بهینه سازی شرایط رشد و تولید آنزیم آمیلاز در باکتری *Janthinobacterium* sp. ATR۸۱۲ با استفاده از روش Response Surface Methodology

راضیه قاضی بیرجندی[۱]، بهارشهنواز[۲]*، معصومه بحرینی[۳]، مریم محجوبین تهران[۴]

تاریخ دریافت: ۹٤/۱۱/۱۷
تاریخ تصویب: ۹٦/۰۳/۰۳

چکیده

آمیلاز (EC ۳,۲,۱,۱) یکی از مهم‌ترین آنزیم های صنعتی است که کاربردهای گسترده‌ای در صنایع مختلف دارد. این آنزیم پیوند گلیکوزیدی (۴-۱) α را در نشاسته هیدرولیز کرده و محصولاتی با وزن مولکولی کمتر مثل گلوکز، مالتوز و مالتوتریوز تولید می‌کند. هدف از انجام این پژوهش بهینه‌سازی شرایط رشد و تولید آنزیم آمیلاز در باکتری مقاوم به سرمای .Janthinobacterium sp می‌باشد. شرایط رشد و تولید آنزیم آمیلاز در مرحله اول با استفاده از روش تک متغیره برای متغیرهای دما، pH، منبع کربن، منبع نیتروژن، درصد نشاسته و میزان تلقیح بهینه‌سازی شد. در مرحله بعدی به منظور بررسی اثر برهم‌کنش بین متغیرهای مختلف بهینه متغیرسازی به روش طراحی روی سطح پاسخ (Response Surface Methodology) صورت گرفت. شناسایی

۱ -دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
*۲-استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
(نویسنده مسئول: shahnavaz@um.ac.ir)
۳-استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
٤-دانشجوی دکترا، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

مولکولی جدایه با استفاده از ژن 16srRNA نشان داد که باکتری به جنس Janthinobacterium تعلق دارند. روش تک متغیره نشان داد که متغیرهای دما، pH و درصد نشاسته بیشترین تاثیر را در تولید آنزیم دارا می‌باشند. مقایسه شرایط قبل و بعد از بهینه سازی نیز مشخص می‌سازد که میزان تولید انزیم از ۰/۰۹۴ به ۰/۱۱۶ واحد آنزیمی افزایش می‌یابد. در نتیجه اعمال شرایط بهینه شده با استفاده از روش RSM، ترشح آنزیم به میزان ۰/۴۳۴ واحد آنزیمی افزایش پیدا می‌کند.

واژه‌های کلیدی: Janthinobacterium sp. ،RSM، آمیلاز، باکتری مقاوم به سرما

مقدمه

اغلب میکروارگانیسم‌های موجود بر روی زمین قادر به رشد و گسترش در شرایط محیطی دشوار هستند که از آنها به عنوان اکسترموفیل‌ها یاد می‌شود (Cavicchioli, 2002). در بین آنها میکروارگانیسم‌های موجود در شرایط سخت، سرمادوست‌ها فراوان‌ترین میکروارگانیسم‌ها از نظر زیست توده، تنوع و توزیع هستند، که این امر در ارتباط با اثرات زیانبار کمتری است که دماهای پایین در مقایسه با pH های خیلی بالا و پایین و یا دماهای خیلی بالا روی ساختار سلولی دارند (Margesin and Feller, 2010) باکتری‌های مقاوم به سرما اغلب آنزیم‌هایی تولید می‌کنند که دمای بهینه آنها اغلب در دماهای متوسط و یا پایین است (Smith and Zahnley, 2005). آنزیم‌های تولید شده توسط این باکتری‌ها در دماهای پایین انرژی فعال سازی پایین و فعالیت بالایی را نشان می‌دهند (Morita et al., 1997). به دلیل مزیت‌هایی که این آنزیم‌ها نشان می‌دهند، در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. اغلب این آنزیم‌ها با یک افزایش متوسط در دما غیر فعال می‌شوند و به دلیل انجام واکنش در دماهای پایین خطر آلوده شدن با باکتری‌های میانه دوست کاهش می‌یابد. انجام واکنش در دماهای پایین باعث صرفه‌جویی در مصرف انرژی می‌شود(Gerday et al., 2000; Lu et al., 2010.) با استفاده از این آنزیم‌ها زمان انجام واکنش در دماهای پایین کاهش می‌یابد و می‌توان به تولیدات بالا در ترکیبات حساس به گرما دست یافت. در کنار این ویژگی‌های مطلوب، میکروارگانیسم‌های سرمادوست و مقاوم به سرما می‌توانند منبع ارزشمندی از

آنزیم‌های جدید با ویژگی‌های مطلوبی مانند اختصاصیت برای یک سوبسترای جدید و تولید محصول تازه باشند(Margesin et al., 2002) .

آمیلاز (EC ۳,۲,۱,۱) یک آنزیم تجزیه‌کننده نشاسته است که پیوند گلیکوزیدی (۴-۱) α را در نشاسته هیدرولیز و محصولاتی با وزن مولکولی کمتر مثل گلوکز، مالتوز و مالتوتزیوز تولید می‌کند (Souza, 2010). آمیلاز یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های صنعتی است که کاربردهای گسترده‌ای در صنایع مختلف دارد(Pandey et al., 2000) . متداول‌ترین کاربرد آلفا آمیلاز در صنایع نشاسته است، که از آن برای هیدرولیز نشاسته در فرایند مایع سازی نشاسته و تبدیل آن به شربت فروکتوز و گلوکز استفاده می‌شود (Gupta et al., 2003). استفاده از این آنزیم با منشا میکروبی در مواد شوینده توانایی آنها را برای حذف لکه‌های دشوار بالا برده و آنها را از نظر کاربردهای زیست محیطی ایمن می‌سازد. آمیلاز دومین نوع از آنزیم‌هایی هستند که در فرمولاسیون شوینده‌های آنزیمی به کار می‌روند و ۹۰% شوینده‌های مایع دارای آنزیم آمیلاز می‌باشند. آمیلازها به طور گسترده‌ای در صنایعی مانند پارچه‌بافی، پخت نان، تولید کیک، آبمیوه و شربت نشاسته کاربرد دارند (Souza, 2010).

