

بررسی فراوانی تولید آنزیم آلفا-آمیلاز در میکروارگانیسم‌های غربالگری شده از ایران وجدایه‌های باسیلوس مراکز کلکسیون میکروبی ایران نجمه گردنوشهری*

استادیار گروه پژوهشی بیوتکنولوژی صنعتی میکروارگانیسم‌ها، پژوهشکده بیوتکنولوژی صنعتی، سازمان جهاد دانشگاهی خراسان
رضوی، مشهد، ایران

*صندوق پستی ۱۳۷۶-۹۱۷۷۵، مشهد، ایران
gord.noshahri@jdm.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۴/۰۲/۳۱

دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۰۵

چکیده

آلفا-آمیلاز به عنوان آنزیم هیدرولیزکننده نشاسته، در صنایع غذایی و تولید اتانول و سوخت زیستی از اهمیت فراوانی برخوردار است. هدف از این پژوهش بررسی تولید آنزیم آلفا-آمیلاز در میکروارگانیسم‌های تولید کننده آنزیم آمیلاز از مناطق مختلف ایران و مراکز کلکسیون میکروبی ایران می باشد. از بین ۳۳۱ جدایه غربالگری شده، تعداد ۱۸۳ جدایه دارای فعالیت آمیلازی بودند. دو سویه جداسازی شده از خاک کشاورزی با نام AGR228 و AGR91 دارای حداکثر نسبت سطح هاله به کلنی بودند. همچنین، همه‌ی سویه متعلق به مراکز کلکسیون میکروبی، فعالیت آمیلازی نشان دادند که از آن بین دو سویه PTCC- 1732 و PTCC- 1156 بالاترین فعالیت را نشان دادند. میزان آمیلاز تولیدی در PTCC- 1732 و AGR228 به ترتیب ۲۰/۵ و ۱۱/۱۸ واحد در میلی لیتر برآورد شد. بیشینه فعالیت آنزیم آمیلاز از باکتری PTCC-1732 در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد و pH برابر با ۱۰ می باشد. در مورد جدایه AGR228 حداکثر فعالیت در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد و pH برابر با ۸ اندازه گیری شد.

کلید واژگان: آلفا-آمیلاز، تجزیه نشاسته، غربالگری، باسیلوس، تریپان بلو

۱- مقدمه

با افزایش جمعیت و افزایش سطح زندگی و رفاه عمومی اهمیت تولید آنزیم‌ها روز به روز افزایش می‌یابد. آنزیم‌ها مصارف گسترده‌ای در صنایع غذایی، دارویی و بهداشتی دارند. طبق آمار اندازه بازار جهانی آنزیم‌های صنعتی تا ماه مارس سال ۲۰۲۴ حدوداً ۱/۷۶ میلیارد دلار بوده است. پیش‌بینی می‌شود با نرخ رشد مرکب (CAGR) برابر با ۵/۲ درصد به درآمد ۲/۹ میلیارد دلاری تا سال ۲۰۳۴ می‌رسد. اکنون آنزیم‌ها در زمینه‌های مختلف مانند غذا، خوراک، مواد شوینده، منسوجات، لباسشویی، دباغی و همچنین صنایع دارویی، آرایشی و مواد شیمیایی استفاده می‌شوند. کاربری صنعتی بیش از ۸۰ درصد از بازار آنزیم‌ها را تشکیل می‌دهند [۱]. که آنزیم آمیلاز ۲۵ الی ۳۰ درصد از این بازار را شامل می‌شود [۲]. در بین آمیلازها؛ آلفا- آمیلازها (EC 3.2.1.1) یکی از محبوب‌ترین و مهم‌ترین نوع آمیلازهای صنعتی هستند که در صنایع تولید اتانول، مواد شوینده و مواد غذایی کاربری دارند. با ظهور مرزهای جدید در بیوتکنولوژی، طیف کاربردهای آمیلاز در بسیاری از زمینه‌های جدید مانند شیمی بالینی، دارویی گسترش یافته است [۳]. آلفا- آمیلازها هیدرولیز پیوند داخلی آلفا-۱-۴- گلیکوزیدی را در نشاسته و سایر الیگوساکاریدها انجام می‌دهد. در واقع از نوع اندوآمیلازها هستند که هیدرولیز اولیه نشاسته به الیگوساکاریدهای کوتاه‌تر را از طریق شکست پیوندهای آلفا-۱ و ۴ گلیکوزیدی کاتالیز می‌کنند [۴].

تکنولوژی هیدرولیز نشاسته یکی از کاربردهای مهم آنزیم آلفا- آمیلاز می‌باشد. نشاسته یکی از اجزای مهم رژیم غذایی انسان است. بنابراین، فراورده‌های حاصل از آن پس از طی فرایند هیدرولیز شیمیایی و آنزیمی در صنایع غذایی مانند مشتقات شربت گلوکز، فروکتوز و مالتودکسترین یا سیکلودکسترین استفاده می‌شود. نشاسته در خصوصیات بافتی بسیاری از غذاها کاربرد دارد و به

طور گسترده در صنایع غلظت دهنده‌ها، پایدارکننده‌های کلوئیدی، عوامل ژل کننده و نگهدارنده آب بکار می‌رود [۵].

آلفا- آمیلاز می‌تواند از گونه‌های مختلف قارچ‌ها و باکتری‌ها تولید شود اما تاکنون آلفا- آمیلاز با کاربرد تجاری عموماً از جنس باسیلوس جداسازی شده است. در میان باکتری‌ها، *Bacillus sp.* به طور گسترده ای برای تولید آلفا- آمیلاز برای تأمین نیازهای صنعتی استفاده می‌شود. *B. subtilis*، *B. stearothermophilus*، *B. licheniformis* و *B. amyloliquefaciens* به عنوان تولیدکنندگان خوب آلفا- آمیلاز شناخته شده‌اند و به طور گسترده‌ای برای تولید تجاری آنزیم برای کاربردهای مختلف مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۶]. از آنجائی‌که فرایند آنزیمی مایع‌سازی نشاسته در دمای بالا (۸۰ تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد) انجام می‌شود. آنزیم آمیلاز با پایداری حرارتی برای بهبود فرایند تجزیه نشاسته و برای تولید محصولات مانند گلوکز، دکستروز کریستالی، شربت دکستروز، مالتوز و مالتودکسترین بسیار کاربرد دارد [۵].

اکثر کارهای مطالعاتی روی شناسایی میکروارگانیسم‌های مولد آنزیم آمیلاز با گزینش آن‌ها بر روی محیط کشت حداقل حاوی نشاسته و رنگ آمیزی بعدی با ید همراه بوده است. این روش موفقیت مناسبی برای گزینش سویه های مولد آمیلاز دارد، زیرا میکروارگانیسمی می‌تواند روی این بستر رشد کند که توانایی تولید آمیلاز برای شکستن نشاسته به قندهای ساده‌تر و تأمین کربن مورد نیاز برای رشد خود را داشته باشد [۳]. پس از رشد باکتری‌ها در محیط آگاردار حاوی نشاسته، از محلول ید جهت بررسی تجزیه نشاسته در اطراف کلنی‌های رشد یافته استفاده می‌شود. از آنجائی‌که ترکیبات ید دار به عنوان مهار کننده باکتری هستند، استفاده از آنها در محیط کشت امکان پذیر نمی‌باشد [۷]. تریپان بلو (Trypan Blue) به عنوان یک ترکیب بی ضرر با نشاسته کمپلکس تشکیل

طرح مبنی بر استفاده از آنزیم در صنعت غذا، باکتری های مورد استفاده ایمن (GRAC) هستند. سویه های تهیه شده به صورت آمپول لیوفیلیز شده از IBRC (مرکز ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران)، PTCC (مرکز کلکسیون میکروبی ایران) شامل:

Bacillus halosaccharovorans (IBRC -M10095), *Bacillus licheniformis* (IBRC- M10204), *Bacillus spizizenii* (PTCC- 1023), *Bacillus licheniformis* (PTCC- 1595), *Bacillus cereus* (IBRC- 10796), *Bacillus subtilus* subsp. *Spizizienii* (IBRC- 10808), *Bacillus subtilis* subsp. *Subtilis* (IBRC- 10997), *Bacillus licheniformis* (IBRC- 11172), *Bacillus amyloliquefaciens* (PTCC- 1156), *Bacillus amyloliquefaciens* (PTCC- 1732), *Bacillus licheniformis* (PTCC- 1320), *Bacillus subtilis* subsp. *Subtilis* (PTCC- 1795), *Geobacillus stearothermophilus* (PTCC- 1713), *Bacillus licheniformis* (PTCC- 1721), *Bacillus spizizenii* (PTCC- 1023)

میکروارگانسیم ها به محیط کشت نوترین برات استریل شامل گرم در لیت: گلوکز ۵، عصاره مخمر ۵، تریپتون ۱۲ و نمک NaCl ۵ با pH برابر با ۷ اضافه شد و گرمخانه گذاری در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد انجام شد. در مورد باکتری *Geobacillus stearothermophilus* (PTCC- 1713) دمای گرمخانه گذاری ۵۰ درجه سانتی گراد در نظر گرفته شد.

