Optimization of Alpha-Amylase Production Using *Bacillus Subtilis* PTCC 1720 under Solid-State Fermentation and Partial Purification of the Enzyme

Nasrin Masoodi
Department of Genetics, Faculty of Science, Shahrekord University, Shahrekord, Iran, nasrin.masoodi1991@gmail.com
Mohsen Mobini-Dehkordi *
Department of Genetics, Faculty of Science, Shahrekord University, Shahrekord, Iran, mmobinid@gmail.com
Behnaz Saffar
Department of Genetics, Faculty of Science, Shahrekord University, Shahrekord, Iran, saffar_b@sku.ac.ir

Abstract

Introduction: Alpha-amylase is one of the most widely-used amylase types in the industry. Bacterial amylase production is less expensive and easier. Also, solid-state fermentation is an efficient method for the production of industrial amylase due to its advantages such as significant cost reduction and recycling of nutrient-rich wastes. Agricultural residues containing nutrients such as wheat bran are more economical substrates for solid-state fermentation. The aim of the present study was to optimize the production of alpha-amylase from *Bacillus subtilis* using wheat bran under solid-fermentation and partial purification of this enzyme.

Materials and Methods: In this study, alpha-amylase production by *Bacillus subtilis* PTCC 1720 in solid-state fermentation (SSF) was investigated and optimized. The produced alpha-amylase in solid-state fermentation was precipitated, separated, concentrated, and dialyzed with 75% ammonium sulfate. Alpha-amylase activity was measured by the DNS method. The protein content after dialysis was estimated by the Bradford method and the purity of the enzyme was calculated. The molecular weight and partial purity of the enzyme were determined by polyacrylamide-sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis (SDS-PAGE).

Results: The results of the study showed optimal enzyme production was achieved when 10 gr of wheat bran mixed with 10 ml tap water and inoculated with 3 ml of bacterial inoculum with OD=1.0 (10^9 CFU/mL) and incubated at 37 °C for 72 h. The alpha-amylase activity after precipitation with 75% ammonium sulfate solutions was 3.563 U/mL. As a result, the purity of alpha-amylase precipitated with 75% saturated ammonium sulfate was estimated to be 26.8% and its molecular weight was 63 KDa

Discussion and Conclusion: Based on the results of the study, solid-state fermentation is a new and valuable way for amylase production using *Bacillus subtilis*.

Key words: Alpha-amylase, *Bacillus Subtilis*, Wheat Bran, Solid-State Fermentation (SSF), Enzyme Purification

* Corresponding author
Received: May 14, 2020 / **Accepted:** March 21, 2021

فصلنامه علمی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها (نوع مقاله پژوهشی)
سال دهم، شماره ۳۹، پاییز ۱۴۰۰ ، صفحه ۱۱-۱
تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۲/۲۵ – تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۰۱
doi: 10.22108/BJM.2021.122808.1298

بهینه‌سازی تولید آلفا آمیلاز با استفاده از باکتری *باسیلوس سابتیلیس* PTCC 1720 در شرایط تخمیر بستر جامد و خالص‌سازی جزئی آنزیم

نسرین مسعودی: کارشناس ارشد گروه ژنتیک، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران، nasrin.masoodi1991@gmail.com
محسن مبینی دهکردی*: دانشیار گروه ژنتیک، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران، mmobinid@gmail.com
بهناز صفار دانشیار گروه ژنتیک، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران، saffar_b@sku.ac.ir

چکیده

مقدمه: آلفا آمیلاز از پرکاربردترین آمیلازها در صنعت است. تولید آمیلاز باکتریایی کم‌هزینه‌تر و آسان‌تر است. همچنین، روش تخمیر در حالت جامد به‌دلیل مزایایی همچون کاهش چشمگیر هزینه‌ها و بازیافت مواد زائد سرشار از مواد مغذی یک روش کارآمد برای تولید آمیلاز صنعتی است. بقایای کشاورزی حاوی ترکیبات مغذی مانند سبوس گندم، سوبستراهای اقتصادی‌تری برای تخمیر در حالت جامدند. هدف این پژوهش، بهینه‌سازی تولید آلفا آمیلاز از *باسیلوس سابتیلیس* با استفاده از سبوس گندم در شرایط تخمیر در بستر جامد و تخلیص جزئی این آنزیم بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تولید آلفا آمیلاز *باسیلوس سابتیلیس* PTCC 1720 در شرایط تخمیر بستر جامد بررسی و بهینه‌سازی شده است. تمامی پروتئین‌های تولیدشده در شرایط بهینه با محلول اشباع آمونیوم سولفات ۷۵ درصد رسوب‌دهی، جداسازی، تغلیظ و دیالیز شدند. فعالیت آلفا آمیلاز با کمک معرف دی‌نیترو سالیسیلیک‌اسید (DNS) سنجیده شد. درصد خلوص با روش بردفورد و خلوص جزئی آنزیم با روش الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌آمید – سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) مشخص شد.

نتایج: تولید بهینهٔ آنزیم زمانی حاصل شد که ۱۰ گرم سبوس گندم با ۱۵میلی‌لیتر آب شهری مخلوط شد و با ۳ میلی‌لیتر از مایه تلقیح با جذب نوری ۱ (10^9 CFU/mL) تلقیح و در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت گرماگذاری شد. فعالیت آلفا آمیلاز بعد از رسوب‌دهی با آمونیوم سولفات ۷۵ درصد، (U/mL) ۳/۵۶۳ بود و میزان خلوص آنزیم ۲۶/۸ درصد محاسبه شد. وزن آنزیم تخلیص‌شده نیز ۶۳ کیلودالتون ارزیابی شد.

بحث و نتیجه‌گیری: براساس یافته‌های این تحقیق، تخمیر بر بستر جامد با حضور *باسیلوس* می‌تواند مسیری جدید و ارزشمند برای تولید آنزیم آمیلاز فراهم کند.

