فصلنامه علمی پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال ششم، شماره 21، بهار 1396، صفحه 81 67
تاریخ دریافت: 1394/05/06 – تاریخ پذیرش: 1395/02/21

بررسی ویژگی‌ها و افزایش تولید آمیلاز در سویه‌های جهش‌یافته *باسیلوس‌لیکنیفورمیس* بومی ایران

محسن مینی 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 هیدرولیزکنندهٔ نشاسته است که پیوندهای داخلی گلیکوزیدی در پلی‌ساکاریدها را هیدرولیز می‌کند. آمیلازها یکی از آنزیم‌های صنعتی مهم هستند که گسترهٔ وسیعی از کاربردها را دارا هستند؛ ازجمله تبدیل نشاسته به شربت قند، تولید سیکلودکسترین‌ها؛ همچنین این آنزیم‌ها در صنعت داروسازی و پزشکی کاربرد دارند.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، سویهٔ *باسیلوس‌لیکنیفورمیس* گرمادوست و بومی که از چشمهٔ آب گرم روستای قینرچه از توابع استان اردبیل جداسازی و خالص‌سازی شده بود در محیط نوترینت براث، در معرض پرتو ماوراءبنفش با طول‌موج 254 نانومتر و از فاصلهٔ 1متری به‌مدت 45 ثانیه در دستگاه هودلامینار قرار داده شد. کلیهٔ سویه‌های جهش‌یافتهٔ جداسازی‌شده ازنظر تحمل دمایی و شوری، میزان تولید آمیلازو همچنین ازنظر مقاومت آنتی‌بیوتیکی با سویهٔ والد مقایسه شدند.

نتایج: از بین 70 نمونهٔ جهش‌یافتهٔ جداسازی‌شده تنها دو سویه به‌نام‌های *B.L.2.M.1* و *B.L.2.M.2* توانستند میزان بیشتری آمیلاز نسبت به سویهٔ والد تولید کنند. تفاوت در تولید آنزیم با تغییر در میزان رشد باکتری‌های جهش‌یافته همراه شد؛ به‌طوری که تمامی اختلاف‌های مشاهده‌شده ازنظر آماری در سطح 5درصد معنادار بودند. میزان تولید آنزیم در سویهٔ *B.L.2.M.1* در دمای 40 درجه سانتیگراد بعد از 72 ساعت 41/7درصد نسبت به سویهٔ والد افزایش نشان داد. از طرف دیگر میزان تحمل دمایی و شوری در باکتری جهش‌یافتهٔ *B.L.2.M.1* از سایر باکتری‌های مطالعه‌شده بیشتر ارزیابی شد.

بحث و نتیجه‌گیری: برآیند جهش‌های تصادفی ایجادشده در باکتری جهش‌یافتهٔ *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 ایجادشده در جهش‌یافتهٔ ذکرشده، زمینه برای مطالعات تکمیلی به‌منظورتولید و بهینه‌سازی آنزیم آمیلاز مقاوم به حرارت فراهم شده است.

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2017, 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.

Archive of SID

www.SID.ir

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

مقدمه

آنزیم آمیلاز[1] را انسلم پاین[2] در سال ۱۸۳۳ کشف کرد (1). آنزیم آمیلاز، آنزیم هضم‌کنندهٔ نشاسته است که پیوندهای داخلی گلیکوزیدی در پلی‌ساکاریدها را هیدرولیز می‌کند. نام دیگر آنزیم آمیلاز، گلیکوژناز[3] است. آنزیم‌های آمیلاز متالوآنزیم[4] هستند که به یون کلسیم جهت ایجاد ساختار کامل و انجام فعالیت خود نیاز دارند. آنزیم آمیلاز متعلق به گروه گلیکوزیدهیدرولاز[5] است. گلیکوزیدهیدرولازها قادر به هیدرولیز وسیع ساکاریدها هستند. این آنزیم‌ها براساس حالت واکنش‌ها و اسیدهای آمینه دسته‌بندی می‌شوند. آنزیم آمیلاز دارای چهارده دسته (A ₦) است. این دسته‌ها برای گلیکوزیدها و ترانس گلیکوزیدها تعریف شده است (2). آمیلازها یکی از آنزیم‌های صنعتی مهم هستند که گسترهٔ وسیعی از کاربردها را دارا هستند؛ ازجمله: تبدیل نشاسته به شربت قند، تولید سیکلودکسترین[6]ها؛ همچنین این آمیلازها در صنعت داروسازی کاربرد دارند. این آنزیم‌ها حدود 30درصد از تولید آنزیم‌های جهان را به خود اختصاص داده‌اند (3). آنزیم آمیلاز در میکروارگانیسم‌ها، گیاهان و موجودات زنده تکامل یافته مشاهده می‌شود (4). آنزیم‌های آمیلاز اساساً به 4 گروه تقسیم می‌شوند: اندوآمیلازها، اگزوآمیلازها، شاخه‌شکن[7] و ترانسفرازها[8]. اندوآمیلازها، پیوندهای گلیکوزید داخلی آلفا دی 1،4 نشاسته را هیدرولیز می‌کنند و محصولات آلفا آنومریک[9] تولید می‌کنند. اگزوآمیلازها پیوندهای آلفا 1،4 یا آلفا 1،6 از باقیماندهٔ[10] گلوکز خارجی را هیدرولیز می‌کنند و محصولات آلفا یا بتا آنومریک را تولید می‌کنند. آنزیم‌های شاخه‌شکن، پیوندهای خارجی آلفا 1،6 پلیساکاریدهای خطی را هیدرولیز می‌کنند و ترانسفرازها پیوندهای گلیکوزیدی آلفا 1،4 از مولکول‌دهنده[11] را هیدرولیز می‌کنند و بخشی از مولکول‌دهنده به مولکول‌پذیرنده انتقال داده می‌شود و یک پیوند گلیکوزیدی جدید ایجاد می‌کند (5). محصولات نهایی حاصل از عملکرد آنزیم آمیلاز بر نشاسته، مخلوطی از ترکیبات گلوکز، مالتوز[12]، مالتوتریوز[13] و اولیگوساکاریدهای شاخه‌ای با 6 تا 8 واحد گلوکز است که هر دو پیوند آلفا 1،4 و آلفا 1،6 را شامل می‌شوند (6).

