فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال چهارم، شماره ۱۵، پاییز ۱۳۹۴، صفحه ۹۹- ۱۰۸
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۲/۱۴ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۶/۰۴

بررسی اثر محیط کشت‌های مختلف در تولید آنزیم آمیلاز توسط یک سویه بومی *باسیلوس سوبتیلیس*

زیبا اکبری: کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران، akbari.ziba@yahoo.com
هاشم نیری *: استادیار بیوشیمی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی ،اصفهان، ایران، nayeri@iaufala.ac.ir
کیوان بهشتی مآل: استادیار میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران، behestimaal@iaufala.ac.ir

چکیده

مقدمه: آمیلاز از مهم‌ترین آنزیم‌هایی است که در زیست فناوری اهمیت زیادی دارد. آمیلاز با کاربرد تجاری، به‌طور گسترده از جنس‌های *باسیلوس* به دست می‌آید. هدف از پژوهش حاضر، شناسایی و جداسازی *باسیلوس* مولد آنزیم آمیلاز، تعیین فعالیت آنزیم آمیلاز و بررسی اثر تعدادی محیط کشت بر تولید این آنزیم است.

مواد و روش‌ها: نمونه‌های خاک از منطقه کشاورزی و آب از تالاب چغاخور در استان چهارمحال و بختیاری و نمونه‌های پساب از کارخانه مواد غذایی در استان اصفهان به شکل تصادفی جمع‌آوری شد. برای غربال‌گری سویه‌های مولد آنزیم آمیلاز، از محیط نشاسته آگار استفاده شد. فعالیت آنزیم آمیلاز با روش دی نیتروسالیسیلیک اسید (DNS) اندازه‌گیری شد. اثر محیط کشت‌های تریپتیکیس سوی براث (TSB)، نوترینت براث (NB)، محلول عصاره مخمر، شیر و ملاس چغندر بر تولید آنزیم آمیلاز بررسی شد.

نتایج: از بین جدایه‌های مولد آنزیم آمیلاز، یک سویه جدا شده از پساب دارای بیش‌ترین فعالیت آنزیم بود. با توجه به جدول *باسیلوس‌های* کتاب برگی و شناسایی مولکولی، نمونه جداسازی شده به گونه *باسیلوس سوبتیلیس* متعلق بود. فعالیت آنزیم آمیلاز توسط *باسیلوس سوبتیلیس* در محیط تولید برابر با ۷/۲۱ (یونیت/ میلی‌لیتر) اندازه‌گیری شد.

بحث و نتیجه‌گیری: در پژوهش حاضر، سویه *باسیلوس سوبتیلیس* جدا شده از پساب میزان در خور توجهی از تولید آنزیم معادل ۷/۲۱ (یونیت/ میلی‌لیتر) را نشان داد. در بین محیط‌های کشت بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم آمیلاز حاصل از *باسیلوس سوبتیلیس* در محیط ملاس چغندر مشاهده شد. با توجه به پژوهش حاضر استفاده از سویه‌های *باسیلوس* برای دستیابی به آنزیم آمیلاز روشی کارآمد است.

واژه‌های کلیدی: آنزیم آمیلاز، *باسیلوس سوبتیلیس*، پساب، محیط کشت

* نویسنده مسؤول مکاتبات

Copyright © 2015, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

آمیلازها آنزیم‌هایی هستند که نشاسته را هیدرولیز می‌کنند. دانه‌های نشاسته در آب سرد نا محلول بوده و بیشتر به آنزیم‌ها و مواد شیمیایی مقاوم هستند (۱). در واقع نشاسته پلیمری از گلوکز است که به واسطه پیوندهای گلیکوزیدی به یکدیگر متصل شده‌اند (۲). آمیلازها از مهم‌ترین آنزیم‌ها در زیست فناوری محسوب می‌شوند و اهمیت آن‌ها به علت کاربرد گسترده این آنزیم‌هاست. آمیلازها کاربردهای وسیعی در صنایع مختلف نظیر نساجی، کاغذسازی، شوینده‌ها، نانوایی و صنایع غذایی اعم از تهیه شربت‌های فروکتوز و گلوکز، آب میوه‌ها، شیرین کننده‌ها و نوشیدنی‌های الکلی دارند. کاربرد این آنزیم‌ها امروزه در زمینه پزشکی و شیمی تجزیه نیز گسترده شده است (۳- ۶). اگر چه بسیاری از گیاهان، جانوران و میکروارگانیسم‌ها توانایی تولید آنزیم آمیلاز را دارند ولی این آنزیم با منشاء میکروبی دارای مصارف صنعتی است (۲، ۶ و ۷). در این بین، جنس *باسیلوس* طیف وسیعی از آنزیم‌های خارج سلولی از قبیل آمیلاز را تولید می‌کند که کاربرد مهمی در صنعت دارد. از *باسیلوس‌های* مولد آنزیم آمیلاز می‌توان به *باسیلوس سوبتیلیس*، *باسیلوس لیکنی فورمیس*، *باسیلوس سرئوس* و *باسیلوس پلی میکسا* اشاره کرد (۲، ۷ و ۸). تولید آنزیم آمیلاز به مواردی از قبیل سویه‌ها، ترکیب محیط کشت، روش کشت، رشد سلول و زمان گرماگذاری بستگی دارد (۹). باتوجه به این که برای تولید آنزیم‌های صنعتی نیاز به سویه مناسب و سپس، فناوری مربوط است، هدف از پژوهش حاضر جداسازی سویه برتر مولد آنزیم آمیلاز از منابع مختلف شامل خاک، پساب و آب، تعیین میزان فعالیت آنزیم آمیلاز و بررسی اثر تعدادی محیط‌های کشت بر تولید آنزیم آمیلاز توسط این سویه است.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی: در پژوهش حاضر از محیط کشت نوترینت آگار، محیط کشت نشاسته آگار، محیط تریپتیکیس سوی براث، نوترینت براث، لوگول، نشاسته سیب زمینی، دانه سویا، عصاره گوشت، کلسیم کلراید، سولفات منیزیم، فسفات پتاسیم و عصاره مخمر محصول شرکت مرک [1] آلمان و همچنین، از دی‌نیتروسالیسیلیک اسید، بافر سدیم فسفات، نشاسته محلول ویژه سنجش و مالتوز محصول شرکت سیگما [2] آمریکا استفاده شد.