واژه‌های کلیدی: آلفا آمیلاز، *باسیلوس سابتیلیس*، سبوس گندم، تخمیر در بستر جامد، تخلیص آنزیم

---

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2021, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

آمیلازها به گروه آنزیم‌های گلیکوزیل هیدرولازها تعلق دارند که تجزیهٔ ترکیبات کربوهیدراتی را کاتالیز می‌کنند. سه گروه اصلی از آمیلازها شامل آلفا، بتا و گاما هستند که آلفا آمیلازها در حیوانات، گیاهان، قارچ‌ها و باکتری‌ها؛ بتا آمیلازها در دانه‌های گیاهان، باکتری‌ها و قارچ‌ها و گاما آمیلازها در مخمر و قارچ‌ها یافت می‌شوند. باوجود تفاوت‌هایی در ساختار و نحوهٔ عمل آمیلازها عملکرد اصلی همه آنها تجزیهٔ نشاسته و قندهاست. آلفا آمیلاز به‌طور تصادفی نشاسته را تجزیه می‌کند و به‌دلیل همین عملکرد غیراختصاصی سرعت هضم بالاتری نسبت به سایر آمیلازها دارد [۱]. آلفا آمیلازها (۴←۱ آلفا دی‌گلوکان گلوکانوهیدرولازها ;EC 3.2.1.1) آنزیم‌های حاوی کلسیم‌اند که یک خانواده از اندو آمیلازها را تشکیل می‌دهند و پیوندهای آلفا دی ۴←۱ گلیکوزیدی را در نشاسته و کربوهیدرات‌های مرتبط تجزیه می‌کنند [۲]. آلفا آمیلاز می‌تواند زنجیره‌های طولانی کربوهیدرات‌ها را تجزیه کند که درنهایت، مالتوز از آمیلوز یا مالتوز، گلوکز و مقداری دکسترین از آمیلو پکتین به دست می‌آید [۳]. آلفا آمیلاز به‌صورت گسترده در صنایع مختلف استفاده می‌شود؛ ازجمله برای هیدرولیز نشاسته در فرایند مایع‌سازی نشاسته، برای تبدیل نشاسته به شربت فروکتوز و گلوکز، برای بهبود آرد در صنعت پخت و پز، برای تولید نشاستهٔ اصلاح‌شده در صنعت کاغذ، برای حذف نشاسته در تولید پارچه و به‌عنوان افزودنی مؤثر در تهیه شوینده‌ها [۴]. همچنین، در فرایند تولید اتانول زیستی استفاده می‌شود. این آنزیم می‌تواند در زمینه‌های مرتبط با زیست‌فناوری مانند اصلاح آلاینده‌های محیط زیست، تبدیل نشاسته به سوبستراهای مطلوب توسط بسیاری از میکروارگانیسم‌ها، نفوذ به پساندهای حاوی نشاسته و تولید مواد بیوشیمیایی استفاده شود. با ظهور مرزهای جدید در زیست‌فناوری طیف کاربردهای آمیلاز به بسیاری از زمینه‌های دیگر مانند بالینی، دارویی و شیمی تجزیه گسترش یافته است [۵].

آنزیم‌های فعال زیستی از حیوانات، گیاهان و میکروارگانیسم‌ها به دست می‌آیند. آنزیم‌های میکروبی به‌دلیل مزایایی همچون جداسازی و تغلیظ آسان‌تر، تولید با هزینهٔ کمتر در یک بازهٔ زمانی، پایداری در شرایط سخت محیطی و کنترل ترکیبات جانبی در حین تولید آنها بیشتر توصیه شده‌اند. بیشتر آنزیم‌های تولیدشده از میکروب‌ها به‌دلیل ترشح به محیط از دیدگاه زیست‌فناوری دارای مزیت‌اند. از میان گونه‌های میکروبی که آمیلاز ترشح می‌کنند، تولید آمیلاز از باکتری‌ها نسبت به سایر میکروارگانیسم‌ها ارزان‌تر و آسان‌تر است. طیف وسیعی از باکتری‌ها برای تولید آمیلاز معرفی شده‌اند که بیشتر گونه‌های *باسیلوس* شامل *باسیلوس سابتیلیس*[۱]، *باسیلوس استئاروترموفیلوس*[۲]، *باسیلوس آمیلولیکوئی فاسینس*[۳]، *باسیلوس لیکنی فورمیس*[۴]، *باسیلوس کوآگولانس*[۵]، *باسیلوس پلی‌میکسا*[۶] هستند [۶]. آمیلازهای تولیدشده توسط گونه‌های مختلف *باسیلوس* حدود ۵۰ درصد بازار جهانی آنزیم‌ها را به خود اختصاص می‌دهند [۷]. گونه‌های *باسیلوس سابتیلیس*، *باسیلوس استئاروترموفیلوس* و *باسیلوس لیکنی‌فورمیس* منابع مناسبی برای تولید آلفا آمیلاز مقاوم به حرارت‌اند و درنتیجه از لحاظ تجاری گونه‌های درخور توجهی به شمار می‌روند [۸] همچنین، *باسیلوس سابتیلیس* قادر است سطح بالایی از این آنزیم سودمند را تولید کند [۹].

آمیلازها حدود ۳۳-۲۳ درصد از بازار جهانی آنزیم را به خود اختصاص می‌دهند؛ با این حال، هزینهٔ تولید آنزیم در مقیاس صنعتی بالاست. برآورد شده است فرمولاسیون محیط کشت میکروبی حدود ۴۰-۳۰ درصد هزینهٔ نهایی آنزیم را به خود اختصاص می‌دهد. نیاز به کاهش هزینه‌ها برای تولید آنزیم‌های صنعتی باعث تحقیق برای یافتن محیط کشت کم‌هزینه می‌شود. در این راستا باقیمانده‌های کشاورزی به‌عنوان سوبسترا برای آنزیم‌های میکروبی در شرایط تخمیر در حالت جامد استفاده می‌شود [۱۰].

