زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس
دوره 7، شماره 2، پاییز و زمستان 1395

جداسازی *Isoptericola variabilis* تحمل کننده حرارت و بهینه‌سازی تولید اگزوکلوکانازی آن

مریم عزیزی[1]، جعفر همت[2*]

1- کارشناس ارشد، رشته میکروبیولوژی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران
2- استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران

* تهران، صندوق پستی 33535111
j.hemmat@gmail.com
(دریافت مقاله: 94/4/2 پذیرش مقاله: 94/10/6)

چکیده- این تحقیق با هدف جداسازی و شناسایی باکتری‌های ترموفیل تولید کننده اگزوکلوکاناز از چشمه‌های آب گرم دهلران در جنوب غربی ایران واقع در استان ایلام انجام شد. پس از نمونه‌گیری، غنی‌سازی در محیط کشت حاوی سبوس برنج یا CMC (کربوکسی متیل سلولز) انجام گردید. شناسایی باکتری‌ها بر اساس خصوصیات آنها از جمله تعیین توالی ژن یونیورسال 16SrRNA و با استفاده از تکنیک PCR انجام شد. مقایسه توالی جدایه‌ها در پایگاه داده ژنومی بانک ژن، بیشترین قرابت را با گونه‌های *Pseudoj,hgdxanthomonas mexicana*، *Chelatococcus daeguensis*، *Promicromonospora* sp.، *Isoptericola variabilis* نشان دادند. در میان جدایه‌ها، سویه منتخب به عنوان *Isoptericola variabilis* sp. IDAH9. شناسایی و نام‌گذاری گردید. این سویه 1U/ml فعالیت اگزوگلوکانازی نشان داد. به منظور بهینه‌سازی تولید آنزیم سویه منتخب، اثر منابع کربن، نیتروژن، توئین 80، ساکاروز بر تولید آنزیم بررسی گردید. نتایج نشان داد، بیشترین فعالیت اگزوگلوکانازی در غلظت‌های 0/2% ساکاروز، 0/6% توئین 80 ، 12 گرم بر لیتر از منابع کربنی سبوس و کربوکسی متیل سلولز و 5/6 گرم بر لیتر آمونیوم سولفات حاصل شده است. آنزیم در دمای 50 °C پس از 24 ساعت 64% فعالیت خود را حفظ نمود. بنابراین *Isoptericola variabilis* sp. IDAH9. می‌تواند گزینه مناسبی برای تولید اگزوکلوکاناز مقاوم به حرارت از منابع کربنی ارزان قیمت باشد.

کلیدواژگان: ترموفیل‌ها، *Isoptericola* variabilis، اگزوگلوکاناز، سلولاز.

1- مقدمه

سلولز فراوانترین کربوهیدرات توده سلول گیاهی موجود در طبیعت است که برخلاف دیگر منابع، مثلا نفت، بطور پیوسته توسط فتوسنتز و رشد جایگزین می‌شود. سالانه حدود 10^{10}-10^{11} تن از این ماده به‌وسیله طبیعت تولید می‌شود [1]. مقادیر وسیعی از این ماده به‌عنوان ضایعات در فعالیت‌های صنایع غذایی، کشاورزی، همچنین ضایعات شهری و صنعتی تولید می‌شود. در طبیعت تجزیه کامل سلولز به گلوکز، یک فرایند کامل ناشی از بی شکل شدن ساختار کریستالی است که توسط آنزیم‌های سلولاز تولیدی توسط قارچ‌ها، باکتری‌ها و اکتینومیست‌ها انجام می‌گردد [2]. فرایند هیدرولیز سلولز نیازمند عملکرد مشارکتی سیستم سلولاز مشتمل بر سه نوع آنزیم اندو-

Archive of SID
www.SID.ir

بتا-1و4 گلوکاناز، اگزو- بتا-1و4 گلوکاناز (Fpase[1] یا CBH[2]) و بتا-گلوکوزیداز است [3]. اگزوگلوکاناز بر روی انتهای زنجیره سلولز عمل می‌کند و بتا سلوبیوز را به عنوان محصول نهایی آزاد می‌کند [4]. از جمله ویژگی‌های سلولازباکتریایی نسبت به انواع قارچی می‌توان به پایداری بیشتر، افزایش فعالیت ویژه و انتقال آسان‌تر توده اشاره کرد. از میان باکتری‌های تجزیه کننده سلولز باکتری‌های ترموفیل وهایپرترموفیل به واسطه مقاومت حرارتی کاتالیست‌هایشان شایان اهمیت هستند. باکتری‌های ترموفیل و ترموتولرانت میکروارگانیسم‌هایی هستند که رشد بهینه آنها در دمای بالاتر از 45 درجه سلسیوس می‌باشد. میکروارگانیسم‌های ترموفیل دارای پروتئین‌های غیر عادی و یا وضعیت فیزیکی و شیمیایی خاصی هستند که فعالیت آنها را در درجه حرارتی که پروتئین‌های سایر میکروب‌ها را تخریب می‌کند، بصورت کاملاً فعال حفظ می‌نماید [5]. آنزیم‌های مقاوم به حرارت به لحاظ دامنه کاربرد، پایداری در دماهای بالاتر، بهبود هیدرولیز سوبستراهای سلولزی و کاهش بروز آلودگی میکروبی حاصل از ارگانیسم‌های مزوفیل کارامدی بیشتر از انواع مزوفیل دارند [2]. تاکنون مطالعات زیای برای جداسازی باکتری‌های ترموفیل تولید کننده سلولاز انجام گرفته است [6-14]. هدف از این مطالعه جداسازی، شناسایی باکتری‌های تولید کننده اگزوکلوکاناز از چشمه‌های آب گرم دهلران، ارزیابی فعالیت اگزوگلوکانازی جدایه‌ها، انتخاب بهترین سویه تولید کننده اگزوکلوکاناز و بهینه‌سازی محیط کشت تولید آنزیم برای جدایه منتخب بوده است.