آلفا آمیلاز به وسیله گیاهان، جانوران، باکتری‌ها و قارچ‌ها تولید می‌شود. آمیلاز به دست آمده از منابع گیاهی و باکتریایی سال‌ها به عنوان افزودنی غذایی کاربرد داشت. منابع میکروبی آمیلاز یعنی آمیلاز قارچی (Carrasco et al., 2016; Ominyi, 2013) ; و باکتریایی (Kuddus et al., 2012; Halder et al., 2014) کاربرد زیادی در صنایع مختلف دارند که به دلیل مزیت‌های زیاد آنها مانند قیمت مناسب، استحکام، زمان و فضای مورد نیاز کمتر برای تولید و نیاز نداشتن به مراحل تغییر و بهینه‌سازی است. پژوهش‌های متعدد نشان می‌دهد که آنزیم آمیلاز در میانه فاز لگاریتمی و یا با توجه به نوع باکتری در اوایل فاز سکون دارای بالاترین میزان ترشح می‌باشد. از طرفی ماهیت محیط کشت و شرایط فیزیکی آن مانند دما، pH، میزان هوادهی در میزان تولید آنزیم تاثیر می‌گذارد(Cotârlet and Bahrim, 2011) . به همین دلیل بهینه‌سازی شرایط رشد باکتری و تولید آنزیم همواره از اهداف پژوهشی به شمار می‌رود. در شرایط بهینه‌سازی تک متغیره، شرایط تولید آنزیم در یکی از شرایط بهینه می‌شود و سپس شرایط آزمایش بعدی براساس مرحله قبل طراحی می‌شود. در این روش، بهینه‌سازی هر یک از متغیرها به صورت مستقل از هم صورت می‌گیرد، در حالی که بین آنها برهم کنش‌هایی وجود دارد. به منظور بررسی این بر هم‌کنش‌ها از روش‌های آماری

مختلف مانند روش طراحی رویه سطح پاسخ (Response surface methodology) استفاده می‌شود. روش طراحی رویه سطح پاسخ شامل مجموعه‌ای از روش‌های تجربی، ریاضی و تحلیل‌های آماری برای طراحی آزمایش، مدل‌سازی، تعیین شرایط بهینه برای هر متغیر و بررسی بر هم‌کنش بین متغیرهای مختلف می‌باشد که رابطه میان متغیرهای مورد آزمایش را ارزیابی کرده و پاسخ حاصل را اندازه‌گیری می‌کند (Zou et al., 2010). این روش شامل دو نوع طراحی می‌باشد؛ طراحی مرکب مرکزی (Central Composite Design) و باکس بنکن (Box and Behnken, 1960).

میکروارگانیسم‌های فعال در سرما دارای ویژگی‌ها و قابلیت‌های منحصر به فردی جهت کاربردهای بیوتکنولوژی می‌باشند. با توجه به این که باکتری‌های مقاوم به سرما قادرند آنزیم‌هایی تولید کنند که فعالیت بهینه آنها در دماهای پایین و نزدیک به دماهای محیط است، آنها را از نظر اقتصادی حائز اهمیت کرده است. با وجود مطالعاتی که در دنیا در این زمینه صورت گرفته است (Caf et al., 2014; Liu et al., 2011; Lu et al., 2010). در ایران تعداد کمی مطالعه درباره باکتری‌های فعال در سرما صورت گرفته است. در این پژوهش برای اولین بار شرایط رشد و تولید آنزیم آمیلاز خارج سلولی در باکتری *Janthinobacterium sp.* که یک سویه مقاوم به سرما بوده و از ارتفاعات بینالود جداسازی و شناسایی شده است، ابتدا با روش تک متغیره بهینه شد. در مرحله بعدی به منظور بررسی برهم کنش بین متغیرها و تعیین شرایط بهینه نهایی از روش طراحی روی سطح پاسخ RSM استفاده شد.

مواد و روش ها

جداسازی و شناسایی باکتری مقاوم به سرما

جدایه ATR 812 از ارتفاع ۱۰۰۰ متری کوه‌های بینالود واقع در خراسان رضوی شمال شرقی ایران (طول ۵۸ درجه، ۵۱ دقیقه، ۹ ثانیه شرقی ـ عرض ۳۶ درجه، ۲۵ دقیقه و ۳۸ ثانیه شمالی) جداسازی شد. رقت‌های متوالی از نمونه خاک تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون خاک به محیط کشتTSA (Tryptic Soy Agar) منتقل و در حرارت °C ۲۰ گرماگذاری شدند. به منظور شناسایی جدایه‌های سرمادوست، مقاوم به سرما و میانه‌دوست آزمون دمایی صورت گرفت. هر یک از جدایه‌های خالص شده به دماهای ٤، ۲۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. جدایه‌هایی که قادر به رشد در °C ٤ بودند، ولی در °C ۲۰ درجه رشد نکردند، به عنوان سرمادوست و جدایه هایی که در ٤ و ۲۰ درجه سانتی‌گراد قادر به رشد بودند و در °C ۳۷ رشد نکردند، مقاوم به سرما و

جدایه‌هایی که در ۴ °C درجه رشد نکردند و در ۲۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد قادر به رشد بودند، به عنوان میانه‌دوست معرفی شدند (Yu et al., 2011). این سویه پس از شناسایی مولکولی با استفاده از ژن rRNA16s و با استفاده از پرایمرهای عمومی به عنوان *Janthinobacterium* sp. ATR812 و با شماره شناسایی KM459535 در NCBI ثبت گردید.

