مقاله تحقیقی

تثبیت باکتری *باسیلوس آلکالیتلوریس* در بستر آگار به منظور تولید آنزیم آلفا-آمیلاز

مرجان علی محمدیان[1]، مهدی ابراهیمی[2،*]، سحر هنرمند جهرمی[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: mehd_ebrahimi@yahoo.com ،ebrahimi@iauvaramin.ac.ir

محل انجام تحقیق: گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، پیشوا، ایران

تاریخ دریافت:۱۴۰۰/۶/۲۷ تاریخ پذیرش:۱۴۰۰/۷/۱۰

فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران
جلد ۱۶- شماره ۱- بهار ۱۴۰۰

چکیده

با توجه به مصرف بالای آنزیم آمیلاز، استفاده از سویه‌های مولد آنزیم آمیلاز و بهینه‌سازی شرایط تولید این آنزیم روشی کارآمد در جهت تولید این آنزیم است. با توجه به این که تا کنون ژن مربوط به آمیلاز *باسیلوس آلکالیتوریس* شناسایی نشده است، دستیابی به شرایط پایدار تولید آنزیم آمیلاز توسط باکتری‌های مولد این آنزیم دارای اهمیت است. یکی از روش های مورد توجه تثبیت باکتری ها در بسترهای مناسب است به طوری که قابلیت تولید آنزیم توسط این باکتری ها حفظ شود. در این پژوهش ابتدا باکتری *باسیلوس آلکالیتلوریس* در محیط کشت لوریا برتانی براث حاوی نشاسته کشت داده شد. سپس باکتری در آگار تثبیت شده و میزان آنزیم تولید شده با استفاده از روش DNS اندازه‌گیری شد. در نهایت میزان تولید آنزیم هنگام استفاده مجدد از سلول های تثبیت شده در کشت های متوالی ارزیابی شد. طبق نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر باکتری *باسیلوس آلکالیتلوریس* تثبیت شده در بستر آگار همچنان قادر است آنزیم آلفا-آمیلاز را تولید نماید. حداکثر میزان تولید آلفا-آمیلاز پس از ۲۴ ساعت به دست آمد. علاوه براین باکتری تثبیت شده پس از ۴ دفعه تعویض محیط کشت همچنان باقی مانده و قادر به تولید آنزیم آمیلاز است به طوری که تا ۷۲ ساعت کاهش قابل توجهی در میزان تولید آنزیم مشاهده نمی شود. با توجه به اینکه تثبیت باکتری *باسیلوس آلکالیتلوریس* در آگار منجر به حفظ قابلیت تولید آنزیم آلفا-آمیلاز می‌گردد، لذا می‌توان از این روش در تولید انبوه آنزیم آمیلاز استفاده نمود.

واژه های کلیدی: *باسیلوس آلکالیتلوریس*، آگار، آلفا-آمیلاز، تثبیت

مقدمه

نشاسته یکی از اجزای اصلی رژیم غذایی روزانه انسان را تشکیل داده و فراوان‌ترین شکل از پلی ساکاریدهای ذخیره ای ساخته شده توسط گیاهان است. نشاسته منبعی ارزان قیمت برای تولید شربت های قندی حاوی گلوکز، فروکتوز یا مالتوز محسوب می‌شود و به طور وسیعی در صنایع غذایی مورد استفاده می گیرد (۱). یکی از مهمترین آنزیم‌های مورد استفاده در ارتباط با صنایع تبدیل نشاسته، آنزیم آمیلاز است. قندهای تولید شده توسط این آنزیم می تواند برای تخمیر و تولید اتانول مورد استفاده قرار گیرد (۲). آمیلازها

