

# جداسازی *Isoptericola variabilis* تحمل کننده حرارت و بهینه‌سازی تولید اگزوگلوکانازی آن

مریم عزیزی<sup>1</sup>، جعفر همت<sup>2\*</sup>

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 اگزوگلوکاناز 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.gdaxanthomonas*، *Promicromonospora* sp.، *Chelatococcus daeguensis mexicana* و *Isoptericola variabilis* sp. نشان دادند. در میان جدایه‌ها، سویه منتخب به عنوان IDAH9. *Isoptericola variabilis* sp. 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 اگزوگلوکاناز مقاوم به حرارت از منابع کربنی ارزان قیمت باشد. کلیدواژگان: ترموفیل‌ها، *Isoptericola variabilis*، اگزوگلوکاناز، سلولاز.

## 1- مقدمه

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-

سلولز فراوانترین کربوهیدرات توده سلول گیاهی موجود در طبیعت است که برخلاف دیگر منابع، مثلاً 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

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: 0/25% 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 آگزوگلوکانازی و میزان رشد

سنجش فعالیت آگزوگلوکانازی ( $Fpase^3$ ) 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 آگزوگلوکانازی، جدایه‌ها از محیط کشت

بتا-1و4 گلوکاناز، آگزو- بتا-1و4 گلوکاناز ( $Fpase^1$ ) یا  $CBH^2$ ) و بتا-گلوکوزیداز است [3]. آگزوگلوکاناز بر روی انتهای زنجیره سلولز عمل می‌کند و بتا سلوبیوز را به عنوان محصول نهایی آزاد می‌کند [4]. از جمله ویژگی‌های سلولزباکتریایی 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 و هاپیترموفیل به واسطه مقاومت حرارتی کاتالیست‌هایشان شایان اهمیت هستند. باکتری‌های ترموفیل و ترموتولرانت میکروارگانیزم‌هایی هستند که رشد بهینه آنها در دمای بالاتر از 45 درجه سلسیوس می‌باشد. میکروارگانیزم‌های 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 ارگانیزم‌های مزوفیل کارآمدی بیشتر از انواع مزوفیل دارند [2]. تاکنون مطالعات زیادی برای جداسازی باکتری‌های ترموفیل تولید کننده سلولاز انجام گرفته است [6-14]. هدف از این مطالعه جداسازی، شناسایی باکتری‌های تولید کننده آگزوگلوکاناز از چشمه‌های آب گرم دهلران، ارزیابی فعالیت آگزوگلوکانازی جدایه‌ها، انتخاب بهترین سویه تولید کننده آگزوگلوکاناز 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-

1. Filter paper ase  
2. Cellobiohydrolases: CBH

3. Filter paper assay

(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، 1 سیکل 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.

#### 2-4-4-2- بهینه‌سازی محیط کشت تولید آنزیم

##### 2-4-4-2-1- اثر القاگر بر تولید آنزیم

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

##### 2-4-4-2-2- 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.

##### 2-4-4-2-3- 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.

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 میلی لیتر بافر فسفات (pH = 7) به‌علاوه 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 [11، 16، 17]. 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 جدا شده 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 فرمتاز استخراج گردید. DNA استخراجی به عنوان الگو ژن 16SrRNA با به کار بردن پرایمرهای یونیورسال:

F-16s

(5CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCC

معیارها به وسیله نرم افزار اکسل محاسبه شدند. زمانی که  $P < 0/05$  value،  $P < 0/01$  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 ایجاد هاله 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 اگزوگلوکاناز (FPase) بالاتری نشان داد (شکل 1).

توالی ژنی 16S rRNA، 4 جدایه مذکور در NCBI، BLAST گردید. شناسایی مولکولی نشان داد جدایه‌های  $D_2$ ،  $D_3$ ،  $D_5$  و  $D_9$  (بر اساس درصد مشابهت و به ترتیب) متعلق به گونه‌های ( $99\%$ ) *Pseudoxanthomonas mexicana* ( $99\%$ )، *Chelatococcus daeguensis* ( $98\%$ )، *Promicromonospora sp.* ( $99\%$ )، *Isoptericola sp.* می‌باشند.