به‌طور عمده دو روش برای تولید آلفا آمیلاز در مقیاس صنعتی وجود دارد: ۱- تخمیر در محیط کشت مایع و ۲- تخمیر در بستر جامد. تخمیر در حالت جامد یک روش جدید و تخمیر در حالت مایع یک روش متداول برای تولید آنزیم از میکروب‌ها با یک سابقهٔ طولانی است [۱۱]؛ با وجود این، تخمیر در حالت جامد به‌عنوان یک زیستگاه شبیه زیستگاه طبیعی میکروارگانیسم جایگزین تخمیر در حالت مایع می‌شود. تخمیر در حالت جامد به‌دلیل ساده‌بودن، کم‌هزینه‌بودن، نیاز به انرژی کمتر، خروجی آب کمتر و عدم تشکیل کف زیاد نسبت به تخمیر در حالت مایع انتخاب بهتری است [۳]. مزیت اصلی در این روش بازیافت مواد زائد سرشار از مواد مغذی و استفاده از آنها به‌عنوان سوبسترا برای محیط کشت است [۱۱]. تعداد زیادی از محصولات جانبی مانند سبوس گندم، پوسته برنج، بقایای فیبر کاساوا، نشاسته برنج، پوست خشک‌شدهٔ سیب‌زمینی، پوست موز، کیک کلزا، کیک روغن نارگیل و کیک روغن خردل به‌عنوان سوبسترا برای تخمیر در حالت جامد استفاده شده‌اند. در این میان، باقیمانده‌های کشاورزی به‌دلیل وجود ترکیبات مغذی، سوبستراهای اقتصادی‌تری برای تخمیر در حالت جامدند. سبوس گندم به‌دلیل اینکه نسبت بالاتری از کربوهیدرات‌های متابولیزه‌شونده (۸۰ درصد) را نسبت به سایر باقیمانده‌های کشاورزی دارد، منبع کربن بهتری است و بیشترین استفاده را به‌عنوان سوبسترا برای تخمیر در حالت جامد دارد. علاوه بر این، سبوس گندم حاوی پروتئین، فیبرهای غذایی، عناصر معدنی و اسید آمینه‌های ضروری مختلف برای رشد و تکثیر باکتری‌ها و درنهایت تولید آنزیم است [۱۲].

آنزیم‌هایی که برای کاربردهای صنعتی استفاده می‌شوند به پردازش و درصد خلوص کمتری نیاز دارند؛ درحالی‌که آنزیم‌های استفاده‌شده در صنایع دارویی و بالینی باید درصد خلوص بالایی داشته باشند. همچنین، زمانی که آنزیم‌ها برای مطالعهٔ ویژگی‌های بیوشیمیایی و رابطهٔ ساختار و عملکرد استفاده می‌شوند باید کامل خالص شده باشند. پروتئین‌ها با استفاده از تکنیک‌های مشخصی خالص‌سازی می‌شوند که شامل رسوب‌دهی با آمونیوم سولفات، اولترافیلتراسیون، دیالیز، کروماتوگرافی تعویض یونی، کروماتوگرافی ستونی است؛ این تکنیک‌ها به خالص‌سازی مرحله به مرحله نیاز دارند. ترکیب این روش‌های بالا در یکسری از مراحل برای رسیدن به درصد خلوص بالا انجام می‌شود [۱۱].

هاشمی و همکاران در سال ۱۳۹۰ تولید آلفا آمیلاز غیروابسته به کلسیم توسط باسیلوس سویهٔ KR-8104 را در دو سامانهٔ تخمیر غوطه‌ور و حالت جامد ارزیابی کردند [۱۳]. همچنین، عظیمی و همکاران در سال ۱۳۹۲ تولید آلفا آمیلاز توسط *باسیلوس لیکنی فورمیس* را در شرایط تخمیر در حالت جامد با استفاده از سبوس گندم ترکیب‌شده با محلول محیط‌های پایه بهینه‌سازی کردند [۱۴]. کابوسی و همکاران در سال ۱۳۹۳ تولید آلفا

آمیلاز توسط *باسیلوس آمیلولیکویی فاسینس* را با استفاده از عصارهٔ نخود فرنگی و کنجاله تخم پنبه با روش تخمیر غوطه‌ور بهینه‌سازی کردند [۱۵] و صمد لویی و همکاران در سال ۱۳۹۴ تولید آلفا امیلاز از گونهٔ باکتری مذکور را بررسی و بهینه‌سازی کردند [۱۶]. درنهایت در سال ۱۳۹۶ *باسیلوس*های مولد آلفا آمیلاز مقاوم به حرارت شناسایی شدند و افریشم و همکاران بهینه‌سازی تولید آنزیم و بررسی فعالیت و پایداری آنزیم را بررسی کردند [۱۷].

هدف این پژوهش، بررسی و بهینه‌سازی تولید آلفا آمیلاز از *باسیلوس سابتیلیس* در شرایط تخمیر در بستر جامد با استفاده از سوبسترای سبوس گندم و بررسی میزان تولید و درصد خلوص آنزیم تولیدشده بعد از خالص‌سازی جزئی به روش رسوب‌دهی با آمونیوم سولفات است.

مواد و روش‌ها

تهیهٔ مایه تلقیح: به‌منظور تهیهٔ مایه تلقیح، ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت TSB با یک پرگنه ایزوله از باکتری *باسیلوس سابتیلیس* PTCC 1720، تلقیح و به مدت ۱۲ ساعت در انکوباتور شیکردار با دور rpm ۱۳۰ و دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد گرماگذاری شد. سپس ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت TSB تازه با یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری (با جذب نوری ۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر) به‌دست‌آمده از مرحلهٔ قبل، تلقیح و در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و ۱۳۰ دور در دقیقه به مدت دو ساعت گرماگذاری شد تا جذب نوری مایه تلقیح به ۱ (10^9 CFU/mL) برسد.