نمونه‌گیری از منابع مختلف:

نمونه‌گیری از خاک: نمونه‌های خاک کشاورزی از استان چهارمحال و بختیاری در ظروف تمیز و استریل جمع‌آوری شد. با رعایت شرایط استریل پس از خشک شدن، نمونه‌ها به خوبی ساییده و نرم شدند و از صافی یا الک‌های ریز عبور داده شدند.

نمونه‌گیری از آب: نمونه‌های آب از قسمتی از تالاب چغاخور از عمق حدود ۶۰ سانتی‌متر در ظروف استریل یک لیتری جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. علت انتخاب این عمق، همجواری زمین‌های کشاورزی زیر کشت غلات با این قسمت از تالاب بود.

نمونه‌گیری از پساب: نمونه‌های پساب از کارخانه‌های بستنی‌سازی، کیک و نوشابه‌سازی در استان اصفهان که حاوی نشاسته و ترکیبات الیگوساکاریدی است، در ظروف تمیز و استریل جمع‌آوری شد.

تهیه رقت از نمونه‌ها:

رقیق‌سازی نمونه خاک: از هر نمونه خاک با استفاده از کاغذ تمیز و ترازوی دقیق مقدار یک گرم وزن شده و در کنار شعله به لوله آزمایش حاوی ۹ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه شد تا رقت ۰/۱ به دست آید. به علت این که مقدار باکتری‌ها و اسپورهای موجود

درخاک بسیار زیاد است برای جداسازی دقیق آن‌ها از رقت 10^{-1} تا 10^{-5} استفاده شد.

رقیق‌سازی نمونه آب و پساب: از نمونه‌های آب و پساب جمع‌آوری شده در شرایط استریل مقدار ۱ میلی‌لیتر در کنار شعله به لوله آزمایش حاوی ۹ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه شد. پس از به دست آمدن رقت ۰/۱ از نمونه پساب، رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-5} تهیه شد. سپس، برای یکسان بودن شرایط آزمایش از نمونه آب نیز مشابه با دو نمونه خاک و پساب رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-5} تهیه شد.

کشت نمونه‌ها: نمونه‌های خاک، آب و پساب بر روی محیط نوترینت آگار به شکل خطی کشت و خالص‌سازی شد. سپس، با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم و مشاهدات میکروسکوپی تعیین هویت مقدماتی شد.

غربال‌گری گونه مناسب مولد آنزیم آمیلاز: برای غربال‌گری گونه مناسب مولد آنزیم آمیلاز در ابتدا از محیط کشت نشاسته آگار استفاده شد و محیط‌های کشت برای مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند (۶ و ۹). رنگ محیط کشت نشاسته آگار به علت وجود نشاسته کدر است و گونه‌ای که بتواند نشاسته را هیدرولیز کند باعث شفاف شدن محیط می‌شود. بنابراین، پس از ۴۸ تا ۷۲ ساعت گونه‌هایی که در اطراف کلونی تک خود هاله شفاف ایجاد کرده بودند مولد آنزیم آمیلاز بوده و برای مراحل بعد انتخاب شدند. برای تایید عمل هیدرولیز نشاسته از معرف لوگول استفاده شد که رنگ آبی تیره معرف لوگول در محیط کشت نشاسته آگار، در جایی که هاله حاصل از هیدرولیز نشاسته وجود دارد به رنگ آبی کم رنگ تا بی رنگ متمایل می‌شود.

