Medical Journal
of
Tabriz University of Medical Sciences and Health Services

Original Article

Isolation and identification of hydrolytic enzymes generated by halophilic bacteria in center of Iran

Mohammad Shadi[1], Hamidreza Heydari[2], Babak Elyasifar[3], Azita Dilmaghani[2*]

[1]Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[2]Department of Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[3]Phd Student of Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
*Corresponding author; E-mail: dilmaghania@tbzmed.ac.ir

Received: 26 Novomber 2018 Accepted: 1 January 2019 First Published online: 18 November 2019
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 December-2020 January; 41(5):65-71

Abstract

Background: Bacteria are one of the important sources of producing enzymes. The aim of this study was to the isolate the halophilic bacteria producing amylase, lipase and pectinase from saline soil of the center of Iran.

Methods: In this study, soil samples were collected from Dagh Biarjmand and Haj Aligholi in Semnan province. At first, isolated halophilic bacteria were cultured and screened for producing of hydrolytic enzymes including amylase, lipase and pectinase using enzyme-specific media. The enzymatic activities of isolates were recognized by induction of growth inhibition zone and/or precipitation around colonies after addition of related indicators. Afterward, enzyme positive isolates were identifies using the 16S rRNA sequencing.

Results: Out of 7 bacterial isolates, 4 bacteria with amylase activity, 6 bacteria with lipase activity and 3 bacteria with pectinase activity were recognized and identified. Results showed that 2 isolates with the ability of producing all three types of enzymes belong to Bacillus genus using molecular identification methods. Furthermore, the halophilic bacteria producing amylase and pectinase were belonging to *Bacillus* and *Halobacillus* genera. Besides, bacteria producing lipase belonged to *Bacillus* and *Virgibacillus* genera.

Conclusion: The Bacillus bacteria isolated from the soil can produce all three amylase, pectinase and lipase enzymes.

Keyword: Pectinase, Amylase, Lipase, Halophilic bacteria.

How to cite this article: Shadi M, Heydari H, Elyasifar B, Dilmaghani A. [Isolation and identification of hydrolytic enzymes generated by halophilic bacteria in center of Iran]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 December-2020 January; 41(5):65-71. Persian.

© 2019 The Author(s). This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

مقاله پژوهشی

جداسازی و شناسایی باکتری های نمکدوست تولید کننده آنزیم های هیدرولایتیک جداسازی شده از مرکز ایران

محمد شادی[۱]، حمیدرضا حیدری[۲]، بابک الیاسی‌فر[۳]، آزیتا دیلمقانی[۲*]

[۱] دکتری عمومی داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
[۲] گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
[۳] دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
* نویسنده مسوول؛ ایمیل: dilmaghania@tbzmed.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۷/۹/۵ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۱۱ انتشار برخط: ۱۳۹۸/۸/۲۷
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی تبریز. آذر و دی ۱۳۹۸؛ ۴۱(۵):۶۵-۷۱

چکیده

زمینه: یکی از منابع مهم برای تولید آنزیم‌ها باکتری‌ها هستند. مطالعه اخیر با هدف جداسازی و غربالگری مولکولی باکتری‌های نمک‌دوست تولید کننده آنزیم‌های آمیلاز، لیپاز و پکتیناز از خاک شور مرکز ایران انجام گرفته است.

روش‌کار: در این مطالعه از خاک شور حاج علی گول و **بیارجمند** استان سمنان نمونه‌برداری شد. جهت جداسازی باکتری‌های مولد آمیلاز، لیپاز و پکتیناز از محیط کشت اختصاصی هرکدام از آنزیم‌ها استفاده شد. فعالیت آنزیمی باکتری‌ها براساس تشکیل هاله شفاف یا ایجاد رسوب در اطراف کلنی‌ها پس از اضافه کردن معرف‌های مربوطه مشخص گردید. جدایه‌ها با فعالیت آنزیمی آمیلازی، لیپازی و پکتینازی با استفاده از روش تعیین توالی S rRNA۱۶ شناسایی شدند.

یافته‌ها: از هفت نمونه باکتری جدا شده از خاک، ۴ باکتری با فعالیت آمیلاز، ۶ باکتری با فعالیت لیپازی و ۳ باکتری با فعالیت پکتینازی جداسازی و شناسایی گردیدند. از این بین دو جدایه، هر سه نوع آنزیم را تولید می‌کند که بررسی‌های مولکولی این دو جدایه متعلق به جنس Bacillus است. از طرف دیگر باکتری‌های نمک‌دوست تولید کننده آنزیم‌های آمیلاز و پکتیناز متعلق به جنس‌های Bacillus و Halobacillus و باکتری‌های تولید کننده لیپاز متعلق به جنس‌های Virgibacillus و Bacillus بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از پژوهش نشان داد که باکتری‌های باسیلوس جداشده از خاک قادر به تولید هر سه آنزیم آمیلاز، پکتیناز و لیپاز هستند.

کلید واژه‌ها: پکتیناز، آمیلاز، لیپاز، باکتری‌های نمک‌دوست

نحوه استناد به این مقاله: شادی م، حیدری ح ر، الیاسی‌فر ب، دیلمقانی آ. جداسازی و شناسایی باکتری های نمکدوست تولید کننده آنزیم های هیدرولایتیک جداسازی شده از مرکز ایران. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی تبریز. ۱۳۹۸؛ ۴۱(۵): ۶۵-۷۱

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.
این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز تحت مجوز کریتو کامنز (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

مناطقی با شوری بالا به عنوان یک نمونه از مناطق با شرایط زیست دشوار هستند که میکروارگانیسم‌های زنده در این مناطق توانایی زیست در رنج بالاتری از غلظت نمک را دارند (۱). کوشنر باکتری‌های نمک‌دوست را بر اساس غلظت نمک که در آن زیست می‌کنند به گروه‌های مختلف تقسیم کرد: باکتری نمک‌دوست خفیف که بهترین رشد را در ۱ تا ۳٪ نمک طعام دارند؛ باکتری نمک‌دوست معتدل که بهترین رشد را در ۳ تا ۱۵٪ نمک طعام دارند؛ و باکتری نمک‌دوست افراطی که رشد مطلوب‌تری را در ۱۵ تا ۳۰٪ نمک طعام دارند، و موجودات غیر نمک‌دوست که به کمتر از ۱٪ نمک طعام نیاز دارند؛ (در حالی‌که اگر این میکروارگانیسم‌ها نیز غلظت بالای نمک را تحمل می‌کردند به عنوان تحمل کننده نمک در نظر گرفته می‌شدند) (۲).

امروزه مطالعه روی میکروارگانیسم‌های نمک‌دوست به دلیل توانایی ویژه تحمل شرایط دشوار تولید انواع متابولیت‌های ثانویه و تجزیه ماکرومولکول‌ها و پالایش زیستی اهمیت دارد. میکروارگانیسم‌های های نمک‌دوست قابلیت تولید محصولات مفیدی هم‌چون پلی‌استرها (۳)، کارتینوئیدها (۴) و بیوسورفکتانت‌ها (۵) را دارند. هم‌چنین از این باکتری‌ها در فرایندهای مفیدی هم‌چون تجزیه ترکیبات سمی (۶) و بازیافت پساب شور (۷) می‌توان استفاده نمود. امروزه توجه به آنزیم‌های میکروارگانیسم‌های نمک‌دوست و کاربردهای زیست فناوری آنها افزایش یافته است. یکی از مهم‌ترین کاربردهای میکروارگانیسم‌های نمک‌دوست در تولید آنزیم‌های هیدرولایتیک (که توانایی انجام واکنش در شرایط سخت را دارند) می‌باشد. از جمله مهم‌ترین این آنزیم‌ها که کاربرد فراوانی در صنایع مختلف دارند می‌توان به آمیلاز، لیپاز و پکتیناز اشاره کرد. آلفاآمیلاز را می‌توان در میکروارگانیسم‌ها، گیاهان و موجودات عالی یافت (۸ و ۹). آمیلازها به یک خانواده از اندوآمیلازها تعلق دارند که باعث کاتالیز یا تجزیه اولیه نشاسته به الیگوساکاریدهای کوتاه می‌شود. محصولات پایانی آمیلاز الیگوساکاریدهای با طول ۸-۶ قند می‌باشند که بوسیله اتصالات ۱-۴و ۱-۶ به یکدیگر متصل شده‌اند. آمیلاز کاربرد بالقوه در تعداد گسترده‌ای از فرآیندهای صنعتی مانند صنایع غذایی، تخمیر و دارویی دارد (۹).

لیپازها آنزیم‌هایی هستند که جزو گروه هیدرولیزها قرار می‌گیرند و عملکرد بیولوژیکی اصلی آن‌ها تبدیل تری‌گلیسیرید نامحلول به اسیدهای چرب و گلیسرول می‌باشد. این آنزیم‌ها از جمله آنزیم‌های مهمی هستند که سطح قابل توجهی از فعالیت و پایداری را در هر دو محیط آبی و غیرآبی دارا می‌باشند تا جایی که قابلیت انجام واکنش‌های کاتالیزوری چندگانه مثل ترنس استریفیکاسیون و غیراستریفیکاسیون را دارند. لیپازها به طور گسترده در فرآیندهای روغن و چربی، شوینده‌ها، فرمولاسیون حذف مواد روغنی، صنایع غذایی، سنتزهای شیمیایی و دارویی، ساخت کاغذ، تولیدات دارویی و غیره استفاده می‌شود .(۱۰ و ۱۱).

آنزیم پکتیناز یک گروه از آنزیم‌های پکتیک می‌باشد که توانایی شکستن پکتین موجود در بخش مرکزی دیواره سلولی را دارد. پکتینازها شامل دو گروه اسیدی و قلیایی هستند. قارچ‌ها و مخمرها توانایی تولید پکتیناز اسیدی را دارند و باکتری‌ها توانایی بالقوه‌ای برای تولید پکتیناز قلیایی را دارا می‌باشند. باکتری‌های جنس Pseudomonas ,Erwinia ,Flovobacterium Xanthomonas مهم‌ترین تجزیه کنندگان پکتین هستند. از فعال‌ترین تجزیه کنندگان پکتین باکتری‌های جنس.Bacillus sp می‌باشد. آنزیم پکتیناز در صنعت کاربرد زیادی دارد که از جمله آن موارد استفاده در تهیه آبمیوه‌ها است (۱۲ و ۱۳).

با توجه به کاربردهای تجاری آمیلاز، پکتیناز و لیپاز، سالانه هزینه‌های زیادی صرف واردات و خرید این آنزیم‌ها در کشور می‌گردد. تولید آنزیم از سویه‌های بومی نیازمند مطالعات و بررسی در مناطق مختلف ایران است. هدف این پژوهش جداسازی و شناسایی آنزیم‌های هیدرولایتیک آمیلاز، لیپاز و پکتیناز از باکتری‌های نمک‌دوست مربوط به فلات مرکزی ایران است.

روش‌کار

نمونه‌برداری از اعماق ۰-۳۰ سانتی‌متر خاک‌های دو منطقه حاج علی گول و بیارجمند استان سمنان انجام گرفت. از نمونه‌های منتقل شده به آزمایشگاه برای جداسازی باکتری‌های نمک‌دوست، تا رقت ۶-۱۰ سری رقیق‌سازی شد. برای جداسازی باکتری‌های نمک‌دوست، از محیط کشت نوترینت براث (گرم در لیتر) کلریدپتاسیم ۲، کلریدکلسیم ۳.۶، سولفات‌منیزیم ۷ آبه ۹/۷، نمک ۸۱، کلریدمنیزیم ۶ آبه ۷، برمیدسدیم ۰/۰۲۶ و بی‌کربنات‌سدیم ۰/۰۶ استفاده شد (۱۴). نمونه‌های مربوطه در ۱۰۰ سی‌سی از محیط کشت نوترینت براث در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار با دور rpm ۱۵۰ به مدت ۷۲ ساعت گرماگذاری شدند. پس از مشاهده کدورت رشد در محیط کشت مایع نمکی، نمونه‌ها در محیط کشت جامد نوترینت با روش کشت خطی کشت شدند و به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. برای بررسی تولید آنزیم آمیلاز، باکتری‌های نمک‌دوست در محیط کشت عصاره گوشت ۳ گرم بر لیتر، نشاسته محلول ۱۰ گرم بر لیتر، آگار ۱۵ گرم بر لیتر در ۱۰۰۰ سی‌سی آب مقطر که حاوی۱۰٪ کلریدسدیم و با pH ۷/۳ بود به صورت یک خط عمود کشت داده شدند و به مدت ۷۲ ساعت در ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. لازم به ذکر است که برای حفظ ترکیبات این محیط کشت دمای استریل کردن ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه در نظر گرفته شد. وجود

آنزیم آمیلاز با ظهور یک ناحیه شفاف اطراف خط کشت با افزودن معرف لوگول که نشان دهنده هیدرولیز نشاسته می‌باشد، مشخص می‌شود. برای بررسی تولید آنزیم پکتیناز، باکتری‌های نمک‌دوست در محیط کشت حاوی ۱ درصد پکتین، ۰/۲ درصد پتاسیم‌هیدروژن‌فسفات، ۰/۱۴ درصد سولفات‌آمونیوم، ۰/۰۲ درصد سولفات‌منیزیم ۷ آبه، ۰/۱ درصد مواد مغذی (۵ میلی‌گرم بر لیتر سولفات‌آهن ۷ آبه، ۱/۶ میلی‌گرم بر لیتر سولفات‌منگنز یک ابه، ۱/۴ میلی‌گرم بر لیتر سولفات‌روی ۷ آبه و ۲ میلی‌گرم بر لیتر کلریدکلسیم)، ۲ درصد آگار و به همراه ۱۰ درصد کلریدسدیم کشت داده شدند. پکتین از طریق صاف کردن و بقیه محیط کشت در دمای ۱۲۱ درجه به مدت ۲۰ دقیقه استریل شد. محیط کشت به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور گرماگذاری گردید. تولید آنزیم پکتیناز توسط باکتری‌ها، با افزودن محلول ۲ درصد لوگول (ید و یدیدپتاسیم) به محیط کشت تشکیل هاله شفاف اطراف کلونی‌ها مشخص گردید. برای بررسی تولید آنزیم لیپاز، از محیط کشت حاوی ۱ درصد پپتون، ۰/۱ درصد کلریدکلسیم، ۱ درصد توئین ۸۰، ۱/۵ درصد آگار، آب مقطر و به همراه ۱۰ درصد کلریدسدیم استفاده شد سپس محیط کشت در دمای ۱۲۱ درجه به مدت ۲۰ دقیقه استریل شد. باکتری‌های نمک‌دوست در محیط مورد نظر کشت داده شدند و بعد از ۴۸ ساعت در صورت ایجاد رسوب شیری رنگ اطراف محیط کشت نشان دهنده تولید آنزیم لیپاز می‌باشد. استخراج DNA باکتری‌ها با استفاده از کیت استخراج DNA کیاژن انجام گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی: ۱۰ نانوگرم بر میکرولیتر DNA، ۰/۴ میلی‌مولار dNTP، ۲ میلی‌مولار کلریدمنیزیم، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR و ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase انجام گردید. واکنش PCR با روش استاندارد و با استفاده از پرایمرهای عمومی (F: 5’ AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3’ , R: 5’- GACGGGCGGTGTGTACAA) در دستگاه ترمال سایکلر (Eppendorf, Germany) تحت شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت (۱۵). در نهایت، قطعه تکثیر شده جهت تعیین توالی به شرکت تکاپوزیست ارسال گردید.

یافته‌ها

تکثیر قطعه S rRNA۱۶ باکتری‌ها با استفاده از روش PCR تکثیر قطعه S rRNA۱۶ جدایه‌ها باندهای مناسب در اندازه‌های تقریبی ۱۵۰۰ جفت باز را نشان داد. توالی تعیین شده قطعه ژنی با نرم‌افزار آنلاین BLAST موجود در وب سایت NCBI بررسی شد. درصد مشابهت جدایه‌ها با دیگر باکتری‌های موجود در بانک اطلاعاتی مقایسه گردید. شناسایی باکتری‌های تولید کننده آنزیم‌های آمیلاز، لیپاز و پکتیناز مطالعه برای توانایی تولید آنزیم‌هایی هیدرولایتیک بر روی باکتری‌های نمک‌دوست مورد نظر انجام شد و از مجموع ۲۰ باکتری‌های جدا شده از خاک مرکزی ایران، تعدادی از باکتری‌های نمک‌دوست برای تولید آنزیم‌های آمیلاز، لیپاز و پکتیناز مثبت بودند. این جدایه‌ها در سطح جنس وگونه در جدول ۱ آورده شده است. پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون باکتری در محیط کشت مخصوص آنزیم آمیلاز، و اضافه نمودن محلول لوگول ۴ باکتری از ۲۰ باکتری جداشده از خاک توانایی تولید آنزیم آمیلاز و ایجاد هاله شفاف را داشتند که این باکتری‌ها شامل DAR, D6A, 6(2)A, 3NB بودند که معادل باکتری‌های *Bacillus subtillis*، *Halobacillus trueperi* و *Bacillus hwajinpoensis* می‌باشند. پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون، در صورت مشخص بودن رسوب اطراف خط کشت تولید آنزیم لیپاز به وسیله باکتری‌های نمک‌دوست جدا شده مثبت گزارش شد. باکتری‌های نمک‌دوست تولید کننده آنزیم لیپاز شامل *Bacillus subtillis*، *Virgibacillus halodentrificans* و *Bacillus hwajinpoensis* بودند. پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه بروی خط کشت باکتری‌های نمک‌دوست در محیط کشت مخصوص تشخص آنزیم پکتیناز لوگول اضافه شد، در صورت ایجاد هاله شفاف در اطراف خط کشت تولید آنزیم پکتیناز مثبت گزارش شد. باکتری‌های نمک‌دوست تولید کننده آنزیم پکتیناز شامل *Bacillus subtillis* و *Halobacillus trueperi* بودند(جدول۲).

جدول۱: اطلاعات مقایسه توالی قطعه ژنی SrRNA۱۶ جدایه با بانک اطلاعاتی NCBI

Isolate	Bacteria	Similarity
D6A	*Bacillus subtillis*	٪۹۹
DAR	*Bacillus subtillis*	٪۹۹
A(۲)۶	*Halobacillus trueperi*	٪۹۹
NB۱	*Virgibacillus halodentrificans*	٪۹۹
NB۲	*Virgibacillus halodentrificans*	٪۹۹
NB۳	*Bacillus hwajinpoensis*	٪۹۹
D8B	*Virgibacillus olivae*	٪۹۹

جدول ۲: نتایج توانایی تولید آنزیم‌های هیدرولایتیک به‌وسیله باکتری‌های نمک‌دوست جداسازی شده

نمونه	نام باکتری	آمیلاز	لیپاز	پکتیناز
D6A	*Bacillus subtillis*	+	+	+
DAR	*Bacillus subtillis*	+	+	+
A(۲)٦	*Halobacillus trueperi*	+	−	+
NB۱	*Virgibacillus halodentrificans*	−	+	−
NB۲	*Virgibacillus halodentrificans*	−	+	−
NB۳	*Bacillus hwajinpoensis*	+	+	−
D8B	*Virgibacillus olivae*	−	+	−

جدول ۳: مکان جداسازی و سویه‌های تولید کننده آنزیم‌های هیدرولایتیک

نویسندگان	مکان نمونه‌برداری	سویه‌های تولید کننده آمیلاز	سویه‌های تولید کننده لیپاز	سویه‌های تولید کننده پکتیناز
کومار	دریاچه Sambhar هندوستان	Marinobacter، Haloalkaliphilic و Halobacillus	Marinobacter، Chromohalobacter، Haloalkaliphilic و Halomonas	–
سانچز	حوضچه‌های شور در اسپانیا	Halomonas	Chromohalobacter و Salinivibrio	–
هونگ دنگ	اوکیناوا	Methylarcula، Cobetia، Halomonas، Pseudomonas، Psychrobacter، Wangia، Bacillus و Sporosarcina	Alcanivorax، Cobetia، Halomonas و Pseudomonas	–
روبای	دریاچه رزازه	Halobacillus، Virgibacillus، Halomonas، Bacillus، Staphylococcus، Idiomarina و Pseudomonas	Halobacillus، Virgibacillus، Oceanobacillus، Halomonas، Bacillus، Staphylococcus و Pseudomonas	Halobacillus، Virgibacillus، Oceanobacillus، Bacillus، Halomonas و Pseudomonas
باباولیان	دریاچه آران و بیدگل	Thalassobacillus، Halobacillus، Halomonas، Salinicoccus و Salicola	Thalassobacillus، Halobacillus، Halomonas، Marinococcus و Salicola	Halobacillus، Thalassobacillus، Halomonas، Salinicoccus و Salicola
محمد شادی	خاک‌های نمکی فلات مرکزی ایران	Bacillus Halobacillus و	Virgibacillus و Bacillus	Halobacillus و Bacillus

بحث

مناطق نمکی و فوق اشباع از نمک در سراسر کره زمین هم‌چون دریاچه‌های نمک یا معادن نمک وجود دارند. این مناطق نمکی شرایط بسیار سخت برای زیستن موجودات عادی فراهم می‌کنند ولی تعدادی میکروارگانیسم که شامل گروهی از آرکی‌آها و باکتری‌ها هستند قابلیت زیستن در این شرایط دشوار را دارند. آنزیم‌های هیدرولایتیک تولید شده توسط این میکروارگانیسم‌ها خصوصیات منحصر به فردی شامل مقاومت به شوری، دما و غیره را دارند (۱۵).

در مطالعات مشابه با تحقیقات حاضر، توان تولید پنج آنزیم هیدرولیتیک برون سلولی شامل آمیلاز، پروتئاز، لیپاز و DNase و پولولاناز در باکتری‌های نمک‌دوست نسبی در حوضچه‌های شور در اسپانیا بررسی شد که باکتری‌های تولید کننده آمیلاز جداسازی شده متعلق به جنس Halomonas و باکتری‌های تولید کننده لیپاز متعلق به جنس Chromohalobacter و Salinivibrio بودند (۶۱).

در سال ۲۰۰۹ توسط Dang و همکاران تولید آنزیم‌های هیدرولاز خارج سلولی در میکروارگانیسم‌های نمک‌دوست بررسی شد که از رسوبات جنوب Okinawa Trough بدست آمده بود. باکتری‌های نمک‌دوست تولید کننده آنزیم آمیلاز متعلق به جنس Methylarcula، Cobetia، Halomonas، Pseudomonas، Psychrobacter، Wangia، Bacillus و Sporosarcina و باکتری‌های نمک‌دوست تولید کننده لیپاز متعلق به جنس‌های Alcanivorax، Cobetia، Halomonas و Pseudomonas بودند (۱۹). Al-Rubaye و همکارن تولید آنزیم‌های هیدرولایتیک به وسیله باکتری‌های نمک‌دوست جداشده از دریاچه Razazah در عراق در سال ۲۰۱۷ بررسی کردند، که باکتری‌های نمک‌دوست تولید کننده آنزیم آمیلاز متعلق به جنس‌های Halobacillus، Virgibacillus، Halomonas، Bacillus، Staphylococcus، Idiomarina و Pseudomonas بودند و باکتری‌های تولید کننده لیپاز متعلق به خانواده Halobacillus، Virgibacillus، Oceanobacillus، Halomonas، Bacillus، Staphylococcus و Pseudomonas و باکتری‌های تولید کننده پکتیناز متعلق به

جنس‌هایHalobacillus ، Virgibacillus ،Oceanobacillus، Bacillus ، Halomonasو Pseudomonas بودند (۲۰).

هم‌چنین بررسی باکتری‌های نمک‌دوست نسبی از نظر تولید آنزیم برون سلولی هیدرولیتیک صنعتی به وسیله Kumar و همکاران در سال ۲۰۱۲ در دریاچه Sambhar در هند انجام شد. باکتری‌های تولید کننده آنزیم آمیلاز متعلق به جنس Haloalkaliphilic، Marinobacter و Halobacillus و باکتری‌های تولید کننده آنزیم لیپاز متعلق به خانواده Marinobacter، Chromohalobacter، Haloalkaliphilic و Halomonas بودند (۱۷).

Amoozegar و همکاران در سال ۲۰۱۱ شناسایی و تعیین خصوصیات باکتری‌های نمک‌دوست تولید کننده ۱۰ آنزیم هیدرولیتیک پروتئاز، آمیلاز، لیپاز، DNase، کربوکسی‌متیل‌سلولاز، پولولاناز، گزیلاناز، پکتیناز و اینولیناز و کیتیناز در دریاچه آران و بیدگل را بررسی کردند. باکتری‌های نمک‌دوست جدا شده که توانایی تولید آنزیم آمیلاز داشتند متعلق به جنس‌های باکتریایی Halobacillus، Thalassobacillus، Salinicoccus، Halomonas و Salicola بودند و باکتری‌های تولید کننده آنزیم لیپاز متعلق به جنس‌های Halobacillus، Thalassobacillus، Marinococcus ، Halomonas و Salicola و هم‌چنین باکتری‌های نمک‌دوست تولید کننده آنزیم پکتیناز متعلق به جنس‌های Halobacillus، Thalassobacillus، Salinicoccus، Halomonas و Salicola بودند (۱۸).

در پژوهش حاضر باکتری‌های نمک‌دوست تولید کننده آنزیم آمیلاز متعلق به خانواده Bacillus و Halobacillus و باکتری‌های نمک‌دوست تولید کننده لیپاز متعلق به جنس‌های Virgibacillus و Bacillus و هم‌چنین باکتری‌های نمک‌دوست تولید کننده آنزیم پکتیناز متعلق به خانواده Bacillus و Halobacillus بودند (جدول ۳).

بی تردید خاک منبع مهمی جهت جداسازی میکروارگانیسم‌های تولید کننده آنزیم‌های صنعتی است. کشور ما با توجه به تنوع اقلیمی دارای منابع بسیار غنی است. با جداسازی و شناسایی سویه‌های بومی برتر تولید کننده آنزیم‌های صنعتی و اعمال روش‌های مهندسی زیستی، می‌توان جهت بومی‌سازی و بهینه‌سازی این آنزیم‌ها گام برداشت. در این مطالعه گونه‌های مختلف بومی ایران معرفی شد که نیاز به تحقیقات بیشتری برای دستیابی به شرایط بهینه تولید و تجاری سازی این آنزیم‌ها توسط جدایه‌های مذکور مورد نظر است.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از پژوهش نشان داد که باکتری باسیلوس جداشده از خاک قادر به تولید هر سه آنزیم آمیلاز، پکتیناز و لیپاز را دارا هستند.

قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه دکتری عمومی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تبریز با شماره پایان‌نامه ۳۹۶۰ است.

ملاحظات اخلاقی

با توجه به این‌که این مطالعه بر روی نمونه‌های جانوری یا انسانی انجام نیافته است، لذا ملاحظات اخلاقی مربوطه در این پژوهش موضوعیت ندارد.

منابع مالی

این پژوهش با هزینه مالی نویسنده مسئول انجام یافته است.

منابع متقابل

مولف اظهار می‌دارد که منافع متقابلی از تالیف یا انتشار این مقاله ندارد.

مشارکت مولفان

همکاران اجرا و تحلیل نتایج مطالعه را برعهده داشتند. آ.د هم‌چنین مقاله را تالیف نموده و نسخه نهایی آن را مطالعه و تایید نموده است.

References

1. Amziane M, Darenfed-Bouanane A, Abderrahmani A, Selama O, Jouadi L, Cayol J-L, et al. Virgibacillus ainsalahensis sp. nov., a Moderately Halophilic Bacterium Isolated from Sediment of a Saline Lake in South of Algeria. *Current microbiology* 2017; **74**: 219-223. doi: 10.1007/s00284-016-1171-0
2. Kushner D. Halophilic bacteria. *Advances in applied microbiology* 1968; **10**: 73-99.
3. Van-Thuoc D, Huu-Phong T, Thi-Binh N, Thi-Tho N, Minh-Lam D, Quillaguaman J. Polyester production by halophilic and halotolerant bacterial strains obtained from mangrove soil samples located in Northern Vietnam. *Microbiology Open* 2012; **1**(4): 395-406. doi: 10.1002/mbo3.44
4. Asker D, Ohta Y. Production of canthaxanthin by extremely halophilic bacteria. *Journal of bioscience and bioengineering* 1999; **88**(6): 617-621. doi: 10.1016/s1389-1723(00)87089-9
5. Sarafin Y, Donio MBS, Velmurugan S, Michaelbabu M, Citarasu T. Kocuria marina BS-15 a biosurfactant producing halophilic bacteria isolated from solar salt works in India. *Saudi journal of biological sciences* 2014; **21**(6): 511-519. doi: 10.1016/j.sjbs.2014.01.001
6. Le Borgne S, Paniagua D, Vazquez-Duhalt R. Biodegradation of organic pollutants by halophilic bacteria and archaea. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 2008; **15**(2-3): 74-92. doi: 10.1159/000121323

7. Woolard C R, Irvine R L. Biological treatment of hypersaline wastewater by a biofilm of halophilic bacteria. *Water Environment Research* 1994; **66**(3): 230-235. doi: 10.1159/000121323
8. Kandra L. α-Amylases of medical and industrial importance. *Journal of Molecular Structure: Theochem*. 2003; **666**: 487-498 doi: 10.1016/j. theochem.2003.08.073.
9. Souza PMd. Application of microbial α-amylase in industry-A review. *Brazilian Journal of Microbiology* 2010; **41**(4): 850-861.
10. Gutarra M L, Godoy M G, Maugeri F, Rodrigues M I, Freire D M, Castilho L R. Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus Penicillium simplicissimum by solid-state fermentation. *Bioresource technology* 2009; **100**(21): 5249-5254. doi: 10.1016/j.biortech.2008.08.050
11. Rigo E, Ninow J L, Di Luccio M, Oliveira J V, Polloni A E, Remonatto D, et al. Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. *LWT-Food Science and Technology* 2010; **43**(7): 1132-1137. doi: 10.1016/j.lwt.2010.03. 002
12. Siddiqui M A, Pande V, Arif M. Production, purification, and characterization of polygalacturonase from Rhizomucor pusillus isolated from decomposting orange peels. *Enzyme research* 2012; **2012**. doi: 10.1155/2012/138634
13. Hla S S, Kurokawa J, Kimura T, Ohmiya K, Sakka K. A novel thermophilic pectate lyase containing two catalytic modules of Clostridium stercorarium. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 2005; **69**(11): 2138-2145. doi: 10.1271/bbb.69.2138
14. Garabito M J, Arahal D R, Mellado E, Márquez M C, Ventosa A. Bacillus salexigens sp. nov., a new moderately halophilic Bacillus species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 1997; **47**(3): 735-741. doi: 10.1099/00207713-47-3-735
15. Enache M, Kamekura M. Hydrolytic enzymes of halophilic microorganisms and their economic values. *Rom J Biochem* 2010; **47**: 47-59.
16. Sánchez-Porro C, Martin S, Mellado E, Ventosa A. Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *Journal of applied microbiology* 2003; **94**(2): 295. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.01834.x
17. Kumar S, Karan R, Kapoor S, Singh S, Khare S. Screening and isolation of halophilic bacteria producing industrially important enzymes. *Brazilian Journal of Microbiology* 2012; **43**(4): 1595-1603. doi: 10.1590/s1517-83822012000400044
18. Babavalian H, Amoozegar M A, Pourbabaee A A, Moghaddam M M, Shakeri F. Isolation and identification of moderately halophilic bacteria producing hydrolytic enzymes from the largest hypersaline playa in Iran. *Microbiology* 2013; **82**(4): 466-474. doi: 10.1134/s0026261713040176
19. Dang H, Zhu H, Wang J, Li T. Extracellular hydrolytic enzyme screening of culturable heterotrophic bacteria from deep-sea sediments of the Southern Okinawa Trough. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2009; **25**(1): 71-79. doi: 10.1007/s 11274-008-9865-5
20. Al-Rubaye MTS, Al-Musawi M H, Fakhari J, Hosseini M. Screening and Characterization of Halophilic Bacteria with Industrial Enzymes from Salt Lake Razazah, Karbala, Iraq. *Biosciences Biotechnology Research Asia* 2017; **14**(2): 531-539. doi: 10.13005/bbra/2476