شرایط تخمیر در بستر جامد: ۱۰ گرم از سبوس گندم به یک ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری انتقال داده و با ۱۰ میلی‌لیتر از آب شهری مخلوط شد. ارلن‌ها بعد از پنبه‌گذاری به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجهٔ سانتی‌گراد در اتوکلاو استریل شدند. بعد از سردشدن در دمای اتاق ارلن‌ها با ۲ میلی‌لیتر مایه تلقیح با جذب نوری ۱، تلقیح و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند [۱۲].

استخراج آنزیم: آنزیم‌های تولیدشده در شرایط تخمیر در بستر جامد با اضافه‌کردن ۵۰ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۰/۰۲ مولار با pH= ۷ به ۱۰ گرم سبوس گندم بعد از فرایند تخمیر و نگهداری در انکوباتور شیکردار با دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد با دور rpm ۱۰۰ به مدت ۲ ساعت، از فاز جامد به فاز مایع وارد شدند و برای جداسازی آنزیم از سایر ترکیبات سوسپانسیون حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد با دور rpm ۶۰۰۰ سانتریفیوژ شد تا آنزیم‌ها در مایه رویی تجمع یابند [۸ و ۱۰].

سنجش فعالیت آنزیم: فعالیت آنزیم با روش DNS (دی‌نیترو سالیسیلیک اسید) اندازه گیری شد [۱۸]. برای تعیین فعالیت آنزیم، ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول به‌دست‌آمده از مرحلهٔ قبل با ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول نشاستهٔ محلول در آب (سیگما – آلدریچ) یک درصد مخلوط شد و به مدت ۵ دقیقه در انکوباتور با دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد و ۱۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت. سپس غلظت قندهای کاهندهٔ آزادشده از سوبسترای نشاسته با اندازه‌گیری جذب نوری محلول در ۵۴۰ نانومتر با روش DNS سنجش شد.

شاهد استفاده‌شده برای صفرکردن دستگاه اسپکتوفتومتر شامل همه مواد درگیر در واکنش سنجش فعالیت آنزیمی به‌جز محلول حاوی آنزیم تولیدشده توسط باکتری است.

بهینه‌سازی تولید آنزیم: برای شکل‌گیری حداکثر تولید میکروارگانیسم‌ها باید شرایط کشت ازنظر پارامترهایی مانند زمان، دما، میزان رطوبت و میزان حجم مایهٔ تلقیح بهینه‌سازی شوند.

به‌منظور دستیابی به زمان بهینهٔ انکوباسیون بعد از آماده‌سازی ۱۵ عدد ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری در هر ارلن ۱۰ گرم سبوس گندم با ۱۰ میلی‌لیتر از آب شهری مخلوط شد. ارلن‌ها بعد از پنبه‌گذاری به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجهٔ سانتی‌گراد در اتوکلاو استریل شدند. بعد از سردشدن در دمای اتاق، ارلن‌ها با ۲ میلی‌لیتر مایهٔ تلقیح با جذب نوری ۱ تلقیح شدند و بعد از گذشت ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت از زمان کشت در سه تکرار ارزیابی شدند.

به‌منظور بررسی اثر رطوبت محیط بر تولید آنزیم بعد از آماده‌سازی ۱۲ عدد ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری، به هر ارلن ۱۰ گرم سبوس گندم، اضافه و به‌ترتیب هر ارلن با ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی‌لیتر از آب شهری مخلوط شد. ارلن‌ها بعد از پنبه‌گذاری به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجهٔ سانتی‌گراد در اتوکلاو استریل شدند. بعد از سردشدن در دمای اتاق، ارلن‌ها با ۲ میلی‌لیتر مایهٔ تلقیح با جذب نوری ۱، تلقیح و به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند و بعد از این زمان تولید آنزیم بررسی شد.

برای بررسی اثر حجم مایهٔ تلقیح بر تولید آنزیم بعد از آماده‌سازی ۱۲ عدد ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری، در هر ارلن ۱۰ گرم سبوس گندم با ۱۵ میلی‌لیتر از آب شهری مخلوط شد. ارلن‌ها بعد از پنبه‌گذاری به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجهٔ سانتی‌گراد در اتوکلاو استریل شدند. بعد از سردشدن در دمای اتاق به‌ترتیب هر ارلن با ۱، ۳ و ۴ میلی‌لیتر مایهٔ تلقیح با جذب نوری ۱، تلقیح و به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند.

به‌منظور بررسی اثر دمای انکوباسیون بر تولید آنزیم بعد از آماده‌سازی ۹ عدد ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری در هر ارلن ۱۰ گرم سبوس گندم با ۱۵ میلی‌لیتر از آب شهری مخلوط شد. ارلن‌ها بعد از پنبه‌گذاری به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجهٔ سانتی‌گراد در اتوکلاو استریل شدند. بعد از سردشدن در دمای اتاق، ارلن‌ها با ۳ میلی‌لیتر مایهٔ تلقیح با جذب نوری ۱، تلقیح و به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتورهایی با دمای ۳۰، ۳۷ و ۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند.

فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز اینگونه تعریف می‌شود؛ میزان پروتئینی که در یک گرم سوبسترای مناسب تولید شده است و می‌تواند یک میلی‌گرم قند کاهنده مانند مالتوز را در یک دقیقه در شرایط سنجش فعالیت آنزیم آزاد کند و به‌صورت U/gds مطرح می‌شود؛ gds میزان سوبسترای خشکی است که محاسبه می‌شود [۱۲].

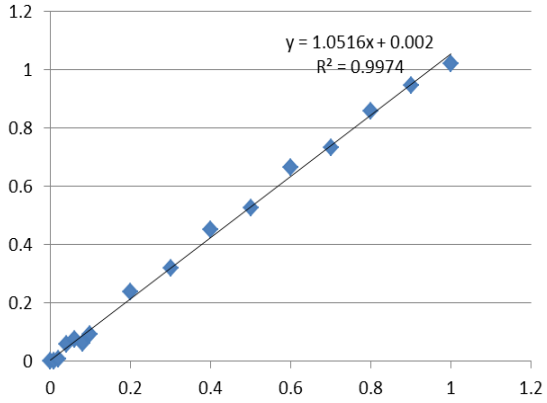
شاهد استفاده‌شده برای پیشگیری از ایجاد خطا در محاسبات تولید آنزیم، به‌دلیل وجود کربوهیدرات‌های متابولیزه (قندهای کاهنده) در سبوس گندم، شامل همه مواد درگیر در واکنش سنجش فعالیت آنزیمی به‌جز محلول نشاسته است. به‌جای محلول نشاسته از آب دوبار تقطیر استفاده شد.

تخلیص جزئی آلفا آمیلاز ازطریق رسوب‌دهی با آمونیوم سولفات: پروتئین‌های تولیدشده توسط باکتری باسیلوس *سابتیلیس* در شرایط تخمیر در بستر جامد (پروتئین‌های موجود در ۴۵ میلی‌لیتر از محلول به‌دست‌آمده در فرایند استخراج آنزیم) در حداقل سه تکرار ازطریق رسوب‌دهی با محلول اشباع ۷۵ درصد نمک آمونیوم سولفات رسوب‌دهی، جداسازی و تغلیظ

شدند. سپس برای حذف نمک آمونیوم سولفات از محلول به‌دست‌آمده، فرایند دیالیز با کیسهٔ دیالیز با برش مولکولی[۷] ۱۲۰۰۰ دالتون در مقابل آب مقطر استریل با چرخش مداوم به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد و تعویض بافر دیالیز در فاصله‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ ساعت انجام شد.

الکتروفورز با ژل سدیم دودسیل سولفات پلی‌آکریل‌آمید: الکتروفورز عمودی ژل پلی‌اکریل‌آمید – سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) برای مشاهدهٔ اندازهٔ آلفا آمیلاز حاصل‌شده و اطمینان از تخلیص نسبی طبق روش زیر انجام شد؛ ژل جداکننده با غلظت ۱۲ درصد و ژل متراکم‌کننده با غلظت ۵ درصد تهیه شد و ۴۰ میکرولیتر از نمونه‌های آماده‌شده درون هریک از چاهک‌ها تزریق شد. در یکی از چاهک‌های کنار نمونه‌ها نیز مارکر اندازه پروتئینی در نظر گرفته شد. پس از رسیدن نمونه‌ها به پایین ژل، جریان برق قطع شد، دو شیشهٔ قالب به آرامی از هم جدا شدند و ژل با آب مقطر شست‌وشو داده شد. بعد از آن، ژل به مدت ۱۶ ساعت در محلول رنگ‌زا قرار داده شد و سپس به مدت ۴ ساعت در محلول رنگ‌بر قرار گرفت تا باندها قابل مشاهده شدند [۱۹].

تعیین میزان غلظت آنزیم: برای بررسی محتوی پروتئینی نمونه‌های تخلیص‌شده و درصد خلوص آلفا آمیلاز، آزمون بردفورد انجام شد. مقدار ۱/۸ میلی‌لیتر محلول کار بردفورد (۶ میلی‌لیتر محلول ذخیرهٔ بردفورد – ۵۳ میلی‌گرم کوماسی بلو، اتانول ۹۵ درصد و ۲۰ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۸۵ درصد – ۳ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد و ۶ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۸۵ درصد را با آب دوبار تقطیر به حجم ۱۰۰ می‌رسانیم) در لوله آزمایش ریخته شد، ۲۰۰ میکرولیتر نمونهٔ پروتئینی به آن اضافه و به‌عنوان شاهد در یک لوله آزمایش نیز به‌جای ۲۰۰ میکرولیتر نمونهٔ پروتئینی، آب مقطر ریخته شد. از مخلوط حاصل به‌عنوان بلانک در مرحلهٔ بعد استفاده شد. جذب نوری مخلوط‌های پروتئینی در ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. با استفاده از نمودار استاندارد بردفورد، میزان پروتئین موجود در هر نمونه محاسبه شد [۲۰].



شکل ۱– نمودار استاندارد بردفورد [۲۱]

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: تمامی داده‌های حاصل از آزمایش‌های مختلف با نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۳ و با کمک آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) در سطح اطمینان ۹۵ درصد تجزیه و تحلیل شدند.

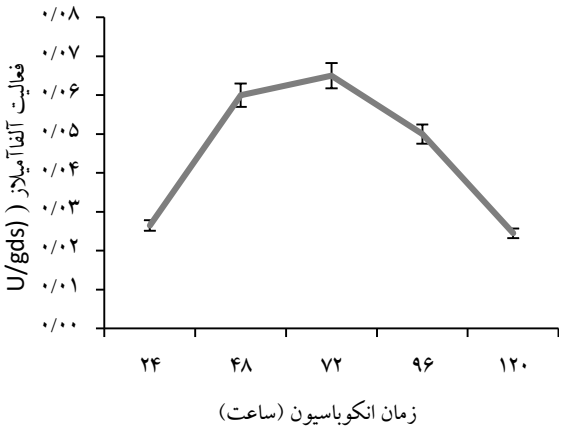
نتایج

اثر مدت زمان انکوباسیون بر تولید آنزیم: شکل ۲ اثر مدت زمان انکوباسیون بر میزان تولید آلفا آمیلاز توسط باکتری *باسیلوس سابتیلیس* را در شرایط تخمیر در بستر جامد نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده مشاهده می‌شود با گذشت زمان تولید آنزیم افزایش می‌یابد، در زمان ۷۲ ساعت تولید آنزیم به بیشترین مقدار خود می‌رسد و بعد از آن با گذشت زمان تولید آنزیم کاهش می‌یابد.

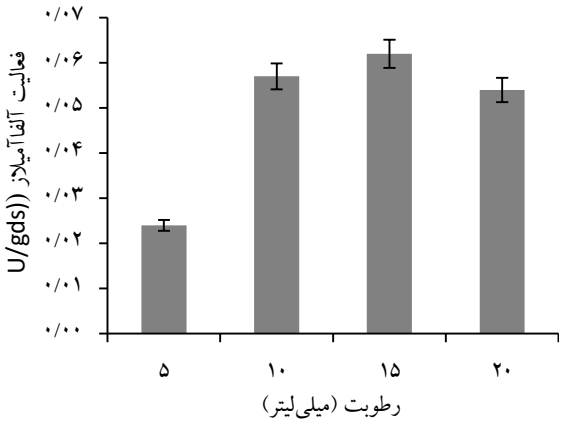
۷۲ ساعت پس از گرمخانه‌گذاری، بهینه شرایط برای تولید آلفا آمیلاز توسط *باسیلوس سابتیلیس* در شرایط تخمیر در بستر جامد اتفاق می‌افتد. اختلاف مشاهده‌شده بین فعالیت آنزیم در زمان ۲۴ با فعالیت آنزیم در سایر زمان‌ها در سطح ۵ درصد معنادار است ($p<0.05$).

اثر رطوبت محیط بر تولید آنزیم: شکل ۳ اثر رطوبت بر میزان تولید آلفا آمیلاز توسط باکتری *باسیلوس سابتیلیس* را در شرایط تخمیر در بستر جامد نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود میزان تولید آنزیم با افزایش رطوبت محیط افزایش می‌یابد و بیشترین میزان تولید آنزیم زمانی به دست می‌آید که ۱۰ گرم سبوس گندم با ۱۵ میلی‌لیتر آب مخلوط شود و از آن پس با افزایش رطوبت تولید آنزیم کاهش یابد. میزان فعالیت آنزیم در شرایطی که ۵ میلی‌لیتر آب به محیط کشت اضافه شده است، با سایر موارد اختلاف نشان می‌دهد این اختلاف در سطح ۵ درصد معنادار است ($p<0.05$).

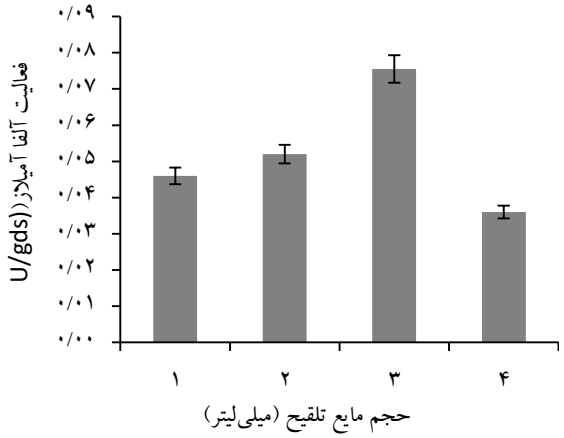
اثر حجم مایهٔ تلقیح بر تولید آنزیم: شکل ۴ اثر حجم مایهٔ تلقیح بر میزان تولید آلفا آمیلاز توسط باکتری *باسیلوس سابتیلیس* را در شرایط تخمیر در بستر جامد نشان می‌دهد. میزان بهینه و بیشترین میزان تولید آنزیم با تلقیح ۱۰ گرم سبوس گندم ۳ میلی‌لیتر از مایهٔ تلقیح حاصل شد. در حجم‌های کمتر و بیشتر از حجم بهینهٔ مایهٔ تلقیح، میزان تولید آنزیم کاهش یافت. اختلاف مشاهده‌شده در فعالیت آنزیم بین حجم‌های تلقیح ۱ و ۳ میلی‌لیتر در سطح ۵ درصد معنادار است ($p<0.05$). معناداربودن اختلاف فعالیت آنزیم بین حجم‌های تلقیح ۳ و ۴ نیز در سطح ۵ درصد تأیید شد؛ اما بین سطوح دیگر خیر.



شکل ۲. بررسی اثر مدت زمان انکوباسیون بر فعالیت آنزیم

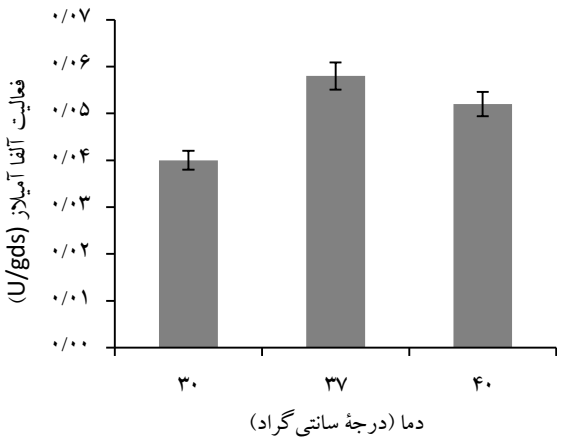


شکل ۳- بررسی اثر رطوبت محیط بر فعالیت آنزیم



شکل ۴- بررسی اثر حجم مایهٔ تلقیح بر فعالیت آنزیم

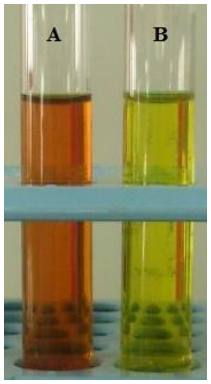
اثر دما بر تولید آنزیم: اثر دما بر تولید آلفا آمیلاز در شکل ۵ مشاهده می‌شود. دمای بهینه برای تولید آلفا آمیلاز از باکتری *باسیلوس سابتیلیس* در شرایط تخمیر در بستر جامد ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد است و در دماهای پایین‌تر و بیشتر از این دما میزان تولید آنزیم کاهش می‌یابد. اختلاف مشاهده‌شده بین فعالیت آنزیم در دماهای مختلف در سطح ۵ درصد معنادار است ($p<0.05$).



