



ارائه شده توسط:

سایت ترجمه فا

مرجع جدیدترین مقالات ترجمه شده

از نشریات معتبر

تولید آنالیز از *B. amyloliquifaciens* در تخمیر مستغرق با استفاده از

فرآورده های فرعی صنعتی کشاورزی

چکیده

سی و یک ایزوله ی باکتریایی از 133 ایزوله از ریزوسفر گیاهان شبدر مصری به دست آمده و بر محیط کشت آمالیز، قابلیت های مختلفی برای شکنندگی نشاسته داشتند. ایزوله ی E109 قدرتمندترین ایزوله ها، 72.5 و 2.5 برای فعالیت آمالیز و میزان آبکافت نشاسته (SHR) در دمای 50 درجه را دارا بود. ایزوله ی قدرتمند E109 بر اساس ویژگی های فنوتیپیک، مواضع فیلوژنتیک مطابق تحلیل ژن 16S rRNA و پیامدهای بنیادین (مطابق NCBI Gen Bank) شناسایی شد. تحلیل ژن 16S rRNA این نکته را تایید کرد که این ایزوله به *Bacillus* نوعی تعلق داشته و بیشتر به *Bacillus* امیلولیک فاشنز (95٪ شباهت) شباهت دارد. برای تولید آمالیز نه پس مانده ی کشاورزی صنعتی به عنوان منابع کربن به محیط کشت پایه اضافه شد. این محیط کشت با باقیمانده ی نشاسته دار سیب زمینی به عنوان تنها منبع کربن مکمل با فعالیت آنزیمی بیش از نشاسته ی قابل حل به عنوان کنترل برای فعالیت های آمالیزهای a، B و γ تکمیل شد، این فعالیت ها بعد از 48 ساعت در دمای 50 درجه با استفاده از لرزاننده ی چرخشی با سرعت 150 rpm با *B. amyloliquifaciens* در حدود 1.26 & 4 و 8 لایه افزایش یافت. حداکثر مقادیر a، B و γ فعالیت آمالیز را بر محیط کشت غنی شده با 2٪ ته مانده ی نشاسته ای سیب زمینی بعد از 30، 30 & 36 ساعت تخمیر در 50 درجه ی سانتیگراد با استفاده از روش محفظه ی لرزان به عنوان نمونه ی کشت دسته ای به دست می دهد. این مقادیر به ترتیب برابر بودند با: 1.0 Uml-1 ($R^2 = 0.093$), 155.2 Uml-1 ($R^2 = 0.95$), 2.4 Uml-1 ($R^2 = 0.94$). می توان گفت که محیط کشت فعال غنی شده با 2٪ باقیمانده ی نشاسته ای سیب زمینی به عنوان زیرلایه ای ارزان از محیط کشت پایه شامل 1٪ نشاسته برای تولید در تخمیر مستغرق ارجح تر بود، زیرا a، B و γ فعالیت آمالیز را به مقدار 1.98، 7.69، و 12 لایه بیشتر از محیط کشت پایه (کنترل) افزایش داد.

عبارات کلیدی: فعالیت آمالیز، *B. amyloliquifaciens*، زیرلایه های نشاسته ای، تخمیر مستغرق، پارامترهای رشد

مقدمه

آنزیم ها به عنوان پروتئین های بیوکاتالیست در طبیعت تعریف شده اند که توسط سلول های زنده برای واکنش های خاص بیوشیمیایی تشکیل دهنده ی قسمت هایی از روند متابولیک سلول تولید می شوند. آنزیم ها به شدت در فعالیت خود روی زیرلایه ها خاص هستند.

تولید آمالیز دیگر آنزیم ها را در بر می گیرد، بنابراین نشاسته 65٪ آنزیم های بازار جهانی را پوشش می دهد (وان در مارل و همکاران، 2002، بالکان و فیگن، 2007). آمالیز a یک آنزیم با فعالیت اندو بوده پیوندهایی را در شکل های تصادفی هیدرولیزه کرده که خود موجب هیدرولیزه شدن a-1، 4 باند و انشعاب a-1، و شش پیوند شده و به شکل گیری اولیگوساکراید خطی و دکسترین محدود منجر می شود. آمالیز B یک آنزیم با عملکرد اکسو می باشد که از انتهای غیرکاهنده به زیرلایه ها حمله می کند، a-1، 4 را هیدرولیزه کرده و نمی تواند از پیوندهای a-1، 6 عبور کند بنابراین مالتوز اولیگوساکراید را به عنوان تولید خواهد کرد (دو واحد از گلوکز همجوار). آمالیز γ (گلوکومیلاز) یک آنزیم با عملکرد اکسو می باشد که از انتهای غیرکاهنده به زیرلایه های حمله کرده و پیوندهای a-1، 4 و a-1، 6 هیدرولیزه کرده و بنابراین مونوساکراید (یک واحد از گلوکز) را به عنوان محصول اصلی خود تولید می کند (گوپتا و همکاران، 2002).

آمالیزها در تجارت برای میعان نشاسته، کاغذ، آهارزنی منسوجات، روکش نشاسته ای رنگ ها، جدا کردن کاغذ دیواری، صنعت آجیو، استخراج شکر با تولید شهد شکر از نشاسته که شامل گلوکز، مالتوز، و اولیگوساکراید می شود، و صنایع دارویی به کار می رود. به منظور رفع نیازهای این صنایع واسطه ای ارزان قیمت برای تولید آمالیزها مورد نیاز است (بالکان و فیجن، 2007). امروزه پتانسیل کاربرد میکروارگانیسم به عنوان منبع بیولوژیکی آنزیم های به صرفه ی صنعتی توجهات را به سمت فعالیت آنزیمی خارج سلولی در چندین میکروارگانیسم جلب کرده است. آمالیزها را می توان از چندین منبع مانند گیاه، حیوان و میکرب هایی مانند باکتری و قارچ به دست آورد (موراکامی و همکاران، 2008). منبع میکربی آمالیزها به علت قابلیت ارتجاعی و دسترسی خود به دیگر منابع ترجیح داده می شود. تا کنون

آنزیم های تجاری از باکتری یا قارچ کشت شده به دست آمده است. آمالیزهای باکتریایی عموماً به دلیل پردازش نشاسته ترجیح داده می شوند. در میان باکتری ها، نمونه های *Bacillus subtilis*، *B. amyloliquefaciens* و *B. megaterium*، *B. macerans*، *stearothermophilus* بهترین تولید کننده های آمالیز a مقاوم در برابر حرارت با استفاده از تخمیر بوده و به صورت گسترده برای تولید تجاری آنزیم در کاربردهای مختلف *Pseudomonas* و *Clostridium thermosacharolyticum*، *Cl. Thermohydrosulfuricum* به کار رفته اند (اناسی، 2007، بوژیک و همکاران، 2011).

بیوسنتز آمالیزها در باقیمانده ها و محصولات فرعی مانند مواد نشاسته ای برای حل مسائل مرتبط با آلودگی و دستیابی به وسیله ای ارزان قیمت انجام شد (حق و همکاران، 2005، جکریف داکاموش و همکاران، 2006، موکرجی و همکاران، 2009). سبوس برنج، سبوس گندم، و زائده ی نشاسته ی سیب زمینی به عنوان زیرلایه کربن ارزان قیمت برای فعالیت آمالیز *B. subtilis* استفاده شده اند (بایسال و همکاران، 2003، شوکلا و کار، 2006، اصغر و همکاران، 2007). هدف از این تحقیق بررسی ته مانده های کشاورزی صنعتی به عنوان منبع جایگزین کربن برای تولید آمالیز توسط باکتری محلی مصری به منظور کاهش آلودگی محیطی و هزینه ی تولید می باشد.

مواد و روش

جمع آوری نمونه از محیط خاک

نمونه های ریزوسفر از زمین های حاصلخیز کشت شده با شبدر مصری (*Trifolium alexandrium*) در ایالت کالیفرنیا جمع آوری شد. نمونه های خاک از عمق 3 تا 5 سانتی متر بعد از برداشت 5 سانتی متر از روی سطح زمین جمع آوری شدند. این نمونه ها در کیسه های پلاستیکی استریل شده جمع آوری شده در طی انتقال به آزمایشگاه در جعبه های یخ نگه داری شدند. در آزمایشگاه تمامی نمونه ها تا زمان ایزوله در یخچال نگه داری شدند.

محیط های کشت

محیط کشت 1: محیط کشت قارچ مغذی (دستورالعمل DIFCO، 1984) برای ایجاد و نگهداری باکتری به کار رفت.

محیط کشت 2: محیط کشت قارچ نشاسته ای (مدیگان و همکاران، 2011) برای ایزوله ی باکتری شکننده ی نشاسته استفاده شد. ترکیب این محیط کشت چنین بود (1-gI): نشاسته ی حل شدنی، 10؛ KNO_3 ، 0.5؛ K_2HPO_4 ، 1؛ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، 0.1؛ $CaCl_2$ ، $FeCl_3$ مقدار کم؛ قارچ، 15، و مجاور تنظیم شده روی pH 7.0. *محیط کشت برات نشاسته نیز مانند محیط کشت قارچ نشاسته ای بود تنها با این تفاوت که قارچ نداشت.

ایزوله و مشاهده ی باکتری آمیلولیتیک

ده گرم از نمونه ی خاک در 90 ml آب شیر استریل ریخته شده و به مدت 10 دقیقه تکان داده شد. میکروارگانسیم های شکننده ی نشاسته از نمونه های جمع آوری شده با روش صفحه ی رقیق سازی خاک با استفاده از محیط کشت قارچ نشاسته ای مطابق کلارک و همکاران (1958) جدا شد. رقیق سازی سریالی تا 7-10 هر نمونه ی خاک با استفاده از آب استریل شده انجام شد. رقیق سازی های مناسب در بالای محیط کشت خاک (به صورت سه لایه) قرار گرفتند. لایه های ریخته شده برای 48 ساعت در دمای 30 و 50 درجه نگه داری شدند. بعد از 48 ساعت، به مدت بیست دقیقه معرف ید لوگول 1٪ روی لایه ها جریان یافت و سپس لایه ها به منظور از بین بردن رنگ های اضافی با آب شستشو داده شدند. ناحیه ی هاله ای اطراف مواد اندازه گیری شد تا میزان آبکافت نشاسته (SHR) طبق تیپسوامی و همکاران (2006) و بهادر و همکاران (2010) محاسبه شود. ایزوله های منتخب روی سطوح قارچی اریب برای استفاده های بعدی نگهداری شدند.

روند تخمیر مستغرق

این مرحله در محفظه های 250 میلی ارلینمیر انجام شد که هرکدام شامل 100 ml محیط کشت برات نشاسته ی استریل بوده و با 1٪ ماده ی استاندارد تلقیح (2.3×10^6 CFU ml⁻¹) برای ایزوله ی باکتری آزمایش شده تلقیح شد که در شیکر چرخشی با سرعت 150 rpm، به مدت 48 ساعت و در دمای 50 درجه نگه داری شده بود. محیط کشت تخمیر شده در 10000 rpm به مدت ده دقیقه سانترفیوژ شد تا وزن سلول خشک و فعالیت آمالیزها در رسوب و شناور مشخص شود. تمامی آزمایشات حداقل سه بار انجام شدند (فاسی و همکاران، 2011).

آماده سازی باقیمانده های کشاورزی صنعتی

نه عدد محصول فرعی کشاورزی، سبوس گندم، ساقه ی گندم، سبوس برنج، ساقه ی برنج، پوسته ی برنج، برنج شکسته، نشاسته ی ذرت، باقیمانده ی نشاسته ای سیب زمینی و چوب ذرت ابتدا با آب سرد و سپس با آب گرم شستشو داده شدند تا آلودگی ها و ذرات خاک آنها از بین برود. زیرلایه های شستشو داده شده در دمای 50 درجه ی شبانه نگهداری شدند تا وزن ثابت خود را بدست بیاورند. زیرلایه های در دستگاه سنگ سمباده آسیاب شده و ذره ای در اندازه ی 5mm بوسیله ی الک کردن و کنار زدن ذرات بزرگ انتخاب شده و برای مطالعات بعدی کنار گذاشته شد (سینگ و رانی، 2014).

تاثیر ته مانده های کشاورزی صنعتی به عنوان زیرلایه ی نشاسته روی فعالیت آنزیم ها

در تخمیر مستغرق فعالیت آنزیم ها و رشد روی زیرلایه های نشاسته ای مختلف به عنوان منابع کربن در طول دوره های مختلف تخمیر مورد مطالعه قرار گرفت. منبع کربن مناسب با جایگزینی مقدار برابری از کربن در هر کدام از منابع کربن آزمایش شده (سبوس گندم، ساقه ی گندم، سبوس برنج، ساقه ی برنج، برنج شکسته، نشاسته ی ذرت، باقی مانده ی نشاسته ای سیب زمینی و چوب ذرت) بجای منبع کربن اصلی در محیط کشت استفاده شده انتخاب شد. تراکومات مختلف باقی مانده های نشاسته ای سیب زمینی از 0.5٪ تا 2.5٪ برای انتخاب روش مناسب تولید آنزیم بوسیله ی انبساط روی محیط کشت فعال به کار گرفته شد.

شناسایی فنوتیپ و ژنوتیپ

شناسایی ایزوله ی منتخب طبق آزمایشات مورفولوژی (انبساط نخود و غشاءدرونی تخم مرغ زیر میکروسکوپ مشاهده شدند) و بیوشیمیایی (کاتالیز، آبکافت نشاسته، آبکافت ژلاتین، آبکافت کاستین، تولید آندول و آزمایش ووگس پروسکور) بر اساس دستورالعمل باکتریولوژی سیستماتیک برگگی، ویرایش دوم انجام شد. نیال و پل، 2009). سپس این مرحله از کار با ترتیب دهی 16S rRNA تایید شد، نمونه های خالص باکتری هدف در محیط کشت برات مغذی در یک شیکر چرخشی (150rpm) در دمای 30 درجه به مدت 24 ساعت برای ایزوله ی DNA ژنومیک با استفاده از روش هینی و همکاران قرار داده شد (یاداف و همکاران، 2009). تکثیر 16S rDNA بوسیله ی PCR با استفاده از استر (27F) پیش (5`-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3`) و (1492R) معکوس (5`-GGT TAC) R

CTT GTT ACG ACT T-3` توصیف شده توسط راجی و همکاران (2008) انجام شد. این تکثیر در والیوم واکنشی 50µl انجام شد. گام های چرخه ی حرارتی (PCR) بدین ترتیب برداشته شدند: 5 دقیقه تقلیب ابتدایی در دمای 95 درجه، 30 چرخه ی 1 دقیقه ای تقلیب در دمای 95 درجه، یک دقیقه گرم کردن استر در دمای 55 درجه، یک دقیقه انبساط در دمای 72 درجه، و 10 دقیقه انبساط در دمای 72 درجه. DNA تکثیر شده روی الکتروفورز ژل آگارز 1% (w/v) جدا شده، و سپس با استفاده کیت ژل Qiaquick (کیاژن، آلمان) با استفاده از دستورالعمل تولیدکننده پاکسازی شد. محصول PCR پاکسازی شده با استفاده از کیت ترمیناتور Big-Dye آنالیزور ژنتیک ABI 310 (Applied Biosystems, USA) ترتیب دهی شد. داده های ترتیب دهی شده ی 16S rDNA تنظیم شده و برای دستیابی به نزدیک ترین میکرب های متشابه بررسی شدند. بررسی ناشناس ترتیب نوکلئوتید 16S rRNA با پایگاه داده های نوکلئوتید با استفاده از برنامه ی BLASTN مقایسه شد که در مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI, 2014) قابل دسترسی و از پایگاه داده های Gene Bank قابل بازیابی ست. تنظیم ترتیب چندگانه برای این ترتیبات مشابه با استفاده از الگوریتم توصیف شده در Clustal Omega ارائه شد. یک درخت تکامل نژادی با استفاده از روش اتصال مجاور طراحی شد.

مراحل تحلیلی

وزن خشک سلول بوسیله ی شستشوی قرص ها با آب مقطر برای رفع مواد نشاسته ای روی قرص تعیین شد که در آن حجم سلولی معلق و با 20ml آب مقطر هموژنیزه شد، بعد از آن سانترفیوژ rpm10000 به مدت ده دقیقه در دمای 4 درجه انجام شد، مواد شناور در طول سه چرخه کنار گذاشته شدند. در نهایت زیست توده در 1 ml آب مقطر معلق شد. ماده ی معلق به سرپوش ها اضافه شده و در اجاقی به دمای 60 درجه 1-2 خشک شد تا به وزن ثابتی برای اندازه گیری وزن خشک سلول (gl-1) برسد (تامیلاراسان و همکاران 2012).

