مقاله تحقیقی

شناسایی اثر pH به عنوان فاکتور موثر بر تولید آنزیم α-آمیلاز توسط باکتری *Bacillusalkalitelluris*

هلاله عزیزی[1]، مهدی ابراهیمی[2،*]، فاطمه نوربخش[1]

۱.گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، پیشوا، ایران
۲.گروه بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، پیشوا، ایران

***مسئول مکاتبات:** آدرس الکترونیکی:ebrahimi@iauvaramin.ac.ir , mehd_ebrahimi@yahoo.com

محل انجام تحقیق: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا

تاریخ دریافت: ۹۵/۷/۷ تاریخ پذیرش:۹۶/۹/۱۸

فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران
جلد ۱۱- شماره ۳- پاییز ۱۳۹۵

چکیده

آنزیم α-آمیلاز پیوندهای α(۱→۴) گلیکوزیدی را در نشاسته هیدرولیز نموده و منجر به تولید دی‌ساکاریدها الیگوساکاریدهای کوچکتر می‌شود. این آنزیم به عنوان یکی از پرکاربردترین آنزیم‌ها در صنایع مختلف محسوب شده بخش بزرگی از بازار آنزیم‌ها را به خود اختصاص می‌دهد. در این مطالعه با استفاده از روش پلاکت-برمن فاکتورهای کشت و تولید آنزیم α-آمیلاز در باکتری *Bacillusalkalitelluris*به منظور شناسایی فاکتورهای موثر مورد ارزیابی قرارگرفته است. به منظور شناسایی محیط کشت مناسب، باکتری در دو محیط کشت R2A (محیط کشت پیشنهادی) LBبراث کشت داده شد. با توجه به سینتیک رشد باکتری، محیط کشت LBبراث برای ادامه مراحل انتخاب‌شد. سپس ۷ فاکتور(نشاسته، عصاره مخمر، پپتون، کلرید کلسیم، دمای انکوباسیون، زمان انکوباسیون وpH) به منظور طراحی آزمایشات با روش پلاکت-برمن انتخاب و میزان تولید آنزیم در آزمایشات طراحی شده اندازه گیری شد. اثر فاکتورها با استفاده از نمودار پارتو و در نظر گرفتن خط مرجع ارزیابی‌شد. در نهایت pH به عنوان موثرترین عامل از میان ۷ فاکتور مورد بررسی شناسایی‌شد. با توجه به قلیادوست بودن باکتری می‌توان نتیجه گرفت که عامل pH به عنوان یک القاگر برای تولید آنزیم α-آمیلاز در باکتری *Bacillusalkalitelluris* عمل می‌نماید.

واژه های کلیدی:α-آمیلاز، *Bacillusalkalitelluris*، پلاکت-برمن، طراحی آزمایش‌ها

مقدمه

نشاسته یک منبع عالی کربن در طبیعت و محصول ذخیره ای اصلی بسیاری از محصولات مهم از لحاظ اقتصادی است. از این رو صنعت فرآوری نشاسته به میزان وسیعی رشد بسیار چشمگیری را داشته است (۱). پنج گروه از آنزیمها نقش کلیدی را در هیدورلیز نشاسته بازی می کنند. این آنزیمها حدود ۳۰٪ تولید آنزیم جهانی را دربرمی گیرند.آمیلازها در بین مهمترین آنزیمهای صنعتی قرار دارند که دارای اهمیت زیادی در مطالعات بیوتکنولوژی هستند (۲). آلفا آمیلاز (اندو ۱و۴ —آلفا-D-گلوکان‌گلوکانوهیدرولاز E.C.3.2.1.1) آنزیمهای خارج سلولی هستند که بطور تصادفی پیوند آلفا-۱و۴ بین واحدهای گلوکز مجاور در زنجیره خطی آمیلوز می شکنند و در نهایت واحدهای گلوکز، مالتوز و مالتوتریوز را تولید می کنند. تبدیل نشاسته به شربت قند(گلوکز، مالتوز، مالتوتریوز دکسترین یا شربت فروکتوز) بخش عمده ای از صنعت فراوری نشاسته است. همچنین آلفا آمیلاز دارای

کاربردهای فراوانی در صنایع مختلف از جمله، صنایع منسوجات، کاغذ، آبجوسازی، پخت و پز و تقطیر، تهیه اسیدهای هاضمه، تولید ورقه ها و نیز صنعت دارویی است (۳). آلفا آمیلاز از چندین منبع قارچی، مخمر، باکتریها و اکتینومیست ها استخراج شده است (۴). خصوصیات پایداری در دما و محیط های قلیایی، از جمله ویژگیهایی مهم برای کاربردهای صنعتی آمیلازِ جداشده از موجودات قلیادوست می باشد (۵). آلفا آمیلازهای میکروبی برای فرایندهای صنعتی بطور عمده از خانواده باسیلوس ها مانند *Bacillus amyloliquefaciens*و *Bacillus licheniforms*و *Bacillus subtilis*استخراج می شوند. بطوریکه آنها قادر به ترشح آمیلاز به مایع رویِی محیط کشت در زمان غوطه ورسازی هستند. آمیلاز استخراج شده از جنس باسیلوس نقش مهمی در صنعت ایفا می کنند (۱).

