Archive of SID

استفاده از ضایعات لیگنوسلولزی کشاورزی جهت تولید اقتصادی آنزیم گزیلاناز قلیایی، از سویه بومی *Bacillus mojavensis* به روش تخمیر غوطه ور و بهینه سازی تولید

عباس اخوان سپهی[۱]، شکوفه غازی*[۱]، جواد جعفری اقدم[۱] و مریم اخوان سپهی[۲]

[۱] تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، دانشکده علوم پایه، گروه میکروب شناسی

[۲] تهران، مؤسسه کنترل کیفی غذا و دارو.

تاریخ دریافت: ۸۸/۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۲/۲٤

چکیده

در این پروژه ضمن جداسازی سویه بومی مناسب *باسیلوس* از خاک مزرعه پنبه، طی مراحل غربالگری اولیه و ثانویه، شایستگی آنزیم گزیلاناز تولید شده توسط این سویه، به لحاظ کمی و کیفی فعالیت آنزیمی بررسی گردید. سنجش دما و pH بهینه فعالیت آنزیمی در محدوده ای بالا از دما و pH، با اندازه گیری میزان آزاد شدن قندهای احیاء کننده انجام گرفت. بهینه دما و اسیدیته فعالیت آنزیمی گزیلاناز جداسازی شده در pH ۹ و دمای ۵۵ درجه سانتی گراد تعیین شد. نتایج مربوط به تعیین ترادف ژنتیکی ۱٦S rRNA سویه غربال شده، ۱۰۰ درصد تشابه ژنتیکی با توالی ۱٦S rRNA *باسیلوس موجاونسیس* نشان داد و هویت جدایه مولد آنزیم، تحت عنوان سویه ای بومی از *باسیلوس موجاونسیس* مشخص گردید. *باسیلوس موجاونسیس* غربال شده به عنوان جدایه برتر جهت تولید اقتصادی گزیلاناز با استفاده از ملاس، باگاس، سبوس گندم، سبوس جو و شلتوک برنج وارد مرحله بهینه سازی گردید. با اعمال تمامی عوامل ممکن در فرآیند بهینه سازی، افزایش در میزان تولید آنزیم از ۱۹٤/٦۸ IU/ml به میزانی معادل ۳۰۲/٤٦٦ IU/ml پس از فرآیند بهینه سازی, مشاهده شد. موفقیت در تولید آنزیم گزیلاناز با استفاده از سوبسترای ارزان و مناسب و توانایی باکتری جهت استفاده از ضایعات لیگنوسلولزی (سبوس جو به عنوان منبع بهینه)، همچنین تولید گزیلاناز فعال درشرایط قلیایی و دمایی بالا، این سویه را جهت تولید اقتصادی گزیلانازهای مناسب صنعتی نامزد می کند.

واژه های کلیدی: *باسیلوس موجاونسیس* ، سبوس جو، گزیلاناز

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۵۲۲٤۰۳۸ پست الکترونیکی: shokoofeh.ghazi@gmail.com

مقدمه

سالیانه مقادیرعظیمی از ضایعات کشاورزی لیگنوسلولزی اعم از سبوس گندم، شلتوک برنج، سبوس جو، ملاس، باگاس و ... در نتیجه فعالیتهای کشاورزی و جنگل داری و انواع فرآیند های صنعتی تولید می شوند (۲۰ و ۲۳). لیگنوسلولزها به عنوان دومین مواد تشکیل دهنده دیواره سلولی گیاهی عمدتاً از لیگنین، سلولز و همی سلولز تشکیل شده اند. گزیلان هتروپلیمری از D گزیلوپیرانوز، دومین بیوپلیمر وافردرطبیعت پس از سلولز می باشد که به عنوان ترکیب اصلی همی سلولزی در چوب یافت می شود و هیدرولیز کامل آن به مونومرهایش به عملکرد آنزیم گزیلاناز وابسته است (۱۸ و ۳۰).

از طرفی به دلیل کاربردهای وسیع بیوتکنولوژیکی و صنعتی گزیلانازها (آنزیم تجزیه کننده پلی مر گزیلان) از جمله در صنعت کاغذسازی به منظور سفیدشویی خمیر کاغذ و حذف لیگنین ازآن، ارتقاء کیفیت گوشت ضمن پخت ، به عنوان آنزیم کمک کننده هضم غذا (Digestive enzyme) در جیره غذایی دام و طیور و در رژیم غذایی افراد گیاه خوار، سالیانه هزینه سنگین واردات آنزیم را برای

www.SID.ir

Archive of SID

کشور در بر دارد (۲، ٤ و ۱۲)، در حالی که می توان از انواع ضایعات کشاورزی به عنوان سوبسترای ارزان قیمت جهت تولید صنعتی و مقرون به صرفه گزیلاناز توسط میکروارگانیسمها و طی یک پروسه ی تخمیری سازماندهی شده استفاده کرد (۲۰ و ۲۳). گزیلانازها طی تخمیر غوطه ور (٦ و ۷) و تخمیر بستر جامد (۱٤، ۲۲ و ۳۰) تولید می شوند. حدود ٤۰ درصد قیمت بالای گزیلانازهای صنعتی به دلیل قیمت بالای سوبسترایی است که در تولید آنزیم به کار رفته است ، درحالی که موفقیت در تولید آنزیم با استفاده از سوبسترای ارزان قیمت و توانایی سویه ها جهت استفاده ازاین منابع کربنی، تولید اقتصادی گزیلانازهای صنعتی را امکان پذیر کرده است (۱، ۱۱ و ۲٦).

از طرفی اغلب گزیلانازهای تولید شده از قارچها و *اکتینومیست ها* به دلیل کاهش یا عدم فعالیت آنزیمی در دماهای بالا و به ویژه pH قلیایی، کاربرد این نوع گزیلانازها را در فرآیندهای صنعتی محدود ساخته و اهمیت تولید آنزیم از منشاء باکتریایی را تقویت می کند (۱٤، ۱۵، ۱۷، ۲٤ و ۲۸) چرا که اغلب گزیلانازهای تولیدی با منشاء باکتریایی قادر به فعالیت در دما و pH بالا می باشند (۱٦، ۲۷ و ۳۱).

ضمن اشاره به اهمیت انواع گزیلانازهایی که بتوانند در دما و اسیدیته بالا فعالیت کنند، امکان تولید اقتصادی آنزیم با سوبستراهای ارزان قیمت، از مهم ترین گامها جهت تولید آنزیم بشمار می رود. در این پروژه ضمن جداسازی سویه مناسب *باسیلوس* ازخاک مزرعه پنبه (ایران- حوالی کاشان)، طی مراحل غربالگری اولیه و ثانویه، شایستگی آنزیم تولید شده توسط سویه از لحاظ کیفی و کمی فعالیت آنزیمی در دما و pH بالا به اثبات رسید و *باسیلوس* جداسازی شده، جهت تولید اقتصادی آنزیم با استفاده از ضایعات کشاورزی حاوی قند مورد نظر مورد نیاز به عنوان سوبسترای ارزان و مناسب و به روش تخمیر غوطه ور و به عنوان جدایه برتر برگزیده شد. در نهایت مراحل بهینه سازی درراستای افزایش میزان تولید اولیه آنزیمی ازاین سویه انجام شد.

مواد و روشها

مراحل جداسازی انحصاری جنس *باسیلوس*: نمونه برداری از خاک مزارع کشاورزی پنبه، بادام، به، کاج، جو و گندم انجام گرفت . به دلیل غنی بودن محتوای خاک این مزارع از گزیلان، انتظار می رفت که اکوسیستم مناسبی جهت زندگی باکتریهای تولید کننده آنزیم گزیلاناز باشند. جهت جداسازی جنس *باسیلوس* ازروش کشت, طی غنی سازی حرارتی (Heat enrichment culture technique) و بدنبال آن از روش کخ – روش پورپلیت (Koch-Pour Plate technique) استفاده گردید (۱۰، ۱۳ و ۱٤).