تولید آمیلاز: مقدار ۳۰ میلی‌لیتر محیط تریپتیکیس سوی براث در یک ارلن تمیز تهیه شد. پس از استریل شدن با *باسیلوس* تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و در شیکر با سرعت ۱۵۰ دور بر دقیقه [3] گرماخانه گذاری شد. پس از فعال شدن جدایه *باسیلوس* در محیط تریپتیکیس سوی براث، سوسپانسیون باکتریایی با رقت $10^{8} \times 1/5$ به میزان ۲ میلی‌لیتر در شرایط استریل و در کنار شعله به محیط تولید آنزیم تلقیح شد. ترکیبات محیط تولید آنزیم (۱۰) بر حسب گرم بر لیتر شامل: نشاسته سیب زمینی (۱۰)، دانه سویا (۴)، عصاره گوشت (۳)، کلسیم کلراید (۰/۵)، سولفات منیزیم (۰/۳) و فسفات پتاسیم (۱) است. گرماگذاری محیط تولید به مدت ۱۴۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۵۰ دور بر دقیقه انجام شد.

سنجش فعالیت آنزیم آمیلاز: برای بررسی میزان فعالیت آنزیم آمیلاز تولید شده از روش DNS [4] استفاده شد. (۷ و ۱۱) برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آمیلاز در ابتدا از ۰/۵ میلی‌لیتر آنزیم خام، ۰/۵ میلی‌لیتر محلول نشاسته ۱ درصد و بافرسدیم فسفات با اسیدیته ۶/۹ استفاده شد. سپس، از ۰/۵ میلی‌لیتر معرف رنگی دی‌نیتروسالیسیلیک اسید (DNS) برای توقف واکنش استفاده شد (۷، ۹ و ۱۰). جذب نوری محلول در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. بنا بر روش استفاده شده یک واحد فعالیت آنزیم آمیلاز برابر با مقدار آنزیمی است که بتواند یک میکرومول قند احیا کننده را در مدت یک دقیقه در شرایط واکنش آزاد کند. بدین ترتیب نمونه‌های منتخب بر اساس این روش مقایسه و برترین سویه انتخاب شد.

رسم منحنی استاندارد مالتوز: برای محاسبه میزان فعالیت آمیلاز نمونه‌های جدا شده، از منحنی استاندارد مالتوز استفاده شد. برای ترسیم منحنی استاندارد، از

مالتوز با رقت‌های ۰/۱، ۰/۴ ، ۰/۸ ، ۱/۲، ۱/۶، ۲ و ۴ درصد آب دو بار تقطیر و معرف رنگی دی‌نیتروسالیسیلیک اسید استفاده شد.

شناسایی باکتری مولد آنزیم آمیلاز

ویژگی‌های بیوشیمیایی: برای شناسایی سویه‌های *باسیلوس* از آزمون‌های بیوشیمیایی *باسیلوس‌ها* استفاده شد (۹ و ۱۲).

ویژگی‌های مولکولی: سویه برتر غربال شده بر مبنای مشاهدات بالا برای شناسایی مولکولی انتخاب شد. عمل PCR با استفاده از دو آغازگر:

FD1:5' AGAGTTTGATCCTGGCTTAG 3'
RD1: 5' TAAGGAGGTGATCCAGCC 3'

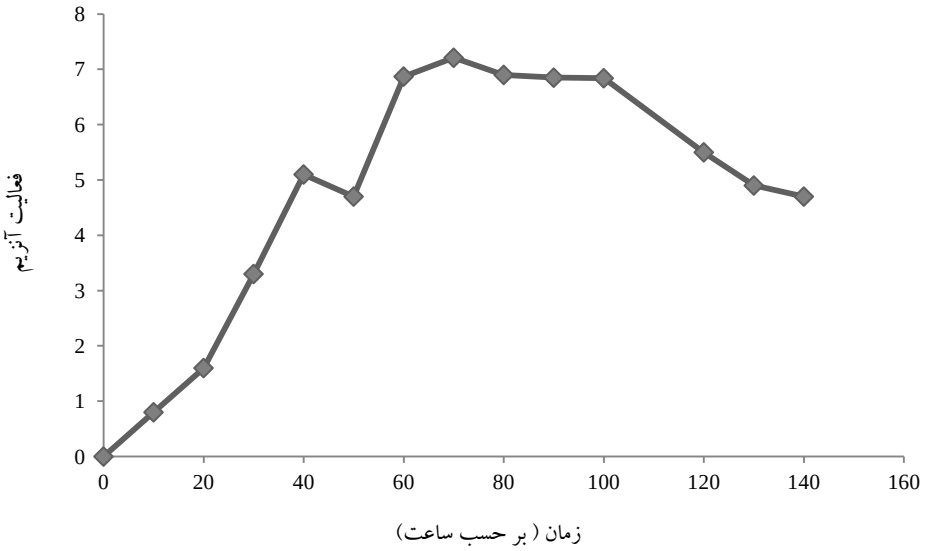
انجام شد. برای شناسایی فیلوژنتیکی پس از انجام PCR و الکتروفورز روی ژل آگارز، قطعات تکثیر و خالص شده تعیین توالی شد. سپس، مقایسه توالی *16s rDNA* *باسیلوس* جدا شده با توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعات ژنومی با استفاده از نرم افزار بلاست [۵] انجام شد.

بررسی اثر محیط کشت‌های مختلف بر تولید آنزیم آمیلاز: اثر محیط کشت‌های تریپتیکیس سوی براث (TSB)[۶]، نوترینت براث (NB)[۷] محلول عصاره مخمر، شیر و ملاس چغندر بر تولید آنزیم آمیلاز توسط سویه برتر جدا شده بررسی شد. قبل از کشت میکروب در این محیط‌ها ابتدا تمام این محیط‌ها با روش ساخت خاص خود تهیه شد. برای فعال‌سازی *باسیلوس* که در مرحله غربال‌گری انتخاب شد از محیط کشت مایع تریپتیکیس سوی براث استفاده شد. سپس، از سوسپانسیون باکتریایی با رقت $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ به میزان ۲ میلی‌لیتر در شرایط استریل به هر یک از محیط‌های کشت اضافه شد. محیط‌ها در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۵۰ دور بر دقیقه قرار گرفتند. سپس، سنجش به روش دی نیتروسالیسیلیک اسید انجام گرفت.

نتایج

نتایج حاصل از کشت نمونه‌ها: در ابتدا نمونه‌های جمع‌آوری شده از خاک، آب و پساب، در محیط نوترینت آگار خالص‌سازی شد. از کشت نمونه‌های خاک، آب و پساب در محیط نشاسته آگار، ۲۰ جدایه توانایی هیدرولیز نشاسته را داشتند. ۱۰ جدایه قطر هاله بزرگتری را نشان دادند.

تولید آمیلاز: تولید آنزیم آمیلاز توسط ۱۰ جدایه مشخص شده در مرحله قبل که در محیط نشاسته آگار بهترین تولید آنزیم آمیلاز را از خود نشان داده بودند بررسی شد. در محیط تولید آنزیم آمیلاز شامل ۱ درصد نشاسته به عنوان القا کننده آنزیم، *باسیلوس* جدا شده از پساب بالاترین میزان تولید آنزیم را در ساعت ۷۲ و به میزان ۷/۲۱ (یونیت/ میلی‌لیتر) [۸] نشان داد. تولید آنزیم آمیلاز در این جدایه در ساعت‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶، ۱۲۰ و ۱۴۴ به ترتیب برابر با ۳/۰۳، ۴/۸، ۷/۲، ۶/۷، ۵/۵ و ۴/۷ (یونیت/ میلی‌لیتر) بود (شکل ۱).



شکل ۱- منحنی تولید آنزیم آمیلاز توسط *باسیلوس سوبتیلیس* پس از ۶ روز گرماگذاری در محیط تولید آنزیم، در ۳۰ درجه سانتی گراد، سرعت شیکر ۱۵۰ دور بر دقیقه

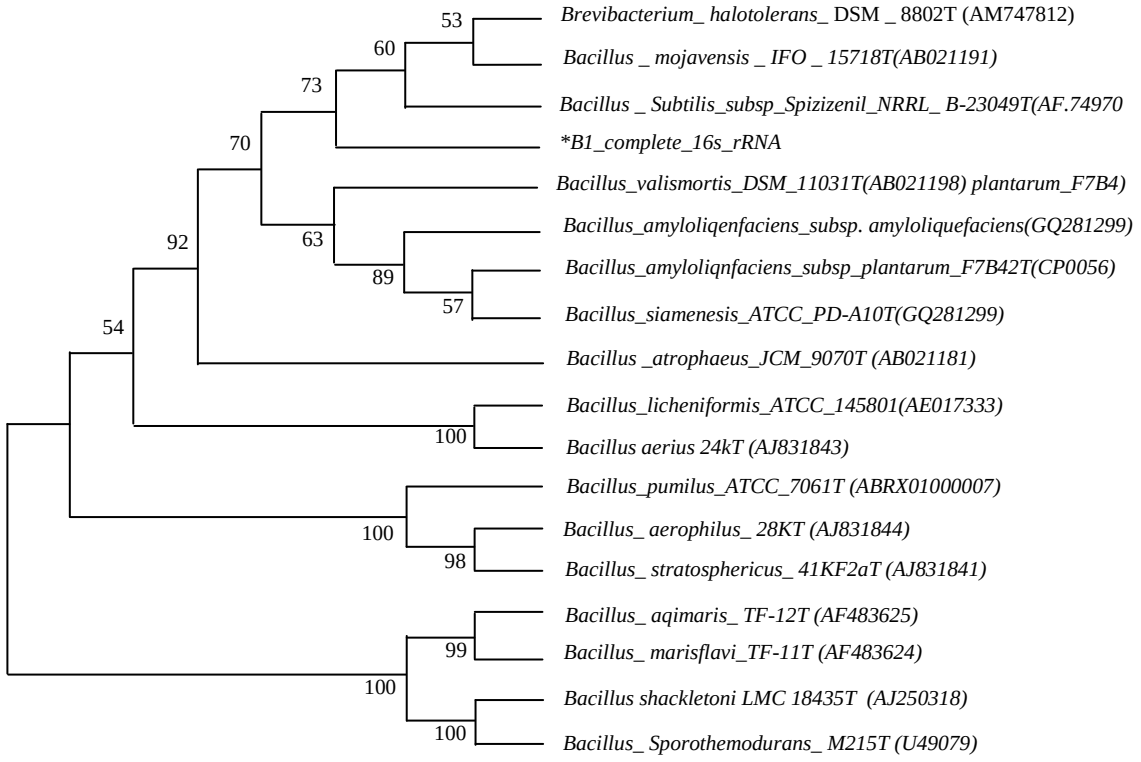
ویژگی‌های گونه باکتری:

شناسایی بر مبنای ویژگی‌های بیوشیمیایی: برای شناسایی دقیق جدایه‌ها از آزمون‌های بیوشیمیایی مطابق جداول برگی[۹] (۱۳) استفاده شد. نتایج مربوط به شناسایی جدایه مورد مطالعه در پژوهش حاضر در جدول ۱ نشان داده شده است.

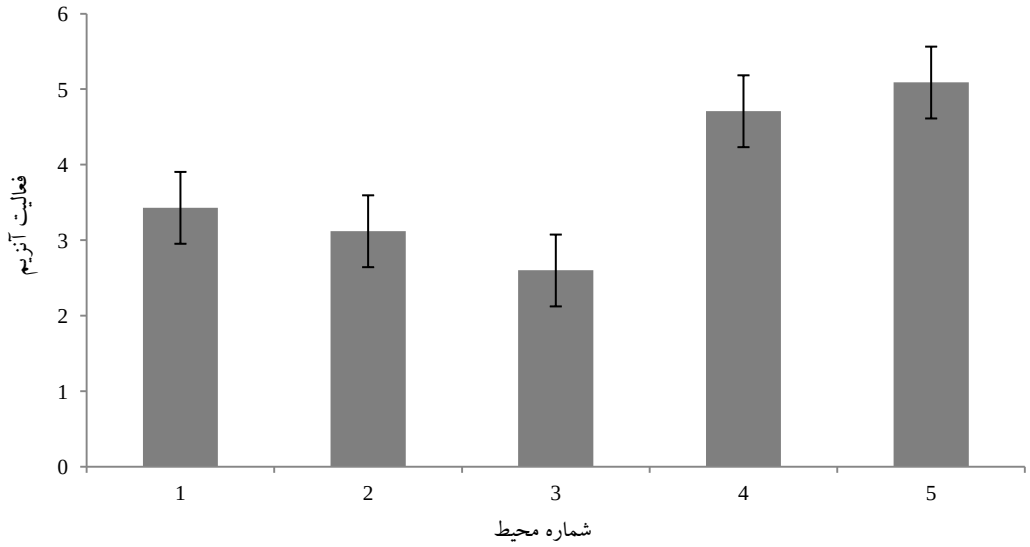
شناسایی مولکولی: از بین سویه‌های جدا شده نمونه‌ای که دارای بیش‌ترین قطر هاله حاصل از هیدرولیز نشاسته در محیط نشاسته آگار و همچنین، بیش‌ترین میزان تولید را در محیط تولید آنزیم داشت برای ادامه پژوهش انتخاب شد. *باسیلوس* مورد نظر بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی مطابق با جدول شناسایی برگی و تحلیل توالی ژنومی *16s rDNA* شناسایی شد. *باسیلوس* شناسایی شده با *باسیلوس سوبتیلیس* تشابهی زیادی را نشان داد. آزمون‌های بیوشیمیایی در جدول ۱ و تصویر درخت فیلوژنی در شکل ۲ آورده شده است.

