

جداسازی و شناسایی باسیلوس مولد آلفا آمیلاز 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، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

*نویسنده مسئول: badoei@uk.ac.ir

چکیده. آلفا آمیلازها، مهم‌ترین و پرکاربردترین آمیلازها در صنعت نشاسته هستند. در میان آلفا آمیلازها، انواع گرمادوست به دلیل پایداری و فعالیت در دماهای بالا مهم‌ترند. این آنزیم‌ها به وسیله میکروارگانیسم‌های گرمادوست از جمله باکتری‌ها تولید می‌شوند. آلفا آمیلازهای گرمادوست در صنایع مختلف از جمله فرآوری نشاسته، مواد شوینده و سوخت زیستی کاربرد دارند. در این تحقیق، باکتری‌های مولد آلفا آمیلاز گرمادوست از چشمه‌های آب گرم روستای گروه واقع در استان کرمان شناسایی و جداسازی شدند. براساس نتایج غربالگری در محیط اختصاصی مایع و جامد، سویه AT59 به‌منزله سویه برتر انتخاب شد. بررسی‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی 16S rDNA نشان داد این سویه به جنس باسیلوس تعلق دارد و گرم مثبت، کاتالاز مثبت، هیدرولیزکننده کازئین و تخمیرکننده 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 آلفا آمیلاز سویه AT59 داشته‌اند. علاوه بر این، بیشترین تولید آنزیم این سویه در محیطی با pH ۵ به دست آمد. این آلفا آمیلاز به ترتیب بیشترین فعالیت و پایداری را در دماهای ۸۰ و ۷۰ درجه سانتی‌گراد داشته‌اند. این یافته‌ها پیشنهاد می‌کند این آنزیم پتانسیل زیادی برای استفاده در صنعت نشاسته دارد.

واژه‌های کلیدی. آنزیم‌های گرمادوست، تولید، چشمه آب گرم، 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 Goroooh 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 °C, respectively. These findings suggested that this enzyme has a considerable potential for use in starch industry.

Keywords. hot spring, production, screening, thermophilic enzymes

مقدمه

میکروارگانسیم‌های گرمادوست موجوداتی هستند که با رشد بهینه در دماهای بالا (بالای ۵۵ درجه سانتی‌گراد) سازگارند و از مکان‌های دریایی و خاکی با درجه حرارت بالا جدا شده‌اند. رایج‌ترین این مکان‌ها چشمه‌های آب گرم و بیابان‌ها هستند (Antranikian & Egorova, 2007). میکروارگانسیم‌های 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 میکروارگانسیم‌های مزوفیل کاتالیز کنند. علاوه بر این، آنزیم‌های به دست آمده 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 درباره میکروارگانسیم‌های 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). آلفا آمیلازها، یکی از رایج‌ترین و مهم‌ترین آمیلازهای صنعتی هستند که به طور تصادفی پیوند $\alpha(1 \rightarrow 4)$ بین واحدهای گلوکز مجاور هم را در زنجیره خطی آمیلوز در کربوهیدرات نشاسته را می‌شکافند (Chandra et al., 2010). تولید آلفا آمیلازهای گرمادوست در صنایع مختلف، خطر آلودگی ناشی از میکروارگانسیم‌های مزوفیل و نیز هزینه‌های سرد کردن اضافی را کاهش می‌دهد و به طور ویژه در صنعت فرآوری نشاسته، افزایش در ضریب انتشار سوبسترا، حلالیت بهتر سوبسترا و محصولات و ویسکوزیته پایین تر (اجازه پمپاژ و مخلوط کردن سریع سوبسترا را می‌دهد) را به دنبال دارد (Kristjanson, 1989). تولید تجاری آلفا آمیلازهای مقاوم به گرما به طور گسترده به وسیله اعضای جنس باسیلوس از جمله *Bacillus subtilis*، *Bacillus stearothermophilus* و *Bacillus licheniformis* 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 آلفا آمیلازهای میکروبی به میزان زیادی تحت تأثیر ترکیبات

محیط کشت از جمله منابع کربن و نیتروژن، مواد معدنی و همچنین عوامل فیزیکی همچون pH و دمای انکوباسیون قرار دارد (Babu & Satyanarayana, 1995). در مقایسه با میکروارگانسیم‌های مزوفیل و حتی سرمادوست، مطالعات کمتری درباره 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، به منظور تولید آنزیم آلفا آمیلاز با قابلیت استفاده در کاربردهای مختلف صنعتی، بوده است. در این مطالعه شرایط بهینه برای تولید آنزیم به دست آمده نیز تعیین شد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

در این تحقیق، چشمه‌های آب گرم روستای گروه از توابع بخش جبالبارز شهرستان جیرفت در استان کرمان جهت نمونه برداری انتخاب شدند. نمونه‌های آب و رسوبات از دو چشمه موجود در این منطقه با دمای تقریبی ۷۰ درجه سانتی‌گراد، در داخل فالدکون‌های استریل جمع‌آوری شد و به منظور حفظ دمای موجود در چشمه‌ها، فالدکون‌ها در داخل فلاسک به آزمایشگاه منتقل شدند.

