جداسازی، شناسایی مولکولی و بهینه سازی تولید آنزیم آمیلاز در اکتینومیست دریایی (Acx1) از خور شادگان

محمد امین شاوردی[۱]، سهیلا مطرودی[۲]* و محمدباقر یخچالی[۱و۳]*

[۱] ایران، میمه، موسسه آموزش عالی غیر انتفاعی غیر دولتی نور دانش

[۲] ایران، خرمشهر، دانشگاه علوم وفنون دریایی خرمشهر، دانشکده علوم دریایی، گروه زیست شناسی دریا

[۳] ایران، تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

تاریخ دریافت: ۹۶/۲/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۶/۸/۳۰

چکیده

اکتینومیستها باکتریهای گرم مثبت و منابعی سرشاراز ترکیبات زیستی فعال می‌باشند که متابولیتهای ثانویه حاصله از آنها به طور گسترده به عنوان ترکیبات دارویی استفاده شده است. یکی از مهمترین متابولیتهای ثانویه آنزیمها می باشند که به عنوان بیوکاتالیست در پروسه های بیولوژیکی عمل می‌کنند. این ترکیبات به لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه و سازگار با محیط زیست می باشند. استحصال انواع آنزیمها ازاکتینومیستها کمک شایانی به صنعت واقتصاد جهانی کرده است به طوری که یکی از شاخصهای رونق اقتصادی در کشور های پیشرفته بهره مندی از این آنزیمهاست. هدف از این تحقیق جداسازی و شناسایی اکتینومیست از رسوبات خور شادگان و بررسی شرایط بهینه رشد و تولید آنزیم آمیلاز در جدایه منتخب می‌باشد. شناسایی مولکولی جدایه توسط تکثیر ژن 16S rRNA بااستفاده از پرایمرهای ۲۷ F و۱۴۹۲ R طی فرآیند PCR انجام شد. شرایط بهینه رشد جدایهAcx1 در شرایط نمک ۶ درصد و۸ pH و نیز دمای ۳۵ درجه سانتی گراد پایش شد و مقدار آنزیم به دست آمده در شرایط بهینه ۸۰۱۵۰ واحد (یک واحد فعالیت آمیلازی مقدار آنزیم مورد نیاز برای آزادسازی یک میکرو مول گلوکز در یک دقیقه است) بود. نتیجه حاصل نشان داد که تولید آنزیم با آهنگ رشد باکتری رابطه مستقیم دارد.

واژه های کلیدی: اکتینومیست ،آمیلاز، 16S rRNA، خور شادگان.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۶۱۵۳۵۳۳۳۲۲، پست الکترونیکی: s.matroodi@kmsu.ac.ir

مقدمه

باکتریها در طبیعت به صورتهای مختلفی دیده شده و کاربردهای مختلفی ازجمله کاربردهای پزشکی، صنعتی و اقتصادی نیز دارند(۲۲). میکروارگانیسمهای دریایی به عنوان منابع غنی و اعجاب انگیز تولید کننده متابولیتهای ثانویه به شمار می روند که در این میان اکتینومیستها دارای پتانسیل بالقوه و قوی در تولید متابولیتهای ثانویه نظیر آنزیمها، آنتی بیوتیکها، مواد ضدسرطان، حشره کش ها و ترکیبات دیگر می باشند (۱۸). میکرو ارگانیسمها در حدود ۲۳/۰۰۰ نوع متابولیت ثانویه مختلف تولید می کنند. از میان اکتینومیستها نیز حدود ۷۶۰۰ متابولیت ثانویه تا سال ۲۰۱۰ توسط گونه های مختلف استرپتومایسس حاصل شدند(۱۰). این باکتریها راسته ای از خانواده بزرگ اکتینوباکترها هستند که دارای جنسهای مختلف و گوناگونی اند. جنس غالب و شناخته شده در میان اکتینومیستها، استرپتومایسس است. استروپتومایسسها به دلیل تنوع گونه ای بالا (بیش از ۵۰۰ گونه)و تولید۷۵-۸۰ درصد آنتی بیوتیکهای موجود در بازار، از اهمیت ویژه ای برخوردارند (۱۱). به نظر می رسد اکتینومیستهای دریایی

منبع بالقوه ای از ترکیبات فعال زیستی و همچنین منبع غنی از متابولیتهای ثانویه باشند. آنها به دلیل توانایی در تولید متابولیتهای جدید و همچنین مولکولهای با اهمیت دارویی دارای موقعیت ویژه در اهداف برنامه های مطالعاتی هستند (۳).

