بررسی مقایسه‌ای تولید آنزیم پروتئاز قلیایی به دو روش کشت غوطه‌ور و تخمیر در بستر جامد توسط اعضای جنس *Bacillus*

کیوان کمالی یزدی[۱]

معصومه انوری[۲]

علی محمدی ترکاشوند[۳]

مهدی شهریاری‌نور[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۳/۰۵
تاریخ تصویب: ۱۳۹۱/۰۷/۱۵

چکیده

در این تحقیق که با هدف بررسی مقایسه‌ای دو روش کشت غوطه‌ور (Submerged fermentation: SMF) و تخمیر در بستر جامد (Solid-state fermentation: SSF) برای تولید آنزیم پروتئاز قلیایی از سوبسترای کاه گندم انجام شد، جدایه باکتریایی از جنس Bacillus ازخاک‌های قلیایی استان گیلان جداسازی و پس از غربالگری بررسی تولید آنزیم، به طور همزمان در دو شرایط کشت غوطه‌ور و تخمیر در بستر جامد از نظر تولید آنزیم مورد ارزیابی قرار گرفت. بهترین نتایج در SSF در محتوی رطوبت ۱۰۰ درصد پس از تلقیح ٤٠ درصد سوسپانسیون باکتریایی و طی گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٨ ساعت (pH آغازین ٩/٤) حاصل گردید. لذا بررسی مقایسه‌ای دو سیستم در بهترین حالت نشان از تولید ۱/۹ برابری در شرایط تخمیر در بستر جامد 4025 U/g در

---

۱. دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات گیلان، گروه زیست‌شناسی - میکروبیولوژی، رشت، ایران.
۲. دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، گروه زیست‌شناسی - میکروبیولوژی (نویسنده مسئول)، رشت، ایران./
E-mail: anvari@iaurasht.ac.ir
۳. دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، گروه خاک‌شناسی، رشت، ایران.
۴. دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات گیلان، گروه زیست‌شناسی - میکروبیولوژی، رشت، ایران.

مقایسه با 2100 U/ml در شرایط تخمیر در بستر غوطه‌ور بوده و حاکی از برتری این روش بر کشت غوطه‌ور است.

واژه‌های کلیدی: پروتئازقلیائی، کشت غوطه‌ور، تخمیر در بستر جامد، *Bacillus*، کاه گندم

مقدمه

پروتئازها آنزیم‌های شکننده پیوندهای پپتیدی و دارای کاربردهای متعدد تجاری هستند. در میان انواع آنزیم‌ها پروتئازهای میکروبی بدلیل کاربرد گسترده در صنایع شوینده، دارویی، تهیه ابریشم و... ٦٠ درصد از کل فروش آنزیمهای صنعتی را به خود اختصاص می‌دهند (Singh et al., 2001).

پروتئازها بر اساس بهینه محدوده عملکرد در pH های مختلف به ۳ نوع اسیدی، خنثی و قلیایی تقسیم می‌شوند (Germano et al., 2003). در میان پروتئازها انواع قلیایی به عنوان افزودنی به انواع دترجنتها ٤٠ درصد از کل فروش آنزیم‌ها و ۸۹ درصد از سهم فروش پروتئازها را به خود اختصاص می‌دهند (Akcan and Uyar, 2011).

میکروارگانیسم‌های زیادی توانایی تولید پروتئاز را دارند. از میان انواع پروتئازها، پروتئازهای قلیایی تولید شده توسط گونه‌های جنس *Bacillus* به دلیل ثبات حرارتی و پایداری تحت pH های متفاوت از اهمیت فزاینده‌ای در صنایع شوینده برخوردارند. به علاوه اعضاء این جنس قابلیت بالایی در تولید و ترشح مقادیر بسیار زیاد آنزیم دارند که ناشی از فعالیتهای فیزیولوژیک آنها می‌باشد (Asokan and Jayanthi., 2010).

تولید این آنزیم با هر دو روش کشت غوطه‌ور و تخمیر در بستر جامد انجام می‌شود (Yang et al., 2000).

هر میکروارگانیسم برای تولید حداکثری آنزیم شرایط بهینه خود را داراست لذا بهینه‌سازی اجزا محیط به منظور ایجاد تعادل بین آنها و به حداقل رساندن مواد مصرف نشده در پایان فرآیند تخمیر از اهمیت بسزایی برخوردار است. یکی از عوامل مهم در مدیریت تولید آنزیم استفاده از محیطی مقرون بصرفه از نظر اقتصادیست که تنها با استفاده از ضایعات فراوان کشاورزی مانند کاه و سبوس گندم و برنج و... امکان‌پذیر است (Valeria et al., 2005).

