جداسازی و شناسایی باکتری‌های تولیدکننده α- آمیلاز هم‌زیست درختان حرا از سواحل غربی جزیره قشم (کنار سیاه) و بررسی برخی از خصوصیات بیوشیمیایی α- آمیلاز در باکتری‌های Bacillus sp. HR10 و Bacillus sp. HR11

لیلا سالکی،[1] احمد همایی، [2*] فاطمه شایسته [3]

1. کارشناسی ارشد زیست‌شناسی بوم‌شناسی دریا، گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
2. دانشیار بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
3. استادیارشیلات، گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

* نویسنده مسئول: a.homaei@hormozgan.ac.ir

چکیده

هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی باکتری‌های بومی تولیدکننده آنزیم آلفا آمیلاز هم‌زیست با درختان حرا در جزیره قشم، استان هرمزگان ایران است. در این مطالعه 45 باکتری از ریشه و برگ Avicennia marina از سواحل غربی جزیره قشم (کنارسیاه) جداسازی شد. از میان آنها 18 سویه توانایی تولید آلفا آمیلاز را داشتند. آنالیز توالی ژن 16S rRNA مربوط به سویه‌های دارای بیشترین تولید آنزیم نشان داد که هر دو سویه جداسازی‌شده به جنس باسیلوس شامل Bacillus sp.HR10 و Bacillus sp.HR11 تعلق دارند. نتایج تأثیر دما و pH روی تولید آنزیم نشان داد، سویه‌های HR10 و HR11 به‌ترتیب بیشترین تولید آنزیم را در دمای 30 و 35°c و pH 8 دارند. نتایج تعیین ویژگی بیوشیمیایی آنزیم نشان داد، سویه‌های HR10 و HR11 بیشترین فعالیت آمیلازی را در دمای 60 و 70°c و pH بهینه 8 دارند. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد، باکتری‌های هم‌زیست جداشده از A. marina منبع بالقوه‌ای از آنزیم آلفا آمیلاز هستند و دامنه گسترده‌ای از دما و pH را تحمل می‌کنند. به‌طورکلی براساس نتایج حاصل، این سویه‌های باکتریایی می توانند منبع مناسبی برای تولید آنزیم آمیلاز تحمل‌کننده حرارت با پایداری عملکردی بالا و کاربرد در صنعت باشند.

کلید واژگان: α- آمیلاز، دمای بهینه، 16S rRNA، مانگرو، باسیلوس، جزیره قشم

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-05]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.4.9.1]

مقدمه

اقیانوس‌ها با بیش از 70 % وسعت زمین، طیفی وسیع از موجوداتی چون جلبک‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها، اسفنج‌ها و جانداران دیگری را شامل می‌شوند که پتانسیل بالقوه‌ای در تولید آنزیم‌های گوناگون پرکاربرد صنعتی مانند آمیلازها دارند[1]. جنگل‌های مانگرو از اکوسیستم‌های آبی منحصربه‌فرد و پرتولید جهان محسوب می‌شوند[2]. درختان حرا به‌طورکلی در خاک سست، مرطوب و آب شور رشد می‌کنند و به‌صورت دوره‌ای در امتداد مناطق ساحلی با جریان جزر و مد زیر آب می‌روند [3]. اکوسیستم‌های مانگرو در ایران فقط از دو گونهٔ درختی با نام درخت حرا (Avicennia marina) و درخت چندل (Rhizophora mucronata) تشکیل شده است [4]. درختان حرا متعلق به جنس Avicennia از تیره Rerbenaceae هستند که بخشی وسیع از سواحل استرالیا و اقیانوس هند از جاوه تا فیلیپین و بخش‌هایی از سواحل و جزایر خلیج فارس و دریای عمان را می‌پوشانند [5]. میکروارگانیسم‌های متنوع در اکوسیستم جنگل‌های حرا در تبدیل مواد آلی مرده به منابع نیتروژن، فسفر و سایر مواد غذایی مورد استفاده گیاهان نقش دارند [6]. بسیاری از باکتری‌ها به‌صورت هم‌زیست با درختان حرا زندگی می‌کنند و با توجه به نوسان‌های مختلف محیطی مانند دما، pH و شوری متفاوت در این منطقه تنوع باکتریایی بالایی دارند [7]. این باکتری‌ها به‌طورکامل در بافت‌های گیاهی مانند ساقه، ریشه، برگ، میوه و بافت‌های پیر گیاه، کلنی تشکیل می‌دهند [8]. همچنین، پیچیدگی محیط زیست دریایی باعث شده است بین ویژگی‌های آنزیم‌هایی که میکروارگانیسم‌های دریایی تولید می‌کنند درمقایسه با آنزیم‌هایی میکروارگانیسم‌های خشکی‌زی تولید می‌کنند تفاوت معنی‌داری وجود دارد. این تفاوت‌های ساختاری و عملکردی، در سال‌های اخیر استفاده از آنزیم دریایی را در صنعت به‌نحو چشمگیری افزایش داده است [9, 10].

مزیت عمده استفاده از این میکروارگانیسم‌ها در صنایع، رشد سریع آنها و ظرفیت تولید بالا و همچنین استخراج آسان آنزیم‌ها از باکتری‌ها در مقایسه با گیاهان و حیوانات است [11]. در میان انواع مختلف آنزیم‌ها، آمیلازها از مهم‌ترین آنزیم‌های صنعتی هستند و هیدرولیز نشاسته را به واحدهای کوچک قندی دکسترین یا پلیمرهای کوچک‌تر گلوکز تقسیم می‌کنند [12]. آمیلازها در سه گروه آلفا آمیلازها، β آمیلازها و γ آمیلازها طبقه‌بندی می‌شوند. آلفا آمیلازها از آمیلازهای صنعتی رایج و مهم هستند [13] و کاربردهای بسیاری در صنایع متعدد ازجمله داروسازی، غذایی، شوینده‌ها، کاغذسازی و نساجی دارند [11, 14]. شوینده‌های حاوی مواد شیمیایی به‌راحتی در فاضلاب تجزیه نمی‌شوند؛ این امر سبب می‌شود مقدار زیادی مواد شیمیایی به محیط زیست وارد شود. اگر آنزیم آلفا آمیلاز جایگزین مواد شیمیایی برای ازبین‌بردن لکه‌های سخت شود، ایمنی محیط زیست نسبت به مواد شوینده را افزایش می‌دهد. ازاین‌رو، امروزه 90٪ مواد شوینده حاوی آنزیم آلفا آمیلاز هستند [15]. نشاسته در ضایعات کشاورزی و فاضلاب‌های تولیدشده از کارخانه‌های فرآوری مواد غذایی و فاضلاب‌های خانگی به فراوانی وجود دارد که این پسماندها باعث ایجاد آلودگی محیط زیست می‌شود. تصفیه بیوتکنولوژیکی فاضلاب‌ها، محصولات ارزشمندی مانند زیست توده میکروبی تولید و همچنین به کمک آنزیم آلفا آمیلاز پساب و پسماندها را تصفیه می‌کند [16, 17]. نشاسته به‌دلیل قیمت پایین و دردسترس‌بودن بیشترین استفاده را برای تولید اتانول دارد. همچنین، برای تولید سوخت زیستی ابتدا نشاسته توسط آلفا آمیلاز هیدرولیز و قندهای قابل تخمیر تولید و سپس این قندها توسط مخمر تخمیر و الکل ساخته می‌شود. استفاده از اتانول به جای سوخت‌های فسیلی باعث کاهش مقدار تولید دی‌اکسیدکربن و درنتیجه کاهش گازهای گلخانه‌ای