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

#### 2-4-4- اثر منبع نیتروژن بر تولید آنزیم

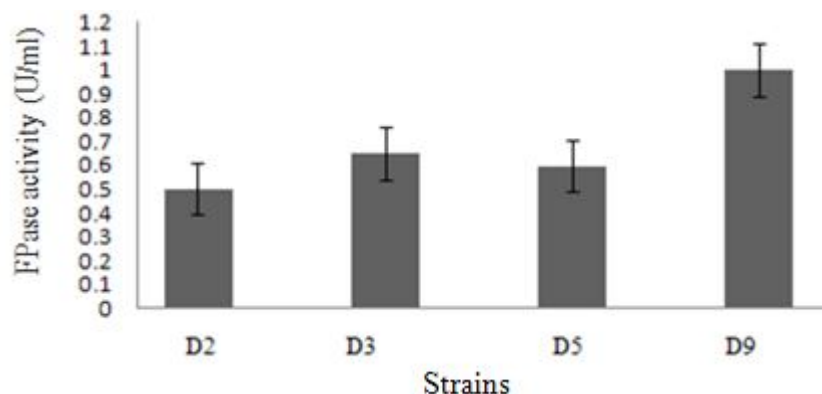
به منظور بررسی اثر منبع نیتروژن بر تولید آنزیم، مقادیر متفاوت از سولفات آمونیوم،  $1/4$  گرم بر لیتر،  $2/8$  گرم بر لیتر،  $5/6$  گرم بر لیتر،  $8/4$  گرم بر لیتر،  $11/2$  گرم بر لیتر،  $16/8$  گرم بر لیتر محیط مورد استفاده قرار گرفت. سپس میزان تولید اگزوگلوکاناز آن اندازه‌گیری شد.

#### 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 قرار گرفتن 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 بر اساس میانگین‌های انحراف معیار ( $\pm SD$ ) بیان شدند. ارور بارها با استفاده از میانگین‌ها و انحراف



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 ( $P^* < 0.01$ ).

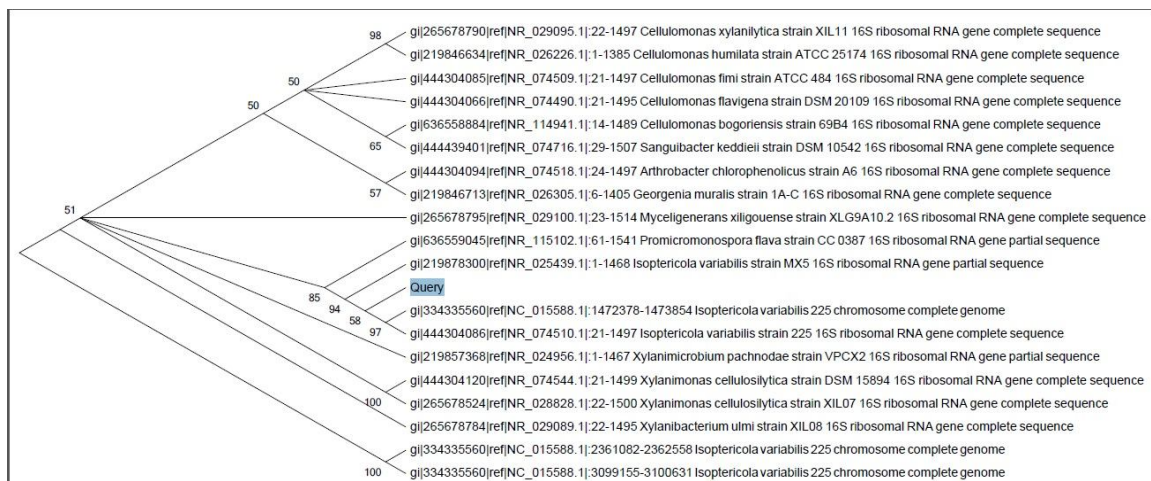
[23]. در مطالعه دیگری که توسط Yoon و همکارانش در سال 2008 صورت پذیرفت، سویه *Chelatococcus daeguensis- sp. nov.* از فاضلاب کارگاه نساجی جداسازی گردید [24]. اما گزارشی مبنی بر وجود *Isoptericola variabilis* در چشمه‌های آبگرم و فعالیت سلولازی آن منتشر نشده است.

### 3-2- 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.

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* 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 تحمل‌کننده 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



شکل 2 درخت فیلوژنتیک ارتباط بین توالی ژنی (*Isoptericola variabilis strain IDAH9*) 16S rDNA 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.

**3-3- اثر مقادیر 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.* مورد ارزیابی قرار گرفت. مشاهدات نشان داد که در میزان 0/2% وزنی ساکاروز میزان اگزوگلوکاناز به ترتیب در روز هشتم به 0/33 U/ml و در روز چهاردهم به 0/62 U/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].

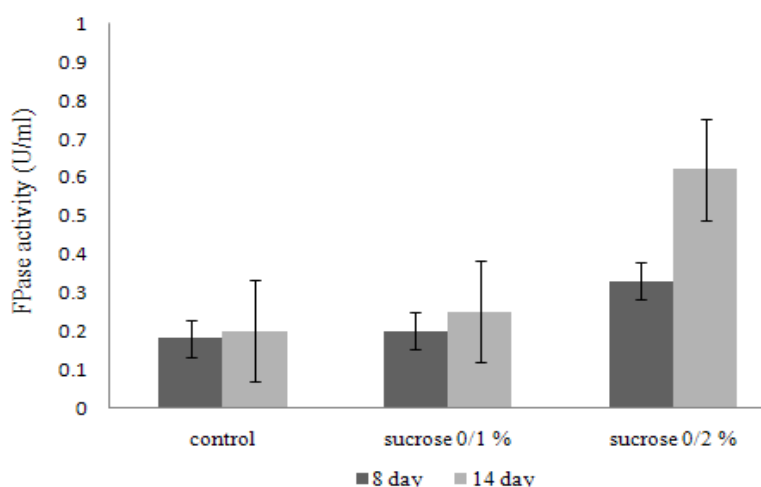
**3-4- اثر مقادیر مختلف توئین 80 بر تولید آنزیم**

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

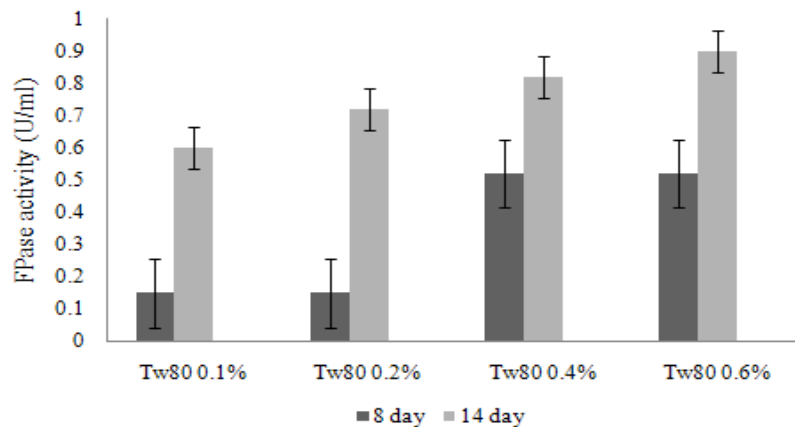
تولید آنزیم اگزوگلوکاناز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده از سنجش کیفی بیانگر شفافیت بیشتر جدایه منتخب در غلظت 0/6% و تولید بیشتر آنزیم در این غلظت بود. همچنین نتایج نشان داد که غلظت 0/6% بهترین اثر افزایشی را روی تولید آنزیم دارد (شکل 4). میزان فعالیت اگزوگلوکانازی در این غلظت 1/008 U/ml بوده است. تولید آنزیم در غلظت‌های مختلف توئین 80 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 توئین 80 تولید سلولاز را در *Nectria Catalinensis* بالا برده است [25].