آمیلازها آنزیمهایی هستند که مولکول نشاسته را به محصولات متنوعی تبدیل می کنند ازجمله دکسترینها و در مراحل بعدی با شکستن پیوندهای 4-1 -ß بین مولکولهای گلوکز، به پلیمرها ی کوچکتر که اغلب شامل واحدهای گلوکزمی باشد تبدیل می کند (۱۴). این آنزیمها اهمیت زیادی در زیست فناوری امروزی با کاربردهای وسیع در صنایع غذایی، تخمیری، نساجی و کاغذسازی دارند. علی رغم اینکه آمیلازها می توانند از چندین منبع از جمله: گیاهان، حیوانات و میکروارگانیسمها مشتق شوند، اما آمیلاز های میکروبی مورد استفاده صنایع می باشند. امروزه تعداد زیادی از آمیلازهای میکروبی به صورت تجاری قابل استفاده و در دسترس هستند که تقریباً جایگزین تمامی روشهای سنتی هیدرولیز شیمیایی نشاسته در صنایع شده اند (۲۱). تولید آمیلاز در اکتینومیستها یک ویژگی بارز به حساب می آید و به طور معمول در استرپتومایسس، که به عنوان منبع غنی از آنزیمهای آمیلازی مطرح می باشد، مشاهده شده است (۱۴). وجود آمیلاز در اکتینوباکترها مشخصه ای بارز است وعموماً دراستروپتومایسسها، جنسی که منبع غنی و بالقوه دارنده آنزیم آمیلازی است مشاهده می شود(۹). در این مطالعه به منظور شناسایی اکتینومسیتها با توانایی تولید آنزیم آمیلاز از رسوبات خور شادگان اقدام به جداسازی ایزوله‌ها و انتخاب فعال‌ترین ایزوله در تولید آنزیم آمیلاز گردید. همچنین شرایط بهینه رشد از قبیل دما، pH و غلظت نمک NaCl در تولید آنزیم آمیلاز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

نمونه برداری در اردیبهشت ۱۳۹۵ از خورشادگان، از رسوبات ساحلی بین جزرومدی ساحل خور با طول جغرافیایی۴۸ درجه و۵۵ دقیقه غربی و عرض جغرافیایی ۳۰ درجه و ۲۹ دقیقه شمالی از عمق ۱۵ سانتیمتری انجام شد. جهت جداسازی اکتینومیستها، ابتدا رسوبات تهیه شده به دمای اتاق رسیدند. پس ازآن رقتهایی از نمونه رسوب به وسیله آب دریای استریل تهیه شد. برای این منظور،۲۰ گرم رسوب با آب دریای استریل به حجم۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شده و به مدت ۱ ساعت بر روی شیکر آزمایشگاه و در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد همگن شد. پس از آن رقتهای مختلفی تا 10^{-6}و نیز لوله بدون رقت از سوسپانسیون مذکور تهیه گردید (۱۰). بعد از آن جهت جداسازی اکتینومیستها از محیط کشت انتخابی استارچ کازئین آگار(SCA) استفاده شد (۱۵). مقدار۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر آنتی بیوتیک نیستاتین و ۰۰/۱ میکروگرم بر میلی لیتر آنتی بیوتیک ریفامپسین و یک میلی لیتر از رقتهای تهیه شده به محیط افزوده شد. استفاده از آنتی-بیوتیکها جهت جلوگیری از رشد باکتریها و قارچهای احتمالی می‌باشد. پلیتها به انکوباتور۲۸ درجه سانتی گراد منتقل شده و به مدت ۱۴روز انکوبه شدند.

استخراج DNA ژنومی و PCR: DNA اکتینومیست Acx۱ با استفاده از کیت استخراج DNA باکتریهای گرم مثبت Cat. No. PR881614Cinna pure DNA استخراج گردید. واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای F۲۷ و R۱۴۹۲(جدول ۱)،مواد مورد استفاده و شرایط واکنش PCR مطابق جدول ۲ و جدول ۳ انجام شد (۸).

