

## استفاده از ضایعات لیگنوسلولزی کشاورزی جهت تولید اقتصادی آنزیم گزیلاناز قلیایی، از سویه بومی *Bacillus mojavensis* به روش تخمیر غوطه ور و بهینه سازی تولید

عباس اخوان سپهی<sup>۱</sup>، شکوفه غازی<sup>\*</sup>، جواد جعفری اقدم<sup>۱</sup> و مریم اخوان سپهی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، دانشکده علوم پایه، گروه میکروب شناسی

<sup>۲</sup> تهران، مؤسسه کنترل کیفی غذا و دارو.

تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۲/۲۴

تاریخ دریافت: ۸۸/۱/۲۰

### چکیده

در این پروژه ضمن جداسازی سویه بومی مناسب باسیلوس از خاک مزرعه پنبه، طی مراحل غربالگری اولیه و ثانویه، شایستگی آنزیم گزیلاناز تولید شده توسط این سویه، به لحاظ کمی و کیفی فعالیت آنزیمی بررسی گردید. سنجش دما و pH بهینه فعالیت آنزیمی در محدوده ای بالا از دما و pH. با اندازه گیری میزان آزاد شدن قندهای احیاء کننده انجام گرفت. بهینه دما و اسیدیته فعالیت آنزیمی گزیلاناز جداسازی شده در pH ۹ و دمای ۵۵ درجه سانتی گراد تعیین شد. نتایج مربوط به تعیین ترادف ژنتیکی rRNA ۱۶S سویه غربال شده، ۱۰۰ درصد تشابه ژنتیکی با توالی rRNA ۱۶S باسیلوس موجاونسیس نشان داد و هویت جدایه مولد آنزیم، تحت عنوان سویه ای بومی از باسیلوس موجاونسیس مشخص گردید. باسیلوس موجاونسیس غربال شده به عنوان جدایه برتر جهت تولید اقتصادی گزیلاناز با استفاده از ملاس، باگاس، سبوس گندم، سبوس جو و شلتوک برنج وارد مرحله بهینه سازی گردید. با اعمال تمامی عوامل ممکن در فرآیند بهینه سازی، افزایش در میزان تولید آنزیم از ۱۹۴/۶۸ IU/ml به میزانی معادل ۳۰۲/۴۶۶ IU/ml پس از فرآیند بهینه سازی، مشاهده شد. موفقیت در تولید آنزیم گزیلاناز با استفاده از سوبسترای ارزان و مناسب و توانایی باکتری جهت استفاده از ضایعات لیگنوسلولزی (سبوس جو به عنوان منبع بهینه)، همچنین تولید گزیلاناز فعال در شرایط قلیایی و دمایی بالا، این سویه را جهت تولید اقتصادی گزیلانازهای مناسب صنعتی نامزد می کند.

واژه های کلیدی: باسیلوس موجاونسیس، سبوس جو، گزیلاناز

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۵۲۲۴۰۳۸ پست الکترونیکی: shokoofeh.ghazi@gmail.com

### مقدمه

و هیدرولیز کامل آن به مونومرهایش به عملکرد آنزیم گزیلاناز وابسته است (۱۸ و ۳۰).

از طرفی به دلیل کاربردهای وسیع بیوتکنولوژیکی و صنعتی گزیلانازها (آنزیم تجزیه کننده پلی مر گزیلان) از جمله در صنعت کاغذسازی به منظور سفیدشویی خمیر کاغذ و حذف لیگنین از آن، ارتقاء کیفیت گوشت ضمن پخت، به عنوان آنزیم کمک کننده هضم غذا (Digestive enzyme) در جیره غذایی دام و طیور و در رژیم غذایی افراد گیاه خوار، سالیانه هزینه سنگین واردات آنزیم را برای

سالیانه مقادیر عظیمی از ضایعات کشاورزی لیگنوسلولزی اعم از سبوس گندم، شلتوک برنج، سبوس جو، ملاس، باگاس و ... در نتیجه فعالیتهای کشاورزی و جنگل داری و انواع فرآیند های صنعتی تولید می شوند (۲۰ و ۲۳). لیگنوسلولزها به عنوان دومین مواد تشکیل دهنده دیواره سلولی گیاهی عمدتاً از لیگنین، سلولز و همی سلولز تشکیل شده اند. گزیلان هتروپلیمری از D گزیلوپیرانوز، دومین بیوپلیمر وافر در طبیعت پس از سلولز می باشد که به عنوان ترکیب اصلی همی سلولزی در چوب یافت می شود

سازی در راستای افزایش میزان تولید اولیه آنزیمی از این سویه انجام شد.

### مواد و روشها

**مراحل جداسازی انحصاری جنس باسیلوس:** نمونه برداری از خاک مزارع کشاورزی پنبه، بادام، به، کاج، جو و گندم انجام گرفت. به دلیل غنی بودن محتوای خاک این مزارع از گزیلان، انتظار می رفت که اکوسیستم مناسبی جهت زندگی باکتریهای تولید کننده آنزیم گزیلاناز باشند. جهت جداسازی جنس باسیلوس از روش کشت، طی غنی سازی حرارتی (Heat enrichment culture technique) و بدنبال آن از روش کخ - روش پورپلیت (Koch-Pour Plate technique) استفاده گردید (۱۰، ۱۳ و ۱۴).

**غربالگری اولیه جهت شناسایی مقدماتی جدایه های تولید کننده آنزیم گزیلاناز:** کشت هر یک از سویه های جداسازی شده به روش کشت خطی و نقطه ای بر روی محیط اختصاصی گزیلان آگار انجام شد و پس از گرماگذاری پلیت ها در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت، نتایج بررسی شدند.

محیط گزیلان آگار (Xylan-Agar)، حاوی گزیلان خالص پوسته جو (تهیه شده از شرکت Fluka) با pH ۷ و ترکیبات زیر (گرم در لیتر) تهیه شد: Oat ۵, Peptone ۵, Yeast extract, MgSO4.7H2O 1۵spelt xylan ۱۵, K2HPO4 ۱Agar.

در چنین محیط کشتی، میکروارگانیسمهای مولد آنزیم گزیلاناز، تولید هاله شفاف ناشی از تجزیه گزیلان (Xylan digestion halo zones) می نمایند. جهت رویت بهتر هاله ها، پلیتها با محلول ۰/۱ درصد کونگو قرمز (Congo Red) به مدت ۱۵ دقیقه رنگ آمیزی شده و سپس با محلول کلرید سدیم ۱ مولار چندین بار شسته شدند (۴).

**غربالگری ثانویه:** جدایه های انتخاب شده طی غربالگری اولیه که قطر هاله مناسبی ناشی از تجزیه گزیلان نشان داده

کشور در بر دارد (۲، ۴ و ۱۲)، در حالی که می توان از انواع ضایعات کشاورزی به عنوان سوبسترای ارزان قیمت جهت تولید صنعتی و مقرون به صرفه گزیلاناز توسط میکروارگانیسمها و طی یک پروسه ی تخمیری سازماندهی شده استفاده کرد (۲۰ و ۲۳). گزیلانازها طی تخمیر غوطه ور (۶ و ۷) و تخمیر بستر جامد (۱۴، ۲۲ و ۳۰) تولید می شوند. حدود ۴۰ درصد قیمت بالای گزیلانازهای صنعتی به دلیل قیمت بالای سوبسترای است که در تولید آنزیم به کار رفته است، درحالی که موفقیت در تولید آنزیم با استفاده از سوبسترای ارزان قیمت و توانایی سویه ها جهت استفاده از این منابع کربنی، تولید اقتصادی گزیلانازهای صنعتی را امکان پذیر کرده است (۱، ۱۱ و ۲۶).