وزن مولکولی آنزیم آمیلاز در موجودات گوناگون متفاوت است و از حدود 10 تا 210 کیلودالتون است. کمترین وزن مولکولی، 10 کیلودالتون برای *باسیلوس کالدولیتیکوس*[14] و بیشترین وزن مولکولی برای *کلروفلکسوسائورنتیکوس*[15] گزارش شده است (7).

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 تحتِ‌تأثیر قرار می‌دهند؛

Archive of SID

www.SID.ir

ازجمله می‌توان به تأثیر پرتوهای موتان‌زا، دما، اسیدیته[16]، دورهٔ گرمخانه‌گذاری، منابع کربن، منابع نیتروژن، مواد فعال سطحی[17]، فسفات، یون‌های فلزی مختلف، رطوبت و فشار اکسایشی[18] اشاره کرد. فعل و انفعالات حاصل از این فاکتورها تأثیر قابلِ‌توجهی را در تولید آنزیم نشان داده است (8).

بهینه‌سازی تولید آنزیم به‌معنای تغییراتی است که بر رشد پرگنه باکتری‌ها و تولید آنزیم اثر می‌گذارد. بهینه‌سازی و دست‌کاری عوامل مختلف بر رشد باکتری‌ها و افزایش تولید آنزیم‌ها از مهم‌ترین روش‌ها برای تولید بیش‌ازحد آنزیم در صنایع است. در این پژوهش، هدف اصلی بررسی اثر پرتو ماوراءبنفش (به‌عنوان عامل جهش‌زای فیزیکی) بر *باسیلوس‌لیکنیفورمیس*[19] گرمادوست جداشده از چشمهٔ آب گرم اردبیل و بررسی و مقایسهٔ خصوصیات مورفولوژی و فیزیولوژی و میزان تولید آنزیم آمیلاز در سویه‌های والد و جهش‌یافته بود.

مواد و روش‌ها

سویه باکتری و محیط‌های کشت: *باسیلوس‌لیکنیفورمیس B.L.2*، نوعی میکروارگانیسم بومی و گرمادوست است که در طی تحقیقات قبلی، مبینی و همکاران[20] آن را با عنوان بهینه‌سازی فرآیند تولید آنزیم آمیلاز و شناسایی مولکولی باکتری گرمادوست از چشمهٔ آب گرم اردبیل، جداسازی و شناسایی کردند؛ توانایی تولید آنزیم آمیلاز آن برابر 3/76 واحد/میلی‌لیتر/دقیقه است. این سویه از چشمهٔ آب گرم روستای قینرچه از توابع استان اردبیل جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی شد (9).

از کشت خالص *باسیلوس‌لیکنیفورمیس* گرمادوست فوق در این پژوهش استفاده شد. سویهٔ موردنظر در محیط نوترینت براث (مرک) کشت داده شد و به‌منظور ایجاد جهش از پرتو ماوراءبنفش (جهش‌زای فیزیکی) استفاده شد.

انجام فرآیند جهش‌زایی با اشعهٔ پرتو ماوراءبنفش و جداسازی جهش‌یافته‌ها: نمونهٔ موردنظر در محیط کشت نوترینت براث تلقیح شد و در دمای 37 درجه سانتیگراد با 100 دور بر دقیقه به‌مدت 18 ساعت گرمخانه‌گذاری شد تا جذب نوری در طول‌موج 600 نانومتر به 0/5 رسید. محیط کشت حاوی نمونهٔ موردنظر 10^6 بار رقیق شد، به‌طوری که در هر 1 میلی‌لیتر محیط کشت، 500 سلول وجود داشت. 5 میلی‌لیتر از محیط کشت رقیق‌شده، در یک پلیت استریل در داخل هودلامینار (ژال تجهیز)، در معرض پرتو ماوراءبنفش با طول‌موج 254 نانومتر و فاصلهٔ 1متری از لامپ ماوراءبنفش در بازه‌های زمانی 2، 5، 10، 20، 30، 40، 50 و 60 دقیقه قرار داده شد. در هنگام پرتودهی با پرتو ماوراءبنفش درِ پلیت برداشته شد. نمونه‌های پرتودیده به محیط کشت آگار مغذی منتقل شدند و در دمای 30 درجه سانتیگراد به‌مدت 24 ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. پس از بررسی و شمارش پرگنه‌های پرتودیده بازهٔ زمانی از دقیقه به ثانیه کاهش یافت. درنهایت پرتو ماوراءبنفش با طول‌موج 254 نانومتر در فاصلهٔ 1متری در بازهٔ زمانی 15، 30، 45، 60، 75، 90، 105 و 120 ثانیه بر نمونه‌های رقیق‌شده، تابیده شد. از سوسپانسیون پرتودیده در هر بازهٔ زمانی 100 میکرولیتر بر روی محیط کشت آگار مغذی کشت داده شد. نمونهٔ شاهد در این آزمون، محیط کشت حاوی نمونهٔ موردنظر با رقت 10^6 بود که پرتو ماوراءبنفش به آن تابیده نشده بود. پلیت‌های حاوی نمونه‌های پرتودیده

Archive of SID

www.SID.ir

در دمای 30 درجه سانتیگراد به‌مدت 24 ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. تمامی پرگنه‌ها در بازه‌های زمانی شمارش شدند (10). بازۀ زمانی که واجد 50درصد باکتری زنده است، به‌عنوان بهترین بازۀ زمانی در نظر گرفته شد. تمامی مراحل دو بار تکرار شد. درنهایت 45 ثانیه به‌عنوان بهترین بازۀ زمانی در نظر گرفته شد. از محیط کشت نوترینت براث حاوی نمونۀ موردنظر که در زیر هودلامینار، پرتو ماوراءبنفش به‌مدت 45 ثانیه دریافت کرد، اقدام به تهیۀ کشت‌های متعدد در پلیت‌های حاوی آگار مغذی شد و تمامی آنها در دمای 30 درجه سانتیگراد به‌مدت 24 ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. باکتری‌های پرتودیده که توانایی ایجاد پرگنه داشتند با روش تهیۀ 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 ازنظر ویژگی‌های مورفولوژی و فیزیولوژی ازجمله شکل ظاهری، تحمل دمایی، تحمل شوری، رشد در دماهای گوناگون و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها (آزمون آنتی‌بیوگرام) نسبت به سویۀ والد بررسی شدند.