جداسازی و غربالگری سویه‌های باکتریایی مولد آلفا آمیلاز
به منظور جداسازی سویه‌های باکتریایی با توانایی هیدرولیز نشاسته، یک میلی‌لیتر از نمونه‌های جمع‌آوری شده پس از رقیق‌سازی متوالی به محیط‌های نشاسته آگار حاوی یک درصد نشاسته محلول، ۰/۲ درصد عصاره مخمر، ۰/۵ درصد پپتون، ۰/۱ درصد سولفات منیزیم، ۰/۱ درصد سدیم کلرید و ۰/۰۲ درصد کلسیم کلرید و ۱/۵ درصد آگار تلقیح و این محیط‌ها ۷۲ ساعت در دستگاه انکوباتور با دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند (Oziengbe & Onilude, 2012). بعد از این مدت، تعدادی از کلنی‌های رشد یافته روی این محیط‌ها انتخاب و مجدداً روی محیط نشاسته آگار کشت داده شدند و ۷۲ ساعت در ۵۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از گذشت ۷۲ ساعت، پلیت‌ها در محلول لوگول غوطه‌ور شدند و کلنی‌های دارای هاله شفاف به منزله سویه مولد آلفا آمیلاز شناخته شدند (Afrisham et al., 2010; Ahmadi et al., 2016). بر این اساس، از بین این کلنی-

پایگاه اطلاعاتی Gene Bank به کمک نرم افزار 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 میلی لیتر محیط نوترینت براث تلقیح و برای ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس، ۱۰ درصد (۲ میلی لیتر) از محیط کشت ۲۴-۱۸ ساعته به محیط تولید حاوی یک گرم نشاسته، یک گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات، ۲ گرم تریتون، ۲ گرم سولفات آمونیوم، ۰/۰۵ گرم سولفات منیزیم، ۰/۰۵ گرم کلسیم کلرید و ۳/۱۳ گرم دی سدیم هیدروژن فسفات اضافه و ۷۲ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد با دور rpm ۱۶۰ انکوبه شد (Samie *et al.*, 2012).

رسم منحنی استاندارد گلوکز

برای اندازه گیری مقدار گلوکز تولید شده در نتیجه فعالیت آلفا آمیلاز، از منحنی استاندارد گلوکز استفاده می شود. برای رسم این منحنی، ابتدا محلول استوک ۰/۱ درصد از گلوکز در آب مقطر تهیه شد، سپس در داخل ۵ لوله آزمایش حجم های ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶ و ۰/۸ میلی لیتر از این محلول ریخته شد و با استفاده از آب مقطر به حجم یک میلی لیتر رسانده شد. همچنین در یک لوله یک میلی لیتر آب مقطر به متابا شاهد ریخته شد. به هر کدام از لوله ها ۲ میلی لیتر از معرف دی نیترو سالیسیلیک (DNS) اضافه، به خوبی تکان داده شد و سپس مخلوط حاصل ۵ دقیقه در آب جوش قرار گرفت. پس از سرد شدن محتوای لوله ها در دمای اتاق، به هر کدام از لوله ها ۷ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد و جذب نوری هر کدام از مخلوط ها در ۵۴۰ نانومتر محاسبه شد. جذب مخلوط های حاوی گلوکز از جذب نمونه شاهد کم شد و در نهایت، منحنی استاندارد گلوکز بر حسب غلظت گلوکز (میلی گرم بر میلی لیتر) و جذب در ۵۴۰ نانومتر رسم شد (Miller, 1959).

سنجش فعالیت آلفا آمیلاز

به منظور تأیید خاصیت هیدرولیز کنندگی نشاسته و تعیین میزان تولید آنزیم آلفا آمیلاز، سنجش فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز بر اساس روش برن فلد (Bernfeld, 1955) و با استفاده از معرف دی نیترو سالیسیلیک انجام گرفت. برای این منظور، ابتدا از باکتری انتخاب شده در ۲۰ میلی لیتر محیط نوترینت-براث پیش کشت تهیه شد. سپس، میزان ۲ میلی لیتر از پیش کشت باکتری به ۲۰ میلی لیتر محیط

های جدا شده، سویه AT59 بر اساس قطر هاله ناشی از هیدرولیز نشاسته به متابا سویه برتر انتخاب و جهت مطالعات آنزیمی استفاده شد.