۲-۲ جداسازی میکروارگانسیم از محیط

۲-۲-۱ نمونه گیری

نمونه گیری از مکان هایی انجام شد که یکی از موارد پتانسیل های دمای بالا یا وجود نشاسته در محیط را داشته باشند. بر این اساس نمونه گیری از مکان های خاک مزارع تحت کشت محصولاتی مانند گندم، ذرت و سیب زمینی، چشمه آبگرم، خاک مناطق گرمسیری، فاضلاب کارخانه تولید گلوکز از نشاسته و فاضلاب کارخانه تولید چیپس انجام شد. کلیه نمونه گیری ها در فصل پاییز و زمستان انجام گرفته و pH و دمای نمونه ثبت شد.

۲-۲-۲ غربالگری

داده و در شناسایی باکتری های تولید کننده آلفا-آمیلاز به عنوان روش جدید معرفی شده است. در این روش ناحیه روشن در اطراف کلنی ایجاد می شود [۸، ۹]. نتایج پژوهش ها نشان داده است که ایران به دلیل طبیعت متنوع حاوی میکروارگانسیم ها با ویژگی خاص است [۱۰، ۱۱]. غربالگری آنزیم های تولید کننده آمیلاز از مناطق مختلف ایران مانند خاک [۱۲]، چشمه های آبگرم [۱۳-۱۶]، کویر لوت [۱۷]، دریاچه [۱۸]، جنگل های حرا و مانگرو [۱۶]، [۱۹] انجام شده است. اما پژوهشی در ارتباط با غربالگری از پساب ها و پسماندهای حاوی نشاسته در ایران انجام نشده است.

پژوهش ها نشان می دهد که پسماندهای حاوی نشاسته مانند زباله های آشپزخانه مکان مناسبی جهت غربالگری میکروارگانسیم های تولید کننده آلفا-آمیلاز است [۲۰]. همچنین، گزاری از غربالگری هدفمند آنزیم آمیلاز از مراکز کلکسیون میکروبی ایران موجود نمی باشد.

هدف از این پژوهش، بررسی فراوانی باکتری های تولید کننده آنزیم آلفا-آمیلاز در باسیلوس های موجود در مراکز کلکسیون میکروبی ایران و مناطق با پتانسیل بالای حضور میکروارگانسیم های مولد آنزیم آلفا-آمیلاز مانند زمین های کشاورزی، چشمه های آبگرم، پساب کارخانه های تولید گلوکز از نشاسته و تولید چیپس می باشد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱ تهیه مواد آزمایشگاهی و میکروارگانسیم ها

پودر گلوکز، عصاره مخمر، سدیم کلرید و پودر تریپتون از شرکت Liofilchem، ایتالیا تهیه شد. سایر نمک ها و حلال ها از شرکت سیگما-آلدریچ خریداری شد. تهیه سویه ها از مرکز کلکسیون میکروبی ایران (PTCC) و مرکز ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران (IBRC) انجام شد. با توجه به اهمیت سویه های متعلق به جنس باسیلوس در تولید آنزیم های صنعتی، کلیه سویه های خریداری شده متعلق به جنس باسیلوس است. از طرفی با توجه به هدف

فرایند غربالگری با استفاده از محیط کشت حاوی نشاسته در دو مرحله غنی سازی و جداسازی انجام شد. محیط کشت قبل از استفاده در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل شد.

مرحله غنی سازی: برای افزایش تعداد میکروارگانیسم تولیدکننده آنزیم آمیلاز، یک گرم نمونه جامد و یا یک میلی لیتر نمونه مایع به محیط کشت غربالگری مایع اضافه شد. این محیط کشت حاوی نشاسته ۱ درصد، تریپتون ۱/۲ درصد، کلرید سدیم ۰/۵ درصد و عصاره مخمر ۰/۵ درصد و pH برابر با ۵/۵ می باشد. محیط کشت در دو دمای ۳۵ و ۵۰ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری و با دور ۱۵۰ دور بر دقیقه به مدت یک هفته گرمخانه گذاری و همزده شد. برای جلوگیری از تبخیر محیط کشت، ظرف آب در انکوباتور قرار داده شد.

مرحله جداسازی: پس از گذشت یک هفته، میزان ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه های مرحله غنی سازی بر روی پلیت های دارای محیط کشت غربالگری جامد حاوی آگار ۱۵ گرم در لیتر منتقل و پخش شد. پلیت ها در دمای ۳۵ و ۵۰ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری و رشد کلنی ها روزانه بررسی شد. پس از مشاهده رشد در پلیت، کلنی هایی که از نظر شکل ظاهری، سایز و رنگ متفاوت بودند به پلیت جدید منتقل شده تا از آن کشت خالص تهیه شد.

۲-۳- سنجش کیفی فعالیت آمیلازی

میکروارگانیسم های مراکز کلکسیون و جدایه های غربالگری شده به پلیت های محیط کشت حداقلی با استفاده از خلال دندان استریل منتقل شدند. برای تهیه محیط کشت حداقلی در یک لیتر بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی مولار، نشاسته ۱۰ گرم، سولفات آمونیوم ۳ گرم، فسفات آمونیوم ۱ گرم، سدیم کلرید ۵ گرم، سولفات منیزیم ۱ گرم، اسید بوریک ۰/۰۲ میلی گرم، کلرید کلسیم ۰/۲ میلی مولار، سولفات منگنز ۰/۱ میلی گرم، سولفات مس ۰/۱ میلی گرم، سولفات نیکل ۰/۱ میلی گرم، سدیم

مولیدات ۲ میلی گرم، کلرید کوبالت ۰/۰۵ میلی گرم، کلرید روی ۰/۱ میلی گرم، سولفات آهن ۴ میلی گرم و آگار ۱۵ گرم اضافه شده و پس از تنظیم pH برابر با ۵/۵ اتوکلاو شد. رنگ تریپان بلو (۲۰ میلی گرم در لیتر) در ۲۰ میلی لیتر آب مقطر حل شده و با استفاده از فیلتر سرسنگی استریل شد و پس از اتوکلاو به محیط کشت اضافه شد. حضور رنگ تریپان بلو در محیط کشت باعث مشاهده هاله فعالیت آنزیم در حین فرایند رشد میکروارگانیسم بدون اثر مهارری روی آنها می شود (تریپان بلو به پلیمر نشاسته متصل می شود).

پلیت ها در دماهای ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری شدند. در ادامه پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت از انکوباسیون از پلیت ها عکس برداری و فرایند توسعه هاله در اطراف کلنی ها با عکس برداری رصد شد. جدایه هایی که دارای هاله اطراف کلنی هستند انتخاب شده و قطر هاله هر کلنی اندازه گیری و توسط نرم افزار Digimizer آنالیز شد. در مورد باکتری *Geobacillus stearothermophilus* از مرکز کلکسیون میکروبی دمای گرمخانه گذاری ۵۰ درجه سانتی گراد در نظر گرفته شد. سپس، از نرم افزار R برای آنالیز، تجزیه و تحلیل های آماری و ترسیم نمودارها استفاده شد.

۲-۴ بررسی میکروسکوپی

جدایه هایی که دارای قطر هاله حداقل ۲۰ میلی متر بودند برای بررسی میکروسکوپی و رنگ آمیزی گرم انتخاب شدند. برای این کار، یک کلنی از باکتری به سه میلی لیتر محیط کشت نوترین براث منتقل شد. سپس، یک قطره روی لام میکروسکوپی قرار گرفته و در مجاورت هوا خشک شد و با حرارت تثبیت شد. سپس، تحت رنگ آمیزی به روش گرم قرار گرفت [۲۱]. لام تهیه شده با میکروسکوپ نوری بررسی شد.

۲-۵ سنجش کمی و بررسی تاثیر دما و pH روی

فعالیت آنزیم

۳-۱ جداسازی میکروارگانیسم‌ها

۳-۱-۱ نمونه‌گیری

نمونه‌گیری از مناطق زیر انجام شد. pH، دمای محیط و تعداد جدایه‌های غربالگری شده در جدول ۲ ثبت شده است.

۱- خاک مزارع کشاورزی: مزرعه کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد در نزدیکی شهر مشهد واقع شده است. خاک این منطقه به دلیل کشاورزی بلند مدت (بیشتر از ۸۰ سال) محصولات گندم و ذرت می‌تواند غنی از باکتری‌های تجزیه کننده نشاسته باشد. همچنین، از خاک

گلخانه کشت سیب‌زمینی نیز نمونه‌گیری انجام شد.

۲- آب مناطق گرمسیر: چشمه‌های آبگرم و آب دریای جنوب می‌توانند مکان‌های مناسبی برای جداسازی باکتری‌های گرمادوست باشند. نمونه‌گیری از آب چشمه آبگرم سرعین، فردوس و دیگ رستم انجام شد. همچنین، از آب دریای بندرعباس و جزیره هنگام نمونه‌گیری شد.

۳- خاک مناطق گرمسیر: خاک مناطق گرمسیر، مانند جزیره‌های هنگام و هرمز نیز به عنوان محلی برای جداسازی باکتری‌های گرمادوست نمونه‌گیری شد.

۴- پساب کارخانه تولیدی مرتبط با نشاسته: پساب کارخانه تولید چپس به دلیل شستشوی سیب‌زمینی که حاوی نشاسته است دارای پتانسیل جداسازی باکتری‌های تولید کننده آنزیم آمیلاز می‌باشند. همچنین، پساب کارخانه تولید کننده گلوکز نیز به دلیل استفاده از نشاسته به عنوان ماده اولیه پتانسیل بالایی در القای تولید آمیلاز در باکتری‌ها دارند.

۳-۱-۲ غربالگری و جداسازی میکروارگانیسم‌ها

تمام نمونه‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت غربالگری رشد نشان دادند. به استثنای نمونه‌های خاک جزیره هنگام (HES) و چشمه آب گرم سرعین (SER) که در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد رشد داشتند. باقی نمونه‌ها در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد رشدی نشان ندادند.

جدایه‌های منتخب از نظر قطر هاله، در محیط کشت مایع حداقلی و دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد رشد داده شدند. سپس، سوپرناتانت محیط کشت پس از جداسازی با استفاده از سانتریفیوژ ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه آنالیز شد. برای بررسی دمای بهینه، مایع رویی محیط کشت به ۱۰۰ میکرولیتر نشاسته محلول ۱ درصد در بافر فسفات pH برابر با ۶/۹ اضافه شده و در دماهای ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری انجام شد. هر واکنش در سه تکرار انجام شد.

برای بررسی pH بهینه، میزان ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی محیط کشت به ۱۰۰ میکرولیتر نشاسته محلول ۱ درصد آماده شده در بافرهای Glycine-HCl، Glycine-NaOH، Tris-HCl، Citrate-Sodium Citrate، Phosphate-Citrate، KH₂PO₄-NaOH اضافه شده و در دماهای ۸۰ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به ترتیب برای باکتری‌های PTCC-1732 و AGR228 به مدت ۱۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری انجام شد. هر واکنش در سه تکرار انجام شد.

برای بررسی میزان واحد تولیدی آنزیم از روش DNS استفاده شد [۲۲]. جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر به وسیله دستگاه BioTek Epoch Microplate اندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد با استفاده از غلظت‌های مختلف قند مالتوز رسم شد. هر واحد آنزیم برابر با میکرومولار مالتوز تولیدی در واحد دقیقه می‌باشد.

۳- نتایج

در این پژوهش مقایسه فعالیت آلفا-آمیلازی در بین جدایه‌های مرکز کلکسیون میکروبی ایران و غربالگری شده از ایران انجام شد. همه‌ی باکتری‌های تهیه شده از مراکز کلکسیون میکروبی در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد رشد کردند، به جزء *Geobacillus stearothermophilus* که در ۵۰ درجه سانتی‌گراد رشد نشان داد.

جدول ۱ جداسازی میکروارگانیسم‌ها

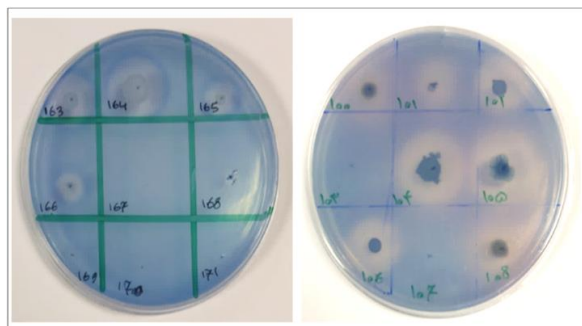
مکان نمونه‌گیری	اسم اختصار باکتری	pH	دما (°C)	تعداد سویه	سویه‌ها با فعالیت آمیلازی
خاک کشاورزی و گلخانه	AGR	۷/۵	۲۵	۳۱۳	۱۶۷
خاک هنگام	HES	۸/۹	۲۵	۲	۲
خاک هرمز	HOS	۸/۹	۲۵	۰	۰
آب دریای بندر عباس	ABS	۷/۰	۳۵	۰	۰
آب چشمه سرعین	SER	۶/۳	۴۲	۴	۴
آب چشمه فردوس	FER	۷/۴۱	۴۸	۲	۲
آب چشمه دیگ رستم	ROS	۷/۵	۵۰	۲	۲
پساب کارخانه تولیدی چیپس	Tapis	۶/۵	۳۰	۴	۲
پساب کارخانه تولیدی گلوکز	GNE	۳/۶	۳۰	۴	۴
تعداد کل جدایه های غربالگری شده				۳۳۱	۱۸۳

غربالگری حاوی نشاسته به منظور بررسی توانایی تولید آنزیم آمیلاز نشان داد که ۲۴ ساعت پس از کشت سویه‌ها رشد کلنی‌ها و همچنین شکل‌گیری هاله در اطراف آنها بیانگر فعالیت آمیلازی در ۱۸۳ سویه جداسازی می‌باشد. ۱۶۷ سویه متعلق به جدایه‌های غربالگری شده از خاک کشاورزی (شکل ۱) و مابقی از سایر مناطق می‌باشند. در اطراف کلنی‌های حاوی آمیلاز، به دلیل شکست نشاسته توسط آنزیم آمیلاز، هاله شفاف ایجاد می‌شود. همچنین، همه‌ی سویه‌های باسیلوس تهیه شده از مراکز کلکسیون نیز فعالیت آمیلازی را با میزان متفاوت نشان دادند (شکل ۲). مساحت هاله شفاف اطراف کلنی‌ها از ۰/۰۰۱ تا ۱۶/۸۲ سانتی‌متر مربع متغیر بود.

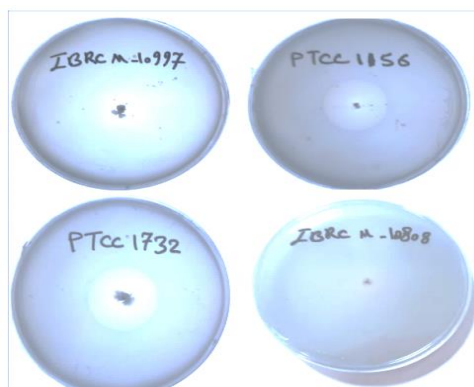
پس از انتقال نمونه‌های رشد یافته به پلیت حاوی محیط کشت غربالگری، تعداد ۳۳۱ جدایه جداسازی شد (جدول ۱). در مورد محیط‌های رشد یافته از نمونه‌های خاک هرمز و آب دریای بندرعباس به پلیت‌های حداقلی رشدی از باکتری مشاهده نشد. این امر می‌تواند به دلیل عدم توانایی باکتری در استفاده از نشاسته به عنوان منبع کربن باشد. این در حالی است که محیط کشت اولیه (غربالگری) به دلیل داشتن عصاره مخمر و پپتون یک محیط غنی برای رشد باکتری بوده است.