سنجش آنزیم آمیلاز: با استفاده از معرف 3،5 دی‌نیتروسالیسیک‌اسید[21] (سیگما) تولید آنزیم آمیلاز به‌صورت کمی در تمامی پرگنه‌های پرتودیدۀ به‌دست‌آمده، بررسی شد. پرگنه‌های پرتودیده در محیط کشت نوترینت براث در دمای 30 درجه سانتیگراد با 100 دور بر دقیقه گرمخانه‌گذاری شدند. 50 میکرولیتر از محیط‌های نوترینت براث حاوی هر پرگنه بر روی محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شدند. از پرگنه‌های موجود در سطح پلیت، یک پرگنه به 10 میلی‌لیتر محیط نوترینت براث تلقیح شد و در دمای 30 درجه سانتیگراد با 100 دور بر دقیقه گرمخانه‌گذاری شد. زمانی که جذب نوری نمونه به 0/5 رسید، 200 میکرولیتر به محیط کشت نوترینت براث تلقیح شد و در دمای 30 درجه سانتیگراد با 100 دور بر دقیقه گرمخانه‌گذاری شد. پس از سانتریفیوژ نمونه در هر زمان موردِنظر، حجم 500 میکرولیتر از سوپرناتانت به 500 میکرولیتر محلول نشاسته (1درصد وزن/حجم) در بافر فسفات سدیم 0/02 مولار با اسیدیتۀ برابر 6/5 اضافه شد. محلول حاصل به‌مدت 3 دقیقه در دمای 30 درجه سانتیگراد با 100 دور بر دقیقه گرمخانه‌گذاری شد. پس از آن 1 میلی‌لیتر از محلول 3،5 دی‌نیتروسالیسیک‌اسید به نمونه‌ها افزوده شد. حدود 15 دقیقه در بن‌ماری در دمای 95 درجه سانتیگراد قرار داده شد. پس از آن تمامی نمونه‌ها در دمای آزمایشگاه سرد شدند و 10 میلی‌لیتر آب مقطر برای جلوگیری از واکنش اضافه شد. در نمونۀ کنترل آب مقطر استریل به‌جای سوپرناتانت استفاده شد. درنهایت، جذب نوری در طول‌موج 540 نانومتر با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر (فارماسیا) خوانده شد (11).

تولید آنزیم در 24، 48، 72، 96 و 120 ساعت پس از کشت بررسی شد. از هر بازۀ زمانی سه تکرار و از هر تکرار سه سنجش آنزیم صورت گرفت. برای ترسیم منحنی استاندارد از غلظت‌های گوناگون گلوکز (مرک) شامل 10، 15، 20 و 25 میلی‌گرم در میلی‌لیتر استفاده شد و طبق رابطۀ (1) میزان گلوکز آزادشده

Archive of SID

www.SID.ir

محاسبه شد:

رابطهٔ شماره 1

$$Y=۰/۰۳۱۳\ X+۰/۰۸۸$$

و از رابطهٔ (2) برای سنجش میزان فعالیت آنزیم آمیلاز (واحد/میلی‌لیتر/دقیقه) استفاده شد:

رابطهٔ شماره 2

$$\text{میزان فعالیت آنزیم آمیلاز} = \frac{(\text{میزان گلوکز آزاد شده})^{۲\times}}{\text{زمان انجام آزمایش}}$$

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

بررسی تحمل دمایی: آزمون تحمل دمایی برای سه سویهٔ *B.L.2*، *B.L.2.M.1* و *B.L.2.M.2* با محیط نوترینت براث در دماهای 30، 40، 45، 50 و 55 با 100 دور بر دقیقه پس از 24 ساعت و در سه تکرار صورت گرفت. میزان جذب نوری سوسپانسیون باکتری‌ها در طول‌موج 600 نانومتر بررسی شدند (12).

بررسی تحمل شوری: محیط‌های آگار مغذی حاوی 3، 5 و 7درصد کلریدسدیم آماده شدند. نمونه‌ها با نسبت 10^6 رقیق شدند و 100 میکرولیتر نمونهٔ رقیق‌شده بر روی محیط‌های آگار مغذی حاوی کلریدسدیم کشت داده شد و به‌صورت وارونه در گرمخانه (ممرت) در دمای 37 درجه سانتیگراد به‌مدت 24 ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. دو تکرار برای هر آزمون تحمل شوری انجام شد (13). 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 نئومایسین با روش انتشار دیسک در سه 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 هینتون آگار (شارلو) و سوسپانسیون باکتری‌ها معادل استاندارد 0/5 مک فارلند استفاده شد و به‌منظور تفسیر نتایج، جداول استاندارد مقاومت/حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف استفاده شدند (14).

