

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال سوم، شماره ۱۱، پاییز ۱۳۹۳، صفحه ۲۱-۳۶
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۲/۰۷- تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۰/۲۴

افزایش میزان تولید آنزیم گزیلاناز از باسیلوس موجاونسیس با استفاده از روش جهش‌زایی تصادفی

شکوفه غازی*: دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران، shokoofeh.ghazi@gmail.com
مهرداد آذین: دانشیار بیوتکنولوژی صنعتی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی، تهران، ایران، azin@irost.com
عباس اخوان سپی: دانشیار میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، ایران، akhavansepahy@gmail.com

چکیده

مقدمه: افزایش میزان تولید آنزیم گزیلاناز از منابع میکروبی همواره مورد توجه پژوهشگران بوده است. مطالعه حاضر با هدف بررسی تاثیر عوامل جهش‌زای القایی کلاسیک بر افزایش میزان تولید آنزیم گزیلاناز باسیلوس موجاونسیس، به منظور دست یافتن به سویه‌های پر تولید انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق، ضمن نشان دادن توانایی باسیلوس موجاونسیس PTCC 1723، به عنوان سویه‌ای جدید برای تولید آنزیم گزیلاناز، به منظور افزایش تولید آنزیم از روش جهش‌زایی کلاسیک استفاده شد. ایجاد جهش‌یافتگان با به کار بردن عوامل جهش‌زا نظیر اشعه فرابنفش و اسید نیترو انجام شد. غربال اولیه با در نظرگیری بالاتر بودن شاخص H/C جهش‌یافتگان در مقایسه با باکتری والد، که معادل ۱/۶ بود، بر روی محیط آگار حاوی گزیلان انجام شد.

نتایج: از میان تعداد بیشماری کلونی تیمار شده، در جمع ۷۲ سویه جهش‌یافته با شاخص قطر هاله معادل و یا بالاتر از ۱/۶ انتخاب شدند. در مرحله بعدی غربال‌گری، میزان آنزیم تولید شده توسط جهش‌یافتگان در کشت مایع با مقدار آنزیم تولید شده توسط باکتری وحشی مقایسه شد. سپس، از بین ۶۷ جهش‌یافته با توانایی تولید آنزیم بیشتر نسبت به باکتری والد، جهش‌یافته شماره ۱۷ با توانایی تولید ۳۳۰/۵۶IU/mL و جهش‌یافته شماره ۴۳ با میزان تولید ۳۱۹/۵۸ انتخاب شدند که به ترتیب افزایش تولیدی معادل ۳/۴۵ و ۳/۳ برابر سویه والد نشان دادند.

بحث و نتیجه‌گیری: در نهایت، این سویه‌ها به عنوان سویه‌های دارای جهش مثبت یا مطلوب و تحت عنوان جهش‌یافتگان پر تولید انتخاب و به عنوان سویه‌های دارای ارزش صنعتی در تولید آنزیم گزیلاناز نگه‌داری شدند.

واژه‌های کلیدی: باسیلوس موجاونسیس، گزیلاناز، جهش‌زایی تصادفی، اشعه فرابنفش، اسید نیترو

مقدمه

جهش‌زایی تصادفی فرآیندی است که در آن، با به کار بردن عوامل شیمیایی و فیزیکی جهش‌زا، تغییراتی در ویژگی‌های محصولات تولید شده توسط ژن‌ها ایجاد می‌شود. گاهی محصول اساساً تولید نمی‌شود و یا محصولاتی غیر طبیعی تولید می‌شوند. ولی گاهی این فرآیند منجر به افزایش تولید محصول در مقایسه با سویه جهش نیافته یا والد می‌شود (۱ و ۲). گزیلاناز، آنزیم اصلی در تجزیه گزیلان، دومین بیوپلیمر فراوان در جهان پس از سلولز است که با حمله به پیوندهای بتا یک به چهار گزیلان باعث شکستن اسکلت اصلی می‌شود (۳ و ۴). گزیلانازها کاربردهای فراوانی در صنایع، از جمله سفید شویی کاغذ، فرآوری نان، هضم غذای دام و طیور و غیره دارد و تولید آن به طور انبوه مورد نیاز است (۵-۹). از آنجا که تولید آنزیم از منابع تولید کننده آن، که بیشتر باکتری‌ها و قارچ‌ها هستند، نمی‌تواند به لحاظ کمیت و ویژگی‌های کیفی آن جواب‌گوی نیازهای تجاری باشد، تغییر ژنتیکی سویه‌های تولید کننده آنزیمی در ازای تولید بیشتر و یا تغییر کیفیت محصول تولیدی مد نظر است. به طور کلی بهبود سویه‌ها به لحاظ صنعتی و استفاده از روش‌های جهش‌زایی تصادفی فرآیندی است که در صورت موفقیت، قابلیت تولید را تا چندین برابر افزایش می‌دهد و این افزایش در میزان تولید آنزیم گزیلاناز بسیار بیشتر و کارآمدتر از روش‌های پر هزینه دیگری نظیر کلونینگ و سایر روش‌های ژنتیکی نظیر جهش‌زایی هدف‌دار است، که شاید با توجه به محدودیت و ویژگی‌های ذاتی خود سویه یا میزبان بیان کننده یک ژن در نهایت کارایی چندانی نداشته باشد (۷ و ۱۰). پژوهش‌های اندکی در

رابطه با افزایش میزان تولید آنزیم گزیلاناز از منشا باکتریایی یا قارچی و با استفاده از روش‌های جهش‌زایی کلاسیک انجام شده است. بیشتر پژوهش‌های انجام شده بر روی کلونینگ ژن گزیلاناز متمرکز شده که میزان تولید را می‌تواند تا حد محدودی افزایش دهد. زیرا محدودیت سویه‌های وحشی تولید کننده و میزبان بیان کننده ژن پس از کلونینگ، خود مانع از تولید بیش از حد محصول کلون شده می‌شود، ضمن اینکه روش‌های بر پایه کلونینگ و یا جهش هدف‌دار گران‌تر نیز هستند. در حالی که ایجاد جهش با اشعه فرا بنفش و یا مواد شیمیایی، نه تنها ارزان‌تر و راحت‌تر بوده بلکه می‌تواند نتایجی به مراتب بهتر در افزایش تولید محصول مورد نظر نسبت به سایر روش‌های ژنتیکی گران قیمت‌تر ارائه دهد (۱ و ۵). مرور مقالات نشان می‌دهد تا به حال به تولید گزیلاناز توسط جهش یافته‌های *Bacillus* *mojavensis* *PTCC1723* *UV*^۱ و اسید نیترو به‌عنوان ابزاری در بهبود سویه استفاده شد. نتایج به دست آمده در میزان تولید آنزیم از سویه‌های جهش یافته مقایسه شده و در نهایت، بهترین سویه با بیش‌ترین میزان تولید آنزیم برگزیده شد.

مواد و روش‌ها

میکروارگانیسم

سویه میکروبی *Bacillus mojavensis* PTCC1723^۱ به شکل لیوفیلیزه از مرکز منطقه‌ای میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران تهیه شد. برای تجدید کشت باکتری اقدامات لازم انجام و با انتقال سویه به محیط غنی برین هارت اینفوژین آگار مرحله احیای آن با موفقیت انجام شد.

تیمار با اشعه فرابنفش

از سوسپانسیون باکتریایی یاد شده سری رقت‌هایی مختلف از 10^{-1} تا 10^{-9} تهیه و از هر رقت به میزان ۵۰ میکرولیتر در پلیت کشت داده شد. پلیت‌های نوترینت آگار برای شمارش تعداد کلونی‌های بازمانده و پلیت‌های گزیلان آگار اختصاصی برای مشاهده هاله هیدرولیز کلونی‌های جهش‌یافته و مقایسه شاخص H/C کلونی‌های جهش یافته با باکتری والد استفاده شدند (۱۵). از لامپ اشعه فرابنفش میله ای شکل فیلیپس ۳۰ وات با طول موج ۲۸۰ نانومتر برای ایجاد جهش استفاده شد. پلیت‌ها در فاصله ۲۰ سانتی متری لامپ قرار داده شدند (۱۶). بازه زمانی اشعه دهی از صفر تا ۴۰۰ ثانیه در نظر گرفته شد و پلیت‌های کشت شده با فواصل ۳۰ ثانیه‌ای از معرض اشعه دهی فرا بنفش خارج شدند. برای جلوگیری از فعال شدن سیستم ترمیم نوری، پلیت‌ها در کیسه‌های نایلونی سیاه رنگ و در یک جعبه مقوایی قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت پلیت‌های اشعه دیده از انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد و شرایط تاریکی خارج شده تا کلونی‌های ظهور یافته بر روی پلیت‌ها شمارش شوند. پلیت یا نمونه متعلق به زمان صفر که همان نمونه شاهد و بدون تیمار با اشعه فرابنفش است، برای تعیین تعداد کلونی‌های اولیه و تیمار نشده استفاده شد. در نهایت، براساس شمارش تعداد کلونی‌های بازمانده در پلیت‌ها منحنی میزان مرگ-میزان بازماندگان در اثر عامل جهش‌زا ترسیم شد که نشان دهنده تغییر تعداد بازماندگان در مقابل زمان است (۱)، (۱۵، ۱۷ و ۱۸).

تیمار با اسید نیترو

غلظت ۰/۲ مولار از نیتريت سدیم در بافر استات ۰/۲ مولار و اسیدیتته ۵/۵ تهیه و پس از سترون شدن با فیلتر

برای بررسی توانایی باسیلوس موجاونسیس PTCC 1723 در تولید آنزیم گزیلاناز^۲، از سوبسترای اختصاصی آنزیم گزیلاناز استفاده شد. محیط اختصاصی گزیلان آگار، حاوی گزیلان خالص پوسته جو، تهیه شده از شرکت فلوکا^۳، با اسیدیتته ۷ و ترکیبات زیر (گرم در لیتر) تهیه شد: گزیلان خالص ۵، پیتون ۵، عصاره مخمر ۵، سولفات منیزیم هفت آبه ۰/۲، دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات ۱ و آگار ۱۵.

کشت نقطه ای از باکتری وحشی بر روی محیط اختصاصی تهیه شد. درچنین محیط کشتی، میکروارگانسیم مولد آنزیم گزیلاناز، هاله شفاف ناشی از تجزیه گزیلان تولید می‌کند. برای رویت بهتر هاله‌ها، پلیت‌ها با محلول ۰/۱ درصد قرمز کنگو به مدت ۱۵ دقیقه رنگ آمیزی و سپس، با محلول کلرید سدیم یک مولار چندین بار شسته شدند (۶، ۷ و ۱۱).

تهیه سوسپانسیون باکتریایی

از کشت ۲۴ ساعته باسیلوس به میزان یک لوپ وارد ۵۰ میلی لیتر از محیط غنی لوریا برتانی حاوی (گرم در لیتر): تریپتون ۱۰، پیتون ۵ و کلرید سدیم ۱۰ شد. گرماگذاری بر روی شیکر انکوباتور به مدت ۱۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد با دور rpm ۱۶۰ انجام شد. سپس، ۱۰ میلی لیتر از کشت مایع در دور rpm ۹۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد تا بیوماس جدا شود. بیوماس در ۱۰ میلی لیتر از محیط سترون لوریا برتانی و در شرایط استریل حل شد. به طوری که کدورت سوسپانسیون به دست آمده در طول موج ۶۲۵ نانومتر معادل ۰/۰۸ تا ۰/۱، برابر نیم درجه مک فارلند شود. به این شکل سوسپانسیونی حاوی حدود $10^8 \times 1/5$ سلول در هر میلی لیتر به دست آمد (۱۲-۱۴).

شد (۲۰). پس از تیمار سوسپانسیون باکتریایی با اشعه فرابنفش و اسید نیترو، با شمارش تعداد کلونی‌های تشکیل شده، منحنی دوز-بقا در مقابل زمان رسم شد. مدت زمانی که ۹۹/۹۹ درصد سلول‌ها دچار مرگ شده‌اند به عنوان زمان بهینه ایجاد جهش در نظر گرفته شد (۱۶). از آن پس مراحل جهش‌زایی با اشعه فرابنفش و اسید نیترو چندین مرتبه تکرار شد و کلونی‌های جهش‌یافته به دست آمده وارد مرحله غربال‌گری کیفی و کمی شدند.

غربال اولیه جهش‌یافتگان بر اساس شاخص قطر هاله

در این مرحله از غربال‌گری از شاخص نیمه کمی قطر هاله، برای انتخاب کلونی‌هایی که تولید آنزیم آن‌ها بیش از سویه وحشی است استفاده شد. شاخص قطر هاله با تقسیم قطر هاله شفاف ناشی از هیدرولیز گزیلان بر قطر کلونی به دست آمد. پس از خالص‌سازی جهش‌یافتگان، از هر یک از کلونی‌ها بر روی محیط گزیلان آگار، دوباره کشت نقطه‌ای داده شد و شاخص قطر هاله کلونی‌ها با شاخص قطر هاله باکتری شاهد مقایسه شد. کلونی‌هایی که نسبت شاخص قطر هاله آن‌ها از سویه والد بزرگتر بود به عنوان کلونی‌های بالقوه پر تولید بررسی و سنجش بیشتر شدند.

غربال ثانویه جهش‌یافته‌ها بر اساس میزان تولید آنزیم گزیلاناز در کشت مایع

جهش‌یافتگان برگزیده شده از مرحله اول به لحاظ میزان تولید آنزیم در محیط کشت مایع سنجش شدند تا میزان تولید آنزیم در آن‌ها با میزان تولید آنزیم سویه وحشی مقایسه شود. برای این منظور در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری مقدار ۵۰ میلی‌لیتر محیط تولید پایه آنزیم گزیلاناز حاوی (گرم در لیتر): گزیلان خالص ۵، پپتون ۵، عصاره مخمر ۵، سولفات منیزیم هفت آب ۰/۲ و دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات ۱ تهیه شد. برای تنظیم اسیدیته از محلول ۱۰ درصد کربنات سدیم سترون استفاده

۰/۲ میکرون به عنوان محلول پایه اسید نیترو در تمام مراحل بعدی جهش‌زایی استفاده شد (۱۵). سوسپانسیون باکتریایی با کدورت نیم درجه مک فارلند تهیه و ۱۰ میلی‌لیتر از آن وارد ارلنی شد که حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محلول اسید نیترو در بافر استات بود. این ارلن در شیکر انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. برای ارزیابی تاثیر اسید نیترو بر سلول‌های باکتریایی، تحت شرایط سترون، از سوسپانسیون سلولی سویه وحشی هر ۵ دقیقه یک‌بار، تا ۷۵ دقیقه، به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر نمونه‌گیری شد و به لوله‌های حاوی ۴/۵ میلی‌لیتر بافر سدیم فسفات ۰/۰۵ مولار با اسیدیته ۷ انتقال یافت. از بافر سدیم فسفات برای توقف اثر اسید نیترو روی سلول‌ها استفاده شد (۱۶). سپس، از لوله‌های یاد شده، ۰/۵ میلی‌لیتر نمونه گرفته و به درون لوله‌های حاوی سرم فیزیولوژی استریل برده شد. پس از هم زدن تمامی لوله‌ها، از هر لوله ۵۰ میکرولیتر بر روی پلیت‌های نوترینت آگار و گزیلان آگار استریل کشت داده شد. پلیت‌های نوترینت آگار برای شمارش تعداد کلونی‌های بازمانده و پلیت‌های گزیلان آگار برای مشاهده هاله هیدرولیز کلونی‌های دچار جهش و مقایسه شاخص قطر هاله کلونی‌های جهش‌یافته با سویه والد در نظر گرفته شدند. پلیت‌ها پس از کشت، به انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل و پس از ۲۴ ساعت برای شمارش تعداد کلونی‌های باقی مانده خارج شدند (۱۶ و ۱۹). به عنوان کنترل، از سوسپانسیون باکتریایی سویه وحشی و تیمار نشده با اسید نیترو استفاده شد.

منحنی دوز بقا

معمولاً برای افزایش اطمینان از موثر بودن جهش‌های ایجاد شده، ضریب مرگ سلول‌ها در اثر عامل جهش‌زا بین ۹۹ تا ۹۹/۹۹ درصد در نظر گرفته می‌شود. ابتدا با تعیین منحنی مرگ میکروارگانیسم در اثر هر یک از عوامل جهش‌زا، زمان تیمار برای فرایند جهش‌زایی بهینه

نتایج

همان‌گونه که در شکل شماره ۱ مشاهده می‌شود، باکتری والد با نشان دادن هاله شفاف نارنجی رنگ حاصل از تجزیه گزیلان به عنوان تولید کننده آنزیم گزیلاناز معرفی و شناخته شد. قطر کلونی‌های ۲۴ ساعته باکتری از سویه وحشی حداقل ۱۵ میلی‌متر و حداقل قطر ناشی از هاله هیدرولیز ۲۵ میلی‌متر بود در نتیجه شاخص قطر هاله آن معادل $1/6$ به دست آمد.



شکل ۱- ظهور هاله‌های نارنجی رنگ شفاف تجزیه گزیلان در اثر تولید آنزیم گزیلاناز در سویه وحشی

منحنی مرگ سلولی باسیلوس موجاونسیس در اثر اشعه فرابنفش

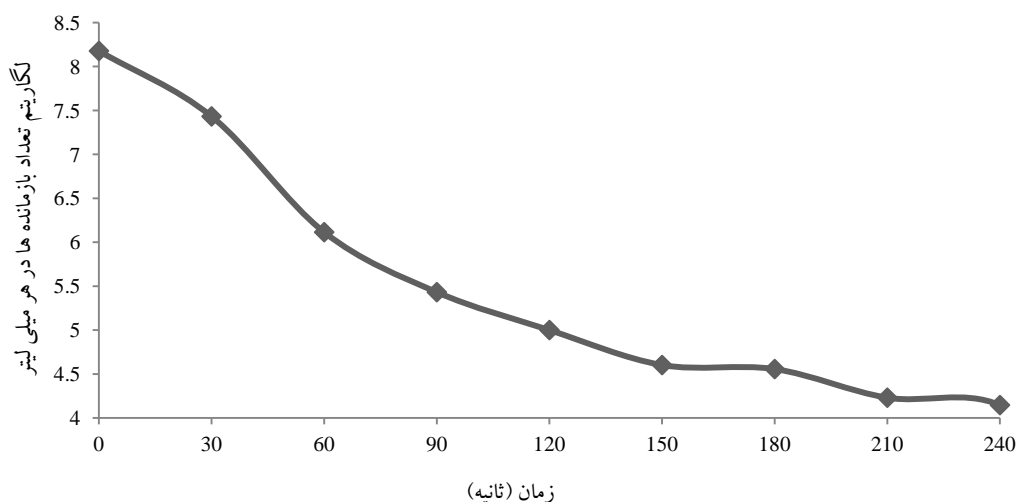
در شکل ۲ منحنی مرگ سلول‌های باسیلوس موجاونسیس در اثر اشعه فرابنفش مشاهده می‌شود. بررسی نمودار نشان می‌دهد پس از ۲۰۰ ثانیه $99/99$ درصد سلول‌ها از بین رفته‌اند. در واقع در منحنی نشان داده شده که در زمان ۲۱۰ ثانیه احتمال دسترسی به کلونی‌های جهش‌یافته در اثر اشعه بالاست. بنابراین، از این پس کلونی‌هایی که پس از ۲۱۰ ثانیه مجاورت با اشعه زنده ماندند، از نظر وقوع جهش مطلوب غربال اولیه و ثانویه شدند.

شد که به طور جداگانه و پس از اتوکلاو محیط‌های تخمیری به آن‌ها اضافه شد. اسیدیته محیط‌ها روی ۷ تنظیم شد (۲۱).

سوسپانسیون‌های باکتریایی تازه از جهش‌یافته‌ها با کدورتی معادل $0/5$ درجه مک فارلند تهیه و برای تلقیح آماده شدند. سپس، از محیط‌های پیش کشت متعلق به هر یک، به میزان $2 (v/v)$ درصد وارد محیط‌های تخمیری شد. ارلن‌های محیط کشت تولید آنزیم به مدت ۹۶ ساعت در شیکر انکوباتور 37 درجه سانتی‌گراد با دور 160 rpm قرار داده شد. از هر ارلن در فواصل زمانی ۲۴ ساعت نمونه‌گیری انجام شد. نمونه‌های گرفته شده با انتقال به لوله‌های اپندورفدر دور 9000 rpm به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفوژ دارای یخچال با دمای 4 درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. از عصاره شفاف رویی به‌عنوان منبع آنزیم گزیلاناز خام برای سنجش فعالیت آنزیمی استفاده شد (۲۱ و ۲۲). از کشت سویه والد در همان شرایط به‌عنوان شاهد استفاده شد.

سنجش فعالیت آنزیم گزیلاناز

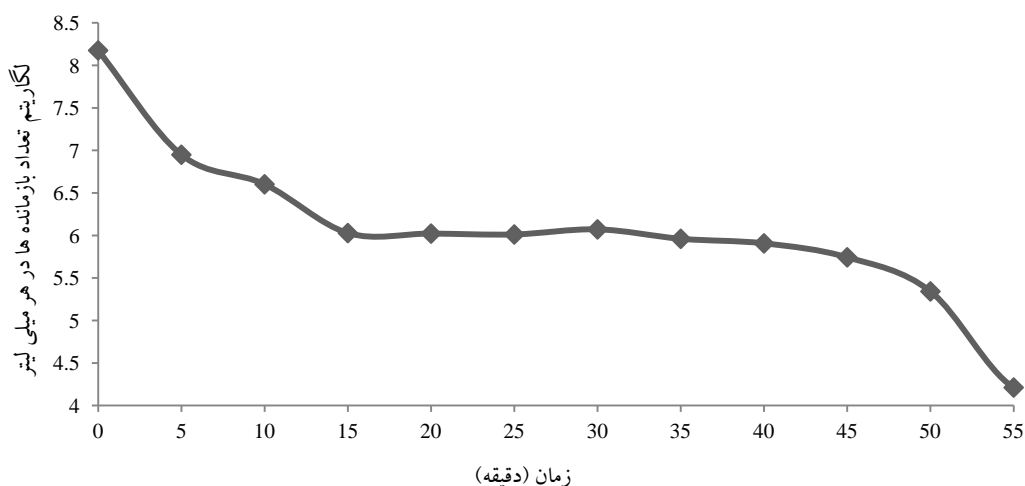
از محلول $0/5 (w/v)$ درصد گزیلان خالص پوسته جو در بافر سدیم فسفات $0/05$ مولار، اسیدیته ۷، به عنوان سوبسترا استفاده شد. میزان $0/5$ میلی‌لیتر از سوبسترا به همراه $0/5$ میلی‌لیتر از محلول آنزیمی، که به میزان مناسبی در بافر فوق رقیق شده بود، به مدت ۲۰ دقیقه در 40 درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. فعالیت آنزیمی با سنجش میزان قندهای احیا کننده آزاد شده با استفاده از معرف دینیترو سالیسیلیک اسید محاسبه شد (۲۳ و ۲۴). از منحنی استاندارد قند د-گزیلوز برای تعیین غلظت قندهای آزاد شده استفاده شد. یک واحد از فعالیت آنزیمی برابر با مقداری از آنزیم در نظر گرفته شد که موجب آزاد شدن یک میکرومول قند د-گزیلوز از سوبسترای به کار رفته در واکنش در هر دقیقه می‌شد (۲۵).



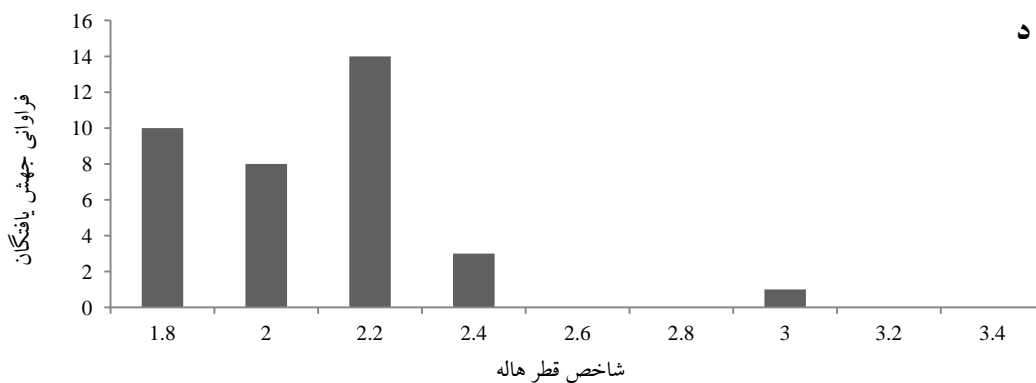
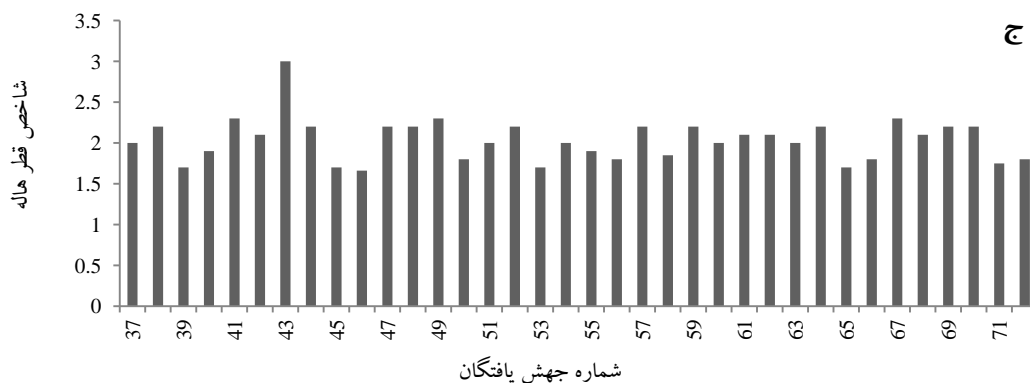
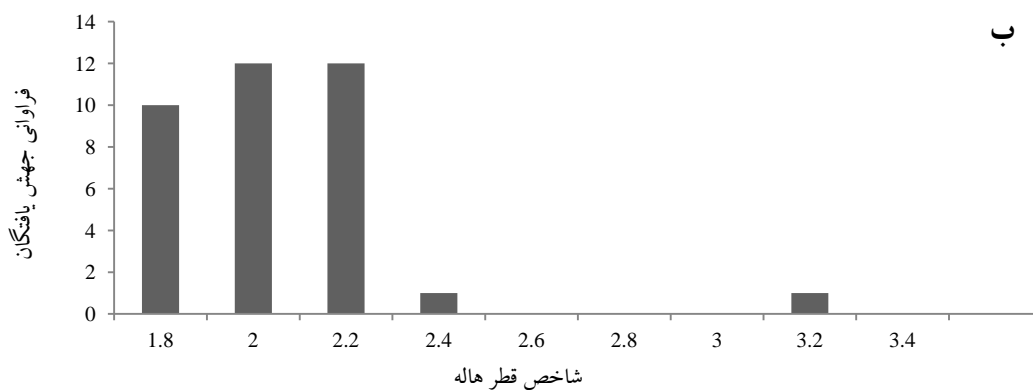
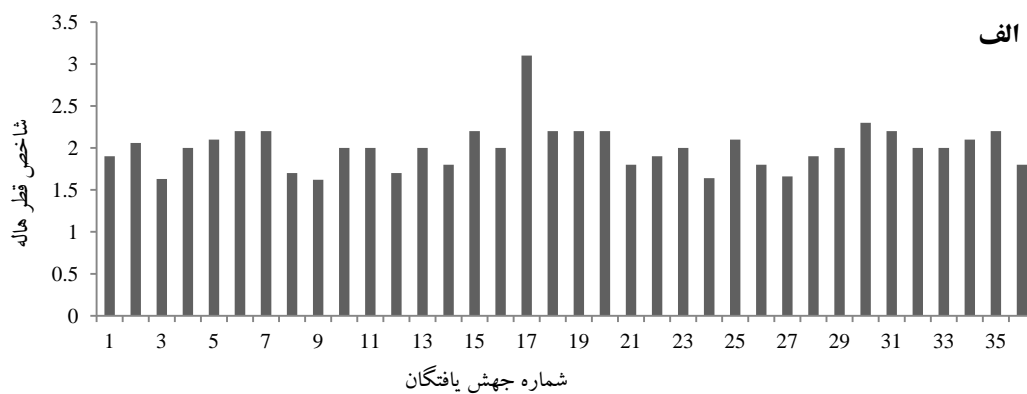
شکل ۲- تاثیر تابش اشعه فرابنفش بر میزان زنده ماندن سلول‌های باسیلوس موجاوتسیس PTCC 1723. نقاط نمایش داده شده بر اساس میانگین داده‌ها در سه تکرار رسم شده است.

در واقع طبق منحنی نشان داده شده که در زمان ۵۲ دقیقه احتمال دسترسی به کلونی‌هایی که در اثر اسید نیترو دچار جهش شده اند حداکثر است. بنابراین، از این پس کلونی‌هایی که پس از ۵۲ دقیقه تیمار با اسید نیترو زنده ماندند، از نظرو قوع جهش مطلوب غربال اولیه و ثانویه شدند.

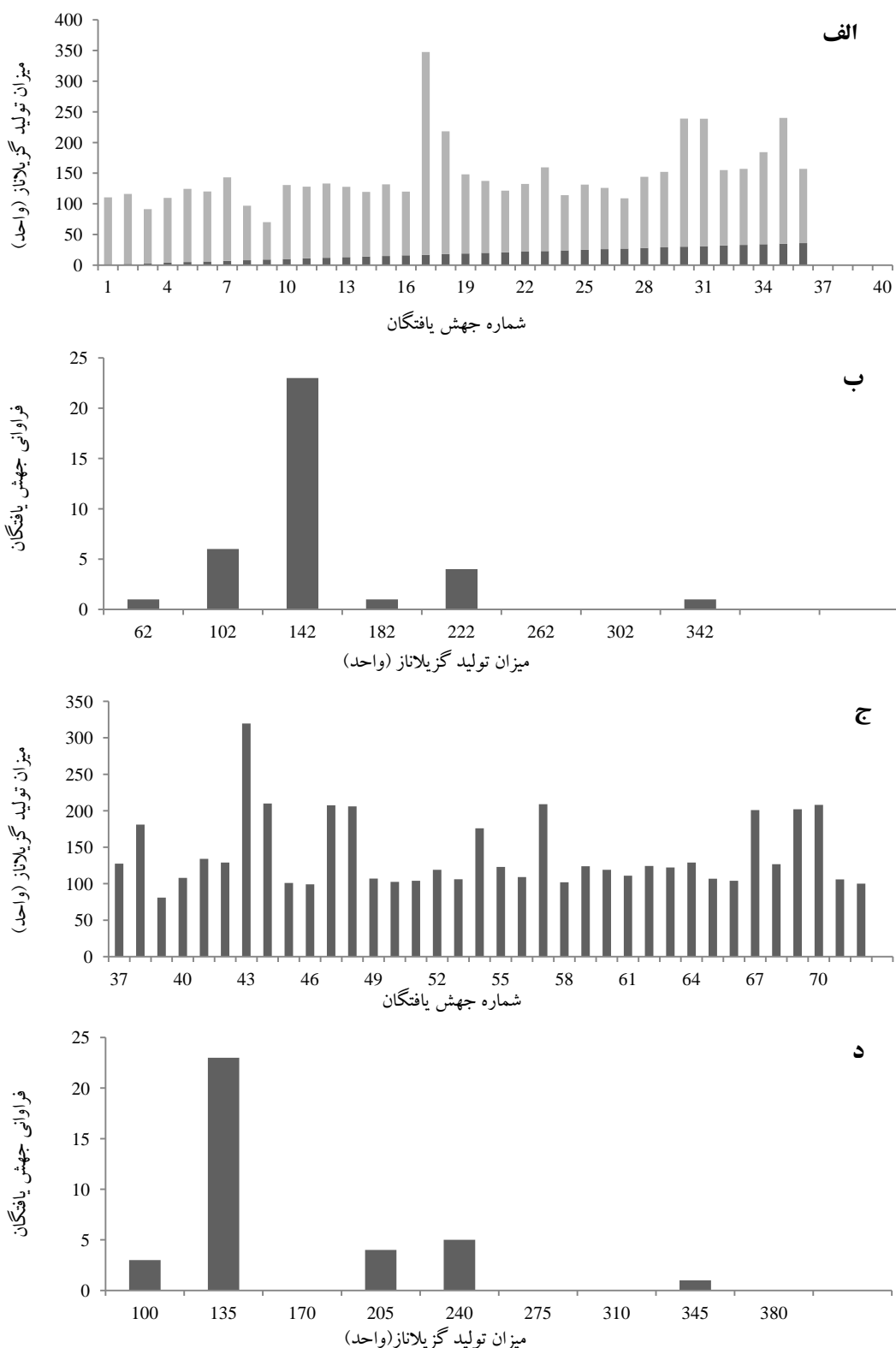
منحنی مرگ سلولی باسیلوس موجاوتسیس در اثر اسید نیترو
در شکل ۳ منحنی مرگ سلول‌های باسیلوس موجاوتسیس در اثر تیمار با اسید نیترو مشاهده می‌شود. با دقت به نمودار برای تعیین دوز بهینه جهش‌زایی اسید نیترو روی باسیلوس موجاوتسیس، زمان بهینه تیمار با اسید نیترو ۵۲ دقیقه به دست آمد که طی آن ۹۹/۹۹ درصد سلول‌ها از بین رفتند.



شکل ۳- تاثیر محلول اسید نیترو بر میزان زنده ماندن سلول‌های باسیلوس موجاوتسیس PTCC 1723. نقاط نمایش داده شده بر اساس میانگین داده‌ها در سه تکرار رسم شده است.



شکل ۴- نتیجه غربال‌گری اولیه. الف) شاخص قطر هاله در جهش‌یافته‌های اشعه فرابنفش، ب) فراوانی جهش‌یافته‌های اشعه فرابنفش از نظر شاخص قطر هاله، ج) شاخص قطر هاله در جهش‌یافته‌های اسید نیترو، د) فراوانی جهش‌یافته‌های اسید نیترو از نظر شاخص قطر هاله. نقاط نمایش داده شده بر اساس میانگین داده‌ها در سه تکرار رسم شده است.



شکل ۵- نتیجه غربال‌گری ثانویه. الف) تولید آنزیم در جهش یافته‌های اشعه فرابنفش، ب) فراوانی جهش یافته‌های اشعه فرابنفش از نظر تولید آنزیم، ج) تولید آنزیم در جهش یافته‌های اسید نیترو، د) فراوانی جهش یافته‌های اسید نیترو از نظر تولید آنزیم. نقاط نمایش داده شده در نمودار الف و ج بر اساس میانگین داده‌ها در سه تکرار رسم شده‌اند.

نتایج غربال اولیه جهش‌یافتگان

طی انجام مرحله اول جهش‌زایی، در مجموع ۷۲ کلونی با جهش مثبت غربال شد که شاخص قطر هاله بزرگتری در مقایسه با باکتری وحشی از خود نشان دادند. همان‌گونه که در شکل ۴ مشاهده می‌شود. تعداد ۳۶ سویه پس از تیمار با اشعه فرابنفش و نیز تعداد ۳۶ سویه پس از تیمار با اسید نیترو با شاخص قطر هاله بزرگتر از سویه وحشی از میان تعداد بیشماری از جهش‌یافتگان غربال شدند. بر اساس شکل ۴ قسمت الف و ج، جهش‌یافته شماره ۱۷ با شاخص قطر هاله برابر با ۳/۲ از بین تیمار شده‌های اشعه فرابنفش و جهش‌یافته شماره ۴۳ با شاخص قطر هاله برابر با ۳ از بین تیمار شده‌های اسید نیترو، به‌طور مشخصی شاخص قطر هاله بزرگتری را نشان دادند.

گزینش جهش‌یافته پر تولید:

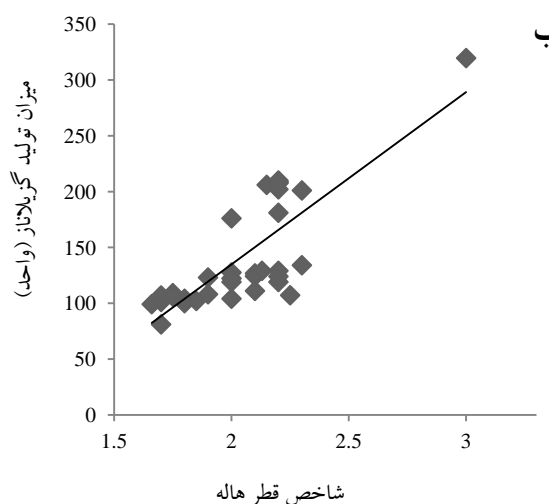
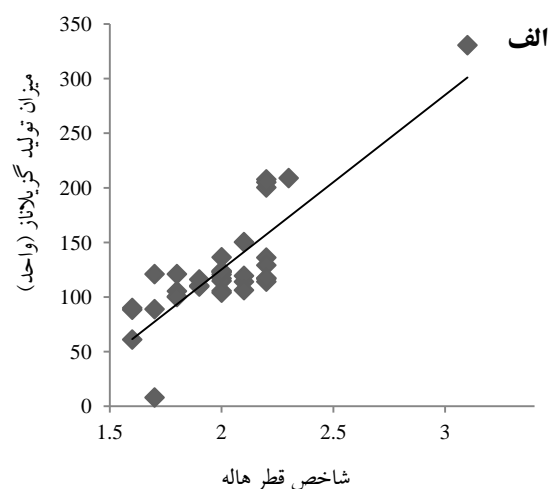
در راستای انجام آزمایش‌های تاییدی و در مرحله غربالگری ثانویه، میزان کمی تولید آنزیم در جهش‌یافتگان مطلوب سنجش و با میزان آنزیم تولید شده توسط باکتری وحشی مقایسه شد. نتایج این مقایسه در شکل ۵ گنجانده شده است. از بین ۳۶ جهش‌یافته به دست آمده از تیمار با اشعه فرابنفش سویه جهش‌یافته شماره ۱۷ به عنوان جهش‌یافته برتر با میزان تولید آنزیمی $330/56 \text{ IU/mL}$ توانست نسبت به باکتری والد، با میزان تولید اولیه $95/73 \text{ IU/mL}$ ، افزایش تولید ۳/۴۵ برابری را نشان دهد.

از طرفی همان‌گونه که در شکل ۵ بارز است چندین سویه جهش‌یافته با میزان تولید آنزیم بالاتری از باکتری وحشی نیز به دست آمدند، از جمله جهش‌یافته پر تولید شماره ۴۳ که ناشی از تیمار سویه والد با اسید نیترو بود؛ زیرا توانست افزایش تولید ۳/۳ برابری را نسبت به آن

نشان دهد. در نتیجه این سویه نیز به لحاظ میزان آنزیم تولید شده که معادل $319/58 \text{ IU/mL}$ است دارای ارزش و اهمیت بوده و نگه‌داری شد. از آنجا که بیش‌ترین میزان تولید آنزیم در سویه والد ۴۸ ساعت پس از گذشت فرایند تخمیر به دست آمد ملاک سنجش و مقایسه میزان تولید آنزیم برای سویه‌های جهش‌یافته نیز همان ۴۸ ساعت در نظر گرفته شد. اگر چه نمونه‌برداری و سنجش میزان تولید آنزیم برای جهش‌یافتگان نیز در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۹۶ ساعته انجام شد، جهش‌یافتگان نیز بالاترین میزان تولید آنزیم را همانند سویه والد پس از گذشت ۴۸ ساعت نشان دادند.

طبق شکل ۶ قسمت الف و ب ضریب همبستگی بین نتایج حاصل از غربال‌گری اولیه و ثانویه در تیمار با اشعه فرابنفش و اسید نیترو (هر دو با فاکتور آلفا کوچکتر از ۰/۰۱) به ترتیب برابر ۰/۸۵۳ و ۰/۷۹۳ بود که نشان دهنده همبستگی قوی بین نتایج این دو مرحله است. ضریب تشخیص همبستگی این دو به ترتیب برابر ۰/۷۲۷ و ۰/۶۳۶ محاسبه شد که نشان می‌دهد در ۷۲/۷ درصد موارد می‌توان با دانستن نسبت شاخص قطر هاله کلونی‌های جهش‌یافته ناشی از تیمار با اشعه فرابنفش، مقدار آنزیم قابل تولید توسط آن‌ها را در غربالگری ثانویه به درستی حدس زد. این احتمال در مورد جهش‌یافتگان ناشی از اسید نیترو ۶۳/۶ درصد است. در هر دو مرحله نیمه کمی و کمی، سویه‌ها اختلاف مشابهی را با والد نشان می‌دهند. به‌علاوه در مرحله دوم اختلاف جهش‌یافتگان با سوش والد خیلی نمایان‌تر است. در نهایت جهش‌یافتگانی که میزان تولید آنزیم آن‌ها کمتر از سویه وحشی بود و یا افزایش تولید آنزیم در آن‌ها خیلی چشمگیر نبوده کنار گذاشته شدند.

جهش‌زایی زیاد است، اگر چه افزایش میزان تولید آنزیم در آن‌ها در مقایسه با باکتری وحشی خیلی چشمگیر نیست اما می‌توان با روش‌های بهبود سویه‌ای و ایجاد جهش‌های پی در پی در پی در آن‌ها به نتایج مطلوبی در بالاتر بردن توانایی تولید محصول دست یافت. از طرفی دیگر، احتمال دست یافتن به جهش‌یافتگانی با توانایی تولید آنزیم بسیار بیشتر، نسبت به باکتری وحشی، در اولین مرحله بسیار اندک و نیازمند تکرار آزمایش‌های طولانی مدت است به طوری که ممکن است زمان زیادی صرف دسترسی به چنین جهش‌یافتگانی شود که به اصطلاح جهش‌های بزرگ گفته می‌شود. اگر چه افزایش تولید محصول در آن‌ها نسبت به باکتری والد بسیار چشمگیر است اما همان‌طور که در شکل ۵ ملاحظه می‌شود فراوانی این جهش‌یافتگان بسیار کمتر است. مقایسه افزایش تولید آنزیم در جهش‌یافتگان گویای آن است که تاثیر اشعه فرابنفش در مقایسه با اسید نیترو در ایجاد جهش‌های مطلوب و کلونی‌های پر تولید بیشتر بوده است (شکل ۴- قسمت ب و دال). نتایج قطعی‌تر را می‌توان با مقایسه نسبت فراوانی جهش‌یافتگانی که میزان آنزیم بیشتری نسبت به باکتری وحشی تولید می‌کنند و ناشی از تیمار با اشعه فرابنفش هستند ابراز داشت. همان‌گونه که در شکل ۵- قسمت ب و دال مشاهده می‌شود، نسبت فراوانی جهش‌یافتگان با میزان تولید آنزیم بین ۱۰۰ تا ۱۳۰ واحد بیش از سایر مقادیر است و در این میان، این افزایش تولید، فراوانی بیشتری را در میان جهش‌یافتگان تیمار یافته با اشعه فرابنفش به خود اختصاص داده است. مقایسه قسمت الف و ج شکل ۴ و ۵ با یکدیگر می‌رساند که دقیقا آن دسته از



شکل ۶- همبستگی بین نتایج حاصل از غربال‌گری اولیه و ثانویه. الف) تیمار با اشعه فرابنفش، ب) تیمار با اسید نیترو

بحث و نتیجه‌گیری

همان‌گونه که مشاهده می‌شود فراوانی جهش‌یافتگان با شاخص قطر هاله ۲ تا ۲/۲ بیش از بقیه است و حدود ۴۵ جهش‌یافته با این حد از شاخص قطر هاله حاصل شده است. در شکل ۴ و ۵ قسمت ب و دال واضح است که فراوانی آن دسته از جهش‌یافتگان مطلوب که نسبت به والد تنها ۵ تا ۱۰ درصد افزایش تولید آنزیم داشتند، بالاست. این کلونی‌ها دارای جهش‌های کوچک هستند و احتمال دستیابی به چنین جهش‌هایی در یک فرایند

اما آنچه در این مورد مهم جلوه می‌کند نحوه توزیع این فراوانی است. فراوانی جهش‌یافتگانی که میزان شاخص قطر هاله آن‌ها بالاتر از $1/6$ است در شکل ۴ قسمت الف و ج گنجانده شده است. نحوه توزیع فراوانی کلونی‌های با شاخص قطر هاله بالاتر دقیقاً مشابه توزیع جهش‌یافتگانی است که آنزیم بیشتری نسبت به والد طبق شکل ۵ قسمت الف و ج تولید می‌کنند. نتایج قطعی‌تر را می‌توان با دقت به شکل ۶ متوجه شد.

شایان ذکر است افزایش تولید گزیلاناز همواره مورد توجه پژوهشگران بوده و برای دستیابی به مقادیر هر چه بالاتر آنزیم، محققان به راه‌های گوناگونی متوسل شده‌اند. عده‌ای نظیر آنچه به اختصار در جدول شماره ۱ یاد شده است در جستجوی میکروارگانیزم‌هایی هستند که ذاتاً توانایی تولید گزیلاناز بالایی را دارند و به طور طبیعی و دست‌نخورده مقادیر مناسبی از آنزیم را تولید می‌کنند (۲۶-۲۸). برخی دیگر به دنبال بالا بردن میزان تولید از سویه‌های میکروبی طی بهینه‌سازی ترکیبات محیط کشت و شرایط تخمیری هستند (۳۰ و ۲۹). به عنوان مثال، گزیلاناز باسیلوس موجاونسیس ۱۳۷ بومی، جداسازی شده از خاک مزرعه پنبه در حوالی کاشان، با تولید اولیه حدود $194/68 \text{ IU/mL}$ ، طی بهینه‌سازی ترکیبات محیط کشت و شرایط تخمیر به میزانی معادل $302/466 \text{ IU/mL}$ افزایش یافت (۲۱). همچنین، در سویه ۱۳۷-۱۲p از گونه ای از *Aeromonas hydrophila*، با به کارگیری روش‌های بهینه‌سازی ترکیبات محیط کشت و شرایط تخمیر، افزایش تولید آنزیم تا حدود ۲۷ واحد به دست آمد (۳).

جهش‌یافتگان با شاخص قطر هاله بزرگتر از باکتری والد لزوماً آنزیم بیشتری نیز تولید کرده‌اند و ضریب همبستگی این دو آزمایش بسیار نزدیک شده است. در واقع با دقت به منحنی توزیع فراوانی جهش‌یافتگان با شاخص قطر هاله بزرگتر از والد در شکل ۴ قسمت ب و دال و مقایسه آن با منحنی توزیع فراوانی جهش‌یافتگان پر تولید در قسمت بو دال شکل ۵ متوجه می‌شویم که بیش از ۷۰ درصد توزیع فراوانی جهش‌یافتگان با شاخص قطر هاله بالاتر، با نحوه توزیع فراوانی جهش‌یافتگان پر تولید مطابقت می‌کند. ضریب همبستگی مرحله نیمه کمی و مرحله غربال ثانویه بسیار نزدیک به هم بوده و این می‌رساند که نتایج برآمده به قدری دقیق بوده که حتی می‌توان گفت نیازی به انجام روش تاییدی نبوده است؛ به عبارتی دیگر اگر چه شاخص قطر هاله یک روش نیمه کمی است، اما نتایج برگرفته از روش کمی کاملاً با آن مطابقت می‌کند. منحنی توزیع فراوانی کل جهش‌یافتگان به دست آمده در حالت تمام شماتیک یک منحنی ناقوسی شکل است. در نمودارهای شکل ۴ و ۵ توزیع فراوانی جهش‌یافتگان منفی با شاخص قطر هاله کمتر از باکتری والد و توزیع فراوانی کلونی‌های بدون جهش نشان داده نشده است. این کلونی‌ها در همان مرحله اول از غربال‌گری حذف شده و میزان تولید آنزیم در آن‌ها سنجش نشده است. بنابراین، توزیع فراوانی مشاهده شده در مورد جهش‌یافتگان، فقط متعلق به فراوانی جهش‌یافتگان مطلوب است که دقیقاً پس از باکتری والد و با میزان تولید بیشتر در نمودارهای شکل ۴ و ۵ مشخص شده‌اند.

جدول ۱- مقادیر آنزیم گزیلاناز تولید شده از میکروارگانیسم‌های مختلف

نام محقق	سال	نام میکروارگانیسم	تولید گزیلاناز (IU/mL)
البیورا و همکاران ^۶ (۳۱)	۲۰۰۶	<i>Penicillium janthineum</i> CRC 87M-115	۵۴/۸
پورنا و همکاران ^۷ (۲۶)	۲۰۰۶	<i>Bacillus pumilus</i>	۵۰۰
کاپورو همکاران ^۸ (۲۷)	۲۰۰۸	<i>Bacillus pumilus</i> سویه MK001	۱۳۰۰
ینگو همکاران ^۹ (۷)	۱۹۹۵	<i>Bacillus v1-4</i>	۵۲
کوردیرو و همکاران ^{۱۰} (۳۰)	۲۰۰۲	<i>Bacillus thermoglucosidasius</i>	۱۷
اخوان سپهی و همکاران ^{۱۱} (۲۱)	۲۰۱۱	<i>Bacillus mojavensis</i>	۳۰۲/۴۶۶
سریدوی و همکاران ^{۱۲} (۲۸)	۲۰۱۱	<i>Trichoderma</i> sp CDC-140	۴۹۵
پورسوکو همکاران ^{۱۳} (۲۳)	۲۰۱۳	<i>Streptomyces</i> Sp. CA24	۲۵۵
آنامالی و همکاران ^{۱۴} (۳۳)	۲۰۰۹	<i>Bacillus subtilis</i>	۲۳۸
دوبودی و همکاران ^{۱۵} (۴)	۲۰۰۹	<i>Penicillium oxalicum</i> سویه جهش یافته SAUE-3.510	۴۸۸/۵
تحقیق حاضر	۲۰۱۳	<i>Bacillus mojavensis</i> جهش یافته شماره ۱۷	۳۳۰/۵۶

جهش یافته RH12 با تولید آنزیم به مقدار ۱۷۲/۳۱ IU/mL شد که افزایش ۱/۶۵ برابری را نسبت به قارچ وحشی نشان داد. سپس، آن‌ها توانستند آنزیم گزیلاناز تولید شده را ضمن بهینه سازی ترکیبات محیط کشت و شرایط تخمیری در نهایت به ۲۸۹/۸۶ IU/mL برسانند که ۲/۷ برابر نسبت به میزان اولیه افزایش تولید داشت (۵). در گزارشی دیگر در سال ۲۰۰۹ تولید گزیلاناز و سلولاز از قارچ والد نروسپورا کراسا^{۲۰} توسط محققانی چون رحیم و همکارانش^{۲۱} بررسی شد. این محققان با به کار گیری روش جهش‌زایی کلاسیک و به کار بردن عواملی نظیر اشعه فرابنفش با طول موج ۲۵۴ نانومتر به یک سویه جهش یافته دست یافتند که اگر چه توانایی بیشتری در تولید این دو آنزیم را دارد اما این افزایش تولید در مقایسه با سویه والد خیلی چشمگیر نبود (۳۴). همچنین، محققان از این روش‌ها در بالا بردن میزان تولید دیگر آنزیم‌های با ارزش صنعتی و بیوتکنولوژیکی نظیر پروتئازها (۱۳)، لیپاز (۲۰)، آمیلازها (۱۲-۱۵ و ۳۵) سلولازها (۱۰، ۳۴ و ۳۶-۳۹)،

از طرفی برخی دیگر نظیر آنچه در جدول شماره ۱ و مثال‌های زیر عنوان شده است با ایجاد جهش در سویه‌های میکروبی سعی در بالا بردن میزان تولید داشتند (۴). بر اساس گزارش تاسنیم و همکارانش^{۱۶} در سال ۲۰۰۳ تولید گزیلاناز از *آسپرژیلوس نایجر* سویه جهش یافته GCBCX-20، طی روش‌های جهش‌زایی با مواد شیمیایی به حدود ۲۰۰ IU/mL افزایش یافت، که توانسته بود ۱/۷ برابر بیش از سویه والد آنزیم تولید کند (۲). در تحقیقی مشابه در سال ۲۰۱۱ عبدال عزیز و همکارانش^{۱۷} توانستند با به کار گیری اشعه فرابنفش با طول موج ۲۵۴ نانومتر به سویه ای جهش یافته از *Streptomyces pseudogriseolus* دسترسی یابند که بتواند گزیلاناز را تا ۱۶۰ درصد بیش از سویه والد تولید کند (۱۱). همچنین، در بررسی که توسط اکرام الحق و همکارانش^{۱۸} در سال ۲۰۰۸ انجام شد نتایج برآمده در روند افزایش تولید آنزیم پس از تیمار قارچ *آسپرژیلوس نایجر* با جهش‌زای شیمیایی نیتروزوگوانیدین^{۱۹} بسیار کارآمد گزارش شد؛ زیرا منجر به جداسازی سویه

References

- (1) Korbekandi H, Darkhal P, Hojati Z, Abedi D, Hamed J, Pourhosein M. Overproduction of Clavulanic Acid by UV mutagenesis of *Streptomyces clavuligerus*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 2010; 9 (2): 177-81.
- (2) Tasneem M, Khan A, Ashraf H, Haq I. Xylanase Biosynthesis by chemically mutated strain of *Aspergillus niger*. *Journal of Food Technology* 2003; 1 (4): 178-81.
- (3) Coman G and Bahrim G. Minimizing cellulase biosynthesis from cellulase-free xylanase production with *Streptomyces* ssp. P12-137 using optimization by response surface methodology. *Cellulose chemistry and technology* 2011; 45 (3-4): 245-50.
- (4) Dwivedi P, Vivekanand V, Ganguly R, Singh R P. Parthenium sp. as a plant biomass for the production of alkalitolerant xylanase from mutant *Penicillium oxalicum* SAUE-3.510 in submerged fermentation. *Biomass & Bioenergy* 2009; 33: 581-8.
- (5) HAQ I, Hussain R, Hameed U, and Javad M. Selection of *Aspergillus niger* mutant using antimetabolite 2-deoxy D-glucose after N-methyl N-nitro N-nitroso guanidine (MNNG) treatment. *Pakistan Journal of Botany* 2008; 40 (6): 2613-23.
- (6) Sa-Pereira P, Mesquita A, Duarte JC, Aires Barros MR, Costa-Ferreira M. Rapid production of thermostable Cellulase-free xylanase by a strain of *Bacillus subtilis* and its properties. *Enzyme and Microbial Technology* 2002; 30: 924-33.
- (7) Yang VW, Zhuang Z, Elegir G, Jeffries TW. Alkaline-active xylanase produced by an alkaliphilic *Bacillus* sp isolated from Kraft pulp. *Journal of Industrial Microbiology* 1995; 15: 434-41.
- (8) Guimarães NCA, Sorgatto M, Peixoto-Nogueira SC, Betini JHA, Zanoelo FF, Marques MR, Polizeli MLTM, and Giannesi GC. Xylanase production from *Aspergillus japonicus* var *aculeatus*: Production using Agroindustrial Residues and Biobleaching Effect on Pulp. *Journal of Biocatalysis and Biotransformation* 2013; 2 (1): 1-6.

پولولاناز (۴۰)، کیتیناز (۱۸)، ال-آسپاراژیناز (۴۱) و سایر آنزیم‌های با ارزش از جهش کلاسیک بهره جسته اند. گرایش در استفاده از این روش‌ها در بالا بردن تولیدات میکروبی با ارزش دیگر نظیر اسید کلاوولانیک (۱)، ملانین (۴۲)، استوئین (۱۹)، باسیتراستین (۴۳)، بیواتانل (۱۶)، تولید زایلیتول و اتانل (۴۴) و دیگر متابولیت‌های ضد میکروبی نیز مشاهده می‌شود (۴۵).

همان‌گونه که در جدول شماره ۱ مقایسه شده است، سویه جهش یافته باسیلوس موجاونسیس شماره ۱۷ با تولید آنزیم ۳۳۰/۵۶ IU/mL قابلیت بالایی برای استفاده در فرایندهای تجاری دارد. هدف از این مراحل رسیدن به جهش یافته پرتولید بوده تا با اعمال فرایند بهینه‌سازی شرایط تخمیر و ترکیبات محیط کشت بتوان میزان تولید آنزیم را بیش از پیش بالا برد. بنابراین، پرتولیدترین جهش یافته (جهش یافته شماره ۱۷) انتخاب شده تا برای انجام مراحل بعدی تحقیقات از آن استفاده شود و میزان تولید آنزیم بالاتر رود.

تشکر و قدردانی

به این وسیله از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران بابت تهیه امکانات و تجهیزات لازم برای انجام این پروژه صمیمانه سپاسگزاری می‌شود. همچنین، از سرکار خانم سپیده شکری به دلیل همکاری‌های ارزنده‌شان در انجام آزمایش‌ها تشکر و قدردانی ویژه می‌شود.

- (9) Terrasan CRF, Temer B, Sarto C, Silva Junior FG, Carmona EC. Xylanase and B-Xylosidase from *Penicillium janczewskii*: Production, Physico-chemical Properties, and application of the crude extract to pulp Biobleaching. *BioResources* 2013. 8 (1): 1292-305.
- (10) Muhammad M.J, Haq I, Irfana M. Multistep mutagenesis for the over-expression of cellulase in *Humicola insolens*. *Pakistan Journal of Botany* 2011; 43 (1): 669-77.
- (11) Abdel-Aziz MS, Talkhan FN, Fadel M, AbouZeied AA, and Abdel-Razik AS. Improvement of xylanase production from *Streptomyces Pseudogriseolus* via UV mutagenesis. *Australian Journal of Basic & Applied Sciences* 2011; 5 (5): 1045-50.
- (12) HAQ I, Ali S, Javed MM, Hameed U, Saleem A, Adnan F, et al. Production of alpha amylase from a randomly induced mutant strain of *Bacillus amyloliquefaciens* and its application as a desizer in textile industry. *Pakistan Journal of Botany* 2010; 42 (1): 473-84.
- (13) Nadeem M, Qazi JI, Baig SH. Enhanced production of alkaline protease by a mutant of *Bacillus licheniformis* N-2 for dehairing. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 2010; 53 (5): 1015-25.
- (14) Abo-State M.A.M, Ghaly M.F, and Abdellah E.M. Optimization of Cellulase (s) and Xylanase Production by Thermophilic and Alkaliphilic *Bacillus* Isolates. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences* 2013; 13 (4): 553-64.
- (15) Azin M, Noroozi E. Random mutagenesis and use of 2-deoxy-D-glucose as an antimetabolite for selection of α -amylase-overproducing mutants of *Aspergillus oryzae*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 2001; 17: 747-50.
- (16) Zarif B, Azin M, Amirmozafari N. Increasing the bioethanol yield in the presence of furfural via mutation of a native strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *African Journal of Microbiology Research* 2011; 5 (6): 651-6.
- (17) Thein A, Prathuangwong S. Novel strains of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* UV mutated induce systemic resistance in rice against bacterial leaf blight disease. *Kasert Journal (Natural Science)* 2010; 44: 1026-43.
- (18) Aly MM, Tork S, Alakilli SY. Molecular characterization of chitinolytic *Bacillus pumilus* isolated from marine habitats and enhancement of chitinase production by mutation. *Universal scholar in Biotechnology* 2011; 1 (2): 14-21.
- (19) Xu H, Jia SH, Liu J. Development of a mutant strain of *Bacillus subtilis* showing enhanced production of acetoin. *African Journal of Biotechnology* 2011; 10 (5): 779-88.
- (20) Tehreema I, Mubashir N, Seyed Qaiser A, Muhammad AZ, Iffat A, Kyejoon L, et al. Mutation induced enhanced biosynthesis of lipase by *Rhizopus oligosporus* var. *microsporus*. *Pakistan Journal of Botany* 2010; 42 (2) :1235-49.
- (21) Akhavan Sepahi A, Ghazi SH, Akhavan Sepahi M. Cost effective production and optimization of alkaline xylanase by indigenous *Bacillus mojavensis* AG137 fermented on agricultural waste. *Enzyme Research* 2011; 10 (11): 1-9.
- (22) Khandepakar RDS, Bhosle NB. Isolation, Purification and characterization of the Xylanase produced by *Arthrobacter* sp. MTCC5214 when grown in solid state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* 2006; 39: 732-42.
- (23) PORSUK I, ÖZAKIN S, BALI B, İNCE YILMAZ E. A cellulase-free, thermoactive, and alkali xylanase production by terrestrial *Streptomyces* sp. CA24. *Turkish Journal of Biology* 2013; 37: 370-5.
- (24) Bailey M J M, Biely P, Poutanen k. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology* 1992; 23: 257-70.

- (25) Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Annual Chemistry* 1959; 31 (3): 426-8.
- (26) Poorna CA, Prema P. Production and partial characterization of endoxylanase by *Bacillus pumilus* using agro industrial residues. *Biochemical Engineering Journal* 2006; 33: 106-12.
- (27) Kapoor M, Nair LM, Kuhad RC. Cost-effective xylanase production from free and immobilized *Bacillus pumilus* strain MK001 and its application in saccharification of *Prosopis juliflora*. *Biochemical Engineering Journal* 2008; 38: 88-97.
- (28) Sridevi B and Charya MAS. Isolation, identification and screening of potential cellulase free xylanase producing fungi. *African Journal of Biotechnology* 2011; 10 (22): 4624-30.
- (29) Gupta G, Sahai V, Gupta RK. Optimization of xylanase production from *Melanocarpus albomyces* using wheat straw extract and it's scale up in stirred tank bioreactor. *Indian Journal of Chemical Technology* 2013; 20:282-9.
- (30) Sugumaran KR, Kiran Kumar B, Mahalakshmi M, Ponnusami V. Cassava bagasse- Low cost substrate for thermotolerant xylanase production using *Bacillus subtilis*. *International Journal of Chemical Technology Research* 2013; 5 (1): 394-400.
- (31) Oliveira LA. Production of xylanase and protease by *Penicillium janthinellum* CRC 87M-115 from different agricultural wastes. *Bioresource Technology* 2006; 97: 862-7.
- (32) Cordeiro CAM, Martins MLL, Luciano AB, Da Silva RF. Production and properties of xylanase from thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 2002. 45 (4): 413-8.
- (33) Annamalai N, Thavasi R, Jayalakshmi S, Balasubramanian T. Thermostable and alkaline tolerant xylanase production by *Bacillus subtilis* isolated from marine environment. *Indian Journal of Biotechnology* 2009; 8: 291-7.
- (34) Rahim T, Ray AL, Beauty SP, Gomes DJ. Induction of mutation in *Neurospora crassa* with Ultraviolet radiation and evaluation of cellulase and xylanase activities. *Bangladesh Journal of Boiology* 2009; 38 (2): 201-3.
- (35) HAQ I, Ali S, Saleem A, and Javed MM. Mutagenesis of *Bacillus licheniformis* through ethyl methanesulfonate for Alha amylase production. *Pakistan Journal of Botany* 2009; 41 (3): 1489-98.
- (36) Kotchoni S, Gachmo EW, Omafuvbe BO, Shonukan OO. Purification and biochemical characterization of carboxymethyl cellulose (CMCase) from a catabolite repression insensitive mutant of *Bacillus pumilus*. *International Journal of Agriculture and Biology* 2006; 8 (2): 286-92.
- (37) Li XH, Yang HJ, Roy B, Park EY, Jiang LJ, Wang D, et al. Enhanced cellulase production of the *Trichoderma viride* mutated by microwave and ultraviolet. *Microbiological Research* 2009; 10:1-10.
- (38) Hao XC, Yu XB, Yan ZL. Optimization of the medium for the production of cellulase by the mutant *Trichoderma reesei* WX-112 using response surface methodology. *Food Technology and Biotechnology* 2006; 44 (1): 89-94.
- (39) Reddi Pradeep M and Narasimha G. Utilization of pea seed husk as a substrate for cellulase production by mutant *Aspergillus niger*. *Insight Biotechnology* 2011; 1 (2): 17-22.
- (40) Nair SU, Singhal RS, Kamat MY. Enhanced production of thermostable Pullulanase type 1 using *Bacillus cereus* FDTA 13 and its mutant. *Food Technology and Biotechnology* 2006; 44 (2): 275-82.
- (41) Amena S, Lingappa K, Prabhakar M, Vishalakshi N. Production of L-Asparaginase by strain improvement and whole-cell immobilization of *Streptomycesgulbargensis*. *Journal of the Renin Angiotensin Aldosterone System* 2012; 27: 93-8.

- (42) Abdel Latif HAM, Abdel Fatah MR, Sabbour MM, El-Sharkawey AZ, El-sayed RS. Genetic modification of *Bacillus thuringiensis* var *Kurstaki* HD-73 to overproduce melanin, UV resistance and their insecticidal potentiality against potato tuber moth. *International Journal of Academic Research* 2010; 2 (6): 73-81.
- (43) Aftab MN, Haq I , Baig SH. Enhanced production of bacitracin by a mutant strain *Bacillus licheniformis* UV-MN-HN-8 (Enhanced bacitracin production by mutagenesis). *Pakistan Journal of Botany* 2010; 42 (3): 2095-103.
- (44) Usama F, Ali, Zeinab M, Ibrahim, and Georg S, Isaac. Ethanol and Xylitol Production from Xylanase Broth of *Thermomyces Lanuginosus* Grown on Some Lignocellulosic Wastes using *Candida tropicalis* EMCC2. *Life Science Journal* 2013; 10 (1): 968-78.
- (45) Radha Krishna E, Shamsher Kumar P, Veerendra Kumar B. Strain improvement of selected strain *Bacillus subtilis* (MTCC No.10619) for enhanced production of antimicrobial Metabolites. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research* 2011; 1 (3): 32-8.

¹- Ultra Violet Light

²- PTCC: Persian Type Culture Collection

³- Xylanase

⁴- Fluka

⁵-H/C: Hallow zone diameter/ Colony diameter

⁶- Oliveira et al

⁷- Poorna et al

⁸- Kapoor et al

⁹- Yang et al

¹⁰- Cordeiro et al

¹¹- Akhavan Sepahi et al

¹²- Sridevi et al

¹³- porsuk et al

¹⁴- Annamali et al

¹⁵-Dwiwdei et al

¹⁶- Tasneem et al

¹⁷- Abdel-Aziz et al

¹⁸- Haq et al

¹⁹- Nitrosoguanidine

²⁰- *Neurospora crassa*

²¹- Rahim et al

Over production of xylanase from *Bacillus mojavensis* by classical mutagenesis

Shokoofeh Ghazi*

Ph.D student of Microbiology, Science and Research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, shokoofeh.ghazi@gmail.com

Mehrdad Azin

Associated Professor of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science & Technology, Tehran, Iran, azin@irost.org

Abbas Akhavan Sepahi

Associated professor of Microbiology, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran, akhavansepahy@gmail.com

Abstract

Introduction: Over production of xylanase, enzyme from microbial resources was always considered by researchers. The present study was conducted to evaluate the effects of inductive mutagenesis, classical type, on enhanced xylanase production from *Bacillus mojavensis* in order to access to potent mutants with high capacity of production.

Materials and methods: *Bacillus mojavensis* PTCC²⁰ 1723, by proving its potentiality to produce xylanase, was used as a wild strain for over production of the enzyme by classical mutagenesis. After using mutagens such as UV and nitrous acid, screening of different mutants was accomplished. Initial screening was based on the enhanced H/C²¹ ratios of the colonies in comparison with that of the wild strain on xylan containing agar medium.

Results: Among numerous screened colonies, seventy two mutants with H/C ratio bigger than the parental strain, ($H/C \geq 1.6$), were isolated. At the next step, enzyme production of mutants was compared with that of the parental strain in liquid cultures. Overall, among 67 screened mutants, 2 mutants, which produced 319.58 and 330.56 IU/mL xylanase, were selected. These mutants produced 3.3 & 3.45 times more enzyme than the native strain, with preliminary production level of 95.73 IU/mL.

Discussion and conclusion: These mutants, as superior ones & resulted from the classical mutagenesis, were selected as the best strains.

Key words: *Bacillus mojavensis*, Xylanase, Random mutagenesis, UV rays, Nitrous acid

* Corresponding author

Received: April 27, 2013 / **Accepted:** January 14, 2014