تحقیق حاضر با هدف مطالعه اثرات زمان تخمیر بر تولید آنزیم پروتئاز قلیایی بطور همزمان در شرایط مشابه به دو روش کشت غوطه‌ور و تخمیر در بستر جامد و ارزیابی مقایسه‌ای تولید در هر دو سیستم انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

جداسازی میکروارگانیسم

تعداد ۱۵ نمونه خاک از مناطق جنوبی استان گیلان شامل منجیل، لوشان و رودبار که برخوردار از خاکهای قلیایی بودند تهیه گردید. نمونه‌ها از عمق ۱۵ سانتی‌متری خاک تهیه و

در کیسه‌های پلی‌اتیلن استریل به آزمایشگاه انتقال یافتند و پس از خشک نمودن، ۱ گرم از نمونه در ارلنهای ۲۵۰ میلی‌لیتر حاوی ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطراستریل سوسپانسیونه شد. سپس لوله‌ها تحت ورتکس، شدیداً تکان داده شده تا اختلاط بخوبی صورت گیرد. سپس لوله‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در ۸۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد و ۰/۱ میلی‌لیتر از هر لوله (حاوی هر نمونه خاک) به محیط آگار غذایی استریل منتقل و توسط میله شیشه‌ای سرکج استریل به روش Spread Plating کشت داده شد و پلیت‌ها به مدت ۲٤ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری و پس از آن کولونی‌ها از نظر واکنش گرم و آزمایشات بیوشیمیایی مورد شناسایی قرار گرفتند (Joo et al., 2002).

غربالگری جدایه‌های تولیدکننده آنزیم

تمامی باسیلوس‌های جداسازی شده در محیط آگار اسکیم میلک (100 gr/lit)، عصاره مخمر (10 gr/lit)، آگار (20 gr/lit) و pH=8 به روش نقطه‌ای کشت داده شدند. تولید هاله شفاف در اطراف کولونی‌ها دال بر تولید آنزیم پروتئاز قلیایی بود (Mehrotra et al., 1999).

شناسایی گونه‌های مولدآنزیم

تایید شناسایی باکتری‌ها بر اساس لام میکروسکوپی، رنگ‌آمیزی گرم و اسپور و آزمایشات بیوشیمیایی در سطح جنس انجام شد. بدین منظور آزمایشات ژلاتیناز، هیدرولیز کازئین، کاتالاز، هیدرولیز لستین، اوره آز، تجزیه سیترات، حرکت، احیای نیترات، هیدرولیز نشاسته، وژپروسکوئر و تخمیر قندهای آرابیونوز، مالتوز، مانیتول و گزیلوز انجام شد (Betty et al., 2002 ,Holt et al., 1994).

غربالگری بستر جامد

بدین منظور از ۷ بستر متفاوت و دو روش کشت غوطه‌ور کاه گندم و تخمیر در بستر جامد کاه گندم استفاده شد، به نحوی که در غربالگری بستر جامد از هیچ‌گونه منبع کربن کمکی یا ازت کمکی استفاده نشد و صرفاً از بافر و میکروارگانیسم استفاده گردید تا بهترین منبع کربن مورد استفاده توسط میکروارگانیسم تعیین گردد.

بدین منظور بر اساس جدول شماره ۱، مقادیر انتخابی از هر سوبسترای کاملاً ریزشده به ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری افزوده و سپس از کشت ۲٤ ساعت از کشت باکتری با کدورت مناسب ($OD_{600\,nm} = 0/6$) به میزان ۱٪ (وزنی/ وزنی به ازای وزن سوبسترا) به بسترها اضافه گردید.

سپس کشت‌ها به مدت ۹٦ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری و میزان فعالیت آنزیمی در هر بستر تعیین گردید (Ashish et al., 2008).

آماده سازی سوبسترا

کاه گندم در پایان فصل برداشت از مزارع گندم استان اردبیل تهیه و به آزمایشگاه منتقل و پس از شستشو با آب مقطر برای حذف ذرات گرد و غبار با استفاده از غرقاب سازی در آب داغ (۸۰ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۲۰ دقیقه رنگ‌زدایی و سپس در آون با دمای ٤٥ درجه سانتی‌گراد خشک و آسیاب گردید و تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد (Ashish et al., 2008).

جدول ۱. بسترهای ترکیبی

بسترهای ترکیبی
کاه گندم+پوست دانه باقالا
کاه گندم+پوست غلاف باقالا
کاه گندم+سبوس برنج
کاه گندم+کاه برنج
کاه گندم+ذرت
کاه گندم+پوست سیر
کاه گندم+سیب‌زمینی
کاه گندم در بستر غوطه‌ور
کاه گندم در بستر جامد

تهیه پیش کشت

به منظور تهیه مایه تلقیح باکتریایی از محیط کشت حاوی (گرم بر لیتر): گلوکز ۱۰، پپتون ۵، عصاره مخمر ۵، $1\ KH_2PO_4$ و $7H_2O$. $0/2\ MgSO_4$ استفاده و pH محیط برابر با ۹/۵ تنظیم گردید (Uyar and Baysal., 2004).

تخمیر در بستر جامد

به ۵ گرم سوبسترا در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتر محلول نمکی حاوی ۰/۱ درصد دی پتاسیم هیدروژن فسفات و سولفات منیزیم ۰/۵ درصد و سولفات آهن ۰/۰۰٤ درصد (وزنی/ وزنی به ازای وزن سوبسترا) اضافه شد (در مرحله بهینه‌سازی فاکتورهای تاثیرگذار به این مجموعه برای دستیابی به بهترین درصد رطوبت سوبسترا آب مقطر نیز اضافه گردید).

ارلن‌ها در ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه استریل و سپس از محیط پیش کشت (دارای $OD_{600nm} = 0/6$) ۲ میلی‌لیتر به محیط بستر تلقیح گردید.

