Isolation and identification of a thermophilic alpha-amylase-producing Bacillus strain from hot water sources in Auj city

Nazanin zahra Eftekhar[1], **Behzad Hemati**[1*]

[1] Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Karaj Branch, Islamic Azad University, Iran.

Received Date:2024.11.04 Accepted Date:2025.02.04

Abstract

Alpha-amylases are the most important and widely used amylases in industry. Among alpha-amylases, thermophilic strains are of particular importance due to their stability and activity at high temperatures. In this study, sampling, isolation, and screening of alpha-amylase-producing bacterial strains, identification of the isolated bacterial strain, measurement of enzyme activity, measurement of alpha-amylase activity, effect of different carbon sources on alpha-amylase enzyme production, investigation of the effect of pH on alpha-amylase enzyme production, investigation of alpha-amylase enzyme thermal activity, investigation of alpha-amylase enzyme thermal stability were performed, respectively. Based on the results of screening in special liquid and solid media, two strains with codes TSG59 and TSG70 were selected as superior strains. Molecular biochemical identification showed that TSG59 and TSG70 had the highest similarity to Bacillus licheniformis. The results of the optimization of the enzyme production medium showed that the production of bi-strain alpha-amylase TSG59 and TSG70 was highest in a medium containing 5 g/L starch, 2 g/L peptone, 1 g/L calcium chloride and pH 5, respectively, and in a medium containing 5 g/L starch, 2 g/L ammonium chloride, 1 g/L calcium chloride and pH 8. The maximum activity and stability of alpha-amylase TSG59 was observed at a temperature of 50 degrees Celsius, and for alpha-amylase TSG70, respectively, 60 and 70 degrees Celsius were achieved, the thermal stability of both TSG59 and TSG70 was improved by adding 20 mM calcium chloride.
.

Keywords: Alpha-amylase, Production, Friend heat enzymes, Temperature activity, and Temperature stability

[*]hematibehzad71@gmail.com

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

EXTENDED ABSTRACT

Introduction: Thermophilic microorganisms are organisms that are compatible with optimal growth at high temperatures (above 55 degrees Celsius) and have been isolated from marine and terrestrial locations with high temperatures. The most common of these places are hot springs and deserts. Thermophilic microorganisms are known as a source of enzymes that show high resistance both chemically and physiologically and are able to catalyze chemical reactions at higher temperatures than the enzymes of mesophilic microorganisms. One of the important points about thermophilic microorganisms is the ability to produce thermophilic amylolytic enzymes with high efficiency, which are used in starch processing and sugar production, textile industry, and detergents. Alpha-amylases are one of the most common and important industrial amylases that randomly cleave α (4→1) bond between adjacent glucose units in the linear chain of amylose in starch carbohydrates.

Materials and methods: From the spa springs of Auj city in Qazvin province, 500 ml of water and sediment samples were collected from the spring in this area with an approximate temperature of 70 degrees Celsius, inside sterile falcons. In order to maintain the temperature in the springs, the falcons were transferred to the laboratory inside the flask. 10 ml of spring water was centrifuged at 3000xg for 20 minutes. In order to isolate the bacteria producing Gramadost alpha-amylase, at first, 5 ml of the collected samples containing bacteria were added to a special liquid medium containing a gram of starch, one gram of potassium dihydrogen phosphate, 2 grams of tryptone, 2 grams of ammonium sulfate, 0.05 grams of magnesium sulfate, 0.05 grams of calcium chloride and 3.13 grams of dihydrogen phosphate per liter of water. Distillation was added to enrich the considered bacteria. In order to identify the isolated strains, a number of biochemical-microbial tests such as gram staining, catalase test, gelatin hydrolysis test were performed based on the systematic book of foliar bacteriology. In order to confirm the hydrolyzability of starch and determine the amount of alpha-amylase enzyme production, alpha-amylase enzyme activity was measured based on Bernfeld's method and using dinitrosalicylic acid reagent. For this purpose, first, the selected bacteria were pre-cultured in 20 ml nutrient broth medium. To identify the suitable carbon source for alpha-amylase enzyme production, the isolated bacterial strain was cultured in the presence of different bacterial carbon sources. The effect of pH on the production of alpha-amylase enzyme was measured by adjusting the pH of the specific liquid medium in the range of 5-9. The base medium contains one gram of starch, one gram of potassium dihydrogen phosphate, 2 grams of tryptone, 2 grams of ammonium sulfate, 0.05 grams of magnesium sulfate, 0.05 grams of calcium chloride and 3.13 grams of dihydrogen phosphate per One liter of distilled water. After 48 hours of the growth of bacterial strains in these media, 5 ml of the media was centrifuged and the enzyme activity of the liquid was measured and the weight of the bacterial deposits was also measured. 0 milliliters of enzyme and 0.5 milliliters the substrate was incubated in the temperature range of 30-80 degrees Celsius for 20 minutes. Then, the reaction was stopped by adding DNS reagent and after placing the reaction mixture in the Banmari apparatus for 5 minutes, the absorbance of the mixture was read at 540 nm. At the end, by comparing the absorbances obtained with the glucose standard curve and evaluating the produced glucose concentration, the temperature activity of the enzyme was measured. To measure the temperature stability of the enzyme, first 0.5 ml of the enzyme was placed alone for one hour at temperatures of 30-80 degrees Celsius. Enzyme samples after being placed at each temperature, in order to prevent inactivation at room temperature, were kept in a refrigerator at 4 degrees Celsius.

Discussion and conclusion: In the present study, two thermophilic alpha-amylase producing strains named

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

Bacillus licheniformis AT59 and Bacillus licheniformis AT70 were isolated from hot springs located in Qazvin province. The activity and stability of the obtained enzymes were investigated in the presence of various factors, including temperature, pH, ions and various chemical compounds, and it was determined that the enzyme obtained from Bacillus licheniformis AT70 in the temperature range It showed stability from 40 to 70 degrees Celsius and it was 100% stable at 70 degrees Celsius. The temperature stability of the enzymes obtained from both sides was improved in the presence of calcium ions, while these enzymes are independent of calcium and do not need calcium ions for their activity; Therefore, the enzymes obtained in this research, especially the Bacillus licheniformis AT70 enzyme, are suitable for use in the starch processing industry, especially in the starch liquefaction stage, due to their high temperature stability. Also, the considered enzymes have shown high activity in alkaline pHs. The activity of the enzymes in question was observed in the presence of different chemical compounds such as SDS, different concentrations of salt and also commercial detergents, which indicates the widespread use of these enzymes in different industries. In addition, it was observed that the obtained enzymes had the ability to break down raw starch found in agricultural waste such as dates, and therefore this substance is suggested as a substrate for the production of alpha-amylase enzyme in the industry will be used.

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

جداسازی و شناسایی سویه بومی باسیلوس مولد آلفا آمیلاز گرمادوست از منابع آب گرم شهرستان آوج

نازنین زهرا افتخار[۱]، **بهزاد همتی**[*۱]

۱ گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۸/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۱۶

چکیده

آلفاآمیلازها، مهم‌ترین و پرکاربردترین آمیلازها در صنعت می‌باشند. در میان آلفاآمیلازها، انواع گرمادوست به دلیل پایداری و فعالیت در دماهای بالا از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. در این تحقیق، به ترتیب ابتدا نمونه برداری، جداسازی و غربالگری سویه های باکتریایی مولد آلفاآمیلاز، شناسایی سویۀ باکتریایی جداشده، سنجش فعالیت آنزیم، سنجش فعالیت آلفاآمیلاز، اثر منابع مختلف کربن بر تولید آنزیم آلفاآمیلاز، بررسی اثرpH بر تولید آنزیم آلفاآمیلاز، بررسی فعالیت دمایی آنزیم آلفاآمیلاز، بررسی پایداری دمایی آنزیم آلفاآمیلاز انجام شد. بر اساس نتایج غربالگری در محیط اختصاصی مایع و جامد، دو سویه با کدهای TSG59 و TSG70، به عنوان سویه‌های برتر انتخاب گردیدند. شناسایی بیوشیمیایی_مولکولی نشان داد TSG59 و TSG70 با *Bacillus licheniformis* بیشترین شباهت را داشته‌اند. نتایج بهینه‌سازی محیط تولید آنزیم نشان داد تولید آلفاآمیلاز دو سویه TSG59 و TSG70 به ترتیب در محیط حاوی ۵ گرم بر لیتر نشاسته، ۲ گرم بر لیتر پپتون، یک گرم بر لیتر کلسیم کلرید و ۵ pH و محیط حاوی ۵ گرم بر لیتر نشاسته، ۲ گرم بر لیتر آمونیوم کلراید، یک گرم بر لیتر کلسیم کلرید و ۸ pH بیشترین مقدار بوده است.حداکثر فعالیت و پایداری آلفاآمیلاز TSG59 در دما ۵۰ درجه سلسیوس مشاهده شد و برای آلفاآمیلاز TSG70، به ترتیب در ۶۰ و ۷۰ درجه سلسیوس به دست آمد، پایداری دمایی هر دو TSG59 و TSG70 با اضافه کردن کلسیم کلرید ۲۰ میلی‌مولار بهبود پیدا کرد.

