

## Original Article

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

Mohammad Shadi<sup>1</sup> , Hamidreza Heydari<sup>2</sup> , Babak Elyasifar<sup>3</sup> , Azita Dilmaghani<sup>2\*</sup> 

<sup>1</sup>Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

<sup>2</sup>Department of Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

<sup>3</sup>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 November 2018    Accepted: 1 January 2019    First Published online: 18 November 2019  
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019;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;41(5):65-71. Persian.

## مقاله پژوهشی

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

محمد شادی<sup>۱</sup>، حمیدرضا حیدری<sup>۲</sup>، بابک الیاسی فر<sup>۳</sup>، آزیتا دیلمقانی<sup>۴\*</sup>

<sup>۱</sup>دکتری عمومی داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران  
<sup>۲</sup>گروه بیوتکنولوژی داروئی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران  
<sup>۳</sup>دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی داروئی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران  
<sup>۴</sup>نویسنده مسول: ایمیل: [dilmaghania@tbzmed.ac.ir](mailto: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.  
**روش کار:** 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 هر کدام 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 ۱۶S rRNA 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 *Bacillus* و *Virgibacillus* بودند.  
**نتیجه‌گیری:** نتایج حاصل از پژوهش نشان داد که باکتری‌های باسیلوس جدا شده 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، الیاسی فر 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 - درمانی تبریز تحت مجوز کرییتیو 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

مناطق با شوری بالا به عنوان یک نمونه از مناطق با شرایط زیست دشوار هستند که میکروارگانیسم های زنده در این مناطق توانایی زیست در رنج بالاتری از غلظت نمک را دارند (۱). کوشنر باکتری های نمکدوست را بر اساس غلظت نمک که در آن زیست می کنند به گروه های 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 مطلوب تری را در ۱۵ تا ۳۰٪ نمک طعام دارند، و موجودات غیر نمکدوست که به کمتر از ۱٪ نمک طعام نیاز دارند؛ (در حالی که اگر این میکروارگانیسم ها نیز غلظت بالای نمک را تحمل می کردند به عنوان تحمل کننده نمک در نظر گرفته می شدند) (۲).

امروزه مطالعه روی میکروارگانیسم های نمکدوست به دلیل توانایی ویژه تحمل شرایط دشوار تولید انواع متابولیت های ثانویه و تجزیه ماکرومولکول ها و پالایش زیستی اهمیت دارد. میکروارگانیسم های نمکدوست قابلیت تولید محصولات مفیدی هم چون پلی استرها (۳)، کارتینوئیدها (۴) و بیوسورفکتانت ها (۵) را دارند. همچنین از این باکتری ها در فرایندهای مفیدی هم چون تجربه ترکیبات سمی (۶) و بازیافت پساب شور (۷) می توان استفاده نمود. امروزه توجه به آنزیم های میکروارگانیسم های نمکدوست و کاربردهای زیست فناوری آنها افزایش یافته است. یکی از مهم ترین کاربردهای میکروارگانیسم های نمکدوست در تولید آنزیم های هیدرولایتیک (که توانایی انجام واکنش در شرایط سخت را دارند) می باشد. از جمله مهم ترین این آنزیم ها که کاربرد فراوانی در صنایع مختلف دارند می توان به آمیلاز، لیپاز و پکتیناز اشاره کرد. آلفا آمیلاز را می توان در میکروارگانیسم ها، 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 می شود. محصولات پایانی آمیلاز الیگوساکاریدهای با طول ۸-۶ قند می باشند که بوسیله اتصالات ۱-۴ و ۱-۶ به یکدیگر متصل شده اند. آمیلاز کاربرد بالقوه در تعداد گسترده ای از فرایندهای صنعتی مانند صنایع غذایی، تخمیر و دارویی دارد (۹).