جدول ۱- شناسایی جدایه *باسیلوس سوبتیلیس* توسط ویژگی‌های ظاهری و آزمون‌های بیوشیمیایی

ویژگی‌های بیوشیمیایی	آزمون لیستیناز	منفی
	آزمون هیدرولیز کازئین	مثبت
	آزمون هیدرولیز نشاسته	مثبت
	آزمون هیدرولیز ژلاتیناز	مثبت
	آزمون تخمیر قند گلوگز	مثبت
	تخمیر قند مانیتول	مثبت
	آزمون تخمیر قند گزیلوز	مثبت
	آزمون تخمیر قند آرابینوز	مثبت
	آزمون هیدرولیز اوره	منفی
	آزمون vp	مثبت
	آزمون احیای نیترات	مثبت
	آزمون تجزیه سیترات	مثبت
	توانایی رشد در شرایط بی‌هوازی	منفی
	کاتالاز	مثبت
	رشد در کلراید سدیم ۲ درصد	مثبت
	رشد در کلراید سدیم ۵ درصد	مثبت
	رشد در کلراید سدیم ۷ درصد	مثبت



شکل ۲- درخت فیلوژنی برای *باسیلوس سوبتیلیس*



شکل ۳- مقایسه تولید آنزیم آمیلاز حاصل از *باسیلوس سوبتیلیس* در محیط‌های کشت: محیط شماره ۱ TSB، محیط شماره ۲ NB، محیط شماره ۳ عصاره مخمر، محیط شماره ۴ محیط شیر و محیط شماره ۵ محیط ملاس چغندر پس از ۷۲ ساعت (زمان حداکثر تولید) با سرعت شیکر ۱۵۰ دور بر دقیقه

اثر محیط کشت‌های مختلف بر تولید آنزیم آمیلاز:
محیط‌های تریپتیکیس سوی براث و نوترینت براث که به عنوان محیط‌های غنی کننده میکروارگانیسم‌ها در آزمایشگاه‌ها استفاده می‌شود، تولید در خور توجهی از این آنزیم را نشان ندادند. کم‌ترین فعالیت آنزیم آمیلاز در محیط عصاره مخمر مشاهده شد. در سه محیط TSB، NB و عصاره مخمر سوبسترای مناسب و کافی در اختیار آنزیم وجود ندارد. در محیط ملاس و محیط شیر نسبت به سایر محیط‌ها تولید بالاتری از آنزیم مشاهده شد. محیط ملاس و محیط شیر دارای ترکیبات قندی مانند الیگو ساکاریدها و دی ساکاریدهاست. همچنین، در هر دو محیط حضور کلسیم در بهبود فعالیت آنزیم آمیلاز مؤثر است. جدایه *باسیلوس سوبتیلیس* در محیط ملاس بهترین تولید آنزیم آمیلاز را نشان داد. فعالیت آنزیم آمیلاز حاصل از *باسیلوس سوبتیلیس* در محیط ملاس پس از ۷۲ ساعت معادل با ۵/۰۴۱ (یونیت/ میلی‌لیتر) بود. کم‌ترین فعالیت آنزیم آمیلاز در مورد *باسیلوس سوبتیلیس* در محیط عصاره مخمر و معادل ۲/۶۶۶ (یونیت/ میلی‌لیتر) اندازه‌گیری شد. که نتایج حاصل از آن در شکل ۳ آورده شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

آمیلاز از مهم‌ترین آنزیم‌ها در زیست فناوری است که با منشاء میکروبی، مصارف صنعتی وسیعی دارد. آمیلاز با کاربرد تجاری به‌طور گسترده از جنس‌های *باسیلوس* به دست می‌آید. در پژوهش حاضر، جداسازی *باسیلوس* از خاک، آب و پساب انجام گرفت. در حالی که در بیشتر مطالعاتی که جداسازی انجام شده سویه‌ها از یک منبع، نمونه خاک یا آب جمع‌آوری و جداسازی شدند. یاسوری نجفی [۱۰] و همکاران جداسازی *باسیلوس* مولد آمیلاز را از نمونه خاک انجام دادند (۱۵). آشوینی [۱۱] و همکاران *باسیلوس* مولد آمیلاز را از نمونه آب جداسازی کردند (۱۳). بوزیک [۱۲] و همکاران در پژوهشی برای تولید α-آمیلاز هضم کننده نشاسته خام از استوک فریز شده *باسیلوس لیکنی فورمیس* ATCC9945a استفاده کردند (۸). در این مطالعه، شناسایی سویه‌های *باسیلوس* به وسیله آزمون‌های بیوشیمیایی انجام گرفت. تایید آزمون‌های مربوط به جدایه برتر در آزمایش‌های حاضر از روش شناسایی مولکولی نیز استفاده شد. در بیشتر مطالعات مشابه از آزمون‌های بیوشیمیایی برای شناسایی سویه‌های *باسیلوس* استفاده شده است. ادیانجو [۱۳] و همکاران باسیلوس لیکنی فورمیس را بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی شناسایی کردند (۶). خان الام [۱۴] و همکاران برای شناسایی *باسیلوس سوبتیلیس* از آزمون‌های بیوشیمیایی استفاده کردند (۱۰). در این مطالعه برای غربال‌گری باکتری‌های مولد آنزیم آمیلاز از محیط نشاسته آگار استفاده شد. گویال [۱۵] از محیط نشاسته آگار برای غربال‌گری *باسیلوس*‌های مولد آنزیم آمیلاز استفاده کرد (۱). آشوینی نیز برای غربال‌گری *باسیلوس‌های* مولد آنزیم آمیلاز از محیط نشاسته آگار استفاده کرد. رشد در محیط نشاسته آگار و هیدرولیز نشاسته حکایت از ترشح آنزیم آمیلاز خارج سلولی دارد که در پژوهش حاضر از این محیط استفاده شد و نتایج رضایت بخشی داشت. در مطالعه حاضر، *باسیلوس* جدا شده از پساب میزان قابل توجهی از تولید آنزیم آمیلاز را نشان داد. قوربل [۱۶] و همکاران بالاترین میزان تولید آنزیم آمیلاز توسط سویه *باسیلوس* را ۲/۱ (یونیت/ میلی‌لیتر) بیان کردند (۱۶). همدیت [۱۷] و همکاران میزان تولید آنزیم آمیلاز توسط *باسیلوس* را ۴/۸ (یونیت/ میلی‌لیتر) اعلام کردند (۱۷).

در پژوهش حاضر، اثر محیط‌های تریپتیکس سوی براث، نوترینت براث، محلول عصاره مخمر، شیر و ملاس چغندر بر تولید این آنزیم آزمایش شد. محیط ملاس چغندر و محیط شیر، به نسبت تولید آنزیم بیشتری را القا می‌کنند و در این بین محیط ملاس چغندر سبب تولید آنزیم آمیلاز بیشتری نسبت به محیط شیر می‌شود. محیط شیر در ترکیب خود دارای قند گالاکتوز و لاکتوز بوده و محیط ملاس دارای قند رافینوز، ساکاروز و فروکتوز است. گویال در مطالعه‌ای اثر ترکیبات قندی از قبیل ساکارز، فروکتوز، لاکتوز و گالاکتوز را بر تولید آنزیم آمیلاز به وسیله سویه *باسیلوس* بررسی کرد و نشان داد که این ترکیبات قندی سبب القا تولید آنزیم آمیلاز می‌شوند (۱). از طرفی محیط شیر و محیط ملاس دارای عنصر کلسیم در ترکیب خود هستند. ادیانجو نیز اثر مثبت کلسیم را بر فعالیت آنزیم آمیلاز عنوان کرد (۶). احمدی[۱۸] بیان داشت که کلسیم بر تولید آنزیم آمیلاز اثر مثبت دارد (۱۱). این طور استنباط می‌شود که ترکیبات موجود در محیط شیر و محیط ملاس سبب القا تولید آنزیم آمیلاز بیشتری نسبت به سایر محیط‌ها می‌شود. در این بین محیط ملاس چغندر محیط تولید به صرفه‌ای است و در مقایسه با سایر محیط‌های استفاده شده به طور رضایت بخشی سبب تولید آنزیم آمیلاز شد.

سویه *باسیلوس سوبتیلیس* سطح مطلوبی از آنزیم آمیلاز را تولید می‌کند و این سویه می‌تواند به عنوان یک سویه صنعتی مناسب در سطح تجاری مطرح شود. همچنین، میزان تولید آنزیم آمیلاز توسط این سویه در محیط کشت‌های صنعتی می‌تواند با بهینه‌سازی شرایط تولید افزایش یابد.

تشکر و قدردانی

از آقای سجاد خدارحمی تشکر و قدردانی می‌شود.

References

(1) Goyal N., Gupta J K., Soni S K. 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* 2005; 37: 723- 34

(2) De Souza M P., De Oliviera E M P. Application of microbial α-amylase in industery- A Review. *Brazilian Journal of Microbiology* 2010; 41: 850- 61

(3) Aiyer Prasanna V. Amylases and their applications. *African Journal of Biotechnology* 2005; 4 (13): 1525- 9.

(4) Burhan A., Coral U N., Colak G., Aygan Ashabil O. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus sp*. isolate ANT-6. *Process Biochemistry* 2003; 38: 1397- 403.

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

(6) Adeyanju M M., Agboola FK., Omafuvbe B O., Oyefuga O H., Adebawo O O. A thermostable extracellulare α-amylase from *Bacillus licheniformis* isolated from cassava steep water. *Biotecnology* 2007; 6 (4): 473- 80.

(7) Kaboosi H, Tabari N, Samadlouie H, Optimization of α-amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens* using response surfaces methodology. *Biological Journal of Microorganism* 2014; 3(11): 79-90.

(8) Bozic N., Ruiz J., Lopez –Santin J., Vujcic Z. Production and properties of the highly efficient raw starch digesting α-amylase from a *Bacillus licheniformis* ATCC9945a. *Biochemical Engineering Journal* 2010; 5248- 255.

(9) Thaddeus C E., Hubert B. Purification, characterization, and synergistic action of phytate-resistant α-amylase and α-glucosidase from *Geobacillus thermodenitrificans* HRO10. *Journal of Biotechnology* 2006; 125: 27- 38.

(10) Khan A J., Priya R. A study on partial purification and characterization of exteracellular amylase from *Bacillus subtilis. Advances in Applied Science Research* 2011; 2 (3): 509- 19.

(11) Ahmadi A., Ghobadia S., Khajeh K., Nomanpour B., Badoei Dalfard A. Purification of α-Amylase from Bacillus sp. GHA1 and Its Partial Characterization. *Journal Iran Chemical Society* 2010; 7 (2) 432- 40.

(12) Bernfield P. Amylases α and β. In Methods in Enzymology edited by Colowich SP Kaplan. 1955; 1: 149- 58.

(13) Ashwini K., Gaurav K., Karthik L., Bhaskara Rao K V. Optimization, production and partial purification of extracellular α- amylase from *Bacillus* sp. marini. *Archives of Applied Science Research* 2011; 3 (1): 33- 42.

(14) Holth J G., Krieg N R., Sneath P H A. Staley J T Williams S T. Bergeys manual of determination bacteriology. 9th ed. U. S. A: Williams and Wilkins; 1994.

(15) Yasouri Najafi F., Rasa M., Sarir R. Extracellular and purification of a thermostable α-amylase from *Bacillus coagulans* found in Iranian soil sample. *International Journal of Chemical Science* 2003; 1 (4): 322- 40.

(16) Ghorbel R E., Maktouf S., Massoud E B., Bejar S., Chaabouni S E. New Thermostable Amylase from *Bacillus cohnii* US147 with a Broad pH Applicability. *Applied Biochemistery Biotechnology* 2009; 157:50- 60.

(17) Hmidet N., Maalej H., Haddar A., NasriA M. A Novel α-Amylase from *Bacillus mojavensis* A21: purification and Biochemical Characterization. *Applied Biochemistery Biotechnology* 2010; 162: 1018- 30.

---

[1]- MERCK
[2]- Sigma
[3]- r. p. m
[4]- 3, 5- Dinitrosalicylic Acid Solution
[5]- BLAST
[6]- Tripticase Soy Broth
[7]- Ntrient Broth
[8]- U/ml
[9]- Bergey
[10]- Yasouri Najafi
[11]- Ashwini
[12]- Bozic
[13]- Adeyanju
[14]- Khan Alam
[15]- Goyal
[16]- Ghorbel
[17]- Hmidet
[18]- Ahmadi

A Study on Effect of different culture media on amylase enzyme production by a native strain of *Bacillus subtilis*

Ziba Akbari
M.Sc. of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad Univercity, Isfahan, Iran, akbari.ziba@yahoo.com
Hashem Nayeri *
Assistant Professor of Biochemistery, Falavarjan Branch, Islamic Azad Univercity, Isfahan, Iran, nayeri@iaufala.ac.ir
Keivan Beheshtimaal
Assistant Professor of Macrobiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad Univercity, Isfahan, Iran, behestimaal@iaufala.ac.ir

Abstract

Introduction: Amylases are among the most important enzymes and have great significance in present-day biotechnology. Amylase with commercial applications is mainly derived from the genus *Bacillus*. The main purpose of this study is identification and isolatation amylase enzyme producer *Bacillus*, determining the amylase enzyme activity and affecting a number of culture medium on amylase enzyme production.

Materials and methods: Soil, water and wastewater samples were collected from agricultural area, choghakhor lake in chahar mahal e bakhtiari province and from food factory in Esfahan. *Bacillus* isolates were screened for amylolytic properties by starch hydrolysis test on starch agar plate. Amylase producing *Bacillus* were identified biochemical tests and molecular experiments. Amylase enzyme activity of isolates was measured using di-nitro salicylic acid (DNS) method. Enzyme production was studied in variose medium culture TSB, NB, Yeast extract, molases and milk medium.

Results: The enzyme amylase-producing strains, one sample showed was the highest amylase activity. The *Bacillus* has been detected as a member of *Bacillus subtilis* according to Bergey's Manual of Systematic Bacteriology and molecular recognition. The enzyme activity of *Bacillus subtilis* was measured 7/21 (U/ml) in production media. Trough medium culture maximum amylase production for *Bacillus subtilis* was achieved in molases medium.

Discussion and conclusion: In this study, *Bacillus subtilis* strains isolated from wastewater of a significant amount of enzyme producing 7/21 (U/ml) as indicated. Among the medium-amylase from *Bacillus subtilis* highest enzyme activity was observed in beet molasses. According to this study, the use of *Bacillus* strains is an efficient way to achieve the amylase enzyme.

Key words: Amylase, *Bacillus subtilis*, Culture medium, Wastewater

* Corresponding author
Received: March 5, 2014 / **Accepted:** August 26, 2014