جداسازی و شناسایی *باسیلوس* مولد آلفاآمیلاز گرمادوست: بهینه‌سازی تولید و بررسی فعالیت و پایداری دمایی

سعیده افریشم، ارسطو بدویی دلفارد*، عبدالحمید نمکی شوشتری، زهرا کرمی و سعید ملک‌آبادی

دریافت: ۱۳۹۵/۵/۲۹ / پذیرش: ۱۳۹۶/۹/۱۳ / چاپ: ۱۳۹۶/۱۲/۲۸

گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران
*نویسنده مسئول: badoei@uk.ac.ir

چکیده. آلفاآمیلازها، مهم‌ترین و پرکاربردترین آمیلازها در صنعت نشاسته هستند. در میان آلفاآمیلازها، انواع گرمادوست به‌دلیل پایداری و فعالیت در دماهای بالا مهم‌ترند. این آنزیم‌ها به‌وسیلهٔ میکروارگانیسم‌های گرمادوست ازجمله باکتری‌ها تولید می‌شوند. آلفاآمیلازهای گرمادوست در صنایع مختلف از جمله فرآوری نشاسته، مواد شوینده و سوخت زیستی کاربرد دارند. در این تحقیق، باکتری‌های مولد آلفاآمیلاز گرمادوست از چشمه‌های آب گرم روستای گُروه واقع در استان کرمان شناسایی و جداسازی شدند. براساس نتایج غربال‌گری در محیط اختصاصی مایع و جامد، سویهٔ AT59 به‌منزلهٔ سویهٔ برتر انتخاب شد. بررسی‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی 16S rDNA نشان داد این سویه به جنس باسیلوس تعلق دارد و گرم مثبت، کاتالاز مثبت، هیدرولیزکنندهٔ کازئین و تخمیرکنندهٔ قندهای لاکتوز و ساکاروز است. نتایج بهینه‌سازی محیط تولید آنزیم نشان داد در میان منابع کربن، نیتروژن و یون تحت بررسی، نشاسته (۱ گرم بر لیتر)، ژلاتین (۲ گرم بر لیتر) و سولفات منیزیم (یک گرم بر لیتر)، بیشترین اثر افزایشی را بر تولید آلفاآمیلاز سویهٔ AT59 داشته‌اند. علاوه‌براین، بیشترین تولید آنزیم این سویه در محیطی با pH ۵ به‌دست آمد. این آلفاآمیلاز به‌ترتیب بیشترین فعالیت و پایداری را در دماهای ۸۰ و ۷۰ درجهٔ سانتی‌گراد داشته‌اند. این یافته‌ها پیشنهاد می‌کند این آنزیم پتانسیل زیادی برای استفاده در صنعت نشاسته دارد.

واژه‌های کلیدی. آنزیم‌های گرمادوست، تولید، چشمهٔ آب‌گرم، غربال‌گری

Isolation and identification of *Bacillus* producing thermophilic alpha amylase: production optimization and investigation of the activity and stability of enzyme

Saideh Afrisham, Arastoo Badoei-Dalfard*, Abdolhamid Namaki-Shoushtari, Zahra Karami & Saeid Malekabadi

Received 19.08.2016/ Accepted 04.12.2017/ Published 19.03.2018

Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran
*Correspondent author: badoei@uk.ac.ir

Abstract. Alpha-amylases are the most important amylases used in industry. Among them, thermophilic alpha-amylases are of particular importance, which is due to their activity and stability in high temperatures. These enzymes produced by thermophile micro-organisms including bacteria. These thermophilic alpha-amylases are used in various industries such as processing of starch as well as production of detergents and biofuels. In this research, the bacteria which produce the thermophilic alpha-amylases were isolated and characterized in hot springs of Gorooh village in Kerman province. According to the results of screening on the specific liquid and solid media, AT59 was selected as the best strain. Morphological and biochemical characterization of the isolated strain indicated that it belonged to *Bacillus* sp. and was gram-positive, catalase positive, casein hydrolyzing and acid producing from lactose and sucrose. The results obtained from the optimization of the enzyme production medium showed that among the carbon, nitrogen and ion sources investigated, starch (1 gr/l), gelatin (2 g/l) and magnesium sulfate (1 g/l) had the most increasing effect on the production of AT59 alpha-amylase. Moreover, the highest enzyme production was obtained at pH 5. This enzyme also demonstrated the highest degree of activity and stability in 80 and 70 ℃, respectively. These findings suggested that this enzyme has a considerable potential for use in starch industry.

Keywords. hot spring, production, screening, thermophilic enzymes

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-03-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1396.4.4.1.8]
[DOI: 10.29252/nbr.4.4.288]

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-03-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1396.4.4.1.8]
[DOI: 10.29252/nbr.4.4.288]

مقدمه

میکروارگانیسم‌های گرمادوست موجوداتی هستند که با رشد بهینه در دماهای بالا (بالای ۵۵ درجهٔ سانتی‌گراد) سازگارند و از مکان‌های دریایی و خاکی با درجهٔ حرارت بالا جدا شده‌اند. رایج‌ترین این مکان‌ها چشمه‌های آب گرم و بیابان‌ها هستند (Antranikian & Egorova, 2007). میکروارگانیسم‌های گرمادوست منبعی از آنزیم‌هایی شناخته می‌شوند که هم از نظر شیمیایی و هم از نظر فیزیولوژیکی مقاومت بالایی نشان داده (Haki & Rakshit, 2003) و قادرند واکنش‌های شیمیایی را در دماهای بالاتری نسبت به آنزیم‌های میکروارگانیسم‌های مزوفیل کاتالیز کنند. علاوه‌براین، آنزیم‌های به‌دست‌آمده از گرمادوست‌ها ویژگی‌های منحصر به فرد دیگری همچون پایداری زیاد در مقابل حلال‌های آلی، pH های شدیداً قلیایی و شدیداً اسیدی و مواد شوینده ارائه می‌دهند (Zeikus *et al.*, 1998). از نکات مهم دربارهٔ میکروارگانیسم‌های گرمادوست توانایی تولید آنزیم‌های آمیلولیتیک گرمادوست با کارایی بالا است که در فرآوری نشاسته و تولید قند، صنعت نساجی و همچنین مواد شوینده کاربرد دارند (Abdel-Fattah *et al.*, 2012). آلفاآمیلازها، یکی از رایج‌ترین و مهم‌ترین آمیلازهای صنعتی هستند که به‌طور تصادفی پیوند α(۱→۴) بین واحدهای گلوکز مجاور هم را در زنجیرهٔ خطی آمیلوز در کربوهیدرات نشاسته را می‌شکافند (Chandra *et al.*, 2010). تولید آلفاآمیلازهای گرمادوست در صنایع مختلف، خطر آلودگی ناشی از میکروارگانیسم‌های مزوفیل و نیز هزینه‌های سردکردن اضافی را کاهش می‌دهد و به‌طور ویژه در صنعت فرآوری نشاسته، افزایش در ضریب انتشار سوبسترا، حلالیت بهتر سوبسترا و محصولات و ویسکوزیته پایین‌تر (اجازهٔ پمپاژ و مخلوط‌کردن سریع سوبسترا را می‌دهد) را به‌دنبال دارد (Kristjanson, 1989). تولید تجاری آلفاآمیلازهای مقاوم به گرما به‌طور گسترده به‌وسیلهٔ اعضای جنس باسیلوس ازجمله *Bacillus subtilis*، *Bacillus stearothermophilus*، *Bacillus licheniformis* و *Bacillus amyloliquefaciens* صورت گرفته است (Souza, 2010). با توجه به اهمیت صنعتی آمیلازها، در سال‌های اخیر، جداسازی سویه‌های باکتریایی جدید با ویژگی‌های مطلوب بسیار مهم قرار گرفته است. تولید آلفاآمیلازهای میکروبی به میزان زیادی تحت تأثیر ترکیبات محیط کشت ازجمله منابع کربن و نیتروژن، مواد معدنی و همچنین عوامل فیزیکی همچون pH و دمای انکوباسیون قرار دارد (Babu & Satyanarayana, 1995). در مقایسه با میکروارگانیسم‌های مزوفیل و حتی سرمادوست، مطالعات کمتری دربارهٔ جداسازی و غربالگری سویه‌های گرمادوست، محیط رشدشان و نیز بهینه‌سازی تولید آنزیم آنها صورت گرفته است (Asgher *et al.*, 2007).

هدف این مطالعه جداسازی و شناسایی سویه‌های باکتریایی گرمادوست از چشمه‌های آب گرم استان کرمان، به‌منظور تولید آنزیم آلفاآمیلاز با قابلیت استفاده در کاربردهای مختلف صنعتی، بوده است. در این مطالعه شرایط بهینه برای تولید آنزیم به‌دست‌آمده نیز تعیین شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

در این تحقیق، چشمه‌های آب‌گرم روستای گُروه از توابع بخش جبالبارز شهرستان جیرفت در استان کرمان جهت نمونه‌برداری انتخاب شدند. نمونه‌های آب و رسوبات از دو چشمهٔ موجود در این منطقه با دمای تقریبی ۷۰ درجهٔ سانتی‌گراد، در داخل فالکون‌های استریل جمع‌آوری شد و به‌منظور حفظ دمای موجود در چشمه‌ها، فالکون‌ها در داخل فلاسک به آزمایشگاه منتقل شدند.

جداسازی و غربال‌گری سویه‌های باکتریایی مولد آلفاآمیلاز

به‌منظور جداسازی سویه‌های باکتریایی با توانایی هیدرولیز نشاسته، یک میلی‌لیتر از نمونه‌های جمع‌آوری شده پس‌از رقیق‌سازی متوالی به محیط‌های نشاسته آگار حاوی یک‌درصد نشاستهٔ محلول، ۰/۲ درصد عصارهٔ مخمر، ۰/۵ درصد پپتون، ۰/۱ درصد سولفات منیزیم، ۰/۱ درصد سدیم‌کلرید و ۰/۰۲ درصد کلسیم کلرید و ۱/۵ درصد آگار تلقیح و این محیط‌ها ۷۲ ساعت در دستگاه انکوباتور با دمای ۵۵ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شدند (Oziengbe & Onilude, 2012). بعد از این مدت، تعدادی از کلنی‌های رشدیافته روی این محیط‌ها انتخاب و مجدداً روی محیط نشاسته آگار کشت داده شدند و ۷۲ ساعت در ۵۵ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از گذشت ۷۲ ساعت، پلیت‌ها در محلول لوگول غوطه‌ور شدند و کلنی‌های دارای هاله شفاف به منزلهٔ سویهٔ مولد آلفاآمیلاز شناخته شدند (Afrisham *et al.*, 2016; Ahmadi *et al.*, 2010). براین‌اساس، از بین این کلنی‌

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-03-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1396.4.4.1.8]
[DOI: 10.29252/nbr.4.4.288]

های جداشده، سویهٔ AT59 براساس قطر هالهٔ ناشی از هیدرولیز نشاسته به‌مثابهٔ سویهٔ برتر انتخاب و جهت مطالعات آنزیمی استفاده شد.

شناسایی سویهٔ باکتریایی جداشده

به‌منظور شناسایی نسبی سویه‌های جدا شده، تعدادی از آزمون‌های بیوشیمیایی-میکروبی از جمله رنگ‌آمیزی گرم، آزمون KOH، آزمون کاتالاز، آزمون هیدرولیز ژلاتین، آزمون هیدرولیز کازئین، آزمون مصرف سیترات و آزمون TSI براساس کتاب سیستماتیک باکتری‌شناسی برگی انجام شد (Sneath *et al.*, 1986). شناسایی مولکولی باکتری با تکثیر قسمتی از ژن 16S rDNA توسط پرایمرهای Forward: 5'-AGTTTGATCC-TGGCTCCAG-3′ با Tm=53.7ºC و پرایمر Reverse -5'- GGCTACCTTGTTACGACTT- 3′ با Tm = 53.4 ºC انجام شد (Badoei-Dalfard *et al*., 2016). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، شامل ۲ میکرولیتر DNA الگو (10 mM)، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر (۵۰ پیکومول)، ۲ میکرولیتر dNTP (10 mM)، ۱ میکرولیتر (50 mM) $MgCl_2$، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10x)، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (5u/ml) خریداری‌شده از شرکت سیناژن و ۱۶/۳ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه با برنامهٔ ذیل انجام شد (Badoei-Dalfard *et al*., 2016): ۱) دمای اولیه ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه، ۲) ۵۲ درجهٔ سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه، ۳) ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد، ۹۰ ثانیه، ۴) برای تکثیر نهایی ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد، برای مدت ۸ دقیقه. محصول PCR پس از الکتروفورز ژل آگارز یک‌درصد با استفاده از کیت استخراج DNA خالص‌سازی شد (Ramezani-Pour *et al.*, 2015; Azadian *et al.*, 2016). سپس، توالی DNA با استفاده از توالی‌یاب DNA شرکت Bioneer، واقع در کره جنوبی تعیین شد. شباهت توالی نوکلئوتیدهای ژن 16S rDN سویهٔ هیدرولیزکننده به‌کمک نرم‌افزار BLAST با توالی‌های ثبت‌شده در پایگاه اطلاعاتی ژنوم Gene Bank مقایسه شد. به این ترتیب، نزدیک‌ترین سویه‌ها با ترادف 16S rDNA با سویه تعیین شد. همچنین، توالی به‌دست‌آمده در این پژوهش در بانک ژنی NCBI ثبت و شمارهٔ دستیابی ژنی مربوط (MG192311) دریافت شد. درخت فیلوژنی توالی سویه با توالی حاصل از جست‌وجو در پایگاه اطلاعاتی Gene Bank به‌کمک نرم‌افزار MEGA4 با روش neighbor joining ترسیم شد (Tamura *et al.*, 2007).

محیط تولید آنزیم

در ابتدا، یک لوپ پر از کلنی باکتری مورد نظر به ۲۰ میلی‌لیتر محیط نوترینت براث تلقیح و برای ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس، ۱۰ درصد (۲ میلی‌لیتر) از محیط‌کشت ۲۴-۱۸ ساعته به محیط تولید حاوی یک گرم نشاسته، یک گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات، ۲ گرم تریپتون، ۲ گرم سولفات آمونیوم، ۰/۰۵ گرم سولفات‌منیزیم، ۰/۰۵ گرم کلسیم کلرید و ۳/۱۳ گرم دی‌سدیم‌هیدروژن فسفات اضافه و ۷۲ ساعت در دمای ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد با دور ۱۶۰ rpm انکوبه شد (Samie *et al.*, 2012).

رسم منحنی استاندارد گلوکز

برای اندازه‌گیری مقدار گلوکز تولیدشده درنتیجهٔ فعالیت آلفاآمیلاز، از منحنی استاندارد گلوکز استفاده می‌شود. برای رسم این منحنی، ابتدا محلول استوک ۰/۱ درصد از گلوکز در آب مقطر تهیه شد، سپس در داخل ۵ لولهٔ آزمایش حجم‌های ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶ و ۰/۸ میلی‌لیتر از این محلول ریخته‌شد و با استفاده از آب مقطر به حجم یک میلی‌لیتر رسانده شد. همچنین در یک لولهٔ یک میلی‌لیتر آب مقطر به‌مثابهٔ شاهد ریخته شد. به هر کدام از لوله‌ها ۲ میلی‌لیتر از معرف دی نیتروسالیسیلیک (DNS) اضافه، به‌خوبی تکان داده شد و سپس مخلوط حاصل ۵ دقیقه درآب جوش قرار گرفت. پس‌از سردشدن محتوای لوله‌ها در دمای اتاق، به هر کدام از لوله‌ها ۷ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و جذب نوری هر کدام از مخلوط‌ها در ۵۴۰ نانومتر محاسبه شد. جذب مخلوط‌های حاوی گلوکز از جذب نمونهٔ شاهد کم شد و درنهایت، منحنی استاندارد گلوکز برحسب غلظت گلوکز (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و جذب در ۵۴۰ نانومتر رسم شد (Miller, 1959).

سنجش فعالیت آلفاآمیلاز

به‌منظور تأیید خاصیت هیدرولیزکنندگی نشاسته و تعیین میزان تولید آنزیم آلفاآمیلاز، سنجش فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز براساس روش برن فلد (Bernfeld, 1955) و با استفاده از معرف دی نیترو سالیسیلیک انجام گرفت. برای این منظور، ابتدا از باکتری انتخاب‌شده در ۲۰ میلی‌لیتر محیط نوترینت-براث پیش‌کشت تهیه‌شد. سپس، میزان ۲ میلی‌لیتر از پیش‌کشت باکتری به ۲۰ میلی‌لیتر محیط

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-03-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1396.4.4.1.8]
[DOI: 10.29252/nbr.4.4.288]

تولید تلقیح و ۷۲ ساعت در انکوباتور با دمای ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه شد. ۵ میلی‌لیتر از محیط حاوی باکتری برداشته شد و در rpm ۱۰۰۰۰، به‌مدت ۱۰ دقیقه و دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. محلول رویی فاقد باکتری به‌مثابهٔ آنزیم مورد استفاده قرارگرفت. سپس، ۵۰۰ میلی‌لیتر از محلول رویی به ۵۰۰ میکرولیتر نشاسته یک‌درصد محلول در بافر سدیم فسفات (pH=۷، ۱۰۰ میلی‌مولار) به عنوان سوبسترا اضافه شد. جهت انجام واکنش، مخلوط حاصل در ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه گرماگذاری شد. در مرحلهٔ بعد، واکنش آنزیماتیک با اضافه‌کردن یک میلی‌لیتر از DNS به مخلوط و قراردادن آن به مدت ۵ دقیقه در آب جوش پایان یافت. این وضعیت به‌مثابهٔ وضعیت استاندارد در نظر گرفته شد. با استفاده از منحنی استاندارد گلوکز غلظت قندهای احیاکننده تولیدشده درنتیجهٔ فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز محاسبه شد و به این ترتیب مقدار فعالیت آنزیمی به‌دست آمد. بر این اساس، یک واحد فعالیت آنزیمی مقدار آنزیمی است که در یک دقیقه، یک میکرومول سوبسترا را به یک میکرومول محصول (گلوکز) تبدیل کند.

بررسی تولید آنزیم آلفاآمیلاز در حضور متغیرهای مختلف

اثر منابع مختلف کربن بر تولید آنزیم آلفاآمیلاز

برای شناسایی منبع کربن مناسب برای تولید آنزیم آلفاآمیلاز، سویهٔ باکتری جداشده در حضور منابع باکتریایی مختلف کربن شامل گلوکز، گالاکتوز، مالتوز، فروکتوز و نشاسته هرکدام در غلظت یک گرم بر لیتر به‌مدت ۴۸ ساعت و در دمای ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد کشت داده شد (Amoozegar *et al.*, 2013). محیط پایه حاوی یک گرم پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات، ۲ گرم تریپتون، ۲ گرم سولفات‌آمونیوم، ۰/۰۵ گرم سولفات منیزیم، ۰/۰۵ گرم کلسیم‌کلرید و ۳/۱۳ گرم دی‌سدیم هیدروژن فسفات به‌ازای یک لیتر آب مقطر بود. بعد از این مدت، ۵ میلی‌لیتر از این محیط‌ها در rpm۱۰۰۰۰، به‌مدت ۱۰ دقیقه و دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد سانتریفیوژ شده و محلول‌های رویی به‌منزلهٔ آنزیم مورد استفاده قرار گرفت. سنجش فعالیت آنزیمی مطابق با شرایط استاندارد در ۵۴۰ نانومتر صورت گرفت. وزن تر رسوب باکتری‌ها برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، به‌منزلهٔ معیاری از میزان رشد اندازه‌گیری شد. تمامی آزمایش‌ها سه بار تکرار شد و میانگین گرفته شد.

اثر منابع مختلف نیتروژن بر تولید آنزیم آلفاآمیلاز

در این بررسی، ۱۰ درصد از پیش‌کشت ۲۴-۱۸ ساعتهٔ باکتری موردنظر به محیط‌های حاوی غلظت ۲ گرم بر لیتر از منابع مختلف نیتروژن شامل پپتون، عصارهٔ مخمر و ژلاتین (منابع نیتروژن آلی) و آمونیوم کلراید، سولفات آمونیوم و سدیم نیترات (منبع نیتروژن غیرآلی) و محیط بدون منبع اضافه شد (Ramachandran *et al.*, 2004). محیط پایهٔ حاوی یک گرم نشاسته، یک گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات، ۰/۰۵ گرم سولفات منیزیم، ۰/۰۵ گرم کلسیم‌کلرید و ۳/۱۳ گرم دی‌سدیم هیدروژن فسفات به‌ازای یک لیتر آب مقطر بود. محیط‌ها ۴۸ ساعت در دمای ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از ۴۸ ساعت، ۵ میلی‌لیتر از محیط‌ها سانتریفیوژ شد و سنجش فعالیت آنزیمی محلول‌های رویی در طول‌موج ۵۴۰ نانومتر انجام گرفت. سپس، محلول‌های رویی دور ریخته شدند و وزن رسوبات باکتریایی اندازه‌گیری شد.

تولید آنزیم در حضور ترکیبات یونی مختلف

برای بررسی اثر یون‌های فلزی مختلف بر تولید آنزیم، غلظت یک گرم بر لیتر از پتاسیم‌کلرید، سدیم‌کلرید، کلسیم‌کلرید و سولفات‌منیزیم به محیط‌کشت بدون یون فلزی اضافه‌شد (Amoozegar *et al.*, 2013). محیط پایهٔ حاوی یک گرم نشاسته، ۲ گرم تریپتون به‌ازای یک لیتر آب‌مقطر بود. بعداز ۴۸ ساعت، انکوباسیون در دمای ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد، ۵ میلی‌لیتر از هرکدام از محیط‌های حاوی باکتری رشدیافتهٔ سانتریفیوژشده و مایع رویی به‌منظور سنجش فعالیت آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت. همچنین، وزن تر رسوبات باکتریایی به‌دست‌آمده اندازه‌گیری شد.