لیپازها آنزیم هایی هستند که جزو گروه هیدرولیزها قرار می گیرند و عملکرد بیولوژیکی اصلی آنها تبدیل تری گلیسیرید نامحلول به اسیدهای چرب و گلیسرول می باشد. این آنزیم ها از جمله آنزیم های مهمی هستند که سطح قابل توجهی از فعالیت و پایداری را در هر دو محیط آبی و غیرآبی دارا می باشند تا جایی که قابلیت انجام واکنش های کاتالیزوری چندگانه مثل ترنس استریفیکاسیون و غیراستریفیکاسیون را دارند. لیپازها به طور گسترده در فرایندهای روغن و چربی، شوینده ها، فرمولاسیون

حذف مواد روغنی، صنایع غذایی، سنتزهای شیمیایی و دارویی، ساخت کاغذ، تولیدات دارویی و غیره استفاده می شود. (۱۰ و ۱۱). آنزیم پکتیناز یک گروه از آنزیم های پکتیک می باشد که توانایی شکستن پکتین موجود در بخش مرکزی دیواره سلولی را دارد. پکتینازها شامل دو گروه اسیدی و قلیایی هستند. قارچ ها و مخمرها توانایی تولید پکتیناز اسیدی را دارند و باکتری ها توانایی بالقوه ای برای تولید پکتیناز قلیایی را دارا می باشند. باکتری های جنس *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Flovobacterium*, *Xanthomonas* مهم ترین تجزیه کنندگان پکتین هستند. از فعال ترین تجزیه کنندگان پکتین باکتری های جنس *Bacillus sp.* می باشد. آنزیم پکتیناز در صنعت کاربرد زیادی دارد که از جمله آن موارد استفاده در تهیه آبمیوه ها است (۱۲ و ۱۳).

با توجه به کاربردهای تجاری آمیلاز، پکتیناز و لیپاز، سالانه هزینه های زیادی صرف واردات و خرید این آنزیم ها در کشور می گردد. تولید آنزیم از سویه های بومی نیازمند مطالعات و بررسی در مناطق مختلف ایران است. هدف این پژوهش جداسازی و شناسایی آنزیم های هیدرولایتیک آمیلاز، لیپاز و پکتیناز از باکتری های نمکدوست مربوط به فلات مرکزی ایران است.

## روش کار

نمونه برداری از اعماق ۰-۳۰ سانتی متر خاک های دو منطقه حاج علی گول و بیارجمند استان سمنان انجام گرفت. از نمونه های منتقل شده به آزمایشگاه برای جداسازی باکتری های نمکدوست، تا رقت ۶-۱۰ سری رقیق سازی شد. برای جداسازی باکتری های نمکدوست، از محیط کشت نوترینت براث (گرم در لیتر) کلریدپتاسیم ۲، کلریدکلسیم ۳٫۶، سولفات منیزیم ۷ آب ۹٫۷، نمک ۸۱ کلرید منیزیم ۶ آب ۷، برمید سدیم ۰٫۰۲۶ و بی کربنات سدیم ۰٫۰۶ استفاده شد (۱۴). نمونه های مربوطه در ۱۰۰ سی سی از محیط کشت نوترینت براث در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد در انکوباتور شیکردار با دور rpm ۱۵۰ به مدت ۷۲ ساعت گرماگذاری شدند. پس از مشاهده کدورت رشد در محیط کشت مایع نمکی، نمونه ها در محیط کشت جامد نوترینت با روش کشت خطی کشت شدند و به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند. برای بررسی تولید آنزیم آمیلاز، باکتری های نمکدوست در محیط کشت عصاره گوشت ۳ گرم بر لیتر، نشاسته محلول ۱۰ گرم بر لیتر، آگار ۱۵ گرم بر لیتر در ۱۰۰۰ سی سی آب مقطر که حاوی ۱٪ کلرید سدیم و با pH ۷/۳ بود به صورت یک خط عمود کشت داده شدند و به مدت ۷۲ ساعت در ۲۸ درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند. لازم به ذکر است که برای حفظ ترکیبات این محیط کشت دمای استریل کردن ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه در نظر گرفته شد. وجود

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 ۱۶ rRNA S باکتری‌ها با استفاده از روش PCR تکثیر قطعه ۱۶ rRNA S 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 و گونه 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 جدا شده 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 subtilis*, *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 subtilis*, *Virgibacillus halodentificans* و *Bacillus hwajinpoensis* بودند. پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه بروی خط کشت باکتری‌های نمک‌دوست در محیط کشت مخصوص تشخیص 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 subtilis* و *Halobacillus trueperi* بودند (جدول ۲).

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 سولفات‌آمونیم، ۰/۰۲ درصد سولفات‌منیزیم ۷ آب، ۰/۱ درصد مواد مغذی (۵ میلی‌گرم بر لیتر سولفات آهن ۷ آب، ۱/۶ میلی‌گرم بر لیتر سولفات منگنز یک آب، ۱/۴ میلی‌گرم بر لیتر سولفات روی ۷ آب و ۲ میلی‌گرم بر لیتر کلرید کلسیم)، ۲ درصد آگار و به همراه ۱۰ درصد کلرید سدیم 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 پیتون، ۰/۱ درصد کلرید کلسیم، ۱ درصد توتین ۸۰، ۱/۵ درصد آگار، آب مقطر و به همراه ۱۰ درصد کلرید سدیم 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 کایژن انجام گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی: ۱۰ نانوگرم بر میکرولیتر DNA، ۰/۴ میلی‌مولار dNTP، ۲ میلی‌مولار کلرید منیزیم، 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

جدول ۱: اطلاعات مقایسه توالی قطعه ژنی ۱۶ rRNA جدایه با بانک اطلاعاتی NCBI

Isolate	Bacteria	Similarity
D6A	<i>Bacillus subtilis</i>	٪۹۹
DAR	<i>Bacillus subtilis</i>	٪۹۹
A(۲)۶	<i>Halobacillus trueperi</i>	٪۹۹
NB۱	<i>Virgibacillus halodentificans</i>	٪۹۹
NB۲	<i>Virgibacillus halodentificans</i>	٪۹۹
NB۳	<i>Bacillus hwajinpoensis</i>	٪۹۹
D8B	<i>Virgibacillus olivae</i>	٪۹۹

جدول ۲: نتایج توانایی تولید آنزیم های هیدرولیتیک به وسیله باکتری های نمکدوست جداسازی شده

نمونه	نام باکتری	آمیلز	لیپاز	پکتیناز
D6A	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+
DAR	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+
A(۲) <sup>۶</sup>	<i>Halobacillus trueperi</i>	+	-	+
NB <sup>۱</sup>	<i>Virgibacillus halodentrificans</i>	-	+	-
NB <sup>۲</sup>	<i>Virgibacillus halodentrificans</i>	-	+	-
NB <sup>۳</sup>	<i>Bacillus hwajinpoensis</i>	+	+	-
D8B	<i>Virgibacillus olivae</i>	-	+	-

جدول ۳: مکان جداسازی و سویه های تولید کننده آنزیم های هیدرولیتیک

نویسندگان	مکان نمونه برداری	سویه های تولید کننده آمیلز	سویه های تولید کننده لیپاز	سویه های تولید کننده پکتیناز
کومار	دریاچه Sambhar هندوستان	، Marinobacter و Haloalkaliphilic Halobacillus	، Chromohalobacter ، Marinobacter و Haloalkaliphilic Halomonas	-
سانچز	حوضچه های شور در اسپانیا	Halomonas	Chromohalobacter و Salinivibrio	-
هونگ دنگ	اوکیناوا	، Methylococcus ، Cobetia ، Halomonas ، Pseudomonas ، Psychrobacter ، Wangia ، Bacillus و Sporosarcina	، Alcanivorax ، Cobetia ، Halomonas و Pseudomonas	-
روبی	دریاچه رزازه	، Halobacillus ، Virgibacillus ، Halomonas ، Bacillus ، Staphylococcus ، Idiomarina و Pseudomonas	، Halobacillus ، Virgibacillus ، Oceanobacillus ، Halomonas ، Bacillus ، Staphylococcus و Pseudomonas	-
باباولیان	دریاچه آران و بیدگل	، Thalassobacillus ، Halobacillus و Halomonas ، Salinicoccus Salicola	، Thalassobacillus ، Halobacillus و Halomonas ، Marinococcus Salicola	-
محمد شادی	خاک های نمکی فلات مرکزی ایران	Bacillus Halobacillus و	Virgibacillus و Bacillus	Bacillus و Halobacillus

## بحث

بررسی شد که از رسوبات جنوب Okinawa Trough بدست آمده بود. باکتری های نمکدوست تولید کننده آنزیم آمیلز متعلق به جنس *Pseudomonas*، *Halomonas*، *Cobetia*، *Methylococcus*، *Psychrobacter*، *Wangia*، *Bacillus* و *Sporosarcina* و باکتری های نمکدوست تولید کننده لیپاز متعلق به جنس های *Alcanivorax*، *Cobetia*، *Halomonas* و *Pseudomonas* بودند (۱۹). Al-Rubaye و همکاران تولید آنزیم های هیدرولیتیک به وسیله باکتری های نمکدوست جدا شده از دریاچه Razazah در عراق در سال ۲۰۱۷ بررسی کردند، که باکتری های نمکدوست تولید کننده آنزیم آمیلز متعلق به جنس های *Halobacillus*، *Virgibacillus*، *Halomonas*، *Bacillus*، *Staphylococcus*، *Idiomarina* و *Pseudomonas* بودند و باکتری های تولید کننده لیپاز متعلق به خانواده *Halobacillus*، *Virgibacillus*، *Oceanobacillus*، *Halomonas*، *Bacillus*، *Staphylococcus* و *Pseudomonas* و باکتری های تولید کننده پکتیناز متعلق به

مناطق نمکی و فوق اشباع از نمک در سراسر کره زمین هم چون دریاچه های نمک یا معادن نمک وجود دارند. این مناطق نمکی شرایط بسیار سخت برای زیستن موجودات عادی فراهم می کنند ولی تعدادی میکروارگانیسم که شامل گروهی از آرکی آها و باکتری ها هستند قابلیت زیستن در این شرایط دشوار را دارند. آنزیم های هیدرولیتیک تولید شده توسط این میکروارگانیسم ها 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 آمیلز، پروتئاز، لیپاز و DNase و پولولاناز در باکتری های نمکدوست نسبی در حوضچه های شور در اسپانیا بررسی شد که باکتری های تولید کننده آمیلز جداسازی شده متعلق به جنس *Halomonas* و باکتری های تولید کننده لیپاز متعلق به جنس *Chromohalobacter* و *Salinivibrio* بودند (۶۱). در سال ۲۰۰۹ توسط Dang و همکاران تولید آنزیم های هیدرولاز خارج سلولی در میکروارگانیسم های نمکدوست

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 تجاری‌سازی 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

مؤلف 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.

جنس‌های *Halobacillus*، *Virgibacillus*، *Oceanobacillus*، *Bacillus*، *Halomonas* و *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 پروتاز، آمیلاز، لیپاز، DNase، کربوکسی‌متیل سلولاز، پولولاناز، گزیلاناز، پکتیناز و اینولیناز 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* و *Halomonas* 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

## References

- 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
- Kushner D. Halophilic bacteria. *Advances in applied microbiology* 1968; **10**: 73-99.
- 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
- 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
- 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
- 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.  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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, Remonato 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 decomposing 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, Arahall 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, Martín 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, Pourbabae 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/s11274-008-9865-5
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