بسیاری از گونه های باسیلوس قلیادوست از دامنه وسیعی از محیط های قلیایی، مانند دریاچه های کربنات سدیم، صحراها و خاکهای خشک جدا شده اند (۶, ۷). حداقل ۱۹ گونه باسیلوس قلیادوست تا به امروز شناسایی شده اند. این باکتریها مرکب از ۶۰ گروه rRNA در جنس باسیلوس هستند که توجه زیادی را در ارتباط با کاربردهای صنعتی،تحقیق های بیوتکنولوژی جلب کرده اند. *Bacillus alkalitelluris*یک گونه از جنسباسیلوس است که به دلیل پایداری قلیایی به عنوان یک میکروارگانیسم قلیادوست مورد توجه قرار می گیرد (۸). هدف این پژوهش، شناسایی فاکتورهای موثر در تولید α-آمیلاز از میان فاکتورهای رشد *باسیلوس آلکالیتوریس* می‌باشد.

مواد و روش ها

تمامی مراحل کشت و تلقیح باکتری با رعایت شرایط استریل به منظور پیشگیری از آلودگی توسط سایر میکروب‌ها انجام شد. باکتری *B. alkalitelluris*(KCTC3947) به صورت پودر لیوفیلیزه، از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه‌شد. به منظور تهیه کشت فعال، باکتری توسط سرنگ به محیط کشت R2A براث تلقیح شد. این محیط کشت در دمای ۳۰°C به مدت ۴۸ ساعت با سرعت همزن ۱۳۵ دور در دقیقه انکوبه شد. پس از رشد باکتری، سینتیک رشد باکتری به منظور مقایسه تاثیر نوع محیط کشت در دو محیط R2Aبراث و LB براث تعیین‌شد. به این منظور، ۵ میلی‌لیتر از کشت ۴۸ ساعته باکتری در محیط R2Aبراث به ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت R2A و LB براث انتقال یافته و میزان جذب نوری هر محیط کشت در زمان‌های ۰، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت در طول موج ۶۰۰nm ثبت شد. در این مرحله از محیط کشت تلقیح‌نشده به عنوان کنترل استفاده شد.

تولید آنزیم آمیلاز و تعیین پارامترهای دما و pH بهینه آنزیم آمیلاز

از محیط کشت LBبراث به عنوان محیط تولید آنزیم آمیلاز استفاده شد. پس از ۴۸ ساعت کشت باکتری در دمای ۳۰°C و سرعت همزن ۱۳۵ دور در دقیقه، محیط کشت با دور ۵۰۰۰ (دور در دقیقه) سانتریفیوژ شده و سوپ رویی که حاوی آنزیم آمیلاز است برای سنجش فعالیت آنزیم مورد استفاده قرارگرفت.

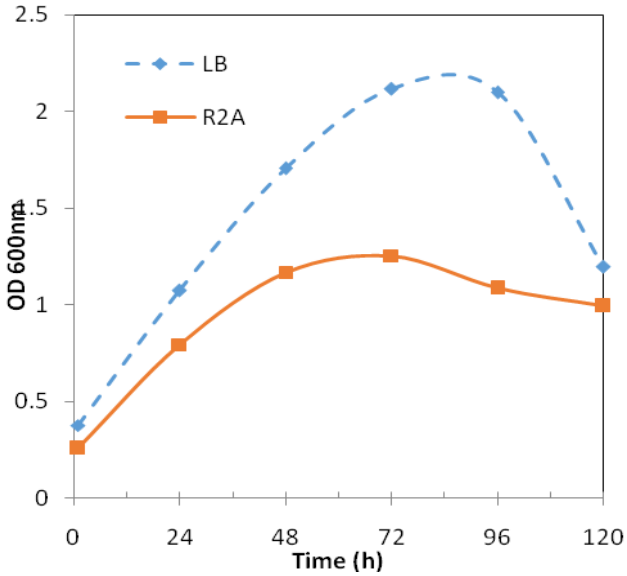
فعالیت آنزیم آمیلاز بر اساس روش برنفلد و با استفاده از سوبسترای نشاسته تعیین گردید. برای این منظور ابتدا معرف DNS با انحلال یک گرم پودر ۲-هیدروکسی۳و۵-دی نیتروبنزوئیک اسید، ۳۰ گرم سدیم پتاسیم تارتارات و ۲۵ میلی لیتر سود ۲ مولار در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر تهیه‌شد (۹). برای سنجش فعالیت آنزیم، ۲۵۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی و ۲۵۰ میکرولیتر بافراستات ۰/۰۵ مولار و ۱/۵ میلی لیتر محلول نشاسته ۲ درصد (w/v) به بافر استات افزوده شد. این مخلوط به مدت ۱ ساعت در دمای ۵۰°C انکوبه شد. سپس دو میلی‌لیتر از این مخلوط به ۲ میلی‌لیتر معرف DNS اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد. در مرحله بعد جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۴۰nm قرائت گردید (۱۰). هر واحد فعالیت آنزیم α-آمیلاز بصورت مقدار قند مالتوز آزادشده (میلی‌مولار) در واحد زمان (دقیقه) تعریف می‌شود.