2- روش‌ها

2- 1- جداسازی باکتری‌های تولید کننده سلولاز

نمونه‌های آب و لجن از چشمه‌های آب گرم دهلران- ایلام- ایران جداسازی شدند. برای جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده سلولز در حدود 1 گرم لجن و 10 سی سی آب به محیط‌های غنی‌سازی 100 میلی‌لیتری در ارلن‌های 500 میلی‌لیتری اضافه شد. ارلن‌ها در شیکر انکوباتور 45 درجه سلسیوس با سرعت 150 دور بر دقیقه برای 7 روز نگهداری شدند. محیط کشت غنی‌سازی شامل: 0/025% آمونیوم سولفات 0/05% عصاره مخمر، 0/27% سدیم دی هیدروژن فسفات، 0/53% دی سدیم هیدروژن فسفات 0/02% منیزیم سولفات 7 آبه، 0/005% کلرید کلسیم بوده است [15]. محیط کشت با کربوکسی متیل سلولز و سبوس (1%) به عنوان تنها منبع کربن کامل شد. pH محیط قبل از اتوکلاو با سدیم هیدروکسید و هیدروژن کلرید 1 نرمال روی 7 تنظیم شد. بعد از 7 روز 4 میلی لیتر از هر ارلن به محیط تازه منتقل شد و برای 7 روز دیگر تحت شرایط مشابه توضیح داده شده از قبل انکوباسیون شد. این عمل 4 بار تکرار گردید. از کشت‌های نهایی رقت مناسب تهیه و بر روی پلیت‌های جامد حاوی محیط کشت غنی‌سازی گسترش داده شد. برای جداسازی باکتری‌های ترموفیل تولید کننده سلولاز پلیت‌ها در 50 درجه سلسیوس به مدت 72-48 ساعت گرمخانه گذاری شدند. برای اطمینان از خالص بودن جدایه‌ها، هر یک از کلنی‌های تک ایجاد شده به طور مکرر، بر روی پلیت‌های حاوی محیط کشت غنی‌سازی دارای آگار 1/5% بصورت خطی کشت داده شدند.

2- 2- بررسی فعالیت اگزوگلوکانازی و میزان رشد

سنجش فعالیت اگزوگلوکانازی (Fpase[3]) با استفاده از روش DNS (3و5- دی نیتروسالسیلیک اسید) و از طریق تعیین قند احیای آزاد شده و بکار بردن کاغذ واتمن شماره 1 به‌عنوان سوبسترا صورت گرفت. به منظور سنجش فعالیت اگزوگلوکانازی، جدایه‌ها از محیط کشت

1. Filter paper ase
2. Cellobiohydrolases: CBH
3. Filter paper assay

Archive of SID

www.SID.ir

جامد به محیط کشت مایع، با همان ترکیب محیط جداسازی منتقل شدند. پس از 48 ساعت به محیط کشت اصلی مایع به میزان 2% تلقیح شد. برای آزمایش‌های صاف شده محیط کشت تهیه شد و محیط کشت به مدت 15 دقیقه با سرعت 10000 دور بر دقیقه سانتریفوژ و مایع رویی برای سنجش فعالیت‌های آنزیمی به کار گرفته شد [16]. مخلوط سنجش آنزیم (2 میلی لیتر) شامل 1 میلی‌لیتر بافر فسفات (pH =7) بعلاوه 1 قطعه کاغذ واتمن 1×6 سانتی متری بود. واکنش به‌وسیله گرمخانه گذاری مخلوط در 50 درجه سلسیوس برای 1 ساعت تیمار شد. سپس واکنش با اضافه کردن محلول DNS (2 میلی لیتر) متوقف شد. نمونه‌ها با جوشاندن در 100 درجه سلسیوس برای 10 دقیقه تیمار شدند و پس از افزودن 1 میلی لیتر محلول تارتارات سدیم- پتاسیم، 5 میلی لیتر آب سرد به منظور ثبات رنگ افزوده شد. در پایان جذب مخلوط‌های واکنش در طول موج 540 nm اندازه گیری شد و با استفاده از یک منحنی قند استاندارد تهیه شده با استفاده از غلظت‌های مختلف گلوکز (Merck) به عنوان استاندارد، به غلظت‌های قند احیا مبدل شد [۱۷،۱۶،۱۱]. برای تعیین فعالیت آنزیمی در سنجش کیفی و با استفاده از تست کنگورد، محیط غنی‌سازی با میزان 0/1% CMC به همراه 0/8% آگارز مورد استفاده قرار گرفت [16]. تمام آزمایش‌ها حداقل سه بار تکرار شده‌اند.

2- 3- شناسایی باکتری‌های جدا شده

باکتری‌های جداشده با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم از نظر واکنش گرم شناسایی شدند. برای شناسایی مولکولی باکتری‌های تولیدکننده سلولاز، DNA ژنومی جدایه‌ها با استفاده از کیت استخراج DNA فرمنتاز استخراج گردید. DNA استخراجی به عنوان الگو ژن 16SrRNA با به کار بردن پرایمرهای یونیورسال:

F-16s
(5CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCC TGGCTCAG) و:

R-16S
(5CCCGGGATCCAAGCTTACGGTTACCTTGT TACGACTT) برای انجام PCR مورد استفاده قرار گرفت. مخلوط واکنش (30 میکرولیتر) شامل: هر پرایمر (10 میکرولیتر) در غلظت 0/75 میکرولیتر، DNA الگو در غلظت 1/5 میکرولیتر، Mastermix (1X) در غلظت 15 میکرولیتر و 12 میکرولیتر آب مقطر استریل بود. برنامه PCR برای تکثیر DNA به این صورت بود: 95 °C، 45 ثانیه، 35 سیکل 95 °C، 40 ثانیه، 65 °C، 45 ثانیه، 72 °C، 45 ثانیه، 1سیکل 72 °C، 10 دقیقه. محصول PCR به طول 1000bp توسط شرکت بایونیر کره جنوبی توالی یابی شد. نتیجه تعیین توالی در پایگاه داده‌های ژنومی NCBI با استفاده از برنامه BLAST مورد بررسی قرار گرفت.

