



جداسازی و شناسایی باکتری‌های تولید کننده آمیلاز مقاوم به حرارت از فاضلاب کارخانه کنسروسازی

سوده یوسفی فخر^۱، نفیسه دعوتی^{۲*}، داریوش مینایی طهرانی^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی سلولی - مولکولی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی بهار، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

۳- دانشیار، گروه زیست شناسی سلولی - مولکولی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

هدف این مطالعه جداسازی سویه‌های میکروبی مولد آمیلاز مقاوم به حرارت از فاضلاب غنی از نشاسته یکی از کارخانه‌های کنسروسازی و سپس شناسایی مولکولی این جدایه‌ها بود. به علاوه آمیلاز مقاوم به حرارت استخراج شده از باکتری به لحاظ دما و pH بهینه فعالیت آنزیمی مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه ۱۴ جدایه میکروبی مقاوم به حرارت از پساب جدا گردید، که تنها دو جدایه دارای فعالیت آمیلازی بود. شناسایی مولکولی این دو جدایه براساس تکثیر ژن 16S rDNA توسط پرایمرهای B27F و U1492R و سپس توالی‌یابی محصول PCR، حضور *Bacillus pumilus* و *Bacillus safensis* را تایید کرد. نتایج نشان داد که دما و pH بهینه فعالیت آمیلازی جدایه‌ها به ترتیب ۶۰ درجه سانتی‌گراد و ۷ بود و *Bacillus safensis* با عملکرد ۷,۶۷ (U/ml) دارای فعالیت آمیلاز بیشتری نسبت به *Bacillus pumilus* با عملکرد ۶,۳۳ (U/ml) بود.

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۲/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۴/۱۸

کلمات کلیدی:

آمیلاز مقاوم به حرارت،

باسیلوس،

دما،

پساب کارخانه

DOI: 10.22034/FSCT.20.139.138

DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.139.9.3

* مسئول مکاتبات:

n.davati@basu.ac.ir

۱- مقدمه

کشف آمیلازها در واقع به پژوهش‌های وسیع پاپن و پرسوز وابسته بود. آنان در سال ۱۸۳۳ موفق شدند از جو سبز شده، ترکیبی را به نام مالت کشف کنند که نشاسته را به قند مبدل می‌ساخت و این ترکیب را دیاستاز نامیدند که امروزه به نام آنزیم آمیلاز معروف است [۱]. آمیلازها ساختاری پروتئینی دارند و به سه زیرگروه آلفا-آمیلاز (α -Amylase)، بتا-آمیلاز (β -Amylase) و گاما-آمیلاز (γ -Amylase) تقسیم‌بندی می‌شوند. آمیلازها یکی از اصلی‌ترین آنزیم‌های مورد استفاده در صنعت هستند. بسیاری از آمیلازها با منشأ میکروبی به صورت تجاری برای رفع نیازهای فزاینده صنعتی در دسترس هستند. آن‌ها تقریباً جایگزین هیدرولیزکننده‌های شیمیایی نشاسته در فرآوری صنعتی این محصول شده‌اند. از مزیت‌های اصلی استفاده از آنزیم‌های میکروبی نسبت به روش‌های شیمیایی جهت هیدرولیز نشاسته می‌توان به ظرفیت بالای تولید اقتصادی آن‌ها، تمایل میکروب‌ها به دستکاری ژنتیکی و بهبود آستانه تحمل فشار بالا اشاره کرد [۲]. همچنین این آنزیم‌ها در صنعت داروسازی، پزشکی، تخمیر، صنایع غذایی، نساجی و کاغذ کاربرد دارند. در واقع آمیلازها تقریباً ۲۵ درصد از کل فروش آنزیم‌های جهانی را تشکیل می‌دهند. خواصی از آمیلازها مانند پایداری حرارتی، پایداری در برابر تغییرات pH، مدت زمان انکوباسیون، منابع کربنی به عنوان محرک، منابع نیتروژنی، اندازه ذرات سویسترای مورد تخمیر، اثر همزدن بر تولید آن اهمیت دارد. امروزه آلفا-آمیلاز یکی از مهمترین و قابل توجه‌ترین آنزیم‌ها از نظر تجاری خصوصاً در صنعت شیرین کننده‌ها می‌باشد. برای فرآیند مواد شیرین کننده از نشاسته، دما باید ۵۰ درجه سانتی گراد در pH معادل ۷ باشد. این امر نیازمند استفاده از آلفا-آمیلاز مقاوم به حرارت می‌باشد. کشف آمیلازهای مقاوم در برابر حرارت نه تنها مسئله پایداری را حل می‌کند، بلکه سرعت واکنش را تسریع می‌کند و آلودگی‌های