شناسایی متغیرهای معنی دار با طراحی پلاکت-برمن

پلاکت- برمن به منظور غربال‌گری و بهینه‌سازی متغیرهای تخمیری استفاده می‌شود (۱۱).در این مرحله، ۷ پارامتر (نشاسته، عصاره مخمر، پپتون، کلرید کلسیم، دمای انکوباسیون، زمان انکوباسیون وpH) انتخاب شد. این پارامترها طی تخمیر غوطه‌وری در ۳ سطح (۱+ ،۰ ، ۱-) در نظر گرفته شدند و با استفاده از طرح پلاکت-برمن ۱۳ آزمایش توسط نرم‌افزار Minitab 17 طراحی‌شد (۱۱). تمامی آزمایشات طبق الگوی مشخص‌شده در جدول ۱ با ۳ بار تکرار در آزمایشگاه انجام شده و در نهایت با کمک نرم‌افزار Minitab 17 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرارگرفت.

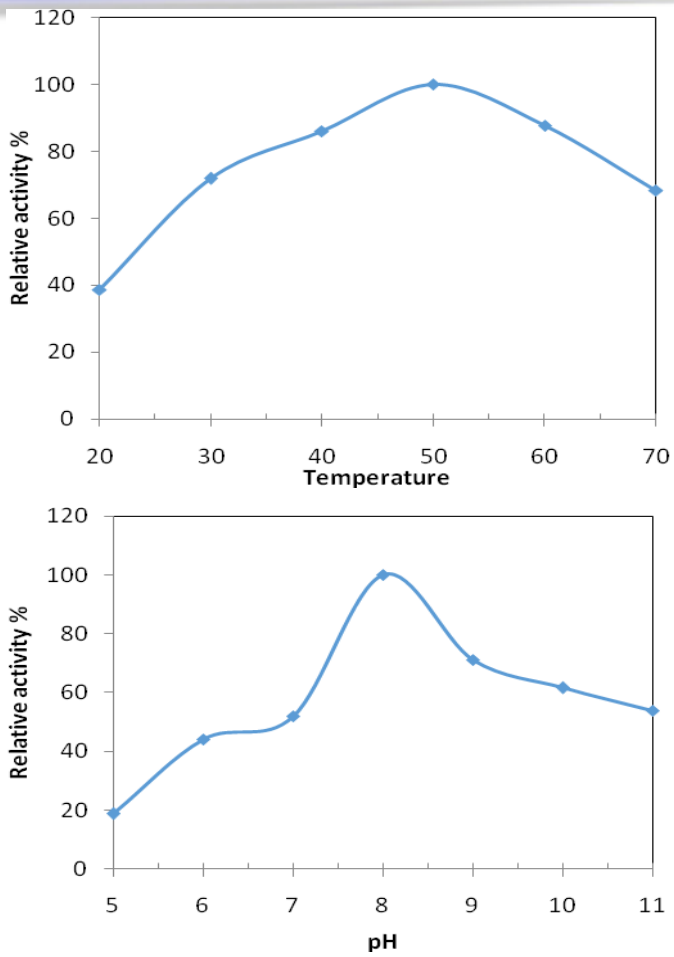
نتایج

مقایسه سینتیک رشد باکتری *B. alkalitelluris*در دو محیط کشت R2A و LBبراث در Error! Unknown switch argument. نشان‌داده شده است. با توجه به این نمودار مشخص می‌شود که باکتری در محیط LBبراث رشد بهتری در مقایسه با محیط R2A دارد. بطوریکه، در زمان‌های مشابه پس از تلقیح باکتری به محیط کشت میزان رشد باکتری در محیط LBبراث بیشتر از R2A است. از طرفی در محیط کشت R2A پس از ۴۸ ساعت باکتری وارد فاز سکون می‌شود این درحالی است که در محیط کشت LBبراث این زمان به ۷۲ ساعت افزایش می‌یابد. بنابراین، محیط کشت LBبراث به عنوان محیط کشت تولید آنزیم در مراحل بعد مورد استفاده قرارگرفت.



نمودار ۱- مقایسه سینتیک رشد باکتری *B. alkalitelluris* در دو محیط R2A و LBبراث.