از طرفی اغلب گزیلانازهای تولید شده از قارچها و اکتینومیست ها به دلیل کاهش یا عدم فعالیت آنزیمی در دماهای بالا و به ویژه pH قلیایی، کاربرد این نوع گزیلانازها را در فرآیندهای صنعتی محدود ساخته و اهمیت تولید آنزیم از منشاء باکتریایی را تقویت می کند (۱۴، ۱۵، ۱۷، ۲۴ و ۲۸) چرا که اغلب گزیلانازهای تولیدی با منشاء باکتریایی قادر به فعالیت در دما و pH بالا می باشند (۱۶، ۲۷ و ۳۱).

ضمن اشاره به اهمیت انواع گزیلانازهایی که بتوانند در دما و اسیدیته بالا فعالیت کنند، امکان تولید اقتصادی آنزیم با سوبستراهای ارزان قیمت، از مهم ترین گامها جهت تولید آنزیم بشمار می رود. در این پروژه ضمن جداسازی سویه مناسب باسیلوس از خاک مزرعه پنبه (ایران- حوالی کاشان)، طی مراحل غربالگری اولیه و ثانویه، شایستگی آنزیم تولید شده توسط سویه از لحاظ کیفی و کمی فعالیت آنزیمی در دما و pH بالا به اثبات رسید و باسیلوس جداسازی شده، جهت تولید اقتصادی آنزیم با استفاده از ضایعات کشاورزی حاوی قند مورد نظر مورد نیاز به عنوان سوبسترای ارزان و مناسب و به روش تخمیر غوطه ور و به عنوان جدایه برتر برگزیده شد. در نهایت مراحل بهینه

گرفت. سپس بهینه pH فعالیت آنزیمی برای گزیلاناز تولید شده از هر سویه، در محدوده ای از pH بین ۷ تا ۱۰/۶ ارزیابی شد. همچنین بررسی بهینه دمای فعالیت آنزیمی هر سویه در pH بهینه تعیین شده و در محدوده ای از دما بین ۳۵ الی ۶۵ درجه سانتی گراد انجام گرفت. در نهایت با مقایسه بهینه دما و اسیدیته فعالیت گزیلانازهای ۶ سویه برتر در دست بررسی، جدایه برتر انتخاب شد.

**جداسازی آنزیم از محیط کشت تولید آنزیم:** پس از اتمام فرآیند تولید آنزیم گزیلاناز توسط هر یک از ۶ سویه در محیط پایه تولید آنزیمی، به طور جداگانه نمونه گیری در شرایط استریل انجام گرفت. محتوای مایع کشت هر ارلن با انتقال به لوله های اپندورف در دور ۱۰۰۰۰ rpm و به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفوژ یخچال دار با دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شدند. سانتریفوژ باعث رسوب مواد جامد و معلق موجود در محیط کشت شده و در نتیجه از عصاره شفاف رویی به عنوان منبع آنزیم گزیلاناز خارج سلولی و خام جهت سنجش فعالیت آنزیمی استفاده شد (۱۴).

**سنجش فعالیت آنزیمی گزیلاناز:** محلول سوسترای ۰/۵ درصد از گزیلان خالص پوسته جو، در بافر مناسب ۰/۰۵ مولار در محدوده ای از pH تهیه و هموژنیزه شد. میزان ۰/۵ ml از سوسترای همراه ۰/۵ ml از محلول آنزیمی که با درصد مناسبی در بافر رقیق شده بودند (Appropriately diluted enzyme)، به مدت ۲۰ دقیقه گرماگذاری شدند.

استفاده از بافر سدیم فسفات برای pH معادل ۸ و ۷ و استفاده از بافر Glycine-NaOH برای سه محدوده pH معادل ۱۰/۶، ۱۰، ۹ در تهیه سوسترای هموژنیزه جهت رقیق سازی محلول آنزیمی برای هر pH، تحت عنوان فاکتور رقت (Dilution factor) استفاده گردید. سنجش فعالیت آنزیمی به روش DNS stopping method که سنجش میزان آزاد شدن قندهای احیاء کننده است محاسبه

بودند، به منظور غربال سویه های مولد گزیلاناز خارج سلولی، وارد مرحله غربالگری ثانویه شدند. در این مرحله از روش چاهک گذاری تحت عنوان روش، Plate enzyme clearing assay test (PECAT) استفاده شد (۹، ۲۷ و ۳۱). در روش چاهک گذاری، سوپرناتانت های شفاف از عصاره کشت ۲۴ ساعته سویه های رشد کرده در محیط گزیلان براث (Xylan broth)، حاوی ترکیبات زیر:

۵ Peptone, ۵ Oat spelt Xylan, 5 Yeast extract, 1  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , ۱  $K_2HPO_4$  و طی سانتریفوژ در دور ۱۰۰۰۰ rpm و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد جداسازی شدند. سوپرناتانت های شفاف (حاوی گزیلاناز خارج سلولی) درون چاهک های حفر شده در پلیتهای حاوی گزیلان آگار و بافر، اضافه شدند. گرماگذاری پلیتها در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت انجام گرفت. قطر هاله های ظهور یافته در روش چاهک گذاری در نتیجه تولید آنزیم خارج سلولی و تجزیه گزیلان توسط هر سویه، جهت مقایسه کیفی و مقدماتی میزان تولید آنزیم گزیلاناز خارج سلولی بین سویه ها، اندازه گیری شد.

**روند انتخاب سویه برتر طی تعیین بهینه دما و pH فعالیت آنزیمی گزیلاناز بین سویه های غربال شده**

با توجه به ارزش گزیلانازهایی با ویژگی بهینه دما و pH فعالیت آنزیمی بالا، مقایسه فعالیت آنزیمی گزیلاناز تولید شده بین سویه های جدا شده از نظر بهینه دما و pH فعالیت آنزیمی و میزان اولیه تولید آنزیمی هر سویه به طور جداگانه انجام شد. جهت تعیین بهینه دما و pH فعالیت آنزیمی، سویه هائی که طی مراحل غربالگری اولیه و ثانویه نتایج بالاتری در ظهور هاله شفاف ناشی از تولید آنزیم گزیلاناز را نشان دادند، به عنوان سویه های برتر انتخاب شده و مورد آزمایش قرار گرفتند. تعداد این سویه های برتر به ۶ سویه رسید، لذا تولید آنزیم توسط هر ۶ سویه به طور مجزا و در محیط پایه تولید آنزیم گزیلاناز انجام

۲۵۰ میلی لیتر در ۳۷ درجه سانتی گراد و دور شیکر rpm ۱۸۰ انجام گرفت. میزان تولید آنزیم برای سویه منتخب، طی ۱۲۰ ساعت کشت سویه به روش تخمیر غوطه ور در محیط تولید پایه ای آنزیم گزیلاناز به همراه هر یک از ضایعات کشاورزی به عنوان منبع کربن گزیلان دار در فواصل زمانی (هر ۲۴ ساعت یکبار) بررسی و فعالیت آنزیمی سنجش شد. مراحل بهینه سازی به این ترتیب می باشد که ابتدا منابع کربن مختلفی به محیط کشت پایه اضافه شد و اثر هر یک از آنها به طور مجزا بر میزان تولید آنزیم بررسی شد. همچنین زمان حداکثر تولید آنزیم در حضور هر یک از منابع کربن بررسی شده و نه تنها بهینه منبع کربن تعیین شد بلکه زمان تولید حداکثر آنزیم (Time course of maximum enzyme production) در حضور منبع کربن بهینه نیز تعیین شد. پس از تعیین بهینه منبع کربن، مناسب ترین غلظت بهینه منبع کربن با درصد حجمی ۱۰، ۵، ۲، ۱ درصد از تلقیح سوسپانسیون باکتریایی از محیط Pre-culture به محیط تولید آنزیم نیز بررسی و بهینه شد.