جدول ۱ – مشخصات پرایمر مورد استفاده

نام پرایمر	توالی آغاز گر
F۲۷	F:5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′
R۱۴۹۲	R: 5′-GGTTACCTTGTTACGACTT-3′

جدول ۲- مواد و مقادیر مصرفی در واکنش PCR

ماده	غلظت	مقدارجهت واکنش ۲۵میکرولیتر
DNA	۱۰۰نانوگرم	۲ میکرولیتر
آنزیم Taq DNA Polymerase	۵u/µl	۰/۵ میکرولیتر
PCR Buffer	۱۰x	۲/۵ میکرولیتر
Mgcl2	۵۰میلی مولار	۱ میکرولیتر
dNTP	۱۰ میلی مولار	۰/۵ میکرولیتر
آغازگر ۱	۱۰ پیکومول	۲میکرولیتر
آغازگر ۲	۲۰ پیکومول	۲میکرولیتر
آب تزریقی	-	۱۴/۵ میکرولیتر

جدول ۳- سیکل حرارتی دستگاه PCR

مراحل	درجه حرارت (℃)	زمان	تعداد سیکل (چرخه)
واسرشت سازی اولیه	۹۵	۲ دقیقه	۱
واسرشت سازی	۹۵	۳۰ ثانیه	-
اتصال	۵۰	۳۰ ثانیه	۳۰
بسط	۷۲	۴۵ ثانیه	-
بسط نهایی	۷۲	۵ دقیقه	۱

رسم منحنی رشد اکتینومیست شناسایی شده: ارلن حاوی محیط کشت برای هوادهی بیشتر برروی شیکر و بادور۱۵۰ دور در دقیقه و در دمای۲۸ درجه سانتی گراد قرار داده شد. بعد از آن هر۱۲ ساعت یکبار مقدار۲ میلی‌لیتر از محیط کشت به وسیله یک پیپت استریل برداشته شد و جذب نوری آن در طول موج ۵۷۸ نانومتر اندازه‌گیری شد.

بهینه سازی شرایط رشد برای تولیدآنزیم آمیلاز: پس از انتخاب گونه منتخب اکتینومیستها مقدار آنزیم آمیلاز در واحد زمان اندازه گیری و شرایط تولید حداکثری آنزیم بررسی شد. ۱ الی ۲ کلونی مستقیماً به ۵۰ میلی لیتر محیط پایه(سوکروز ۲ درصد، پپتون ۰/۳۵ درصد و عصار مالت ۰/۱۵ درصد) تلقیح شد. پس از آن محیط کشت بر روی شیکربا سرعت ۱۵۰ rpm در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد قرار داده شد. هر ۱۲ ساعت یک بار OD محیط کشت در مقابل محیط کشت پایه در طول موج ۵۷۸ نانومتر اندازه گیری شد.

تعیین شرایط بهینه رشد: برای بهینه سازی شرایط نمک (NaCl)، ابتدا محیط پایه‌ای با درصدهای نمک (NaCl) ۲، ۶ و ۱۰ ساخته و با تلقیح اکتینومیست منتخب رشد باکتری با اندازه گیریOD ها بررسی شد.

برای بهینه سازی شرایط pH، در مرحله بعد برای سنجش مقدار OD های حاصله از رشد باکتری، محیط پایه ای با درصد نمک ۶ و در چهارpH ۴، ۶، ۸ و ۱۰ ساخته شد. در غلظت ۶ درصد نمک بیشترین رشد اکتینومیست منتخب ثبت شد. آزمایشات به همان صورت گفته شده در قبل برای ارلنهای ۵۰ میلی لیتر حاوی محیط پایه با pH های مختلف صورت پذیرفت و OD ها همگی ثبت شد.

با توجه به اینکه درpH۸ بالاترین OD رشد باکتری ثبت شد برای سنجش مرحله بعدی یعنی ارزیابی رشد اکتینومیست منتخب در دماهای مختلف محیط پایه ای با غلظت نمک ۶ و۸ pH ساخته شد. حال محیط ساخته شده در دماهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت . OD رشد

دماهای ۲۰، ۲۸، ۳۵ و ۴۰ درجه سانتی گراد جمع آوری و ثبت گردید.

جهت سنجش تولید آنزیم آمیلاز در شرائط بهینه رشد نمونه اکتینومیست منتخب به صورت مستقیم درون ۵۰ میلی لیتر محیط کشت مایع بهینه و دمای مطلوب تلقیح و بر روی شیکر با سرعت۱۵۰rpm قرار گرفت. پس از آن هر ۱۲ ساعت یکبار مقدار ۵ میلی لیتر از محیط جمع آوری شد OD آن اندازه گیری و سپس برای انجام آزمایش سنجش آنزیم آمیلاز با دور(rpm) ۴۵۰۰سانتریفیوژ شد.

تعیین فعالیت آنزیم آمیلازبه روش کمی: در تمامی آزمایشات سنجش فعالیت آنزیم، دو لوله آزمایش یکی به عنوان شاهد و دیگری به عنوان آزمون انتخاب شد، سپس مراحل کاری به ترتیب زیر انجام شد:

۱- در هر دو لوله ۱ میلی لیتراز محلول نشاسته ۱ درصد به عنوان سوبسترای آنزیم ریخته شد.

۲- در لوله تست ۰/۵ میلی لیتر نمونه آنزیمی و در لوله شاهد ۰/۵ سی سی آب مقطر ریخته شد.

۳- به هر دو لوله ۰/۵ میلی لیتربافر سیترات ۰/۵ مولار با pH ۴/۸اضافه شد.

۴- نمونه ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد در بن ماری انکوبه شدند.

۵- برای انجام واکنش آنزیمی ۲ میلی لیتر معرف (3,5-Dinitro-2-hydroxybenzoic acid) DNS اضافه شد.

۶- لوله ها به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار داده شدند تا در اثر احیای معرف DNS توسط قند احیاء شده (گلوکز)، تغییر رنگ معرف از زرد به قرمز ایجاد شود.

۷- ۱ میلی لیترمحلول تارتارات مضاعف سدیم و پتاسیم ۴۰ درصد برای پایداری رنگ محیط اضافه شد.

۸- جذب نوری در طول موج ۵۷۸ نانومتر خوانده ونتایج ثبت شد.

اختلاف جذب بین لوله شاهد و لوله تست بیانگر میزان قند احیاء کننده به وجود آمده از فعالیت آنزیم آمیلاز در طی مدت واکنش است.

تهیه منحنی استاندارد گلوکز در طول موج۵۷۸ نانومتر: ترسیم منحنی استاندارد گلوکز در طول موج ۵۷۸ نانومتر جهت محاسبه میزان گلوکز حاصله از فعالیت آنزیم آمیلاز ضروری است . پس از تهیه محلول ۱۰۰ میلی مولار گلوکز از آن به عنوان محلول اصلی در تهیه محلولهای صفر، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۸۰ و ۱۰۰ میلی مولار استفاده می شود. محلول صفر دارای تنها بافر سیترات ۰/۵ مولار باpH۴/۸باشد. حجم هر لوله با استفاده از همین بافر به ۱۰ میلی لیتررسیده سپس ۲ میلی لیتر معرف DNS به هر لوله افزوده شده و لوله ها در بن ماری جوش به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شدند. پس از سرد شدن لوله ها میزان جذب نوری خوانده شد.

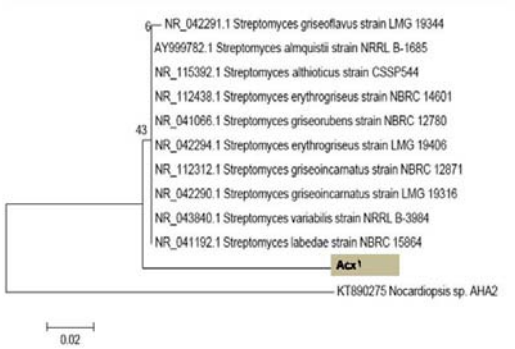
آنالیز داده ها: کروماتوگرامهای به دست آمده ازتوالی یابی ابتدا به وسیله نرم افزار Chromes بررسی و ویرایش شدند. پس از آن توالی به دست آمده در پایگاه اطلاعات زیستی با استفاده ازبرنامه Blast با توالیهای ثبت شده در پایگاه همردیف و شناسایی شد. برای رسم درخت فیلوژنی از نرم افزار MEGA6 استفاده گردید.

نتایج

تأیید تکثیر ژن 16S rDNA و توالی یابی محصول PCR: توالی محصول PCR ژن 16S rDNA جدایهAcx1 توسط شرکت ماکروژن کره ای انجام شد و با توالیهای ثبت شده در بانک ژنی مقایسه گردید. نتایج نشان داد تشابه جدایه مورد نظربا ۸۸الی ۸۹ درصد تشابه متعلق به *Streptomyces* spp. می باشد.

