مجله دنیای میکروب‌ها
سال هفتم شماره سوم (پیاپی ۲۰) پاییز ۱۳۹۳
صفحات ۲۰۵-۱۹۷

Original Article

همسانه سازی و بیان ژن کد کننده آلفا آمیلاز *باسیلوس لیکنیفورمیس* و تعیین ویژگی های بیوشیمیایی آنزیم نوترکیب

اشرف کریمی نیک*[1]، کبری سعیدی[1]

[1]دانشجوی دکتری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرمان، گروه میکروب شناسی

چکیده

سابقه و هدف: آلفا آمیلاز یک اندونوکلئاز می باشد که با شکستن پیوند داخلی آلفا ۱ و ٤ آمیلوز، آمیلوپکتین و گلیکوژن را هیدرولیز می نماید. امروزه گونه های مختلف جنس *باسیلوس* منبع مهمی در تولید این آنزیم به شمار می روند. این مطالعه با هدف همسانه سازی و بیان ژن کد کننده آلفا آمیلاز (*amy*S) از باکتری *باسیلوس لیکنیفورمیس* و تعیین خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم نوترکیب انجام شد.

مواد و روش ها: توالی ژن مربوط به آنزیم آلفا آمیلاز با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلی مراز در *باسیلوس* ردیابی و جداسازی گردید. قطعات مورد نظر در ناقل بیانی pET-26b(+) وارد شدند. پس از توالی یابی قطعات، ناقلین نوترکیب به باکتری بیانی *اشرشیا کلی* BL21(DE3) منتقل و بیان شدند. به منظور خالص سازی آنزیم نوترکیب از فیلتر آمیکون و کیسه دیالیز استفاده شد. برای اندازه گیری فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز از روش دی نیترو سالیسیلیک اسید استفاده گردید.

یافته ها: نتایج این تحقیق نشان دهنده بیان فراوان آنزیم آلفا آمیلاز در سیستم های بیانی غیر از خود باکتری *باسیلوس* بود. بر اساس الکتروفورز بر روی ژل SDS-PAGE، وزن مولکولی آنزیم نوترکیب معادل ٥٤ کیلو دالتون گزارش گردید. همچنین آنزیم دارای فعالیت نسبی ٤/٧٧ واحد در میلی لیتر بود.

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق بیانگر بیان فراوان این آنزیم در سیستم های بیانی دیگر می باشد. اهمیت این سیستم به دلیل وجود پروموتر قوی T7 است. به دلیل بیان ترشحی آنزیم مورد نظر و در نتیجه تاخوردن صحیح و حفظ فعالیت آنزیم، استفاده از این سیستم در مقیاس صنعتی پیشنهاد می گردد.

واژگان کلیدی: آلفا آمیلاز، pET-26b(+)، BL21(DE3)، پروتئین نوترکیب.

دریافت مقاله: مهرماه ۹۲ پذیرش برای چاپ: بهمن ماه ۹۲

مقدمه

یکی از مهمترین آنزیم‌هایی که کاربرد فراوانی در صنعت دارند، آمیلازها می‌باشند (۱). آمیلازها هیدرولیز نشاسته و گلیکوژن را کاتالیز می کنند و از اولین آنزیم هایی کشف شده توسط بشر می باشند (۲). آلفا آمیلازها در صنایع نانوایی، نوشابه سازی، شوینده‌ها، نساجی، کاغذسازی، غذای کودک و تهیه انواع شربت‌های گلوکز و فروکتوز به کار می روند و از منابع گیاهی، جانوری و میکروبی به دست می آیند (۵-۳). امروزه آمیلازها بیشترین سهم را در تجارت بین‌المللی آنزیم دارند. به گونه‌ای که ۳۰ درصد بازار جهانی آنزیم ها را به خود اختصاص داده اند. آلفا آمیلازها در دو مرحله بر روی آمیلوز عمل می‌کنند (٦ و ۷). در ابتدا به صورت تصادفی به اتصالات گلیکوزیدی آلفا ۱ و ٤ حمله کرده و موجب تجزیه سریع آنها

*) آدرس برای مکاتبه: کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرمان، گروه میکروب شناسی.
تلفن: ۰۹۱۳۳٤۱۳٥٥٦ پست الکترونیک: a.kariminik@iauk.ac.ir

و تولید محصولاتی از قبیل مالتوز و مالتوتریوز می گردند. این امر سبب کاهش سریع ویسکوزیته و قدرت رنگ پذیری یدی آمیلوز می‌شود. در مرحله دوم که سرعت آن آهسته‌تر از مرحله اول است، اتصالات الیگوساکاریدها را هیدرولیز کرده و گلوکز و مالتوز ایجاد می گردد (۸ و ۹).

آمیلازهای حاصل از منابع میکروبی خود به دو دسته باکتریایی و غیر باکتریایی و همچنین مقاوم به حرارت و حساس به حرارت تقسیم بندی می شوند (۱۰). آلفا آمیلازها عموماً در حضور یون کلسیم، در دامنه وسیعی از pH پایدار هستند (۱۱). وجود کلسیم برای فعالیت و پایداری آنزیم لازم است. همچنین حضور یون کلسیم موجب افزایش مقاومت حرارتی آلفا آمیلاز می گردد (۱۲ و ۱۳). در بین باکتری ها جنس *باسیلوس* توانایی تولید طیف وسیعی از آنزیم ها را دارا می باشند (۱٤). به ویژه باکتری *باسیلوس لیکنی فورمیس* (*Bacillus licheniformis*) که در صنعت از اهمیت ویژه ای برخوردار است (۱۵). این باکتری در تولید آنتی بیوتیک (۱٦)، بیوسورفکتانت (۱۵)، پروتئاز های قلیایی (۱۷ و ۱۸) و آمیلاز (۱۹) نقش دارد.

هدف از این مطالعه همسانه سازی و بیان ژن کد کننده آلفا آمیلاز (*amyS*) باکتری *باسیلوس لیکنیفورمیس* و تعیین خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم نوترکیب بود.

مواد و روش‌ها

الف) باکتری مورد استفاده: در این پژوهش باکتری مورد مطالعه سویه *باسیلوس‌لیکنی فورمیس* (PTCC NO. 1721) مولد آلفا آمیلاز بود که از مرکز پژوهش های علمی و صنعتی ایران، تهران به صورت لیوفیلیزه تهیه شد. همچنین باکتری *اشریشیا کلی* DH5α حاوی پلاسمید بیانی pET-26b(+) از شرکت Novagen تهیه گردید. سویه *اشریشیا کلی* MC106 از شرکت The coli Genetic stock center خریداری شد. به منظور کشت باکتری از محیط نوترینت براث استفاده گردید. به منظور تشخیص فعالیت آلفا-آمیلازی، کشت بر روی محیط نوترینت آگار حاوی یک درصد نشاسته انجام گرفت. تولید آمیلاز پس از ۲٤ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه سیلیسیوس و افزودن چند قطره محلول لوگل، با ظهور هاله‌ای شفاف اطراف کلنی ها مشخص گردید (۲۰).

ب) استخراج DNA : برای این منظور از کیت CinnaPure DNA شرکت سیناژن ایران و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده استفاده گردید.

ج) طراحی آغازگر: به منظور طراحی آغازگر برای ژن *amyS* از نسخه دوم نرم افزار Oligo5 استفاده شد. ابتدا با استفاده از برنامه SignalP (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP)، قسمت سیگنال پپتید پروتئین مربوطه شناسایی و پس از حذف آن طراحی آغازگر رفت (forward) صورت گرفت. از آنجایی که این پروتئین توسط تیمار حرارتی نیز خالص می شود، به منظور جلوگیری از بیان قطعه اضافی در پروتئین نوترکیب در طراحی آغازگر برگشت (reverse) کدون پایان ژن مربوطه نیز در نظر گرفته شد. بنابراین پروتئین نوترکیب فاقد ناحیه his tag می باشد. آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه دارای توالی 5'-AGTGGCCATGGCAAATCTTAATGG-3' به عنوان آغازگر رفت و توالی 5'TCTGCTCGAGCTATCTTTGAACATAAATTG-3' به عنوان آغازگر برگشت بودند.

د) واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR): واکنش PCR با حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر DNA ی الگو (٤۰ نانو گرم)، یک میکرولیتر از هر پرایمر (۱۰ Pmol/µl)، ۰/۳ میکرولیتر dNTP Mix (10 mM)، ۱/۵ میکرولیتر بافر PCR (10X)، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم *Pfu* پلی مراز (۲/۵ u/µl) و ۸/۷ میکرولیتر آب مقطر استریل انجام گردید.

در ادامه واکنش PCR با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹٤ درجه سیلیسیوس و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹٤ درجه سیلیسیوس به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۵ درجه سیلیسیوس به مدت ۱ دقیقه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سیلیسیوس به مدت ۳ دقیقه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای۷۲ درجه سیلیسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصولات PCR به ژل آگاروز

۰/۷ درصد منتقل و الکتروفورز گردیدند. در نهایت باند مربوط به قطعه تکثیر شده از روی ژل بریده شده و با استفاده از کیت ویوانتیس GF-1 Gel DNA Recovery Kit و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده عمل خالص سازی انجام شد.

ه) همسانه سازی ژن: برش وکتور بیانی pET-26b(+) و محصول PCR توسط آنزیم های XhoI و MscI به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ °C انجام گرفت. پس از عمل برش، پلاسمید هضم شده خالص گردید. محصول PCR و وکتور با کمک آنزیم T_4 DNA-لیگاز به هم متصل گردیده و مجدداً به صورت وکتور حلقوی درآورده شدند. در این واکنش میزان ۲ میکرولیتر آنزیم، ۲۰۰ نانوگرم وکتور، ۶۰۰ نانوگرم محصول PCR، ۲ میکرولیتر پلی اتیلن گلیکول و ۲ میکرولیتر بافر در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر استفاده شد. واکنش فوق به مدت ۲۲ ساعت در ۲۰ درجه سیلیسیوس نگهداری گردید.

به منظور تکثیر انبوه از سویه مستعد باکتری *اشریشیا کلی* سویه MC1061 استفاده گردید. مستعد سازی با استفاده از روش کلرید کلسیم صورت گرفت. مقدار ۲۰ میکرولیتر محصول واکنش اتصال به ۱۵۰ میکرولیتر سلول های باکتری مستعد شده اضافه شد. در پایان سلول های آماده شده به محیط کشت LB حاوی کانامایسین و به مدت ۱۲ ساعت در ۳۷ °C قرار داده شدند تا کاملاً رشد کرده و آماده مراحل تأیید شوند. به منظور شناسایی باکتری های واجد قطعه مورد نظر از تکنیک PCR مستقیم به کمک آغازگرهای promotorT7 (TAATACGACTCACTATAGGG) و terminatorT7 (GCTAGTTATTGCTCAGCGG) استفاده شد. قطعه مورد نظر به منظور تایید نهایی توالی یابی گردید.

پس از انتخاب باکتری های حاوی قطعه مورد نظر، وکتور ها از باکتری های *اشریشیا کلی* سویه MC1061 با استفاده از کیت استخراج وکتور ویوانتیس GF-1 Plasmid DNA (Extraction Kit) استخراج شده و به باکتری *اشریشیا کلی*سویه BL21 (DE3) انتقال یافتند (۲۱).

و) بیان آنزیم نوترکیب آلفا آمیلاز: به منظور بیان پلاسمید نوترکیب ابتدا باکتری های مورد نظر در محیط کشت LB مایع حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین (۲۰ mg/ml) به مدت ۱۲ ساعت با ۱۵۰ دور در دقیقه در ۳۷ °C رشد داده شدند. سپس ۱۰ میلی لیتر باکتری رشد یافته به ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت TB (Terrific broth) مایع حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین اضافه گردید. محیط در دمای ۳۷ °C و ۱۸۰ دور در دقیقه گرماگذاری شد.

پس از رشد باکتری ها به مدت ٤ تا ٥ ساعت، ٥٠ میکرولیتر از ایزو پروپیل-بتا-دی-تیو گالاکتو پیرانوزید (IPTG) یک مولار (نیم میلی مولار در غلظت نهایی) به محیط کشت اضافه گردید. کشت باکتریایی به مدت ٤ ساعت دیگر ادامه یافت. محیط کشت حاوی باکتری ها به مدت ۱۰ دقیقه در ٦٠٠٠ دور در دقیقه (٤٦٢٩ g) در دمای ٤ °C سانتریفوژ گردید. سپس روماند دور ریخته شد. به رسوب باقی مانده ۱۰ میلی لیتر محلول بافر TE (Tris-HCl ده میلی مولار و EDTA یک میلی مولار با اسیدیته ۷/۸) افزوده شد. نمونه ها پس از مخلوط شدن تا انجام مراحل بعدی در دمای ۲۰- °C نگهداری گردیدند.

به منظور مشاهده بیان فراوان پلاسمیدهای مورد نظر از الکتروفورز بر روی ژل پلی اکریل امید-سدیم دو دسیل سولفات (SDS-PAGE) ۱۲٪ به مدت ۱۲۰ دقیقه استفاده گردید. برای بررسی بیان پروتئین های تراریخت از دو گروه شاهد استفاده گردید. شاهد نوع اول باکتری های واجد قطعه مورد نظر بودند که به آن ها IPTG افزوده نگردیده بود. این گروه از باکتری ها به عنوان نمونه بدون القا در کنار نمونه های القا شده رشد یافتند. شاهد نوع دوم از میزبان بیانی حاوی ناقل pET-26b(+) فاقد هر گونه ژن خارجی استفاده گردید.

ز) تهیه عصاره پری پلاسمی: به منظور ردیابی پروتئین در بخش رسوب یا محلول، ابتدا سلول های باکتری باید شکسته شوند سپس به کمک سانتریفیوژ بخش رسوب و محلول از یکدیگر جدا شوند. برای این منظور، به سوسپانسیون سلولی حاضر لیزوزیم با غلظت نهایی ۱ mg/ml ، یک قرص بازدارنده آنزیم پروتئاز و ۲۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه سرد افزوده شد. سوسپانسیون سلولی با دور ٦٠ g بر روی یخ به مدت یک ساعت مخلوط گردید. سلول ها به مدت ۲۰ دقیقه در دور

g ۱۶۰۰۰ سانتریفیوژ گردیدند (۲۲). بخش رسوب و محلول به صورت جداگانه برای آنالیزهای بعدی نگهداری شدند.

ح) خالص سازی آنزیم نوترکیب: برای این منظور ابتدا مخلوط محیط کشت و باکتری سانتریفیوژ گردیدند. بخش محلول به مدت ۲۰ دقیقه در ۸۰ °C قرار گرفت. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دور g ۱۰۰۰ سانتریفیوژ شد تا پروتئین های باکتری رسوب نمایند. به منظور حذف پروتئین های باکتریایی باقی مانده در بخش محلول از فیلترهای آمیکون ۱۰ کیلو دالتونی و کیسه دیالیز استفاده شد (۵).

ط) اندازه گیری فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز: به منظور اندازه گیری فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز از روش DNS (دی نیترو سالیسیلیک اسید) استفاده شد. در این روش نیم میلی لیتر از محلول آنزیمی در کنار نیم میلی لیتر از سوبسترا (نشاسته یک درصد) قرار داده شد.

واکنش پس از ۳ دقیقه توسط یک میلی لیتر از محلول واکنشگر دی نیترو سالیسیلیک اسید متوقف گردید. محلول حاصل به مدت ۵ دقیقه درون حمام آب ۱۰۰ درجه سیلیسیوس قرار گرفت و بلافاصله به کمک حمام یخ به دمای ۳۵ درجه سیلیسیوس رسانیده شد.

پس از افزودن ۱۰ میلی لیتر آب مقطر به آن میزان جذب به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر در برابر آب مقطر به عنوان شاهد خوانده شد. به منظور تعیین میزان قندهای احیا کننده موجود در محیط حاوی آنزیم، یک میلی لیتر محلول DNS به نیم میلی لیتر آنزیم اضافه گردید. سپس نیم میلی لیتر نشاسته یک درصد به آن افزوده شد و مطابق مراحل بالا پس از اضافه کردن آب مقطر در طول موج ۵۴۰ نانومتر در برابر آب مقطر خوانده شد. جذب به دست آمده را از جذب اصلی کم کرده تا تنها میزان جذب مربوط به فعالیت آنزیمی حاصل شود. با استفاده از فرمول زیر، فعالیت آنزیمی محاسبه گردید (۲۳ و ۲۴).

فعالیت آنزیمی برابر است با:

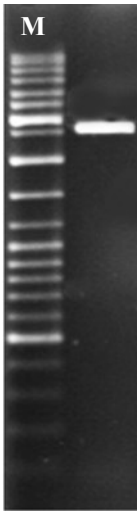
(۳ دقیقه) زمان / تعداد میکرومول مالتوز به دست آمده از معادله منحنی استاندارد

یافته ها

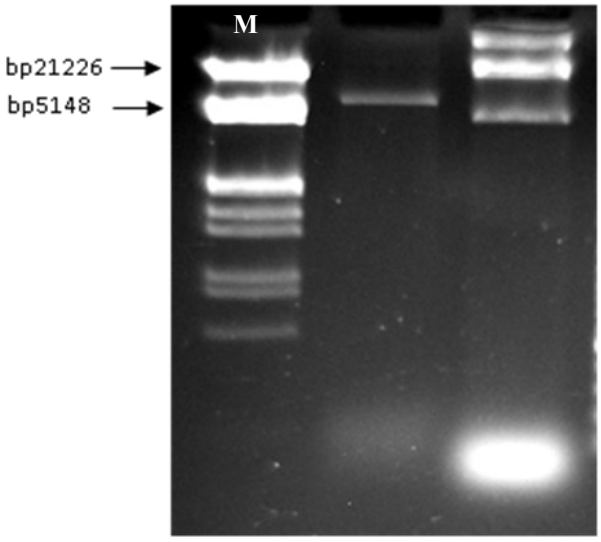
الف) واکنش زنجیره ای پلی مراز: ارزیابی الکتروفورز محصولات حاصل از PCR نشان دهنده تکثیر قطعه ای به طول ۱۴۷۲ جفت باز بود (شکل ۱).

ب) همسانه سازی محصول حاصل از واکنش زنجیره ای پلی مراز در وکتور بیانی: از آنجایی که وکتور pET دارای ژن مقاومت به آنتی بیوتیک کانامایسین بود، بنابراین باکتری های MC1061 که در حضور کانامایسین رشد می نمودند دارای وکتور pET بودند. به منظور شناسایی باکتری های واجد قطعه از روش PCR استفاده گردید. پس از اطمینان از وجود قطعه مناسب در باکتری انتخاب شده، قطعه توالی یابی شد. در این مطالعه نتایج توالی یابی با موفقیت همراه بود (شکل ۲).

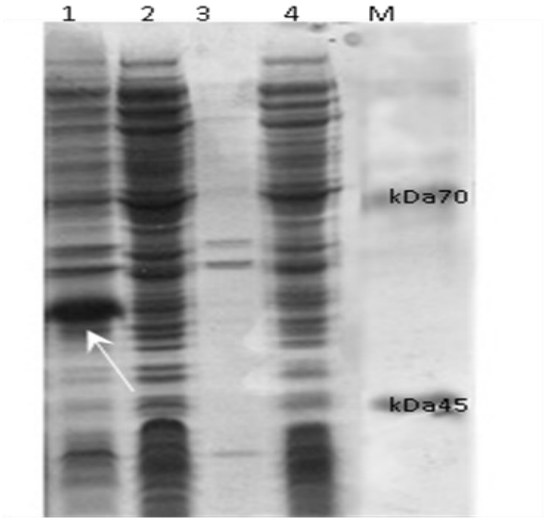
ج) بیان نوترکیب آنزیم آلفا آمیلاز: مقایسه الگوی پروتئینی هر دو شاهد با باکتری های تراریخت القا شده، نشان دهنده تولید پروتئین های تراریخت بود. پس از لیز باکتری ها توسط دستگاه اولتراسونیک و سانتریفیوژ کردن و جداسازی فاز محلول و رسوب باند مربوط به پروتئین نوترکیب هم در بخش پری پلاسمیک و هم سیتوپلاسمیک مشاهده گردید. بر اساس الکتروفورز بر روی ژل SDS-PAGE، وزن مولکولی آنزیم نوترکیب معادل ۵۴ کیلو دالتون گزارش گردید (شکل ۳).



شکل ۱: تکثیر ژن آلفا آمیلاز با استفاده از آنزیم Pfu پلی مراز. M) مارکر (۱۰۰ جفت بازی)، ستون ۱) ژن تکثیر شده آلفا آمیلاز (۱۴۷۲ جفت باز).



شکل ۲: نتیجه هضم آنزیمی ناقل (+)pET-26b با آنزیم های XohI و MscI. M مارکر III، ستون ۱) پلاسمید هضم شده، ستون ۲) پلاسمید هضم نشده (نمونه شاهد).



شکل ۳: بیان پروتئین نوترکیب آلفا آمیلاز در باکتری *اشریشیا کلی*. M) نشانگر پروتئین، ستون ۱) آلفا آمیلاز القا شده، ستون ۲) آلفا آمیلاز القا نشده، ستون ۳) ناقل pET القا شده، ستون ٤) ناقل pET القا نشده (فلش سفید در شکل نمایانگر پروتئین نوترکیب تولید شده می باشند).

د) بررسی فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز: به منظور اندازه گیری فعالیت آنزیم از روش DNS استفاده شد. در این مطالعه آنزیم دارای فعالیت نسبی ٤/٧٧ واحد در میلی لیتر بود.

بحث

جنس *باسیلوس* در بین باکتری ها قادر به تولید طیف گسترده ای از آنزیم ها است که از لحاظ صنعتی حائز اهمیت می باشند. *باسیلوس لیکنی فورمیس* از نظر توانایی تولید آنزیم آلفا آمیلاز مقاوم به حرارت بسیار مورد توجه می باشد (۲۸). با توجه به اهمیت صنعتی این آنزیم و کاهش سطح بیانی آن در بسیاری از میکرواورگانیسم ها، در این پژوهش ژن مربوط به این آنزیم توسط تکنیک PCR از باکتری *باسیلوس لیکنی فورمیس* شناسایی و جداسازی گردید. آنزیم مورد استفاده در این تکنیک pfu پلی مراز می باشد. این آنزیم با دارا بودن فعالیت اگزونوکلئازی ´3 به ´5 قادر به تکثیر DNA با کمترین اشتباه می باشد. میانگین خطای همانند سازی این آنزیم ($1/3\times10^{-6}$) حدود ٦ برابر کمتر از میانگین خطای آنزیم Taq پلی مراز (8×10^{-6}) است (۲۵). ژن تکثیر شده پس از برش توسط آنزیم های برشی به وکتور بیانی (+)pET-26b انتقال داده شد. ناقل بیانی (+)pET-26b یکی از قوی ترین ناقل های بیانی شناخته شده می باشد. این ناقل علاوه بر تولید سیتوپلاسمی، توانایی ترشح پروتئین نوترکیب را به بخش پری پلاسمیک نیز دارا می باشد. در مطالعه حاضر توالی سیگنال پپتید خود ژن حذف گردید و به منظور بیان ترشحی از سیگنال پپتید ناقل بیانی استفاده شد. ناقل نوترکیب سپس به باکتری *اشریشیا کلی* سویه BL21 انتقال یافت. در بیان پری پلاسمیک تغییرات پس از ترجمه ایجاد می شود. اما چنین تغییراتی در بیان سیتوپلاسمی ایجاد نمی گردد. علاوه بر این، ترشح پروتئین های نوترکیب به فضای پری پلاسم *اشریشیا کلی*، امتیازات متعددی مانند افزایش فعالیت زیستی، حلالیت محصول و سهولت خالص سازی پروتئین را دارد (۲۹).

در پژوهش حاضر انتقال و بیان ژن *آلفا آمیلاز* در باکتری *اشریشیا کلی* BL21 به طور موفقیت آمیزی صورت پذیرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که آنزیم نوترکیب تولید شده دارای فعالیت فعالیت نسبی ٤/٧٧ واحد در میلی لیتر می باشد. در مطالعه مشابه انجام شده بر روی بررسی توان تولید آنزیم آلفا آمیلاز در باکتری *باسیلوس لیکنی فورمیس* مشخص گردید که ماهیت تولید این آنزیم به منبع کربن به کار رفته در محیط کشت

بستگی دارد. در مقادیر کافی گلوکز تولید آنزیم متوقف شده حتی اگر در محیط نشاسته قرار داده شود (۱۹ و ۳۰). حداکثر فعالیت تولید آنزیم نیز در غلظت دو درصد نشاسته نشان داده شد (۲۰). در پژوهش دیگری که بر روی تولید آنزیم آلفا آمیلاز در باکتری های مزوفیل صورت گرفت مشخص گردید که بیشترین فعالیت آنزیم در تجزیه نشاسته بر خلاف دمای ایده ال رشد باکتری در دمای ۵۰ الی ۷۰ درجه سیلیسیوس صورت می پذیرد (۲۰).

آیبا (Aiba) و همکاران در پژوهش دیگری ژن مولد آنزیم را از یک باکتری ترموفیل به نام *باسیلوس استئاروترموفیلوس* (*Bacillus stearothermophilus*) جداسازی و در وکتور pTB90 و pTB53 کلون نمودند. یافته های آنها نشان داد که میزان بیان ژن در باکتری یاد شده در مقایسه با باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* کمتر می باشد (۳۱). در این مطالعه تخلیص پروتئین نوترکیب با روش تیمار حرارتی با توجه به مقاومت دمایی صورت گرفت. ایندیرا و برند (Indira and Bernd) با بیان آنزیم آلفا آمیلاز باکتری *باسیلوس* در باکتری *اشریشیاکلی* توانستند یک آنزیم نوترکیب مقاوم به حرارت با فعالیت ۵۰۶ mU/mg تولید کنند (۳۲). نیو (Niu) و همکاران نیز با شناسایی استرین خاصی از *باسیلوس لیکنی فورمیس* به نام سویه CBBD302 و بیان آنزیم آلفا آمیلاز باکتری یاد شده موفق به بیان ۲۶ برابری آلفا آمیلاز به صورت نوترکیب شدند (۳۳). راکلئووا (Rakleova) و همکاران با بیان آلفا آمیلاز متعلق به گیاه *داکتیلیس گلومراتا* (*Dactylis Glomerata*) در باکتری *اشریشیاکلی* موفق به بیان نوترکیب این آنزیم شدند. در این تحقیق بیشترین عملکرد برابر با ۲۰۰ میلی گرم پروتئین به ازای یک لیتر محیط کشت بود (۳٤).

وانگ (Wang) و همکاران با جداسازی ژن آلفا آمیلاز از باکتری *باسیلوس لیکنی فورمیس* و بهینه سازی کدن آن با *پیکیا پاستوریس* (*Pichia pastoris*) و متعاقبا بیان آن در مخمر ذکر شده موفق به بیان این آنزیم با فعالیت ۱۱۰۰۰ واحد در میلی لیتر شدند (۳۵).

نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان دهنده بیان فراوان این آنزیم در سیستم های بیانی غیر از خود باکتری *باسیلوس* می باشد. اهمیت این سیستم بیانی به دلیل وجود یک پروموتر بیانی قوی به نام T7 می باشد. پس از آنالیز بیان پروتئین نوترکیب و خالص سازی آن مشخص گردید که این آنزیم دارای فعالیت نسبی ٤/۷۷ واحد در میلی لیتر می باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان به دلیل حمایت های مالی و همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Windish W, Mhatre N, Wayne W. Microbial amylases. In : Advances in applied microbiology. Academic Press, New York, NY, USA, 1965; pp: 273-304.

2. Sarbatly R, England R. Critical review of membrane bioreactor system used for continuous production of hydrolyzed starch. Chem Biochem Engin Quart. 2004; 18(2): 155-165.

3. Pandey A, Nigam P, Soccol C, Soccol V, Sngh D, Mohan R. Advances in microbial amylases. Biotechnol Appl Biochem. 2000; 31: 135-152.

4. Universiteit O. Technological application of biocatalysts. Butterworth Heineman UK. 1993; 12: 20-50.

5. Rana N, Walia A, Gaur A. α-Amylases from microbial sources and its potential applications in

various industries. Natl Acad Scilett. 2013; 36(1): 9-17.

6. Ozcan N, Altinalan A, Ekuncu M. Molecular cloning of an a-amylase gene from *Bacillus subtilis* RSKK246 and its expression in *Escherichia coli* and in *Bacillus subtilis*. Turk J Vet Anim Sci. 2001; 25(2): 197-201.

7. Reddy N, Nimmagadda A, Rao K. An overview of the microbial alpha amylase family. Afr J Biotech. 2003(2): 645-648.

8. Alariya S, SethiS, Gupta S, Gupta B. Amylase activity of a starch degrading bacteria isolated from soil. Arch Appl Sci Res. 2013; 5(1): 15-24.

9. Roy J, Mukherjee A. Applications of a high maltose forming, thermo-stable α-amylase from an extremely alkalophilic *Bacillus licheniformis* strain AS08E in food and laundry detergent industries. Biochem Engin J. 2013; 77(15): 220-230.

10. Maarel V, Marc J. Properties and applications of starch converting enzymes of the alpha amylase family. J Biotech. 2002; 94: 137-155.

11. Gupta R, Gigras P, Mohapatra H, Goswami V, Chauhan B. Microbial alpha amylase: a biotechnological perspective. Processs Biochem. 2002; 38: 1599-1616.

12. Kuriki, Imanaka T. The concept of the alpha amylase family: structural similarity and common catalytic mechanism. J Biosci Bioengin. 1999; 87: 557-565.

13. Vinhinen M, Mantsala P. Microbial amylolytic enzymes. Crit Rev Biochem Mol Biol. 1989; 24: 329-363.

14. Lonsane B, Ramesh M. Production of bacterial thermostable alpha-amylase by solid-state fermentation: a potential tool for achieving economy in enzyme production and starch hydrolysis. Adv Appl Microbiol. 1990; 35: 1-56.

15. Dewaliya V, Jasodani R. Isolation and identification of *Bacillus licheniformis* for biosurfactant production. J Microbiol. 2013; 2(4): 14-19.

16. Smitha S, Bhat S. Thermostable bacteriocin BL8 from *Bacillus licheniformis* isolated from marine sediment. J App Microbiol. 2013; 114(3): 688-694.

17. Sathyavrathan P, Krithika S. Production and optimization of Protease from *Bacillus licheniformis* NRRL-NRS-1264 using cheap source substrates by submerged (SmF) and solid-state fermentation (SSF). In J Chem Tech Res. 2014; 6(1): 286-292.

18. Sellami-Kamoun A, Haddar A, El-Hadj Ali N, Ghorbel-Frikha B, Kanoun S, Nasri M. Stability of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in commercial solid laundry detergent formulations. Microbiol Res. 2008; 163: 299-306.

19. Rothstein D, Devlin P, Cate R. Expression of alpha-Amylase in *Bacillus licheniformis*. J Bacteriol. 1986; 168(2): 839-842.

20. MishraS, Behera N. Amylase activity of a starch degrading bacteria isolated from soil receiving kitchen wastes. Afr J Biotechnol. 2008; 7(18): 3326-3331.

21. Torry S. Enzyme technology. Noyes publications USA. 1983; pp: 33-63.

22. Gholipour A, Moosavian M, Galehdari H, Makvandi M, Memari H, Alvandi A. Cloning and

periplasmic expression of peptidoglycan-associated lipoprotein (PAL) protein of *Legionella pneumophila* in *Escherichia coli*. Jundishapur J Microbiol. 2010; 3(1): 1-9.

23. Miller G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analchem. 1959; 31: 426-428.

24. Sajedi R, Naderi-Manesh H, Khajeh K, Ahmadvand R, Ranjbar B, Asoodeh A. A ca-independent alpha amylase that is active and stable at low pH from the *Bacillus* sp. KR-8104. Enzyme Microb Technol. 2004; 36(5-6): 666-671.

25. Cline J, Braman J, Hogrefe H. PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. Nucleic Acids Res. 1996; 24(18): 3546-3551.

26. Tucker GA, Woods L. Enzyme in food processing. Blackie academic press UK. 1995; pp: 190-255.

27. Chang Q, Chen J. Separation and purification of two enzymes from *Bacillus subtilis* using aliquat 336 reversed micells: study of the effect cosolvent concentration. Chem Eng J. 1995; 59(3): 303-308.

28. Priest F. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. Bacteriol Rev. 1977; 41(3): 711-753.

29. Sockolosky JT, Szoka FC. Periplasmic production via the pET expression system of soluble, bioactive human growth hormone. Protein Expression Purification. 2013; 87(2): 129-135.

30. Nigam P, Singh D. Enzyme and microbial systems involved in starch processing. Enzym Microb Technol. 1995; 17: 770-778.

31. Aiba S, Kitai K, Imanaka T. Cloning and expression of thermostable a-amylase gene from *Bacillus stearothermophilus* in *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus subtilis*. Appl Environ Microbiol. 1983; 46(5): 1059-1065.

32. Indira AR, Bernd HAR. One-step production of immobilized α-amylase in recombinant *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol. 2009; 75(7): 2012-2016.

33. Niu D, Zuo Z, Shi GY, Wang ZX. High yield recombinant thermostable α-amylase production using an improved *Bacillus licheniformis* system. Microbial Cell Factories. 2009; 8: 58.

34. Rakleova G, Keightley A, Pantchev I. Identification, molecular cloning, and recombinant gene expression of an extracellular a-amylase from dactylis glomerata L. embryogenic suspension cultures. Biotechnol Biotechnolog Equipment. 2012; 26: 4.

35. Wang JR, Li YY, Liu DNi, Liu JS, Li P, Chen LZ, Xu SD. Codon optimization significantly improves the expression level of α-amylase gene from *Bacillus licheniformis* in *Pichia pastoris*. BioMed Res Int. 2014; 2:34.

Journal of Microbial World
Volume 7, No. 3, October 2014

Original Article

Cloning and over expression of alpha-amylase gene isolated from *Bacillus licheniformis* and determination of biochemical characterizations of this recombinant enzyme

Ashraf Kariminik[1], **Kobra Saeedi**[1]

[1]PhD Student, Department of Microbiology, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran

Abstract

Background & Objectives: α-amylase, is an endoamylase to hydrolyses amylase, amylopectin and glycogen by randomly cleavage of internal alpha 1, 4 linkages. Genus *Bacillus* is one of the most common microbial sources of α-amylase production. The aim of the present study is identification, overexpression and activity analysis of *Bacillus licheniformis* α-amylase (*amy*S).

Materials & Methods: A polymerase chain reaction was used to identify and isolate *α-amylase* gene in *Bacillus* sp. The fragments were introduced into expression vector pET-26 (+). After sequencing, the recombinant vectors were introduced into *E. coli* BL21 (DE3) for expression. The recombinant enzyme were purified using amicon filter and dialysis bags. α-amylase activity was measured using di-nitro salicylic acid technique.

Results: Based on the results, the *α-amylase* gene was over-expressed in an expression system beyond the native host (*Bacillus* sp.). Based on the SDS-PAGE electrophoresis, the molecular weight of this enzyme was predicted 54 KDa. The α-amylase showed an enzyme activity about 4.77 U/ml.

Conclusion: These results indicated a high expression of this enzyme in an expression system beyond the host, which was due to existence of a strong promoter used in this study, T7promoter. As a result, employment of this system in an industrial scale is recommended due to the secretion of the target enzyme, a proper folding of the enzyme and maintenance of its activity.

Keywords: Alpha amylase, pET-26b (+), Bl21 (DE3), Recombinant protein.

Correspondence to: Ashraf Kariminik

Tel: +989133413556

E-mail: kariminik@iauk.ac.ir

Journal of Microbial World 2014, 7(3): 197-205.