کلید واژه ها : آلفا آمیلاز، تولید، آنزیم‌های گرما دوست، فعالیت دمایی، پایداری دمایی

* hematibehzad71@gmail.com

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

مقدمه

آنزیم‌ها، پروتئین‌های کروی هستند و همانند سایر پروتئین‌ها دارای زنجیره‌های طویلی از آمینواسیدها می‌باشند که تاخورده‌اند تا یک ساختار سه‌بعدی ایجاد شود. آنزیم‌ها مسئول واکنش‌های بیوشیمیایی ضروری زیادی در میکروارگانیسم‌ها، گیاهان، حیوانات و انسان‌ها می‌باشند(۱). این پروتئین‌ها توانایی منحصر به فردی برای تسهیل واکنش‌های بیوشیمیایی(بدون آن که دستخوش تغییر شوند) دارند؛ به طوری که بعد از انجام واکنش، آزاد شده و مجدداً مورد استفاده قرار می‌گیرند. آنزیم‌ها، کاتالیست‌های بیولوژیکی با اختصاصیت بالا می‌باشند. بعضی از آنزیم‌ها به مولکول‌های غیر پروتئینی کوچکی به نام کوفاکتور برای عمل کاتالیزوری خود نیاز دارند (۲). آن‌هامعمولاً در درجه حرارت‌های متعادل فعالیت دارند و بالاتر از دمای معین دناتوره می‌شوند(۳). همچنین آنزیم‌ها یک pH خاص دارند که در آن pH فعالیت آن‌ها ماکزیمم است. pHهای بالا روی میانکنش‌های الکترواستاتیک درون آنزیم‌ها اثر می‌گذارد و منجر به غیر فعال شدن آن‌ها می‌شوند (۴). فاکتورهای مهم دیگری که بر فرآیند آنزیمی اثر می‌گذارند، شامل زمان تیمار، مواد افزودنی مثل سورفکتانت ها، شلاتورها و استرس‌های مکانیکی می‌باشند (۵). برای هر نوع از واکنش در سلول، یک آنزیم مختلف وجود دارد. هر آنزیم توانایی شکستن ترکیب مولکولی خاصی را دارد. مولکولی که آنزیم روی آن فعالیت می‌کند، سوبسترا نامیده شده که به محصول یا محصولات تبدیل می‌شود(۶). اتصال آنزیم به سوبسترا از طریق ناحیه‌ای در مولکول آنزیم به نام جایگاه فعال صورت می‌گیرد(۷). از معمول‌ترین آنزیم‌ها، آمیلازها (نشاسته را به قندهای ساده‌تر تبدیل می‌کند)، پروتئازها (هیدرولیز پروتئین‌ها را کاتالیز می‌کنند)، سلولازها (سلولز راتجزیه می‌کنند) و لیپازها (چربی‌ها را به گلیسرول و اسیدهای چرب تبدیل می‌کنند) می‌باشند(۸). چشمه‌های آبگرم آوج که نمونه برداری از آنجا صورت گرفته آب چشمه ثابت، کارستی و دارای رسوب آهکی می باشد و همچنین از دسته آب های کلروه سدیک و بیکربناته کلسیک گرم با pH اسیدی می باشد(۹). هدف این مطالعه جداسازی و شناسایی سویه های باکتریایی گرمادوست از چشمه‌های آب گرم شهرستان آوج، به منظور تولید آنزیم آلفا آمیلاز با قابلیت استفاده در کاربردهای مختلف صنعتی، بوده است. در این تحقیق شرایط بهینه برای تولید آنزیم به دست آمده نیز تعیین می‌شود.

مواد و روش ها

نمونه برداری

از چشمه‌های آبگرم شهرستان آوج در استان قزوین ۵۰۰ میلی لیترنمونه‌های آب و رسوبات از چشمه‌ی موجود در این منطقه با دمای تقریبی ۷۰ درجه‌ی سلسیوس، در داخل فالکون‌های استریل که مجدد به روش گرمایی استریل گردید، جمع آوری شد. به منظور حفظ دمای موجود در چشمه ها، فالکون‌ها در داخل فلاسک به آزمایشگاه منتقل شدند. مقدار ۱۰میلی لیتر از آب چشمه با ۳۰۰۰×g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید(۱۰).

جداسازی و غربال گری سویه های باکتریایی مولد آلفاآمیلاز

به منظور جداسازی باکتری‌های مولد آلفاآمیلاز گرمادوست، در ابتدا میزان ۵ میلی‌لیتر از نمونه‌های جمع‌آوری شده حاوی باکتری، به محیط مایع اختصاصی حاوی یک گرم نشاسته، یک گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات، ۲ گرم تریپتون، ۲ گرم سولفات آمونیوم، ۰/۰۵ گرم سولفات منیزیم، ۰/۰۵گرم کلسیم کلرید و ۳/۱۳ گرم دی سدیم هیدروژن فسفات به ازای یک لیتر آب مقطر جهت غنی‌سازی باکتری‌های مورد نظر، اضافه گردید. سپس این محیط‌ها در شیکر انکوباتور با دمای ۵۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند. بعد از گذشت سه روز، یک میلی‌لیتر از این محیط‌ها به محیط مایع اختصاصی

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

تلقیح شد تا تعداد میکروارگانیسم‌های غیر از باکتری‌های مورد نظر به حداقل برسد. محیط‌های مایع جدید به مدت سه روز در دما ۵۵ درجه سلسیوس انکوبه شدند. بعد از این مدت، این محیط‌ها به مدت سه روز دیگر در شیکر انکوباتور نگهداری شدند (۱۰). در نهایت بعد از گذشت ۹ روز، ۱۰۰ میکرولیتر از این محیط‌ها به محیط‌های جامد اختصاصی (نشاسته-آگار) دارای یک درصد نشاسته محلول، ۰/۲ درصد عصاره مخمر ، ۰/۵ درصد پپتون، ۰/۱ درصد سولفات منیزیم، ۰/۱ درصد سدیم کلرید و ۰/۰۲ درصد کلسیم کلرید و ۱/۵ درصد آگار تلقیح و این محیط‌ها به مدت سه روز در دستگاه انکوباتور با دمای ۵۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند. بعد از این مدت، کلنی‌های رشد یافته بر روی این محیط ها جهت مطالعات بعدی مورد بررسی قرار گرفتند.

شناسایی سویهٔ باکتریایی جداشده

به منظور شناسایی نسبی سویه‌های جدا شده، تعدادی از آزمون‌های بیوشیمیایی-میکروبی از جمله رنگ آمیزی گرم، آزمون کاتالاز، آزمون هیدرولیز ژلاتین براساس کتاب سیستماتیک باکتری شناسی برگی انجام شد (۱۱).

تست رنگ‌آمیزی گرم توسط هانس کریستین گرم ابداع شد. اساس این تست، تفاوت ساختمانی دیواره سلولی باکتری‌ها می‌باشد و بر این اساس، باکتری‌ها به دو دسته گرم مثبت وگرم منفی تقسیم می‌شوند. باکتری‌های گرم مثبت به دلیل داشتن لایه پپتیدوگلیکان ضخیم در دیواره خود، رنگ کریستال ویوله (رنگ اولیه) را به خود می گیرند. باکتری‌های گرم منفی به دلیل داشتن غشای خارجی لیپیدی و همچنین لایه پپتیدوگلیکان نازک‌تر، رنگ اولیه را در حضور الکل از دست داده و رنگ سافرانین (رنگ ثانویه) را به خود می گیرند(۱۱).

تست KOH، این تست برای تعیین نوع گرم باکتری‌های مورد نظر و تکمیل کننده تست رنگ‌آمیزی گرم می‌باشد. ابتدا یک تا دو قطره از محلول KOH ۳ درصد روی یک لام تمیز قرار داده، با استفاده از یک سواب استریل در کنار شعله مقداری از کشت باکتری به آن اضافه و کاملا مخلوط گردید. در صورتی که نوع گرم باکتری منفی باشد، در اثر مخلوط شدن با محلول KOH، به صورت شیرابه کشدار و لزج در می‌آید و تست مثبت در نظر گرفته می‌شود(۱۱).

تست کاتالاز،آنزیم کاتالاز،آنزیمی است که تجزیه هیدروژن پراُکسید به آب و اکسیژن را کاتالیز می کند. برای بررسی تولید یا عدم تولید آنزیم کاتالاز توسط باکتری، یک یا چند قطره هیدروژن پراُکسید ۳ درصد را روی یک لام قرار داده و باکتری به آن اضافه شد، چنانچه باکتری تولیدکننده آنزیم کاتالاز باشد، بعد از چند ثانیه حباب‌های اکسیژن ظاهر می‌شوند که ناشی از تجزیه هیدروژن پراُکسید به وسیله آنزیم کاتالاز می‌باشد. برای انجام این تست، از کشت ۲۴ ساعت باکتری‌ها استفاده شد(۱۱).

تست هیدرولیز ژلاتین، برای بررسی تولید آنزیم ژلاتیناز، تست هیدرولیز ژلاتین روی محیط کشت جامد نوترینت ژلاتین انجام گرفت. باکتری‌های مورد نظر با استفاده از یک آنس به صورت عمودی در محیط کشت نوترینت ژلاتین درون لوله تلقیح و در دمای ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند.بعد از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، هیدرولیز ژلاتین بررسی شد. به این صورت که، محیط کشت‌ها بعد از رسیدن به دمای محیط به مدت ۳۰ دقیقه در درون یخچال قرار داده شدند. از آن جا که در طی انکوباسیون، محیط کشت حالت مایع به خود می‌گیرد، چنانچه باکتری توانایی هیدرولیز ژلاتین را داشته باشد، بعد از این مدت زمان، همچنان به‌صورت مایع خواهد بود . در غیر این صورت باکتری فاقد آنزیم ژلاتیناز می‌باشد(۱۱).

جهت استخراج DNA ژنومی، ابتدا از باکتری‌های TSG59 و TSG70 روی محیط نشاسته-آگار کشت تازه (۲۴ ساعته) در دمای ۵۰ درجه سلسیوس تهیه شد و سپس مطابق با مراحل زیر عمل شد:

۱. به یک میلی‌لیترآب مقطر دیونیزه درون ویال‌های ۱/۵ میلی‌لیتری، یک لوپ پر از باکتری مربوطه اضافه شد. بعد از ورتکس کردن ویال‌ها، مخلوط حاصل در ۵۰۰۰ xg، دمای ۴ درجه سلسیوس و به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید.

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

۲. به رسوب باکتریایی حاصل از مرحله قبل، ۳۰۰ میکرولیتر بافر استخراج شامل (Tris-HCl 10 mM, pH8، EDTA 0.1M، SDS %5, pH 8) و یک میکرولیتر Rnase اضافه و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در بن‌ماری گرماگذاری شد.

۳. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر پروتئیناز K به سوسپانسیون اضافه و به مدت ۲ ساعت در بن‌ماری در دمای ۵۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. هر ۲۰ دقیقه یک بار، ۳ بار ویال برعکس شده تا محتویات به طور کامل مخلوط شوند.