غربالگری اولیه جهت شناسایی مقدماتی جدایه های تولید کننده آنزیم گزیلاناز: کشت هر یک از سویه ها ی جداسازی شده به روش کشت خطی و نقطه ای بر روی محیط اختصاصی گزیلان آگار انجام شد و پس از گرماگذاری پلیت ها در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲٤ ساعت، نتایج بررسی شدند.

محیط گزیلان آگار(Xylan-Agar)، حاوی گزیلان خالص پوسته جو (تهیه شده از شرکت Fluka) با pH ۷ و ترکیبات زیر(گرم در لیتر) تهیه شد: ۵ Oat, ۵ Peptone, spelt xylan۱۵ ,MgSO4.7H2O ,Yeast extract ,۱۵ ,Agar۱ K2HPO4 .

در چنین محیط کشتی، میکروارگانیسمهای مولد آنزیم گزیلاناز, تولید هاله شفاف ناشی از تجزیه گزیلان Xylan (digestion halo zones) می نمایند. جهت رویت بهتر هاله ها، پلیتها با محلول ۰/۱ درصد کونگو قرمز(Congo Red) به مدت ۱۵ دقیقه رنگ آمیزی شده و سپس با محلول کلرید سدیم ۱ مولار چندین بار شسته شدند (٤).

غربالگری ثانویه : جدایه های انتخاب شده طی غربالگری اولیه که قطر هاله مناسبی ناشی از تجزیه گزیلان نشان داده

www.SID.ir

Archive of SID

بودند، به منظور غربال سویه های مولد گزیلاناز خارج سلولی, وارد مرحله غربالگری ثانویه شدند. دراین مرحله از روش چاهک گذاری تحت عنوان روش، Plate enzyme clearing assay test (PECAT) استفاده شد (۹، ۲۷ و ۳۱). در روش چاهک گذاری، سوپرناتانتهای شفاف از عصاره کشت ۲٤ ساعته سویه های رشد کرده در محیط گزیلان براث (Xylan broth), حاوی ترکیبات زیر:

Yeast extract 5 , Oat spelt Xylan ۵ , Peptone ۵ , K2HPO4 ۱MgSO4.7H2O 1 , و طی سانتریفوژ در دور rpm ۱۰۰۰۰ و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی گراد جداسازی شدند. سوپرناتانتهای شفاف (حاوی گزیلاناز خارج سلولی) درون چاهک های حفرشده در پلیتهای حاوی گزیلان آگار و بافر، اضافه شدند. گرماگذاری پلیتها در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ٤۸ ساعت انجام گرفت. قطر هاله های ظهور یافته در روش چاهک گذاری در نتیجه تولید آنزیم خارج سلولی و تجزیه گزیلان توسط هر سویه، جهت مقایسه کیفی و مقدماتی میزان تولید آنزیم گزیلانازخارج سلولی بین سویه ها، اندازه گیری شد.

روند انتخاب سویه برتر طی تعیین بهینه دما و pH فعالیت آنزیمی گزیلاناز بین سویه های غربال شده

با توجه به ارزش گزیلانازهایی با ویژگی بهینه دما و pH فعالیت آنزیمی بالا، مقایسه فعالیت آنزیمی گزیلاناز تولید شده بین سویه های جدا شده از نظر بهینه دما و pH فعالیت آنزیمی و میزان اولیه تولید آنزیمی هر سویه به طور جداگانه انجام شد. جهت تعیین بهینه دما و pH فعالیت آنزیمی, سویه هائی که طی مراحل غربالگری اولیه و ثانویه نتایج بالاتری در ظهور هاله شفاف ناشی از تولید آنزیم گزیلاناز را نشان دادند, به عنوان سویه های برتر انتخاب شده و مورد آزمایش قرار گرفتند. تعداد این سویه های برتر به ٦ سویه رسید, لذا تولید آنزیم توسط هر ٦ سویه به طور مجزا و در محیط پایه تولید آنزیم گزیلاناز انجام گرفت . سپس بهینه pH فعالیت آنزیمی برای گزیلاناز تولید شده ازهر سویه، در محدوده ای از pH بین pH ۷ الی ۱۰/٦ ارزیابی شد. همچنین بررسی بهینه دمای فعالیت آنزیمی هر سویه در pH بهینه ی تعیین شده و در محدوده ای از دما بین ۳۵ الی ٦۵ درجه سانتی گراد انجام گرفت. در نهایت با مقاسیه بهینه دما و اسیدیته فعالیت گزیلانازهای ٦ سویه برتر در دست بررسی، جدایه برتر انتخاب شد.

جداسازی آنزیم از محیط کشت تولید آنزیم: پس از اتمام فرآیند تولید آنزیم گزیلاناز توسط هر یک از ٦ سویه در محیط پایه تولید آنزیمی، به طور جداگانه نمونه گیری در شرایط استریل انجام گرفت. محتوای مایع کشت هر ارلن با انتقال به لوله های اپندورف در دور rpm ۱۰۰۰۰ و به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفوژ یخچال دار با دمای ٤ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شدند. سانتریفوژ باعث رسوب مواد جامد و معلق موجود در محیط کشت شده و درنتیجه از عصاره شفاف رویی به عنوان منبع آنزیم گزیلانازخارج سلولی و خام جهت سنجش فعالیت آنزیمی استفاده شد (۱٤).

سنجش فعالیت آنزیمی گزیلاناز: محلول سوبسترای ۰/۵ درصد از گزیلان خالص پوسته جو، در بافر مناسب ۰/۰۵ مولار درمحدوده ای ازpH تهیه وهموژنیزه شد. میزان ml ۰/۵ از سوبسترا به همراه ml ۰/۵ ازمحلول آنزیمی که با درصد مناسبی در بافر رقیق شده بودند (Appropriately diluted enzyme)، به مدت ۲۰ دقیقه گرماگذاری شدند.

استفاده از بافر سدیم فسفات برای pH معادل ۸ و۷ و استفاده از بافر Glycine-NaOH برای سه محدوده pH معادل ۱۰/٦ و ۱۰ , ۹ در تهیه سوبسترای هموژنیزه جهت رقیق سازی محلول آنزیمی برای هر pH ، تحت عنوان فاکتور رقت (Dilution factor) استفاده گردید. سنجش فعالیت آنزیمی به روش DNS stopping method که سنجش میزان آزاد شدن قندهای احیاء کننده است محاسبه

www.SID.ir

Archive of SID

گردید (۳ و ۲۱). میزان آزاد شدن قندهای احیاء کننده با روش اسپکتروفتومتری در طول موج ٥٤٠ نانومتر، اندازه گیری شد. از منحنی استاندارد قند د-گزیلوز جهت تعیین غلظت قندهای آزاد شده استفاده گردید. طبق تعریف IUPAC ، یک واحد از فعالیت آنزیمی برابر است با، مقداری از آنزیم که آزاد شدن یک میکرومول قند D- (xylose equivalent) را از سوبسترای به کار رفته در واکنش را در یک دقیقه انجام دهد (٤).