2- 4- بهینه‌سازی محیط کشت تولید آنزیم

2-4-1- اثر القاگر بر تولید آنزیم

برای مطالعه اثر القاگر روی تولید آنزیم سلولاز جدایه، در شرایط یکسان به میزان 0/2% و0/1% وزنی- حجمی قند ساکاروز به محیط کشت افزوده و در پایان تولید سلولاز ارزیابی شد. محیط کشت کنترل فاقد ساکارز بود.

2-4-2- اثر توئین 80 بر تولید آنزیم

از بین سورفکتانت‌ها، توئین 80 (Tween80) با غلظت‌های 0/1 %، 0/2%، 0/4% و 0/6% به محیط کشت افزوده و اثر آن بر تولید آنزیم بررسی شد.

2-4-3- اثر منابع کربنی محیط کشت روی تولید آنزیم

به منظور بررسی اثر منبع کربن بر تولید آنزیم، از محیط کشت اولیه چند ارلن یکسان محیط کشت تهیه شد و در آنها از غلظت‌های 1/5 گرم بر لیتر، 3 گرم بر لیتر، 6 گرم بر لیتر، 9 گرم بر لیتر، 12 گرم بر لیتر کربوکسی متیل سلولز یا سبوس برنج به‌عنوان منابع کربن استفاده گردید.

Archive of SID

www.SID.ir

در پایان آزمایش میزان فعالیت اگزوگلوکانازی در محلول رویی اندازه‌گیری شد.

2-4-4- اثرمنبع نیتروژن بر تولید آنزیم

به منظور بررسی اثر منبع **نیتروژن** بر تولید آنزیم، مقادیر متفاوت از سولفات آمونیوم، 1/4 گرم بر لیتر، 2/8 گرم بر لیتر، 5/6 گرم بر لیتر، 8/4 گرم بر لیتر، 2/ 11 گرم بر لیتر، 16/8 گرم بر لیتر محیط مورد استفاده قرارگرفت. سپس میزان تولید اگزوگلوکانازآن اندازه‌گیری شد.

2-4-5- ارزیابی پایداری حرارتی فعالیت آنزیمی

به منظور سنجش میزان پایداری حرارتی فعالیت اگزوگلوکانازی، محلول رویی محیط کشت حاوی جدایه منتخب در بن ماری 50 درجه سلسیوس قرار داده شد و در فواصل زمانی 2 ساعته، 4 ساعته، 24 ساعته از محلول نمونه‌گیری شد. پس از زمان‌های طی شده میزان فعالیت اگزوگلوکانازی اندازه‌گیری گردید. کنترل انجام آزمایش، نمونه قبل از قرارگرفتن در بن ماری بود.

2-4-6- تحلیل آماری

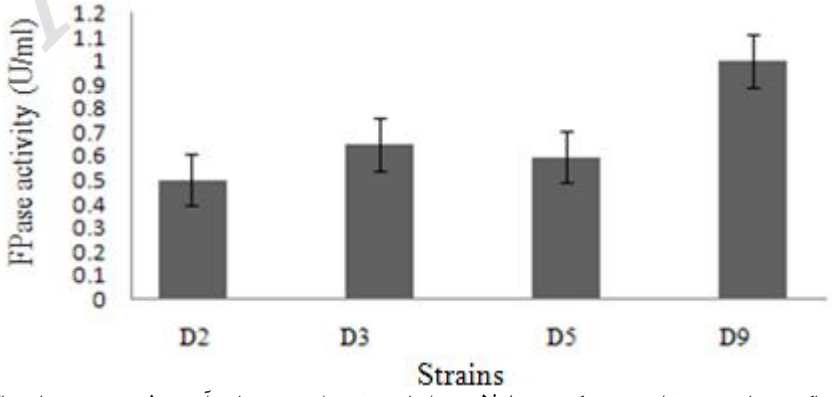
همه آزمایش‌ها حداقل سه بار تکرار شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون مقایسه زوجی و Anova انجام شد. داده‌ها براساس میانگین‌های انحراف معیار (±SD) بیان شدند. ارور بارها با استفاده از میانگین‌ها و انحراف معیارها به‌وسیله نرم‌افزار اکسل محاسبه شدند. زمانی که P value $P<0/05$ ، $P<0/01$ و $P<0/001$ تفاوت معنادار در نظر گرفته شد.

3- نتایج و بحث

3-1- جداسازی و شناسایی باکتری‌های ترموفیل تجزیه کننده سلولز

در میان کلنی‌های جدا شده از نمونه‌های لجن و آب چشمه‌های آب گرم دهلران 4 جدایه D_2، D_3، D_5 و D_9 به طور واضح رشد کرده و توانایی ایجادهاله شفاف حاصل از فعالیت سلولازی روی پلیت‌های کنگورد طی انکوباسیون را نشان دادند. اما این جدایه‌های باکتریایی بر اساس میزان کمی فعالیت سلولازی غربال‌گری شدند. بر این اساس از میان 4 جدایه مذکور، جدایه D_9 میزان اگزوگلوکانازی (FPase) بالاتری نشان داد (شکل 1).

توالی ژنی 16SrRNA، 4 جدایه مذکور در NCBI، BLAST گردید. شناسایی مولکولی نشان داد جدایه‌های D2، D3، D_5 و D9 (بر اساس درصد مشابهت و به ترتیب) متعلق به گونه‌های *Pseudoxanthomonas mexicana* (%99)، *Chelatococcus daeguensis* (%99)، *Promicromonospora sp.* (%98) و *Isoptericola sp.* (%99) می‌باشند.



شکل 1 غربالگری باکتری‌های ترموفیل تجزیه کننده سلولاز جداسازی شده از نمونه‌های آب و لجن. سویه‌های باکتریایی تولید کننده سلولاز براساس فعالیت اگزوگلوکانازی موجود در محلول رویی محیط کشت مقایسه شدند ($P^* < 0.01$).