شناسایی سویه باکتریایی جدا شده

به منظور شناسایی نسبی سویه های جدا شده، تعدادی از آزمون های بیوشیمیایی-میکروبی از جمله رنگ آمیزی گرم، آزمون KOH، آزمون کاتالاز، آزمون هیدرولیز ژلاتین، آزمون هیدرولیز کازئین، آزمون مصرف سیترات و آزمون TSI بر اساس کتاب سیستماتیک باکتری شناسی برگی انجام شد (Sneath *et al.*, 1986). شناسایی مولکولی باکتری با تکثیر قسمتی از ژن 16S rDNA توسط پرایمرهای Forward: 5'-AGTTTGATCC-3' و Tm=53.7°C و پرایمر Reverse: 5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3' با Tm = 53.4 °C انجام شد (Badoei-Dalfard *et al.*, 2016). واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)، در حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر، شامل ۲ میکرو لیتر DNA الگو (10 mM)، ۰/۵ میکرو لیتر از هر پرایمر (۵۰ پیکومول)، ۲ میکرو لیتر dNTP (10 mM)، ۱ میکرو لیتر (50 mM) MgCl₂ (۲/۵ mM) میکرو لیتر بافر PCR (10x)، ۰/۲ میکرو لیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (5u/ml) خریداری شده از شرکت سینازن و ۱۶/۳ میکرو لیتر آب مقطر دیونیزه با برنامه ذیل انجام شد (Badoei-Dalfard *et al.*, 2016): (۱) دمای اولیه ۹۴ درجه سانتی گراد، ۴۵ ثانیه، (۲) ۵۲ درجه سانتی گراد، ۴۵ ثانیه، (۳) ۷۲ درجه سانتی گراد، ۹۰ ثانیه، (۴) برای تکثیر نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد، برای مدت ۸ دقیقه. محصول PCR پس از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد با استفاده از کیت استخراج DNA خالص سازی شد (Ramezani-Pour *et al.*, 2015; Azadian *et al.*, 2016). سپس، توالی DNA با استفاده از توالی یاب DNA شرکت Bioneer، واقع در کره جنوبی تعیین شد. شباهت توالی نوکلئوتیدهای ژن 16S rDN با BLAST با پایگاه اطلاعاتی ژنوم Gene Bank مقایسه شد. به این ترتیب، نزدیک ترین سویه ها با ترادف 16S rDNA با سویه تعیین شد. همچنین، توالی به دست آمده در این پژوهش در بانک ژنی NCBI ثبت و شماره دستیابی ژنی مربوط (MG192311) دریافت شد. درخت فیلوژنی توالی سویه با توالی حاصل از جست و جو در

در این بررسی، ۱۰ درصد از پیش کشت ۲۴-۱۸ ساعته باکتری مورد نظر به محیط‌های حاوی غلظت ۲ گرم بر لیتر از منابع مختلف نیتروژن شامل پیتون، عصاره مخمر و ژلاتین (منابع نیتروژن آلی) و آمونیوم کلراید، سولفات آمونیوم و سدیم نیترات (منبع نیتروژن غیر آلی) و محیط بدون منبع اضافه شد (Ramachandran et al., 2004). محیط پایه حاوی یک گرم نشاسته، یک گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات، ۰/۰۵ گرم سولفات منیزیم، ۰/۰۵ گرم کلسیم-کلرید و ۳/۱۳ گرم دی سدیم هیدروژن فسفات به ازای یک لیتر آب مقطر بود. محیط‌ها ۴۸ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. پس از ۴۸ ساعت، ۵ میلی لیتر از محیط‌ها سانتریفیوژ شد و سنجش فعالیت آنزیمی محلول‌های رویی در طول موج ۵۴۰ نانومتر انجام گرفت. سپس، محلول‌های رویی دور ریخته شدند و وزن رسوبات باکتریایی اندازه گیری شد.

تولید آنزیم در حضور ترکیبات یونی مختلف

برای بررسی اثر یون‌های فلزی مختلف بر تولید آنزیم، غلظت یک گرم بر لیتر از پتاسیم کلرید، سدیم کلرید، کلسیم کلرید و سولفات منیزیم به محیط کشت بدون یون فلزی اضافه شد (Amoozegar et al., 2013). محیط پایه حاوی یک گرم نشاسته، ۲ گرم تریپتون به ازای یک لیتر آب مقطر بود. بعد از ۴۸ ساعت، انکوباسیون در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد، ۵ میلی لیتر از هر کدام از محیط‌های حاوی باکتری رشد یافته سانتریفیوژ شده و مایع رویی به منظور سنجش فعالیت آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت. همچنین، وزن تر رسوبات باکتریایی به دست آمده اندازه گیری شد.

