جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

در
امور دام و آبزیان شماره ۸۱ زمستان ۱۳۸۷
پژوهش و سازندگی

بررسی خصوصیات آلفا آمیلاز تولید شده به وسیله باکتری های ترموفیل جدا شده از چشمه های آب گرم ایران

• **مهناز فرهمند**
دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران
• **نور امیر مظفری**
عضو هیات علمی دانشگاه علوم پزشکی ایران
• **صدیقه مهرابیان**
عضو هیات علمی دانشگاه تربیت معلم تهران
• **رمضانعلی خاوری نژاد**
عضو هیات علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران
تاریخ دریافت: آذر ماه ۱۳۸۶ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ماه ۱۳۸۷
Email: Farahmand90@yahoo. com

چکیده

باکتری های ترموفیل منابع با ارزشی از آنزیم های هیدرولیتیک مقاوم به گرما هستند. آنزیم های مقاوم به گرما در صنعت دارای اهمیت بسیار می باشند و برای اهداف تجاری مختلف استفاده می شوند. از بین آنزیمهای هیدرولیز کننده نشاسته، آلفا آمیلاز یکی از مهمترین و قابل توجه ترین آنزیم ها از نظر تجاری خصوصاً در صنعت مواد شیرین کننده می باشد. برای فرایند تولید مواد شیرین کننده از نشاسته، دما باید ۵۰ درجه سلسیوس یا بالاتر و pH در حدود ۷ باشد تا از به رنگ قهوه‌ای درآمدن جلوگیری به عمل آمده و چسبندگی (ویسکوزیته) کاهش یابد. این امر نیازمند استفاده از آلفا آمیلاز مقاوم به حرارت به منظور مقاومت در برابر حرارت فرایند می باشد. باکتری ها از دو چشمه آبگرم خرقان (در استان قزوین) و محلات (در اراک) جدا شدند. نمونه های آب از ۵۰ سانتی متری سطح آب چشمه جمع آوری شدند. دمای آب در زمان نمونه برداری در مکان های خرقان و محلات به ترتیب، ۵۶ و ۴۸ درجه سلسیوس بود. پس از سانتریفیوژ کردن نمونه های آب، رسوبات باقیمانده در نوترینت براث غنی شده با عناصر ضروری کشت داده شدند و در درجه حرارت مناسب قرار داده شدند. چهار باکتری جدا شده از نظر مولکولی به وسیله PCR و ریبوتایپینگ ژن ۱۶S rRNA شناسایی شدند. آنها *Anoxybacillus pushchinoensis. Bacillus licheniformis Aneurinibacillus aneurinilyticus Aneurinibacillus thermoaerophilus* تشخیص داده شدند. تولید α - آمیلاز در پلیت های آگار نشاسته دار مورد بررسی قرار گرفت و میزان فعالیت این آنزیم به روش دی نیتروسالیسیلیک(DNS) اندازه گیری شد. pH و حرارت مناسب برای فعالیت آنزیم آمیلاز تعیین گردید. حداکثر فعالیت آنزیم *B.licheniformis* در ۷۰ درجه سلسیوس و pH=۷ مشاهده شد. حداکثر فعالیت آنزیم *A.aneurinilyticus* در ۷۰ درجه سلسیوس و pH=۸ بود در حالیکه برای آنزیم *A.pushchinoensis* در ۸۰ درجه سلسیوس و pH=۸ بود.

کلمات کلیدی: : باکتری های ترموفیل، آنزیم α-آمیلاز، چشمه آب گرم

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

Pajouhesh & Sazandegi No 81 pp: 161 - 167

Characterization of α-amylase produced by thermophilic bacteria isolated from Iranian hot spring waters

By: M. Farahmand, Azad University, N. A. Mozaffari, Member of Scientific Board of Faculty of Medicine Sciences of Iran, S. Mehrabian, Member of Scientific Board of Tarbiat Moalem University and R. Khavarinejad, Member of Scientific Board of Azad University.

Thermophilic bacteria are valuable sources of thermostable hydrolytic enzymes. Heat-stable enzymes have immense importance in industry and are generally utilized for a variety of commercial Purposes. Among the starch hydrolyzing enzymes, α-amylases have considerable commercial value, especially in sweetener industry. For the production process of sweeteners from starch, the temperature should be 50°c or higher and the pH close to 7 in order to prevent browning effects and reduce viscosity. It thus requires enzymes able to withstand the elevated process temperatures. Bacteria were isolated from two hot spring waters of Kharaghan (in Gazvin province) and Mahallat (in Arak). Water samples were collected from 50cm below the spring water surface.The water temperatures at the time of sampling at the Kharaghan and Mahallat sites were 56° c and 48° c, respectively. Following centrifugation of the water samples, any remaining pellets were cultured in trace element enriched nutrient broth and incubated at proper elevated temperatures. The four recovered bacteria were identified molecularly by PCR and 16S rRNA gene ribotyping. They were identified as Aneurinibacillus aneurinilyticus, *Aneurinibacillus thermoaerophilus*, *Anoxybacillus pushinoensis* and *Bacillus licheniformis*.