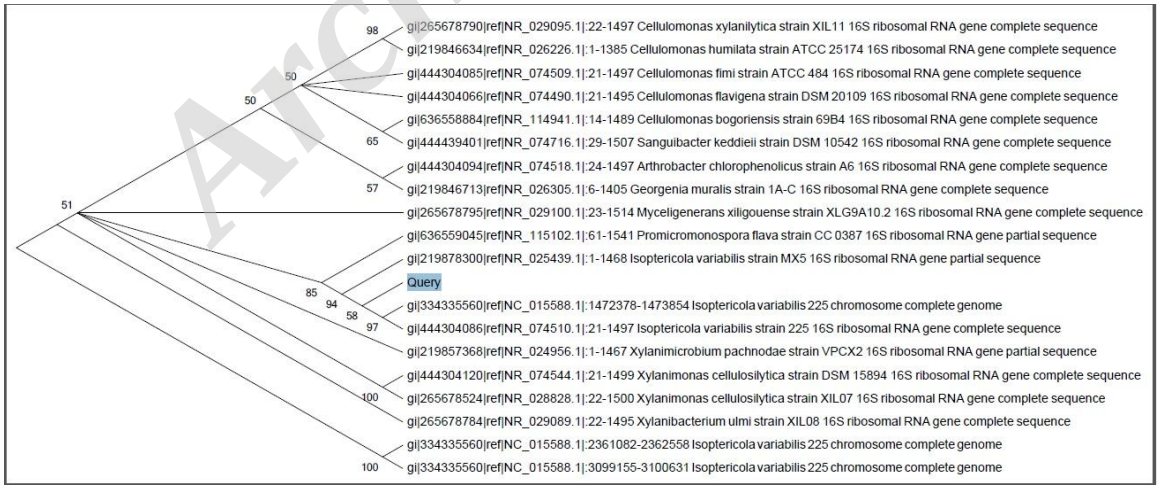
Archive of SID
www.SID.ir

بر اساس نتایج ارزیابی فعالیت اگزوگلوکانازی از بین گونه‌های جداشده، *Isoptericola sp* به واسطه مقدار بیشتر فعالیت انتخاب و مطالعه در مورد آن ادامه یافت. بر اساس نتایج توالی سویه منتخب D9 به عنوان *Isoptericola variabilis sp.* IDAH9. شناسایی و در بانک اطلاعات ژن به شماره KM279624 ثبت گردید. شکل 2 خاستگاه و ارتباط فیلوژنی جدایه منتخب را با باکتری‌های دیگر نشان می‌دهد. **که بعد از** *Isoptericola variabilis* 225 **نزدیک‌ترین سویه به آن** *Promicromonospora citrea* **است.**

از جمله محیط‌های طبیعی و زیستگاه باکتری‌های ترموفیل چشمه‌های آبگرم می‌باشد. گزارشات متعددی در زمینه جداسازی و بررسی فعالیت سلولازی میکروارگانیسم‌های حرارت دوست یا تحمل کننده حرارت از چشمه‌های آب گرم صورت گرفته است [9،12،18-22]. طی مطالعه‌ای که در سال 2006 انجام شده برخی گونه‌های *Pseudoxanthomonas*، از مکان‌های مختلف از جمله چشمه‌های آب گرم جداسازی شده‌اند که قادر به تجزیه سلولز و قادر به رشد در 50 درجه سلسیوس بوده‌اند [23]. در مطالعه دیگری که توسط Yoon و همکارانش در سال 2008 صورت پذیرفت، سویه *Chelatococcus daeguensis- sp. nov.* , از فاضلاب کارگاه نساجی جداسازی گردید [24]. اما گزارشی مبنی بر وجود *Isoptericola variabilis* در چشمه‌های آبگرم و فعالیت سلولازی آن منتشر نشده است.

2-3- توسعه فعالیت سویه *Isoptericola variabilis sp. IDAH9*

پس از انتخاب سویه مناسب به منظور توسعه فعالیت جدایه، محیط کشت تولید آنزیم بهینه‌سازی شد. بدین منظور اثر منابع کربن، نیتروژن، توئین، ساکاروز بر روی محیط که برای تولید آنزیم مورد استفاده قرار گرفته شده بود، بررسی گردید. مقادیر متفاوتی از منبع کربن محیط یعنی سبوس برنج و CMC، آمونیوم سولفات، توئین 80 و ساکاروز که به‌عنوان القاگر تولید آنزیم می‌باشد، به محیط *Isoptericola variabilis sp. IDAH9* افزوده شد و میزان تولید آنزیم اگزوگلوکاناز در هر یک از محیط‌ها ارزیابی گردید.



شکل 2 درخت فیلوژنتیک ارتباط بین توالی ژنی 16S rDNA*Isoptericola variabilis strain (IDAH9)* را با توالی‌های مرتبط در GenBank نشان داده است. درخت با استفاده از برنامه MEGA 6 و الگوریتم neighbor-joining algorithm با 1000 بوت استرپ ساخته شد.

Archive of SID

www.SID.ir

3-3- اثرمقادیر مختلف القاگر بر تولید آنزیم

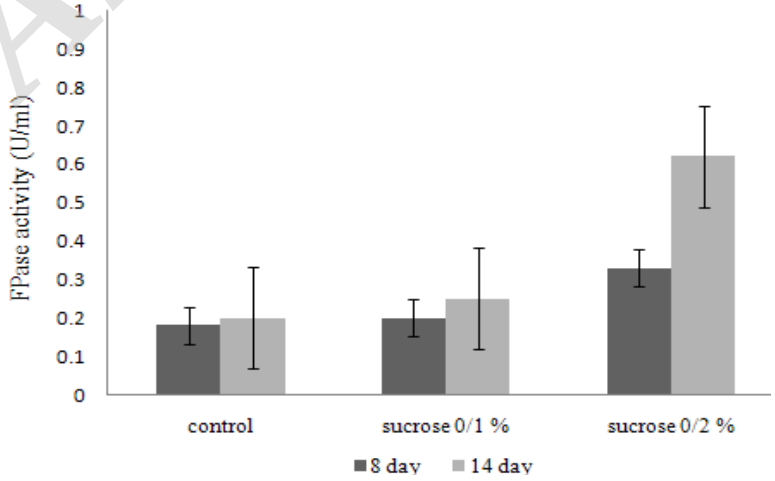
بر اساس گزارشات برخی مواد می‌توانند تولید آنزیم را القاء کنند. از جمله برخی قندها در حضور سلولز، می‌توانند چنین نقشی را ایفا کنند [16]. در بررسی انجام شده، اثر حضور غلظت‌های 0/2% و 0/1% ساکاروز در محیط بر تولید اگزوگلوکاناز *Isoptericola variabilis sp. IDAH9* مورد ارزیابی قرار گرفت. مشاهدات نشان داد که در میزان 0/2 % وزنی ساکاروز میزان اگزوگلوکاناز به‌ترتیب در روز هشتم به 0/33 U/ml و در روز چهاردهم به 0/62U/ml افزایش یافت (شکل 3). بنابراین نتیجه گرفته شد که افزایش القاگر در محیط باعث افزایش اگزوگلوکاناز می‌شود. همچنین نتایج نشان داد که در روز چهاردهم تولید آنزیم بیشتر از روز هشتم می‌باشد. در مطالعه‌ای که Liang در سال 2010 انجام داد ملاحظه کرد که کربوهیدرات‌های مختلف می‌توانند در طیف‌های گوناگونی ترشح سلولاز را القا کنند. سلوبیوز، گلوکز، لاکتوز و ساکاروز نسبت به سلولز اثر القایی بیشتری نشان داده‌اند و سلولازهای ترشح شده از *Anoxybacillus sp. 527* به‌وسیله سلوبیوز بهتر القا شده است [25].