بررسی اثر pH بر تولید آنزیم آلفا آمیلاز

اثر pH بر تولید آنزیم آلفا آمیلاز، با تنظیم pH محیط مایع اختصاصی در محدوده ۹-۵-سنجیده شد (Aullybox & Puchooa, 2013). محیط پایه حاوی یک گرم نشاسته، یک گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات، ۲ گرم تریپتون، ۲ گرم سولفات-آمنیوم، ۰/۰۵ گرم سولفات منیزیم، ۰/۰۵ گرم کلسیم کلرید و ۳/۱۳ گرم دی سدیم هیدروژن فسفات به ازای یک لیتر آب مقطر است. بعد از گذشت ۴۸ ساعت از رشد سویه‌های باکتریایی در این محیط‌ها، ۵ میلی لیتر از محیط‌ها سانتریفیوژ شد و فعالیت آنزیمی مایع سنجش شد و وزن تر رسوبات باکتریایی نیز اندازه گیری شد.

بررسی فعالیت دمایی آنزیم آلفا آمیلاز

تولید تلقیح و ۷۲ ساعت در انکوباتور با دمای ۵۰ درجه سانتی-گراد انکوبه شد. ۵ میلی لیتر از محیط حاوی باکتری برداشته شد و در ۱۰۰۰۰ rpm، به مدت ۱۰ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. محلول رویی فاقد باکتری به مثابه آنزیم مورد استفاده قرار گرفت. سپس، ۵۰۰ میلی لیتر از محلول رویی به ۵۰۰ میکرو لیتر نشاسته یک درصد محلول در بافر سدیم فسفات (pH=۷، ۱۰۰ میلی مولار) به عنوان سوبسترا اضافه شد. جهت انجام واکنش، مخلوط حاصل در ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه گرما گذاری شد. در مرحله بعد، واکنش آنزیماتیک با اضافه کردن یک میلی لیتر از DNS به مخلوط و قراردادن آن به مدت ۵ دقیقه در آب جوش پایان یافت. این وضعیت به مثابه وضعیت استاندارد در نظر گرفته شد. با استفاده از منحنی استاندارد گلوکز غلظت قندهای احیا کننده تولید شده در نتیجه فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز محاسبه شد و به این ترتیب مقدار فعالیت آنزیمی به دست 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 آلفا آمیلاز در حضور متغیرهای مختلف

اثر منابع مختلف کربن بر تولید آنزیم آلفا آمیلاز

برای شناسایی منبع کربن مناسب برای تولید آنزیم آلفا آمیلاز، سویه باکتری جدا شده در حضور منابع باکتریایی مختلف کربن شامل گلوکز، گالاکتوز، مالتوز، فروکتوز و نشاسته هر کدام در غلظت یک گرم بر لیتر به مدت ۴۸ ساعت و در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد کشت داده شد (Amoozegar et al., 2013). محیط پایه حاوی یک گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات، ۲ گرم تریپتون، ۲ گرم سولفات آمونیوم، ۰/۰۵ گرم سولفات منیزیم، ۰/۰۵ گرم کلسیم کلرید و ۳/۱۳ گرم دی سدیم هیدروژن فسفات به ازای یک لیتر آب مقطر بود. بعد از این مدت، ۵ میلی لیتر از این محیط‌ها در ۱۰۰۰۰ rpm، به مدت ۱۰ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شده و محلول‌های رویی به منزله آنزیم مورد استفاده قرار گرفت. سنجش فعالیت آنزیمی مطابق با شرایط استاندارد در ۵۴۰ نانومتر صورت گرفت. وزن تر رسوب باکتری‌ها بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر، به منزله معیاری از میزان رشد اندازه گیری شد. تمامی آزمایش‌ها سه بار تکرار شد و میانگین گرفته شد.

اثر منابع مختلف نیتروژن بر تولید آنزیم آلفا آمیلاز

اثر منابع مختلف کربن بر تولید آنزیم آلفا آمیلاز

اثر منابع مختلف کربن بر تولید آنزیم آلفا آمیلاز بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون تحت بررسی قرار گرفت و مشخص شد تولید آنزیم آلفا آمیلاز 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 به دست آمد. نتایج به دست آمده در شکل ۳ نشان داده شده است.