فعالیت آمالیز آلفا با استفاده از روش ید نشاسته توصیف شده توسط سودهارسان و همکاران (2007) بررسی شد. فعالیت مورد نظر با استفاده از 0.5 ml از نشاسته ی حل شدنی 1% (Sigma S-2630) ژلاتینه شده در آب (15 دقیقه[^] 100 درجه، ترکیب مداوم) فرو رفته در 0.5 ml 0.1 M بافر فسفات (pH 7.0) تخمین زده شد، 1 ml آنزیم

خام در 60 درجه به مدت 30 دقیقه مخلوط و نگهداری شد، که در آن آنزیم های بررسی شده بیشترین فعالیت را داشتند، و 1ml از 1 M HCl برای توقف واکنش آنزیمی اضافه شد، سپس a ml معرف ید را اضافه کردیم (5 mM I₂ و 5 mM KI). بعد از تشکیل رنگ، جذب در 620 nm با استفاده از طیف نورسنج اندازه گرفته شد (Unico S2100 series UV/Vis). بررسی ید نشاسته به عنوان ناپدید شدن مقدار میانگین 1 mg ماده ی نشاسته یدی در دقیقه در یک واکنش آزمایشی تعریف شده است. 1-U ml با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$U \text{ ml}^{-1} = (A_{620 \text{ nm control}} - A_{620 \text{ nm sample}}) / (A_{620 \text{ nm/mg starch}}) / 30 \text{ min} / 1 \text{ ml/dilution factor.}$$

که در آن کنترل A620 nm جذب بدست آمده از نشاسته بدون اضافه کردن آنزیم می باشد، نمونه ی A620 nm جذب برای نشاسته ی تجزیه شده با آنزیم و نشاسته ی A620 nm/mg جذب برای 1 mg از نشاسته ی بدست آمده از منحنی استاندارد می باشد (یو و همکاران، 1987، فولر و الیوت، 1999، ژیاو و همکاران، 2005). آمالیزهای بتا یا گاما با اندازه گیری مقدار گلوکز آزاد شده از نشاسته می باشد (بریجاک، 2003). 0.5 ml از نشاسته ی حل شدنی 1٪ (Sigma S-2630) ژلاتینه شده در آب (15 دقیقه، 100 درجه، ترکیب مداوم)، 0.5 ml از بافر فسفات 0.1 M (pH 4.8 یا 4.5) و نمونه ی 0.5 ml از آنزیم خام با هم ترکیب شده و برای سه دقیقه در دمای 45 یا 55 نگه داشته شدند. گلوکز آزاد شده بوسیله ی کیت های پیروکسیداز اکسیداز از EL NASR (BIO-ADWIC) PHARMACEUTICAL CHEMICALS CO (مصر) اندازه گرفته شد. فعالیت های آمالیزهای بتا یا گاما از مقدار کاهش یافته ی شکر تولید شده با فرمول توصیه شده توسط حق و همکاران (2003) و کارنوال و نیگام (2013) اندازه گرفته شد.

U ML-1 = (مقدار شکر کاهش یافته x عامل انبساط) / (MW x1000 گلوکز (180.2) x زمان X حجم آنزیم). یک واحد (U) از آمالیزهای بتا و گاما مقدار آنزیمی ست که 1 μmole گلوکز را در یک دقیقه آزاد می کند.

محاسبه ی پارامترها

میزان رشد خاص (μ) (h-1) و زمان دوبرابر (td) (h)، ضریب تقویت (MR) و تعداد نسل ها (N) با استفاده از معادلات زیر مطابق دوئل (1975) محاسبه شد. فرمول های زیر برای محاسبه ی این پارامترها به کار رفتند:

میزان رشد خاص در هر ساعت: $(\mu) = (1n X - 1n X_0) (t-t_0)^{-1}$ ، زمان دوبرابر شده $(td) = 1n_2(\mu)^{-1}$ ، ضریب

تقویت $(MR) = 1(td)^{-1}$ و تعداد نسل ها $(N) = (t-t_0) (td)^{-1}$

میزان آبکافت نشاسته (SHR) با استفاده از معادله ی زیر محاسبه شد:

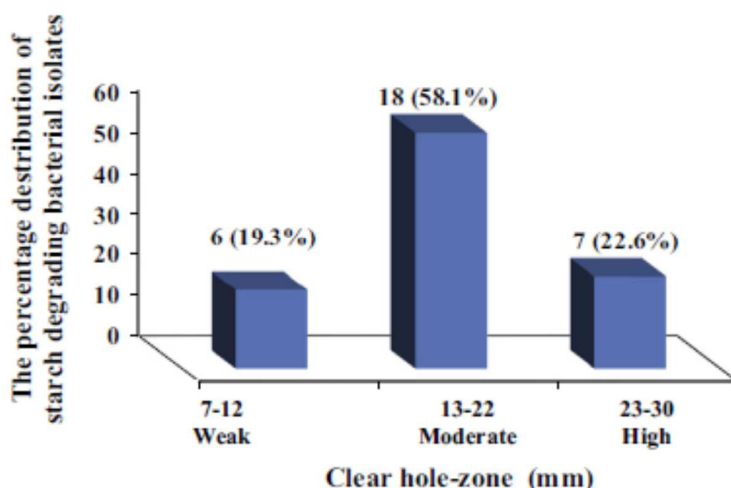
$SHR = \text{قطر ناحیه ی هاله ای (mm)} / \text{قطر رشد کولونی (mm)}$ (تیپسوامی و همکاران، 2006، بهادر و همکاران، 2010).

داده های جمع آوری شده به صورت آماری با استفاده از نرم افزار IBM SPSS (2011) و ضریب رابطه ی متقابل آنها با مایکروسافت آفیس اکسل 2013 بررسی شد.

نتایج و بحث

ایزوله و انتخاب باکتری شکننده ی نشاسته

بین 133 ایزوله ی باکتریایی 31 مورد آمیلولیتیک بوده و می شد آنها را بر اساس میزان آبکافت نشاسته به سه دسته (زیاد، متوسط، ضعیف) تقسیم کرد. شکل 1 درصد توزیع آنها که به عنوان قطر ناحیه ی شفاف (mm) بیان شده است را نشان می دهد. 31 ایزوله ی آمیلولیتیک را نیز توانستیم بر اساس دمای رشد بهینه به دو نوع تقسیم کنیم. ده ایزوله مسوفیلیک بوده و 31 ایزوله در دمای 50-60 درجه بهتر از دمای 30 درجه رشد داشتند.



شکل 1. درصد توزیع ایزوله های باکتریایی شکننده ی نشاسته در سه دسته ای که قطر ناحیه ی آبکافت را نشان می دهد (mm).

تمامی ایزوله های قبلی از لحاظ قابلیت تولید آمالیز روی محیط کشت (2)، پس از 48 ساعت در دمای مناسب خود تحت بررسی کمی و کیفی قرار گرفتند. داده های شکل 2 (A) و (B) به وضوح نشان می دهند که فعالیت آمالیز a و SHR (میزان آبکافت نشاسته) از 1.03 تا 1.51 و 12.1 تا 31.3 U ml-1 برای ایزوله های مسوفیلیک در دمای سی درجه، و 2.5-1.07 و 15-72.5 U ml-1 برای ایزوله های ایزوله های ترموفیلیک در دمای 50 درجه متفاوت بود. تحلیل آماری (تحلیل واریانس و میانگین تفاوت توسط دانکان) داده های شکل 2 (A) و (B) نشان داد که ایزوله ی E109 با U ml-1 72.5 در دمای 50 درجه بیشترین قابلیت را داشته در حالی که مقدار برای ایزوله ی E20 با U ml-1 31.3 برابر بود. از تمامی داده های پیشین می توان نتیجه گرفت که E109 پیشگام بوده است زیرا مقدار 2.33 – fold U ml-1 و 1.7-fold SHR را در مقایسه با ایزوله ی مسوفیلیک به دست داد. بنابراین ایزوله ی E109 برای مطالعات بعدی به عنوان یک ایزوله ی فعال ترموفیلیک کنار گذاشته شد.