رشد و تولید آمیلاز

بررسی اولیه فعالیت آمیلازی با تلقیح باکتری *Janthinobacterium* sp. ATR812 در محیط TSA حاوی ۱% نشاسته صورت گرفت. غلظت استاندارد از باکتری تهیه و ۱۰ µl از سوسپانسیون باکتری به محیط کشت تلقیح شده و به مدت ۵ روز در دمای ۲۰ °C نگهداری شد. سپس محلول لوگل به محیط اضافه گردید. ایجاد هاله شفاف در اطراف کلنی باکتری نشان دهنده فعالیت آمیلازی و تجزیه نشاسته می‌باشد. سنجش کمی فعالیت آمیلازی با روش Brenfeld انجام شد (Brenfeld, 1995). به این منظور به ml ۲۰ محیط TSB حاوی ۱% نشاسته (pH: 6/8) غلظت ۰/۵ مک فارلند از باکتری تلقیح شده و در حرارت ۲۰ °C با دور ۱۵۰ rpm گرماگذاری گردید. بررسی فعالیت آمیلازی هر ۲۴ ساعت و به مدت شش روز انجام شد. محیط کشت حاصل جهت حذف باکتری به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. محلول رویی عصاره خام حاوی آنزیم می‌باشد.

مخلوط واکنش شامل ۲۵۰ میکرولیتر محلول رویی حاوی آنزیم و ۲۵۰ میکرولیتر نشاسته (w/v1%) محلول در بافر فسفات (pH: 6/8) در دمای ۳۰ °C به مدت ۱۵ دقیقه می‌باشد. واکنش با اضافه کردن ۵۰۰ میکرولیتر دی نیتروسالیسیک اسید متوقف شده و سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۴۰nm تعیین شد. یک واحد فعالیت آنزیمی مقدار آنزیمی است که یک میلی‌گرم قند احیا شده مالتوز را در یک دقیقه آزاد کند.

بهینه‌سازی شرایط رشد و تولید آنزیم به روش تک متغیره

به منظور بهینه سازی شرایط کشت و تولید آنزیم اثر برخی عوامل مانند زمان گرماگذاری، دما،pH ، نوع منبع کربن، نوع منبع نیتروژن، درصد نشاسته و میزان تلقیح مورد بررسی قرار گرفت. به منظور اندازه‌گیری تاثیر دوره انکوباسیون رشد و تولید آمیلاز در محیط کشت (TSB حاوی ۱% نشاسته) در ۲۰°C و در فاصله زمانی ۲۴h به مدت ۱۴۴h با دور ۱۵۰mpr تعیین شد. به منظور تعیین دما و Hp بهینه، محیط کشت حاوی باکتری به ترتیب در دماهای مختلف ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۷ درجه سانتیگراد و Hp

(٤، ٦، ٩ و ١١) و در شیکر با دور ۱۵۰rpm گرماگذاری شد. تاثیر منبع کربن و نیتروژن خارجی روی رشد و تولید آمیلاز با افزودن (w/v 1%) از هریک از منابع کربن گلوکز، مالتوز، ساکارز، نشاسته و گلیسرول و منابع نیتروژن عصاره مخمر، پپتون، اسکیم میلک، آمونیوم سولفات و محیط بدون منبع نیتروژن بررسی شد. در بررسی اثر مقادیر متفاوت نشاسته به محیط کشت درصدهای ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ اضافه شد. اثر مقادیر مختلف تلقیح (v/v، ۵، ۱، ۲ و ۳) روی رشد و تولید آمیلاز از کشت باکتری به محیط بهینه شده در مرحله قبل تلقیح شد.

بهینه سازی تولید آمیلاز با روش Response surface methodology

در این پژوهش سه متغیر دما، pH و درصد نشاسته که بیشترین تاثیر را با استفاده از روش تک متغیره روی تولید آمیلاز داشتند، در سه سطح (+)، (۰) و (−) و با سه تکرار برای تعیین پاسخ سطح درجه دو مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۱). آنالیز رگرسیون برای ارزیابی دقت و صحت نتایج حاصل انجام شده است. برای این منظور، فعالیت آنزیم به عنوان متغیر وابسته یا پاسخ (Y) در نظر گرفته شده است. بر اساس نتایج این روش، یک مدل چندجمله‌ای درجه دوم برای پیشگویی پاسخ در نظر گرفته شده است. طراحی آزمایش با نرم افزار (ver.16) Minitab انجام شد. متغیرهای مورد بررسی در این پژوهش و محدوده اثر آنها در جدول ۱ ذکر شده است.

جدول ۱: جدول سطوح و متغیرهای کد گذاری شده در پژوهش برای طراحی آزمایش Box-Behnken

متغیرهای مستقل	کدها	سطوح کد گذاری		
		−۱	۰	+۱
درجه حرارت (سانتی گراد)	X_1	۱۵	۲۰	۲۵
pH	X_2	۵	۷	۹
نشاسته (*%w/v*)	X_3	۰/۵	۱	۱/۵

در این روش یک مدل چند جمله ای درجه دوم برای پیشگویی پاسخ در نظرگرفته شده است .مدل پیشنهادی برای هر پاسخ (Y) به صورت معادله است:

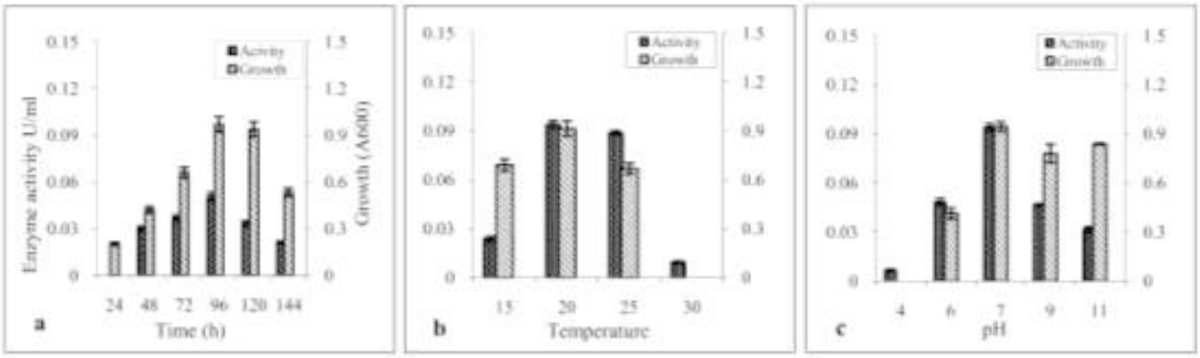
$$Y = \beta0 + \beta1X1 + \beta2X2 + \beta3X3 + \beta4X4 + \beta22X22 + \beta33X32 + \beta44X42 + \beta12X1X2 + \beta13X1X3 + \beta14X1X4 + \beta23X2X3 + \beta24X2X4 + \beta34X3Xs$$

در این معادله Y پاسخ پیش‌گویی شده، β0 ثابت مدل، X۱، X۲ ، X۳و X٤ متغیرهای مستقل، β۱ ۲، β۳، β٤ ضرایب خطی و β۱۱ ،β۲۲، β۳۳ و β٤٤ ضرایب درجه دو هستند.

نتایج و بحث

بهینه‌سازی تک متغیره

Janthinobacterium sp. ATR812 باکتری گرم منفی، میله‌ای شکل، کاتالاز مثبت و فاقد اسپور است. این باکتری در محیط کشت TSA دارای کلنی صاف بوده و رنگدانه بنفش تولید می‌کند. بیشترین فعالیت آنزیم در فاز سکون و پس از ۹٦ ساعت بدست آمد که نشان می‌دهد در این سویه تولید آنزیم وابسته به رشد سلول است. در بررسی اثر دما بیشترین میزان رشد و فعالیت آنزیم در دمای ۲۰ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد و پس از آن در دمای ۱۵ °C مشاهده شد، در حالی که افزایش دما تا حدود ۳۰ °C کاهش رشد و فعالیت آنزیم را به همراه دارد. pH بهینه برای رشد و تولید آنزیم در این سویه در ۷ : U/ml (۰/٤۹۰Hp) می‌باشد (شکل ۱). رشد باکتری در شرایط قلیایی ۹، ۱۱ و نسبتا اسیدی ٦ ادامه دارد، و فعالیت آنزیمی در شرایط قلیایی و نسبتا اسیدی همچنان بالاست، در حالی که در pH= ٤ تقریبا متوقف می‌شود (شکل ۱).

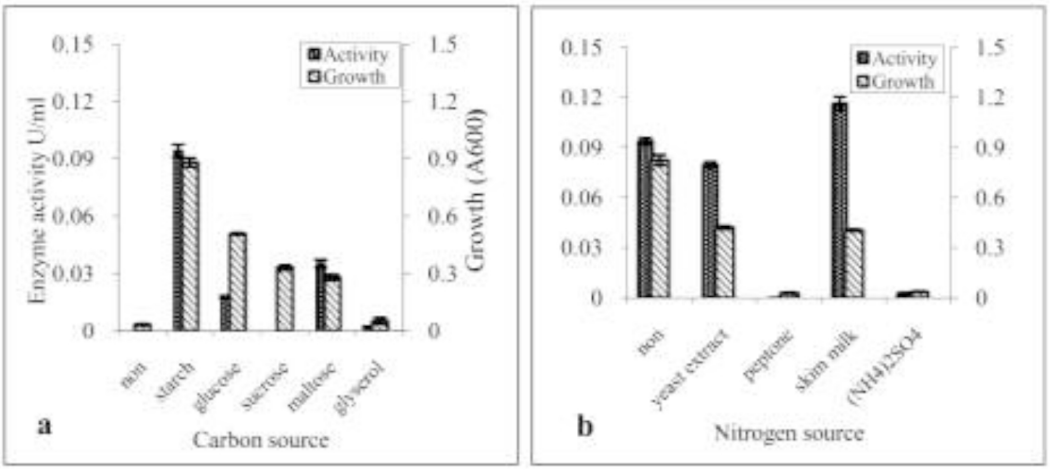


شکل ۱: اثر (a) زمان گرماگذاری، (b) دما و (c) pH روی رشد و تولید آنزیم آمیلاز در باکتری *Janthinobacterium* sp. ATR812

رشد در حضور همه منابع کربنی دیده می‌شود، در حالی که بالاترین فعالیت آنزیمی در حضور ۱% نشاسته (۰/۰۹٤ U/ml) و سپس مالتوز (۰/۰۳۵ U/ml) دیده می‌شود. با توجه به این که در نمونه کنترل که فاقد منبع کربن خارجی می‌باشد، هیچ فعالیت آمیلازی مشاهده نشد، نتیجه بدست آمده نشان می‌دهد که بیان آنزیم آمیلاز در این سویه القایی می‌باشد. کاهش تولید آمیلاز در حضور گلوکز نیز موید این مطلب می‌باشد. Smith و همکارانش گزارش کردند که بیشترین تولید آمیلاز در حضور نشاسته به عنوان

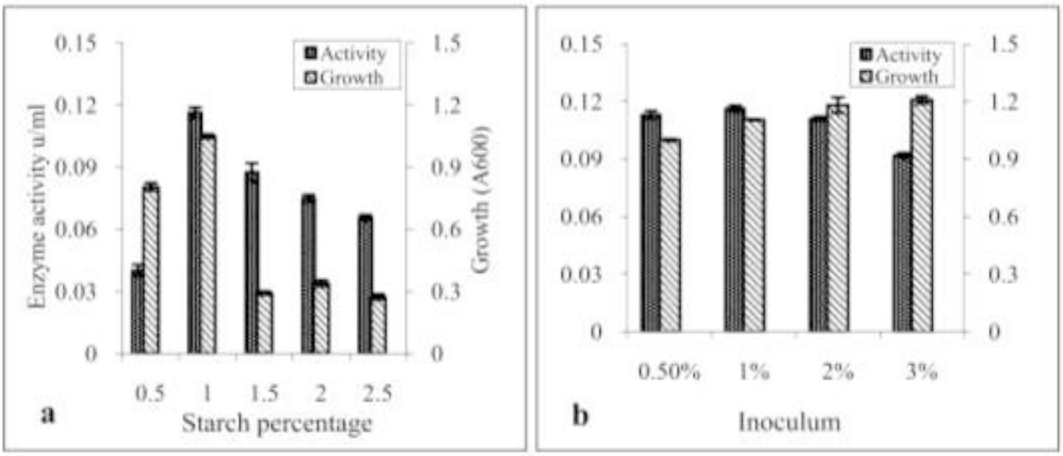
منبع کربن بوده هم چنین تولید آمیلاز در حضور گلوکز تا حد زیادی کاهش یافته که می‌تواند به دلیل اثر مهارکنندگی گلوکز بر روی تولید آمیلاز در این گونه باشد (Smith and Zahnley, 2005) (شکل ۲). بیشترین میزان فعالیت آنزیمی در محیط دارای اسکیم میلک (۰/۱۱٦ U/ml) مشاهده شد. در برخی مطالعات کاهش تولید آمیلاز با افزودن منابع نیتروژن غیر آلی، عصاره مخمر و کازئین گزارش شده است (Lu et al., 2010).

Anto و همکاران گزارش کردند که افزودن منبع نیتروژن خارجی در برخی سویه‌ها می‌تواند باعث مهار تولید آمیلاز می‌شود (Anto et al., 2006) با توجه به این که در بررسی‌ها نشان داد این سویه دارای فعالیت پروتئازی مثبت بوده و اسکیم میلک القاکننده تولید پروتئاز می‌باشد، بنابراین سویه به دلیل داشتن فعالیت پروتئازی منبع نیتروژن اسکیم میلک اثر مهارکنندگی نداشته است (شکل ۲).



شکل ۲: اثر (a) منابع کربنی و (b) اثر منابع نیتروژنی روی رشد و تولید آنزیم آمیلاز در باکتری *Janthinobacterium sp.* ATR812

بررسی آماری در سطح اطمینان ۹۵% نشان داد تولید آنزیم در جدایه ATR ۸۱۲ در ۱% نشاسته اختلاف معناداری با دیگر مقادیر دارد (شکل ۳). در بررسی‌هایی که بر روی درصدهای مختلف نشاسته صورت گرفت، مقادیر مختلفی به عنوان سطح بهینه گزارش شد (Cotarlet and Bahrim, 2011; Couda and Elbahloul, 2008; Tanyildizi et al., 2006). مجموع این پژوهش‌ها نشان می‌دهد که درصد نشاسته بهینه برحسب سویه باکتری مورد نظر می‌تواند متغیر باشد. بررسی آماری در مورد جدایه ATR۸۱۲ اختلاف معناداری را بین مقادیر ۰/۵ و ۱ درصد تلقیح نشان نداد و به دلیل رشد بیشتر باکتری در ۱% تلقیح، این مقدار به عنوان بهینه در نظر گرفته شد (شکل ۳).



شکل ۳: (a) درصد نشاسته و (b) درصد تلقیح روی رشد و تولید آنزیم آمیلاز در باکتری *Janthinobacterium* sp. ATR812

بهینه‌سازی به روش طراحی رویه سطح پاسخ

متغیرهای دما، pH و مقدار نشاسته در تولید آمیلاز نقش مهم‌تری دارند. به منظور بررسی برهم کنش بین این متغیرها و تعیین شرایط بهینه، طراحی آزمایش به روش Box-Behnken انجام شد. ۱۵ آزمایش طراحی و اثر متغیرهای مورد نظر در سطوح مختلف مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۲).

جدول ۲: طراحی آزمایش های Box-Behnken همراه با پاسخ های اندازه‌گیری شده و پیشگویی شده به منظور بهینه‌سازی تولید آنزیم آمیلاز در باکتری *Janthinobacterium sp. ATR812*

Run order	Tem. (°C)	pH	Starch%	Amylase activity U/ml	
				Experimental	*predicted*
۱	۲۰	۷	۱/۰	۰/۱۲۹	۰/۱۱
۲	۲۵	۷	۰/۵	۰/۴۷۵	۰/۴۳۲
۳	۲۰	۹	۰/۵	۰/۰۴	۰/۰۷۲
۴	۱۵	۷	۰/۵	۰/۰۱۸۹	۰/۰۳۶
۵	۱۵	۷	۱/۵	۰/۱۲۱	۰/۱۶۴
۶	۲۰	۵	۱/۵	۰/۰۰۰۰	-۰/۰۳۲
۷	۲۰	۷	۱/۰	۰/۰۸۵	۰/۱۱
۸	۲۰	۵	۰/۵	۰/۰۴۳	۰/۰۳۵
۹	۲۰	۷	۱/۰	۰/۱۱۶	۰/۱۱
۱۰	۲۵	۷	۱/۵	۰/۳۵۱	۰/۳۳۳
۱۱	۱۵	۵	۱/۰	۰/۱۶۵	۰/۱۵۴
۱۲	۱۵	۹	۱/۰	۰/۰۰۰۰	-۰/۰۵
۱۳	۲۵	۵	۱/۰	۰/۰۶۲	۰/۱۱۲
۱۴	۲۰	۹	۱/۵	۰/۱۶۲	۰/۱۶۹
۱۵	۲۵	۹	۱/۰	۰/۰۴۶	۰/۵۵۶

در باکتری Janthinobacterium sp. strain ATR812 تاثیر متغیرهای دما و pH در تولید آمیلاز معنی‌دار می‌باشند. pH محیط کشت از مهمترین متغیرهایی است که انجام واکنش‌های آنزیمی، تولید و پایداری آنزیم را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Banerjee and Bhattacharyya, 1992). در روش سطح پاسخ دمای بهینه برای تولید آمیلاز ۲۵ °C و pH بهینه ۹ می‌باشد که با نتایج حاصل از روش تک متغیره اندکی متفاوت می‌باشد. این پدیده می‌تواند به دلیل برهم کنش دما با pH در این سویه باشد. این بر همکنش به صورت جالبی نشان می‌دهد که فعالیت آنزیمی در حرارت پایین و شرایط قلیایی در حالت بهینه قرار دارد. آنزیم‌های باکتری‌های مقاوم به سرما و قلیادوست کاربردهای گسترده‌ای در تولید شوینده‌ها و صنایع پارچه بافی کاربرد دارند (Abou-Elela et al., 2009)

معادله چند جمله‌ای بدست آمده از آنالیز رگرسیون برای *Janthinobacterium* sp. ATR812 به صورت زیر می‌باشد که در این معادله فعالیت آمیلاز (Y) به عنوان تابعی از مقدار متغیرهای مستقل است.

YJanthinobacterium sp.=0.110+0.141X1+059X2+0.007X3+0.131X12-0.048X22-0.0003X32+0.162X1X2-0.056X1X3+0041X2X3

در این معادله Y فعالیت آنزیمی و متغیرهای X۱، X۲ و X۳ به ترتیب دما، pH و درصد نشاسته هستند. معادله نشان می‌دهد که ضریب هر سه متغیر مثبت می‌باشد. مثبت بودن ضریب رگرسیون متغیرها نشان می‌دهد که مقادیر بالاتر این متغیرها باعث افزایش تولید آمیلاز می‌شود. دما اثر بیشتری در تولید آنزیم آمیلاز دارد، زیرا ضریب خطی آن (۰/۱٤۱) بالاتر از pH (۰/۰۵۹) و درصد نشاسته (۰/۰۰۷) می‌باشد.

صحت مدل با استفاده آنالیز واریانس(ANOVA) بررسی شد (جدول ۳). داده‌های ANOVA دقت این مدل درجه دوم را تأیید می‌کند. پارامتر F معیاری از انحراف داده‌ها از مقدار میانگین است. مقدار پارامتر F Prob کمتر از ۰/۰۵ نیز به معنی معنی‌دار بودن مدل است. معنی دار بودن اثر متغیرها روی تولید آمیلاز و برهم کنش بین متغیرها از طریق مقادیر p-value تعیین می‌شود. مقادیر 05/0P< نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اثر متغیر در تولید آمیلاز و برهم کنش بین دو متغیر می‌باشد. در این پژوهش مقدار p-valueبرای متغیر دما (۰/۰۰۱) و pH (۰/۰۲۱) می‌باشد که نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اثر متغیرها می‌باشد. از سویی دیگر p-value برهم کنش بین متغیرهای دما و pH (X1X2) ۰/۰۰۱ بوده است که نشان‌دهنده واکنش معنی‌دار بین آنها می‌باشند.

توانایی پیش‌بینی کلی مدل به وسیله اندازه‌گیری مقدار R۲ شرح داده می‌شود که

معیاری از میزان تطبیق پذیری نتایج بدست آمده با نتایج پیش‌بینی شده است. R۲ برای این سویه ۹۶/۸۱ درصد بود. هر قدر مقدار R۲ به ۱۰۰ در صد نزدیک‌تر باشد، نشان‌دهنده تطابق بهتر داده‌های تجربی با مقادیر پیش‌بینی شده است. عدم انطباق (Lack- of- fit)که معیاری از ناکارآمدی مدل در داده‌های موجود در دامنه آزمایش و بیانگر مقایسه بین خطای خالص و خطای باقی مانده در آزمایش‌ها است، در باکتری مورد نظر ۰/۱۱۸ بدست آمد که نشان دهنده انطباق داده‌ها با مدل است.

