

بهینه‌سازی و خالص‌سازی جزئی آنزیم پروتئاز، لیپاز و آمیلاز از سویه جدید شناسایی شده *Aeromonas taiwanensis* strain Persiangulf ST16 در شمال خلیج فارس

چکیده

آنزیم‌های میکروبی جدا شده از محیط‌های دریایی، به دلیل داشتن ویژگی‌های منحصر به فرد، کاربرد ویژه‌ای در صنایع مختلف پیدا کرده‌اند. خلیج فارس به دلیل داشتن تنوع زیستی فراوان، یک مکان بکر برای جداسازی سویه‌های باکتریایی با پتانسیل تولید آنزیم‌های جدید می‌باشد. پروتئاز، لیپاز و آمیلاز از جمله پرمصرف‌ترین آنزیم‌ها در صنایع مختلف هستند و با توجه به افزایش اهمیت و تقاضا نسبت به آنزیم‌های میکروبی- دریایی در صنایع، این مطالعه با هدف بهینه‌سازی و خالص‌سازی جزئی این آنزیم‌ها از سویه‌های جدید جدا شده در بندر چوبنده (شمال خلیج فارس) برای اولین بار انجام شد. نمونه‌برداری در آبان سال ۱۳۹۸ از ۱۰ ایستگاه مختلف (نمونه آب و رسوب) انجام شد. سویه جدید، *Aeromonas taiwanensis* - Persiangulf ST16 با قابلیت تولید پروتئاز، لیپاز و آمیلاز با بررسی فیلوژنیک توالی ۱۶S rRNA شناسایی شد. شرایط بهینه برای رشد این باکتری شامل دمای ۳۷-۳۰ درجه سانتی‌گراد، pH=۶ و غلظت نمک ۲/۵ درصد بود. بیشترین فعالیت آنزیمی برای هر سه آنزیم در روز دوم انکوباسیون مشاهده شد. بیشترین تولید پروتئاز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، pH=۷، حضور مالتوز به عنوان منبع کربن و کازئین به عنوان منبع نیتروژن گزارش شد و کمترین میزان در حضور دکستروز و عصاره گوشت مشاهده شد. شرایط بهینه برای تولید لیپاز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، pH=۶-۷ و در حضور روغن زیتون و تریپتون بود و استفاده از توئین ۲۰ و کازئین باعث تولید کمترین میزان آنزیم شد. تولید بهینه آمیلاز در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، pH=۷ و استفاده از نشاسته و عصاره مخمر مشاهده شد، اما سوربیتول و سولفات آمونیوم، کمترین میزان تولید را القاء کردند. در طی مراحل خالص‌سازی، فعالیت ویژه هر سه آنزیم افزایش یافت و همچنین در مرحله آخر خالص‌سازی، آنزیم‌های پروتئاز، لیپاز و آمیلاز به ترتیب ۱۶/۲۳، ۲/۶۹ و ۲/۴۳ برابر نسبت به آنزیم خام خالص‌سازی شدند. بهینه‌سازی تولید هر سه آنزیم با فعالیت قابل توجه توسط سویه *Aeromonas taiwanensis*- Persiangulf ST16 نشان داد که این باکتری می‌تواند کاندیدای مناسبی برای مطالعات بیشتر و استفاده در صنعت باشد.

واژگان کلیدی: *Aeromonas taiwanensis* پروتئاز، لیپاز، آمیلاز، خلیج فارس.

مقدمه

امروزه کاربردهای بیوتکنولوژی ترکیبات زیست فعال تولید شده توسط میکروارگانیسم‌های دریایی بسیار متوجه قرار گرفته است، زیرا میکروارگانیسم‌های دریایی قادر به تولید ترکیبات منحصر به فرد با ویژگی‌های جدید می‌باشند. ترکیبات تولید شده توسط موجودات دریایی به ویژه اکستروموفیل‌ها، ممکن است در میکروارگانیسم‌های زمینی یافت نشود (Balachandran et al., 2021). متفاوت بودن ترکیبات در میکروارگانیسم‌های دریایی، به دلیل مواجه شدن آن‌ها با شرایط متغیر محیط از جمله شوری بالا، فشار بالا، pH اسیدی، دمای شدید یا مجموعه‌ای

سارا تقوی^۱

رویا ذکاوتی^{۲*}

عفت عباسی منتظری^۳

لاله رومیانی^۴

پروانه صفاریان^۵

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی،

واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.

۲. گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد

اهواز، اهواز، ایران.

۳. گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه

علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران.

۴. گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اهواز،

اهواز، ایران.

*مسئول مکاتبات:

roya.zekavati@iauahvaz.ac.ir

کد مقاله: ۱۴۰۱۰۲۱۰۰۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۱۰

این مقاله پژوهشی و برگرفته از رساله دکتری است.



از آن‌ها می‌باشد. این عوامل باعث تولید ترکیبات جدید با قابلیت‌های جدید می‌شوند (Cheng et al., 2020)، ازجمله آنزیم‌های میکروبی جدید که قادرند واکنش‌های بیوشیمیایی مختلف را کاتالیز کنند (Sabu, 2003).

پروتئاز مهم‌ترین آنزیمی است که به‌صورت صنعتی تولید می‌شود. آنزیم پروتئاز به‌طور طبیعی در همه موجودات وجود دارد و ۱ تا ۵ درصد از کل محتوای پروتئین را شامل می‌شود (Singh et al., 2012) و آنزیم آلکالین پروتئاز، ۶۰ تا ۶۵ درصد بازار جهانی آنزیم را تشکیل می‌دهد (Balachandran et al., 2021). آنزیم پروتئاز در صنایع غذایی، مواد شوینده، تولید چرم، خمیر، کاغذ، دارو و همچنین در فرآیندهای زیست‌پالایی کاربرد فراوانی دارند (Singh et al., 2012؛ Sharma et al., 2017). در میان تولیدکنندگان مختلف پروتئاز صنعتی، باکتری‌ها با ظرفیت تولید بالا و فعالیت کاتالیزوری خود در مقایسه با حیوانات، گیاهان و قارچ‌ها بیشترین سهم را دارند (Uttatree and Charoenpanich, 2018).

لیپیدها بخش بزرگی از زیست‌توده زمین را تشکیل می‌دهند و آنزیم‌های لیپولیتیک نقش مهمی در تخریب آن‌ها دارند (Lowe, 2002). این آنزیم‌ها بر روی سوبستراهای مختلفی عمل می‌کنند و توئین‌ها، فسفولیپیدها را اغلب با انتخاب پذیری موقعیتی، تخریب می‌کنند. لیپازها به دلیل تطبیق‌پذیری گسترده آن‌ها در کاربردهای صنعتی مانند فرآوری مواد غذایی، تولید مواد شوینده، صنایع شیمیایی و علوم زیست پزشکی به‌عنوان بیوکاتالیست‌های بسیار مفید شناخته شده‌اند (Ranjitha et al., 2009). میکروارگانیسم‌های تولیدکننده لیپاز در جمعیت میکروبی که تقریباً در همه‌جا یافت می‌شوند کنار گذاشته نمی‌شوند، زیرا گزارش شده است که این میکروارگانیسم‌ها از خاک، محیط‌زیست دریایی، فاضلاب صنایع ماهی، پسماندهای کشاورزی و صنعتی، مواد فرار زباله، هوا، پساب کارخانه‌های روغن، روده کرم ابریشم و روی پوست انسان جدا شده‌اند (Ilesanmi et al., 2020). در سال‌های اخیر، لیپازهای میکروبی به دلیل خواص چندگانه‌شان نسبت به لیپازهای گیاهی و حیوانی برای کاربردهای تجاری و صنعتی اهمیت پیدا کرده‌اند (Edupuganti et al., 2017).

آمیلازها نیز ازجمله آنزیم‌های مهم صنعتی هستند که در هیدرولیز آنزیمی نشاسته نقش مهمی دارند و امروزه از آمیلازهای میکروبی به دلیل خواص منحصر به فردشان (فعالیت در محدوده مختلف دمایی، شوری و pH) در صنایع برای هیدرولیز نشاسته استفاده می‌شود (Al-Dhabi et al., 2020). آمیلازها، از نظر بیوتکنولوژیکی، کاربردهای مختلفی دارند و در فرآیند تخمیر، تولید مواد غذایی، صنایع کاغذ و نساجی اهمیت زیادی دارند (Ullah et al., 2021).

تحت کنترل درآوردن میکروارگانیسم‌ها برای فعالیتهای متابولیکی بالقوه آن‌ها تا حد زیادی به ترکیب محیط کشت بستگی دارد. رویکرد فرآیند بهینه‌سازی معمولاً به‌صورت یک متغیر در زمان انجام می‌شود. عوامل در معرض تغییر شامل عوامل تغذیه‌ای (منابع کربن و نیتروژن) و فاکتورهای فیزیکی-شیمیایی (زمان گرمخانه‌گذاری، دما، pH، حضور القاء کننده، کوفاکتورها، بازدارنده‌ها) می‌باشد (Soleymani et al., 2017). تحقیقات علمی زیادی ثابت کرده است که باکتری‌های دریایی قادر به تولید طیف وسیعی از آنزیم‌های صنعتی هستند. برخی از این باکتری‌های دریایی تولیدکننده آنزیم‌های صنعتی به‌عنوان *Aeromonas* sp. گزارش شده‌اند (Cheng et al., 2020).