پارامترهای دما و pH نقش مهمی در فعالیت آنزیم دارند و بنابراین در هر آنزیم لازم است تا تمامی اندازه گیریهای فعالیت آنزیمی در دما و pH بهینه انجام شوند. با توجه به اینکه تاکنون هیچ گزارشی در زمینه مطالعه دما و pH بهینه آنزیم آمیلاز باکتری *B. alkalitelluris* ارائه نشده است، در این مطالعه به منظور دستیابی به شرایط بهینه سنجش فعالیت α-آمیلاز ابتدا با اندازه گیری فعالیت آنزیم در دما و pH متغیر، شرایط بهینه برای این دو فاکتور تعیین‌شد. نتایج بررسی دما و pH بهینه به ترتیب در نمودارهای ۲ و ۳ نشان داده شده است. با توجه نمودارهای مربوطه، بیشترین فعالیت آنزیمی مشاهده شده در دمای ۵۰°C و pH=۸ می‌باشد (Error! Unknown switch argument.).



نمودار ۲- تعیین دما و pH بهینه آنزیم α-آمیلاز باکتری *B. alkalitelluris*

شناسایی فاکتورهای موثر بر تولید آمیلاز با روش پلاکت-برمن

به منظور شناسایی فاکتورهای موثر، ۷ پارامتر شامل غلظت کلرید کلسیم، پپتون، عصاره مخمر، نشاسته، pH، زمان انکوباسیون و دمای انکوباسیون با توجه به مطالعات پیشین انتخاب‌شده و با روش پلاکت-برمن آزمایشات مربوطه طراحی و مورد بررسی قرارگرفتند (Error! Unknown switch argument.).

تاثیر هر پارامتر در تولید آنزیم آمیلاز با در نظر گرفتن نتایج بدست آمده از ۱۳ آزمایش طراحی‌شده تعیین‌شد. اثرات این پارامترها در نمودار پارتو[1] با یکدیگر مقایسه شده است (Error! Unknown switch argument.). با در نظر گرفتن خط مرجع[2] که برابر با ۲/۷۷ است، پارامترهای بیشتر از این خط به عنوان پارامترهای موثر و مابقی ناموثر شناخته‌می‌شوند. بر این اساس از میان پارامترهای مورد بررسی تنها پارامتر pH در تولید آمیلاز توسط *B. alkalitelluris* موثر شناخته می‌شوند.

بحث

در میان باکتریها، گونه‌هایی که در مناطق حاد از نظر دما، pH، فشار و غلظت نمک حضور دارند به دلیل دارابودن ویژگیهایی که این میکروارگانیسم‌ها را با شرایط مورد نظر سازگار نموده است توانسته‌اند نظر محققین را به خود جلب نمایند. علاوه بر زمینه‌های

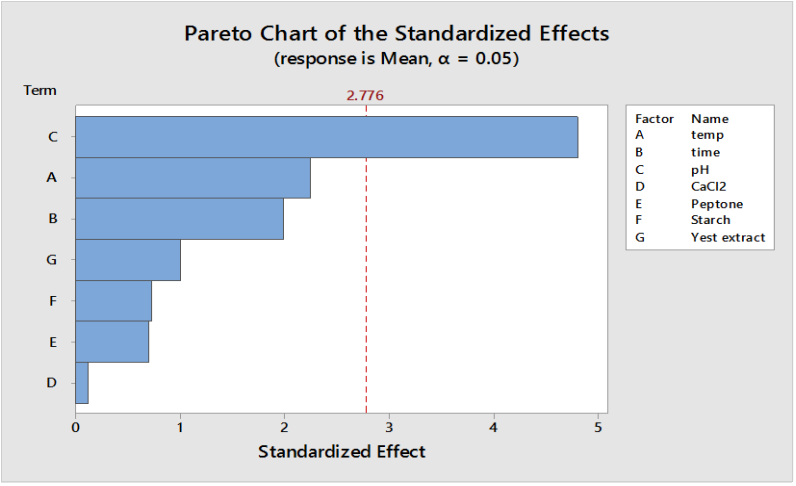
[1]Pareto chart

[2]Reference line

پژوهشی بسیار گسترده در مطالعه این میکروارگانیسم-ها، آنها به دلیل دارا بودن متابولیت‌ها و سایر ترکیبات دارای اهمیت بیوتکنولوژیک و صنعتی از نظر اقتصادی نیز حائز اهمیت می‌باشند. با این رویکرد، امروزه مطالعات بسیاری در زمینه کشف میکروارگانیسم‌های جدید از منابع دارای شرایط حاد زندگی مانند اعماق دریا، چشمه های آب‌گرم، دریاچه‌های نمکی و غیره صورت می‌گیرد.

جدول ۱ طراحی آزمایش و نتایج مربوطه به تغییرات اعمال شده بر روی ۷ فاکتور به روش پلاکت – برمن.