جدول ۳: آنالیز واریانس (ANOVA) مدل چند جمله ای درجه دو فعالیت آمیلازی

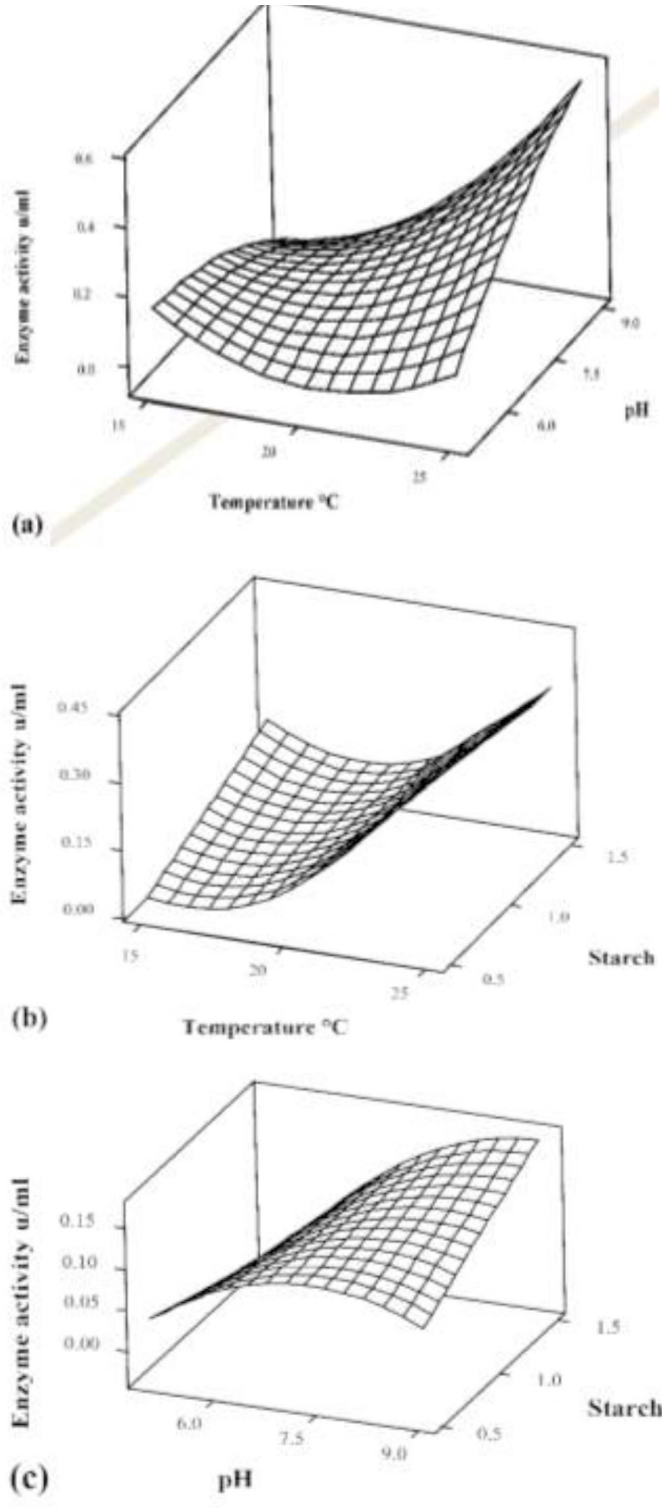
Source	*Sum of squares*	*DF*	*Mean squares*	*F-value*	*Probability (p) > F*
Model	۰/۳۹	۹	۰/۰۴۳	۱۶/۸۵	۰/۰۰۳
Residual	۰/۰۱۲	۵	۰/۰۰۲		
Lake of fit	۰/۰۱۱	۳	۰/۰۰۳	۷/۶۶	۰/۱۱
Pure error	۰/۰۰۱	۲	۰/۰۰۰۵		
Corrected total	۰/۴۰	۱۴			
R^2 = ۹۶/۸۱	R^2_{Pred} =۵۲/۴۳	R^2_{adj} =۹۱/۰۶			

اثر سه متغیر مورد بررسی روی تولید آمیلاز به صورت نمودار در شکل ٤ نشان داده شده است. این نمودارها اثر برهم‌کنش بین دو متغیر دما و pH، دما و درصد نشاسته و pH و درصد نشاسته روی تولید آنزیم در باکتری *Janthinobacterium* sp. ATR812را نشان می‌دهد. در هر یک از این نمودارها متغیر سوم ثابت بوده و بر هم‌کنش بین دو متغیر دیگر روی تولید آمیلاز بررسی شد. نتایج نشان می‌دهد که متغیرهای دما و pH دارای بر هم کنش می‌باشند، و ضریب رگرسیون مربوط به بر هم‌کنش این دو متغیر مثبت می‌باشد. به این ترتیب که افزایش دما تا ۲۵ °C همزمان با افزایش pH تا ۹ تولید آمیلاز را افزایش می‌دهد (شکل a٤). در بر هم‌کنش بین درصد نشاسته و دما افزایش دما تا ۲۵ °C باعث افزایش تولید آمیلاز می‌شود، در صورتی که افزایش میزان نشاسته تاثیری در افزایش تولید آنزیم ندارد. مقدارp-value برای درصد نشاسته و برهم کنش آن با دما معنی‌دار نمی‌باشد (شکل b٤).

نرم افزار بهترین شرایط تولید آنزیم را برای باکتری *Janthinobacterium* sp. strain ATR812 در دمای ۲۵ °C، pH=۹ و ۰/۵ درصد نشاسته مدلسازی می‌کند. این شرایط به منظور تولید آنزیم در شرایط تجربی بازسازی شده و فعالیت آنزیمی حاصل از آن اندازه‌گیری شد. میزان فعالیت آنزیم در این شرایط ۰/٤۳٤ واحد فعالیت آنزیمی بود و مقدار پیشنهاد شده توسط نرم افزار ٥٦٤/. واحد فعالیت آنزیمی می‌باشد. این نتیجه

مقدمه

بیماری برگ بادبزنی مو یکی از مهمترین بیماری های تاکستان های انگور می باشد



شکل ٤: اثر (a) دما و pH، (b) دما و درصد نشاسته و pH (c) و درصد نشاسته روی تولید آنزیم آمیلاز در نمودارهای سه بعدی

پاسخ سطح

در نهایت با انجام بهینه سازی به روش RSM میزان تولید آنزیم ۳/۷ برابر نسبت به روش تک متغیره و ۸/۵ برابر نسبت به شرایط اولیه افزایش یافت. Cotârlet و همکاران با استفاده از روش RSM میزان تولید آمیلاز در باکتری مقاوم به سرما Streptomyces MIUG ٤ را ۲/۸ برابر افزایش دادند (Cotârleţ, 2013). مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که بهینه‌سازی تولید آنزیم به روش RSM روش مناسبی برای بهبود تولید آمیلاز بوده و اهمیت این روش را نسبت به روش تک متغیره نشان میدهد (Shabbiri et al., 2012; Kuddus, 2014).

سپاسگزاری

انجام این طرح تحقیقاتی با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد در قالب طرح شماره ۲۷۱٤۰/۳ انجام شده است. از آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی میکروبی گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

Abou-elela, G., El-sersy, N. A. and Wefky, S. (2009) Statistical optimization of cold adapted α-amylase production by free and immobilized cells of Nocardiopsis aegyptia. Journal of Applied Science Research 5(3): 286-292.

Anto, H., Trivedi, U. and Patel, K. (2006) Alpha Amylase Production by Bacillus cereus MTCC 1305 Using Solid-State Fermentation. Food Technology and Biotechnology 44(2): 241–245.