آنالیز آماری: از آزمون t-Test با نرم‌افزار اس‌پی‌اس‌اس نسخهٔ 17[۲۲] جهت بررسی آماری تمامی داده‌های حاصل‌شده از آزمون‌های مختلف و معناداربودن یا نبودن داده‌ها استفاده شد. همچنین رسم نمودارها به‌کمک نرم‌افزار اکسل 2013[۲۳] 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 40 پرگنه و پلیت دیگر نمونهٔ پرتودیده در بازهٔ زمانی 2 دقیقه با 2 پرگنه بود. به‌علت کم‌بودن تعداد پرگنه‌ها، بازهٔ زمانی از

Archive of SID

www.SID.ir

دقیقه به ثانیه کاهش داده شد و زمان‌های 15، 30، 45، 60، 75، 90، 105 و 120 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 1 نشان داده شده است. نتایج این جدول، تعداد پرگنه‌های مقاوم به پرتو ماوراءبنفش را در بازه‌های زمانی موردنظر نشان می‌دهد. براین‌اساس بازهٔ زمانی انتخاب شد که 50درصد تعداد پرگنه‌های شاهد را داشت.

با بررسی نتایج، بهینه تأثیر پرتو ماوراءبنفش بر نمونهٔ موردنظر در بازهٔ زمانی 45 ثانیه در نظر گرفته شد. در این بازهٔ زمانی تمامی مراحل چهار بار تکرار شد. از نمونه‌ای که به‌مدت 45 ثانیه پرتو ماوراءبنفش دریافت کرده بود، پس از کشت و گرمخانه‌گذاری در مجموع تعداد 70 پرگنه جداسازی و خالص‌سازی شد. این پرگنه‌هایی که تحتِ‌تأثیر پرتو ماوراءبنفش زنده مانده بودند، ازجهت میزان تولید آنزیم آمیلاز سنجش شدند و سویه‌هایی که آنزیم آمیلاز بیشتری تولید کردند به‌عنوان سویه‌های جهش‌یافته جداسازی و خالص‌سازی شدند.

جدول 1 میانگین تعداد پرگنه‌های حاصل از باکتری پس از تأثیر پرتو ماوراءبنفش

زمان (ثانیه)	تعداد پرگنه
0	45
15	37
30	31
45	27
60	15
75	13
90	7
105	3
120	1

سنجش تولید آنزیم آمیلاز: تولید آنزیم آمیلاز به‌صورت کمی در تمامی نمونه‌ها (70 پرگنه) در دمای 30 درجه سانتیگراد در بازه‌های زمانی 24، 48، 72، 96 و 120 ساعت بررسی شدند و تنها دو پرگنه فعالیت آنزیمی بیشتری نسبت به سویهٔ والد داشتند که با *B.L.2.M.1* و *B.L.2.M.2* نام‌گذاری شدند و در اصل جهش‌یافته‌های اصلی به شمار می‌آیند. نتایج حاصل در جدول 2 و شکل 1 نشان داده شده است. طبق جدول 2، 10 مورد باکتری جهش‌یافته که پرتو ماوراءبنفش را تحمل کرده‌اند و جزء 15درصد باقیمانده هستند، رشد می‌کنند و تولید آنزیمی متفاوت با سویهٔ والد را نشان می‌دهند. پس دستیابی به سویهٔ جهش‌یافته 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 معناداربودن نتایج، از نرم‌افزار SPSS استفاده شد و در سطح 5درصد اختلاف فعالیت آنزیم آمیلاز بین سویهٔ والد و دو سویهٔ جهش‌یافته کاملاً معنادار است ($P_{value}<0/05$). در ادامه منحنی رشد باکتری‌ها در دمای 30 درجه سانتیگراد رسم شد. نتایج حاصل از سه نمونهٔ *B.L.2*، *B.L.2.M.1* و *B.L.2.M.2* در جذب نوری با طول‌موج 600 نانومتر در شکل 2 نشان داده شده است.

نتایج با آزمون t-Test آنالیز شد و نشان داد که اختلاف رشد باکتری‌ها در سویهٔ والد و دو سویهٔ جهش‌یافته اصلی در سطح 5درصد کاملاً معنادار است ($P_{value}<0/05$). منحنی رشد و نمودار میزان فعالیت آنزیم آمیلاز نشان داد که رشد سویهٔ جهش‌یافتهٔ *B.L.2.M.1* از هر دو سویهٔ والد و *B.L.2.M.2* بیشتر است. درحالی‌که سویهٔ *B.L.2.M.2* رشد کمتری نسبت

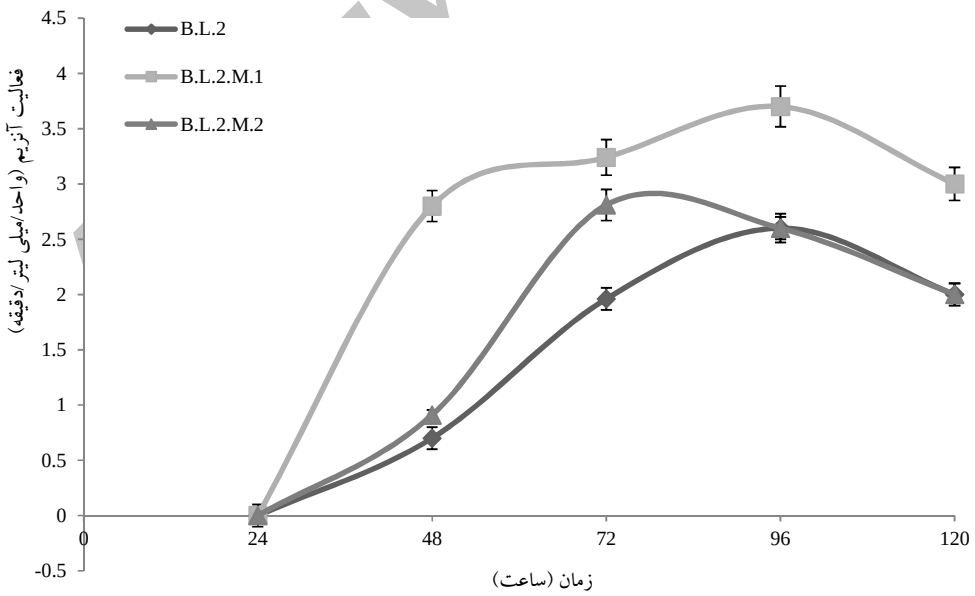
Archive of SID

www.SID.ir

به سویهٔ والد داشت، اما میزان فعالیت آنزیم آمیلاز بیشتری را نشان داد. برای بررسی بیشتر سویه‌ها ازنظر مورفولوژی، تحمل دمایی و شوری و تولید آنزیم آمیلاز در دماهای مختلف بررسی شدند.

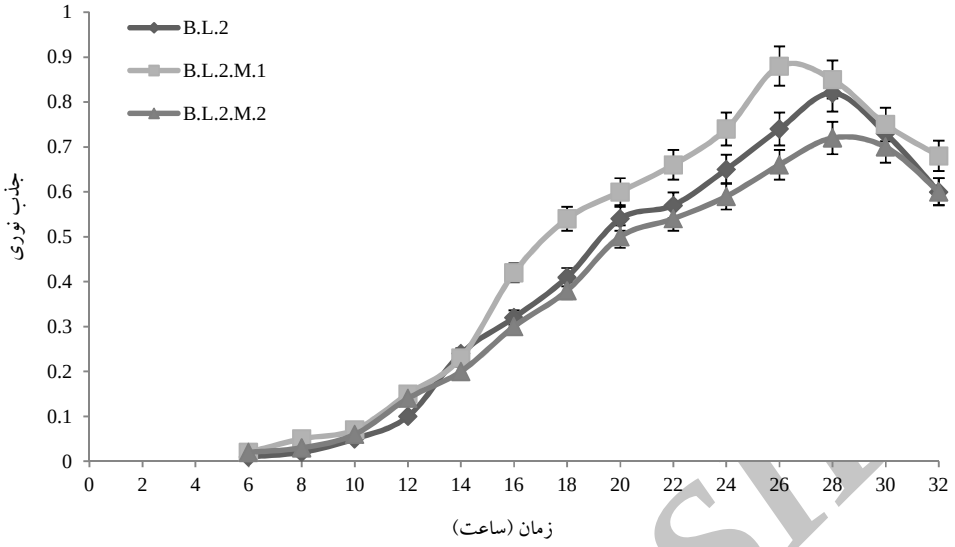
جدول 2 میزان فعالیت و انحراف معیار میانگین آنزیم آمیلاز (واحد/میلی‌لیتر/دقیقه) در تعدادی از باکتری‌های جهش‌یافته در مقایسه با سویهٔ والد

زمان (ساعت) / نمونه	24	48	72	96	120
B.L.2	0±0/05	0/70±0/07	1/96±0/1	2/60±0/2	2±0/06
B.L.2.M.1	0±0/05	2/80±0/1	3/24±0/08	3/70±0/09	3±0/04
B.L.2.M.2	0±0/05	0/91±0/1	2/81±0/1	2/60±0/02	2±0/03
B.L.2.M.3	0±0/05	0/40±0/01	0/90±0/01	1±0/01	0/70±0/01
B.L.2.M.4	0±0/05	0/40±0/01	0/20±0/01	0/11±0/01	0/10±0/01
B.L.M.5	0±0/05	0/10±0/01	0/35±0/04	0/60±0/01	0/50±0/01
B.L.2.M.6	0±0/05	0/01±0/001	0/04±0/001	0/08±0/001	0/06±0/001
B.L.2.M.7	0±0/05	0/10±0/01	0/15±0/01	0/20±0/01	0/14±0/01
B.L.2.M.8	0±0/05	0/52±0/01	0/62±0/01	0/73±0/01	0/55±0/06
B.L.2.M.9	0±0/05	0/65±0/01	0/75±0/01	0/86±0/01	0/70±0/01
B.L.2.M.10	0±0/05	0/30±0/01	0/40±0/01	0/50±0/01	0/40±0/01



شکل 1 میزان فعالیت آنزیم آمیلاز در دو سویهٔ جهش‌یافتهٔ اصلی در مقایسه با سویهٔ والد. فعالیت آنزیم در سه تکرار و در دمای 30 درجه سانتیگراد محاسبه شده است. (error bar ها نشان‌دهندهٔ انحراف معیار سه تکرار است)

Archive of SID
www.SID.ir



شکل 2 منحنی رشد دو سویهٔ جهش‌یافتهٔ اصلی در مقایسه با سویهٔ والد. منحنی رشد در سه تکرار، در دمای 30 درجه سانتیگراد و در محیط کشت نوترینت براث با 100rpm ترسیم شد. (error bar ها نشان‌دهندهٔ انحراف معیار سه تکرار است)

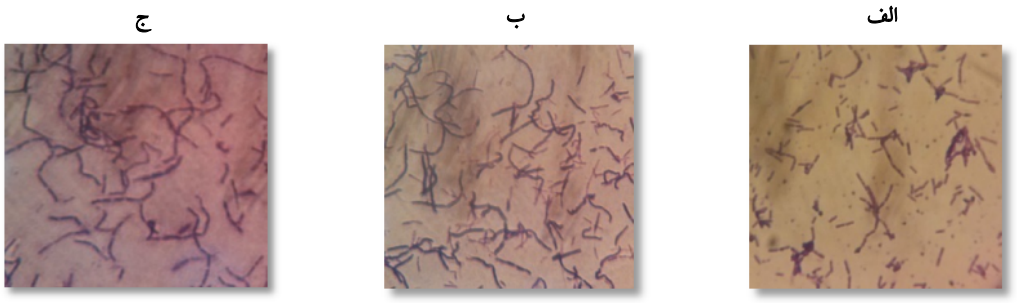
تولید آنزیم‌ها جزء متابولیت‌های اولیه است؛ پس در فاز رشد، هم‌زمان با رشد سلولی آنزیم‌ها تولید می‌شوند. همانطور که مشاهده می‌شود در زمان 24 ساعت به بعد آنزیم شروع به تولید کرده است و با گذشت زمان میزان تولید افزایش داشته است. این احتمال نیز دربارهٔ آنزیم آمیلاز در نظر گرفته می‌شود که تا زمانی که مقدار 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 به‌تبع میزان تولید آنزیم آمیلاز توسط ژن‌های مولد آنزیم‌های هیدرولاز به‌منظور مصرف نشاسته افزایش می‌یابد. همانطور که در شکل 1 و 2 مشاهده می‌شود بعد از گذشت 24 ساعت آنزیم آمیلاز شروع به تولید می‌کند و بهترین بازهٔ زمانی برای بیشترین میزان تولید آنزیم 72 و 96 ساعت است.

بررسی شکل ظاهری و واکنش گرم نمونه: برای بررسی شکل ظاهری سویه‌ها از کیت رنگ‌آمیزی گرم استفاده شد. نمونه‌برداری، رنگ‌آمیزی و مشاهدهٔ لام‌ها در زیر میکروسکوپ نوری در شرایط یکسانی صورت گرفت. بررسی لام‌ها نشان داد که هر سه سویهٔ *باسیلوس* گرم‌مثبت هستند و ازنظر ساختاری سویهٔ *B.L.2.M.2* از هر دو سویهٔ والد و *B.L.2.M.1* بزرگ‌تر است. نتایج میکروسکوپی نمونه‌ها در شکل 3 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 24 ساعت در تمامی دماها به دست آمده است. رشد سویهٔ *B.L.2.M.1* نسبت به دو سویهٔ دیگر بیشتر بود؛ اما دو سویهٔ *B.L.2* و *B.L.2.M.2* رشد تقریباً مشابهی داشتند. این نتیجه در منحنی رشد در دما 30 درجه سانتیگراد هم مشاهده شد. بهترین رشد سویه‌ها بعد از 24 ساعت در دمای 40 و 45 درجه سانتیگراد مشاهده شد. نتایج حاصل از مقایسهٔ رشد سه سویه در جدول 3 نشان داده شد.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل 3 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 3 میانگین جذب نوری و انحراف معیار میانگین‌های مربوط به رشد سویه‌های جهش‌یافتهٔ اصلی و والد در دماهای مختلف بعد از 24 ساعت در سه تکرار.

دما (درجه سانتیگراد) / نمونه	30	40	45	50	55
B.L.2	0/70±0/04	1/50±0/05	1/20±0/05	1/0±0/04	0/03±0/01
B.L.2.M.1	0/81±0/04	1/80±0/03	1/50±0/04	1/0±0/05	0/05±0/01
B.L.2.M.2	0/80±0/03	1/50±0/05	1/20±0/05	1/0±0/04	0/03±0/01

هر دو سویهٔ جهش‌یافتهٔ اصلی میزان تولید آنزیم آمیلاز بیشتری داشتند اما طی بررسی‌هایی که بر رشد سلولی سویه‌ها صورت گرفت، مشخص شد که سویهٔ *B.L.2.M.1* در دماهای بالا نیز سریع‌تر رشد می‌کند، درحالی‌که در دماهای 40 تا 55 درجه سانتیگراد رشد سویهٔ *B.L.2.M.2* برابر با رشد سویهٔ والد بود. سپس تولید آنزیم آمیلاز در دماهای مختلف سنجش شد و نتایج نشان داد تولید آنزیم آمیلاز *B.L.2.M.1* در دمای 40 و 45 درجه سانتیگراد بیشتر از سویهٔ والد و *B.L.2.M.2* بود. نتایج میزان فعالیت آنزیم آمیلاز در دماهای مختلف در جدول 4 نشان داده شده است.

جدول 4 میانگین و انحراف معیار فعالیت آنزیم آمیلاز (واحد/میلی‌لیتر/دقیقه) در دماهای مختلف در سه تکرار.

دما (درجه سانتیگراد)	زمان (ساعت) / نمونه	24	48	72	96
40	B.L.2	0±0/05	1/32±0/04	2/40±0/06	2/40±0/05
	B.L.2.M.1	0±0/05	2/40±0/03	5/80±0/02	3/03±0/06
	B.L.2.M.2	0±0/05	1/32±0/03	2/40±0/03	0/30±0/04
45	B.L.2	0±0/05	1/30±0/02	1/30±0/04	0/30±0/06
	B.L.2.M.1	0±0/05	2/40±0/04	3/45±0/02	2/40±0/02
	B.L.2.M.2	0±0/05	0/30±0/01	1/50±0/02	0/70±0/02
50	B.L.2	0±0/05	0/30±0/01	0/30±0/01	0/30±0/01
	B.L.2.M.1	0±0/05	0/30±0/01	0/30±0/01	0/30±0/01
	B.L.2.M.2	0±0/05	0/30±0/01	0/30±0/01	0±0/05

Archive of SID
www.SID.ir

بررسی تحمل شوری: دو سویهٔ جهش‌یافته ازنظر تحمل شوری هم بررسی شدند. سویه‌های جهش‌یافته مانند سویهٔ والد با افزایش مقدار نمک دچار کاهش میزان رشد شدند. نتایج حاصل از تحمل شوری در جدول 5 نشان داده شده است.

آزمون آنتی‌بیوگرام: این آزمون طبق مراحل ذکرشده با دیسک‌های آنتی‌بیوتیک صورت گرفت. براساس اطلاعات موجود در جدول استاندارد، مقاوم و نیمه‌حساس و حساس‌بودن 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. درواقع دو سویهٔ جهش‌یافته با سویهٔ والد در نه آنتی‌بیوتیک نتایج یکسانی را نشان دادند؛ اما در برابر آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین دو سویهٔ والد و *B.L.2.M.2* حساس بودند و *B.L.2.M.1* نیمه‌حساس بود. درنهایت نتیجه گرفته شد که پرتو ماوراءبنفش بر مقاومت سویهٔ *B.L.2.M.2* نسبت به ده آنتی‌بیوتیک موردنظر تغییری ایجاد نکرده است، اما توانسته است بر مقاومت سویهٔ *B.L.2.M.1* نسبت به آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین مؤثر باشد. گفتنی است که پرتوهای ماوراءبنفش می‌توانند باعث تأثیر بر پمپ‌های غشایی و مسیرهای متابولیک (تولید آنزیم) شوند (15، 16 و 17). این احتمال وجود دارد که در سویهٔ جهش‌یافتهٔ *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 6 نشان داده شده است.

جدول 6 نتایج حاصل از بررسی مقاومت باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف

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

جدول 5 نتایج تحمل شوری. میانگین و انحراف معیار تعداد پرگنه‌های شمارش‌شده در پلیت‌ها در سه تکرار.

محیط کشت / نمونه	نوترینت آگار	نوترینت آگار با 3 درصد کلرید سدیم	نوترینت آگار با 5 درصد کلرید سدیم	نوترینت آگار با 7 درصد کلرید سدیم
B.L.2	28±0/6	23±0/6	18±0/6	9±0/6
B.L.2.M.1	32±0/6	30±0/6	23±0/6	15±0/6
B.L.2.M.2	28±0/6	20±0/6	18±0/6	8±0/6

Archive of SID

www.SID.ir

بحث و نتیجه‌گیری

آنزیم‌های آمیلاز ازجمله آنزیم‌های مهم صنعتی هستند که سالانه چند تن از آنها در صنایع گوناگون مصرف می‌شوند. حدود 50 نوع باکتری و قارچ، آنزیم آمیلاز تولید می‌کنند. بارزترین آنها گونه‌های *باسیلوس* ازجمله *باسیلوس‌سوبتیلیس* و *باسیلوس‌لیکنیفورمیس* هستند (18). در این پژوهش سویهٔ *باسیلوس‌لیکنیفورمیس* استفاده شده است.

نتایج پژوهش حاضر ثابت کرد که محیط کشت متداول آزمایشگاهی برای تولید آنزیم آمیلاز از *باسیلوس‌لیکنیفورمیس* گرمادوست به‌طور موفقیت‌آمیزی قابلِ‌استفاده است. در پژوهش‌های پیشین از محیط کشت نوترینت براث با نشاسته 1درصد (وزن/حجم) برای رشد *باسیلوس‌سوبتیلیس* و همچنین بررسی تولید آنزیم آمیلاز استفاده شده است (19 و 20). در این پژوهش نیز برای رشد *باسیلوس‌لیکنیفورمیس* گرمادوست و بررسی تولید آنزیم آمیلاز از محیط‌های کشت نوترینت براث و نوترینت آگار با 1درصد (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 به‌منظور ایجاد جهش‌زایی در سویهٔ والد به دست آمد (18، 21 و 22). تابش پرتو ماوراءبنفش در بازهٔ زمانی 45 ثانیه باعث شد 50درصد از باکتری‌های گرمادوست مقاوم به پرتو ماوراءبنفش زنده بماند. درنتیجه احتمال ایجاد جهش‌یافته در بین پرگنه‌های تشکیل‌شده بیشتر بود. به همین دلیل ابتدا جدولی از تعداد پرگنه‌هایی که در اثر تیمار توسط پرتو ماوراءبنفش زنده ماندند تهیه شد (23). پس از آن، به‌منظور القای جهش و ایجاد سویه‌های جهش‌یافته به‌جهت افزایش میزان تولید آنزیم آمیلاز از پرتو ماوراءبنفش استفاده شد. درنهایت 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 سویهٔ جهش‌یافته، آنزیم آمیلاز بیشتری نسبت به سویهٔ والد تولید کردند. پاندی[۲۴] و گوپدا[۲۵] از پرتو ماوراءبنفش به‌مدت 4 و 8 دقیقه برای بهینه‌سازی آنزیم آمیلاز در *باسیلوس‌سوبتیلیس* استفاده کردند و تولید آنزیم آمیلاز 2/08درصد افزایش داشت (10). پرتو ماوراءبنفش به سویه‌های رشدیافته در محیط کشت نوترینت براث، به‌مدت 45 ثانیه تابیده شد و از سویه‌های جهش‌یافتهٔ ارزیابی‌شده دو سویهٔ 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 نمونهٔ والد با استفاده از معرف دی‌نیتروسالیسیلیک‌اسید سنجش شدند (11) و نتایج نشان داد سویهٔ جهش‌یافتهٔ *B.L.2.M.1* در دمای 40 درجه سانتیگراد بعد از گذشت 72 ساعت 5/8 واحد/میلی‌لیتر/دقیقه تولید آنزیم آمیلاز داشته‌اند که در مقایسه با سویهٔ والد 41/7درصد آنزیم بیشتری تولید کردند. نتایج بازدهی تولید آنزیم در سویهٔ گرمادوست همچون نتایج پاندی و گوپدا روند افزایشی داشت (10)؛ اما در این پژوهش درصد تولید آنزیم بسیار بالاتر بود. سویه‌های جهش‌یافته ازنظر مورفولوژی و فیزیولوژیکی نسبت به سویهٔ والد بررسی شدند. ازنظر مورفولوژی سویهٔ *B.L.2.M.2* ازنظر ساختاری بزرگ‌تر از سویهٔ والد مشاهده شد. بررسی شکل ظاهری هر سه سویه (والد و دو سویهٔ جهش‌یافته) در شرایط