۲-۳ ارزیابی کیفی فعالیت آمیلازی

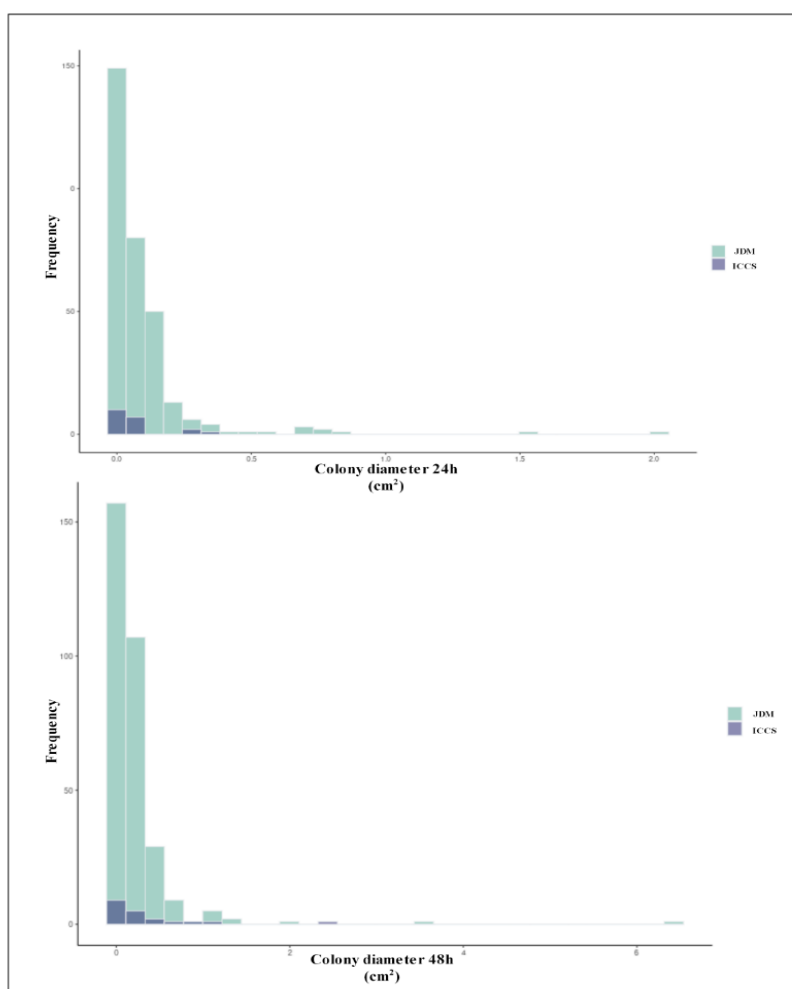
بررسی کشت سویه‌های میکروارگانیسم‌های مراکز کلکسیون (ICCs) و غربالگری شده (JDM) روی محیط کشت



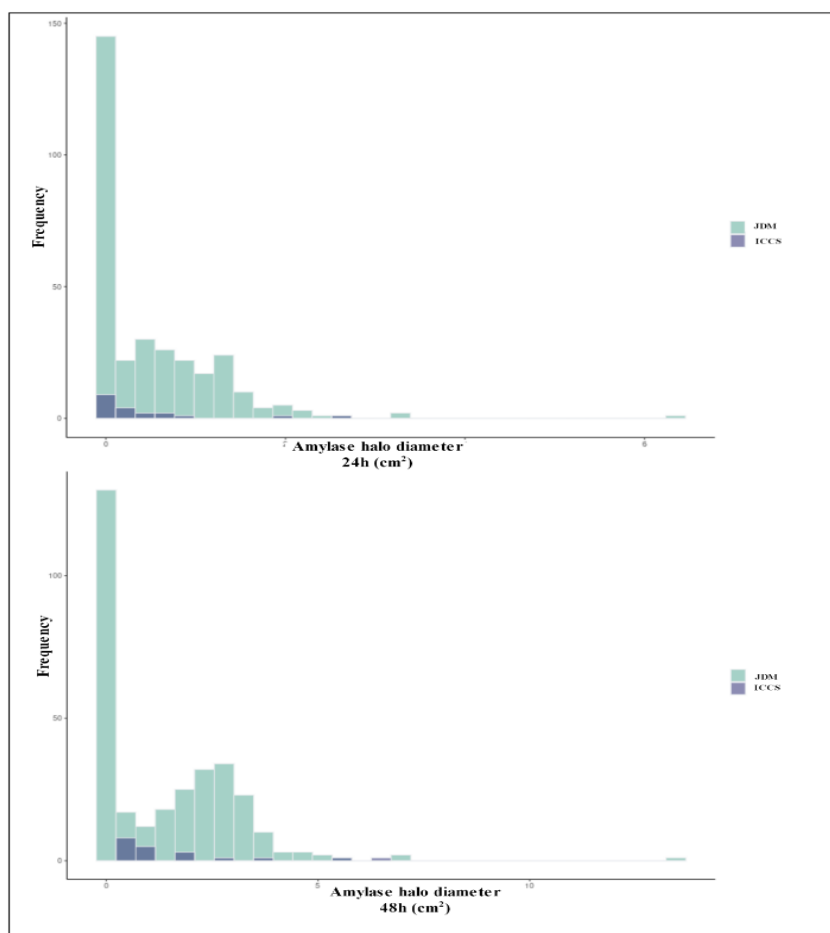
شکل ۱ رشد سویه‌ها و تولید هاله در سویه‌های غربالگری شده از خاک کشاورزی روی محیط کشت حاوی تریپان بلو



شکل ۲ رشد سویه‌ها و تولید هاله در سویه‌های باسیلوس متعلق به مراکز کلکسیون میکروبی روی محیط کشت حاوی تریپان بلو



شکل ۳ نمودار فراوانی توانایی سویه‌ها برای تولید آمیلاز براساس شاخص سطح کلنی ۲۴ و ۴۸ ساعت در سویه‌های مراکز کلکسیون (ICCS) و غربالگری شده در جهاد دانشگاهی مشهد (JDM)

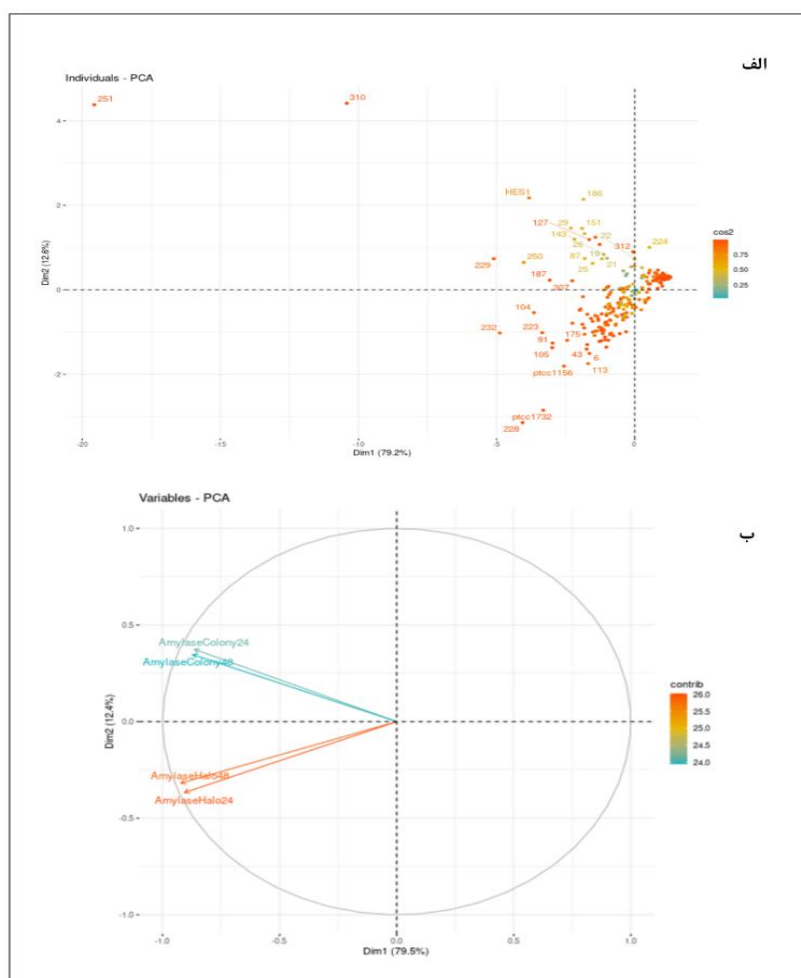


شکل ۴ نمودار فراوانی توانایی سویه‌ها برای تولید آمیلاز براساس شاخص سطح هاله در ۲۴ و ۴۸ ساعت در سویه‌های مراکز کلکسیون (JDM) و غربالگری شده در جهاد دانشگاهی مشهد (ICCs)

AGR251 (ایزوله خاک مزارع کشاورزی) مشاهده شد. در بین میکروارگانیسم‌های مراکز کلکسیون (ICCs) و غربالگری شده (JDM)، سویه‌های که دارای مساحت هاله و کلنی بیشتر از ۵ سانتی‌متر هستند، دارای فراوانی کمتر هستند (شکل ۴). آنالیز تجزیه به مولفه‌های اصلی (PCA)^۱ روی داده‌های به‌دست آمده از رشد کلنی‌ها و تولید هاله در دو آزمون ارزیابی فعالیت آمیلازی به خوبی سویه‌ها را از یکدیگر تفکیک کرد (شکل ۵). نتایج این آنالیز در بعد اول که ۶۰ درصد تغییرات را توضیح می‌داد سویه‌ها را بر اساس توانایی تولید آمیلاز تفکیک کرد.