Aeromonas ها به‌طور گسترده در محیط‌های آبی مانند آب‌های سطحی (شیرین، دهانه رودخانه و دریا)، آب‌های زیرزمینی، سیستم‌های آب آشامیدنی، فاضلاب، خاک و همچنین مواد غذایی مانند سبزیجات، گوشت، کله‌پاچه، سوسیس، شیر خام و ماهی یافت می‌شوند (Pinto et al., 2012). محیط دریایی منبعی از میکروارگانیسم‌های منحصر به فرد با پتانسیل زیاد برای بهره‌برداری بیوتکنولوژیکی است. تولید آنزیم‌های مختلف خارج سلولی توسط میکروب‌های مختلف به‌ویژه باکتری‌های آبی موضوع تحقیقاتی است که این روزها مورد توجه قرار گرفته است. مطالعات زیادی مبنی بر شناسایی باکتری‌های آبی مولد آنزیم‌های آمیلاز، پروتئاز و لیپاز در کشورهای مختلف انجام شده است. گزارشات مختلفی در مورد باکتری‌های آبی مولد پروتئاز مانند باکتری *Bacillus amyloliquefaciens* تولیدکننده پروتئاز جدا شده در اندونزی (Amin et al., 2018)، باکتری‌های *Bacillus*، *Pseudoalteromonas*، *Vibrio* و *Alteromonas* جدا شده در چین (Guo et al., 2022)، باکتری *pumilus* جدا شده از چشمه آب معدنی دوساری واقع در شهرستان جیرفت (بدویی دلفارد و همکاران، ۱۳۹۳) و غیره وجود دارد. ازجمله باکتری‌های

مولد لیپاز شامل گونه‌های *Aeromonas* جدا شده از لجن دریایی در تایلند (Charoenpanich et al., 2011)، باکتری *Aeromonas caviae* جدا شده در ترکیه (Gurkok and Ozdal, 2021)، باکتری آبزی *Idiomarina zobellii* جدا شده در ایران (Sadeghi-Dastjerdi et al., 2018) و باکتری *Aeromonas sobria* آبزی جدا شده در نیجریه (Takahashi et al., 2012) می‌باشند. باکتری‌های آبزی مولد آمیلاز شامل *Aeromonas salmonicida* جدا شده در چین (Peng et al., 2015)، *Aeromonas hydrophila* جدا شده در نیجریه (Samuel et al., 2020) و *Streptomyces* جدا شده از رسوبات ساحلی خور شادگان (Yakhchali, 2020) گزارش شده‌اند.

شهر چوئیده در ۳۵ کیلومتری جنوب شرقی آبادان واقع شده است و چوئیده نسبت به شهرهای آبادان و خرمشهر به خلیج فارس نزدیک‌تر است و در حاشیه رودخانه بهمنشیر شکل گرفته است. تاکنون گزارشی مبنی بر شناسایی سویه‌های مولد آمیلاز، پروتئاز و لیپاز در این منطقه ارائه نشده است. آنزیم‌های جدید با ویژگی‌های منحصر به فرد که می‌توانند در فرآیندهای صنعتی کاربرد داشته باشند، همیشه مورد تقاضا هستند. لذا این مطالعه برای اولین بار در بندر چوئیده در شمال خلیج فارس با هدف بهینه‌سازی و خالص‌سازی جزئی آنزیم‌های جدید آمیلاز، پروتئاز و لیپاز در سویه‌ی جدید جداسازی شده انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری در فصل پاییز، ۲۴ آبان سال ۱۳۹۸ از شمال خلیج فارس در استان خوزستان در محدوده بندر چوئیده آبادان از ۱۰ ایستگاه مختلف (۱۰ نمونه آب و رسوب) در شرایط کاملاً استریل انجام شد. نمونه‌های آب (۵ نمونه) با استفاده از دستگاه نمونه‌بردار و نمونه‌های رسوب (۵ نمونه) با استفاده از نمونه‌بردار گِرِپ و ون‌وین استریل شده جمع‌آوری شدند. سپس نمونه‌های آب در بطری‌های ۵۰۰ میلی‌لیتر و نمونه رسوب در کیسه‌های پلاستیکی استریل شده جمع‌آوری شدند. این نمونه‌ها تا زمان تحویل به آزمایشگاه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد (روی یخ) نگهداری شدند. pH آب، شوری و دما نیز اندازه‌گیری شد.

۶۰ میکرو لیتر از نمونه آب و نمونه رسوب رقیق شده، بر روی محیط کشت های مارین آگار ۲۲۱۶ (هایمدیا)، مک کانکی آگار (مرک) و بلاد آگار (مرک) کشت داده شدند. سپس پلیت‌ها در دمای ۲۵، ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ تا ۵ روز انکوبه شدند. کلونی‌های رشد یافته با کشت های مکرر خالص‌سازی شدند و در نهایت کلونی‌هایی با ویژگی‌های متمایز مانند رنگ‌دانه، اندازه، کدورت، ارتفاع، حاشیه و سطح انتخاب شدند (Jayadev and Lekshmi, 2016; Yeon et al., 2005).

کشت های خالص به صورت خطی روی محیط شیر آگار بدون چربی (Skim milk agar) تلقیح شدند و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند. منطقه شفاف هیدرولیز در اطراف خط کشت نشان‌دهنده سنتز پروتئاز است (Atlas, 1997). ایزوله‌ای که فعالیت پروتئاز خارج سلولی را نشان داد برای مطالعات بیشتر مورد استفاده قرار گرفت. برای شناسایی سویه‌های مولد لیپاز، کشت های خالص به صورت خطی بر روی پلیت‌های توئین ۸۰ آگار کشت شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲-۴۸ ساعت انکوبه شدند. سویه‌هایی با ناحیه رسوب مشخص به عنوان تولیدکننده لیپاز در نظر گرفته شدند و بیشتر مورد بررسی قرار گرفتند (Sivasubramani et al., 2013). جدایه‌های باکتری از نظر خواص آمیلولیتیک با آزمایش هیدرولیز نشاسته بر روی محیط نشاسته آگار غربالگری شدند. جدایه‌های میکروبی به صورت خطی روی نشاسته آگار کشت شدند و پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲-۲۴ ساعت انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، محلول ید ۱ درصد (تازه تهیه شده) روی محیط نشاسته آگار ریخته شد. وجود رنگ آبی در اطراف رشد نشان‌دهنده نتیجه منفی و ناحیه هیدرولیز شفاف اطراف رشد نشان‌دهنده نتیجه مثبت است (Ashwini et al., 2011).

شرایط رشد در دماهای مختلف (۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۳۷، ۴۰ و ۴۵ درجه سانتی گراد)، غلظت نمک مختلف (۵/۲، ۵/۷، ۱۰/۱۲، ۱۵/۲۰ و ۲۵ درصد) و pH مختلف (۴/۴، ۵/۵، ۶/۵، ۷/۵، ۸/۵ و ۹) برای باکتری‌های مولد آنزیم بهینه‌سازی شد. رشد باکتری به مدت ۴۸ ساعت با خواندن جذب در ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

نمونه‌های مولد آنزیم بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی شناسایی شدند (Vos et al., 2011). برای شناسایی مولکولی سویه‌های باکتریایی از توالی یابی 16S rRNA استفاده شد. نمونه‌های DNA باکتری با استفاده از پرایمرهای 16S rRNA فوروارد (5'-TCACGGAGTTT-GATCCTG-3') و معکوس (5'-GCGGCTGCACGTA GTT-3') تکثیر شدند و برای توالی یابی ژن 16S rRNA استفاده شدند (Khan et al., 2019). توالی سویه‌های مورد استفاده برای تجزیه و تحلیل از پایگاه داده NCBI GenBank و <https://lpsn.dsmz.de/> بازیابی شد. توالی‌ها با هم تراز شدند و درخت فیلوژنتیک با استفاده از نرم‌افزار MEGA 7/0 رسم شدند و با استفاده از روش Maximum-Likelihood (ML) بازسازی شدند. درخت فیلوژنتیک سویه باکتریایی نشان‌دهنده رابطه تکاملی با توالی انتخاب شده است.

برای تولید پروتئاز، محیط skim milk broth (Atlas, 1997) (ترکیب در لیتر: ۵ گرم کازئین، ۲/۵ گرم عصاره مخمر، ۱ گرم گلوکز، ۱ گرم پودر شیر بدون چربی) با ۱۰ درصد از کشت تازه از باکتری مورد نظر تلقیح شد و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. نمونه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. مایع رویی شفاف به عنوان آنزیم خام برای مطالعات تجربی بیشتر استفاده شد.