۴. پس از سرد شدن سوسپانسیون در دمای محیط، مقدار ۳۰۰ میکرولیتر فنل اشباع (محلول در بافر)Tris-HCl, pH8 به آن اضافه و با معکوس کردن ویال، محتویات آن مخلوط گردید. مخلوط حاصل در ۵۰۰۰ xg، به مدت ۲۰ دقیقه و در دمای اتاق سانتریفیوژ گردید. در این مرحله سه فاز تشکیل می‌شود؛ فاز رویی دارای DNA استخراج شده به همراه آب ، فاز میانی شامل پروتئین‌های جداشده از DNA و فاز زیرین شامل فنل و سایر ناخالصی‌های جداشده از DNA می‌باشد. فاز رویی به یک ویال دیگر منتقل شده و این مرحله تا دو مرتبه دیگر تکرار شد. هنگام انتقال مایع رویی باید مراقب بود که پروتئین‌های موجود در فاز میانی به همراه DNA به ویال منتقل نشوند.

۵. در این مرحله به اندازه ۰/۲ حجم مایع رویی، آمونیوم استات ۱۰ مولار و همچنین ۲ حجم اتانول ۱۰۰ درصد اضافه و با وارونه نمودن ویال محتویات آن مخلوط شد. در این حالت رشته‌های DNA در محلول قابل مشاهده‌اند.

نکته۲: اتانول سبب کاهش حلالیت رشته‌های DNA در فاز آبی شده و درنتیجه با استفاده از آمونیوم استات ضخیم شده و رسوب می کنند.

۶. به منظور جمع‌آوری رسوب DNA، محلول به دست آمده به مدت ۵ دقیقه در ۵۰۰۰ xg و دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شده و مایع رویی دور ریخته می‌شود.

۷. به منظور حذف نمک‌های اضافی به همراه DNA، رسوب DNA در اتانول ۷۰ درصد مخلوط شده و سپس در دمای ۴ درجه سلسیوس و ۵۰۰۰ xg، به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ صورت گرفته و مایع رویی دور ریخته شد. جهت تبخیر کامل اتانول، رسوب DNA در دمای اتاق قرار داده شد.

۸. پس از تبخیر کامل اتانول، رسوب DNA در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه مخلوط گردید و به منظور آب گرفتگی DNA و فعال شدن مجدد آن در یخچال قرار داده شد.

ژن ۱۶S rRNA، در DNA ژنومی تمامی باکتری‌ها به طور حفاظت شده دیده می‌شود. بنابراین برای شناسایی و تعیین سویه باکتری‌های مورد نظر، این ژن در طی واکنش زنجیرهای پلیمراز تکثیر داده شد. این واکنش به ازای یک نمونه DNA باکتریایی در حجم ۲۵ میکرولیتر آماده می‌شود. برای تکثیر ژن ۱۶S rRNA، دو پرایمر عمومی Forward و Reverse (جدول۱) مورد استفاده قرار گرفتند(۱۲).

واکنش زنجیرهای پلیمراز

ژن ۱۶S rRNA، در DNA ژنومی تمامی باکتری‌ها به طور حفاظت شده دیده می‌شود. بنابراین برای شناسایی و تعیین سویه باکتری‌های مورد نظر، این ژن در طی واکنش زنجیرهای پلیمراز تکثیر داده شد. این واکنش به ازای یک نمونه DNA باکتریایی در حجم ۲۵ میکرولیتر آماده می‌شود(جدول۱). برای تکثیر ژن ۱۶S rRNA، دو پرایمر عمومی Forward و Reverse به ترتیب زیر مورد استفاده قرار گرفتند(جدول۲).

مراحل انجام یک واکنش PCR، شامل موارد زیر می‌باشد:

۱. ابتدا درون ویال ۲۰۰ میکرولیتری ۱۷/۲ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه ریخته شد.

۲.بافر PCR (۱۰ X)، ۱۰ میلی‌مولار $dNTP_s$ و ۲۰ میلی‌مولار $MgCl_2$ به ترتیب به ویال اضافه و محتویات ویال به وسیله پی‌پتاژ کردن، با یکدیگر مخلوط شدند.

۳. در این مرحله پرایمرهای مورد نظر از استوک ۲۰ پیکومولار به ویال اضافه شده و سپس DNA الگو (استخراج شده از باکتری) اضافه گردید.

۴. در پایان، آنزیم DNA Taq پلیمراز به محتویات ویال اضافه شده و حجم کل مخلوط با استفاده از آب مقطر به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد.

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

برنامه به کار رفته جهت انجام PCR به شرح زیر می‌باشد: تکمیل رشته‌های ناقص.

۱. اعمال دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، به منظور از بین رفتن پیچ و تاب‌های درون مولکول DNA.
۲.اعمال دمای ۹۴ درجه سلسیوس‌به مدت ۴۵ ثانیه برای باز شدن دو رشته DNA.

۳. اتصال پرایمرها به دو رشته DNA در دمای ۵۱ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه.

۴. اتصال نوکلئوتیدها به پرایمرها و طویل شدن رشته DNA تولید شده در دمای ۷۲ درجه سلسیوس و مدت زمان ۹۰ ثانیه.
۵. ۳۰ بار تکرار مرحله ۲ تا ۴.
۶ . اعمال دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۸ دقیقه جهت

جدول ۱- مواد مورد نیاز جهت انجام PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر

ماده	حجم مورد نیاز (میکرولیتر)
بافر PCR (۱۰ X)	۲/۵
$dNTP_s$ (10mM)	۰/۵
$MgCl_2$	۱
پرایمر Forward	۰/۳
پرایمر Reverse	۰/۳
DNA الگو	۱-٤ (با توجه به غلظت نمونه)
DNA Taq پلیمراز	۰/۲
آب مقطر دیونیزه	۱۷/۲
حجم نهایی	۲۵

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

جدول۲- پرایمرهای طراحی شده توسط نرم افزار Oligo

پرایمرهای طراحی شده توسط نرم افزار Oligo		دمای ذوب پرایمر Tm
Forward	5'-AGTTTGATCC TGGCTCCAG-3′	53.7℃
Reverse	5'-GGCTACCTTGTTACGACTT- 3′	53.4℃

سپس توالی DNA با استفاده از توالی‌یابی DNA تعیین شد. شباهت توالی نوکلوتیدهای ژن سویه هیدرولیز کننده با کمک نرم افزار BLAST با توالی‌های ثبت شده در پایگاه اطلاعاتی ژنوم Gene Bank مقایسه گردید. به این ترتیب نزدیک‌ترین سویه‌ها با سویه مد نظر ما تعیین شد و همچنین، توالی به دست آمده در این پژوهش در بانک ژنی NCBI ثبت و شمارهٔ دستیابی ژنی مربوطه دریافت شد.

محیط تولید آنزیم

در ابتدا، یک لوپ پر از کلنی باکتری مورد نظر به ۲۰ میلی-لیتر محیط نوترینت براث تلقیح و برای ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۵۰ درجهٔ سلسیوس قرار داده شد. سپس ۱۰ درصد (۲ میلی‌لیتر) از محیط کشت ۲۴-۱۸ ساعته به محیط تولید حاوی یک گرم نشاسته، یک گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات، ۲ گرم تریپتون، ۲ گرم سولفات آمونیوم، ۰/۰۵ گرم سولفات منیزیم، ۰/۰۵گرم کلسیم کلرید و ۳/۱۳ گرم دی سدیم هیدروژن فسفات اضافه و ۷۲ ساعت در دمای ۵۰ درجهٔ سلسیوس با دور g× ۱۶۰ انکوبه شد (تمامی مواد به صورت خشک استفاده شده و به حجم ۱لیتر رسیده‌اند)(۱۳).

سنجش فعالیت آلفاآمیلاز

به منظور تأیید خاصیت هیدرولیزکنندگی نشاسته و تعیین میزان تولید آنزیم آلفاآمیلاز، سنجش فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز براساس روش برن فلد (۱۴) و با استفاده از معرف دی نیترو سالیسیلیک اسید انجام گرفت. برای این منظور، ابتدا از باکتری انتخاب شده در ۲۰ میلی‌لیتر محیط نوترینت براث پیش کشت تهیه شد. سپس میزان ۲ میلی‌لیتر از پیش کشت باکتری به ۲۰ میلی‌لیتر محیط تولید تلقیح و۷۲ ساعت در انکوباتور با دمای ۵۰ درجهٔ سلسیوس انکوبه شد. ۵ میلی‌لیتر از محیط حاوی باکتری برداشته شد و در ۱۰۰۰۰xg، به مدت ۱۰ دقیقه و دمای ۴ درجهٔ سلسیوس سانتریفیوژ شد. محلول رویی فاقد باکتری به مثابهٔ آنزیم مورد استفاده قرارگرفت. سپس ، ۵۰۰ میکرولیتر از محلول رویی به ۵۰۰ میکرولیتر نشاسته یک درصد محلول در بافر سدیم فسفات (pH۷، ۱۰۰ میلی مولار) به عنوان سوبسترا اضافه شد. جهت انجام واکنش، مخلوط حاصل در ۵۰ درجهٔ سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه گرماگذاری شد. در مرحلهٔ بعد، واکنش آنزیماتیک با اضافه کردن یک میلی لیتر از DNS به مخلوط و قراردادن آن به مدت ۵ دقیقه در آب جوش پایان یافت. این وضعیت به مثابهٔ وضعیت استاندارد در نظر گرفته شد. با استفاده از منحنی استاندارد گلوکز غلظت قندهای احیاکننده تولیدشده درنتیجهٔ فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز محاسبه شد و به این ترتیب مقدار فعالیت آنزیمی به دست آمد. بر این اساس، یک واحد فعالیت آنزیمی مقدار آنزیمی است که در مدت زمان یک دقیقه، یک میکرومول سوبسترا را به یک میکرومول محصول (گلوکز) تبدیل کند.

میزان خلوص آلفاامیلاز TSG70با استفاده از ژل الکتروفورز سدیم دو دسیل سولفات- پلی-آکریل‌آمید و بر طبق روش لاملی مورد بررسی قرار گرفت. این ژل به دو صورت پیوسته و ناپیوسته تهیه می‌شود. ژل ناپیوسته دارای دو لایه بالا یا متراکم کننده و پایین یا جداکننده می‌باشد که در تهیه هر لایه بافر مخصوص همان لایه به کار می‌رود. معمولاً به وسیله ایزوپروپانول سطح لایه پایینی صاف و لایه بالایی بر روی آن قرار می‌گیرد.

