بهینه سازی تولید آنزیم پروتئاز قلیایی در بستر جامد توسط اعضاء جنس باسیلوس با استفاده از بستر جدید سیب زمینی و کاه گندم

زینب احمدی[۱]
معصومه انوری[۲]
غلام خیاطی[۳]
مهدی شهریاری نور[۱]

تاریخ دریافت : ۱۳۹۱/٦/٦
تاریخ تصویب: ۱۳۹۱/۱۲/۲۲

چکیده

در این تحقیق ، سویه هایی از جنس باسیلوس جدا شده از خاکهای قلیایی استان گیلان با توانایی تولید آنزیم پروتئاز غربالگری و شناسایی گردیدند. سپس تولید آنزیم در انواع بسترهای جامد با تغییر فاکتورهای تأثیرگذار در تولید ، مورد ارزیابی قرار گرفت. بهترین بستر تولید بستر ترکیبی کاه گندم و سیب زمینی و بهترین شرایط تولید به ترتیب زمان انکوباسیون ۹٦h، محتوی رطوبت اولیه ٪۲۵۰ و منبع کربن کمکی گلوکز بود. در میان منابع ازت سولفات آمونیوم بیشترین تأثیر را در افزایش تولید آنزیم داشت. در شرایط بهینه حداکثر تولید آنزیم(U/g ٦۸۰۰) بود.

واژه‌های کلیدی :پروتئاز قلیایی ، باسیلوس ، تخمیر در بستر جامد، سیب زمینی و کاه گندم

[۱] دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات گیلان ، گروه زیست شناسی – میکروبیولوژی
[۲] دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت ، گروه زیست شناسی – میکروبیولوژی (نویسنده مسئول)؛ anvariir@yahoo.com
[۳] دانشگاه گیلان ، دانشکده فنی ، گروه مهندسی شیمی – صنایع غذائی

مقدمه

پروتئازها یکی از سه گروه آنزیم های مهم کاربردی در صنعت بوده و حدود ٦٠٪ از کل فروش جهانی آنزیم ها را به خود اختصاص می دهند.آنها در صنایع مختلف چون فرآوری انواع گوشت، صنایع لبنی ، تهیه کودهای آلی ،تهیه ابریشم و بازیافت نقره از فیلم های رادیوگرافی ، اشعه X کاربرد دارند (Mukherjee et al., 2008).

پروتئازهای قلیایی توسط انواعی از میکروارگانیسم ها مانند باکتری‌ها ،کپک ها ،مخمرها تولید می شوند.در میان باکتری ها تولید آنزیم ،عمدتاً به اعضاء جنس باسیلوس اختصاص دارد (Ng et al.,1996; Rao et al.,1998 : Kumar et al.,1999)

پروتئاز توسط میکروارگانیسم‌ها به هردو روش تخمیر در بستر جامد و تخمیر درکشت غوطه‌ور تهیه می شوند،اما روش نخست به دلیل مصرف انرژی کمتر و امکان کنترل آلودگی کشت (به دلیل برخورداری از رطوبت کمتر) بر روش دوم برتری دارد.

به علاوه در این روش می توان از سوبستراهای ارزان قیمت مانند کاه گندم و برنج ، سبوس گندم و برنج ، ضایعات نیشکر یا سیب زمینی و ... استفاده نمود (Mitchell et al.,2002).

در این روش بازیافت محصول هم بهتر انجام می شود .لذا دستیابی به شرایط بهینه تولید در محیط به منظور حصول حداکثر تولید آنزیم از اهمیت بسزایی برخوردار است (Tunga et al.,1999).

تعیین شرایط بهینه طی روش های سنتی و مرسوم همواره متضمن صرف هزینه و زمان طولانی بوده و درک درستی از اثرات متقابل متغیرها را نمی دهد . بهینه سازی با تکنیک طراحی فاکتوریل و روش سطح پاسخ، می تواند تا حد زیادی بر این مشکلات غلبه کند. روش طراحی فاکتوریل به طور موفقیت آمیزی برای بهینه سازی و ارزیابی اثرات متغیرهای فرایند در تولیدات آنزیمی و متابولیت های دیگر به کار گرفته می شود (Salihu et.al, 2011).

در این تحقیق با استفاده از سویه ای از جنس باسیلوس جدا شده از خاک های قلیایی استان گیلان، فاکتورهای تأثیرگذار بر تولیدآنزیم پروتئاز قلیایی در بستر جامد ، به منظور دستیابی به بیشترین میزان تولید، مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش ها

جداسازی میکروارگانیسم های مولد:

جهت جداسازی باسیلوس مولد آنزیم تعداد ۱۵ نمونه خاک قلیایی از مناطق لوشان، منجیل ، رودبار در استان گیلان تحت شرایط عاری از آلودگی در ظروف استریل جمع آوری و به آزمایشگاه انتقال یافت.