برای تولید لیپاز، از محیط تخمیر حاوی ترکیبات زیر استفاده شد؛ پپتون: ۵ گرم در لیتر، KH₂PO₄: ۲/۵ گرم در لیتر، گلوکز: ۱ گرم در لیتر، کلرید پتاسیم: ۰/۵ گرم در لیتر، سولفات منیزیم: ۰/۵ گرم در لیتر، کلرید کلسیم: ۰/۵ گرم در لیتر، روغن: ۱۵ میلی لیتر. محیط در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شد. پس از اتوکلاو، کشت های باکتریایی جدا شده در محیط های تخمیر تلقیح شدند. فلاسک ها با کشت تازه از باکتری مورد نظر به میزان ۱۰ درصد تلقیح شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و دور ۲۲۰ به مدت ۴ روز انکوبه شدند (Jaiswal et al., 2017).

برای تولید آمیلاز از محیط تخمیر (g/l) با ترکیبات: ۱۰ گرم نشاسته، ۳ گرم پپتون، ۰/۵ گرم NaCl، ۰/۰۱ گرم CaCl₂، ۶ گرم Na₂HPO₄، ۳ گرم KH₂PO₄ و ۰/۲۴ گرم MgSO₄ استفاده شد. محیط مورد نظر در حجم ۵۰ میلی لیتر تهیه شد. pH محیط با N HCl ۰/۱ و N NaOH ۰/۱ بر روی ۷ تنظیم شد. سپس (v/v) ۲ درصد از کشت ۲۴ ساعته در فلاسک های ارلن تلقیح شد (Elmansy et al., 2018). محیط کشت در انکوباتور شیکر در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با سرعت ۱۴۰ دور در دقیقه به مدت ۹۶ ساعت انکوبه شد. نمونه هر ۲۴ ساعت از محیط گرفته شد و سپس سانتریفیوژ شد (۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد). فعالیت آنزیمی و محتوای پروتئین مایع رویی به عنوان نمونه آنزیمی خام هر ۲۴ ساعت تخمین زده شد.

فعالیت پروتئاز با پیروی از روش سنجش منظم با استفاده از کازئین به عنوان سوبسترا (با برخی تغییرات) تعیین شد (George et al., 2001). فعالیت پروتئاز با انکوبه کردن ۱۰۰ میکرو لیتر از آنزیم با ۴۰۰ میکرو لیتر میلی لیتر کازئین ۱ درصد (وزنی/حجمی) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه مورد سنجش قرار گرفت. واکنش با افزودن ۵۰۰ میکرو لیتر تری کربوکسیلیک اسید خاتمه یافت. بعد از ۱۰ دقیقه، با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. جذب نوری نمونه های آنزیمی در طول موج ۲۸۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر نسبت به نمونه شاهد تعیین شد. فرکشن محلول تری کربوکسیلیک اسید حاوی پپتیدهای محلول با استفاده از روش Lowty با ارجاع به منحنی استاندارد تیروزین (۲۵۰-۰ میکروگرم بر میلی لیتر) اندازه گیری شد. یک واحد فعالیت پروتئاز، مقدار آنزیم مورد نیاز برای آزادسازی ۱ میکرومولار تیروزین در شرایط بهینه pH و دما است.

برای ارزیابی فعالیت آنزیم لیپاز از روش تیتراسیون آنزیم خام در برابر $\text{NaOH } 0.05\%$ مولار استفاده شد. مقدار NaOH استفاده شده نشان دهنده مقدار اسید موجود در محلول است که ارتباط مستقیمی با مقدار لیپاز تولید شده دارد. واکنش با تغییرات جزئی در مقدار ترکیبات مخلوط انجام شد. یک واحد لیپاز به عنوان مقدار آنزیمی که یک میکرو مول اسید چرب در هر میلی لیتر در هر دقیقه تحت شرایط سنجش استاندارد آزاد می کند، تعریف شده است (Jaiswal et al., 2017).

فعالیت آمیلاز با اندازه گیری کاهش شدت رنگ آبی ناشی از هیدرولیز آنزیمی نشاسته تعیین شد (Palanivelu, 2001). ابتدا، ۱۵۰ میکرو لیتر مایع رویی شفاف (به عنوان آنزیم خام) در لوله آزمایش ریخته شد و سپس ۱۵۰ میکرو لیتر محلول ۱ درصد نشاسته به آن اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. سپس با افزودن ۱۵۰ میکرو لیتر $\text{HCl } 0.1\text{ N}$ واکنش متوقف و سپس ۱۵۰ میکرو لیتر محلول ید اضافه شد. چگالی نوری (OD) محلول رنگ آبی در ۶۶۰ نانومتر با استفاده از Uv-vis array spectrophotometer (photon x Ar 2015) تعیین شد. یک واحد (U) فعالیت آنزیم به عنوان مقدار آنزیمی تعریف می شود که ۱ میلی گرم نشاسته را در هر دقیقه و در هر میلی لیتر در شرایط بهینه هیدرولیز می کند. فعالیت ویژه به عنوان واحد فعالیت آنزیم در هر میلی گرم پروتئین بیان شد. تمام اندازه گیری ها سه بار انجام شد و میانگین آن گزارش شد.

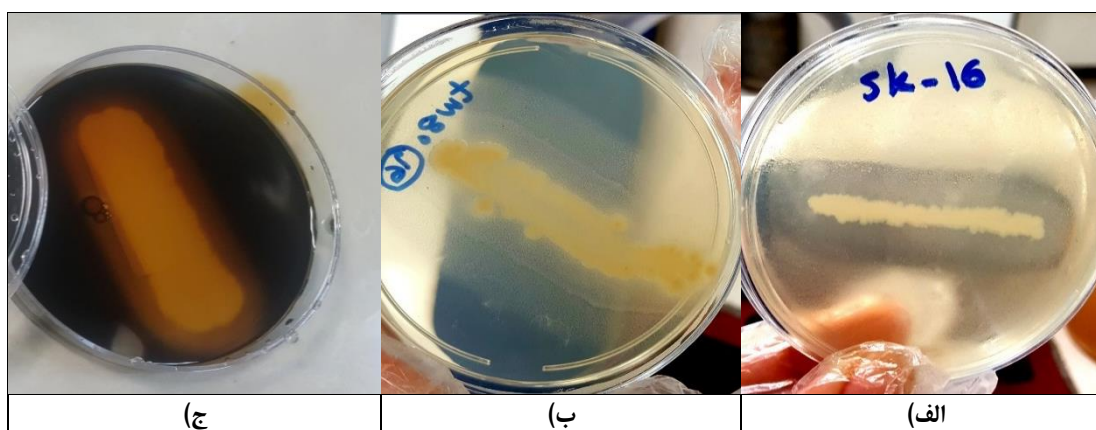
محتوای پروتئین با روش برادفورد با استفاده از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد برآورد شد (Bradford, 1976). در طی مراحل اندازه گیری فعالیت آنزیم ها و خالص سازی آن ها، محتوای پروتئین با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد.

۱۰۰ میلی لیتر از محیط های تخمیر متفاوت از نظر pH، دما، غلظت نمک، منبع نیتروژن و کربن با ۲ درصد حجمی / حجمی از کشت ۲۴ ساعته از باکتری مورد نظر تلقیح شد و فلاسک ها در انکوباتور شیکردار به مدت ۹۶ ساعت انکوبه شدند و فعالیت آنزیم و محتوای پروتئین هر ۲۴ ساعت تخمین زده شد. نتایج، میانگین سه بار تکرار آزمایش است. برای تعیین زمان انکوباسیون بهینه برای تولید آنزیم، سویه انتخاب شده به مدت ۴ روز متوالی در انکوباتور شیکردار با ۱۴۰ دور در دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد و فعالیت آمیلاز آن روزانه کنترل شد. اثر مقدار pH با کشت سویه انتخاب شده در محیط تولید بررسی شد. محیط با pH مختلف به صورت ۴، ۵، ۵/۵، ۶، ۶/۵، ۷، ۷/۵، ۸، ۸/۵ و ۹ در لوله های مختلف با افزودن $\text{HCl } 1\text{ N}$ و $\text{NaOH } 1\text{ N}$ تنظیم شد. به منظور تعیین دمای بهینه برای تولید آنزیم توسط سویه انتخابی، فعالیت آنزیمی در دماهای مختلف ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۳۷، ۴۰ و ۴۵ درجه سانتی گراد بررسی شد. برای تولید آنزیم منابع کربنی و منابع نیتروژنی مختلف (با غلظت ۱ درصد) در نظر گرفته شد. محیط کشت به طور جداگانه با هر منبع تهیه شد و ۰/۱ میلی لیتر از باکتری انتخاب شده (کشت به مدت ۲۴ ساعت) به محیط تلقیح شد و به مدت ۹۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد.