Amylase production was assayed on starch agar plates by dinitrosalicylic assay. The optimal pH and temperature for enzyme activity were characterized.The maximum activity for the *B.licheniformis* enzyme was observed at 70° c and at pH 7.0. The *A.aneurinilyticus* enzyme maximum activity was at 70° c and at pH 8.0 ; whereas , these for the *A.pushinoensis* enzyme was at 80° c and at pH 8.0 .

Key words: Thermophilic bacteria, α-amylase enzyme, Hot spring

مقدمه

یکی از مهم ترین و با قابلیت ترین میکروارگانیسم ها باکتری های ترموفیل می باشند. باکتری های ترموفیل میکروارگانیسم هایی هستند که رشد بهینه آنها در دمای بالاتر از ۴۵ درجه سلسیوس می باشند (۵ ، ۶ ، ۲۱). میکروارگانیسم های ترموفیل دارای پروتئین های غیر عادی و یا وضعیت فیزیکی و شیمیایی خاصی هستند که فعالیت آنها را در درجه حرارتی که پروتئین های سایر میکروب ها را تخریب می کند، به صورت کاملاً فعال حفظ می نماید (۱۱). این میکروارگانیسم ها از محیط های مختلفی مثل نواحی آتشفشانی، خاک مناطق گرمسیری، خاک برگ و چشمه های آب گرم جداسازی شده اند (۱۲،۷،۴،۳).

باکتری های ترموفیل به دلیل قابلیت تحمل حرارت بالایی که دارند دارای آنزیم های مقاوم به حرارت نیز می باشند که حتی برای فعالیت، نیازمند شرایط دمایی بالا می باشند (۲۳،۱۷،۱۴،۱۰). آنزیم های مقاوم به حرارت که از میکروارگانیسم های ترموفیل به دست می آیند، به دلیل قابلیت تحمل حرارتی بسیار مورد توجه قرار گرفته اند و در بیشتر صنایع از جمله تولید شربت گلوکز و فروکتوز، ساخت منسوجات و بخصوص پودرهای شستشو بسیار حائز اهمیت هستند (۲۱،۱۸). از میان آنزیم های هیدرولیز کننده نشاسته، آلفا آمیلازها یکی از مهمترین آنزیم ها هستند که نقش مهمی در تولید شیرین کننده ها در صنعت دارند.

در روند تولید مواد شیرین کننده مصنوعی از نشاسته دو نیاز اصلی وجود دارد: یکی از این شرایط حرارت پروسه است که ۵۰ درجه سلسیوس یا بالاتر بوده و دیگری pH آن می باشد که باید نزدیک به ۷ باشد. به شرط رعایت دو اصل فوق، از بوجود آمدن رنگ قهوه‌ای جلوگیری بعمل آمده و ویسکوزیته نشاسته کاهش می یابد. برای رفع این نیاز از α- آمیلازهای مقاوم به حرارت که قادرند حرارت بالا را تحمل کنند استفاده می شود (۲۷).

چشمه های آبگرم خرقان و محلات از چشمه های آب گرم ایران می باشندکه درجه حرارت آب این چشمه ها به ترتیب ۵۶ و ۴۸ درجه سلسیوس و pH آنها برابر ۷ و ۸ می باشد. چشمه خرقان در ۹۵ کیلومتری قزوین به همدان و چشمه محلات در ۳۰ کیلومتری غرب دلیجان واقع شده است. با توجه به درجه حرارت بالای آب این چشمه ها، از نظر وجود باکتری های ترموفیل مورد بررسی قرار گرفتند.

روش کار

جداسازی نمونه ها

در این تحقیق از عمق ۵۰ سانتی متری چشمه های آبگرم نمونه برداری

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

صورت گرفت. سپس عمل جداسازی باکتری های ترموفیل از نمونه های آب گرم انجام شد. از محیط کشت Sea water agar به همراه عناصر ضروری[1] برای رشد باکتری ها استفاده گردید و روی این محیط به روش کشت سفره ای[2]، باکتری ها کشت داده شدند.

سپس از کلنی های ظاهر شده با انجام کشت های مکرر[3]، کشت خالص تهیه گردید و پس از بدست آوردن فاز لگاریتمی رشد باکتری های مذکور، در این فاز باکتری ها با استفاده از گلیسرول ۱۵٪ در ۷۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

تعیین ترادف ژن ۱۶ S rRNA و شناسایی گونه های ترموفیل

محیط کشت مایع حاوی نوترنیت براث به همراه عناصر کمیاب لازم برای باکتری های ترموفیل انتخاب شد و باکتری داخل آن تلقیح شد. پس از گرماگذاری و هوادهی کشت مایع به مدت ۲۴ ساعت، از کشت مایع داخل لوله اپندروف استریل را پرکرده و سپس با دور ۱۱۵۰۰ rpm به‌مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ کرده و مایع رویی دور ریخته شد. مجدداً این عمل تکرار شد تا پس از چند نوبت میزان مناسبی بیومس باکتری رسوب نموده و جمع شود. . سپس استخراج DNA از بیومس تهیه شده بوسیله کیت استخراج صورت گرفت. برای اطمینان از استخراج DNA الکتروفورز انجام شد و باندهای DNA تخلیص شده به کمک دستگاه نمایانگرژل مشاهده شدند.

