مقاله پژوهشی مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان دوره هشتم، شماره چهارم، زمستان ۱۳۸۸، ۳۱۳–۳۰۳

تعیین خصوصیات سویه بومی گونه باسیلوسی مولد آنزیم آلفا آمیلاز مقاوم به دما

ایرج رسولی ۱، سید لطیف موسوی گرگری^۲، رحیم سروری زنجانی^۳، شکیبا درویش علیپور آستانه ⁴

دريافت مقاله: ۸۷/۱۱/۲۹ ارسال مقاله به نويسنده جهت اصلاح: ۸۸/٤/۲۳ دريافت اصلاحيه از نويسنده: ۸۸/۸/۷ پذيرش مقاله: ۸۸/۸/۱۳

چکیده

زمینه و هدف: آنزیم آلفا آمیلازهای مقاوم به دما کاربردهای تجاری وسیعی در فرآوری نشاسته، تخمیر و تهیه محصولات کربوهیدراتی دارد و جایگزین هیدرولیز شیمیایی نشاسته در فرآوری صنعتی شده است. هدف خصوصیات سویه بومی گونه باسیلوس مولد آنزیم آلفا آمیلاز مقاوم به دما بوده است.

مواد و روشها: در این مطالعه آزمایشگاهی باسیلوس جدا شده با نام B.licheniformis shahed-07 با استفاده از روشهای بیوشیمیایی شناسایی شد. این باسیلوس در محیط مایع برای تولید آلفا آمیلاز کشت داده شد. محیطهای تولید آنزیم با استفاده از منابع مختلف کربنی و نیتروژنی ارزیابی و محیط مناسب فرموله گردید. پایداری آنزیم تولیدی، پس از تخلیص نسبی آن، در برابر تغییرات دما، pH، فلزات یونی و عوامل کلاته کننده ارزیابی شد.

یافته ها: حداکثر میزان آنزیم، در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد و PH = V در طی ۲۶ ساعت تولید شد. با افرودن N-1 تریپتوفن به محیط کشت، میزان تولید آنزیم تا N-1 افزایش یافت در حالی که N-1 پپتون و لیزین به شدت موجب افت تولید شد. در مقایسه با آنزیم ناخالص، خلوص آنزیم نیمه تخلیص شده N-1 برابر و فعالیت آنزیمی آن N-1 برابر بود. این آنزیم در ژل الکترفورز Sodium Dodecyl Sulfate) SDS) با N-1 نشاسته تک باند با وزن مولکولی N-1 دالتون فعالیت آمیلولیتیکی نشان داد. فعالیت مطلوب آنزیم در ۷۰ درجه سانتی گراد و N-1 بود، این آنزیم همچنین در دامنه N-1 بین ۶ تا ۷ به مدت ۲۴ ساعت پایداری داشت. یون جیوه به طور کلی بازدارنده فعالیت آنزیم بوده و یـونهـای منگنـز، آهن، کبالت و کلسیم سبب افزایش فعالیت آن شدند.

نتیجه گیری: سویه B.licheniformis Shahed-07 سطح مطلوبی از آلفا آمیلاز مقاوم به دما، متناسب با ویژگی های مورد نیاز فرآوری نشاسته و صنایع غذایی تولید می کند. فرآیند تولید، بعد از بهینه سازی، می تواند در سطح تجاری مطرح شود. واژه های کلیدی: باسیلوس لیکنی فرمیس، آلفا آمیلاز، بهینه سازی، محیط تولید

۱- (نویسنده مسئول) استاد گروه آموزشی زیستشناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد تهران تلفن: ۱۲۱۲۹۰، دورنگار: ۵۱۲۱۲۹۰۱، پست الکترونیکی: rasooli@shahed.ac.ir

۲- دانشیار گروه آموزشی زیستشناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد تهران

۳- استادیار گروه آموزشی میکروبشناسی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...

٤- كارشناس ارشد گروه أموزشي زيستشناسي، دانشكده علوم پايه، دانشگاه شاهد تهران

مقدمه

آمیلاز از جمله مهمترین آنزیمهایی است که در بیوتکنولوژی نوین اهمیت قابل توجهی دارد. این آنزیم حدوداً ۲۵٪ بازار جهانی آنزیمهای تجاری را به خود اختصاص داده [۲-۱] و جایگزین هیدرولیز شیمیایی نشاسته در فرآوری صنعتی شده است [۳]. اگرچه بسیاری از گیاهان، جانوران و میکروارگانیسمها توانایی تولید آنزیم آمیلاز را دارند، ولی این آنزیم با منشاء میکروبی مصارف صنعتی داشته و در زمینههای بالینی، دارویی، شیمی تجزیه و در فرآوری نشاسته، تخمیر و تهیه محصولات کربوهیدراتی کاربردهای وسیعی دارد. همچنین در تولید شربت گلوکز، صنایع نساجی، تخمیر و صنایع غذایی حائز اهمیت است. علاوه بر این در تهیه خوراک دام، غذا، داروسازی و مواد پاک کننده استفادههای متنوعی دارد

مقاومت در برابر دما، از ویژگیهای مطلوب برای آننزیمهای صنعتی محسوب می شود. هم اکنون آلفا آمیلازهای مقاوم به دما گونه مزوفیل B. licheniformis و دو گونیه باسیلوس (۱۵-۱۵ هم ۱۹۳۱) و این الفا همالی همالی الفا همالی الفا همالی الفا همالی الفا همالی همالی الفا همالی همالی در طیف وسیعی از ارگانیسمها از جمله گیاهان، انزیمی در طیف وسیعی از ارگانیسمها از جمله گیاهان، قارچها و باکتریها وجود دارد [۹]. در این بین، جنس باسیلوس طیف وسیعی از آنزیمهای خارج سلولی شامل پروتئاز و آمیلاز را تولید می کنند که کاربرد مهمی در صنعت دارند. از جمله ویژگی آنها می توان به کاهش در هزینه خنک کنندهها، حلالیت بهتر سوبسترا و کاهش ویسکوزیته که هم زدن نمونه و پمپاژ آن را تسهیل کرده و خطر آلودگی را کاهش می دهد، اشاره کرد. در درجه حرارت بالا (۱۱۰–۱۰۰ سانتی گراد) نشاسته ژلهای شده و با تجزیه به وسیله آلفا آمیلاز در دمای ۴۰–۸۰ سانتی گراد