احتمالی و ویسکوزیته محیط را کاهش می‌دهد، بنابراین به طور مستقیم به صنایع فرآوری نشاسته در دمای بالا سود می‌رساند. همچنین علاوه بر فرآوری نشاسته، کاربردهای وسیعی در صنایع غذایی، دامی، تخمیری، بهداشتی، تولید-کاغذ، شوینده‌ها و تهیه محصولات کربوهیدراتی داشته و جایگزین روش هیدرولیز شیمیایی نشاسته در فرآوری صنعتی آن شده است. باکتری‌های *باسیلوس سوبتیلیس*، *باسیلوس استئاروترموفیلوس* و *باسیلوس آمیلوفاسینس* به عنوان تولیدکنندگان خوب آمیلاز مقاوم به دمای بالا در صنعت شناخته شده‌اند [۳]. بطور کلی، آلفا-آمیلازهای حاصل از منابع باکتریایی مقاومت حرارتی بیشتری نسبت به انواع تهیه شده از جو یا گندم جوانه زده داشته و دسته اخیر مقاوم‌تر از انواع قارچی هستند. آنچه امروزه آمیلازهای مالتوژنیک نامیده می‌شوند حاصل منابع باکتریایی بوده و از نظر ترکیب و ساختار، بسیار شبیه به آنزیم‌های حاصل از منابع قارچی می‌باشند. با هدف دستیابی به باکتری‌هایی با پتانسیل تولید آمیلاز مقاوم به حرارت، پساب حاوی نشاسته یکی از کارخانه‌های کنسروسازی در استان همدان به عنوان منبع بالقوه این باکتری استفاده شد و پس از شناسایی مولکولی جدایه‌های میکروبی، پتانسیل تولید این آنزیم و شرایط بهینه فعالیت آمیلاز به دست آمده از آن‌ها بررسی گردید.

۲- مواد و روش‌ها

در این پژوهش ۳ ناحیه مختلف از پساب یکی از کارخانه-های کنسروسازی واقع در همدان، ایران برای جداسازی میکروارگانیسم‌های مولد آمیلاز استفاده گردید. تمام جدایه-ها توسط آزمون‌های بیوشیمیایی از جمله رنگ‌آمیزی گرم، تست کاتالاز و هیدرولیز نشاسته غربالگری اولیه شدند.

۲-۱- نمونه‌گیری از پساب کارخانه

فعالیت کاتالازی جدایه‌ها توسط پراکسید هیدروژن ۳٪ مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس جهت غربالگری اولیه جدایه‌های مولد آنزیم آمیلاز، جدایه‌های باسیلی گرم مثبت با فعالیت کاتالازی مثبت روی محیط نوترینت آگار حاوی ۱٪ نشاسته کشت شدند و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند و پس از انکوباسیون، محلول لوگل یدین (مرک، آلمان) روی پلیت-های حاوی نشاسته به مدت ۱ دقیقه ریخته شد. وجود یک منطقه واضح و قهوه‌ای رنگ از هیدرولیز در اطراف کلنی و مناطق رشد به عنوان نتیجه مثبت فعالیت آمیلازی هریک از جدایه‌های میکروبی ثبت شد. پس از فعال‌سازی جدایه‌ها و غربالگری اولیه هریک از جدایه‌های آمیلاز مثبت در نوترینت براث (مرک، آلمان) حاوی ۱٪ نشاسته تلقیح شد و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. سپس ۱ میلی‌لیتر از محیط را به درون میکروتیوپ‌های استریل ریخته و با شدت دور ۱۲۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ (سیگما، آلمان) شد. سپس مایع‌رویی آن‌ها، بعد از فیلتراسیون با فیلترهای ۰٫۴۵ میکرومتری، برای برآورد فعالیت آمیلازی (سوپ عاری از سلول حاوی آمیلاز) استفاده شد [۴، ۵].

۲-۴- اندازه‌گیری میزان فعالیت آمیلازی جدایه‌ها

برای محاسبه میزان فعالیت آمیلازی جدایه‌ها از محلول‌های استاندارد گلوکز (مرک، آلمان) با غلظت‌های ۱۰ تا ۱۰۰ میکرومول بر میلی‌لیتر استفاده شد. برای اندازه‌گیری جذب، ابتدا ۱ میلی‌لیتر از محلول‌های استاندارد با ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات ۱٪ (آریا طب، ایران) و ۲ میلی‌لیتر معرف ۳،۵-دی‌نیترو سالیسیلیک اسید (DNS) مخلوط شد و بعد ۴ میلی‌لیتر آب به آن اضافه شد و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری گردید. سپس میزان

در این تحقیق پساب حاصل از تولید سس مایونز کم‌چرب کارخانه صنایع غذایی سحر همدان که حاوی نشاسته است به عنوان منبع احتمالی باکتری مولد آمیلاز انتخاب گردید و از سه قسمت اول، وسط و آخر مسیر پساب در ظروف استریل نمونه‌گیری شد و جهت جداسازی باکتری‌هایی با فعالیت آمیلازی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تحت شرایط استریل به آزمایشگاه منتقل شد.

۲-۲- کشت و خالص‌سازی جدایه‌های باکتریایی مقاوم

به حرارت از پساب

نمونه‌های پساب تا رقت 10^{-7} توسط رینگر استریل (مرک، آلمان) رقیق‌سازی شدند. بعد از رقیق‌سازی لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور (پارسیان طب، ایران) ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا باکتری‌های غیراسپورزا حذف شوند. سپس نمونه‌ها روی محیط کشت نوتریت آگار به صورت سطحی کشت داده شدند و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ گرمخانه‌گذاری شدند. کلنی‌های متفاوت از نظر اندازه، رنگ و شکل انتخاب شدند و روی محیط کشت نوترینت آگار حاوی ۱٪ نشاسته به صورت خطی کشت داده شدند و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. در نهایت کلنی‌های مجزا به عنوان جدایه‌های خالص در محیط کشت نوترینت براث (مرک، آلمان) حاوی ۱۵٪ گلیسرول (مرک، آلمان) در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