Banerjee, R. and Bhattacharyya B. (1992) Extracellular alkaline protease of newly isolatedRhizopus oryzae. Biotechnology letters 14(4): 301-304.

Box, G. E. and Behnken, D. W. (1960) Some new three level designs for the study of quantitative variables. Technometrics 2(4): 455-475.

Brenfeld, P. (1995) Amylases, alpha and beta. In: Colowick SP, Kaplan ON, editors. Methods in enzymology Academic Press Inc., New York, 149–58.

Caf, Y., Valipour, E. and Arikan, B. (2014) Isolation and Characterization of Alkalin, Halotolerant, Detergent-Stable and Cold-Adaptive-Amylase from a Novel Iso-

late Bacillus sp. Calp12-7. International Journal Current Microbiology and Applied Sciences 3(4): 950-960.

Carrasco, M., Villarreal, P., Barahona, S., Alcaíno, J., Cifuentes, V. and Baeza, M. (2016) Screening and characterization of amylase and cellulase activities in psychrotolerant yeasts. BMC Microbiology 16: 21.

Cavicchioli, R. (2002) Extremophiles and the search for extraterrestrial life. Astrobiology 2 (3) 281-292.

Cotârleţ, M. (2013) Medium optimization for the production of cold-active beta amylase by psychrotrophic Streptomyces MIUG 4 alga using response surface methodology. Microbiology 82(2): 147-154.

Cotârlet, M. and Bahrim, G. E. (2011) Optimization of cold-adapted amylases and protease production by psychrotrophic Streptomyces 4 Alga using response surface methodology. Turkish Journal of Biochemistry/Turk Biyokimya Dergisi 36(2):83-92.

Gerday, C., Aittaleb, M., Bentahir, M., Chessa, J. P., Claverie, P., Collins, T., D'amico, S., Dumont, J., Garsoux, G. and Georlette, D. (2000) Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. Trends in biotechnology 18(3): 103-107.

Gouda, M. and Elbahloul, Y. (2008) Statistical optimization and partial characterization of amylases produced by Halotolerant *Penicillium* sp. World Journal of Agricultural Sciences 4(3): 359-368.

Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K. and Chauhan, B. (2003)Microbial α-amylases: a biotechnological perspective. Process Biochemistry, 38(11): 1599-1616.

Halder, D., Biswas, E. and Basu, M. (2014) Amylase production by *Bacillus cereus strain* BRSC-S-A26MB under optimal laboratory condition. International Journal of Current. Microbiology and Applied Sciences 3(6):1035-1047.

Kuddus, M. (2014) Bio-statistical approach for optimization of cold-active α-amylase production by novel psychrotolerant *Microbacterium foliorum* GA2 in solid state fermentation. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 3: 175-181.

Kuddus, M., Roohi., A. and Ahmad, I. Z. (2012) Cold-active extracellular α-amylase

production from novel bacteria *Microbacterium foliorum* GA2 and Bacillus cereus GA6 isolated from Gangotri glacier, Western Himalaya. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology 10(1): 151-159.

Liu, J., Zhang, Z., Liu, Z., Zhu, H, Dang, H., Lu J. and Cui Z. (2011) Production of cold-adapted amylase by marine bacterium *Wangia* sp. C52: optimization, modeling, and partial characterization. Marine Biotechnology 13(5): 837-844.

Lu, M. S., Fang, Y., Li, H., Liu, H. and Wang, S. (2010) Isolation of a novel cold-adapted amylase-producing bacterium and study of its enzyme production conditions. Annals of Microbiology 60(3): 557-563.

Margesin, R. and Feller, G. (2010) Biotechnological applications of psychrophiles. Environmental Technology 31(8-9): 835-844.

Margesin, R., Zacke, G. and Schinner, F. (2002) Characterization of heterotrophic microorganisms in alpine glacier cryoconite. Arctic, Antarctic, and Alpine Research 34(1): 88-93.

Morita, Y., Nakamura, T., Hasan, Q., Murakami, Y., Yokoyama, K. and Tamiya, E. (1997) Cold-active enzymes from cold-adapted bacteria. Journal of the American Oil Chemists› Society 74(4): 441-444.

Ominyi, M. C. (2013) Optimization of α-amylase and glucoamylase production from three fungal strains isolated from Abakaliki, Ebonyi State. European Journal of Experimental Biology 3(4): 26-34.

Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C., Soccol, V., Singh, D. and Mohan, R. (2000)Advances in microbial amylases. Biotechnology and Applied Biochemistry 31:135-152.

Shabbiri, K., Adnan, A., Noor, B. and Jamil, S. (2012) Optimized production, purification and characterization of alpha amylase by *Brevibacterium* linens DSM 2015, using bio-statistical approach. Annals of Microbiology 62(2): 523-532.

Smith, M. R. and Zahnley, J. C. (2005) Production of amylase by *Arthrobacter psychrolactophilus*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 32(7): 277-283.

Souza, P. M. D. (2010) Application of microbial α-amylase in industry-A review. Brazilian Journal of Microbiology 41(4): 850-861.

Tanyildizi, M. S., Elibol, M. and Özer D. (2006) Optimization of growth medium for the production of α-amylase from Bacillus amyloliquefaciens using response surface methodology. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 81(4): 618-622.

Yu, Y., Li, H. R., Zeng, Y. X. and Chen, B. (2011) Bacterial diversity and bioprospecting for cold-active hydrolytic enzymes from culturable bacteria associated with sediment from Nella Fjord, Eastern Antarctica. Marine Drugs 9(2): 184-195.

Zou, X., Chen, C. F., Hang, H. F., Chu J., Zhuang, Y. P. and Zhang, S. L. (2010)Response surface methodology for optimization of the erythromycin production by fed-batch fermentation using an inexpensive biological nitrogen source. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly 24(1): 95-100.