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-05]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.4.9.1]

می‌شود [18, 19]. بیشتر گونه‌های باسیلوس که عبارت‌اند از B. subtilis، B. stearothermophilus، B. amyloliquefaciens، B. licheniformis، B. coagulans، B. polymyxa، B. mesentericus، B. vulgaris، B. megaterium، B. cereus، B. halodurans آنزیم آلفا آمیلاز تولید می‌کنند [20, 21]. عوامل مختلف فیزیکی و شیمیایی مانند دما، pH، دوره انکوباسیون، منابع کربن به‌عنوان القاکننده‌ها، سورفکتانت‌ها، منابع نیتروژن، فسفات و یون‌های مختلف فلزی میزان تولید آلفا آمیلاز باکتری‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهند [22]. با توجه به استفاده از آنزیم آلفا آمیلاز در صنایع گوناگون فرایندهای دوست‌دار محیط زیست چون تولید مواد شوینده [15]، تصفیه فاضلاب و پسماندهای کشاورزی [16, 17] و تولید الکل سوختی [18, 19] و همچنین این امر که درباره باکتری‌های تولیدکننده آلفا آمیلاز هم‌زیست درختان حرا خلیج فارس گزارشی وجود ندارد، در این پژوهش برای اولین‌بار باکتری‌های بومی تولیدکننده آنزیم آلفا آمیلاز هم‌زیست درختان حرا از سواحل غربی جزیره قشم (کنارسیاه) جدا و شناسایی شدند و برخی از ویژگی‌های بیوشیمیایی آنها نیز تعیین شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های برگ و ریشه Avicennia marina

نمونه‌های برگ و ریشه‌های هوایی درختان حرا از روستای کنارسیاه واقع در سواحل غربی جزیره قشم استان هرمزگان جداسازی و جمع‌آوری شدند. سپس، در ظروف استریل حاوی یخ در دمای 4- c°10 سریعاً به آزمایشگاه انتقال یافتند. نمونه‌برداری در سه مرحله و روزهای متفاوت و همچنین از نقاط مختلف منطقه انجام شد[23] .

جداکردن باکتری‌ها از برگ و ریشه Avicennia marina

برای پاکسازی نمونه‌های برگ و ریشه از ذرات شن و ماسه، ابتدا نمونه‌ها با آب دریای استریل شست‌وشو، سپس 2 گرم از هرکدام از نمونه‌ها با الکل 70% به مدت 1 دقیقه، متانول 96% به مدت 30 ثانیه، هیپوکلریت سدیم 2/5 ، به مدت 4 دقیقه و همچنین در آب مقطر استریل در هر مرحله شست‌وشو شدند. درنهایت با 6 میلی‌لیتر نرمال سالین نمونه‌ها همگن شدند. برای جداسازی باکتری‌های هم‌زیست رقت سریالی (10^{-1}-10^{-4}) از عصاره همگن‌شده تهیه و بعد از 3 ساعت انکوباسیون سوسپانسیون در انکوباتور با دمای c°30، 10 میکرولیتر از عصاره روی محیط کشت نوترینت آگار کشت داده و به مدت 48ساعت با دمای c° 30 انکوبه شد [24].

غربالگری اولیه باکتری‌های تولیدکننده آلفا آمیلاز

باکتری‌های جداشده از درختان حرا روی محیط کشت اختصاصی حاوی نشاسته (1%) و در دمای c° 30 به مدت 48 ساعت کشت شدند. پس از 48 ساعت رشد باکتری‌ها روی محیط کشت نشاسته بررسی شدند و نمونه‌هایی که توانایی رشد در این محیط را داشتند، برای ادامه کار انتخاب شدند [25]. در این مرحله روی محیط کشت اختصاصی حاوی نشاسته محلول لوگل ریخته شد. سپس، براساس قطر هاله شفاف اطراف کلنی باکتری که هیدرولیزشدن نشاسته و تولید آنزیم را توسط باکتری نشان می‌دهد، کلنی‌های تولیدکننده آنزیم آلفا آمیلاز جداسازی و انتخاب شدند [26].

غربالگری ثانویه باکتری‌های تولیدکننده آلفا آمیلاز و سنجش فعالیت آنزیم

باکتری‌های تولیدکننده آنزیم آلفا آمیلاز که در مرحله غربالگری اولیه، هاله قوی‌تری تولید کرده بودند، برای غربالگری ثانویه و سنجش فعالیت آنزیمی انتخاب شدند. در این مرحله باکتری‌ها در محیط نوترینت براث کشت داده و در شیکر انکوباتور دمای c°30 و دور 100 rpm انکوبه شدند. پس از گذشت 24 ساعت، با دور 12000 به مدت 20 دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی به‌عنوان محلول حاوی آنزیم آلفا آمیلاز در مراحل بعدی آزمایش استفاده

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-05]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.4.9.1]

شد [27]. برای سنجش فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز نیز از روش Bernfeld استفاده شد [28]. بدین منظور، 400 میکرولیتر محلول بافر فسفات، 100 میکرولیتر عصاره آنزیم آلفا آمیلاز و 500 میکرولیتر نشاسته 1% به‌عنوان سوبسترا در دمای 60 °c به مدت 20 دقیقه انکوبه شدند. سپس 1 میلی‌لیتر محلول DNS به لوله آزمایش افزوده، به مدت 5 دقیقه در حمام آب جوش انکوبه و پس از سردشدن، 1 میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه شد. پس از به‌هم‌زدن محتویات لوله جذب نمونه در طول موج 540 نانومتر در برابر نمونه شاهد خوانش شد.

