکانسیم کاتالیز کردن بطور کامل مشـخص نیسـت، اما بطور کلی بصورت زیر است (۴).

$$2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$$

ایـن آنـزیم از نظـر اقتصـادی در صـنایع غـذایی، لبنیات، منسوجات و صنایع کاغذ سازی و خمیـر کاغـذ استفاده می شود (۱). حجم بالایی از پراکسید هیدروژن به عنوان محصول فرعی در فرآیند های موجـود در ایـن کارخانه ها تولید می شـود و ایـن آنـزیم بـرای برطـرف کـردن پراکسـید هیـدروژن اسـتفاده مـی شـود، وجـود پراکسـید هیـدروژن مـی توانـد در پروسـه هـای بعـدی اخـتلال ایجـاد نمایـد. اگـر از آنـزیم اسـتفاده نشـود می‌بایست برای رفع پراکسید هیـدروژن،کارهایی ماننـد شستشو وسیع وکلی انجام شود که حجـم بـالایی از آب آلوده می شـود، بـه همـین دلیـل کاتـالاز یـک راه کـار مناسب برای حل این مشکل است (۱۰).

C. glutamicum در سال ۱۹۵۷ برای اولین بار توسط Kinoshita جداسـازی شـده اسـت (۱۲). ایـن باکتری دارای واکـنش هـای تخمیـری اسـت کـه بـرای تولید اسید آمینه ها و یا به عبارت بهتر برای نوکلئوتیدها و ویتامین‌ها استفاده می‌شـود (۹). *C. glutamicum* یک باکتری گرم مثبت، غیربیماری زا و بـا رشـد سـریع در خاک است که اهمیـت بـالایی را در بیوتکنولـوژی دارا می باشد و در مقیاس های بزرگ برای تولیـد اسـید آمینه های بخصوص L-گلوتامات وL- لیـزین بـه کـار مـی رود. امـا اطلاعـات کمـی در زمینـه تولیـد آنـزیم کاتالاز توسط این میکروارگانیزم وجود دارد (۱۵).

روش های کلاسیک بهینه سازی محیط بسیار رایج بوده و بسیاری از محققان در زمینـه بهینـه سـازی محـیط جهت تولید فرآورده های مختلف از آنها بهره جسته‌اند. مهمترین روش کلاسیک در این زمینه روش تغییر یـک فاکتور بر حسب زمـان (one-factor-at-a-time) و یـا روش یـک بعـدی (single dimensional search) است. در این روش یک متغییر مسـتقل (نظیـر یک مادهٔ مغذی خاص) و یا درجهٔ حـرارت، pH و... را در یک سطح خـاص تغییـر مـی دهـیم و ایـن در حـالی است که پارامترهای دیگر را ثابت نگه می داریم و نقطهٔ مطلوب را بدست می آوریم، سپس به سراغ پارامترهای بعدی رفته و همین کار را تکرار می کنیم و در نهایت با همه پارامترهای بهینه بدست آمده فرآیند تولید را انجـام داده و میـزان افـزایش تولیـد را بررسـی مـی کنـیم. ایـن روش سخت و وقت گیر بوده و بخصوص بـرای تعـداد زیادی متغییر دارای مشکل است و اغلب تعیـین شـرایط بهینه را تضمین نمی کند. از طرفی، از آنجائیکه بسیاری از متغییرهـای فیزیکـی و تغذیـه ای بـر فیزیولـوژی میکروبی می توانند در هر لحظه تـأثیر نماینـد لـذا تغییـر یک پارامتر در یک زمان وقت گیر و بـی نتیجـه اسـت. ولی با کمک روشهای آماری مـی تـوان تغییـرات تمـام فاکتورهـا را همزمـان ارزیـابی کـرد و بـرای مقاصـد آزمایشگاهی و در مـواقعی کـه از مسـیرهای متـابولیکی ارگانیزم و نیز پارامترهای رشد فیزیکی آن اطلاع داریـم با داشـتن یـک فرمـول موجـود محـیط کشـت و تولیـد، مـی‌تـوان بطـور سـریع نـواحی مطلـوب را بـا ایـن روش بدست آورد (۱۱). در صورت وجـود بعضـی اطلاعـات

Archive of SID

www.SID.ir

بیوشیمیایی و مطالعاتی در این راستا می توان موفقیت‌های بیشتری در زمینهٔ بهینه سازی مواد مغذی بدست آورد. در این خصوص داشتن اطلاعاتی در مورد پیش سازها، مسیرهای بیوسنتیک، احتیاجات ویژهٔ کربن، فسفات، سولفور، مواد معدنی و عناصر جزئی(Trace) و تشکیل محصول ضروری هستند. تنظیم میزان محصول بسیاری از متابولیت های اولیه و ثانویه توسط کربن، نیتروژن، فسفر، عناصر جزئی به اثبات رسیده است. بنابراین تعیین سطحی که این مکانسیم های تنظیمی در یک ارگانیزم خاص موجب افزایش تولید می شوند نیز مهم خواهد بود.