(آلفا-آمیلاز، بتا-آمیلاز و گلوکوآمیلاز) از مهمترین آنزیم‌ها، در بیوتکنولوژی نوین محسوب شده و به دلیل کاربرد گسترده از اهمیت بالایی برخوردار هستند (۳). این آنزیم ها بین ۳۰-۲۵ درصد از بازار جهانی آنزیم‌های مهم تجاری را به خود اختصاص داده و جایگزین هیدرولیز شیمیایی نشاسته در فرآوری صنعتی شده اند (۱). آلفا-آمیلاز در طبیعت توسط جانوران، گیاهان و میکروارگانیسم ها تولید می‌شود. این آنزیم، یک اندوهیدرولاز است که به طور تصادفی اتصالات گیلوکوزیدی آلفا(۴→۱) را در ترکیبات نشاسته ای، گلیکوژن و پلی‌ساکاریدهای مرتبط با آن ها هیدرولیز نموده و اولیگوساکاریدهایی با اندازه‌های متعدد به وجود می آورد (۴).

خواص شیمیایی، فیزیکی و مکانیسم عمل آلفا-آمیلازها تا حدودی به منبع آنزیم بستگی دارد. هرچند که آنزیم آلفا-آمیلاز پستانداران و دانه های گیاهان زیاد مورد مطالعه قرار گرفته اند، اما این آلفا-آمیلازهای باکتریایی هستند که امروزه در صنعت و تجارت مورد استفاده قرار می گیرند (۵). آمیلازهای باکتریایی بدلیل برخی مزایای ویژه نسبت به آمیلازهای قارچی بیشتر مورد استفاده قرار می گیرند (۶). تقریبا همه اعضای جنس باسیلوس قادر به تولید آنزیم آلفا-آمیلاز هستند، بنابراین این جنس پتانسیل بیشتری نسبت به بقیه باکتری ها برای تولید آنزیم آلفا-آمیلاز در صنایع آنزیمی دارد (۷).

اغلب گونه های قلیادوست باسیلوس از محیط های قلیایی، مانند دریاچه های کربنات سدیم، صحراها و خاکهای خشک جدا شده اند (۸). تا امروز حدود ۱۹ گونه باسیلوس قلیادوست شناسایی شده اند و برای استفاده در فرایند مختلف صنعتی و تحقیق های بیوتکنولوژی مورد توجه قرار گرفته اند. *Bacillus alkalitelluris* یک گونه از جنس باسیلوس است که به دلیل پایداری قلیایی به عنوان یک میکروارگانیسم قلیادوست مورد توجه قرار گرفته است (۹).

تولید و تخلیص آنزیم ها بدلیل کاربرد گسترده آنها در فرایندهای صنعتی بسیار مورد توجه بوده اما مستلزم صرف وقت و هزینه بالاست. بنابراین چگونگی بازیافت و استفاده مجدد و تولید پایدار آنزیم ها جایگاه تحقیقاتی ویژه ای برای محققان حوزه آنزیم شناسی می باشد. در این مطالعه نیز با هدف تولید پایدار، باکتری *باسیلوس آلکالیتلوریس* در بستر آگارزی تثبیت شده و تولید آنزیم آلفا-آمیلاز مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش ها

تهیه کشت فعال باکتری

باکتری *B. alkalitelluris* از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران به صورت پودر لیوفیلیزه تهیه شد. کشت فعال با تلقیح سوسپانسیون باکتری به محیط کشت لوریا برتانی براث تهیه شده و به مدت ۴۸ ساعت با سرعت همزن ۱۳۵ دور در دقیقه دردمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد.

تثبیت باکتری در آگار

مقدار ۱۸ میلی لیتر محلول آگار با غلظت ۵ درصد درون فالکون ۵۰ میلی‌لیتری تهیه و توسط اتوکلاو استریل شد. مقدار ۲ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری *B. alkalitelluris* به محلول آگار اضافه نموده به مدت ۵ دقیقه هم زده شد تا مخلوط یکنواخت باکتری در محلول آگار تهیه شود. سپس محلول آگار حاوی باکتری داخل پتری دیش توزیع شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد قراد داده شد. پس از این مدت ژل آگار تهیه شده به قطعات کوچک با قطر حدوداً ۰/۵ سانتی‌متر مکعب برش داده شد. سپس قطعات آگار به بافر سدیم فسفات ۰/۱ مولار (pH=7) انتقال یافته و سپس در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

تولید آنزیم توسط باکتری های تثبیت شده

در این مرحله قطعات تثبیت شده به ارلن های با حجم ۲۵۰ میلی لیتر محتوی ۵۰ میلی لیتر محیط LB حاوی نشاسته ۲ درصد منتقل شدند و در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۰ درجه سانتی گراد در دور ۱۲۰ rpm قرار داده شدند و پس از ۶، ۱۲، ۱۸، ۲۴، ۳۰ و ۳۶ ساعت از محلول محیط کشت برای اندازه گیری فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز استفاده شد.