۲-۳- غربالگری اولیه جدایه‌های مولد آمیلاز مقاوم به

حرارت و استخراج آمیلاز مقاوم به حرارت از جدایه‌های منتخب

جهت بررسی مورفولوژی جدایه‌ها، هریک تحت رنگ آمیزی گرم و سپس مشاهده میکروسکوپی گرفته شدند و

۰,۱ نرمال (مرک، آلمان) معادل ۶، ۷، ۸ و ۹ توسط pH متر (متروم، سویس) تنظیم شد. و فعالیت آمیلازی بعد از تنظیم pH مورد نظر توسط معرف DNS مطابق روش قبل اندازه گیری شد [۷-۵].

۲-۶-۲- شناسایی مولکولی جدایه‌ها

۲-۶-۱- استخراج DNA از جدایه‌های منتخب

جهت استخراج ژنوم باکتری، ابتدا هریک از جدایه‌های خالص در محیط نوترینت آگار کشت داده شد سپس چند کلنی باکتری در بافر فسفات تعلیق‌سازی شدند و به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۵۰۰ g سانتریفیوژ شد و از رسوب حاصل از باکتری جهت استخراج DNA توسط کیت استخراج DNA (سیناکلون، ایران) استفاده شد و کیفیت DNA توسط ژل الکتروفورزیس (ژل آگارز ۱٪) بررسی گردید.

۲-۶-۲- واکنش زنجیره ای PCR

محلول واکنش PCR شامل ۱۶ μl آب دیونیزه استریل، ۲ μl از پرایمرهای B27F و U1492R (بایونیر، کره) با غلظت ۱۰ picomol/μl، ۲۵ μl مستر میکس (یکتاتجهیز، ایران) و ۵ μl DNA بود. مراحل انجام این واکنش بعد از فعال سازی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل برنامه دمایی- زمانی شامل واسرشته‌سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، توسعه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و سپس توسعه نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و در مرحله پایانی سرد کردن به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بود. محصول PCR حدود ۱۲۰۰ bp جهت توالی‌یابی (ماکروژن، کره) ارسال شد [۸، ۹].

جذب در ۵۴۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر UV/VIS (Aquaytic، آلمان) اندازه‌گیری شد. همچنین برای شاهد و جدایه‌های میکروبی آزمون مشابه استاندارد انجام شد اما به جای ۱ میلی‌لیتر محلول استاندارد از ۱ میلی‌لیتر سوپ عاری از سلول حاوی آمیلاز حاوی ۱٪ نشاسته برای جدایه‌های میکروبی استفاده شد. یک واحد آنزیمی (U/ml) معادل مقدار آنزیم مورد نیاز برای آزادسازی ۱ میکرومول قند احیاء در دقیقه در نظر گرفته شد [۷-۵].

۲-۵- تعیین دما و pH بهینه فعالیت آمیلاز و بررسی

پایداری حرارتی آمیلاز

جهت تعیین دمای بهینه فعالیت آنزیم آمیلاز، ابتدا ۱ میلی‌لیتر سوپ آمیلازی عاری از سلول حاوی ۱٪ نشاسته به همراه با ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات ۱٪ و ۲ میلی‌لیتر معرف DNS مخلوط شد و بعد ۴ میلی‌لیتر آب به آن اضافه شد سپس در دماهای مختلف ۳۰ تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری شد و سپس میزان فعالیت آمیلازی جهت تعیین دمای بهینه با روش DNS اندازه‌گیری شد. جهت تعیین پایداری حرارتی آمیلاز، ۱ میلی‌لیتر از سوپ عاری از سلول حاوی آمیلاز با ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات ۱٪ و ۲ میلی‌لیتر معرف DNS مخلوط شد و بعد ۴ میلی‌لیتر آب به آن اضافه شد و در دماهای ۶۰ تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه در بن‌ماری حرارت داده شد. سپس تا غلظت ۱٪ نشاسته اضافه گردید و در دمای بهینه بدست آمده از مرحله قبل گرمخانه‌گذاری شد و فعالیت آمیلازی در ۵۴۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر UV/VIS اندازه‌گیری شد. برای بررسی اثر تغییرات pH بر فعالیت آنزیم آمیلاز به این صورت عمل شد که ابتدا به ۱ میلی‌لیتر سوپ آمیلازی تهیه شده از مراحل قبل برای جدایه‌های باکتریایی منتخب، ۴ میلی‌لیتر بافر فسفات ۱٪ اضافه شد و سپس pH آن با استفاده از اسیدکلریدریک ۰,۱ نرمال (مرک، آلمان) و سود

هر توالی در هر طرف خوانش شد و با توالی‌های موجود در بانک اطلاعاتی ژن با کمک برنامه بلاست در سایت <http://www.NCBI.nlm.nih.gov> مقایسه گردید. جدایه‌هایی با ۹۹ درصد تا ۱۰۰ درصد مشابهت به عنوان همان گونه باکتریایی شناسایی شد. با وارد کردن توالی‌های خوانش شده در نرم افزار مگا درخت خویشاوندی از توالی‌ها برای جدایه‌ها تهیه شد.