**پیش تیمار ضایعات کشاورزی لیگنوسلولزی:** جهت استفاده از ضایعات در شرایط تخمیر غوطه ور، پیش تیمار بر روی این تفاله ها انجام شد. پس از تهیه تفاله ها از بازار محلی، تفاله مورد نظر را خرد کرده و به منظور به دست آوردن ذرات مناسب از لحاظ اندازه، از الکی با قطر منافذ ۱ mm عبور داده، جهت حذف اضافات قندی حاصل از فرآیندهای تهیه و جمع آوری نمونه ها، آنها را دو بار با آب مقطر ولرم شستشو داده و پس از خشک شدن تفاله ها در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد، ذرات پودری مناسب حاصله (به قطر تقریبی ۱mm)، جهت استفاده درون محیط کشت طی فرآیند تخمیر و تولید آنزیم آماده شد. ضمن اینکه، اتوکلاو کردن محیط کشت تولید آنزیم، با توجه به حرارتی که به تفاله موجود در آن وارد می آید، به عنوان یک پیش تیمار، منجر به نرم شدن تفاله و خروج کامل عصاره گزیلاناز از تفاله ها گردید (۲۳ و ۲۴).

گردید (۳ و ۲۱). میزان آزاد شدن قندهای احیاء کننده با روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۴۰ نانومتر، اندازه گیری شد. از منحنی استاندارد قند د-گزیلوز جهت تعیین غلظت قندهای آزاد شده استفاده گردید. طبق تعریف IUPAC، یک واحد از فعالیت آنزیمی برابر است با، مقداری از آنزیم که آزاد شدن یک میکرومول قند D-(xylose equivalent) را از سوبسترای به کار رفته در واکنش را در یک دقیقه انجام دهد (۴).

**تعیین هویت سویه منتخب تولید کننده گزیلاناز:** مراحل رنگ آمیزی گرم و اسپور (مالاشیت گرین) به همراه بررسیهای مورفولوژیکی و تستهای تشخیصی بیوشیمیایی جنس *Bacillus* طبق Bergey's manual of determinative bacteriology انجام شد (۱۹ و ۲۹). جهت اثبات تعیین هویت ژنتیکی جدایه برتر، ابتدا جداسازی و تخلیص DNA نمونه با استفاده از کیت Roche انجام گرفت. سپس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، PCR آن انجام شد (۹ و ۱۷). پرایمرهای استفاده شده جهت تعیین هویت جدایه دارای ترادف زیر بودند:

f 3: 5'- AGAGTT TGATCCTGGC -3'

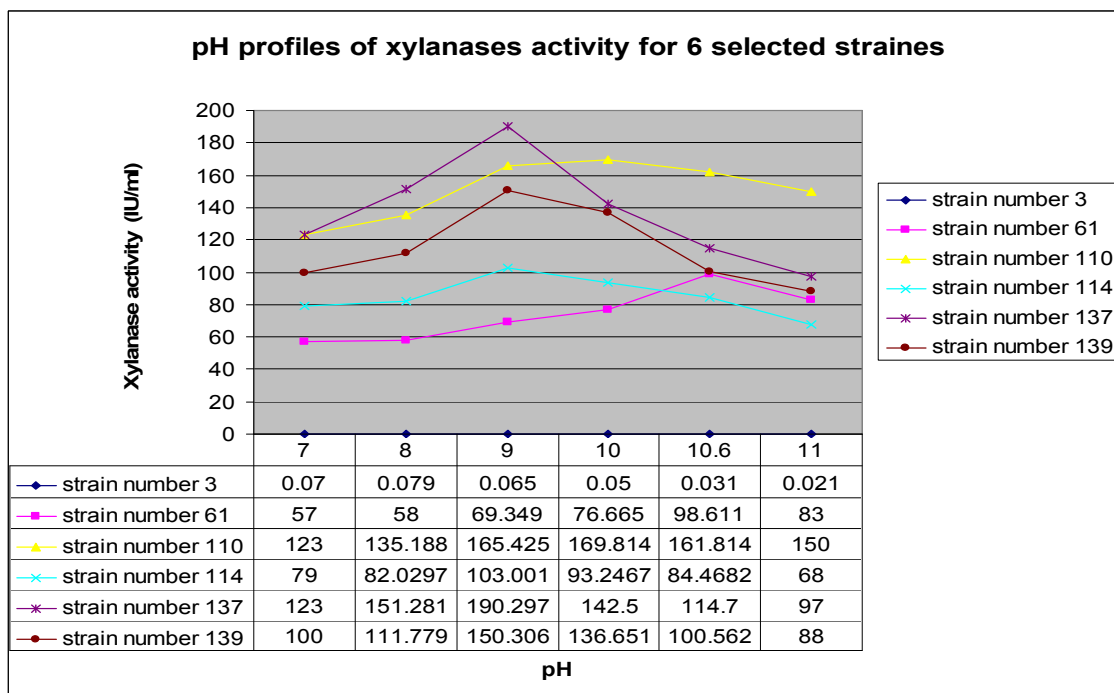
r 5: 5'- TACCTTGTTACGACTT -3'

در نهایت نمونه ها جهت تعیین ترادف ژنتیکی به شرکت SQ lab آلمان ارسال شده و نتیجه با استفاده از برنامه Blast مقایسه و تعیین هویت گردید.

**بهینه سازی:** جهت تولید آنزیم گزیلاناز از محیطهای پایه تولید آنزیم با ترکیبات زیر (pH ۸) استفاده گردید (گرم در لیتر): Yeast extract 5, MgSO4.7H2O 1, Peptone 5, Agar ۱۵, K2HPO4 ۱، انواع ضایعات لیگنوسلولزی کشاورزی از جمله: ملاس، شلتوک برنج، باگاس نیشکر، سیوس گندم و سیوس جو با درصد حجمی (w/v) ۲ درصد، به عنوان منبع کربن و سوبسترای اصلی القاء کننده تولید آنزیم. شرایط تخمیر جهت تولید آنزیم در ۵۰ میلی لیتر از محیط کشت پایه تولید آنزیمی در ارلنهای با حجم

بهینه شدند. ضمن اعمال هر فاکتور جهت بهینه سازی، سنجش فعالیت آنزیمی در فواصل زمانی ۲۴ ساعته از محیط کشت تخمیری صورت گرفت و نتایج حاصله از میزان فعالیت آنزیم در حضور هر یک از فاکتورها مقایسه شدند.