بررسی اثر pH بر تولید آنزیم آلفاآمیلاز

اثر pH بر تولید آنزیم آلفاآمیلاز، با تنظیم pH محیط مایع اختصاصی در محدودهٔ ۹-۵ سنجیده شد (Aullybux & Puchooa, 2013). محیط پایه حاوی یک گرم نشاسته، یک گرم پتاسیم دی‌هیدروژن‌فسفات، ۲ گرم تریپتون، ۲ گرم سولفات-آمونیوم، ۰/۰۵ گرم سولفات منیزیم، ۰/۰۵ گرم کلسیم‌کلرید و ۳/۱۳ گرم دی‌سدیم‌هیدروژن فسفات به‌ازای یک لیتر آب مقطر است. بعد از گذشت ۴۸ ساعت از رشد سویه‌های باکتریایی در این محیط‌ها، ۵ میلی‌لیتر از محیط‌ها سانتریفیوژ شد و فعالیت آنزیمی مایع سنجش شد و وزن تر رسوبات باکتریایی نیز اندازه‌گیری شد.

بررسی فعالیت دمایی آنزیم آلفاآمیلاز

برای بررسی فعالیت دمایی آنزیم آلفاآمیلاز، مخلوط ۰/۵ میلی-لیتر سوپ باکتریایی حاوی آنزیم و ۰/۵ میلی‌لیتر سوبسترا در محدودهٔ دمایی ۹۰-۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شد. سپس، با اضافه‌کردن معرف DNS واکنش متوقف شد و پس از قراردادن مخلوط واکنش در دستگاه بن‌ماری به مدت ۵ دقیقه، جذب مخلوط در ۵۴۰ نانومتر خوانش شد. فعالیت باقی‌ماندهٔ آنزیم به‌صورت درصد محاسبه شد (Prakash *et al.*, 2009).

بررسی پایداری دمایی آنزیم آلفاآمیلاز

برای اندازه‌گیری میزان پایداری دمایی آنزیم، ابتدا ۰/۵ میلی‌لیتر سوپ باکتریایی حاوی آنزیم به‌تنهایی به‌مدت یک ساعت در دماهای ۹۰-۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد (Karakaş *et al.*, 2010). سپس، به نمونه‌ها ۰/۵ میلی‌لیتر سوبسترا اضافه و مخلوط حاصل در شرایط سنجش انکوبه شد. درنهایت، فعالیت باقی‌ماندهٔ سوپ باکتریایی حاوی آنزیم، با استفاده از معرف دی نیتروسالیسیلیک‌اسید و سپس خوانش جذب مخلوط واکنش در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

نتایج

غربال‌گری و شناسایی سویه‌های باکتریایی مولد آلفاآمیلاز

جهت غربالگری باکتری مولد آلفاآمیلاز گرمادوست، آزمون هیدرولیز نشاسته با استفاده از معرف لوگول روی محیط نشاسته-آگار انجام گرفت و هاله شفاف اطراف کلنی باکتری، که نشان-دهندهٔ تولید آنزیم آلفاآمیلاز و هیدرولیز نشاسته بود، مشاهده شد (شکل ۱). از ۶۵ سویهٔ باکتریایی جداشده، تعداد ۱۵ مورد توانایی تولید آنزیم آلفاآمیلاز قابل ملاحظه‌ای را داشتند. به‌منظور شناسایی ابتدایی سویه‌های باکتریایی مولد آلفاآمیلاز، برخی آزمون‌های بیوشیمیایی انجام گرفت و مشاهده شد سویه‌های باکتریایی جداشده گرم مثبت و دارای فرم باسیل هستند. نتایج مربوط به آزمون‌های بیوشیمیایی در جدول ۱ آمده است. مقایسهٔ توالی ژن 16S rDNA این سویهٔ باکتریایی با گونه‌های نزدیک از نظر توالی ژن موردنظر موجود در NCBI تحت‌بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از تطبیق توالی و درخت فیلوژنتیکی نشان داد که گونه پیش‌گفته به *Bacillus licheniformis* نزدیک است. توالی نوکلئوتیدی ارائه‌شده در بانک ژنی NCBI با شماره دسترسی MG192311 ثبت شده است.

اثر منابع مختلف کربن بر تولید آنزیم آلفاآمیلاز

اثر منابع مختلف کربن بر تولید آنزیم آلفاآمیلاز بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون تحت بررسی قرار گرفت و مشخص شد تولید آنزیم آلفاآمیلاز AT59 در حضور منابع مختلف کربن شامل نشاسته، مالتوز، فروکتوز و گلوکز افزایش یافته و در حضور نشاسته بیشترین مقدار بوده است، ولی گالاکتوز تأثیر ناچیزی بر میزان تولید آنزیم داشته است. حداکثر رشد این سویه نیز در حضور منبع گلوکز به‌دست آمد. نتایج بهدست‌آمده در شکل ۳ نشان داده شده است.

اثر منابع مختلف نیتروژن بر تولید آنزیم آلفاآمیلاز

بررسی تولید آنزیم آلفاآمیلاز AT59 در حضور منابع مختلف نیتروژن شامل پپتون، عصارهٔ مخمر، ژلاتین، آمونیوم‌کلراید، سولفات‌آمونیوم و سدیم‌نیترات مشخص کرد تولید آنزیم در این سویه در حضور اکثر منابع نیتروژنی افزایش یافته است و ژلاتین تولید آنزیم را تا بیش از سه برابر افزایش داده است. همچنین، سویهٔ مورد نظر حداکثر میزان رشد را در حضور عصاره مخمر نشان داد. نتایج گفته‌شده در شکل ۴ آمده است.

تولید آنزیم آلفاآمیلاز در حضور ترکیبات یونی مختلف

اثر یون‌های معدنی مختلف بر تولید آنزیم، با افزودن ترکیبات یونی مختلف شامل پتاسیم‌کلرید، سولفات‌منیزیم، سدیم‌کلرید و کلسیم‌کلرید هر کدام با غلظت ۰/۱ درصد، به محیط پایهٔ بدون یون و سپس تلقیح باکتری‌های مورد نظر، بعد از گذشت ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد تحت بررسی قرار گرفت. نتایج در شکل ۵ آمده است که نشان می‌دهد تولید آنزیم در حضور یون منیزیم بیشترین مقدار و در حضور یون‌های سدیم و پتاسیم کمترین مقدار بوده است. کمترین میزان رشد این باکتری نیز در محیط حاوی پتاسیم‌کلرید و بیشترین مقدار در حضور کلریدسدیم مشاهده شد.

بررسی تولید آنزیم آلفاآمیلاز در حضور pHهای مختلف

در این بررسی، تولید آنزیم سویهٔ موردنظر در محیط‌های مایع حاوی نشاسته با pHهای مختلف در محدودهٔ ۹-۵ تحت بررسی قرار گرفت و با توجه به نتایج شکل ۶ مشخص شد تولید آنزیم با افزایش pH محیط کاهش پیدا کرده و pH=۵ مناسب‌ترین pH برای تولید آنزیم است. همچنین رشد این باکتری نیز به‌طورکلی با افزایش pH محیط کاهش پیدا کرده و در محیط دارای pH=۵ و

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-03-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1396.4.4.1.8]
[DOI: 10.29252/nbr.4.4.288]

جدول ۱- آزمون‌های بیوشیمیایی برای شناسایی سویه‌های باکتریایی.

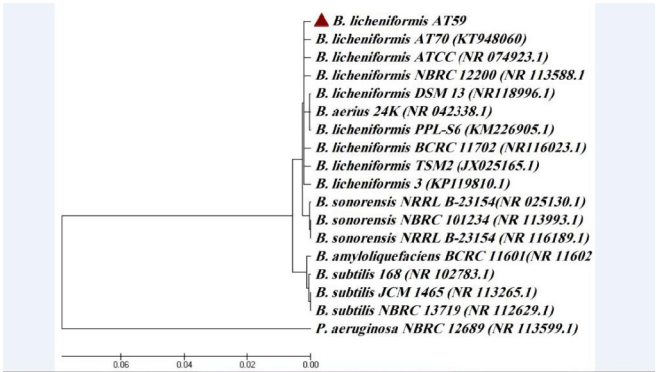
Table 1. Biochemical tests for identification of the bacterial strains.

باکتری	رنگ‌آمیزی گرم	KOH	هیدرولیز کازئین در محیط اسکیم-میلک آگار	هیدرولیز کازئین در محیط کازئین-آگار	هیدرو لیز ژلاتین	کاتالاز	مصرف سیترات	TSI	قطر هاله حاصل از هیدرولیز نشاسته (سانتی متر)
AT25	باسیل و گرم مثبت	-	-	-	-	+	-	قلیا/ قلیا	۰/۳
AT55	باسیل و گرم مثبت	-	-	+	-	+	-	قلیا /قلیا	۰/۳
AT56	باسیل و گرم مثبت	-	-	+	-	+	-	قلیا/اسید	۰/۱
AT57	باسیل و گرم مثبت	-	-	+	-	+	-	قلیا/ قلیا	۰/۲
AT58	باسیل و گرم مثبت	-	-	+	-	+	-	قلیا / قلیا	۰/۳
AT59	باسیل و گرم مثبت	-	-	+	-	+	-	اسید/ قلیا	۰/۶
AT60	باسیل و گرم مثبت	-	-	+	-	+	-	قلیا/ اسید	۰/۱
AT61	باسیل و گرم مثبت	-	-	+	-	+	-	قلیا/ قلیا	۰/۱
AT62	باسیل و گرم مثبت	-	-	+	-	+	-	قلیا / قلیا	۰/۱
AT63	باسیل و گرم مثبت	-	-	-	-	+	-	اسید/ قلیا	۰/۲
AT64	باسیل و گرم مثبت	-	-	+	-	-	-	اسید/ اسید	۰/۲
AT65	باسیل و گرم مثبت	-	-	+	-	+	-	قلیا/ اسید	۰/۱
AT66	باسیل و گرم مثبت	-	-	-	-	+	-	قلیا /قلیا	۰/۴
AT67	باسیل و گرم مثبت	-	-	+	-	-	-	اسید/ قلیا	۰/۳
AT68	باسیل و گرم مثبت	-	-	-	-	+	-	اسید/ اسید	۰/۳



شکل ۱- بررسی تولید آنزیم آلفاآمیلاز سویهٔ منتخب با استفاده از آزمون هیدرولیز نشاسته. (ایجاد هاله شفاف اطراف ناحیه رشد باکتری نشان دهنده تولید آنزیم آلفاآمیلاز و هیدرولیز نشاسته است).

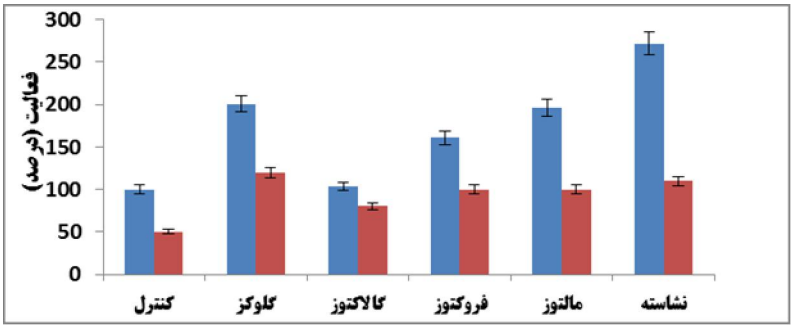
Fig. 1. Investigation of alpha-amylase production from the selected strain by using starch hydrolysis test. (Clear zone around bacterium growth indicates alpha-amylase production and starch hydrolyses).



شکل ۲- درخت فیلوژنی سویهٔ باسیلوس لکنی فورمیس AT59. سودوموناس ایروزینا بعنوان گروه خارجی استفاده شد. درخت بر اساس روش neighbor-joining تولید شده و مقیاس‌ها بر اساس درصدی از هزار تکرار بیان شده است.

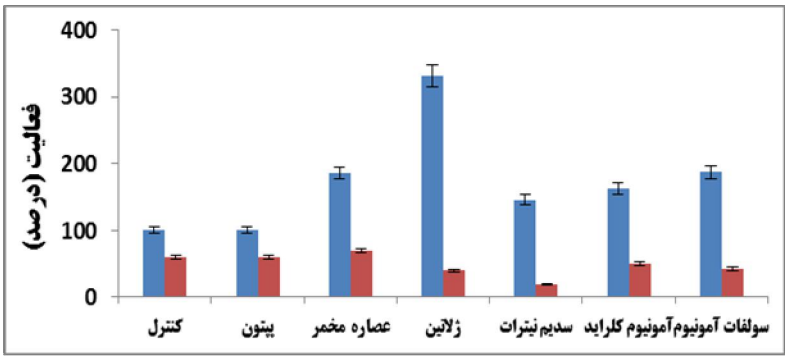
Fig. 2. The phylogenetic tree of *Bacillus licheniformis* AT59. *P. aeruginosa* NBRC 12689 was used as outgroup. The tree was generated using the neighbor-joining method. Bootstrap values expressed as percentages of 1000 replications.

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-03-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1396.4.4.1.8]
[DOI: 10.29252/nbr.4.4.288]



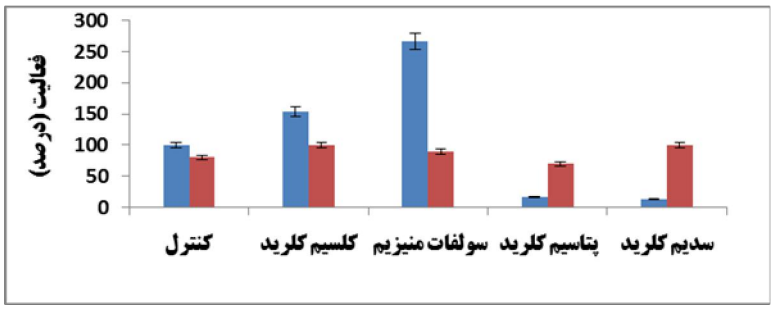
شکل ۳- بررسی تولید آنزیم آلفاآمیلاز در حضور منابع مختلف کربن (آبی) و وزن تر (قرمز) (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر).

Fig. 3. Investigation of alpha-amylase production in different carbon sources (blue) and wet mass (red) (mg/ml)



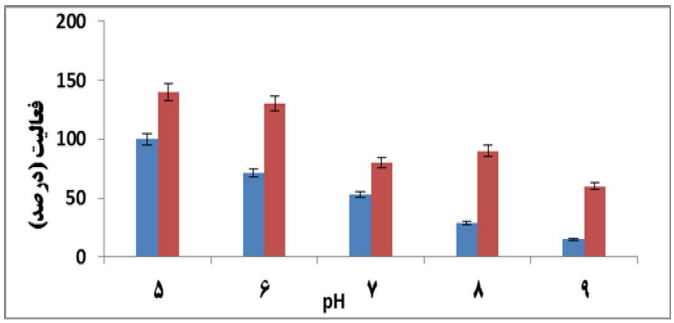
شکل ٤- بررسی تولید آنزیم آلفاآمیلاز در حضور منابع مختلف نیتروژن (آبی) و وزن تر (قرمز) (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر).

Fig. 4. Investigation of alpha-amylase production in various nitrogen sources (blue) and wet mass (red) (mg/ml).



شکل ٥- بررسی تولید آنزیم آلفاآمیلاز در حضور ترکیبات‌یونی مختلف (آبی) و وزن تر (قرمز) (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر).

Fig. 5. Investigation of alpha-amylase production in various ion compounds (blue) and wet mass (red) (mg/ml).



شکل ٦- بررسی تولید آنزیم آلفاآمیلاز در حضور pHهای مختلف (آبی) و وزن تر (قرمز) (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر).

Fig. 6. Investigation of alpha-amylase production in various pH (blue) and wet mass (red) (mg/ml).

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-03-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1396.4.4.1.8]
[DOI: 10.29252/nbr.4.4.288]

pH=۹ به‌ترتیب بیشترین و کمترین میزان رشد را نشان داده است.

فعالیت و پایداری آنزیم آلفاآمیلاز در دماهای انکوباسیون مختلف

دما ازجمله مهم‌ترین عوامل اثرگذار بر ساختار ذاتی یک آنزیم است. ازآن‌جاکه اکثر فرآیندهای صنعتی در دماهای بالا انجام پذیرند، یافتن آنزیم‌هایی که در دماهای بالا قادرند ساختار خود را حفظ کنند و فعال بمانند، اهمیت زیادی دارد. شکل‌های ۷ و ۸ نتایج میزان فعالیت و پایداری آلفاآمیلاز تولیدشده توسط AT59 در دماهای مختلف را نشان می‌دهد. این آنزیم در دماهای مختلف فعالیت و پایداری خوبی نشان داده است. بیشترین فعالیت و پایداری دمایی این آنزیم به ترتیب در دمای ۸۰ و ۷۰ درجه به‌دست آمد.

بحث

ازآن‌جاکه اکثر فرایندهای صنعتی معمولاً در دماهای بالا انجام پذیرند، استفاده از آلفاآمیلازهای گرمادوست، که توانایی فعالیت و حفظ ساختار خود در این دماها را دارند، می‌تواند جهت پیشبرد هرچه بیشتر این فرایندها کمک‌کننده باشد (Bouzas *et al*., 2006). امروزه، مفیدبودن کاربرد آلفاآمیلازهای گرمادوست در صنایع مختلف از جمله نساجی، فراوری مواد غذایی، مواد شوینده و به‌ویژه نشاسته جهت انجام هم‌زمان فرایند مایع‌سازی و ژلاتیناسیون نشاسته و کاهش هزینه‌های خنک‌کردن، اثبات شده است (Abdel-Fattah *et al*., 2012; Antranikian & Egor-ova, 2007; Zeikus *et al*., 1998). در این پژوهش، به‌منظور جداسازی و غربال‌گری باکتری‌های مولد آلفاآمیلاز گرمادوست، چشمهٔ آب گرم گُروه با دمای تقریبی ۷۰ درجهٔ سانتی‌گراد واقع در استان کرمان جهت نمونه‌برداری انتخاب شد. جهت غربال‌گری از محیط نشاسته-آگار استفاده شد و آزمون هیدرولیز نشاسته انجام گرفت. کلنی‌های دارای هالهٔ شفاف به‌منزلهٔ سویه‌های تولیدکنندهٔ آلفاآمیلاز گرمادوست شناخته شده‌اند و براساس قطر هاله‌های ایجادشده سویهٔ AT59، سویهٔ برتر جهت انجام مطالعات آنزیمی در نظر گرفته شد. به‌طور مشابه، در تحقیق Fooladi و Sajjadian (2010)، به‌منظور دستیابی به سویه‌های مولد آلفا آمیلاز مقاوم به حرارت، نمونه‌های جمع‌آوری شده از سه چشمهٔ آب گرم محلات، لاریجان و مشکین شهر تحت تحلیل قرارگرفت و کلنی باکتریایی با خاصیت هیدرولیزکنندگی بالا از چشمهٔ آب گرم مشکین‌شهر جداسازی شد. Asoodeh و همکاران (2013)، سویه‌های باکتریایی مولد آلفاآمیلاز گرمادوست از چشمهٔ آب گرم دیگ رستم با pH=۷/۲ و دمای ۵۵ درجه در جنوب ایران جداسازی کردند. با توجه به پژوهش‌های صورت‌گرفته می‌توان نتیجه گرفت چشمه‌های آب گرم ایران ذخایر میکروبی بزرگی دارند و می‌توانند به‌مثابهٔ منابع محصولات بیولوژیکی مختلف مانند آنزیم‌ها استفاده شوند (Fooladi & Sajjadian, 2010). علاوه‌براین، گزارشی مبنی بر نمونه‌برداری از یک چشمهٔ آب گرم واقع در هند جهت دست‌یابی به باکتری‌های مولد آلفاآمیلاز گرمادوست، به‌کوشش Sen و همکاران (2014) منتشر شده است. جداسازی باکتری‌های گرمادوست مولد آلفاآمیلاز از یک چشمهٔ آب گرم واقع در ترکیه صورت گرفته است (Baysal *et al*., 2003). به‌منظور شناسایی ابتدایی باکتری‌های مولد آلفاآمیلاز گرمادوست جداشده، تعدادی از آزمون‌های بیوشیمیایی از قبیل رنگ‌آمیزی گرم، کاتالاز، هیدرولیز کازئین، هیدرولیز ژلاتین و... انجام و مشخص شد باکتری‌های مورد نظر به شکل باسیل و گرم مثبت هستند. امروزه، تولید تجاری آلفاآمیلازها با استفاده از اعضای جنس باسیلوس صورت می‌گیرد (Pandey *et al*., 2001). در مطالعه‌ای، آلفاآمیلاز مقاوم به گرما از سویهٔ نسبتا گرمادوست از *Bacillus subtilis* به نام JS-2004 جدا شد (Asgher *et al*., 2007). Mahdavi و همکاران (2010) آلفا آمیلازی با فعالیت دمایی وسیع را از سویه‌ای از *Bacillus cereus* به نام GUF8 جداسازی و تعیین خصوصیت کردند. بااین‌حال، علاوه‌بر باسیلوس‌ها، جنس‌های باکتریایی دیگر نیز می‌توانند تولیدکنندگان آلفاآمیلازهای مقاوم به گرما و گرمادوست شناخته شوند، تولید آلفاآمیلاز نمک-گرمادوست از *Neste-renkonia strain* F به‌قلم Amoozegar و همکاران (2013) گزارش شد. ازجمله مهم‌ترین عوامل اثرگذار بر متابولیسم میکروبی منبع کربن است که می‌تواند بازده تولید آنزیم خارج‌سلولی را تحت تأثیر قرار دهد (Bozic *et al*., 2011). بنابراین، در این پژوهش، به‌منظور دست‌یابی به محیط بهینه، تولید آنزیم آلفاآمیلاز AT59 در حضور منابع مختلف کربن شامل نشاسته، گلوکز، فروکتوز، مالتوز و گالاکتوز هر کدام با غلظت یک گرم بر لیتر بررسی شد. نتایج نشان داد که نشاسته مؤثرترین منبع در

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-03-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1396.4.4.1.8]
[DOI: 10.29252/nbr.4.4.288]

تولید آنزیم بوده است. در پی یافتن محیط بهینه برای تولید آلفاآمیلاز *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC23842، غلظت‌های ۲-۰/۵ از منابع مختلف کربن شامل نشاستهٔ محلول، نشاستهٔ هیدرولیزشده، گلوکز، لاکتوز و مالتوز به محیط تولید آنزیم اضافه شد و نتایج نشان داد با اضافه‌کردن یک‌درصد نشاستهٔ محلول به محیط کشت، بیشترین بازده تولید آنزیم به‌دست خواهد آمد (Gangadharan *et al.*, 2006). همچنین، در مطالعهٔ Amoozegar و همکاران (2013)، غلظت یک‌درصد نشاسته غلظت بهینه برای تولید آلفاآمیلاز *Nesterenkonia strain F* معرفی شد. همچنین، در پژوهش حاضر، محیط تولید آنزیم آلفاآمیلاز AT59 با اضافه‌کردن غلظت ۲ گرم بر لیتر از منابع نیتروژن آلی و غیرآلی شامل پپتون، عصارهٔ مخمر، ژلاتین، سدیم نیترات، سولفات‌آمونیوم و آمونیوم‌کلراید به محیط پایهٔ فاقد نیتروژن، از نظر منبع نیتروژن مورد استفاده بهینه شد. در این بررسی، تمام منابع تحت مطالعه به‌جز پپتون بر تولید آنزیم اثر افزایشی داشت و بیشترین بازده تولید در محیط حاوی ژلاتین به دست آمد. این در حالی است که در پژوهش Aiyer (2005) و Oziengbe و Onilude (2012) پپتون بهترین منبع نیتروژن آلی برای تولید آلفاآمیلاز شناخته شد. بهینه‌سازی محیط تولید آنزیم سویهٔ *Nesterenkonia* strain F در حضور منابع مختلف نیتروژن با غلظت‌های مختلف صورت گرفت و مشخص شد سویهٔ موردنظر در محیط حاوی ۰/۷۵ درصد عصاره مخمر بیشترین میزان آلفاآمیلاز را تولید کرده است (Amoozegar *et al.*, 2013). در این پژوهش، بررسی اثر یون‌های فلزی مختلف بر میزان تولید آنزیم آلفاآمیلاز AT59 به‌وسیلهٔ اضافه‌کردن غلظت ۰/۱ درصد از سولفات‌منیزیم، کلسیم‌کلرید، پتاسیم‌کلرید و سدیم‌کلرید به محیط تولید فاقد یون انجام گرفت. براساس نتایج به‌دست‌آمده، مشخص شد باوجود افزایش فراوان تولید آنزیم در حضور یون منیزیم (تا ۱/۵ برابر نمونه کنترل)، یون‌های سدیم و پتاسیم تقریباً به‌طور کامل تولید آنزیم این سویه را مهار کردند. در بررسی پراکاش و همکاران به‌منظور بهینه‌سازی محیط تولید آنزیم آلفاآمیلاز، مشخص شد یون کلسیم در غلظت ۵۰ میلی‌مولار توانسته ۲۵ درصد تولید آنزیم را افزایش‌دهد (Prakash *et al.*, 2009). در یک مطالعه، سولفات منیزیم در غلظت یک میلی‌مولار منبع بهینهٔ تولید آنزیم آلفاآمیلاز معرفی شد (Sodhi *et al.*, 2005). بالاترین سطح تولید آلفاآمیلاز *Nesterenkonia* sp. F در غلظت ۲ مولار سدیم کلرید مشاهده شد (Amoozegar *et al.*, 2013). در این پژوهش، به‌منظور تعیین pH بهینه برای تولید آنزیم آلفاآمیلاز، pH محیط تولید آنزیم در محدودهٔ ۹-۵ تنظیم شد و پس از گذشت ۴۸ ساعت از رشد باکتری در این محیط‌ها، تولید آنزیم تحت بررسی قرار گرفت و مشخص شد تولید بهینه در ۵ pH صورت گرفته است. pH بهینهٔ گزارش‌شده برای تولید آلفاآمیلاز در پژوهش‌های قبلی بالاتر از pH بهینهٔ به‌دست‌آمده در این پژوهش است (Oziengbe & Onilude, 2012; Amoozegar *et al.*, 2013; Prakash *et al.*, 2009). مطالعهٔ فعالیت و پایداری دمایی آلفاآمیلاز AT59 نشان داد این آنزیم دارای محدودهٔ وسیعی از فعالیت و پایداری در دماهای مختلف بوده و حداکثر فعالیت و پایداری این آنزیم در دمای ۸۰ و ۷۰ درجه به‌دست آمد. Abdel-Fattah و همکاران (2012) فعالیت دمایی آلفاآمیلاز سویه‌ای از *Bacillis licheniformis* را تحت بررسی قرار دادند و مشخص شد این آنزیم در محدودهٔ دمایی ۸۰-۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد بیشترین فعالیت را داشته است. در مطالعهٔ Kolcuoğlu و همکاران (2010)، دمای بهینه برای فعالیت نوعی آمیلاز مالتوژنیک و با مقاومت دمایی بالا، ۵۰ درجه معرفی شده است. Shafiei و همکاران (2012) حداکثر فعالیت و پایداری آلفاآمیلاز *Nesterenkonia* sp. *F* را به‌ترتیب در دماهای ۴۵ و۶۰-۳۵ گزارش دادند. حداکثر فعالیت و پایداری آلفاآمیلاز *Bacillus* sp. ANT-6 نیز به ترتیب در ۸۰ و ۵۰ درجه به‌دست آمد (Burhan *et al.*, 2003). خالص‌سازی و بررسی ساختاری این آنزیم در دست بررسی است. این نتایج قابلیت فراوان این آنزیم را برای استفاده در صنایع نشان می‌دهد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید باهنر کرمان به‌دلیل حمایت مالی در انجام این پروژه تشکر و قدردانی می‌کنند.

REFERENCES

Abdel-Fattah, Y.R., Soliman, N.A., El-Toukhy, N.M., El-Gendi, H. and Ahmed, R.S. 2012. Production, purification, and characterization of thermostable alpha-amylase produced by *Bacillus licheniformis* isolate AI20. – J. Chem. 13: 1-11.

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-03-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1396.4.4.1.8]
[DOI: 10.29252/nbr.4.4.288]

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-03-28]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1396.4.4.1.8]

[DOI: 10.29252/nbr.4.4.288]

Afrisham, S., Badoei-Dalfard, A., Namaki-Shoushtari, A. and Karami, Z. 2016. Characterization of a thermostable, $CaCl_2$-activated and raw-starch hydrolyzing alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* AT70: Production under solid statef-ermentation. – J. Mol. Catal. B: Enzym. 132: 98-106.

Ahmadi, A., Ghobadi, S., Khajeh, K., Nomanpour, B. and Badoei-Dalfard, A. 2010. Purification of α-Amylase from *Bacillus* sp. GHA1 and its partial characterization. – J. Iran Chem. Soc. 7: 432-440.

Aiyer, P.D. 2005. Effect of C: N ratio on alpha-amylase production by *Bacillus licheniformis* SPT 27. – African J. Biotech. 3: 519-522.

Amoozegar, M.A., Samareh-Abolhasani, B., Shafiei, M., Didari, M. and Hamedi, J. 2013. Production of halothermotolerant alpha-amylase from a moderately halophilic bacterium, *Nesterenkonia* Strain F. – Progress in Biological Sciences. 2: 85-97.

Antranikian, G. and Egorova, K. 2007. Extremophiles, a unique resource of biocatalysts for industrial biotechnology. Extremophiles. – ASM Press, Washington 361-406.

Asgher, M., Asad, M.J., Rahman, S.U. and Legge, R.L. 2007. A thermostable α-amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. – J. Food Eng. 79: 950-955.

Asoodeh, A., Alemi, A., Heydari, A. and Akbari, J. 2013. Purification and biochemical characterization of an acidophilic amylase from a newly isolated *Bacillus* sp. DR90. – Extremophiles 17: 339-348.

Aullybux, A.A. and Puchooa, D. 2013. Alpha-amylase production on low-cost substrates by *Naxibacter* sp. isolated from Mauritian soils. – Br. Microbiol. Res. J. 3: 478-491.

Azadian, F., Badoei-Dalfard, A., Namaki-Shoushtari, A. and Hassanshahian, M. 2016. Purification and biochemical properties of a thermostable, haloalkaline cellulase from *Bacillus licheniformis* AMF-07 and its application for hydrolysis of different cellulosic substrates to bioethanol prod-uction. – Mol. Bio. Res. Comm. 5: 143-155.

Babu, K.R. and Satyanarayana, T. 1995. Alpha-amylase production by thermophilic *Bacillus coagulans* in solid state fermentation. – Process Biochem. 30: 305-309.

Badoei-Dalfard, A., Karami, Z., Ramezani-Pour, N. 2016. Bench scale production of nicotinic acid using a newly isolated *Stenotrophomonas maltophilia* AC-21 producing highly-inducible and versatile nitrilase. – J. Mol. Catal. B: Enzym. 133: 552-559.

Badoei-Dalfard, A., Karami, Z., Ramezani-pour, N. 2016. Production and characterization of a nitrilase from *Pseudomonas aeruginosa* RZ44 and its potential for nitrile biotransformation. – Iranian J. Biotechnol. 14: 142-153.

Baysal, Z., Uyar, F. and Aytekin, Ç. 2003. Solid state fermentation for production of alpha-amylase by a thermotolerant *Bacillus subtilis* from hot-spring water. – Process Biochem. 38: 1665-1668.

Bernfeld, P. 1955. Amylases, α and β. – Methods Enzymol. 1: 149-158.

Bouzas, T.M., Barros-Velázquez, J. and Gonzalez Villa, T. 2006. Industrial applications of hyperthermophilic enzymes: a review. – Protein Pept. Lett. 13: 645-651.

Bozic, N., Ruiz, J., Santin, J., and Vujcic, Z. 2011. Optimization of the growth and alpha-amylase production of *Bacillus subtilis* IP 5832 in shake flask and laboratory fermenter batch cultures. – J. Serb. Chem. Soc. 76: 965-972.

Burhan, A., Nisa, U., Gökhan, C., Ömer, C., Ashabil, A., and Osman, G. 2003. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. – Process Biochem. 38: 1397-1403.

Chandra, M.S., Mallaiah, K.V., Sreenivasulu, P. and Choi, Y.L. 2010. Purification and characterization of highly thermostable alpha-amylase from thermophilic *Alicyclobacillus acidocaldarius*. Biotechnol. – Bioprocess Eng. 15: 435-440.

Fooladi, J. and Sajjadian, A. 2010. Screening the thermophilic and hyperthermophilic bacterial popu-lation of three Iranian hot-springs to detect the therm-ostable alpha-amylase producing strain. – Iran J. Med. Microbiol. 2: 46-50.

Gangadharan, D., Sivaramakrishnan, S., Nampoothiri, K.M. and Pandey, A. 2006. Solid culturing of *Bacillus amyloliquefaciens* for alpha-amylase production. – Food Technol. Biotechnol. 44: 269-274.

Haki, G.D. and Rakshit, S.K. 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a revi-ew. – Bioresour. Technol. 89: 17-34.

Karakaş, B., İnan, M. and Certel, M. 2010. Expression and characterization of *Bacillus subtilis* PY22 alpha-amylase in Pichia pastoris. – J. Mol. Catal. B: Enzym. 64: 129-134.

Kolcuoğlu, Y., Colak, A., Faiz, O. and Belduz, A.O. 2010. Cloning, expression and characterization of highly thermo-and pH-stable maltogenic amylase from a thermophilic bacterium *Geobacillus caldoxyl-osilyticus* TK4. – Process Biochem. 45: 821-828.

Kristjanson K.J. 1989. Thermophilic organisms as sour-ce of thermostable enzymes. – Trends Biotechnol. 7: 49-53.

Mahdavi, A., Hassan Sajedi, R., Rassa, M. and Jafarian, V. 2010. Characterization of an alpha-amylase with broad temperature activity from an acid-neutralizing *Bacillus cereus* strain. – Iran J. Biotechnol. 8: 103-111.

Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. – Anal. Chem. 31: 426-428.

Oziengbe, E.O. and Onilude, A.A. 2012. Production of a thermostable alpha-amylase and its assay using *Bacillus licheniformis* isolated from excavated land sites in Ibadan, Nigeria. – Bayero Journal of Pure and Applied Sciences 5: 132-138.

Pandey, A., Soccol, C.R., Rodriguez-Leon, J.A. and Nigam, P. 2001. Solid state fermentation in biotec-hnolog'y. – J. Microbiol. Methods 34: 405-423.

Prakash, B., Vidyasagar, M., Madhukumar, M.S., Muralikrishna, G. and Sreeramulu, K. 2009. Produ-

ction, purification, and characterization of two extremely halotolerant, thermostable, and alkali-stable apha-amylases from *Chromohalobacter* sp. TVSP 101. – Process Biochem. 44: 210-215.

Ramachandran, S., Patel, A.K., Nampoothiri, K.M., Francis, F., Nagy, V., Szakacs, G. and Pandey, A. 2004. Coconut oil cake-a potential raw material for the production of alpha-amylase. – Bioresour. Technol. 93: 169-174.

Ramezani-Pour, N., Badoei-Dalfard, A., Namaki-Shoushtari, A. and Karami, Z. 2015. Nitrile-metabolizing potential of Bacillus cereus strain FA12; Nitrilase production, purification, and characterization. – Bioc-atal. Biotransform. 33: 156-166

Samie, N., Noghabi, K.A., Gharegozloo, Z., Zahiri, H.S., Ahmadian, G., Sharafi, H., Behrozi, R. and Vali, H. 2012. Psychrophilic alpha-amylase from *Aeromonas veronii* NS07 isolated from farm soils. – Process Biochem. 47: 1381-1387.

Sen, S.K., Raut, S., Satpathy, S., Rout, P.R., Bandyopadhyay, B. and Mohapatra, P.K.D. 2014. Characterizing novel thermophilic amylase producing bacteria from Taptapani hot spring, Odisha, India. – Jundishapur. J. Microbiol. 7: 1-7.

Shafiei, M., Ziaee, A.A. and Amoozegar, M.A. 2012. Purification and characterization of a halophilic alpha-amylase with increased activity in the presence of organic solvents from the moderately halophilic *Nesterenkonia* sp. strain F. – Extremophiles 16: 627-635.

Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. 1986. Bergy's manual of systematic bacteriology, Vol. 2. – William and Wilkins, Baltimore, USA.

Sodhi, H.K., Sharma, K., Gupta, J.K. and Soni, S.K. 2005. Production of a thermostable alpha-amylase from *Bacillus* sp. PS-7 by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production. – Process Biochem. 40: 525-534.

Souza, P.M.D. 2010. Application of microbial alpha-amylase in industry-a review. – Braz. J. Microbiol. 41: 850-861.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. – Mol. Biol. Evol. 24: 1596-1599.

Zeikus, J.G., Vieille, C. and Savchenko, A. 1998. Thermozymes: biotechnology and structure–function relationships. – Extremophiles 2: 179-183.

*****

How to cite this article:

Afrisham, S., Badoei-Dalfard, A., Namaki-Shoushtari, A., Karami, Z. and Malekabadi, S. 2018. Isolation and Identification of *Bacillus* producing thermophilic alpha amylase: production optimization and investigation of the activity and stability of enzyme. – Nova Biologica Rep. 4: 288-298.

افریشم، س.، بدویی‌دلفارد، ا.، نمکی‌شوشتری، ع.، کرمی، ز. و ملک‌آبادی، س. ۱۳۹۶. جداسازی و شناسایی *باسیلوس* مولد آلفاآمیلاز گرمادوست: بهینه‌سازی تولید و بررسی فعالیت و پایداری دمایی. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۴: ۲۹۸-۲۸۸.

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-03-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1396.4.4.1.8]
[DOI: 10.29252/nbr.4.4.288]