اندازه گیری فعالیت آنزیم آمیلاز

اندازه گیری فعالیت آنزیم آمیلاز با استفاده از سوبسترای نشاسته و بر اساس روش برنفلد انجام شد. در این روش ابتدا یک گرم پودر ۲ -هیدروکسی۳و۵-دی نیتروبنزوئیک اسید، ۳۰ گرم سدیم پتاسیم تارتارات و ۲۵ میلی لیتر سود ۲ مولار در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر حل شده و محلول DNS تهیه شد (۱۰). برای سنجش فعالیت آنزیم، ۲۵۰ میکرولیتر عصاره محیط کشت و ۲۵۰ میکرولیتر بافراستات ۰/۰۵ مولار و ۱/۵ میلی لیتر محلول نشاسته ۲ درصد (v/w) به بافر استات افزوده شد. مخلوط حاصله به مدت ۱ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس دو میلی‌لیتر از این مخلوط به ۲ میلی‌لیتر معرف DNSافزوده شده و به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد و جذب نمونه در طول موج ۵۴۰ nm ثبت شد (۱۱).

مقایسه میزان تولید آنزیم هنگام استفاده مجدد از سلول های تثبیت شده

بدین منظور پس از ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت، محیط کشت سلول های تثبیت شده با محیط کشت جدید جایگزین شد. بدین ترتیب که بستر آگارز-آنزیم را از محیط کشت قدیمی خارج نموده با آب مقطر شسته و به محیط کشت جدید انتقال داده شد. قبل از هر بار تعویض محیط کشت میزان تولید آنزیم آلفا-آمیلاز در آن ها با روش DNS بررسی شد.

نتایج

میزان تولید آنزیم توسط باکتری های تثبیت شده

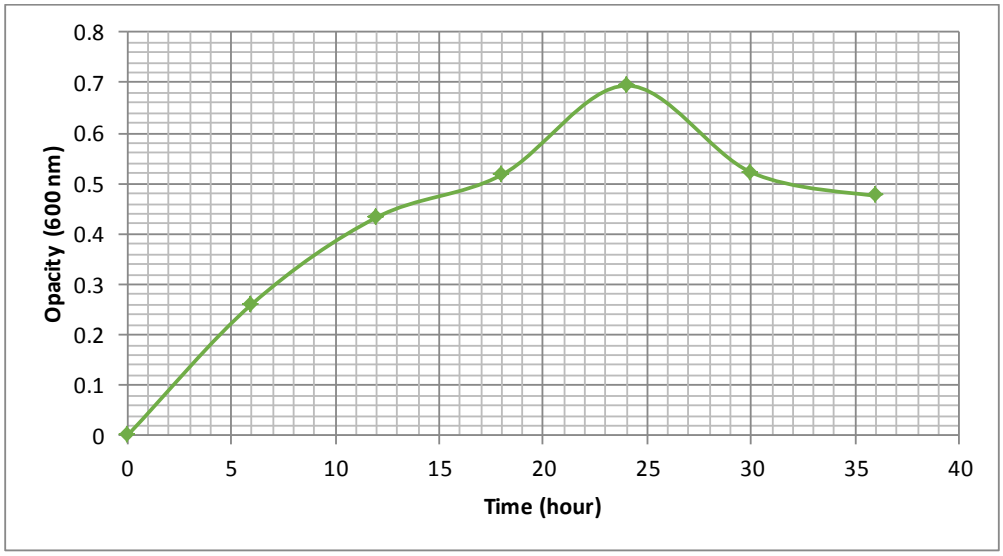
میزان تولید آنزیم آلفا-آمیلاز توسط باکتری *باسیلوس آلکالیتلوریس* پس از تثبیت در آگار در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و در دور ۱۲۰ rpm در زمان های ۶، ۱۲، ۱۸، ۲۴، ۳۰، ۳۶ ساعت پس از زمان تلقیح توسط جذب نوری دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر سنجش شد (نمودار ۱). با توجه به نمودار مشخص است که با افزایش زمان میزان فعالیت آنزیمی ثبت شده نیز افزایش می‌یابد که نشان می دهد باکتری تثبیت شده در ژل آگار آنزیم را تولید نموده و به محیط کشت رها می کند. حداکثر مقدار فعالیت آنزیمی در زمان ۲۴ ساعت به دست آمده است. پس ۲۴ ساعت میزان تولید آنزیم ثابت مانده و در مقداری نیز کاهش می یابد که علت آن می تواند اتمام مواد مغذی محیط کشت و ورود باکتری به فاز سکون باشد.