با صرف هزینه کمتری ذوب می گردد. بنابراین جستجوی آلفا آمیلازهای مقاوم به دما و یا ترموفیل ضروری است [۲]. با فرض بر این که هیچ نوع انتخاب طبیعی برای آنزیمهایی که در دماهای بالا فعال هستند در محیط طبیعی وجود ندارد و با وجود منبع طبیعی آلفا آمیلاز مقاوم دمایی در باسیلوس لیکنیفرمیس، این باکتری به عنوان یک ارگانیسم مزوفیل، مورد توجه قرار می گیرد. زیرا آنزیمهای مقاوم دما معمولاً ثبات بیشتری داشته و در درجه حرارت معمولی فعالیت کمتری دارند و درجه حرارت مطلوب آنزیم معمولاً به درجه حرارت رشد ارگانیسم تولیدکننده بستگی دارد [۱۰].

هدف اصلی برای آنزیمهای مهم صنعتی، غربال گری گونههای جدید از باکتریهای تولیدکننده آمیلاز است که در تکنولوژی صنعتی مدرن مورد استفاده باشند و هر یک از این موارد با ویژگی منحصر به فرد به اختصاصی بودن شرایط، پایداری، درجه حرارت و pH وابسته است. غربال کردن میکروارگانیسمهای مولد آلفا آمیلاز میتواند دستیابی به آمیلازهای با صفات متنوع را تسهیل کند. در این مقاله غربال گری، شناسایی و شرایط تولید آلفا آمیلاز میگیرد. مقاوم به دما در گونهای از باسیلوس بومی مورد توجه و بحث قرار می گیرد.

مواد و روشها

در این مطالعه آزمایشگاهی Shahed-07 در این مطالعه آزمایشگاهی که سویهای از باکتری مقاوم به دما است در دانشگاه شاهد غربال گری شد. سوسپانـسیون خاک در سـرم فیزیولـوژی رقیق شده و در محیط شـماره (۱) شـامل ۲٪ پپتـون، ۱٪ عصاره مخمر، ۱٪ کلرید سدیم، ۱٪ نشاسته و ۲٪ آگـار بـا pH برابر ۷ در سطح محیط گسترش داده و در حرارت ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت گرماگذاری شد. بعـد از مشاهده کلنی، باکتری از محیط شـماره (۱) بـه محـیط

شماره (۲) محتوی محلول نشاسته ۱٪، عصاره مخمر ۲/۰٪، پپتون ۰٪، سولفات منیزیوم ۰٪، کلرید سدیم ۰٪، کلرید کلید کلرید کلییم ۲٪، آگار ۲٪ و pH برابر ۷ انتقال داده شد. این کشتها نیز در ۵۵ درجه سانتی گراد برای ۴۸ ساعت گرماگذاری شد. مشخصات ظاهری و مرفولوژیکی کلنیها به گونههای باسیلوس مشابه بود. کلنیهای مولد آمیلاز به کمک معرف لوگل شناسایی شدند. سویه غربال شده از نظر مورفولوژیکی و به کمک آزمایشات بیوشیمیایی مورد شناسایی قرار گرفت.

محیط تولید آنزیم: محیط پایه شامل محلول نشاسته ۱۰، مالتوز ۱٪، سولفات آمونیم ۲۰٪، کلرید کلسیم ۱۰، مول، کلرید منیزیم ۲۰۰٪، دی پتاسیم هیدروژن فسفات ۱۰ مول در ۲۹ و به سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه استریل شد. در فلاسکهای ۵۰۰ میلیلیتری که شامل ۱۰۰ میلیلیتر محیط کشت است، میلیلیتری که شامل ۱۰۰ میلیلیتر محیط کشت است، به میزان ۱٪ از کشت ۱۸ ساعته تلقیح و در حرارت ۵۵ درجه سانتی گراد (به استثنای آزمایشهایی که برای تعیین درجه حرارت مناسب انجام شد) در ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۱۴۴ساعت گرماگذاری شد. نمونهها ۳ بار (به فاصله ۲ ساعت) سانتریفوژ گردیدند. سلول ها به کمک سانتی گراد رسوب داده شدند و محلول رویی برای بررسی سنجش آنزیم مورد استفاده قرار گرفت.

بهینهسازی محیط کشت و شرایط رشد باکتری: در ابتدا ارگانیسم در یک محیط پایه مایع با pH برابر ۷، در ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ تا ۹۶ ساعت گرماگذاری شد. برای مطالعه تأثیر منبع نیتروژن، به محیط پایه شامل (وزنی/حجمی) محلول ۱٪ نشاسته، هر یک از منابع نیتروژن آلی و معدنی شامل تریپتون، پروتئازپپتون و عصاره مخمر با غلظت (وزنی/حجمیی) ۸۰/۸ افروده شد.

همچنین تأثیر تغییرات دامنه pH بین ۵ تا ۱۰ و درجه حرارت از ۳۰ تا ۱۰۰ درجه سانتی گراد در تولید آلفا آمیلاز باکتری مورد بررسی قرار گرفت. در تمامی موارد، از یک کشت ۱۸ ساعته به میزان (حجمی/حجمی) ۲٪ به فلاسکهای ۵۰۰ میلی لیتری که شامل ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت بود، تلقیح شد. کشتها در دوفاز، لرزشی با محیط کشت بود، تلقیح شد. کشتها در دوفاز، لرزشی با کما دور در دقیقه و هیمچنین در حالیت سیکون گرماگذاری شدند. تولید آنزیم برحسب میزان رشد باکتری در فواصل زمانی ۲ ساعت، به کمک اندازه گیری کدورت نسبی در ۴۰۰ نانومتر و تعیین وزن خشک توده سلولی مورد بررسی قرار گرفت.

تخلیص نسبی آمیلاز: مایع رویی محیط کشت مایع، بعد از سانتریفیوژ در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه به کمک سولفات آمونیوم در دامنه غلظتی ۶۰–۴۰٪ تغلیظ شد، بعد از سانتریفیوژ در ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵دقیقه، رسوب حاصل در بافر فسفات ۱۰۰ میلیمول با PH حل شد.

سنجش غلظت پروتئین: غلظت پروتئین آنزیم به روش Loury اندازگیری [۱۱] و با استفاده از سرم آلبومین به عنوان استاندارد، محاسبه شد.

سنجش آلفا آمیلاز: فعالیت آلفا آمیلاز به کمک واکنش زیر مورد بررسی قرار گرفت: ۵۰ میکرولیتر محلول رویی کشت به انضمام ۴۵۰ میکرولیتر بافر Tris – HCl با برابر ۵۰۰ و ۵۰۰ میکرولیتر محلول ۱٪ وزنی/حجمی به نشاسته تهیه شد. بعد از گرماگذاری واکنش فوق در ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ دقیقه، واکنش آنزیمی به کمک افزودن ۲ میلیلیتر معرف ۵۰۳ دی نیتروسالیسیلیک اسید متوقیف شد [۱۲] و جدب نوری به کمک اسیکتروفتومتر (Biofuge) واحد فعالیت آنزیمی ازیمی کانومتر اندازگیری گردید. (یک واحد فعالیت آنزیمی الانومتر اندازگیری گردید. (یک واحد فعالیت آنزیمی (U)

برابر مقدار آنزیمی است که بتواند ۱ میکرومول قند احیاء شده را در ۱ دقیقه از انتهای مولکول نشاسته آزاد سازد).

الكترفورز SDS-PAGE: براى تشخيص هموژن بودن و وزن مولکولی آنزیم تغلیظ شده، از ژل ۱۰٪ آکریلآمید به علاوه ۰/۲٪ نشاسته در ژل پایینی و قبل از اضافه کردن يرسولفات آمونيوم استفاده شد [۷]. بعد از الكترفورز، ژل به مدت ۱ ساعت با کوماسی بلو R250 در محلول متانول -اسید استیک – آب به نسبت حجمی ((4-1-4)) رنگ آمیزی شد و سپس در همان محلول عمل رنگبری انجام گرفت. برای سنجش میزان فعالیت آمیلاز، SDS به کمک شستشوی ژل در درجه حرارت اتاق به روشی که در زیـر اشاره می شود، برداشته شد. ابتدا ژل را در محلول ۵۰ میلی،مولار دی سدیم فسفات، مونو سدیم فسفات با pH برابر ۷/۲ و ایزوپروپانول ۴۰٪ به مدت ۱ ساعت قـرار داده بعد از طی دوره انکوباسیون، ژل در بافر ۵۰ میلیمولار دی سدیم فسفات و مونو سدیم فسفات بـا pH برابـر ۷/۲ قـرار گرفت. در نهایت برای برگرداندن ساختار طبیعی و انجام فعالیت آنزیم، ژل به مدت ۱۸-۱۸ ساعت در محلول ۵۰ میلی مولار بافر سدیم فسفات با ۷/۲ pH به عالاوه بتامر کاپتواتانول به غلظت ۵ میلی مسولار و EDTA ۱ (Ethylene Diaminete Traacetic Acid) میلی مولار در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شد. بعد از طی مرحله انکوباسیون، ژل را به پلیت شیشهای انتقال داده و در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴ الی ۵ ساعت گرماگذاری انجام گرفت. بعد از طی زمان مورد نظر، ژل به کمک محلول یدین (۵ گرم در لیتر ید و ۵۰ گرم در لیتر یدیـد پتاسیم) به مدت ۳۰ دقیقه رنگ آمیزی شد. وجود باندهای شفاف، نشانه فعالیت آمیلاز و تجزیه نشاسته به کمک مولکول آنزیم بود. وزن مولکولی آنزیم در نهایت به کمک

نشانگر استاندارد مشخص شد. (SigmaM3788, 36, 45,). 55, 66, 84, 97, 116, 205 KDa

تأثیر pH بر میزان پایداری و فعالیت آنزیم: میزان pH مطلوب بر فعالیت آنزیم به کمک تغییرات pH در واکنش مطلوب بر فعالیت آنزیم به کمک تغییرات pH در واکنش سنجش آنزیمی [۱۲] با استفاده از بافرهای ۰/۱ مـولار در pH بین ۵ تا ۱۰ (۵/۵–۵–۵/۱ استات سـدیم/ اسـید اســتیک، pH =۷/۵–۸ بـافر فــسفات ســدیم، Glycin/NaOH بافر pH =۹-۱۰، Tris-HCl بررسـی بافر در تغیین میزان پایداری آنزیم در ابتدا محلول آنزیمی در بافرهای ۰/۱ مولار در دامنه pH بین ۵ تا ۱۰بـه مـدت در بافرهای ۰/۱ مولار در دامنه pH بین ۵ تا ۱۰بـه مـدت کر ساعت قرارگرفته و سـپس فعالیـت آنـزیم منطبـق بـر روش ذکر شده، سنجش شد.

تأثیر درجه حرارت روی پایداری و فعالیت آنزیم: درجه حرارت مطلوب آنزیم با اندازگیری فعالیت آلفا آمیلاز در بافر ۰/۱ مولار Tris هیدروکلرید با PH ۷/۵ در دامنه حرارتی بین ۳۰ تا ۱۰۰ درجه سانتی گراد بررسی شد. برای تعیین پایداری آنزیم در درجه حرارت مطلوب، فعالیت آن پس از ۲ ساعت انکوباسیون آنزیم در بافر ۰/۱ مولار Tris هیدروکلرید با PH ۵/۷، در دامنه حرارتی بین مولار ۳۰۱-۳۰ درجه سانتی گراد مورد بررسی قرار گرفت.

تأثیر فلزات یونی و عوامل کلاته کننده روی فعالیت آنزیم: برای بررسی تأثیر یونهای فلزی و عوامل کلاته کننده بر فعالیت آمیلاز، هر یک از یونها با غلظتی برابر ۲ میلیمول به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد در حضور آنزیم انکوبه شده، سپس فعالیت آنزیمی در درجه حرارت و pH مطلوب بررسی شد.

نتايج

مشخصات گونه باکتری: باسیلوس غربال شده با کمک انواع پارامترهای بیوشیمیایی مورد شناسایی قرار گرفت،

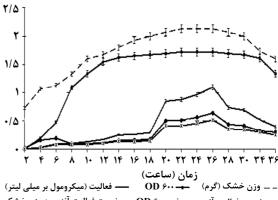
آزمایشات بیوشیمیایی مشابهت این سویه با باسیلوس لیکنی فرمیس را نشان داد (جدول ۱).

جدول ۱ - مقايسه مشخصات بيوشيميايي B.licheniformi Shahed-07 با مشخصات B.licheniformis استاندارد

مشخصات بيوشيميايي	B.lichenifor mis	Shahed-07	مشخصات بيوشيميايي	B.licheniformis	Shahed-07
اسپور کروی با موقعیت مرکزی	-	-	لیپاز(روغن زیتون)	d	+
کریستالهای پا را اسپورال	-	-	تشکیل گاز از نیترات	d	-
ט וזוע;	+	+	رشد در ۵= pH		+
رشد بیهوازی	+	+	نیاز به فاکتورهای رشد	-	-
VP تست	+	+	تولید اسید از فروکتوز		+
pH مايع PV (۶۶)	+	+	تولید اسید از گالاکتوز		+
PH ما يع VP (٧ <)	-	+	تولید اسید از گلیسرول		+
تولید اسید از D – گلوکز	+	+	تولید اسید از لاکتوز		_
تولید اسید از $- \mathbf{L}$ آرابینوز	+	+	تولید اسید از مالتوز		+
تولید اسید از D – مانیتول	+	+	تولید اسید از سوکروز		+
هيدروليز توئين ٨٠	+	+	استفاده از سیترات	+	=
هيدروليز اوره	=	+	تجزيه تايروزين	=	+
تشکیل گاز از گلوکز	(-) ^P	=	مصرف استات		+
هيدروليز كازئين	+	+	مصرف گليسرول		+
هيدروليز نشاسته	+	+	مصرف گلايسين		+
هيدروليز ژلاتين	+	+	مصرف مانيتول		+
رشد در کلراید سدیم ۲٪	+	+	مصرف تارتارات		+
رشد در کلراید سدیم ۵٪	+	+	رشد در PH ۶/۸	+	+
رشد در کلراید سدیم ۷٪	+	+	رشد در ۵/۷ pH	+	+
رشد در ۱۰ NaCl ٪	ND	=	هيدروليز أرژنين	+	+
دى آميناسيون فنيل آلانين	-	-	رشد در ۵ درجه سانتی گراد	-	-
تشكيل ايندول	=	=	رشد در ۱۰ درجه سانتی گراد	-	-
تشکیل دی هیدروکسی استون	ND	=	رشد در ۳۰ درجه سانتی گراد	+	+
احیاء نیترات به نیتریت	+	+	رشد در ۴۰ درجه سانتی گراد	+	+
نیازبه Nacl ,Kcl برای رشد	-	-	رشد در ۵۰ درجه سانتی گراد	+	+
دى كربوكسيلاسيون لايزين	=	+	رشد در ۵۵ درجه سانتی گراد	+	+
اكسيداز	d	+	رشد در ۶۵ درجه سانتی گراد	+	-

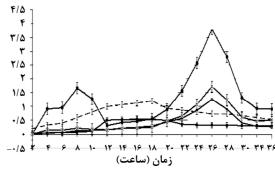
-= حداقل ۹۰٪ سویهها دارای جواب منفی، += حداقل ۹۰٪ سویهها دارای جواب مثبت، ND= تنایج تعیین نشده است. d = کمتر از ۹۰٪ پاسخ مثبت یا منفی دارند، d d d کمی تولید شده است. جاهای خالی= متغیر.

تولید آمیلاز: نتایج این مطالعات روی رشد سلول و ميزان توليد ألفا أميلاز در محيط پايهای شامل ١٪ نـشاسته بـه عنـوان القاءكننـده توليـد آنـزيم در سـويه B.licheniformis Shahed-07 در دو حالت لرزش و سكون در نمودارهای ۱ و ۲ نشان داده شده است. آزمایشات نشان داد که تولید آنزیم در B.licheniformis Shahed-07 هنگامی به حداکثر میزان خود میرسد که جمعیت توده سلولی در فلاسک لرزشی به حداکثر مقدار خود رسیده باشد (نمودار ۱). منحنی تولید آنزیم در فاز رکود رشد افزایش می یابد (نمودار ۲).



--- فعالیت (میکرومول بر میلی لیتر) بت فعالیت آنزیم به جذب ۶۰۰ OD -- نسبت فعالیت آنزیم به وزن خشک

نمودار ۱- روند تولید آلفا آمیلاز در فلاسکهای لرزشی

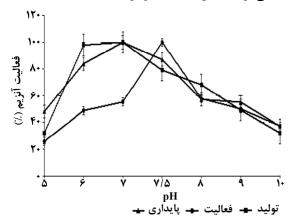


OD 9... --- فعالیت (میکرومول بر میلی لیتر) _ _ وزن خشک (گرم) ← نسبت فعالیت آنزیم به جذب ۶۰۰ OD حــ نسبت فعالیت آنزیم به وزن خشک

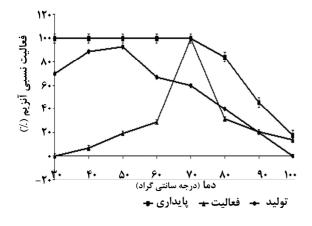
نمودار ۲- تولید آلفا آمیلاز در فلاسکهای راکد

pH بهینه سازی شرایط رشد باکتری: c_1 مرارت و مطلوب رشد و تولید آنزیم به ترتیب ۵۰ درجه سانتی گراد

و ۷ تعیین شد (نمودارهای ۳ و ۴). سویه مورد نظر در دامنه درجه حرارت مورد آزمایش به خوبی رشد داشت و بیشینه تولید آنزیم در گرماگذاری محیط کشت با درجه حرارت ۵۰ درجه سانتی گراد به دست آمد. ولی تولید آنزیم در درجه حرارت گرماگذاری بالای ۵۵ درجه سانتی گراد کاهش داشت (نمودار ۴).



نمودار ۳- تأثیر pH در تولید، پایداری و فعالیت آنزیم



نمودار ٤- تأثير دما در توليد، پايداري و فعاليت آنزيم

سويه B.licheniformis Shahed-07 در محيط پايـه شامل نشاسته محلول برای تولید آنزیم، کـشت داده شـد. تأثیر انـواع منبـع کـربن و نیتـروژن روی تولیـد آنـزیم در شرایط کشت بسته، در حالت لرزشی بررسی شد. بین کربوهیدراتهای تعریف شده، مالتوز و نشاسته رشدی ايرج رسولي و همكاران

خوب همراه با تولید آمیلاز را نشان دادند، تولید آنزیم به وسیله این سویه فقط در حضور نشاسته القاء می شود. نشاسته به نسبت ۲٪ حجمی روی تولید آنزیم تأثیر مثبت دارد و در این بین، بالاترین تولید آنزیم در حضور نشاسته ثبت شد. تریپتوفن میزان تولید آنزیم را تا ۲۰۲٪ در مقایسه با محیط پایه افزایش می دهد، در حالی که پپتون و

لایزین مهار کاتابولیکی قوی را نشان داده و تا سطح ۰/۵٪ تولید را کاهش میدهد.

ویژگیهای آلفا آمیلاز و بررسی پایداری آن: با خلوص نسبی حـدود ۳۲/۶۴ برابـر نسبی حـدود ۳۲/۶۴ برابـر افزایش یافت (جدول ۲).

جدول٢- مقايسه فعاليت آنزيم ناخالص و آنزيم نيمه خالص

نسبت آنزیم ناخالص/آنزیم نیمه تخلیص شده	آنزیم نیمه تخلیص شده	آنزيم ناخالص	مشخصات آنزیم
<u> </u>	ΨΥΥ/· λ	1	درصد فعالیت آنزیم
			(میکرومول برمیلیلیتر)
•/17	•/٢٣	7/• 7	ميزان پروتئين
			(میلیگرم بر میلیلیتر)
47/84	4784/48	1	درصد فعاليت اختصاصى

به کمک ژل الکترفورز SDS-PAGE محتوی ۲۰/۲٪ نشاسته، وزن مولکولی و هموژن بودن آنزیم تغلیظ شده، مشخص گردید و فعالیت آمیلازی آنزیم هموژن در ژل الکترفورز نیز نشان داده شد. وزن مولکولی این باند حدود ۶۰ کیلو دالتون است. مطالعه روی شناسایی آلفا آمیلاز در عصاره خام نشان داد که حداکثر فعالیت آن در pH برابر ۵/۷ و درجـه حـرارت ۷۰ درجـه سانتی گـراد است (نمودارهای ۴ و ۳). عصاره خام آنزیم به مدت ۲۴ ساعت در دامنه pH بین ۷-۶ در ۷۰ درجه سانتی گـراد پایـداری نشان می دهد (نمودار ۳). آنزیم در ۷۰ درجه سانتی گـراد پایـداری کاملاً پایدار است ولی در دمای ۸۰ و ۹۰ درجه سانتی گـراد

به ترتیب ۱۶٪ و ۵۴٪ فعالیت آن کاهش می یابد (نمودار ۴۰). فعالیت آنزیم در دامنه درجه حرارتی بین ۴۰ تا ۷۰ درجه سانتی گراد افزایش یافته و در دمای بالاتر از ۷۰ درجه سانتی گراد کاهشی در فعالیت آنزیم مشاهده می شود.

تأثیر فلزات یونی و بازدارنده ها: در بین فلزات مورد بررسی، جیوه اثر بازدارندگی بر فعالیت آنزیم دارد. ولی یونهایی همچون منگنز، آهن، کبالت و کلسیم سبب افزایش فعالیت آنزیم به ترتیب تا میزان ۳۲۳٪، ۲۲۳٪، ۱۴۹٪ و ۱۴۰٪ می شوند (جدول ۳).

ى فعاليت آنزيم آلفا آميلاز توليد شده توسط	جدول۳- تأثیر کاتیونهای فلزی بر روی
	B.licheniformis Shahed-07

درصد فعالیت آنزیم	كاتيون	درصد فعاليت آنزيم	كاتيون
1	شاهد	٣٢٣	منگنز
14.	كلسيم	٧۵	روی
١٠٨	منيزيم	۸۲	مس
777	آهن	49	نیکل
149	كبالت	•	جيوه

بحث

با شناسایی بیوشیمیایی باسیلوس غربال شده بومی، این سویه از باسیلوس به نام B.licheniformis Shahed-07 نام گذاری شد.

تولید آمیلاز: افزایش pH از ۵ تا ۷ محرکی برای تولید آنزیم است به طوری که در PH ۷ با بیشینه تولید آنزیم، رشد سلول نیز افزایش می یابد. بین پارامترهای فیزیکی، pH محیط کشت نقش مهمی در تغییرات مورفولوژیکی ارگانیسم و تولید آنزیم ایفا می کند. تغییر pH در طی رشد ارگانیسم بر روی پایداری آنزیم تولید شده مؤثر است. pH مطلوب رشد و تولید آنزیم در بیشتر سویههای باسیلوس که به طور تجاری برای تولید آلفا آمیلاز مورد استفاده قرار می گیرند، بین ۶ تا ۹ است [۱۳]. pH خنثی، برای تولید آنزیم در گونههای B.thermoolevorans NP54 [۱۴] B.subtilis [18] B.licheniformis [10] B.coagulans [۷] JS-2004 و PH نيز به عنوان pH مطلوب گزارش شده است. سویه B.licheniformis Shahed-07 نیز توانایی تولید آلفا آمیلاز و هیدرولیز نشاسته را داراست. آنزیم در درجه حرارت بین ۳۰ تا ۸۰ درجه سانتی گراد تولید میشود.

تأثیر درجه حرارت بر تولید آنزیم به رشد ارگانیسم وابسته است. دامنه وسیع درجه حرارت بین ۳۵ تا ۸۰ درجه سانتیگراد برای رشد مطلوب و تولید آنزیم در باکتریها گزارش شده است [۱۸]. سویهای از B.subtilis ترموفیلیک جداشده از شیر تازه گوسفند، در یک محیط با غلظت کم نشاسته در ۴۰ درجه سانتی گراد، بیشترین تولید ألفا أمیلاز مقاوم به دما خارج سلولی را داشت [۱۹]. غشای این جنس از باسیلوس تنوع وسیعی از آنزیمهای خارج سلولی را داراست که در این بین، اَمیلاز از نظر صنعتی مورد توجه قرار گرفته است. مشابه این گزارش در B.licheniformis و B.thermooleovorans NP54 Shahed-07 نيز نشان داده شده است به طوري که حد مطلوب درجه حرارت رشد و تولید آنزیم برای این سویهها ۵۰ درجه سانتیگراد است. آلفا آمیلاز سویه B.licheniformis Shahed-07 در ۲۶ ساعت به حداکثر تولید خود میرسد و پس از ۳۰ ساعت منحنی تولید انزیم سیر نزولی مییابد (نمودارهای ۱ و ۲). این در حالی است که میزان تولید آنزیم در سویه *B.subtilis* JS-2004 در زمان ۴۸ ساعت پس از رشد به حداکثر میرسد و پس از ۹۶ ساعت منحنی تولید آنزیم سیر نزولی می یابد. با رسیدن جمعیت توده سلولی در فلاسک لرزشی به حداکثر

مقدار خود، تولید آنزیم نیز به حد اکثر خود رسید (نمودار ۱). افزایش تولید آنزیم در فاز رکود رشد (نمودار ۲) به عبارتی نشان میدهد زمانی که سلولها به فاز رکود منحنی رشد برسند و دسترسی به سایر منابع کربن در محیط کشت برای آنها کاهش یابد، القاء آنزیم صورت می گیرد [۲۱–۲۰].

بهینهسازی شرایط رشد باکتری: آزمایشات نشان داده است که شرایط کشت، تأثیر مهمی بر تولید آنزیم آمیلاز دارد. هنگامی که جمعیت سلولی در محیط کشت به فاز رکود رشد خود میرسد، میزان تولید آنزیم افزایش مییابد. بنابراین، تولید آنزیم رابطهای با مراحل رشد میکروارگانیسم ندارد. تأثیر مثبت نشاسته به نسبت ۲٪ حجمی روی تولید آنزیم در این مطالعه نشاندهنده القایی بودن تولید آنزیم فقط در حضور نشاسته است. سبوس بودن تولید آنزیم فقط در حضور نشاسته است. سبوس نشاسته نشان میدهند. میزان تولید در مقایسه با نشاسته به طور ثابت تا ۸٪ افزایش یافته و بعد از آن منحنی سیر نزولی مییابد [۲۲].

تأثیر گلایسین، تریپتوفن، پپتون، تریپتون، لایبزین و عصاره مخمر در محیط کشت بر میزان تولید می تواند قابل توجه باشد. با افزایش میبزان تولید آنیزیم تا ۲۰۲٪ در حضور تریپتوفن، می توان نشاسته و تریپتون را به عنوان منبع کربن و نیتروژن مطلوب گزارش نمود [۲۳]. تولید آمیلاز در میکروارگانیسمهای مختلف به حضور یا عدم حضور منابع گوناگون نیتروژن و انواع اسید آمینه در محیط کشت وابسته است. منابع آلی نیتروژن همچون عصاره مخمر و پپتون، بر تولید آنزیم اثر تحریک کنندگی دارند [۲۵-۲۵]. در گونه Bacillus sp. WN11 در صورت

استفاده از پروتئاز پپتون و تریپتون به عنوان منبع نیتروژن، رشد بهتر و بالاترین تولید آنزیم در سطح فعالیت آنزیمی مشاهده شده است ولی در صورت استفاده از NO_3 , NH_4 , NO_4 و اوره به عنوان منبع نیتروژن هیچگونه رشدی مشاهده نشد. بنابراین نیازهای تغذیهای متفاوت انواع ارگانیسمها و سویههای میکروبی تولیدکننده آلفا آمیلاز میتواند به خصوصیت ژنتیکی آنها وابسته باشد.

ویژگیهای آلفا آمیلاز و بررسی پایداری آن: وزنهای مولکولی متفاوتی برای آنزیم آمیلاز درگونههای مختلف باسیلوس و دیگر گروههای میکروارگانیسم گزارش شده است. به طوری که در گونه stearothermophilus وزن مولکولی آنزیم در دامنه بین ۸۹-۵۹ کیلو دالتون [۲۶]، گونه Bacillus ANT-6 کیلو دالتون (۲۶ کیلو دالتون (۲۶ کیلو دالتون (۲۷ کیلو دالتون گزارش شده و در اکثر گونههای باسیلوس ۶۳ کیلو دالتون گزارش شده است.

درجه حرارت مطلوب فعالیت آلفا آمیلاز در سویه درجه حرارت مطلوب فعالیت آلفا آمیلاز در سویه نافیا آمیلاز در سویه نافیا آمیلاز گونههای دیگر باسیلوس، ۷۰ درجه سانتی گراد گزارش شده است. تحمل پذیری دمایی در ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴ ساعت برای آلفا آمیلاز گونه آمیلاز گونه CUMC 305 کرارش شده است [۱۶] آلفا آمیلاز در گونهای از باسیلوس ۶۶. ANT میلاد و گونهای از باسیلوس ۶۶. ANT درجه سانتی گراد و ساعت و ۲۴ ساعت گرماگذاری در ۱۰۰ درجه سانتی گراد و بایر ۱۰ به ترتیب ۸۵/۵ و ۵۵٪ فعالیت آنزیمی بود را حفظ کرده است. گونهای از stearothermophilus که در حین فرآوری صنعتی سیب زمینی جدا شده است نیز توانایی تولید آلفا آمیلاز با

تحمل پدنیری بالای دمایی را داراست. درجه حرارت مطلوب برای فعالیت این آنزیم، ۷۰ درجه سانتی گراد است ولی pH مطلوب برای فعالیت آنزیم نسبتاً کم و در دامنه بین ۶-۵/۵ است [۲۸].

آلفا آمیلازهای جنس باسیلوس پایداری گرمایی دارند و این ویژگی مطلوبی در صنایع ذوب نشاسته به شمار میرود. علیرغم مطالعات زیادی که روی آلفا آمیلاز مقاوم گرمایی B.licheniformis انجام شد [۲۹-۳۰] منشاء طبیعی تحمل پذیر بودن دمای بالا به صورت یک معما باقی مانده است. به این معنی که آیا B.licheniformis آلفا آمیلاز مقاوم دما را به صورت تصادفی تولید می کند و یا تحت شرایط انتخابی در درجه حرارت بالا و یا دیگر شوکهای محیطی تولید می شود.

تأثیر فلزات یونی و بازدارندهها: فاکتورهای خارجی همچون کاتیونها و افزایندهها در فعالیت آنزیم مؤثر همیباشند. اثر یون روی در بین آمیلازهای مختلف متفاوت میباشند. اثر یون روی در بین آمیلازهای مختلف متفاوت است. برای مثال یون روی، بازدارندگی کامل روی Schwanniomyces alluvius ,Bacillus cereus NY14 هیچ داشته و در فعالیت آنزیم Aspergillus kowachii هیچ گونه اثری ندارد. اما ۴۶٪ اثر بازدارندگی روی آمیلاز مقاوم به دما در گونهای از باسیلوس ترموفیلیک گزارش شده و به دما در گونهای از باسیلوس ترموفیلیک گزارش شده و شده است [۳۱]. آمیلاز مقاوم به دما نشان داده شده است (۳۱]. آمیلاز مقاوم به دما نشان داده شده است (جدول ۳). فعالیت آنزیمی در گونههای داده باسیلوس آلکالوفیلیک و ترموفیلیک 1۲۵٪ با حضور کلرید باسیلوس آلکالوفیلیک و ترموفیلیک 1۲۵٪ میرسد این در

نتيجهگيري

سویه B.licheniformis Shahed-07 سطح مطلوبی از آلفا آمیلاز مقاوم به دما را تولید می کنید کیه در فرآوری نشاسته و صنایع غذایی کاربرد دارد. تولید آنزیم آلفا آمیلاز توسط این سویه جدا شده و بومی می تواند با بهینه سازی فرآیند تولید، افزایش یافته و در سطح تجاری مطرح شود.

تشکر و قدردانی

در اینجا لازم است از معاونت پژوهشی و مرکز تحقیقات علوم پایه دانشگاه شاهد که با تأمین بودجه امکان اجرای این پژوهش را فراهم آوردند تشکر و قدردانی به عمل آید.

References

- [1] Burhan A, Nisa U, Gokhan C, Omer C, Ashabil A, Osman G. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic Bacillus sp. Isolate ANT-6. *Process Biochem* 2003; 38: 1397-1403.
- [2] Sidhu GS, Sharma P, Chakraborty K, Gupta JK. Strain improvement for the production of a thermostable alpha-amylase. *Enz. Microb Technol* 1997; 21: 525-30.
- [3] Pandey A, Nigam P, Soccol CR, Soccol VT, Singh D, Mohan R. Advances in microbial amylases. *Biotechnol Appl Biochem* 2000; 31: 135-52.
- [4] Gupta R, Gigras P, Mohapatra H, Goswami VK, Chauhan B. Microbial alpha-amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochem* 2003; 38: 1599-616.
- [5] Leveque E, Janecek S, Haye B, Belarbi A. Thermophilic archaeal amylolytic enzymes catalytic mechanism, substrate specificity, and stability. *Enz MicrobTechnol* 2000; 26: 3-14.
- [6] Morgan FJ Priest FG. Characterization of thermostable α-amylase from Bacillus

- licheniformis NCTB 6346. J Appl Bacteriol 1981; 50: 104-14.
- [7] Asgher M, Asad MJ, Rahman SU, Legge RL. A thermostable α-amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *J Food Engg* 2007; 79: 950-55.
- [8] Teodoro CED, Martin MLL. Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus* sp. *Braz J Microbiol* 2000; 31: 298-302.
- [9] Janecek S. Alpha-amylase family: molecular biology and evolution. *Prog Biophys Mol Biol* 1997; 67: 67-97.
- [10] Danson MJ, Hough DW, Russell RJ, Taylor GL, Pearl L. Enzyme thermostability and thermoactivity. *Prot Engg* 1996; 9: 629-30.
- [11] Lowry OH, Rosebrough N, Farr A, Randall R.
 Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-76.
- [12] Bernfeld P. Enzymes of Starch Degradation and Synthesis in, *Advances in Enzymology* In *Advances in Enzymology Vol. XII*. Nord, F. (ed). NY: Interscience Publ. 1951, pp. 379.
- [13] Jin B, van Leeuwen J, Patel B. Mycelial morphology and fungal protein production from

- starch processing wastewater in submerged cultures of *Aspergillus oryzae*. *Process Biochem* 1999; 34: 335-40.
- [14] Malhotra R, Noorwez SM, Satyanarayana T. Production and partial characterization of thermostable and calcium-independent alphaamylase of an extreme thermophile *Bacillus* thermooleovorans NP54. Lett Appl Microbiol 2000; 31: 378-84.
- [15] Medda S. and Chandra AK. New strains of Bacillus licheniformis and Bacillus coagulans producing thermostable alpha-amylase active at alkaline pH. J Appl Bacteriol 1980; 48: 47-58.
- [16] Krishnan T. and Chandra AK. Purification and Characterization of alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* CUMC305. *Appl Environ Microbiol* 1983; 46: 430-7.
- [17] Tsvetkov VT. and Emanuilova EI. Purification and properties of heat stable alpha-amylase from Bacillus brevis. *Appl Microbiol Biotechnol* 1989; 31: 246-8.
- [18] Lin LL, Chyau CC, Hsu WH. Production and properties of a raw-starch-degrading amylase from the thermophilic and alkaliphilic Bacillus sp. TS-23. *Biotechnol Appl Biochem* 1998; 28: 61-8.

- [19] Konsula Z. and Liakopoulou-Kyriakides M. Hydrolysis of starches by the action of an alphaamylase from *Bacillus subtilis*. *Process Biochem* 2004; 39: 1745-9.
- [20] Huang H, Ridgway D, Gu T, Moo-Young M. A segregated model for heterologous amylase production by Bacillus subtilis. *Enz MicrobTechnol* 2003; 32: 407-13.
- [21] Wanderley KJ, Torres FAG, Moraes L, and Ulhoa CJ. Biochemical characterization of alpha-amylase from the yeast *Cryptococcus* flavus. FEMS Microbiol Lett 2004; 231: 165-9.
- [22] Mamo G, and Gessesse A. Effect of cultivation conditions on growth and alpha-amylase production by a thermophilic Bacillus sp. *Lett Appl Microbiol* 1999; 29: 61-65.
- [23] Narang S, and Satyanarayana T. Thermostable alpha-amylase production by an extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans*. *Lett Appl Microbiol* 2001; 32: 31-35.
- [24] Hamilton LM, Kelly CT, Fogarty WM. Production and properties of the raw starchdigesting alpha-amylase of Bacillus sp. IMD 435. Process Biochem 1999; 35: 27-31.
- [25] Hewitt CJ, and Solomons GL. The production of alpha-amylase (E.C.3.2.1.1) by *Bacillus amyloliquefaciens*, in a complex and a totally

- defined synthetic culture medium. *J Indust Microbiol Biotechnol* 1996; 17: 96-99.
- [26] Ben Ali M, Mhiri S, Mezghani M, Bejar S. Purification and sequence analysis of the atypical maltohexaose-forming alpha-amylase of the *B. stearothermophilus* US100. *Enz MicrobTechnol* 2001; 28: 537-42.
- [27] Duedahl-Olesen L, Matthias Kragh K, Zimmermann W. Purification and characterisation of a malto-oligosaccharideforming amylase active at high pH from *Bacillus* clausii BT-21. Carbohyd Res 2000; 329: 97-107.
- [28] Wind RD, Buitelaar RM, Eggink G, Huizing HJ, Dijkhuizen L. Characterization of a new *Bacillus stearothermophilus* isolate: a highly thermostable α-amylase producing strain. *Appl Microbiol Biotechnol* 1994; 41: 155-62.
- [29] Declerck N, Machius M, Joyet P, Wiegand G,Huber R, Gaillardin C. Engineering the

- thermostability of *Bacillus licheniformis* alphaamylase. *Biologia* 2002; 57: 203-11.
- [30] Nielsen JE. and Borchert TV. Protein engineering of bacterial alpha-amylases. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1543: 253-74.
- [31] Mamo G. and Gessesse A. Purification and characterization of two raw-starch-digesting thermostable alpha-amylases from a thermophilic Bacillus. *Enz MicrobTechnol* 1999; 25: 433-8.
- [32] Srivastava RAK. Purification and chemical characterization of thermostable amylases produced by *Bacillus stearothermophilus*. *Enz MicrobTechnol* 1987; 9: 749-54.
- [33] Dong G, Vieille C, Savchenko A, Zeikus JG. Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding extracellular α-amylase from *Pyrococcus furiosus* and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 3569-76.

Characterization of a Thermotolerant α-amylase Producing Natural Variant of Bacillus Species

I. Rasooli¹, S.L. Mousavi Gargari², R. Sorouri Zanjani³, Sh. Darvish Alipoor Astaneh⁴

Received: 17/02/09 Sent for Revision: 14/07/09 Received Revised Manuscript: 29/10/09 Accepted: 14/11/09

Background and Objectives: Thermotolerant α -amylases have had extensive commercial applications in starch processing, brewing and sugar production, and have almost completely replaced chemical hydrolysis of starch in the starch processing industry. The aim of this study was to determine the characterization of thermotolerant α -amylase producing natural variant of *bacillus* species

Materials and Methods: In this laboratory study, the isolated bacillus species known as *Bacillus licheniformis* Shahed-07 was identified by biochemical methods. The bacillus was cultured in liquid media to produce α -amylase. The enzyme production media were assessed controlled and optimized for enzyme productivity using various carbon and nitrogen sources. The stability of the enzyme against temperature, pH, metal ions and chelating agents was then determined.

Results: Maximum enzyme production was achieved after 26 h cultivation at pH 7.0 and 50°C. Supplementation of medium with 0.5% Tryptophan enhanced the enzyme productivity to 202%, whereas Peptone and Lysin at 0.5% level showed a strong repression. In comparison with the crude α -amylase, the partially purified enzyme had 3.77 fold purity with 32.64 fold increased activity. This enzyme showed amylolytic activity with a single band of 6000 daltons on electrophoresis gel with 0.2% starch. The optimum activity was at pH 7.5 and 70°C. The crude enzyme was stable for 24 h at pH range of 6-7 at 70°C. Hg²⁺ was completely inhibitory to the enzyme activity, and Mn²⁺, Fe²⁺, Co²⁺ and Ca²⁺ increased the enzyme activity.

Conclusion: The *B. licheniformis* Shahed-07 strain produced high levels of thermotolerant α -amylase with characteristics suitable for application in starch processing and other food industries. The production process can be commercialized after further optimization for enhancing enzyme production.

Key word: Bacillus licheniformis, α-Amylase, Optimization, Production Medium

Conflict of interest: This research was funded by Shahed University.

Funding: None declared

Ethical approval: The Ethical Committee of Shahed University approved the study.

¹⁻ Prof., Dept. of Biology, College of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran (Corresponding author) Tel: (021) 51212600, Fax: (021) 51212601, E.mail: rasooli@shahed.ac.ir

²⁻ Associate Prof., Dept. of Biology, College of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran

³⁻ Assistant Prof., of Microbiology, Baghiyatollah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁴⁻ Master Science, Dept. of Biology, College of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran