جداسازی و شناسایی باکتری سایکروتروف تجزیه کننده نشاسته و مطالعه بر روی ویژگیهای آمیلولیتیک آن

غلامرضا بخشی خانیکی[۱]، فاطمه حسینی[۱]، اعظم صفری[۱]، کامبیز اکبری نوقابی[۲] و حسین شهبانی ظهیری[۲]*

[۱] تهران، دانشگاه پیام نور، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

[۲] تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، گروه ژنتیک مولکولی

تاریخ دریافت: ۹۰/۶/۸ تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۲۱

چکیده

باکتری سایکروتروف تجزیه کننده نشاسته از نمونه های خاک جمع آوری شده از حومه جنوب غربی تهران جداسازی شد. با استفاده از روشهای بیوشیمیایی و مولکولی براساس تعیین توالی ژن 16S rDNA این باکتری به عنوان گونه ایی از جنس اگزیگوآباکتریوم شناسایی و تحت عنوان اگزیگوآباکتریوم سویه SH3 نام گذاری گردید. این باکتری در دماهای ۴، ۳۰، ۳۷، و ۴۸ درجه قادر به رشد و تولید آنزیمهای آمیلولیتیک بود. دمای بهینه برای تولید آنزیمهای آمیلولیتیک توسط این باکتری ۳۰ درجه سانتی گراد و pH بهینه ۷ تعیین شدند. این باکتری قادر بود نشاسته اضافه شده (۱ درصد) به محیط کشت را در مدت ۹ ساعت به طور کامل تجزیه نماید. سوپرناتانت محیط کشت باکتری به عنوان منبع خام آنزیم برای بررسی فعالیت آمیلازی مورد استفاده قرار گرفت. این سوپرناتانت در دامنه رسیعی از دماها بین ۴ تا ۴۵ درجه، و pH بین ۵ تا ۹ واجد فعالیت آمیلازی بود. دما و pH بهینه برای فعالیت آمیلازی به ترتیب ۳۷ درجه و ۷ pH تعیین شدند. به نظر می رسد که آنزیمهای سازگار با سرما به دلیل برخورداری از فعالیت کاتالیتیک زیاد برای کاربرد در دمای محیط مثل شستشو و فرآوری غذا نسبت به انواع مزوفیل و گرمادوست از مزیت بیشتری برخوردار هستند.

واژه های کلیدی: آگزیگوآباکتریوم، سایکروتروف، نشاسته، آمیلولیتیک، فعالیت آنزیمی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۴۴۷۸۷۳۴۰-۰۲۱، پست الکترونیکی: Shahbani@nigeb.ac.ir

مقدمه

توانایی موجودات زنده برای تولید آنزیمهایی که در دمای نزدیک به نقطه انجماد آب قادر به کاتالیز واکنشها می باشند از جنبه های زیست شناسی و بیوتکنولوژی شایان توجه می باشد. دمای پایین باعث کاهش لگاریتمی سرعت واکنشهای شیمیایی و فشردگی مولکولهای پروتئینی می شود. این فشردگی با انعطاف پذیری شکلی آنزیمها که برای بر همکنش مناسب و فعالیت کاتالیزوری ضروری هستند در تناقض می باشد (۱۷). آنزیمهای سازگار با سرما به دلیل ویژگیهای ساختمانی و کاتالیتیک در انجام واکنشها در دماهای پایین و معتدل نسبت به رقبای مزوفیل و گرمادوست از مزیت بیشتر برخوردار هستند (۷). آنزیمهای سازگار با سرما با سرعتی بیش از دو برابر آنزیمهای سازگار با دماهای معتدل قادر به کاتالیز واکنشهای شیمیایی در دماهای سرد می باشند (۲). به علاوه، به کارگیری آنزیمهای سازگار با سرما در فرآیندهای صنعتی ممکن است موجب کاهش هزینه های مصرف انرژی و تولید محصول شود. بازار جهانی آنزیمهای صنعتی به ۲/۱ میلیارد دلار در سال می رسد و بنظر می رسد که با رشدی حدود ۱۵-۱۰ درصد همراه باشد. آمیلاز ها ۲۵ درصد از بازار آنزیم را به خود اختصاص می دهند و در صنایع

تجزیه نشاسته، تهیه منسوجات، غذا، و تخمیری کاربرد دارند (۱۸). در اکثر فرآیندهای متداول یک منبع نشاسته نظیر ذرت ابتدا آسیاب می شود و سپس با آب خمیر شده و با آمیلاز های گرمادوست مخلوط می شود. سپس در دمای ۱۵۰-۱۰۵ درجه حرارت داده می شود تا به صورت ژلاتینی و مایع تبدیل شود. در صنایع تولید سوختهای زیستی این فرآیند بین ۱۰ تا ۲۰ درصد از هزینه تولید اتانول سوختی را به خود اختصاص می دهد (۱۹). بنابراین، تلاش هایی صورت گرفته تا بتوان از آنزیمهای سازگار با سرما برای مایع سازی نشاسته در دمای محیطی استفاده شود (۲۱ و ۲۷).

آمیلازهای فعال در شرایط سرما همچنین برای تولید شوینده هایی که به سرعت کثیفی و لکه را هیدرولیز می کنند مورد توجه قرار گرفته اند. به کارگیری این شوینده ها در شستشوی البسه ممکن است موجب کاهش مصرف انرژی و اثرات زیست محیطی شود. همچنین تغییراتی مثل پوسیدگی لباس، کوتاه شدن و یا از دست رفتن رنگ البسه کاهش یابد. تولید آمیلاز های گرمادوست و یا مقاوم به گرما به وسیله باکتریها و آرکئا به خوبی مورد توجه قرار گرفته است (۴، ۵، ۱۳، ۱۴، ۲۰ و ۲۵). در مقابل، تاکنون توجه کمتری به آمیلاز های سرما دوست به عمل آمده است (۲۳). در این مقاله، جداسازی باکتری سایکروتروف متعلق به جنس اگزیگوآباکتریوم و تولید آنزیمهای آمیلازی توسط این باکتری گزارش می گردد.

مواد و روشها

جداسازی و شناسایی اگزیگوآباکتریوم سایکروتروف: اگزیگوآباکتریوم SH3 از خاکهای نمونه گیری شده از حومه تهران جداسازی شد. رقتهای متوالی از سوسپانسیون خاک در آب تهیه و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر بر روی پلیتهای حاوی نوترینت آگار (peptone, 0.5%; beef extract, 0.3%; NaCl, 0.5%; agar, 1.5%; pH 7) کشت داده شدند. جداسازی باکتریها سرما دوست در شرایط دمای ۴ درجه صورت گرفت و کلنی باکتریها از طریق کشتهای پی در پی بر روی محیط جامد خالص سازی شدند. بررسیهای بیوشیمیایی و ظاهری و همچنین تعیین توالی ژن 16S rDNA برای شناسایی باکتری جداسازی شده مورد استفاده قرار گرفتند. پرایمرهای عمومی باکتریهای حقیقی به نام های 27F و 1492R برای تکثیر 16S rDNA مورد استفاده قرار گرفتند. واکنش PCR در مخلوط حاوی ۱/۵ میلی مولار کلرید منیزیم، ۲۰۰ میکرومولار dNTPs، ۰/۳ میکرومولار پرایمرها و یک واحد آنزیم Taq DNA پلیمراز انجام شد. بعد از واسرشتگی DNA در دمای ۹۸ درجه برای مدت سه دقیقه، ژن 16S rDNA در ۳۰ چرخه شامل واسرشتگی در دمای ۹۴ درجه (۳۰ ثانیه)، جفت شدن پرایمرها در دمای ۵۲ درجه (۳۰ ثانیه) و تکثیر در دمای ۷۲ درجه (۱ دقیقه) انجام شد. مرحله نهایی واکنش در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. محصول PCR به وسیله کیت اختصاصی شرکت کیاژن (Qiagen, Valencia, CA, USA) خالص سازی شد و مورد تعیین توالی توسط شرکت seqlab قرار گرفت. درختچه فیلوژنیتکی با استفاده از نرم افزار مگا ۴ (MEGA 4) و بر اساس توالی ژن 16S rDNA به دست آمد (۲۶).

رشد و تولید آمیلاز: باکتر جداسازی شده بر روی محیط استارچ آگار حاوی (در لیتر): KH_2PO_4 (۱ گرم)، Na_2HPO_4 (۲/۵ گرم)، NaCl (۱ گرم)، $(NH_4)_2SO_4$ (۲ گرم)، $CaCl_2$ (۰/۰۵ گرم)، Tryptone (۲ گرم)، starch (۱۰ گرم)، $MgSO_4.7H_2O$ (۰/۰۵ گرم)، و آگار (۱۵ گرم) کشت داده شد. از همین محیط برای تهیه کشتهای مایع به منظور بررسی تأثیر شرایط مختلف محیطی بر تولید آنزیمهای آمیلازی استفاده شد. تولید آمیلاز در ارلنهای ۵۰۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط مایع استارچ صورت گرفت و برای تلقیح این محیطها از کشت شبانه آگزیگوآباکتریوم در محیط نوترینت براث استفاده گردید. برای تأمین همزمانی کشتها، مقدار تلقیح طوری محاسبه می

شد که جذب نوری اولیه حدود ۰/۱ تنظیم شود. به منظور بررسی تأثیر دما بر روی رشد و تولید آمیلاز توسط اگزیگوآباکتریوم SH3 ، کشتها در دماهای مختلف شامل ۴، ۳۰، ۳۷، و ۴۵ درجه بر روی شیکر گرماگذاری شدند. تأثیر pH اولیه محیط کشت بر روی رشد این باکتری و تولید آمیلاز در pH های ۵، ۶، ۷، ۸، و ۹ بررسی شد. برای این منظور از افزودن هیدروکسید سدیم و اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال برای تنظیم pH استفاده شد. از کشتها در فواصل منظم به میزان ۱ میلی لیتر نمونه گیری انجام گردید و از نظر رشد سلولی و فعالیت آمیلازی مورد بررسی قرار گرفتند. رشد از طریق اندازه گیری جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر بررسی شد. سپس نمونه ها در دور g ۹۳۰۰ برای مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتریفیوژ شدند و فعالیت آمیلازی سوپرناتانت اندازه گیری شد. برای این کار ۰/۵ میلی لیتر سوپرناتانت با ۰/۵ میلی لیتر محلول نشاسته (۱ درصد نشاسته در بافر ۱۰۰ میلی مولار سدیم فسفات ، pH۷) مخلوط و در دمای مناسب گرماگذاری گردید. بعد از یک ساعت، ۲ میلی لیتر از محلول ۵،۳- دی نیتروسالیسیلیک اسید برای متوقف کردن واکنش اضافه شد. این معرف در حضور قندهای احیاء کننده تولید کمپلکس رنگی می کند که با مقدار قند در محیط واکنش ارتباط مستقیم دارد. بنابراین آزاد شدن قندهای احیاء کننده در اثر فعالیت آمیلاز با اندازه گیری میزان جذب نور در طول موج ۵۷۰ نانومتر قابل اندازه گیری خواهد بود (۱۶). یک واحد فعالیت آنزیمی به عنوان مقدار آنزیمی تعریف می شود که منجر به آزاد شدن یک میکرومول قند احیاء کننده در هر دقیقه از زمان واکنش می گردد (۶).

اثر حرارت و pH بر روی فعالیت آمیلولیتیک: برای مطالعه اثر دما، فعالیت آنزیمی تحت شرایط تعریف شده در دماهای مختلف شامل ۴، ۲۰، ۳۰، ۳۷، و ۴۵ درجه در بافر فسفات سدیم (۱۰۰ میلی مولار) مورد اندازه گیری قرار گرفت. پایداری حرارتی آنزیمهای آمیلولیتیک از طریق گرماگذاری سوپرناتانت در بن ماری در دماهای ۵۰، ۶۰، ۷۰، و ۸۰ درجه برای زمانهای ۱ و ۷ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. بعد از این زمانها، فعالیت آنزیمی باقیمانده تحت شرایط تعریف شده و در دمای ۳۷ درجه اندازه گیری شد.

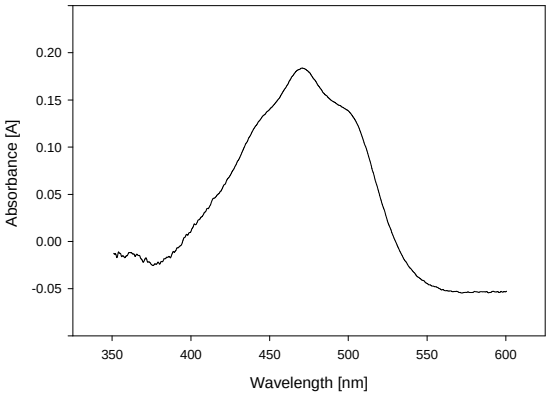
اثر pH بر روی فعالیت آنزیمی در بافر های مختلف (۱۰۰ میلی مولار) شامل استات سدیم (pH 5-5.5)، فسفات سدیم (pH 6-7)، تریس (pH 7.5-8)، و گلایسین -pH 9) (10 اندازه گیری شد. اثر یونهای فلزی بر روی فعالیت آمیلولیتیک در حضور نمکهای کلرید کلسیم، سولفات منیزیم، سولفات آهن، کلرید کبالت، سولفات منگنز، و سولفات روی اندازه گیری شد. هر یک از این نمکها در غلظت نهایی ۲ میلی مولار به بافر فسفات سدیم (pH 7) اضافه شدند و واکنشها برای مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انجام گرفتند.

نتایج

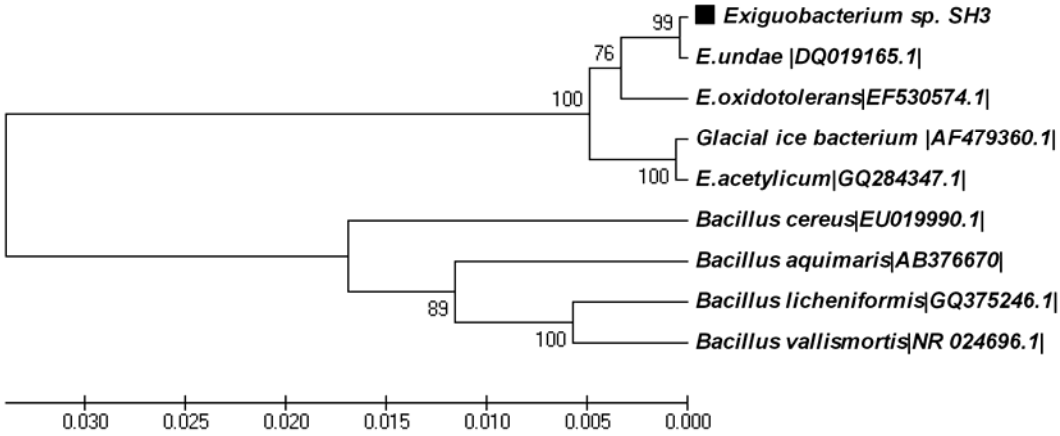
میکروب جداسازی شده یک باکتری گرم مثبت، میله ایی شکل، کاتالاز مثبت، و بدون اسپور بود. کلنی های سطحی بر روی محیط نوترینت آگار به رنگ نارنجی روشن، محدب با حاشیه صاف مشاهده می شدند. با نگهداری پلیتها در یخچال ۴ درجه رنگ کلنی ها بعد از چند روز به نارنجی پررنگ تبدیل شدند. رنگدانه نارنجی این باکتری با مخلوط متانول/کلروفرم (۳۰/۷۰) استخراج گردید. جذب نوری ماده استخراج شده در طیف UV-VIS اندازه گیری شد و منحنی به دست آمده شباهت زیادی را با منحنی کاروتنوئید ها نشان می داد (شکل ۱). این باکتری قادر به هیدرولیز ژلاتین و کازئین، تخمیر گلوکز، ساکاروز و نشاسته بود. واکنش وگس-پروسکائر (Voges-Proskauer test) در مورد این باکتری مثبت بود که از طریق اضافه کردن هیدروکسید پتاسیم (۴۰٪) و محلول آلفا نفتول (۵ درصد در اتانول) به محیط کشت باکتری نشان داده

می شود. در این آزمایش تشکیل رنگ قرمز نشانه تشکلیل ۲، ۳ بوتان دیول از تخمیر گلوکز می باشد.

تکثیر ژن 16S rDNA با روش PCR منجر به قطعاتی به طول ۱۴۶۱ جفت باز گردید که پس از تعیین توالی، برای مقایسه شباهت آن با ژنهای به دست آمده از سایر باکتریها در سامانه اینترنتی NCBI مورد استفاده قرار گرفت. بررسی فیلوژنتیکی نشان داد که این باکتری قرابت نزدیکی با جنس اگزیگوآباکتریوم دارد (شکل ۲) و به همین دلیل به عنوان سویه SH3 از این جنس نام گذاری گردید.



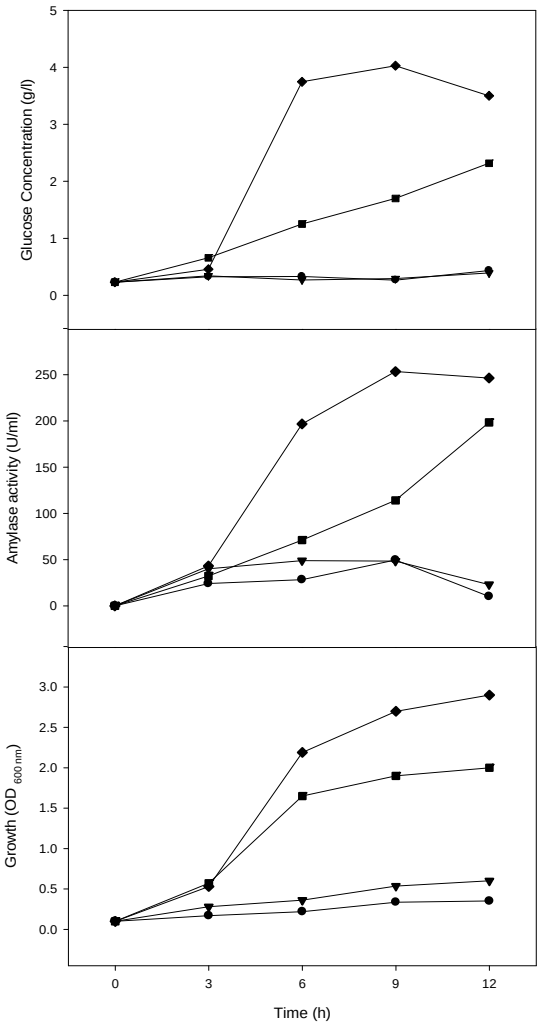
شکل ۱- طیف UV-VIS از رنگدانه های کاروتنوئیدی اگزیگوآباکتریوم SH3 استخراج شده به وسیله متانول/ کلروفرم (۳۰/۷۰)



شکل ۲- درختچه فیلوژنتیکی ارتباط تکاملی اگزیگوآباکتریوم SH3 بر اساس توالی 16S rDNA

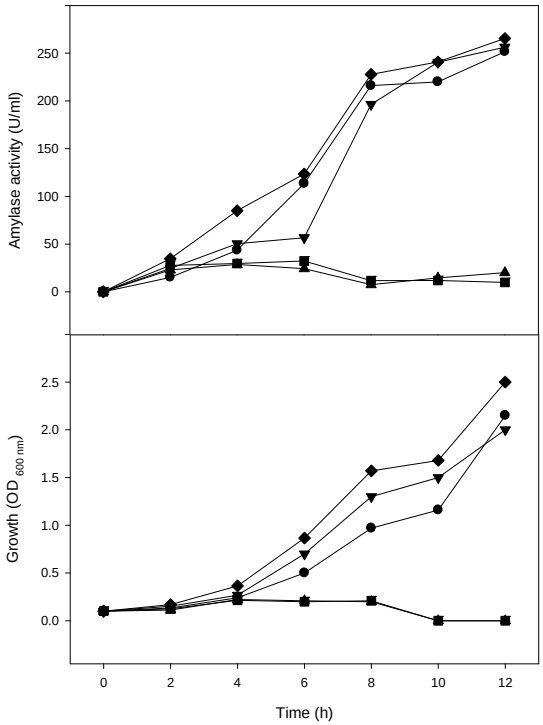
اثر دما بر رشد و تولید آنزیمهای آمیلولیتیک: باکتری جداسازی شده در محیط استارچ کشت داده شد که واجد نشاسته به عنوان تنها منبع کربن بود. در مدت ۱۲ ساعت گرماگذاری در دماهای ۴، ۳۰، ۳۷، و ۴۸ درجه نمونه گیریها در فواصل زمانی ۳ ساعته برای اندازه گیری فعالیت آمیلازی و غلظت گلوکز انجام گرفتند. این اگزیگوآباکتریوم در تمام دماهای مورد آزمایش قادر به رشد بود و در دمای بهینه ۳۰ درجه رشد آن بعد از ۱۲ ساعت به جذب نوری ۲/۹ در طول موج ۶۰۰ نانومتر رسید. در دمای ۳۷ درجه رشد این باکتری اندکی کاهش نشان می داد و نهایتاً به جذب نوری حدود ۲ رسید. رشد در دمای ۴ درجه آهسته تر بود و در دمای ۴۸ درجه به کمترین میزان خود رسید. بعد از ۱۲ ساعت رشد باکتری در دماهای ۴ و ۴۸ درجه جذب نوری محیط کشت به ترتیب به ۰/۶ و ۰/۳۵ رسید (شکل ۳). بعد از سانتریفیوژ کردن نمونه ها، سوپرناتانت برای اندازه گیری فعالیت آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت. بیشترین فعالیت آنزیمی حدود ۲۵۳ U/ml بعد از حدود ۹ ساعت در شرایط دمای کشت ۳۰ درجه اندازه گیری شد. گلوکز محیط کشت نیز در این دما به همین نسبت بالا بود. برای نشان دادن نشاسته باقیمانده در محیط کشت، ۵۰ میکرولیتر سوپرناتانت با همان مقدار محلول ید (lugol's solution) مخلوط می شد که در صورت وجود نشاسته منجر به تشکیل رنگ آبی می شود. با این آزمایش نشان داده شد که پس از کشت باکتری در دمای ۳۰ درجه، تمام نشاسته اضافه شده به محیط بعد از ۹ ساعت مصرف می شود که با بیشینه فعالیت آنزیمی

همزمان بود. در دمای ۳۷ درجه، منحنی فعالیت آمیلازی در مدت ۱۲ ساعته کشت باکتری هرگز به قله نرسید و بیشترین فعالیت آنزیمی ۱۹۸ U/ml اندازه گیری شد (شکل ۳).