تخمیر در کشت غوطه‌ور

بدین منظور به ٤۰ میلی‌لیتر محلول نمکی استریل حاوی ۰/۱ درصد دی پتاسیم هیدروژن فسفات و سولفات منیزیم ۰/۵ درصد سولفات آهن ۰/۰۰٤ درصد (وزنی/ وزنی به ازای وزن سوبسترا) به ارلنهای ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵ گرم سوبسترای کاه گندم اضافه گردید و ۲ میلی‌لیتر از پیش کشت باکتریایی (با $OD_{600nm} = 0/6$) به آن افزوده گردید (Sandhya et al., 2005).

اثر پارامترهای محیطی بر تولید آنزیم در بستر جامد

محیط¬های کشت بستر جامد در دوره‌های زمانی ٢٤ تا ۱۲۰ ساعت، مقدار تلقیح ۲۰ تا ۱۰۰ درصد (حجمی به وزن سوبسترا با $OD_{600nm} = 0/6$) و pH آغازین ٦/۵ تا ۱۱/۵ و رطوبت اولیه ۱۰۰ تا ٤۰۰ درصد از نظر تولید آنزیم مورد بررسی قرار گرفتند.

اثـر پارامترهـای محیطـی بـر تولید آنزیم در محیط غوطه‌ور

تولید آنزیم در دوره‌هـای زمانی ۲٤ تا۱۲۰ سـاعت، مقدار تلقیح ۲۰ تا ۱۰۰ درصد و pH آغازین ٦/٥ تـا ۱۱/٥ و تکانش ۱٥۰ تا ٤٥۰ rpm ازنظر تولید آنزیم مورد بررسـی و با کشت در بستر جامد مقایسه شدند.

استخراج آنزیم

بدین منظور ابتدا محیط کشـت مایع از کاغذ صافی معمولی فیلتر شده در لوله‌های آزمایش تقسیم و پس از سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه در ٦۰۰۰ دور محلـول رویی جهت ارزیابی فعالیت آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت. در محیط‌های دارای بستر جامد، ابتدا محتویات با ۲۰ میلی‌لیتر بافر کربنات بیکربنات با غلظت ۰/۰۱ مولار و pH=10 شستشـو و سپس با کاغـذ صافی فیلتر گردید. عصاره حاصل از فیلتراسیون به مدت ۱۰ دقیقه در ٦۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید و از سوسپانسیون رویی به عنوان محلول خام حاوی آنزیم اسـتفاده شد (Uyar and Baysal., 2004).

سنجش فعالیت آنزیم

ایـن آزمایش با اسـتفاده از سوبسـترای کازئین انجام شد. بدین منظور ٥۰ میکرولیتر از محلول حاصل ازشستسوی بستر جامد با بافرکربنـات بیکربنـات (۱۰میلی‌مولار)، ۸۳ میکرولیتر محلول سوبسـترا حاوی۱٪ کازئیـن (وزنی/حجمـی) حل شـده در ٥۰ میکرومـول بافـر Tris_HCL در pH=8 اضافه و این ترکیب ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سـانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. به منظور توقـف واکنش آنزیمـی ٤۰۰ میکرولیتر از مخلوط TCA 5% (حاوی TCA 5 %، ۹ استات سـدیم و ۹٪ اسیداسـتیک) اضافه گردید و سپس به مدت نیم ساعت در درجه حرارت اتاق نگهداری و سپس لوله‌ها در ٦۰۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید و جذب نوری نمونه‌ها (در مقایسه با لوله‌های شاهد بدون گرمخانه‌گذاری اولیه) در ۲٦۲ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت، یک واحد فعالیت آنزیمی بـه صورت مقدار آنزیمی که بتواند ۱ میکرومول تیروزین در دقیقه تولید نماید، تعریـف گردید. مقدار تیروزیـن حاصله با استفاده از منحنی استاندارد تیروزین تعیین شد (Ravichandra et al., 2007).

آنالیز آماری

تمامی آزمایشات در ۳ تکرار انجام و تجزیه و تحلیل نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد.

نتایج

نتایـج حاصل از آزمایشـات بیوشـیمیایی تاییدکننـده تعلق باکتری جداسـازی شـده بـه جنس باسـیلوس بود. جدول شـماره ۲ خصوصیات بیوشـیمیایی باکتری را نشان می‌دهد.

در بین بسـترهای مورد آزمایش با توجه به فعالیت آنزیمی، بستر کاه گندم و پوست دانه باقالا نسبت به سایر بسترها ارجحیت داشت (جدول شماره ۳).

در تعیین بهترین زمان گرمخانه‌گذاری برای تولید آنزیم از ۲٤ تا ۱۲۰ ساعت، بررسی‌ها نشـان‌دهنده بهترین تولید طی ٤۸ ساعت در سیسـتم 2889 U/g SSF و در سیستم U/ml 2310 SMF بـود (P<0/05). گرمخانه‌گذاری

جدول ۲. خصوصیات بیوشیمیایی مربوط به باکتری جداسازی شده

تست‌های بیوشیمیایی	نتایج
هیدرولیزکازئین	+
هیدرولیز نشاسته	+
هیدرولیز ژلاتین	+
هیدرولیز لستین	+
کاتالاز	+
احیای نیترات	+
اوره آز	-
تجزیه سیترات	-
حرکت	+
آرابیونوز	-
مالتوز	+
مانیتول	-
گزیلوز	+

جدول ۳. انتخاب بستر

بسترهای ترکیبی	فعالیت آنزیم (U/g)
کاه گندم+پوست دانه باقالا	1341
کاه گندم+پوست غلاف باقالا	141
کاه گندم+سبوس برنج	225
کاه گندم+کاه برنج	666
کاه گندم+ذرت	1300
کاه گندم+پوست سیر	91
کاه گندم+سیب‌زمینی	766
کاه گندم در بستر غوطه‌ور	675
کاه گندم در بستر جامد	325

در زمانی بیش از این سبب کاهش تولید آنزیم در هر دو سیستم گردید (شکل ۱).

در خصوص درصد تلقیح مشاهده شد که در سیستم SSF تا ٤٠ درصد تلقیح فعالیت آنزیمی افزایش یافته (2961 U/g) و پس از آن بتدریج کاهش یافت (شکل ۲) (P<0/05).

در سیستم SMF برای دستیابی به حداکثر فعالیت آنزیم این میزان به ٦٠ درصد (2373 U/ml) افزایش یافت (شکل ۲) (P<0/05).

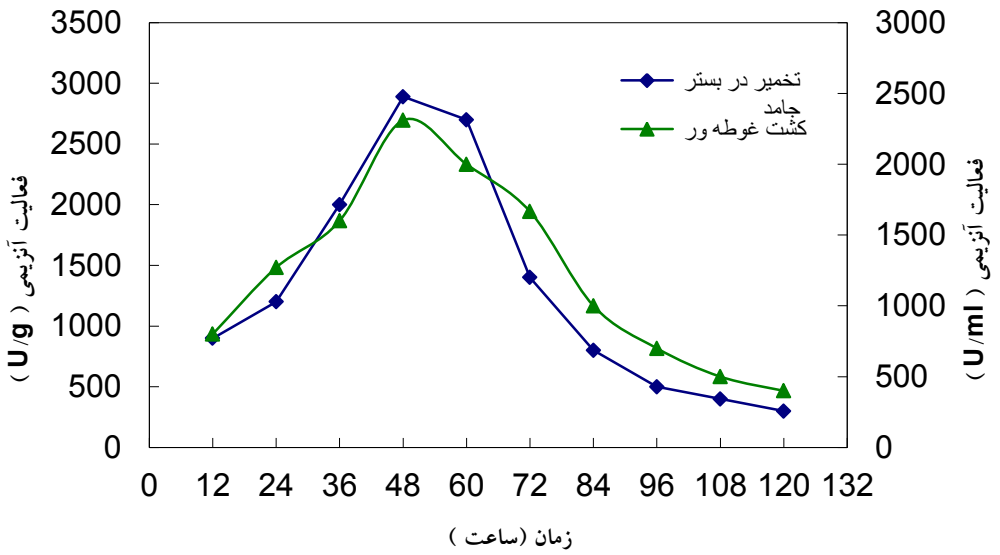
در رابطه با تکانش بیشترین تولیدآنزیم به RPM 250 اختصاص داشت (2961 U/ml) (شکل ٥).

در خصوص اثر pH بر فعالیت آنزیمی پس از تعیین آن در pH های متفاوت (١٠/٥ تا

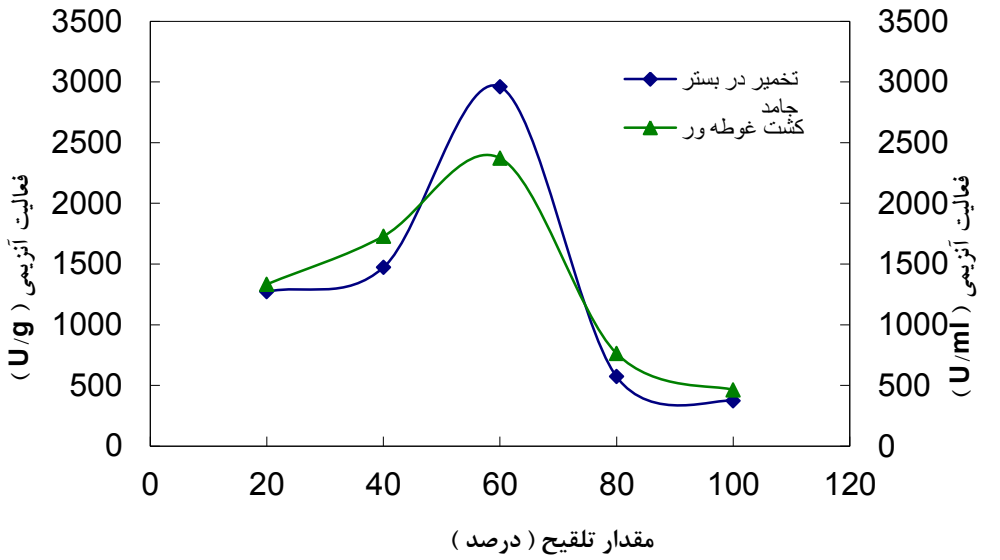
۸/۵) در هر دو سیستم مشخص شد که تولید آنزیم با افزایش pH تا ۹/۵ افزایش (در SSF 4025 U/g و در SMF 2100 U/ml) و پس از آن بتدریج کاهش یافت (شکل ۳).

نکته جالب توجه آن بود که با افزودن مقادیر مختلف اسید و باز برای کنترل pH در سیستم SSF تغییر قابل ملاحظه‌ای در pH مشاهده نگردید.

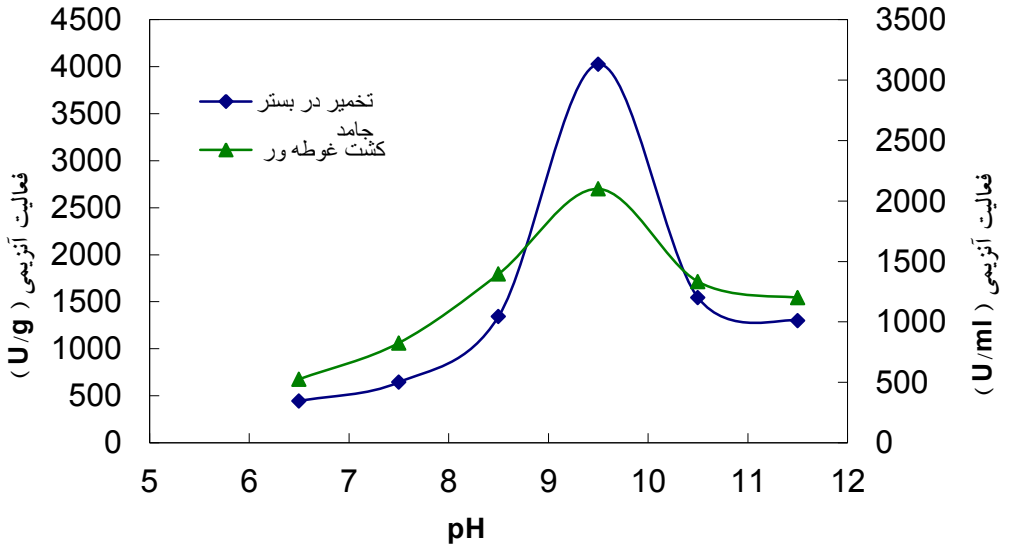
در خصوص رطوبت اولیه، بهترین نتایج در کشت با بستر جامد در رطوبت اولیه ۱۰۰ درصد مشاهده گردید (2480 U/gr) (شکل ٤).



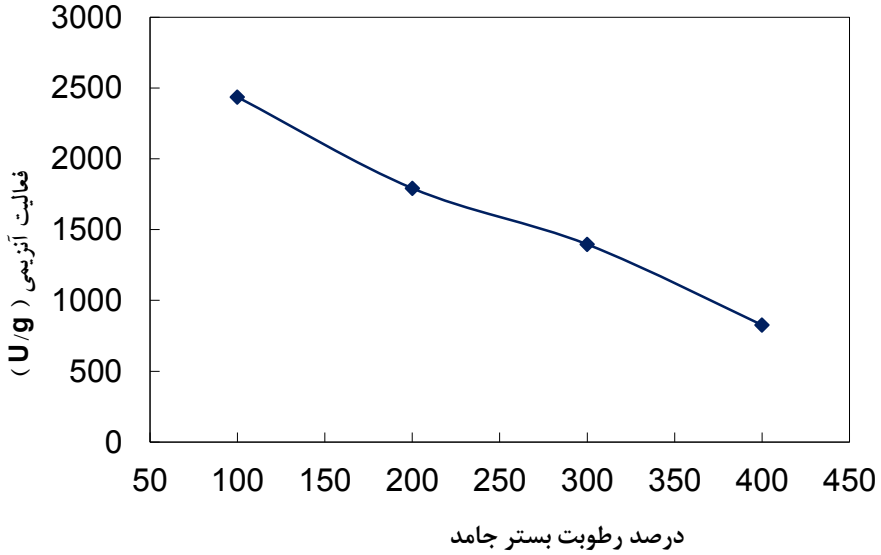
شکل ۱. اثر زمان گرمخانه‌گذاری بر میزان تولید آنزیم در دو سیستم تخمیر در بستر جامد و کشت غوطه‌ور



شکل ۲. اثر مقدار تلقیح بر میزان تولید آنزیم در دو سیستم تخمیر در بستر جامد و کشت غوطه‌ور



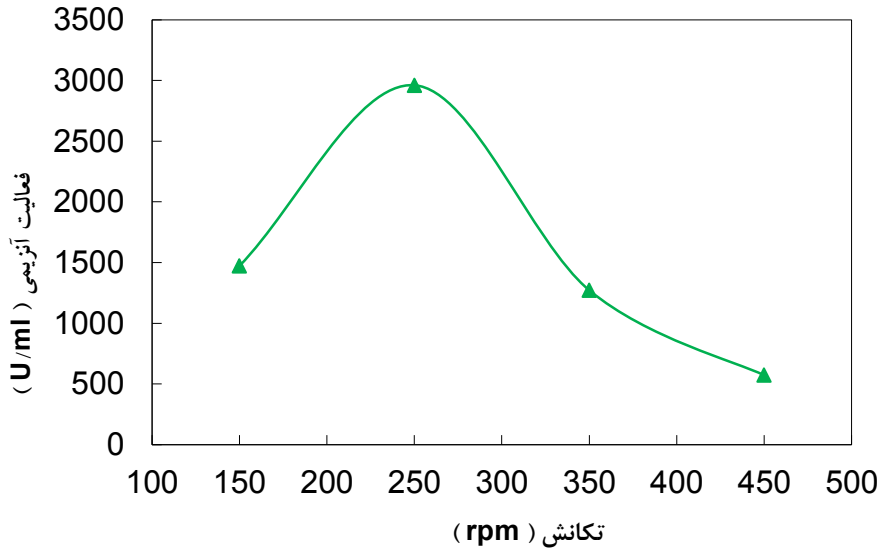
شکل ۳. اثر pH آغازین بر میزان تولید آنزیم در دو سیستم تخمیر در بستر جامد و کشت غوطه‌ور



شکل ۴. اثر درصد رطوبت بستر جامد بر میزان تولید آنزیم در سیستم تخمیر در بستر جامد

بحث

مطالعات و بررسی‌های متفاوت حاکی از آن است که کاه و سبوس گندم سوبسترای مناسبی برای تولید آنزیم در هر دو شرایط تخمیر در بستر جامد و کشت غرقابی هستند (Malathi and Chakraborty., 1991). kaur و همکاران و همچنین Adesh و همکاران وی، در گزارش‌هایی جداگانه بترتیب در سیستم‌های کشت غوطه‌ور، بستر جامد و سیستمهای دو فازی تخمیری دریافتند که در میان بسترهای متفاوت انتخابی خود شامل سبوس برنج، سبوس گندم، ضایعات کلم، نیشکر، زیتون، کاه گندم از بیشترین قابلیت برای تولید آنزیم برخوردار بوده است (kaur., et al 2001, Adesh et al., 2002). در این خصوص استثنائاتی هم وجود دارد



شکل ۵. اثر تکانش بر میزان تولید آنزیم در کشت غوطه‌ور

مثلاً در مورد قارچ *Rhizopus oligosporus* در میان سوبسترهای مختلف، سبوس برنج از کارایی بهتر در تولید آنزیم برخوردار بوده است (kaur., et al 2001).

در مطالعه دیگری، ترکیبی از کاه برنج، سبوس برنج و پوست نخود به نسبت ۵:۳:۲ شرایط مناسبی برای تولید پروتئاز مشاهده شد (Nehra et al., 2002).

از نظر تاثیر زمان انکوباسیون در تولید کاهش فاحشی بعد از ۷۲ ساعت از زمان شروع در هر دو سیستم کشت غوطه‌ور در بستر جامد مشاهده گردید .

Yang و Agarwal در دو تحقیق متفاوت در این خصوص به نتیجه مشترک رسیدند و دریافتند حداکثر زمان بهینه انکوباسیون برای تولید آنزیم توسط *Bacillus subtilis* و اعضا جنس Penicillium به ترتیب در دو سیستم کشت غوطه‌ور و تخمیر در بستر جامد ۷۲ ساعت بوده است (Yang et al., 2000, Agarwal et al., 2004). گرچه در این خصوص نیز استثنائاتی وجود دارد مثلاً تولید آنزیم پروتئاز قلیایی توسط اعضا جنس Streptomyces پس از زمان انکوباسیون ۱۲۰ ساعت به حداکثر خود رسید. از دلایل اصلی کاهش تولید آنزیم بعد از ۷۲ ساعت می تواند تقلیب یا دگرگونی ساختار آنزیم و یا کاهش مواد غذایی قابل دسترس توسط میکروارگانیسم باشد (Lai et al., 2004).

محتوی رطوبت اولیه از فاکتورهای تاثیرگذار بر رشد میکروب و بازدهی محصول است که صرفاً در محیط بستر جامد قابل بررسی است. این پارامتر فعالیت‌های تولید میکروب را تحت تاثیر قرار داده و مستقیماً بر تولید آنزیم تاثیرگذار است. کمبود رطوبت اولیه باعث کاهش حلالیت مواد غذایی مورد نیاز در بستر جامد می‌گردد که به نوع خود منجر به کاهش مصرف مواد غذایی توسط میکروب‌ها و کاهش فشار اسمزی و در نتیجه عدم انتقال مواد غذایی می‌گردد (Puri et al., 2002). همچنین افزایش میزان رطوبت باعث کاهش تخلخل، از دست دادن جزئی ساختار، افزایش چسبندگی و کاهش تبادلات

گازی می‌شود (Lekha and Lonsane, 1994). pH محیط فاکتور تاثیرگذار دیگری است که علاوه بر تاثیر بر ساختار آنزیم بر فرایند نقل و انتقال مواد درعرض غشاء نیز تاثیر می‌گذارد (Moon and parulekar, 1991). نتایج حاصله نشان داد که در هر دو سیستم کشت غوطه‌ور و کشت در بستر جامد افزایش pH در محدوده ۹/۵ منجر به افزایش تولید آنزیم گردید و جالب توجه اینکه در هر دو سیستم افزودن اسید و باز برای تنظیم pH محیط تغییر قابل توجهی در آن ایجاد نمی‌کرد. این نشانه نقش فوق‌العاده خاصیت بافری کاه گندم (مانند سایر ضایعات کشاورزی) در کنترل pH است (Pandey et al., 1999, 2001). Nampoothiri و همکاران وی در خصوص نقش بافری کاه گندم در تولید آنزیم کیتیناز در محیط کشت غوطه‌ور به نتایج مشابهی دست یافتند (Nampoothiri et al., 2004).

در خصوص درصد تلقیح از پیش کشت به کشت اصلی در هر دو سیستم با افزایش درصد تلقیح به ٦٠ درصد کاهش قابل ملاحظه‌ای در فعالیت آنزیمی مشاهده گردید که به نوبه خود می‌تواند ناشی از کوتاه شدن دسترسی زمانی به غذا و روند مصرف افزاینده مواد غذایی باشد. لذا دستیابی به تعادل بین بیومس مواد و غذای قابل دسترس در دستیابی به حداکثر بازدهی تولید آنزیم از اهمیت بسزایی برخوردار است (Sen 1995, Nutan et al.,2002).

تکانش یکی از فاکتورهای مهم در تولید پروتئازهای میکروبی در کشت غوطه‌ور است چرا که سبب بهینه‌سازی اختلاط در سیستم کشت بسته می‌شود و سرعت انتقال جرم اکسیژن را افزایش می‌دهد. افزایش بیش از حد اختلاط منجر به اعمال تنش به میکروارگانیسم‌ها می‌گردد که به نوبه خود می‌تواند باعث کاهش غلظت توده سلولی گردد. محققان بسیاری بهترین سرعت تکانش را برای تمام انواع سویه‌های مولد آنزیم پروتئاز در کشت غوطه‌ور بین ۱۵۰ تا ۳۰۰ (rpm) گزارش کرده‌اند. که نتایج این تحقیق (250 rpm) با نتایج آنان مطابقت دارد (Joo et al., 2002, Liu and Tzeng 1998, Banerjee et al., 1999).

اساساً تحقیقات متعدد بر برتری تکنیک SSF در مقایسه با SMF در تولید انواع آنزیم‌های میکروبی اذعان دارند. در مجموع نتایج حاصل از این تحقیق (به طور متوسط) حاکی از برتری روش SSF بر روش SMF است.

نزدیک به ۱۵ میلیون تن گندم در کشور عرضه می‌گردد که ۲۰ درصد آن به شکل ضایعات هدر می‌رود. ۱۰۰ گرم کاه گندم حاوی ۱۵ درصد پروتئین است که می‌تواند منبع مناسب و ارزان قیمت جهت تولید پروتئاز قلیایی باشد.

سالانه بیش از ٤٦ هزار تن باقالا در کشور عرضه می‌گردد؛ مناطق اصلی کشت این محصول در ایران، استان‌های خوزستان، گلستان و مازندران است که استان گلستان با برداشت بیش از ۳۲ هزار تن در سال اولین تولیدکننده این محصول در کشور محسوب می‌شود و از نظر سطح کشت بعد از استان مازندران مقام دوم را به خود اختصاص داده است. ۱۰۰ گرم پوست باقلا حاوی ۲۰ گرم پروتئین بوده و می‌تواند منبع مناسبی جهت تولید پروتئاز قلیایی باشد. لذا با توجه به حجم بالای تولید این محصولات در کشور و حجم بالای ضایعات حاصل از این

محصولات و نیز با توجه به نتایج مطلوب حاصل از این تحقیق، تولید آنزیم در مقیاس نیمه صنعتی با استفاده از سویه جداسازی شده و سوبسترای ترکیبی کاه گندم و پوست دانه باقلا می‌بایست مد نظر قرار گیرد.

جمع‌بندی

سویه *Bacillus* جداسازی شده از خاک‌های قلیایی استان گیلان قادر به تولید آنزیم پروتئاز قلیایی در هر دو سیستم تخمیر در بستر جامد و کشت غوطه‌ور بود اما فعالیت آنزیمی در بستر جامد در مقایسه با کشت غوطه‌ور ۱/۹ برابر بیشتر بود.

References

- Adesh, K., Archana, S., Balasubramanyam, S.D., Saxena, A.K., Lata. (2002). Optimization of conditions for production of neutral and alkaline protease from species of Bacillus and Pseudomonas. Ind J Microbiol 42: 233–236.
- Agarwal, D., Patidar, P., Banerjee, T., Patil, S. (2004).Production of alkaline protease by Penicillium sp. under SSF conditions and its application to soy protein hydrolysis. Process Biochem 39: 977–981.
- Akcan and Uyar. (2011). Production of extracellular alkaline protease from *Bacillus subtilis* RSKK96 with solid state. EurAsian Journal of BioSciences 5: 64-72.
- Ashis, K., Mukherjee., Hemanta Adhikari., Sudhir, K., Rai, S.k. (2008). Production of alkaline protease by a thermophilic Bacillus subtilis under solid-state fermentation (SSF) condition using Imperata cylindrical grass and potato peel as low-cost medium: Characterization and application of enzyme in detergent formulation. Biochemical Engineering Journal 39: 353–361
- Asokan, S., Jayanthi, C. (2010). Alkaline protease production by Bacillus *licheniformis* and *Bacillus coagulans*. Journal of Cell and Tissue Research 10: 2119-2123.
- Banerjee, C.U., Sani, R.K., Azmi, W., Soni, R. (1999). Thermostable alkaline protease from Bacillus brevis and its characterization as a laundry detergent additive. Pro Biochem 35: 213–219.
- Betty, A.F., Daniel, F.S., Alice, S.W. (2002). Bacillus and similar organisms. In: Diagnostic Microbiology 11th Edition, Publishe by Mosby Inc. 11830 West line Industrial Drive, St. Louis, Missouri 63146, USApp 317324-.
- Germano, S., Pandey, A., Clarice, A., Osaku, C.A., rocha, N., Soccol, C.R. (2003). Characterization and stability of proteases from Penicillium sp. produced by solid-state fermentation. Enzyme and Microbial Technology 32: 246–251.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Stately, J.T., William, S.T. (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th Ed., Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland, USA, pp. 559.
- Joo, H.S., Kumar, C.G., Park, G.C., Kim, K.T., Paik, S.R., Chang, C.S. (2002). Optimization of the production of an extra cellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. Pro Biochem. 38: 155–159.
- Kaur, S., Vohra, R.M., Kapoor, M., Beg, Q.K., Hoondal, G.S. (2001). Enhanced production and characterization of a highly thermostable alkaline protease from Bacillus sp. P-2. World J Microbiol Biotechnol. 17: 125129-
- Lai, D., Freire, D.M.G., Soares, R.M.A., Leite, S.G.F., Coelho, R.R.R. (2004). Production and partial characterization of thermophilic proteases from Streptomyces sp. isolated from Brazilian cerrado soil. Enzyme Microb Streptomyces sp. isolated from Brazilian cerrado soil. Enzyme Microb Technol. 34: 354–358
- Lekha, P.K., Lonsane, B.K. (1994). Comparative titres location and properties of tannin acyl hydrolase produced by Aspergillus niger PKL104 in solid state, liquid surface and submerged fermentation. Process Biochem 29: 497–503.
- Liu, B.L., Tzeng, Y.M. (1998). Optimization of growth medium for the production of spores from *Bacillus thuringiensis* using surface response methodology. Bioprocess Eng 18 : 413–418.
- Malathi, S., Chakraborty, R. (1991). Production of alkaline protease by a new *Aspergillus flavus* isolate under solid-state fermentation conditions for use as a

depilation agent. Appl Environ Microbiol 57: 712–716.
- Mehrotra, S., Pandey, P.K., Gaur, R., Darmwal, N.S. (1999). The production of alkaline protease by a Bacillus species isolate. Bioresource Technology 67: 201203- .
- Moon, S.H., Parulekar, S. (1991). A parametric study of protease production in batch and fed- batch cultures of *Bacillus firmus*. Biotechnol Bioeng 37:467–483.
- Nampoothiri, K.M., Baiju, T.V., Sandhya, C., Sabu, A., Szakacs, G., Pandey, A. (2004). Process optimization for antifungal chitinase production by Trichoderma harzianum. Process Biochem 39: 1583–90.
- Nehra, K.S., Dhillon, S., Kamala, C., Randir, S. (2002). Production of alkaline protease by Aspergillus sp.under submerged and solid substrate fermentation. Ind J Microbiol 42: 43–47.
- Nutan, D., Ulka, S.P., Kulbhushan, B.B., Jayant, M.K., Digamber, V.G. (2002). Production of acidic lipase by Aspergillus niger in solid state fermentation. Process Biochem 38: 715–721.
- Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C.R., Nigam, P. (1999). Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. Curr Sci 77: 149–162.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Rodriguez-Leon, J.A., Poonam, N. (2001). Solid-state fermentation in biotechnology: Fundamentals and application. New Delhi: Asiatech Publishers: p. 17.
- Potumarthi, R., Subhakar, Ch ., Annapurna, J. (2007). Alkaline protease production by submerged fermentation in stirred tank reactor using *Bacillus licheniformis* NCIM-2042: Effect of aeration and agitation regimes. BiochemicalEngineeringJournal 34:185–192.
- Puri, S., Beg, Q.K., Gupta, R. (2002). Optimization of alkaline protease production from Bacillus sp. by response surface methodology. Curr Microbiol 44:286–90.
- Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G., Pandey, A. (2005). Comparative evaluation of neutral protease production by Aspergillus oryzae in submerged and solid-state fermentation. Process Biochemistry 40: 2689–2694.
- Sen, S. (1995). Alkaline protease of a moderate thermophile *Bacillus licheniformis* S40. Ph.D. Thesis,University of Delhi.
- Singh, J., Batra; N., Sobti, R.C.(2000) serine alkaline protease from a newly isolated Bacillus sp.SSR1.Process biochem 36: 781785-.
- Uyar, F., Baysal, Z. (2004). Production and optimization of process parameters for alkaline protease production by a newly isolated *Bacillus sp.* Under solid state fermentation. Process Biochemistry 39: 1893–1898.
- Valeria, F., SOARES., LEDA R. CASTILHO., ELBA P. S. BON., DENISE M. G. FREIRE. (2005). High-Yield *Bacillus subtilis* Protease Production by Solid-State Fermentation. Applied Biochemistry and Biotechnology 121: 311-319
- Yang, J.K., Shihb, I.L., Tzengc, Y.M. , Wanga, S.L. (2000). Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. Enzyme and Microbial Technology 26: 406–413.