4-3- اثر مقادیر مختلف توئین 80 برتولید آنزیم

اثر 4 غلظت 0/1 %، 0/2%، 0/4%، 0/6% توئین در محیطی که میزان CMC موجود در آن 3 گرم بر لیتر بود، بر روی تولید آنزیم اگزوگلوکاناز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده از سنجش کیفی بیانگر شفافیت بیشتر جدایه منتخب در غلظت 0/6% و تولید بیشتر آنزیم در این غلظت بود. همچنین نتایج نشان داد که غلظت 0/6% بهترین اثر افزایشی را روی تولید آنزیم دارد (شکل 4). میزان فعالیت اگزوکلوکانازی در این غلظت 1/008U/ml بوده است. تولید آنزیم در غلظت‌های مختلف توئین80 در روز چهاردهم بیشتر از روز هشتم بود. افزایش فعالیت آنزیمی در حضور سورفکتانهای غیر یونی، به پدیدار شدن گروه‌های SH در آنزیم باکتریایی و سپس افزایش واکنش داخلی بین آنزیم و سوبسترا نسبت داده شده است. از طرفی توئین80 تولید سلولاز را در *Nectria Catalinensis* بالا برده است [25].

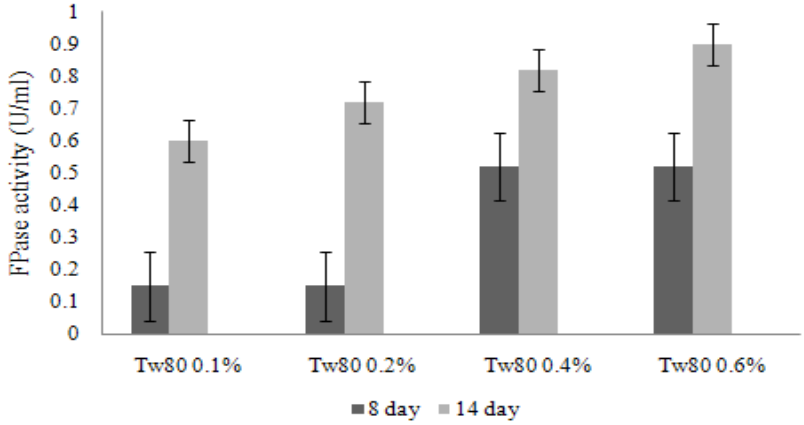
5-3- اثر مقادیر متفاوت منابع کربنی روی تولید آنزیم

از آنجا که هدف نهایی تحقیق، استفاده از منابع کربنی مختلف برای تولید آنزیم بود، اثر 2 منبع کربنی کربوکسی متیل سلولز و سبوس بر تولید آنزیم *Isoptericola variabilis sp. IDAH9* بررسی شد. میزان اگزوگلوکاناز جدایه منتخب، در محیط‌هایی که دارای ترکیبات پایه یکسان با میزان 1/5g/l، 3 g/l، 6g/l، 9 g/l، 12g/l از منابع کربنی سبوس و کربوکسی متیل سلولز بودند، سنجش گردید.



شکل 3 اثر القاگر بر تولید اگزوگلوکاناز (FPase) ($P^* < 0.05$)

Archive of SID
www.SID.ir



شکل 4 اثر Tween 80 (Tw80) بر تولید اگزوگلوکاناز (P* < 0.05)

بر اساس نتایج حاصل، بیشترین فعالیت اگزوگلوکانازی در غلظت 12 گرم بر لیتر کربوکسی متیل سلولز و سبوس در روز چهاردهم مشاهده شد. ضمن آنکه در محیط حاوی کربوکسی متیل سلولز فعالیت بیشتری نسبت به محیط دارای سبوس مشاهده گردید (شکل‌های 5 و 6). در تحقیقی، Assareh و همکارانش یافتند که سبوس گندم و جو بهترین سوبستراها برای تولید سلولاز به‌وسیله *Geobacillus.sp. T1* جداسازی شده از خاک معرفی شده است [13].

3-6- اثر مقادیر مختلف منبع نیتروژن بر تولید آنزیم

همان‌طور که در شکل 7 نشان داده شده است، *Isoptericola variabilis sp. IDAH9* بیشترین میزان تولید آنزیم را در غلظت 5/6g/l آمونیوم سولفات داشته است و میزان تولید اگزوگلوکاناز در روز چهاردهم در این غلظت از آمونیوم به 0/71U/ml رسیده است. Acharya و همکاران گزارش کردند که ترکیبات نیتروژنی آلی و غیر آلی که به‌عنوان منبع نیتروژن برای تولید سلولاز در *Aneuribacillus thermoaerophilus WBS2* جداسازی شده از چشمه‌های آب گرم استفاده نموده‌اند [14]. Spiridonov و Wilson ترکیبات NH4 را به عنوان منابع نیتروژنی مطلوبی برای سنتز سلولاز گزارش کرده‌اند [26].