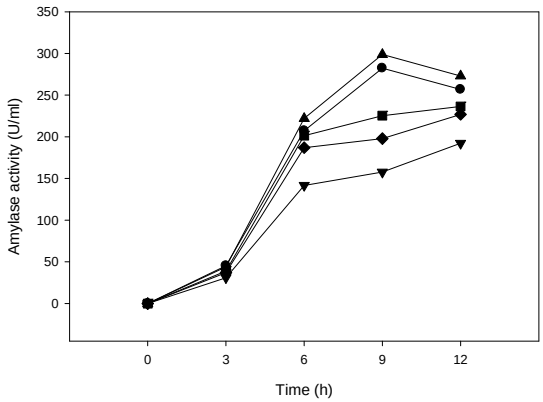


شکل ۳- تأثیر دما بر روی رشد و تولید آنزیمهای آمیلولیتیک توسط اگزیگوآباکتریوم SH3 در محیط استارچ ۱ درصد:
▼, 4ºC; ♦, 30ºC; ■, 37ºC; ●, 48ºC

تأثیر pH بر روی رشد و فعالیت آمیلازی: تأثیر pH های مختلف بین ۵ تا ۹ بر روی رشد و فعالیت آمیلازی باکتری اگزیگوآباکتریوم SH3 در دمای ۳۰ درجه مورد بررسی قرار گرفت. شرایط pH ۷ به عنوان بهینه برای رشد و فعالیت آمیلازی باکتری تعیین گردید که در اثر آن رشد باکتری به جذب نوری ۲/۵ و فعالیت آمیلازی محیط کشت به U/ml ۲۶۵ رسید. رشد باکتری و فعالیت آمیلازی آن در pH های ۶ و ۸ تقریباً مشابه و اندکی کمتر از pH ۷ بودند ولی در pH های ۵ و۹ رشد باکتری و فعالیت آمیلازی به شدت مهار می شد (شکل ۴).



شکل ۴- تأثیر pH محیط کشت بر رشد و تولید آنزیمهای آمیلولیتیک توسط اگزیگوآباکتریوم SH3 در محیط استارچ ۱٪: ■, pH 5; ▼, pH 6; ♦, pH 7; ●, pH 8; ▲, pH 9.

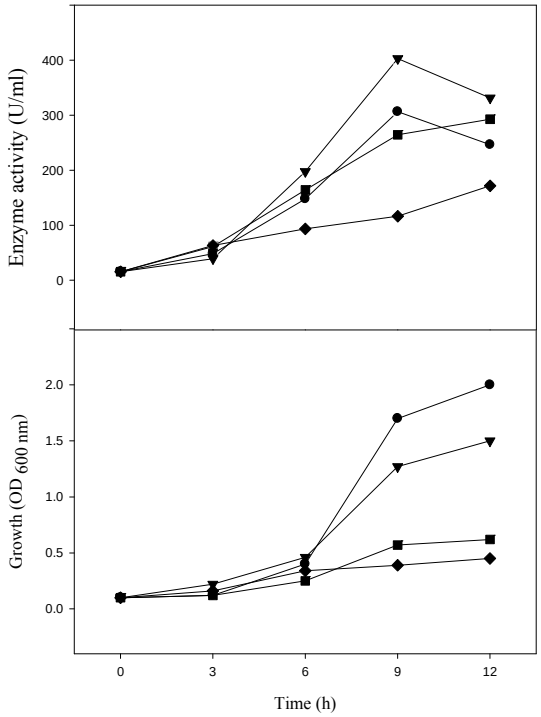


شکل ۵- تأثیر غلظت نشاسته بر تولید آمیلاز بوسیله اگزیگوآباکتریوم SH3 در محیط استارچ در دمای ۳۰ درجه و pH۷: ▼, 0.2 g/l; ♦, 0.4 g/l; ■, 0.6 g/l; ●, 0.8 g/l; ▲, 1 g/l

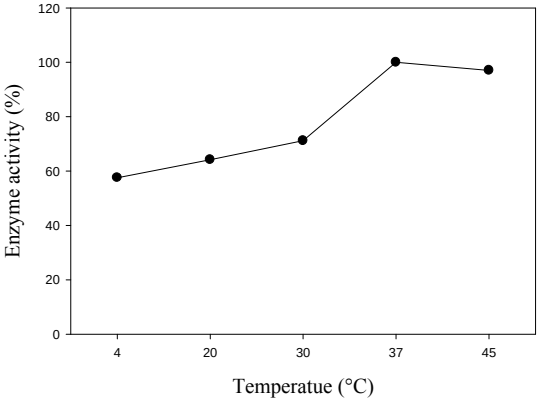
تأثیر غلظت نشاسته بر روی فعالیت آمیلازی: تأثیر نشاسته در غلظتهای ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸، و ۱ گرم در لیتر بر روی فعالیت آمیلازی باکتری اگزیگوآباکتریوم SH3 در مدت ۱۲ ساعت کشت باکتری در دمای ۳۰ درجه و pH ۷ مورد بررسی قرار گرفت. همان طور که در شکل ۵ ملاحظه می شود، بین غلظت نشاسته به عنوان القاء کننده و مقدار فعالیت آمیلازی ارتباط مستقیمی وجود دارد. بیشترین فعالیت آمیلازی در غلظتهای ۰/۸ و ۱ گرم در لیتر نشاسته پس از ۹ ساعت گرماگذاری بدست آمد. در غلظتهای کمتر نشاسته منحنی فعالیت آمیلازی در طی مدت ۱۲ ساعته کشت هیچگاه به قله نرسید. استفاده از سایر منابع کربن شامل گلوکز، فروکتوز، گلیسرول، و مالتوز به جای نشاسته باعث مهار شدید فعالیت آمیلازی باکتری اگزیگوآباکتریوم SH3 شد (شکل ۵).

تأثیر منابع ازت بر روی رشد و فعالیت آمیلازی: در محیط کشت واجد ۱ درصد نشاسته، کشت باکتری در دمای ۳۰ درجه و pH ۷ برای مدت ۱۲ ساعت انجام شد و تأثیر منابع مختلف ازت شامل پپتون، عصاره مخمر، نیترات سدیم، و نیترات پتاسیم مورد مطالعه قرار گرفتند. پپتون بهترین منبع برای رشد باکتری بود و در این آزمایش جذب نوری محیط کشت در طول مدج ۶۰۰ نانومتر به ۲ رسید (شکل ۶). در حضور عصاره مخمر، نیترات پتاسیم، و نیترات سدیم، بیشترین رشد باکتری به ترتیب ۱/۵، ۰/۶، و ۰/۵ بودند. بیشترین فعالیت آمیلازی تا ۴۰۲ U/ml با عصاره مخمر بعد از ۹ ساعت به دست آمد (شکل ۶). پپتون نیز موجب فعالیت آمیلازی تا ۳۰۶ U/ml گردید. با نیترات پتاسیم، و نیترات سدیم منحنی فعالیت آمیلازی در مدت کشت باکتری به قله نرسید و پس از ۱۲ ساعت به ترتیب به ۲۹۲ و ۱۷۱ واحد رسید (شکل ۶).

تأثیر دما و pH بر روی فعالیت آمیلازی: فعالیت آمیلازی سوپرناتانت در دماهای مختلف شامل ۴، ۳۰، ۳۷، ۴۵ درجه مورد بررسی قرار گرفت. پروفایل به دست آمده نشان داد که دمای ۳۷ درجه موجب بیشترین فعالیت آمیلازی می گردد (شکل ۷).



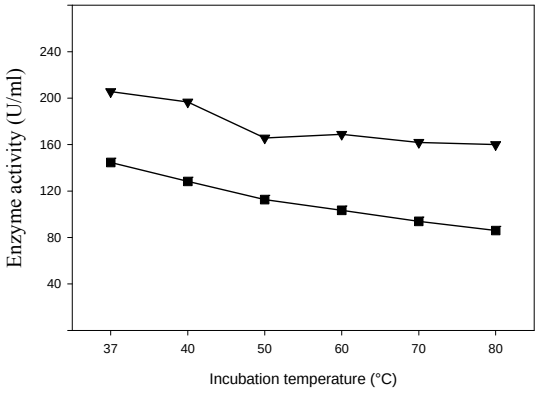
شکل ۶- تأثیر منابع مختلف ازت بر رشد و تولید آمیلاز توسط اگزیگوآباکتریوم SH3 در محیط استارچ ۱ درصد در دمای ۳۰ درجه و pH۷ : ●, peptone; ▼, yeast extract;■, potassium nitrate;
♦, sodium nitrate.



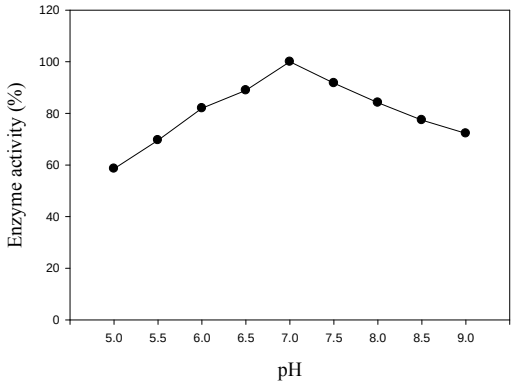
شکل ۷- منحنی فعالیت آنزیمهای آمیلازی اگزیگوآباکتریوم SH3 دردماهای مختلف

این فعالیت در دمای ۴۵ درجه به ۹۷ درصد کاهش یافت. جالب آینکه این فعالیت در دمای ۴ درجه نیز تا حدود ۵۷ درصد مقدار بیشینه حفظ گردید. نتایج نشان می دهند که

این فعالیت آمیلازی مربوط به آنزیمهای مقاوم به سرما می باشد که می توانند در دامنه وسیعی از دماها فعالیت خود را حفظ نمایند.



شکل ۸- منحنی پایداری آنزیمهای آمیلازی اگزیگوآباکتریوم SH3 دردماهای مختلف: ▼, 1 h; ■, 7 h.



شکل ۹- منحنی فعالیت آنزیمهای آمیلازی اگزیگوآباکتریوم SH3 در pH های مختلف

همچنین، پایداری حرارتی سوپرناتانت در دماهای ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰ درجه بعد از ۱ و ۷ ساعت گرماگذاری در بن ماری مورد بررسی قرار گرفت. بعد از گرماگذاری در دماهای مورد نظر، فعالیت آمیلازی باقیمانده در دمای ۳۷ درجه مورد اندازه گیری شد. نتایج نشان دادند که بیش از ۷۲ درصد فعالیت بعد از یکساعت گرماگذاری و بیش از ۵۹ درصد فعالیت بعد از ۷ ساعت گرماگذاری سوپرناتانت در تمام دماها حفظ شده بود (شکل ۸).