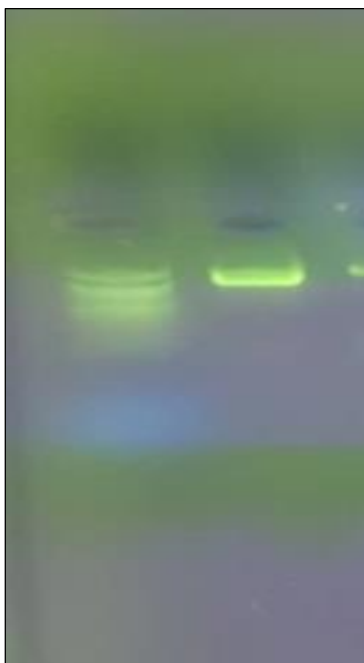
سویه مورد نظر در ۵۰۰ میلی لیتر محیط کشت با شرایط بهینه کشت داده شد. برای خالص سازی، مایع رویی (آنزیم خام) با استفاده از سولفات آمونیوم تا ۸۰ درصد اشباع در حمام یخ رسوب داده شد. سپس سانتریفیوژ در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد انجام شد و پروتئین رسوب داده شده در حداقل حجم بافر فسفات ($\text{pH} = 7$ ، 0.1 M) حل شد. محلول آنزیمی در برابر همان بافر به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد دیالیز شد (Ahmed et al., 2020). نمونه دیالیز بر روی ستون سفادکس G-۱۰۰ که قبلاً با همان بافر متعادل شده بود بارگذاری شد. شستشو با بافر مناسب با سرعت ۲ میلی لیتر در دقیقه انجام شد. میزان جذب هر بخش در طول موج ۲۸۰ نانومتر خوانده شد و سپس محتوای پروتئین و فعالیت آنزیمی مورد بررسی قرار گرفت. فراکسیون های فعال آنزیمی به صورت آنزیم خالص جمع آوری شدند (Nouadri et al., 2010).

نتایج

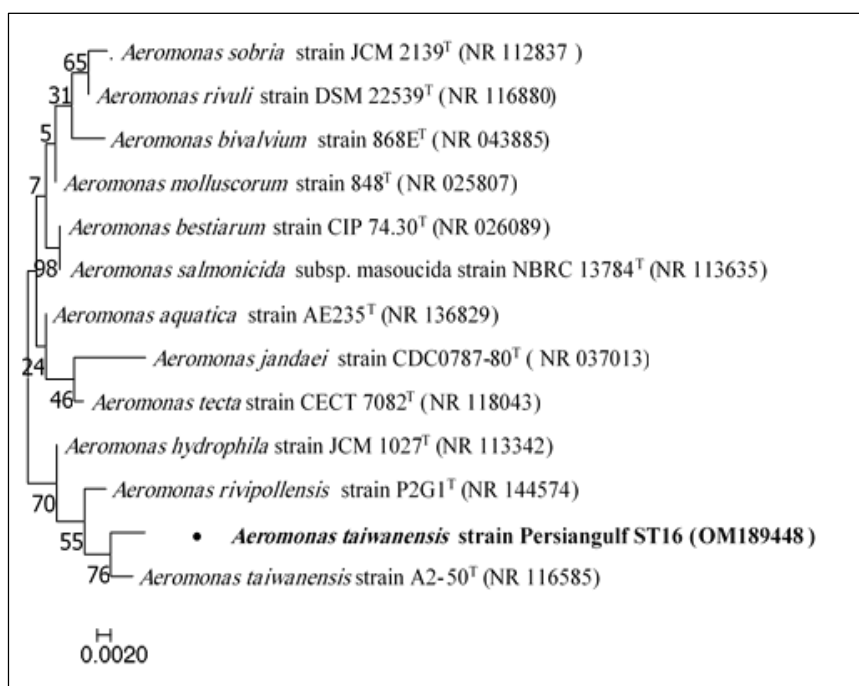
در مطالعه حاضر که در بندر چوئیده آبادان (آب‌های شمالی خلیج فارس) انجام شد، سویه‌ای با فعالیت پروتئاز، لیپاز و آمیلاز شناسایی شد. تشکیل یک هاله شفاف با هیدرولیز پروتئین در محیط شیر آگار بدون چربی نشان‌دهنده‌ی فعالیت پروتئازی بود. در فعالیت لیپازی، اسید چرب آزاد شده از هیدرولیز توئین ۸۰ همراه با کلرید کلسیم برای تولید اولئات کلسیم نامحلول، به صورت یک رسوب سفیدرنگ در اطراف کلونی باکتری ظاهر شد. در فعالیت آمیلازی، پس از افزودن محلول ید، در محیط نشاسته آگار در اطراف خط کشت هاله شفاف تشکیل شد (شکل ۱). شناسایی تاکسونومیکی این سویه با آنالیز ۱۶S rRNA انجام شد. شکل ۲، تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR ژن ۱۶S rRNA برای سویه‌های مولد آنزیم آمیلاز را نشان می‌دهد. توالی ۱۶S rRNA این سویه در بانک ژن NCBI بلاست شد و درخت فیلوژنتیک با سایر توالی‌های همولوگ ساخته شد. این سویه برای اولین بار در این منطقه و ایران به عنوان سویه *Aeromonas taiwanensis* strain Persiangulf ST16 جداسازی شد (شماره دسترسی: OM189448) (شکل ۳) که یک باکتری گرم منفی، میله‌ای شکل و بدون اسپور می‌باشد. این سویه ۹۸/۵۴ درصد به سویه‌ی *Aeromonas taiwanensis* strain A2-50^T با شماره دسترسی NR_116585 شباهت دارد (Type strain = ^T). شرایط بهینه رشد این سویه *Aeromonas taiwanensis*- Persiangulf ST16 در شکل ۴ نشان داده شده است. شرایط بهینه برای رشد این باکتری شامل دمای ۳۰-۳۷ درجه سانتی‌گراد، pH=۶ و غلظت نمک ۲/۵ درصد بود.



شکل ۱: باکتری *Aeromonas taiwanensis* strain Persiangulf ST16 با فعالیت پروتئاز (الف)، لیپاز (ب) و آمیلاز (ج).



شکل ۲: تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR ژن ۱۶S rRNA برای سویه‌ی مولد آنزیم آمیلاز، پروتئاز و لیپاز. چاهک اول از سمت چپ (Ladder 1 KB)، چاهک دوم (نمونه موردنظر).

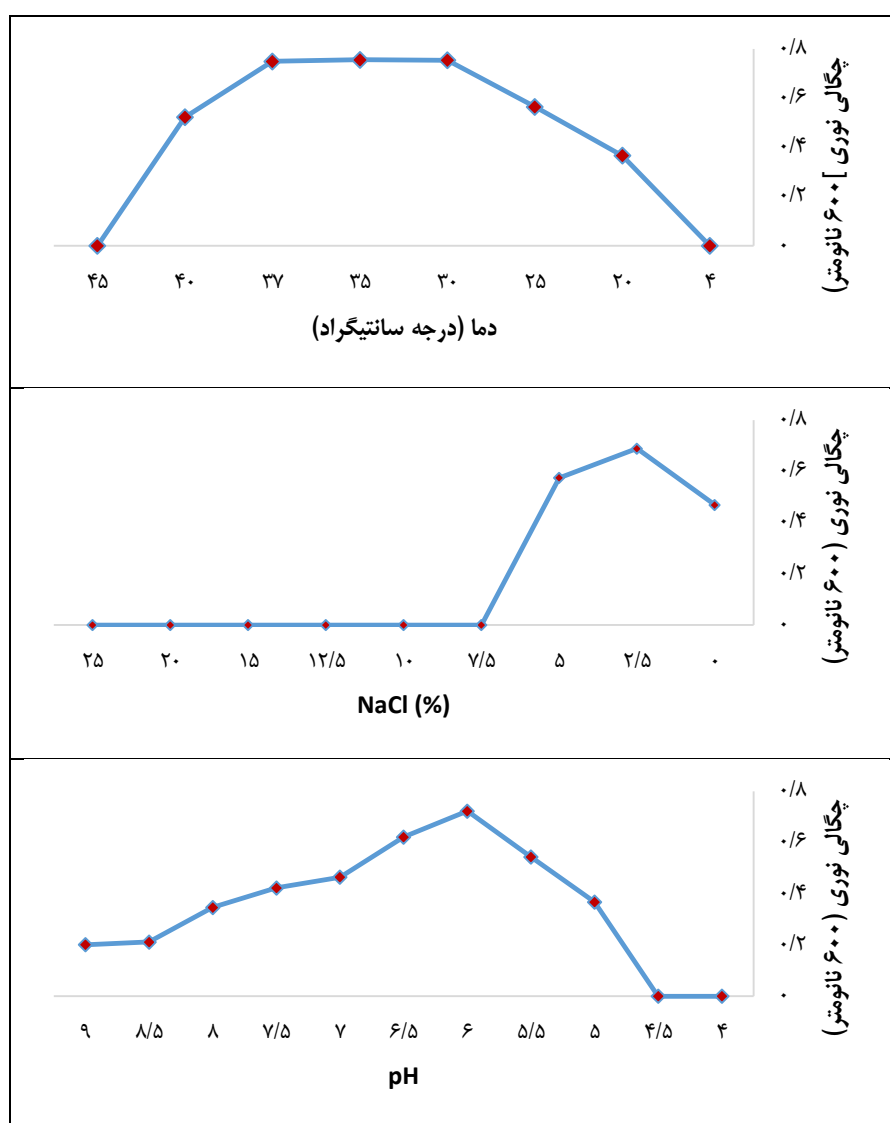


شکل ۳: آنالیز فیلوژنتیک مولکولی با روش Maximum likelihood بر اساس توالی‌های ژن ۱۶S rRNA.