روش آماری بهینه سازی تاگوچی (Taguchi) در سالهای اخیر در فرآیندهای بهینه سازی بیوتکنولوژی در ایران نیز بکار گرفته شده است. با استفاده از نرم افزار تاگوچی می توان آرایه (جدول تاگوچی) مناسب را انتخاب،که این آرایه متناسب با تعداد پارامتر و سطوح آنها و تداخل پارامترها است. تجزیه پاسخ ها، تعیین فاکتورهایی که بیشترین اختلاف را ایجاد کرده اند و در نهایت تعیین حالات اپتیمم و یا میزان بهینه سطح هر فاکتور نیز قابل انجام است (۱۱).

در این تحقیق بهینه سازی شرایط و ترکیبات محیط کشت بر روی تولید آنزیم کاتالاز توسط سویه *C. glutamicum* PTCC 1532 انجام پذیرفت. تا جایی که مطالعات انجام شد اطلاعاتی در زمینه بهینه سازی تولید آنزیم کاتالاز توسط این باکتری وجود نداشته و این اولین گزارش در این زمینه می باشد.

مواد و روشها

سویه میکروبی و شرایط کشت

سویه *C. glutamicum* PTCC 1532 از مرکز کلکسیون باکتری ها و قارچ‌های صنعتی و عفونی ایران واقع در سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران خریداری شد.کلیه مواد شیمیایی و ترکیبات لازم برای تهیه محیط های کشت به کار گرفته شده از شرکت مرک (Merck) تهیه شد.

کشت اولیه باکتری لیوفیلیزه روی محیط کشت نوترینت براث و نوترینت آگار انجام پذیرفت. محیط کشت مناسب برای رسم منحنی رشد باکتری و اندازه‌گیری میزان آنزیم کاتالاز به ترتیب شامل ترکیبات زیر بر حسب گرم به ازای هر لیتر بود:

Na_2CO_3(3 g l^{-1}), KCl(2 g l^{-1}), $MgSO_4.7H_2O$(1g l^{-1}), Na_3-Citrate (3g l^{-1}), Yeast extract (10g l^{-1}), $MnCl_2.4H_2O$ (0.36mg l^{-1}), $FeSO_4$ (50 mg l^{-1})

ابتدا کشت ۲۴ ساعته از باکتری *C .glutamicum* PTCC 1532 (ATCC 13032) در ۳۷°C بدست آمد. برای رسم منحنی رشد باکتری ابتدا به کمک محیط کشت اولیه بدون تلقیح، اسپکتروفوتومتر را صفر کرده و در طول موج در ۵۷۰nm تنظیم و میزان کدورت محیط ها را در فاصله‌های زمانی ۴ ساعته از زمان تلقیح اندازه گیری شد. اندازه گیری میزان آنزیم کاتالاز، پس از تلقیح باکتری در ارلن ها و گرماگذاری در انکوباتور، در فاصله های زمانی ۴ ساعته پس از تلقیح اندازه گیری گردید.

Archive of SID
www.SID.ir

سنجش آنزیم کاتالاز: سنجش آنزیم به روش Colorimetric Assay for Catalase Activity که توسط Christian Thorsent پیشنهاد شده بود انجام پذیرفت. دو سری ۱۰تایی لولهٔ آزمایش انتخاب شد که به آنها مقادیر افزایشی H_2O_2 (۳۰٪) از ۱۰ تا ۱۶۰ میکرومول با سمپلر اضافه گردید و برای رساندن حجم کلی لوله ها به ۲۰۰µl بقیه حجم لوله ها با آب مقطر پر شد.

یک لوله را به عنوان شاهد در نظر گرفته و به آن ۲۰۰µl آب مقطر اضافه گردید. به همه لوله ها ۲ ml معرف دی کرومات پتاسیم/ اسید استیک اضافه شد. در لحظهٔ اول ورود معرف به داخل لولهٔ آزمایش رسوب آبی رنگی در ته لوله ها ایجاد شد. برای رسیدن حجم کلی لوله ها به ۳ ml و سنجیدن در اسپکتروفوتومتر به همه لوله ها به میزان ۰/۸ cc آب مقطر اضافه گردید.

به عبارت دیگر همهٔ لوله ها حاوی ۲ml معرف دی کرومات پتاسیم/ اسید استیک و ۲۰۰µl (۰/۲ cc)آب مقطر و H_2O_2 بودند که با اضافه کردن ۰/۸ cc آب مقطر به حجم نهایی ۳ ml رسیدند. در نهایت میزان کدورت این رقت ها دراسپکتروفوتومتر و در طول موج ۵۷۰ nm سنجیده شد (۶). یک واحد فعالیت آنزیم برحسب تعریف عبارت است از: میزان تجزیه یک میکرومول آب اکسیژنه در شرایط بهینه ذکر شده بالا در شرایط آزمایشگاهی.

تأثیر منابع مختلف کربنی بر تولید آنزیم: برای بررسی تأثیر منابع مختلف کربنی بر روی بیوسنتز آنزیم، منابع کربنی مختلف شامل گلوکز، مالتوز، سوکروز و فروکتوز به طور جداگانه به میزان ۱٪ به هر ارلن اضافه شدند و پس از تلقیح باکتری ها در ارلن ها و گرماگذاری در انکوباتور شیکردار میزان تولید آنزیم در فاصله های زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت بررسی شد.