نمونه	دمای انکوباسیون (°C)	زمان انکوباسیون (ساعت)	pH	کلرید کلسیم (g/l)	پپتون (g/l)	نشاسته (g/l)	عصاره مخمر (g/l)	فعالیت آمیلاز (U)
۱	۴۰	۷۲	۸/۵	۰/۳۷۵	۰/۶۲۵	۰/۲۵	۰/۳۷۵	۰/۱۹
۲	۴۰	۷۲	۱۰/۵	۰/۱۲۵	۰/۶۲۵	۱/۲۵	۰/۱۲۵	۰/۰۹
۳	۴۰	۷۲	۸/۵	۰/۳۷۵	۰/۳۷۵	۰/۲۵	۰/۱۲۵	۰/۲
۴	۴۰	۲۴	۱۰/۵	۰/۳۷۵	۰/۳۷۵	۱/۲۵	۰/۱۲۵	۰/۰۴
۵	۲۰	۷۲	۸/۵	۰/۱۲۵	۰/۳۷۵	۱/۷۵	۰/۳۷۵	۰/۰۵۵
۶	۴۰	۲۴	۸/۵	۰/۱۲۵	۰/۶۲۵	۱/۲۵	۰/۳۷۵	۰/۰۶۲
۷	۲۰	۲۴	۸/۵	۰/۳۷۵	۰/۶۲۵	۱/۷۵	۰/۱۲۵	۰/۰۵
۸	۲۰	۷۲	۱۰/۵	۰/۱۲۵	۰/۶۲۵	۰/۲۵	۰/۱۲۵	۰/۰۰۵
۹	۳۰	۴۸	۹/۵	۰/۲۵	۰/۵	۱	۰/۲۵	۰/۰۹۱
۱۰	۲۰	۲۴	۱۰/۵	۰/۳۷۵	۰/۶۲۵	۰/۲۵	۰/۳۷۵	۰/۰۰۲
۱۱	۲۰	۷۲	۱۰/۵	۰/۳۷۵	۰/۳۷۵	۱/۷۵	۰/۳۷۵	۰/۰۰۷
۱۲	۲۰	۲۴	۸/۵	۰/۱۲۵	۰/۳۷۵	۰/۲۵	۰/۱۲۵	۰/۰۸
۱۳	۴۰	۲۴	۱۰/۵	۰/۱۲۵	۰/۳۷۵	۰/۲۵	۰/۳۷۵	۰/۰۰۳



نمودار ۳ مقایسه اثرات پارامترهای مورد بررسی در تولید آنزیم α-آمیلاز.

α-آمیلاز (α-1 ,4-D glucanglucanohydrolases ,E.C.3.2.1.1) آنزیم خارج سلولی است که بطور تصادفی پیوندهای داخلی۴←۱α خطی را در مولکول نشاسته هیدرولیز نموده و آن را به الیگوساکاریدهای کوتاه می‌شکند و در نتیجه واحدهایی با وزن مولکولی پایین‌تر تولید می‌کند (۱۵-۱۲).به این ترتیب می‌تواند ویسکوزیته ایجاد شده توسط آمیلوپکتین در محیط را کاهش دهد و محیط را رقیق نماید. ازهمین نظر است که به آن آنزیم مایع‌کننده نیز گفته می‌شود. آنزیم α-آمیلاز کاربرد گسترده ای در زمینه‌های مختلف از

جمله پزشکی، دارویی، تجزیه و تحلیل‌های شیمیایی و دیگر صنایع همچون نساجی، کاغذسازی، صنعت تخمیر و غذا دارد. با وجود تنوع منابع تولیدکننده آمیلاز، به دلیل تنوع و گستره بالای زمینه‌های کاربردی این آنزیم و نیاز به استفاده از آن در زمینه‌های جدید، همچنان دستیابی به آمیلازهای دارای ویژگی‌های عملکردی جدید مورد توجه محققین قراردارد (۱۲).

بسیاری از گونه های باسیلوس قلیادوست از دامنه وسیعی از محیط‌های قلیایی، مانند دریاچه‌های-قلیایی(دارای کربنات سدیم)، صحراها و خاک‌های خشک جدا شده اند(۶, ۷, ۱۶, ۱۷).حداقل ۱۹ گونه باسیلوس قلیادوست تا به امروز شناسایی شده‌اند که توجه زیادی را در کاربردهای صنعتی وتحقیقات بیوتکنولوژی جلب کرده‌اند. *Bacillus alkalitelluris*یک گونه از جنس باسیلوس است که به دلیل پایداری قلیایی به عنوان یک میکروارگانیسم قلیادوست مورد توجه قرار می‌گیرد (۸). انتظار می‌رود آنزیم‌های تولیدشده توسط این باکتری، از جمله α-آمیلاز نیز دارای مقاومت به pH قلیایی بوده (pH=۸) و از این نظر از آنها در زمینه‌هایی که نیازمند به عملکرد α-آمیلاز در شرایط قلیایی است استفاده نمود. بسته به میکروارگانیسم مورد نظر pH بهینه آنزیم‌های مربوطه از جمله α-آمیلاز متفاوت است. در سال ۲۰۱۳ بوزیک بر روی سویه‌های باسیلوس تحقیقی انجام داد و pH بهینه برای فعالیت آنزیم α-آمیلاز را pH =۸ گزارش کرد (۱۸). در تحقیقی دیگر که توسط اولها کوبراک در سال۲۰۱۰ بر روی *Bacillus* sp. BKLP20Hانجام شد، pH بهینه برای فعالیت آنزیم α-آمیلاز pH = ۸ گزارش شد (۱۹). آشوینی در سال ۲۰۱۱ pH بهینه برای فعالیت α-آمیلاز تولید شده از *Bacillus* sp.marini را pH=۷ گزارش کرد (۲). آنامالای در سال ۲۰۱۱ pH بهینه را برای فعالیت α-آمیلاز حاصل از *Bacillus cereus*را pH=۱۱ گزارش کرد (۲۰). ساکسنادر سال۲۰۱۱pH بهینه برای فعالیت α-آمیلاز حاصل از سویه‌های باسیلوس را pH= ۶ گزارش کرد (۲۱). گورودبن در سال ۲۰۱۱ بر روی *Bacillus megaterium*تحقیقی انجام داد و pH= ۶/۵ را pH بهینه گزارش کرد (۴). طبق نتایج بدست آمده آنزیم α-آمیلاز *B. alkalitelluris* جزء آنزیم‌های قلیادوست محسوب می‌شود و از این نظر حائز اهمیت می‌باشد. علاوه براین، دمای بهینه این آنزیم در محدوده ۴۰ تا ۶۰°C است که این محدوده می تواند برای اغلب مصارف صنعتی قابل توجه باشد. این محدوده مشابه با دمای بهینه گزارش شده برای α-آمیلاز از سایر گونه-های باسیلوس است. سدا بانو در سال ۲۰۱۱ بر روی *Bacillusubtilis*KIBGE HAS تحقیقی انجام داد و دمای‌بهینه برای فعالیت آنزیم را ۵۰°C گزارش کرد (۳). پرومیتا دب در سال ۲۰۱۳ دمای‌بهینه برای فعالیت آنزیم α-آمیلاز تولید شده توسط *Bacillus amyloliquefaciens* P-100 را ۵۰°C گزارش کرد (۲۲). محمد عبدول آل زازایی در سال ۲۰۱۱ دمای بهینه فعالیت α-آمیلاز حاصل از *Bacillus cereus* Ms6 را ۴۵°C گزارش کرد (۲۳). آنوپامادر سال ۲۰۱۱ بر روی *Bacillus aquimaris* VITP4 تحقیقی انجام داد و دمای بهینه برای فعالیت α-آمیلاز حاصل از آن را ۴۰°C گزارش کرد (۲۴). آنامالای در سال ۲۰۱۱ دمای بهینه برای فعالیت α-آمیلاز تولید شده توسط *Bacillus creus*را ۶۵°C گزارش کرد (۲۰). ازدمیر در سال ۲۰۱۱ دمای بهینه برای فعالیت α-آمیلاز تولید شده توسط *Bacillus subtilis*را ۶۰°Cگزارش کرد (۲۳). آشوینی در سال ۲۰۱۱ دمای بهینهبرای فعالیت α-آمیلاز حاصل از *Bacillus* sp.*marini* را ۴۰°C گزارش کرد (۲). در تحقیقی دیگر که توسط هون‌کیم در سال ۲۰۱۲ بر روی *Bacillus* sp.AAH-31 انجام داد، دمای بهینه برای فعالیت α-آمیلاز حاصل از آن را ۶۰°C گزارش کرد (۲۵). با توجه به این ویژگی‌ها، این آنزیم α-آمیلاز *B. alkalitelluris* می‌تواند گزینه مناسبی جهت مصارف صنعتی و بیوتکنولوژیک محسوب شود.

ترکیبات محیط کشت و شرایط محیطی نقش مهمی در رشد و تولید متابولیت‌ها توسط میکروارگانیسم‌ها دارند. در *B. alkalitelluris* ، میزان رشد باکتری در محیط LBبراث در مقایسه با محیط R2A به میزان قابل توجهی بهبود می‌یابد. این امر