پس از تعیین pH اولیه خاک ها و میزان رطوبت آنها ، هر نمونه در آب مقطر استریل در لوله آزمایش سوسپانسیون گردید.سپس به مدت ۲۰ دقیق در درجه حرارت 80^0c حرارت داده شد.سپس از هریک از لوله ها به محیط آگار غذایی منتقل و پلیت ها به مدت ۲٤h و در شرایط هوازی ,$37\ ^0c$ گرمخانه گذاری گردیدند . در مرحله بعد کلنی ها از نظر خصوصیات ظاهری و بیوشیمیایی مورد مطالعه و شناسایی قرار گرفتند (Mukherjee et al., 2008)

غربالگری جدایه های تولید کننده آنزیم:

تمامی باسیلوس‌های جداسازی شده درمحیط آگاردارای شیر(اسکیم میلک) (۱۰۰ gr/lit)، حاوی عصاره مخمر(۱۰gr/lit)وآگار (۲۰gr/lit)وpH=۸ به روش نقطه ای کشت داده شدند .

تولید هاله شفاف در اطراف کلنیها دال بر تولید آنزیم پروتئاز قلیایی بود (Mehrotra et al.,1999).

محیط پیش کشت:

به منظور تهیه مایه تلقیح باکتریایی از محیط کشت حاوی (گرم بر لیتر) گلوکز ۱۰، پپتون ۵، عصاره مخمر ۵، KH_2PO_4 ۱، $MgSO_4.7H_2o$ ۰/۲ و Na_2CO_3 ۱۰ استفاده و pH محیط برابر با ۹/۵ تنظیم گردید (Uyar et al .,2004).

غربالگری بسترجامد

بدین منظور از ۷ بستر متفاوت به شرح زیر استفاده شد: سیب زمینی – گاه گندم، سیب زمینی – پوست دانه باقلا، سیب زمینی – ذرت، سیب زمینی – سبوس برنج، سیب زمینی –کاه برنج، سیب زمینی – غلاف باقلا و سیب زمینی. به نحوی که در غربالگری بستر جامد از هیچ گونه منبع کربن یا ازت کمکی استفاده نشد و صرفاً از بافر و میکروارگانیسم استفاده گردید تا بهترین منبع کربن مورداستفاده توسط میکروارگانیسم تعیین گردد.

بدین منظور مقادیر انتخابی از هر سوبسترای کاملاً ریزشده به ارلن های ۲۵۰ میلی لیتری افزوده و سپس از کشت ۲٤ ساعت باکتری با کدورت مناسب (OD=۰/٦) به میزان ۱٪ وزنی / وزنی به بسترها اضافه گردید. سپس کشت ها به مدت ۹٦ ساعت در 37^0c گرمخانه گذاری و میزان فعالیت آنزیمی در هر بستر تعیین گردید.

سنجش فعالیت آنزیم:

بدین منظورµl۵۰ ازمحلول حاصل ازشستشوی بسترجامدبا بافرکربنات بیکربنات(۱۰میلی مولار)، با۸۳ میکرولیتر محلول سوبسترا (حاوی۱٪ حجمی/حجمی کازئین حل شده در ۵۰ میکرومول بافر Tris-HCL در pH=۸) اضافه و این ترکیب به

مدت ۳۰دقیقه در 37^0c گرمخانه گذاری شد.به منظور توقف واکنش آنزیمی ٤٠٠µl از مخلوط TCA ٥٪ (حاوی 5%TCA٪۹ استات سدیم و ۹٪ اسیداستیک)اضافه گردید ، سپس به مدت نیم ساعت در درجه حرارت اتاق نگهداری و پس از آن لوله ها در دور٦٠٠٠ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و سپس جذب نوری نمونه ها (در مقایسه با لوله های شاهد بدون گرمخانه گذاری اولیه) در ۲٦۲ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت ،یک واحد فعالیت آنزیمی به صورت مقدار آنزیمی که بتواند µmol ۱ تیروزین در دقیقه به ازای هر گرم وزن خشک سوبسترا تولید نماید ، تعریف گردید. مقدار تیروزین حاصله با استفاده از منحنی استاندارد تیزوزین تعیین شد (Potumarthi et al., 2007).

بهینه سازی تخمیر در بستر جامد

به منظور تعیین بهترین شرایط تولید آنزیم ، ٥ گرم سوبسترا به ارلن های میلی لیتری۲٥۰ حاوی KH_2POH(۱gr/lit) و $mgso_4.7H_2o$(۰/۲gr/lit) در pH=۹/٤ استریلیزه گردید و ۲ میلی لیتر از کشت ۲٤h باکتریایی(با OD=۰/٦ در طول موج ٦۰۰nm) در شرایط آسپتیک به آن افزوده و در 37^0c در زمانهای ۲٤ و ٤۸ ، ۷۲، ۹٦، ۱۲۰ ساعت گرمخانه گذاری شد.