3-7- ارزیابی پایداری حرارتی فعالیت آنزیمی *Isoptericola variabilis sp. IDAH9*

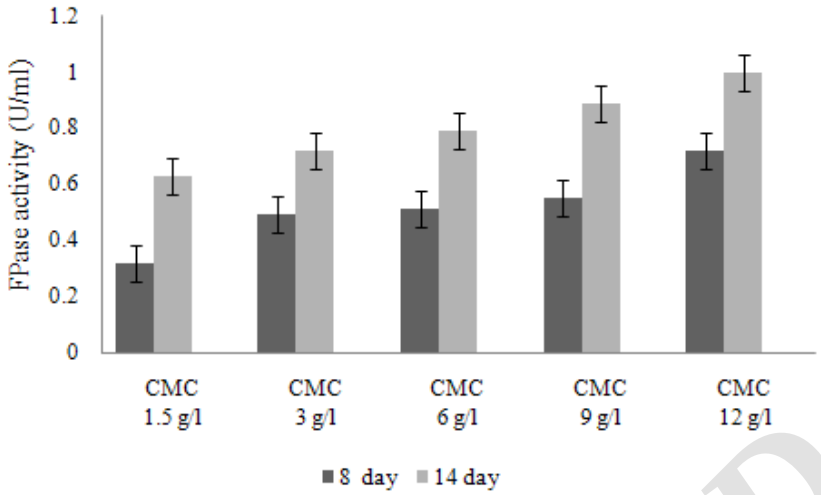
نتایج نشان داد که در *Isoptericola variabilis sp. IDAH9* در دمای 50 درجه سلسیوس پس از 2 ساعت همچنان 77% از فعالیت اگزوگلوکانازی خود را حفظ خواهد کرد. همچنین پس از گرما گذاری محلول رویی جدایه منتخب در مدت 24 ساعت حدود 64% فعالیت اگزوگلوکانازی باقی خواهد ماند (شکل 8). بر اساس مطالعات دیگر، چندین سویه مقاوم حرارت دیگر مانند *Paenibacillus, Brevibacillus, Thermobifida* و *Cellulomonas sp.* تولید سلولاز پایدار در حرارت را نشان داده‌اند، اگرچه سلولازهایشان فعالیت را برای مدت طولانی در دماهای بالای بیش از 60 درجه سلسیوس حفظ نکرده‌اند [11].

3-8- بررسی رابطه تولید آنزیم اگزوگلوکاناز طی زمان

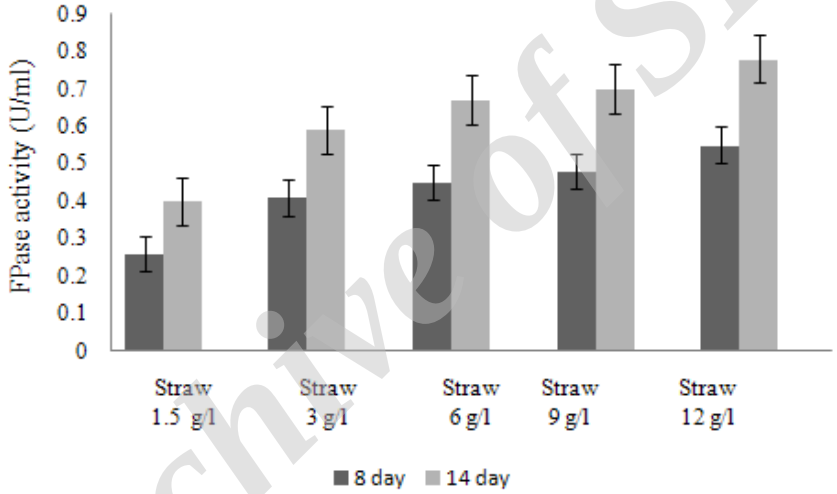
بررسی روند تولید آنزیم اگزوگلوکاناز *Isoptericola variabilis sp. IDAH9* طی زمان، نشان داد که جدایه در پایان روز اول حدود 0/68U/ml فعالیت اگزوگلوکانازی دارد. سپس میزان فعالیت‌ها با یک روند افزایشی تا روز چهاردهم پیش رفته است. در این حالت فعالیت اگزوگلوکوناز حدود 1/19U/ml است و سپس کاهش یافت (شکل 9).

Archive of SID

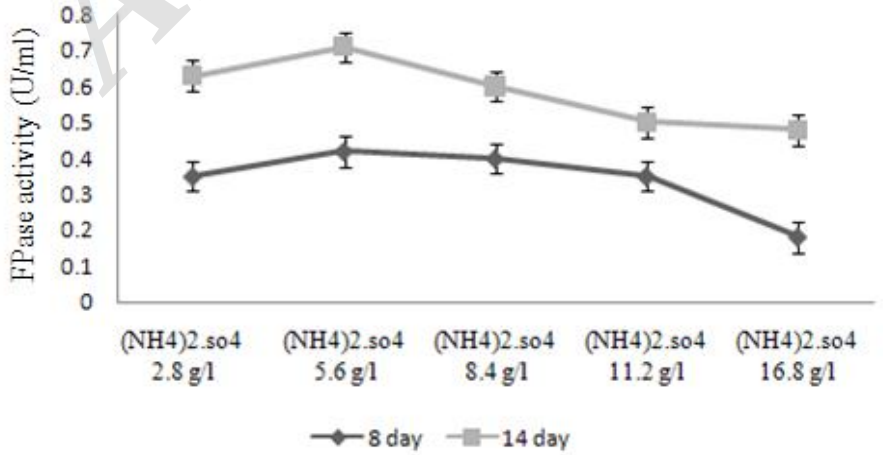
www.SID.ir



شکل 5 اثر غلظت‌های مختلف کربوکسی متیل سلولز به عنوان منبع کربن بر تولید اگزوگلوکاناز (P* < 0.05)