نشان می‌دهد که این محیط کشت بهتر می‌تواند نیازهای تغذیه‌ای این باکتری را تامین نماید. به منظور دستیابی به مقادیر انبوه از آنزیم‌ها، رویکردهای متفاوتی وجوددارد. با توجه به اینکه تاکنون ژن مربوط به آمیلاز *B. alkalitelluris* شناسایی نشده است استفاده از رویکردهای مهندسی ژنتیک می‌تواند وقت‌گیر و مستلزم صرف هزینه باشد. رویکرد دیگر استفاده از روشهای بهینه‌سازی شرایط کشت باکتری جهت تولید بیشتر آنزیم است طوریکه کمترین تداخل با رشد طبیعی آنزیم وجود داشته‌باشد. اولین قدم در فرایند بهینه‌سازی تولید، شناخت پارامترهای موثر در دستیابی به پاسخ مورد نظر است. امروزه از روش پلاکت—برمن[3] بجای روش‌های وقت‌گیر و هزینه‌بر یک متغییر در یک زمان[4] برای شناسایی پارامترهای موثر در فرایند مورد نظر از میان انبوه پارامترهای موجود استفاده می‌شود. در این تحقیق، از میان فاکتورهای متعدد موثر بر رشد باسیلوس، ۷ فاکتور با بررسی گزارشات موجود انتخاب شده و تاثیر آنها بر تولید آمیلاز توسط *B. alkalitelluris* با استفاده از روش پلاکت-برمن مورد ارزیابی قرارگرفت. در این میان تنها فاکتور pH به عنوان عامل موثر در این زمینه شناسایی‌شد. در مطالعات دیگری که در ارتباط با تولید آنزیم α-آمیلاز انجام شده است نیز pH به عنوان یکی از فاکتورهای موثر در تولید α-آمیلاز گزارش شده است. برهان در سال ۲۰۰۳ اثر pHهای ۵ تا ۱۳ را بر روی فعالیت آنزیم α-آمیلاز مطالعه کرد و pH=۹ را pH بهینه گزارش کرد (۲۶). احمدی در سال ۲۰۱۱ در ارتباط با اثر pHهای ۳ تا ۹ بر روی فعالیت آنزیم α-آمیلاز تحقیقی انجام داد و pH=۸ را بهترین برای تولید آنزیم α-آمیلاز می باشد (۲۷). ساجیتا در سال ۲۰۱۱ اعلام کرد که *Bacillus megaterium* در pH =۷/۵ بیشترین میزان تولید آنزیم α-آمیلاز را دارد (۲۸). آشوینی در سال ۲۰۱۱ بیان کرد که بهترین pH برای تولید آنزیم α-آمیلاز pH=۷ بوده، در pH های اسیدی و قلیایی تولید آنزیم به میزان قابل توجهی کاهش می‌یابد (۲). این نتایج اهمیت روش پلاکت-برمن به عنوان روشی در غربالگری فاکتورها برای تعیین فاکتورهای موثر را اثبات می‌کند. استفاده از این روش می‌تواند منجر به صرفه-جویی قابل توجهی در هزینه‌ها و همچنین زمان مطالعات برای بهبود فرایند تولید شود. علاوه براین، فاکتورهای غیرموثر را می‌توان با فاکتورهای دیگر جایگزین نموده و اثرات آنها در تولید آنزیم آمیلاز مورد ارزیابی قرارگیرد.

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد تولید α-آمیلاز توسط باکتری *B. alkalitelluris* وابستگی بالایی به تغییرات pH محیط در مقایسه با سایر فاکتورهای محیط کشت دارد. به عبارت دیگر تغییر در pH محیط می‌تواند به عنوان یک عامل القاکننده موجب تحریک تولید α-آمیلاز در این باکتری شود.

تقدیر و تشکر

از همکاری صمیمانه جناب آقای راندی کارشناس محترم آزمایشگاه میکروبیولوژی واحد صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین به این وسیله از حمایت‌های سرکار خانم دکتر هنرمند جهرمی مدیر گروه میکروبیولوژی در انجام این پایان‌نامه کمال تشکر و قدردانی را داریم.

[3]Placket-Burman
[4]One parameter at a time

منابع مورد استفاده

. Tabassum, R., Khaliq, S., Rajoka, M. I., Agblevor, F., 2014. Solid state fermentation of a raw starch digesting alkaline alpha-amylase from Bacillus licheniformis RT7PE1 and its characteristics. Biotechnol Res Int .2014:495384.

2. Ashwini, K., Gaurav, K., Karthik, L., Bhaskara Rao, K., 2011. Optimization, production and partial purification of extracellular α-amylase from Bacillus sp. marini. Arch Appl Sci Res 3(1): 33-42.

3. Bano, S., Qader, S. A. U., Aman, A., Syed, M. N., Azhar, A., 2011. Purification and characterization of novel α-amylase from Bacillus subtilis KIBGE HAS. Aaps Pharmscitech 12(1):255-61.

4. Gurudeeban, S., Satyavaniand, K., Ramanathan, T., 2011, Production of extra cellular-amylase using Bacillus megaterium isolated from White Mangrove (Avicennia marina). Asian J Biotechnol 3(3): 310-6.

5. El-Shishtawy, R. M., Mohamed, S. A., Asiri, A. M., Gomaa, A. B., Ibrahim, I. H., Al-Talhi, H. A., 2014. Solid fermentation of wheat bran for hydrolytic enzymes production and saccharification content by a local isolate Bacillus megatherium. BMC Biotechnol 14(1): 29.

6. Ulukanli, Z., DIĞRAK, M., 2002. Alkaliphilic micro-organisms and habitats. Turkish Journal of Biology 26(3): 181-91.

7. Yumoto, I., Yamaga, S., Sogabe, Y., Nodasaka, Y., Matsuyama, H., Nakajima, K., 2003. Bacillus krulwichiae sp. nov., a halotolerant obligate alkaliphile that utilizes benzoate and m-hydroxybenzoate. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 53(5): 1531-6.

8. Lee, J. C., Lee, G. S., Park, D. J., Kim, C. J., 2008. Bacillus alkalitelluris sp. nov., an alkaliphilic bacterium isolated from sandy soil. Int J Syst Evol Microbiol 58(Pt 11): 2629-34.

9. Bernfeld, P., 1955. Amylases, α and β. Methods in Enzymology 1: Academic Press; pp. 149-58.

10. Miller, G. L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry 31(3): 426-8.

11. Asgher, M., Asad, M. J., Rahman, S., Legge, R., 2007. A thermostable α-amylase from a moderately thermophilic Bacillus subtilis strain for starch processing. Journal of Food Engineering 79(3): 950-5.

12. Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., Chauhan, B., 2003. Microbial α-amylases: a biotechnological perspective. Process Biochemistry 38(11): 1599-616.

13. Kandra, L., 2003. α-amylases of medical and industrial importance. Journal of Molecular Structure 666: 487-98.

14. Tangphatsornruang, S., Naconsie, M., Thammarongtham, C., Narangajavana, J., 2005. Isolation and characterization of an alpha-amylase gene in cassava (Manihot esculenta). Plant Physiol Biochem 43(9): 821-7.

15. Tester, R. F., Karkalas, J., Qi, X., 2004. Starch-composition, fine structure and architecture. Journal of Cereal Science 39(2): 151-65.

16. Li, Z., Kawamura, Y., Shida, O., Yamagata, S., Deguchi, T., Ezaki, T., 2002. Bacillus okuhidensis sp. nov., isolated from the Okuhida spa area of Japan. Int J Syst Evol Microbiol 52(Pt 4): 1205-9.

17. Yumoto, I., Hirota, K., Goto, T., Nodasaka, Y., Nakajima, K., 2005. Bacillus oshimensis sp. nov., a moderately halophilic, non-motile alkaliphile. Int J Syst Evol Microbiol 55(Pt 2): 907-11.

18. Božić, N., Ruiz, J., López-Santín, J., Vujčić, Z., 2011. Production and properties of the highly efficient raw starch digesting α-amylase from a Bacillus licheniformis ATCC 9945a. Biochemical Engineering Journal 53(2): 203-9.

19. Kubrak, O. I., Storey, J. M., Storey, K. B., Lushchak, V. I., 2010. Production and properties of alpha-amylase from Bacillus sp. BKL20. Can J Microbiol 56(4): 279-88.

20. Annamalai, N., Thavasi, R., Vijayalakshmi, S., Balasubramanian, T., 2011. Extraction, purification and characterization of thermostable, alkaline tolerant alpha-amylase from Bacillus cereus. Indian J Microbiol 51(4): 424-9.

21. Saxena, R., Singh, R., 2011. Amylase production by solid-state fermentation of agro-industrial wastes using Bacillus sp. Brazilian Journal of Microbiology 42(4): 1334-42.

22. Deb, P., Talukdar, S. A., Mohsina, K., Sarker, P. K., Sayem, S. A., 2013. Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from Bacillus amyloliquefaciens P-001. Springerplus 2(1): 154.

23. Rajeshwara, A., 2011. Identification, characterization of novel halophilic Bacillus Cereus Ms6: a source for extra cellular A-amylase. Advances in Environmental Biology 5(5): 992-9.

24. Anupama, A. and Jayaraman, G., 2011. Detergent stable, halotolerantα-amylase from bacillus aquimaris vitp4 exhibits reversible unfolding. International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology. 2(2): 366-376.
25. Kim, D. H., Morimoto, N., Saburi, W., Mukai, A., Imoto, K., Takehana, T., 2012. Purification and characterization of a liquefying alpha-amylase from alkalophilic thermophilic Bacillus sp. AAH-31. Biosci Biotechnol Biochem 76(7): 1378-83.
26. Burhan, A., Nisa, U., Gökhan, C., Ömer, C., Ashabil, A., Osman, G., 2003. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic Bacillus sp. isolate ANT-6. Process Biochemistry 38(10): 1397-403.
27. Ahmadi, A., Ghobadi, S., Khajeh, K., Nomanpour, B., Dalfard, A. B., 2010. Purification of α-amylase from Bacillus sp. GHA1 and its partial characterization. Journal of the Iranian Chemical Society 7(2): 432-40.
28. Sajitha, N., Vasanthabharathi, V., Lakshminarayanan, R., Jayalakshmi, S., 2011. Amylase from an Estuarine Bacillus megaterium. Curr Res J Biol Sci 3(2): 110-5.