همچنین از طرح آزمایش Placket-Burman به منظور بررسی اثر منابع مختلف کربن (شامل گلوگز،لاکتوز، سوکروز) و نیتروژن (شامل سولفات آمونیوم ، عصاره مخمر،پپتون وکازئین) بر شرایط تولید استفاده شد . در ادامه برای‌بررسی اثرات سایرعوامل تأثیرگذار بر تولید نظیر اثررطوبت اولیه به ترتیب با۲۰۰،۱۰۰،٥۰، ۲٥۰، ۳۰۰درصد آب ،(حجمی/ وزنی به ازای وزن سوبسترا)،میزان تلقیح۲۰،۱۰، ٤۰، ٦۰، ۸۰، ۱۰۰ درصد(حجمی/وزنی) مورد ارزیابی قرار گرفت (Potumarthi et al., 2007).

بهینه سازی محیط کشت تولید لیپاز با طرح آزمایش Placket-Burman

طرح Placket-Burman روش موثری برای غربالگری پارامترهای فیزیکو- شیمیایی در میان متغیرهای زیاد فرایند، به منظور یافتن ترکیبات بهینه محیط کشت و بهبود شرایط تولید به کار گرفته شد. برای این منظور سه نوع منبع کربن گلوکز، ساکاروز ولاکتوز و سه نوع منبع نیتروژن آلی عصاره مخمر، پپتون و کازئین و یک منبع ازت معدنی سولفات آمونیوم انتخاب شدند. جهت بهینه سازی محیط کشت و بررسی اثر منابع کربن ، نیتروژن و زمان گرمخانه گذاری بر میزان تولید لیپاز با استفاده از روش پلاکت- برمن تعداد ۱۲ آزمایش در سه سطح طراحی شد.

در جدول۱ متغیرهای مستقل فرآیند و مقادیر آنها نشان داده شده است.

آنالیز آماری: بدین منظور از نرم‌افزار Minitab 16 برای بررسی معنی دار بودن یا نبودن اثر فاکتورهای مورد آزمایش استفاده گردید.

نتایج

از مجموع ۱۵ میکروارگانیسم جداسازی شده از خاک های قلیایی ۱٤نمونه ، توانایی بالایی در تولید آنزیم از خودشان دادند.میزان تولید براساس اندازه گیری قطرهاله تولید شده در محیط اسکیم میلک ارزیابی گردید.(شکل ۱)

غربالگری بهترین سوبسترا در بستر جامد: از میان ۷ سوبسترای ساده و ترکیبی ، بیشترین فعالیت آنزیمی به بستر ترکیب سیب زمینی –کاه گندم اختصاص یافت (جدول ۲).

بهینه سازی ترکیبات محیط کشت برای تولید لیپاز با استفاده از طرح آزمایش پلاکت- برمن

امروزه استفاده از مدل های آماری به منظور بهینه سازی ترکیب و شرایط محیط کشت افزایش یافته است. در مطالعه حاضر ترکیبات ضروری محیط کشت نظیر منابع کربن و نیتروژن برای افزایش تولید لیپاز توسط طراحی پلاکت-برمن شناسایی و انتخاب شدند (جدول ۱) . طرح آزمایش پلاکت– برمن بعنوان یک ابزار ارزشمند برای غربالگری اولیه اثرات عوامل مختلف با تعداد کم آزمایشات قابل اطمینان می باشد این تکنیک نشان می دهد که هر فاکتور چگونه فرایند تولید را برای بهینه سازی تحت تاثیر قرار می دهد (Ruchi et al. 2008)..

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که از میان ۷ منبع کربن و ازت مختلف گلوکز و سولفات آمونیوم بترتیب منابع کربن و ازت تاثیر گذار در تولید آنزیم توسط سویه مورد آزمایش مطرح می باشند ($p < ۰/۰۵$) (جدول ۳). لذا این دو ترکیب برای بررسی سایر عوامل تاثیر گذار به محیط اضافه شدند.

بهترین زمان برای تولید آنزیم در شکل ۲ داده است . حداکثر تولید آنزیم ۹٦h پس از گرمخانه گذاری مشاهده شد(٦۱۰۰ U/g) و پس از آن تولید کاهش یافت ، شکل ۳ رابطه میان میزان رطوبت اولیه و فعالیت آنزیمی را شکل نشان می دهد. بیشترین فعالیت آنزیمی در رطوبت ۲۵۰٪ حاصل گردید. (U/g ٦۲۷۰) .

میزان تلقیح آخرین فاکتور تأثیرگذار در تولید بود.از میان مقادیر مورد مطالعه بیشترین فعالیت آنزیمی (٦۸۰۰ U/g) با میزان تلقیح ۲۰٪ حاصل گردید(شکل ٤).

بحث:

تخمیر در بستر جامد تا حد زیادی از ماهیت و نوع سوبسترا تأثیر می پذیرد.سوبستراها درچنین بسترهایی معمولاً پلیمرهای غیر قابل حل سلولزی با نشاسته اند (Mukherjee et al., 2008).

در حال حاضر هزینه های تولید آنزیم ها بسیار بالاست و دستیابی یه سوبسترا های ارزان قیمت بدین منظور ضروری است . بعلاوه آنزیم هایی که با استفاده از محیط-های تجاری آماده تهیه می‌شوندازطعم خوبی‌برخوردارنبوده در صنایع غذایی ودارویی قابل‌استفاده نیستند(Prakasham et al2006)(Sandhya et al .,2005).

در این تحقیق سوبسترای ترکیبی جدید و ارزان قیمت ضایعات سیب زمینی و کاه گندم برای تولید آنزیم پروتئاز قلیایی معرفی گردیده است .تولید بالای گندم و سیب زمینی کشور سالیانه به ترتیب بالغ بر ۱۳/۲و ۵ میلیون تن ، ضرورت استفاده از ضایعات کاه گندم و سیب زمینی با آماری بالغ بر ٪ ۲۵ ضایعات در سال) به عنوان سوبستراهایی ارزان قیمت برای تولید ، مطرح می نماید.

به علاوه در بسیاری از منابع علمی گزارش شده درنقاط مختلف دنیا از کاه گندم برای تولید به عنوان سوبسترای ترجیحی در مقایسه با سایر سوبستراها(در تولید آنزیم پروتئاز دربستر جامد) نام برده شده است (Uyar et al., 2004).

نتایج حاصل از این تحقیق در انتخاب بسترحاکی از حصول تولید بیشترین آنزیم در بستر ترکیبی در مقایسه با کاه گندم یا سیب زمینی به تنهایی با نسبت های برابر است. گزارشات متعدد حاکی از حداکثر تولید در فاصله زمانی بین ٤٨ تا٩٦ برای باکتریها، ٦-٩ روز برای قارچهاست (Puri et al 2002). در حالیکه نتایج این تحقیق نیز نشان داد بهترین دوره زمانی برای تولید بیشترین میزان آنزیم ٩٦ ساعت بود. احتمالاً کم شدن مقادیر تولید با گذشت زمان ناشی از تقلیب آنزیم تحت شرایط انکوباسیون یا واکنش آن با سایر اجزاء تشکیل دهنده محیط است.

از آنجائیکه رشد میکروبها و تشکیل محصولات میکروبی در نزدیکی سطح سوبسترای مرطوب رخ می دهد ، لذا دستیابی به حداکثر بازده محصول مورد نظر با بهینه سازی محتوی رطوبت و کنترل میزان رطوبت سوبسترای مورد تخمیر امکان پذیر است. محتوی رطوبت از فاکتورهای اصلی تاثیرگذار در موفقیت فرآیند تخمیر در SSF است(Ramesh et al.,1990). البته برحسب نوع میکروارگانیسم و سوبسترا طبعاً درصد بهینه رطوبت برای حداکثر تواید آنزیم متفاوت خواهد بود مثلاً Uyar و همکاران برای تولید آنزیم پروتئاز قلیائی از سوبسترای گندم توسط اعضاء جنس باسیلوس رطوبت اولیه ۳ درصد و برای

اعضاء جنس سودوموناس رطوبت اولیه ۷٤ درصد را گزارش کرده اند. بیشترین میزان تولید در رطوبت ٪۲۵۰ حاصل شده و کاهش تولید با افزایش میزان رطوبت اولیه می تواند ناشی از ایجاد تغییر در ساختار ذرات تشکیل دهنده محیط،کاهش حجم گازها بخصوص O_2 و اختلال در انتقال آن باشد (Krishna et al.,1996). در تحقیقات مختلف رطوبت بهینه دربستر کاه‌گندم بین ۷۵-۷۰ درصد و سیب زمینی ۱۰۰ درصد گزارش شده است.