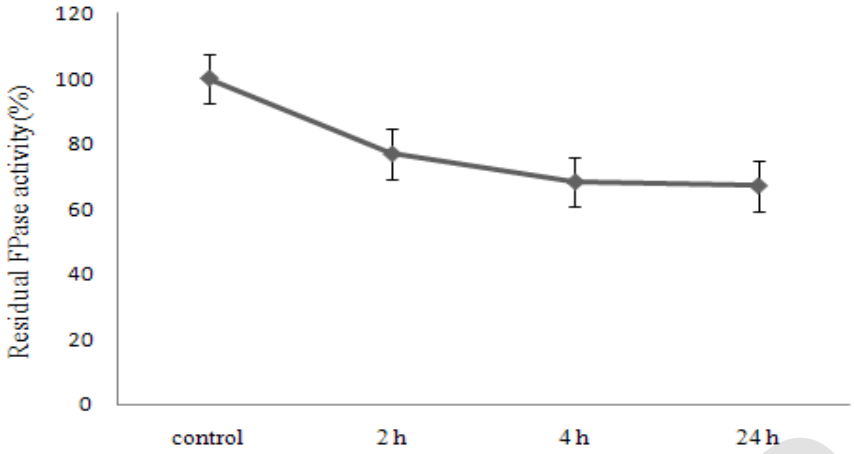
شکل 6 اثر غلظت‌های مختلف سبوس به عنوان منبع کربن بر تولید اگزوگلوکاناز (P* < 0.02)



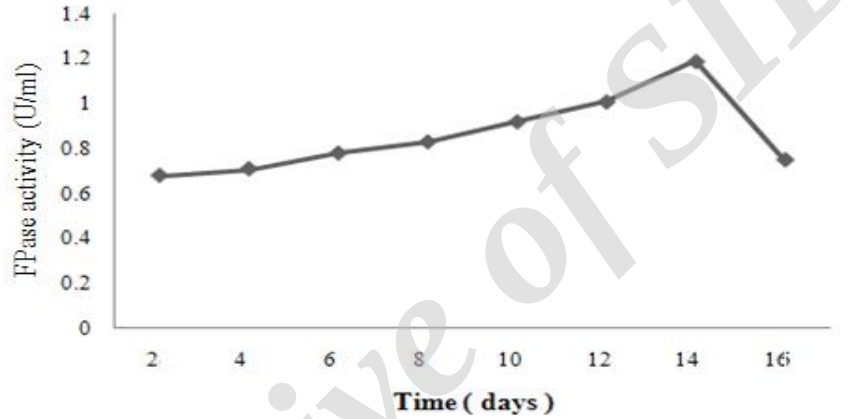
شکل 7 اثر منبع نیتروژن بر تولید اگزوگلوکاناز (P* < 0.05)

Archive of SID

www.SID.ir



شکل 8 بررسی میزان پایداری حرارتی فعالیت اگزوگلوکانازی جدایه منتخب (P* < 0.01)



شکل9 بررسی رابطه تولید آنزیم اگزوگلوکاناز طی زمان

کاهش فعالیت آنزیمی با گذر زمان ممکن است ناشی از شکستن یا تغییر مواد مغذی و تولید محصولات فرعی در محیط کشت باشد [27]. Pothiraj و همکاران بیشینه فعالیت Fpase (0.46 IU/ml) را برای *Rhizopus stolonifer* بعد از گذشت 10 روز دوره گرمخانه گذاری بر روی ضایعات نشاسته گزارش کردند [26]. Kim و همکارانش گزارش کردند که avicelase و Fpase تولید شده به‌وسیله باکتری ترموفیل *Bacillus K-12*، در محیط مایع بسرعت افزایش یافته تا اینکه در روز هشتم به حداکثر میزان خود میرسد [2].

4- نتیجه‌گیری

چشمه‌های آب گرم مورد مطالعه، تنوع زیستی قابل توجه از باکتری های سلولاتیک و تحمل کننده حرارت دارند که قابل کشت و جداسازی می‌باشند. در میان جدایه‌ها، *I. variabilis sp.* DAH9 می‌تواند با منابع کربنی ارزانی مانند سبوس برنج و CMC تجاری، اگزوگلوکاناز مقاوم به حرارت قابل ملاحظه‌ای تولید نماید.

5- تقدیر و تشکر

از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به خاطر همکاری در انجام این تحقیق سپاس‌گزاری می‌گردد.
بخشی از هزینه‌های این مطالعه توسط صندوق حمایت از پژوهشگران (INSF) با شماره 87041530 تأمین اعتبار شده است.

Archive of SID
www.SID.ir

6- منابع

[1] Sun, Y., Lin, L., Deng, H., Li, J., He, B., Sun, R.,Ouyang, P., (2008) Structural changes of bamboo cellulose in formic acid. BioResource. 3, 297-315.

[2] Silvania, A. L., Erica, C., Andréia, B. D., Joao, B. B., Meire Lelis Leal, M., (2015) Cellulase production by thermophilic *Bacillus sp. SMIA-2* and its detergent compatibility. Electronic Journal of Biotechnology. 18, 110–115.

[3] Wang, K., Luo, H., Bai, Y., Shi, P., Huang, H., Xue, X., Yao, Bin., (2014) A thermophilic endo-1,4-β-glucanase from *Talaromyces emersonii CBS394.64* with broad substrate specificity and great application potentials. Appl. Microbiol. Biotechnol. 98, 7051-7060.

[4] Kuhad, R. C., Gupta, R., Singh, A., (2011) Microbial cellulases and their industrial applications. Enzyme Research, 2011, 1-10.

[5] Farahmand, M., Mozaffari, N.A., Mehrabian, S., Khavarinejad, R., (2009) Characterization of α- amylase produced by thermophilic bacteria isolated from Iranian hot spring waters. *Pajouhesh*–Va- sazandegi. 81, 161-167.

[6] Lu, W.J., Wang, H.T., Yang, S.J., Wang, Z.C., Nie, Y.F., (2005) Isolation and characterization of mesophilic cellulose-degrading bacteria from flower stalks-vegetable waste co-composting system. J. Gen. Appl. Microbiol. 51, 353–360.

[7] Mayendea, L., Wilhelmia, B.S., Pletschke, B.I., (2006) Cellulases (CMCases) and polyphenol oxidases from thermophilic *Bacillus spp.* isolated from compost. Soil Biol. Biochem. 38, 2963–2966.