مطالعه فعالیت آنزیمی در pH های مختلف نشان داد که بیشترین فعالیت آمیلازی در pH ۷ مشاهده می شود. پروفایل فعالیت آمیلازی در pH های ۵ تا ۹ تقریباً متقارن و واجد یک قله در pH ۷ بود. حتی در pH های ۵ و ۹ نیز فعالیت آمیلازی به ترتیب تا ۵۹ و ۷۲ درصد مقدار بیشینه حفظ شده بود (شکل ۹).

بحث

باکتری اگزیگوآباکتریوم SH3 که قادر به زندگی در سرما می باشد از نمونه های خاک جداسازی شد و رشد این باکتری در دامنه دمایی ۴ تا ۴۸ درجه نشان داده شد. این باکتری در محیط واجد نشاسته قادر به تولید آنزیم آمیلاز مقاوم به سرما می باشد. تولید آنزیمهای آمیلولیتیک توسط این باکتری وابسته به نشاسته بود به طوری که میزان فعالیت آمیلازی در طی دوره کشت ۱۲ ساعته در دمای ۳۰ درجه به مقدار نشاسته افزوده شده به محیط وابسته بود و بیشینه فعالیت آنزیمی با زمان حذف کامل نشاسته از محیط همزمانی داشت. بررسی فعالیت در دماهای مختلف نشان داد که دمای ۳۷ درجه شرایط بهینه برای فعالیت آمیلولیتیک بود که از ویژگیهای آنزیمهای سرما دوست می باشد (۹ و ۲۴). در مقایسه با باکتری سرمادوست دیگری که قبلاً گزارش شده بود (۲۳). فعالیت آمیلازی اگزیگوآباکتریوم SH3 پایداری حرارتی بیشتری را نشان می داد. پیشنهاد شده است که حضور سوبسترا ممکن است آنزیمهای سرمادوست را از واسرشتگی حرارتی محافظت نماید (۲۴). همچنین پیشنهاد شده است که ناپایداری حرارتی آنزیمهای سرمادوست به دلیل پایین بودن پایداری آنزیم در مکان فعال و یا نزدیکی آن می باشد (۳، ۸ و ۱۰). در واقع به دلیل ناپایداری نواحی انعطاف پذیر اطراف مکان فعال، غیر فعال شدن این آنزیمها پیش از واسرشتگی حرارتی تمام مولکول اتفاق می افتد. به نظر می رسد که این انعطاف پذیری برای بر همکنش صحیح آنزیم و سوبسترا در سرما ضروری باشد. سایر سازگاریهای ساختمانی نیز در مورد آنزیمهای سرمادوست پیشنهاد شده اند. به عنوان مثال، وجود ناحیه انعطاف پذیر بلند (۲۸)،

مکان فعال بزرگتر و قابل دسترس تر (۱)، مناسب بودن وضعیت الکترواستاتیک آنزیم در مکان فعال یا نزدیکی آن (۱۲)، و باز آرایی ساختمان چهارم از عوامل مؤثر در فعالیت آنزیمهای سرمادوست در دماهای پایین می باشند (۲۲). بر اساس ویژگیهای مربوط به پایداری آنزیمها، پیشنهاد شده که آمیلازهایی با دمای بهینه نزدیک ۴۰ درجه برای کاربرد در شرایط دمای محیط مناسب تر از آمیلازهایی هستند که دمای بهینه آنها کمتر از ۳۵ درجه می باشد. از این نظر، آمیلازهای تولید شده توسط اگزیگوآباکتریوم SH3 واجد ویژگیهای جالب توجهی هستند. آنزیمهای سرمادوست و به خصوص آنهایی که از پایداری کافی برای مواجه با تغییرات محیط برخوردار هستند برای کاربرد در شرایط دمای محیط مورد توجه زیادی قرار گرفته اند (۴، ۱۱ و ۱۵). آنزیمهای تجزیه کننده نشاسته که توسط اگزیگوآباکتریوم SH3 تولید می شوند از نظر دامنه فعالیت در دماها و pH های مختلف جالب توجه هستند. در این مطالعه سوپرناتانت محیط کشت برای به دست آوردن اطلاعات اولیه مورد بررسی قرار گرفت. خالص سازی آنزیم و مطالعات بیوشیمیایی دقیق تر در دست انجام هستند.

منابع

1. Aghajari N., Van Petegem F., Villeret V., Chessa J.P., Gerday C., Haser R., Van Beeumen J. (2003) Crystal structures of a psychrophilic metalloprotease reveal new insights into catalysis by cold adapted proteases. Proteins 50:636–647.
2. Amico S.D., Collins T., Marx J.C., Feller G., Gerday C. (2006) Psychrophilic microorganisms: challenges for life. Embo Rep. 7:385–389.
3. Amico S.D., Marx J.C., Gerday C., Feller G. (2003) Activity-stability relationships in extremophilic enzymes. J. Biol. Chem. 278:7891–7896.
4. Arikan B. (2008) Highly thermostable, thermophilic, alkaline, SDS and chelator resistant amylase from a thermophilic Bacillus sp. isolate A3-15. Bioresource Technol. 99:3071–3076.
5. Arikan B., Nisa U., Goekhan C., Öemer C., Ashabil A., Osman G. (2003) Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic Bacillus sp. Isolate ANT-6. Process. Biochem. 38:1397–1403.
6. Bernfeld P. (1955) Amylases α- and β. Method. Enzymol. 1:149–158.
7. Cavicchioli R., Siddiqui K.S., Andrews D., Sowers K.R. (2002) Low-temperature extremophiles and their applications. Curr. Opin. Biotech. 13:253–161.
8. Collins T., Meuwis M.A., Gerday C., Feller G. (2003) Activity, stability and flexibility in glycosidases adapted to extreme thermal environments. J. Mol. Biol. 328:419–428.
9. Georlette D., Blaise V., Collins T., Amico S.D., Gratia E., Hoyous A., Marx J., Sonan G., Feller G., Gerday C. (2004) Some like it cold: biocatalysis at low temperatures. FEMS Microbiol. Rev. 28:24-42.
10. Georlette D., Damien B., Blaise V., Depiereux E., Uversky V.N., Gerday C., Feller G. (2003) Structural and functional adaptations to extreme temperatures in psychrophilic, mesophilic, and thermophilic DNA ligases. J. Biol. Chem. 278:37015–37023.
11. Jana M., Chattopadhyay D.J., Pati B.R. (1997) Thermostable, high salt tolerant amylase from Bacillus megaterium VUMB-109. ACTA Microbiol. Imm. H. 44:281–289.
12. Leiros I., Moe E., Lanes O., Smalas A.O., Willassen N.P. (2003) The structure of uracil-DNA glycosylase from Atlantic cod (Gadus morhua) reveals cold-adaptation features. ACTA Crystallogr D 59:1357–1365.
13. Leveque E., Janacek S., Haye B., Belarbi A. (2000) Thermophilic archeal amylolytic enzymes. Enzyme Microb. Tech. 26:3–14.
14. Mamo G., Gessesse A. (1999) Purification and characterization of two raw-starch-digesting thermostable α-amylase from a thermophilic Bacillus. Enzyme Microb. Tech. 25:433–438.
15. McTigue M.A., Kelly C.T., Doyle E.M., Fogarty W.M. (1995) The alkaline amylase of the alkalophilic Bacillus sp. IMD 370. Enzyme Microb. Tech. 17:570–573.

16. Miller G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31:426-428.

17. Rasmussen B.F., Stock A.M., Rings D., Petsko G.A. (1992) Crystallin ribonuclease A loses function below the dynamical transition at 220 K. Nature 357:423–424.

18. Chakraborty S., Khopade A., Biao R., Jian W., Liu X.Y., Mahadik K., Chopade B., Zhang L., Kokare C. (2011) Characterization and stability studies on surfactant, detergent and oxidant stable α-amylase from marine haloalkaliphilic *Saccharopolyspora* sp. A9. J. Mol. Catal. B-Enzym. 68(1): 52-58.

19. Robertson G.H., Wong D.W.S., Lee C.C., Wagschal K., Smith M.R., Orts W.J. (2006) Native or raw starch digestion: a key step in energy efficient biorefining of grain. J. Agr. Food. Chem. 54:353–365.

20. Saxena K.R., Dutt K., Agarwal L., Nayyar P. (2007) A highly and thermostable alkaline amylase from a Bacillus sp. PN5. Bioresource Technol. 98:260–265.

21. Shetty, J.K., Lantero O.J., Dunn-Colemen N. (2005) Technological advances in ethanol production. Int. Sugar J. 107:605-610.

22. Skalova T., Dohnalek J., Spiwok V., Lipovova P., Vondrackova E., Petrokova H., Duskova J., Strnad H., Kralova B., Hasek J. (2005) Cold-active beta-galactosidase from Arthrobacter sp. C2-2 forms compact 660 kDa hexamers: crystal structure at 1.9A resolution. J. Mol. Biol. 353:282–294.

23. Smith M.R., Zahnley J.C. (2005) production of amylase by Arthrobacter psychrolactophilus. J. Ind. Microbiol. Biot. 32:277-283.

24. Smith M.R., Zahnley J.C. (2005) Characterization of the amylase of Arthrobacter psychrolactophilus. J. Ind. Microbiol. Biot. 32:439-448.

25. Sodhi H.K., Sharma K., Gupta J.K., Soi S.K. (2005) Production of a thermostable a-amylase from Bacillus sp. PS-7 bysolid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production. Process. Biochem. 40: 525–534.

26. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. (2007) MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. 24:1596–1599.

27. Textor S., Hill A., MacDonald D., St. Denis E. (1998) Cold enzyme hydrolysis of wheat starch granules. Can. J. Chem. Eng. 76:87-93.

28. Violot S., Aghajari N., Czjzek M., Feller G., Sonan G.K., Gouet P., Gerday C., Haser R., Receveur- Brechot V. (2005) Structure of a full length psychrophilic cellulase from Pseudoalteromonas haloplanktis revealed by X-ray diffraction and small angle X-ray scattering. J. Mol. Biol.348: 1211–1224.

Isolation and identification of an Amylolytic psychrotrophic bacterium and characterization of the Amylolytic activity of the isolate

Bakhshi Khaniki Gh.R.[1], Hosseini F.[1], Safari A.[1], Akbari Noughabi K.[2] and Shahbani Zahiri H.[2]

[1] Biology Dept, Faculty of Science, Payamenoor University, Tehran, I.R. of Iran

[2] National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, I.R. of Iran

Abstract

A psychrotrophic bacterium with amylolytic activity was isolated from soil samples collected from the southwestern suburb of Tehran. Using biochemical tests and a molecular approach based on 16S rDNA sequencing this bacterial isolate was identified as closely related with *Exiguobacterium* genus. This bacterium designated as *Exiguobacterium* sp. SH3 was able to grow and produce amylolytic enzymes at 4, 30, 37, and 48 °C. The best temperature for amylase production by this bacterium was 30 °C at which the starch (1%) added as inducer to the culture medium was totally digested during 9 h of culture. The supernatant of culture medium was used as a source of crude enzyme for amylase assay. The amylolytic activity was observed over a wide range of the tested temperatures from 4 to 45 °C and a wide range of the tested pH conditions from 5 to 9. Cold adapted enzymes with high catalytic activity seem to be more efficient than their mesophilic or thermophilic counterparts for applications at ambient temperature such as laundry and food processing.

Key words: *Exiguobacterium,* psychrophile, starch, amylolytic, enzyme activity