۲-۷-روش آماری

اثرات تیمارها شامل دما در هفت سطح (۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰ درجه سانتی‌گراد) و pH در چهار سطح ۶، ۷، ۸ و ۹ بر فعالیت آمیلازی براساس روش آماری فاکتوریل و طرح آماری کاملاً تصادفی در سه تکرار بررسی شد. تجزیه و تحلیل واریانس داده‌ها با نرم افزار SPSS انجام گردید.

۳-نتایج و بحث

۳-۱-آزمون‌های میکروبی

نتایج شمارش کلی باکتری‌ها (CFU/ml) نشان داد ناحیه ابتدایی پساب دارای 26×10^3 از فلور میکروبی بیشتری نسبت به نواحی میانی 8×10^3 و انتهایی پساب 3×10^3 برخوردار بود. از نمونه پساب، ۱۴ جدایه باکتری مقاوم به حرارت، گرم مثبت، باسیلی شکل و کاتالاز مثبت حاصل گردید. در مطالعه حاضر باکتری‌های مولد آمیلاز، متعلق به جنس باسیلوس، از پساب یکی از کارخانه‌های تولید محصولات غذایی جداسازی گردید.

۲-۳-بررسی تولید آمیلاز توسط جدایه‌های باکتریایی

در بین ۱۴ جدایه میکروبی ترموفیل، تنها جدایه‌های ۱۹ و B توانستند نشاسته موجود در محیط نوترینت آگار را تجزیه کنند که نشانه مثبت بودن فعالیت آمیلازی آن‌ها بود. نتایج فعالیت آمیلازی جدایه‌های میکروبی با کمک استاندارد گلوکز مطابق جدول ۱ نمایش داده می‌شود.

پرایمرهای یونیورسال^۱ جهت تکثیر ژن 16S rRNA شامل B27F و U1492R (بایونیر، کره) با توالی زیر با غلظت ۱۰ picomol/μl تهیه شدند:

Forward: B27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')
Reverse: U1492R (5'-ACGTGTTTGAAGAGATTTTCG-3')

۳-۶-۲-ژل الکتروفورز

در ابتدا جهت تهیه ژل آگاروز ۱ درصد، پودر آگاروز (سینا کلون، ایران) در بافر TBE 0.5x (DNA بایوتک، ایران) حل گردیده و تا شفاف شدن مایع حرارت داده شد. سپس قبل از سرد شدن ژل به آن ۱ μl سایبرسیف (سیناکلون، ایران) اضافه گردید و پس از مخلوط شدن داخل سینی چسب زده و شانه‌گذاری شده ریخته شد. ژل بسته شده به تانک الکتروفورز (پدیده نوژن پارس، ایران) منتقل گردید [۹]. جهت بارگذاری محصول PCR در هر چاهک مقدار ۷ μl محصول واکنش PCR انتقال داده شد درون یکی از چاهک‌ها نیز ۳ μl لدر ۱ kb (سیناکلون، ایران) تزریق شد یک چاهک نیز به عنوان کنترل منفی محصول واکنش PCR فاقد DNA در نظر گرفته شد، الکتروفورز به مدت ۳۰ دقیقه با ولتاژ ۷۰ تا ۷۵ ولت اجرا شد. در نهایت تشکیل باند محصول PCR معادل ۱۵۰۰ bp با مطابقت با مارکر توسط دستگاه ترانس الیمیناتور بررسی گردید [۹].

۲-۶-۴-توالی‌یابی محصول PCR و آنالیز تکامل نژادی

جدایه‌ها

پس از خالص‌سازی محصول PCR با کیت خالص‌سازی (اینترون، کره) طبق دستورالعمل شرکت سازنده ۴۰-۵۰ μl از محصول خالص سازی شده مربوطه برای توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره ارسال شد، عملیات توالی‌یابی با استفاده از پرایمرهای B27F و U1492R توسط این شرکت انجام شد. هر توالی مورد خوانش دو طرفه قرار گرفت. به طور متوسط ۸۵۰bp تا ۱۲۰۰ نوکلئوتید به ازای

به آن‌ها نشاسته افزوده شد و در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد که در مرحله قبل به عنوان دمای بهینه تعیین شده بود قرار داده شد، اما بعد تیمار حرارتی آنزیم ظاهرًا ساختار فعال پروتئینی خود را از دست داده و فعالیت آن کاهش یافت (شکل ۲).

