جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران
کرمان مردادماه ۱۳۸٤

مرکز بین المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی
International Center For Science & high Technology and Environmental Sciences

The 4th National Biotechnology congress
Islamic Republic of Iran
Kerman august 2005

بررسي اثر پارامترهاي محيطي بر ميزان رشد و توليد پروتئاز توسط *Bacillus licheniformis* L2

سيده فرانک قائمي اسکويي * (۱) ، فاطمه تابنده (۲) ، فرشته افتخار (۱) ،حورا احمدی دانش(۲)، باقر يخچالي ** (۲)
(۱) دانشگاه شهيد بهشتي، دانشکده علوم ، گروه زيست شناسي
(۲) پژوهشگاه ملي مهندسي ژنتيک و زيست فناوري، پژوهشکده صنعت، گروه فرايندهاي زيستي
تلفن: ۴۵۸۰۳۵۳ فکس: ۴۵۸۰۳۹۹ e-mail: byakhcha@nrcgeb.ac.ir

چکيده:
در اين تحقيق اثر پنج فاکتور منبع کربن، منبع نيتروژن آلي، منبع نيتروژن معدني، يونهاي فلزي دو ظرفيتي و سرعت هوادهي با استفاده از روش تاگوچی هر يک در چهار سطح بر ميزان رشد باکتري و توليد آنزيم پروتئاز قليايي توسط باکتري *Bacillus licheniformis* L2 در محيط کشت مايع بررسي شد.. نتايج نشان داد منبع نيتروژن آلی و معدنی به ترتيب مهمترين عامل در رشد باکتري و توليد پروتئاز با ميزان تأثير ۶۰ و ۵۴ درصد بودند. تاثير منابع کربن بر رشد باکتري و توليد پروتئاز به ترتيب ۲۱ و ۵ درصد بوده که در مقايسه با منبع نيتروژن آلی و معدنی بسيار کمتر بود. آناليز آماری داده ها با استفاده از نرم افزار Design-Expert 6.0.10 انجام شد. نتايج نشان داد حضور يونهاي فلزي Mn^{2+} و Cu^{2+} در محيط کشت، رشد سلولها و توليد پروتئاز را تحريک و يون Fe^{2+} هر دو مورد را مهار می کند، نمکهاي نيترات توليد پروتئاز را افزايش داده و سرعت هم زدن در طی فاز سکون تاثير قابل ملاحظه ای بر فعاليت پروتئاز ندارد.

کلمات کليدي: *Bacillus licheniformis* ، پروتئاز قليايي ، پارامترهای محيطی، روش تاگوچي, Design-Expert 6.0.10

The effect of environmental parameters on the growth and protease production by *Bacillus licheniformis* L2

Ghaemi Oskouie, S.F.*,[1], Tabandeh, F.,[2], Eftekhar, F.,[1], Ahmadi Danesh, H.,[2], Yakhchali, B.,[2]**

Abstract
In this study, the effect of five factors including: carbon source, organic nitrogen source, inorganic nitrogen source, metal ion and agitation on the growth of *Bacillus licheniformis* L2 and alkaline protease production in four levels were investigated by Taguchi method. The results showed that organic and inorganic nitrogen sources were the most important factors on growth and protease production with the effect of 60% and 54%, respectively,. The effect of carbon source on growth and protease production were 21% and 5%, respectively, which is not significant compared to the organic and inorganic nitrogen sources. Statistical analysis of data has been done by Design-Expert 6.0.10. The presence of Mn^{2+} and Cu^{2+} in the medium induced growth and protease production and Fe^{2+} inhibited both of them. The Nitrate salts increased the protease production. Agitation rate did not have a significant effect on protease production during stationary phase.

Key words: *Bacillus licheniformis*, alkaline protease, environmental parameters, Taguchi method, Design-Expert 6.0.10.

مقدمه:
پروتئازها از مهمترين آنزيم هاي صنعتي هستند که حداقل يک چهارم توليدات آنزيمي در سطح جهان را به خود اختصاص داده اند و به طور گسترده در صنايع گوناگون به کار برده مي شوند. در اين ميان پروتئازهاي قليايي در صنعت مواد شوينده اهميت بيشتري دارند (Joo *et al*. 2002, Joo *et al*. 2004, Johnvesly *et al*. 2001). جهت توليد گسترده و ارزان اين آنزيم محيطهای کشت با استفاده از روشهاي آماري گوناگون طراحی شده اند (Khalil Beg *et al*. 2003, Chauhan & Gupta *et al*. 2004, Puri *et al*. 2002, Adinarayana &Ellaiah *et al*. 2002). از آنجايی که با روش تاگوچي مي توان به اطلاعات کافي از تاثير فاکتورها بر پاسخ با حداقل تعداد آزمايشها دست يافت(Roy *et al*. 1990)، در تحقيق حاضر از اين روش جهت بررسي اثر پنج فاکتور منبع کربن، منبع نيتروژن آلي، منبع نيتروژن

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

معدني، يونهاي فلزي دو ظرفيتي و سرعت هوادهي (دور همزن) هر يک در چهار سطح (جدول ۱) بر رشد و توليد پروتئاز استفاده شده است.

مواد و روشها:

كشت باكتري: باكتري مورد استفاده در اين تحقيق در سال ۱۳۷۷ در دانشگاه شهيد بهشتي شناسايي و تحت عنوان *Bacillus licheniformis* L2 نامگذاری (Eftekhar *et al.* 2003, فقیهی و همکاران ۱۳۷۷) و فعاليت پروتئازي آن تأييد شد (كرباسچی و همكاران ۱۳۸۱). اين باكتري در دماي ۷۰- درجه سانتي گراد در محيط حاوي ۳۰% گليسرول نگهداري شد.

محيط كشت: برای ۴ فاكتور در ۵ سطح از جدول L_{16} روش آماری تاگوچی استفاده شد. همه محيطها حاوي K_2HPO_4 ، $MgSO_4 .7H_2O$ ، $CaCl_2$ و تري سديم سيترات بودند كه پس از افزودن ساير تركيبات (جدول ۲)، pH محيط كشت به ۱۰ رسانده شد. شايان ذكر است برای بررسی اثر يونهای فلزی، يون مورد نظر از محلول عناصر كمياب حذف شد. پس از استريليزاسيون محيطها, يونهاي فلزي دو ظرفيتي فيلتر شده و قبل از تلقيح (به ميزان ۳%) به محيط ها اضافه شدند.
تعيين رشد سلولي: از جذب نوري در طول موج ۶۰۰ nm براي تعيين رشد باكتريها استفاده شد.
تعيين فعاليت آنزيمي: فعاليت آنزيمي با روش Chang كه تغييراتي در آن داده شد، اندازه گيري شد (Joo *et al.* 2002). اساس اين روش تجزيه كازئين و آزادسازي تيروزين و اندازه گيري ميزان تيروزين آزاد شده در طول موج ۲۷۵ nm مي باشد.

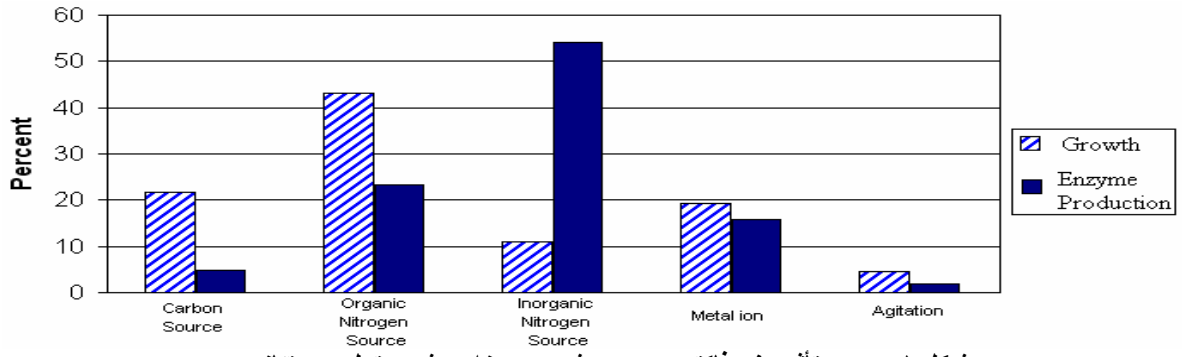
نتايج و بحث:

نتايج رشد و توليد پروتئاز پس از چهل و هشت ساعت در جدول ۲ آمده است. شكل ۱ درصد تاثير هر يک از فاكتورها را بر رشد و توليد پروتئاز طبق نتايج آناليز واريانس نشان مي دهد. با توجه به نتايج به نظر مي رسد وجود آمونيوم و جذب آسان آن مانع از توليد و ترشح پروتئاز مي شود (Ferrero *et al.* 1995, Johnvesly *et al.* 2001, Moon & Parulekar *et al.* 1990) . گلوكز نيز به عنوان منبع كربن براي رشد سريع باكتري ها مناسب است ولي بدليل ايجاد مهار كاتابوليكي نهايتاً توليد پروتئاز و رشد سلول ها را محدود می كند (Ferrero *et al.* 1995, Johnvesly *et al.* 2001, Joo *et al.* 2002) . نتايج حاصل از آناليز آماری نشان داد تاثير منبع نيتروژن معدنی بر رشد سلولها و تاثير منبع كربن بر توليد پروتئاز معنی دار نيست. با توجه به پيشگويی نرم افزار برای دستيابی به نقاط بهينه (جدول ۳) محيط پيشنهادی برای رشد سلولها و توليد پروتئاز بايد شامل نشاسته، عصاره مخمر، نيترات پتاسيم و فاقد يون آهن دو ظرفيتی بوده و ميزان هوادهي در فاز توليد پروتئاز بين ۲۰۰-۱۰۰ rpm باشد.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

جدول ۱ – فاکتور هاي بررسي شده و سطوح آنها

Factors	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4
A: Carbon source (1%)	glucose	glycerol	starch	Sucrose
B: Organic nitrogen source (1%)	pepton	yeast	casein	casamino acids
C: Inorganic nitrogen source (0.5%)	$(NH_4)_2SO_4$	$NaNO_3$	KNO_3	NH_4Cl
D: Metal ion	$-Mn^{2}+$	$-Fe^{2}+$	$-Zn^{2}+$	$-Cu^{2}+$
E: Agitation (rpm)	100	200	300	350



شکل ۱ـ درصد تأثير پنج فاکتور بررسي شده بر ميزان رشد و توليد پروتئاز

جدول ۲ـ ترکيب محيطهاي کشت طبق جدول L_{16} و نتايج ميزان رشد و فعاليت پروتئاز

trial no.	1% (w/v)	1% (w/v)	0.5% (w/v)	without	agitation (rpm)	OD_{600} (nm)	Activity (U ml^{-1})
1	glucose	pepton	$(NH_4)_2SO_4$	$Mn^{2}+$	100	3.2	9.4
2	glucose	yeast	$NaNO_3$	$Fe^{2}+$	200	7.8	118.4
3	glucose	casein	KNO_3	$Zn^{2}+$	300	3.2	51.0
4	glucose	casamino acids	NH_4Cl	$Cu^{2}+$	350	2.8	15.0
5	glycerol	pepton	$NaNO_3$	$Zn^{2}+$	350	2.1	46.0
6	glycerol	yeast	$(NH_4)_2SO_4$	$Cu^{2}+$	300	4.5	13.6
7	glycerol	casein	NH_4Cl	$Mn^{2}+$	200	0.7	6.0
8	glycerol	casamino acids	KNO_3	$Fe^{2}+$	100	4.0	90.5
9	starch	pepton	KNO_3	$Cu^{2}+$	200	4.1	76.0
10	starch	yeast	NH_4Cl	$Zn^{2}+$	100	14.2	37.6
11	starch	casein	$(NH_4)_2SO_4$	$Fe^{2}+$	350	3.6	38.4
12	starch	casamino acids	$NaNO_3$	$Mn^{2}+$	300	2.4	124.0
13	sucrose	pepton	NH_4Cl	$Fe^{2}+$	300	5.5	26.8
14	sucrose	yeast	KNO_3	$Mn^{2}+$	350	4.5	136.0
15	sucrose	casein	$NaNO_3$	$Cu^{2}+$	100	3.0	24.6
16	sucrose	casamino acids	$(NH_4)_2SO_4$	$Zn^{2}+$	200	3.7	32.0

جدول ۳- نتایج پیشگویی نرم افزار Design-Expert 6-0-10 برای نقاط بهینه

	Prediction	SE Mean	95% CI low	95% CI high	Optimum Conditions
Optical Density	16.74		10.91	25.69	A:3; B:2; C: No; D:2; E:1
Protease activity ($U\ ml^{-1}$)	127.6	16.98	86.09	169.18	A: No; B:2; C:3; D:2; E: No

SE: Standard Error (A-E): factors No: no significant

CI: Confidence Interval (1-4): levels

منابع

- Adinarayana K, Ellaiah P, 2002, Response surface optimization of the critical medium components for the production of alkaline protease by a newly isolated *Bacillus* sp., J Pharm Pharmaceut Sci , PP. 272-278 , India.
- Chauhan B., Gupta R. 2004. Application of statistical design for optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. RGR-14, Process Biochemistry, PP. 2115-2122, India.
- Eftekhar F, Fouladi J, Faghihi M, 2003, Isolation and identification of an alkaline protease production *Bacillus* from soil, Iranian J. Biotechnology, PP. 183-185.
- Ferrero M. A., Castro G. R., Abate C. M., Baigori M. D., Sineriz F., 1996. Thermostable alkaline protease of *Bacillus licheniformis* MIR 29: isolation, production and characterizatio , Appl Microbiol Biotechnol , PP. 327-332 , Argentina.
- Johnvesly B., Naik G. R. , 2001. Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkalophilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium, Process Biochemistry. PP. 139-144 , India.
- Khalil Beg Q. , Sahai V. , Gupta R. 2003. Statistical media optimization and alkaline protease production from *Bacillus mojavensis* in a bioreactor, Process Biochemistry, PP. 203-209, India.
- Joo H. , Ganesh Kumar C. , Park G. , Paik S. , Chang C. , 2004. Bleach-resistant alkaline protease produced by the Korean polychaete , *Periserrula leucophryna* , Process Biochemistry , PP. 1441-1447 , South Korea.
- Joo H. , Ganesh Kumar C. , Park G. , Kim k. T. , Paik S. , Chang C. , 2002. Optimization of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshi* , Process Biochemistry , PP. 155-159 , Republic of Korea.
- Puri S. Khalil Beg Q. , Gupta R. , 2002. Optimization of Alkaline Protease Production from *Bacillus* sp. By Response Surface Methodology, Current Microbiology, PP. 286-290, India.
- Roy, RK.1990. A primer on the Taghuchi metod, VAN NOS REIN REINHOLD, New York, PP.1-18.
- Seung-hyeon Moon and Satish J. Parulekar 1991 , A Parametric Study of Protease Production in Batch and Fed-Batch Cultures of *Bacillus firnus*, Biotechnology and Bioengineering, PP. 467-483.
- فقيهي م، افتخار ف، فولادي ج، ۱۳۷۷. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه شهید بهشتی.
- کرباسچي م،افتخار ف، ۱۳۸۱ .پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه شهید بهشتی.