[8] Abdel-Fattah, Y.R., El-Helow, E.R., Ghanem, K.M., Lotfy, W.A., (2007) Application of factorial designs for optimization of avicelase production by a thermophilic *Geobacillus* isolate. Res. J. Microbiol. 2, 13–23.

[9] Li, W., Zhang, W., Yang, M., Chen, Y.L., (2008) Cloning of the thermostable cellulase gene from newly isolated *Bacillus subtilis* and its expression in *Escherichia coli*. Mol Biotechnol. 40,195–201.

[10] Ng, T. K., And Zeikus, J. G., (1981) Comparison of Extracellular Cellulase Activities of *Clostridium thermocellum LQRI* and *Trichoderma reesei QM9414*. Appl. Environ. Microbiol. 42(2), 231-240.

[11] Rastogi, G., Aditya, B., Adhikari, A., Bischoff, K., Hughes, S., Christopher, L., Sani, R., (2010) Characterization of hermostable cellulases produced by *Bacillus* and *Geobacillus* strains. Bioresour. Technol. 101, 8798-8806.

[12] Khalil, A., (2011) Isolation and characterization of three thermophilic bacterial strains (lipase, cellulase and amylase producers) from hot springs in Saudi Arabia. Afr J Biotechnol. 10(44), 8834-8839.

[13] Assareh, R., Shahbani Zahiri, H., Akbari Noghabi, k., Amin zadeh, S., Bakhshi Khaniki, G., (2012) Characterization of the newly isolated *Geobacillus sp. T1*, the efficient cellulase-producer on untreated barley and wheat straws. Bioresour. Technol. 120, 99-105.

[14] Acharya, S., Chaudhary, A., (2012) Alkaline cellulase produced by a newly isolated thermophilic *Aneurini bacillus thermoaerophilus* WBS2 from hot spring, India. Afr J Microbiol Res. 6, 5453-5458.

[15] Crawford, D., And Mccoy, E., (1972) Cellulases of *Thermomonospora fusca* and *Streptomyces thermodiastaticus*. J Appl Microbiol. 24, 150-152.

[16] Hemmat J, Emtiazi, G (2001) Isolation of *Cellulomonas sp.* from silkworm's gut and evaluation of its endoglucanase activity. Iranian J. Agric. Sci. 31, 255-60.

[17] Ghose, T. K., (1987) Intrenational Union of Pure and Appled Chemistry. Pure & Appl. Chem, 59, 257-268.

[18] Susanti, D., Johnson, E.F., Rodriguez, J.R., Anderson, I., Perevalova, A.A., Kyrpides, N., Lucas, S., Han, J., Lapidus, A., Cheng, J.F., Goodwin, L., Pitluck, S., Osavrommatis, K., Peters, L., L. Land, M., Hauser, L., Gopalan, V., P. Chan, P., M. Lowe, T., Atomi, H., A. Bonch-Osmolovskaya, E., Woyke, T., Mukhopadhyaya, B., (2012) Complete genome sequence of *Desulfurococcus fermentans*,a hyperthermophilic cellulolytic crenarchaeon isolated from a freshwater Hot Spring in Kamchatka, Russia. Journal of Bacteriology. 194, 5703–5704.

[19] Hreggvidsson, G.O., Kaiste, E., Holst, O., Eggertsson, G., Palsdottir, A., Kristjansson, JK. (1996) An extremely thermostable cellulase from the thermophilic *Eubacterium Rhodothermus* marinus. Appl. Environ. Microbiol. 62(8), 3047-3049.

Archive of SID

www.SID.ir

works, and emended description of the genus *Chelatococcus*. Int. J. Syst. Evol. 58, 2224-2228.

[25] Liang, Y., Feng, Z., Yesuf, J., Blackburn, J.W., (2010) Optimization of growth medium and enzyme assay conditions for crude cellulases produced by a novel thermophilic and cellulolytic bacterium, *Anoxybacillus sp. 527*. Appl Biochem Biotechnol. 160, 1841–1852.

[26] Acharya, S., Chaudhary, A., (2012) Optimization of fermentation condition for production cellulases by *Bacillus licheniformis MVS1* and *Bacillus sp. MSV3* isolated India Hot Spring. Braz. Arch. Biol. Technol. 55, 497-503.

[27] Haq, IU., Hameed, K., Shahzadi, MM., Javed, SA., Qadeer, MA., (2005) Cotton Saccharifying activity of cellulases *by Trichoderma harzianum UM-11* in shake flask. Int J Bot. 1, 19-22.

[28] Teather, R.M., Wood, P.J., (1982) Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumerationand characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. Appl. Environ. Microbiol. 43, 777-780.

[20] Reynolds, P.H.S., Sissons, C. H., Daniel, R.M., Morgan, H. W., (1986) Comparison of cellulolytic activities in *Clostridium thermocellum* and three thermophilic, cellulolytic anaerobes. Appl. Environ. Microbiol. 51, 12-17.

[21] Acharya, S., Chaudhary, A., (2011) Effect of nutritional and enviromental factor on cellulase activity by thermophilic bactria isolated from hot spring. J. Sci. Ind. Res. 70, 142-148.

[22] Zheng-Guo, He., Huifang, Z., Yaqin, Li., (2004*) Acidianusteng chongensissp. nov.*, a New Species of *Acidothermophilic Archaeon* Isolated from an Acidothermal Spring. Curr Microbiol. 48, 159-163.

[23] Woen, H.Y., Kim, B.Y., Kim, J.S., Lee, S.Y., Cho, Y.H., Go, S.J., Hong, S.B., Im, W,T., Kwon, S.W., (2006) *Pseudoxanthomonas Suwonensis Sp.* Nov., isolated from cotton wastes composts. Int. J. Syst. Evol. 56, 659-662.

[24] Yoon, J.H., Kang, S.J., Im, W.T., Lee, S.T., Oh, T.K., (2008) *Chelatococcus daeguensis sp. nov*. Isolated from wastewater of a textile dry

Archive of SID

www.SID.ir