Archive of SID
www.SID.ir

آزمایشگاهی و میکروسکوپی یکسان صورت گرفت. ازنظر فیزیولوژیکی تأثیر شوری، دما و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها توسط آزمون آنتی‌بیوگرام جهت مقایسهٔ تأثیر پرتو ماوراءبنفش بر روی سویهٔ والد با دو سویهٔ جهش‌یافته صورت گرفت (12، 13 و 14). نتایج نشان داد که تابش پرتو ماوراءبنفش بر تحمل به شوری در سویه‌های جهش‌یافته نسبت به سویهٔ والد اثر گذاشته است و سویهٔ جهش‌یافتهٔ *B.L.2.M.1* در محیط‌های نمکی تعداد پرگنه‌های بیشتری تولید کرد، با توجه به اینکه همانند سویهٔ 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 سویهٔ *B.L.2.M.1* مقاومت از حالت حساس به نیمه‌حساس تغییر کرده است. این تغییر مقاومت به آنتی‌بیوتیک در سویهٔ جهش‌یافته می‌تواند در اثر تأثیر پرتو ماوراءبنفش بر عملکرد پمپ‌های غشایی صورت گرفته باشد و باعث شده عملکرد این پمپ‌ها کمتر شود که نتیجهٔ آن، کاهش ورود آنتی‌بیوتیک‌ها به داخل باکتری است. بنابراین عملکرد سویه از حالت حساس به نیمه‌حساس تغییر کرده است.

تأثیر دما برای تولید آنزیم به رشد میکروارگانیسم‌ها وابسته است. دامنهٔ وسیع دما بین 35 تا 80 درجه سانتیگراد در باکتری‌ها گزارش شده است (24، 25). لیو[۲۶] و همکارانش سویه‌ای از جنس *باسیلوس* جدا کردند که در دمای 45 درجه سانتیگراد بعد از 44 ساعت بیشتر تولید آنزیم آمیلاز (53 واحد/میلی‌لیتر) را نشان داد (26). کنشولا[۲۷] و همکارانش سویه‌ای از *باسیلوس سوبتیلیس* جدا کردند که در دمای 40 درجه سانتیگراد بعد از 36 ساعت (22 واحد/میلی‌لیتر) بیشترین تولید آنزیم آمیلاز را داشت (27). در این پژوهش میزان رشد سویه‌ها در دماهای بررسی شدند و بهترین رشد سویه‌ها بعد از 24 ساعت در دماهای 40 و 45 درجه سانتیگراد مشاهده شد. سویهٔ *B.L.2.M.1* در دماهای 40 و 45 درجه سانتیگراد بیشترین رشد سلولی را نسبت به سویهٔ والد داشت. تولید آنزیم در سویه‌های مطالعه‌شده در دماهای مختلف بررسی شدند و میزان تولید آنزیم آمیلاز در سویهٔ جهش‌یافتهٔ *B.L.2.M.1* بعد از 72 ساعت در دماهای 40 و 45 درجه سانتیگراد به‌ترتیب 5/8 و 3/45 واحد/میلی‌لیتر/دقیقه بود، که این میزان تولید آنزیم نسبت به دو سویهٔ دیگر بیشتر بود. تولید آنزیم در سویهٔ *B.L.2.M.1* بعد از 72 ساعت در 40 درجه سانتیگراد، 41/7درصد افزایش نسبت به سویهٔ والد را نشان داد.

رسولی و همکارانش میزان رشد *باسیلوس لیکنیفورمیس* گرمادوست و میزان تولید آنزیم آمیلاز در دمای 50 درجه سانتیگراد به‌مدت 36 ساعت بررسی کردند و نتیجه گرفتند بعد از 26 ساعت، جمعیت توده سلولی به حداکثر مقدار خود رسیده باشد، میزان تولید آنزیم افزایش می‌یابد. پس میزان تولید آنزیم آمیلاز با رشد سویه رابطهٔ مستقیم دارد(28). نتایج این پژوهش نشان داد که در زمان 26 و 28 ساعت به‌ترتیب 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 وهمکارانش منطبق بود، اما تا 96 و 72 ساعت به‌ترتیب برای *B.L.2.M.1* و *B.L.2.M.2* تولید آنزیم افزایش می‌یابد. به‌عبارتی‌دیگر، با گذشت زمان دسترسی سلول‌ها به منبع کربن کاهش یافته است که باعث افزایش بیان آنزیم آمیلاز می‌شود(26، 27 و 28). آنزیم‌های آمیلاز از منابع کربنی همچون گلوکز، لاکتوز

Archive of SID

www.SID.ir

و مالتوز استفاده می‌کند. درصورتی‌که 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 (27 و 28). از طرفی دیگر، با افزایش زمان تا 120 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 درنتیجه کاهش فعالیت آمیلاز می‌شوند (18 و 29).

بنابراین دستاوردی که در این پژوهش حاصل شد، سویه‌های جهش‌یافته بودند که میزان تولید آنزیم آمیلاز بیشتری نسبت به سویهٔ والد داشتند و تولید آنزیم تا دمای 45درجه 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.

References

(1) Silverman RB. *The organic chemistry of enzyme-catalyzed reactions*. 3rd ed. London, England: Academic Press; 2002.

(2) Bordbar AK., Omidiyan 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.

Archive of SID

www.SID.ir

(9) Jafari-Dehkordi S., Mobini-Dehkordi M., Saffar B. Alpha-amylase enzyme production process optimization and molecular identification of thermophilic bacteria hotspring 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. NewYork: Scientific American; 2007.

(15) Kim J-S., Lee C-H., Chang I-S. Effect of pump shear on the performance of a crossflowmembrane 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 Limnologyand 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 αlpha-amylase enzyme produced by *Bacillus licheniformis*. *Pakistan Journal of Agriculture Scienes* 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 *Trichodermaharzianum*: their biocontrol activity on *Pyrenochaetalycopersici*. *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.

Archive of SID

www.SID.ir

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]-Cyclodextin
[7]-Debranching
[8]-Transfrasese
[9]-Alpha-anomeric
[10]Residues
[11]Donor molecule
[12]-Maltose
[13]-Maltotriose
[14]-*Bacillus caldolyticus*
[15]-*Chloroflexusaurantiacus*
[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

Archive of SID
www.SID.ir