رابطه سویه، Aeromonas taiwanensis strain Persiangulf ST16، را با سویه Aeromonas taiwanensis strain A2-50^T نشان می‌دهد.
(^T= Type strain)

در محیط تخمیر ذکر شده برای هر آنزیم، سویه Persiangulf ST16 کشت داده شد و فعالیت آنزیمی آن‌ها هر ۲۴ ساعت به مدت ۴ روز بررسی شد. باکتری بیشترین فعالیت پروتئاز (۰/۲۲۴ واحد/میلی‌لیتر/دقیقه = U/ml/min)، لیپاز (۷/۵ واحد/میلی‌لیتر/دقیقه) و فعالیت آمیلاز (۷/۸۲ واحد/میلی‌لیتر/دقیقه) را در روز دوم داشت.

تأثیر دمای مختلف انکوباسیون بر تولید پروتئاز، لیپاز و آمیلاز توسط سویه Persiangulf ST16 در شکل ۵ نشان داده شده است. بیشترین فعالیت پروتئاز (۰/۲۴۸ واحد/میلی‌لیتر/دقیقه) و میزان پروتئین (۲/۰۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر)، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد. دمای بهینه برای تولید لیپاز ۳۷ درجه سانتی‌گراد بود (فعالیت لیپاز: ۷/۵ واحد/میلی‌لیتر/دقیقه، میزان پروتئین: ۰/۷۶۸ میلی‌گرم/میلی‌لیتر). تولید بهینه آمیلاز در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد (فعالیت آنزیم: ۹/۲۹ واحد/میلی‌لیتر/دقیقه و میزان پروتئین: ۳/۲۳ میلی‌گرم/میلی‌لیتر). تولید آنزیم و میزان پروتئین خارج از این محدوده دمایی به شدت کاهش یافت.



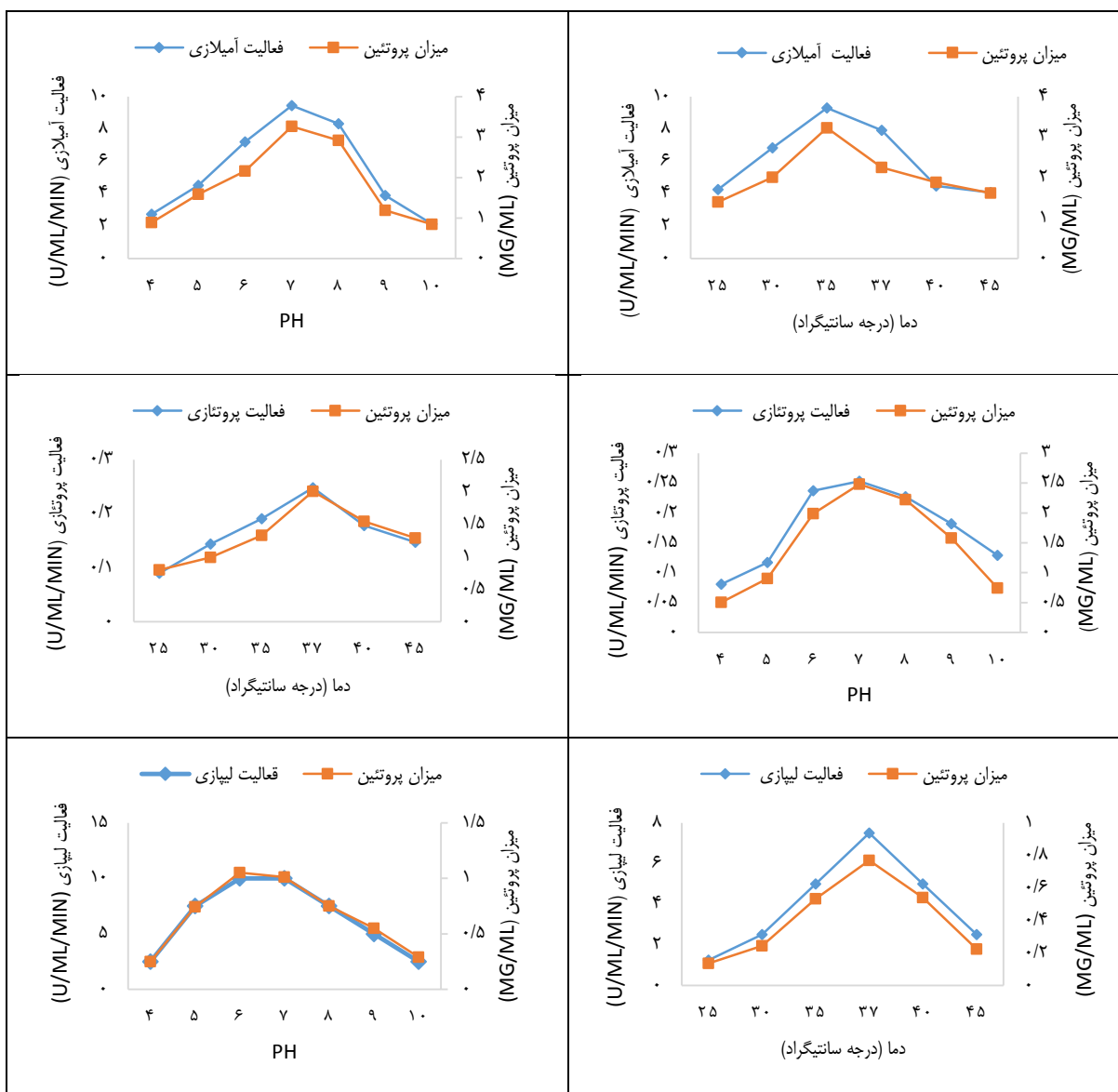
شکل ۴: شرایط بهینه رشد (از نظر دما، pH و درصد نمک مورد نیاز) برای سویه‌ی مولد آمیلاز، پروتئاز و لیپاز پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون با اندازه‌گیری کدورت در ۶۰۰ نانومتر (سال ۱۳۹۸).

pH بهینه برای تولید پروتئاز در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد ۷ pH بود (فعالیت پروتئاز: ۰/۲۵۳ واحد/میلی لیتر/دقیقه، میزان پروتئین: ۲/۴۸ میلی گرم/میلی لیتر)، به طوری که با کاهش و افزایش pH، رشد ارگانیسیم، میزان پروتئین و فعالیت آنزیم به تدریج کاهش یافت (شکل ۵). بیشترین فعالیت لیپاز در محدوده pH حدود ۶ تا ۷ مشاهده شد (فعالیت لیپاز: ۱۰ واحد/میلی لیتر/دقیقه، محتوای پروتئین: ۱/۰۳ میلی گرم/میلی لیتر). بیشترین فعالیت آمیلاز در pH برابر ۷ مشاهده شد (فعالیت آمیلاز: ۹/۴۴ واحد/میلی لیتر/دقیقه و میزان پروتئین: ۳/۲۶ میلی گرم/میلی لیتر).