اثر منابع مختلف نیتروژن بر تولید آنزیم آلفا آمیلاز

بررسی تولید آنزیم آلفا آمیلاز AT59 در حضور منابع مختلف نیتروژن شامل پپتون، عصاره مخمر، ژلاتین، آمونیوم کلراید، سولفات آمونیوم و سدیم نترات 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، سویه مورد نظر حداکثر میزان رشد را در حضور عصاره مخمر نشان داد. نتایج گفته شده در شکل ۴ آمده است.

تولید آنزیم آلفا آمیلاز در حضور ترکیبات یونی مختلف

اثر یون‌های معدنی مختلف بر تولید آنزیم، با افزودن ترکیبات یونی مختلف شامل پتاسیم کلراید، سولفات منیزیم، سدیم کلراید و کلسیم کلراید هر کدام با غلظت ۰/۱ درصد، به محیط پایه بدون یون و سپس تلقیح باکتری‌های مورد نظر، بعد از گذشت ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد 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 پتاسیم کلراید و بیشترین مقدار در حضور کلرید سدیم مشاهده شد.

بررسی تولید آنزیم آلفا آمیلاز در حضور pH های مختلف

در این بررسی، تولید آنزیم سویه مورد نظر در محیط‌های مایع حاوی نشاسته با pH های مختلف در محدوده 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 به‌طور کلی با افزایش pH محیط کاهش پیدا کرده و در محیط دارای pH=۵

برای بررسی فعالیت دمایی آنزیم آلفا آمیلاز، مخلوط ۰/۵ میلی-لیتر سوپ باکتریایی حاوی آنزیم و ۰/۵ میلی‌لیتر سوپ استرا در محدوده دمایی ۹۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شد. سپس، با اضافه کردن 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 باقی‌مانده آنزیم به صورت درصد محاسبه شد (Prakash *et al.*, 2009).

بررسی پایداری دمایی آنزیم آلفا آمیلاز

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

نتایج

غربال‌گری و شناسایی سویه‌های باکتریایی مولد آلفا آمیلاز

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

جدول ۱- آزمون‌های بیوشیمیایی برای شناسایی سویه‌های باکتریایی.

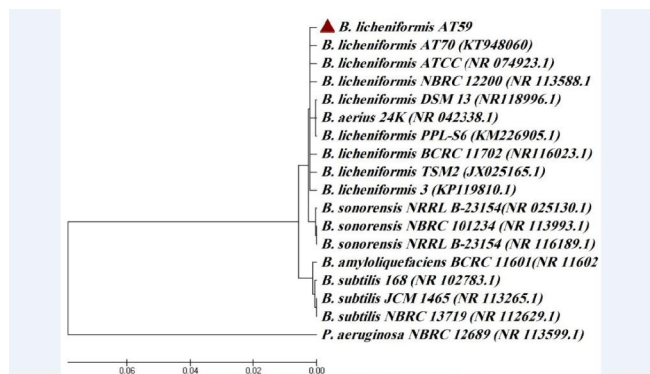
Table 1. Biochemical tests for identification of the bacterial strains.

بakteri	رنگ آمیزی گرم	KOH	هیدرولیز کازئین در محیط اسکیم-میلک آگار	هیدرولیز کازئین در محیط کازئین-آگار	هیدرو لیز ژلاتین	کانالاز	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	۰/۸
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	۰/۸
AT61	باسیل و گرم مثبت	-	-	+	-	+	-	قلیا/قلیا	۰/۸
AT62	باسیل و گرم مثبت	-	-	+	-	+	-	قلیا /قلیا	۰/۸
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	۰/۸
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



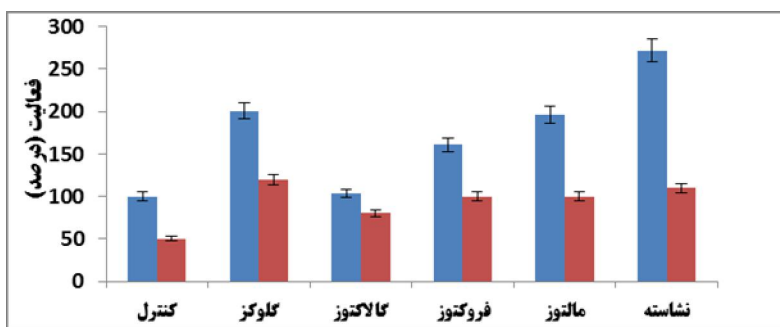
شکل ۱- بررسی تولید آنزیم آلفاآمیلاز سویه منتخب با استفاده از آزمون هیدرولیز نشاسته. (ایجاد هاله شفاف اطراف ناحیه رشد باکتری نشان دهنده تولید آنزیم آلفاآمیلاز و هیدرولیز نشاسته است).

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).



