فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال سوم، شماره ۱۱، پاییز ۱۳۹۳، صفحه ۷۹- ۹۰
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۷/۲۱ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۰/۲۴

بهینه‌سازی تولید آلفا آمیلاز توسط *باسیلوس آمیلولیکویی فسینز* با روش سطح پاسخ

حامی کابوسی*: استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی، آمل، ایران، hkaboosi@gmail.com
نعیمه طبری: کارشناس ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی، آمل، ایران، naeimehtabari@yahoo.com
حمید رضا صمدلویی: استادیار تکنولوژی غذایی، دانشگاه صنعتی شاهرود، ایران، hsamadlouie@yahoo.com

چکیده

مقدمه: آلفا آمیلاز یکی از آنزیم‌های تجاری مهم در میان آنزیم‌های هیدرولیز کننده نشاسته است. استفاده از آمیلاز باکتریایی در صنایع مختلف به‌دلیل مزایای آن نسبت به آمیلازهای حاصل از منابع گیاهی و حیوانی، از اولویت بیشتری برخوردار است. همچنین، استفاده از محصولات کشاورزی و بقایای آن‌ها به عنوان سوبستراهای تخمیری ارزان قیمت، اهمیت شایانی برای کاهش هزینه‌های تولید صنعتی این آنزیم دارد. هدف اصلی این تحقیق، بهینه‌سازی تولید آلفا آمیلاز توسط *باسیلوس آمیلولیکویی‌فسینز* با استفاده از منابع کشاورزی ارزان قیمت و با روش سطح پاسخ بود.

مواد و روش‌ها: تاثیر مقادیر مختلف منبع کربنی (عصاره نخود فرنگی) و منبع نیتروژنی (کنجاله تخم پنبه) بر روی تولید آلفا آمیلاز توسط *باسیلوس آمیلولیکویی‌فسینز* با استفاده از روش آماری سطح پاسخ بررسی شد. منابع کربنی و نیتروژنی طی تخمیر غوطه وری در ۵ سطح در نظر گرفته شدند و از طرح مرکب مرکزی با ۱۰ آزمایش استفاده شد.

نتایج: بهترین شرایط برای حداکثر تولید آلفا آمیلاز توسط *باسیلوس آمیلولیکویی‌فسینز*، غلظت ۷۵ گرم بر لیتر عصاره نخود فرنگی و ۳۳/۳ گرم بر لیتر کنجاله تخم پنبه بود که در این شرایط آلفا آمیلاز به میزان ۶۹/۷۴ واحد در میلی‌لیتر تولید شد. در بهینه‌سازی با روش سطح پاسخ مشخص شد که با وجود اهمیت منبع کربنی (عصاره نخود فرنگی)، میزان منبع نیتروژنی مورد استفاده (کنجاله تخم پنبه) اثر بیشتری در تولید آلفا آمیلاز باکتریایی در تخمیر غوطه‌وری نسبت به منبع کربنی داشته است.

بحث و نتیجه‌گیری: این پژوهش نشان‌دهنده اهمیت رابطه بین سطح منبع نیتروژنی و منبع کربنی در تولید آلفا آمیلاز است. بر اساس نتایج به دست آمده، روش سطح پاسخ برای بهینه‌سازی شاخص‌های فرایند تخمیر غوطه‌وری به منظور دستیابی به حداکثر میزان تولید آلفا آمیلاز توسط باکتری مورد استفاده، کارایی مطلوبی داشته است.

واژه‌های کلیدی: آلفا آمیلاز، *باسیلوس آمیلولیکویی‌فسینز*، روش سطح پاسخ، تخمیر غوطه‌وری

* نویسنده مسؤول مکاتبات

مقدمه

آلفا آمیلاز یک اندوهیدرولاز خارج سلولی است که هیدرولیز نشاسته و کربوهیدرات‌های وابسته را به الیگوساکاریدهای کوچکی که از واحدهای متوالی گلوکز تشکیل شده است، کاتالیز می‌کند (۱). آلفا آمیلاز به‌طور تصادفی پیوندهای α۱→۴ داخلی مولکول نشاسته را تجزیه می‌کند و پلیمرهای کوچکی مانند گلوکز، مالتوز، دکسترین و مشتقات آن را تولید می‌کند (۲- ۴). از آلفا آمیلاز در بیشتر فرایندهای صنعتی مانند صنایع غذایی، کاغذسازی، نساجی، دارویی و سایر به‌طور گسترده استفاده می‌شود (۵). آلفا آمیلازها می‌توانند از منابع گیاهی، حیوانی و یا میکروبی حاصل شوند. بیشتر آلفا آمیلازهای مورد استفاده در صنعت از نوع آنزیم‌های میکروبی هستند (۶). گونه‌های مختلف قارچی و باکتریایی، کاربرد گسترده‌ای در تولید آلفا آمیلاز دارند (۷). مهم‌ترین باکتری‌های تولید کننده آلفا آمیلاز، *باسیلوس آمیلولیکویی فسینز*[1]، *باسیلوس استئاروترموفیلوس*، *باسیلوس سوبتیلیس* و *باسیلوس لیکنی فورمیس* هستند (۸).

علاوه بر میکروارگانیسم مولد، از مهم‌ترین عوامل دیگری که روی تولید آنزیم‌های میکروبی از جمله آلفا آمیلاز در طی فرایندهای صنعتی تخمیری اهمیت دارد، سوبستراهای مورد مصرف برای تولید تخمیری آنزیم است. نشاسته یکی از مهم‌ترین پلی‌ساکاریدها و سوبسترای کربنی مورد استفاده در تولید آلفا آمیلاز است که در ریشه و میوه بسیاری از غلات و گیاهان در مقادیر متفاوتی یافت می‌شود (۹). یکی از گیاهانی که دارای مقادیر زیادی نشاسته است، نخود فرنگی می‌باشد. نخود فرنگی با نام علمی *پیسیوم*[2] به خانواده *پاپیلیوناسه*[3] متعلق است و مهم‌ترین ذخیره کربوهیدراتی در آن، نشاسته است (۱۰). مقدار آمیلوز موجود در نخود فرنگی بین ۴۸/۹ تا ۴۹/۶ درصد وزن خشک آن است (۱۱). پس از کربن، نیتروژن به عنوان عامل اساسی دیگر برای رشد، تکثیر و تولید فراورده‌های میکروبی به شمار می‌آید. میکروارگانیسم‌ها برای تامین نیاز نیتروژنی خود از ترکیبات آلی و معدنی استفاده می‌کنند. ترکیبات آلی می‌توانند نیتروژن مورد نیاز میکروارگانیسم را به‌شکل اسید آمینه، پروتئین و یا اوره تامین کنند. دانه‌های سویا، کنجاله سویا، کنجاله تخم پنبه و عصاره مخمر مهم‌ترین منابع نیتروژنی آلی مورد استفاده در تولید فراورده‌های میکروبی هستند (۱۲). پنبه گیاهی گلدار و دو لپه‌ای از خانواده *ماواسه*[4] و از جنس *گوسیپیوم*[5] است (۱۳). پس از استخراج روغن پنبه توسط روش‌های مکانیکی یا استفاده از حلال و یا تلقیق هر دو روش، تفاله باقی‌مانده کنجاله تخم پنبه نامیده می‌شود (۱۴). اهمیت کنجاله تخم پنبه مربوط به میزان نیتروژن آلی آن است (۱۲).

روش تخمیر غوطه‌وری روش سنتی در تولید آلفا آمیلاز است (۱۵). به‌طور کلی برای تولید صنعتی آنزیم‌های مهم بیشتر از روش تخمیر غوطه‌وری استفاده می‌شود، زیرا شاخص‌هایی مانند اسیدیته، دما، هوادهی، انتقال اکسیژن و رطوبت بهتر کنترل می‌شود (۱۶- ۱۸). همچنین، چون حجم تولید بالای آنزیم را دارد به راحتی پاسخگوی نیاز صنایع مختلف است (۷).

رشد و تولید آنزیم توسط میکروارگانیسم به شدت به ترکیبات و عوامل ورودی به سیستم وابسته است. بنابراین، بهینه‌سازی ترکیبات و شاخص‌های محیط کشت، اولین وظیفه در فرایند تخمیر است. یکی از روش‌های بهینه‌سازی، استفاده از روش یک عامل در یک زمان[6] است. به این شکل که یکی از عوامل (متغیر پاسخ) تغییر می‌کند و بقیه متغیرها ثابت نگه داشته می‌شوند.

در واقع این یک روش آزمون و خطاست که هزینه و زمان زیادی را می‌طلبد. از معایب دیگر این روش امکان نادیده گرفته شدن اثر متقابل بین عوامل و متغیرهای مختلف است(۱۷ و ۱۹). محدودیت‌های این روش می‌تواند توسط روش آماری سطح پاسخ[۷] حذف شود. سطح پاسخ روشی برای توضیح اثرات بر هم و متقابل تمام عوامل موجود در فرایند تخمیر است (۱۷ و ۲۰).

هدف اصلی این تحقیق، بهینه‌سازی تولید آنزیم آلفا آمیلاز توسط *باسیلوس آمیلولیکویی فسینز* با استفاده از منابع کشاورزی ارزان قیمت (نخود فرنگی به عنوان منبع کربنی و کنجاله تخم پنبه به عنوان منبع نیتروژنی) و با روش آماری سطح پاسخ بود.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی عصاره نخودفرنگی و کنجاله تخم پنبه

کنجاله تخم پنبه پس از خرد و الک کردن به‌شکل پودر استفاده شد. ۱۰۰ گرم نخود فرنگی شسته، خرد و سپس، در ۵۰۰ سی‌سی آب مقطر ریخته شد. در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه پخته و آب آن تحت شرایط خلا فیلتر شد (۲۱).

سویه باکتریایی

از *باسیلوس آمیلولیکویی فسینز* سویه DSM 7 (ATCC 23350) استفاده شد. ویال لیوفیلیزه سویه یاد شده در محیط کشت نوترینت آگار (به‌شکل اسلنت) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد فعال‌سازی و هر هفته تجدید کشت شد.

روش بررسی کینتیک رشد باکتری

برای بررسی کینتیک رشد باکتری در محیط کشت توسعه تلقیح و محیط کشت تولید، یک لوپ پر از کشت ۲۴ ساعته باکتری بر روی اسلنت نوترینت آگار به فلاسک‌های حاوی محیط‌های کشت توسعه تلقیح و تولید استریل تلقیح شد. فلاسک‌ها به مدت ۴۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار با ۱۲۰ دور بر دقیقه گرمخانه‌گذاری شد. روند رشد باکتری و تعداد باکتری در ساعت‌های متفاوت تخمیر در هر دو محیط کشت اندازه گیری شد. به این منظور، هر دو ساعت یک‌بار از فلاسک‌ها نمونه‌برداری شد. پس از رقیق‌سازی مناسب نمونه‌ها با پیپتون واتر استریل، نمونه‌ها در محیط نوترینت آگار کشت داده شدند. محیط‌های نوترینت آگار به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری و سپس، کلونی‌های رشد یافته شمارش شدند. نتایج به شکل لگاریتم تعداد باکتری (بر حسب واحد تشکیل دهنده کلونی در میلی‌لیتر) محاسبه شدند. هدف از این کار، تلقیح مناسب از محیط کشت توسعه تلقیح به محیط کشت تولید و نیز دست‌یابی به مدت زمان بهینه تخمیر برای تولید آلفا آمیلاز در محیط کشت تولید بود (۲۰).

محیط کشت توسعه تلقیح[۸]

فلاسک بافل‌دار ۲۵۰ سی‌سی حاوی ۵۰ سی‌سی محیط کشت توسعه تلقیح شامل (گرم در لیتر): گلوکز ۱۵، پیپتون ۲/۵، عصاره مخمر ۲، کلرید سدیم ۱/۵ بود. محیط در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل شد. سپس، یک لوپ از کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط اسلنت نوترینت آگار به محیط کشت توسعه تلقیح استریل، انتقال یافت. محیط کشت توسعه تلقیح به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار با ۱۲۰ دور بر دقیقه گرمخانه‌گذاری شد (۲۲).

محیط کشت تولید[۹]

فلاسک‌های بافل‌دار ۲۵۰ سی‌سی حاوی ۵۰ سی‌سی محیط کشت تولید شامل: ترکیب عصاره نخود فرنگی و کنجاله تخم پنبه (نسبت‌های یاد شده در جدول ۲) بود. به این فلاسک‌ها علاوه بر ترکیب عصاره نخود فرنگی و کنجاله تخم پنبه، نمک‌های شامل (گرم در لیتر): ۱ KH_2PO_4، ۰/۳ $MgSO_4$، ۷ H_2O ، ۰/۱ $CaCl_2$ و ۰/۷ NaCl اضافه شد. اسیدیته محیط با سود ۱ نرمال روی ۷ تنظیم شد. فلاسک‌های محیط کشت تولید در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل و پس از آن ۲ درصد (حجمی/حجمی) از محیط کشت توسعه تلقیح به محیط کشت تولید اضافه شد. فلاسک‌های محیط کشت تولید به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار با ۱۲۰ دور بر دقیقه گرمخانه‌گذاری شدند(۲۲)

بهینه‌سازی تولید آلفا آمیلاز به روش سطح پاسخ

آزمایش‌های بهینه‌سازی، به‌دست آوردن یک مدل ریاضی برای پیش بینی رفتار فرایند است. طرح‌های بهینه‌سازی از عوامل کمتری نسبت به طرح‌های معمولی برخوردار هستند ولی این عوامل به شدت تاثیرگذار هستند (۲۲). در این تحقیق، برای طراحی آزمایش و بهینه‌سازی تولید آنزیم از نرم افزار دزاین اکسپرت[۱۰] استفاده شد. این نرم افزار به منظور غربال‌گری[۱۱] و بهینه‌سازی متغیرهای تخمیری استفاده می‌شود. دزاین اکسپرت، نقاط بهینه متغیرهای تخمیری مورد بررسی و نیز میزان پیش‌بینی شده تولید محصول را تعیین می‌کند. همچنین، این نرم افزار جدول تحلیل واریانس مدل طراحی شده و نیز تاثیر مستقل و متقابل متغیرها بر روی تولید محصول را مشخص و منحنی پاسخ متغیرها را ترسیم می‌کند (۱۹). از آنجا که هدف اصلی این تحقیق افزایش میزان تولید آلفا آمیلاز بود، بازه ای از دو ترکیب کلیدی شامل: منبع کربن (عصاره نخود فرنگی) و منبع نیتروژن (کنجاله تخم پنبه) انتخاب شد. منابع کربنی و نیتروژنی طی تخمیر غوطه وری در ۵ سطح (شامل: ۱/۴۱۴۲+، ۱+، ۰، ۱- و ۱/۴۱۴۲-) در نظر گرفته شدند و از طرح مرکب مرکزی[۱۲] با ۱۰ آزمایش استفاده شد (جدول ۱). انتخاب سطوح متغیرها (میزان عصاره نخود فرنگی و کنجاله تخم پنبه) توسط نرم افزار دزاین اکسپرت انجام شد. سطوح بالا (۱+)، پایین (۱-) و میانگین (صفر) متغیرها و نیز مقادیر α+ (۱/۴۱۴۲+) و α- (۱/۴۱۴۲-) در چرخش پذیری[۱۳] مدل توسط نرم‌افزار به شرح جدول ۱ انتخاب شدند. بنابراین، مقادیر عصاره نخود فرنگی و کنجاله تخم پنبه به منظور افزایش تولید آلفا آمیلاز به روش سطح پاسخ بهینه‌سازی و برای بررسی تاثیر متغیرهای انتخاب شده آزمایش‌ها در ۱۰ دور انجام شدند. شایان ذکر است که تمام آزمایش‌ها سه تکرار داشته است. میانگین نتایج در جدول ۲ قابل مشاهده است.

جدول۱- میزان واقعی و کد شده متغیرهای غیروابسته در روش آماری سطح پاسخ

عامل	نماد			سطوح متغیر		
کد		-۱/۴۱۴۲	-۱	صفر	۱	۱/۴۱۴۲
عصاره نخود فرنگی (گرم بر لیتر)	X_1	۳۹/۶۴	۵۰	۷۵	۱۰۰	۱۱۰/۳۵
کنجاله تخم پنبه (گرم بر لیتر)	X_2	۱۰/۶۸	۱۴	۲۲	۳۰	۳۳/۳۱

جدول۲- طراحی آزمایش‌ها از دو متغیر اعمال شده به روش سطح پاسخ برای تولید آلفا آمیلاز

شماره آزمایش	مقادیر عصاره نخود فرنگی (گرم در لیتر)	مقادیر کنجاله تخم پنبه (گرم در لیتر)
۱	۷۵	۲۲
۲	۵۰	۱۴
۳	۷۵	۳۳/۳۱
۴	۷۵	۳۰
۵	۱۰۰	۳۰
۶	۷۵	۱۰/۶۸
۷	۳۹/۶۴	۲۲
۸	۱۱۰/۳۵	۲۲
۹	۵۰	۳۰
۱۰	۱۰۰	۱۴

روش سنجش آلفا آمیلاز

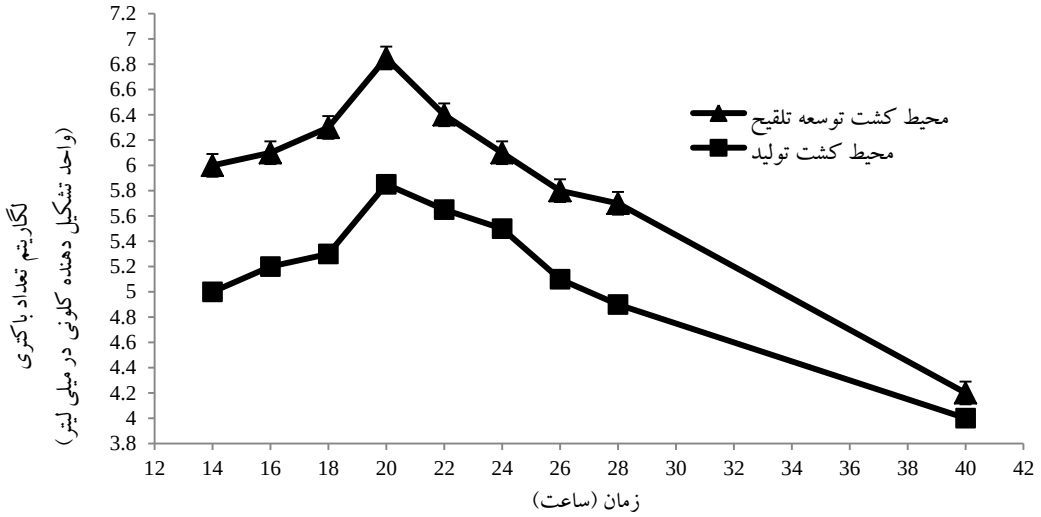
پس از پایان تخمیر، محیط کشت تولید به لوله‌های فالکون استریل منتقل و سپس، به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد و ۵۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول رویی به‌عنوان منبع آنزیمی استفاده شد. برای سنجش میزان آنزیم تولید شده از روش دی‌نیتروسالسیلیک اسید[۱۴] (شرکت کیو لب[۱۵] به شماره ۸۰/۱۴۱۰۰۲۵) تهیه شده به روش برنفلد[۱۶] استفاده شد (۲۳). برای این کار، ۸۰ میکرولیتر نمونه فیلتر شده با ۴۰۰ میکرولیتر بافر سیترات-فسفات ۰/۱۵ مولار با اسیدیته ۵ مخلوط شد. سپس، با نشاسته ۴ درصد به حجم یک سی‌سی رسانده و در ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری شد. سپس، با ۴۸۰ میکرولیتر محلول دی نیتروسالسیلیک اسید مخلوط و در بن‌ماری جوش برای ۵ دقیقه قرار داده شد تا واکنش متوقف شود. در نهایت، شدت جذب نمونه‌ها توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد. هر واحد تولید آلفا آمیلاز، مقدار فعالیت آنزیمی تعریف شد که قادر باشد یک میکرومول قند احیا کننده را در یک دقیقه تحت شرایط سنجش آزاد کند (۱۷ و ۱۸). میزان تولید آنزیم به ازای میلی‌لیتر سوبسترا یا محیط کشت تولید نشان داده شده است. برای ترسیم منحنی استاندارد آلفا آمیلاز نیز آنزیم آلفا آمیلاز (شرکت سیگما الدریچ[۱۷] به شماره A۷۵۹۵) با رقت‌های ۱۵، ۳۰، ۵۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ واحد در میلی‌لیتر آلفا آمیلاز توسط کلرید سدیم ۱۰ میلی‌مولار تهیه شد و با روش یاد شده سنجش شد. شدت جذب نمونه‌های استاندارد نیز در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده و منحنی استاندارد آنزیم آلفا آمیلاز ترسیم شد (۲۴).

نتایج

بررسی کینتیک رشد باکتری

روند رشد *باسیلوس آمیلولیکویی‌فسینز* در محیط کشت توسعه تلقیح و تولید در ساعت‌های متفاوت تخمیر اندازه‌گیری شد. هدف از این کار، تلقیح مناسب از محیط کشت توسعه تلقیح به محیط کشت تولید و نیز دست‌یابی به مدت زمان بهینه تخمیر برای تولید آلفا آمیلاز در محیط کشت تولید بود. نتایج نشان دادند که باکتری در محیط توسعه تلقیح رشد بیشتری نسبت به محیط تولید داشت. این امر به دلیل وجود منابع کربنی و نیتروژنی بهتر و در دسترس‌تر در محیط توسعه تلقیح (گلوکز، پپتون و عصاره مخمر) نسبت به منابع کربنی و نیتروژنی محیط تولید (عصاره نخود فرنگی و کنجاله تخم پنبه) طبیعی بود. نتایج هر دو تیمار نشان داد که تا گذشت ۲۰ ساعت از شروع تخمیر، تعداد باکتری افزایش یافت (شکل ۱). تولید آلفا آمیلاز توسط باکتری‌های جنس *باسیلوس* در هر دو مرحله رشد لگاریتمی و سکون انجام می‌شود، هر چند میزان تولید آنزیم در مرحله رشد لگاریتمی بیشتر از مرحله سکون است (۷). به عبارت دیگر، سلول‌های جوان باکتریایی

بیش‌ترین میزان تولید آنزیم آلفا آمیلاز را دارند و در شرایط مرگ، تولید آنزیم‌های خارج سلولی کاهش می‌یابد (۲۵). از این رو زمان مناسب تخمیر، زمانی است که سلول‌ها در فاز رشد لگاریتمی خود باشند و تعداد سلول به حداکثر میزان خود رسیده باشد. نتایج دو تیمار نشان داد که پس از گذشت ۲۰ ساعت از شروع تخمیر، بیشترین تعداد سلول به‌دست آمد و پس از گذشت ۲۰ ساعت، تعداد سلول‌های زنده روند کاهشی داشتند. از این رو چنین نتیجه‌گیری شد که زمان تخمیر ۲۰ ساعت، زمان بهینه برای تولید آلفا آمیلاز توسط *باسیلوس آمیلولیکوییفسینز* در محیط کشت تخمیری تولید است.



شکل ۱- نتایج منحنی رشد *باسیلوس آمیلولیکوییفسینز* در دو تیمار کشت مختلف

مدل‌سازی

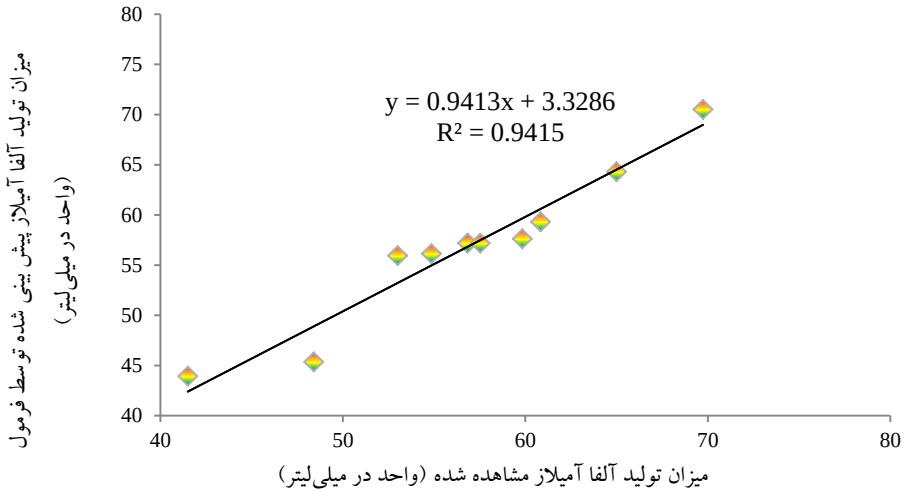
با توجه به شرایط تعیین شده بر اساس مدل آماری سطح پاسخ، ۱۰ طراحی برای تولید آلفا آمیلاز انجام شد. سطوح مختلف منبع کربنی و منبع نیتروژنی اعمال شده و نتایج میزان تولید آلفا آمیلاز بر اساس این طراحی در جدول ۳ آمده است. همان‌طور که در این جدول دیده می‌شود ضرایب مدل چند جمله‌ای درجه دوم پس از تجزیه و تحلیل توسط نرم‌افزار و حذف عبارت‌های غیرمعنی‌دار توسط روش فوروارد[18] در نرم‌افزار به‌دست آمد. نتیجه حاصل معادله زیر است:

$$Y = ۵/۸۶۶۸۶ + ۱/۲۲۸۶۲ \times X_1 - ۰/۷۵۵۹۹ \times X_2 - ۹/۰۷۹۲۵ \times ۱۰^{-۳} \times X_1 \times X_2 - ۵/۷۰۹۷۵ \times ۱۰^{-۳} \times X_1^2 + ۰/۰۴۷۳۱۸ \times X_2^2$$

در این معادله Y میزان تولید آلفا آمیلاز بر حسب واحد در میلی‌لیتر و X_1 و X_2 به ترتیب مربوط به میزان عصاره نخود فرنگی و کنجاله تخم پنبه بر حسب گرم در لیتر است. به منظور ارزیابی مدل، در آزمون‌هایی با سه تکرار شرایط پیش‌بینی شده مدل تولید آلفا آمیلاز اعمال شد. بر اساس نتایج (جدول ۳)، شرایط بهینه برای تولید آنزیم در محیط حاوی ۷۵ گرم بر لیتر عصاره نخود فرنگی و ۳۳/۳ گرم بر لیتر کنجاله تخم پنبه در اسیدیته اولیه ۷ بود. در این شرایط پس از ۲۰ ساعت تخمیر، آلفا آمیلاز به میزان ۶۹/۷۴ واحد در میلی‌لیتر به‌دست آمد که با نتیجه پیش‌بینی شده از فرمول (۷۰/۷ واحد در میلی‌لیتر)، نزدیکی قابل ملاحظه‌ای دارد. میزان خطا ۰/۰۱ درصد به‌دست آمد.

جدول ۳- طراحی آزمایش‌ها و نتایج مربوط به دو متغیر اعمال شده به روش سطح پاسخ

نمونه	عصاره نخود فرنگی (گرم در لیتر)	کنجاله تخم پنبه (گرم در لیتر)	میزان جذب	میزان تولید آلفا آمیلاز (واحد در میلی‌لیتر)
۱	۷۵/۰۰	۲۲/۰۰	۱/۱۶۶۷	۵۶/۸۳۴
۲	۵۰/۰۰	۱۴/۰۰	۱/۲۹۷۲	۴۸/۴۰۰
۳	۷۵/۰۰	۳۳/۳۱	۱/۷۲۷۹	۶۹/۷۴۱
۴	۷۵/۰۰	۳۰/۰۰	۱/۱۹۷۳	۵۷/۵۳۷
۵	۱۰۰/۰۰	۳۰/۰۰	۱/۵۲۱۹	۶۵/۰۰۳
۶	۷۵/۰۰	۱۰/۶۸	۰/۶۹۷۵	۵۳/۰۰۰
۷	۳۹/۶۴	۲۲/۰۰	۰/۷۳۹۵	۴۱/۵۰۰
۸	۱۱۰/۳۵	۲۲/۰۰	۱/۰۸۰۶	۵۴/۸۵۳
۹	۵۰/۰۰	۳۰/۰۰	۱/۳۰۴۷	۶۰/۸۳۶
۱۰	۱۰۰/۰۰	۱۴/۰۰	۱/۲۹۷۰	۵۹/۸۳۱



شکل۲- مقایسه بین میزان تولید آلفا آمیلاز مشاهده شده و میزان تولید آلفا آمیلاز پیش بینی شده توسط فرمول

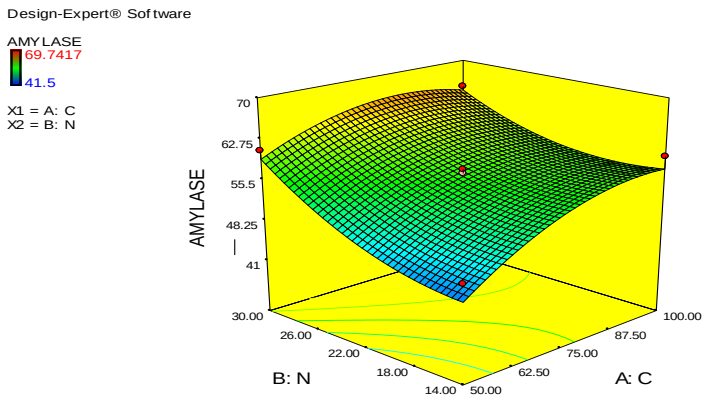
جدول ۴- نتایج جدول تحلیل واریانس برای مدل درجه دوم

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	احتمال F	احتمال P	
مدل	۵۴۹/۴۴	۵	۱۰۹/۸۹	۱۲/۸۴	۰/۰۱۴۲	significant
A-C		۱	۱۴۸/۶۴	۱۷/۳۷	۰/۰۱۴۱	
B-N		۱	۲۱۳/۰۶	۲۴/۹۰	۰/۰۰۷۵	
AB		۱	۱۳/۱۹	۱/۵۴	۰/۲۸۲۳	
A^2		۱	۵۸/۲۲	۶/۸۰	۰/۰۵۹۵	
B^2		۱	۴۱/۹۲	۴/۹۰	۰/۰۹۱۳	
باقیمانده		۴	۸/۵۶			
Lack of Fit		۳	۱۱/۳۳	۴۵/۷۴	۰/۱۰۸۲	not significant
خطای خالص		۱	۰/۲۵			
Cor total		۹				
ضریب تعیین						۰/۹۴۱

تحلیل آماری نتایج به دست آمده از آزمایش‌ها در جدول ۴ نشان داده شده است. میزان احتمال F با میزان ۱۲/۸۴ دلالت بر معنی‌دار بودن مدل است. همچنین، نشان می‌دهد که ۱/۴۲ درصد احتمال وجود دارد که مدل، دچار اختلال شود. مقدار عددی ضریب تعیین (R^2) برای فعالیت آلفا آمیلاز ۰/۹۴ است که نشان‌دهنده میزان انطباق داده‌ها از مدل رگرسیون می‌باشد. می‌توان چنین نتیجه گرفت که مدل‌های رگرسیون به‌خوبی توانسته‌اند رابطه بین شرایط کشت (منابع کربنی و نیتروژنی) و تولید آلفا آمیلاز را نشان داده و پیش‌بینی کنند. احتمال P معنادار بودن ضرایب و همچنین، اهمیت واکنش‌های متقابل بین متغیرها را مشخص می‌کند. به عبارت دیگر اثرات خطی عصاره نخود فرنگی و کنجاله تخم پنبه در میزان تولید آلفا آمیلاز در محیط کشت، معنی‌دار است (*Pvalue*>۰/۰۵). در واقع احتمال P پیشنهاد می‌کند که از بین دو متغیر اعمال شده، B-N (غلظت منبع نیتروژنی) تاثیر بیشتری بر تولید آلفا آمیلاز داشته است. اثرات متقابل عصاره نخودفرنگی و کنجاله تخم پنبه بر تولید آلفا آمیلاز معنی‌دار نیست (*Pvalue*<۰/۰۵). در مورد اثرات درجه دوم بر تولید آلفا آمیلاز هر دو عامل معنی‌دار نیست (*Pvalue*<۰/۰۵). معادله Y، مدل رگرسیون را برای تولید آلفا آمیلاز پس از تجزیه و تحلیل نتایج توسط نرم‌افزار دزاین اکسپرت نشان می‌دهد. همچنین، مدل نهایی دارای عدم تطابق غیر معنی‌دار است که نشان‌دهنده پردازش خوب مدل است. جدول ۴ ضریب‌های رگرسیون و مقادیر P را برای مدل رگرسیون نشان می‌دهد.

نتایج و تفسیر اثر غلظت عصاره نخود فرنگی و کنجاله تخم پنبه بر عملکرد تولید آلفا آمیلاز

شکل ۳ تاثیر سطوح مختلف عصاره نخود فرنگی و کنجاله تخم پنبه را بر میزان تولید آلفا آمیلاز نشان می‌دهد. بیش‌ترین میزان تولید آلفا آمیلاز در غلظت عصاره نخود فرنگی ۷۵ و کنجاله تخم پنبه ۳۳/۳ گرم در لیتر به مقدار ۶۹/۷۴ واحد در میلی‌لیتر به‌دست آمد. نتایج نشان داد که افزایش منبع نیتروژنی تاثیر در خور توجهی در میزان تولید آلفا آمیلاز داشته است به‌طوری که با افزایش آن، میزان تولید آلفا آمیلاز افزایش در خور توجهی یافته است. افزایش منبع کربنی نیز باعث افزایش میزان تولید آلفا آمیلاز شده است. کم‌ترین میزان تولید آلفا آمیلاز در کم‌ترین سطح منبع کربنی مشاهده شده است که نشان‌دهنده اهمیت غلظت منبع کربنی در میزان تولید آلفا آمیلاز است.



شکل ۳- منحنی سطح پاسخ برای تولید آلفا آمیلاز توسط *باسیلوس آمیلولیکوییفسینز* با متغیرهای عصاره نخود فرنگی (A:C) و کنجاله تخم پنبه (B:N)

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان‌دهنده اهمیت رابطه بین سطح منبع نیتروژنی و منبع کربنی در تولید آلفا آمیلاز توسط *باسیلوس آمیلولیکویی‌فسینز* است. در سطوح پایین‌تر منبع نیتروژنی، تاثیر منبع کربنی بر میزان تولید آنزیم بالاست. از سوی دیگر با افزایش منبع نیتروژنی، میزان تاثیرگذاری منبع کربنی در افزایش تولید آنزیم آلفا آمیلاز کاهش می‌یابد. به عبارت دیگر نتایج نشان داد که افزایش منبع نیتروژنی تاثیر در خور توجهی در میزان تولید آلفا آمیلاز توسط *باسیلوس آمیلولیکویی‌فسینز* داشته است، به‌طوری که با افزایش آن، میزان تولید آلفا آمیلاز افزایش در خور توجهی یافته است. افزایش منبع کربنی نیز باعث افزایش میزان تولید آلفا آمیلاز شده است، زیرا کم‌ترین میزان تولید آلفا آمیلاز در کم‌ترین سطح منبع کربنی مشاهده شده است.

در نتایج به‌دست آمده توسط رامش و همکاران[۱۹] (۲۶)، بایسال و همکاران[۲۰] (۲۷)، کانسولا و همکاران[۲۱] (۲۸) و همچنین، گویال و همکاران[۲۲] (۲۹) نیز نشان داده شد که در تولید آلفا آمیلاز توسط باکتری‌های جنس *باسیلوس*، در ابتدا با افزایش منبع کربنی تولید آنزیم آلفا آمیلاز افزایش می‌یابد، اما با افزایش بیشتر منبع کربنی، تولید آنزیم کاهش می‌یابد (۲۶-۲۹). نتایج آن‌ها با نتایج تحقیق حاضر انطباق دارد زیرا در مطالعه حاضر نیز مشاهده شد که در سطح منبع نیتروژنی ۲۲ گرم در لیتر و با افزایش منبع کربنی تا سطح ۷۵ گرم در لیتر، تولید آنزیم افزایش در خور توجهی داشته است و با افزایش بیشتر در میزان منبع کربنی تا سطح ۱۱۰/۳۵ گرم در لیتر، میزان تولید آنزیم کاهش یافته است. این پدیده می‌تواند ناشی از تاثیر فشار اسمزی محیط در کاهش توانایی سلول برای تولید آنزیم باشد (۲۸).

در پایین‌ترین سطح منبع نیتروژنی یعنی ۱۴ گرم بر لیتر و با افزایش منبع کربنی از ۵۰ به ۱۰۰ گرم بر لیتر، میزان تولید آنزیم آلفا آمیلاز ۱۱ واحد در میلی‌لیتر افزایش یافته است، که با نتایج به‌دست آمده توسط تانییلدیزی و همکاران[۲۳] انطباق دارد (۲۲). این در حالی است که در سطح ۳۰ گرم بر لیتر منبع نیتروژنی و با همین میزان افزایش منبع کربنی، فعالیت آنزیمی تنها ۵ واحد در میلی‌لیتر افزایش یافته است. بنابراین، نتایج نشان دهنده این نکته نیز بود که در سطح بالای منبع نیتروژنی، میزان تولید آلفا آمیلاز به‌طور در خور توجهی بیشتر از سطح پایین منبع نیتروژنی است. اهمیت نیتروژن می‌تواند به این دلیل باشد که میکروارگانیسم‌ها برای سنتز پروتئین، اسید آمینه و به دنبال آن آنزیم‌ها از جمله آلفا آمیلاز، نیاز به نیتروژن دارند که آن را از طریق تجزیه مواد حاوی پروتئین موجود در محیط کشت تامین می‌کنند (۲).

نتایج به‌دست آمده توسط دی و همکاران[۲۴] که بر روی بهینه‌سازی تولید آلفا آمیلاز با روش سطح پاسخ پرداختند نیز نشان داده که با افزایش منبع نیتروژنی (کنجاله سویا)، تولید آلفا آمیلاز افزایش می‌یابد (۳۰). در این تحقیق، نیز مشاهده شد که با افزایش منبع نیتروژنی، میزان تولید آلفا آمیلاز افزایش می‌یابد که با نتایج به‌دست آمده توسط تانییلدیزی و همکاران، گویال و همکاران و نیز دی و همکاران انطباق دارد (۲۰ و ۲۹-۳۰).

می‌توان نتیجه گیری کرد که نتایج این پژوهش بیانگر اهمیت رابطه بین سطوح منبع نیتروژنی و منبع کربنی در تولید آلفا آمیلاز باکتریایی است. در این تحقیق، بازه‌ای از سوبستراهای تغذیه‌ای (عصاره نخود فرنگی و کنجاله تخم پنبه) به منظور تولید آلفا آمیلاز

توسط *باسیلوس آمیلولیکوییفسینز* استفاده شدند. نتایج نشان دادند که بهینه‌سازی تولید آلفا آمیلاز، با انتخاب دقیق بازه‌ای از ترکیبات کلیدی - در این تحقیق منابع کربنی و نیتروژنی مورد استفاده- به شدت در میزان تولید آلفا آمیلاز باکتریایی تاثیر گذار است. بر اساس یافته‌های تحقیق، روش سطح پاسخ برای بهینه‌سازی شاخص‌های فرایند تخمیر غوطه‌وری به منظور دستیابی به حداکثر میزان تولید آلفا آمیلاز با سوبستراها و باکتری مورد استفاده، کارایی مطلوبی داشته است.

References

(1) Kandra L. α-amylases of medical and industrial importance. *Journal of Molecular Structure (Theochem)* 2003; 666-667: 487-98.

(2) Gupta R, Gigras P, Mohapatra H, Goswami VK, Chauhan B. Microbial α amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry* 2003; 38: 1599-616.

(3) Iulek J, Franco OL, Silva M, Slivinski CT, Bloch JC, Rigden DJ, et al. Purification, biochemical characterization and partial primary structure of a new α-amylase inhibitor from Secale cereal. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2000; 32 (11-12): 1195-204.

(4) Tangphatsornruang S, Naconsie M, Thammarongtham C, Narangajavana J. Isolation and characterization of an α-amylase gene in cassava (*Manihot esculenta*). *Plant Physiology and Biochemistry* 2005; 43 (9): 821-7.

(5) Reddy NS, Nimmagadda A, Rao KR. An overview on the microbial α-amylase family. *African Journal of Biotechnology* 2003; 2 (12): 645-8.

(6) Souza PM, Magalhaes PO. Application of microbial α-amylase in industry. *Brazilian Journal of Microbiology* 2010; 41: 850-61.

(7) Singh P, Gupta P, Singh R, Sharma R. Factors affecting alpha amylase production on submerged fermentation by *Bacillus* sp. *International Journal of Pharmacy and Life Sciences* 2012; 3 (12): 2243-6.

(8) Pandey A, Nigam P, Soccol CR, Soccol VT, Singh D, Mohan R. Advances in microbial amylases. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 2000; 31: 135-52.

(9) Muralikrishna G, Nirmala M. Cereal α-amylases-an overview. *Carbohydrate Polymers* 2005; 60 (2): 163-73.

(10) Khorshidi J, Ebrahimzadeh H. Olericulture. 3rd ed. Tehran: Shahre Ab Press; 2009. 271-318 .

(11) Ratnayake WS, Hoover R, Shahidi F, Perera C, Jane J. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of starches from four field pea (*Pisum sativum* L.) cultivars. *Food Chemistry* 2001; 74 (2): 189-202.

(12) Shojaosadati SA, Asadollahi MA. Industrial Biotechnology. 2nd ed. Tehran: Tarbiat Modares University Press; 2008. 67-104.

(13) Silva TMS, Camara CA, Medeiros FD, Oliveira EJ, Agra MF, Harley RM, et al. Phaeophytins from *Gossypium mustelinum* Miers ex Watt (Malvaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 2005; 34 (3): 263-4.

(14) Hovi Y. Fats and vegetable oils: Characteristics and processing. 2nd ed. Tehran: Marze Danesh Press; 2008. 455-72.

(15) Kunamneni A, Permaul K, Singh S. Amylase production in solid state fermentation by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2005; 100: 168-71.

(16) Couto SR, Sanroman MA. Application of solid-state fermentation to food industry. *Journal of Food Engineering* 2006; 76 (3): 291-302.

(17) Gangadharan D, Sivaramakrishnan S, Nampoothiri KM, Sukumaran RK, Pandey P. Response surface methodology for the optimization of alpha amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Bioresource Technology* 2008; 99 (11): 4597-602.

(18) Hashemi M, Mousavi SM, Razavi SH, Shojaosadati SA. Comparison of submerged and solid state fermentation systems effects on the catalytic activity of *Bacillus* sp. KR-8104 alpha amylase at different pH and temperatures. *Industrial Crops and Products* 2013; 43: 661-7.

(19) Wenster-Botz D. Experimental design for fermentation media development: Statistical design or global random search. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2000; 90 (5): 473-83.

(20) Tanyildizi MS, Ozer D, Elibol M. Production of bacterial α-amylase by *Bacillus amyloliquefaciens* under solid substrate fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 2007; 37 (3): 294-7.

(21) Zhao CH, Chi Z, Zhang F, Guo FJ, Li M, Song WB, et al. Direct conversion of inulin and extract of tubers of Jerusalem artichoke into single cell oil by co-cultures of *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a and immobilized inulinase-producing yeast cells. *Bioresource Technology* 2011; 102 (10): 6128-33.

(22) Tanyildizi MS, Ozer D, Elibol M. Optimization of α-amylase production by *Bacillus* sp. using response surface methodology. *Process Biochemistry* 2005; 40 (7): 2291-6.

(23) Bernfeld P. Amylases, α and β. Methods in Enzymology, vol. 1. New York: Academic Press; 1955. 149-54.

(24) Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 1959; 31: 426-8.

(25) de Santos EO, Martins M. Effect of the medium composition on formation of amylase by *Bacillus* sp. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 2003; 46 (1): 129-34.

(26) Ramesh MV, Lonsane BK. Ability of a solid state fermentation technique to significantly minimize catabolic repression of α-amylase production by *Bacillus licheniformis* M27. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1991; 35 (5): 591-3.

(27) Baysal Z, Uyar F, Aytekin C. Solid state fermentation for production of α-amylase by a thermotolerant *Bacillus subtilis* from hot-spring water. *Process Biochemistry* 2003; 38 (12): 1665-8.

(28) Konsula Z, Liakopoulou-Kyriakides M. Hydrolysis of starches by the action of an α-amylase from *Bacillus subtilis*. *Process Biochemistry* 2004; 39 (11): 1745-9.

(29) Goyal N, Gupta JK, Soni SK. A novel raw starch digesting thermostable α-amylase from *Bacillus* sp. I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch. *Enzyme and Microbial Technology* 2005; 37 (7): 723-34.

(30) Dey D, Mitra A, Banerjee R, Maiti BR. Enhanced production of amylase by optimization of nutritional constituents using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal* 2001; 7 (3): 227-31.

---

[1]- *Bacillus amyloliquefaciens*
[2]- *Pisum*
[3]- *Papilionaceae*
[4]- *Mavaceae*
[5]- *Gossypium*
[6]- One factor at a time
[7]- Response Surface Methodology
[8]- Inoculum development medium
[9]- Fermentation medium or Production medium
[10]- Design expert
[11]- Screening
[12]- Central Composite Design
[13]- Rotatability
[14]- Dinitrosalicylic acid (DNS (
[15]- Q Lab
[16]- Bernfeld
[17]- Sigma aldrich
[18]- Forward
[19]- Ramaesh *et al.*
[20]- Baysal *et al.*
[21]- Konsula *et al.*
[22]- Goyal *et al.*
[23]- Tanyildizi *et al*
[24]- Dey *et al.*

Optimization of α-amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens* using response surfaces methodology

Hami Kaboosi *
Assistant Professor of Microbiology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran, hkaboosi@gmail.com
Naimeh Tabari
M.Sc of Food Science and Technology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran, naeimehtabari@yahoo.com
Hamid Reza Samadlouie
Assistant Professor of Food Technology, Shahrood University of Technology, Iran, hsamadlouie@yahoo.com

Abstract

Introduction: Alpha-amylase is an important commercialized enzyme among the starch-hydrolyzing ones. The bacterial amylase is widely utilized in various sectors of industry due to its advantages to amylases derived from plant or animal sources. Also the use of agricultural products and their residues as inexpensive fermentation substrates has high impact on minimizing the cost of α-amylase production. The principle aim of this study is to optimize α-amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens* using low cost agricultural resources with Response Surfaces Methodology (RSM).

Materials and methods: The Effect of different amounts of the carbon source (extract of pea) and nitrogen source (cotton seed cake) on production of α-amylase by *B. amyloliquefaciens* using statistical methods of RSM was studied. Carbon and nitrogen sources were considered in 5 levels during the submerged fermentation and used central composite rotatable design with 10 experiments.

Results: The best conditions for maximum production of α-amylase by *B. amyloliquefaciens* were pea extract of 75g/L and cotton seed cake of 33.3 g/L, so that in these conditions the enzyme production rate was 69.74 Uml^{-1}. During optimization by RSM, it became clear that the level of the used nitrogen source (cotton seed cake) is more effective in producing bacterial α-amylase in submerged fermentation compared to the used carbon source (extract of pea).

Discussion and conclusion: This study showed the importance of the relationship between nitrogen and carbon sources on production of α-amylase. The results showed that the RSM applied for optimizing parameters of submerged fermentation condition aimed at producing maximum quantities of α-amylase by *B. amyloliquefaciens* acts with high efficiency.

Key words: α-amylase, *Bacillus amyloliquefaciens,* Response Surface Methodology, Submerged Fermentation

* Corresponding author
Received: October 13, 2013 / **Accepted:** January 14, 2014