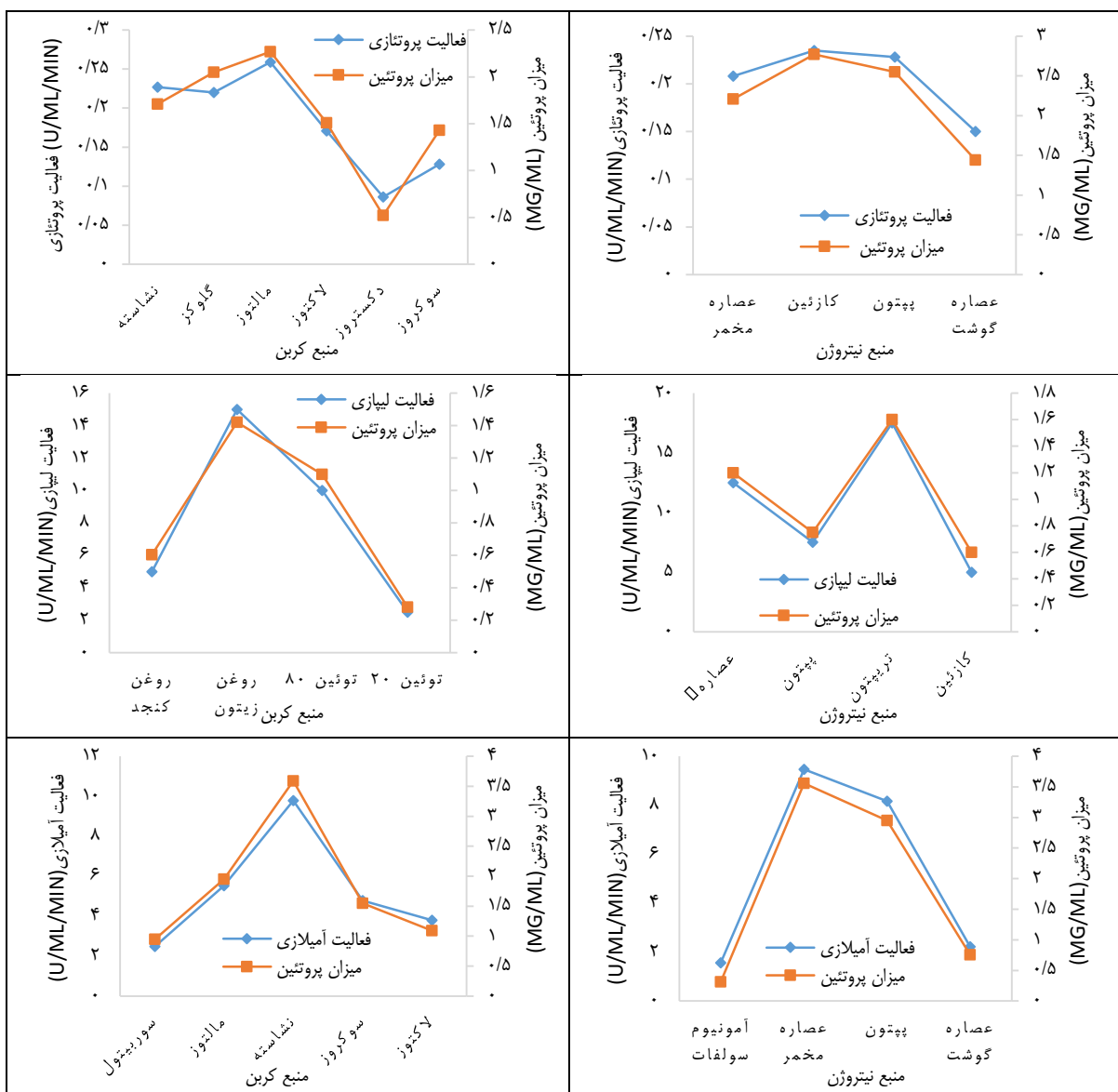
اثر منابع کربن بر تولید پروتئاز با استفاده از شش قند مختلف در غلظت ۱ درصد (وزنی / حجمی) مشخص شد. سویه Persiangulf ST16 بیشترین میزان پروتئین (۲/۲۷ میلی گرم/میلی لیتر) و فعالیت پروتئاز (۰/۲۵۹ واحد/میلی لیتر/دقیقه) را در حضور مالتوز به عنوان منبع کربن نشان داد، در حالی که حداقل میزان پروتئین (۰/۵۲۰ میلی گرم/میلی لیتر) و فعالیت آنزیمی (۰/۰۸۶ واحد/میلی لیتر/دقیقه) در حضور دکستروز مشاهده شد (شکل ۶). بهینه سازی آنزیم لیپاز در حضور ۴ منبع کربن مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین فعالیت لیپاز (۱۵ واحد/میلی لیتر/دقیقه) و میزان پروتئین (۱/۴۲ میلی گرم/میلی لیتر) در حضور روغن زیتون و کمترین فعالیت (۲/۵ واحد/میلی لیتر/دقیقه) و میزان پروتئین (۰/۲۸ میلی گرم/میلی لیتر) در حضور توئین ۲۰ مشاهده شد (شکل ۶). در حضور ۶ منبع کربن، تولید آمیلاز مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین فعالیت آمیلاز (۹/۷۹ واحد/میلی لیتر/دقیقه) و میزان پروتئین (۳/۵۹ میلی گرم/میلی لیتر) در حضور نشاسته و کمترین فعالیت (۲/۴۹ واحد/میلی لیتر/دقیقه) و میزان پروتئین (۰/۹۴۶ میلی گرم/میلی لیتر) در حضور سوربیتول مشاهده شد (شکل ۶).

تولید آنزیم توسط سویه Persiangulf ST16 در حضور چهار منبع مختلف نیتروژن مورد مطالعه قرار گرفته است. در این میان، در حضور کازئین حداکثر میزان پروتئین (۲/۷۷ میلی گرم در میلی لیتر) و فعالیت آنزیم پروتئاز (۰/۲۳۵ واحد/میلی لیتر/دقیقه) مشاهده شد. عصاره گوشت حداقل میزان پروتئین (۱/۴۴ میلی گرم در میلی لیتر) و فعالیت آنزیمی (۰/۱۵۰ واحد/میلی لیتر/دقیقه) را نشان داد (شکل ۶). بهینه سازی تولید لیپاز در حضور چهار منبع مختلف نیتروژن مورد بررسی قرار گرفت، به طوری که بیشترین فعالیت لیپاز (۱۷/۵ واحد/میلی لیتر/دقیقه) و میزان پروتئین (۱/۶ میلی گرم در میلی لیتر) در حضور تریپتون مشاهده شد. کمترین فعالیت (۵ واحد/میلی لیتر/دقیقه) و میزان پروتئین (۰/۶ میلی گرم در میلی لیتر) در حضور کازئین مشاهده شد (شکل ۶). همچنین بیشترین فعالیت آمیلاز (۹/۴۷۱ واحد/میلی لیتر/دقیقه) و میزان پروتئین (۳/۵۶ میلی گرم در میلی لیتر) در حضور عصاره مخمر و کمترین فعالیت (۱/۵۶۳ واحد/میلی لیتر/دقیقه) و میزان پروتئین (۰/۳۱۵ میلی گرم در میلی لیتر) آن در حضور سولفات آمونیوم مشاهده شد (شکل ۶).

نتایج حاصل از خالص سازی آنزیم های تولید شده توسط سویه Persiangulf ST16 در جدول ۱ خلاصه شده است. فعالیت ویژه آنزیم پروتئاز خام ۰/۱۵۴ واحد بر میلی گرم پروتئین بود. فعالیت ویژه در هر مرحله نسبت به مرحله قبل افزایش یافت. در مرحله دیالیز آنزیم خالص شده، فعالیت ویژه ۲/۵۰ واحد بر میلی گرم نشان داد. در مرحله آخر فعالیت ویژه لیپاز خالص ۲۹/۳۰ واحد بر میلی گرم پروتئین مشخص شد. همچنین فعالیت اختصاصی آنزیم آمیلاز خالص ۲/۵۰ واحد بر میلی گرم به دست آمد.



شکل ۵: اثر دما و pH محیط کشت بر روی فعالیت آنزیم‌های آمیلاز، پروتئاز و لیپاز و میزان پروتئین *Aeromonas taiwanensis* strain Persiangulf ST16 (سال ۱۳۹۸).



شکل ۶: تأثیر منابع کربن و نیتروژن بر میزان تولید و فعالیت آنزیم هپروتئاز، لیپاز و آمیلاز (سال ۱۳۹۸).

Aeromonas taiwanensis strain Persiangulf ST16

جدول ۱: خلاصه نتایج خالص سازی آنزیم های پروتئاز، لیپاز و آمیلاز.

مرحله خالص سازی	عصاره خام	رسوب دهی با سولفات آمونیوم (۸۰٪)	دیلایز
حجم (میلی لیتر)	۵۰۰	۲۵	۲۵
فعالیت کل (واحد/میلی لیتر/دقیقه)	۱۳۹/۵	۷/۲	۷/۴
پروتئین کل (میلی گرم/میلی لیتر)	۸۴۰	۷	۲/۹۵
فعالیت اختصاصی (واحد/میلی گرم)	۰/۱۵۴	۱/۰۲۸	۲/۵۰
مرتبۀ خالص سازی	۱	۶/۶۷	۱۶/۳۳
فعالیت کل (واحد/میلی لیتر/دقیقه)	۸۷۵۰	۴۳۷/۵	۴۶۸/۷۵

آنزیم پروتئاز

آنزیم لیپاز

مرحله خالص سازی	عصاره خام	رسوب دهی با سولفات آمونیوم (۸۰٪)	دیالیز
حجم (میلی لیتر)	۵۰۰	۲۵	۲۵
پروتئین کل (میلی گرم/میلی لیتر)	۸۰۰	۲۳	۱۶
فعالیت اختصاصی (واحد/میلی گرم)	۱۰/۹۳	۱۹/۰۲	۲۹/۳۰
مرتبۀ خالص سازی	۱	۱/۷۴	۲/۶۹
فعالیت کل (واحد/میلی لیتر/دقیقه)	۴۹۵۵	۲۵۵/۲۵	۲۶۴/۵
پروتئین کل (میلی گرم/میلی لیتر)	۱۵۶۰	۵۶/۴۷۵	۳۴/۲
فعالیت اختصاصی (واحد/میلی گرم)	۳/۱۷۶	۴/۵۱۹	۲/۵۰
مرتبۀ خالص سازی	۱	۱/۴۲	۲/۴۳۵

بحث و نتیجه گیری

خلیج فارس به دلیل داشتن تنوع زیستی فراوان، یک مکان بکر برای جداسازی سویه های باکتریایی با پتانسیل تولید آنزیم های جدید می باشد. پروتئاز، لیپاز و آمیلاز از جمله پرمصرف ترین آنزیم ها در صنایع مختلف هستند. آنزیم های میکروبی جدا شده از محیط های دریایی، به دلیل داشتن ویژگی های منحصر به فرد، کاربرد ویژه ای در صنایع مختلف پیدا کرده اند. در این مطالعه، سویه جدید *Aeromonas taiwanensis*-Persiangulf ST16 با قابلیت تولید آنزیم های پروتئاز و لیپاز و آمیلاز برای اولین بار از آب های شمالی خلیج فارس (بندر چوئیده) جداسازی و تولید این آنزیم ها بهینه و خالص سازی شد.