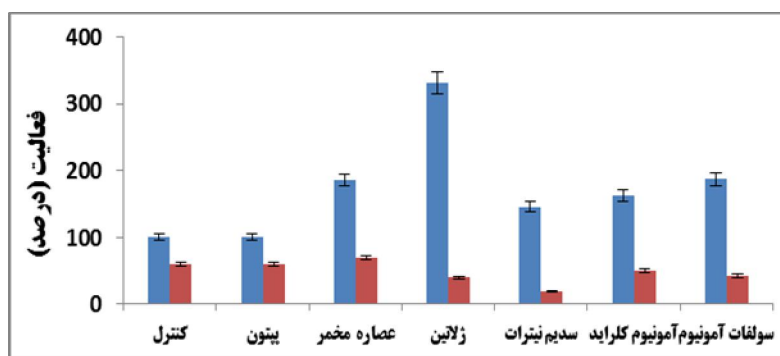
شکل ۲- درخت فیلوژنی سویه باسیلوس لکنی فورمیس AT59. سودوموناس ایروزینا بعنوان گروه خارجی استفاده شد. درخت بر اساس روش neighbor-joining تولید شده و مقیاس ها بر اساس درصدی از هزار تکرار بیان شده است.

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.



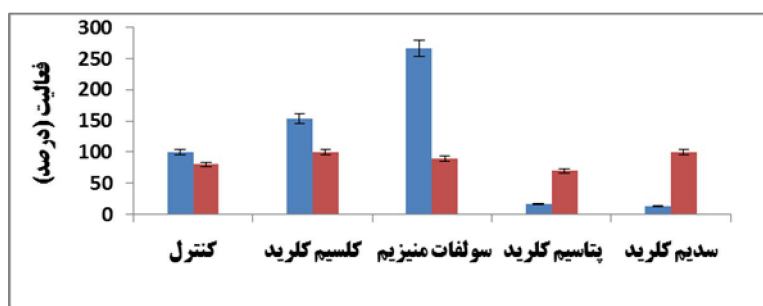
شکل ۳- بررسی تولید آنزیم آلفا آمیلاز در حضور منابع مختلف کربن (آبی) و وزن تر (قرمز) (میلی گرم بر میلی لیتر).

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



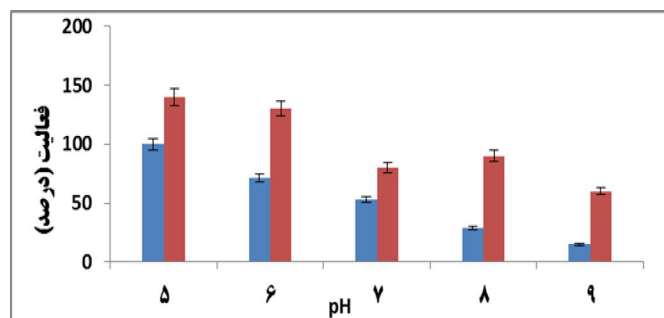
شکل ۴- بررسی تولید آنزیم آلفا آمیلاز در حضور منابع مختلف نیتروژن (آبی) و وزن تر (قرمز) (میلی گرم بر میلی لیتر).

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



شکل ۵- بررسی تولید آنزیم آلفا آمیلاز در حضور ترکیبات یونی مختلف (آبی) و وزن تر (قرمز) (میلی گرم بر میلی لیتر).

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



شکل ۶- بررسی تولید آنزیم آلفا آمیلاز در حضور pHهای مختلف (آبی) و وزن تر (قرمز) (میلی گرم بر میلی لیتر).

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

pH=۹ به ترتیب بیشترین و کمترین میزان رشد را نشان داده است. **فعالیت و پایداری آنزیم آلفا آمیلاز در دماهای انکوباسیون مختلف**

دما از جمله مهم ترین عوامل اثرگذار بر ساختار ذاتی یک آنزیم است. از آنجا که اکثر فرآیندهای صنعتی در دماهای بالا انجام پذیرند، یافتن آنزیم هایی که در دماهای بالا قادرند ساختار خود را حفظ کنند و فعال بمانند، اهمیت زیادی دارد. شکل های ۷ و ۸ نتایج میزان فعالیت و پایداری آلفا آمیلاز تولید شده توسط AT59 در دماهای مختلف را نشان می دهد. 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 به دست آمد.

