

شناسایی باکتری‌های جدید با فعالیت آمیلازی بالا در سواحل چوبنده آبادان، بهینه‌سازی و خالص‌سازی آنزیم با فعالیت قابل توجه در سویه‌ی جدید *Salinicoccus roseus*- Persiangulf TA4

چکیده

خلیج فارس به دلیل داشتن ساختار اکولوژیکی منحصربه‌فرد، زیستگاه انواع باکتری‌های دریایی با پتانسیل تولید آنزیم‌های هیدرولیتیک مانند آمیلاز است. با توجه به اهمیت آنزیم‌های میکروبی در صنایع مختلف، این مطالعه باهدف شناسایی، بهینه‌سازی و خالص‌سازی آنزیم آمیلاز از سویه‌های جدید باکتریایی جداشده از شمال خلیج-فارس (بندر چوبنده آبادان) برای اولین بار صورت گرفت. نمونه‌برداری در فصل پاییز، سال ۱۳۹۸ از ۱۰ ایستگاه مختلف (نمونه آب و رسوب) در شرایط کاملاً استریل انجام شد. با بررسی فیلوژنیک توالی 16S rRNA، سویه‌های جدید مولد آمیلاز شامل *Salinicoccus roseus*- Persiangulf TA4، *Pseudomonas oleovorans* - و *Aeromonas hydrophila*- Persiangulf TA8 و Persiangulf T10 شناسایی شدند. سویه‌ی جدید Persiangulf TA4، فعالیت آمیلازی قابل‌توجهی را نسبت به سایر سویه‌ها نشان داد. شرایط بهینه رشد برای سویه‌های TA4، TA8 و TA10 به ترتیب دمای ۳۰، ۳۷ و ۳۰-۳۷ درجه سانتی‌گراد و pH بهینه ۷/۵، ۷/۵ و ۶-۷ و غلظت نمک بهینه ۰/۵، ۰/۰ و ۲/۵ درصد بود. سویه‌ی نمک دوست TA4، در غلظت ۲۵ درصد نمک نیز قادر به رشد بود. شرایط بهینه برای تولید آنزیم توسط سویه TA4 به ترتیب بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون، دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و pH=۷ تشخیص داده شد. همچنین نشاسته و پپتون تولید آمیلاز بیشتری را القا کردند. آنزیم خالص‌شده در مرحله کروماتوگرافی با فعالیت اختصاصی بالا (۸/۸۷ واحد/میلی‌گرم) یافت شد. دما و pH بهینه برای فعالیت آنزیم خالص‌شده، دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۹ بود. این آنزیم در رنج وسیعی از دما و pH قادر به حفظ بخش عمده‌ای از فعالیت خود بود، به‌طوری‌که در دمای ۴۵-۶۵ درجه سانتی‌گراد قادر به حفظ ۹۰-۱۰۰ درصد از فعالیت و در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد، ۸۰/۳۳ درصد از فعالیت خود را داشت. همچنین این آنزیم در محدوده ۶-۱۱ pH قادر به حفظ ۸۰-۱۰۰ درصد از فعالیت خود بود. کاربرد صنعتی این آنزیم جدید TA4، با توجه به ویژگی‌های جالب‌توجه آن با بررسی بیشتر توصیه می‌شود.

واژگان کلیدی: *Salinicoccus roseus*، آمیلاز، خلیج فارس، بهینه‌سازی، خالص‌سازی.

مقدمه

محیط‌زیست دریایی منبع عظیمی از موجودات دریایی می‌باشد که با نوسانات مختلف عوامل فیزیکی مانند شوری بالا، فشار بالا، pH اسیدی، دمای شدید یا ترکیبی از آن‌ها مواجه می‌شوند و این عوامل می‌تواند محیطی منحصربه‌فرد برای میکروارگانیسم‌ها ایجاد کند تا متابولیت‌های ثانویه منحصربه‌فرد با اسکلت‌های کربنی جدید و فعالیت‌های زیستی جدید تولید کنند (Cheng et al., 2020)، بنابراین میکروارگانیسم‌های دریایی می‌توانند قادر به تولید پروتئین‌های متمایز با پتانسیل جدید باشند. اجزای زیست فعال موجود در این موجودات ممکن است در هم‌تایان زمینی آن‌ها

سارا تقوی^۱

رویا ذکاوتی^{۲*}

عفت عباسی منتظری^۳

لاله رومیانی^۴

پروانه صفاریان^۵

۱، ۵. گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.

۲. گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اهواز، اهواز، ایران.

۳. گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران.

۴. گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اهواز، اهواز، ایران.

*مسئول مکاتبات:

roya.zekavati@iauahvaz.ac.ir

کد مقاله: ۱۴۰۱۰۹۳۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۰۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۲۹

این مقاله پژوهشی و برگرفته از رساله دکتری است.

یافت نشود. امروزه اکستروموفیل‌ها دریایی از نظر تولید ترکیباتی زیست فعال که از نظر کاربردهای مختلف بیوتکنولوژیکی برجسته هستند، قابل توجه می‌باشند (Balachandran *et al.*, 2021) و همچنین طیف متنوعی از فعالیت آنزیمی دارند و قادرند واکنش‌های بیوشیمیایی مختلف را با آنزیم‌های جدید کاتالیز کنند (Sabu, 2003).

آمیلازها آنزیم‌های صنعتی مهمی هستند که حدود ۶۵ درصد از بازار جهانی آنزیم را تشکیل می‌دهند و همچنین در مطالعات بیوتکنولوژیکی از اهمیت بالایی برخوردار هستند. آن‌ها دومین گروه بزرگ از آنزیم‌ها در جهان هستند (Gurung *et al.*, 2013). آمیلاز (EC 3.2.1) یک آنزیم هیدرولیتیک است که نشاسته را برای تولید آمیلوز و آمیلوپکتین و مشتقات نشاسته مانند دکسترین و لیگوساکاریدهای آزادکننده گروه‌های احیاکننده هیدرولیز می‌کند (Wolfgang and Sons, 2007). آمیلازها به‌طور گسترده‌ای در بین یوکاریوت‌ها، باکتری‌ها و آرکی‌ها شناسایی شده‌اند و این آنزیم‌ها همچنین نقش مهمی در متابولیسم کربوهیدرات در ارگانیسم‌ها و باکتری‌های مختلف با خواص ضد باکتریایی و ضد سرطانی دارند (Siroosi *et al.*, 2021). آنزیم‌های آمیلولیتیک که نشاسته را تجزیه می‌کنند، کاربردهای مختلف بیوتکنولوژیکی دارند و در تخمیر، تولید مواد غذایی، کاغذ و نساجی اهمیت زیادی دارند. در سال‌های اخیر، هیدرولیز آنزیمی نشاسته به‌طور مؤثر جایگزین روش‌های شیمیایی شده است. آمیلازهای میکروبی با خواص جدید، کاربردهای صنعتی زیادی دارند. این خواص منحصر به فرد شامل فعالیت آنزیمی در محدوده وسیع دما، pH و شوری است (Ullah *et al.*, 2021; Al-Dhabi *et al.*, 2020). آلفا آمیلازهای میکروبی به‌طور گسترده در صنعت نشاسته و در فرآوری مواد غذایی استفاده می‌شود. با پیشرفت تکنولوژی، α -آمیلازها در بسیاری از زمینه‌ها مانند شیمی بالینی و تحلیلی، پزشکی، آبجوسازی و صنایع غذایی برای مایع سازی نشاسته، شیرین سازی و چرخه بیوژئوشیمیایی کربن استفاده می‌شوند و از اهمیت بالایی برخوردار هستند (Gupta *et al.*, 2003; Souza, 2010; Luchian and Csatos, 2010). این آنزیم در حدود ۹۰ درصد از تمام شوینده‌های مایع وجود دارد و حتی استفاده از آلفا آمیلاز در شوینده‌های ظرف‌شویی اتوماتیک به‌طور چشمگیری افزایش یافته است (Ahmadi *et al.*, 2010). آنزیم‌های آمیلاز مشتق شده از باکتری‌ها و قارچ‌ها گزینه بهتری برای تولید صنعتی نسبت به موجودات یوکاریوتی هستند، زیرا کار با آن‌ها آسان‌تر بوده و به راحتی دست‌کاری ژنتیکی می‌شوند و علاوه بر آن پتانسیل تولید انبوه را دارند (Singh *et al.*, 2016; Khan *et al.*, 2011; Matthew *et al.*, 2016). اما برای تولید متابولیت‌های ثانویه، سویه‌های باکتریایی به دلیل زمان، مکان و هزینه کمتر به گونه‌های قارچی ترجیح داده می‌شوند (Aladejana *et al.*, 2020).

گرچه میکروارگانیسم‌های خشکی پتانسیل تولید آنزیم‌های جدید را نیز دارند، اما میکروارگانیسم‌های دریایی ترجیح بیشتری نسبت به خشکی‌ها دارند، زیرا محیط دریایی منبع غنی از موجودات و ترکیبات خاص و متنوع است و همچنین به دلیل شرایط فیزیکی ناپایدار محیط‌زیست دریایی، متابولیت‌ها و آنزیم‌های تولید شده نیز ممکن است در متغیرهای فیزیکی از نظر دما، شوری و pH پایدار باشند که از نظر صنعتی ویژگی بسیار مهمی است (Pomponi, 1999; Ashwini *et al.*, 2011a). غلظت بالای نمک در محیط‌های دریایی باعث تولید آنزیم‌های منحصر به فردی توسط میکروارگانیسم‌ها می‌شود که از نظر درمانی و پزشکی بسیار مفید هستند. علاوه بر این، بیشتر آنزیم‌های باکتریایی دریایی به‌طور قابل توجهی مقاوم به حرارت هستند و برای مدت طولانی در دمای اتاق پایدار می‌مانند (Mohapatra *et al.*, 2003). بنابراین، با غربالگری میکروارگانیسم‌های دریایی، آمیلاز بسیار فعال جدیدی را می‌توان برای کاربردهای بیوتکنولوژیکی و صنعتی کشف کرد (Ashwini *et al.*, 2011b). برای تولید تجاری آلفا آمیلازها در میان گونه‌های باکتریایی، جنس باسیلوس (*Bacillus*) نسبت به سایر جنس‌ها بیشتر مورد مطالعه قرار گرفته است (Konsoula and Liakopoulou-Kyriakides, 2007). گونه‌های باسیلوس دریازی مولد آمیلاز توسط Annamalai و همکاران (۲۰۱۱) از آب‌های بندر کودالور (اقیانوس هند)، Elmansy و همکاران (۲۰۱۸) در خلیج سوئز در شمال غربی دریای سرخ و Simair و همکاران (۲۰۱۷) از آب‌های ساحلی در پاکستان جداسازی شدند. همچنین سایر گونه‌های باکتریایی آبزی مولد آمیلاز مانند *Aeromonas veronii* (Samie *et al.*, 2012)، *Aeromonas salmonicida* (Peng *et al.*, 2015) و *Streptomyces* sp. (Al-Dhabi *et al.*, 2020) شناسایی شدند.

در ایران نیز مطالعات مختلفی در مناطق مختلف برای شناسایی سویه‌های آبی مولد آمیلاز صورت گرفته است، مانند شناسایی باکتری آنوکسی باسیلوس جونسیس (*Anoxybacillus junisis*) مولد آمیلاز در چشمه آبگرم گروه واقع در استان کرمان (افریشم و همکاران، ۱۳۹۶)، شناسایی سویه باسیلوس مولد آلفا آمیلاز در چشمه آبگرم مشکین‌شهر (Fooladi and Sajjadian, 2010) و شناسایی باکتری سودوآلتروموناس مولد آنزیم‌های خارج سلولی در خلیج‌فارس (Ardakani et al., 2012).

این مطالعه برای اولین بار در بندر چوئیده (شمال خلیج‌فارس) باهدف شناسایی باکتری‌های آبی جدید تولیدکننده آمیلاز و خالص‌سازی و بهینه‌سازی آنزیم انجام شد. شهر چوئیده در ۳۵ کیلومتری جنوب شرقی آبادان واقع شده است و چوئیده نسبت به شهرهای آبادان و خرمشهر به خلیج‌فارس نزدیک‌تر است و به‌صورت نوار باریکی به طول ۱۱ کیلومتر در حاشیه رودخانه بهمنشیر شکل گرفته است. تاکنون گزارشی مبنی بر شناسایی سویه‌های مولد آمیلاز در این منطقه ارائه نشده است. با بهینه‌سازی پارامترهای فیزیکی و انتخاب محیط کشت مناسب برای رشد باکتری موردنظر، می‌توان رشد باکتری و در نتیجه تولید آنزیم و فعالیت آن را افزایش داد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری در پاییز سال ۱۳۹۸ از شمال خلیج‌فارس در استان خوزستان در محدوده بندر چوئیده آبادان از ۱۰ ایستگاه مختلف (نمونه آب و رسوب) در شرایط کاملاً استریل انجام شد. جدول ۱ مختصات جغرافیایی مناطق نمونه‌برداری و عمق نمونه‌برداری را نشان می‌دهد. در نمونه‌های آب پس از جمع‌آوری توسط دستگاه نمونه‌بردار در بطری‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری جمع‌آوری شد. نمونه‌های رسوب با استفاده از نمونه‌بردار گرپ ون‌وین استریل شده در کیسه‌های پلاستیکی استریل شده جمع‌آوری شد. این نمونه‌ها تا زمان تحویل به آزمایشگاه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد (روی یخ) نگهداری شدند (Darabpour et al., 2011). شوری و دمای آب با استفاده از دستگاه دیجیتال شوری سنج (DMT-20) و pH آب با استفاده از دستگاه PH متر (EZDO 6011) اندازه‌گیری شد.

تمام نمونه‌های جمع‌آوری شده با توجه به مکان‌های جمع‌آوری شده علامت‌گذاری شدند. از هر نمونه ۶۰ میکرو لیتر آب و نمونه‌های رسوب پس از رقیق‌سازی بر روی پلیت‌های مارین آگار ۲۲۱۶ (هایمدیا)، مک کانگی آگار (مرک) و بلاد آگار (مرک) کشت شدند. پلیت‌های تلقیح شده در دمای ۲۵، ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ تا ۵ روز انکوبه شدند. کلنی‌های توسعه‌یافته با کشت‌های مکرر خالص‌سازی شدند (Darabpour et al., 2011). در نهایت کلنی‌هایی با ویژگی‌های متمایز مانند رنگ‌دانه، اندازه، کدورت، ارتفاع، حاشیه و سطح انتخاب شدند. برای پردازش بیشتر پس از انکوباسیون، کلنی‌های مختلف برای استفاده بیشتر به محیط کشت‌های تازه استریل منتقل شدند (Jayadev and Lekshmi, 2016; Yeon et al., 2005).

جدول ۱: مختصات جغرافیایی مناطق نمونه‌برداری - ایستگاه بندر چوئیده (سال ۱۳۹۸)

شماره مناطق نمونه‌برداری	عرض جغرافیایی شرقی (E)	طول جغرافیایی شمالی (N)	نمونه - عمق نمونه‌برداری
۱	۴۸°۳۵' : ۱۴/۴۸"	۳۰°۹' : ۵۵/۷۸"	آب - یک متر
۲	۴۸°۳۵' : ۱۲/۶۳"	۳۰°۹' : ۵۱/۱۸"	آب - یک متر
۳	۴۸°۳۵' : ۱۰/۷۳"	۳۰°۹' : ۴۸/۸۶"	آب - یک متر
۴	۴۸°۳۵' : ۸/۹۵"	۳۰°۹' : ۴۵/۸۴"	آب - یک متر
۵	۴۸°۳۵' : ۴/۴۱"	۳۰°۹' : ۳۸/۱۸"	آب - یک متر
۶	۴۸°۳۵' : ۲/۵۹"	۳۰°۹' : ۳۷/۶۴"	رسوب - دو متر

شناسایی باکتری‌های جدید با فعالیت آمیلازی بالا در سواحل چوئیده آبادان، بهینه‌سازی و خالص‌سازی آنزیم با ... / تقوی و همکاران

شماره مناطق نمونه‌برداری	عرض جغرافیایی شرقی (E)	طول جغرافیایی شمالی (N)	نمونه - عمق نمونه‌برداری
۷	۴۸°۳۴' : ۵۹/۷۷"	۳۰°۹' : ۳۳/۵۸"	رسوب - دو متر
۸	۴۸°۳۵' : ۵۷/۷۴"	۳۰°۹' : ۳۰/۳۷"	رسوب - سه متر
۹	۴۸°۳۴' : ۵۲/۵۰"	۳۰°۹' : ۲۵/۲۶"	رسوب - سه متر
۱۰	۴۸°۳۴' : ۴۸/۴۸"	۳۰°۹' : ۲۱/۳۶"	رسوب - چهار متر

برای شناسایی باکتری‌های مولد آمیلاز، کلنی‌های خالص روی محیط نشاسته آگار به‌صورت خطی کشت شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، محلول یک درصد روی محیط نشاسته آگار ریخته شد. تشکیل هاله شفاف در اطراف خط رشد نشان‌دهنده نتیجه مثبت است و سویه به‌عنوان تولیدکننده آمیلاز در نظر گرفته شد و وجود رنگ آبی در اطراف رشد نشان‌دهنده نتیجه منفی بود (Ashwini et al., 2011a).

شرایط رشد در دماهای مختلف (۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۳۷، ۴۰ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد)، غلظت نمک مختلف (۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۰، ۱۲/۵، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد) و pH مختلف (۴، ۴/۵، ۵، ۵/۵، ۶، ۶/۵، ۷، ۷/۵، ۸، ۸/۵ و ۹) برای باکتری‌های مولد آمیلاز بهینه‌سازی شد. رشد باکتری به مدت ۴۸ ساعت با خواندن جذب در ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

سویه باکتریایی جداشده دریایی با فعالیت آمیلاز بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی با توجه به روش‌هایی که در کتابچه راهنمای باکتری‌شناسی سیستماتیک Bergey توضیح داده شده است، شناسایی شد (Vos et al., 2011). برای شناسایی مولکولی سویه‌های باکتریایی از توالی یابی 16S rRNA استفاده شد. نمونه‌های DNA باکتری با استفاده از پرایمرهای 16S rRNA فوروارد (5'-TCACGGAGTTT-GATCCTG-3') و معکوس (5'-GCGGCTGCACGTA GTT-3') تکثیر شدند و برای توالی‌یابی ژن 16S rRNA استفاده شدند (Khan et al., 2019). توالی سویه‌های مورد استفاده برای تجزیه و تحلیل از پایگاه داده NCBI GenBank و <https://lpsn.dsmz.de/> بازیابی شد. توالی‌ها با هم تراز شدند و درخت فیلوژنتیک با استفاده از نرم‌افزار MEGA (نسخه ۷) رسم شدند و با استفاده از روش maximum-likelihood (ML) بازسازی شدند. درخت فیلوژنتیک سویه باکتریایی نشان‌دهنده رابطه تکاملی با توالی انتخاب شده است.

برای تولید آمیلاز از محیط تخمیر (گرم بر لیتر) با ترکیبات: ۱۰ گرم نشاسته، ۳ گرم پیتون، ۰/۵ گرم NaCl، ۰/۱ گرم CaCl₂، ۶ گرم Na₂HPO₄، ۳ گرم KH₂PO₄ و ۰/۲۴ گرم MgSO₄ استفاده شد. محیط موردنظر در حجم ۵۰ میلی‌لیتر تهیه شد. pH محیط با HCl ۰/۱ نرمال و NaOH ۰/۱ نرمال بر روی ۷ تنظیم شد. سپس (v/v) ۲ درصد از کشت ۲۴ ساعته در فلاسک‌های ارلن تلقیح شد (Elmansy et al., 2018). محیط کشت در انکوباتور شیکر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۴۰ دور در دقیقه به مدت ۹۶ ساعت انکوبه شد. نمونه هر ۲۴ ساعت از محیط گرفته شد و سپس سانتریفیوژ شد (۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد). فعالیت آنزیمی و محتوای پروتئین مایع رویی به عنوان نمونه آنزیمی خام هر ۲۴ ساعت تخمین زده شد.

فعالیت آمیلاز با اندازه‌گیری کاهش شدت رنگ آبی ناشی از هیدرولیز آنزیمی نشاسته تعیین شد (Palanivelu, 2001). ابتدا، ۱۵۰ میکرو لیتر مایع رویی شفاف (به‌عنوان آنزیم خام) در لوله آزمایش ریخته شد و سپس ۱۵۰ میکرو لیتر محلول ۱ درصد نشاسته (تهیه‌شده در بافر فسفات ۰/۲ مولار pH=۷) به آن اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. سپس با افزودن ۱۵۰ میکرو لیتر HCl ۰/۱ نرمال واکنش متوقف شد و سپس ۱۵۰ میکرو لیتر محلول ید اضافه شد. چگالی نوری (OD) محلول رنگ آبی در ۶۶۰ نانومتر با استفاده از (photon x Ar 2015) Uv-vis array spectrophotometer تعیین شد. یک واحد (U) فعالیت آنزیم به‌عنوان مقدار آنزیمی تعریف می‌شود که ۱ میلی‌گرم نشاسته

را در هر دقیقه و در هر میلی‌لیتر در شرایط بهینه هیدرولیز می‌کند. فعالیت ویژه به‌عنوان واحد فعالیت آنزیم در هر میلی‌گرم پروتئین بیان شد. تمام اندازه‌گیری‌ها سه بار انجام شد و میانگین آن گزارش شد.

محتوای پروتئین با روش برادفورد با استفاده از آلبومین سرم گاوی به‌عنوان استاندارد برآورد شد (Bradford, 1976). در طی مراحل اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها و خالص‌سازی آن‌ها، محتوای پروتئین با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد.

۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط‌های تخمیر متفاوت از نظر pH، دما، غلظت نمک، منبع نیتروژن و کربن با ۲ درصد حجمی / حجمی از کشت ۲۴ ساعته از باکتری موردنظر تلقیح شد و فلاسک‌ها در انکوباتور شیکردار به مدت ۹۶ ساعت انکوبه شدند و فعالیت آنزیم و محتوای پروتئین هر ۲۴ ساعت تخمین زده شد.

برای تعیین زمان انکوباسیون بهینه برای تولید آمیلاز، سویه انتخاب‌شده به مدت ۴ روز متوالی در انکوباتور شیکردار با ۱۴۰ دور در دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و فعالیت آمیلاز آن روزانه کنترل شد. به‌منظور تعیین دمای بهینه برای تولید آمیلاز توسط سویه انتخابی، فعالیت آمیلاز در دماهای مختلف ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۳۷، ۴۰ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد بررسی شد. اثر مقدار pH بر روی تولید آنزیم توسط سویه انتخاب‌شده در محیط تولید بررسی شد. محیط با pH مختلف به‌صورت ۴، ۴/۵، ۵، ۵/۵، ۶، ۶/۵، ۷، ۷/۵، ۸، ۸/۵ و ۹ در لوله‌های مختلف با افزودن ۰/۱ HCl نرمال و ۰/۱ NaOH نرمال تنظیم شد.

برای تولید آمیلاز پنج منبع کربن مختلف مانند نشاسته، مالتوز، ساکارز، لاکتوز و سوربیتول (با غلظت ۱ درصد) و پنج منبع مختلف نیتروژن مانند سولفات آمونیوم، عصاره مخمر، پپتون، عصاره گوشت و کازئین (با غلظت ۱ درصد) در نظر گرفته شد. محیط کشت به‌طور جداگانه با هر منبع تهیه شد و ۰/۱ میلی‌لیتر از باکتری انتخاب‌شده (کشت به مدت ۲۴ ساعت) به محیط تلقیح شد و به مدت ۹۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد.

ابتدا سویه موردنظر در ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت با شرایط بهینه کشت داده شد. برای خالص‌سازی، مایع رویی (آنزیم خام) با استفاده از سولفات آمونیوم تا ۸۰ درصد اشباع در حمام یخ رسوب داده شد. سپس سانتریفیوژ در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد و پروتئین رسوب داده‌شده در حداقل حجم بافر فسفات (۰/۱ مولار، pH=۷) حل شد. محلول آنزیمی در برابر همان بافر به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد دیالیز شد (Ahmed et al., 2020). نمونه دیالیز بر روی ستون سفادکس G-100 که قبلاً با همان بافر متعادل شده بود بارگذاری شد. شستشو با بافر مناسب با سرعت ۲ میلی‌لیتر در دقیقه انجام شد. میزان جذب هر بخش در طول موج ۲۸۰ نانومتر خوانده شد و سپس محتوای پروتئین و فعالیت آنزیمی موردبررسی قرار گرفت. فراکسیون‌های فعال آنزیمی به‌صورت آنزیم خالص جمع‌آوری شدند (Nouadri et al., 2010).

اثرات pH و دما بر فعالیت آنزیم خالص‌سازی شده موردبررسی قرار گرفت. برای بررسی اثر دما، ۱۵۰ میکرو لیتر آنزیم خالص‌شده به‌علاوه ۱۵۰ میکرو لیتر سوبسترا در بافر فسفات با pH=۷ در محدوده دمایی ۹۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد با pH ثابت به مدت زمان ۱۵ دقیقه انکوبه شد. پس از توقف واکنش جذب آن بررسی شد و فعالیت آنزیمی و باقی‌مانده (نسبی) به‌صورت درصد بیان شد. برای بررسی اثر pH، در ابتدا محلول سوبسترا با pH های مختلف (۵-۱۲) تهیه شد. سپس ۱۵۰ میکرو لیتر سوبسترا با pH موردنظر با ۱۵۰ میکرو لیتر نمونه آنزیم خالص‌شده در دمای ثابت ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. بافر فسفات ۰/۱ مولار برای محدوده pH قلیایی و خنثی و بافر ۰/۱ مولار اسفات برای محدوده pH اسیدی استفاده شد. پس از توقف واکنش جذب آن بررسی شد و فعالیت آنزیمی و باقیمانده (نسبی) به‌صورت درصد بیان شد. فعالیت نسبی (درصد) آنزیم آمیلاز، از طریق نسبت فعالیت آنزیم به فعالیت نمونه‌ی شاهد محاسبه شد.

برای مقایسه بین شرایط بهینه مختلف و نیز تعیین اختلاف معنی‌دار بین آن‌ها در سطح احتمال ($P < 0/05$) از تحلیل واریانس یک‌طرفه ANOVA استفاده شد. تمام تحلیل‌های آماری و ترسیم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۶ انجام شد.

نتایج

در مطالعه حاضر گونه‌های مختلف باکتری از نمونه‌های دریایی جمع‌آوری شده از شمال خلیج فارس در استان خوزستان در بندر چوبنده آبادان جداسازی شد. تمامی نمونه‌ها از نظر توانایی تولید آنزیم آمیلاز مورد آزمایش قرار گرفتند. پس از کشت بر روی محیط نشاسته آگار و افزودن محلول ید، هاله شفاف در اطراف خط کشت ایجاد شد (شکل ۱). سه نمونه فعالیت آمیلازی خوبی را بر اساس هاله تشکیل شده در اطراف خط رشد نشان دادند. همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، نمونه شماره ۴ دارای بزرگ‌ترین هاله شفاف و نمونه شماره ۸ دارای کوچک‌ترین هاله شفاف هستند. نمونه‌های شماره ۴ و ۸ از آب و نمونه شماره ۱۰ از رسوب جدا شدند. شناسایی تاکسونومیک ایزوله باکتری با تجزیه و تحلیل 16S rRNA انجام شد. شکل ۲، تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR ژن 16S rRNA برای سویه‌های مولد آنزیم آمیلاز را نشان می‌دهد. توالی باکتری در بانک ژن NCBI بلاست شد و درخت فیلوژنتیک با توالی‌های همولوگ دیگر رسم شد. سویه‌های شماره ۴، ۸ و ۱۰ به ترتیب به‌عنوان سویه‌های جدید *Salinicoccus roseus*- Persiangulf TA4 با شماره دسترسی OK287340، *Aeromonas*-Persiangulf TA8 با شماره دسترسی OK284471 و *Pseudomonas oleovorans* - Persiangulf T10 با شماره دسترسی OK217257 شناسایی شدند. درخت Maximum-likelihood بر اساس توالی‌های ژن ۱۶S rRNA که رابطه سویه‌های Persiangulf TA4، Persiangulf TA8 و Persiangulf TA10 را با سویه‌های مرتبط نشان می‌دهد (جدول ۲ و شکل ۳). برخی از شرایط بهینه نمونه‌های مورد نظر با فعالیت آنزیمی در شکل ۴ نشان داده شده است. دمای بهینه رشد برای نمونه شماره ۴، ۸ و ۱۰ به ترتیب ۳۷، ۳۰ و ۳۷-۳۰ درجه سانتی‌گراد بود. pH بهینه رشد برای سه نمونه به ترتیب ۷/۵، ۷/۵ و ۶-۷ بود و غلظت نمک بهینه برای رشد این باکتری‌ها به ترتیب ۷/۵ درصد، ۰/۰ درصد و ۲/۵ درصد بود. همان‌طور که در نمودار مشاهده می‌شود نمونه‌ی شماره ۴ جز میکروارگانیسم‌های نمک دوست هست، به‌طوری‌که در غلظت ۲۵ درصد نمک نیز قادر به رشد هست.

قطر هاله‌ی ایجادشده در اطراف خط کشت در محیط نشاسته آگار در سویه‌های دارای فعالیت آمیلاز با باکتری باسیلوس سوبتلیس به‌عنوان شاهد مثبت مقایسه شد. قطر هاله‌ی تشکیل شده در اطراف شاهد مثبت، یک میلی‌متر بود و نمونه‌های شناسایی شده در این مطالعه به‌خصوص سویه‌ی Persiangulf TA4 با توجه به اندازه‌ی بزرگ‌تر قطر هاله‌ی تشکیل شده در اطراف خط کشت، به‌عنوان سویه‌هایی با فعالیت آمیلاز بالا انتخاب شدند (شکل ۱).

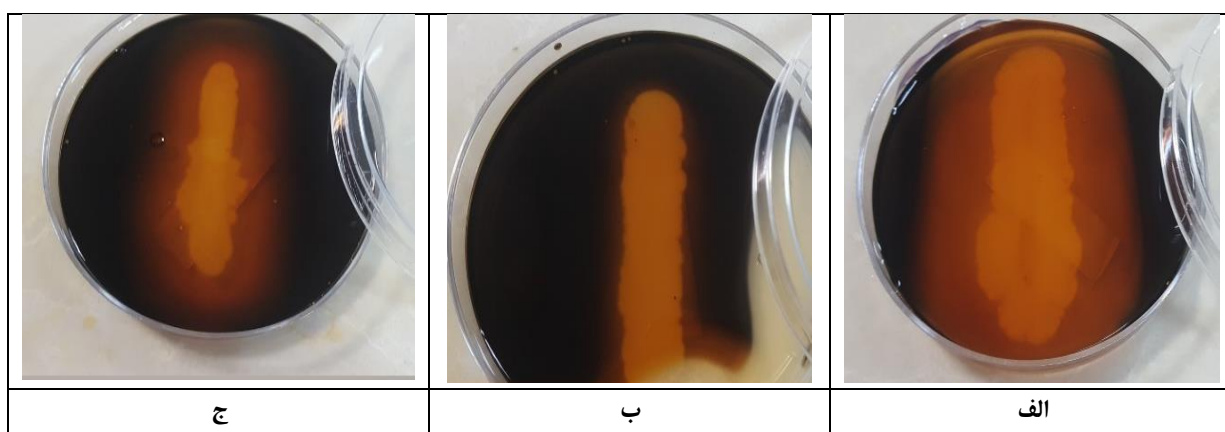
سویه‌های دارای فعالیت آمیلازی در محیط کشت موردنظر کشت داده شدند و شرایط رشد برای آن‌ها بهینه شد. سپس هر ۲۴ ساعت فعالیت آمیلاز آن‌ها بررسی شد تا بهترین سویه از نظر فعالیت آمیلاز برای بهینه‌سازی مشخص شود. همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، آنزیم سویه Persiangulf TA4 بیشترین فعالیت (واحد بر میلی‌لیتر در دقیقه = ۱۳/۹۵ U/ml/min) را در روز دوم و بعدازآن، سویه Persiangulf TA10 در روز اول (۸/۱ واحد بر میلی‌لیتر در دقیقه) نشان داد. سویه Persiangulf TA8 فعالیت کمتری نسبت به سویه‌های دیگر نشان داد و بیشترین فعالیت آن در روز دوم (۴/۴ واحد بر میلی‌لیتر در دقیقه) مشاهده شد. سویه Persiangulf TA4 به‌عنوان سویه برتر انتخاب شد و شرایط تولید آمیلاز برای این سویه بهینه شد و فعالیت آمیلاز و محتوای پروتئین به روش برادفورد در روز دوم برآورد شد.

شکل ۶، اثر دماهای مختلف را بر تولید آمیلاز از *Salinicoccus roseus* سویه Persiangulf TA4 نشان داد. محاسبات آماری نشان داد که اختلاف معناداری بین فعالیت آمیلاز در دماهای مختلف آنکوباسیون وجود دارد، به‌طوری‌که تولید بهینه آمیلاز در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد با میزان پروتئین (۶/۸۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر = mg/ml) و فعالیت آنزیم (۲۳/۰۹ واحد بر میلی‌لیتر در دقیقه) مشاهده شد. در دمای بالاتر و کمتر از این محدوده، فعالیت آنزیمی و محتوای پروتئین کاهش می‌یابد.

اثر pH در محدوده ۵ تا ۸/۵ بر تولید آمیلاز توسط *Salinicoccus roseus* سویه Persiangulf TA4 تعیین شد. در تولید آمیلاز در محیط کشت با pH مختلف، تفاوت معناداری مشاهده شد. pH بهینه برای تولید آمیلاز در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، pH = ۷ بود (محتوای پروتئین:

۶/۴۳ میلی گرم بر میلی لیتر و فعالیت آنزیم: ۲۰/۳۵ واحد بر میلی لیتر در دقیقه) به دست آمد، به طوری که با کاهش و افزایش pH، کاهش تدریجی رشد و تولید آنزیم مشاهده شد (شکل ۶).

سویه Persiangulf TA4 بیشترین میزان پروتئین (۶/۴۰ میلی گرم در میلی لیتر) و فعالیت آنزیمی (۲۰/۴۴ واحد بر میلی لیتر در دقیقه) را به طور معناداری در حضور نشاسته به عنوان منبع کربن نشان داد، در حالی که حداقل محتوای پروتئین (۲/۱۸ میلی گرم در میلی لیتر) و فعالیت آنزیم (۴/۸۲ واحد بر میلی لیتر در دقیقه) را در حضور سوربیتول مشاهده شد نشان داد (شکل ۶). به طور معناداری در حضور پیتون به عنوان منبع نیتروژن حداکثر محتوای پروتئین (۶/۵۲ میلی گرم در میلی لیتر) و فعالیت آنزیم (۲۱/۹۷ واحد بر میلی لیتر در دقیقه) مشاهده شد. عصاره گوشت حداقل محتوای پروتئین (۲/۲۴ میلی گرم در میلی لیتر) و فعالیت آنزیمی (۷/۴۴ واحد بر میلی لیتر در دقیقه) را نشان داد (شکل ۶).

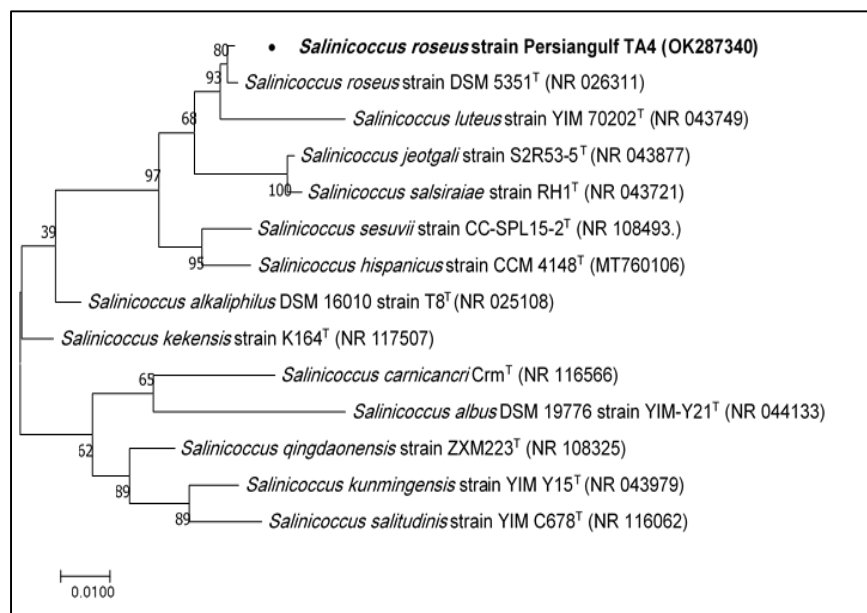


شکل ۱: جداسازی سویه‌های مولد آمیلاز. سویه Persiangulf TA4 (الف)، سویه Persiangulf TA8 (ب) و سویه Persiangulf TA10 (ج).

منطقه شفاف نشان‌دهنده هیدرولیز نشاسته در نتیجه تولید آمیلاز بعد از اضافه کردن محلول ید یک درصد است.



شکل ۲: تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR ژن *SrRNA* ۱۶ برای سویه‌های مولد آنزیم آمیلاز. چاهک اول از سمت چپ (Ladder 1 KB)، چاهک دوم (نمونه ۴)، چاهک سوم (نمونه ۸) و چاهک چهارم (نمونه ۱۰).



شکل ۳: درخت فیلوژنتیک *Salinicoccus roseus*- Persiangulf TA4

درخت Maximum-likelihood، بر اساس توالی‌های ژن *S rRNA* 16، رابطه سویه‌ی Persiangulf TA4 را با سویه‌ی *Salinicoccus roseus* strain DSM 5351^T (T= Type strain) نشان داد.

جدول ۲: شناسایی نزدیک‌ترین گونه به نمونه‌های مولد آمیلاز توسط بلاست توالی‌های *16S rRNA* در پایگاه داده

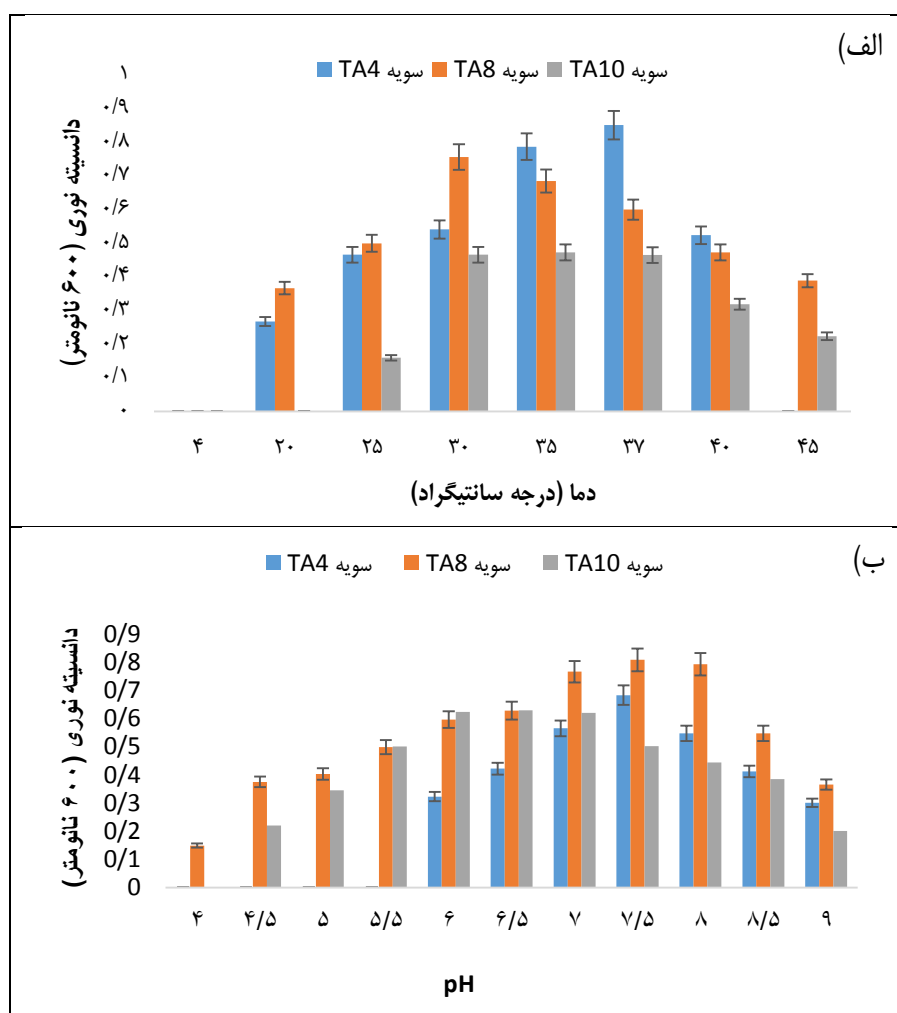
NCBI

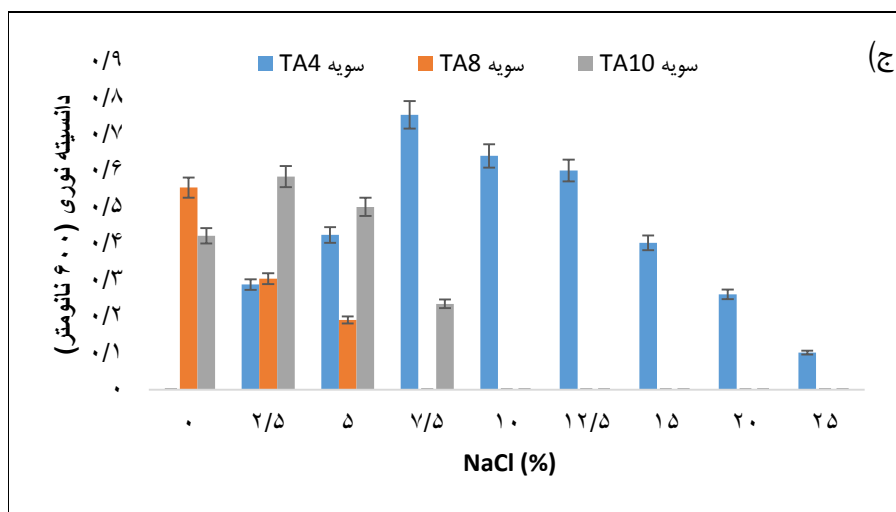
شماره نمونه	نزدیک‌ترین سویه	درصد شباهت (%)	سویه جدید	شماره دسترسی
نمونه شماره ۴	<i>Salinicoccus roseus</i> strain DSM 5351 ^T (NR_026311)	۹۹/۰۲	Persiangulf TA10	OK287340
نمونه شماره ۸	<i>Aeromonas hydrophila</i> strain ATCC 7966 ^T (NR_074841)	۹۹/۷۹	Persiangulf TA8	OK217257
نمونه شماره ۱۰	<i>Pseudomonas oleovorans</i> subsp. <i>oleovorans</i> JCM 11598 ^T (LC507444)	۹۸/۰۵	Persiangulf TA10	OM212978

نتایج حاصل از خالص‌سازی آلفا آمیلاز تولیدشده توسط سویه Persiangulf TA4 در جدول ۳ و شکل ۷ نشان داده شده است. در مرحله اول، فعالیت اختصاصی آنزیم آمیلاز (۵/۱۱ واحد بر میلی گرم پروتئین) نسبت به مرحله قبل (آنزیم خام) افزایش یافت و پس از مرحله دیالیز مجدداً

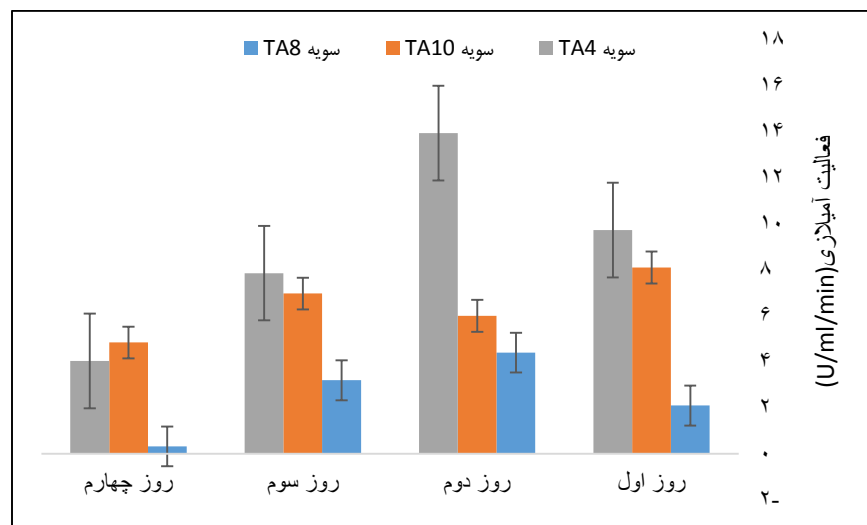
فعالیت اختصاصی آنزیم افزایش یافت (۵/۶۷ واحد بر میلی گرم پروتئین). سپس توسط کروماتوگرافی سفادکس G-100، نمک‌زدایی و حذف پروتئین‌های با وزن مولکولی کم صورت گرفت و بیشتر خالص‌سازی شد. آنزیم خالص‌شده دارای فعالیت اختصاصی بالا (۸/۸۷ U/mg) و مرتبه خالص‌سازی (۲/۲۷) بود.

دما و pH بهینه برای فعالیت آنزیم خالص‌شده دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۹ بود. این آنزیم در محدوده وسیعی از دما و pH قادر به حفظ بخش عمده‌ای از فعالیت خود بود، به‌طوری‌که در دمای ۴۵-۶۵ درجه سانتی‌گراد قادر به حفظ ۹۰-۱۰۰ درصد از فعالیت خود بود و در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد ۸۰/۳۳ درصد فعالیت خود را داشت. همچنین این آنزیم در محدوده pH=۶-۱۱ قادر به حفظ ۸۰-۱۰۰ درصد از فعالیت خود بود (شکل ۸).

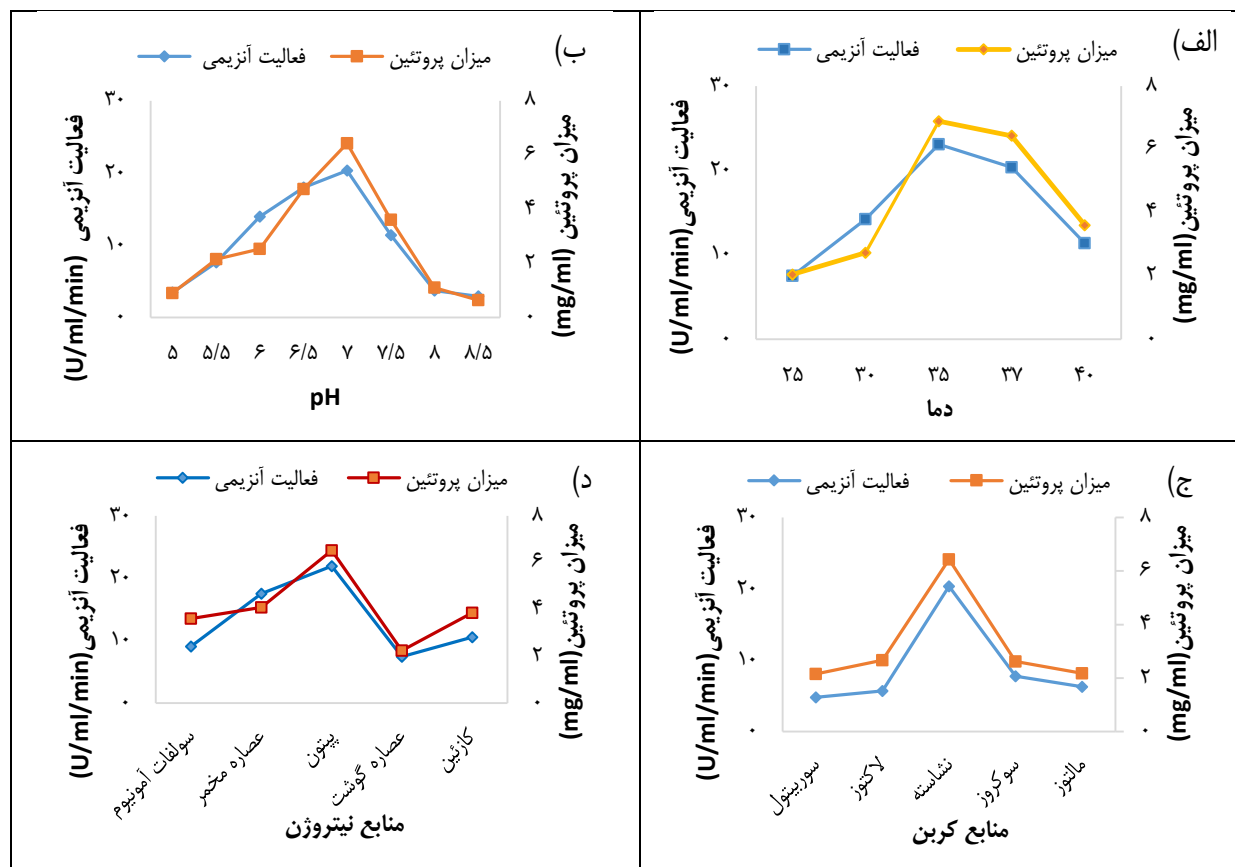




شکل ۴: بررسی میزان رشد سویه‌های TA4، TA8، TA10 Persiangulf از نظر دما (الف)، pH (ب) و درصد نمک (ج) مورد نیاز برای سویه‌های مولد آمیلاز پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون با اندازه‌گیری کدورت در ۶۰۰ نانومتر.



شکل ۵: ارزیابی فعالیت آمیلاز برای سویه‌های TA4، TA8، TA10 برای ۴ روز متوالی.

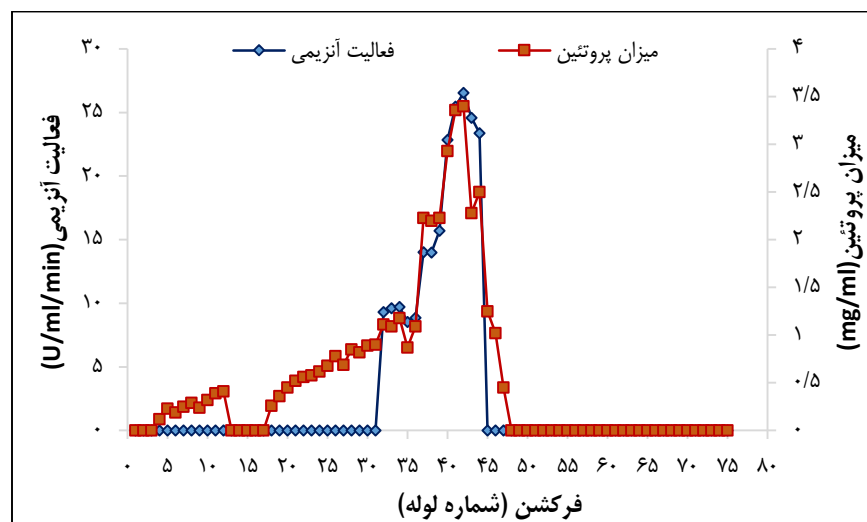


شکل ۶: تأثیر دما (الف)، pH (ب)، منابع کربن (ج) و نیتروژن (د) بر روی تولید و فعالیت آنزیمی سویه *Salinicoccus roseus*-Persiangulf TA4.

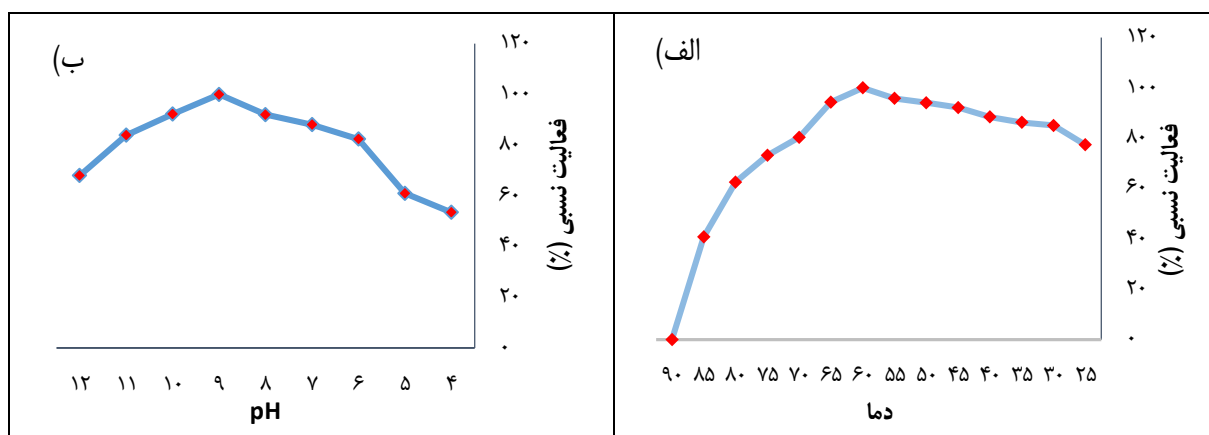
جدول ۳: خلاصه‌ای از روش‌های خالص‌سازی آلفا آمیلاز تولیدشده از سویه *Salinicoccus roseus*-Persiangulf TA4.

مرحله خالص‌سازی	حجم (میلی لیتر)	فعالیت آنزیمی	کل فعالیت آنزیمی	میزان پروتئین	کل میزان پروتئین	فعالیت اختصاصی	مرتبه خالص‌سازی
مابع رویی محیط کشت (آنزیم خام)	۵۰۰	۲۵/۶۱	۱۲۸۰۵	۶/۵۳	۳۲۶۵	۳/۹۱	۱
رسوب‌دهی با سولفات آمونیوم ۸۰٪	۲۵	۳۰/۳۵	۷۵۸/۷۵	۵/۹۳	۱۴۸/۲۵	۵/۱۱	۱/۳۰
دیالیز	۲۵	۲۹/۶۱	۷۴۰/۲۵	۵/۲۲	۱۳۰/۵	۵/۶۷	۱/۴۴
کروماتوگرافی سفادکس G-100	۲	۲۶/۵۵	۵۳/۱۰	۲/۹۹	۵/۹۸	۸/۸۷	۲/۲۷

شناسایی باکتری‌های جدید با فعالیت آمیلازی بالا در سواحل چوبنده آبادان، بهینه‌سازی و خالص‌سازی آنزیم با ... / تقوی و همکاران



شکل ۷: کروماتوگرام آلفا آمیلاز خالص تولیدشده توسط *Salinococcus roseus*- Persiangulf TA4.



شکل ۸: اثر دما (الف) و pH (ب) بر فعالیت نسبی آنزیم خالص شده.

بحث و نتیجه‌گیری

موجودات مختلف زمینی و دریایی پتانسیل تولید آنزیم‌های مهم خارج سلولی از جمله آمیلاز را دارند، اما موجودات دریایی به‌ویژه پروکاریوت‌ها مانند باکتری‌ها و قارچ‌ها به دلیل ویژگی‌های ساختاری محیط خود، آنزیم‌هایی با ساختار منحصر به فرد تولید می‌کنند که از نظر کاربرد صنعتی، اهمیت آن‌ها ثابت شده است (Annamalai et al., 2011; Homaei et al., 2016). سه سویه‌ی جدید با فعالیت آمیلاز قابل توجه برای اولین بار در منطقه شمالی خلیج فارس (بندر چوبنده آبادان) شناسایی شد.

سویه *Salinococcus roseus*- Persingulf TA4 بیشترین فعالیت آمیلاز را در روز دوم (۴۸ ساعت) انکوباسیون نشان داد. تاکنون هیچ تحقیقی مبنی بر جداسازی این سویه با فعالیت آمیلازی در ایران گزارش نشده است. فعالیت آنزیمی به دلیل ورود سلول‌های میکروبی به فاز زوال کاهش می‌یابد و با مصرف ترکیبات موجود در محیط کشت و تولید محصولات جانبی، سلول‌ها وارد فاز مرگ می‌شوند؛ بنابراین تولید آنزیم آمیلاز

می‌تواند به مراحل رشد باکتری‌ها در محیط کشت بستگی داشته باشد و در فاز مرگ تولید کاهش می‌یابد (Simair et al., 2017; Mulimani and Patil, 2000; Aiyyer, 2005; Teodoro and Martins, 2000). در این مطالعه دمای بهینه برای فعالیت آمیلاز ۳۵ درجه سانتی‌گراد بود، درحالی‌که در برخی از مطالعات دمای بهینه برای سایر موجودات متفاوت گزارش شده است. دمای یکی دیگر از عوامل مؤثر بر رشد و تولید آنزیم‌های میکروبی است و محدوده دمایی مطلوب برای هر سلول میکروبی متفاوت است (Sivakumar et al., 2011). مشابه با نتایج این مطالعه، دمای بهینه رشد برای باکتری باسیلوس جداسده از اسفنج دریایی در آب‌های بوشهر (Matroodi et al., 2022) و باکتری آززی *Salinicoccus* sp. JAS4 تولیدکننده آمیلاز جداسده در هند (Jayachandra et al., 2012) به ترتیب دمای ۳۵ و ۳۴ درجه سانتی‌گراد بود.

pH محیط کشت نقش مهمی در رشد میکروارگانیسم‌ها، تولید و فعالیت آنزیم دارد و خارج از محدوده pH بهینه، رشد و در نتیجه تولید آنزیم کاهش می‌یابد (Singh et al., 2012; Demirkan et al., 2017). pH بهینه برای فعالیت آمیلاز توسط سویه *Persiangulf* TA4 در pH خنثی مشاهده شد. برخلاف نتایج مطالعه حاضر، شرایط بهینه رشد برای باکتری باسیلوس جداسده از آب‌های بوشهر pH برابر ۱۲ گزارش شد (Matroodi et al., 2022) و همچنین باکتری *Salinicoccus* sp. در محدوده pH حدود ۱۱-۶ قادر به رشد بود (Jayachandra et al., 2012). مشابه نتایج این مطالعه، بهینه رشد باکتری *Salinicoccus iranensis* sp. جداسده از پساب صنایع نساجی در قم توسط Amoozegar و همکاران (۲۰۰۸)، دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و pH برابر با ۷/۵ بود.

رشد بهینه سویه *Persiangulf* TA4 در حضور ۷/۵ درصد نمک مشاهده شد و این سویه قادر به رشد در حضور ۲۵ درصد نمک نیز بود و جز میکروارگانیسم‌های نمک دوست محسوب می‌شود. رشد بهینه باکتری *Salinicoccus iranensis* نیز در حضور ۱۰-۷/۵ درصد نمک مشاهده شد (Amoozegar et al., 2008). باکتری شدیداً نمک دوست *Salinicoccus* sp. JAS4، در حضور ۲۵-۲ درصد NaCl قادر به رشد بود، ولی رشد بهینه در حضور ۱۰ درصد نمک مشاهده شد (Jayachandra et al., 2012). Ravi و Patel (۲۰۱۵)، باکتری دریایی نمک دوست *Salinicoccus roseus* مولد آمیلاز را در هند جداسازی کردند. فعالیت بهینه آمیلاز این باکتری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، pH=۸ و غلظت نمک ۵ درصد گزارش شد. Sánchez-Porro و همکاران (۲۰۰۳) سویه *Salinicoccus* تولیدکننده آمیلاز را در اسپانیا جداسازی کردند. این باکتری‌ها قادر بودند در محیط‌های دارای ۱۵-۵ درصد نمک و در بیشتر موارد تا ۲۰-۲۵ درصد نمک رشد بهینه داشته باشند. pH بهینه برای تولید و فعالیت آمیلاز در سایر گونه‌های باکتریایی مانند *Aeromonas veronii* NS07 (Samie et al., 2012)، *Streptomyces* sp. (Lakshmi et al., 2020)، *Bacillus* sp. Q-164 (Peng et al., 2015)، *Aeromonas salmonicida* (Al-Dhabi et al., 2020) به ترتیب ۴، ۶، ۷ و ۸ گزارش شده است. به‌طور مشابه، بالاترین تولید آمیلاز توسط *Pseudomonas mendocina* (Padhiar and Kommu, 2016) در pH حدود ۷ و pH بهینه برای فعالیت آنزیمی *Pseudoalteromonas* sp. ۷/۵ گزارش شده است (محدوده طبیعی) (Wang et al., 2019).

به‌طور مشابه، تولید آمیلاز توسط سویه *Pseudomonas luteola* بین دمای ۳۳ تا ۳۷ درجه سانتی‌گراد گزارش شده است (Khannous et al., 2014). دمای بهینه برای فعالیت آمیلاز در سایر گونه‌های باکتریایی مانند *Bacillus* sp. NRC22017 (Elmansy et al., 2018)، *Bacillus* sp. Q-164 (CH et al., 2020)، *Aeromonas hydrophila* (Gupta et al., 2003)، *Aspergillus niger* (Rosés and Guerra, 2009) و *Aeromonas veronii* NS07 (Samie et al., 2012) به ترتیب در دمای ۴۵، ۳۸، ۳۷، ۳۰ و ۱۰ درجه سانتی‌گراد گزارش شده‌اند. تولید بهینه در *Bacillus megaterium* (Sivakumar et al., 2012) و *Aeromonas salmonicida* (Peng et al., 2015) در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد گزارش شده است.