تعیین هویت سویه منتخب تولید کننده گزیلاناز: مراحل رنگ آمیزی گرم و اسپور(مالاشیت گرین) به همراه بررسیهای مورفولوژیکی و تستهای تشخیصی بیوشیمیایی جنس *Bacillus* طبق Bergey ´s manual of determinative bacteriology انجام شد (۱۹ و ۲۹). جهت اثبات تعیین هویت ژنتیکی جدایه برتر، ابتد ا جداسازی و تخلیص DNA نمونه با استفاده از کیت Roche انجام گرفت. سپس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، PCR آن انجام شد (۹ و ۱۷). پرایمرهای استفاده شده جهت تعیین هویت جدایه دارای ترادف زیر بودند:

f 3: 5'- AGAGTT TGATCCTGGC -3'

r 5: 5'- TACCTTGTTACGACTT -3'

در نهایت نمونه ها جهت تعیین ترادف ژنتیکی به شرکت SQ lab آلمان ارسال شده و نتیجه با استفاده از برنامه Blast مقایسه و تعیین هویت گردید.

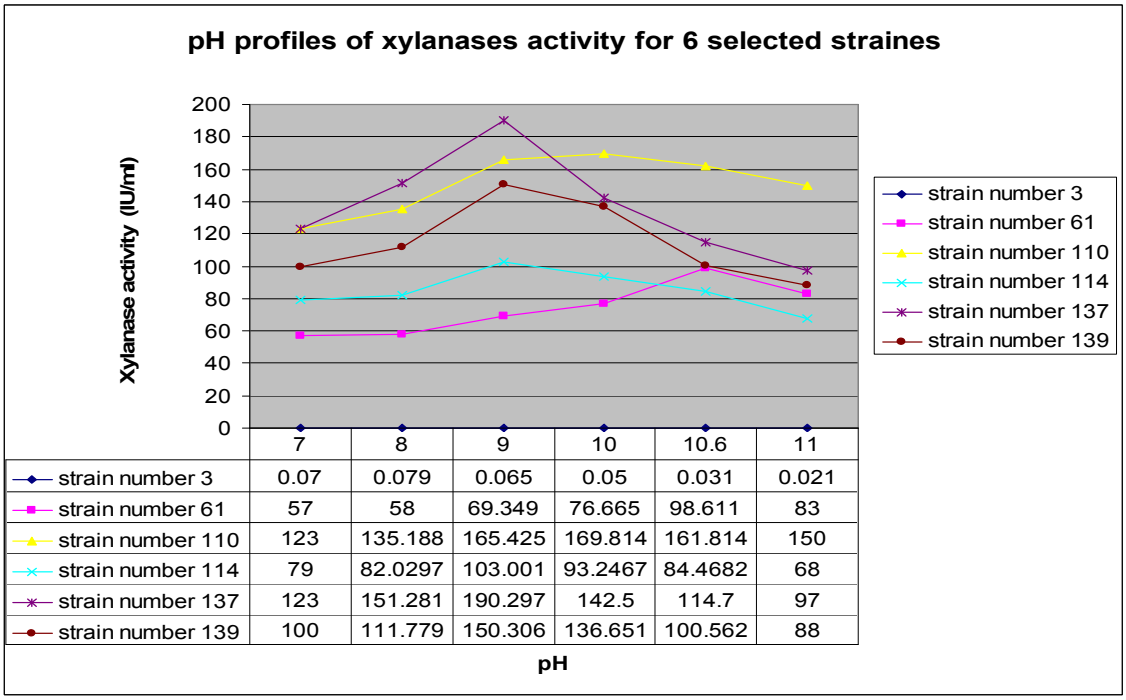
بهینه سازی: جهت تولید آنزیم گزیلاناز از محیطهای پایه تولید آنزیم با ترکیبات زیر (pH ۸) استفاده گردید (گرم در لیتر) : Peptone 5، Yeast extract 5, MgSO4.7H2O 1 ، K2HPO4 ۱ ، Agar ۱۵، انواع ضایعات لیگنوسلولزی کشاورزی از جمله: ملاس ، شلتوک برنج، باگاس نیشکر، سبوس گندم و سبوس جو با درصد حجمی (w/v) ۲ درصد، به عنوان منبع کربن و سوبسترای اصلی القاء کننده تولید آنزیم. شرایط تخمیر جهت تولید آنزیم در ٥٠ میلی لیتر از محیط کشت پایه تولید آنزیمی در ارلنهای با حجم ۲٥٠ میلی لیتر در ۳۷ درجه سانتی گراد و دور شیکر rpm ۱۸۰ انجام گرفت. میزان تولید آنزیم برای سویه منتخب، طی ۱۲۰ ساعت کشت سویه به روش تخمیر غوطه ور در محیط تولید پایه ای آنزیم گزیلاناز به همراه هر یک از ضایعات کشاورزی به عنوان منبع کربن گزیلان دار در فواصل زمانی (هر ٢٤ ساعت یکبار) بررسی و فعالیت آنزیمی سنجش شد. مراحل بهینه سازی به این ترتیب می باشد که ابتدا منابع کربن مختلفی به محیط کشت پایه اضافه شد و اثرهر یک از آنها به طور مجزا بر میزان تولید آنزیم بررسی شد. همچنین زمان حداکثرتولید آنزیم در حضور هر یک از منابع کربن بررسی شده و نه تنها بهینه منبع کربن تعیین شد بلکه زمان تولید حداکثر آنزیم (Time course of maximum enzyme production) در حضور منبع کربن بهینه نیز تعیین شد. پس از تعیین بهینه منبع کربن، مناسب ترین غلظت بهینه منبع کربن با درصد حجمی ۱۰ و ٥ , ۲ , ۱ درصد از تلقیح سوسپانسیون باکتریایی از محیط Pre-culture به محیط تولید آنزیم نیز بررسی و بهینه شد.

پیش تیمار ضایعات کشاورزی لیگنوسلولزی: جهت استفاده از ضایعات در شرایط تخمیر غوطه ور, پیش تیماربر روی این تفاله ها انجام شد. پس از تهیه تفاله ها از بازار محلی، تفاله مورد نظر را خرد کرده و به منظور به دست آوردن ذرات مناسب از لحاظ اندازه, از الکی با قطر منافذ ۱ mm عبور داده، جهت حذف اضافات قندی حاصل از فرآیندهای تهیه و جمع آوری نمونه ها, آنها را دو بار با آب مقطر ولرم شستشو داده و پس از خشک شدن تفاله ها در دمای ٥٠ درجه سانتی گراد، ذرات پودری مناسب حاصله (به قطر تقریبی ۱mm)، جهت استفاده درون محیط کشت طی فرآیند تخمیر و تولید آنزیم آماده شد. ضمن اینکه، اتوکلاو کردن محیط کشت تولید آنزیم، با توجه به حرارتی که به تفاله موجود در آن وارد می آید، به عنوان یک پیش تیمار، منجر به نرم شدن تفاله و خروج کامل عصاره گزیلان از تفاله ها گردید (۲۳ و ٢٤).

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی انواع منابع نیتروژنی با غلظت (w/v) ۱ درصد پارامتر بعدی در فرآیند بهینه سازی بود تا بهینه منبع نیتروژن جهت افزایش تولید آنزیم بدست آید. میزان هوادهی ، pH محیط کشت تولید ودمای فرآیند تخمیر، همچنین تأثیر افزودنیها از جمله فاکتورهای بعدی بودند که بهینه شدند. ضمن اعمال هر فاکتور جهت بهینه سازی, سنجش فعالیت آنزیمی در فواصل زمانی ۲٤ ساعته از محیط کشت تخمیری صورت گرفت و نتایج حاصله از میزان فعالیت آنزیم در حضور هر یک از فاکتورها مقایسه شدند.