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

بررسی تولید آنزیم آلفاآمیلاز در حضور متغیرهای مختلف

اثر منابع مختلف کربن بر تولید آنزیم آلفاآمیلاز

برای شناسایی منبع کربن مناسب برای تولید آنزیم آلفاآمیلاز، سویهٔ باکتری جداشده در حضور منابع باکتریایی مختلف کربن کشت داده شد (۱۵). محیط پایه حاوی یک گرم نشاسته، یک گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات، ۲ گرم تریپتون، ۲ گرم سولفات آمونیوم، ۰/۰۵ گرم سولفات منیزیم، ۰/۰۵گرم کلسیم کلرید و ۳/۱۳ گرم دی سدیم هیدروژن فسفات به ازای یک لیتر آب مقطر بود. بعد از این مدت، ۵ میلی‌لیتر از این محیط ها در ۱۰۰۰۰xg، به مدت ۱۰ دقیقه و دمای ۴ درجهٔ سلسیوس سانتریفیوژ شده و محلول های رویی به منزلهٔ آنزیم مورد استفاده قرار گرفت. سنجش فعالیت آنزیمی مطابق با شرایط استاندارد در ۵۴۰ نانومتر صورت گرفت. وزن رسوبات باکتری‌ها برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، به منزلهٔ معیاری از میزان رشد اندازه‌گیری شد. تمامی آزمایش‌ها سه بار تکرار شد و میانگین گرفته شد (۱۶).

اثر منابع مختلف نیتروژن بر تولید آنزیم آلفاآمیلاز

در این بررسی، ۱۰ درصد از پیش کشت ۲۴-۱۸ ساعتهٔ باکتری موردنظر به محیط های حاوی غلظت ۲ گرم بر لیتر از منابع مختلف نیتروژن شامل پپتون، عصارهٔ مخمر و ژلاتین (منابع نیتروژن آلی) و آمونیوم کلراید، سولفات آمونیوم و سدیم نیترات (منبع نیتروژن غیرآلی) و محیط بدون منبع اضافه شد (۱۶). محیط پایهٔ حاوی یک گرم نشاسته، یک گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات، ۲ گرم تریپتون، ۲ گرم سولفات آمونیوم، ۰/۰۵ گرم سولفات منیزیم، ۰/۰۵گرم کلسیم کلرید و ۳/۱۳ گرم دی سدیم هیدروژن فسفات به ازای یک لیتر آب مقطر بود. محیط‌ها ۴۸ ساعت در دمای ۵۰ درجهٔ سلسیوس انکوبه شدند. پس از ۴۸ ساعت، ۵ میلی‌لیتر از محیط ها سانتریفیوژ شد و سنجش فعالیت آنزیمی محلول‌های رویی در طول موج ۵۴۰ نانومتر انجام گرفت. سپس محلول‌های رویی دور ریخته شدند و وزن رسوبات باکتریایی اندازه گیری شد.

بررسی اثر pH بر تولید آنزیم آلفاآمیلاز

اثر pH بر تولید آنزیم آلفاآمیلاز، با تنظیم pH محیط مایع اختصاصی در محدودهٔ ۹-۵ سنجیده شد (۵). محیط پایه حاوی یک گرم نشاسته، یک گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات، ۲ گرم تریپتون، ۲ گرم سولفات آمونیوم، ۰/۰۵ گرم سولفات منیزیم، ۰/۰۵گرم کلسیم کلرید و ۳/۱۳ گرم دی سدیم هیدروژن فسفات به ازای یک لیتر آب مقطر است. بعد از گذشت ۴۸ ساعت از رشد سویه های باکتریایی در این محیط ها، ۵ میلی‌لیتر از محیط ها سانتریفیوژ شد و فعالیت آنزیمی مایع سنجش شد و وزن رسوبات باکتریایی نیز اندازه‌گیری شد.

بررسی فعالیت دمایی آنزیم آلفاآمیلاز

برای بررسی فعالیت دمایی آنزیم آلفاآمیلاز، مخلوط ۰/۵ میلی‌لیتر آنزیم و ۰/۵ میلی‌لیتر سوبسترا در محدوده دمایی ۸۰-۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شد. سپس با اضافه کردن معرف DNS واکنش متوقف شده و پس از قرار دادن مخلوط واکنش در دستگاه بن‌ماری به مدت ۵ دقیقه، جذب مخلوط در ۵۴۰ نانومتر خوانش شد. در پایان، با استفاده از مقایسه جذب‌های به دست آمده با منحنی استاندارد گلوکز و ارزیابی غلظت گلوکز تولید شده، فعالیت دمایی آنزیم اندازه‌گیری شد(۱۷).

بررسی پایداری دمایی آنزیم آلفاآمیلاز

برای اندازه‌گیری میزان پایداری دمایی آنزیم، ابتدا ۰/۵ میلی‌لیتر آنزیم به تنهایی به مدت یک ساعت در دماهای ۸۰-۳۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. نمونه‌های آنزیمی پس از قرارگیری در هر دما، به منظور جلوگیری از غیر فعال شدن در دمای اتاق، در داخل یخچال در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند. در مرحله بعد، به نمونه‌های آنزیمی ۰/۵ میلی‌لیتر سوبسترا اضافه و مخلوط حاصل در شرایط سنجش انکوبه گردید. در نهایت، فعالیت باقیمانده آنزیم با استفاده از

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

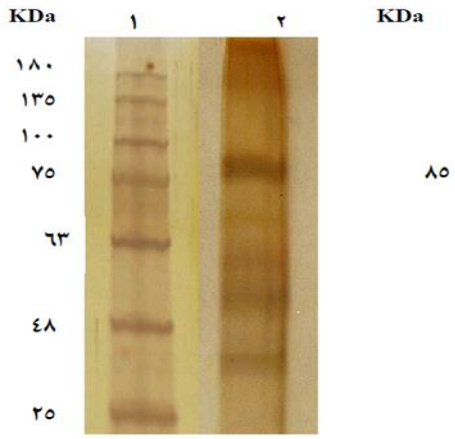
معرف DNS و سپس خوانش جذب مخلوط واکنش در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۱۷).

نتایج

غربال‌گری و شناسایی سویه های باکتریایی مولد آلفاآمیلاز

جهت غربالگری باکتری مولد آلفاآمیلاز گرمادوست، آزمون هیدرولیز نشاسته با استفاده از معرف لوگول روی محیط نشاسته-آگار انجام گرفت و هاله شفاف اطراف کلنی باکتری، که نشان دهندهٔ تولید آنزیم آلفاآمیلاز و هیدرولیز نشاسته بود، مشاهده شد. از ۸۶ سویهٔ باکتریایی جداشده، تعداد ۱۷ مورد توانایی تولید آنزیم آلفاآمیلاز قابل ملاحظه‌ای داشتند. به منظور شناسایی ابتدایی سویه‌های باکتریایی مولد آلفاآمیلاز، برخی آزمون‌های بیوشیمیایی انجام گرفت و مشاهده شد سویه های باکتریایی جداشده گرم مثبت و میله ای شکل هستند. نتایج مربوط به آزمون های بیوشیمیایی در جدول ۳ آمده است.

به منظور بررسی میزان خلوص و وزن مولکولی آنزیم آلفاآمیلاز سویه TSG70، نمونه دارای حد اکثر فعالیت آنزیمی و محتوای پروتئینی کم به همراه نمونه مارکر بر روی ژل الکتروفورز سدیم دو دسیل سولفات-پلی‌آکریل‌آمید بارگذاری شد. در مرحله بعد به منظور مشاهده باندها، ژل حاصل با استفاده از نیترات نقره رنگ‌آمیزی شد، باند آنزیم با باندهای مارکر مقایسه و مشخص گردید این آنزیم داری وزن مولکولی تقریبی ۸۵ KDa می‌باشد(شکل ۱).



شکل ۱.مشاهده باند آنزیم TSG70 بر روی ژل الکتروفورز با استفاده از رنگ‌آمیزی نیترات نقره. ۱) مارکر و ۲) فراکشن فعال.

به منظور شناسایی مولکولی، پس از مشاهده باند ژن ۱۶SrDNA مربوط به سویه مورد نظر، محصول PCR این ژن توسط شرکت بیونیر کره جنوبی تعیین توالی شد. پس از تعیین توالی ژن ۱۶S rRNA ، توالی مربوط به هر یک از آن‌ها به طور جداگانه با استفاده از نرم افزار BLAST با سایر توالی‌های ثبت شده در بانک ژنی مقایسه شد. این سویهٔ باکتریایی با گونه های نزدیک از نظر توالی ژن موردنظر موجود در NCBI تحت بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از تطبیق توالی و درخت فیلوژنتیکی نشان داد که گونه پیش گفته به *Bacillus licheniformis* نزدیک است. توالی نوکلئوتیدی ارائه شده در بانک ژنی NCBI با شماره دسترسی زیر ثبت شده است (جدول۳-شکل۲).

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

جدول۳- شماره دسترسی سویه های AT59 و AT70

نام سویه	شماره دسترسی
B. licheniformis AT59	MG192311
B. licheniformis AT70	KT948060

اثر منابع مختلف کربن بر تولید آنزیم آلفاآمیلاز

اثر منابع مختلف کربن شامل نشاسته، گالاکتوز، فروکتوز و مالتوز با غلظت یک گرم بر لیتر بر رشد باکتری و تولید آنزیم آلفاآمیلاز دو سویه TSG59 و TSG70 در طی ۴۸ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. در مورد سویه TSG59 نتایج نشان داد تولید آنزیم و رشد باکتری به ترتیب در حضور دو منبع نشاسته و گلوکز بیشترین مقدار بوده است. همچنین در میان منابع کربن مورد استفاده مشاهده شد نشاسته بیشترین اثر افزایشی را بر تولید آنزیم و رشد سویه TSG70 داشته است. در مقابل، رشد این باکتری و تولید آنزیم آن به ترتیب در محیط حاوی مالتوز و فروکتوز در مقایسه با نمونه کنترل کاهش نشان داده است. نتایج به دست آمده در شکل۳ نشان داده شده است.

