

Characterization and increment of amylase production in mutant strains of Iranian native *Bacillus licheniformis*

Mohsen Mobini-Dehkordi*

Assistant Professor of Microbiology, University of Shahrekord, Iran, mobini-m@sci.sku.ac.ir

Sahar Jafari-Dehkordi

M.Sc. of Microbial biotechnology, Shahrekord University, Iran, sahar_jafari91@yahoo.com

Behnaz Saffar

Assistant Professor of Cell and Molecular Biology, University of Shahrekord, Iran, saffar_b@sci.sku.ac.ir

Abstract

Introduction: The amylase enzyme hydrolyze starch and break glycosidic internal bonds of this polysaccharides. Amylases are important industrial enzymes for a wide range of applications including starch conversion to sugar syrup, dextrin production, and use in the pharmaceutical and medical industries.

Materials and methods: In this study, thermophilic bacterium was isolated and purified from the Qynarcheh hot spring in Ardabil. Desired strain suspension in nutrient broth medium was placed in front of UV rays with a wavelength of 254 nm at a distance of 1 meter for 45 seconds in the laminar air flow. The mutant strains were compared to wild type in temperature and salinity tolerance, amylase production content and different antibiotics resistance.

Results: In this study, two interesting mutant strains were isolated and named B.L.2.M.1 and B.L.2.M.2. Mutations caused many changes in bacteria such as cell growth speed and enzyme production content. Differences in cell growth, production of amylase and other characters were significant at 0.05 level ($P_{\text{value}} < 0.05$). B.L.2.M.1 strain produced alpha-amylase enzyme 41.7 percent more than wild type at 40°C for 72 h.

Discussion and conclusion: According to random mutations, the mutated bacterium-B.L.2.M.1- showed new phenotype with increment of enzyme production, increased cell growth rate and increased resistance to higher temperatures, and salinity. According to the unique features created in the mutant, the groundwork for additional studies is provided in order to produce and optimize the thermophilic amylase enzyme.

Key words: *Bacillus licheniformis*, Thermophile, Mutagenesis, Amylase, Ultraviolet ray

* Corresponding author

Received: July 28, 2015/ **Accepted:** May 10, 2016

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال ششم، شماره ۲۱، بهار ۱۳۹۶، صفحه ۸۱-۶۷
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۵/۰۶ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۲/۲۱

بررسی ویژگی‌ها و افزایش تولید آمیلاز در سویه‌های جهش یافته باسیلوس لیکنیفورمیس بومی ایران

محسن مبینی دهکردی*: استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه شهرکرد، ایران، mmobinid@gmail.com
سحر جعفری دهکردی: کارشناسی ارشد زیست‌فناوری میکروبی، دانشگاه شهرکرد، ایران، sahar_jafari91@yahoo.com
بهناز صفار: استادیار زیست سلولی و مولکولی، دانشگاه شهرکرد، ایران، saffar_b@sci.sku.ac.ir

چکیده

مقدمه: آمیلاز آنزیم هیدرولیزکننده نشاسته است که پیوندهای داخلی گلیکوزیدی در پلی ساکاریدها را هیدرولیز می‌کند. آمیلازها یکی از آنزیم‌های صنعتی مهم هستند که گستره وسیعی از کاربردها را دارا هستند؛ از جمله تبدیل نشاسته به شربت قند، تولید سیکلودکسترین‌ها؛ همچنین این آنزیم‌ها در صنعت داروسازی و پزشکی کاربرد دارند.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، سویه *باسیلوس لیکنیفورمیس* گرمادوست و بومی که از چشمه آب گرم روستای قینچه از توابع استان اردبیل جداسازی و خالص‌سازی شده بود در محیط نوترینت براث، در معرض پرتو ماوراءبنفش با طول موج ۲۵۴ نانومتر و از فاصله ۱ متری به مدت ۴۵ ثانیه در دستگاه هودلامینار قرار داده شد. کلیه سویه‌های جهش یافته جداسازی شده از نظر تحمل دمایی و شوری، میزان تولید آمیلاز و همچنین از نظر مقاومت آنتی‌بیوتیکی با سویه والد مقایسه شدند.

نتایج: از بین ۷۰ نمونه جهش یافته جداسازی شده تنها دو سویه به نام‌های *B.L.2.M.1* و *B.L.2.M.2* توانستند میزان بیشتری آمیلاز نسبت به سویه والد تولید کنند. تفاوت در تولید آنزیم با تغییر در میزان رشد باکتری‌های جهش یافته همراه شد؛ به طوری که تمامی اختلاف‌های مشاهده شده از نظر آماری در سطح ۵ درصد معنادار بودند. میزان تولید آنزیم در سویه *B.L.2.M.1* در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد بعد از ۷۲ ساعت ۴۱/۷ درصد نسبت به سویه والد افزایش نشان داد. از طرف دیگر میزان تحمل دمایی و شوری در باکتری جهش یافته *B.L.2.M.1* از سایر باکتری‌های مطالعه شده بیشتر ارزیابی شد.

بحث و نتیجه‌گیری: برآیند جهش‌های تصادفی ایجاد شده در باکتری جهش یافته *B.L.2.M.1* سبب بروز فنوتیپ جدیدی شده است که افزایش میزان تولید آنزیم، افزایش سرعت رشد سلولی، افزایش مقاومت به دماهای بالاتر و افزایش تحمل شوری از مهم‌ترین آنها هستند. با توجه به ویژگی‌های مثبت و منحصربه‌فرد ایجاد شده در جهش یافته ذکر شده، زمینه برای مطالعات تکمیلی به منظور تولید و بهینه‌سازی آنزیم آمیلاز مقاوم به حرارت فراهم شده است.

واژه‌های کلیدی: *باسیلوس لیکنیفورمیس*، گرمادوست، جهش‌زایی، آمیلاز، پرتو ماوراءبنفش

* نویسنده مسئول مکاتبات

مقدمه

آنزیم آمیلاز^۱ را انسلم پاین^۲ در سال ۱۸۳۳ کشف کرد (۱). آنزیم آمیلاز، آنزیم هضم‌کننده نشاسته است که پیوندهای داخلی گلیکوزیدی در پلی‌ساکاریدها را هیدرولیز می‌کند. نام دیگر آنزیم آمیلاز، گلیکوژناز^۳ است. آنزیم‌های آمیلاز متالوآنزیم^۴ هستند که به یون کلسیم جهت ایجاد ساختار کامل و انجام فعالیت خود نیاز دارند. آنزیم آمیلاز متعلق به گروه گلیکوزیدهیدرولاز^۵ است. گلیکوزیدهیدرولازها قادر به هیدرولیز وسیع ساکاریدها هستند. این آنزیم‌ها براساس حالت واکنش‌ها و اسیدهای آمینه دسته‌بندی می‌شوند. آنزیم آمیلاز دارای چهارده دسته (A-N) است. این دسته‌ها برای گلیکوزیدها و ترانس‌گلیکوزیدها تعریف شده است (۲). آمیلازها یکی از آنزیم‌های صنعتی مهم هستند که گستره وسیعی از کاربردها را دارا هستند؛ از جمله: تبدیل نشاسته به شربت قند، تولید سیکلودکسترین^۶ها؛ همچنین این آمیلازها در صنعت داروسازی کاربرد دارند. این آنزیم‌ها حدود ۳۰ درصد از تولید آنزیم‌های جهان را به خود اختصاص داده‌اند (۳). آنزیم آمیلاز در میکروارگانیسم‌ها، گیاهان و موجودات زنده تکامل یافته مشاهده می‌شود (۴). آنزیم‌های آمیلاز اساساً به ۴ گروه تقسیم می‌شوند: اندوآمیلازها، اگزوآمیلازها، شاخه‌شکن^۷ و ترانسفرازها^۸. اندوآمیلازها، اندوآمیلازها، پیوندهای گلیکوزید داخلی آلفا-دی-۱،۴-نشاسته را هیدرولیز می‌کنند و محصولات آلفا-آنومریک^۹ تولید می‌کنند. اگزوآمیلازها پیوندهای آلفا-۱،۴ یا آلفا-۱،۶ از باقیمانده^{۱۰} گلوکز خارجی را هیدرولیز می‌کنند و محصولات آلفا یا بتا-آنومریک را تولید می‌کنند. آنزیم‌های شاخه‌شکن، پیوندهای خارجی

آلفا-۱،۶ پلیساکاریدهای خطی را هیدرولیز می‌کنند و ترانسفرازها پیوندهای گلیکوزیدی آلفا-۱،۴ از مولکول‌دهنده^{۱۱} را هیدرولیز می‌کنند و بخشی از مولکول‌دهنده به مولکول‌پذیرنده انتقال داده می‌شود و یک پیوند گلیکوزیدی جدید ایجاد می‌کند (۵). محصولات نهایی حاصل از عملکرد آنزیم آمیلاز بر نشاسته، مخلوطی از ترکیبات گلوکز، مالتوز^{۱۲}، مالتوتریوز^{۱۳} و اولیگوساکاریدهای شاخه‌ای با ۶ تا ۸ واحد گلوکز است که هر دو پیوند آلفا-۱،۴ و آلفا-۱،۶ را شامل می‌شوند (۶).

وزن مولکولی آنزیم آمیلاز در موجودات گوناگون متفاوت است و از حدود ۱۰ تا ۲۱۰ کیلودالتون است. کمترین وزن مولکولی، ۱۰ کیلودالتون برای باسیلوس کالدولیتیکوس^{۱۴} و بیشترین وزن مولکولی برای کلروفلکسوسائورتیکوس^{۱۵} گزارش شده است (۷).

بهینه‌سازی عوامل مختلف و دست‌کاری در محیط‌ها، یکی از فناوری‌های مهم برای تولید بیش‌از‌حد آنزیم‌ها در مقادیر زیاد برای درخواست‌های صنعتی است. عوامل فیزیکی و شیمیایی مختلفی شناخته شده‌اند که تولید آنزیم آمیلاز را تحت‌تأثیر قرار می‌دهند؛ از جمله می‌توان به تأثیر پرتوهای موتان‌زا، دما، اسیدیته^{۱۶}، دوره گرمخانه‌گذاری، منابع کربن، منابع نیتروژن، مواد فعال سطحی^{۱۷}، فسفات، یون‌های فلزی مختلف، رطوبت و فشار اکسایشی^{۱۸} اشاره کرد. فعل و انفعالات حاصل از این فاکتورها تأثیر قابل‌توجهی را در تولید آنزیم نشان داده است (۸).

بهینه‌سازی تولید آنزیم به معنای تغییراتی است که بر رشد پرگنه باکتری‌ها و تولید آنزیم اثر می‌گذارد. بهینه‌سازی و دست‌کاری عوامل مختلف بر رشد

شد تا جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۵ رسید. محیط کشت حاوی نمونه مورد نظر ۱۰^۶ بار رقیق شد، به طوری که در هر ۱ میلی‌لیتر محیط کشت، ۵۰۰ سلول وجود داشت. ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت رقیق شده، در یک پلیت استریل در داخل هود لامینار (ژال تجهیز)، در معرض پرتو ماوراءبنفش با طول موج ۲۵۴ نانومتر و فاصله ۱ متری از لامپ ماوراءبنفش در بازه‌های زمانی ۲، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ دقیقه قرار داده شد. در هنگام پرتو دهی با پرتو ماوراءبنفش در پلیت برداشته شد. نمونه‌های پرتو دیده به محیط کشت آگار مغذی منتقل شدند و در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. پس از بررسی و شمارش پرگنه‌های پرتو دیده بازه زمانی از دقیقه به ثانیه کاهش یافت. در نهایت پرتو ماوراءبنفش با طول موج ۲۵۴ نانومتر در فاصله ۱ متری در بازه زمانی ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰، ۷۵، ۹۰، ۱۰۵ و ۱۲۰ ثانیه بر نمونه‌های رقیق شده، تایید شد. از سوسپانسیون پرتو دیده در هر بازه زمانی ۱۰۰ میکرولیتر بر روی محیط کشت آگار مغذی کشت داده شد. نمونه شاهد در این آزمون، محیط کشت حاوی نمونه مورد نظر با رقت ۱۰^۶ بود که پرتو ماوراءبنفش به آن تایید نشده بود. پلیت‌های حاوی نمونه‌های پرتو دیده در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. تمامی پرگنه‌ها در بازه‌های زمانی شمارش شدند (۱۰). بازه زمانی که واجد ۵۰ درصد باکتری زنده است، به عنوان بهترین بازه زمانی در نظر گرفته شد. تمامی مراحل دو بار تکرار شد. در نهایت ۴۵ ثانیه به عنوان بهترین بازه زمانی در نظر گرفته شد. از محیط کشت نوترینت برات حاوی نمونه مورد نظر که در زیر هود لامینار، پرتو ماوراءبنفش

باکتری‌ها و افزایش تولید آنزیم‌ها از مهم‌ترین روش‌ها برای تولید بیش از حد آنزیم در صنایع است. در این پژوهش، هدف اصلی بررسی اثر پرتو ماوراءبنفش (به عنوان عامل جهش‌زای فیزیکی) بر باسیلوس لیکنیفورمیس^{۱۹} گرمادوست جدا شده از چشمه آب گرم اردبیل و بررسی و مقایسه خصوصیات مورفولوژی و فیزیولوژی و میزان تولید آنزیم آمیلاز در سویه‌های والد و جهش یافته بود.

مواد و روش‌ها

سویه باکتری و محیط‌های کشت:

باسیلوس لیکنیفورمیس *B.L.2*، نوعی میکروارگانسیم بومی و گرمادوست است که در طی تحقیقات قبلی، مبینی و همکاران^{۲۰} آن را با عنوان بهینه‌سازی فرآیند تولید آنزیم آمیلاز و شناسایی مولکولی باکتری گرمادوست از چشمه آب گرم اردبیل، جداسازی و شناسایی کردند؛ توانایی تولید آنزیم آمیلاز آن برابر ۳/۷۶ واحد/میلی‌لیتر/دقیقه است. این سویه از چشمه آب گرم روستای قینرچه از توابع استان اردبیل جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی شد (۹).

از کشت خالص باسیلوس لیکنیفورمیس گرمادوست فوق در این پژوهش استفاده شد. سویه مورد نظر در محیط نوترینت برات (مرک) کشت داده شد و به منظور ایجاد جهش از پرتو ماوراءبنفش (جهش‌زای فیزیکی) استفاده شد.

انجام فرآیند جهش‌زایی با اشعه پرتو ماوراءبنفش و

جداسازی جهش یافته‌ها: نمونه مورد نظر در محیط کشت نوترینت برات تلقیح شد و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با ۱۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری

به مدت ۴۵ ثانیه دریافت کرد، اقدام به تهیه کشت‌های متعدد در پلیت‌های حاوی آگار مغذی شد و تمامی آنها در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. باکتری‌های پرتودیده که توانایی ایجاد پرگنه داشتند با روش تهیه ساب کالچر جداسازی و خالص‌سازی شدند. با این روش در ابتدا سویه‌هایی که مقاوم به پرتو ماوراءبنفش بودند، جداسازی شدند و تمامی سویه‌های مقاوم به پرتو ماوراءبنفش از جهت میزان تولید آنزیم آمیلاز بررسی شدند. سویه‌هایی که میزان تولید آنزیم آمیلاز بیشتری داشتند، به‌عنوان جهش‌یافته در نظر گرفته شدند. سویه‌های جهش‌یافته از نظر ویژگی‌های مورفولوژی و فیزیولوژی از جمله شکل ظاهری، تحمل دمایی، تحمل شوری، رشد در دماهای گوناگون و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها (آزمون آنتی‌بیوگرام) نسبت به سویه والد بررسی شدند.

سنجش آنزیم آمیلاز: با استفاده از معرف ۳،۵-دی‌نیتروسالسیک‌اسید^{۲۱} (سیگما) تولید آنزیم آمیلاز به‌صورت کمی در تمامی پرگنه‌های پرتودیده به‌دست آمده، بررسی شد. پرگنه‌های پرتودیده در محیط کشت نوترینت برات در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد با ۱۰۰ دور بر دقیقه گرمخانه‌گذاری شدند. ۵۰ میکرولیتر از محیط‌های نوترینت برات حاوی هر پرگنه بر روی محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شدند. از پرگنه‌های موجود در سطح پلیت، یک پرگنه به ۱۰ میلی‌لیتر محیط نوترینت برات تلقیح شد و در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد با ۱۰۰ دور بر دقیقه گرمخانه‌گذاری شد. زمانی که جذب نوری نمونه به ۰/۵ رسید، ۲۰۰ میکرولیتر به محیط کشت نوترینت برات تلقیح شد و در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد با ۱۰۰ دور بر دقیقه

گرمخانه‌گذاری شد. پس از سانتریفیوژ نمونه در هر زمان موردنظر، حجم ۵۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت به ۵۰۰ میکرولیتر محلول نشاسته (۱ درصد وزن/حجم) در بافر فسفات سدیم ۰/۰۲ مولار با اسیدیته برابر ۶/۵ اضافه شد. محلول حاصل به مدت ۳ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد با ۱۰۰ دور بر دقیقه گرمخانه‌گذاری شد. پس از آن ۱ میلی‌لیتر از محلول ۳،۵-دی‌نیتروسالسیک‌اسید به نمونه‌ها افزوده شد. حدود ۱۵ دقیقه در بن‌ماری در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد. پس از آن تمامی نمونه‌ها در دمای آزمایشگاه سرد شدند و ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر برای جلوگیری از واکنش اضافه شد. در نمونه کنترل آب مقطر استریل به‌جای سوپرناتانت استفاده شد. در نهایت، جذب نوری در طول موج ۵۴۰ نانومتر با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر (فارماسیا) خوانده شد (۱۱).

تولید آنزیم در ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت پس از کشت بررسی شد. از هر بازه زمانی سه تکرار و از هر تکرار سه سنجش آنزیم صورت گرفت. برای ترسیم منحنی استاندارد از غلظت‌های گوناگون گلوکز (مرکز) شامل ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر استفاده شد و طبق رابطه (۱) میزان گلوکز آزاد شده محاسبه شد:

رابطه شماره ۱

$$Y = 0.00313X + 0.088$$

و از رابطه (۲) برای سنجش میزان فعالیت آنزیم آمیلاز (واحد/میلی‌لیتر/دقیقه) استفاده شد:

رابطه شماره ۲

$$\text{میزان فعالیت آنزیم آمیلاز} = \frac{\text{میزان گلوکز آزاد شده} \times 2}{\text{زمان انجام آزمایش}}$$

تکرار استفاده شد. آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، آموکسی‌سیلین و پنی‌سیلین بر سنتز دیوارهٔ پپتید و گلیکان و سایر آنتی‌بیوتیک‌ها بر سنتز پروتئین‌ها بر باکتری‌های گرم‌مثبت تأثیرگذار بودند. برای انجام این آزمون از محیط کشت مولر هیتون آگار (شارلو) و سوسپانسیون باکتری‌ها معادل استاندارد ۰/۵ مک فارلند استفاده شد و به‌منظور تفسیر نتایج، جداول استاندارد مقاومت/حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف استفاده شدند (۱۴).

آنالیز آماری: از آزمون t-Test با نرم‌افزار اسپ‌اس اس نسخهٔ ۲۱۷ جهت بررسی آماری تمامی داده‌های حاصل‌شده از آزمون‌های مختلف و معنادار بودن یا نبودن داده‌ها استفاده شد. همچنین رسم نمودارها به کمک نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۳ انجام شد.

نتایج

در ابتدا سوسپانسیونی از نمونهٔ موردنظر طبق مراحل ذکرشده تهیه شد. تنها در دو پلیت پرگنه مشاهده شد، یکی از این پلیت‌ها حاوی نمونهٔ شاهد با ۴۰ پرگنه و پلیت دیگر نمونهٔ پرتودیده در بازهٔ زمانی ۲ دقیقه با ۲ پرگنه بود. به‌علت کم بودن تعداد پرگنه‌ها، بازهٔ زمانی از دقیقه به ثانیه کاهش داده شد و زمان‌های ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰، ۷۵، ۹۰، ۱۰۵ و ۱۲۰ ثانیه در نظر گرفته شد. نمونه‌های پرتودیده در هر بازهٔ زمانی دو بار تکرار شد و نتایج میانگین تعداد پرگنه‌های زنده حاصل‌شده پس از تأثیر پرتو ماوراءبنفش در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج این جدول، تعداد پرگنه‌های مقاوم به پرتو ماوراءبنفش را در بازه‌های زمانی موردنظر نشان می‌دهد. براین اساس بازهٔ زمانی انتخاب شد که ۵۰ درصد تعداد پرگنه‌های شاهد را داشت.

پس از بررسی کمی تولید آنزیم آمیلاز، سویه‌هایی که تولید بیشتری داشتند، جداسازی شدند و از نظر کیفی هم بررسی شدند.

بررسی تحمل دمایی: آزمون تحمل دمایی برای سه سویهٔ *B.L.2.M.1*، *B.L.2.M.2* و *B.L.2.M.2* با محیط‌های نوترینت برات در دماهای ۳۰، ۴۰، ۴۵، ۵۰ و ۵۵ با ۱۰۰ دور بر دقیقه پس از ۲۴ ساعت و در سه تکرار صورت گرفت. میزان جذب نوری سوسپانسیون باکتری‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر بررسی شدند (۱۲).

بررسی تحمل شوری: محیط‌های آگار مغذی حاوی ۵، ۳ و ۷ درصد کلرید سدیم آماده شدند. نمونه‌ها با نسبت ۱۰^۶ رقیق شدند و ۱۰۰ میکرولیتر نمونهٔ رقیق‌شده بر روی محیط‌های آگار مغذی حاوی کلرید سدیم کشت داده شد و به‌صورت وارونه در گرمخانه (ممرت) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به‌مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. دو تکرار برای هر آزمون تحمل شوری انجام شد (۱۳). در این بررسی تأثیر پرتوهای ماوراءبنفش بر تحمل شوری در سویه‌های جهش‌یافته با سویهٔ والد مقایسه شد.

آزمون آنتی‌بیوگرام: این آزمون جهت بررسی مقاومت سویه‌های جهش‌یافته و سویهٔ والد به آنتی‌بیوتیک‌ها صورت گرفت، تا تأثیر پرتو ماوراءبنفش بر مقاومت آنتی‌بیوتیک‌ها در سویه‌های جهش‌یافته با سویهٔ والد مقایسه شود. آنتی‌بیوتیک‌هایی در این آزمون استفاده شد که بر سنتز دیوارهٔ سلولی و سنتز پروتئین‌های سلولی تأثیرگذار بودند. از ده آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین، اریترومایسین، آزیترومایسین، آمپی‌سیلین، آموکسی‌سیلین، آمیکاسین، پنی‌سیلین، جنتامایسین، سفالکسین و نوومایسین با روش انتشار دیسک در سه

جدول ۲ و شکل ۱ نشان داده شده است. طبق جدول ۲، ۱۰ مورد باکتری جهش یافته که پرتو ماوراءبنفش را تحمل کرده‌اند و جزء ۱۵ درصد باقیمانده هستند، رشد می‌کنند و تولید آنزیمی متفاوت با سویه والد را نشان می‌دهند. پس دستیابی به سویه جهش یافته قطعی است و پرتو ماوراءبنفش توانسته است با اعمال جهش‌های تصادفی، تغییراتی در سلول ایجاد کند که منجر به تولید بیشتر آنزیم شود.

برای بررسی معنادار بودن نتایج، از نرم‌افزار SPSS استفاده شد و در سطح ۵ درصد اختلاف فعالیت آنزیم آمیلاز بین سویه والد و دو سویه جهش یافته کاملاً معنادار است ($P_{\text{value}} < 0/05$). در ادامه منحنی رشد باکتری‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد رسم شد. نتایج حاصل از سه نمونه $B.L.2.M.1$ ، $B.L.2.M.2$ و $B.L.2.M.2$ در جذب نوری با طول موج ۶۰۰ نانومتر در شکل ۲ نشان داده شده است.

نتایج با آزمون t-Test آنالیز شد و نشان داد که اختلاف رشد باکتری‌ها در سویه والد و دو سویه جهش یافته اصلی در سطح ۵ درصد کاملاً معنادار است ($P_{\text{value}} < 0/05$). منحنی رشد و نمودار میزان فعالیت آنزیم آمیلاز نشان داد که رشد سویه جهش یافته $B.L.2.M.1$ از هر دو سویه والد و $B.L.2.M.2$ بیشتر است. در حالی که سویه $B.L.2.M.2$ رشد کمتری نسبت به سویه والد داشت، اما میزان فعالیت آنزیم آمیلاز بیشتری را نشان داد. برای بررسی بیشتر سویه‌ها از نظر مورفولوژی، تحمل دمایی و شوری و تولید آنزیم آمیلاز در دماهای مختلف بررسی شدند.

با بررسی نتایج، بهینه تأثیر پرتو ماوراءبنفش بر نمونه موردنظر در بازه زمانی ۴۵ ثانیه در نظر گرفته شد. در این بازه زمانی تمامی مراحل چهار بار تکرار شد. از نمونه‌ای که به مدت ۴۵ ثانیه پرتو ماوراءبنفش دریافت کرده بود، پس از کشت و گرمخانه‌گذاری در مجموع تعداد ۷۰ پرگنه جداسازی و خالص‌سازی شد. این پرگنه‌هایی که تحت تأثیر پرتو ماوراءبنفش زنده مانده بودند، از جهت میزان تولید آنزیم آمیلاز سنجش شدند و سویه‌هایی که آنزیم آمیلاز بیشتری تولید کردند به عنوان سویه‌های جهش یافته جداسازی و خالص‌سازی شدند.

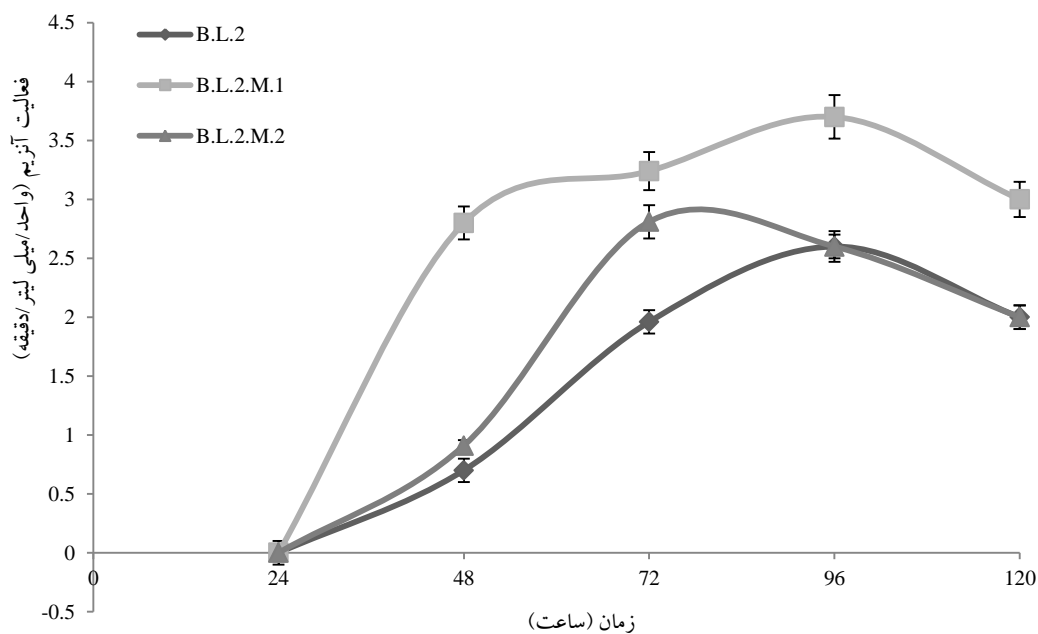
جدول ۱- میانگین تعداد پرگنه‌های حاصل از باکتری پس از تأثیر پرتو ماوراءبنفش

تعداد پرگنه	زمان (ثانیه)
۴۵	۰
۳۷	۱۵
۳۱	۳۰
۲۷	۴۵
۱۵	۶۰
۱۳	۷۵
۷	۹۰
۳	۱۰۵
۱	۱۲۰

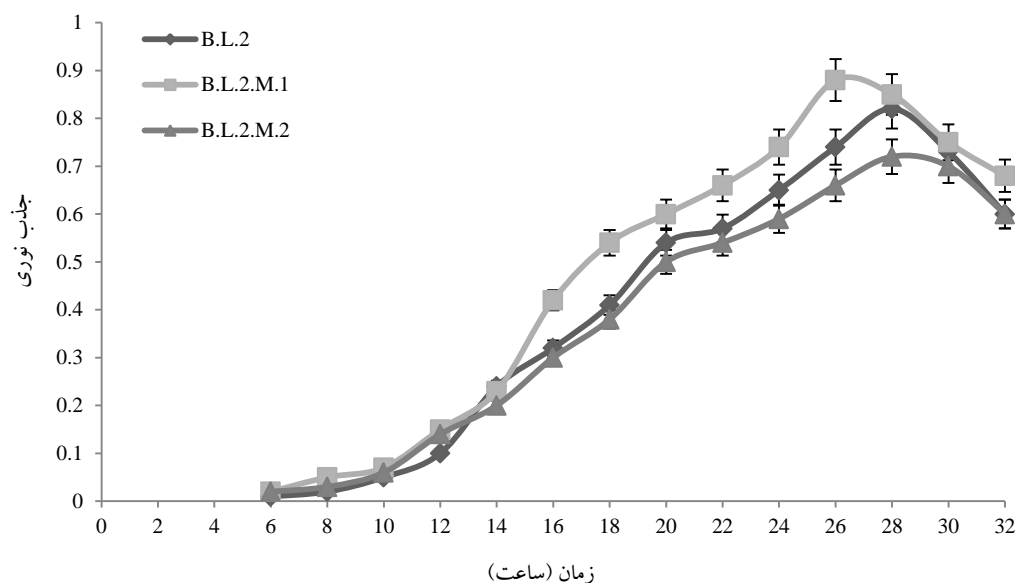
سنجش تولید آنزیم آمیلاز: تولید آنزیم آمیلاز به صورت کمی در تمامی نمونه‌ها (۷۰ پرگنه) در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت بررسی شدند و تنها دو پرگنه فعالیت آنزیمی بیشتری نسبت به سویه والد داشتند که با $B.L.2.M.1$ و $B.L.2.M.2$ نام‌گذاری شدند و در اصل جهش یافته‌های اصلی به شمار می‌آیند. نتایج حاصل در

جدول ۲- میزان فعالیت و انحراف معیار میانگین آنزیم آمیلاز (واحد/میلی‌لیتر/دقیقه) در تعدادی از باکتری‌های جهش‌یافته در مقایسه با سویه والد

نمونه	زمان (ساعت)	۲۴	۴۸	۷۲	۹۶	۱۲۰
B.L.2		۰±۰/۰۵	۰/۷۰±۰/۰۷	۱/۹۶±۰/۰۱	۲/۶۰±۰/۰۲	۲±۰/۰۶
B.L.2.M.1		۰±۰/۰۵	۲/۸۰±۰/۰۱	۳/۲۴±۰/۰۸	۳/۷۰±۰/۰۹	۳±۰/۰۴
B.L.2.M.2		۰±۰/۰۵	۰/۹۱±۰/۰۱	۲/۸۱±۰/۰۱	۲/۶۰±۰/۰۲	۲±۰/۰۳
B.L.2.M.3		۰±۰/۰۵	۰/۴۰±۰/۰۱	۰/۹۰±۰/۰۱	۱±۰/۰۱	۰/۷۰±۰/۰۱
B.L.2.M.4		۰±۰/۰۵	۰/۴۰±۰/۰۱	۰/۲۰±۰/۰۱	۰/۱۱±۰/۰۱	۰/۱۰±۰/۰۱
B.L.M.5		۰±۰/۰۵	۰/۱۰±۰/۰۱	۰/۳۵±۰/۰۴	۰/۶۰±۰/۰۱	۰/۵۰±۰/۰۱
B.L.2.M.6		۰±۰/۰۵	۰/۰۱±۰/۰۰۱	۰/۰۴±۰/۰۰۱	۰/۰۸±۰/۰۰۱	۰/۰۶±۰/۰۰۱
B.L.2.M.7		۰±۰/۰۵	۰/۱۰±۰/۰۱	۰/۱۵±۰/۰۱	۰/۲۰±۰/۰۱	۰/۱۴±۰/۰۱
B.L.2.M.8		۰±۰/۰۵	۰/۵۲±۰/۰۱	۰/۶۲±۰/۰۱	۰/۷۳±۰/۰۱	۰/۵۵±۰/۰۶
B.L.2.M.9		۰±۰/۰۵	۰/۶۵±۰/۰۱	۰/۷۵±۰/۰۱	۰/۸۶±۰/۰۱	۰/۷۰±۰/۰۱
B.L.2.M.10		۰±۰/۰۵	۰/۳۰±۰/۰۱	۰/۴۰±۰/۰۱	۰/۵۰±۰/۰۱	۰/۴۰±۰/۰۱



شکل ۱- میزان فعالیت آنزیم آمیلاز در دو سویه جهش‌یافته اصلی در مقایسه با سویه والد. فعالیت آنزیم در سه تکرار و در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد محاسبه شده است. (error bar نشان‌دهنده انحراف معیار سه تکرار است)



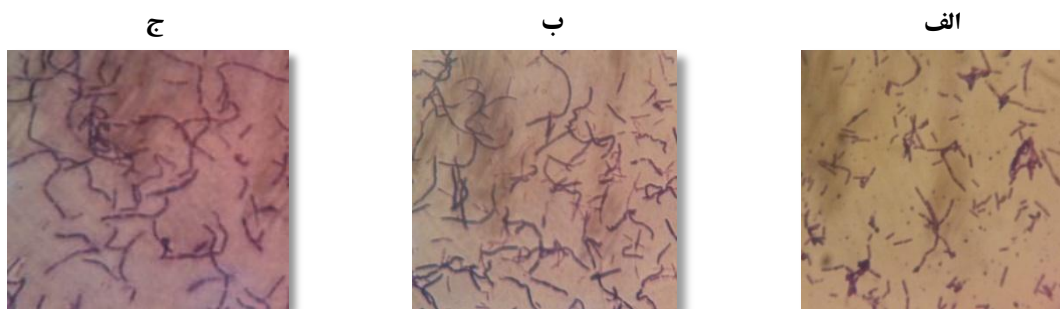
شکل ۲- منحنی رشد دو سویه جهش یافته اصلی در مقایسه با سویه والد. منحنی رشد در سه تکرار، در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد و در محیط کشت نوترینت براث با ۱۰۰rpm ترسیم شد. (error bar نشان‌دهنده انحراف معیار سه تکرار است)

استفاده شد. نمونه برداری، رنگ آمیزی و مشاهده لام‌ها در زیر میکروسکوپ نوری در شرایط یکسانی صورت گرفت. بررسی لام‌ها نشان داد که هر سه سویه باسیلوس گرم مثبت هستند و از نظر ساختاری سویه *B.L.2.M.2* از هر دو سویه والد و *B.L.2.M.1* بزرگ‌تر است. نتایج میکروسکوپی نمونه‌ها در شکل ۳ نشان داده شده است.

بررسی تحمل دمایی: نتایج رشد سه سویه در دماهای گوناگون با هم مقایسه شد. نتایج نشان داد که بیشترین رشد بعد از ۲۴ ساعت در تمامی دماها به دست آمده است. رشد سویه *B.L.2.M.1* نسبت به دو سویه دیگر بیشتر بود؛ اما دو سویه *B.L.2* و *B.L.2.M.2* رشد تقریباً مشابهی داشتند. این نتیجه در منحنی رشد در دما ۳۰ درجه سانتیگراد هم مشاهده شد. بهترین رشد سویه‌ها بعد از ۲۴ ساعت در دمای ۴۰ و ۴۵ درجه سانتیگراد مشاهده شد. نتایج حاصل از مقایسه رشد سه سویه در جدول ۳ نشان داده شد.

تولید آنزیم‌ها جزء متابولیت‌های اولیه است؛ پس در فاز رشد، هم‌زمان با رشد سلولی آنزیم‌ها تولید می‌شوند. همانطور که مشاهده می‌شود در زمان ۲۴ ساعت به بعد آنزیم شروع به تولید کرده است و با گذشت زمان میزان تولید افزایش داشته است. این احتمال نیز درباره آنزیم آمیلاز در نظر گرفته می‌شود که تا زمانی که مقدار منبع کربن (گلوکز) کافی در محیط کشت است نیازی به تولید زیاد آنزیم نیست. با گذشت زمان و ورود سلول به فاز رکود، مقدار منبع کربن یعنی گلوکز در محیط کاهش می‌یابد و به تبع میزان تولید آنزیم آمیلاز توسط ژن‌های مولد آنزیم‌های هیدرولاز به منظور مصرف نشاسته افزایش می‌یابد. همانطور که در شکل ۱ و ۲ مشاهده می‌شود بعد از گذشت ۲۴ ساعت آنزیم آمیلاز شروع به تولید می‌کند و بهترین بازه زمانی برای بیشترین میزان تولید آنزیم ۷۲ و ۹۶ ساعت است.

بررسی شکل ظاهری و واکنش گرم نمونه: برای بررسی شکل ظاهری سویه‌ها از کیت رنگ آمیزی گرم



شکل ۳- لام میکروسکوپی سویه‌های باسیلوس بومی و جهش‌یافته. الف) B.L.2، ب) B.L.2.M.1 و ج) B.L.2.M.2

جدول ۳- میانگین جذب نوری و انحراف معیار میانگین‌های مربوط به رشد سویه‌های جهش‌یافته اصلی و والد در دماهای مختلف بعد از ۲۴ ساعت در سه تکرار.

دما (درجه سانتیگراد) نمونه	۳۰	۴۰	۴۵	۵۰	۵۵
B.L.2	۰/۷۰±۰/۰۴	۱/۵۰±۰/۰۵	۱/۲۰±۰/۰۵	۱/۰±۰/۰۴	۰/۰۳±۰/۰۱
B.L.2.M.1	۰/۸۱±۰/۰۴	۱/۸۰±۰/۰۳	۱/۵۰±۰/۰۴	۱/۰±۰/۰۵	۰/۰۵±۰/۰۱
B.L.2.M.2	۰/۸۰±۰/۰۳	۱/۵۰±۰/۰۵	۱/۲۰±۰/۰۵	۱/۰±۰/۰۴	۰/۰۳±۰/۰۱

تولید آنزیم آمیلاز در دماهای مختلف سنجش شد و نتایج نشان داد تولید آنزیم آمیلاز *B.L.2.M.1* در دمای ۴۰ و ۴۵ درجه سانتیگراد بیشتر از سویه والد و *B.L.2.M.2* بود. نتایج میزان فعالیت آنزیم آمیلاز در دماهای مختلف در جدول ۴ نشان داده شده است.

هر دو سویه جهش‌یافته اصلی میزان تولید آنزیم آمیلاز بیشتری داشتند اما طی بررسی‌هایی که بر رشد سلولی سویه‌ها صورت گرفت، مشخص شد که سویه *B.L.2.M.1* در دماهای بالا نیز سریع‌تر رشد می‌کند، در حالی که در دماهای ۴۰ تا ۵۵ درجه سانتیگراد رشد سویه *B.L.2.M.2* برابر با رشد سویه والد بود. سپس

جدول ۴- میانگین و انحراف معیار فعالیت آنزیم آمیلاز (واحد/میلی‌لیتر/دقیقه) در دماهای مختلف در سه تکرار.

دما (درجه سانتیگراد) نمونه	زمان (ساعت)			
	۲۴	۴۸	۷۲	۹۶
۴۰	B.L.2	۰±۰/۰۵	۱/۳۲±۰/۰۴	۲/۴۰±۰/۰۵
	B.L.2.M.1	۰±۰/۰۵	۲/۴۰±۰/۰۳	۳/۰۳±۰/۰۶
	B.L.2.M.2	۰±۰/۰۵	۱/۳۲±۰/۰۳	۲/۴۰±۰/۰۳
۴۵	B.L.2	۰±۰/۰۵	۱/۳۰±۰/۰۲	۰/۳۰±۰/۰۶
	B.L.2.M.1	۰±۰/۰۵	۲/۴۰±۰/۰۴	۳/۴۵±۰/۰۲
	B.L.2.M.2	۰±۰/۰۵	۰/۳۰±۰/۰۱	۱/۵۰±۰/۰۲
۵۰	B.L.2	۰±۰/۰۵	۰/۳۰±۰/۰۱	۰/۳۰±۰/۰۱
	B.L.2.M.1	۰±۰/۰۵	۰/۳۰±۰/۰۱	۰/۳۰±۰/۰۱
	B.L.2.M.2	۰±۰/۰۵	۰/۳۰±۰/۰۱	۰±۰/۰۵

باعث تأثیر بر پمپ‌های غشایی و مسیرهای متابولیک (تولید آنزیم) شوند (۱۵، ۱۶ و ۱۷). این احتمال وجود دارد که در سویه جهش‌یافته *B.L.2.M.1* پرتو ماوراءبنفش بر عملکرد پمپ‌های غشایی اثر گذاشته باشد و ضمن کاهش عملکرد این پمپ‌ها، از ورود آنتی‌بیوتیک به سلول باکتری ممانعت شده باشد. بنابراین عملکرد سویه از حالت حساس به نیمه‌حساس تغییر کرده است. نتایج این آزمون در جدول ۶ نشان داده شده است.

جدول ۶- نتایج حاصل از بررسی مقاومت باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف

نمونه	B.L.2	B.L.2.M.1	B.L.2.M.2
آنتی‌بیوتیک	استرپتومایسین	حساس	حساس
	اریترومایسین	مقاوم	مقاوم
	آزیترومایسین	مقاوم	مقاوم
	آمپی‌سیلین	حساس	حساس
	آموکسی‌سیلین	حساس	حساس
	آمیکاسین	حساس	حساس
	پنی‌سیلین	مقاوم	مقاوم
	جنتامایسین	حساس	حساس
	سفالکسین	حساس	حساس
	نئومایسین	حساس	حساس

بررسی تحمل شوری: دو سویه جهش‌یافته از نظر تحمل شوری هم بررسی شدند. سویه‌های جهش‌یافته مانند سویه والد با افزایش مقدار نمک دچار کاهش میزان رشد شدند. نتایج حاصل از تحمل شوری در جدول ۵ نشان داده شده است.

آزمون آنتی‌بیوگرام: این آزمون طبق مراحل ذکر شده با دیسک‌های آنتی‌بیوتیک صورت گرفت. براساس اطلاعات موجود در جدول استاندارد، مقاوم و نیمه‌حساس و حساس بودن سویه‌ها بررسی شد. هر سه سویه در برابر آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین، آزیترومایسین و پنی‌سیلین مقاوم بودند و در برابر آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، آموکسی‌سیلین، آمیکاسین، جنتامایسین، سفالکسین و نئومایسین حساس بودند. در واقع دو سویه جهش‌یافته با سویه والد در نه آنتی‌بیوتیک نتایج یکسانی را نشان دادند؛ اما در برابر آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین دو سویه والد و *B.L.2.M.2* حساس بودند و *B.L.2.M.1* نیمه‌حساس بود. در نهایت نتیجه گرفته شد که پرتو ماوراءبنفش بر مقاومت سویه *B.L.2.M.2* نسبت به ده آنتی‌بیوتیک موردنظر تغییری ایجاد نکرده است، اما توانسته است بر مقاومت سویه *B.L.2.M.1* نسبت به آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین مؤثر باشد. گفتنی است که پرتوهای ماوراءبنفش می‌توانند

جدول ۵- نتایج تحمل شوری. میانگین و انحراف معیار تعداد پرگنه‌های شمارش شده در پلیت‌ها در سه تکرار.

نمونه	محیط کشت	نوترینت آگار	نوترینت آگار با ۳ درصد کلرید سدیم	نوترینت آگار با ۵ درصد کلرید سدیم	نوترینت آگار با ۷ درصد کلرید سدیم
B.L.2		۲۸±۰/۶	۲۳±۰/۶	۱۸±۰/۶	۹±۰/۶
B.L.2.M.1		۳۲±۰/۶	۳۰±۰/۶	۲۳±۰/۶	۱۵±۰/۶
B.L.2.M.2		۲۸±۰/۶	۲۰±۰/۶	۱۸±۰/۶	۸±۰/۶

بحث و نتیجه‌گیری

آنزیم‌های آمیلاز از جمله آنزیم‌های مهم صنعتی هستند که سالانه چند تن از آنها در صنایع گوناگون مصرف می‌شوند. حدود ۵۰ نوع باکتری و قارچ، آنزیم آمیلاز تولید می‌کنند. بارزترین آنها گونه‌های باسیلوس از جمله باسیلوس سوبتیلیس و باسیلوس لیکنیفورمیس هستند (۱۸). در این پژوهش سویه باسیلوس لیکنیفورمیس استفاده شده است.

نتایج پژوهش حاضر ثابت کرد که محیط کشت متداول آزمایشگاهی برای تولید آنزیم آمیلاز باسیلوس لیکنیفورمیس گرمادوست به‌طور موفقیت‌آمیزی قابل استفاده است. در پژوهش‌های پیشین از محیط کشت نوترینت برات با نشاسته ۱ درصد (وزن/حجم) برای رشد باسیلوس سوبتیلیس و همچنین بررسی تولید آنزیم آمیلاز استفاده شده است (۱۹ و ۲۰). در این پژوهش نیز برای رشد باسیلوس لیکنیفورمیس گرمادوست و بررسی تولید آنزیم آمیلاز از محیط‌های کشت نوترینت برات و نوترینت آگار با ۱ درصد (وزن/حجم) نشاسته استفاده شد.

در این پژوهش برای القای جهش و ایجاد سویه‌های جهش‌یافته از عوامل فیزیکی استفاده شد. پیش از بررسی اثر پرتو ماوراءبنفش بر میزان فعالیت آنزیم آمیلاز، تعداد پرگنه‌های باقیمانده در بازه‌های زمانی بررسی شد و بهترین بازه‌های زمانی برای تابش پرتو ماوراءبنفش به منظور ایجاد جهش‌زایی در سویه والد به دست آمد (۱۸، ۲۱ و ۲۲). تابش پرتو ماوراءبنفش در بازه زمانی ۴۵ ثانیه باعث شد ۵۰ درصد از باکتری‌های گرمادوست مقاوم به پرتو ماوراءبنفش زنده بماند. در نتیجه احتمال ایجاد جهش‌یافته در بین پرگنه‌های تشکیل شده بیشتر بود. به همین دلیل ابتدا جدولی از تعداد پرگنه‌هایی که

در اثر تیمار توسط پرتو ماوراءبنفش زنده ماندند تهیه شد (۲۳). پس از آن، به منظور القای جهش و ایجاد سویه‌های جهش‌یافته به جهت افزایش میزان تولید آنزیم آمیلاز از پرتو ماوراءبنفش استفاده شد. در نهایت از بین جهش‌یافته‌هایی که با پرتو ماوراءبنفش تیمار شده بودند، دو سویه با نام‌های *B.L.2.M.1* و *B.L.2.M.2* حاصل شد. این دو سویه جهش‌یافته، آنزیم آمیلاز بیشتری نسبت به سویه والد تولید کردند. پانندی^{۲۴} و گوپدا^{۲۵} از پرتو ماوراءبنفش به مدت ۴ و ۸ دقیقه برای بهینه‌سازی آنزیم آمیلاز در باسیلوس سوبتیلیس استفاده کردند و تولید آنزیم آمیلاز ۲/۰۸ درصد افزایش داشت (۱۰). پرتو ماوراءبنفش به سویه‌های رشد یافته در محیط کشت نوترینت برات، به مدت ۴۵ ثانیه تابیده شد و از سویه‌های جهش‌یافته ارزیابی شده دو سویه جهش‌یافته با نام‌های انتخابی *B.L.2.M.1* و *B.L.2.M.2* جداسازی شدند. در بهینه‌سازی با پرتو ماوراءبنفش، نمونه‌های جهش‌یافته در مقایسه با نمونه والد با استفاده از معرف دی‌نیتروسالیسیلیک اسید سنجش شدند (۱۱) و نتایج نشان داد سویه جهش‌یافته *B.L.2.M.1* در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد بعد از گذشت ۷۲ ساعت ۵/۸ واحد/میلی‌لیتر/دقیقه تولید آنزیم آمیلاز داشته‌اند که در مقایسه با سویه والد ۴۱/۷ درصد آنزیم بیشتری تولید کردند. نتایج بازدهی تولید آنزیم در سویه گرمادوست همچون نتایج پانندی و گوپدا روند افزایشی داشت (۱۰)؛ اما در این پژوهش درصد تولید آنزیم بسیار بالاتر بود. سویه‌های جهش‌یافته از نظر مورفولوژی و فیزیولوژیکی نسبت به سویه والد بررسی شدند. از نظر مورفولوژی سویه *B.L.2.M.2* از نظر ساختاری بزرگ‌تر از سویه والد مشاهده شد. بررسی شکل ظاهری هر سه سویه (والد و دو سویه جهش‌یافته) در شرایط آزمایشگاهی و

میکروسکوپی یکسان صورت گرفت. از نظر فیزیولوژیکی تأثیر شوری، دما و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها توسط آزمون آنتی‌بیوگرام جهت مقایسه تأثیر پرتو ماوراءبنفش بر روی سویه والد با دو سویه جهش یافته صورت گرفت (۱۲، ۱۳ و ۱۴). نتایج نشان داد که تابش پرتو ماوراءبنفش بر تحمل به شوری در سویه‌های جهش یافته نسبت به سویه والد اثر گذاشته است و سویه جهش یافته *B.L.2.M.1* در محیط‌های نمکی تعداد پرگنه‌های بیشتری تولید کرد، با توجه به اینکه همانند سویه والد با افزایش درصد شوری در محیط کشت پایه، میزان رشد سویه‌ها روند کاهشی مشاهده شد. در آزمون آنتی‌بیوگرام تنها در یک آنتی‌بیوتیک (استرپتومایسین) و در سویه *B.L.2.M.1* مقاومت از حالت حساس به نیمه حساس تغییر کرده است. این تغییر مقاومت به آنتی‌بیوتیک در سویه جهش یافته می‌تواند در اثر تأثیر پرتو ماوراءبنفش بر عملکرد پمپ‌های غشایی صورت گرفته باشد و باعث شده عملکرد این پمپ‌ها کمتر شود که نتیجه آن، کاهش ورود آنتی‌بیوتیک‌ها به داخل باکتری است. بنابراین عملکرد سویه از حالت حساس به نیمه حساس تغییر کرده است.

تأثیر دما برای تولید آنزیم به رشد میکروارگانیسم‌ها وابسته است. دامنه وسیع دما بین ۳۵ تا ۸۰ درجه سانتیگراد در باکتری‌ها گزارش شده است (۲۴، ۲۵). لیو^{۲۶} و همکارانش سویه‌ای از جنس *باسیلوس* جدا کردند که در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد بعد از ۴۴ ساعت بیشتر تولید آنزیم آمیلاز (۵۳ واحد/میلی‌لیتر) را نشان داد (۲۶). کنشولوا^{۲۷} و همکارانش سویه‌ای از *باسیلوس سوبتیلیس* جدا کردند که در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد بعد از ۳۶ ساعت (۲۲ واحد/میلی‌لیتر) بیشترین

تولید آنزیم آمیلاز را داشت (۲۷). در این پژوهش میزان رشد سویه‌ها در دماهای بررسی شدند و بهترین رشد سویه‌ها بعد از ۲۴ ساعت در دماهای ۴۰ و ۴۵ درجه سانتیگراد مشاهده شد. سویه *B.L.2.M.1* در دماهای ۴۰ و ۴۵ درجه سانتیگراد بیشترین رشد سلولی را نسبت به سویه والد داشت. تولید آنزیم در سویه‌های مطالعه شده در دماهای مختلف بررسی شدند و میزان تولید آنزیم آمیلاز در سویه جهش یافته *B.L.2.M.1* بعد از ۷۲ ساعت در دماهای ۴۰ و ۴۵ درجه سانتیگراد به ترتیب ۵/۸ و ۳/۴۵ واحد/میلی‌لیتر/دقیقه بود، که این میزان تولید آنزیم نسبت به دو سویه دیگر بیشتر بود. تولید آنزیم در سویه *B.L.2.M.1* بعد از ۷۲ ساعت در ۴۰ درجه سانتیگراد، ۴۱/۷ درصد افزایش نسبت به سویه والد را نشان داد.

رسولی و همکارانش میزان رشد *باسیلوس لیکنیفورمیس* گرمادوست و میزان تولید آنزیم آمیلاز در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۶ ساعت بررسی کردند و نتیجه گرفتند بعد از ۲۶ ساعت، جمعیت توده سلولی به حداکثر مقدار خود رسیده باشد، میزان تولید آنزیم افزایش می‌یابد. پس میزان تولید آنزیم آمیلاز با رشد سویه رابطه مستقیم دارد (۲۸). نتایج این پژوهش نشان داد که در زمان ۲۶ و ۲۸ ساعت به ترتیب برای *B.L.2.M.1* و *B.L.2.M.2*، تولید آنزیم آمیلاز با افزایش رشد سلولی، افزایش داشت که این نتایج با نتایج رسولی و همکارانش منطبق بود، اما تا ۹۶ و ۷۲ ساعت به ترتیب برای *B.L.2.M.1* و *B.L.2.M.2* تولید آنزیم افزایش می‌یابد. به عبارتی دیگر، با گذشت زمان دسترسی سلول‌ها به منبع کربن کاهش یافته است که باعث افزایش بیان آنزیم آمیلاز می‌شود (۲۶، ۲۷ و ۲۸). آنزیم‌های آمیلاز از منابع کربنی همچون گلوکز، لاکتوز

References

- (1) Silverman RB. *The organic chemistry of enzyme-catalyzed reactions*. 3rd ed. London, England: Academic Press; 2002.
- (2) Bordbar AK., Omidian K., Hosseinzadeh R. Study on interaction of alpha-amylase from *Bacillus subtilis* with cetyl trimethylammonium bromide. *Journal of Colloids and surfaces B: Biointerfaces* 2005; 40(1): 67-71.
- (3) Van Der Maarel MJ., Van Der Veen B., Uitdehaag J., Leemhuis H., Dijkhuizen L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of biotechnology*. 2002; 94(2): 137-55.
- (4) Kandra L. α -Amylases of medical and industrial importance. *Journal of Molecular Structure: Theochem* 2003; 666: 487-98.
- (5) Tangphatsornruang S., Naconsie M., Thammarongtham C., Narangajavana J. Isolation and characterization of an α -amylase gene in cassava (*Manihot esculenta*). *Journal of Plant Physiology and Biochemistry* 2005; 43(9): 821-7.
- (6) Whitcomb DC., Lowe ME. Human pancreatic digestive enzymes. *Journal of Digestive diseases and sciences* 2007; 52(1): 1-17.
- (7) Gupta R., Gigras P., Mohapatra H., Goswami VK., Chauhan B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Journal of Process Biochemistry* 2003; 38(11): 1599-616.
- (8) Tanyildizi MS., Özer D., Elibol M. Optimization of α -amylase production by *Bacillus* sp. using response surface methodology. *Journal of Process Biochemistry* 2005; 40(7): 2291-6.