بررسی انواع منابع نیتروژنی با غلظت ۱ (w/v) درصد پارامتر بعدی در فرآیند بهینه سازی بود تا بهینه منبع نیتروژن جهت افزایش تولید آنزیم بدست آید. میزان هوادهی، pH محیط کشت تولید و دمای فرآیند تخمیر، همچنین تأثیر افزودنیها از جمله فاکتورهای بعدی بودند که



نمودار ۱- مقایسه بهینه pH فعالیت آنزیم گزیلاناز تولید شده بین ۶ جدایه برتر در شرایط دمائی ۳۷ درجه سانتی گراد

جدول ۱- نتایج تستهای بیوشیمیایی *Bacillus mojavensis* بومی جدا سازی شده از خاک مزرعه پنبه

-/+	تخمیر قند گزیلوز	+	حساسیت به پنسیلین	+	کاتالاز
+	تخمیر قند مالتوز	+	همولیز روی بلاداگار	+	اکسیداز
+	تخمیر قند مانیتول	+	تست INM	+	اوره از
-	تخمیر قند آرابینوز	-	تولید لسیتیناز	-	تجزیه سبترات
-/+	تخمیر قند رافینوز	+	تولید ژلاتیناز	-	تست اندول
+	تخمیر قند تره هالوز	+	تولید آمیلاز	+	تست حرکت
-	تخمیر قند لاکتوز	-	هیدرولیز کازئین	-	تولید سولفید هیدروژن
+	تخمیر قند ساکاروز	+	تخمیر قند گلوکز	-/-	واکنش mR / Vp

میلی لیتر که حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط کشت بهینه تولید آنزیمی بوند، طبق شرایط بهینه تهیه گردید. جهت بررسی تأثیر ترکیبات افزودنی در میزان تولید آنزیم، از آنها به طور

در آخرین مرحله از بهینه سازی و به منظور ارتقاء میزان تولید آنزیم در محیط کشت تولیدی، تأثیر برخی ترکیبات افزودنی (Additives) بررسی شد. ارلنها با گنجایش ۲۵۰

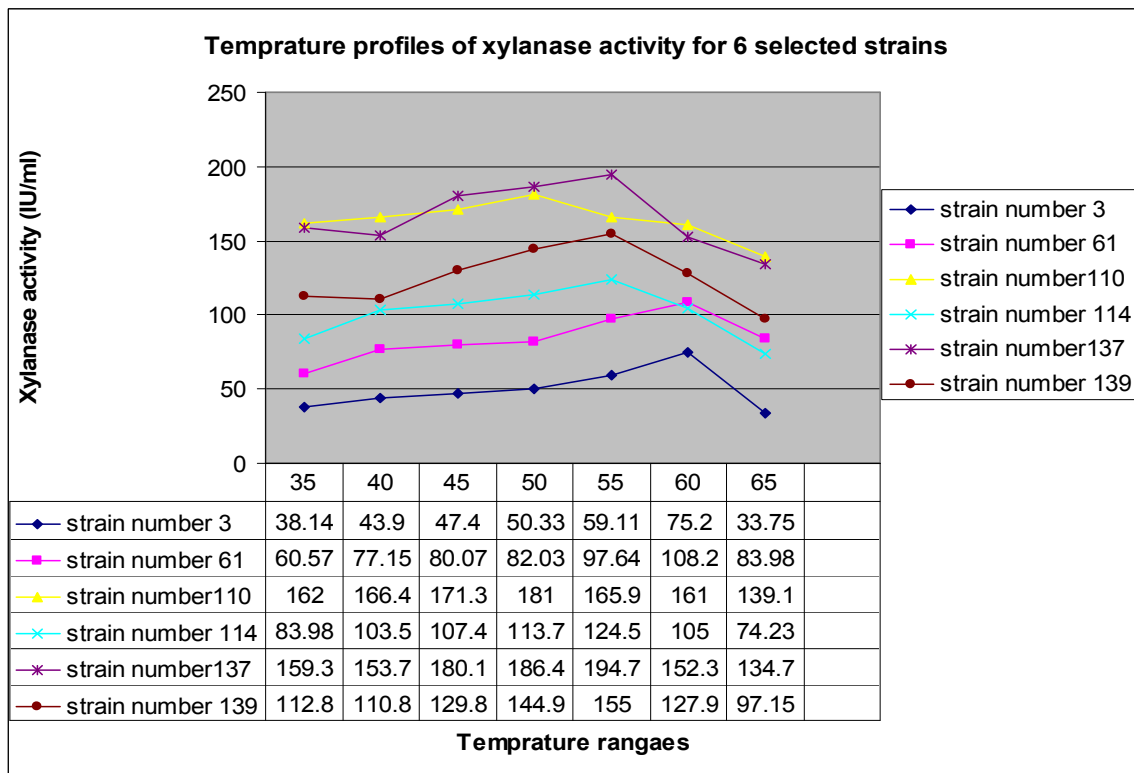
افزودن Trace element solution با ترکیبات ذیل (pH 7) بررسی شدند (g/l):

Urea 0.3, CoCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 2, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1.4, MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 1.6, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 5, CaCl<sub>2</sub> 0.3 and Tween 80 1.0.

pH تک تک محیطها بر روی ۸ تنظیم گردید (استفاده از محلول ۱۰ درصد کربنات سدیم قلیایی استریل شده جهت تنظیم pH). محیط کنترل فاقد هر گونه ترکیب افزوده به عنوان شاهد تهیه و میزان تولید آنزیمی مربوط به سایر ترکیبات با آن مقایسه شد.

جداگانه به محیطهای کشت اضافه و محیطها اتوکلاو شدند. ترکیبات افزوده بکار گرفته شده، از گروه قندها (منوساکارید و دی ساکارید)، (اسیدهای آمینه)، برخی سورفاکتنتها و نمکهای معدنی بودند از جمله:

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> با غلظت ۰/۱ (w/v) درصد، قند گلوکز با غلظت ۰/۱ (w/v) درصد، قند سوکروز با غلظت ۰/۱ (w/v) درصد، قند گزیلوز با غلظت ۰/۱ (w/v) درصد، روغن زیتون با غلظت ۰/۲ درصد، توئین ۸۰ با غلظت ۰/۱ (w/v) درصد، سدیم دودسیل سولفات (SDS) با غلظت ۰/۲ (w/v) درصد، گلیسین با غلظت ۰/۲ (w/v) درصد و تأثیر

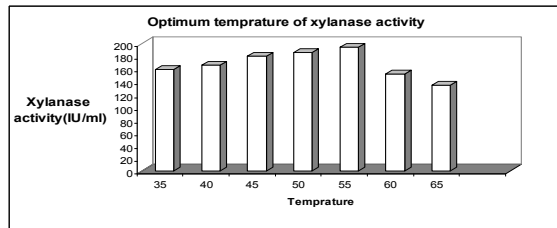


نمودار ۲ - مقایسه بهینه دمای فعالیت آنزیم گزیلاناز تولید شده بین ۶ جدایه برتر در شرایط pH بهینه ی بدست آمده از نمودار بالا برای هر سویه

## نتایج و بحث

نتیجه حاصل از جداسازی سویه و غربالگری تولید کنندگان منتخب آنزیمی: ۱۵۰ نمونه باسیل گرم مثبت اسپوردار هوازی از خاک مزارع جدا شدند. در غربالگری

نتایج حاصله از مقایسه مقادیر فعالیت آنزیمی به دست آمده مربوط به هر ارلن نقش مثبت و منفی ترکیبات اضافه شده را به عنوان مهار کننده تولید آنزیم و یا القاء کننده و افزایشده تولید آنزیم گزیلاناز آشکار ساخت.