اثر منابع مختلف نیتروژن بر تولید آنزیم آلفاآمیلاز

بررسی تولید آنزیم آلفاآمیلاز و رشد دو سویه باکتریایی برتر در حضور منابع مختلف نیتروژن شامل پپتون، عصاره مخمر، ژلاتین، آمونیوم کلراید، سولفات آمونیوم و سدیم نیترات در طی ۴۸ ساعت بعد از انکوباسیون انجام گرفت و مشخص شد، سویه TSG59 حداکثر میزان رشد را در حضور عصاره مخمر دارا می‌باشد و تولید این آنزیم در حضور اکثر منابع نیتروژنی افزایش داشته و ژلاتین تولید آنزیم را تا بیش از سه برابر افزایش داده است. در مورد سویه TSG70، میزان رشد در حضور ژلاتین، سدیم نیترات، سولفات آمونیوم و آمونیوم کلراید در مقایسه با نمونه کنترل افزایش یافته و در حضور ژلاتین بیشترین مقدار بوده است. در مقابل، رشد این باکتری در حضور عصاره مخمر ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نسبت به نمونه کنترل کاهش یافته است. تولید آنزیم این باکتری در محیط حاوی عصاره مخمر نسبت به محیط پایه، ۵۰ درصد کاهش پیدا کرده و در برابر سایر منابع افزایش نشان داده است.نتایج مذکور در (شکل۴) نشان داده شده است.

بررسی تولید آنزیم آلفاآمیلاز در حضور pHهای مختلف

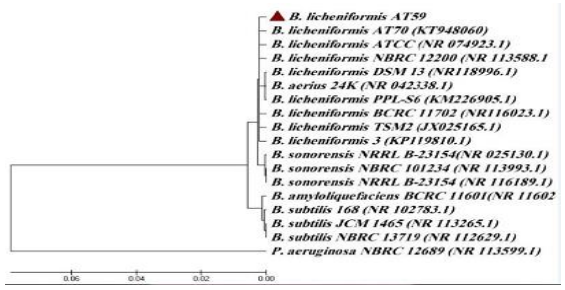
در این بررسی، تولید آنزیم و رشد دو سویه مورد نظر در محیط‌های مایع حاوی نشاسته با pHهای مختلف در محدوده ۹-۵ مورد بررسی قرار گرفت و با توجه به نتایج به دست آمده مشخص شد، تولید آنزیم سویه TSG59 با افزایش pH محیط کاهش پیدا کرد. همچنین رشد این باکتری نیز به طور کلی با افزایش pH محیط کاهش پیدا کرده و در محیط دارای pH۵ و pH ۹ به ترتیب بیشترین و کمترین میزان رشد را نشان داده است. در مورد سویه TSG70 مشخص شد حداکثر میزان تولید آنزیم در محیط دارای pH ۸ صورت گرفته است؛ بالاترین میزان رشد این سویه در محیط دارای pH ۷ به دست آمد(شکل۵).

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

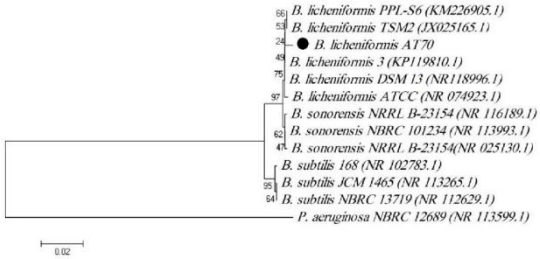
جدول ۳- آزمون‌های بیوشیمیایی برای شناسایی سویه های باکتریایی.

باکتری	رنگ آمیزی	KOH	هیدرولیزکازئین درمحیط Skim Milk Agar	هیدرولیز کازئین در محیط Casein Agar	هیدرولیز ژلاتین	کاتالاز	مصرف سیترات	TSI	قطر هاله حاصل از هیدرولیز نشاسته (میلی متر)
TSG52	باسیل و گرم مثبت	-	-	-	-	+	-	قلیا /قلیا	۳
TSG55	باسیل و گرم مثبت	-	-	+	-	+	-	قلیا /قلیا	۳
TSG56	باسیل و گرم مثبت	-	-	+	-	+	-	قلیا/اسید	۱
TSG57	باسیل و گرم مثبت	-	-	+	-	+	-	قلیا /قلیا	۲
TSG58	باسیل و گرم مثبت	-	-	+	-	+	-	قلیا /قلیا	۳
TSG59	باسیل و گرم مثبت	-	-	+	-	+	-	اسید/قلیا	۶
TSG60	باسیل و گرم مثبت	-	-	+	-	+	-	قلیا/اسید	۱
TSG61	باسیل و گرم مثبت	-	-	+	-	+	-	قلیا /قلیا	۱
TSG62	باسیل و گرم مثبت	-	-	+	-	+	-	قلیا /قلیا	۱
TSG63	باسیل و گرم مثبت	-	-	-	-	+	-	اسید/قلیا	۲
TSG64	باسیل و گرم مثبت	-	-	+	-	-	-	اسید/اسید	۲
TSG65	باسیل و گرم مثبت	-	-	+	-	+	-	قلیا/اسید	۱
TSG66	باسیل و گرم مثبت	-	-	-	-	+	-	قلیا /قلیا	۴
TSG67	باسیل و گرم مثبت	-	-	+	-	-	-	اسید /قلیا	۳
TSG68	باسیل و گرم مثبت	-	-	-	-	+	-	اسید/اسید	۳
TSG69	باسیل و گرم مثبت	-	-	-	-	+	-	اسید/اسید	۳
TSG70	باسیل و گرم مثبت	-	-	+	-	+	-	اسید/اسید	۷

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]



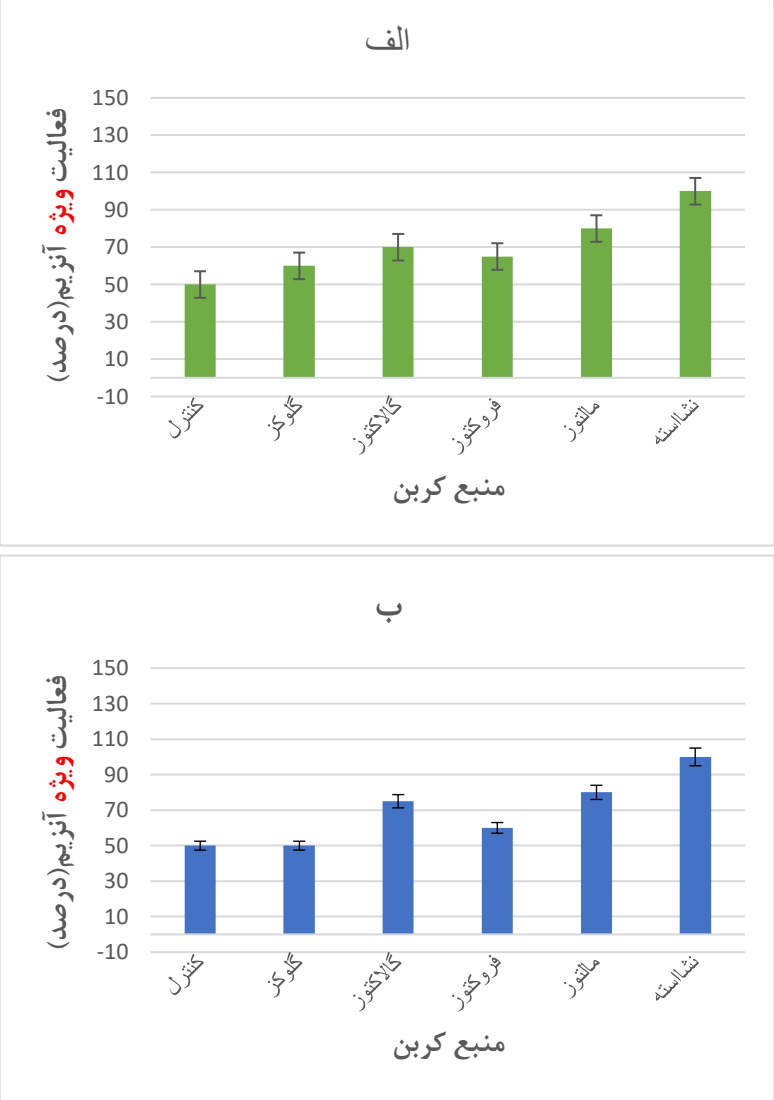
الف



ب

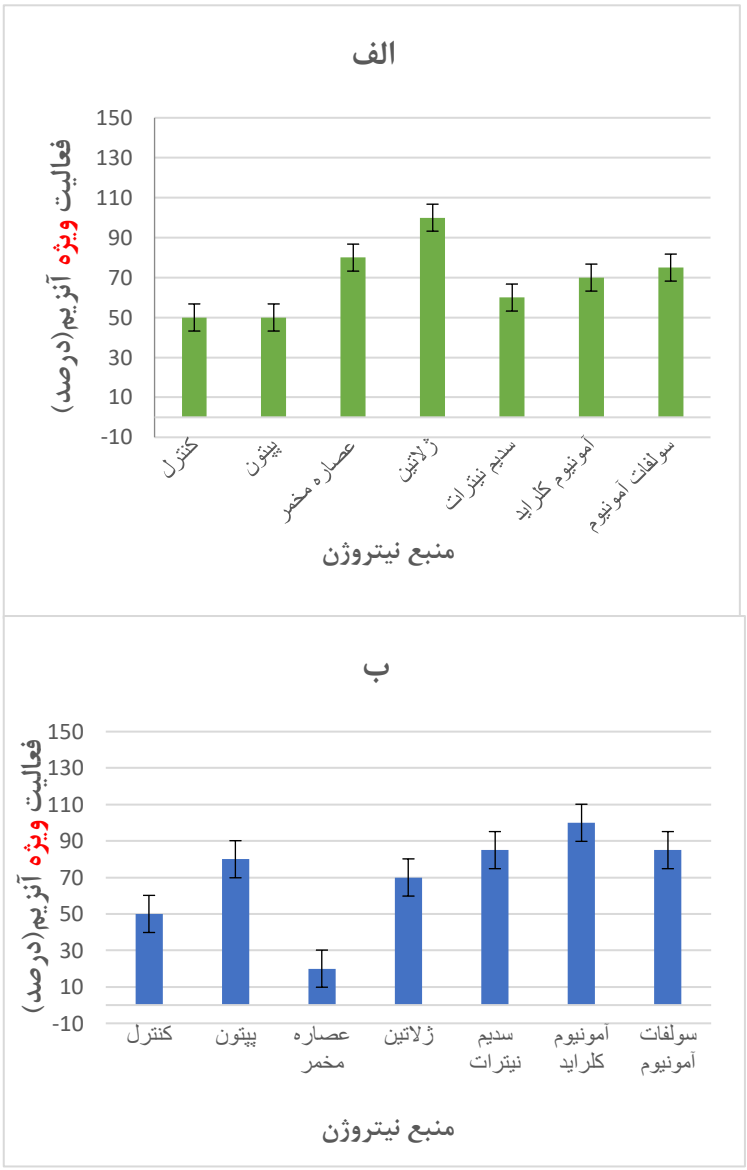
شکل ۲- الف.درخت فیلوژنتیک باکتری TSG59 بر اساس شباهت توالی ژن ۱٦S rRNA.ب. درخت فیلوژنتیک باکتری TSG70 بر اساس شباهت توالی ژن ۱٦S rRNA.

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]



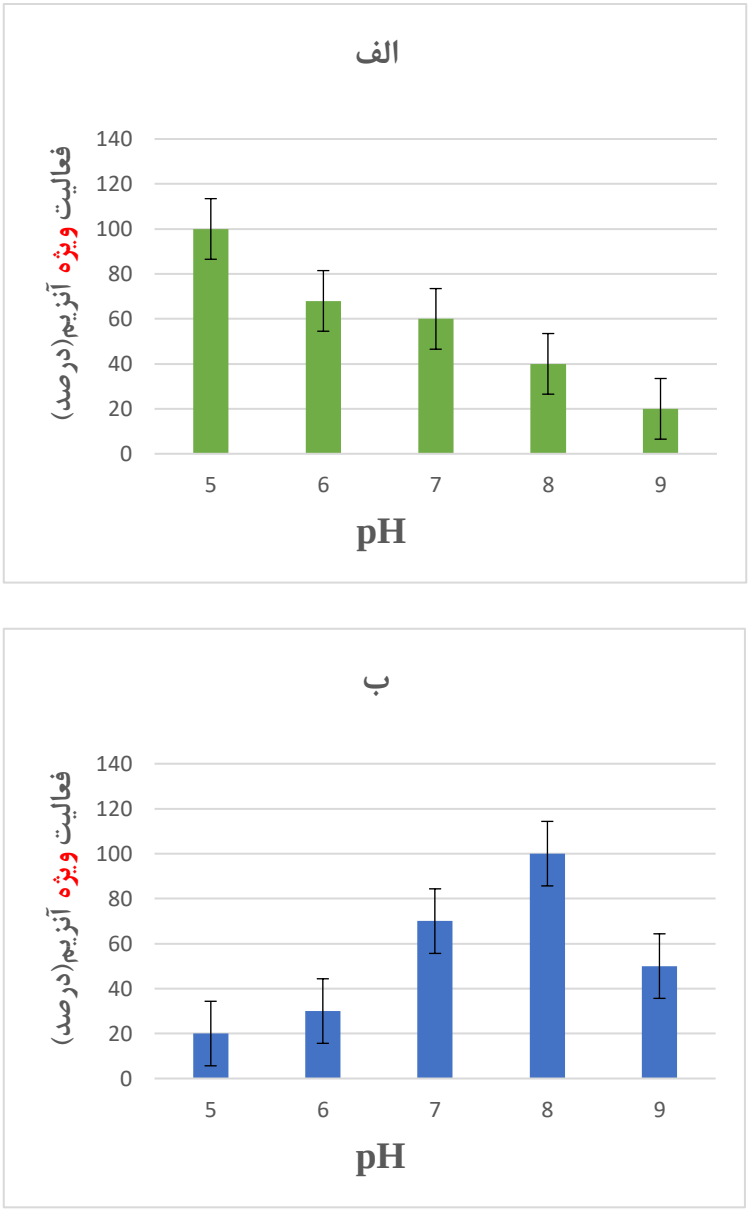
شکل ۳- اثر منابع مختلف کربن بر رشد باکتری و تولید آنزیم. الف) TSG59 و ب) TSG70.

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]



شکل ٤- اثر منابع مختلف نیتروژن بر رشد باکتری و تولید آنزیم. الف) TSG59 و ب) TSG70.

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]



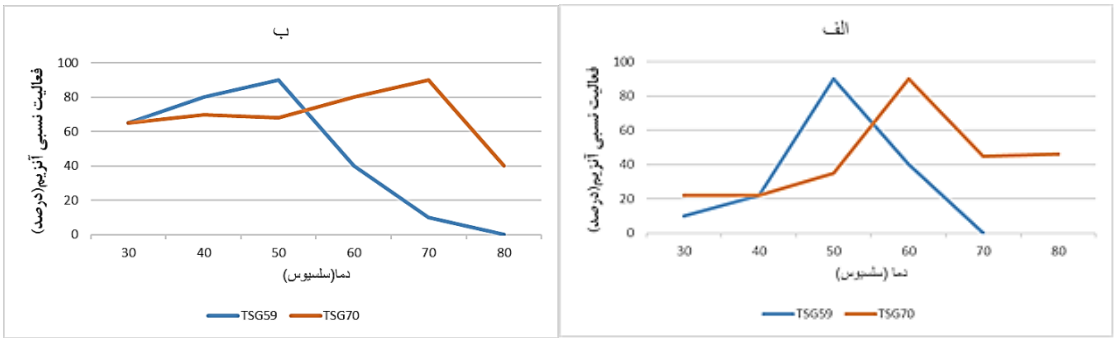
شکل ۵- بررسی تولید آنزیم و رشد باکتری در محیط‌هایی با pHهای مختلف. الفTSG59 وب) TSG70

فعالیت و پایداری آنزیم آلفاآمیلاز در دماهای انکوباسیون مختلف

در این مقاله، فعالیت و پایداری دمایی آنزیم آلفاآمیلاز دو سویه TSG59 و TSG70 در محدوده دمایی ۸۰-۳۰ درجه سلسیوس مورد بررسی قرار گرفت. دما از جمله مهم‌ترین عوامل اثر گذار بر ساختار ذاتی یک آنزیم است؛ از آن جا که اکثر فرآیندهای صنعتی در دماهای بالا قابل انجام‌اند، یافتن آنزیم‌هایی که در دماهای بالا قادرند ساختار خود را حفظ کرده و فعال بمانند، اهمیت زیادی دارد. برای این منظور، در این تحقیق میزان پایداری آنزیم آلفاآمیلاز تولید شده توسط TSG59 و TSG70 در دماهای مختلف بررسی شد. نتایج به دست آمده نشان داد، بیشترین پایداری دمایی آلفاآمیلاز TSG59 در دمای ۵۰ درجه سلسیوس صورت گرفته است؛ حداکثر فعالیت آنزیمی این سویه نیز در همین دما به دست آمد. این آنزیم در محدوده ۵۰-۳۰ درجه سلسیوس، بیش از ۶۰ درصد پایداری نشان داده و در دمای ۷۰ درجه سلسیوس به طور کامل ناپایدار و همچنین غیر فعال شده است. در مورد سویه TSG70، حداکثر پایداری

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

آلفاآمیلاز تولید شده در دمای ۷۰ درجه سلسیوس مشاهده شد؛ در صورتی که بیشینه فعالیت آن در دمای ۶۰ درجه سلسیوس بوده و در دمای ۷۰ درجه سلسیوس بیش از نیمی از فعالیت خود را از دست داده است. نتایج به دست آمده در (شکل ۶) آورده شده است.



شکل٦. الف)مقایسه فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز در دماهای مختلف و ب) مقایسه پایداری آنزیم آلفاآمیلاز در دماهای مختلف

بحث و نتیجه گیری

از آن جا که اکثر فرایندهای صنعتی معمولاً در دماهای بالا قابل انجام هستند، استفاده ازآلفاآمیلازهای گرمادوست که توانایی فعالیت و حفظ ساختار خود در این دماها را دارند، می‌تواند جهت پیش‌برد هرچه بیشتر این فرایندها کمک‌کننده باشد (۲۳). امروزه کاربرد آلفاآمیلازهای گرمادوست در صنایع مختلف از جمله نساجی، فراوری مواد غذایی، مواد شوینده و به ویژه نشاسته جهت انجام هم زمان فرایند مایع سازی و ژلاتیناسیون نشاسته و کاهش هزینه‌های خنک کردن، شناخته شده است(۱۸). آلفاآمیلازهای گرمادوست معمولاً توسط میکروارگانیسم‌های گرمادوست ازجمله باکتری‌ها تولید می‌شوند. این میکروارگانیسم‌ها در مناطقی از زمین که دارای دمای بالا می‌باشند، از جمله بیابان‌ها و چشمه‌های آب گرم یافت می‌شوند(۱۹) بنابراین در این پژوهش، به منظور جداسازی و غربالگری باکتری‌های مولد آلفاآمیلاز گرمادوست، چشمه آب گرم آوج با دمای تقریبی ۷۰ درجه سلسیوس واقع در استان قزوین جهت نمونه‌برداری انتخاب شد. جهت غربالگری از محیط نشاسته-آگار استفاده شد و تست هیدرولیز نشاسته انجام گرفت. قطر هاله‌های ایجاد شده اطراف ناحیه رشد باکتری‌های جداسازی شده اندازه‌گیری و بر این اساس، دو سویه با کدهای TSG59 و TSG70 به عنوان سویه‌های برتر انتخاب گردیدند. به طور مشابه، در تحقیق انجام شده توسط فولادی و سجادیان[1] در سال ۲۰۱۰، به منظور دستیابی به سویه‌های مولد آلفا آمیلاز مقاوم به حرارت، نمونه‌های جمع آوری شده از سه چشمه آب گرم محلات، لاریجان و مشکین شهر مورد آنالیز قرارگرفته و کلنی باکتریایی با خاصیت هیدرولیزکنندگی بالا (دارای بزرگ‌ترین ناحیه هاله) از چشمه آب گرم مشکین شهر جداسازی شد (۲۰). همچنین در پژوهشی دیگر توسط آسوده و همکاران[2]، به منظور دستیابی به سویه‌های مولد آلفاآمیلاز گرمادوست، چشمه آب گرم دیگ رستم با pH ۷/۲ و دمای ۵۵ درجه سلسیوس در جنوب خراسان جهت نمونه برداری انتخاب و سویه‌های باکتریایی مورد نظر با تلقیح نمونه‌های آب جمع‌آوری شده روی محیط نشاسته-آگار جداسازی شدند (۲۱). با توجه به پژوهش‌های صورت گرفته می‌توان نتیجه گرفت، چشمه های آب‌گرم ایران ذخایر میکروبی بزرگی دارند و می‌توانند به عنوان منابع محصولات بیولوژیکی مختلف مانند آنزیم ها استفاده شوند(۲۲). علاوه بر چشمه‌های آب گرم ایران، در سال ۲۰۱۴ گزارشی مبنی بر نمونه برداری از یک چشمه آب گرم واقع در هند جهت دستیابی به باکتری‌های مولد آلفاآمیلاز گرمادوست، توسط

[1] Fooladi &Sajjadian

[2] Asoodeh ,.etal

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

سن و همکاران[1] منتشر شده است (۲۳).
به منظور شناسایی ابتدایی باکتری‌های جداشده، تعدادی از تست‌های بیوشیمیایی از قبیل رنگ‌آمیزی گرم، کاتالاز، هیدرولیز کازئین، هیدرولیز ژلاتین و ... انجام و مشخص شد باکتری‌های مورد نظر به شکل باسیل و گرم مثبت می‌باشند. در مرحله بعد، به منظور شناسایی دقیق‌تر و تعیین جنس، گونه و به ویژه سویه، توالی ژن 16S rRNA دو باکتری TSG59 و TSG70 تعیین ومشخص شد این دو باکتری به ترتیب با *Bacillus licheniformis AT59* و *Bacillus licheniformis AT70* بیشترین شباهت را دارا می‌باشند. در مطالعه‌صورت گرفته در سال ۲۰۱۹، آلفاآمیلاز مقاوم به گرما از سویه نسبتا گرمادوست از *Bacillus subtilis* به نام JS-2004 جداسازی شد (۲۴).مهدوی و همکاران[2] آلفا آمیلازی با فعالیت دمایی وسیع را از سویه‌ای از *Bacillus cereus* به نام GUF8 جداسازی و تعیین خصوصیت کردند (۲۵). بنابراین، با توجه به مطالعات صورت گرفته، باسیلوس‌ها به عنوان تولیدکنندگان اصلی آلفاآمیلازها به ویژه آلفاآمیلازهای گرمادوست و مقاوم به گرما به شمار می‌روند. با این حال، علاوه بر باسیلوس‌ها، جنس‌های باکتریایی دیگر نیز می‌توانند به عنوان تولیدکنندگان آلفاآمیلازهای مقاوم به گرما و گرمادوست شناخته شوند؛ به طوری که در سال ۲۰۱۲، تولید آلفاآمیلاز نمک-گرمادوست از *Nesterenkonia strain F* توسط آموزگار وهمکاران[3] (۲۰۱۲)گزارش شد (۲۶).

از جمله مهم‌ترین عوامل اثر گذار بر متابولیسم میکروبی، منبع کربن می‌باشد که می‌تواند بازده تولید آنزیم توسط میکروارگانیسم مولد را تحت تأثیر قرار دهد. بنابراین در این پژوهش، به منظور دستیابی به محیط بهینه، تولید این آنزیم در حضور منابع مختلف کربن شامل نشاسته، گلوکز، فروکتوز، مالتوز و گالاکتوز هر کدام با غلظت یک گرم بر لیتر بررسی شد. نتایج به دست آمده نشان داد که نشاسته مؤثرترین منبع در تولید آنزیم هر دو سویه TSG59 و TSG70 بوده است، بنابراین تولید آنزیم در حضور غلظت‌های مختلف نشاسته مورد مطالعه قرار گرفت و مشخص شد بیشترین میزان تولید آنزیم در محیط حاوی ۰/۵ درصد نشاسته صورت گرفته است. همچنین نتایج نشان داد بازده تولید آنزیم سویه TSG70 در محیط حاوی فروکتوز کمترین مقدار بوده است؛ در صورتی که در پژوهشی، فروکتوز به عنوان بهترین منبع برای تولید آنزیم آلفاآمیلاز *Bacillus licheniformis* معرفی گردید (۲۶).در مطالعه‌ای، در پی یافتن محیط بهینه برای تولید آلفاآمیلاز *Bacillus amyloliquefaciens ATCC23842*، غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ درصد از نشاسته محلول، نشاسته هیدرولیز شده، گلوکز، لاکتوز و مالتوز به محیط تولید آنزیم اضافه شد و نتایج نشان داد با اضافه کردن یک درصد نشاسته محلول به محیط کشت، بیشترین بازده تولید آنزیم به دست خواهد آمد (۲۷). همچنین در مطالعه صورت گرفته توسط آموزگار و همکاران[4]، غلظت یک درصد نشاسته به عنوان غلظت بهینه برای تولید آلفاآمیلاز *Nesterenkonia strain F* معرفی شد (۲۶).

در این پژوهش، محیط تولید آنزیم آلفاآمیلاز با اضافه‌کردن غلظت ۲ گرم بر لیتر از منابع نیتروژن آلی و غیر آلی شامل پپتون، عصاره مخمر، ژلاتین، سدیم نیترات، سولفات آمونیوم و آمونیوم کلراید به محیط پایه فاقد نیتروژن، از نظر منبع نیتروژن مورد استفاده بهینه شد. در این بررسی، بیشترین بازده تولید آنزیم آلفاآمیلاز برای دو سویه TSG59 و TSG70 به ترتیب در محیط حاوی مخمر، ژلاتین و آمونیوم کلرید به دست آمد. بهینه‌سازی محیط تولید آنزیم سویه *Nesterenkonia strain F* در حضور غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ درصد پپتون و عصاره مخمر، ۱ درصد پپتون + ۱ درصد عصاره مخمر و غلظت ۰/۷۵ درصد از ژلاتین، کازئین، عصاره گوشت، اوره و آمونیوم کلراید صورت گرفت؛ در میان این منابع مشخص شد، سویه مورد نظر در محیط حاوی ۰/۷۵ درصد عصاره مخمر بیشترین میزان آلفاآمیلاز را تولید کرده، در صورتی که در محیط حاوی ۰/۷۵ درصد آمونیوم

[1] Sen,.etal
[2] Mahdavi, .etal
[3] Amozegar, .etal
[4] Amozegar, .etal

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

کلرید کمترین مقدار آنزیم تولید شده است (۲۷). در تحقیق صورت گرفته در سال ۲۰۱۳ برای دستیابی به محیط بهینه برای تولید آنزیم آلفاآمیلاز، اثر منابع نیتروژن مختلف بر تولید آنزیم مورد سنجش قرار گرفت و مشخص شد در میان منابع مورد مطالعه، پپتون بیشترین اثر افزایشی را در تولید آنزیم داشته، در صورتی که تولید آنزیم در حضور عصاره مخمر کمترین مقدار را دارا بوده است (۲۶).

در این پژوهش، به منظور تعیین pH بهینه برای تولید آنزیم آلفاآمیلاز، pH محیط تولید آنزیم در محدوده ۹-۵ تنظیم شد و پس از گذشت ۴۸ ساعت از رشد سویه‌های باکتریایی برتر در این محیط‌ها، تولید آنزیم مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد برای TSG59 و TSG70 به ترتیب در pH ۵ و pH ۸ صورت گرفته است. در سال ۲۰۱۳، اثر pHهای مختلف بر میزان تولید آنزیم آلفاآمیلاز توسط آموزگار و همکاران مورد سنجش قرار گرفت و دریافت شد بالاترین میزان تولید آلفاآمیلاز در pH ۸ صورت گرفته است (۲۶). در تحقیق انجام شده در سال۲۰۱۴، تولید آلفاآمیلاز *Bacillus licheniformis* در محدوده pH۸-۵ مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد این باکتری بیشترین میزان آلفاآمیلاز را در pH ۷ تولید کرده است (۲۳). همان طور که در مطالب قبل ذکر شد، آنزیم‌هایی که قادرند در دماهای بالا فعالیت و پایداری بالایی از خود نشان دهند، از نظر کاربرد در فرآیندهای صنعتی از قبیل صنعت فراوری نشاسته در فرایند مایع سازی و قند سازی نشاسته بسیار قابل اهمیت‌اند، چرا که این فرآیندها در دماهای بالا قابل انجام هستند؛ بنابراین، در این پژوهش فعالیت و پایداری دمایی آنزیم آلفاآمیلاز تولید شده توسط سویه‌های منتخب، در دماهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده مشخص شد بیشینه فعالیت و پایداری آنزیم آلفاآمیلاز TSG59 در دمای ۵۰ درجه سلسیوس صورت گرفته است؛ این آنزیم در دماهای پایین‌تر و بالاتر از ۵۰ درجه سلسیوس تقریبا به طور کامل غیر فعال بوده، با این وجود در دماهای ۳۰ و ۴۰ درجه سلسیوس به ترتیب ۶۸ و ۸۷ درصد پایداری نشان داده است.

حداکثر فعالیت آلفاآمیلاز سویه TSG70 در دمای ۶۰ درجه سلسیوس مشاهده شد، در صورتی که در بررسی پایداری دمایی مشخص شد بیشینه پایداری این آنزیم در دمای ۷۰ درجه سلسیوس بوده است. در یک مطالعه، فعالیت آلفاآمیلاز *Bacillus sp. DR90* در محدوده دمایی ۹۵-۳۰ درجه سلسیوس مورد بررسی قرار گرفته است؛ حداکثر فعالیت آلفاآمیلاز تولید شده در دمای ۴۵ درجه سلسیوس بوده و در محدوده ۹۵-۷۰ درجه سلسیوس با شیبی تند کاهش پیدا کرده است (۲۱). در سال ۲۰۱۳، فعالیت دمایی آلفاآمیلاز سویه‌ای از *Bacillis licheniformis* را مورد بررسی قرار داده و مشخص شد این آنزیم در محدوده دمایی ۸۰-۶۰ درجه سلسیوس بیشترین میزان فعالیت را دارا بوده است (۲۶). در سال ۲۰۱۴ آلفاآمیلاز *Bacillus sp. DR90* در محدوده ۳۵ تا ۷۵ درجه سلسیوس بیشترین میزان فعالیت و پایداری را نشان داد و دمای بهینه برای فعالیت و پایداری این آنزیم ۷۵ درجه سلسیوس به دست آمد (۲۵). در مطالعه صورت گرفته توسط کلوگوعه و همکاران[1]، دمای بهینه برای فعالیت نوعی آمیلاز مالتوژنیک و با مقاومت دمایی بالا، ۵۰ درجه معرفی شده است (۱۸). در سال ۲۰۱۰، شفیعی و همکاران[2] حداکثر فعالیت و پایداری آلفاآمیلاز *Nesterenkonia sp. F* را به ترتیب در دماهای ۴۵ و ۶۰-۳۵ درجه سلسیوس گزارش دادند (۱۹). همچنین حداکثر فعالیت و پایداری آلفاآمیلاز *Bacillus sp. ANT-6* به ترتیب در ۸۰و ۵۰ درجه سلسیوس به دست آمده است (۲۸).