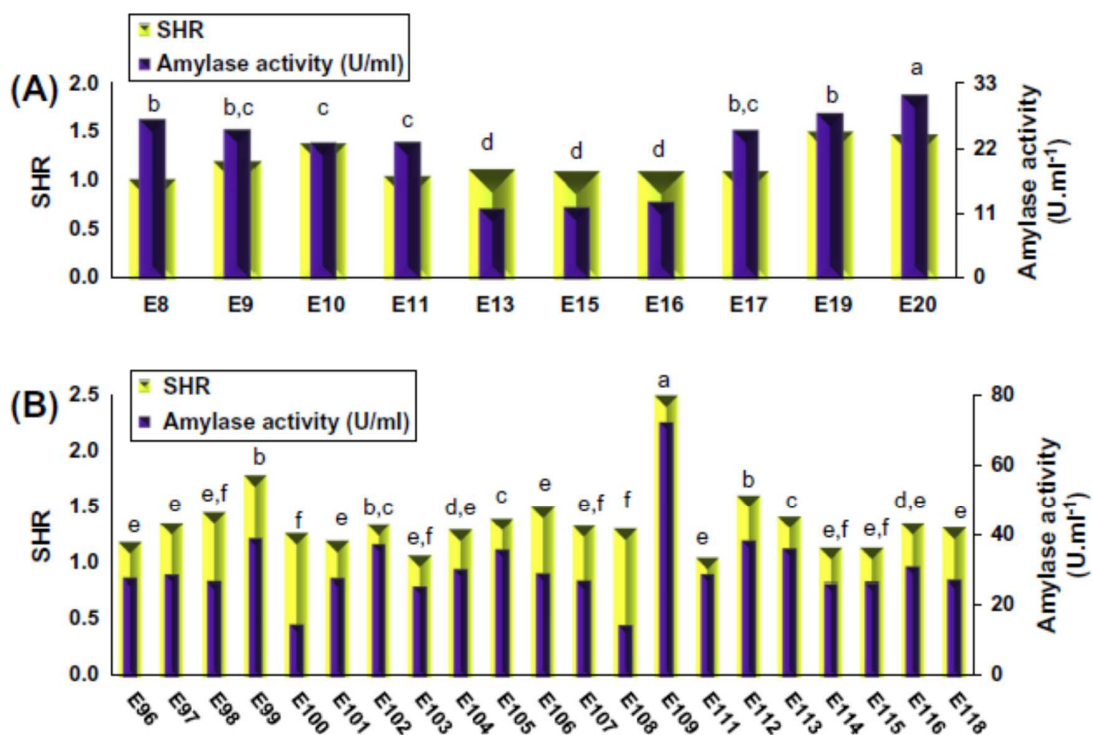
واسیکاران و همکاران (2010) گزارش داد که بیشترین میزان شکنندگی نشاسته از 3.4 تا 4 برای ایزوله های مورد آزمایش متفاوت بوده در حالی که آلکاندو و ابراهیم (2011) اظهار داشتند که میزان شکنندگی نشاسته توسط B. licheniformis در مقایسه با دیگر نمونه های باکتریایی مورد آزمایش 1.5 بوده است.

طبق گزارش رسولی و همکاران (2008) میکروارگانیسم های ترموفیلیک قادر بودند آنزیم مقاوم در برابر حرارت را تولید کنند. این قابلیت ها ممکن است به دلیل تغییرات مولکولی آنها در درجه ی سلولی و زیرسلولی بوجود آمده باشد. واسیکاران و همکاران (2010) و پاندا و همکاران (2013) سه شاخه از خاک دریافت کننده ی ضایعات نانوائی را ایزوله کردند که بیشترین فعالیت آمالیز a را در دمای 90 درجه نشان داد. جوگزیایی و همکاران (2011) مشاهده کردند که فعالیت آمالیزها برای B. subtilis در دمای 40 درجه به حداکثر خود می رسد.

شناسایی قدرتمندترین ایزوله

ویژگی های فنوتیپ

ایزوله‌ی منتخب بر اساس محیط کشت، ویژگی‌های مورفولوژیک و بیوشیمیایی خود بر اساس دستورالعمل باکتریولوژی سیستماتیک ویرایش دوم طبق نیال و پل (2009) شناسایی شد.



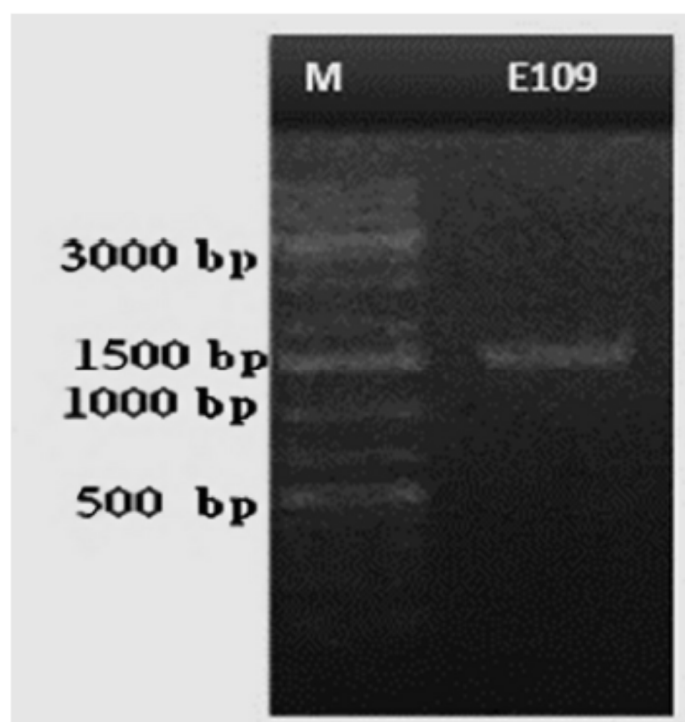
شکل 2. میزان آبکافت نشاسته و فعالیت آمالیزها $U\ ml^{-1}$ بدست آمده با باکتری‌های متفاوت ایزوله شده از ذرت مصری کشت شده به مدت 48 ساعت به عنوان تخمین کمی و کیفی در (A) 30 درجه، (B) 50 درجه. مقادیر در یک ستون (با حروف در ترتیب الفبایی) که یک حرف مشترک دارند بر اساس دانکان (1955) تفاوت چندانی نداشته‌اند. مقادیر با حروف بدون ترتیب الفبایی طبق دانکان (1955) در درجه‌ی 5٪ قابل توجه بوده‌اند. ایزوله‌ی E109 گرم مثبت، میله‌ای شکل، قادر به جنبش، باکتری تولیدکننده‌ی هاگ، هوازی و مثبت برای کاتالیز، آبکافت نشاسته، آبکافت کاسئین، آبکافت ژلاتین، سوخت سیترات بوده در حالی که نتایج منفی برای کاهش نیترات و Voges-Proskauer به دست می‌دهد. ویژگی‌های ابتدایی نشان می‌دهند که E109 در واقع *B. amyloliquefaciens* بوده است.

ویژگی‌های ژنوتیپ و درخت فیلوژنتیک

شناسایی و دسته بندی مولکولی بر اساس تحلیل ترتیبی 16S rDNA برای شناسایی درست نمونه ی میکروبی و سپس تشخیص ویژگی های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی به علت دشواری و زمان بر بودن اهمیت دارد (پورانی و همکاران، 2009). بنابراین قدرتمندترین ایزوله (E109) با قابلیت بالای شکنندگی نشاسته انتخاب شده و شناسایی با استفاده از تحلیل ترتیبی 16S rDNA را تایید می کند. DNA ژنومیک برای این ایزوله با استفاده از تکثیر PCR از ژن 16S rRNA تکثیر شد. نتایج تکثیر کافی را نشان دادند، همچنین یک رشته ی 1500 bp تکثیر DNA نیز مشاهده شد (شکل 3).

تحلیل ژن 16S rRNA از *B. amyloliquefaciens* (E109) با استر R1 در جهت مخالف ترتیب دهی شده و 1223 bp را تولید کرد. نتایج ترتیب PCR با نتایج باکتری ترتیب داده شده در مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) در پایگاه داده های Gene Bank و Ribosomal Database Project (RDP) مقایسه شده و شباهتی میان ترتیب های استخراج شده با برخی ترتیبات rDNA کوچک 16S از دیگر باکتری ها یافت شد.

درخت فیلوژنتیک با استفاده از ترتیبات بدست آمده طراحی شد. ترتیبات بدست آمده از BLASTN (یاخته ی نوکلئوتید) در فرمت FASTA بدست آمده و رابطه ی بین هر ترتیب با استفاده از تنظیم ترتیبات چندگانه با نرم افزار الگوریتم CLUSTAL شناخته شد. این درخت با استفاده از روش اتصال همجوار (NJ)، یک الگوریتم فاصله ای از تحلیل فیلوژنتیک ایجاد شد. ایزوله ی باکتریایی (E109) جدا شد. بر اساس تحلیل ژن 16S rRNA ایزوله ی E109 در گروه ژنی *Bacillus* قرار گرفت. ترتیب E109 بیشتر از همه با شباهت 95 درصدی به *B. amyloliquefaciens* ارتباط داشت (شکل 4).



شکل 3. محصولات PCR برای ژن 16S با ایزوله ی باکتریایی E109

M: 1 kbp DNA ladder

تأثیر زیرلایه های نشاسته ای بر تولید آمالیز به وسیله ی *B. amyloliquefancies* در دمای 50 درجه با تخمیر

مستغرق

بیوسنتز آمالیزها بر ضایعات صنعتی کشاورزی به عنوان مواد نشاسته ای برای حل مشکلات آلودگی و دستیابی به واسطه ای ارزان قیمت صورت گرفت (حق و همکاران، 2005، آنتو و همکاران، 2006، موخرجی و همکاران، 2009). به منظور بررسی ضایعات مختلف صنعتی کشاورزی به عنوان منابع کربن مانند چوب ذرت، نشاسته ی ذرت، باقیمانده ی نشاسته ی سیب زمینی، سبوس برنجف برنج شکسته، پوسته ی برنج، ساقه ی برنج، سبوس گندم و ساقه ی گندم، بر رشد و فعالیت آمالیزهای تولید شده توسط *B. amyloliquefaciens* در نوبت های زمانی مختلف، با محیط کشت پایه و جایگزینی نشاسته ی حل شدنی (کنترل 1٪) انجام شد. نتایج شکل 5A به وضوح نشان می دهد که *B. amyloliquefaciens* در طول اولین 36 ساعت دوره های تخمیر بر نشاسته ی حل شدنی، باقیمانده ی نشاسته

ی سیب زمینی، نشاسته ی ذرت و برنج شکسته رشد کرد در حالی که این مدت برای سبوس گندم، ساقه ی گندم، سبوس برنج، پوسته ی برنج، ساقه ی برنج و چوب ذرت 48 ساعت بوده است.

داده های جدول 1 که در تصویر 5A هم آمده اند نشان می دهند که بیشترین مقدار وزن خشک سلول با B. amyloliquefaciens بر باقیمانده ی نشاسته ی سیب زمینی (0.72 g l⁻¹)، نشاسته ی ذرت (0.62 g l⁻¹)، بعد از 36 ساعت تخمیر ثبت شده است. کمترین مقادیر زیست توده در محیط کشت سبوس گندم و یا چوب ذرت در مقایسه با دیگر منابع کربن آزمایش شده مشاهده شد.

داده ها همچنین نشان داد که پارامترهای رشد (میزان رشد خاص (μ))، زمان دوبرابر (td)، میزان تکثیر (MR)، و تعداد نسل ها (N)، در منحنی رشد B. amyloliquefaciens بر اساس محیط کشت 2 غنی شده با منابع کربن مختلف محاسبه شد. میزان رشد خاص (میزان رشد خاص (μ))، زمان دوبرابر (td)، میزان تکثیر (MR)، و تعداد نسل ها (N) برای تمامی منابع کربن آزمایش شده همانطور که در شکل 5B نشان داده شده است، برابر بود با: 0.0044-0.084 h⁻¹، 0.06-0.12، 8.3-15.8 h، و 2.0-2.8. حداکثر مقدار μ ، MR و N را در محیط کشت غنی شده با باقیمانده ی نشاسته ی سیب زمینی (0.084 h⁻¹، 0.12 & 2.6) و برنج شکسته (0.083 h⁻¹، 0.12 & 2.8) به دست داد. همچنین کمترین زمان دوبرابر برای باقیمانده ی نشاسته ی سیب زمینی (8.3 h) و برنج شکسته (8.5 h) ثبت شد.

فعالیت های آمالیزهای a و B برای B. amyloliquefaciens به تدریج در طول دوره های تخمیر افزایش یافته و بعد از 30 & 30 و 36 ساعت روی محیط کشت غنی شده با باقیمانده ی نشاسته ی سیب زمینی و برنج شکسته به اوج خود رسید که در اولی برابر با 98.4 & 0.52 و 1.6 U ml⁻¹ و در دومی برابر با 93.4 & 0.24 و 0.61 U ml⁻¹ می باشد (جدول 1). فعالیت آنزیم های مشاهده شده در محیط کشت غنی شده با چوب ذرت یا سبوس گندم 67.7% یا 65.5% از فعالیت آمالیز a خود را از دست داد، در حالی که این کاهش برای فعالیت آمالیز B، 82.7% یا 98.1% و برای فعالیت آمالیز y، 87.5% یا 97.5% بود، کاهش قابل توجه فعالیت آنزیم ها می تواند به علت ضخامت محیط کشت تخمیر برای سبوس گندم بوده باشد که منجر به کاهش هوادهی نمونه می شود که برای رشد و

فعالیت آنزیم‌ها امری اساسی است (ساتیناریانا و همکاران، 2004)، همچنین چوب ذرت منبع کربن مناسبی نبوده و دلیل آن می‌تواند این باشد که نشاسته‌ی آن برای فعالیت آمالیزها بسیار کم و ناچیز بوده است (مویرا و همکاران، 2004).

این نتایج با یافته‌های بسیاری از تحقیقات همخوانی داشته که نشان می‌دهد نشاسته‌های طبیعی مانند نشاسته‌ی ذرت، نشاسته‌ی سیب زمینی، و نشاسته‌ی برنج بهترین منابع کربن برای فعالیت آمالیز a می‌باشند (شیگچی و همکاران، 2004، یانگ و لیو، 2004، کونامنی و همکاران، 2005، نجفی و دیوباگا، 2005). کام و کام (2004) نیز اظهار داشتند که نشاسته‌ی سیب زمینی و برنج زیرلایه‌های مناسبی برای تولید آمالیزها با *Bacillus* بوده‌اند. کومارایی و همکاران (2011) به نتایج مشابهی دست یافتند که نشان می‌دهد فعالیت و رشد آمالیزها در کاربرد نشاسته‌ی ذرت و بعد از آن نشاسته‌ی سیب زمینی به عنوان منبع کربن بالا بوده است.

RNA 16S ریبوزومی، توالی نسبی

RNA 16S 102428 ریبوزومی، توالی نسبی

RNA 16S 5391 DSM ریبوزومی، توالی نسبی

رشته‌ی RNA 16S MB-9 ریبوزومی، توالی نسبی

رشته‌ی RNA 16S azotifigens 24KS-1 ریبوزومی، توالی نسبی

رشته‌ی RNA 16S PN5 cecembensis ریبوزومی، توالی کامل

رشته‌ی RNA 16S ge14 *Bacillus ginsengi* ریبوزومی، توالی نسبی

رشته‌ی RNA 16S *Bacillus amyloliquefaciens* NRRL B-14393 ریبوزومی، توالی نسبی

رشته‌ی RNA 16S *Bacillus amyloliquefaciens* BCRC 11601 ریبوزومی، توالی نسبی

رشته‌ی RNA 16S *Bacillus myloliuefaciens* NBRC 15535 ریبوزومی، توالی نسبی

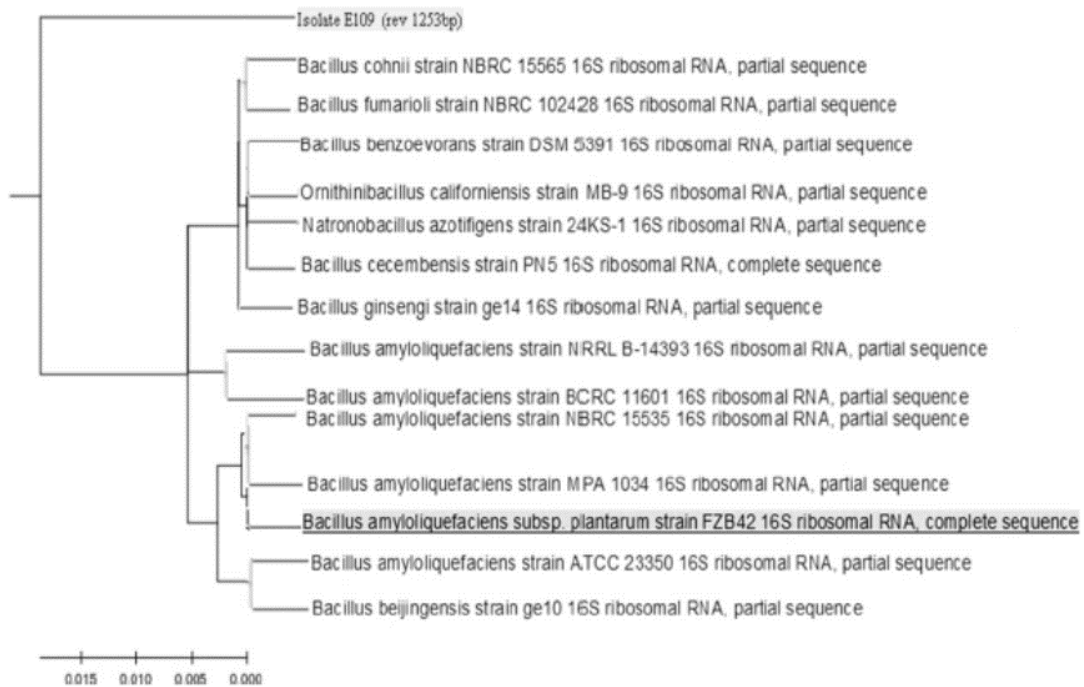
رشته‌ی RNA 16S *Bacillus myloliuefaciens* MPA 1034 ریبوزومی، توالی نسبی

رشته ی *Bacillus myloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42 رشته ی RNA *plantarum* FZB42 ریبوزومی 16S،

توالی کامل

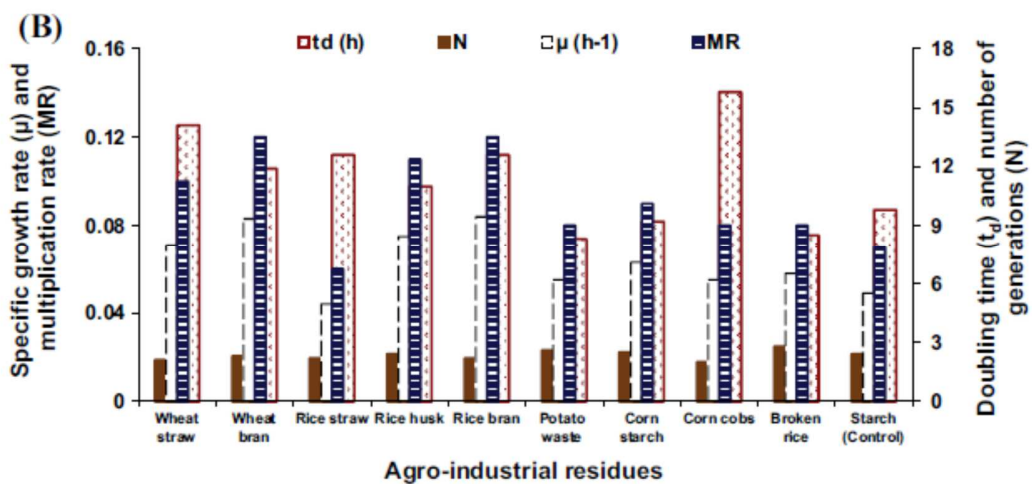
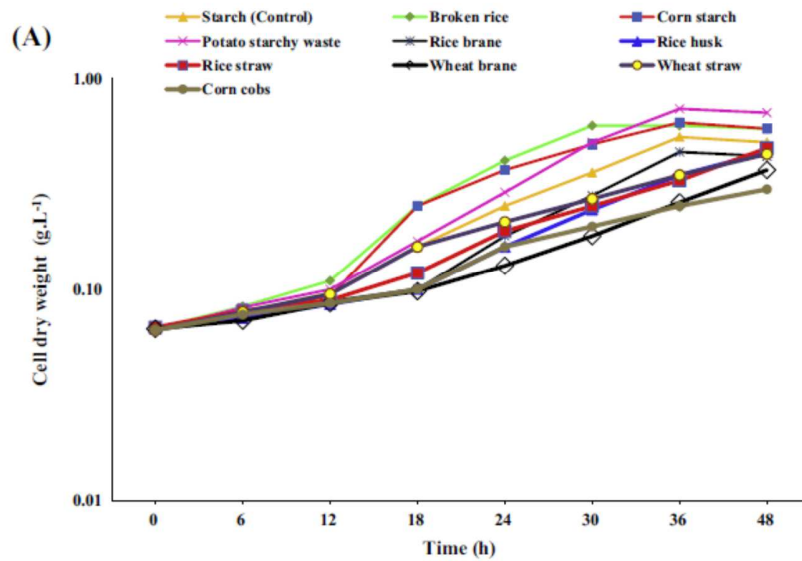
رشته ی *Bacillus myloliquefaciens* ATCC 23350 ریبوزومی 16S، توالی نسبی

رشته ی *Bacillus myloliquefaciens* ge10 ریبوزومی 16S، توالی نسبی



شکل 4. درخت اتصال همجوار بر اساس توالی های 16S rRNA ژن *Bacillus* بدست آمده از جستجوی BLAST

نشان دهنده ی موقعیت ایزوله و رشته های مربوطه



شکل 5. الگوهای رشد *B. amyloliquefaciens* تحت تاثیر منابع مختلف کربن در طول 48 ساعت در دمای 50 درجه با استفاده از محفظه های لرزان به عنوان محیط دسته ای. (A) منحنی رشد حلقوی (B) پارامترهای رشد عموماً می توان گفت که محیط کشت غنی شده با باقیمانده ی نشاسته ی سیب زمینی به عنوان تنها منبع کربن می تواند از نشاسته ی حل شدنی به عنوان کنترل برای فعالیت های آمالیز a و B مناسب تر باشد زیرا آنزیم های تولید شده با *B. myloliwuefaciens* را به صورت 4 & 1.26 و 8-fold افزایش می دهد.

Starch substrates	Time (h)	CDW (g ⁻¹)	Enzyme activity (U ml ⁻¹)			Starch substrates	Time (h)	CDW (g ⁻¹)	Enzyme activity (U ml ⁻¹)		
			α	β	γ				α	β	γ
Soluble starch (control)	0	0.07 ^d	0.00 ^{nm}	0.000 ^d	0.000 ^d	Rice bran	0	0.07 ^{h,j}	0.00 ^{nm}	0.000 ^d	0.000 ^d
	6	0.08 ^d	7.20 ^{kl}	0.021 ^{kl}	0.009 ^d	6	0.07 ^{h,j}	3.25 ^{nm}	0.002 ^d	0.003 ^d	
	12	0.10 ^d	12.9 ^{kl}	0.051 ^l	0.015 ^d	12	0.09 ^{h,j}	7.63 ^{kl}	0.002 ^d	0.003 ^d	
	18	0.16 ^{h,i}	24.9 ^{kl}	0.075 ^l	0.050 ^d	18	0.10 ^{h,j}	12.3 ^{kl}	0.003 ^d	0.006 ^d	
	24	0.25 ^{h,i}	36.4 ^{kl}	0.098 ^l	0.088 ^{kl}	24	0.13 ^{h,j}	19.1 ^{kl}	0.005 ^d	0.011 ^{kl}	
	30	0.36 ^{h,i}	52.1 ^{kl}	0.130 ^l	0.131 ^{kl}	30	0.18 ^{h,j}	25.1 ^{kl}	0.008 ^d	0.022 ^{kl}	
	36	0.53 ^{h,i}	78.2 ^{kl}	0.126 ^l	0.200 ^{kl}	36	0.26 ^{h,k}	33.9 ^{kl}	0.010 ^d	0.040 ^{kl}	
48	0.50 ^{h,i}	72.3 ^{kl}	0.116 ^l	0.176 ^{kl}	48	0.37 ^{h,k}	23.1 ^{kl}	0.009 ^d	0.034 ^{kl}		
Broken rice	0	0.07 ^d	0.00 ^{nm}	0.000 ^d	0.000 ^d	Rice husk	0	0.07 ^{h,j}	0.00 ^{nm}	0.000 ^d	0.000 ^d
	6	0.08 ^d	15.0 ^{kl}	0.010 ^h	0.070 ^{kl}	6	0.07 ^{h,j}	3.80 ^{nm}	0.004 ^d	0.005 ^d	
	12	0.11 ^d	23.7 ^{kl}	0.030 ^{kl}	0.150 ^{kl}	12	0.09 ^{h,j}	8.20 ^{kl}	0.007 ^d	0.007 ^d	
	18	0.25 ^{h,i}	36.8 ^{kl}	0.050 ^l	0.220 ^{kl}	18	0.10 ^{h,j}	17.9 ^{kl}	0.010 ^d	0.012 ^{kl}	
	24	0.41 ^{h,i}	50.1 ^{kl}	0.150 ^l	0.350 ^{kl}	24	0.16 ^{h,j}	27.8 ^{kl}	0.016 ^d	0.029 ^{kl}	
	30	0.55 ^{h,i}	93.4 ^{kl}	0.240 ^l	0.480 ^{kl}	30	0.24 ^{h,k}	42.2 ^{kl}	0.020 ^d	0.039 ^{kl}	
	36	0.60 ^l	88.1 ^{kl}	0.230 ^l	0.610 ^{kl}	36	0.35 ^{h,k}	66.2 ^{kl}	0.019 ^d	0.060 ^{kl}	
48	0.58 ^{h,i}	79.7 ^{kl}	0.230 ^l	0.570 ^{kl}	48	0.45 ^{h,k}	54.4 ^{kl}	0.017 ^d	0.052 ^{kl}		
Corn-cobs	0	0.06 ^d	0.00 ^{nm}	0.000 ^d	0.000 ^d	Rice straw	0	0.07 ^{h,j}	0.00 ^{nm}	0.000 ^d	0.000 ^d
	6	0.08 ^d	3.10 ^{nm}	0.006 ^d	0.010 ^l	6	0.08 ^{h,j}	5.60 ^{kl}	0.004 ^d	0.019 ^{kl}	
	12	0.09 ^d	6.19 ^{kl}	0.011 ^h	0.019 ^{kl}	12	0.09 ^{h,j}	10.8 ^{kl}	0.006 ^d	0.031 ^{kl}	
	18	0.10 ^d	11.3 ^{kl}	0.020 ^{kl}	0.053 ^{kl}	18	0.12 ^{h,j}	17.3 ^{kl}	0.013 ^d	0.056 ^{kl}	
	24	0.16 ^{h,i}	17.9 ^{kl}	0.039 ^{kl}	0.091 ^{kl}	24	0.19 ^{h,j}	27.4 ^{kl}	0.022 ^d	0.072 ^{kl}	
	30	0.20 ^{h,i}	23.8 ^{kl}	0.064 ^l	0.131 ^{kl}	30	0.25 ^{h,k}	47.1 ^{kl}	0.032 ^d	0.095 ^{kl}	
	36	0.29 ^{h,i}	31.8 ^{kl}	0.090 ^l	0.200 ^{kl}	36	0.33 ^{h,k}	70.6 ^{kl}	0.050 ^d	0.140 ^{kl}	
48	0.30 ^{h,i}	20.8 ^d	0.082 ^l	0.182 ^d	48	0.47 ^{h,k}	60.4 ^{kl}	0.045 ^d	0.128 ^{kl}		
Coen starch	0	0.07 ^d	0.00 ^{nm}	0.000 ^d	0.000 ^d	Wheat bran	0	0.07 ^{h,j}	0.00 ^{nm}	0.000 ^d	0.000 ^d
	6	0.08 ^d	4.80 ^{kl}	0.010 ^h	0.040 ^{kl}	6	0.07 ^{h,j}	3.25 ^{nm}	0.002 ^d	0.003 ^d	
	12	0.09 ^d	11.0 ^{kl}	0.020 ^{kl}	0.050 ^{kl}	12	0.09 ^{h,j}	7.63 ^{kl}	0.002 ^d	0.003 ^d	
	18	0.25 ^{h,i}	29.2 ^{kl}	0.040 ^{kl}	0.070 ^{kl}	18	0.10 ^{h,j}	12.3 ^{kl}	0.003 ^d	0.006 ^{kl}	
	24	0.37 ^{h,i}	50.1 ^{kl}	0.060 ^l	0.130 ^{kl}	24	0.13 ^{h,j}	19.1 ^{kl}	0.005 ^d	0.011 ^{kl}	
	30	0.49 ^{h,i}	89.5 ^{kl}	0.110 ^l	0.170 ^{kl}	30	0.18 ^{h,j}	25.1 ^{kl}	0.008 ^d	0.022 ^{kl}	
	36	0.62 ^l	80.2 ^{kl}	0.100 ^l	0.250 ^{kl}	36	0.26 ^{h,k}	33.9 ^{kl}	0.010 ^d	0.040 ^{kl}	
48	0.58 ^{h,i}	71.2 ^{kl}	0.090 ^l	0.220 ^{kl}	48	0.37 ^{h,k}	23.1 ^{kl}	0.009 ^d	0.034 ^{kl}		
Potato starch/water	0	0.06 ^d	0.00 ^{nm}	0.000 ^d	0.000 ^d	Wheat straw	0	0.06 ^d	0.00 ^{nm}	0.000 ^d	0.000 ^d
	6	0.08 ^d	11.6 ^{kl}	0.040 ^{kl}	0.096 ^{kl}	6	0.08 ^{h,j}	4.19 ^{kl}	0.002 ^d	0.003 ^d	
	12	0.10 ^d	25.8 ^{kl}	0.080 ^{kl}	0.363 ^{kl}	12	0.10 ^{h,j}	14.6 ^{kl}	0.005 ^d	0.006 ^{kl}	
	18	0.17 ^{h,i}	40.6 ^{kl}	0.140 ^{kl}	0.523 ^{kl}	18	0.16 ^{h,j}	26.6 ^{kl}	0.007 ^d	0.015 ^{kl}	
	24	0.29 ^{h,i}	66.3 ^{kl}	0.305 ^h	0.881 ^{kl}	24	0.21 ^{h,j}	35.6 ^{kl}	0.010 ^d	0.042 ^{kl}	
	30	0.50 ^{h,i}	94.4 ^{kl}	0.520 ^l	1.265 ^{kl}	30	0.27 ^{h,k}	51.3 ^{kl}	0.022 ^d	0.065 ^{kl}	
	36	0.72 ^l	94.4 ^{kl}	0.505 ^l	1.600 ^{kl}	36	0.35 ^{h,k}	70.3 ^{kl}	0.040 ^d	0.090 ^{kl}	
48	0.69 ^{h,i}	80.1 ^{kl}	0.484 ^l	1.452 ^{kl}	48	0.44 ^{h,k}	61.7 ^{kl}	0.032 ^d	0.080 ^{kl}		

CDW = cell dry weight.
Values in the same column followed by the same letter do not significantly differ from each other, according to Duncan (1955) at 5% level.

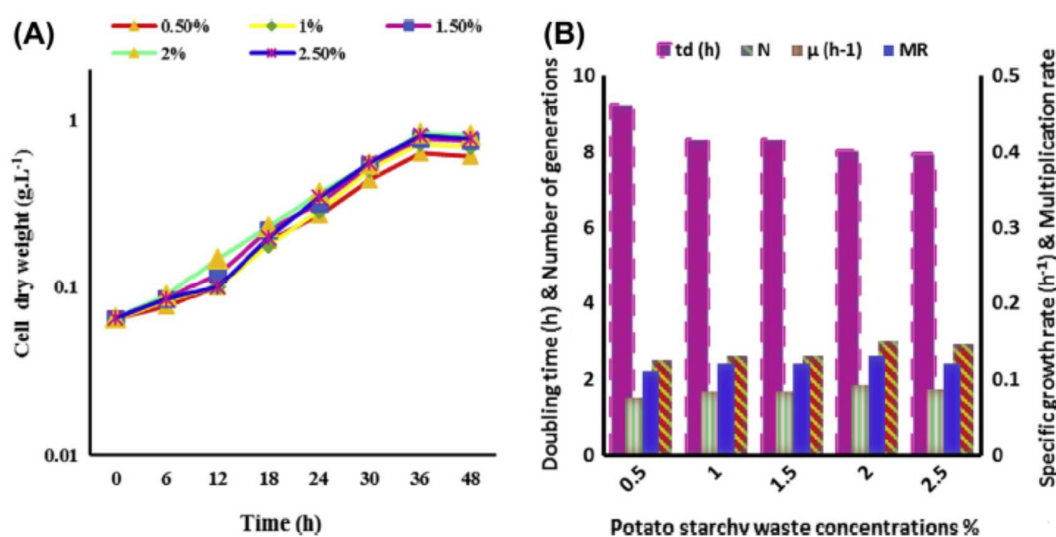
جدول 1- تاثیر باقیمانده های کشاورزی-صنعتی مانند نشاسته ی سیب زمینی بر رشد و آمالیز B. amyloliquefaciens بر med.2 در طی 48 ساعت با استفاده از فلاسک های لرزشی و محیط پیچ

تراکامات باقیمانده ی نشاسته ی سیب زمینی

پنج تراکم باقیمانده ی نشاسته ی سیب زمینی از 0.5٪ تا 2.5٪ برای فعالیت آمالیز توسط رشته ی مورد آزمایش به کار گرفته شد. داده های نمایش داده شده در شکل 6(A) و (B) به وضوح نشان می دهند که B. amyloliquefaciens در طول 36 ساعت در محیط کشت شامل تراکامات باقیمانده ی نشاسته ی سیب زمینی از 0.5٪ تا 2.5٪ رشد کرده است. بیشترین مقدار رشد (0.84 g l^{-1}) از وزن خشک سلول) در باقیمانده ی نشاسته ی سیب زمینی 2٪ بعد از 36 ساعت دوره ی تخمیر ثبت شد که در مقایسه با نتیجه ی باقیمانده ی نشاسته ی سیب زمینی 1٪ (کنترل)، 16.6٪ افزایش داشت. بیشترین مقدار رشد خاص (μ)، میزان تکثیر (MR) و تعداد نسل ها (N) برابر بودند با 0.092 ، 0.13 و 3 . کمترین مقدار زمان دوبرابر (td) بعد از 8 ساعت به دست آمد.

همچنین داده های جدول 2 به وضوح نشان می دهند که افزایشی تدریجی در فعالیت آمالیزها توسط رشته ی مورد آزمایش با افزایش تراکمت باقیمانده ی نشاسته ی سیب زمینی از 1.5% به 2.5% رخ داد که در 2% به حداکثر رشد و فعالیت آمالیزها رسید. بدین ترتیب حداکثر مقادیر فعالیت آمالیزهای a, B, و y بعد از 30 و 30 & 36 ساعت دوره ی تخمیر، به ترتیب 1.0، 155.2 و 2.4 ml-1 U بدست آمد.

تحلیل آماری نشان داد که ضریب رابطه ی متقابل مثبتی (r^2) بین تراکمت باقیمانده ی نشاسته ی سیب زمینی و هر کدام از فعالیت های آنزیم وزن خشک سلول (آمالیزهای a, B و y) وجود دارد.



شکل 6. الگوهای رشد *B. myloliuefaciens* تحت تاثیر تراکمت مختلف باقیمانده ی نشاسته ی سیب زمینی در طول 48 ساعت و در دمای 50 درجه با استفاده از محفظه های لرزان به عنوان نمونه ی کشت دسته ای. (A) منحنی رشد حلقوی (B) پارامترهای رشد

PSW conc.(%)	Time (h)	C.D.W (gl ⁻¹)	Enzyme activity (U ml ⁻¹)			PSW conc. (%)	Time (h)	C.D.W (gl ⁻¹)	Enzyme activity (U ml ⁻¹)		
			α	β	γ				α	β	γ
0.5	0	0.07 ^g	0.00 ⁿ	0.00 ⁱ	0.00 ^h	1.5	24	0.32 ^d	75.80 ^{e,f}	0.526 ^d	0.970 ^d
	6	0.08 ^g	5.21 ⁿ	0.048 ⁱ	0.079 ^{g,h}		30	0.54 ^c	133.8 ^{b,c}	0.750 ^c	1.206 ^c
	12	0.10 ^{f,g}	15.8 ^{m,n}	0.094 ^{h,i}	0.217 ^g		36	0.78 ^a	125.9 ^c	0.739 ^c	1.800 ^b
	18	0.19 ^e	28.6 ^{l,m}	0.118 ^g	0.333 ^{f,g}		48	0.76 ^a	120.9 ^c	0.678 ^c	1.765 ^b
	24	0.27 ^e	47.6 ^{i,j}	0.257 ^f	0.468 ^{e,f}						
	30	0.44 ^d	77.6 ^{e,f}	0.410 ^e	0.784 ^c						
	36	0.63 ^b	72.6 ^{f,g}	0.373 ^e	1.000 ^d						
1.0	0	0.06 ^g	0.00 ⁿ	0.00 ⁱ	0.00 ^h	2.0	0	0.07 ^g	0.000 ⁿ	0.000 ⁱ	0.000 ^h
	6	0.08 ^g	11.7 ^{m,n}	0.040 ⁱ	0.096 ^{g,h}		6	0.09 ^{f,g}	20.70 ^{m,n}	0.098 ^{h,i}	0.251 ^g
	12	0.10 ^{f,g}	25.8 ^{l,m}	0.079 ^{h,i}	0.363 ^g		12	0.15 ^{f,g}	43.50 ^{i,k}	0.178 ^g	0.505 ^{e,f}
	18	0.18 ^e	40.5 ^{j,k}	0.140 ^g	0.523 ^{e,f}		18	0.23 ^e	71.80 ^{f,g}	0.327 ^e	0.815 ^d
	24	0.29 ^e	66.5 ^{g,h}	0.305 ^e	0.881 ^d		24	0.37 ^d	98.30 ^d	0.696 ^c	1.304 ^{b,c}
	30	0.51 ^c	98.4 ^d	0.520 ^d	1.265 ^c		30	0.55 ^c	155.2 ^a	1.000 ^a	1.749 ^b
	36	0.72 ^b	94.1 ^d	0.505 ^d	1.600 ^b		36	0.84 ^a	149.2 ^b	0.969 ^a	2.400 ^a
1.5	0	0.07 ^g	0.00 ⁿ	0.00 ⁱ	0.00 ^h	2.5	0	0.07 ^g	0.000 ⁿ	0.000 ⁱ	0.000 ^h
	6	0.09 ^{f,g}	15.50 ^{m,n}	0.149 ^g	0.268 ^g		6	0.09 ^{f,g}	17.10 ^{m,n}	0.124 ^g	0.178 ^{g,h}
	12	0.12 ^{f,g}	30.20 ^{l,m}	0.249 ^f	0.459 ^{e,f}		12	0.10 ^{f,g}	38.20 ^k	0.224 ^f	0.284 ^g
	18	0.22 ^c	45.70 ^j	0.348 ^e	0.616 ^c		18	0.20 ^e	65.70 ^{g,h}	0.355 ^e	0.471 ^{e,f}
							24	0.35 ^d	88.98 ^{d,e}	0.529 ^d	0.706 ^{d,e}
							30	0.56 ^c	149.0 ^b	0.900 ^b	1.252 ^c
							36	0.81 ^a	140.9 ^b	0.842 ^b	2.100 ^a
					48	0.78 ^a	129.9 ^c	0.773 ^c	1.716 ^b		

PSW = potato starchy waste, CDW = cell dry weight.

Values in the same column followed by the same letter do not significantly differ from each other, according to Duncan (1955) at 5% level.

جدول 2. تاثیر تراکومات مختلف باقیمانده ی نشاسته ی سیب زمینی بر رشد *B. myloliquefaciens* در طول 48 ساعت و در دمای 50 درجه با استفاده از محفظه های لرزان به عنوان نمونه ی کشت دسته ای. مقادیر r2 از 0.87 تا 0.95 متفاوت بوده اند. بعلاوه تاثیر قابل توجه بر رشد باکتریایی و سنتز آمالیزها با رشته ی مورد آزمایش در تمامی تراکومات باقیمانده ی نشاسته ی سیب زمینی دیده شد. در مطالعاتی مشابه میشرا و بهرا (2008)، و کانیموزی و همکاران (2014) بیشترین فعالیت آنزیم برای *Bacillus* را در نشاسته ی 2.0٪ مشاهده کرده اند در حالی که بیشترین فعالیت آنزیم بوسیله ی فلورانس کاذب از 1.5٪ تا 2.5٪ نشاسته متفاوت بوده و در نشاسته ی 3.5٪ کاهش یافته است این نتیجه توسط کارنوال و نیگام (2013) گزارش شده است. بنابراین می توان گفت باقیمانده ی نشاسته ی سیب زمینی 2٪ بهترین تراکم برای رشد و فعالیت آنزیم توسط *B. myloliquefaciens* در 1.98، 7.69 و 12-fold برای فعالیت های آمالیز a، B و y در مقایسه با کنترل (1٪) می باشد.

نتیجه گیری

چندین ایزوله ی باکتریایی از خاک مصری جدا شده و قادر بودند رشد کرده و آمالیز تولید کنند. در میان این ایزوله ها E109 بیشترین فعالیت آمالیز را روی یک محیط کشت فعال غنی شده با 1٪ نشاسته در دمای 50 درجه در طول 48 ساعت با استفاده از محفظه های لرزان به عنوان نمونه کشت دسته ای تولید کند. این ایزوله به عنوان *B.*

amyloliquifaciens بر اساس آزمون های فوتیپیک شناسایی شده و مورد تایید ترتیب دهی ژن 16S rRNA قرار گرفت. تحقیق کنونی با هدف بررسی امکان استفاده از ضایعات صنعتی کشاورزی به عنوان زیرلایه های نشاسته ای در تولید آمالیز توسط رشته های مورد آزمایش در تخمیر مستغرق صورت گرفته است که می توانند نشاسته را به گلوکز هیدرولیزه کنند. برای استفاده از زیرلایه های ارزان می توان روند تولید را اقتصادی تر کرد. این رشته توانست بیشترین آمالیز a و B را بعد از 30 ساعت و آمالیز y را بعد از 36 ساعت در محیط کشتی شامل 2٪ باقیمانده ی نشاسته ی سیب زمینی تولید کند که به ترتیب با استفاده از محفظه های لرزان (rpm150) به عنوان یک روش نمونه کشت دسته ای نگهداری شدند.



این مقاله، از سری مقالات ترجمه شده رایگان سایت ترجمه فا میباشد که با فرمت PDF در اختیار شما عزیزان قرار گرفته است. در صورت تمایل میتوانید با کلیک بر روی دکمه های زیر از سایر مقالات نیز استفاده نمایید:

لیست مقالات ترجمه شده ✓

لیست مقالات ترجمه شده رایگان ✓

لیست جدیدترین مقالات انگلیسی ISI ✓

سایت ترجمه فا ؛ مرجع جدیدترین مقالات ترجمه شده از نشریات معتبر خارجی