بررسی پراکنده‌گی سویه‌ها از نظر توانایی تولید کلنی و هاله در محیط حداقل دارای نشاسته نشان داد که در بین سویه‌ها از این نظر تنوع وجود دارد. با وجودی که در علم آمار جوامع معمولاً توزیع نرمال دارد. نمودار فراوانی نشان داد که از نظر توانایی ایجاد کلنی و رشد آن و چه از نظر هاله، جامعه مورد بررسی ما نرمال نیست و میانگین جامعه به سمت صفر چولگی دارد (شکل ۳ و ۴). در بین سویه های مورد مطالعه پس از ۲۴ ساعت متوسط سطح کلنی ایجاد شده ۰/۲۴ سانتیمتر مربع و متوسط هاله ایجاد شده ۱/۴۰ سانتیمتر مربع بود. بیشترین رشد کلنی با سطح شش سانتیمتر مربع و هاله سیزده سانتیمتر مربع در سویه شماره

^۱ Principal Component Analysis



شکل ۵ الف) نمودار تجزیه به مولفه‌های اصلی (PCA) روی داده‌های حاصل از آزمایش فعالیت آمیلازی در سویه‌های مورد مطالعه. ب) آنالیز تجزیه به مولفه‌های اصلی (PCA)

جدول ۲ جدایه‌های منتخب تولید کننده آمیلاز

ردیف	سویه	نسبت سطح هاله به سطح کلنی
۱	AGR228	۱۶/۸۲
۲	PTCC-1732	۱۶/۶۲
۳	AGR91	۱۱/۰۸
۴	PTCC-1156	۸/۵۲

۳-۳- بررسی میکروسکوپی

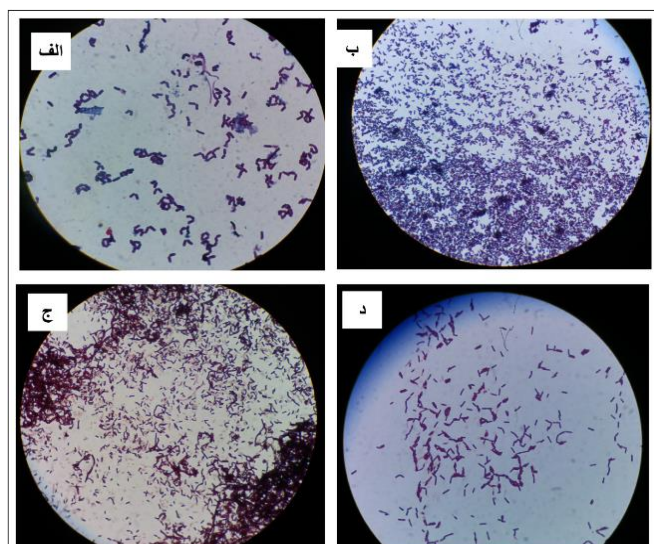
نتایج بررسی میکروسکوپی جدایه‌های منتخب جدول ۴ نشان داد که باکتری‌های غربالگری شده از نظر شکل باسیل و گرم مثبت می‌باشند. که در شکل ۶ نشان داده شده است. میزان آنزیم آمیلاز پس از ۲۴ ساعت در مورد باکتری‌های PTCC-1732 و AGR228 به ترتیب برابر با ۲۰/۵ و ۱۱/۱۸ محاسبه شد. نتایج آزمایشات بررسی دمایی فعالیت آمیلازی در جدایه‌های PTCC-1732 و AGR228 با DNS نشان داد که جدایه PTCC-1732 حداکثر فعالیت آمیلازی در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد دارد. با افزایش دما به ۹۰ و ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به ترتیب فعالیت نسبی آمیلازی به ۹۷ و ۷۳ درصد فعالیت اولیه کاهش یافت (شکل الف ۷). با توجه به فعالیت آنزیم آمیلاز در دمای بالا، آنزیم ترموفیل می‌باشد. در مورد جدایه AGR228 دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد حداکثر فعالیت آنزیمی دارد. و آنزیم با ۹۰ درصد آمیلازی اولیه در سایر دماها فعال می‌باشد (شکل ب ۷).

به نحوی که در شکل ۵ (الف) در بعد اول نمودار هر چه از سمت راست نمودار به سمت چپ نمودار حرکت می‌کنیم بر توانایی تولید آنزیم توسط سویه افزوده می‌شود.

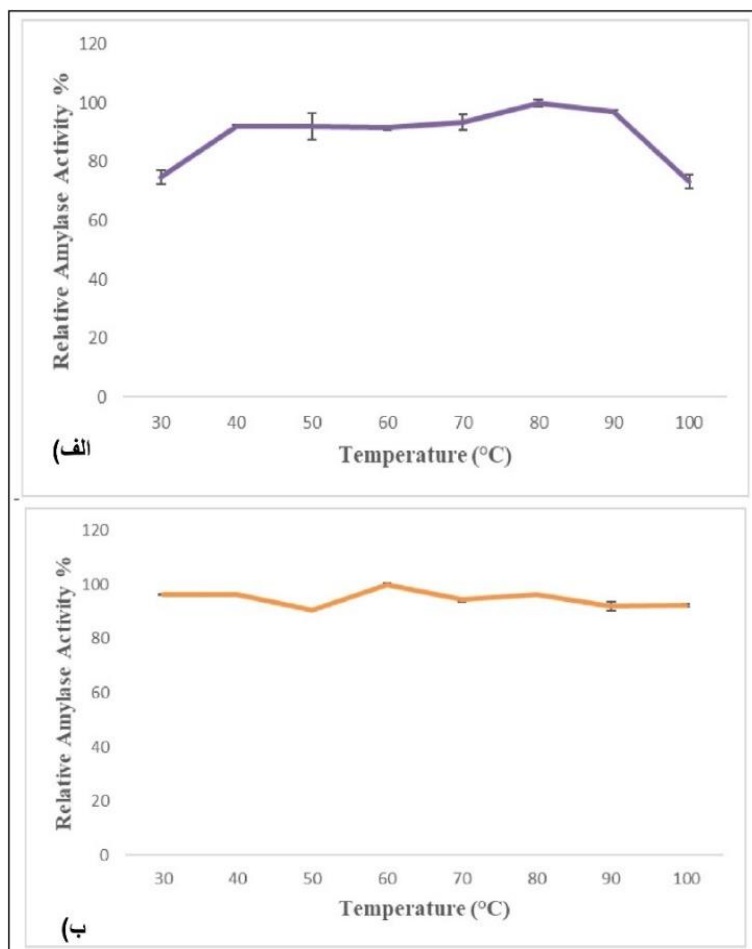
در بعد دوم نیز که ۲۲ درصد از تغییرات را توضیح می‌داد سویه‌ها بر اساس فعالیت آمیلازی از هم تفکیک شدند. به نحوی که در قسمت بالای نمودار سویه‌های باکتری بزرگتر قرار گرفتند. بر این اساس، به ترتیب سویه‌های AGR251، AGR232، AGR250، HES1، AGR310، ATCC-6051 و AGR229 دارای بیشترین سطح کلنی هستند.

در قسمت پایین نمودار (شکل ۵ ب)، از نظر سطح هاله به کلنی بالاترین نسبت متعلق به باکتری‌های PTCC-1732 و AGR228 می‌باشد. بر این اساس، ۲ سویه (AGR228 و PTCC-1732) با بالاترین نسبت میزان فعالیت آنزیمی بر سطح کلنی برای بررسی کمی آنزیم آمیلاز انتخاب شد (جدول ۲).

دو سویه PTCC-1732 و PTCC-1156 از مرکز کلکسیون میکروبی تهیه شد و هردو متعلق به گونه *Bacillus amyloliquefaciens* می‌باشند.



شکل ۶ بررسی میکروسکوپی جدایه‌های منتخب با بزرگ نمایی ۱۰۰۰×. الف) جدایه AGR228. ب) جدایه PTCC-1732. ج) جدایه PTCC-1156. د) جدایه AGR91.

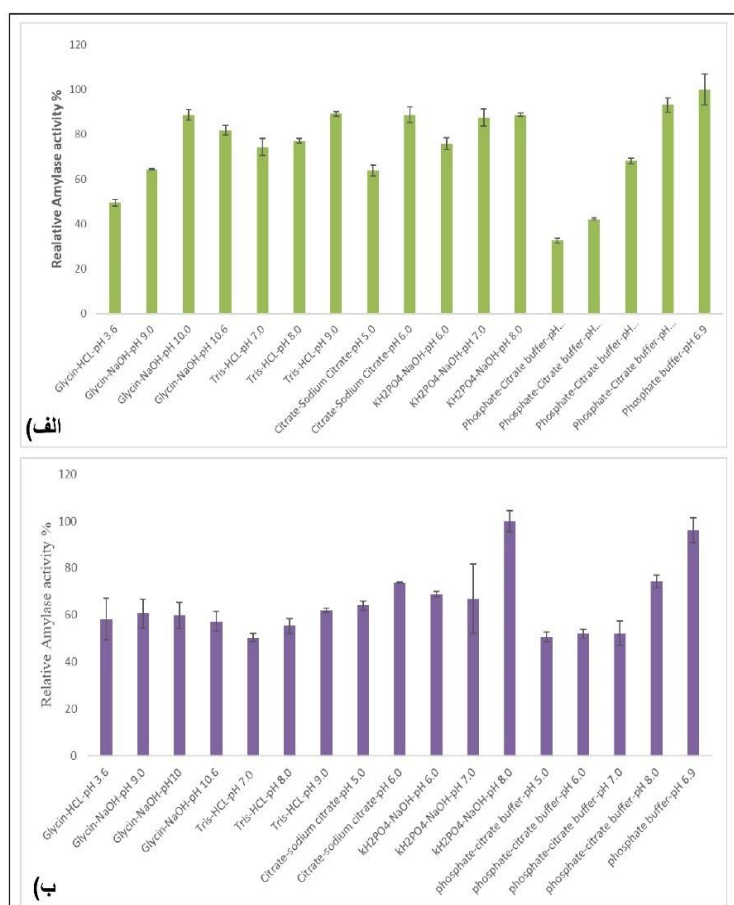


شکل ۷ بررسی دمای بهینه فعالیت آنزیم آمیلاز (الف) سویه PTCC-1732 (ب) سویه AGR228

کمترین فعالیت آمیلازی مربوط با بافر اسیدی فسفات سیترات pH 5 ثبت شد (شکل الف ۸). در باکتری AGR228 حداکثر فعالیت آنزیمی را در بافر KH_2PO_4 (pH = 8) نشان داد. در بافر فسفات با pH برابر ۶/۹ حدود ۹۶ درصد از فعالیت نسبی حفظ شد. در سایر بافرهای مانند Phosphate Citrate (pH=8) و بافر Citrate Sodium citrate (pH=6) حدود ۷۰ درصد از فعالیت نسبی آمیلازی حفظ شد. در سایر بافرهای مورد استفاده ۵۰ الی ۶۰ درصد فعالیت آمیلازی نسبی حفظ شد (شکل ب ۸).

بررسی اثر بافرها در pH های متفاوت در محلول رویی محیط کشت در جدایه های PTCC- 1732 و AGR228 در شکل ۸ نشان داده شده است. بالاترین فعالیت آمیلازی سوپرناتانت محیط کشت باکتری PTCC- 1732 در بافر فسفات pH برابر ۶/۹ مشاهده شد. حدود ۹۳ درصد فعالیت آمیلازی در بافر Phosphate Citrate (pH= ۸) مشاهده شد.

پس از آن بافرهای Glycin-NaOH (pH=10)، Tris-HCl (pH=9)، Citrate sodium citrate (pH=6)، KH_2PO_4 (pH=8)، Phosphate Citrate buffer (pH=8، pH=7) با ۸۸ الی ۹۰ درصد، بالاترین فعالیت آمیلازی را نشان داد.



شکل ۸ بررسی اثر بافرهای متفاوت بر فعالیت آمیلازی (الف) سویه PTCC-1732، (ب) سویه AGR228

۴-بحث

آنزیم آمیلاز با پایداری حرارتی برای بهبود فرایند تجزیه نشاسته و برای تولید محصولاتی مانند گلوکز، دکستروز کریستالی، شربت دکستروز، مالتوز و مالتودکستریز بسیار کاربرد دارد [۲۳]. پژوهش حاضر با هدف غربالگری آنزیم آمیلاز در میکروارگانیسم‌های جداسازی شده از مناطق مختلف ایران و دو مرکز کلکسیون میکروبی ایران به نام مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران (IBRC) و مرکز کلکسیون میکروبی ایران (PTCC) انجام شد.

در مطالعه حاضر تعداد ۳۳۱ جدایه غربالگری اولیه شد که فقط ۱۸۳ جدایه فعالیت آمیلازی روی پلیت حداقلی نشان دادند. برای غربالگری از محیط کشت شامل نمک‌های

معدنی، نشاسته به عنوان منبع کربن، پیتون و عصاره مخمر به عنوان تنها منبع نیتروژن استفاده شد. جدایه‌هایی تولید کننده آنزیم آمیلاز با قابلیت استفاده از نشاسته به عنوان منبع کربن قادر به رشد در محیط کشت مذکور هستند. همچنین، با توجه به حضور عصاره مخمر و پیتون در محیط کشت سایر باکتری‌ها نیز رشد نشان دادند. به همین جهت پس از انتقال سویه‌ها به پلیت حاوی محیط کشت حداقلی (حاوی نشاسته و نمک‌های معدنی به همراه منبع نیتروژن معدنی) از ۳۳۱ جدایه فقط ۱۸۳ جدایه رشد کردند.

نسبت قطر کلونی به قطر هاله بزرگتر از یک، به عنوان یک روش انتخاب سویه تولید کننده آنزیم آمیلاز توسط

Bajpai و همکاران در سال ۲۰۱۵ معرفی شد [۲۴]. در پژوهش حاضر از بین جدایه‌هایی که فعالیت آمیلازی بالا نشان دادند، جدایه AGR251 با مساحت حدود ۱۳ سانتی متر مربع حداکثر فعالیت آمیلازی را نشان داد. اما حدود نیمی از این مساحت را کلنی این باکتری تشکیل می‌دهد که نشان دهنده میزان بالای بیومس در نتیجه تولید بیشتر آمیلاز می‌باشد. به همین جهت جدایه‌ی AGR228 برای ادامه کار انتخاب شد که فعالیت آمیلازی بالا به همراه سطح کلنی کمتر داشته باشند. باکتری PTCC-1732 متعلق به مراکز کلکسیون‌ی نیز فعالیت آمیلازی بالایی نشان دادند که متعلق به گونه *Bacillus amyloliquefaciens* می‌باشند. این باکتری خاک‌زی بوده و یک باکتری کلونیزه شده در ریشه و به عنوان کنترل بیولوژیک بر علیه پاتوژن های ریشه گیاه می‌باشد [۲۵].

نکته قابل توجه درباره نتایج این پژوهش است که به نظر می‌رسد فراوانی توانایی تولید آمیلاز از سویه‌های خاک‌زی بسیار بالا است. که این فراوانی بالا امکان دسترسی به تنوعی از ساختارهای آنزیمی مختلف برای مطالعات و گزینش آنزیم‌هایی که قابلیت صنعتی داشته باشند را فراهم می‌کند. میکروارگانیسم‌های ساپروفیت خاک‌زی با توجه به اینکه منابع غذایی خود را از بقای گیاهی و جانوری به دست می‌آورند باید دارای آنزیم‌های تجزیه‌کننده و هیدرولیز کننده مناسب برای رشد در شرایط خاک باشند. از آنجایی که این میکروارگانیسم‌ها ناگزیر به تطبیق با ساختار محل زندگی خود هستند، بنابراین انتخاب محل نمونه‌گیری بر اساس خصوصیت آنزیمی که در صنعت مورد نیاز است می‌تواند بسیار موثر باشد.

انتخاب محل نمونه‌گیری در جداسازی سویه‌های آنزیم آمیلاز ترموفیل موثر می‌باشد. غربالگری از خاک کشور سودان به عنوان یک منطقه گرمسیر جغرافیایی منجر به جداسازی آلفا-آمیلاز با پایداری حرارتی از دو سویه

Bacillus cereus و *Bacillus licheniformis* به ترتیب در دمای ۵۰ و ۷۰ درجه سانتی‌گراد شد [۲۶].

همچنین، تحقیقات نشان می‌دهد که چشمه‌های آبگرم هم به عنوان یکی از منابع مناسب برای غربالگری آمیلاز با پایداری حرارتی است. غربالگری از چشمه آبگرم در مالزی منجر به جداسازی باکتری *Anoxybacillus flavithermus* با قابلیت تولید آلفا-آمیلاز پایدار در ۶۰ درجه سانتی‌گراد شد [۲۲]. تاکنون چشمه‌های آبگرم ایران تحت غربالگری حضور آنزیم آمیلاز قرار گرفته‌اند. در پژوهشی که در سال ۱۳۸۸ از منابع آب گرم سمنان انجام شد، نمونه گرمادوست باکتری *باسیلوس لیچینی فورمیس* با توانایی تولید آمیلاز با روش کیفی و کمی شناسایی شد [۲۷]. غربالگری جدایه‌های هالوفیل نیز از دریاچه حوض سلطان در استان فارس توسط فهیمی و همکاران (۱۳۹۲) انجام شد. از بین ۲۰۵ جدایه غربالگری شده، یک از جدایه‌ها فعالیت آنزیمی ۱۸ واحد بر میلی‌لیتر پس از ۴۸ ساعت از کشت میکروارگانیسم نشان داد. بهینه فعالیت آنزیم pH بین ۷ تا ۷/۵ و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد گزارش شد [۱۸]. در پژوهشی که توسط آقامعالی و همکاران (۱۳۹۳) انجام شد، آنزیم آمیلاز از چشمه آب گرم در مشکین شهر جداسازی و تعیین خصوصیات شد [۲۸]. فعالیت آمیلازی در رسوبات جنگل مانگرو خوزستان توسط کفیل‌زاده و همکاران (۱۳۹۴) بررسی شد. در این پژوهش باکتری‌های اکتینومیسست با فعالیت آمیلازی حدود ۶۰ واحد در میلی‌لیتر در دما ۴۰ درجه سانتی‌گراد شناسایی شدند [۱۶]. همچنین، جداسازی و خالص‌سازی آنزیم آلفا-آمیلاز با پایداری حرارتی از خاک ایران توسط رسولی و همکاران (۱۳۸۷) انجام شد. بهینه فعالیت آنزیم دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و pH برابر با ۷/۵ گزارش شد [۱۲].

صنایع وابسته به فراوری سیب‌زمینی نیز به عنوان مکان مناسب برای غربالگری باکتری‌های تولید کننده آنزیم

آمیلاز در پژوهشی در کشور هلند معرفی شدند [۲۹]. در این پژوهش نیز غربالگری از کارخانه های تولید چپس و گلوکز انجام شد و تعداد شش جدایه تولید کننده آنزیم آلفا آمیلاز جداسازی شد.

بررسی منابع نشان داد که آلفا- آمیلاز می تواند از گونه های مختلف میکروارگانیسم ها تولید شود اما تاکنون آلفا- آمیلاز با کاربرد تجاری عموماً از نوع باکتری های گرم مثبت و بیشتر از جنس باسیلوس جداسازی شده اند. بیشترین تولید جهانی آنزیم آلفا- آمیلاز تولید شده توسط باکتری *B.amyloliquefaciens* می باشد [۶]. میزان تولید آنزیم آمیلاز پس از بهینه سازی محیط کشت توسط سویه مذکور ۱۹۰۰۰ واحد در میلی لیتر گزارش شده است [۳۰]. نرخ هیدرولیز نشاسته توسط آلفا- آمیلاز، وابسته به شرایطی مثل دما، pH، منشا و غلظت سوبسترا، غلظت آنزیم، وجود یا عدم وجود یون کلسیم و دیگر عوامل پایدار کننده آنزیم است. در این پژوهش، اثر دما، pH و منابع مختلف نشاسته بر میزان فعالیت آنزیم بررسی شد. نتایج نشان داد که بیشینه فعالیت آنزیم آمیلاز از باکتری PTCC-1732 در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد، pH برابر با ۱۰ در بافرهای Glycin-NaOH می باشد. این آنزیم ۹۰ درصد فعالیت خود را در pH برابر با ۱۰ حفظ می کند. در مورد جدایه AGR228 حداکثر فعالیت در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد، pH برابر با ۸ در بافر KH_2PO_4 اندازه گیری شد. هر دو سویه بیشینه فعالیت را در pH قلیایی نشان دادند. در آمیلازهای قارچی به طور معمول در pH اسیدی بیشترین فعالیت را دارند [۳۱].

در پژوهشی دیگر که توسط Nureddin Yassin و همکاران (۲۰۲۱) از نمونه گیری خاک اتیوپی انجام شد. جدایه هایی از جنس باسیلوس با فعالیت آمیلازی حدود ۰/۷ واحد در میلی لیتر شناسایی شدند. آنزیم آمیلاز یکی از جدایه ها به نام M13 با حداکثر فعالیت در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد با باقیمانده ۸۰ درصد از فعالیت پس از

انکوباسیون به مدت یک ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد گزارش شد. قطر هاله شفاف حاصل از فعالیت آمیلازی روی پلیت حاوی نشاسته بعد از ۲ روز گرمخانه گذاری در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد، در جدایه های مختلف بین ۱/۱ تا ۵/۹ میلی متر اندازه گیری شد. همچنین، فعالیت آنزیم در حضور کلسیم افزایش یافت [۳].

سنجش کمی اولیه میزان آنزیم آمیلاز ترشحي در محیط کشت حاوی نشاسته با روش DNS نشان داد که در مورد باکتری های PTCC- 1732 و AGR228 به ترتیب برابر با ۴۲ و ۱۱/۱۸ واحد در هر میلی لیتر اندازه گیری شد. به نظر می رسد این شیوه کارایی مناسبی برای گزینش سویه ترشح کننده آنزیم آلفا- آمیلاز دارد. اگرچه آزمایشات کمی نشان داد که برای استفاده از آنزیم در صنعت نیاز به افزایش واحد آنزیم در میلی لیتر می باشد. بررسی منابع اخیر نشان می دهد که عموماً کشورهای هند، چین، پاکستان و آفریقا پژوهش در زمینه تولید آنزیم آمیلاز انجام می دهند که آنزیم آلفا- آمیلاز تولیدی توسط باکتری ها از ۱ واحد تا ۲۶،۰۰۰ واحد در میلی لیتر متغیر است [۳۲-۳۶]. اما بررسی صنایع تولید کننده آنزیم نشان می دهد که حداقل واحد تولیدی آنزیم در هر فرمانتور بیش از ۱۰۰۰ واحد در میلی لیتر می باشد که با میزان تولیدی این پژوهش در ارلن (۴۲ واحد در میلی لیتر) فاصله زیادی دارد.

بررسی سویه های تولید کننده آنزیم صنعتی نشان می دهد که مهم ترین مرحله در توسعه تولید آنزیم، بهبود سویه توسط مهندسی ژنتیک است که به تولید آنزیم های صنعتی در مقیاس بزرگ و مقرون به صرفه کمک می کند. معمولاً آنزیم های طبیعی نمی توانند شرایط سخت صنعتی را که مانع از فولدینگ مؤثر آنزیم می شود را تحمل کنند. استراتژی هایی مانند تکامل هدایت شده (Directed evolution)، طراحی منطقی یا نیمه منطقی، مهندسی

Bacillus strain. Applied and environmental microbiology. 61 (8): p. 3105- 3112.

[7] Reimer, K., et al.(2002) Antimicrobial effectiveness of povidone-iodine and consequences for new application areas. Dermatology. 204 (Suppl. 1): p. 114- 120.

[8] Xiangdong, M., et al.(2000) A new method to identify alpha-amylase activity and its producing bacteria. Hua Zhong Nong ye da xue xue bao= Journal Huazhong (Central China) Agricultural University. 19 (5): p. 456- 460.

[9] Zhou, B., et al.(2020) Development of a strategy for the screening of α -glucosidase-producing microorganisms. Journal of Microbiology. 58: p. 163- 172.

[10] Gord Noshahri, Najme, et al. (2019) Screening and comparative characterization of microorganisms from Iranian soil samples showing ω -transaminase activity toward a plethora of substrates. Catalysts 9.10 : 874.

[11] Golestani, Robabeh, et al. (2024) Iranian Grape Waste: A High Potential Source for Screening of Bioethanol-Producing Microorganisms. Journal of Cell and Molecular Research. 16.1: 1- 12.

[12] Rasooli, I., et al. (2008) A thermostable α -amylase producing natural variant of *Bacillus* spp. isolated from soil in Iran. American Journal of Agricultural and Biological Sciences. 3 (3): p. 591- 596.

[13] Fooladi, J. and Sajjadian, A. 2010 Screening the thermophilic and hyperthermophilic bacterial population of three Iranian hot-springs to detect the thermostable α -amylase producing strain. Iranian journal of microbiology, 2010. 2 (1): p. 46.

[14] Afrisham, S., et al.(2018) Isolation and identification of *Bacillus* producing thermophilic alpha amylase: production optimization and investigation of the activity and stability of enzyme. Nova Biologica Reperta. 4 (4): p. 288- 298.

[15] Asoodeh, A., Chamani, J., and Lagzian, M. (2010) A novel thermostable, acidophilic α -amylase from a new thermophilic "*Bacillus sp. Ferdowsicus*" isolated from Ferdows hot mineral spring in Iran: Purification and biochemical characterization. International journal of biological macromolecules. 46 (3): p. 289- 297.

متابولیک برای اصلاح کارایی و پایداری آنزیم‌های طبیعی

[۳۷] و بهینه‌سازی محیط کشت [۳۸] استفاده می‌شود.

پژوهش‌ها نشان می‌دهد که ۹۰ درصد درصد از آنزیم‌های

صنعتی موجود در بازار از ارگانسیم نو ترکیب تولید

می‌شوند [۳۹].

سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت پژوهشی جهاد دانشگاهی بابت

تامین هزینه‌های انجام این پروژه به‌عنوان بخشی از طرح

مصوب با عنوان " غربالگری جدایه‌های تولید کننده آنزیم

آلفا-آمیلاز با پایداری حرارتی در فرایندهای صنعت غذا"

کمال تشکر را دارند.

منابع

[1] Zhang, G., et al.,(2021) Growth-coupled evolution and high-throughput screening assisted rapid enhancement for amylase-producing *Bacillus licheniformis*. Bioresource Technology. 337: p. 125467.

[2] Choubane, S., B.A. Cheba, and A. (2016) Benourrad, Screening and phenotypic diversity of amylase producing rhizospheric bacteria from some North African plants. Procedia Technology. 22: p. 1197- 1204.

[3] Nureddin Yassin, S., T. Mikessa Jiru, and Indracanti, M, (2021) Screening and Characterization of Thermostable Amylase-Producing Bacteria Isolated from Soil Samples of Afdera, Afar Region, and Molecular Detection of Amylase-Coding Ge. International Journal of microbiology. 2021(1), 5592885.

[4]Najafi, M.F., Deobagkar, D., and Deobagkar D, (2005) Purification and characterization of an extracellular α -amylase from *Bacillus subtilis* AX20. Protein expression and purification. 41 (2): p. 349- 354.

[5] Shruti, M. and Banik P, (2016) Isolation, Characterization, Identification and Screening of Amylase Producing Bacteria from Soil under System of Rice Intensification (SRI) Technique. International of pure and applied bioscience. 4: p. 5.

[6] Kim, T.U., et al. (1995) Purification and characterization of a maltotetraose-forming alkaline (alpha)-amylase from an alkalophilic

- [26] Rakaz, M.A., Hussien, M.O., and Ibrahim, H.M. (2021) Isolation, Extraction, Purification, and Molecular Characterization for Thermostable α -Amylase from Locally Isolated *Bacillus* Species in Sudan. *Biochemistry research international*. 2021 (1): p. 6670380.
- [27] Moghbeli, M. and Noshiri, H. (2009) Isolation of a Native *Bacillus licheniformis* Amylase Producer from Hot Source of Semnan. *Journal of Microbial World*. 2 (3): p. 155- 160.
- [28] Agha Maali, M.R., et al. (2014) Biochemical characteristics of alpha amylase produced by *Anoxybacillus* sp. from Qinarjeh, Meshkin-Shahr. *Aquatics Physiology and Biotechnology*. 2 (2): p. 17- 29.
- [29] Wind ,R., et al. (1994) Characterization of a new *Bacillus stearothermophilus* isolate: a highly thermostable α -amylase-producing strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 41 : p. 155- 162.
- [30] El-Tayeb, O., et al. (2008) Optimization of the industrial production of bacterial alpha amylase in Egypt. IV. Fermentor production and characterization of the enzyme of two strains of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. *African Journal of Biotechnology*. 7 (24).
- [31] Silva, T.M., et al.(2011) Thermostable saccharogenic amylase produced under submerged fermentation by filamentous fungus *Penicillium purpurogenum*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 42: p. 1136- 1140.
- [32] Bano, S., et al.(2011) Purification and characterization of novel α -amylase from *Bacillus subtilis* KIBGE HAS. *Aaps Pharmscitech*. 12: p. 255- 261.
- [33] Abd-Elhalim, B.T., et al. (2023) Optimizing alpha-amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* on bread waste for effective industrial wastewater treatment and textile desizing through response surface methodology. *Scientific Reports*. 13 (1): p. 19216.
- [34] Abdel-Fattah, Y.R., et al. (2013) Production, Purification, and Characterization of Thermostable α -Amylase Produced by *Bacillus licheniformis* Isolate AI20. *Journal of Chemistry*. 2013 (1): p. 673173.
- [16] Kafilzadeh, F. and Dehdari, F. (2015) Amylase activity of aquatic *actinomycetes* isolated from the sediments of mangrove forests in south of Iran. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*. 41 (2): p. 197- 201.
- [17] Popov, Y., et al., *Purification and characterization of a novel thermostable and acid stable α -amylase from bacillus sp. Iranian s.l.* *International Journal of Engineering*, 2013. 26 (8): p. 815- 820.
- [18] Fahimeh, M., Nima, B., and Majid, B.(2013) Isolation, characterization and identification of amylase producing halothermophilic isolates from Howz Soltan Lake, Iran. *African Journal of Microbiology Research*. 7 (36): p. 4483- 4490.
- [19] Saleki, L., Homaei A., and Shayesteh, F. (2021) Isolation and identification of α -amylase-producing bacteria from mangrove trees on the west coast of Qeshm Island (Konar siah) and investigation of some biochemical properties of α -amylases from *Bacillus* sp. *HR10* and *Bacillus* sp. *HR11*. *Modares Journal of Biotechnology*. 12 (4): p. 81- 94.
- [20] Mishra, S. and Behera, N, (2008) Amylase activity of a starch degrading bacteria isolated from soil receiving kitchen wastes. *African journal of Biotechnology*. 7 (18).
- [21] Tripathi, N. and A. Sapra. 2020 Gram staining.
- [22] FAZAL, B.Z., et al.(2022) Screening, isolation, and characterization of amylase-producing bacteria from Poring Hot Spring Sabah, Malaysia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*. 23(6).
- [23] Souza, P.M.d.(2010) Application of microbial α -amylase in industry-A review. *Brazilian journal of microbiology*. 41 (4): p. 850- 861.
- [24] Bajpai, B., Chaudhary, M., and Saxena, J. (2015) Production and characterization of α -amylase from an extremely halophilic archaeon, *Haloferax* sp. HA10. *Food technology and biotechnology*. 53 (1): p. 11.
- [25] Wu, L., et al. (2015) Bacilysin overproduction in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 markerless derivative strains FZBREP and FZBSPA enhances antibacterial activity. *Applied microbiology and biotechnology*. 99: p. 4255- 4263.

- [38] Gord Noshahri, N., et al. (2021) Growth optimization and identification of an ω -transaminase by a novel native PAGE activity staining method in a *Bacillus sp.* strain BaH isolated from Iranian soil. *AMB Express*. 11: p. 1- 11.
- [39] Ferreira, R.d.G., Azzoni, A.R. and Freitas, S. (2018) Techno-economic analysis of the industrial production of a low-cost enzyme using *E. coli*: the case of recombinant β -glucosidase. *Biotechnology for biofuels*. 11: p. 1- 13.
- [35] Lakshmi, H.P., et al. (2013) Molecular characterization of α -amylase from *Staphylococcus aureus*. *Bioinformation*. 9 (6): p. 281.
- [36] Wang, S., et al. (2016) Characterization and optimization of amylase production in WangLB, a high amylase-producing strain of *Bacillus*. *Applied biochemistry and biotechnology*. 180: p. 136- 151.
- [37] Fasim, A., More, V.S., and More, S.S. (2021) Large-scale production of enzymes for biotechnology uses. *Current opinion in biotechnology*. 69: p. 68- 76.

Investigating the frequency of α -amylase enzyme production in Microorganisms screened from Iran and Iranian microbial collection centers

Najme Gord Noshahri*

Assistant Professor, Industrial Microbial Biotechnology Department, Research Institute for Industrial Biotechnology, Academic Center for Education, Culture, and Research (ACECR)-Khorasan Razavi Province, Mashhad, Iran

gord.noshahri@jdm.ac.ir

Receipt: 2024/12/25

Accepted: 2025/05/21

Abstract

As a starch hydrolyzing enzyme, α -amylase is important in the food industry and ethanol and biofuel production. This research aims to investigate the production of α -amylase enzyme in microorganisms from different regions of Iran and microbial collection centers of Iran. The results showed that 183 out of 331 isolates screened had α -amylase activity. Of these, two strains isolated from agricultural soil, named AGR228 and AGR91, had the maximum halo-to-colony ratio. In addition, all the strains belonging to the microbial collection centers showed amylase activity, of which PTCC- 1732 and PTCC- 1156 showed the highest activity. The amount of amylase produced in PTCC- 1732 and AGR228 was estimated to be 20.5 and 11.18 units/ml, respectively. The maximum activity of the amylase enzyme from PTCC- 1732 is at 80°C, and pH 10. In the case of AGR228, the maximum activity was measured at 60°C, and pH 8.

Keywords: α -amylase, starch degradation, screening, Bacillus, trypan blue