	7	8	9	10	10.6	11
strain number 3	0.07	0.079	0.065	0.05	0.031	0.021
strain number 61	57	58	69.349	76.665	98.611	83
strain number 110	123	135.188	165.425	169.814	161.814	150
strain number 114	79	82.0297	103.001	93.2467	84.4682	68
strain number 137	123	151.281	190.297	142.5	114.7	97
strain number 139	100	111.779	150.306	136.651	100.562	88

نمودار۱- مقایسه بهینه pH فعالیت آنزیم گزیلاناز تولید شده بین ٦ جدایه برتر در شرایط دمائی ۳۷ درجه سانتی گراد

جدول۱- نتایج تستهای بیوشیمیائی *Bacillus mojavensis* بومی جدا سازی شده از خاک مزرعه پنبه

کاتالاز	+	حساسیت به پنیسیلین	+	تخمیر قند گزیلوز	+/ –
اکسیداز	+	همولیز روی بلاداگار	+	تخمیر قند مالتوز	+
اوره از	+	تست INM	+	تخمیر قند مانیتول	+
تجزیه سیترات	–	تولید لسیتیناز	–	تخمیر قند آرابینوز	–
تست اندول	–	تولید ژلاتیناز	+	تخمیر قند رافینوز	+/ –
تست حرکت	+	تولید آمیلاز	+	تخمیر قند تره هالوز	+
تولید سولفید هیدروژن	–	هیدرولیز کازئین	–	تخمیر قند لاکتوز	–
واکنش Vp / mR	–/–	تخمیر قند گلوکز	+	تخمیر قند ساکاروز	+

در آخرین مرحله از بهینه سازی و به منظور ارتقاء میزان تولید آنزیم در محیط کشت تولیدی، تأثیر برخی ترکیبات افزودنی (Additives) بررسی شد. ارلنها با گنجایش ۲۵۰ میلی لیتر که حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط کشت بهینه تولید آنزیمی بوند، طبق شرایط بهینه تهیه گردید. جهت بررسی تأثیرترکیبات افزودنی در میزان تولید آنزیم، از آنها به طور

www.SID.ir

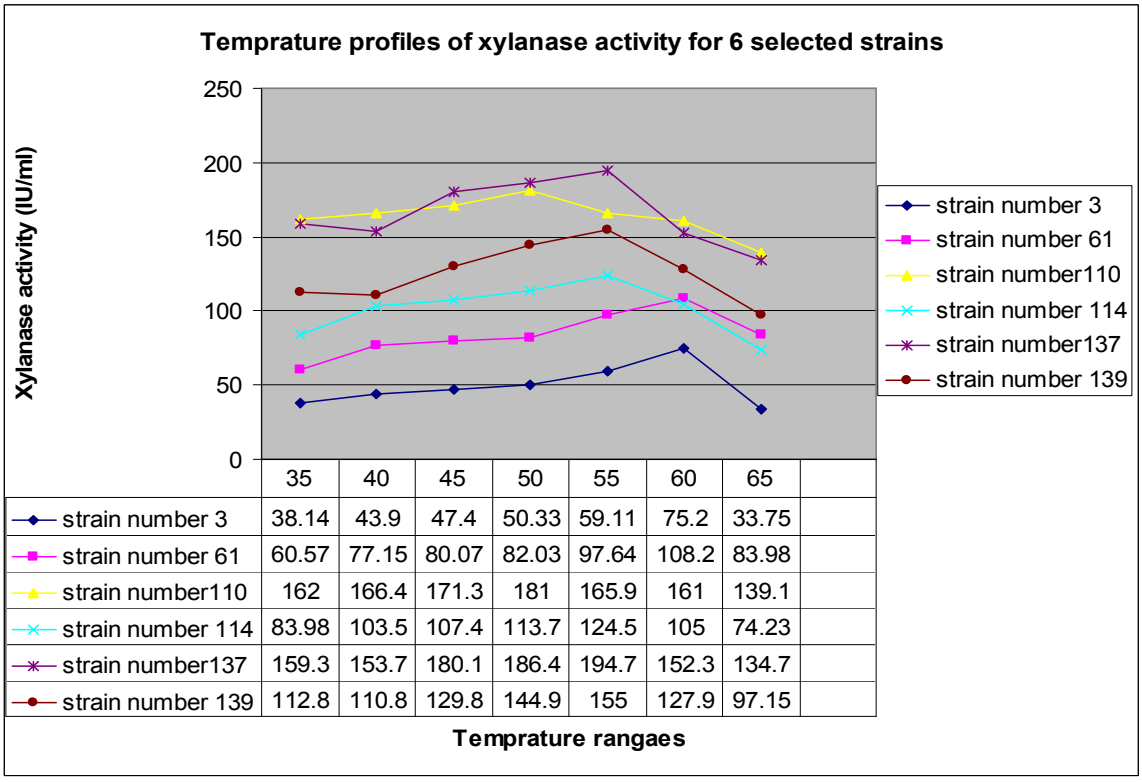
Archive of SID

جداگانه به محیطهای کشت اضافه و محیطها اتوکلاو شدند. ترکیبات افزوده بکار گرفته شده، از گروه قندها (منوساکارید و دی ساکارید)، (اسید های آمینه)، برخی سورفاکتنتها و نمکهای معدنی بودند از جمله:

KH2PO4 با غلظت (w/v) ۰/۱ درصد، قند گلوکز با غلظت (w/v) ۰/۱ درصد، قند سوکروز با غلظت (w/v) ۰/۱ درصد، قند گزیلوز با غلظت (w/v)۰/۱ درصد، روغن زیتون با غلظت ۰/۲ درصد، توئین ۸۰ با غلظت (w/v)۰/۱ درصد، سدیم دودسیل سولفات (SDS) با غلظت (w/v) ۰/۲ درصد، گلایسین با غلظت (w/v) ۰/۲ درصد و تأثیر افزودن Trace element solution با ترکیبات ذیل (pH 7) بررسی شدند (g/l):

Urea 0.3, CoCl2.2H2O 2 ، ZnSO4.7H2O 1.4 ، MnSO4.H2O 1.6 ، FeSO4.7H2O 5 ، CaCl2 0.3 and Tween 80 1.0.

pH تک تک محیطها بر روی ۸ تنظیم گردید (استفاده از محلول ۱۰ درصد کربنات سدیم قلیایی استریل شده جهت تنظیم pH). محیط کنترل فاقد هر گونه ترکیب افزوده به عنوان شاهد تهیه و میزان تولید آنزیمی مربوط به سایر ترکیبات با آن مقایسه شد.



	35	40	45	50	55	60	65
strain number 3	38.14	43.9	47.4	50.33	59.11	75.2	33.75
strain number 61	60.57	77.15	80.07	82.03	97.64	108.2	83.98
strain number110	162	166.4	171.3	181	165.9	161	139.1
strain number 114	83.98	103.5	107.4	113.7	124.5	105	74.23
strain number137	159.3	153.7	180.1	186.4	194.7	152.3	134.7
strain number 139	112.8	110.8	129.8	144.9	155	127.9	97.15

نمودار۲ – مقایسه بهینه دمای فعالیت آنزیم گزیلاناز تولید شده بین ٦ جدایه برتردر شرایط pH بهینه ی بدست آمده از نمودار بالا برای هر سویه

نتایج حاصله از مقایسه مقادیر فعالیت آنزیمی به دست آمده مربوط به هر ارلن نقش مثبت و منفی ترکیبات اضافه شده را به عنوان مهار کننده تولید آنزیم و یا القاء کننده و افزاینده تولید آنزیم گزیلاناز آشکار ساخت.