نمودار ۴- بهینه دمای فعالیت آنزیم گزیلاناز تولیدی از جدایه منتخب ۱۳۷

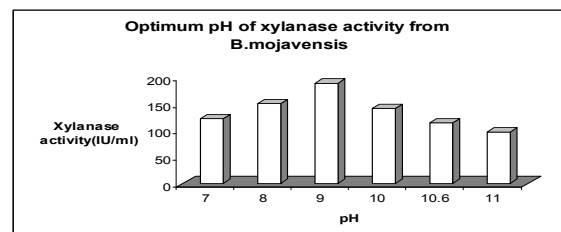
نتایج به دست آمده، pH ۹ و دمای ۵۵ درجه سانتی گراد را به عنوان بهینه pH و دمای فعالیت آنزیمی به ترتیب معادل ۱۹۰/۲۹۷ IU/ml و ۱۹۴/۶۸ IU/ml برای تک سویه منتخب ۱۳۷ مشخص ساخت (نمودار ۴ و ۵). ویژگی که آنزیم را نسبت به انواع گزیلانازهای تولید شده از قارچها از جمله *Aspergillus niger* ANL 301 (۲۴) و *Penicillium janthinellum* (۲۵) و برخی باکتریها از جمله *Bacillus subtilis* (۲۷) که بهینه دما و pH فعالیت آنزیمی پایینی دارند، برتر می سازد.

**نتایج تعیین هویت جدایه ۱۳۷ منتخب:** نتایج مربوط به تعیین هویت سویه برتر و آنالیز توالی rRNA ۱۶S، ۱۰۰ درصد تشابه ژنتیکی سویه جداسازی شده از خاک مزرعه پنبه را با جنس و گونه *Bacillus mojavensis* سویه NBRC15718 به اثبات رسانید.

بر اساس مطالعات انجام شده، تولید آنزیم گزیلاناز از *Bacillus mojavensis* به عنوان اولین گزارش در دنیا می باشد (۸). از این گونه به طور بالقوه در حیطه کنترل بیولوژیکی و به عنوان یک عامل ضد قارچی علیه قارچهای بیماری زای گیاهی نظیر *Fusarium* استفاده می شود و در حیطه تولید آنزیم تنها گزارشات اندکی از تولید آنزیم پروتئاز قلیایی از این باکتری به چشم می خورد (۵).

**نتایج بهینه سازی:** یکی از اهداف این پروژه تولید آنزیم در محیطی ساده و ارزان قیمت بود. لذا در ازای منبع گزیلان خالص به عنوان منبع کربن که هزینه تولید را بسیار بالا می برد، از انواع ضایعات لیگنوسلولوزی ارزان قیمت به

اولیه، ۴۰ سویه با ظهور هاله های شفاف نارنجی رنگ حاصل از تجزیه گزیلان (*Xylan digestion halos*)، به عنوان تولید کنندگان گزیلاناز شناسایی شدند که از بین آنها، ۲۰ سویه با نشان دادن بزرگترین قطر هاله بین ۲۵-۳۵mm وارد مرحله غربال ثانویه شدند. در غربالگری ثانویه با اندازه گیری قطر هاله های شفاف ناشی از تولید آنزیم گزیلاناز ظاهر شده در اطراف چاهکها، تولید گزیلاناز خارج سلولی توسط سویه های برتر در این مرحله اثبات شد. ۶ سویه با نشان دادن بزرگترین قطر هاله تولید گزیلاناز خارج سلولی در اطراف چاهکها معادل ۳۲ الی ۳۵ میلیمتر، به عنوان ۶ سویه برتر تولید کنندگان گزیلاناز خارج سلولی در این مرحله برگزیده شدند. کاربرد صنعتی گزیلاناز به ویژه هنگامی مطرح خواهد بود که آنزیم با حداقل ممکنه (امتیاز آنزیم از لحاظ کمی) بتواند در pH بالا و دمای بالا فعالیت مناسبی نشان دهد (امتیاز کیفی آنزیم). لذا بهینه دما و pH فعالیت آنزیمی ۶ سویه غربال شده سنجیده و با هم مقایسه گشت (نمودار ۲ و ۱). در نتیجه جدایه ای با بزرگترین قطر هاله تولید گزیلاناز خارج سلولی، معادل ۳۵ mm در غربالگری ثانویه و در نظر گرفتن ویژگی فعالیت آنزیمی آن ( بالاتر بودن بهینه دما و pH فعالیت آنزیم گزیلاناز ) در مقایسه با جدایه های دیگر، به عنوان سویه برتر و با نام موقتی جدایه ۱۳۷، انتخاب گردید (نمودار ۴ و ۳).



نمودار ۳- بهینه pH فعالیت آنزیم گزیلاناز تولیدی از جدایه منتخب ۱۳۷

می شوند (۲۵). از طرفی توجه به مقادیر تولید آنزیمی در حضور سایر منابع کربنی به ویژه باگاس در ساعت ۹۶، ملاس در ساعت ۴۸ و سبوس گندم در ساعت ۱۸ از فرآیند تخمیر، نشان می دهد که باکتری در حضور این منابع کربنی میزان بسیار مناسبی از گزیلاناز به ترتیب معادل ۱۸۲ IU/ml و ۱۹۸، ۲۰۰ را تولید می کند. این امر بیانگر این مطلب است که با اعمال فرآیند بهینه سازی در حضور سایر منابع کربنی نیز رسیدن به مقادیر بالای تولید آنزیمی امکان پذیر است. ضمن اینکه این وضعیت یک ویژگی مثبت برای سویه بشمار می رود چرا که توانایی تخمیر انواع ضایعات لیگنوسلولزی و تولید مقادیر مناسب گزیلاناز را داراست.

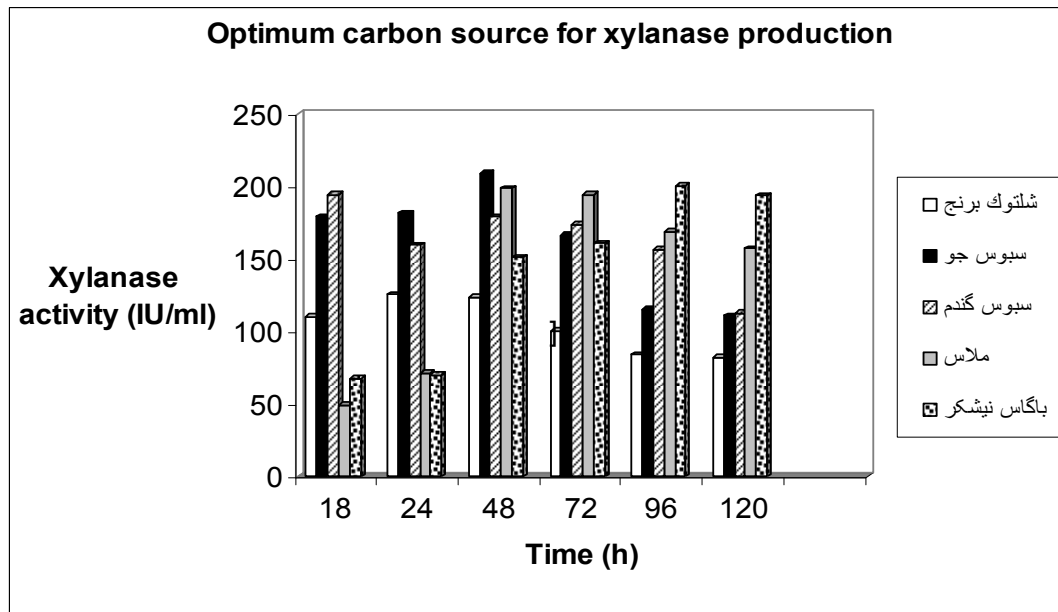
با انتخاب سبوس جو به عنوان منبع کربن بهینه، ضمن بررسی انجام شده و سنجش فعالیت آنزیمی، غلظت ۲۰ گرم در لیتر از سبوس جو در حضور تلقیحی از کشت ۱۸ ساعته از سوسپانسیون باکتریایی معادل (۷/۷) ۲ درصد به عنوان بهینه این دو عامل انتخاب شدند.