تأثیر منابع مختلف نیتروژنی بر تولید آنزیم: برای بررسی تأثیر منابع مختلف نیتروژنی بر روی بیوسنتز آنزیم، محیط های کشت بدون منبع نیتروژنی تهیه شدند و سپس منابع مختلف نیتروژنی به میزان ۱٪ به محیط ها به طور جداگانه اضافه گردیدند. این منابع نیتروژنی شامل پپتون (Peptone)، باکتو پپتون (Bactopeptone)، Soybean، Meat extract بودند. بعد از اتوکلاو کردن و تلقیح باکتری، محیط ها در انکوباتور شیکردار قرار گرفته و بعد از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت تولید آنزیم در آنها بررسی گردید.

مناسب ترین غلظت نمک های تری سدیم سیترات و $MgSO_4.7H_2O$ برای تولید آنزیم: برای تعیین میزان بهینه نمک برای تولید آنزیم کاتالاز دو سری ۵ تایی ارلن ۵۰ میلی لیتری انتخاب شد. مقادیر محیط کشت پایه، بدون عصارهٔ مخمر به اندازهٔ ۳۰۰ میلی لیتر وزن شده و در ارلن های سری اول تقسیم گردید. به ترتیب به هر یک از ارلن ها ۰/۲۵، ۰/۲، ۰/۱۵، ۰/۱ و ۰/۰۵ گرم به ازای لیتر $MgSO_4.7H_2O$ اضافه شد.

در ارلن های سری دوم، مقادیر محیط کشت پایه بدون عصارهٔ مخمر به اندازهٔ ۳۰۰ میلی لیتر وزن شده و در ارلن های ۵۰ میلی لیتری تقسیم گردید. به هر یک از ارلن ها به ترتیب ۰/۲۵، ۰/۲، ۰/۱۵، ۰/۱ و ۰/۰۵ گرم تری سدیم سیترات به ازای لیتر اضافه شد. بعد از اتوکلاو شدن محیط های کشت به همهٔ ارلن ها به اندازهٔ ۵λ گلوگز ۴٪ و باکتوپپتون ۱٪ استریل اضافه شد. ۲۴ ساعت پس از تلقیح باکتری میزان آنزیم تولید شده، اندازه گیری گردید.

Archive of SID

www.SID.ir

بررسی شرایط بهینهٔ تولید از نظر درجه حرارت و pH: پس از بدست آوردن بهینهٔ منابع کربن و نیتروژنی، برای بهینه سازی درجه حرارت و pH از درجه حرارت‌های ۴۰، ۵۰، ۶۰ درجه سانتی گراد و برای بهینهٔ pH از pH های ۵/۵، ۵/۶، ۸/۷ و ۹/۵ در شرایط اپتیمم شده منابع کربن و نیتروژنی استفاده شد.

بررسی شرایط بهینه برای تولید آنزیم نهایی به روش تغییر یک فاکتور در یک زمان: در این مرحله از کار همهٔ شرایط بهینهٔ بدست آمده در هر یک از مراحل کار به طور کلی برای باکتری فراهم شده و میزان تولید آنزیم بررسی گردید. مقادیر مورد نیاز برای ۳۰۰ میلی لیتر از محیط کشت تولید وزن شده، بعد از اتوکلاو و تلقیح باکتری، محیط ها در انکوباتور شیکردار قرار گرفت و در بازه های زمانی ۴ ساعته از زمان تلقیح میزان کدورت ایجاد شده در محیط کشت و میزان تولید آنزیم کاتالاز بررسی شد.

بهینه سازی محیط کشت با فرمولاسیون پیشنهادی تاگوچی (Taguchi) برای تولید آنزیم: با استفاده از نرم افزار تاگوچی آرایه های متناسب با تعداد پارامترها و سطوح آنها در تداخلات پارامترهای منتخب و بهترین آرایه بدست آمد. اساس کار ارائه جدول استانداردی است که متغییرها را همراه و یا بدون اثرات متقابل بررسی کند. بر اساس این روش ۸ ارلن ۵۰ cc از محیط کشت تولید بر اساس ترکیبات ارائه شده توسط این نرم افزار انتخاب گردید. بعد از اتوکلاو و تلقیح باکتری، محیط ها در انکوباتور شیکردار قرار گرفته و پس از گذشت ۲۴ ساعت از زمان تلقیح، میزان رشد سلول و تولید آنزیم کاتالاز بررسی شد.

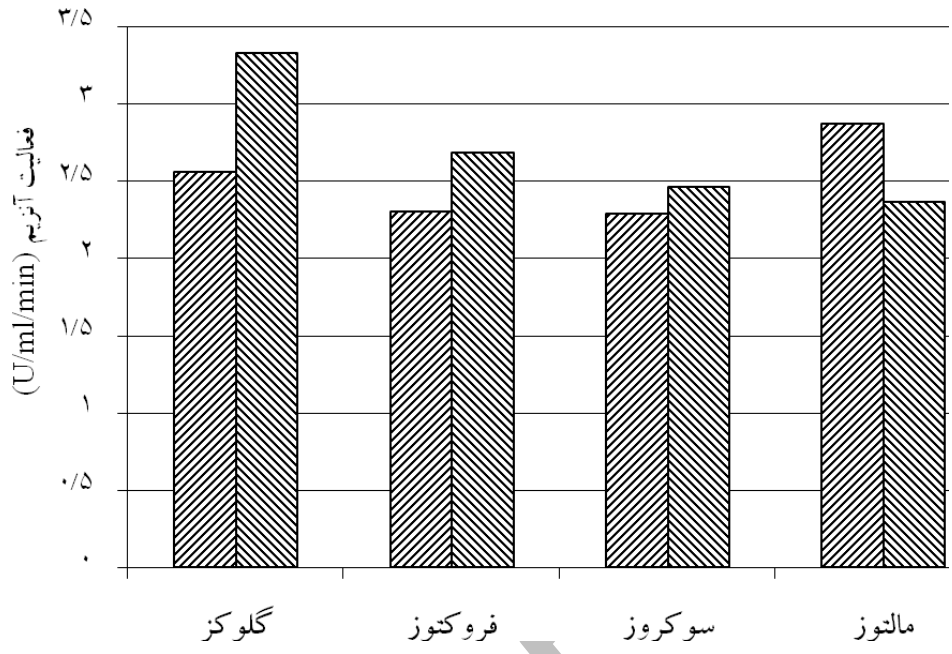
نتایج

نتایج بهینه سازی منابع کربنی: پس از بررسی منابع کربنی در تولید آنزیم کاتالاز قند گلوکز به عنوان بهترین منبع کربنی با غلظت ۴٪ انتخاب گردید.سپس غلظت های ۱ تا ۱۰٪ این قند در افزایش تولید آنزیم بررسی گردید.در نهایت غلظت ۴٪ گلوکز به عنوان بهترین غلظت تشخیص داده شد.

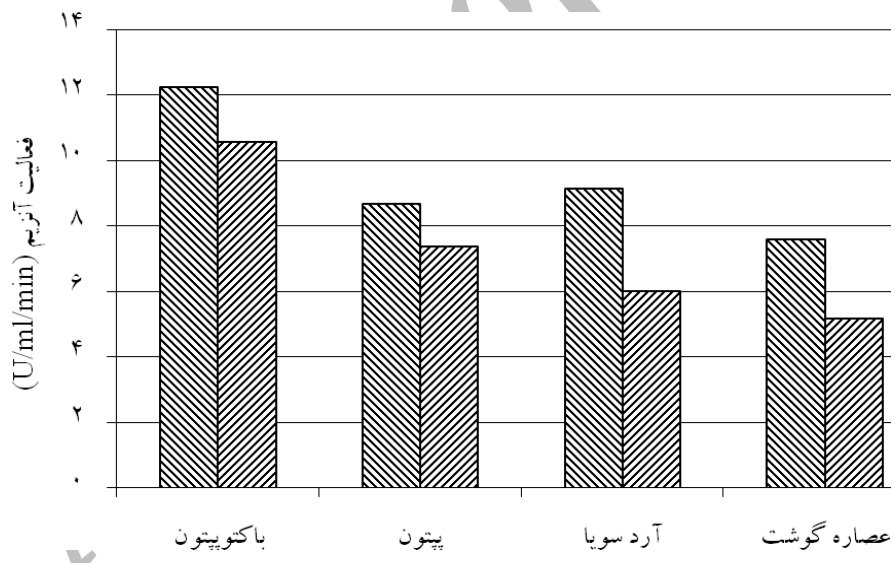
نتایج بهینه سازی منابع نیتروژنی: پس از بررسی منابع نیتروژنی در تولید آنزیم کاتالاز باکتوپپتون به عنوان بهترین منبع کربنی با غلظت ۱٪ انتخاب گردید. سپس غلظت های ۱ تا ۱۰٪ باکتوپپتون در افزایش تولید آنزیم بررسی گردید. در نهایت غلظت ۱٪ باکتوپپتون به عنوان بهترین غلظت جهت تولید آنزیم انتخاب گردید. نتایج بدست آمده مربوط به انتخاب بهترین منبع کربن و نیتروژن در نمودارهای ۱ و ۲ آمده است.

Archive of SID

www.SID.ir



نمودار ۱: اثر منابع مختلف کربنی بروی تولید آنزیم کاتالاز بوسیلهٔ *C. glutamicum* PTCC 1532

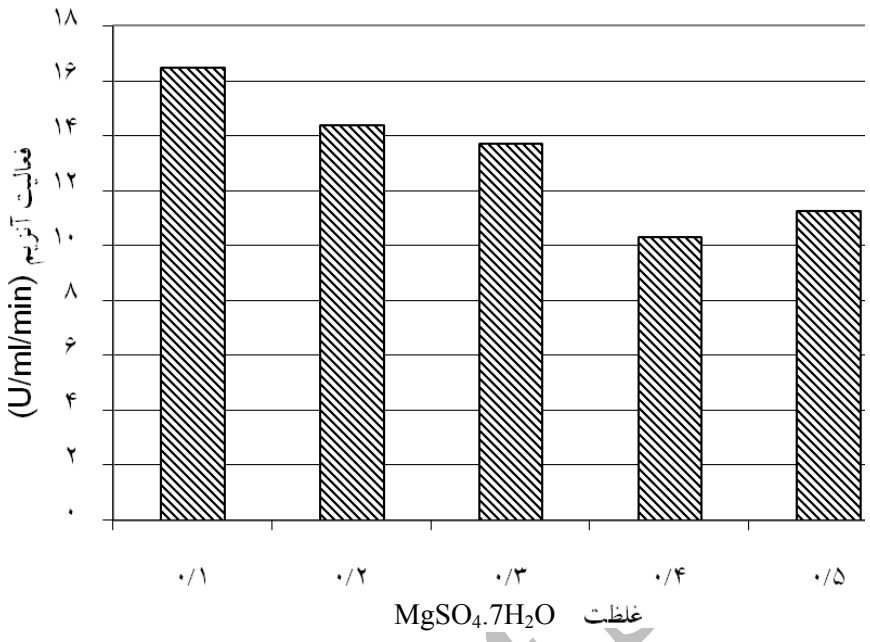


نمودار ۲: اثر منابع مختلف کربنی بروی تولید آنزیم کاتالاز بوسیلهٔ *C .glutamicum* PTCC 1532

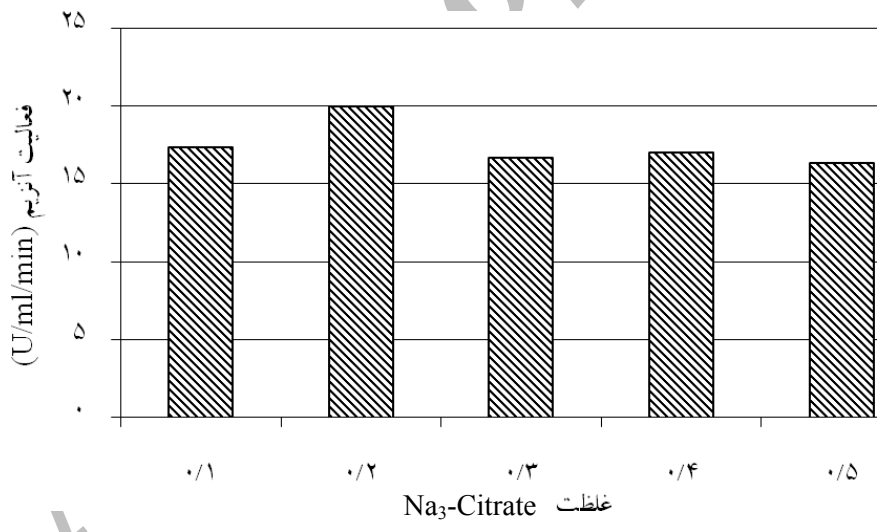
نتایج بهینه سازی غلظت نمک های تری سدیم – سیترات و $MgSO_4.7H_2O$ برای تولید آنزیم:

پس از بررسی غلظت نمک های تری سدیم- سیترات و $MgSO_4.7H_2O$ برای تولید آنزیم، از بین غلظت‌های مختلف $MgSO_4.7H_2O$ بیشترین میزان تولید آنزیم کاتالاز در غلظت ۰/۱ گرم به ازای هر ۱۰۰ میلی لیتر از محیط کشت و از بین غلظت های مختلف تری سدیم - سیترات بیشترین میزان تولید آنزیم در غلظت ۰/۲ گرم به ازای هر ۱۰۰ میلی لیتر از محیط کشت می‌باشد. نتایج بدست آمده در نمودارهای ۳ و ۴ آمده است.

www.SID.ir



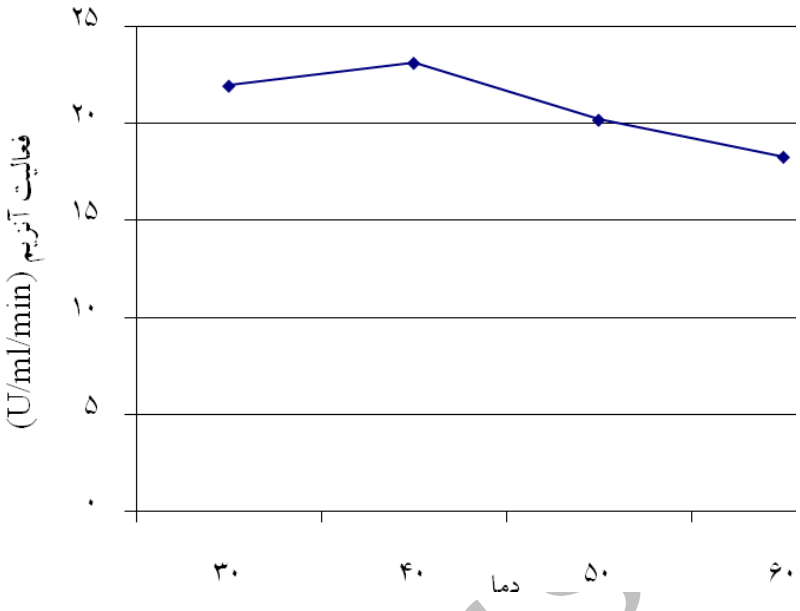
نمودار ۳: اثر $MgSO_4 .7H_2O$ بر روی تولید آنزیم کاتالاز بوسیلهٔ *C .glutamicum* PTCC1532



نمودار ۴: اثر تری سدیم - سیترات بروی تولید آنزیم کاتالاز بوسیلهٔ *C. glutamicum* PTCC1532

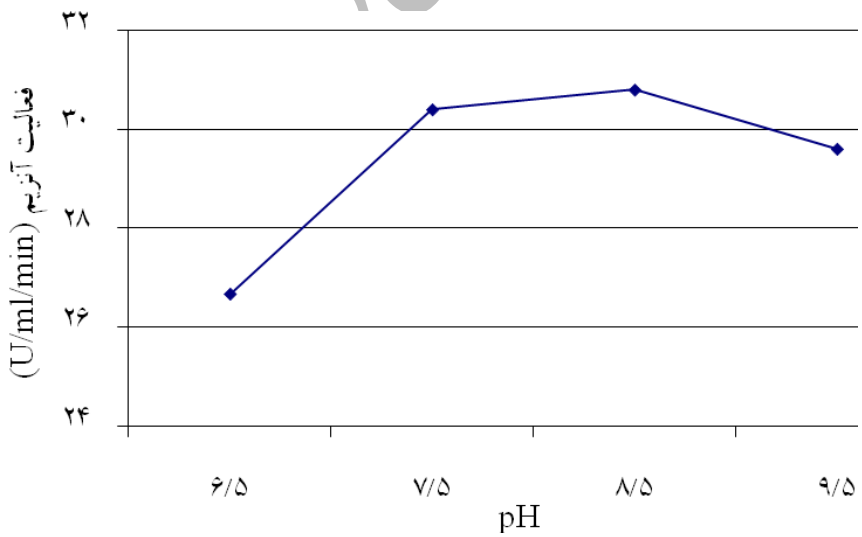
نتایج بهینه سازی دما: پس از بررسی دماهای مختلف، بهترین دمای محیط کشت جهت تولید بالاترین میزان تولید آنزیم توسط باکتری، دمای $40^{\circ}C$ می باشد.

www.SID.ir



نمودار ۵: اثر دما بروی تولید آنزیم کاتالاز بوسیلهٔ *C .glutamicum* PTCC1532

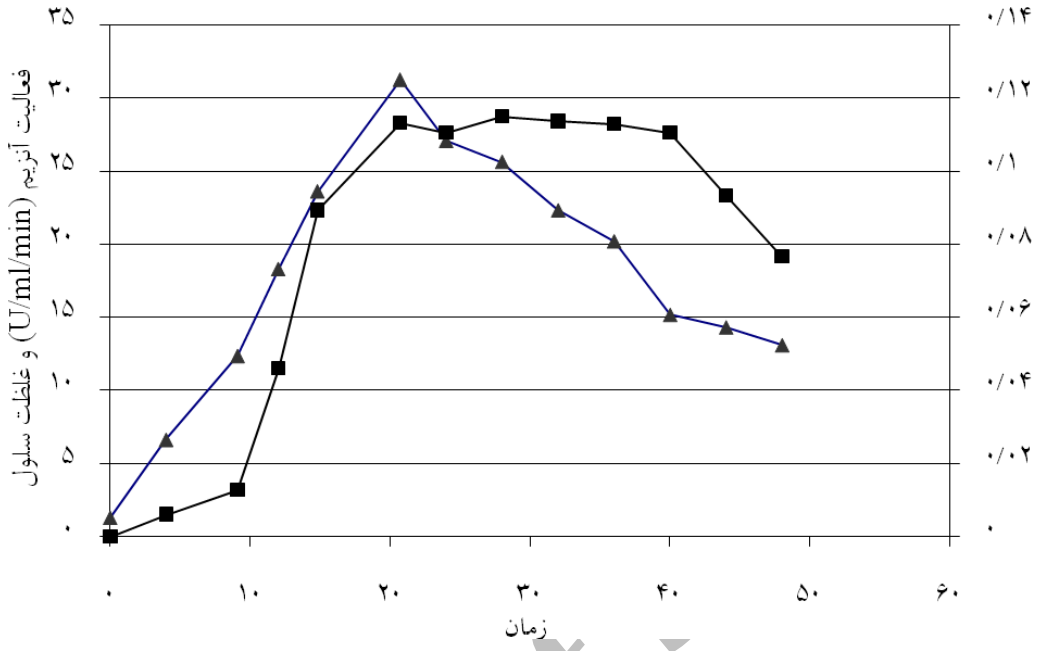
نتایج بهینه سازی pH: پس از بررسی pH های مختلف، نتایج حاصله از تغییر pH نشان داد که بالاترین مقدار تولید آنزیم در pH=۸/۵ می باشد. این نتایج بدست آمده در نمودارهای ۵ و ۶ آمده است.



نمودار ۶: اثر pH بروی تولید آنزیم کاتالاز بوسیلهٔ *C .glutamicum* PTCC1532

نتایج بررسی شرایط بهینه برای تولید آنزیم نهایی به روش تغییر یک فاکتور در یک زمان: پس از بررسی و تعیین منابع و غلظت های بهینهٔ منابع کربنی، نیتروژنی و نمکی بر طبق نمودار ۷ منحنی رشد سلول و تولید آنزیم نشان داده شده است.

www.SID.ir

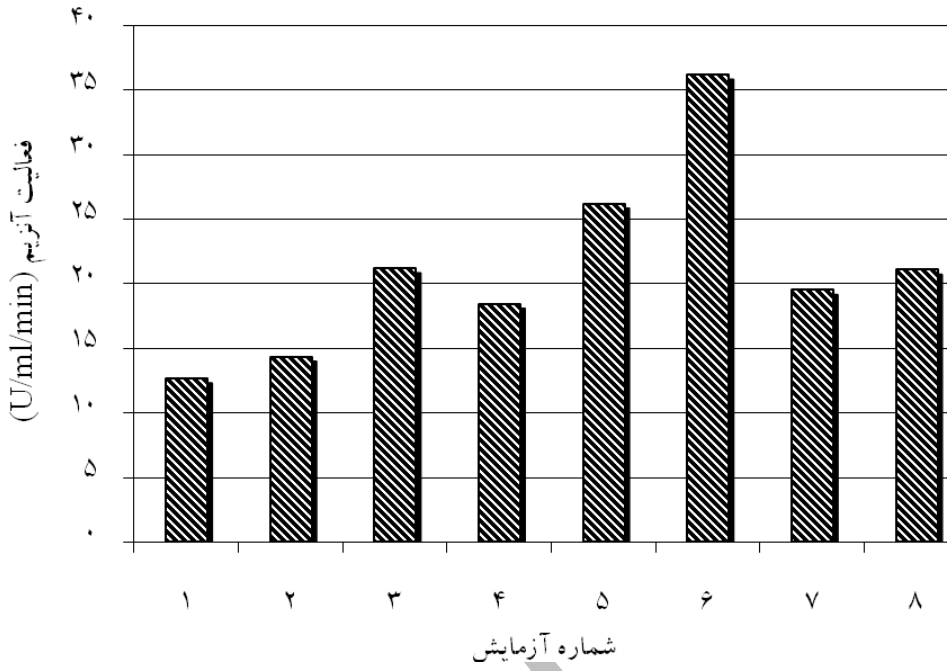


نمودار ۷: بهینهٔ میزان تولید آنزیم کاتالاز پس از بهینه سازی به روش تغییر یک فاکتور در یک زمان توسط *C .glutamicum* PTCC 15332

نتایج بررسی تأثیر شرایط بهینه سازی محیط کشت با فرمولاسیون پیشنهادی تاگوچی (Taguchi): نتایج بدست آمده بر اساس شرایط بهینهٔ تعریف شده توسط نرم افزار تاگوچی، یک سطح بهینه‌ای از هر فاکتور را برای تولید بالای آنزیم ارائه می‌دهد. در نمودار ۸ میزان تولید آنزیم نشان در بهینه‌سازی به روش تاگوچی نشان داده شده است.

Archive of SID

www.SID.ir



نمودار ۸: بهینهٔ میزان تولید آنزیم کاتالاز پس از بهینه سازی محیط کشت با فرمولاسیون پیشنهادی تاگوچی(Taguchi): زمان توسط *C .glutamicum* PTCC 15332

بحث

فعالیت های آنزیمی تنها در میان پاره ای از ویژگی‌های فیزیکی موثر می باشند، ویژگی های آنزیمی به ویژه آنهایی که پروتینی هستند، از طریق شرایط فیزیکی معمول قابل تغییر می باشند و تنها یک محدوده بسیار کوچکی از شرایط، دارای فعالیت بالا و یا بهینه می باشند (۵). از جمله عوامل موثر بر فعالیت‌های آنزیمی pH، دما و غلظت سوبسترا می‌باشند (۱۶). در این تحقیق از روشهای کلاسیک بهینه سازی محیط استفاده شده است و اثر یک سری شرایط مانند تغییر منابع و غلظت های مختلف کربنی، نیتروژنی، دما، pH، نمک های تری سیترات سدیم و سولفات منیزیم روی باکتری *C. glutamicum* PTCC 1532 بررسی شد. هر یک از شرایط تعریف شده اثر متفاوتی بر روی میزان رشد سلولی و آنزیم کاتالاز توسط باکتری داشتند.

در اثر تغییر منابع مختلف کربنی نتیجه گرفته شد که *C .glutamicum* PTCC 1532 با وجود حضور گلوکز به عنوان سوبسترای اصلی آنزیم کاتالاز، قادر به بیوسنتز این آنزیم بوده در حضور قندهای دیگر به عنوان منبع کربن فعالیت آنزیم کمتر است. Button و Low در سال ۱۹۷۳ نیز تولید بالای آنزیم کاتالاز را توسط سویه های کورینه فرم را در حضور گلوکز به عنوان منبع کربن گزارش نمودند (۵). Wittman و همکارانش نیز نتیجه گرفتند که سنتز کاتالاز زمانی که باکتری در ساکاروز و مالتوز رشد می کند،کمتر می شوند. اما هنگام رشد در گلوکز و فروکتوز افزایش می یابند (۳).

در این تحقیق همچنین نتیجه گرفته شد که منابع نیتروژنی تولید آنزیم را القا می کنند، در میان نمک ها باکتوپپون بهترین بازدهی را داشت. Beckers et al در سال ۲۰۰۱ با بدست آوردن نتایج مشابه، به ترتیب

Archive of

www.SID.ir

باکتوپپتون و پپتون را به عنوان بهترین منابع نیتروژنی معرفی کرد (۳).

مطالعه اثر دما بر تولید آنزیم کاتالاز توسط *C. glutamicum* PTCC 1532 نشان داد که اپتیمم دما برای این سویهٔ ۴۰°C می‌باشد. Davati و همکارش در سال ۲۰۰۵، با بررسی تولید این آنزیم توسط سویه های *Corynebacterium* در فاصله‌های ۳۰°C تا ۳۹°C اپتیمم دمای تولید را ۳۷°C عنوان نمود (۱۴).

نتایج نشان می دهد که pH بهینه جهت فعالیت سلول۸/۵ می باشد. Barriuso و همکارانش در سال ۲۰۰۸، اپتیمم pH را برای فعالیت آنزیم ۹-۷ عنوان کرد (۱۳). در حالیکه Armstrong و همکارانش اپتیمم pH برای فعالیت کاتالاز را ۷/۵ گزارش نمودند (۲). نتیجه بدست آمده در این تحقیق با این مطلب که کاتالازهای بیشتر باکتریها اپتیمم pH خنثی(۷) تا قلیایی دارند مطابقت دارد و محدودهٔ فعالیت کاتالاز بین ۷ تا ۱۰ می باشد (۸). با مطالعات انجام شده در این تحقیق نتیجه گرفته شد که با تغییر منابع غذایی و شرایط محیط کشت می توان تولید آنزیم کاتالاز توسط کورینه باکتریوم گلوتامیکوم را افزایش داد و با بهینه سازی به کمک تغییر یک فاکتور در یک زمان و روش تاگوچی میزان تولید آنزیم برابر افزایش یافت.

سپاسگزاری

بدینوسیله از حمایت های ارزنده آقای دکتر مهدی آسمار مدیریت محترم گروه کارشناسی ارشد کمال سپاسگزاری و تشکر را داریم.

منابع

1. Abramoff, P. and Thomson, R.G., 1976. Factors Affecting Enzyme Activity. An Experimental Approach of Biology. W.H. Freeman and Co, pp 65-73.
2. Armstrong, N. and Marmelstein, K., 1983. Process for fermentative production of amino acids. Journal of Microbiology. pp 77-123.
3. Beckers, G. et al., 2001. Glutamate synthase of the *C.glutamicum* in not essential for glutamate synthesis and is regulatated by the nitrogen status. Journal Microbiology. pp. 368-489.
4. Boon, E.M.; Downs, A. and Marcey, D., 2007.Catalase H_2O_2: H_2O_2 Oxidoreductase. Catalase Structural Tuforial Text. Winkimedia Foundation Inc U.S. pp. 254-256.
5. Button, D.K. and Low, A.T., 2003. Multiple-Carbone-Source-Limited growth kinetics of the Marine Coyneforme bacterium. Journal Bacteriol. Nov: 116.
6. Christian, T., 1973. Colorimetric Assay for Catalase Activity, Appl.Biochemistry Experiments, pp 1- 6.
7. Elizabeth, M.B.; Aaron, D. and David, M., 2001. Catalase: H_2O_2 Oxidoreductase. Journal Mol. Biol, pp.77-132.
8. Fusho,Y., (Kanagawa, jp) and Yajima, Y., (chiba,jp), 1997.Catalase from bacillus and process for the producting the same. United State. pp. 754-956.
9. Letek, M.; Fiuza, M.; Ordonez, E.; Villadangos, A.F.; Ramns, A.; Mateos, L.M. and Gil, J.A., 2008 .Cell growth and cell division in the rod shaped actinomycete *C.glutamic- um.* Department of Molecular Biology. Area Microbiology, Faculty Biology. University Leo. Leo. Spain. pp. 689-825.
10. Elwess, L. and Latourelle, S., 2008. Enzyme Kinetics: Effect pH upon Enzyme Activity. Worthington Biochemical Corporation. pp. 125-165.
11. Faezi, G.M.; Shodjai-Arani, A. and Moazami, N., 2008. Optimization of bacteriorhodopsin production by *Halobacterium salinarium* PTCC 1685. pp 1-19.

Archive of SID

www.SID.ir

12. Letek, M.; Fiuza, M.; Efren, O.; Almudena, V.; Astrid, R.; Luis, M. and Gil, J., 2008. Cell growth and cell division in the rod-shape actinomycete *Coryne-bacterium glutamicum*. pp. 686-825.
13. Barriuso, M.; Iglesias; Schluesener, D.; Barreio, C.; Poetsch, A. and Juan, F.M., 2008. Response of the cytoplasmic and membrane proteome of the *C.glutamicum* ATCC 13032 to pH changes. BMC Microbiol. 64.
14. Davati, N. and Hamidy, Z., 2005. Optimization fermentation conditions of glutamic acid production from dates Fruit wastes as substrate by *C.glutamicum.* Department Food Science –Faculty CECT690, CECTW of the Agriculture, University of the Tarbiat Modares. pp. 128-186.
15. Gourdon, P.; Raherimandimby, M.; Dominguez, H.; Cocaign, B. and Lindley, N.D., 2003. Osmotic stress transport capacity and consequences for glutamate overproduction in *C.glutamicum*. Appl. Journal of Biotechnology 104, pp 77-85.
16. Morbach, S. and Karmer, R., 2003. Impact of transport process in osmotic response of *C.glutamicum*, Appl. Journal of Biotechnology 104, pp 69-75.

Archive of SID

www.SID.ir