و مالتوز استفاده می‌کند. در صورتی که منابع اصلی کربن در محیط کم باشند، از منبعی چون نشاسته استفاده می‌کنند و تولید آنزیم آمیلاز افزایش می‌یابد. در پژوهش‌های مشابهی که بر تولید آنزیم آمیلاز صورت گرفته است؛ نشان داده شده است که تولید آنزیم آمیلاز در حضور نشاسته افزایش می‌یابد (۲۷ و ۲۸). از طرفی دیگر، با افزایش زمان تا ۱۲۰ ساعت، تولید آنزیم کاهش یافت که می‌توان علت کاهش را افزایش بیان آنزیم‌های پروتئاز و پپتیداز مختلف دانست که بر آنزیم آمیلاز اثر می‌گذارد و باعث هیدرولیز پروتئین‌های آنزیمی و در نتیجه کاهش فعالیت آمیلاز می‌شوند (۱۸ و ۲۹).

بنابراین دستاوردی که در این پژوهش حاصل شد، سویه‌های جهش‌یافته بودند که میزان تولید آنزیم آمیلاز بیشتری نسبت به سویه والد داشتند و تولید آنزیم تا دمای ۴۵ درجه سانتیگراد در یکی از سویه‌های جهش‌یافته همچنان روند افزایشی را نشان می‌دهد. بدیهی است که استفاده از سویه‌هایی که میزان تولید آنزیم و مقاومت حرارتی بیشتری دارند در صنایع مرتبط با زیست‌فناوری مناسب‌تر و مقرون‌به‌صرفه‌تر هستند و می‌توان زمینه را برای تولید انبوه آنزیم با حضور آنها فراهم کرد.

تشکر و قدردانی

از همکاری و مساعدت‌های آقای مهندس فرهاد بنی مهدی به‌عنوان کارشناس آزمایشگاه زیست‌فناوری و مولکولی دانشکده علوم پایه که در انجام این پژوهش ما را یاری کردند، تشکر و قدردانی می‌شود.

- (9) Jafari-Dehkordi S., Mobini-Dehkordi M., Saffar B. Alpha-amylase enzyme production process optimization and molecular identification of thermophilic bacteria hot spring of Ardebil [Dissertation]. Shahrekord: Shahrekord Univ; 2015.
- (10) Pandey A., Gupta L. Effect of UV Radiations on Enzyme Kinetics of Extracellular Amylases Isolated from *Bacillus subtilis*. *Journal of Advanced BioTechnology* 2011; 11(6): 20-4.
- (11) Aynadis T., Tilahun B., Gulelat D. Thermostable alpha-amylase from geothermal sites of Ethiopia (Afar Region): Isolation, purification and characterization. *Greener Journal of Biological Sciences* 2013; 3(2): 061-73.
- (12) Samanta A., Bera P., Khatun M., Sinha C., Pal P., Lalee A., et al. An investigation on heavy metal tolerance and antibiotic resistance properties of bacterial strain *Bacillus sp.* isolated from municipal waste. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research* 2012; 2(1): 178-89.
- (13) Cowan ST., Steel KJ., Barrow G., Feltham R. Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria. *Journal of clinical pathology* 2004; 28(7): 600.
- (14) Schwalbe R., Steele-Moore L., Goodwin AC. *Antimicrobial susceptibility testing protocols*. 3rd ed. New York: Scientific American; 2007.
- (15) Kim J-S., Lee C-H., Chang I-S. Effect of pump shear on the performance of a crossflow membrane bioreactor. *Journal of Water research* 2001; 35(9): 2137-44.
- (16) Wetzel RG, Hatcher PG., Bianchi TS. Natural photolysis by ultraviolet irradiance of recalcitrant dissolved organic matter to simple substrates for rapid bacterial metabolism. *Journal of Limnology and Oceanography* 1995; 40(8): 1369-80.
- (17) Smith KC. UV radiation effects on molecules and cells. *The Science of Photobiology: Springer* 2010; 113-42.
- (18) Siddique F., Hussain I., Mahmood MS., Ahmed SI., Iqbal A. Isolation and characterization of a highly thermostable alpha-amylase enzyme produced by *Bacillus licheniformis*. *Pakistan Journal of Agriculture Sciences* 2014; 51(2): 309-14.
- (19) Moghbeli M., Noshiri H. Isolation of a Native *Bacillus licheniformis* Amylase Producer from Hot Source of Semnan. *Journal of Microbial World* 2009; 2(3): 155-160.
- (20) Akbari Z., Nayeri H., Behetimaal K. A Study on Effect of different culture media on amylase enzyme production by a native strain of *Bacillus subtilis*. *Biological Journal of Microorganism* 2015; 4(15): 99-108.
- (21) Parry JM., Cox BS. Photoreactivation of Ultraviolet Induced Reciprocal Recombination, Gene Conversion and Mutation to Prototrophy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of general Microbiology* 1965; 402(4): 235-41.
- (22) Besoain XA., Perez LM., Araya A., Lefever L., Sanguinetti M., Montealegre JR. New strains obtained after UV treatment and protoplast fusion of native *Trichoderma reesei*: their biocontrol activity on *Pyrenochaeta lycopersici*. *Electronic Journal of biotechnology* 2007; 10(4): 605-617.
- (23) Ashraf H., Haq I., Iqbal J. Screening of *Bacillus licheniformis* mutants for improved production of alpha amylase. *Pakistan Journal of Bioteny* 2001; 40: 518-25.
- (24) Lin LL., Chyau CC., Hsu WH. Production and properties of a raw-starch-degrading amylase from the thermophilic and alkaliphilic *Bacillus sp.* TS-23. *Journal of Biotechnology and Applied Biochemistry* 1998; 28(1): 61-8.
- (25) Sivaramakrishnan S., Gangadharan D., Nampoothiri KM., Soccol CR., Pandey A.

- α -Amylases from microbial sources—an overview on recent developments. *Journal of Food Technology Biotechnology* 2006; 44(2): 173-84.
- (26) Liu XD., Xu Y. A novel raw starch digesting α -amylase from a newly isolated *Bacillus* sp. YX-1: purification and characterization. *Journal of Bioresource Technology* 2008; 99(10): 4315-20.
- (27) Konsula Z., Liakopoulou-Kyriakides M. Hydrolysis of starches by the action of an α -amylase from *Bacillus subtilis*. *Journal of Process Biochemistry* 2004; 39(11): 1745-9.
- (28) Pandey A., Nigam P., Soccol C., Soccol V., Singh D, Mohan R. Advances in microbial amylases. *Journal of Biotechnology and Applied Biochemistry* 2000; 31: 135-52.
- (29) Rasooli I., Mousavi Gargari S., Sorouri Zanjani R., Darvish Alipoor Astaneh S. Characterization of a Thermotolerant α -amylase Producing Natural Variant of *Bacillus Species*. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences* 2009; 8(4): 303-16.

¹-Amylase

²-Anselme Payen

³-Glycogenase

⁴-Metalloenzyme

⁵-Glycoside hydrolase

⁶-Cyclodextrin

⁷-Debranching

⁸-Transfrase

⁹-Alpha-anomeric

¹⁰-Residues

¹¹-Donor molecule

¹²-Maltose

¹³-Maltotriose

¹⁴-*Bacillus caldolyticus*

¹⁵-*Chloroflexus aurantiacus*

¹⁶-pH

¹⁷-Surfactants

¹⁸-Oxidative stress

¹⁹-*Bacillus licheniformis*

²⁰- Jafari-Dehkordi

²¹-3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS)

²²-SPSS ver.17

²³-Excel 2013

²⁴-Pandey

²⁵-Gupta

²⁶-Liu

²⁷-Konsula