با مشاهده جهش در تولید گزیلاناز از IU/ml ۲۵ در حضور عصاره مخمر و پیتون (منابع نیتروژنی محیط کنترل) به IU/ml ۲۴۹/۳۰۸ در حضور تریپتون و عصاره مخمر، این دو منبع به عنوان منابع بهینه نیتروژنی برگزیده شدند (جدول ۲).

عنوان منبع کربن و سوبسترای ارزان و مناسب جهت تولید آنزیم استفاده شد و ضمن بررسی تأثیر هر یک از آنها بر میزان تولید آنزیم، مناسب ترین منبع کربن جهت تولید میزان بالایی از گزیلاناز تعیین و به منظور ادامه عملیات بهینه سازی به کار گرفته شد.

پس از بررسی تأثیر هر یک از منابع کربنی در فواصل ۲۴ ساعت یکبار و سنجش میزان فعالیت آنزیمی، به مدت ۱۲۰ ساعت، مشخص گردید که بیشترین میزان تولید آنزیم در حضور سبوس جو و در ساعت ۴۸ از فرآیند تخمیر با میزانی معادل IU/ml ۲۰۹/۴۱۵ می باشد (نمودار ۵). در حضور منبع کربن بهینه سبوس جو، حتی تا ساعت ۹۶ و ۷۲ از فرآیند تخمیر میزان قابل قبولی از تولید آنزیم به ترتیب معادل IU/ml ۱۱۰ و ۱۱۴ حاصل می شود اما با ادامه تخمیر به ۱۲۰ ساعت میزان تولید آنزیم به شدت کاهش یافت که علت این امر می تواند به دلیل کاهش میزان مواد غذایی در دسترس برای باکتری و یا وقوع پدیده پروتئولیز باشد (۱۳). احتمالاً، وجود مقادیر بالای همی سلولز در سبوس جو به عنوان مهم ترین و اساسی ترین عامل در القای تولید میزان زیاد آنزیم گزیلاناز می باشد. در فرآیند برداشت جو، غشای خارجی دانه جو به صورت پوسته ای از قسمت های نشاسته ای آن جدا می شوند و این سبوسها که قسمتهای همی سلولزی دانه است آسیاب





نمودار ۵- تأثیر انواع ضایعات لیگنوسلولزی به عنوان منبع کربنی در تولید آنزیم گزیلانازو تعیین بهینه منبع کربن

جدول ۲- تأثیر منابع نیتروژنی در تولید آنزیم گزیلاناز و تعیین بهینه منبع نیتروژنی

منابع نیتروژن آلی	منابع نیتروژن معدنی و ترکیبی از منابع نیتروژنی آلی و معدنی		فعالیت گزیلاناز (IU/ml)
	فعالیت گزیلاناز (IU/ml)	فعالیت گزیلاناز (IU/ml)	
Peptone	۱۱۸/۱۱۸	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	۱۶۳/۴۷۴۲
Beef extract	157/134	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	۷۴/۷۱۴
Casein	۱۴۰/۰۶۵	NaNO <sub>3</sub>	۱۳۷/۶۲۶
Yeast extract	۱۹۶/۱۴۹۶	Y+NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	۱۹۳/۲۲۳
Y+Tryptone	۲۴۹/۳۰۸	Y+(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	۹۱/۳۰۵
Y+ Beef extract	۲۱۳/۲۱۸	Y+NaNO <sub>3</sub>	۱۸۰/۸۹
Control (Y+Peptone)	۲۰۵/۴۱۵	Y+KNO <sub>3</sub>	۱۸۵/۴۲۰۴

Y = Yeast extract

جدول ۳- تعیین بهینه دمای انکوباسیون، بهینه pH و بهینه دور شیکر شرایط تخمیری در تولید آنزیم گزیلاناز

فعالیت گزیلاناز (IU/ml)	بهینه pH محیط تخمیری در تولید آنزیم	فعالیت گزیلاناز (IU/ml)	جهت تولید آنزیم در فرآیند تخمیری	دور شیکر (rpm) بهینه	دمای بهینه انکوباسیون فرآیند تخمیر (°C)
-------------------------	-------------------------------------	-------------------------	----------------------------------	----------------------	---

۳۲	۱۸۶/۳۹	۱۶۰	۱۸۹/۳۲۹	۶	۲۱۵/۶۵۷
۳۷	۲۹۰/۷۶	۱۸۰	۲۵۲/۷۲۱	۷	۱۴۸/۳۳۲
۴۲	۲۹۹/۳۱	۲۰۰	۲۹۰/۷۶	۸	۲۵۲/۷۲۱
		۲۲۰	۲۲۰/۵۳۴	۹	۱۸۲/۹۸۱
				۱۰	۴۹/۸۴۲
				۱۱	۳۲/۲۸۵
				-	-

جدول ۴- تأثیر انواع ترکیبات افزودنی جهت تولید آنزیم گزیلاناز

فعالیت گزیلاناز (IU/ml)	ترکیبات افزوده شده	فعالیت گزیلاناز (IU/ml)	ترکیبات افزوده شده
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	۳۰۲/۴۶۶	Olive oil+ KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	۱۷۳/۲۲۸۱
Tween 80	۲۶۵/۴۵۱	SDS	۶۵/۹۳۵
Olive oil	۲۵۱/۲۵۸	Glucose	۱۴/۷۲۸۲
Trace elemets solution	۲۴۶/۸۶۹۶	Sucrose	۱۱/۸۰۲
Glycine	۱۸۶/۳۹۵۷	D-xylose	۱۱/۳۱۴
Control: (Yeast extrac+Tryptone)	۲۵۲/۷۲۲	-	-

این جدایه آشکار می سازد. ضمن اینکه در حضور سولفات آمونیوم و نترات آمونیوم به همراه عصاره مخمر، مهار شدیدی در میزان تولید گزیلاناز مشاهده شد که این امر احتمالاً به دلیل تأثیر مهارکنندگی یونهای می باشد که سولفات آمونیوم در محیط آزاد کرده و منجر به کاهش میزان تولید آنزیم و یا کاهش نفوذپذیری غشاء سلولی جهت ترشح و خروج گزیلاناز تولید شده می باشد (۱۳).

pH محیط تخمیری نقش بسزایی را در فرآیند های تولید آنزیم و انتقال ترکیبات مختلف از بین غشای سلولی دارد (۱۳) و تولید گزیلاناز به شدت به pH محیط تخمیری وابسته است (۴). ضمن مطالعات قبلی نیز این گونه گزارش شده که pH قلیایی اغلب مناسب تولید گزیلانازهایی با منشاء باکتریایی است (۲۶) در حالی که pH اسیدی ۶-۴، اغلب مناسب تولید گزیلانازهایی با منشاء قارچی است (۲۸) که این اظهارات با نتایج برگرفته

از آنجایی که این دو منبع چه از لحاظ در دسترس بودن و چه از نظر ترکیب غنی پروتئینی جهت تولید آنزیم توسط این سویه مناسب می باشند، شاید بتوان این گونه برآورد کرد که در مقایسه با سایر منابع نیتروژنی این دو ترکیب اغلب اسید های آمینه ای را که سویه جهت تولید گزیلاناز نیاز دارد را در اختیار آن قرار می دهند لذا سویه قادر است مستقیماً این اسید های آمینه را جذب کند و همین امر ضمن بالا بردن میزان تولید گزیلاناز، باعث برتر بودن این دو ترکیب نسبت به دیگر منابع نیتروژنی می شود (۱۳). ترکیبی از عصاره از نوع گوشت گوساله ( Beef extract) به همراه عصاره مخمر معمولی ( Yeast extract) نیز، با القاء میزان مناسبی از تولید آنزیم معادل 213/218 IU/ml، تأثیر مناسبی در بالا بردن تولید آنزیم نشان دادند (جدول ۲). لذا توجه به میزان تولید آنزیم گزیلاناز در جدول ۲، برتری منابع نیتروژن آلی را در مقایسه با منابع نیتروژنی معدنی در تولید گزیلاناز را توسط

از بهینه سازی گزیلاناز توسط غازی و اخوان سپهی مطابقت دارد (جدول ۳).

pH بهینه محیط تخمیری در تولید گزیلاناز ۸ گزارش شد که این pH با بهینه pH رشد باکتری در محیط نوترین برات نیز مطابقت داشت. تولید گزیلاناز در محیط تخمیری از ۶ pH شروع و در ۸ pH حداکثر فعالیت گزیلاناز سنجیده شد در حالی که در ۱۱ و ۱۰ pH تولید گزیلاناز افت شدیدی داشت (جدول ۳).

در ادامه مراحل بهینه سازی، بهینه دمای انکوباسیون فرآیند تخمیر، ۳۷ درجه سانتی گراد گزارش شد (جدول ۳). در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد بالاترین میزان تولید آنزیم گزیلاناز نسبت به دماهای مورد آزمایش ۳۲ درجه سانتی گراد و ۴۲ مشاهده شد، ضمن اینکه ۳۷ درجه سانتی گراد بهینه دمای رشد باکتری در محیط نوترین برات نیز می باشد.

در مورد تأثیر میزان هوادهی، دور شیکر ۲۰۰ rpm بهترین تأثیر را در بالا بردن میزان تولید گزیلاناز از باسیلوس موجونسیس نشان داد. میزان هوادهی در فرآیند تخمیر با دور تکان دهی کمتر از ۱۸۰ rpm منجر به کاهش میزان تولید گزیلاناز شد. علت این امر را می توان به دلیل سخت تر شدن نگهداری میزان متعادلی از اکسیژن محلول مورد نیاز برای رشد سلولها به طور یکنواخت در محیط تخمیری دانست. همچنین با توجه به هوازی اختیاری بودن این باسیلوس، هوادهی مناسب نه تنها باعث مخلوط شدن و یکنواخت تر شدن انتشار مواد غذایی مورد نیاز و در دسترس برای سلولهای باکتری می باشد، بلکه باعث رسانیدن مقادیر مناسبی از اکسیژن به سلولهای در حال رشد می باشد (۴ و ۱۳). در هوادهی با دور بالاتر از ۲۰۰ rpm کاهش در میزان تولید آنزیم مشاهده گشت.

بررسی تأثیر ترکیبات افزوده بر افزایش یا کاهش میزان تولید آنزیم در جدول ۴ ارائه شده، که در این بین تأثیر مثبت حضور ترکیب  $KH_2PO_4$  و سپس توئین ۸۰ در بالا

بردن فعالیت آنزیمی به چشم می خورد. تأثیر این ترکیبات در افزایش میزان فعالیت آنزیمی را می توان این گونه توجیه کرد که احتمالاً با افزایش نفوذ پذیری غشاء و در نتیجه ترشح سریع تر و بیشتر آنزیم باعث افزایش در تولید آنزیمی شده اند. گزارشاتی از تأثیر فزاینده توئین ۸۰ طی بررسیهای گذشته به اثبات رسیده است (۱۳).

بررسی تأثیر روغن زیتون جهت عاملی در راستای افزایش نفوذپذیری غشاء سلولی و در نتیجه افزایش میزان آزاد شدن گزیلاناز، منجر به افزایش چشمگیری در بالا بردن تولید گزیلاناز نشد هر چند که تأثیر کاهنده بر میزان تولید نیز نداشت (جدول ۴).

افزودن سورفاکتنت سدیم دودسیل سولفات به محیط تخمیری نیز مهار شدید تولید آنزیم را در پی داشته که علت این امر را می توان به چند طریق توجیه کرد: تغییر شکل ساختار دوم و سوم پروتئین و یا اتصال SDS به جایگاه فعال آنزیم و یا تغییر ماهیت سوبسترا و کاهش در دسترس بودن مکانهای واکنش سوبسترا با آنزیم را می توان از علل کاهش فعالیت آنزیمی در حضور SDS برشمرد (۱۳). حضور قندها در ترکیبات محیط تخمیری، منجر به مهار بسیار شدید تولید گزیلاناز شد (جدول ۴)، که علت این امر را می توان پدیده مهار کاتابولیک گزارش کرد (۱۳). در نهایت و با اعمال تمام عوامل بهینه سازی چه از لحاظ ترکیبات محیط کشت تخمیری و چه از لحاظ شرایط انجام فرآیند تخمیر، حدود ۱/۵۵ برابر افزایش در تولید گزیلاناز از میزان اولیه ۱۹۴/۶۸ IU/ml در شرایط غیر بهینه به میزانی معادل ۳۰۲/۴۶۶ IU/ml در شرایط بهینه تخمیر حاصل شد و لذا نتایج حاصله نقش بهینه سازی را به عنوان یکی از مهم ترین عوامل ممکن جهت افزایش میزان تولید آنزیم به اثبات می رساند.

موفقیت در تولید آنزیم با استفاده از سوبسترای ارزان قیمت و توانایی باکتری جهت استفاده از سبوس جو و تولید آنزیم گزیلاناز قلیایی (Alkaline active xylanase)

توانایی تولید آنزیمهای مناسب صنعت، می توانند مورد توجه بیشتری باشند.

این سویه را جهت تولید اقتصادی گزیلانازهای صنعتی نامزد می کند.

ضمن اینکه نشان می دهد، خاکهای کشاورزی به عنوان منابع ناب اکولوژیکی جهت جداسازی باکتریهای بالقوه با

### منابع

1. Adsul MG, Ghule J E, Singh R, Shaikh H, Bastawde KB, Gokhale DV, and Varma Aj (2004) Polysaccharides from bagasse: application in cellulose and xylanase production. *Carbohydrate Polym.* 57: 67-72.
2. Anuradha P, Vijayalakshmi K, Prasanna ND, and Sridevi K (2007) Production and properties of alkaline xylanase from *Bacillus sp* isolated from sugarcane fields. *Curr sci.* 92 (9): 1283-1286.
3. Bailey MJM, Biely P, Poutanen k (1992) Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J of Biotechnol.* 23: 257-270.
4. Battan B, Sharma J, Dhiman SS, Khuhad RC (2007) Enhanced production of Cellulase-free thermostable xylanase by *Bacillus pumilus* ASH and its potential application in paper industry. *Enzyme Microb. Technol.* 4: 733-739.
5. Beg Q.KH, Sahai V, Gupta R (2003) Statistical media optimization and alkaline protease production from *Bacillus mojavensis* in a bioreactor. *Process Biochem.* 39 (2):203-209.
6. Bocchini DA, Oliveira OMMF, Gomes E, Da Silva R (2005) Use of sugarcane bagasse and grass hydrolysates as carbon sources for xylanase production by *Bacillus citculanse* D1 in submerged fermentation. *Process Biochem.* 40:3653- 3659.
7. Bocchini DA, Oliveira OMMF, Gomes E, Da Silva R (2002) Optimization of xylanase production by *Bacillus citculanse* D1 in submerged fermentation using response surface methodology. *Process Biochem.* Vol. 38: 727-731.
8. Charles W, Bacon, Dorothy MH (2002) Endophytic and biological control potential of *Bacillus mojavensis* and related species. *Science-Direct.* 23(3): 274-284.
9. Chivero E T, Mutukumira A N, and Zvauya R (2001) Partial purification & characterization of a xylanase enzyme. *Food Chemistry.* 72: 179-185.
10. Cordeiro CAM, Martins MLL, Luciano A B, and Da Silva R F (2002) Production and properties of xylanase from thermophilic *Bacillus sp.* Brazilian Archives Biol. Technol. 45(4): 413-418.
11. Dobrev G T, Pishtiyski IG, Stanchev VS, and Mircheva R (2007) Optimization of nutrient medium containing agricultural wastes for xylanase production by *Aspergillus niger* BO3 using optimal composite experimental design. *Bioresour. Technol.* 98: 2671-2678.
12. Kar S, Mandal A, Mohapatra PK, Mondal KC, Pati BR (2006) Production of cellulose-free xylanase by *Trichoderma reesei* SAF3. *Braz. J. Microbiol.* 37: 462-464.
13. Kapoor M, Nair LM, Kuhad RC (2008) Cost-effective xylanase production from free and immobilized *Bacillus pumilus* strain MK001 and its application in saccharification of *Prosopis juliflora*. *Biochem. Eng. J.* 38: 88-97.
14. Khandepakar RDS, Bhosle NB (2006) Isolation, Purification and characterization of the Xylanase produced by *Arthrobacter sp.* MTCC5214 when grown in solid state fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* 39: 732-742.
15. Khandeparkar RDS, Bhosle NB (2004) Purification and characterization of thermoalkalophilic xylanase isolated from the *Enterobacter sp* MTCC 5112.
16. Lama L, Calandrelli V, Gambacorta A, Nicolaus B (2004) Purification and characterization of thermostable xylanase and B-xylosidase by thermophilic bacterium *Bacillus thermantarcticus*, *Research in Microbiology.* 155: 283-289.
17. Lyon PF, Beffa T, Blanc M, Auling G, Aragno M (2000) Isolation and characterization of highly thermophilic xylanolytic *Thermus yhermophilus* strains from hot composts, *Can. J. Microbiol.* 46:1029-1035.
18. Mamo G, Hatti-Kaul R, Mattiasson B (2006) A thermostable alkaline active endo-B-1-4-xylanase from *Bacillus halodurans* S7: Purification and characterization. *Enzyme Microb. Technol.* 39: 1492-1498.

19. Mandeva R, Dimitrov P, Emanuilova E (1998) General characterization of two xylanolytic Bacterial strains isolated from Bulgarian hot springs. *Journal of culture collections*. 2: 3-9.
20. Milagres AMF, Santos E, Piovan T, Roberto I C (2004) Production of xylanase by *Thermoascus aurantiacus* from sugar cane bagasse in an aerated growth fermentor. *Process Biochem*. 39: 1358-1391.
21. Miller GL (1959) Measurement of reducing sugar by DNS reagent. *Anal. Biochem*. 31(3): 426-428.
22. Muthezhilan R, Jayalakshmi S, Ashok R (2007) Production and optimization of thermostable alkaline xylanase by *Penicillium oxalicum* in solid state fermentation. *Afr. J. Microbiol. Res*. Pp: 020-028.
23. Okafor UA, Emezue TN, Okochi V I, Onyegeme-Okerenta BM, and Nwodo-Chinedu S (2007) Xylanase production by *Penicillium chrysogenum* (PCL501) fermented on cellulosic wastes. *Afr. J. Biochem. Res*. 1(4): 048-053.
24. Okafor UA, Okochi V I, Onyegeme-Okerenta BM, and Nwodo-Chinedu S (2007) Xylanase production by *Aspergillus niger* ANL 301 using agro-wastes. *Afr. J. Biotechnol*. 6 (14): 1710-1714.
25. Oliveira LA, Porto Ana LF, Tambourgi EB (2006) Production of xylanase and protease by *Penicillium janthinellum* CRC 87M-115 from different agricultural wastes. *Bioresource.Tech*. 97: 862-867.
26. Poorna CA, Prema P (2006) Production and partial characterization of endoxylanase by *Bacillus pumilus* using agro industrial residues. *Biochem. Eng. J*. 33: 106-112.
27. Sa-Pereira P, Mesquita A, Duarte JC, Aires Barros Mr, Costa-Ferreira M (2002) Rapid production of thermostable Cellulase-free xylanase by a strain of *Bacillus subtilis* and its properties. *Enzyme Microb. Technol.* 30: 924-933.
28. Simoes MLG, Tauk-Tornisielo SM (2005) Optimization of xylanase biosynthesis by *Aspergillus japonicus* isolated from a Caatinga area in the Brazilian state of Bahia. *Afr. J. Biotechnol*. 5(11): 1135-1141.
29. Sneath PHA et al. (1996) *Bergey's manual of systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins. 8th edn, Vol.2. N.J.
30. Virupakshi S, Gireesh Babu K, Gaikwad SR, Niak GR (2005) Production of xylanolytic enzyme by a thermoalkaliphilic *Bacillus sp.* JB-99 in solid state fermentation. *Process Biochem*. 40: 431-435.
31. Yang VW, Zhuang Z, Elegir G, Jeffries TW (1995) Alkaline-active xylanase produced by an alkaliphilic *Bacillus sp* isolated from Kraft pulp. *J. Indus. Microbiol*. 15: 434-441.

# The Usage of Agricultural Lignocellulosic Wastes in Cost - Effective Production and Optimization of Alkaline Xylanase, by an Indigenous Strain of *Bacillus Mojavensis* Through Submerged Fermentation

Akhavan Sepahy A.<sup>1</sup>, Ghazi Sh.<sup>1</sup>, Jafariagdam J.<sup>1</sup> and Akavan Sepahy M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Microbiology Dept., Islamic Azad University-Basic Science, North Tehran Branch, Tehran, I.R. of IRAN

<sup>2</sup> Drug and Food Control Administration Institute, Tehran, I.R. of IRAN

## Abstract

In this project, an appropriate indigenous *Bacillus* strain for xylanase production was isolated from cotton farm (Iran- kashan). According to evaluation by preliminary and secondary screening procedures, the competency of produced xylanase by this strain was confirmed. pH and temperature of enzyme activity in elevated pH and temperature ranges was assessed by measurement of released amounts of reducing sugar method. Optimum pH 9 and temperature of 55 °C for xylanase activity for this strain determined as optimum points. 16S rRNA sequencing analysis identified the isolate, as a strain of *Bacillus mojavensis*. Optimization step for screened *Bacillus mojavensis* strain, as a superior strain in the course of enzyme economical production process was performed in the presence of molasses, bagasse, wheat bran, oat husk and rice straw, and enzyme production level was evaluated. Finally, xylanase production level from 194/68 IU/ml, under non-optimized culture condition, increased to 302/466 IU/ml in optimized fermentation condition. Increase in cost- effective xylanase production by lignocellulosic wastes (Oat husk as optimum carbon source), strain ability to ferment such wastes, production of high level of xylanase, and optimum enzyme activity in alkaline pH and elevated temperature, all reveal the superiority of this *Bacillus* as a candidate for industrial-scale economical production of xylanase.

**Keywords:** *Bacillus mjavensis*, Oat husk, Xylanase