نتیجه گیری کلی:

در پژوهش حاضر، دو سویه مولد آلفاآمیلاز گرمادوست به نام‌های *Bacillus licheniformis AT59* و *Bacillus licheniformis* AT70 از چشمه‌های آب گرم واقع در استان قزوین جداسازی شدند. بررسی فعالیت و پایداری آنزیم‌های به دست آمده، در حضور عوامل مختلف ز جمله دما، pH، یون‌ها و ترکیبات شیمیایی مختلف، صورت گرفته و مشخص شد آنزیم به دست آمده از سویه *Bacillus licheniformis* AT70 در محدوده دمایی گسترده از ۴۰ تا ۷۰ درجه

[1] Kolcuoğlu,.etal

[2] Shafiei,.etal

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

سلسیوس پایداری نشان داده و در دمای ۷۰ درجه سلسیوس به طور صد در صد پایدار بوده است. بنابراین آنزیم‌های به دست آمده در این پژوهش، به ویژه آنزیم *Bacillus licheniformis AT70* به دلیل پایداری دمایی بالا، به منظور استفاده در صنعت فرآوری نشاسته و به ویژه در مرحله مایع سازی نشاسته مناسب می‌باشند. همچنین، آنزیم‌های مورد نظر در pHهای قلیایی فعالیت بالایی از خود نشان داده‌اند. فعالیت آنزیم‌های مورد نظر در حضور ترکیبات شیمیایی مختلف مانند SDS، غلظت‌های مختلف نمک و همچنین شوینده‌های تجاری مشاهده شد که حاکی از کاربرد گسترده این آنزیم‌ها در صنایع مختلف می‌باشد. علاوه بر این مشاهده شد آنزیم‌های به دست آمده توانایی تجزیه نشاسته خام موجود در ضایعات کشاورزی همچون خرما را داشته و بنابراین پیشنهاد می‌گردد این ماده به عنوان سوبسترا برای تولید آنزیم آلفاآمیلاز در صنعت مورد استفاده قرار گیرد و همچنین می توان موارد زیر را جهت ادامه این تحقیق به محققین دیگر پیشنهاد داد:

انجام کروماتوگرافی لایه نازک و آنالیز محصولات حاصل از هیدرولیز نشاسته، جهت شناسایی دقیق آنزیم آلفاآمیلاز.

جداسازی ژن آلفاآمیلاز .

کلون کردن ژن آلفاآمیلاز در میزان مناسب به منظور تولیدت انبوه آن.

مهندسی پروتئین آلفاآمیلاز جهت افزایش کارایی‌این‌آنزیم.

تعیین ساختار آلفاآمیلاز با استفاده از کریستالوگرافی اشعه X..

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

منابع

1. Kumari, N. and K. Sethy, THE INVERTASE-A REVIEW. International Journal of Bio-pharmacology, Biotechnology and Allied Sciences, 2020. 1(2): p. 192-209.

2. Deljou, A. and I. Arezi, Production of thermostable extracellular α-amylase by a moderate thermophilic Bacillus licheniformis isolated from Qinarje Hot Spring (Ardebil prov. of Iran). Periodicum Biologorum, 2016. 118(4).

3. Garcia, M.A.V.T., C.F. Garcia, and A.A.G. Faraco, Pharmaceutical and biomedical applications of native and modified starch: A review. Starch-Stärke, 2020. 72(7-8): p. 1900270.

4. Kiran, S., et al., Isolation and characterization of thermostable amylase producing bacteria from hot springs of Bihar, India. International Journal of Pharma medicine and biological sciences, 2018. 7(2): p. 28-34.

5. Afrisham, S., Badoei-Dalfard, A., Namaki-Shoushtari, A. and Karami, Z. Characterization of a thermostable, CaCl 2-activated and raw-starch hydrolyzing alpha-amylase from Bacillus licheniformis AT70: Production under solid statefermentation. – J. Mol. Catal. B: Enzym,2016. 132: 98-106.

6.Azadian, F., Badoei-Dalfard, A., Namaki-Shoushtari, A. and Hassanshahian, M. Purification and biochemical properties of a thermostable, haloalkaline cellulase from Bacillus licheniformis AMF-07 and its application for hydrolysis of different cellulosic substrates to bioethanol production. – Mol. Bio. Res. Comm,2016.5: 143-155.

7.Badoei-Dalfard, A., Karami, Z., Ramezani-Pour, N. Bench scale production of nicotinic acid using a newly isolated Stenotrophomonas maltophilia AC21 producing highly-inducible and versatile nitrilase. – J. Mol. Catal. B: Enzym, 2016. 133: 552-559.

8.Badoei-Dalfard, A., Karami, Z., Ramezani-pour, N. Production and characterization of a nitrilase from Pseudomonas aeruginosa RZ44 and its potential for nitrile biotransformation. – Iranian J. Biotechnol,2016. 14: 142-153.

9. Davati, N., et al., Study of lactic acid bacteria community from raw milk of Iranian one humped camel and evaluation of their probiotic properties. Jundishapur journal of microbiology, 2015. 8(5).

10. Baysal Z, Uyar F, Aytekin C. Solid state fermentation for production of α-amylase by a *thermotolerant Bacillus* subtilis from hot-spring water. Process Biochemistry. 2003 Jul 31; 38(12):1665-8.

11. Božić N, Ruiz J, López-Santín J, Vujčić Z. Optimization of the growth and alpha-amylase production of *Bacillus subtilis IP 5832* in shake flask and laboratory fermenter batch cultures. Journal of the Serbian Chemical Society. 2011; 76(7):965-72.

12. Vaulot D, Geisen S, Mahé F, Bass D. pr2-primers: An 18S rRNA primer database for protists. Molecular Ecology Resources. 2022 Jan; 22(1):168-79.

13. Chandra MS, Mallaiah KV, Sreenivasulu P, Choi YL. Purification and characterization of highly

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

thermostable α-amylase from thermophilic *Alicyclobacillus acidocaldarius*. Biotechnology and Bioprocess engineering. 2010 Jun 1; 15(3):435-40.

14. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical chemistry. 1959 Mar 1; 31(3):426-8.

15. Goodfellow M. Phylum XXVI. Actinobacteria phyl. Nov. InBergey's manual® of systematic bacteriology 2012 Jan 1 (pp. 33-2028). Springer New York.

16. Karakaş B, İnan M, Certel M. Expression and characterization of *Bacillus* subtilis PY22 α-amylase in Pichia pastoris. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 2010 Jul 1; 64(3-4):129-34.

17. Kristjansson JK. Thermophilic organisms as sources of thermostable enzymes. Trends in Biotechnology. 1989 Dec 1; 7(12):349-53.

18. Kolcuoğlu Y, Colak A, Faiz O, Belduz AO. Cloning, expression and characterization of highly thermo-and pH-stable maltogenic amylase from a thermophilic *bacterium Geobacillus caldoxylosilyticus TK4*. Process Biochemistry. 2010 Jun 1; 45(6):821-8.

19. Shafiei M, Ziaee AA, Amoozegar MA. Purification and characterization of a halophilic α-amylase with increased activity in the presence of organic solvents from the *moderately halophilic Nesterenkonia sp. strain F*. Extremophiles. 2012 Jul 1; 16(4):627-35.

20. Fooladi J, Sajjadian A. 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 Mar; 2(1):46.

21. Asoodeh A, Alemi A, Heydari A, Akbari J. Purification and biochemical characterization of an acidophilic amylase from a newly isolated Bacillus sp. DR90. Extremophiles. 2013 Mar 1; 17(2):339-48.

22. Pandey A, Soccol CR, Larroche C, editors. Current developments in solid-state fermentation. Springer Science & Business Media; National Academy Science Letters.2019; 36(1), 9-17.

23.Prakash B, Vidyasagar M, Madhukumar MS, Muralikrishna G, Sreeramulu K. Production, purification, and characterization of two extremely halotolerant, thermostable, and alkali-stable α-amylases from *Chromohalobacter sp*. TVSP 101. Process Biochemistry. 2014 Feb 1; 44(2):210-5.

24.Samie N, Noghabi KA, Gharegozloo Z, Zahiri HS, Ahmadian G, Sharafi H, Behrozi R, Vali H. Psychrophilic α-amylase from *Aeromonas veronii* NS07 isolated from farm soils. Process Biochemistry. 2019 Sep 1; 47(9):1381-7.

25. Mahdavi, A., Hassan Sajedi, R., Rassa, M. & Jafarian, V. Characterization of an a-amylase with broad temperature activity from an acid-neutralizing Bacillus cereus strain. Iranian Journal of Biotechnology.2020; 8(2), 103-111.

26.Amoozegar M A, Samareh-Abolhasani B, Shafiei M, Didari M, Hamedi J Production of Halothermotolerant α-Amylase from a Moderately Halophilic Bacterium, Nesterenkonia Strain F. Prog Biol Sci.2013: 2:85–97.

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]

Biochemistry. 2005 Feb 1; 40(2):525-34.

28. Souza PM. Application of microbial α-amylase in industry-A review. Brazilian journal of microbiology. 2010 Dec; 41(4):850-61.

27.Sodhi HK, Sharma K, Gupta JK, Soni SK. Production of a thermostable α-amylase from *Bacillus sp*. PS-7 by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production. Process

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-06-09]