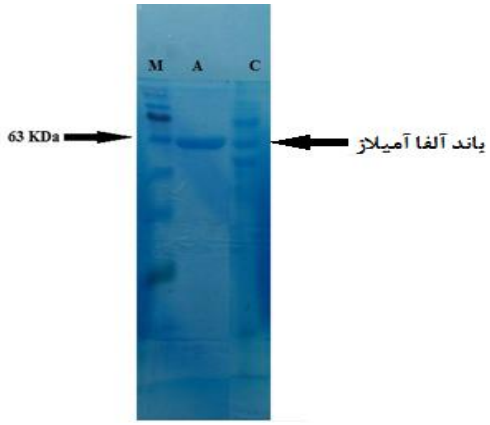
شکل ۵- بررسی اثر دمای انکوباسیون بر فعالیت آنزیم

تخلیص جزئی آلفا آمیلاز: تخلیص جزئی آلفا آمیلاز از مجموعه پروتئین‌های تولیدشده توسط باکتری *باسیلوس سابتیلیس* در شرایط تخمیر در بستر جامد با استفاده از محلول اشباع ۷۵ درصد نمک آمونیوم سولفات انجام شد (شکل ۶) و فعالیت آلفا آمیلاز بعد از رسوب‌دهی، تغلیظ و دیالیز U/mL ۳/۵۶۳ محاسبه شد.

ویژگی‌های آلفا آمیلاز و درصد خلوص: بعد از تخلیص جزئی آلفا آمیلاز تولیدشده در شرایط بهینه با محلول اشباع ۷۵ درصد آمونیوم سولفات برای بررسی کیفیت و وزن مولکولی آلفا آمیلاز تخلیص شده است و نمونه‌ها روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۲ درصد بارگزاری شده‌اند. همان‌طور که در شکل ۷ مشاهده می‌شود آلفا آمیلاز تخلیص‌شده ۶۳ کیلودالتون است و همچنین حضور این باند تأیید کیفی تخلیص آلفا آمیلاز را اثبات می‌کند. برای محاسبهٔ درصد خلوص آلفا آمیلاز تخلیص‌شده آزمون بردفورد انجام شد. فعالیت ویژهٔ آنزیم U/mg ۰/۲۶۸ و درصد خلوص آنزیم ۲۶/۸ محاسبه شده است.



شکل ۶- نتیجهٔ سنجش فعالیت آنزیم با معرف DNS بعد از رسوب‌دهی با آمونیوم سولفات ۷۵ درصد و دیالیز. (B- بلانک، A- نمونهٔ بعد از دیالیز)



شکل ۷- تصویر الکتروفورز عمودی (SDS-PAGE) خالص‌سازی جزئی آلفا آمیلاز تولیدشده توسط باکتری *باسیلوس سابتیلیس* در شرایط تخمیر در بستر جامد (M- مارکر پروتئینی، A- کنترل مثبت، - نمونهٔ حاصل از خالص‌سازی جزئی آلفا آمیلاز تولیدشده در بستر جامد)

بحث

گونه‌های *باسیلوس* مهم‌ترین منابع تولید آلفا آمیلاز و سایر آنزیم‌ها با روش‌های مختلف تخمیرند [۳]. در این مطالعه توانایی *باسیلوس سابتیلیس* برای تولید آلفا آمیلاز در شرایط تخمیر بستر جامد بررسی و تأیید شد که به‌نوبه‌خود واجد اهمیت فراوان است. همچنین پارامترهای محیطی مانند دمای انکوباسیون، زمان انکوباسیون، رطوبت محیط و حجم مایهٔ تلقیح برای تولید آلفا آمیلاز توسط باکتری *باسیلوس سابتیلیس* در روش تخمیر در حالت جامد با استفاده از سبوس گندم بهینه‌سازی شدند. بیشترین میزان تولید آنزیم زمانی به دست آمد که ۱۰ گرم سبوس گندم با ۱۵ میلی‌لیتر آب شهری، مخلوط و با ۳ میلی‌لیتر از مایهٔ تلقیح به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد.

اثر مدت زمان انکوباسیون بر تولید آنزیم: با توجه به اینکه باکتری *باسیلوس سابتیلیس* بعد از گذشت ۷۲ ساعت به فاز سکون رشد می‌رسد، حداکثر تجمع آلفا آمیلاز در انتهای فاز لگاریتمی رشد و در همین زمان دیده می‌شود. همچنین کاهش میزان تولید آلفا آمیلاز بعد از گذشت ۷۲ ساعت ممکن است به‌دلیل انتشار سطح بالایی از پروتئازهای درون سلولی هم‌زمان با تشکیل آندوسپور باشد.

اثر رطوبت محیط بر تولید آنزیم: افزایش میزان تولید آنزیم با افزایش رطوبت محیط کشت را می‌توان به نیاز باکتری‌ها به فعالیت بالای آب مرتبط دانست. بدیهی است بهترین میزان رطوبت برای تولید آنزیم در باکتری در شرایطی اتفاق می‌افتد که بهینهٔ رشد انجام شود و حضور مولکول‌های آب مانع انتشار مطلوب اکسیژن و انتقال مواد مغذی به درون سلول‌های باکتری نشود.

اثر حجم مایهٔ تلقیح بر تولید آنزیم: علت میزان کم تولید آنزیم در حجم‌های پایین از مایهٔ تلقیح را می‌توان به تعداد کم سلول‌های زنده در محیط تولید مرتبط دانست و این سلول‌ها به زمان بیشتری برای رشد و رسیدن به تعداد مطلوب برای استفاده از مواد مغذی محیط کشت برای تولید بهینهٔ آنزیم نیاز دارند؛ درحالی‌که ممکن است دلیل میزان کم تولید در حجم‌های بیشتر از حجم بهینهٔ مایهٔ تلقیح، کم‌بودن مواد مغذی برای تعداد زیاد سلول‌های زنده و تجمع متابولیت‌های سمی باشد.

اثر دما بر تولید آنزیم: تولید آنزیم با افزایش دما تا نقطه‌ای روند افزایشی نشان می‌دهد که برای باکتری مناسب است و رشد خود را به خوبی انجام می‌دهد؛ اما با افزایش بیشتر دما تولید آنزیم کاهش می‌یابد. این ممکن است به‌علت از دست دادن رطوبت در بستر جامد و عدم شرایط بهینهٔ فعالیت سلول‌های میکروبی باشد که به کاهش رشد و کاهش تولید آنزیم منجر می‌شود.

نتایج حاصل از تولید و تخلیص جزئی آنزیم و همچنین درصد خلوص آلفا آمیلاز در این مطالعه بیان‌کنندهٔ این موضوع است که روش تخمیر در بستر جامد با بهره‌گیری از ضایعات دورریز کشاورزی مانند سبوس گندم یک پیشنهاد مناسب برای تولید آلفا آمیلاز در مقیاس صنعتی است.

سپاسگزاری

از مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه شهرکرد بابت حمایت مالی و از دکتر صادق فرهادیان استادیار گروه زیست‌شناسی بابت مشاوره در زمینهٔ خالص‌سازی آنزیم کمال تشکر و قدردانی را داریم.

References

(1) Azzopardi E, Lloyd C, Teixeira S, Conlan R, Whitaker I. Clinical applications of amylase: novel perspectives. *Surgery*. 2016; 160 (1): 26–37

(2) Naidu M, Saranraj P. Bacterial amylase: a review. International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives. 2013; 4 (2): 274 - 287.

(3) Raul D, Biswas T, Mukhopadhyay S, Kumar Das S, Gupta S. Production and partial purification of alpha amylase from *Bacillus subtilis* (mtcc 121) using solid state fermentation. *Biochemistry Research Internationa*l. 2014; 2014: 5.

(4) Nielsen J, Borchert T. protein engineering of bacterial α-amylases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*. 2000; 1543 (2): 253-274

(5) Mobini-Dehkordi M, Afzal Javan F. Application of alpha-amylase in biotechnology. *Biology and Today's World*. 2012; 1 (1): 39–50.

(6) Gopinath S, Anbu P, Arshad M, Lakshmipriya T, Voon C, Hashim U, et al. Biotechnological processes in microbial amylase production. *BioMed Research International*. 2017; 9.

(7) Afzal-Javan F, Mobini-Dehkordi M. Amplification, sequencing and cloning of Iranian native Bacillus subtilis alpha-amylase gene in Saccharomyces cerevisiae. *Journal of Biology and today's world*. 2013; 1(1): 39-50.

(8) Magalhães P, Souza P. Application of microbial α-amylase in industry-a review. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2010; 41 (4): 850-861.

(9) Asgher M, Asad M, Rahman S, Legge R. A thermostable α-amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *Journal of Food Engineering*. 2007; 79 (3): 950-955.

(10) De Oliveira AP, Silvestre MA, Garcia NF, Alves-Prado HF, Rodrigues A, Paz MF, et al. Production and catalytic properties of amylases from Lichtheimia ramosa and thermoascus aurantiacus by solid-state fermentation. *The Scientific World Journal*. 2016; 2016.

(11) Sundarram A, Murthy T. α-Amylase production and applications: a review. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*. 2014; 2 (4): 166-175.

(12) Ikram H, Mahmood Z, Javed M. Solid state fermentation for the production of α-amylase by *Paenibacillus amylolyticus*. *Pakistan Journal of Botany*. 2012; 44 (SPL.ISS.1): 341-346.

(13) Hashemi M, Shojaosadati A, Razavi H, Mousavi M. Evaluation of Ca-independent α-amylase production by Bacillus sp. *KR-8104 in submerged and solid state fermentation systems*. 2011; 9 (3): 188–96.

(14) Azimi S, Deljoo A. *Alpha-amylase production by Bacillus licheniformis in solid-state fermentation*. 8th Conference of Biotechnology, Iran, Tehran, 2013.

(15) Kabusi H, Tabari N, Samadluei H. Improvement of alpha-amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens* using response surface methodology (RSM). *Biological Journal of Microorganisms*. 2014; 3 (11): 79-90.

(16) Samadlouie H, Karimiroozbahani M, Kaboosi H, Farrokhi N. Optimizations of α-amylase production by response surface methodology in immobilization Bacillus amyloliquefaciens ATCC 23350. *Biological Journal of Microorganism*. 2016; 4 (16): 77–86.

(17) Afrisham S, Badoei-delfard A, Namaki Shoushtari A, Karami Z, Malek-abad. Isolation and identification of Bacillus producing thermophilic alpha amylase: production optimization and investigation of the activity and stability of enzyme. *Nova Biologica Reperta*. 2018; 4 (4): 288–98.

(18) Garriga M, Almaraz M, Marchiaro A. Determination of reducing sugars in extracts of undaria pinnatifida (harvey) algae by UV-visible spectrophotometry (DNS method). *Actas de Ingeniería*. 2017; 3: 173-179.

(19) Sambrook J,Russell D. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. 3rd ed. *Cold Spring Harbor*.New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

(20) pour Nouroozi R. Determination of protein concentration using bradford microplate protein quantification assay. *International Electronic Journal of Medicine*. 2015; 4 (1):11-17.

(21) Jafari-Dehkordi S, Mobini-Dehkordi M, Saffar S. *Improvement of alpha-amylase production and molecular identification of isolated thermophile bacteria from Ardabil hot spring*. MSc thesis of Microbial Biotechnology, Shahrekord University, 2014.

[1]- *Bacillus subtilis*
[2]- *Bacillus stearothermophilus*,
[3]- *Bacillus amyloliquefaciens*
[4]- *Bacillus licheniformis*
[5]- *Bacillus coagulans*
[6]- *Bacillus polymyxa*
[7]- Molecular weight cut off