منابع کربن و نیتروژن از دیگر عوامل مؤثر بر رشد میکروبی و تولید و فعالیت آمیلاز هستند. در مطالعه حاضر نشاسته و پیتون به‌عنوان مؤثرترین منابع کربن و نیتروژن بر فعالیت و تولید آمیلاز توسط سویه Persiangulf TA4 شناسایی شدند و ساکارز و عصاره مخمر در رتبه دوم قرار گرفتند. در بیشتر تحقیقات روی گونه‌های مختلف باکتری، نشاسته به‌عنوان مؤثرترین منبع کربن برای تولید آمیلاز شناسایی شده است، اما این موضوع برای همه باکتری‌ها صادق نیست و سایر قندها ممکن است در تولید آنزیم‌ها مؤثرتر باشند (Al-Dhabi et al., 2020). در مورد باکتری‌های دیگر، به‌طور مشابه، تولید بهینه توسط *Bacillus sp.* (Teodoro and Martins, 2000; CH et al., 2020) و *Bacillus megaterium* (Sivakumar et al., 2012) و *Aspergillus oryzae* (Pedersen and Nielsen, 2000) در حضور عصاره مخمر گزارش شده است. به‌طور مشابه، حداکثر فعالیت *Pseudomonas stutzeri* در حضور نشاسته و پیتون مشاهده شد (Dutta et al., 2016). Elkady و همکاران (۲۰۱۷) و Gangadharan و همکاران (۲۰۰۶) گزارش کردند که *Bacillus sp.* NRC12017 و *Bacillus amyloliquefaciens* بالاترین بازده آنزیم را با حضور نشاسته محلول و به دنبال آن مالتوز نشان دادند.

در این مطالعه، آنزیم آمیلاز خالص‌شده سویه Persiangulf TA4 در محدوده وسیعی از دما و pH قادر به حفظ بخش عمده‌ای از فعالیت خود بود. دما و pH بهینه برای فعالیت آنزیم خالص‌شده دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و pH برابر ۹ بود و آنزیم در pH محدوده ۶-۱۱ قادر به حفظ ۸۰-۱۰۰ درصد از فعالیت خود بود. شرایط بهینه برای فعالیت آنزیم باکتری باسیلوس جداشده از چشمه آب گرم مشکین_شهر، pH برابر با ۶ و دمای بین ۶۰ تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد بود. کاهش در فعالیت آنزیم در مقادیر بالای ۸۰ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد؛ اما عصاره آنزیمی ۱۰۰ درصد از فعالیت اولیه را به ترتیب به مدت ۴۵ دقیقه در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد حفظ کرد. پس از این مدت فعالیت به‌شدت کاهش یافت (Fooladi and Sajjadian, 2010). در مطالعه حاضر آنزیم آمیلاز، در دمای ۴۵-۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه قادر به حفظ ۹۰-۱۰۰ درصد از فعالیت خود بود و در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه، ۸۰/۳۳ درصد فعالیت خود را داشت. Wang و همکاران (۲۰۱۹) دما و pH بهینه برای فعالیت آنزیم خالص‌شده در سویه *Pseudoalteromonas sp.* M175 را به ترتیب ۳۰ درجه سانتی‌گراد و ۷/۵ گزارش کردند.

میزان فعالیت آنزیم آمیلاز خالص‌شده سویه Persiangulf TA، ۲۶/۵۵ واحد/میلی‌لیتر/ دقیقه مشاهده شد. حداکثر فعالیت آمیلازی باکتری *Bacillus sp.* NRC22017 در شرایط بهینه ۱۵/۱۵ واحد/میلی‌لیتر گزارش شد. در این گزارش یک واحد (U) فعالیت آنزیم به‌عنوان مقدار آنزیمی اطلاق شده است که ۰/۵ میلی‌گرم نشاسته را در هر دقیقه و در هر میلی‌لیتر در شرایط بهینه هیدرولیز می‌کند، ولی در این مطالعه یک واحد فعالیت آنزیم به‌عنوان مقدار آنزیمی است که یک میلی‌گرم نشاسته را در هر دقیقه و در هر میلی‌لیتر هیدرولیز کند (Elmansy et al., 2018). Matroodi و همکاران (۲۰۲۰)، میزان فعالیت آمیلاز تولیدشده توسط باکتری باسیلوس جداشده از اسفنج دریایی در آب‌های بوشهر را ۱۰۹ واحد و Aladejana و همکاران (۲۰۲۰)، فعالیت آمیلاز خالص تولیدشده توسط باکتری *Bacillus subtilis* Y25 را ۱۱۲/۳۷ واحد/میلی‌لیتر گزارش کردند. در این دو مطالعه محاسبات بر اساس میکروگرم صورت گرفته است؛ یعنی میزان فعالیت آنزیمی بر اساس میلی‌گرم، به ترتیب ۰/۱۰۹ و ۰/۱۱۲ واحد/میلی‌لیتر می‌باشد که در برابر فعالیت آمیلاز سویه Persiangulf TA4 خیلی کمتر می‌باشد. Wang و همکاران (۲۰۲۰) حداکثر فعالیت آمیلازی باکتری *Pseudoalteromonas sp.* M175 را ۵/۹ واحد/میلی‌لیتر گزارش کردند. Demirkan و همکاران (۲۰۱۷) فعالیت آمیلاز سویه *Bacillus sp.* M10 را حدود ۳۰ واحد/میلی‌لیتر در مدت ۱۰ دقیقه گزارش کردند؛ یعنی میزان فعالیت آنزیم در مدت یک دقیقه برابر با ۳ واحد/میلی‌لیتر می‌باشد که کمتر از فعالیت آمیلازی سویه Persiangulf TA4 می‌باشد، بنابراین این سویه به‌عنوان یک سویه با فعالیت قابل توجه می‌باشد.

در سال‌های اخیر، مطالعات زیادی در مورد پتانسیل میکروب‌های آبی برای تولید ترکیبات فعال بیولوژیکی انجام شده است. با توجه به اینکه محیط‌های آبی شرایط بسیار متفاوتی با محیط‌های خشکی دارند، تقریباً هر موجود زنده‌ای در این محیط‌ها ترکیبات منحصر به فردی تولید می‌کند؛ بنابراین خلیج فارس می‌تواند منبع غنی آنزیم‌هایی با عملکردهای مختلف باشد. علاوه بر این، آنزیم‌های میکروبی به‌ویژه باکتری‌ها نسبت به

آنزیم‌های مشتق شده از منابع دیگر دارای خواص برتری هستند و بر اساس ویژگی‌های زیست‌محیطی خود می‌توانند محصولات متنوعی تولید کنند. در این مطالعه، سویه‌های جدید با فعالیت آمیلاز برای اولین بار در شمال خلیج فارس (بندر چوئیده) شناسایی شدند. سویه *Salinicoccus roseus*-Persiangulf TA4 در بین سویه‌های مولد آمیلاز جدا شده از بندر چوئیده، به‌عنوان سویه با فعالیت آمیلاز بالاتر انتخاب شد. با توجه به ویژگی‌های جالب‌توجه این آنزیم و فعال بودن آنزیم در محدوده وسیعی از دما و pH، می‌توان آن را برای اهداف صنعتی بیشتر مورد مطالعه قرار داد.

منابع

- افرشیم، س.، بدویی دلفارد، ا.، نمکی شوشتری، ع. و کرمی، ز.، ۱۳۹۶. تولید و ارزیابی مشخصات آنزیم آلفا آمیلاز گرمادوست و نمک دوست جدا شده از باکتری آنوکسی باسیلوس جونسیس AT23. فصلنامه علمی پژوهشی دنیای میکروب‌ها، ۱۰ (۲): ۱۷۶-۱۹۱.
- Ahmadi, A., Ghobadi, S., Khajeh, K., Nomanpour, B. and Dalfard, A. B. J. o. t. I. C. S., 2010. Purification of α -amylase from *Bacillus* sp. GHA1 and its partial characterization, Journal of Iran Chemical Society, 7(2): 432-440.
- Ahmed, N. E., El Shamy, A. R. and Awad, H. M., 2020. Optimization and immobilization of amylase produced by *Aspergillus terreus* using pomegranate peel waste. Bulletin of the National Research Centre, 44(1): 1-12.
- Aiyer, P. V., 2005. Amylases and their applications. African Journal of Biotechnology, 4(13).
- Al-Dhabi, N. A., Esmail, G. A., Ghilan, A.-K. M., Arasu, M. V., Duraipandian, V. and Ponmurugan, K., 2020. Isolation and purification of starch hydrolysing amylase from *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-46 obtained from the Jazan region of Saudi Arabia with industrial applications. Journal of King Saud University-Science, 32(1): 1226-1232.
- Aladejana, O. M., Oyedeji, O., Omoboye, O. and Bakare, M. J. N. S. B., 2020. Production, purification and characterization of thermostable alpha amylase from *Bacillus subtilis* Y25 isolated from decaying yam (*Dioscorea rotundata*) tuber, Notulae Scientia Biologicae, 12(1): 154-171.
- Amoozegar, M. A., Schumann, P., Hajighasemi, M., Ashengroph, M. and Razavi, M. R., and 2008. *Salinicoccus iranensis* sp. nov, a novel moderate halophile, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 58(1): 178-183.
- Annamalai, N., Thavasi, R., Vijayalakshmi, S. and Balasubramanian, T., 2011. Extraction, purification and characterization of thermostable, alkaline tolerant α -amylase from *Bacillus cereus*. Indian journal of Microbiology, 51(4): 424-429.
- Ardakani, M. R., Poshtkouhian, A., Amoozegar, M. A. and Zolgharnein, H., 2012. Isolation of moderately halophilic *Pseudoalteromonas* producing extracellular hydrolytic enzymes from persian gulf. Indian journal of Microbiology, 52(1): 94-98.
- Ashwini, K., Gaurav, K., Karthik, L. and Bhaskara Rao, K., 2011a. Optimization, production and partial purification of extracellular α -amylase from *Bacillus* sp. marini. Archives of Applied Science Research, 3(1): 33-42.
- Balachandran, C., Vishali, A., Nagendran, N. A., Baskar, K., Hashem, A. and Abd-Allah, E. F., 2021. Optimization of protease production from *Bacillus halodurans* under solid state fermentation using agrowastes. Saudi Journal of Biological Sciences, 28.8: 4263-4269
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry, 72(1-2): 248-254.
- CH, C. M., Gayatri, K., Manisha, P. and Aishwarya, K., 2020. Statistical optimization of amylase production and its purification from a palm wine isolate *Bacillus* sp., Q-164. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 29:101820.
- Cheng, T., Ismail, N., Kamaruding, N., Saidin, J. and Danish-Daniel, M., 2020. Industrial enzymes-producing marine bacteria from marine resources. Biotechnology Reports, 27: e00482.