روش PCR و شرایط واکنش

در این روش PCR از پرایمرهای ۸F با توالی 5′ – AGAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3′ و ۱۴۹۲R با توالی 5′ – GGTTTACCTTGTTACGACTT – 3′ استفاده شد. نسبت های به کار رفته در PCR به قرار زیر بود:

PCR بافر: ۲/۵ میکرولیتر، ۱۰mM dNTps : ۰/۵ میکرولیتر، DNA الگو : ۱ میکرولیتر، $Mgcl_2$ ۵mM : ۰/۷۵ میکرولیتر، ۱۰mM Primer : از هرکدام ۱/۲۵ میکرولیتر، Smart taq polymerase : ۰/۵ میکرولیتر، آب مقطر : ۱۶/۳۵ میکرولیتر.

واکنش PCR در ۳۵ سیکل به‌مدت ۴۵ دقیقه با دمای ذوب اولیه ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، دمای ذوب ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، دمای انلینگ ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، دمای سنتز رشته‌ها ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱/۵ دقیقه و دمای اضافی نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰دقیقه انجام گرفت.

روش الکتروفورز

محصولات PCR روی ژل الکتروفورز در ولتاژ ۵ V/CM حرکت داده شدند. ژل با ۰/۴ گرم آگارز همراه ۴۰ میلی‌لیترآب مقطر و ۱۰ میلی لیتر بافر TBE تهیه شد که به این محلول ۲ میکرولیتر اتیدیوم بروماید اضافه شده تانک الکتروفورز حاوی بافر TBE بوده و مقدار آن طوری بود که روی ژل را می‌پوشاند. در کنار چاهک‌های نمونه یک DNA شاهد مثبت حرکت داده شد تا حدود قطعه‌های محصول PCR مشخص شود. پس از انجام عمل الکتروفورز، ژل در دستگاه نمایشگر ژل(Gel Doc) قرار داده شد و با تابش اشعه UV به اتیدیوم بروماید و ایجاد رنگ فلوروسانس باندهای مربوط به محصولات PCR دیده و از درستی PCR اطمینان حاصل شد. سپس محصولات PCR به کشور کره جنوبی ارسال شد و بوسیله تعیین ترادف ۱۶S rDNA گونه باکتری های جدا شده تشخیص داده شد.

سنجش فعالیت آنزیم آمیلاز

برای بررسی تولید آنزیم آمیلاز از نمونه های ترموفیل جدا شده کلونی های خالص شده را در محیط حاوی نوترنیت آگار به همراه ۱٪ نشاسته کشت داده و در انکوباتور با درجه حرارت مناسب (بر حسب نمونه ۵۶ و ۴۸ درجه سلسیوس) بمدت ۲۴-۴۸ ساعت قرار داده شدند. سپس نمونه های آمیلاز مثبت پس از ریختن چند قطره معرف لوگل، با ظهور هاله‌ای شفاف اطراف کلونی که ناشی از هیدرولیز نشاسته است، مشخص گردید.

در تولید آنزیم توسط باکتری‌ها از محیط‌های کشت پیش تولید و تولید استفاده گردید. محیط کشت پیش تولید شامل نوترنیت براث ۰/۸ g، پپتون سویا ۱/۰ g ، عصاره مخمر ۱/۰ g ، نشاسته سیب زمینی ۱/۰ g ، نمک طعام ۰/۵ g، و آب مقطر ۱۰۰ ml، و pH=۶/۸ می باشد. محیط کشت تولید شامل نشاسته سیب زمینی ۱/۰ g، پپتون سویا ۰/۵ g، عصاره گوشت ۰/۳ g، کلرید کلسیم ۰/۰۵ g، سولفات منیزیوم ۰/۰۳ g، فسفات پتاسیم ۰g/۴ و آب مقطر ۱۰۰ ml و pH=۶/۸ می باشد(۱، ۲۷،۲۴).

پس از کشت باکتری ها در محیط پیش تولید، آنها به محیط تولید انتقال یافتند. در زمانهای مشخص ۶۰،۴۸،۲۴ ساعت از ظروف حاوی محیط کشت تولید قرار گرفته در انکوباتور شیکردار، مقدار ۱۰ ml از محیط بصورت آسپتیک برداشته شده و با استفاده از سانتریفوژ معمولی ۳۰۰۰ xg به مدت ۱۵ دقیقه و دمای ۴ درجه سلسیوس، محلول رویی جدا و در شیشه استریل نگهداری شد.

در این تحقیق قندهای احیاء شده با استفاده از معرف دی نیتروسالیسیلیک اسید (DNS) اندازه‌گیری شدند. این روش توسط Brifield در سال ۱۹۴۵ ارائه گردید. (۸، ۱۵، ۱۹، ۲۶ ، ۲۷). برای ساختن این معرف یک گرم از پودر دی نیتروسالیسیلیک اسید را در ۵۰ ml آب حل کرده و به آهستگی ۳۰ گرم تارتارات مضاعف سدیم پتاسیم را به آن اضافه کردیم. سپس ۲۰ ml هیدروکسید سدیم (سود) ۲ نرمال اضافه کردیم و با آب مقطر حجم را به ۱۰۰ ml رساندیم. محلول نارنجی رنگی به دست آمد که دور از نور و اکسیژن در شیشه‌های تیره نگهداری شد.

سپس از سه لوله کنترل مثبت، کنترل منفی و بلانک استفاده کردیم. در لوله بلانک بافر و نشاسته محلول در بافر با pH = ۷، در لوله کنترل مثبت نمونه آنزیم استخراج شده، بافر و نشاسته و در لوله کنترل منفی، آنزیم، بافر و نشاسته را افزودیم. در لوله کنترل منفی بلافاصله DNS را اضافه کردیم. در لوله کنترل مثبت بعد از گذشت ۱۰ دقیقه (یا بیشتر که مدت زمان تأثیر آنزیم است) DNS را اضافه کردیم. تمامی لوله‌ها را به همراه لوله‌های استاندارد مالتوز به مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری جوش قراردادیم. سپس لوله‌ها را خارج کرده و پس از خنک شدن مقدار ۲/۵ ml آب مقطر به لوله‌ها اضافه کردیم و پس از مخلوط کردن، جذب آنها را در طول موج ۵۴۰ nm به وسیله دستگاه اسپکتروفتومترخواندیم.

علاوه بر این اثر pH و دما بر فعالیت آنزیم آمیلاز مورد بررسی قرار گرفت. همچنین دمای بهینه و pH بهینه برای رشد باکتری ها تعیین شد. برای سنجش pH اپتیمم برای فعالیت آنزیم آمیلاز در نمونه های جدا شده،

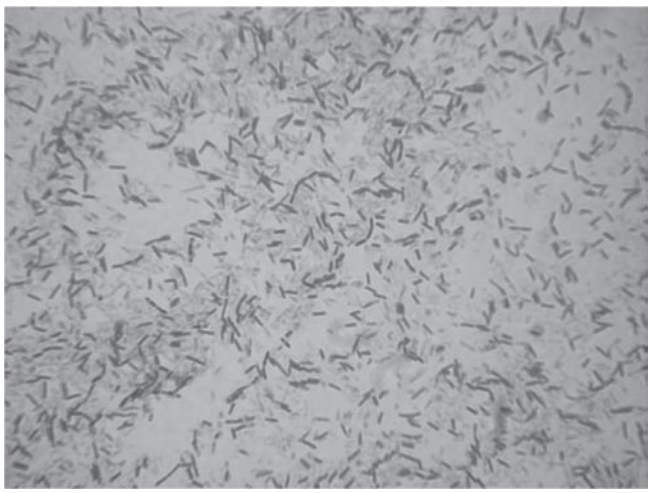
بافرهای مورد نیاز شامل: Tris (۲۰میلی مولار)، استات سدیم (۲۰۰ میلی مولار)، فسفات سدیم(۲۰۰ میلی مولار)، گلایسین (۲۰۰ میلی مولار) تهیه شد.(۱). سپس اثر pH از ۲ تا ۱۲ روی فعالیت آلفا آمیلاز بررسی گردید.

برای سنجش دمای اپتیمم برای فعالیت آنزیم آمیلاز در نمونه های جدا شده بافرتریس(۲۰ میلی مولار)، کلرید کلسیم (۱۰ میلی مولار) آب مقطر(۱۰۰ ml) و pH =۷/۴ مورد نیاز است. پس از آماده سازی نمونه ها، دما را از ۴۰ درجه سلسیوس، ۱۰ درجه ۱۰ درجه افزایش دادیم (۴۰-۱۰۰ درجه سلسیوس) و با استفاده از خواندن جذب در ۵۴۰ نانومتر، مقدار فعالیت آنزیم اندازه گیری شد.

نتایج:

از چشمه آبگرم خرقان (دو نمونه ۱ - KH-۱ و ۲ - KH) و محلات (دو نمونه ۲ - SH و ۳- SH) چهار باکتری ترموفیل جدا شد که تمام باکتری های جدا شده به دلیل داشتن رشد بهینه در بالای ۴۵ درجه سلسیوس در دسته باکتری های ترموفیل قرارگرفتند (۱۹،۱۸). دمای بهینه برای رشد هر دو باکتری ۱ - KH و ۲ - KH ۵۶ درجه سلسیوس و pH اپتیمم برای آنها ۷- ۶/۵ تعیین گردید. در مورد سویه‌های ۲ - SH و ۳- SHبهترین رشد در دمای ۴۸ درجه سلسیوس pH =۷ مشاهده گردید.

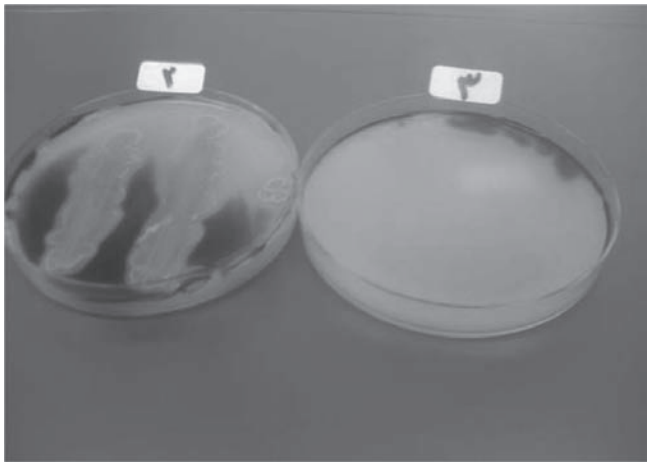
بر اساس رنگ آمیزی گرم، تست های بیوشیمیایی انجام شده (بررسی نتایج بر طبق کتاب مرجع برجی) و تعین ترادف ژن ۱۶S rRNA چهار باکتری جدا شده شناسایی شدند و گونه آنها تعیین شد . بر اساس این بررسی های مولکولی سویه ترموفیل ۲ - KH شکل شماره ۲) در گونه *Bacillus licheniformis* و سویه ترموفیل ۱ - KH (شکل شماره۱) در گونه *Anoxybacillus pushchinoensis* قرار داشتند. همچنین سویه های ۲ - SH و ۳- SH به ترتیب در گونه های *Aneurinibacillus aneurinilyticus* (شکل شماره ۳) و *Aneurinibacillus thermoaerophilus* تشخیص داده شدند.



شکل شماره۱- KH-۱ *Anoxybacillus pushchinoensis*

شکل شماره۲- KH-۲ *Bacillus licheniformis*

شکل شماره۳- SH-۳ *Aneurinibacillus aneurinilyticus*



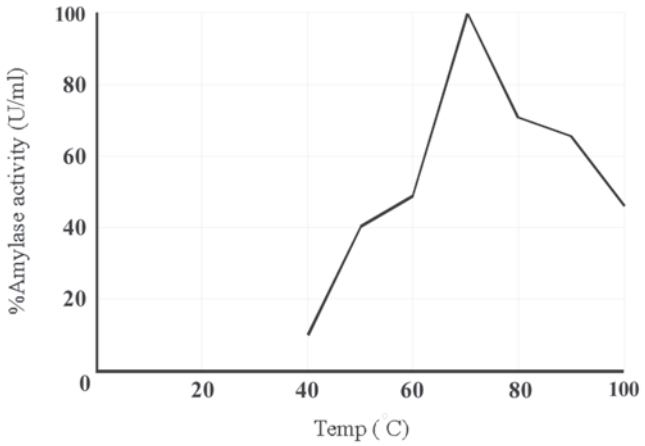
شکل شماره ۴-تولید آنزیم آمیلاز در۱) KH-نمونه۳) وKH-۲ (نمونه۲)

از بین ۴ سـویه ترموفیل جدا شده ۳ سویه (SH-۳ ، KH -۱ ، KH -۲) تولیـد آمیلاز قوی داشـتند که میزان فعالیت آنزیم در آنها مورد سـنجش قرار گرفت.

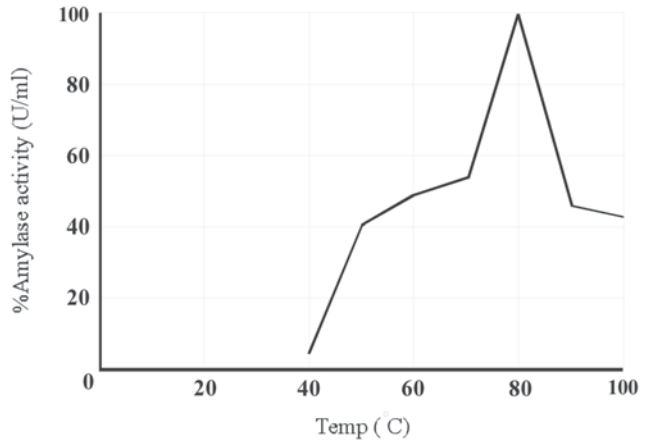
نتایج حاصل از بررسـی اثر دما بر فعالیت آنزیم آمیلاز تولید شـده بوسیله نمونه ها نشـان داد دمای بهینه فعالیت آنزیم در نمونه ۸۰ ۱- KH درجه سلسـیوس و در نمونه ۷۰ ۲- KH درجه سلسـیوس می باشد (نمودار ۱ و ۲). در بررسـی فعالیـت آنزیم آمیلاز در pH هـای مختلف، اپتیمم pH

جدول۱- اثر pH بر فعالیت آنزیم آمیلاز در نمونه های جدا شده

pH / نمونه	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
kH-1	۰/۰۰۴	۰/۰۲۵	۰/۰۳۱	۰/۰۳۶	۰/۰۴۴	۰/۰۵۰	۰/۰۶۸	۰/۰۷۲	۰/۰۷۴	۰/۰۷۳	۰/۰۷۷
kH-2	۰/۰۰۳	۰/۰۲۸	۰/۰۳۵	۰/۰۳۸	۰/۰۴۷	۰/۰۶۵	۰/۰۶۹	۰/۰۷۳	۰/۰۷۶	۰/۰۷۹	۰/۰۸۰

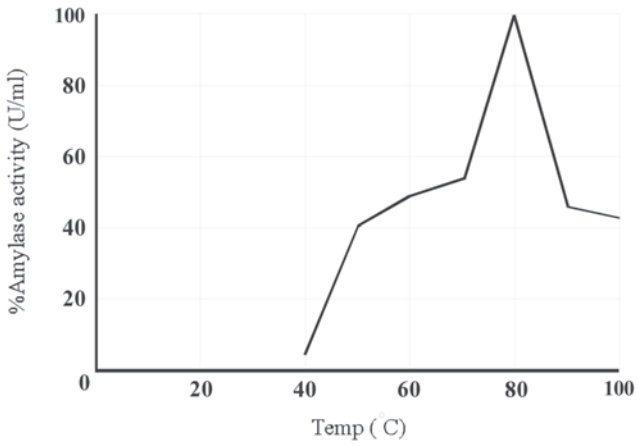


نمودار۱- بررسی اثر دما بر فعالیت آنزیم آمیلاز تولید شده بوسیله نمونهKH-۲



نمودار ۲- اثر دما بر فعالیت آنزیم آمیلاز تولید شده بوسیله نمونه KH-۱

در نمونـه ۱- KH ، ۸ = pH و در نمونـه ۲- KH ، ۷ = pH تعییـن گردید(جـدول۱). در نمونه ۳- SH بیشـترین فعالیت آنزیم در دمای ۷۰ درجه سلسـیوس و pH=۸ مشاهده گردید.(نمودار ۳) با توجه به نمودار ۱ آنزیم آمیلاز تولید شـده بوسـیله نمونه ۲ - KH در دمای ۷۰ ، ۸۰ و ۹۰ درجه سلسیوس به ترتیب دارای ۱۰۰ ، ۷۰ و ۶۶ درصد فعالیت می باشد. همانطور که در نمودار ۲ مشاهده می شود دمای بهینه فعالیت آنزیم تولید شده از نمونه KH-۱ ۸۰ درجه سلسیوس است، اما این آنزیم در دمای ۹۰ درجه سلسـیوس ۵۵ درصد فعالیت خود را حفظ کرده اسـت. آنزیم آمیلاز تولید شـده بوسیله سـویه ترموفیل ۳ - SH دردمای ۸۰ درجه سلسیوس حـدود ۵۰ درصد فعالیـت اولیه خود را داراسـت و در دمـای ۱۰۰درجه سلسـیوس این میزان فعالیت به ۴۴ درصد کاهش مـی یابد. این نتایج در



نمودار ۳- اثر دما بر فعالیت آنزیم آمیلاز تولید شده بوسیله نمونه SH-۳

نمودار ۳ مشخص می باشد.

بحث

در سال ۲۰۰۳ در تحقیقی مشابه با این پژوهش، تولید آمیلاز در ۱۰ گونه از جنس باسیلوس مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی مشخص شد گونه‌های *B.coagulans* و *B.licheniformis* (S۲) و *B. polymyxa* دارای فعالیت آنزیمی بالایی بود (۳).

در سال ۲۰۰۵ طی تحقیقی به وسیله Thaddeus و همکارانش باکتری هوازی آمیلولیتیک و ترموفیل از خاک جدا شد که در ۶۰ درجه سانتی گراد بهترین رشد را نشان داد و از نشاسته به عنوان منبع کربن استفاده کرد. این باکتری سویه HRO ۱۰ نام گرفت و مشخص گردید که به گونه *Geobacillus thermodenitrificans* تعلق دارد. آمیلاز تولید شده به وسیله این باکتری در pH = ۶/۵-۷/۵ بالاترین فعالیت را نشان داد (۲۵). این نتایج با نتایج پژوهش انجام شده همسوئی دارد.

یکی از مصارف اصلی آمیلازها تولید شیرین‌کننده‌های مورد استفاده در صنایع غذایی است (۲۶). در روند تولید مواد شیرین‌کننده مصنوعی از نشاسته دو نیاز اصلی دیده می‌شود. یکی این که درجه حرارت باید ۵۰ درجه سلسیوس یا بیشتر باشد و دیگر این که pH نزدیک به ۷ باشد. در بین آمیلازهای جدا شده در این تحقیق آمیلاز حاصل از باکتری *B.licheniformis* KH۲ که دارای دمای بهینه فعالیت ۷۰ درجه سلسیوس و pH بهینه فعالیت ۷ می‌باشد از نظر کاربرد در تولید مواد شیرین‌کننده می‌تواند حائز اهمیت باشد. زیرا برای رفع دو نیاز فوق باید از آمیلازهای مقاوم به حرارت که قادرند حرارت بالا را تحمل کنند،استفاده شود. این نتایج به دست آمده با مطالعات Z. Al – Qodah در سال ۲۰۰۷ و Jei – FU در سال ۱۹۹۵ همخوانی دارد (۲۷،۱۵).

در سال ۲۰۰۷ به وسیله Z. Al – Qodah اثر pH و دما بر آنزیم آمیلاز تولید شده به وسیله باکتری ترموفیل *B. sphaericus* مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که ماکزیمم فعالیت آنزیم در pH = ۷ می‌باشد و دمای بهینه نیز برای فعالیت ۶۵ درجه سانتی گراد تعیین شد (۲۷).

در تحقیق دیگری به وسیله Jel – FU یک آمیلاز برون سلولی از یک اکسترموفیل از جنس Thermus جدا شد و مشخص شد که pH و دمای بهینه فعالیت آنزیم روی سوبسترای نشاسته به ترتیب ۵/۵-۶/۵ و ۷۰ درجه سلسیوس بود (۱۵).

در سال ۲۰۰۴ Marcus و همکارانش طی مطالعاتی بر روی تولید آنزیم‌های هیدرولیز کننده نشاسته متوجه شدند که آنزیم حاصل از *B. coagulans* به دلیل این که دارای pH بهینه ۹-۷ و دمای بهینه ۶۵-۵۵ درجه سلسیوس است می‌تواند در صنعت هیدرولیز نشاسته مورد استفاده قرار گیرد زیرا که این pH و دما کاملاً با این پروسه سازگاری دارد (۱۸).

در سال ۲۰۰۶ مطالعه‌ای بر روی خصوصیات آمیلاز قلیایی تولید شده بوسیله باکتری Bacillus Sp.AB۰۴ صورت گرفت و pH و دمای بهینه فعالیت این آنزیم تعیین گردید. ماکزیمم فعالیت این آنزیم در pH = ۸ مشاهده شد اما در pH = ۱۰ باکتری ۸۰٪ فعالیت اولیه خود را حفظ کرده بود (۱). در این پژوهش نیز چنین نتایجی در آمیلاز تولید شده به وسیله سویه۱ - KH مشاهده شد.

همچنین Igaranshi و همکاران در سال ۱۹۸۸ میلادی ، یک آلفا آمیلاز فعال در شرایط قلیایی جداسازی کردند که pH بهینه فعالیتش ۸-۸/۵ بود و این α- آمیلاز از باکتری *Bacillus firmus* بدست آمده و دمای بهینه فعالیت آنزیم ۵۵ درجه سلسیوس بود (۱۳).

در سایر تحقیقات، همانند این پژوهش، باکتری های ترموفیل از چشمه های آب گرم جدا شده اند. در سال ۱۹۹۸ باکتری های هایپر ترموفیل از جنس Aquifex از چشمه های آب گرم Ganiba و Nakanoyu در ژاپن جدا شدند . دمای آب این چشمه ها ۵۲ تا ۷۲ درجه سلسیوس و pH آنها ۸ – ۷/۲ بود (۹). در سال ۲۰۰۶ بوسیله Weidong و همکارانش یک سویه ترموفیل جدید از چشمه آب گرم Zarvarzin در روسیه جدا شد. با بررسی های انجام شده گونه این باکتری *Thermalkalibacillus uzoniensis* تشخیص داده شد.(۲۸)

با توجه به اینکه در صنایع مختلف بخصوص صنایع نساجی، شوینده و تولید مواد شیرین کننده از آنزیم آمیلاز در سطح وسیعی استفاده می شود(۸), لذا باکتری های ترموفیل تولید کننده چنین آنزیم هایی همواره مورد توجه قرار گرفته اند. در صنعت تولید مواد شیرین کننده که نیاز به دمای بالاتر از ۵۰ درجه سلسیوس و pH خنثی می باشد (۲۲,۲۰,۲) ، آنزیم آمیلاز مقاوم به حرارت جدا شده از نمونه KH-۲ می تواند حائز اهمیت باشد.

همچنین آنزیم های آمیلاز جدا شده از نمونه های KH -۱ و SH - ۳ که دارای ماکزیمم فعالیت در pH =۸ می باشند، می توانند از لحاظ کاربرد در صنایع شوینده مورد بهره برداری قرار گیرند.

پاورقی ها

1- Trace Element

2-Spread Plate

3- Sub Culture

منابع مورد استفاده

1-A.Behal, J.Singh. 2006. Characterization of alkaline α-Amylase from Bacillus sp.AB04. Int. J.Agri. Biol. 8,1:80-83.

2-Ajayai,Fagade.2003.Utilization of corn starch as substrate for β-amylase by bacillus spp.African Journal of Biochemical Research.6(1):37-42.

3-Alexander, M. 1997. Introduction to soil microbiology. NewYork , pp:467.

4-Allais, H. Lopez, G.Kammoun. 1987. Isolation and characterization of thermophilic bacterial strains with inulinase activity. Appl. Environ.Microbiol. 53: 942-945.

5-Akher, M.Leithy, M.A. 1983.Optimal condition of the production. Zentralbl. Bacterial. Parasitek.Infektisokr. Hyg. 2.128.(5-6): 483-490.

6-Akpan, I.Bankol, Adesemowo, A.M, Latunde-Dada. 1999. Production of amylase by *A.niger* in a cheap solid medium using rice bran and agricultural materials. Trop.Sci. 39:71-77.

7-Beffa, T.Blanc, M.Lyon.1996.Isolation of thermus strains from hot composts (60°c to 80°c). Appl. Environ. Microbiol. 62:1723-1727.

8-Boyer, E.W. 1972. Extracellular alkaline amylase from Bacillus species. J.Bacteriol. 110: 992-1000.

9 -Brok, T.D.1998.Thermophilic microorganisms and life at high temperatures. New York,N.Y: Springer-Verlag 9.

10-Campbel, L.L, Clevel, Philip, d. 1961. Thermostable α-amylase of *Bacillus stearothermophilus*. J.Biol.Chem. 236: 2960-2969.

11-Cordeiro CAM, Matins Mill, Luciano AB. 2002. Production and properties of α-amylase from thermophilic Bacillus sp. Brazil.J. Biotechnol. pp: 33.

12-Hazem A, Manar A. 2003. Genetic polymorphism by RAPD-PCR and phenotypic characteristics of isolated thermotolerant Bacillus strains from hot spring sources. New Microbiol. 26(3): 249-256.

13-Igaranshi, K,Hatada. 1988. Enzimatic properties of a novel liquefying α-amylase from an alkaliphilic Bacillus isolated and entire nucleotide and amino acid sequences. Appl. Environ. Microbiol. 64: 3282-3289.

14-Ivanova, V.Dobreva, E.Emanuilova. 1993. Purification and characterization of thermostable alpha-amylase from *Bacillus licheniformis*. J. Biotechnol. 28: 277-289.

15-Jei.Fu Shaw, Fu.Pang Lin. 1995. purification and properties of an extracellular α-amylase from Thermus sp. Bot. Bull. Acad. Sin. 36:195-200.

16-Jin F,Li Y, Zhang Ch. 2001. Thermostable α-amylase and α-galactosidase production from the thermophilic and aerobic Bacillus sp. JF strain. Process Biochem. 36:559-564 .

17-Johnvesly, B.Naik. 2001. Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic Bacillus sp.IB99 in a chemistry defined medium. Process Biochemistry.37: 139-144.

18-Marcus schally.2004.Developments in the use of bacillus species for industrial production.Can.j.Micribiol. 50:1-17.

19-M.Asgher, M.Javaid Asad, S.U.Rahman. 2007. A thermostable α-amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. Journal of Food Engineering.79: 950-955.

20-Michel, Laurent.1997.Rapid identification of heterotrophic thermophilic, spore-Forming bacteria isolated from hot composts.International Journal of Systematic Bacteriology. 1246-1248.

21-Narang, Styanarayana. 2001. Thermostable α-amylase production by an extreme thermophilic *Bacillus thermoleovorans*. Lett.Appl. Microbiol.32:31-35 .

22-Pandey, A.Nigam. 2000. Advances in microbial amylases. Biotechnology and Applied Biochemistry. 31:135-152.

23-Stefanova,M.Emanuilova. 1999. Characterization of thermostable alpha amylase from *Bacillus brevis* EUF.J. Biochem.207:345-349.

24-Swamy, M.V.Seenaya. 1995. *Thermostable* pullulanase and α-amylase activity from *Clostridium thermosulfurogenes* SVq-optimization of culture condition for enzyme production. Process Biochemistry. 31:157-162.

25-Thaddeus, Ezeji, Arite.2005.Isolation, characterization and identification of *Geobacillus thermodenitrificans* Hro 10 an α-amylase and α-glucosidase producing thermophile.Canadian Journal of Microbiology. 51(8): 685-693.

26-Zeriksum, J.G. 1979. Thermophilic Bacteria, Ecology, Physiology and Technology Enz. Microbiol. Technol. 1:243-245.

27-Z.Al.Qodah, H.Daghstani, Ph.Geopel. 2007. Determination of Kinetic parameters of α-mylase producing thermophile Bacillus sphaericus. African Journal of Biotechnology.6(6): 699-706.

28-Weidong Zhao. Carolyn Weber.2006. Thermoalkalibacillus uzonensis gen. nov. sp. nov, a novel aerobic alkali-tolerant thermophilic bacterium isolated from a hot spring in Uzon Caldera, Kamchatka. Extremophiles. 10: 337-345.