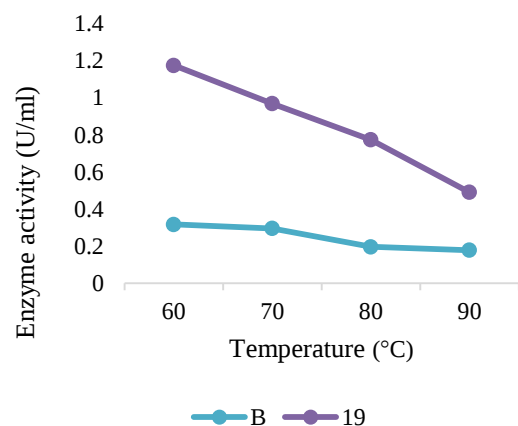


Fig 2. Thermal stability of amylase activity of isolates at 60 °C to 90 °C

در بررسی اثر pH بر فعالیت آنزیم آمیلازی مشخص گردید که این آنزیم دارای حداکثر فعالیت در pH برابر ۷ است و نتایج آنالیز آماری نشان داد که pH اثر معنی‌داری بر فعالیت آمیلازی ($p < 0.05$) دارد. همچنین نتایج نشان داد که فعالیت نسبی آمیلازی در دامنه pH ۶ تا ۷ رو به افزایش بود درحالی‌که این فعالیت در دامنه pH ۸ تا ۹ روند کاهشی داشت. در مقایسه شرایط بهینه به دست آمده برای فعالیت آنزیم مورد مطالعه با سایر مطالعات انجام شده نتایج نشان داد که آمیلاز به دست آمده بطور مشابهی دارای فعالیت بهینه در دمای ۵۰-۶۰ درجه سانتی‌گراد و pH بهینه تقریباً معادل ۷ می‌باشد. بطور مشابه مطالعه ما، تیپسوامی و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند که دما و pH بهینه فعالیت آمیلازی باسیلوسی که از فاضلاب صنعتی جدا شده بود به ترتیب ۶۰ درجه سانتی‌گراد و ۶٫۵ بود [۱۰]. همچنین ساگزنا و سینق (۲۰۱۱) نشان دادند که دما و pH بهینه فعالیت آمیلازی باسیلوس مورد مطالعه آن‌ها به ترتیب ۵۰ درجه

Table 1. Amylase activity of microbial isolates after 15 and 30 minutes

Enzyme activity (U/ml)		Microbial isolates
30min	15min	
6.33	3.39	B
7.67	6.20	19

۳-۳- تعیین شرایط بهینه فعالیت آمیلازی جدایه‌ها

جهت مقایسه تاثیر دما بر فعالیت آنزیم آمیلاز، فعالیت دو جدایه (B و ۱۹) در دماهای مختلف اندازه‌گیری شد. الگوی تاثیر دما بر دو جدایه تقریباً یکسان بود، در محدوده دمایی ۳۰ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد فعالیت آمیلازی روند افزایشی داشت بطوری که بیشینه فعالیت در دمای ۶۰ درجه سانتی-گراد مشاهده شد و سپس از دمای ۶۰ تا ۹۰ درجه سانتی-گراد فعالیت آنزیمی روند کاهشی نشان داد (شکل ۱) که می‌تواند به دلیل دناتوره شدن آنزیم در دمای بالا باشد. فعالیت آنزیمی جدایه ۱۹ بیشتر از B در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد نشان داده شد. نتایج آنالیز آماری نشان داد که دما اثر معنی‌داری بر فعالیت آمیلازی ($p < 0.05$) دارد.

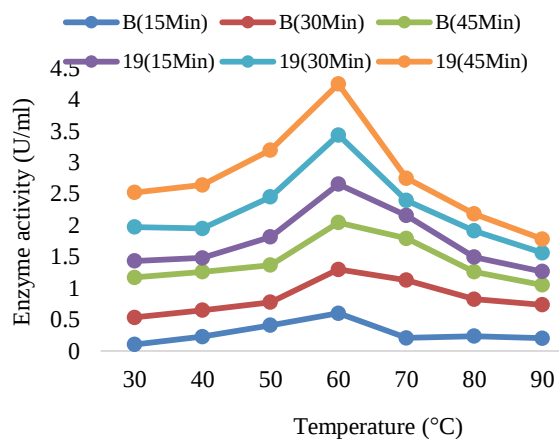


Fig 1. Optimum temperature of amylase activity of isolates in 15, 30 and 45 min

جهت بررسی پایداری حرارتی آمیلاز، سوپ آنزیمی بدون نشاسته حاصل از دو جدایه (B و ۱۹) به مدت ۶۰ دقیقه در بن‌ماری در رنج ۶۰ تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده، سپس

سانتی‌گراد و ۶ می‌باشد [۱۱]. داس و همکاران (۲۰۰۴)، دما و pH بهینه فعالیت آمیلاز قلبایی و مقاوم به حرارت مستخرج از باسیلوس سابتیلیس را به ترتیب ۵۲-۵۵ درجه- سانتی‌گراد و ۹ گزارش کردند. آن‌ها نشان دادند که پایداری حرارتی این آنزیم، دمای ۹۵ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ده دقیقه است اما در این شرایط ۶۰٪ از فعالیت خود را از دست داد [۱۲]. اما مطالعاتی هم انجام شده است که دما بهینه بالاتری برای آمیلاز گزارش کرده‌اند. در این زمینه، کوردیرو و همکاران اعلام کردند که فعالیت آمیلازی باسیلوس مقاوم به حرارت تحت مطالعه‌شان دارای دمای بهینه ۷۰ درجه سانتی‌گرادی است اما مشابه مطالعه ما دارای مقاومت حرارتی پایینی در دمای بالا بود این باکتری دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد را به مدت ۲ ساعت تحمل می‌کرد اما در دماهای ۶۰، ۷۰ و ۹۰ درجه سانتی‌گراد به ترتیب ۴٪، ۱۳٪ و ۳۸٪ از فعالیت خود را از دست داد، آن‌ها گزارش کردند که pH بهینه این باکتری ۷٫۵ بود [۱۳]. همچنین اچمیدت و همکاران (۲۰۱۰)، شرایط بهینه فعالیت آمیلاز مستخرج از باسیلوس مجاونسیس را دمای بالایی معادل ۸۰ درجه‌سانتی‌گراد و pH ۶٫۵ [۱۴] و سریواستاوا و باروآه (۱۹۸۶) دمای بالایی معادل ۸۲ درجه سانتی‌گراد و pH ۶٫۹ را به عنوان شرایط بهینه فعالیت این آنزیم گزارش کردند [۱۵]. در ارتباط با میزان فعالیت آمیلازی استخراج شده از میکروارگانیسم‌ها، بخصوص باسیلوس‌ها، مقادیر مختلفی گزارش شده است که به عوامل مختلفی از جمله نوع سویه میکروبی (وحشی یا جهش‌یافته)، شرایط کشت، مقیاس تولید (صنعتی یا آزمایشگاهی) و غیره می‌توان اشاره کرد. الخلیل و گافر (۲۰۱۱)، دمای بهینه ۵۰-۷۰ درجه سانتی‌گراد را برای آمیلاز مستخرج از باسیلوس استئاروترموفیلوس گزارش کردند اما بطور قابل توجهی در ۷۰ درجه دارای پایداری حرارتی ۶۰ دقیقه بود. آن‌ها با اصلاح شرایط و ترکیبات محیط کشت موفق به تولید (U/ml) ۵۷٫۷-۶۳٫۳ شدند [۱۶]. در ارتباط با سایر میکروارگانیسم‌های مولد

آمیلاز، می‌توان به گونه‌ای از استرپتومایسس‌ها اشاره کرد که دارای فعالیت آمیلازی معادل (U/mg) ۱۱٫۷ در دمای ۵۰-۶۰ درجه و pH برابر ۶ بود [۱۷]. با توجه به اینکه گزارشات متعددی در زمینه بهینه‌سازی شرایط تولید آمیلاز مقاوم به حرارت در مقیاس صنعتی و افزایش راندمان بالای این آنزیم حاصله از باسیلوس‌های مقاوم به حرارت وجود دارد، اما براساس نتایج مطالعه ما مقدار فعالیت آمیلازی به دست آمده (U/ml) ۶٫۲-۷٫۶۷ در مقایسه با سایر مطالعاتی که تنها در مقیاس آزمایشگاهی روی سویه میکروبی وحشی جدا شده از طبعیت انجام شده است، نسبتاً مطلوب است. به عنوان مثال آجایی و فگد (۲۰۰۳)، فعالیت آمیلازی (U/ml) ۴٫۲ برای باسیلوس لیچنیفورمیس و (U/ml) ۶٫۲۴ برای باسیلوس سابتیلیس [۱۸] و نماسیواوام و نیرمالا (۲۰۱۳) فعالیت آمیلازی (U/ml) ۶-۸٫۵ را برای اسپرژیلوس گزارش کردند [۱۹]. البته احتمال اینکه در مطالعه ما، دمای رشد باکتری ۵۰ درجه‌سانتی‌گراد در کاهش فعالیت آمیلازی موثر بوده باشد دور از انتظار نیست. در زمینه ارتباط میزان فعالیت آمیلازی با دمای رشد باکتری می‌توان به مطالعه ویند و همکاران (۱۹۹۴) اشاره کرد. آن‌ها در تحقیقی که موفق به شناسایی باسیلوس استئاروترموفیلوس با پتانسیل بالای تولید آمیلاز مقاوم به حرارت شدند گزارش کردند که آمیلاز مورد مطالعه آن‌ها دارای دمای بهینه فعالیت ۷۰ درجه و pH = ۵٫۵-۶ است و در دمای بهینه رشد باکتری ۶۵ درجه، به عنوان یک آنزیم وابسته به رشد فعالیت می‌کند، اما با کاهش دمای رشد از ۶۵ به ۴۰ درجه سانتی-گراد میزان تولید آمیلاز (U/ml) از ۳٫۹ تا ۱۴۳ افزایش می‌یابد [۲۰]. بنابراین کاهش دما در افزایش میزان تولید آن موثر است و بالعکس. در مطالعه ما، کاهش فعالیت آمیلاز با افزایش دمای بالاتر از ۶۰ درجه سانتی‌گراد می‌تواند ناشی از دناتوره شدن ساختار پروتئینی باشد. پایداری ساختار پروتئین‌ها بستگی به نیروهای تثبیت کننده ناشی از تعداد زیادی از برهمکنش‌های نسبتاً ضعیف مولکولی دارد. در این

شد که شکل ۳ نشان از تایید تشکیل باند ۱۵۰۰ bp و انجام واکنش PCR می‌دهد. از نرم افزار Geneious prime برای ویرایش توالی‌های نوکلئوتیدی استفاده شد و دو گونه باکتری *Bacillus pumilus* و *Bacillus safensis* توسط بلاست توالی ویرایش شده در سایت <http://www.NCBI.nlm.nih.gov> با ۹۹٪ identity مورد شناسایی قرار گرفت. مطابق شکل ۳، درخت تکامل نژادی رابطه خویشاوندی این جدایه‌ها نمایش داده می‌شود.

میان برهمکنش‌های هیدروفوبی و پیوندهای هیدروژنی بین اتمها و مولکول‌ها نقش اصلی در افزایش مقاومت حرارتی دارد. مکانیسم‌های اصلی تجزیه‌گر در ساختار پایدار پروتئینی مربوط به دامیناسیون آسپاراژین و گلوتامین، و تشکیل سوکسین‌امید در آسپاراتات و گلوتامات است که منجر به هیدرولیز پیوند پپتیدی می‌شود [۲۱].

۳-۴- شناسایی مولکولی جدایه‌های میکروبی

جهت شناسایی مولکولی جدایه‌های میکروبی، ابتدا محصول PCR ناحیه 16S rRNA جدایه‌ها روی ژل اکتروفورز برده

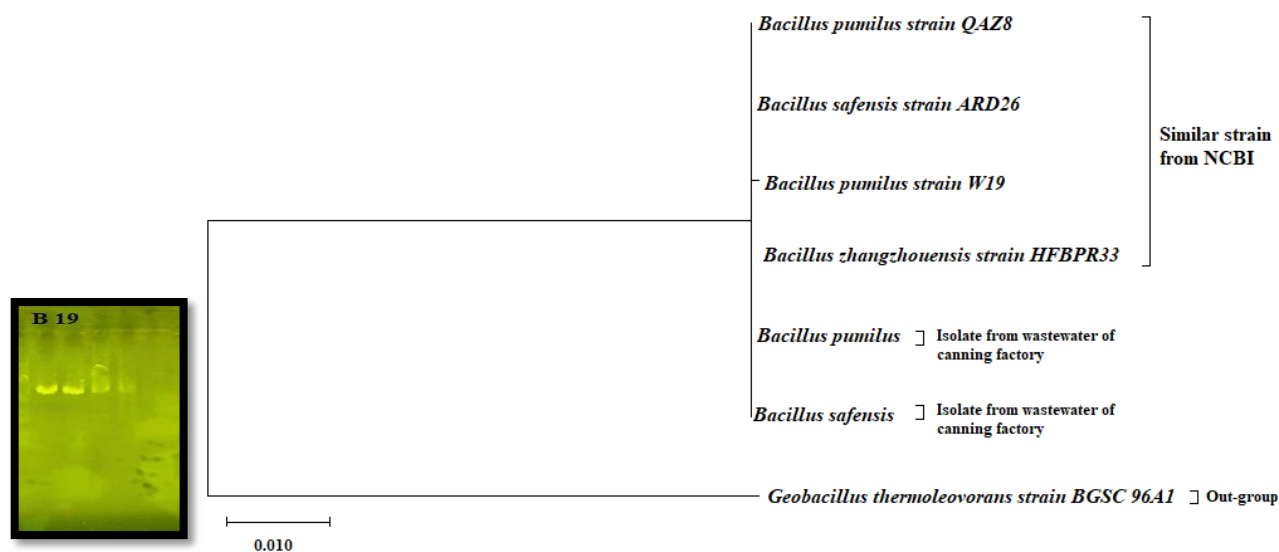


Fig 3. Phylogenetic tree of thermostable amylase producing isolates obtained from wastewater of canning factory

از آنجا که اکثر فرایندهای غذایی معمولاً در دماهای بالا انجام پذیرند، استفاده از آلفا-آمیلازهای گرمادوست با منشأ باکتریایی، که توانایی فعالیت و حفظ ساختار خود در این دماها را دارند، می‌تواند جهت پیش‌برد هرچه بیشتر این فرایندها کمک‌کننده باشند. با افزایش تقاضای آمیلاز در صنعت، مطالعه حاضر به هدف دستیابی به آمیلاز مقاوم به دمای بالا، پساب کارخانه‌ای سس مایونز کم‌چرب را به عنوان منبع احتمالی برای باکتری‌های مولد این آنزیم در نظر گرفت. از آنجا که زمینه کاربرد آنزیم آمیلاز با توجه به ویژگی‌های آن‌ها بسیار گسترده است، تعیین ویژگی‌ها و

توالی ژنی دو گونه باکتری *Bacillus* و *Bacillus pumilus* با *safensis* با Accession number به ترتیب OL774705 و OL774706 در NCBI ثبت گردید. براساس نتایج شناسایی مولکولی جدایه‌ها و همچنین ارزیابی نتایج فعالیت آمیلازی آن‌ها، بنابراین *Bacillus safensis* به عنوان باکتری با پتانسیل تولید آمیلاز با فعالیت بیشتر نسبت به *Bacillus pumilus* تایید شد.

۴- نتیجه‌گیری

گونه *Bacillus pumilus* و *Bacillus safensis* تایید شد. از نظر فعالیت آنزیمی، (7.67 (U/ml)) *Bacillus safensis* دارای فعالیت آمیلازی بیشتری نسبت به (6.33 (U/ml)) *Bacillus pumilus* بود، بنابراین به عنوان باکتری منتخب برای مطالعات بعدی جهت کاربرد آمیلاز در صنایع غذایی پیشنهاد می‌شود.

۵- منابع

- [1] Kumari, N. and K. Sethy, *THE INVERTASE-A REVIEW*. International Journal of Bio-pharmacology, Biotechnology and Allied Sciences, 2020. **1**(2): p. 192-209.
- [2] Deljou, A. and I. Arezi, *Production of thermostable extracellular α -amylase by a moderate thermophilic Bacillus licheniformis isolated from Qinarje Hot Spring (Ardebil prov. of Iran)*. Periodicum Biologorum, 2016. **118**(4).
- [3] Garcia, M.A.V.T., C.F. Garcia, and A.A.G. Faraco, *Pharmaceutical and biomedical applications of native and modified starch: A review*. Starch-Stärke, 2020. **72**(7-8): p. 1900270.
- [4] Matpan Bekler, F. and K. Güven, *Isolation and production of thermostable α -amylase from thermophilic Anoxybacillus sp. KP1 from Diyadin hot spring in Ağrı, Turkey*. Biologia, 2014. **69**(4): p. 419-427.
- [5] Kiran, S., et al., *Isolation and characterization of thermostable amylase producing bacteria from hot springs of Bihar, India*. International Journal of Pharma medicine and biological sciences, 2018. **7**(2): p. 28-34.
- [6] Miller, G.L., *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar*. Analytical chemistry, 1959. **31**(3): p. 426-428.
- [7] Bernfeld, P., [17] *Amylases, α and β* . 1955.
- [8] Bulut, Ç., *Isolation and molecular characterization of lactic acid bacteria from cheese*. 2003: Izmir Institute of Technology (Turkey).
- [9] Davati, N., et al., *Study of lactic acid bacteria community from raw milk of Iranian one humped camel and evaluation of their probiotic properties*. Jundishapur journal of microbiology, 2015. **8**(5).
- [10] Thippeswamy, S., K. Girigowda, and V. Mulimani, *Isolation and identification of α -amylase producing Bacillus sp. from dhal industry waste*. 2006.
- [11] Saxena, R. and R. Singh, *Amylase production by solid-state fermentation of agro-industrial wastes using Bacillus sp.* Brazilian Journal of Microbiology, 2011. **42**: p. 1334-1342.
- [12] Das, K., R. Doley, and A.K. Mukherjee, *Purification and biochemical characterization of a thermostable, alkaliphilic, extracellular α -amylase from Bacillus subtilis DM-03, a strain isolated from the traditional fermented food of India*. Biotechnology and applied biochemistry, 2004. **40**(3): p. 291-298.
- [13] Cordeiro, C.A.M., M.L.L. Martins, and A.B. Luciano, *Production and properties of alpha-amylase from thermophilic Bacillus sp.* Brazilian Journal of Microbiology, 2002. **33**: p. 57-61.
- [14] Hmidet, N., et al., *A novel α -amylase from Bacillus mojavensis A21: purification and biochemical characterization*. Applied biochemistry and biotechnology, 2010. **162**: p. 1018-1030.
- [15] Srivastava, R. and J. Baruah, *Culture conditions for production of thermostable amylase by Bacillus stearothermophilus*. Applied and Environmental Microbiology, 1986. **52**(1): p. 179-184.
- [16] Elkhailil, E.A. and F.Y. Gaffar, *Biochemical characterization of thermophilic amylase enzyme isolated from Bacillus strains*. 2011.
- [17] Kaneko, T., T. Ohno, and N. Ohisa, *Purification and characterization of a thermostable raw starch digesting amylase*

- from a *Streptomyces* sp. isolated in a milling factory. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 2005. **69**(6): p. 1073-1081.
- [18] Ajayi, A. and O. Fagade, *Utilization of corn starch as substrate for β -Amylase by Bacillus SPP.* African Journal of Biomedical Research, 2003. **6**(1).
- [19] Namasivayam, S.K.R. and D. Nirmala, *Evaluation of organic waste liquor media for the production of alpha amylase using Aspergillus niger.* Peak J. Biotechnol, 2013. **1**(2): p. 7-11.
- [20] Wind, R., et al., *Characterization of a new Bacillus stearotheophilus isolate: a highly thermostable α -amylase-producing strain.* Applied Microbiology and Biotechnology, 1994. **41**: p. 155-162.
- [21] Daniel, R.M., M. Dines, and H.H. Petach, *The denaturation and degradation of stable enzymes at high temperatures.* Biochemical journal, 1996. **317**(1): p. 1-11.



Scientific Research

Isolation and identification of thermostable amylase producing bacteria from the wastewater of the canning factorySoudeh Yousefi fakhr¹, Nafiseh Davati^{2*}, Dariush Minai-Tehrani³

1-MSc Student, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

2*-Assistant professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Food Industry, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.

3-Associate professor, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

ABSTRACT

The aim of this study was to isolate thermostable amylase producing bacteria from starch-rich wastewater of one of the canning factories and then molecular identification of these isolates. In addition, the thermostable amylase extracted from the bacterium was investigated for the optimum temperature and pH of enzyme activity. In this study, 14 heat-resistant microbial isolates were isolated from wastewater and only two isolates had amylase activity. Molecular identification of isolates based on amplification of 16S rDNA gene by B27F and U1492R primers and then sequencing of PCR product confirmed the presence of *Bacillus pumilus* and *Bacillus safensis*. The results showed that the optimum temperature and pH of amylase activity were 60°C and 7, respectively, and *Bacillus safensis* 7.67 (U/ml) had more amylase activity than of *Bacillus pumilus* 6.33 (U/ml).

ARTICLE INFO

Article History:

Received: 2023/4/30

Accepted: 2023/7/9

Keywords:

Thermostable amylase,

Bacillus,

Temperature,

Factory wastewater

DOI: 10.22034/FSC.T.20.139.138**DOR:** 20.1001.1.20088787.1402.20.139.9.3*Corresponding Author E-Mail:
n.davati@basu.ac.ir