- Darabpour, E., Ardakani, M. R., Motamedi, H. and Ronagh, M. T., 2011.** Isolation of a broad spectrum antibiotic producer bacterium, *Pseudoalteromonas piscicida* PG-02, from the Persian Gulf. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 6(2): 74-83.
- Demirkan, E., Sevgi, T. and Başkurt, M., 2017.** Optimization of Physical Factors Affecting the Production of the α -Amylase from a Newly Isolated *Bacillus* sp. M10 Strain. *Karaelmas Science and Engineering Journal*, 7(1).
- Dutta, P., Deb, A. and Majumdar, S., 2016.** Optimization of the medium for the production of extracellular amylase by the *Pseudomonas stutzeri* ISL B5 isolated from municipal solid waste. *International journal of microbiology*, 2016.
- El-Kady, E. M., Asker, M. S., Hassanein, M. S., Elmansy, E. A. and El-Beih, F. M., 2017.** Optimization, production, and partial purification of thermostable α -amylase produced by marine bacterium *Bacillus* sp. NRC12017. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9(8): 558-570.
- Elmansy, E. A., Asker, M. S., El-Kady, E. M., Hassanein, S. M. and Fawkia, M., 2018.** Production and optimization of α -amylase from thermo-halophilic bacteria isolated from different local marine environments. *Bulletin of the National Research Centre*, 42(1): 1-9.
- Fooladi, J. and Sajjadian, A., 2010.** Screening the thermophilic and hyperthermophilic bacterial population of three Iranian hot-springs to detect the thermostable α -amylase producing strain. *Iranian journal of microbiology*, 2(1): 46.
- Gangadharan, D., Sivaramakrishnan, S., Nampoothiri, K. M. and Pandey, A., 2006.** Solid culturing of *Bacillus amyloliquefaciens* for alpha amylase production. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2).
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K. and Chauhan, B., 2003.** Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 38(11): 1599-1616.
- Gurung, N., Ray, S., Bose, S. and Rai, V. J. B. r. i., 2013.** A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *BioMed research international*, 2013
- Homaei, A., Ghanbarzadeh, M. and Monsef, F., 2016.** Biochemical features and kinetic properties of α -amylases from marine organisms. *International journal of biological macromolecules*, 83: 306-314.
- Jayachandra, S., Anil Kumar, S., Merley, D. P. and Sulochana, M.B., 2012.** Isolation and characterization of extreme halophilic bacterium *Salinicoccus* sp. JAS4 producing extracellular hydrolytic enzymes. *Recent Research in Science and Technology*, 4(4).
- Jayadev, A. and Lekshmi, M., 2016.** Screening and Isolation of Protease producing Marine Bacteria. *Emergent Life Sciences Research*, 2: 73-76.
- Khan, I. A., Jahan, P., Hasan, Q. and Rao, P., 2019.** Genetic confirmation of T2DM meta-analysis variants studied in gestational diabetes mellitus in an Indian population. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 13(1): 688-694.
- Khan, J. A., Yadav, S. K., 2011.** Production of alpha amylases by *Aspergillus niger* using cheaper substrates employing solid state fermentation. *International journal of Plant, Animal and Environmental Science*, (1): 100-108.
- Khannous, L., Jrad, M., Dammak, M., Miladi, R., Chaaben, N., Khemakhem, B., . . . Fendri, I., 2014.** Isolation of a novel amylase and lipase-producing *Pseudomonas luteola* strain: study of amylase production conditions. *Lipids in health and disease*, 13(1): 1-9.
- Konsoula, Z. and Liakopoulou-Kyriakides, M. J. B. T., 2007.** Co-production of α -amylase and β -galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates. *Bioresource Technology*, 98(1):150-157.
- Lakshmi, S. S., Mahesh, C. H., Gayatri, K., Manisha, P. and Aishwarya, K., 2020.** Statistical optimization of amylase production and its purification from a palm wine isolate *Bacillus* sp., Q-164. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 29: 101820.
- Luchian, M. and Csatlos, C. J. J. o. E., 2010.** Research on the effect of α -amylase used in bakery. *Journal of EcoAgriTourism*, 6(3): 111-115.
- Matroodi, S., Shakeri, S. and Jomehzadeh, N. J. J. o. O., 2022.** Optimization Amylase Production in Bacteria from Marine Sponges. *Journal of Oceanography*, 12(48): 41-51.

- Matthew, J., Vazhacharickal, P. J., Sajeshkumar, N. and John, N. K., 2016.** Comparative study of the activity of amylase produced by *Aspergillus niger* through solid state fermentation (SSF) using various starchy materials. *Indian Journal of Plant Science*, 5(1): 79-90.
- Mohapatra, B., Bapuji, M. and Sree, A. J., 2003.** Production of industrial enzymes (amylase, carboxymethylcellulase and protease) by bacteria isolated from marine sedentary organisms. *Acta Biotechnologica*, 23(1): 75-84.
- Mulimani, V. and GN Patil, R., 2000.** α -Amylase production by solid state fermentation: a new practical approach to biotechnology courses. *Biochemical Education*, 28(3): 161-163.
- Nouadri, T., Meraihi, Z., Shahrazed, D. D. and Leila, B., 2010.** Purification and characterization of the-amylase isolated from *Penicillium camemberti* PL21. *African Journal of Biochemistry Research*, 4(6): 155-162.
- Padhiar, A. and Kommu, S., 2016.** Isolation, characterization and optimization of bacteria producing amylase. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, 3(7): 1-7.
- Palanivelu, P., 2001.** Analytical biochemistry and separation techniques. Palkalai Nagar, Madurai, pp.60-62.
- Pedersen, H. and Nielsen, J., 2000.** The influence of nitrogen sources on the α -amylase productivity of *Aspergillus oryzae* in continuous cultures. *Applied microbiology and biotechnology*, 53(3): 278-281.
- Peng, H., Chen, M., Yi, L., Zhang, X., Wang, M., Xiao, Y. and Zhang, N., 2015.** Identification and characterization of a novel raw-starch-degrading α -amylase (AmyASS) from the marine fish pathogen *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*. *Journal of Molecular Catalysis b: Enzymatic*, 119: 71-77.
- Pomponi, S. A., 1999.** The bioprocess-technological potential of the sea. In *Progress in Industrial Microbiology* (Vol. 35, pp. 5-13): Elsevier.
- Ravi, R. and Patel, P. J., 2015.** Isolation and characterization of hydrolytic enzyme producing halophilic bacteria *Salinicoccus roseus* from okha. *International Journal of Microbiology Research*, 0975-5276.
- Rosés, R. P. and Guerra, N. P., 2009.** Optimization of amylase production by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation using sugarcane bagasse as solid support material. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(11):1929-1939.
- Sabu, A., 2003.** Sources, properties and applications of microbial therapeutic enzymes.
- Samie, N., Noghabi, K. A., Gharegozloo, Z., Zahiri, H. S., Ahmadian, G., Sharafi, H., . . . Vali, H., 2012.** Psychrophilic α -amylase from *Aeromonas veronii* NS07 isolated from farm soils. *Process Biochemistry*, 47(9): 1381-1387.
- Sánchez Porro, C., Martin, S., Mellado, E. and Ventosa, A. J. J., 2003.** Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *Journal of applied microbiology*, 94(2): 295-300.
- Simair, A. A., Khushk, I., Qureshi, A. S., Bhutto, M. A., Chaudhry, H. A., Ansari, K. A. and Lu, C., 2017.** Amylase production from thermophilic *Bacillus* sp. BCC 021-50 isolated from a marine environment. *Fermentation*, 3(2): 25.
- Singh, A. M., Latha, B., Chethankumar, M. and Kumar, B. S. J., 2016.** A comparative study on fungal (*Aspergillus niger*) amylase and elephant foot yam (*Amorphophallus campanulatus*) amylase with yam starch as substrate. *International Journal of Applied Research*, 2: 1006-1010.
- Singh, P., Gupta, P., Singh, R. and Sharma, R., 2012.** Factors affecting alfa amylase production on submerged fermentation by *Bacillus* sp. *International Journal of Pharmacy and Life Sciences*, 3(12): 2243-2246.
- Siroosi, M., Borujeni, F. B., Amoozegar, M. A., Babavalian, H. and Hassanshahian, M. J. B., 2021.** Halophilic amylase production and purification from *Haloarcula* sp. strain D61. 11(1): 7382-7392.
- Sivakumar, T., Ramasubramanian, V., Shankar, T., Vijayabaskar, P. and Anandapandian, K., 2011.** Screening of kera screening of keratinolytic bacterial *Bacillus cereus* us from the feather dumping soil of Sivakasi. *Journal of Basic and Applied Biology*, 5(1&2): 305-314.
- Sivakumar, T., Shankar, T., Vijayabaskar, P., Muthukumar, J. and Nagendrakannan, E., 2012.** Amylase production using *Bacillus cereus* isolated from a vermicompost site. *International Journal of Microbiological Research*, 3(2): 117-123.

- Souza, P. M., 2010.** Application of microbial α -amylase in industry-A review. Brazilian journal of microbiology, 41(4): 850-861.
- Teodoro, C. E. d. S. and Martins, M. L. L., 2000.** Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus* sp. Brazilian journal of microbiology, 31: 298-302.
- Teodoro, S. and Martins, A., 2000.** Effect of C: N ratio on alpha amylase production by *B. licheniformis* SPT. African Journal of Biotechnology, 3:519-522.
- Ullah, I., Khan, M. S., Khan, S. S., Ahmad, W., Zheng, L., Shah, S. U., Iqbal, A. J. S., 2021.** Identification and characterization of thermophilic amylase producing bacterial isolates from the brick kiln soil. Saudi journal of biological sciences, 28(1): 970-979.
- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A. and Whitman, W. B., 2011.** Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes (Vol. 3): Springer Science & Business Media.
- Wang, X., Kan, G., Shi, C., Xie, Q., Ju, Y., Wang, R.X., 2019.** Purification and characterization of a novel wild-type α -amylase from Antarctic sea ice bacterium *Pseudoalteromonas* sp. M175. Protein Expression and Purification, 164: 105444.
- Wolfgang, A. J. J. and Sons, N. J., 2007.** Enzymes in industry: Production and applications, 11: 8-13.
- Yeon, S.H., Jeong, W.J. and Park, J. S., 2005.** The diversity of culturable organotrophic bacteria from local solar salterns. The Journal of Microbiology, 43(1):1-10.