میزان تلقیح فاکتور مهم تأثیر گذار دیگر در تولید آنزیم است بیشترین تولید آنزیم با ۲۰ درصد تلقیح حاصل گردید. Uyarو همکاران وی ۲۰ درصد تلقیح را بهترین درصد تلقیح برای ماکزیمم تولید آنزیم در کاه گندم به تنهائی توسط سویه جنس یاسیلوس گزارش نمودند(Uyar et al.,2004). احتمالاً با افزایش درصد تلقیح تولید آنزیم به دلیل-کمبود موادغذایی درمحیط کاهش می یابد(Mahadik et al.,2002).

در خصوص منابع کربن کمکی و ازت اساساً انتخاب بهترین منبع ، اثر قابل ملاحظه ای در تولید آنزیم دارد. یافته های حاصل از این تحقیق مانند یافته های سایر محققان،دال بر آنست که باکتریها وگونه های مختلف منابع ترجیحی متفاوتی بدین منظور دارند(Pandey et al.,2000; Prakasham et al.2006). در بررسی جدایه مورد مطالعه در این تحقیق منبع ازت معدنی به آلی ترجیح داشت. برخلاف گزارش Chen و همکاران (۲۰۰٤) در خصوص اثر مهاری گلوکز در تولیذ آنزیم در باکتری *Geobacillus coldoprolyticus* در میان منابع کربن کمکی با گلوکز بهترین نتایج حاصل شد که با نتایج Prakasham و همکاران (۲۰۰٦) در تولید و بهینه سازی تولید آنزیم پروتئاز قلیایی توسط باسیلوس ها مطابقت دارد.

Mukherjeeوهمکاران (۲۰۰۸) درخصوص بهینه سازی تولیدآنزیم پروتئاز قلیایی در بستر سیب زمینی درشرایط رطوبت اولیه ٪۱۰۰وpH=8،پس از ۹٦ساعت گرمخانه گذاری ودرصد تلقیح ۱۰۰-٤۰،ماکزیمم فعالیت آنزیمی ٤۵۰u/gdsحاصل گردید.

Uyarوهمکاران وی ماکزیمم فعالیت پروتئاز قلیایی رادررطوبت اولیه ٪٤۰،۱۰=pH، بافر کربنات بیکربنات ۰/۵:۱(حجمی /وزنی نسبت به وزن سوبسترا) دربستر کاه گندم ،u/g٤۲۹/۰٤گزارش نمودنددرصورتی که در تحقیق حاضر با استفاده از بستر تر کیبی سیب زمینی_کاه گندم ،رطوبت اولیه ٪۲۵۰،پس از ۹٦ ساعت گرمخانه گذاری در ^{0}C۳۷،٪۲۰تلقیح معادل ٦۸۰۰u/gdsحاصل گردید که تقریباً در میان بسترهای جامد مورد استفاده بیشترین مقدار گزارش شده محسوب می گردد.

نتیجه گیری کلی

در این مطالعه تولید آنزیم پروتئازقلیایی با استفاده ازبستر های ترکیبی کاه گندم_سیب زمینی انجام شد که بهترین شرایط بهینه شامل ۲۰درصد تلقیح باکتری در رطوبت اولیه ۲۵۰ درصد پس از ۹۶ساعت در 37^0c گرم خانه گذاری شدومنبع کربن کمکی گلوکزبود.

درمیان منابع ازت،ازت معدنی سولفات آمونیوم بیشترین تاثیررادرتولیدآنزیم داشت.

در شرایط بهینه فعالیت ویژه پروتئازقلیایی تولید شده ۶۸۰۰U/gds بود.

باتوجه به اینکه این میزان تولید از تمامی مقادیر اندازه گیری شده در تحقیقات مشابه بالاتر است بنابراین میتوان نتیجه گیری نمود که این جدایه در بستر ترکیبی سیب زمینی- کاه‌گندم جهت تولید انزیم پروتئاز قلیایی انتخاب مناسبی است.

جدول ۱ - متغیرها و سطوح مختلف آنها در طرح آزمایش پلاکت- برمن همراه با پاسخ آن برای تولید پروتئاز در سطوح مختلف

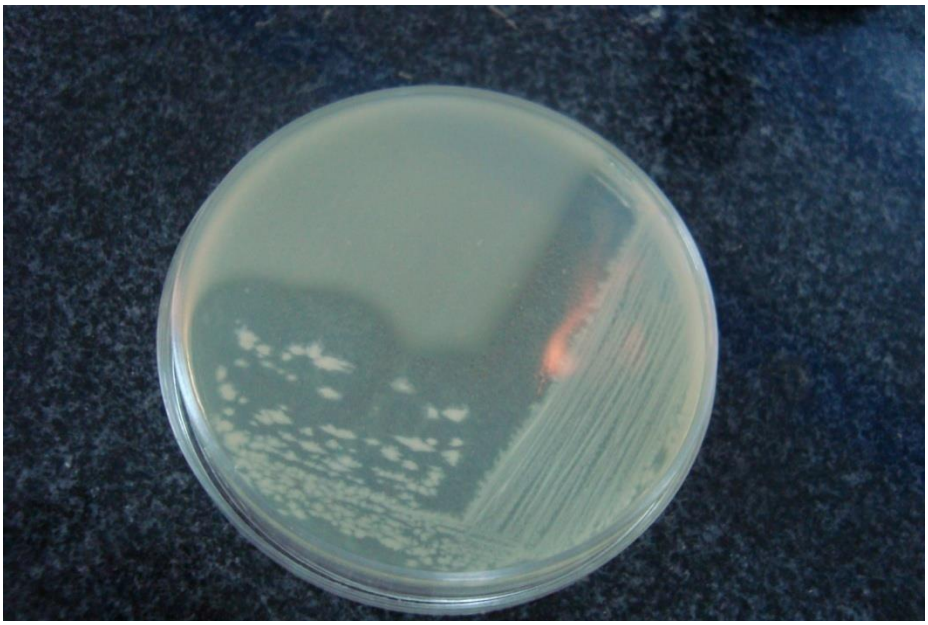
شماره آزمایش	گلوکز	لاکتوز	سوکروز	کازئین	سولفات آمونیوم	عصاره مخمر	پپتون	مقدار تولید آنزیم (U/g)
۱	۱	۰/۵	۱	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۵	۵۹۲۵
۲	۱	۱	۰/۵	۰/۵	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۳۵۰۰
۳	۰/۵	۱	۱	۰/۱	۰/۵	۰/۱	۰/۱	۲۲۰۰
۴	۱	۰/۵	۱	۰/۵	۰/۱	۰/۵	۰/۱	۲۶۰۰
۵	۱	۱	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۱	۰/۵	۱۴۰۰
۶	۱	۱	۱	۰/۱	۰/۵	۰/۵	۰/۱	۱۳۰۰
۷	۰/۵	۱	۱	۰/۵	۰/۱	۰/۵	۰/۵	۱۷۷۵
۸	۰/۵	۰/۵	۱	۰/۵	۰/۵	۰/۱	۰/۵	۴۵۰
۹	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۱	۲۰۰
۱۰	۱	۰/۵	/۵	۰/۱	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۳۴۲۵
۱۱	۰/۵	۱	۰/۵	۰/۱	۰/۱	۰/۵	۰/۵	۲۶۷۵
۱۲	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۱۷۷۵

جدول ۲ – نتایج تولید آنزیم در بسترهای مختلف

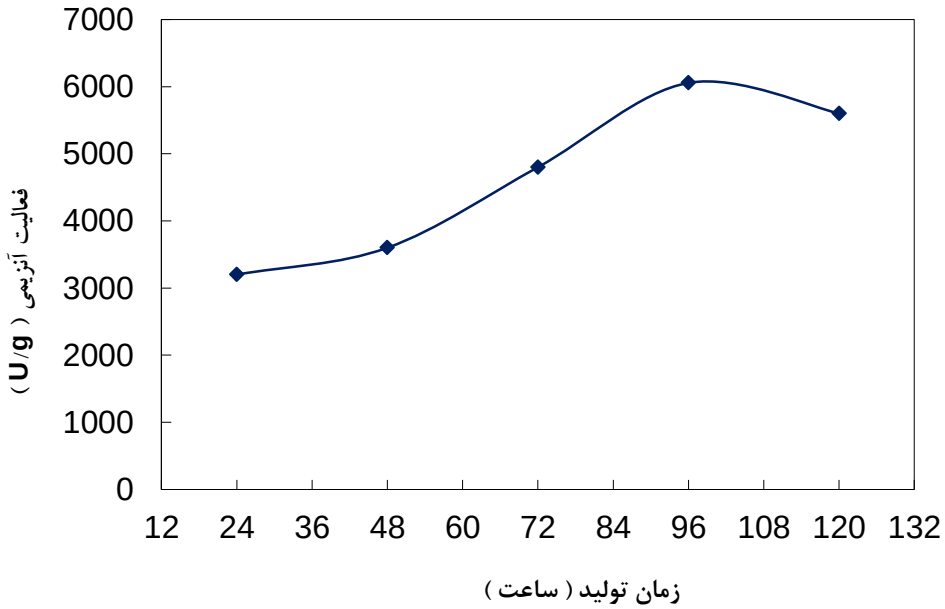
بسترهای ترکیبی	فعالیت آنزیم (U/g)
سیب زمینی – گاه گندم	۱۳۲۵
سیب زمینی – پوست دانه باقلا	۱۲۴۱
سیب زمینی – ذرت	۵۲۵
سیب زمینی – سبوس برنج	۲۹۱
سیب زمینی –کاه برنج	۲۷۵
سیب زمینی – غلاف باقلا	۲۳۳
سیب زمینی	۱۵۸

جدول ۳ – اثرات و ضرایب متغییر های مورد آزمایش در طراحی پلاکت – بورمن

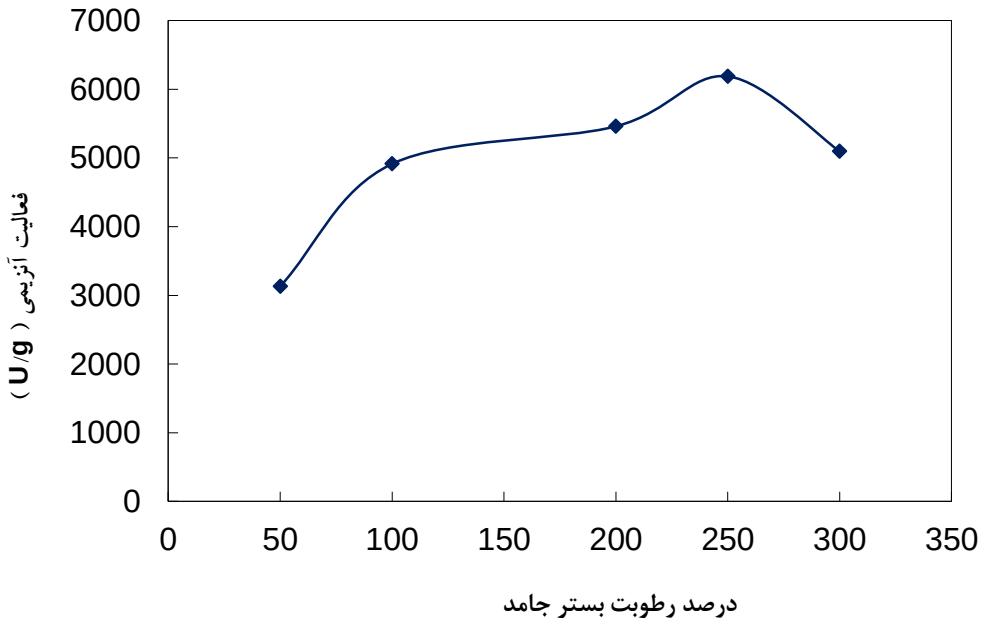
	اثر	ضریب	مقدار p
مقدار ثابت	۱۵۱۲/۵	۲۲۶۸/۸	۰/۰۰۲
گلوکز (%w/v)	۱۵۱۲/۵	۷۵۶/۲	۰/۰۴۱
لاکتوز (%w/v)	-۲۵۴/۲	-۱۲۷/۱	۰/۷۱۵
ساکاروز (%w/v)	۲۱۲//۵	۱۰۶/۲	۰/۷۶۱
کازئین (%w/v)	-۱۲۲۹/۲	-۶۱۴/۶	۰/۱۳۲
سولفات آمونیوم (%w/v)	-۱۵۴۵/۸	-۷۷۲/۹	۰/۰۴۷
عصاره مخمر (%w/v)	-۵۴۵/۸	-۲۷۲/۹	۰/۴۴۹
پپتون (%w/v)	۶۷۹/۲	۳۳۹/۶	۰/۳۵۶



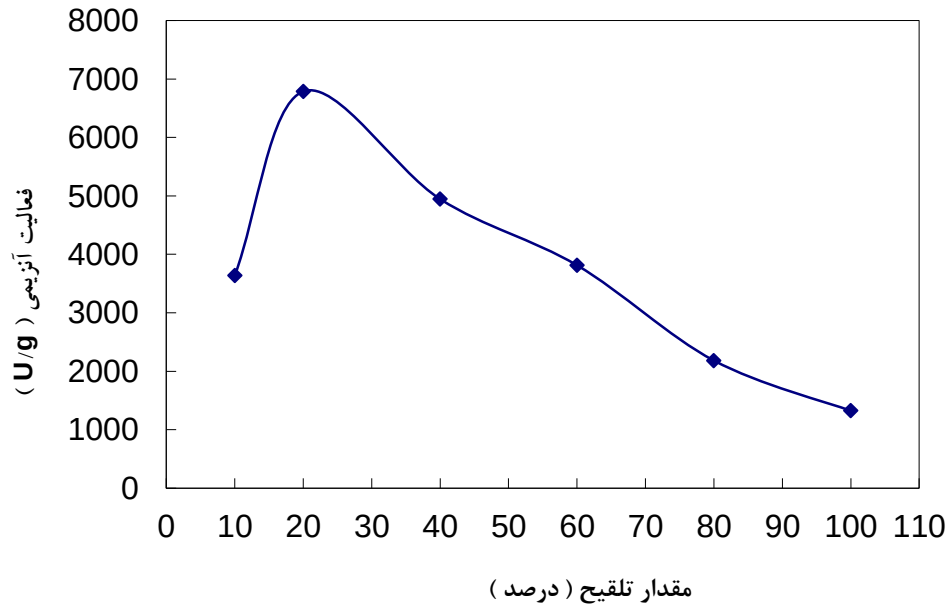
شکل ۱ – هاله ناشی از تولید آنزیم در محیط skim milk agar



شکل ۲ – اثر زمان گرمخانه گذاری بر میزان تولید آنزیم



شکل ۳ – **اثر درصد رطوبت بستر جامد بر میزان تولید آنزیم**



شکل ٤ – **اثر مقدار تلقیح بر میزان تولید آنزیم**

REFRENCES

- Chen, X.G., Stabnikova, O., Tay, J.H., Wang, J.Y., Tay, S.T.L. (2004). Thermoactive extracellular proteases of *Geobacillus caldoproteolyticus*, sp. nov., from sewage sludge. Extremophiles, 8: 489-498.
- Krishna, C., Chandrasekaran, M. (1996). Banana waste as substrate for- amylas e production by *Bacillus subtilis* (CBTK106) under solid state fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology, 46:106–111.
- Kumar, C.G., Tiwari, M.P., Jany, K.D. (1999). Novel alkaline serine proteases from alkalophilic *Bacillus sp*p.: purification and some properties. Process Biochemistry, 34: 441-449.
- Mahadik, N.D., Puntambekar, U.S., Bastawde, K.B., Khire, J.M., Gokhale, D.V. (2002). Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. Process Biochemistry, 31: 715-721.
- Mehrotra, S., Pandey, P.K., Gaur, R., Darmwal, N.S. (1999). The production of alkaline protease by a *Bacillus* species isolate. Bioresource Technology, 67: 201-203.
- Mitchell, D.A., Berovic, M., Krieger, N. (2002). Overview of solid state bioprocessing. Biotechnology Annual Review **8:** 183–225.
- Mukherjee, A.K., Adhikari, H., Rai, S.K. (2008). Production of alkaline protease by athermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF)condition using Imperata cylindrica grass and potato peela slow-cost medium: Characterization and application of enzyme in detergent formulation. Biochemical Engineering Journal, 39: 361-53.
- Ng, T.K., Keneal, W.R. In:(1986). *Thermophiles .General, Molecular and Applied Microbiology* (Brock, T.D. ed), Wiley Press, 197-205 pp., New-York.
- Pandey, C.R., Soccol, P., Nigam, D., Brand, Mohan, R., Roussos, S. (2000). Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocess. Biochemical Engineering Journal, 6: 153–162.
- Potumarthi, R., Subhakar, C., Jetty, A. (2007). Alkaline protease production by submerge fermentation in stirred tank reactor using *Bacillus licheniformis* NCIM-2042, Effect of aeration and agitation regimes. Biochemical Engineering Journal, 34:185–190.
- Prakasham, R.S., Rao, C.S., Sarma, P.N. (2006). Green gram husk-an inexpensive substrate for alkaline protease production by *Bacillus sp*.in solid state Fermentation. Bioresour Technology. 97: 1449-1454.
- Puri, S., Beg, Q.K., Gupta, R. (2002). Optimization of alkaline protease production from *Bacillus sp*.by response surface methodology. Current Microbiology, 44: 286–290.
- Ramesh, M.V., Lonsane, B.K. (1990). Critical importance of moisture content of the medium in alpha-amylase production by *Bacillus licheniformis* M27 in a solid state fermentation system. Applied Microbiology and Biotechnology, 33:501-505.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V. (1998). Molecular and Biotechnological aspect of microbial proteases. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62: 597–635.

- Ruchi, G., Anshu, G., Khare, S.K. (2008). Lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* strain: Production optimization by response surface methodology and application. Bioresource Technology, 99: 4796–4802.
- Salihu, A., Alam, M.Z., AbdulKarim, M.I., Salleh, M.H. (2011). Optimization of lipase production by *Candida cylindracea* in palm oil mill effluent based medium using statistical experimental design. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 69: 66–73.
- Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G., Pandey, A. (2005). Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. Process.Biochemistry, 40: 2689–2694.
- Tunga, R., Banerjee, R., Bhattacharya, B.C. (1999). Some studies on optimization of extraction process for protease production in SSF. Bioprocess Engineering, 20: 485-489.
- Uyar, F., Baysal, Z. (2004). Production and optimization of process parameters for alkaline protease production by a newly isolated *Bacillu sp*. under solid state fermentation. Process Biochemistry, 39:1893–1898.