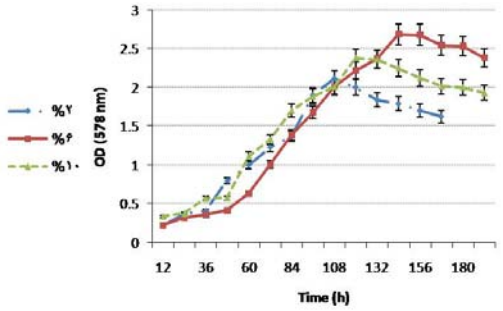
رسم درخت فیلوژنی گونه مورد مطالعه و مقایسه با گونه های مشابه: دربخشی از تحقیق حاضر، روابط فیلوژنی بین گونه های اکتینومیست با استفاده از ژن 16S

rRNA مورد بررسی قرار گرفت. به منظور رسم درخت فیلوژنتیکی، ۱۰ توالی مربوط به گونه های اکتینومیست و توالی مربوط به ژن 16S rRNA گونه *Nocardiopsis* sp. که به عنوان out group در نظرگرفته شده است، ازبانک ژن گرفته شد و درتجزیه و تحلیل داده ها وارد گردید. سپس درخت فلوژنتیکی به روش پیوند همجواری (NJ) ترسیم شد (شکل ۱).



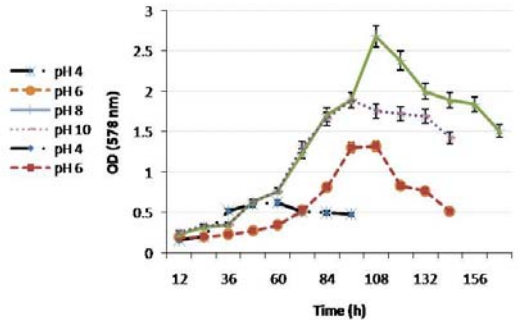
شکل ۱- درختچه Neighbor Joining گونه ACX1 بر اساس توالی ژن 16SrDNA و *Nocardiopsis sp.AH2* به عنوان outgroup می‌باشد.

کشت جدایه Acx1 در غلظتهای مختلف نمک: پس از کشت جدایه Acx1 در محیط پایه ای با غلظتهای ۲، ۶ و ۱۰ درصدی نمک نتایجی به دست آمد که در آن بیشترین رشد جدایه مورد نظر در نمک ۶ درصد ثبت شد (شکل ۲).



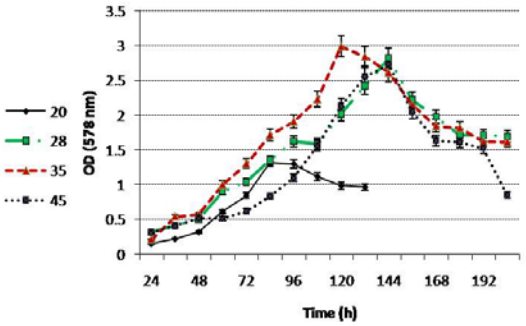
شکل ۲- منحنی مقایسه ای رشد Acx۱ درغلظتهای مختلف نمک دریایی

کشت جدایه Acx۱ در pH مختلف: از کشت جدایه Acx۱ در محیط پایه ای با pH۴، ۶، ۸ و ۱۰نتایجی طبق جدول ومنحنی زیر به دست آمد. بیشترین رشد جدایه مورد نظر در pH۸ ثبت شد (شکل ۳).



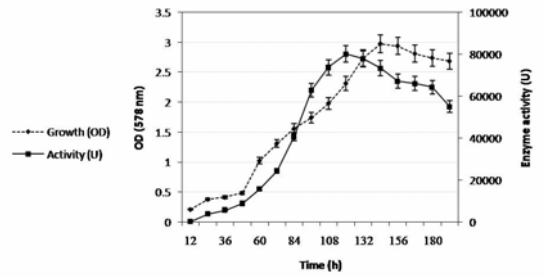
شکل ۳- منحنی مقایسه ای رشد Acx۱ درpH مختلف

کشت جدایه Acx۱ در دماهای مختلف: دراین مرحله جدایه Acx۱ در محیط پایه ای با دماهای ۲۰، ۲۸، ۳۵ و ۴۵ درجه سانتی گراد کشت داده شد. بیشترین رشد جدایه مورد نظر در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد ثبت شد(شکل ۴).



شکل ۴- منحنی مقایسه ای رشد Acx۱ دردماهای مختلف

محاسبه تولید آنزیم آمیلاز جدایه Acx۱ در شرایط بهینه: پس از تعیین شرایط بهینه رشد تولید آنزیم آمیلاز در جدایه Acx۱ بررسی و نتایج حاصله نشان داد بیشترین مقدار تولید آمیلاز ۸۰۱۵۰ واحد آمیلاز (میکرومول) در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد، pH ۸ و غلظت نمک ۶ درصد است(شکل ۵) .



شکل ۵- منحنی تولید آنزیم آمیلاز در شرایط بهینه رشد Acx۱

بحث و نتیجه گیری

زیستگاههای خشکی و دریایی پر از منابع میکروبی غنی از لحاظ ترکیبات فعال زیستی هستند(۱، ۲ و ۸). در این میان میکروارگانیسمهای دریایی به علت اینکه کمتر از میکرو ارگانیسمهای خشکی مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته اند بیشتر مورد توجه واقع شده اند. محیطهای دریایی منابع غنی برای جداسازی میکرو ارگانیسمهای جدید با پتانسیل تولید متابولیتهای ثانویه هستند (۴ و ۷). در بین این میکرو ارگانیسمها، اکتینومیستها اهمیت بسیار ویژه دارند و آن به علت تولید ترکیبات زیستی فعال متنوع با طیف وسیعی از فعالیتهای بیولوژیکی است (۵ و ۱۶). هدف از تحقیق حاضر جداسازی و شناسایی اکتینومیستهای دریایی تولید کننده آمیلاز در منطقه جنوب غرب کشور(خور شادگان)و معرفی گونه های جدید و شرایط بهینه رشد آنها می باشد.

در این تحقیق جدایه اکتینومیست از ناحیه جزر و مدی ساحل خور شادگان، براساس خصوصیات مورفولوژی، تستها بیوشیمیایی و بررسی کیفی تولید آمیلاز جداسازی شده و جدایه ای که بیشترین تولید آمیلاز را در آزمایشات کیفی از خود نشان داد مورد شناسایی با استفاده از ژن 16S rRNA قرار گرفت و شرایط تولید آنزیم آمیلاز در آن بهینه سازی شد. آنالیزهای فیلوژنتیک با استفاده از ژن*16S rRNA* منجر به شناسایی جدایه اکتینومیست از رسوبات ساحل خور شادگان شد. بر اساس درخت فیلوژنی رسم شده*Acx*۱ به عنوان جنس *Streptomyces* شناخته شد. ایزوله شناسایی شده *Acx*۱ با گونه های *Streptomyces sp.* *(LMG19344 , NRRL B-1658 , CSSP544 , …)* در یک کلاد با بوت استرپ بالای ۴۰ درصد تأیید شد که می تواند نشان دهنده جدید بودن گونه باشد که در صورت مطالعات بیشتر امکان دارد گونه ای جدید به دست آید.

در مطالعه حاضر به منظور ارزیابی فعالیت آنزیمی،آزمون کیفی تعیین فعالیت آمیلازی اکتینومیست بر روی محیط کشتSCA صورت گرفت. نتایج حاضر با مطالعه ای که Acharyabhatta و همکاران در سال ۲۰۱۳ بر روی اکتینومیست دریایی.*Streptomyces* sp BTSS 1001 منطقه ساحلی Bay در بنگال هند انجام دادند یکی بود (۲۳). BTSS 1001 بیشترین فعالیت آمیلازی را در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد pH ۹ و NaCl ۷ درصد دارد. در حالی که در مطالعه حاضر بهینه شرایط تولید آنزیم Acx۱ دمای ۳۵ درجه سانتی گراد، PH ۸ و غلظت نمک (NaCl) ۶ درصدتعیین شد.این اختلاف در شرایط بهینه می تواند مربوط به نوع گونه، منطقه جغرافیایی نمونه برداری و شرایط انجام آزمایش باشد. Ramesh و همکاران (۲۰۰۹) موفق به جدا سازی تعدادی اکتینومیست با توانایی تولید آنزیمهای صنعتی مانند آمیلاز، سلولاز ، لیپاز و ژلاتیناز شدند (۱۹). همچنین از خلیج عدن اکتینومیستهایی از جنس استرپتومایسس با توانایی تولید آنزیمهای صنعتی جدا شده است (۱۲). Shaik و همکاران (۲۰۱۷) دوازده ایزوله اکتینومیست از رسوبات جداسازی کردند که پنج ایزوله توانایی بالایی در تولید -Lآسپاراژین نشان دادند و یک ایزوله (VMS-A10) توانایی خوبی در تولید آنزیم آمیلاز (۲۵/۵ U/ml) گزارش کردند (۲۰). همچنین Narayana و همکاران (۲۰۰۸) شرایط تولید خارج سلولی آنزیم آمیلاز را با استفاده از روشهای آماری در سویه Streptomyces badius DBS بهینه سازی کردند. در این تحقیق با روشهای به کار رفته از قبیل فاکتورهای رشد سلولی توانستند تا بیش از پنج برابر میزان تولید را افزایش دهند (۱۳). رشد و تولید امیلاز توسط سویه Bacillus sp.WN11 تحت شرایط مختلف کشت توسط Mamo و همکاران (۱۹۹۹) مطالعه شد. در این مطالعه بیشترین رشد

در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد مشاهده شد در حالی که بیشترین میزان تولید آمیلاز در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد ثبت شد. همچنین در pH، ۵ و ۶ هم تولید آنزیم و هم میزان رشد خوبی مشاهده شد (۱۲). در مطالعه ای توسط Naryana و Vijayalakshmi(۲۰۰۸) انجام شد سویه Streptomyces albidoflavus از خاک جدا سازی و شرایط رشد برای بهینه سازی تولید آنزیم بررسی شد. در این مطالعه بهترین زمان برای تولید آنزیم ۸۴ ساعت پس از کشت و pH و دمای مناسب به ترتیب ۶/۵ و ۳۰ درجه سانتی گراد گزارش شد (۱۳). Poornima و همکاران (۲۰۰۸) ایزوله‌هایی از اکتینومیست از رسوبات جمع آوری شده از حوضچه‌های پرورش میگو جداسازی کردند. از بین ایزوله‌های جدا شده ایزوله Streptomyces aureofasciculus بیشترین فعالیت آمیلازی را نشان داد. مطالعات بیشتر نشان داد که این گونه بیشترین فعالیت آمیلازی را در pH برابر ۹، دمای ۴۵ درجه سانتی گراد و ۰/۰۵ درصد NaCl دارد (۱۷).

در مطالعه حاضر بهینه شرایط تولید آمیلاز در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد، pH۸ و غلظت نمک ۶ درصد تعیین و تا حدود زیادی با مطالعه Chakrabortyو همکاران همخوانی داشت و نشان داده شد مقدار تولید آنزیم با مقدار رشد باکتری رابطه مستقیم دارد (۶).

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج ازبخشی از نتایج طرح تحقیقاتی اجرا شده با شماره ۱۳۰ در دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر می باشد.

منابع

۱- محمدی ر.، دادگر ت.، پردلی ح.، یزدان ستاد س.، نجف پور ر.، فرج تبریزی ا. ۱۳۹۵. جداسازی و شناسایی مولکولی باکتریهای باسیلوس سرئوس و باسیلوس سوبتیلیس به عنوان تولیدکنندهٔ آنزیم پکتینازی از مناطق مختلف استان گستان .مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی. جلد ۲۹، شماره ۳، ۳۴۰-۳۴۸ .

۲- جواهری ز.، امین زاده س.، زمانی م.، مطلبی م. ۱۳۹۵. بهینه‌سازی شرایط کشت آنزیم خارج سلولی تجزیه‌کننده سیانید باکتری انتروباکتر ZS به روش سطح پاسخ. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی. جلد ۲۹، شماره ۳، ۲۷۴-۲۸۱.

3-Anto H. Trivedi U. Patel K. 2006. Alpha-amylase production by Bacillus cereus MTCC 1305 using solid-state fermentation. Food Technology and Biotechnology. 44: 241-245.

4-Bull A.T.Stach J.E.M. 2007. Marine actinobacteria: new opportunitiesfor natural product search and discovery. TrendsMicrobiology. 15:491–499.

5-Bull A.T.Stach J.E.M. Ward A.C.Goodfellow M. 2005. Marin Actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. Antonie Van Leeuwenhoek.87: 65–79.

6-Chakraborty S., Khopade A., Kokare C., Mahadik K., Chopade B. 2008. Isolation and characterization of novel α-amylase from marine *Streptomyces*sp.Dl. Journal of Molecular Catalysis B: Enzym.58:17–23.

7-Das S. Lyla P.S. Khan S.A. 2006. Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives. Current Science. 90: 1325–1335.

8-Gulve R.M. Deshmukh A.M. 2011. Enzymatic activity of actinomycetes isolated from marine sedimentes. Recent Research in science and Technology.3(5):80.83.

9-Keharom S.Mahachai R.Chanthai S. 2016.The Optimization Study of α-Amylase Activity Based on Central Composite Design-Response Surface Methodology by Dinitrosalicylic Acid Method. Food Research International journal.23(1):10-17.

10-Kumar P.S. Preetam RajJ.P.DuraipandiyanV. IgnacimuthuS. 2012. Antibacterial activity of some actinomycetes from Tamil Nadu, India. Asian pacific Journal Tropical Biomedicine. 2(21):936-943.5.

11-Sivakumar K. Sahu M.K. Thangaradjou T.Kannan L. 2007. Research onmarineActinobacteria in India. Indian Journal of Microbiology. 47: 186–196.

12-Mamo G. Gessesse A. 1999. Effect of cultivation conditions on growth and α-amylase production

by a thermophilic *Bacillus* sp.. Letters in Applied Microbiology. 29: 61–65.

13-Narayana K. I. P. Vijayalakshmi M. 2008. Production of Extracellular α-amylase by *Streptomyces albidoflavus*. Asian Journal of Biochemistry. 3(3): 194-197.

14-Pandey G. singh B. 2011. Screening of actinomycetesrom earthworm castings for their antimicrobial activty and industrial enzymes. Berazilian Journal of microbiology. 205-214.

15-Parthasarathi, S., Sathya, S., Bupesh, G., Manikandan, M., Kim, C.J., Manikandan, T. and Balakrishnan, K., 2012. Isolation, Characterization and Extraction of antimicrobial compound from marine actinomycete *Streptomyces hygroscopicus* BDUS 49. Research Journal of Biotechnology. 8 (3): 40-49.

16-Peela S. BapirajuKurada V. V. S. N. B.Terli R. 2005. Studies on antagonistic marine actinomycetes from the Bay of Bengal. World Journalof Microbiology and Biotechnology. 21:583-585.

17-Poornima R. Maloy K.S. Sivakumar K. Pushpavalli V. 2008. Optimization of α-amylase production by Actinomycete strain AE-19 isolated from shrimp pond. Trends in Applied Science Research 3(1): 45-52.

18-Prakash D. NeeluN. Mansi P. BodasAbul M. M. Madhukar K. BalasahebK. 2013. Actinomycetes: Arepertoryof green catalysts with apotential revenue resource. Biomed Research International.1-8.

19-Ramesh S. M. Rajesh N. 2009. Mathivanan Characterization of a thermostable alkaline protease produced by marine Streptomyces fungicidicus MML1614.Bioprocess*and*Biosystems Engineering. 32: 791–800

20-Shaik M, Girija Sankar G., Iswarya M., Rajitha P. 201. Isolation and characterization of bioactive metabolites producing marine strain sankarensis-A10. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 15(1) :187-94.

21-Vigal T. Gil J.F. Daza A. Garcia-Gonzalez M.D. Martin J.F. 1991 Cloning characterization and expression of an alpha amylase gene from Streptomyces griseus IMRU 3570. Molecular Genetics and Genomics.225: 278–288.

22-Xu D.B.Ye W.W. Han Y. Deng Z.X. Hong k. 2014.Natural Products From MangrovActinomycetes. Marine Drugs. 12: 2590-2613.

23- Acharyabhatta A. Kandula S. K. Terli R. 2013. Taxonomy and Polyphasic Characterization of Alkaline Amylase Producing Marine Actinomycete Streptomyces rochei BTSS 1001. International journal of microbiology. 3:235-258.

Isolation, molecular identification and optimization of amylase production of marine actinomycete (Acx1) from Shadegan estuary

Shaverdi M.A.,[1] Matroodi S.[2] and Yakhchali M.B.[1,3]*

[1] **Nourdanesh Institute of Higher Education, Meymeh, I.R. of Iran.**

[2] **Dept. of Marine biology, Faculty of Marine Science and Oceanography, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, I.R. of Iran.**

[3] **National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, I.R. of Iran.**

Abstract

Actinomycetes, Gram positive bacteria, are rich sources of bioactive compounds. Secondary metabolites of these bacteria are used as pharmaceutical compounds Enzymes are one of the most important secondary metabolites which act as bio-catalysts to perform reactions in bio-processes in an economical and environmentally-friendly manner. Enzyme production from actinomycetes makes significant facility in industrial and world economic. So, that it is becoming one of the economic indexes of developed countries. The goal of this research is isolation of actinomycetes from Shadegan estuary, optimization of bacterial growth and amylase production. Molecular identification was done by amplification of 16S rRNA gene using R1492 and F27 primers. Optimum growth condition was found at 6% NaCl concentration, 35˚C temperature and pH 8. Maximum amylase activity in optimum condition was 80150 Unit (one Unit is amount of enzyme that release one microgram of glucose in a minute). The results showed that enzyme production is related to growth of bacteria conditions.

Key words: Actinomycete, Amylase, 16S rRNA, Shadegan estuary