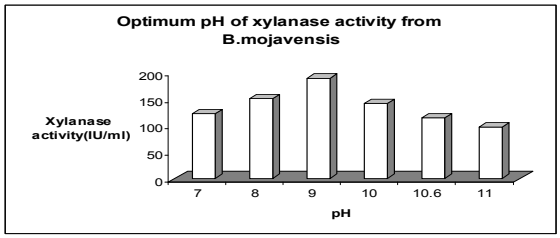
نتایج و بحث

نتیجه حاصل از جداسازی سویه و غربالگری تولید کنندگان منتخب آنزیمی: ۱۵۰ نمونه *باسیل* گرم مثبت اسپوردارهوازی از خاک مزارع جدا شدند. در غربالگری

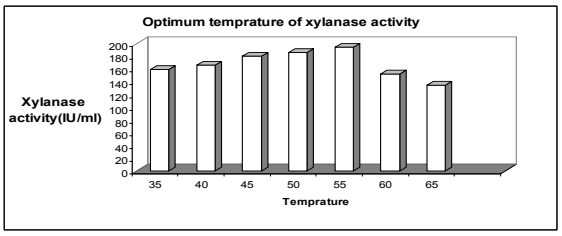
www.SID.ir

Archive of SID

اولیه، ٤٠ سویه با ظهور هاله های شفاف نارنجی رنگ حاصل از تجزیه گزیلان (Xylan digestion halos)، به عنوان تولید کنندگان گزیلاناز شناسایی شدند که از بین آنها، ٢٠ سویه با نشان دادن بزرگترین قطر هاله بین ٣٥mm- ٢٥ وارد مرحله غربال ثانویه شدند. درغربالگری ثانویه با اندازه گیری قطر هاله های شفاف ناشی از تولید آنزیم گزیلاناز ظاهر شده در اطراف چاهکها، تولید گزیلاناز خارج سلولی توسط سویه های برتر در این مرحله اثبات شد. ٦ سویه با نشان دادن بزرگترین قطر هاله تولید گزیلاناز خارج سلولی در اطراف چاهکها معادل ٣٢ الی ٣٥ میلیمتر، به عنوان ٦ سویه برتر تولید کنندگان گزیلاناز خارج سلولی در این مرحله برگزیده شدند. کاربرد صنعتی گزیلاناز به ویژه هنگامی مطرح خواهد بود که آنزیم با حداقل ممکنه (امتیاز آنزیم از لحاظ کمی) بتواند در pH بالا و دمای بالا فعالیت مناسبی نشان دهد (امتیاز کیفی آنزیم). لذا بهینه دما و pH فعالیت آنزیمی ٦ سویه غربال شده سنجیده و با هم مقایسه گشت (نمودار ٢ و ١). درنتیجه جدایه ای با بزرگترین قطر هاله تولید گزیلاناز خارج سلولی، معادل mm ٣٥ در غربالگری ثانویه و در نظر گرفتن ویژگی فعالیت آنزیمی آن(بالاتر بودن بهینه دما و pH فعالیت آنزیم گزیلاناز) در مقایسه با جدایه های دیگر، به عنوان سویه برتر و با نام موقتی جدایه ١٣٧، انتخاب گردید (نمودار ٤ و٣).



نمودار٣- بهینه pH فعالیت آنزیم گزیلاناز تولیدی از جدایه منتخب ١٣٧



نمودار٤- بهینه دمای فعالیت آنزیم گزیلاناز تولیدی از جدایه منتخب ١٣٧

نتایج به دست آمده ، pH ٩ و دمای ٥٥ درجه سانتی گراد را به عنوان بهینه pH و دمای فعالیت آنزیمی به ترتیب معادل ١٩٠/٢٩٧ IU/ml و ١٩٤ /٦٨ IU/ml برای تک سویه منتخب ١٣٧ مشخص ساخت (نمودار ٣و٤) .ویژگی که آنزیم را نسبت به انواع گزیلانازهای تولید شده از قارچها از جمله *Aspergillus niger* ANL 301 (٢٤) و *Penicillium janthinellum*(٢٥) و برخی باکتریها ازجمله *Bacillus subtilis*(٢٧) که بهینه دما و pH فعالیت آنزیمی پایینی دارند، برتر می سازد.

نتایج تعیین هویت جدایه ١٣٧ منتخب: نتایج مربوط به تعیین هویت سویه برتر و آنالیز توالی ١٦S rRNA، ١٠٠ درصد تشابه ژنتیکی سویه جداسازی شده از خاک مزرعه پنبه را با جنس و گونه *Bacillus mojavensis*, سویه NBRC15718 به اثبات رسانید.

بر اساس مطالعات انجام شده، تولید آنزیم گزیلاناز از *Bacillus mojavensis* به عنوان اولین گزارش در دنیا می باشد (٨). ازاین گونه به طور بالقوه در حیطه کنترل بیولوژیکی و به عنوان یک عامل ضد قارچی علیه قارچهای بیماری زای گیاهی نظیر *Fusarium* استفاده می شود و در حیطه تولید آنزیم تنها گزارشات اندکی از تولید آنزیم پروتئاز قلیایی از این باکتری به چشم می خورد (٥).

نتایج بهینه سازی: یکی از اهداف این پروژه تولید آنزیم در محیطی ساده و ارزان قیمت بود. لذا در ازای منبع گزیلان خالص به عنوان منبع کربن که هزینه تولید را بسیار بالا می برد، از انواع ضایعات لیگنوسلولزی ارزان قیمت به

www.SID.ir

Archive of SID

عنوان منبع کربن و سوبسترای ارزان و مناسب جهت تولید آنزیم استفاده شد و ضمن بررسی تأثیر هر یک از آنها بر میزان تولید آنزیم، مناسب ترین منبع کربن جهت تولید میزان بالایی از گزیلاناز تعیین و به منظور ادامه عملیات بهینه سازی به کار گرفته شد.

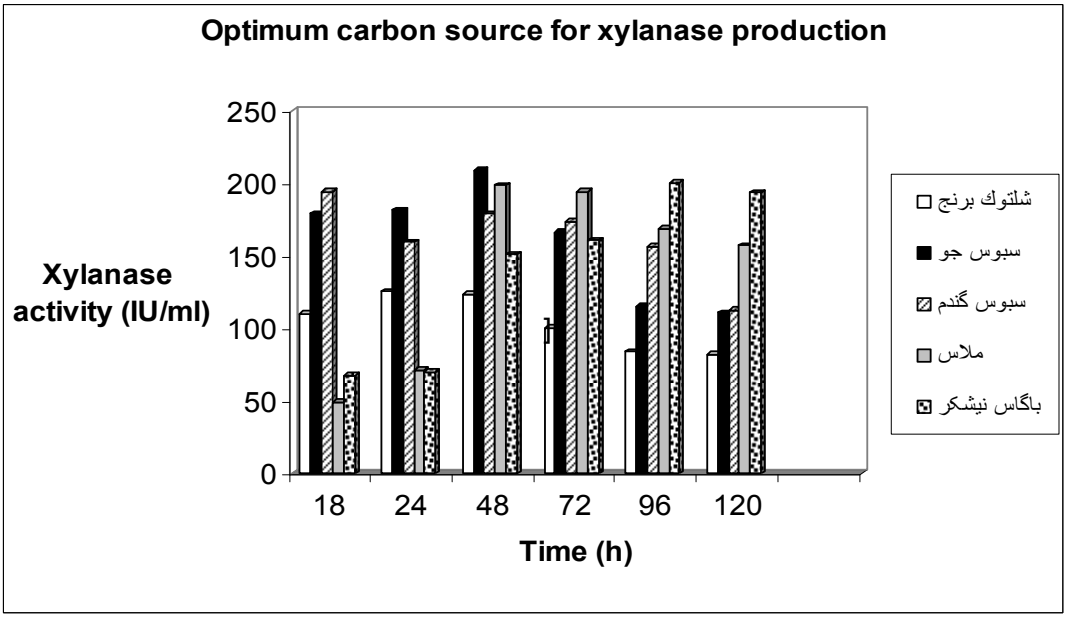
پس از بررسی تأثیر هر یک از منابع کربنی در فواصل ۲٤ ساعت یکبار و سنجش میزان فعالیت آنزیمی، به مدت ۱۲۰ ساعت، مشخص گردید که بیشترین میزان تولید آنزیم در حضور سبوس جو و در ساعت ٤۸ از فرآیند تخمیر با میزانی معادل IU/ml ۲۰۹/٤۱۵ می باشد (نمودار۵). در حضور منبع کربن بهینه سبوس جو، حتی تا ساعت ۹٦ و ۷۲ از فرآیند تخمیر میزان قابل قبولی از تولید آنزیم به ترتیب معادل IU/ml ۱۱۰ و ۱۱٤ حاصل می شود اما با ادامه تخمیر به ۱۲۰ ساعت میزان تولید آنزیم به شدت کاهش یافت که علت این امر می تواند به دلیل کاهش میزان مواد غذایی در دسترس برای باکتری و یا وقوع پدیده پروتئولیز باشد (۱۳). احتمالاً، وجود مقادیر بالای همی سلولز در سبوس جو به عنوان مهم ترین و اساسی ترین عامل در القای تولید میزان زیاد آنزیم گزیلاناز می باشد. در فرآیند برداشت جو، غشای خارجی دانه جو به صورت پوسته ای از قسمت های نشاسته ای آن جدا می شوند و این سبوسها که قسمتهای همی سلولزی دانه است آسیاب می شوند (۲۵). از طرفی توجه به مقادیر تولید آنزیمی در حضور سایر منابع کربنی به ویژه باگاس در ساعت ۹٦، ملاس در ساعت ٤۸ و سبوس گندم در ساعت ۱۸ از فرآیند تخمیر، نشان می دهد که باکتری در حضور این منابع کربنی میزان بسیار مناسبی ازگزیلاناز به ترتیب معادل IU/ml ۱۸۲ و ۱۹۸ ، ۲۰۰ را تولید می کند. این امر بیانگر این مطلب است که با اعمال فرآیند بهینه سازی در حضور سایر منابع کربنی نیز رسیدن به مقادیر بالای تولید آنزیمی امکان پذیر است. ضمن اینکه این وضعیت یک ویژگی مثبت برای سویه بشمار می رود چرا که توانایی تخمیر انواع ضایعات لیگنوسلولزی و تولید مقادیر مناسب گزیلاناز را داراست.

با انتخاب سبوس جو به عنوان منبع کربن بهینه، ضمن بررسی انجام شده و سنجش فعالیت آنزیمی، غلظت ۲۰ گرم در لیتراز سبوس جو در حضور تلقیحی از کشت ۱۸ ساعته از سوسپانسیون باکتریایی معادل (v/v) ۲ درصد به عنوان بهینه این دو عامل انتخاب شدند.

با مشاهده جهش در تولید گزیلاناز ازIU/ml ۲۵ در حضور عصاره مخمر و پپتون (منابع نیتروژنی محیط کنترل) به IU/ml ۲٤۹/۳۰۸ در حضور تریپتون و عصاره مخمر، این دو منبع به عنوان منابع بهینه نیتروژنی برگزیده شدند (جدول ۲).

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار۵- تأثیر انواع ضایعات لیگنوسلولزی به عنوان منبع کربنی در تولید آنزیم گزیلاناز و تعیین بهینه منبع کربن

جدول۲- تأثیر منابع نیتروژنی در تولید آنزیم گزیلاناز و تعیین بهینه منبع نیتروژنی

منابع نیتروژن آلی	فعالیت گزیلاناز (IU/ml)	منابع نیتروژن معدنی و ترکیبی از منابع نیتروژنی آلی و معدنی	فعالیت گزیلاناز (IU/ml)
Peptone	۱۱۸/۱۱۸	NH4NO3	۱٦۳/٤۷٤۲
Beef extract	157/134	(NH4)2SO4	۷٤/۷۱٤
Casein	۱٤۰/۰٦٥	NaNO3	۱۳۷/٦۲٦
Yeast extract	۱۹٦/۱٤۹٦	Y+NH4NO3	۱۹۳/۲۲۳
Y+Tryptone	**۲٤۹/۳۰۸**	Y+(NH4)2SO4	۹۱/۳۰٥
Y+ Beef extract	۲۱۳/۲۱۸.	Y+NaNO3	۱۸۰/۸۹
Control (Y+Peptone)	۲۰٥/٤۱٥	Y+KNO3	۱۸٥/٤۲۰٤

Y = Yeast extract

جدول۳- تعیین بهینه دمای انکوباسیون، بهینه pH و بهینه دور شیکر شرایط تخمیری در تولید آنزیم گزیلاناز

دمای بهینه انکوباسیون فرآیند تخمیر(^{o}C)	فعالیت گزیلاناز (IU/ml)	دور شیکر بهینه (rpm) جهت تولید آنزیم در فرآیند تخمیری	فعالیت گزیلاناز (IU/ml)	بهینهpH محیط تخمیری در تولید آنزیم	فعالیت گزیلاناز (IU/ml)

www.SID.ir

Archive of SID

٢١٥/٦٥٧	٦	١٨٩/٣٢٩	١٦٠	١٨٦/٣٩	٣٢
١٤٨/٣٣٢	٧	٢٥٢/٧٢١	١٨٠	**٢٩٠/٧٦**	**٣٧**
٢٥٢/٧٢١	٨	**٢٩٠/٧٦**	**٢٠٠**	٢٩٩/٣١	٤٢
١٨٢/٩٨١	٩	٢٢٠/٥٣٤	٢٢٠		
٤٩/٨٤٢	١٠				
٣٢/٢٨٥	١١				
–	–				

جدول٤- تأثیر انواع ترکیبات افزودنی جهت تولید آنزیم گزیلاناز

فعالیت گزیلاناز (IU/ml)	ترکیبات افزوده شده	فعالیت گزیلاناز (IU/ml)	ترکیبات افزوده شده
١٧٣/٢٢٨١	Olive oil+ KH_2PO_4	**٣٠٢/٤٦٦**	**KH_2PO_4**
٦٥/٩٣٥	SDS	٢٦٥/٤٥١	Tween 80
١٤/٧٢٨٢	Glucose	٢٥١/٢٥٨	Olive oil
١١/٨٠٢	Sucrose	٢٤٦/٨٦٩٦	Trace elemets solution
١١/٣١٤	D-xylose	١٨٦/٣٩٥٧	Glycine
–	–	٢٥٢/٧٢٢	Control: (Yeast extrac+Tryptone)

از آنجایی که این دو منبع چه از لحاظ در دسترس بودن و چه از نظر ترکیب غنی پروتئینی جهت تولید آنزیم توسط این سویه مناسب می باشند، شاید بتوان این گونه برآورد کرد که در مقایسه با سایر منابع نیتروژنی این دو ترکیب اغلب اسید های آمینه ای را که سویه جهت تولید گزیلاناز نیاز دارد را در اختیار آن قرار می دهند لذا سویه قادر است مستقیماً این اسید های آمینه را جذب کند و همین امر ضمن بالا بردن میزان تولید گزیلاناز، باعث برتر بودن این دو ترکیب نسبت به دیگر منابع نیتروژنی می شود (١٣).ترکیبی از عصاره ازنوع گوشت گوساله (Beef extract) به همراه عصاره مخمر معمولی (Yeast extract) نیز، با القاء میزان مناسبی از تولید آنزیم معادل 213/218 IU/ml، تأثیر مناسبی در بالا بردن تولید آنزیم نشان دادند (جدول ٢). لذا توجه به میزان تولید آنزیم گزیلاناز در جدول ٢، برتری منابع نیتروژن آلی را در مقایسه با منابع نیتروژنی معدنی در تولید گزیلاناز را توسط این جدایه آشکار می سازد. ضمن اینکه در حضور سولفات آمونیوم و نیترات آمونیوم به همراه عصاره مخمر، مهار شدیدی در میزان تولید گزیلاناز مشاهده شد که این امر احتمالاً به دلیل تأثیر مهارکنندگی یونهایی می باشد که سولفات آمونیوم در محیط آزاد کرده و منجر به کاهش میزان تولید آنزیم و یا کاهش نفوذپذیری غشاء سلولی جهت ترشح و خروج گزیلاناز تولید شده می باشد (١٣).

pH محیط تخمیری نقش بسزایی را در فرآیند های تولید آنزیم و انتقال ترکیبات مختلف از بین غشای سلولی دارد (١٣) و تولید گزیلاناز به شدت به pH محیط تخمیری وابسته است (٤). ضمن مطالعات قبلی نیز این گونه گزارش شده که pH قلیایی اغلب مناسب تولید گزیلانازهایی با منشاء باکتریایی است (٢٦) در حالی که pH اسیدی ٦-٤ ، اغلب مناسب تولید گزیلانازهائی با منشاء قارچی است (٢٨) که این اظهارات با نتایج برگرفته

www.SID.ir

Archive of SID

از بهینه سازی گزیلاناز توسط غازی و اخوان سپهی مطابقت دارد (جدول ۳).

pH بهینه محیط تخمیری در تولید گزیلاناز ۸ گزارش شد که این pH با بهینه pH رشد باکتری در محیط نوترین براث نیز مطابقت داشت. تولید گزیلاناز در محیط تخمیری از ٦ pH شروع و در ۸ pH حداکثر فعالیت گزیلاناز سنجیده شد در حالی که در ۱۱و ۱۰ pH تولید گزیلاناز اُفت شدیدی داشت (جدول ۳).

در ادامه مراحل بهینه سازی، بهینه دمای انکوباسیون فرآیند تخمیر، ۳۷ درجه سانتی گراد گزارش شد (جدول ۳). در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد بالاترین میزان تولید آنزیم گزیلاناز نسبت به دماهای مورد آزمایش ۳۲ درجه سانتی گراد و ٤۲ مشاهده شد، ضمن اینکه ۳۷ درجه سانتی گراد بهینه دمای رشد باکتری در محیط نوترین براث نیز می باشد.

در مورد تأثیر میزان هوادهی، دور شیکر rpm ۲۰۰ بهترین تأثیر را در بالا بردن میزان تولید گزیلاناز از *باسیلوس موجاوِنسیس* نشان داد. میزان هوادهی در فرآیند تخمیر با دور تکان دهی کمتر از rpm ۱۸۰ منجر به کاهش میزان تولید گزیلاناز شد. علت این امر را می توان به دلیل سخت تر شدن نگهداری میزان متعادلی از اکسیژن محلول مورد نیاز برای رشد سلولها به طور یکنواخت در محیط تخمیری دانست. همچنین با توجه به هوازی اختیاری بودن این *باسیلوس*، هوادهی مناسب نه تنها باعث مخلوط شدن و یکنواخت ترشدن انتشار مواد غذایی مورد نیاز و در دسترس برای سلولهای باکتری می باشد, بلکه باعث رسانیدن مقادیر مناسبی از اکسیژن به سلولهای در حال رشد می باشد (٤ و ۱۳). درهوادهی با دور بالاتر از ۲۰۰rpm کاهش در میزان تولید آنزیم مشاهده گشت.

بررسی تأثیر ترکیبات افزوده بر افزایش یا کاهش میزان تولید آنزیم در جدول ٤ ارائه شده، که در این بین تأثیر مثبت حضور ترکیب KH2PO4 و سپس توئین ۸۰ در بالا بردن فعالیت آنزیمی به چشم می خورد. تأثیر این ترکیبات در افزایش میزان فعالیت آنزیمی را می توان این گونه توجیه کرد که احتمالاً با افزایش نفوذ پذیری غشاء و در نتیجه ترشح سریع تر و بیشتر آنزیم باعث افزایش درتولید آنزیمی شده اند. گزارشاتی ازتأثیر فزاینده توئین ۸۰ طی بررسیهای گذشته به اثبات رسیده است (۱۳).

بررسی تأثیر روغن زیتون جهت عاملی در راستای افزایش نفوذپذیری غشاء سلولی و در نتیجه افزایش میزان آزاد شدن گزیلاناز، منجر به افزایش چشمگیری در بالا بردن تولید گزیلاناز نشد هر چند که تأثیر کاهنده بر میزان تولید نیز نداشت (جدول ٤).

افزودن سورفاکتنت سدیم دودسیل سولفات به محیط تخمیری نیز مهار شدید تولید آنزیم را در پی داشته که علت این امر را می توان به چند طریق توجیه کرد : تغییر شکل ساختار دوم و سوم پروتئین و یا اتصال SDS به جایگاه فعال آنزیم و یا تغییر ماهیت سوبسترا و کاهش در دسترس بودن مکانهای واکنش سوبسترا با آنزیم را می توان از علل کاهش فعالیت آنزیمی در حضور SDS برشمرد (۱۳). حضور قندها در ترکیبات محیط تخمیری، منجر به مهار بسیار شدید تولید گزیلاناز شد (جدول٤)، که علت این امر را می توان پدیده مهار کاتابولیک گزارش کرد (۱۳). در نهایت و با اعمال تمام عوامل بهینه سازی چه از لحاظ ترکیبات محیط کشت تخمیری و چه از لحاظ شرایط انجام فرآیند تخمیر، حدود 1/55 برابر افزایش در تولید گزیلاناز از میزان اولیه ۱۹٤/٦۸ IU/ml در شرایط غیر بهینه به میزانی معادل ۳۰۲/٤٦٦ IU/ml در شرایط بهینه تخمیر حاصل شد و لذا نتایج حاصله نقش بهینه سازی را به عنوان یکی از مهم ترین عوامل ممکن جهت افزایش میزان تولید آنزیم به اثبات می رساند.

موفقیت در تولید آنزیم با استفاده از سوبسترای ارزان قیمت و توانایی باکتری جهت استفاده از سبوس جو و تولید آنزیم گزیلاناز قلیایی (Alkaline active xylanase)

www.SID.ir

Archive of SID

این سویه را جهت تولید اقتصادی گزیلانازهای صنعتی نامزد می کند.

ضمن اینکه نشان می دهد، خاکهای کشاورزی به عنوان منابع ناب اکولوژیکی جهت جداسازی باکتریهای بالقوه با توانایی تولید آنزیمهای مناسب صنعت، می توانند مورد توجه بیشتری باشند.

منابع

1. Adsul MG, Ghule J E, Singh R, Shaikh H, Bastawde KB, Gokhale DV, and Varma Aj (2004) Polysaccharides from bagasse:application in cellulose and xylanase production.Carbohydrate Polym. 57: 67-72.
2. Anuradha P, Vijayalakshmi K, Prasanna ND, and Sridevi K (2007) Production and properties of alkaline xylanase from *Bacillus sp* isolated from sugarcane fields. Curr sci. 92 (9): 1283-1286.
3. Bailey MJM, Biely P, Poutanen k (1992) Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. J of Biotechnol. 23: 257-270.
4. Battan B, Sharma J, Dhiman SS, Khuhad RC (2007) Enhanced production of Cellulase-free thermostable xylanase by *Bacillus pumilus* ASH and its potential application in paper industry. Enzyme Microb. Technol. 4: 733-739.
5. Beg Q.KH, Sahai V, Gupta R (2003) Statistical media optimization and alkaline protease production from *Bacillus mojavensis* in a bioreactor. Process Biochem.39 (2):203-209.
6. Bocchini DA, Oliveira OMMF, Gomes E, Da Silva R (2005) Use of sugarcane bagasse and grass hydrolysates as carbon sources for xylanase production by *Bacillus citculanse* D1 in submerged fermentation. Process Biochem. 40:3653- 3659.
7. Bocchini DA, Oliveira OMMF, Gomes E, Da Silva R (2002) Optimization of xylanase production by *Bacillus citculanse* D1 in submerged fermentation using response surface methodology. Process Biochem. Vol. 38: 727-731.
8. Charles W, Bacon, Dorothy MH (2002) Endophytic and biological control potential of *Bacillus mojavensis* and related species. Science-Direct. 23(3): 274-284.
9. Chivero E T, Mutukumira A N, and Zvauya R (2001) Partial purification & characterization of a xylanase enzyme. Food Chemistry.72: 179-185.
10. Cordeiro CAM, Martins MLL, Luciano A B, and Da Silva R F (2002) Production and properties of xylanase from thermophilic *Bacillus sp.* Brazilian Archives Biol. Technol.45(4): 413-418.
11. Dobrev G T, Pishtiyski IG, Stanchev VS, and Mircheva R (2007) Optimization of nutrient medium containing agricultural wastes for xylanase production by *Aspergillus niger* BO3 using optimal composite experimental design. Bioresour.Technol. 98: 2671-2678.
12. Kar S, Mandal A, Mohapatra PK, Mondal KC, Pati BR (2006) Production of cellulose-free xylanase by Trichoderma reesei SAF3. Braz. J. Microbiol. 37: 462-464.
13. Kapoor M, Nair LM, Kuhad RC (2008) Cost-effective xylanase production from free and immobilized *Bacillus pumilus* strain MK001 and its application in saccharification of Prosopis juliflora. Biochem. Eng. J. 38: 88-97.
14. Khandepakar RDS, Bhosle NB (2006) Isolation, Purification and characterization of the Xylanase produced by *Arthrobacter sp*. MTCC5214 when grown in solid state fermentation. Enzyme Microb. Technol. 39: 732-742.
15. Khandeparkar RDS, Bhosle NB (2004) Purification and characterization of thermoalkalophilic xylanase isolated from the *Enterobacter sp* MTCC 5112.
16. Lama L, Calandrelli V, Gambacorta A, Nicolaus B (2004) Purification and characterization of thermostable xylanase and B-xylosidase by thermophilic bacterium *Bacillus thermantarcticus*, Research in Microbiology. 155: 283-289.
17. Lyon PF, Beffa T, Blanc M, Auling G, Aragno M (2000) Isolation and characterization of highly thermophilic xylanolytic *Thermus yhermophilus* strains from hot composts, Can. J. Microbiol. 46:1029-1035.
18. Mamo G, Hatti-Kaul R, Mattiasson B (2006) A thermostable alkaline active endo–B-1-4-xylanase from *Bacillus halodurans* S7: Purification and characterization.Enzyme Microb. Technol. 39: 1492-1498.

www.SID.ir

Archive of SID

19. Mandeva R, Dimitrov P, Emanuilova E (1998) General characterization of two xylanolitic Bacterial strains isolated from Bulgarian hot springs. Journal of culture collections. 2: 3-9.

20. Milagres AMF, Santos E, Piovan T, Roberto I C (2004) Production of xylanase by *Thermoascus aurantiacus* from sugar cane bagasse in an aerated growth fermentor. Process Biochem. 39: 1358-1391.

21 .Miller GL (1959) Measurement of reducing sugar by DNS reagent. Anal. Biochem. 31(3): 426-428.

22. Muthezhilan R, Jayalakshmi S, Ashok R (2007) Production and optimization of thermostable alkaline xylanase by *Penicillium oxalicum* in solid state fermentation. Afr. J. Microbiol. Res. Pp: 020-028.

23. Okafor UA, Emezue TN, Okochi V I, Onyegeme-Okerenta BM, and Nwodo-Chinedus S (2007) Xylanase production by *Penicillium chrysogenum* (PCL501)fermented on cellulosic wastes. Afr. J. Biochem. Res. 1(4): 048-053.

24. Okafor UA, Okochi V I, Onyegeme-Okerenta BM, and Nwodo-Chinedu S (2007) Xylanase production by *Aspergillus niger* ANL 301 using agro-wastes. Afr. J. Biotechnol. 6 (14): 1710-1714.

25. Oliveira LA, Porto Ana LF, Tambourgi EB (2006) Production of xylanase and protease by *Penicillium janthinellum* CRC 87M-115 from different agricultural wastes.Bioresource.Tech. 97: 862-867.

26. Poorna CA, Prema P (2006) Production and partial characterization of endoxylanase by *Bacillus pumilus* using agro industrial residues. Biochem. Eng. J. 33: 106-112.

27. Sa-Pereira P, Mesquita A, Duarte JC, Aires Barros Mr, Costa-Ferreira M (2002) Rapid production of thermostable Cellulase-free xylanase by a strain of *Bacillus subtilis* and its properties. Enzyme Microb. Technol.. 30: 924-933.

28. Simoes MLG, Tauk-Tornisielo SM (2005) Optimization of xylanase biosynthesis by *Aspergillus japonicus* isolated from a Caatinga area in the Brazilian state of Bahia. Afr. J. Biotechnol. 5(11): 1135-1141.

29. Sneath PHA et al. (1996) Bergey s manual of systematic Bacteriology. Williams and Wilkins. 8th edn, Vol.2. N.J.

30.Virupakshi S, Gireesh Babu K, Gaikwad SR, Niak GR (2005) Production of xylanolytic enzyme by a thermoalkaliphilic *Bacillus sp.* JB-99 in solid state fermentation. Process Biochem. 40: 431-435.

31. Yang VW, Zhuang Z, Elegir G, Jeffries TW (1995) Alkaline-active xylanase produced by an alkaliphilic *Bacillus sp* isolated from Kraft pulp. J. Indus. Microbiol. 15: 434-441.

www.SID.ir

Archive of SID

TheUsage of Agricultural Lignocellulosic Wastes in Cost - Effective Production and Optimization of Alkaline Xylanase, by an Indigenous Strain of *Bacillus Mojavensis* Through Submerged Fermentation

Akhavan Sepahy A.[1], Ghazi Sh.[1], Jafariagdam J. [1] and Akavan Sepahy M.[2]

[1] Microbiology Dept., Islamic Azad University-Basic Science, North Tehran Branch, Tehran, I.R. of IRAN

[2] Drug and Food Control Administration Institute, Tehran, I.R. of IRAN

Abstract

In this project, an appropriate indigenous *Bacillus* strain for xylanase production was isolated from cotton farm (Iran- kashan). According to evaluation by preliminary and secondary screening procedures, the competency of produced xylanase by this strain was confirmed. pH and temperature of enzyme activity in elevated pH and temperature ranges was assessed by measurement of released amounts of reducing sugar method. Optimum pH 9 and temperature of 55 ^{o}C for xylanase activity for this strain determined as optimum points. 16S rRNA sequencing analysis identified the isolate, as a strain of *Bacillus mojavensis*. Optimization step for screened *Bacillus mojavensis* strain, as a superior strain in the course of enzyme economical production process was performed in the presence of molasses, bagasse, wheat bran, oat husk and rice straw, and enzyme production level was evaluated. Finally, xylanase production level from 194/68 IU/ml, under non-optimized culture condition, increased to 302/466 IU/ml in optimized fermentation condition. Increase in cost- effective xylanase production by lignocellulosic wastes (Oat husk as optimum carbon source), strain ability to ferment such wastes, production of high level of xylanase, and optimum enzyme activity in alkaline pH and elevated temperature, all reveal the superiority of this *Bacillus* as a candidate for industrial-scale economical production of xylanase.

Keywords: *Bacillus mjavensis*, Oat husk, Xylanase

www.SID.ir