نتایج میزان تولید آنزیم در استفاده مجدد از سلول-های تثبیت شده در آگار

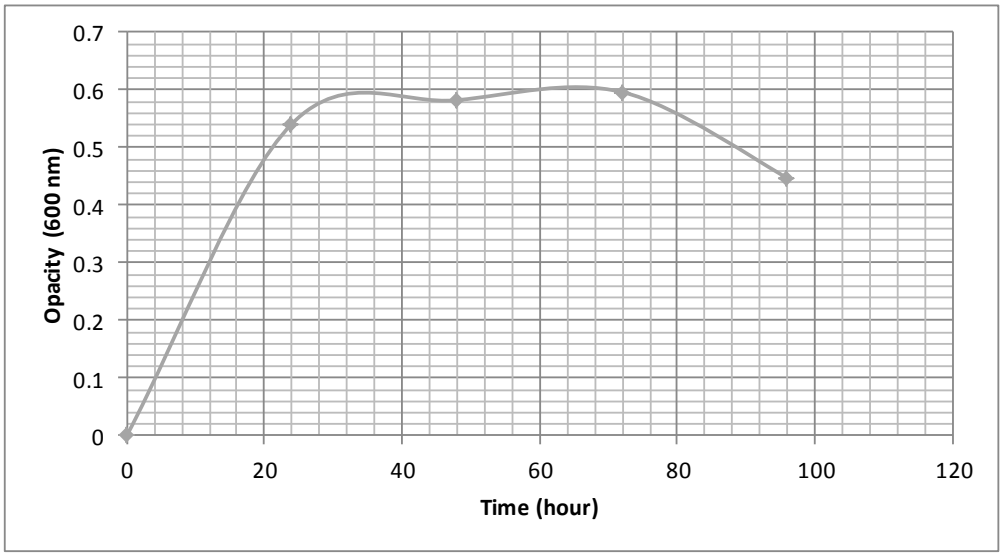
نتایج به دست آمده از استفاده مجدد از بستر آگار-آنزیم در نمودار-۲ نشان داده شده است. با توجه به این نمودار مشخص است که قابلیت تولید آنزیم توسط باکتری تثبیت شده در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تقریبا برابر است. اما در زمان ۹۶ ساعت به میزان قابل توجهی کاهش می یابد. به عبارت دیگر باکتری تثبیت شده توانسته است تا سه مرحله متوالی تعویض محیط کشت باقی مانده و به تولید آنزیم ادامه دهد.

بحث

با توجه به مصرف بالای آنزیم آمیلاز، استفاده از سویه-های مولد آنزیم آمیلاز و بهینه‌سازی شرایط تولید این آنزیم روشی کارآمد در جهت تولید اقتصادی آنزیم آمیلاز محسوب می‌شود. به منظور دستیابی به مقادیر انبوه از آنزیم ها، رویکردهای متفاوتی وجود دارد. با توجه به این که تا کنون ژن مربوط به آمیلاز *باسیلوس آلکالیتوریس* شناسایی نشده است، استفاده از رویکردهای مهندسی ژنتیک می تواند وقت گیر و مستلزم صرف هزینه باشد. به همین دلیل استفاده از روش های تثبیت باکتری به دلیل اینکه کم‌ترین تداخل با رشد طبیعی باکتری دارد جهت تولید بیشتر آنزیم مورد توجه قرار گرفته است.



نمودار ۱- میزان فعالیت آنزیمی ثبت‌شده توسط باکتری های تثبیت شده در آگار.



نمودار ۲- میزان آنزیم تولید شده در استفاده مجدد از سلول های تثبیت شده در آگار.

نتایج به دست آمده نشان داد باکتری *باسیلوس آلکالیتلوریس* در شرایط تثبیت شده در آگار همچنان قادر به تولید آنزیم آمیلاز است. میزان تولید آمیلاز توسط باکتری تثبیت شده در مدت ۲۴ ساعت به حداکثر میزان خود افزایش می‌یابد. علاوه براین، باکتری تثبیت شده قادر است تا ۷۲ ساعت و ۳ مرحله تعویض محیط کشت آنزیم آلفا-آمیلاز را تولید نماید. در پژوهشی که توسط Stefanova و همکاران (۱۹۹۸) انجام شد سلول های در حال رشد باکتری گرما دوست *باسیلوس برویس* تولیدکننده آلفا-آمیلاز مقاوم در برابر حرارت، در ژل آگار تثبیت شدند. نتایج این پژوهش نشان داد حداکثر فعالیت آلفا- آمیلاز پس از چرخه دوم کشت به دست آمد (۱۲).

رویکرد تثبیت سلول های باکتری در تولید سایر آنزیم‌ها نیز مورد استفاده قرار گرفته است. Adinarayana و

همکارانش (۲۰۰۵)، تولید آنزیم آلکالین پروتئاز را توسط سلول های تثبیت شده *باسیلوس سوبتیلیس* زیر گونه *PE11* بررسی کردند و میزان ۷۹ درصد افزایش در تولید این آنزیم را بعد از تثبیت با آلژینات کلسیم گزارش نمودند (۱۳). Vassileva و همکارانش (۲۰۰۳)، از آگار-آگار جهت تثبیت سلول های *باسیلوس سیرکولانس* زیر گونه ATCC 21783 به منظور تولید سیکلودکسترین گلوکانوترانسفراز استفاده کردند (۱۴). در گزارشی توسط Tonkova (۱۹۹۴)، سلول-های تثبیت شده *باسیلوس لیکِنیفورمیس* زیر گونه 44MB82-G برای تولید آلفا-آمیلاز ترموستاتا مورد استفاده قرار گرفتند. تولید آلفا-آمیلاز پس از ۱۴۴ ساعت کشت سلول های تثبیت شده در مقایسه با سلول های آزاد ۴۰ درصد بیشتر بود (۱۵).

از روش تثبیت سلول باکتری علاوه بر تولید آنزیم برای تولید پایدار سایر ترکیبات فعال زیستی و یا فرایندهای زیست پالایی نیز استفاده شده است. Dzionek و همکاران (۲۰۱۸) باکتری *Planococcus* sp. S5 را در بستر اسفنج لوفا تثبیت نموده و از آن برای حذف آلودگی ناپروکسن استفاده نمودند. نتایج این تحقیق نشان داد باکتری تثبیت شد می تواند به مدت ۵۵ روز فرایند تجزیه ناپروکسن را انجام دهند (۱۶). در تحقیق دیگر باکتری *Rhodotorula mucilaginosa* در بستر آگار تثبیت شده و از آن برای کاتالیز واکنش احیاء کتون به الکل استفاده شد. نتایج این تحقیق نشان داد باکتری تثبیت شده می تواند حتی پس از ۶ چرخه استفاده و بازیافت همچنان ۱۰۰ عملکرد خود را حفظ نماید (۱۷).

نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان داده است که تثبیت باکتری *باسیلوس آلکالیتلوریس* در بستر آگارز امکان پذیر بوده و در محیط حاوی نشاسته قادر به تولید آنزیم آلفا آمیلاز است، همچنین تولید آنزیم مذکور به مدت سه روز در شرایط تثبیت باکتری وجود دارد که این ویژگی متعاقبا باعث کاهش دوره های کشت باکتری همراه با افزایش راندمان و کاهش هزینه های تولید آنزیم می شود.

تقدیر و تشکر

نتایج این مقاله مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین – پیشوا است.

منابع مورد استفاده

1. Rasooli, I., Mousavi, S. L., 2009. Characterization of a thermotolerant α-amylase Producing Natural Variant of Bacillus Species. Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences 8(4): 303-316.
2. Goyal, N., Gupta, J. K., Soni, S. K., 2005. A novel raw starch digesting thermostable α-amylase from Bacillus sp. I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch. Enzyme and Microbial Technology 37(7): 723-734.
3. Deljou, A., Arzi, I., 2015. Alpha amylase production by a native thermophilic strain Bacillus licheniformis-AZ2 isolated from Qinarje Hot spring in Ardebil Province. Agricultural Biotechnology Journal 7(1): 75-92.
4. Antranikian, G., 1990. Physiology and enzymology of thermophilic anaerobic bacteria degrading starch. FEMS Microbiology Letters 75(2-3): 201-218.
5. Dordick, J. S. (Ed.). (2013). *Biocatalysts for industry*. Springer Science & Business Media.Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., Singh, D., Mohan, R., 2000. Advances in microbial amylases. Biotechnology and applied biochemistry 31(2): 135-152.
6. Khan, M. A., Wali, H., Khan, K. U., Ayub, M., Mengal, S., 2021. Bioprocessing of agricultural wastes for value added bacterial amylase production. Pakistan Journal of Agricultural Sciences 58(1): 261-268.
7. Ulukanli, Z., Digrak M., 2002. Alkaliphilic micro-organisms and habitats. Turkish Journal of Biology 26(3): 181-191.
8. Lee, J.C., Lee, G. S., Park, D.J. and Kim, C.J., 2008. Bacillus alkalitelluris sp. nov., an alkaliphilic bacterium isolated from sandy soil. International journal of systematic and evolutionary microbiology 58(11): 2629-2634.
9. Bernfeld, P., 1955. Amylases, α and β. methods in anzymology . 1 : 149-158.
10. Miller, G. L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical chemistry 31(3): 426-428.

11. Stefanova, M. E., Tonkova, A. I., Dobreva, E. P, Spasova, D. I., 1998. Agar gel immobilization ofBacillus brevis cells for production of thermostable α-amylase. Folia Microbiologica 43(1): 42-46.
12. Adinarayana, K., Jyothi, B. and Ellaiah, P., 2005. Production of alkaline protease with immobilized cells of Bacillus subtilis PE-11 in various matrices by entrapment technique. AAPS PharmSciTech 6(3): E391-E397.
13. Vassileva, A., Burhan, N., Beschkov, V., Spasova, D., Radoevska, S., Ivanova, V., Tonkova, A., 2003. Cyclodextrin glucanotransferase production by free and agar gel immobilized cells of Bacillus circulans ATCC 21783. Process Biochemistry 38(11): 1585-1591.
14. Tonkova, A., Ivanova, V., Dobreva, E., Stefanova, M., Spasova, D., 1994. Thermostable α-amylase production by immobilized Bacillus licheniformis cells in agar gel and on acrylonitrile/acrylamide membranes. Applied microbiology and biotechnology 41(5): 517-522.
15. Dzionek, A., Wojcieszyńska, D., Hupert-Kocurek, K., Adamczyk-Habrajska, M., Guzik, U., 2018. Immobilization of Planococcus sp. S5 Strain on the Loofah Sponge and Its Application in Naproxen Removal. Catalysts 8(5): 176.
16. Liu, H., Duan, W.-D., De Souza, F. Z. R., Liu, L. Chen, B.S., 2018. Asymmetric Ketone Reduction by Immobilized Rhodotorula mucilaginosa. Catalysts 8(4): 165.