شناسایی باکتری‌های بالقوه تولیدکننده آلفا آمیلاز

در این مطالعه شناسایی باکتری‌های بالقوه تولیدکننده آنزیم آلفا آمیلاز با بررسی خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی و با استفاده از آنالیز ژن 16S rRNA انجام شد. برای استخراج DNA باکتری‌ها از روش Boiling استفاده شد [29, 30]. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با روش استاندارد برای ازدیاد قطعه 1500 جفت باز از ژن 16S rRNA با DNA الگوی استخراج‌شده باکتری‌های بالقوه تولیدکننده آلفا آمیلاز (HR10 و HR11) تحت پرایمرهای پیش رو (5′AGA GTT TGA TCCTGG CTC AG3′) و معکوس (5′AAG GAGGTG ATC CAGCC3′) درحجم نهایی 50 میکرولیتر شامل 2 میکرولیتر DNA الگوی سویه باکتریایی استخراج‌شده، 0/5 میکرولیتر پرایمر پیش رو، 0/5 میکرولیتر پرایمر معکوس، 25 میکرولیتر محلول مستر میکس قرمز آماده آمپلیکون و 22 میکرولیتر آب مقطر دیونیزه انجام شد [31]. واکنش PCR در دستگاه ترموسیکلر با شرایط 1 دقیقه دناتوره‌شدن اولیه در دمای 95°c و در ادامه 30 سیکل شامل دناتوره‌شدن در دمای 95°c به مدت 20 ثانیه، اتصال در دمای 63°c به مدت 30 ثانیه و طویل‌شدن در دمای 72°c به مدت 1 دقیقه و درنهایت طویل‌شدن نهایی در دمای 72°c به مدت 5 دقیقه انجام شد. بعد از بررسی کیفیت و کمیت محصولات PCR روی الکتروفورز ژل آگارز 1% و اسپکتروفتومتر جهت تعیین توالی به شکل دوطرفه به شرکت فزاپژوه ارسال شدند. توالی‌ها با استفاده از ابزار بلاست موجود در سایت NCBI با توالی‌های آمیلازی ثبت‌شده در پایگاه داده NCBI مقایسه شدند. پس از این مقایسه، نزدیک‌ترین سویه براساس توالی ژن S rRNA16و نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی انتخاب شد.

برای آنالیز روابط فیلوژنی، توالی‌های مورد نظر در بانک ژن NCBI جستجو و آنالیز بلاست شدند. در انتها، با استفاده از نرم‌افزار MEGA4 و الگوریتم Joining Neibour-(NJ) با بوت استرپ 1000 تکرار درخت فیلوژنی ترسیم شد [32].

بررسی اثر دما و pH بر تولید آنزیم آلفا آمیلاز

اثر دما بر تولید آنزیم آلفا آمیلاز با انکوبه‌کردن محیط کشت باکتری‌های بالقوه تولیدکننده آلفا آمیلاز در محدوده دمایی 25- 35°c سنجیده شد. بدین‌منظور، پس از گذشت 48 ساعت از رشد سویه‌های باکتریایی انتخاب‌شده در محیط کشت اختصاصی حاوی نشاسته فعالیت آنزیمی سنجیده شد [33].

اثر pH بر تولید آنزیم آلفا آمیلاز با انکوبه‌کردن محیط کشت باکتری‌های بالقوه تولیدکننده آلفا آمیلاز در محدوده pH های 6-8 سنجیده شد. به‌همین دلیل، پس از گذشت 48 ساعت از رشد سویه‌های باکتریایی انتخاب‌شده در محیط کشت اختصاصی حاوی نشاسته، فعالیت آنزیمی سنجیده شد [34].

بررسی اثر دما و pH در فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز

فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در دماهای 20-40°c در بافر 20 میلی‌مولار فسفات، pH 7/4 تعیین شد. باید توجه کرد که برای سنجش فعالیت آنزیمی در هر دما، سوبسترا (نشاسته 1%) و محلول آنزیمی (بافر و عصاره آنزیم) هر دو باید در آن دما به تعادل برسند، سپس فعالیت آنزیمی سنجش شود [35].

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-05]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.4.9.1]

فعالیت نسبی آنزیم در pHهای مختلف 12-2 در دمای اتاق اندازه‌گیری شد. برای این منظور بافر مخلوط (مخلوطی از غلظت 25mM تریس-باز، گلایسین، فسفات سدیم و استات سدیم) تهیه و با استفاده از محلول NaOH و HCl در pHهای مختلف 2 تا 12 تنظیم شد. محلول نشاسته 1% نیز به‌عنوان سوبسترا تهیه و فعالیت آنزیم در بافر فوق با pHهای مختلف سنجش شد.

نتایج و بحث

جداکردن باکتری‌ها از برگ و ریشه Avicennia marina

در این مطالعه از نمونه‌های جمع‌آوری‌شده برگ و ریشه A. marina، 45 کلنی جدا شد که 28 کلنی از ریشه و 17 کلنی از برگ بود. این یافته‌ها نشان می‌دهد، باکتری‌های بیشتری از ریشه (نسبت به برگ) درخت A. marina جدا شده است. با توجه به اینکه رسوبات دریا حاوی ذخیره وسیعی از کربن ارگانیک، شیبی از غلظت اکسیژن و مواد غذایی آلی و غیر آلی هستند، ترکیبی فراهم می‌کنند که کنام ویژه‌ای برای میکروارگانیسم‌های متفاوت باشد [36, 37]. بنابراین، تعداد بیشتر باکتری‌های جداشده از ریشه نسبت به برگ A. marina منطقی به نظر می‌رسد.

غربالگری اولیه باکتری‌های تولیدکننده آلفا آمیلاز

برای جداکردن باکتری‌های تولیدکننده آنزیم آلفا آمیلاز از محیط کشت اختصاصی حاوی نشاسته استفاده شد. در این محیط کشت با توجه به اینکه نشاسته به‌عنوان منبع کربن به‌کار می‌رود، فقط باکتری‌هایی رشد می‌کنند که بتوانند آنزیم آلفا آمیلاز را سنتز کنند. تعداد 28 کلنی جداشده از برگ و ریشه A. marina روی محیط اختصاصی حاوی نشاسته هیچ‌گونه رشدی نداشتند. این امر نشان می‌داد، این باکتری‌ها توانایی سنتز آنزیم آلفا آمیلاز را نداشتند. همچنین، 18باکتری روی محیط اختصاصی حاوی نشاسته رشد کردند و هاله شفافی در اطراف کلنی تشکیل شد که تولید آنزیم آلفا آمیلاز را توسط این باکتری‌ها نشان می‌داد. باکتری‌های تولیدکننده آنزیم آلفا آمیلاز به‌ترتیب 8 و 10 سویه جداشده از ریشه و برگ بودند و 7 سویه هاله قوی تشکیل دادند که تولید بالای آنزیم آمیلاز را نشان می‌داد. باکتری‌های دیگر نیز هاله متوسط یا ضعیف داشتند. در پژوهش‌های گذشته نیز همچون این مطالعه از محیط کشت اختصاصی حاوی نشاسته برای غربالگری اولیه باکتری‌های تولیدکننده آنزیم آلفا آمیلاز استفاده کرده‌اند [38, 39]. برای مثال، Mansi و همکارانش (2013) با استفاده از نشاسته به‌عنوان منبع کربن موفق شدند باکتری‌های تولیدکننده آنزیم آلفا آمیلاز از نمونه‌های آب دریاچه لونار هند را شناسایی کنند و نتایج به‌دست‌آمده نیز رشد مناسب باکتری ها و فعالیت آنزیمی را نشان داد [38].

غربالگری ثانویه باکتری‌های تولیدکننده آلفا آمیلاز و سنجش فعالیت آنزیم

ازمیان باکتری‌های جداشده از برگ و ریشه A. marina، 11 سویه باکتری دارای بیشترین میزان تشکیل هاله (قوی و متوسط) در مرحله غربالگری اولیه برای سنجش فعالیت آنزیمی انتخاب شدند. در این میان، دو سویه HR10 وHR11 بیشترین مقدار فعالیت آنزیمی را به‌ترتیب 0/065 و 0/034 یونیت آنزیمی داشتند. درنهایت این دو سویه بالقوه تولیدکننده آنزیم آلفا آمیلاز برای بررسی‌های بعدی و شناسایی مولکولی انتخاب شدند.

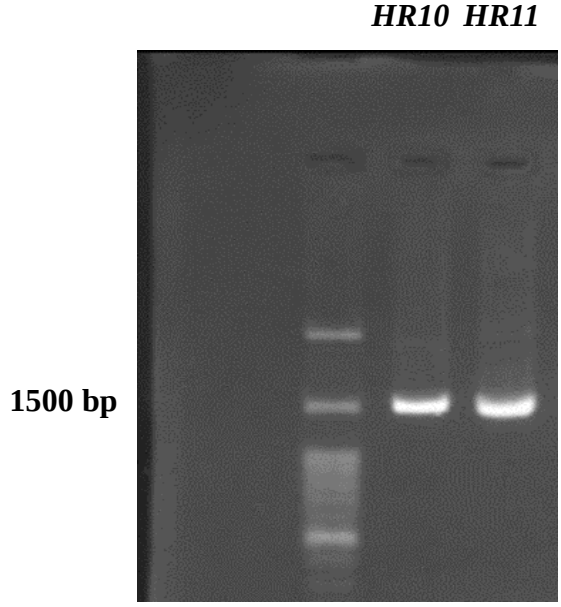
شناسایی مولکولی سویه‌های بالقوه تولیدکننده آنزیم آلفا آمیلاز

دو سویۀ HR10 و HR11 که بیشترین فعالیت آلفا آمیلازی را داشتند، با آنالیز ژن 16S rRNA شناسایی شدند (شکل 1). نتایج بلاست توالی نوکلئوتیدی ژن 16S rRNA باکتری‌های جداشده در پایگاه NCBI نشان داد، هر دو سویۀ بالقوه تولیدکننده آلفا آمیلاز بیشترین تشابه را با جنس Bacillus از خانواده Bacillaceae داشتند. براساس این نتایج سویه‌های HR10 و HR11 بیشترین تشابه (99%) را

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-05]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.4.9.1]

به‌ترتیب با Bacillus amyloliquefaciens strainTS.18 S.BK (MH250028) و Bacillus infantis sp. Strain C4(MF993020) نشان دادند. توالی‌های ژن 16S rRNA سویه‌های Bacillus sp. strain HR10 و Bacillus sp. strain HR11, در پایگاه NCBI به‌ترتیب با شماره‌های دسترسی MN988922 و MN988923 ثبت شدند.

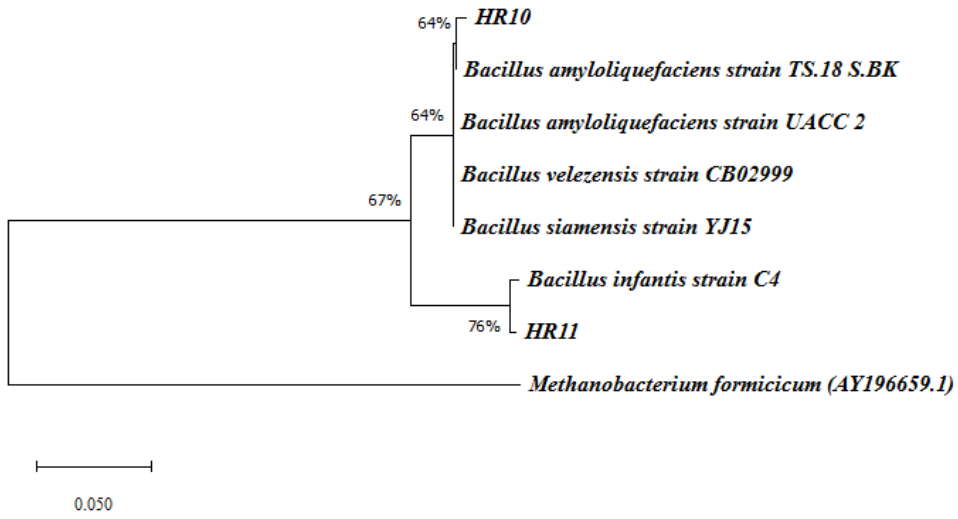


شکل 1. الکتروفورز ژن 16S rRNA تکثیرشده با استفاده از PCR سویه‌های HR10 و HR11، باند در راستای 1500 جفت بازی قرار دارد.

درخت فیلوژنتیکی توالی‌های نوکلئوتیدی ژن 16S rRNA سویه‌های HR10 و HR11 جداشده در این مطالعه با 5 توالی موجود در NCBI که عبارت‌اند از Bacillus amyloliquefaciens strain TS.18 S.BK، Bacillus amyloliquefaciens strainUACC2، Bacillu velecensis CB02999، Bacillus siamensis strain YJ15، Bacillus infantis. Strain C4 بعد از هم‌ردیف‌کردن رسم شد. گونه Methanobacterium fornicium AY196659.1 به‌عنوان برون‌گونه انتخاب شد. براساس نتایج درخت فیلوژنتیکی سویه HR10 با 64% همسانی در کلاد مربوط به گونه Bacillus amyloliquefaciens strain TS.18 S.BK و سویه HR11 با 76% همسانی در کلاد مربوط به گونه Bacillus infantis. Strain C4 حمایت شد (شکل 2).

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-05]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.4.9.1]



شکل 2. درخت فیلوژنتیکی توالی ژن 16S rRNA سویه‌های HR10 و HR11 و سایر توالی‌های موجود در بانک ژنی NCBI که موقعیت این باکتری‌های را در میان سویه‌های دیگر نشان می‌دهد.

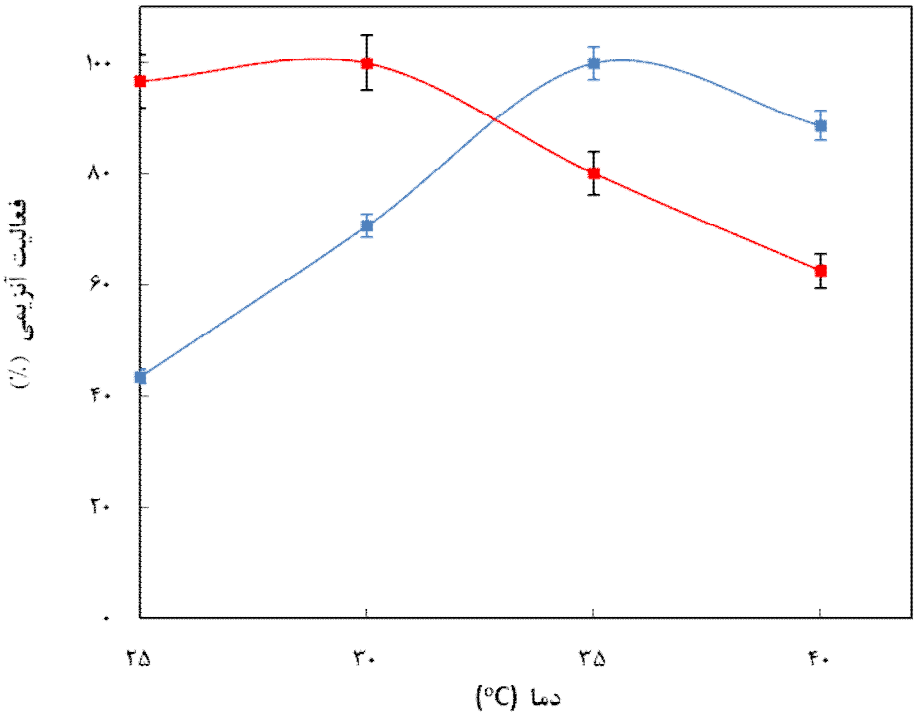
Castro و همکارانش در سال 2014 میکروارگانیسم-های اندوفیت همزیست با برگ و شاخه درختان مانگرو را در کشور برزیل از دو گونه مانگرو (Rhizophora mangle و Avicennianitida) جدا کردند. باسیلوس‌ها بیشترین جنس جداشده از این منطقه بودند [40]. مثل این مطالعه، باکتری‌های متعلق به جنس باسیلوس چون B. subtilis، B.stearothermophilus و B. Amyloliquefaciens به‌عنوان باکتری‌های بالقوه تولیدکننده آنزیم آلفا آمیلاز شناسایی شدند [22, 41-43]. آنزیم آلفا آمیلاز تولیدشده توسط B. amyloliquefaciens بیشترین تولید جهانی این آنزیم را به خود اختصاص داده است. آلفا آمیلاز تولیدی توسط این باکتری اولین آنزیمی بود که در صنعت در شیرین‌سازی و مایع‌سازی نشاسته استفاده شد [44]. این امر توانایی منحصربه‌فرد باسیلوس‌ها را در تولید آنزیم‌های آلفا آمیلاز نشان می‌دهد.

اثر دما و pH برمیزان تولید آنزیم آلفا آمیلاز

براساس نتایج این تحقیق، بیشترین و کمترین میزان تولید آنزیم آلفا آمیلاز توسط Bacillus sp.HR10 به‌ترتیب در دمای 25 - 35° c و توسط سویه Bacillus sp. HR11 در دمای30 - 35°c بود (شکل3). Burhan پژوهشی روی آنزیم آلفا- آمیلاز تولیدشده از باکتری Bacillus sp. ANT-6 انجام داد که حاکی از تولید بهینه این آنزیم در دمای 37°c بود [45].

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-05]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.4.9.1]

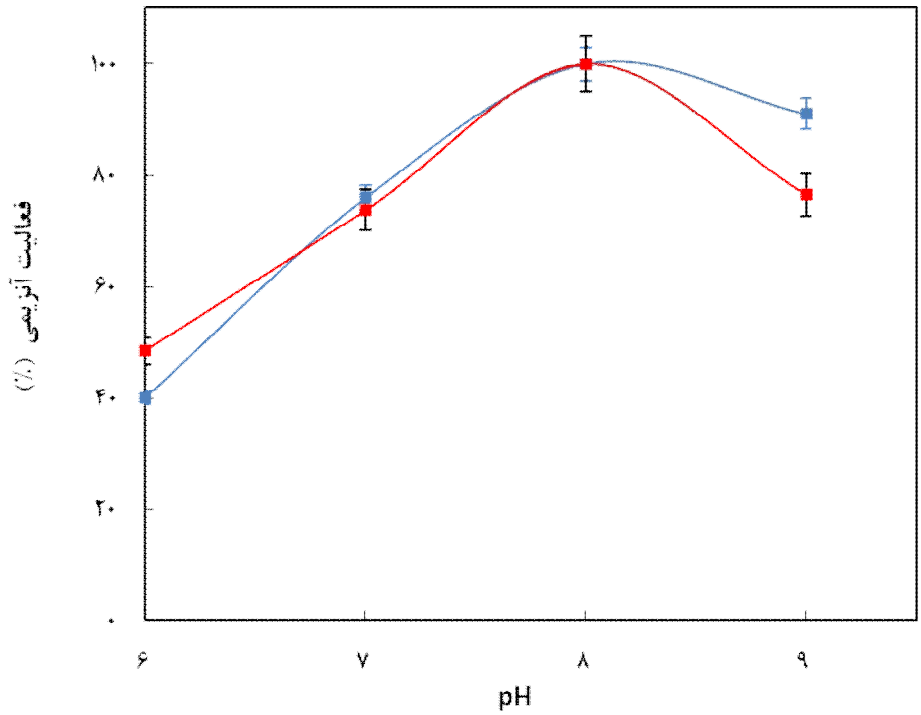


شکل 3. نتایج بهینه‌کردن تولید آلفا آمیلاز در دماهای مختلف

بیشترین و کمترین مقدار تولید آنزیم آلفا آمیلاز توسط سویه‌های باکتریایی Bacillus sp.HR10 و Bacillus sp. HR11 به‌ترتیب در pHهای 8 و 6 بود که افزایش میزان تولید آنزیم را در شرایط قلیایی نسبت به اسیدی توسط Bacillus sp. نشان می‌داد (شکل4). Sivaramakrishnan و همکارانش نیز pH بهینه تولید آنزیم آلفا آمیلاز Bacillus sp. را در محدوده 8-7 گزارش کردند [22]. همچنین Lee و همکارانش در سال 1994، pH بهینه تولید آلفا آمیلاز Bacillus sp. جداشده از خاک را در pH قلیایی 8 و 9 گزارش کردند که با این مطالعه تطابق دارد [46].

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-05]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.4.9.1]



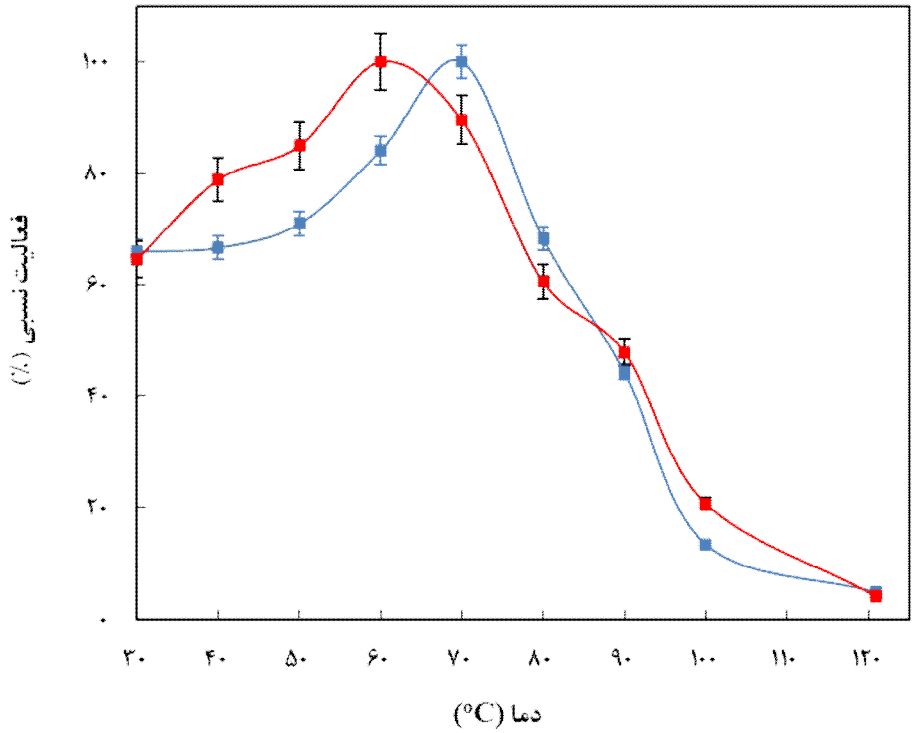
شکل 4. نتایج بهینه‌کردن تولید آلفا آمیلاز در pHهای مختلف

اثر دما و pH بر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز

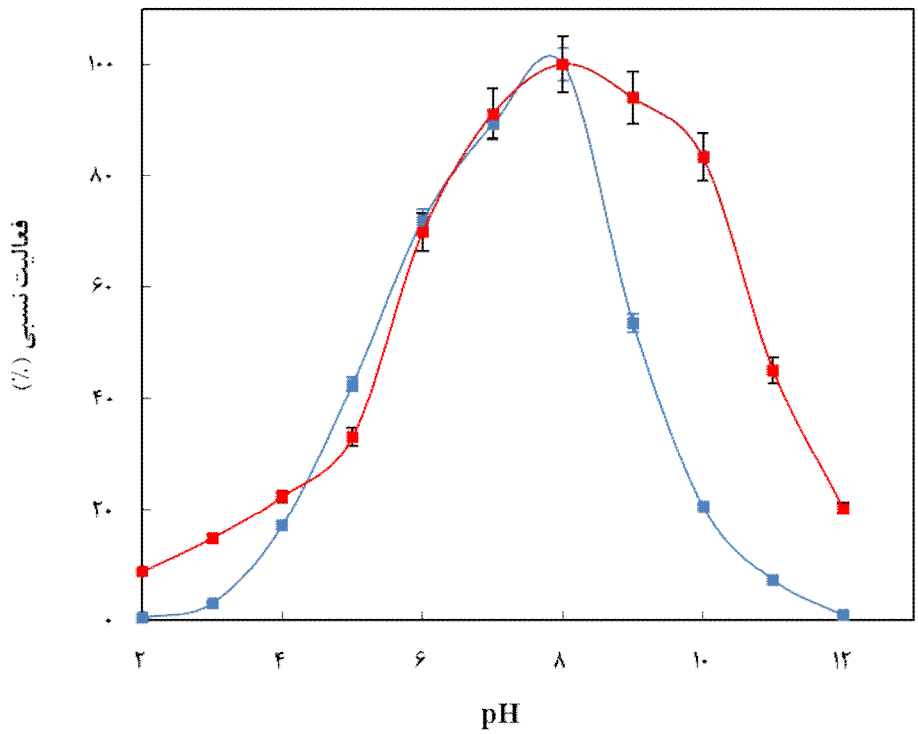
در بررسی اثر دما و pH بر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در سویه‌های HR10 و HR11 مشخص شد که این آنزیم به‌ترتیب در دمای 60 و 70°c و pH 8 دارای حداکثر فعالیت است. در هر دو سویه آنزیم بیشترین پایداری دمایی در محدوده دمایی50 تا 70°c رخ داد (شکل5). دو سویهHR10 و HR11، بیشترین پایداری را به‌ترتیب در pHهای 6 تا 8 و 7 تا 9 نشان دادند (شکل6). براساس گزارش‌های قبلی، آلفا آمیلاز جداشده از Bacillus sp. ANT-6 در دمای 80°c [45] و از Bacillus sp. MB6 در دمای 55°c [47]. بیشترین فعالیت آنزیمی را داشتند. براساس مطالعات قبلی گزارش شده است که آلفا آمیلاز جداشده از Bacillus spp. در pHهای قلیایی بیشترین فعالیت را دارد [48-50]. پژوهش‌های انجام‌شده روی آنزیم آلفا آمیلاز B. cereus نشان داد، این آنزیم بیشترین فعالیت آنزیمی را در دمای 80°c و pH حدودی 8 دارد. آنزیم بیش از 80% فعالیتش را در محدوده دمایی50 تا 70°c حفظ کرد و در pH محدوده 3 تا 5 فعال و پایدار بود [51]. در باکتری ترموفیل Geobacillus stearothermophilus از چشمه‌های آب گرم غیر سولفوری جداشده نشان داده شد که بیشترین فعالیت آمیلازی در محدوده دمایی 40 تا 70° c و pH بهینه 5-8 است [52]. به‌طورکلی مطالعات نشان می‌دهد، آنزیم آلفا آمیلاز در محدوده pH بین 4 تا 11 پایدار است، اما آنزیم‌های آلفا آمیلاز قلیایی بازده کاتالیزوری بالایی دارند و این آنزیم در pH 8 تا 10 بیشترین پایداری و فعالیت را دارد. درنتیجه آنزیم‌های قلیایی با توجه به شرایط مطلوب آنزیم از نظر پایداری دمایی و pH کاندیدای مستعدی در صنایع نساجی و تولید مواد شوینده هستند [53].

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-05]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.4.9.1]



شکل 5. اثر دما بر فعالیت آلفا آمیلاز HR10 و HR11 . فعالیت در دمای بهینه 100% در نظر گرفته شد.



شکل 6. اثر pH بر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز HR10 و HR11 . فعالیت در pH بهینه 100% در نظر گرفته شد.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-05]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.4.9.1]

نتیجه‌گیری کلی

در این مطالعه، باکتری‌های هم‌زیست Bacillus sp. HR10 و Bacillus sp. HR11 جداشده از A.marina فعالیت مناسبی را برای تولید آنزیم آمیلاز به‌ترتیب در دمای 60 و 70°c و pH 8 نشان دادند. با توجه به خصوصیات این آنزیم و فعال‌بودن آن در دماهای بالا و pH قلیایی و پتانسیل آنزیم آلفا آمیلاز می‌توان آن را به‌عنوان کاندیدای مستعد برای تجاری‌کردن و تولید انبوه در صنایع غذایی و شوینده معرفی کرد و یک گام عملی در زمینه بیوتکنولوژی دریا در تولید محصولات کاربردی با ارزش زیستی بالا برداشت.

منابع

1. Parte, S., V. Sirisha, and J. D'Souza, *Biotechnological applications of marine enzymes from algae, bacteria, fungi, and sponges*, in *Advances in food and nutrition research*. 2017, Elsevier. p. 75-106.

2. Qamar, M.K., *Mangroves of the Active Indus Delta-Changes and their causes*. 2009, National College of Buisness Administration & Economics, Lahore. p. p 3.

3. Kasawani, I., J. Kamaruzaman, and M. Nurun-Nadhirah, *Biological diversity assessment of Tok Bali mangrove forest, Kelantan, Malaysia.* WSEAS Transactions on Environment and Development, 2007. **3**(2): p. 30-385.

4. Ghasemi, S., et al., *A review of mangrove value and conservation strategy by local communities in Hormozgan province, Iran.* Journal of American Science, 2010. **6**(10): p. 329-338.

5. Alongi, D.M., *Present state and future of the world's mangrove forests.* Environmental conservation, 2002: p. 331-349.

6. Sahoo, K. and N. Dhal, *Potential microbial diversity in mangrove ecosystems: a review.* 2009.

7. Vazquez, P., et al., *Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon.* Biology and Fertility of Soils, 2000. **30**(5): p. 460-468.

8. Mohanraju, R. and R. Natarajan, *Methanogenic bacteria in mangrove sediments*, in *The Ecology of Mangrove and Related Ecosystems*. 1992, Springer. p. 187-193.

9. Harmsen, H., D. Prieur, and C. Jeanthon, *Distribution of microorganisms in deep-sea hydrothermal vent chimneys investigated by whole-cell hybridization and enrichment culture of thermophilic subpopulations* .Applied and Environmental Microbiology, 1997. **63**(7): p. 2876.

1. Farha, A.K., et al., *Phylogenetic diversity and biotechnological potentials of marine bacteria from continental slope of eastern Arabian Sea.* Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 2018. **16**(2): p. 253-258.

11. Gupta, R., et al., *Microbial α-amylases: a biotechnological perspective.* Process Biochemistry, 2003. **38**(11): p. 1599-1616.

12. Nakagawa, Y., et al., *Gene cloning and enzymatic characteristics of a novel γ-cyclodextrin-specific cyclodextrinase from alkalophilic Bacillus clarkii 7364.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 2008. **1784**(12): p. 2004-2011.

13. Chandra, M.S., et al., *Purification and characterization of highly thermostable α-amylase from thermophilic Alicyclobacillus acidocaldarius.* Biotechnology and Bioprocess engineering, 2010. **15**(3): p. 435-440.

14. Sen, S.K., et al., *Characterizing novel thermophilic amylase producing bacteria from Taptapani hot spring, Odisha, India.* Jundishapur journal of microbiology, 2014. **7**(12.(

15. Demirci, A., G. Izmirlioglu, and D. Ercan, *Fermentation and enzyme technologies in food processing.* Food processing: principles and applications. 2nd ed. New York: Wiley, 2014: p. 107-36.

16. Putri, A.Z. and T. Nakagawa ,*Microbial α-Amylases in the Industrial Extremozymes.* Reviews in Agricultural Science, 2020. **8**: p. 158-169.

17. Bhatt, B.M., U.B. Trivedi, and K.C. Patel, *Extremophilic amylases: Microbial production and applications*, in *Microbial enzymes: Roles and*

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-05]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.4.9.1]

27. Ahmadi, A., et al., *Purification of α-Amylase from Bacillus sp. GHA1 and its partial characterization.* Journalof the Iranian Chemical Society, 2010. **7**(2): p. 432-440.

28. Bernfeld, P., *Amylases, alpha and beta.* Methods in enzymology I, 1955: p. 149-158.

29. Abdelhai, M.H., H.A. Hassanin, and X. Sun, *Comparative study of rapid DNA extraction methods of pathogenic bacteria.* American Journal of Bioscience and Bioengineering, 2016. **4**(1): p. 1.

30. Alimolaei, M. and M. Golchin, *An efficient DNA extraction method for Lactobacillus casei, a difficult-to-lyse bacterium.* Int J Enteric Pathog, 2016. **4**(1): p. 1-6.

31. Boulares, M., et al., *Characterisation and identification of spoilage psychotrophic Gram-negative bacteria originating from Tunisian fresh fish.* Annals of microbiology, 2013. **63**(2): p. 733-744.

32. Tamura, K., et al., *MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0.* Molecular biology and evolution, 2007. **24**(8): p. 1596-1599.

33. Prakash, B., et al., *Production, purification, and characterization of two extremely halotolerant , thermostable, and alkali-stable α-amylases from Chromohalobacter sp. TVSP 101.* Process Biochemistry, 2009. **44**(2): p. 210-215.

34. Aullybux, A.A. and D. Puchooa, *α-Amylase production on low-cost substrates by Naxibacter sp. isolated from mauritian soils.* Microbiology Research Journal International, 2013: p. 478-491.

35. Karakaş, B., M. İnan, and M. Certel, *Expression and characterization of Bacillus subtilis PY22 α-amylase in Pichia pastoris.* Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2010. **64**(3-4): p. 1134,-29

36. Ramesh, S. and N. Mathivanan, *Screening of marine actinomycetes isolated from the Bay of Bengal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes.* World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009. **25**(12): p. 2103-2111.

applications in industries. 2020, Springer. p. 185-205.

18. Stefanello, C., et al., *Starch digestibility, energy utilization, and growth performance of broilers fed corn-soybean basal diets supplemented with enzymes.* Poultry science, 2015. **94**(10): p. 2472-2479,

19. Gernaey, B., J.O.B. Sorbara, and P.H. Nielsen, *Environmental assessment of amylase used as digestibility improvement factor for intensive chicken production in Brazil.* Sustainability, 2018. **10**(8): p. 2735.

20. Souza, P.M.d., *Application of microbial α-amylase in industry-A review.* Brazilian journal of microbiology, 2010. **41**(4): p. 850-861.

21. Hussain, I., et al., *A Review of the Microbiological Aspect of α-amylase Production.* International Journal of Agriculture & Biology, 2013. **15**(5.(

22. Sivaramakrishnan, S., et al., *a-Amylases from microbial sources–an overview on recent developments.* Food Technol Biotechnol, 2006. **44**(2): p. 173-184.

23. Gomathi, V., et al., *Endophytic thraustochytrids in Mangrove leaves.* Novus International Journal of Biotechnology & Bioscience
2012,

24. Susilowati, R., A. Sabdono, and I. Widowati, *Isolation and characterization of bacteria associated with brown algae Sargassum spp. from Panjang Island and their antibacterial activities.* Procedia Environmental Sciences, 2015 :23 .p. 240-246.

25. Kathiresan, K., et al., *Microbial enzyme activity in decomposing leaves of mangroves.* Int J Adv Biotechnol Res, 2011. **2**(3): p. 382-389.

26. Afrisham, S., et al., *Characterization of a thermostable, CaCl2-activated and raw-starch hydrolyzing alpha-amylase from Bacillus licheniformis AT70: Production under solid state fermentation by utilizing agricultural wastes.* Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2016. **132**: p. 98-106.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-05]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.4.9.1]

37. Toffin ,L., et al., *Molecular monitoring of culturable bacteria from deep-sea sediment of the Nankai Trough, Leg 190 Ocean Drilling Program.* FEMS Microbiology Ecology, 2004. **48**(3): p. 357-367.

38. Mansi, K., M. Reddy, and G. Reddy, *Polyphasic taxonomic characterization of bacteria isolated from Chilka Lake, Odisha, India*. 2013.

39. Du, R., et al., *Purification and characterization of novel thermostable and Ca-independent α-amylase produced by Bacillus amyloliquefaciens BH072.* International journal of biological macromolecules, 2018. **115**: p. 1151-1156.

40. Castro, R.A., et al., *Isolation and enzyme bioprospection of endophytic bacteria associated with plants of Brazilian mangrove ecosystem.* SpringerPlus, 2014. **3**(1): p. 1-9.

41. Mohapatra, B., M. Bapuji, and A. Sree, *Production of industrial enzymes (amylase, carboxymethylcellulase and protease) by bacteria isolated from marine sedentary organisms.* Acta Biotechnologica, 2003. **23**(1): p. 75-84.

42. Sajitha, N., et al., *Amylase from an estuarine Bacillus megaterium.* Curr. Res. J. Biol. Sci, 2011. **3**(2): p. 110-115.

43. Barros, F.F.C., et al., *Production of enzymes from agroindustrial wastes by biosurfactant-producing strains of Bacillus subtilis.* Biotechnology research international, 2013. **2013**.

44. Kim, T.U., et al ,.*Purification and characterization of a maltotetraose-forming alkaline (alpha)-amylase from an alkalophilic Bacillus strain, GM8901.* Applied and environmental microbiology, 1995. **61**(8): p. 3105.

45. Burhan, A., et al., *Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic Bacillus sp. isolate ANT-6.* Process Biochemistry, 2003. **38**(10): p. 1397-1403.

46. Lee, S.-P., et al., *Cloning of the aapT gene and characterization of its product, alpha-amylase-pullulanase (AapT), from thermophilic and alkaliphilic Bacillus sp. strain XAL601.* Applied and Environmental Microbiology, 1994. **60**(10): p. 3764.

47. Paul, J.S., et al., *Parameter's optimization and kinetics study of α-amylase enzyme of Bacillus sp . MB6 isolated from vegetable waste.* Process Biochemistry, 2017. **52**: p. 123-129.

48. Chakraborty, K., B. Bhattacharyya, and S. Sen, *Purification and characterization of a thermostable α-amylase fromBacillus stearothermophilus.* Folia microbiologica, 2000 . :(3)45p. 207-210.

49. Deb, P., et al., *Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from Bacillus amyloliquefaciens P-001.* SpringerPlus, 2013. **2**(1): p. 1-12.

50. Aygan, A., et al., *Highly thermostable and alkaline α-amylase from a halotolerant-alkaliphilic Bacillus sp. AB68.* Brazilian Journal of Microbiology, 2008. **39**(3): p. 547-553.

51. آزاده, ط., et al., خالص سازی و بررسی برخی خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم آلفا آمیلاز مقاوم به حرارت باکتری *Bacillus cereus.*

52. قلندری, س., et al., بررسی خصوصیات بیو - آلفا آمیلاز از باکتری ترموفیل α شیمیایی آنزیم *Geobacillus Stearothermophilus*, in علوم جانوران آبزی. 1392,

53. Yang, H., et al., *Heterologous expression, biochemical characterization, and overproduction of alkaline α-amylase from Bacillus alcalophilus in Bacillus subtilis.* Microbial cell factories, 2011. **10**(1): p. 1-9.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-05]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.4.9.1]

Biotechnology-Tarbiat Modares University

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*

Leila Saleki[1], Ahmad Homaei[2*], Fatemeh Shayesteh [3]

1. MSc Student in Marine Biology, Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran
2. Associate Professor of Biochemistry, Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran
3. Assistant Professor of Fisheries Science (Marine), Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.

*Corresponding author**:** a.homaei@hormozgan.ac.ir

Abstract

The aim of this study was to isolate and identify □-amylase-producing bacteria present in mangrove ecosystems on Qeshm Island, Hormozgan, Iran. Samples of mangrove leaves and roots were screened for □-amylase activity using Lugol's solution. Crude extracts were prepared of positive samples, and their □-amylase activity was determined by the Bernfeld method. The two strains with the highest activity were identified by molecular analysis of their 16S rRNA genes. □-Amylase production and activity were optimized by varying temperature and pH. 46 bacterial strains were isolated from mangrove tree leaf and root samples. Of these, 28 strains were capable of producing □-amylase. 16S rRNA gene sequence analysis of two strains with the highest enzyme production identified them as *Bacillus* sp. strain HR10 and *Bacillus* sp. strain HR11. The optimum temperature for enzyme production was 35 and 30 °C for strains HR10 and HR11, respectively, and the optimum pH was pH 8 for both strains. The highest enzyme activity was observed at 70 °C and 60 °C for the HR10 and HR11 strains, respectively, and the optimum pH was pH 8 for both strains. In conclusion, we have shown that bacteria isolated from mangrove leaf and root samples are potential source of□ □-amylases, tolerating a wide range of temperature and pH. Such □-amylases may be of interest for use in environmentally friendly industries.

Keywords: α- Amylase, Optimum temperature, 16S rRNA, Mangrove, *Bacillus*, Qeshm Island

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-05]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1400.12.4.9.1]