در این مطالعه بیشترین فعالیت پروتئاز توسط سویه Persiangulf ST16 در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و pH برابر ۷ مشاهده شد. همچنین بیشترین فعالیت آنزیمی در حضور مالتوز به عنوان منبع کربن و کازئین به عنوان منبع نیتروژن نشان داده شد و کمترین میزان در حضور دکستروز و عصاره گوشت مشاهده شد. بر اساس مطالعات انجام شده توسط Divakar و همکاران (۲۰۱۰)، تولید بهینه پروتئاز استخراج شده از *Aeromonas veronii* را در pH= ۷/۵ و در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد گزارش کردند. pH بهینه برای تولید آنزیم پروتئاز توسط سویه *Aeromonas hydrophila* pH قلیایی گزارش شده است (Babu and Aji, 2020). نانو ذرات گلیسرول، توئین ۸۰، Span 80 و Ag تولید پروتئاز *Aeromonas hydrophila* را افزایش دادند (Borhani et al., 2019). MacLean و Shieh (۱۹۷۵) دمای بهینه برای تولید آنزیم پروتئاز باکتری *Aeromonas salmonicida* را دمای ۶۰ درجه سانتی گراد گزارش کردند. Espoui و همکاران (۲۰۲۲) شرایط بهینه برای تولید پروتئاز توسط باکتری *Bacillus licheniformis* را در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، pH برابر ۸ و زمان انکوباسیون ۴۸ ساعت گزارش کردند.

بیشترین فعالیت لیپاز توسط سویه Persiangulf ST16 در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و pH برابر ۷-۶ مشاهده شد. همچنین بیشترین فعالیت آنزیمی در حضور روغن زیتون به عنوان منبع کربن و تریپتون به عنوان منبع نیتروژن نشان داده شد و استفاده از توئین ۲۰ و کازئین باعث تولید کمترین میزان آنزیم شد. طبق مطالعات انجام شده توسط Takahashi و همکاران (۲۰۱۲)، باکتری *Aeromonas sobria* قابلیت تولید آنزیم لیپاز را داشت. Ozdal و Gurkok (۲۰۲۱)، تولید بهینه لیپاز توسط باکتری *Aeromonas caviae* strain LipT51 را در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد و pH= ۹ گزارش کردند، در صورتی که طبق مشاهدات Velu و همکاران (۲۰۱۲)، دما و pH بهینه برای تولید لیپاز توسط سویه *Aeromonas caviae* strain AU04، دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و pH= ۷ بود. Dharmsthiti و Lotrakul (۱۹۹۷) دما و pH بهینه برای تولید لیپاز توسط باکتری *Aeromonas sobria* را دمای ۴۵ درجه سانتی گراد و pH برابر ۶ گزارش کردند. مشابه نتایج ما، Ilesanmi و همکاران (۲۰۲۰) گزارش کردند که بهترین منبع کربن برای تولید لیپاز روغن زیتون بود، اما برخلاف نتایج ما بهترین منبع نیتروژن را عصاره

مخمر گزارش کردند. *Aeromonas* sp. جدا شده از لجن دریایی در تایلند، یک لیپاز ترموفیل خارج سلولی تولید کرد که حداکثر فعالیت لیپاز پس از ۱۵ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و $\text{pH}=8$ با ۰/۵ درصد روغن زیتون به عنوان منبع کربن به دست آمد. این آنزیم با ته نشینی متوالی سولفات آمونیوم، کروماتوگرافی ستونی بانفوذ ژل و اولترافیلتراسیون با موفقیت ۳۰ برابر خالص شد (Charoenpanich et al., 2011). بررسی اثر pH و دما بر روی فعالیت آنزیم لیپاز استخراج شده از باکتری *Aeromonas hydrophila* (نمونه بالینی) نشان داد که pH بهینه ۷/۵ و دمای مطلوب ۳۷ درجه سانتی گراد است و زمانی که مقادیر pH و دما بالاتر یا کمتر از این مقادیر باشد، این فعالیت کاهش می یابد (Hassan, 2012). دما و pH بهینه فعالیت لیپاز *Idiomarina zobellii* با اندازه گیری میزان فعالیت در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد و pH محدوده ۷ تا ۱۱ تعیین شد (Sadeghi-Dastjerdi et al., 2018).

تولید بهینه آمیلاز توسط سویه ی *Persianguif ST16* در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد، $\text{pH}=7$ مشاهده شد. Peng و همکاران (۲۰۱۵) تولید بهینه آمیلاز توسط *Aeromonas salmonicida* را در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و $\text{pH}=6-7$ گزارش کردند. برخلاف مطالعه حاضر، Samie و همکاران (۲۰۱۲) ماکزیم تولید و فعالیت آمیلاز را در دمای ۱۰ درجه سانتی گراد و $\text{pH}=4$ مشاهده کردند. Emele (۲۰۰۱) گزارش داد که توانایی تولید آمیلاز به منبع جداسازی *Aeromonas* بستگی ندارد و همه ی آنروموناس های جدا شده از منابع مختلف در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد فعال بودند. در مطالعه ما استفاده از نشاسته و عصاره مخمر باعث افزایش میزان تولید و فعالیت آنزیمی شد، اما سوربیتول و سولفات آمونیوم، کمترین میزان تولید را القاء کردند. بسیاری از مطالعات دیگر بر روی باکتری ها نشان داده اند که نشاسته بهترین منبع کربن برای تولید آنزیم آمیلاز است (Al-Dhabi et al., 2020). مشابه مطالعه حاضر، Peng و همکاران (۲۰۱۵) نشاسته را به عنوان بهترین منبع کربن برای تولید آمیلاز توسط *Aeromonas salmonicida* معرفی کردند. بر اساس مطالعات Samuel و همکاران (۲۰۲۰) بازده آنزیم تولید شده توسط *Aeromonas hydrophila* طی ۷۲ ساعت پس از تخمیر افزایش یافت و پس از آن بازده کاهش یافت. آنزیم خالص شده دارای حداکثر فعالیت و پایداری مطلوب در $\text{pH}=6$ و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد بود.

در این مطالعه، آنزیم های پروتئاز، لیپاز و آمیلاز به ترتیب ۱۶/۲۳، ۲/۶۹ و ۲/۴۳ برابر خالص سازی شدند. درصد خالص سازی آنزیم پروتئاز باکتری *Aeromonas salmonicida* ۲۸ درصد گزارش شد (Shieh and MacLean, 1975). خالص سازی لیپاز استخراج شده از باکتری *Aeromonas caviae* نیز باعث افزایش فعالیت ویژه و کارایی نهایی آنزیم شد (Gurkok and Ozdal, 2021). با توجه به ساختار اکولوژیکی منحصربه فرد خلیج فارس و تأثیر قرار گرفتن میکروارگانیسم های این منطقه تحت شرایط متغیر، این میکروارگانیسم ها به ویژه باکتری ها قابلیت سنتز متابولیت های ثانویه ی متفاوتی با عملکرد منحصربه فردی دارند. بهینه سازی تولید آمیلاز، لیپاز و پروتئاز توسط سویه *Persianguif ST16* جدا شده از شمال خلیج فارس نشان داد که این باکتری می تواند کاندیدای مناسبی برای مطالعات بیشتر و استفاده در صنعت باشد.

منابع

بدویی دلفارد، ا.، امیری، پ.، کرمی، ز.، قنبری، ب. و سیدعلیپور، ب.، ۱۳۹۳. جداسازی و تعیین خصوصیت بیوشیمیایی پروتئاز مقاوم به شوینده از سویه باسیلوپس پومیلوس. زیست فناوری، ۱۶(۱): صفحات ۵۰-۶۰.

Ahmed, N. E., El Shamy, A. R. and Awad, H. M., 2020. Optimization and immobilization of amylase produced by *Aspergillus terreus* using pomegranate peel waste. Bulletin of the National Research Centre, 44(1): 1-12.

Al-Dhabi, N. A., Esmail, G. A., Ghilan, A. K. M., Arasu, M. V., Duraipandiyar, V. and Ponnurugan, K., 2020. Isolation and purification of starch hydrolysing amylase from *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-46 obtained from the Jazan region of Saudi Arabia with industrial applications. Journal of King Saud University-Science, 32(1):1226-1232.

Amin, M., 2018. Marine protease-producing bacterium and its potential use as an abalone probiont. Aquaculture Reports, 12: 30-35.

- Ashwini, K., Gaurav, K., Karthik, L. and Bhaskara Rao, K., 2011. Optimization, production and partial purification of extracellular α -amylase from *Bacillus* sp. marini. *Archive of Applied Science Research*, 3(1):33-42
- Atlas, R. M., 1997. Handbook of microbiological media, CRC Press. Inc., Edited by Lawrence C. Parks.
- Babu, N. R. and Aji, A. M., 2020. Molecular characterization of alkaline protease gene isolated from *Aeromonas hydrophila* strain AH10. *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology*, 8(2): 154-160.
- Balachandran, C., Vishali, A., Nagendran, N. A., Baskar, K., Hashem, A. and Abd-Allah, E. F., 2021. Optimization of protease production from *Bacillus halodurans* under solid state fermentation using agrowastes. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(8): 4263-4269.
- Borhani, M. S., Etemadifar, Z. and Jorjani, E., 2019. Evaluation of *Aeromonas Hydrophila* MSB16 Protease Production in Response to Low Intensity Electric Current, Surfactants, and Nanoparticles. *Biological Journal of Microorganism*, 8(32): 177-186.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2): 248-254.
- Charoenpanich, J., Suktanarag, S. and Toobbucha, N., 2011. Production of a thermostable lipase by *Aeromonas* sp. EBB-1 isolated from marine sludge in Angsila, Thailand. *Science Asia*, 37(2): 105-114.
- Cheng, T. H., Ismail, N., Kamaruding, N., Saidin, J. and Danish-Daniel, M. J. B. R., 2020. Industrial enzymes-producing marine bacteria from marine resources. *Biotechnology Reports*, 27: e00482.
- Divakar, K., Priya, J. D. A. and Gautam, P., 2010. Purification and characterization of thermostable organic solvent-stable protease from *Aeromonas veronii* PG01. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 66(3-4): 311-318.
- Edupuganti, S., Parcha, L. and Mangamoori, L. N., 2017. Purification and characterization of extracellular lipase from *Staphylococcus epidermidis* (MTCC 10656). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7(1): 057-063.
- Elmansy, E. A., Asker, M. S., El-Kady, E. M., Hassanein, S. M. and El-Beih, F. M., 2018. Production and optimization of α -amylase from thermo-halophilic bacteria isolated from different local marine environments. *Bulletin of the National Research Centre*, 42(1): 1-9.
- Emele, F. E., 2001. Rapid iodometric detection of *Aeromonas* amylase and its diagnostic significance. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 40(3): 91-94.
- Espoui, A. H., Larimi, S. G. and Darzi, G. N., 2022. Optimization of protease production process using bran waste using *Bacillus licheniformis*. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 39(3): 674-683.
- George, S. P., Ahmad, A. and Rao, M. B., 2001. Studies on carboxymethyl cellulase produced by an alkalothermophilic actinomycete. *Bioresource technology*, 77(2): 171-175.
- Guo, C., Sun, C. and Wu, S., 2022. Screening and characterization of proteases produced by deep-sea cold seep bacteria. *Journal of Oceanology and Limnology*, 40(2): 678-689.
- Gurkok, S. and Ozdal, M., 2021. Purification and characterization of a novel extracellular, alkaline, thermoactive, and detergent-compatible lipase from *Aeromonas caviae* LipT51 for application in detergent industry. *Protein Expression and Purification*, 180: 105819.
- Hassan, L. G., 2012. Partial Purification and Characterization of Lipase Produced by *Aeromonas hydrophila* Isolated from Fecal of Patients Suffering from Diarrhea. *Journal of College of Education*, (1).
- Ilesanmi, O. I., Adekunle, A. E., Omolaiye, J. A., Olorode, E. M. and Ogunkanmi, A. L., 2020. Isolation, optimization and molecular characterization of lipase producing bacteria from contaminated soil. *Scientific African*, 8: e00279.
- Jaiswal, A., Preet, M. and Tripti, B., 2017. Production and optimization of lipase enzyme from mesophiles and thermophiles. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 9(3):126-131.
- Jayadev, A. and Lekshmi, M., 2016. Screening and Isolation of Protease producing Marine Bacteria. *Emergent Life Sciences Research*, 2:73-76.
- Khan, I. A., Jahan, P., Hasan, Q. and Rao, P., 2019. Genetic confirmation of T2DM meta-analysis variants studied in gestational diabetes mellitus in an Indian population. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*, 13(1): 688-694.

- Lotrakul, P. and Dharmsthiti, S., 1997.** Purification and characterization of lipase from *Aeromonas sobria* LP004. *Journal of Biotechnology*, 54(2): 113-120.
- Lowe, M.E., 2002.** The triglyceride lipases of the pancreas. *Journal of lipid research*, 43(12): 2007-2016.
- Nouadri, T., Meraihi, Z., Shahrazed, D.D. and Leila, B., 2010.** Purification and characterization of the- α -amylase isolated from *Penicillium camemberti* PL21. *African Journal of Biochemistry Research*, 4(6): 155-162.
- Palanivelu, P., 2001.** Analytical biochemistry and separation techniques. Palkalai Nagar, Madurai, pp. 60-62.
- Peng, H., Chen, M., Yi, L., Zhang, X., Wang, M., Xiao, Y. and Zhang, N., 2015.** Identification and characterization of a novel raw-starch-degrading α -amylase (AmyASS) from the marine fish pathogen *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 119: 71-77.
- Pinto, A. D., Terio, V., Pinto, P. D. and Tantillo, G., 2012.** Detection of potentially pathogenic *Aeromonas* isolates from ready- to- eat seafood products by PCR analysis. *International journal of Food Science and Technology*, 47(2): 269-273.
- Ranjitha, P., Karthy, E. S. and Mohankumar, A., 2009.** Purification and Characterization of the Lipase from Marine *Vibrio fischeri*. *International Journal of Biology*, 1(2): 48.
- Sabu, A., 2003.** Sources, properties and applications of microbial therapeutic enzymes.
- Sadeghi-Dastjerdi, S., Ebrahimi, M. and Yalfani, R., 2018.** Production of lipase by the deep-sea bacterium *Idiomarina zobellii*; Identification of effective factors and optimization of production process. *Biological Journal of Microorganism*, 7(28): 41-52.
- Samie, N., Noghabi, K. A., Gharegozloo, Z., Zahiri, H. S., Ahmadian, G., Sharafi, H., Behrozi, R. and Vali, H., 2012.** Psychrophilic α -amylase from *Aeromonas veronii* NS07 isolated from farm soils. *Process Biochemistry*, 47(9): 1381-1387.
- Samuel, O., Judith, E. and Frederick, O., 2020.** Effects of pH, Temperature, metal salts, enzyme inhibitor and starch concentration on alpha amylase derived from *Aeromonas hydrophyla*. *International Journal of Advanced Technology and Science*, 1(1): 143-160.
- Sharma, K. M., Kumar, R., Panwar, S. and Kumar, A., 2017.** Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1): 115-126.
- Shieh, H. S. and MacLean, J. R., 1975.** Purification and properties of an extracellular protease of *Aeromonas salmonicida*, the causative agent of furunculosis. *international Journal of Biochemistry*, 6(9): 653-656.
- Singh, K., Bose, H., Richa, K., Karthik, L., Gaurav, K. and KV, B., 2012.** Isolation and characterization of protease producing marine eubacteria. *Journal of Agricultural Technology*, 8(5): 1633-1649.
- Sivasubramani, K., Singh, J. R., Jayalakshmi, S., Kumar, S. S. and Selvi, C., 2013.** Production and optimization of lipase from marine derived bacteria. *Journal of ICMAS*, pp. 4-126.
- Soleymani, S., Alizadeh, H., Mohammadian, H., Rabbani, E., Moazen, F., Sadeghi, H.M., Shariat, Z. S., Etemadifar, Z. and Rabbani, M., 2017.** Efficient media for high lipase production: one variable at a time approach. *Avicenna journal of medical biotechnology*, 9(2): 82.
- Takahashi, E., Ito, H., Kobayashi, H., Yamanaka, H., Takeda, Y., Balakrish Nair, G., Arimoto, S., Negishi, T. and Okamoto, K., 2012.** Production and properties of lipase of *Aeromonas sobria*. *Microbiology and immunology*, 56(5): 295-307.
- Ullah, I., Khan, M. S., Khan, S. S., Ahmad, W., Zheng, L., Shah, S. U. A., Ullah, M. and Iqbal, A., 2021.** Identification and characterization of thermophilic amylase producing bacterial isolates from the brick kiln soil. *Saudi journal of biological sciences*, 28(1): 970-979.
- Uttatree, S. and Charoenpanich, J., 2018.** Purification and characterization of a harsh conditions-resistant protease from a new strain of *Staphylococcus saprophyticus*. *Agriculture and Natural Resources*, 52(1): 16-23.
- Velu, N., Divakar, K., Nandhinidevi, G. and Gautam, P., 2012.** Lipase from *Aeromonas caviae* AU04: Isolation, purification and protein aggregation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 1(1): 45-50.
- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K. H. and Whitman, W. B. eds., 2011.** *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*. Springer Science & Business Media.

Yakhchali, B., 2020. Isolation, molecular identification and optimization of amylase production of marine actinomycete (Acx1) from Shadegan estuary. Cellular and Molecular Researches (Iranian Journal of Biology), 32(4): 591-605.

Yeon, S. H., Jeong, W. J. and Park, J. S., 2005. The diversity of culturable organotrophic bacteria from local solar salterns. Journal of Microbiology, 43(1): 1-10.