**3-5- 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* مورد بررسی شد. میزان اگزوگلوکاناز جدایه منتخب، در محیط‌هایی که دارای ترکیبات پایه یکسان با میزان 1/5g/l، 3g/l، 6g/l، 9g/l، 12g/l از منابع کربنی سبوس و کربوکسی متیل سلولز بودند، سنجش گردید.



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



شکل 4 اثر Tween 80 (Tw80) بر تولید آگزوگلوکاناز ( $P^* < 0.05$ )

### 7-3- 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 آگزوگلوکانازی خود را حفظ خواهد کرد. همچنین پس از گرما گذاری محلول رویی جدایه منتخب در مدت 24 ساعت حدود 64% فعالیت آگزوگلوکانازی 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].

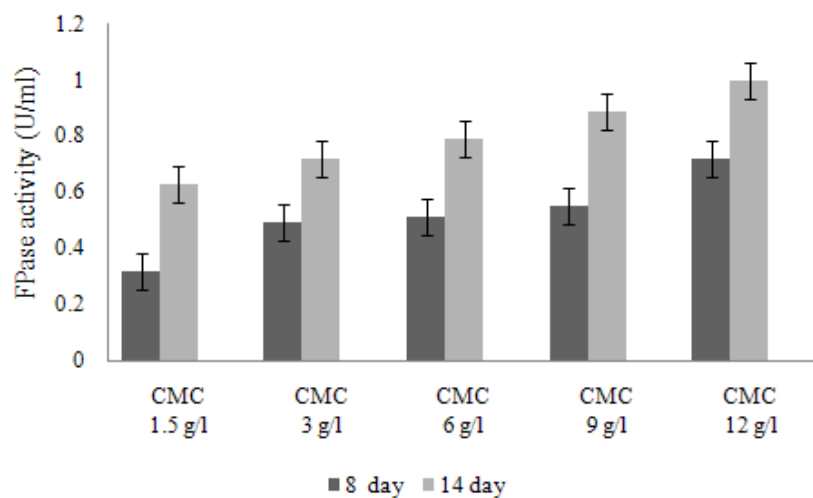
### 8-3- بررسی رابطه تولید آنزیم آگزوگلوکاناز طی زمان

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

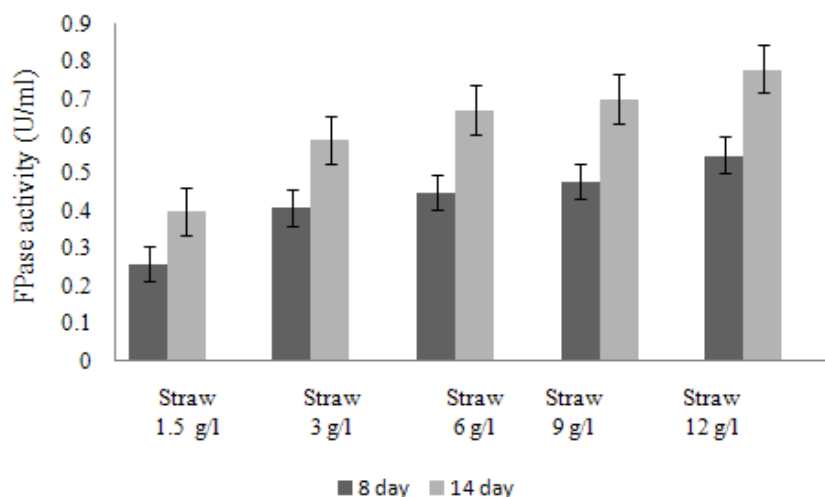
بر اساس نتایج حاصل، بیشترین فعالیت آگزوگلوکانازی در غلظت 12 گرم بر لیتر کربوکسی متیل سلولز و سبوس در روز چهاردهم مشاهده شد. ضمن آنکه در محیط حاوی کربوکسی متیل سلولز فعالیت بیشتری نسبت به محیط دارای سبوس مشاهده گردید (شکل‌های 5 و 6). در تحقیقی، Assareh و همکارانش یافتند که سبوس گندم و جو بهترین سویستراها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

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

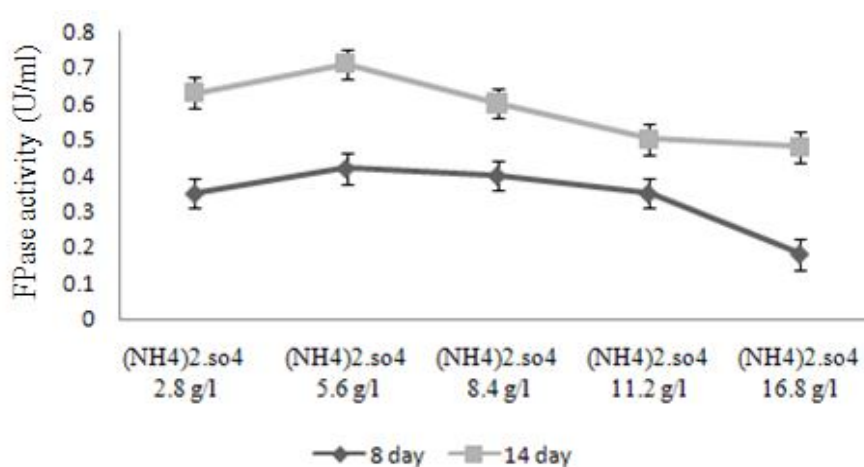
همان‌طور که در شکل 7 نشان داده شده است، *Isoptericola variabilis* sp. IDAH9 بیشترین میزان تولید آنزیم را در غلظت 5/6g/l آمونیوم سولفات داشته است و میزان تولید آگزوگلوکاناز در روز چهاردهم در این غلظت از آمونیوم به 0/71U/ml رسیده است. Acharya و همکاران گزارش کردند که ترکیبات نیتروژنی آلی و غیر آلی که به‌عنوان منبع نیتروژن برای تولید سلولاز در جداسازی *Aneuribacillus thermoaerophilus* WBS2 شده از چشمه‌های آب گرم استفاده نموده‌اند [14]. Spiridonov و Wilson ترکیبات  $NH_4$  را به عنوان منابع نیتروژنی مطلوبی برای سنتز سلولاز گزارش کرده‌اند [26].



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

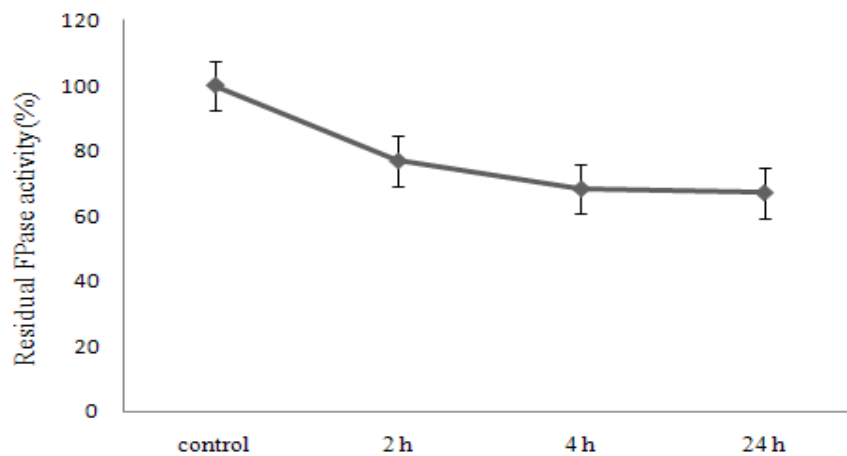


شکل 6 اثر غلظت‌های مختلف سیبوس به عنوان منبع کربن بر تولید آگزوگلوکاناز ( $P^* < 0.02$ )

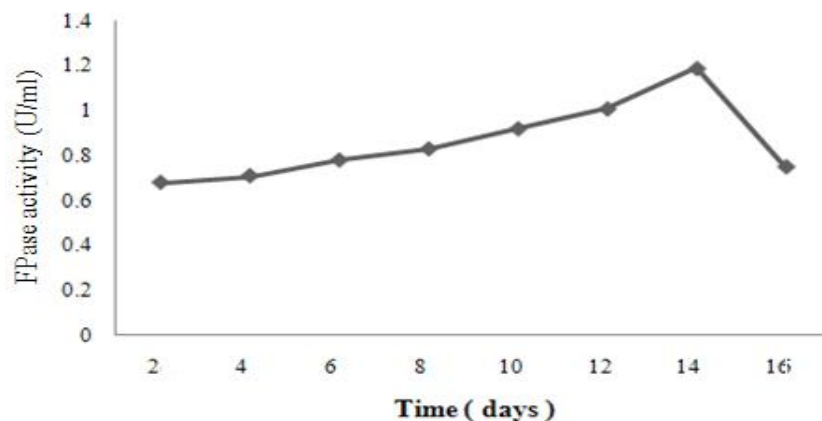


شکل 7 اثر منبع نیتروژن بر تولید آگزوگلوکاناز ( $P^* < 0.05$ )





شکل 8 بررسی میزان پایداری حرارتی فعالیت آگزوگلوکانازی جدایه منتخب ( $P^* < 0.01$ )



شکل 9 بررسی رابطه تولید آنزیم آگزوگلوکاناز طی زمان

از باکتری های سلولاتی و تحمل کننده حرارت دارند که قابل کشت و جداسازی می باشند. در میان جدایه ها، *I. variabilis* sp. DAH9 می تواند با منابع کربنی ارزانی مانند سبوس برنج و CMC تجاری، آگزوگلوکاناز مقاوم به حرارت قابل ملاحظه ای تولید نماید.

#### 5- تقدیر و تشکر

از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران به خاطر همکاری در انجام این تحقیق سپاس گزاری می گردد. بخشی از هزینه های این مطالعه توسط صندوق حمایت از پژوهشگران (INSF) با شماره 87041530 تأمین اعتبار شده است.

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 Fpase و avicelase تولید شده به وسیله باکتری ترموفیل *Bacillus K-12* در محیط مایع سرعت افزایش یافته تا اینکه در روز هشتم به حداکثر میزان خود میرسد [2].

#### 4- نتیجه گیری

چشمه های آب گرم مورد مطالعه، تنوع زیستی قابل توجه

## 6- منابع

- [11] Rastogi, G., Aditya, B., Adhikari, A., Bischoff, K., Hughes, S., Christopher, L., Sani, R., (2010) Characterization of thermostable 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 Noghahi, 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 thermodiasticus*. *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) International Union of Pure and Applied 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., 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.
- [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] Silvanía, 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., Wilhelms, 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.

- 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 enumeration and 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 environmental factor on cellulase activity by thermophilic bacteria isolated from hot spring. J. Sci. Ind. Res. 70, 142-148.
- [22] Zheng-Guo, He., Huifang, Z., Yaqin, Li., (2004) *Acidianusteng chongensis sp. 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