بحث

از آنجا که اکثر فرآیندهای صنعتی معمولاً در دماهای بالا انجام پذیرند، استفاده از آلفا آمیلازهای گرمادوست، که توانایی فعالیت و حفظ ساختار خود در این دماها را دارند، می تواند جهت پیشبرد هرچه بیشتر این فرایندها کمک کننده باشد (Bouzas et al., 2006). امروزه، مفید بودن کاربرد آلفا آمیلازهای گرمادوست در صنایع مختلف از جمله نساجی، فراوری مواد غذایی، مواد شوینده و به ویژه نشاسته جهت انجام همزمان فرایند مایع سازی و ژلاتیناسیون نشاسته و کاهش هزینه های خنک کردن، اثبات شده است (Abdel-Fattah et al., 2012; Antranikian & Egorova, 1998). در این پژوهش، به منظور جداسازی و غربالگری باکتری های مولد آلفا آمیلاز گرمادوست، چشمه آب گرم گروه با دمای تقریبی ۷۰ درجه سانتی گراد واقع در استان کرمان جهت نمونه برداری انتخاب شد. جهت غربالگری از محیط نشاسته-آگار استفاده شد و آزمون هیدرولیز نشاسته انجام گرفت. کلنی های دارای هاله شفاف به منزله سویه های تولید کننده آلفا آمیلاز گرمادوست شناخته شده اند و براساس قطر هاله های ایجاد شده سویه AT59، سویه برتر جهت انجام مطالعات آنزیمی در نظر گرفته شد. به طور مشابه، در تحقیق Fooladi و Sajjadian (2010)، به منظور دستیابی به سویه های مولد آلفا آمیلاز مقاوم به حرارت، نمونه های جمع آوری شده از سه چشمه آب گرم محلات، لاریجان و مشکین شهر تحت تحلیل قرار گرفت و کلنی

باکتریایی با خاصیت هیدرولیزکنندگی بالا از چشمه آب گرم مشکین شهر جداسازی شد. Asoodeh و همکاران (2013)، سویه های باکتریایی مولد آلفا آمیلاز گرمادوست از چشمه آب گرم دیگ رستم با pH=۷/۲ و دمای ۵۵ درجه در جنوب ایران جداسازی کردند. با توجه به پژوهش های صورت گرفته می توان نتیجه گرفت چشمه های آب گرم ایران ذخایر میکروبی بزرگی دارند و می توانند به مثابه منابع محصولات بیولوژیکی مختلف مانند آنزیم ها استفاده شوند (Fooladi & Sajjadian, 2010). علاوه بر این، گزارشی مبنی بر نمونه برداری از یک چشمه آب گرم واقع در هند جهت دستیابی به باکتری های مولد آلفا آمیلاز گرمادوست، به کوشش Sen و همکاران (2014) منتشر شده است. جداسازی باکتری های گرمادوست مولد آلفا آمیلاز از یک چشمه آب گرم واقع در ترکیه صورت گرفته است (Baysal et al., 2003). به منظور شناسایی ابتدایی باکتری های مولد آلفا آمیلاز گرمادوست جدا شده، تعدادی از آزمون های بیوشیمیایی از قبیل رنگ آمیزی گرم، کاتالاز، هیدرولیز کازئین، هیدرولیز ژلاتین و... انجام و مشخص شد باکتری های مورد نظر به شکل باسیل و گرم مثبت هستند. امروزه، تولید تجاری آلفا آمیلازها با استفاده از اعضای جنس باسیلوس صورت می گیرد (Pandey et al., 2001). در مطالعه ای، آلفا آمیلاز مقاوم به گرما از سویه نسبتاً 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 سویه ای از *Bacillus cereus* به نام GUF8 جداسازی و تعیین خصوصیت کردند. با این حال، علاوه بر باسیلوس ها، جنس های باکتریایی دیگر نیز می توانند تولید کنندگان آلفا آمیلازهای مقاوم به گرما و گرمادوست شناخته شوند، تولید آلفا آمیلاز نمک-گرمادوست از *Neste renkonkia strain F* به قلم Amoozegar و همکاران (2013) گزارش شد. از جمله مهم ترین عوامل اثرگذار بر متابولیسم میکروبی منبع کربن است که می تواند بازده تولید آنزیم خارج سلولی را تحت تأثیر قرار دهد (Bozic et al., 2011). بنابراین، در این پژوهش، به منظور دستیابی به محیط بهینه، تولید آنزیم آلفا آمیلاز 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

بالاترین سطح تولید آلفاآمیلاز *Nesterenkonia* sp. F غلظت ۲ مولار سدیم کلرید مشاهده شد (Amoozegar et al., 2013). در این پژوهش، به منظور تعیین pH بهینه برای تولید آنزیم آلفاآمیلاز، pH محیط تولید آنزیم در محدوده 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 بهینه گزارش شده برای تولید آلفاآمیلاز در پژوهش‌های قبلی بالاتر از pH بهینه به دست آمده در این پژوهش است (Oziengbe & Onilude, 2012; Prakash et al., 2009; Amoozegar et al., 2013). فعالیت و پایداری دمایی آلفاآمیلاز AT59 نشان داد این آنزیم دارای محدوده وسیعی از فعالیت و پایداری در دماهای مختلف بوده و حداکثر فعالیت و پایداری این آنزیم در دمای ۸۰ و ۷۰ درجه به دست آمد. Abdel-Fattah و همکاران (2012) فعالیت دمایی آلفاآمیلاز سویه‌ای از *Bacillus licheniformis* را تحت بررسی قرار دادند و مشخص شد این آنزیم در محدوده دمایی ۸۰-۶۰ درجه سانتی‌گراد بیشترین فعالیت را داشته است. در مطالعه 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 به ترتیب در دماهای ۴۵ و ۶۰-۳۵ گزارش دادند. حداکثر فعالیت و پایداری آلفاآمیلاز *Bacillus* sp. ANT-6 نیز به ترتیب در ۸۰ و ۵۰ درجه به دست 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 به دلیل 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.

تولید آنزیم بوده است. در پی یافتن محیط بهینه برای تولید آلفاآمیلاز *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC23842 غلظت‌های ۲-۰/۵ از منابع مختلف کربن شامل نشاسته محلول، نشاسته هیدرولیز شده، گلوکز، لاکتوز و مالتوز به محیط تولید آنزیم اضافه شد و نتایج نشان داد با اضافه کردن یک درصد نشاسته محلول به محیط کشت، بیشترین بازده تولید آنزیم به دست خواهد آمد (Gangadharan et al., 2006). همچنین، در مطالعه Amoozegar و همکاران (2013)، غلظت یک درصد نشاسته غلظت بهینه برای تولید آلفاآمیلاز *Nesterenkonia* strain F معرفی شد. همچنین، در پژوهش حاضر، محیط تولید آنزیم آلفاآمیلاز AT59 با اضافه کردن غلظت ۲ گرم بر لیتر از منابع نیتروژن آلی و غیرآلی شامل پیتون، عصاره مخمر، ژلاتین، سدیم نترات، سولفات آمونیوم و آمونیوم کلراید به محیط پایه فاقد نیتروژن، از نظر منبع نیتروژن مورد استفاده بهینه شد. در این بررسی، تمام منابع تحت مطالعه به جز پیتون 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) پیتون بهترین منبع نیتروژن آلی برای تولید آلفاآمیلاز شناخته شد. بهینه‌سازی محیط تولید آنزیم سویه *Nesterenkonia* strain F در حضور منابع مختلف نیتروژن با غلظت‌های مختلف صورت گرفت و مشخص شد سویه مورد نظر 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 به وسیله اضافه کردن غلظت ۰/۱ درصد از سولفات منیزیم، کلسیم کلرید، پتاسیم کلرید و سدیم کلرید به محیط تولید فاقد یون انجام گرفت. براساس نتایج به دست آمده، مشخص شد با وجود افزایش فراوان تولید آنزیم در حضور یون منیزیم (تا ۱/۵ برابر نمونه کنترل)، یون‌های سدیم و پتاسیم تقریباً به طور کامل تولید آنزیم این سویه را مهار کردند. در بررسی پراکاش و همکاران به منظور بهینه‌سازی محیط تولید آنزیم آلفاآمیلاز، مشخص شد یون کلسیم در غلظت ۵۰ میلی‌مولار توانسته ۲۵ درصد تولید آنزیم را افزایش دهد (Prakash et al., 2009). در یک مطالعه، سولفات منیزیم در غلظت یک میلی‌مولار منبع بهینه تولید آنزیم آلفاآمیلاز معرفی شد (Sodhi et al., 2005).

- Afrisham, S., Badoei-Dalfard, A., Namaki-Shoushtari, A. and Karami, Z. 2016. Characterization of a thermostable, CaCl₂-activated and raw-starch hydrolyzing alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* AT70: Production under solid state-fermentation. – 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., Shaffei, 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 production. – 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 population of three Iranian hot-springs to detect the thermostable 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 review. – 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 caldophililyticus* TK4. – Process Biochem. 45: 821-828.
- Kristjanson K.J. 1989. Thermophilic organisms as source 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 biotechnology. – 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 alpha-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. – Biocatal. 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. Thermozyms: biotechnology and structure-function relationships. – Extremophiles 2: 179-183.

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.

افرشام، س.، بدویی دالفارد، ا.، نمکی شوشتری، ع.، کریمی، ز. و ملک‌آبادی، س. ۱۳۹۶. جداسازی و شناسایی باسیلوس مولد آلفا آمیلاز گرمادوست: بهینه‌سازی تولید و بررسی فعالیت و پایداری دمای. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۴: ۲۹۸-۲۸۸.

How to cite this article: