مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

تولید آنزیم آلفاآمیلاز از سویه گرمادوست بومی *Bacillus licheniformis*-AZ2 جداسازی شده از چشمه آبگرم قینرجه در استان اردبیل

علی دلجو*[1]، ایمان آرضی[2]

[1] دانشیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان

[2] دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۸/۱۲، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۰/۰۵

چکیده

باکتری‌های گرمادوست منابع با ارزشی از آنزیم‌های هیدرولیتیک مقاوم به دمای بالا هستند که در صنایع مختلف دارای اهمیت بسیار می‌باشند. در مقایسه با سایر آنزیم‌های هیدرولیز کننده نشاسته، کاربرد تجاری آنزیم آلفاآمیلاز در فرآوری نشاسته، تخمیر و تهیه محصولات کربوهیدراتی از اهمیت خاصی برخوردار است و توانسته جایگزین هیدرولیز شیمیایی نشاسته در فرآوری صنعتی شود. هدف از انجام این تحقیق تعیین شرایط مطلوب برای تولید آنزیم آلفاآمیلاز مقاوم به دمای بالا توسط یک سویه باسیلوس بومی است که به تازگی از چشمه آبگرم قینرجه در استان اردبیل جداسازی و به نام *Bacillus licheniformis*-AZ2 در کلکسیون باکتریایی گروه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه بوعلی سینای همدان، شناسایی و ثبت گردیده است. در این مطالعه با استفاده از روش رنگ آمیزی یداین، امکان فعالیت آمیلولیتیکی باکتری مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج آزمایش‌ها نشان می‌دهد که بیشترین فعالیت زیستی سلول و تولید آنزیم در شرایط محیط کشت پایه که بوسیله یک درصد مایه تلقیح اولیه (حجمی/حجمی) تلقیح شده بود، پس از ۸٤ ساعت در pH=۹ و دمای ٤۰°C محقق شده است. همچنین آزمایش‌های مربوط به تعیین فعالیت آنزیم نیز نشان داد که آنزیم تولید شده، بالاترین فعالیت خود را در شرایط دمای ۸۰°C و بافر Tris- HCl با pH=۷ بروز می‌دهد. بر اساس این نتایج، آنزیم تولید شده بوسیله سویه بومی (*Bacillus licheniformis*-AZ2) مقاوم به دمای بالا بوده و دارای ویژگی‌های مورد نیاز برای فرآوری نشاسته و کاربرد در صنایع غذایی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *باسیلوس لیکنی فورمیس، آلفاآمیلاز مقاوم به دما، بهینه‌سازی، محیط تولید.*

* نویسنده مسئول: علی دلجو تلفن: ۰۹۱۸۱۱۱۱۵٦۷ Email: alideljou@yahoo.com

مقدمه

نشاسته، یکی از اجزای اصلی رژیم غذایی روزانه ما را تشکیل می‌دهد (Rasooli *et al.*, 2008). علاوه براین نشاسته فراوانترین شکل از پلی‌ساکاریدهای ذخیره‌ای ساخته شده توسط گیاهان بوده و منبعی ارزان قیمت برای تولید شربت‌های قندی حاوی گلوکز، فروکتوز یا مالتوز به شمار می‌آید و به طور وسیعی در صنایع غذایی مورد استفاده قرار گرفته است. هم چنین قندهای تولید شده توسط این آنزیم می‌تواند برای تخمیر و تولید اتانول مورد استفاده قرار گیرد (Goyal *et al.*, 2005). در گرانول‌های نشاسته، مولکول‌ها به صورت متراکم در یک حالت پلی‌کریستالین (بسیار متبلور) با پیوندهای بیرون و درون مولکولی به هم فشرده شده‌اند، از اینرو در آب سرد نامحلول بوده و به اکثر مواد شیمیایی و آنزیم‌ها مقاوم هستند (Hamilton *et al.*, 1999). آمیلازها [α- آمیلاز، ß- آمیلاز و گلوکوآمیلاز] از مهمترین آنزیم‌ها، در بیوتکنولوژی نوین محسوب شده و بدلیل کاربرد گسترده از اهمیت بیشتری برخوردار می‌باشند (Ziaei ziabari *et al.*, 2008; Rasooli *et al.*, 2009). این آنزیم‌ها بین ۳۰-۲۵ درصد از بازار جهانی آنزیم‌های مهم تجاری را به خود اختصاص داده و جایگزین هیدرولیز شیمیایی نشاسته در فرآوری صنعتی شده‌اند (Rasooli *et al.*, 2009). آلفاآمیلاز (α-1,4 -D-glucanohydrolase, E.C.3.2.1.1) در طبیعت توسط جانوران، گیاهان و میکرورگانیسم-ها تولید می‌شود. این آنزیم، یک اندوهیدرولاز است که به طور تصادفی اتصالات گلیکوزیدی α-۱و٤ را در ترکیبات نشاسته‌ای، گلیکوژن و پلی ساکاریدهای مرتبط با آن‌ها هیدرولیز کرده و اولیگوساکاریدهایی با موقعیت آلفا ۱ و در اندازه-های متعدد به وجود می‌آورد (Antranikian, 1990). خواص شیمیایی، فیزیکی و مکانیسم عمل آلفاآمیلازها تا حدودی به منبع آنزیم بستگی دارد. هر چند که آنزیم آلفاآمیلاز پستانداران و دانه‌های گیاهان زیاد مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، اما این آلفاآمیلازهای باکتریایی هستند که امروزه در صنعت و تجارت مورد استفاده قرار می‌گیرند. معمولاً آلفاآمیلازهای حاصل از منابع باکتریایی بر اساس الگوی عمل بر روی نشاسته به دو دسته تقسیم می‌شوند: الف) شیرین‌ساز، ب) مایع‌ساز (Dordick, 1991). از ابتدای دهه ۱۹٦۰ میلادی زمانی که آلفاآمیلاز حاصل از *Bacillus subtilis* و گلوکوآمیلاز تولید شده بوسیله *Aspergillus niger* به عنوان جایگزین کاتالیز اسیدی در تولید دکستروز مورد استفاده قرار گرفتند، افزایش چشمگیری در تولید و کاربرد آن‌ها اتفاق افتاد (Bhutto and Dahot, 2010). علیرغم تولید آمیلازها در موجودات مختلف، منابع میکروبی، یعنی آمیلازهای قارچی و باکتریایی، بدلیل مزایایی از جمله هزینه کمتر، پایداری بیشتر، صرفه‌جوئی در زمان و مکان مورد نیاز برای تولید و سادگی فرآیند بهبود و بهینه‌سازی، در تولید صنعتی بیشتر مورد استفاده گرفته‌اند (El-Tayeb *et al.*, 2007). آمیلازهای باکتریایی بدلیل برخی مزایای ویژه نسبت به آمیلازهای قارچی بیشتر

ترجیح داده می‌شوند (Pandey and Nigam, 2000). تقریباً همه اعضای جنس باسیلوس آلفا-آمیلاز تولید می‌کنند. بنابراین این جنس پتانسیل بالقوه بیشتری در صنایع آنزیمی دارد و برای تولید آن مورد استفاده قرار می‌گیرد (Pretorius *et al.*, 1986). برخی نژادهای باسیلوس در فاز لگاریتمی آمیلاز تولید می‌کنند، این درحالی است که برخی دیگر در اواسط فاز سکون، آنزیم مورد نظر را تولید می‌نمایند. به طور کلی شباهت‌هایی در الگوی رشد و منحنی تولید آنزیم آمیلاز در *Bacillus* spp. وجود دارد، ولی شرایط بهینه برای تولید آمیلازها به طور وسیعی بسته به نوع سویه متفاوت است (Thippeswamy *et al.*, 2006). تولید آمیلازها طی فرایند تخمیر به طور کامل بررسی شده است، آمیلازها اکثراً خارج سلولی بوده و توسط عوامل فیزیکوشیمیایی مختلفی تحت تأثیر قرار می‌گیرند. در بین این عوامل می‌توان به ترکیب محیط کشت، سن و حجم مایه تلقیح، pH، دما، تکان دهی، منابع غیرآلی، اکسیژن محلول، القاءکننده‌ها، منابع نیتروژنی و کربنی به عنوان مهمترین عوامل در تولید آمیلاز اشاره کرد (Forgaty and Kelly, 1980; Forgaty and Joyce, 1974; Lonsane and Ramesh, 1990; Priest, 1977; Kuddus and Roohi, 2010). علاوه براین، در موارد متعددی گزارش شده که محصولات جانبی و ضایعات مختلف کشاورزی مثل سبوس گندم، سبوس برنج، ملاس نیشکر، پوسته ذرت، شیرابه-های گلوکزی و نشاسته ذرت جایگزین منبع کربنی اصلی در محیط تخمیر شده، و علاوه بر افزایش تولید آلفاآمیلاز، به لحاظ اقتصادی نیز محیط‌های تخمیری ارزان قیمتی را ارائه کرده است (Singh *et al.*, 2009; Ul-Haq *et al.*, 2003; Mahmoud *et al.*, 1978). با توجه به همه موارد فوق، در مطالعه حاضر پتانسیل تولید آنزیم آلفاآمیلاز از سویه گرمادوست بومی *Bacillus licheniformis*-AZ2 که به تازگی از چشمه آبگرم قینرجه در استان اردبیل جداسازی شده و هم چنین شرایط محیط کشت و فعالیت آنزیم از جمله دما، pH و مدت زمان انکوباسیون مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

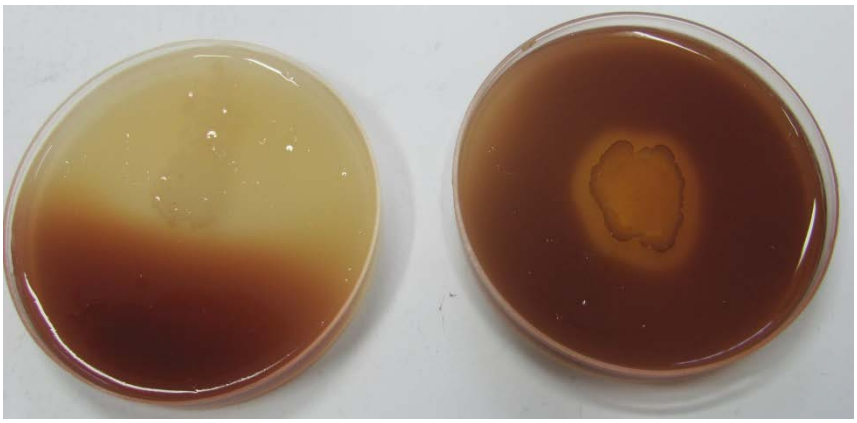
میکرو ارگانیسم

سویه بومی *Bacillus licheniformis*-AZ2 از کلکسیون باکتریایی گروه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا همدان که به عنوان یک سویه گرمادوست نسبی از چشمه آبگرم قینرجه (در نزدیکی روستای موئیل در ۱۵ کیلو-متری جنوب مشکین شهر، استان اردبیل، با مختصات جغرافیایی طول °٤٦ , ´۳۹ شرقی و عرض °۳٦ , ´۵۳ شمالی و دمای آب °C۸۲) جداسازی و شناسایی شده است، فراهم گردید.

بررسی پتانسیل تولید آمیلاز توسط باکتری

باکتری جداسازی شده به منظور تعیین خصوصیات آمیلولیتیکی با آزمون هیدرولیز نشاسته بر روی پتری‌های آگار حاوی نشاسته یک درصد (وزنی/حجمی) مورد ارزیابی قرار گرفت.

سویه میکروبی به شکل لکه‌ای بر روی این پتری-ها کشت و در دمای ٤٠°C به مدت ٢٤ ساعت نگهداری شدند. پس از سپری شدن دوره نگهداری، پتری‌های آگار با محلول یداین (تازه تهیه شده) رنگ آمیزی شدند. ظهور هاله‌ای شفاف در اطراف کلونی نشانگر هیدرولیز نشاسته توسط باکتری است (شکل ۱) که آنرا به عنوان تولیدکننده آمیلاز برای بررسی‌های بیشتر مورد توجه قرار می‌دهد.



شکل ۱- تعیین فعالیت آمیلازی باکتری *Bacillus licheniformis*-AZ2 براساس تغییر رنگ در حاشیه کلونی.

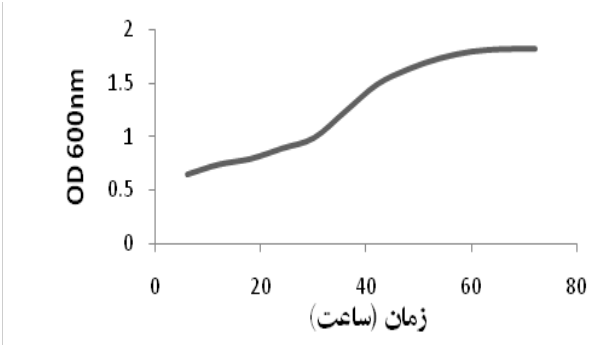
Figure 1- Detection of amylolytic activity in *Bacillus licheniformis*-AZ2 based on appearance of clear zones around the growing colonies.

اندازه گیری رشد باکتری

به منظور بررسی وضعیت رشد باکتری، میزان تراکم سلولی با روش کدورت سنجی و جذب در طول موج ٦٠٠ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Varian-UV-vis 100) در مقایسه با کنترل منفی تعیین شد (Cappuccino and Sherman, 1996).

تهیه مایه تلقیح

سویه *Bacillus licheniformis*-AZ2 بر روی پتری‌های آگار حاوی محیط کشت LB برای مدت ٢٤ ساعت در دمای ٤٠°C نگهداری شدند. پس از آن، محیط مایع LB با دو لوپ از سلول‌های این پتری‌ها تلقیح شد و فلاسک‌ها به مدت ٢٤ ساعت در شیکر انکوباتور و در دمای ٤٠°C وسرعت ١٢٠ rpm نگهداری و در ابتدای فاز لگاریتمی به عنوان مایه تلقیح استفاده شدند (شکل ۲).



شکل ۲- منحنی رشد *Bacillus licheniformis*- AZ2 در محیط کشت مایع LB.

Figure 2- Growth curve of *Bacillus licheniformis*-AZ2 in LB medium.

تولید آلفاآمیلاز

حجم مایه تلقیح یک درصد (حجمی/ حجمی) محیط تولید در نظر گرفته شد. برای هر فلاسک ۲۵۰ میلی‌لیتری مقدار ۱۰۰ میلی لیتر محیط تولید (حاوی نشاسته ۱۰g/ℓ، عصاره مخمر ۳g/ℓ، پپتون ۵g/ℓ، NaCl ۳g/ℓ و $MgSO_4.7H_2O$ ۰/۵g/ℓ) استفاده شد (Suman and Ramesh, 2010). پس از تلقیح، فلاسک‌ها برای مدت ۱۲۰ ساعت در دمای ٤۰°C روی شیکر با سرعت ۱۲۰rpm نگهداری شدند. فعالیت آمیلولیتیکی آلفاآمیلاز با استفاده از واکنشگر ۳ و ۵- دی نیتروسالیسیلیک اسید (DNS) تعیین شد (Bernfield, 1955). هر ٦ ساعت یکبار نمونه-گیری انجام گردید و سلول‌ها با کمک سانتریفوژ یخچالدار (٤°C) با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه از محیط کشت جدا شدند. مایع رویی برای سنجش فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز مورد استفاده قرار گرفت.

سنجش فعالیت آلفاآمیلاز

فعالیت آلفاآمیلازی با روش اسپکتروفتومتری تعریف شده توسط ریک و استگبوئر تعیین گردید (Rick and Stegbauer, 1974). بر طبق روش مورد نظر فعالیت آلفا-آمیلازی با اضافه کردن یک میلی لیتر آنزیم (عصاره خام/ مایع رویی براث تخمیر شده) به یک میلی لیتر محلول یک درصد نشاسته محلول در بافر Tris- HCl ، ۰/۰۵ مولار با pH=۷/۲ در لوله آزمایش اندازه گیری شد. لوله‌های آزمایش با پنبه پوشانده شده و برای ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ٦۵ °C نگهداری شدند. سپس ۲ میلی لیتر از واکنشگر DNS (۳و۵-دی نیترو سالیسیلیک اسید) به منظور توقف واکنش به هر یک از لوله‌ها اضافه گردید و دقیقاً به مدت ۵ دقیقه در آب جوش قرار داده شدند. پس از سرد شدن در حمام آب سرد، میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵٤۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Varian-UV-vis 100) قرائت شد. یک واحد فعالیت آلفاآمیلازی برابر با مقدار

آنزیمی است که بتواند یک میلی‌گرم قند احیاء-کننده معادل با مالتوز را در شرایط واکنش از سوبسترای نشاسته‌ای آزاد کند.

بررسی مدت زمان انکوباسیون، شرایط محیط کشت و فعالیت آلفاآمیلاز

به منظور بررسی اثر مدت زمان انکوباسیون، ۱۲۰ ساعت پس از تلقیح محیط تولید، رشد و تولید آلفاآمیلاز در فواصل زمانی ٦ ساعته اندازه-گیری شده و منحنی‌های مربوط به رشد باکتری و تولید آلفاآمیلاز رسم گردید. هم چنین برای تعیین بهترین شرایط محیط تولید، رشد باکتری و تولید آلفاآمیلاز در دامنه دمایی بین ۱۰ °C تا ۷۰ °C و pH محیط تولید در دامنه بین ٤ تا ۱۱ مورد بررسی قرار گرفت. میزان pH بهینه برای فعالیت آلفاآمیلاز به کمک تغییرات pH در واکنش سنجش آنزیمی با استفاده از بافرهای ۰/۰۵ مولار در دامنه pH بین ۳ تا ۱۱ بررسی شد (برای pHهای ۳ ،٤ و ۵ از بافر استات سدیم/ اسید استیک، pH ٦ و۷ از بافر فسفات سدیم، pH ۸ و ۹ از بافر تریس/ اسید کلریدریک و برای pHهای ۹، ۱۰ و ۱۱ نیز از بافر گلیسین/ هیدروکسید سدیم استفاده شد). هم چنین میزان درجه حرارت مطلوب فعالیت آلفاآمیلاز با اندازه‌گیری فعالیت آلفاآمیلاز در بافر ۰/۰۵ مولار تریس/ اسید کلریدریک (Tris-HCl) با pH=۷/۲ در دامنه دمایی بین ۳۰°C تا ۱۰۰°C تعیین گردید. همه آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد. داده‌های ارائه شده میانگین سه تکرار می‌باشند.

نتایج و بحث

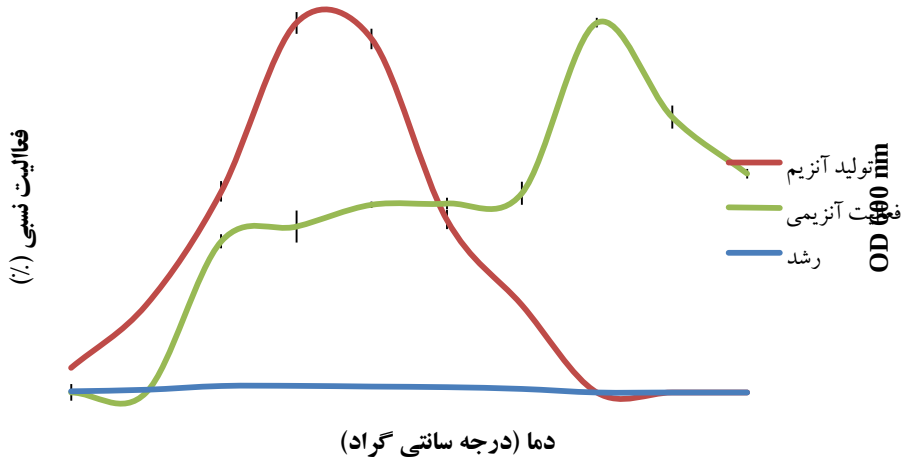
تأثیر دما بر رشد، تولید و فعالیت آلفاآمیلاز

انتخاب دامنه دمایی مورد استفاده در این آزمایش با در نظر گرفتن منابع مشابه موجود (Ul-Haq *et al.*, 2005; Thippeswamy *et al.*, 2006; Rasooli *et al.*, 2009) صورت گرفت. مقادیر OD_{600nm} مورد اندازه‌گیری در شکل ۳ نشان داده شده است. طبق این نتایج در دماهای ۱۰°C تا ۲۰°C سرعت تقسیم سلولی بسیار کند و روند تغییرات منحنی رشد قابل توجه نبوده است اما در فاصله ۳۰°C تا ٤۰°C افزایش چشمگیری در تراکم سلولی مشاهده شد و حداکثر آن در دمای ٤۰°C اتفاق افتاده است، مشابه چنین الگوی رشد ارگانیسم و تولید آلفاآمیلاز نیز توسط سویه *Bacillus licheniformis* GCB-36 مشاهده شده است (Hamad Ashraf, 2004). هر چند که این سویه باکتری توانسته است در دمای ۷۰°C هم به حیات خود ادامه دهد و دمای چشمه مورد نمونه-برداری هم ۸۲°C بوده است، اما بالاترین سرعت رشد مربوط به دمای ٤۰°C می‌باشد. Baysal *et al.* (2003) نیز با جداسازی سویه *Bacillus subtilis* از چشمه آبگرمی در ترکیه که دمای فصلی آن در دامنه ٦۲°C تا ۸۵°C است، دریافتند که دمای بهینه رشد این باکتری ۳۷°C می‌باشد. این تفاوت می‌تواند ناشی از آن باشد که هر چند ارگانیسم قادر به رشد و تولید آنزیم در دماهای بالا می‌باشد، اما بهینه دمایی سایر فرآیندهای دخیل در رشد، متابولیسم و بیوسنتز آنزیم‌ها در دمای پایین‌تری اتفاق می‌افتد. سویه‌ای

گرمادوست از *Bacillus licheniformis* که توسط Ashraf *et al.* (2005) از خاک جداسازی شده است نیز بیشترین تولید آنزیم را در دمای ٤٠°C و بیشترین فعالیت خود را در دمای ٦٥°C داشت. Rasooli *et al.* (2009) نیز سویه *Bacillus licheniformis* shahed-07 که از خاک غربالگری شده بود را مورد مطالعه قرار دادند و گزارش کردند که حداکثر میزان آلفاآمیلاز در دمای ٥٠°C تولید شد، درحالیکه فعالیت مطلوب این آنزیم در دمای ٧٠°C بود. سویه گرمادوستی از *Bacillus subtilis* که از شیر تازه گوسفند جدا شده نیز وجود دارد که بیشترین میزان تولید آلفا-آمیلاز خارج سلولی مقاوم به دمای بالا را در دمای ٤٠°C داشته است ولی دمای بهینه فعالیت آن در حضور نشاسته و کلسیم در pH = ٦/٥ ، ١٣٥°C می‌باشد (Konsula and Liakopoulou-Kyriakides, 2004). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که معمولاً بیشترین فعالیت آنزیم در دمایی بسیار بالاتر از دمای بهینه رشد باکتری اتفاق می-افتد و بالاتر بودن بهینه فعالیت آلفاآمیلاز بدست آمده از این سویه نسبت به سویه‌های جداسازی شده از خاک می‌تواند بدلیل شرایط محیط مبدأ جداسازی آن و تغییرات ژنتیکی که طی سال‌ها در این سویه برای سازگار شدن با محیط پیرامونی خود بوده است، باشد. مشابه دمای بهینه رشد و تولید آلفاآمیلاز در سویه مورد بررسی در گونه-های *B. licheniformis* SPT27 (Dharani Aiyer, 2004)، *Bacillus* sp. *Marini* (Ashiwini *et al.*, 2011)، *B. megaterium* (Bhutto and Dahot, 2010)، *B. licheniformis* BS1 ، *B. licheniformis* FS1 و *B. licheniformis* GS1 (Vaseekaran *et al.*, 2010)، *B. subtilis* GCBM-2 (Ul-Haq *et al.*,2005) نیز گزارش شده است به طوری که حد مطلوب دمای رشد و تولید آلفاآمیلاز برای این سویه‌ها ٣٧°C است. تأثیر دما بر تولید آنزیم به رشد میکروارگانیسم وابسته است. که این موضوع به وضوح در نتایج مشاهده گردید و با افزایش و کاهش رشد در دماهای مختلف میزان تولید آلفاآمیلاز نیز متناسب با تغییرات رشد در دماهای مختلف بود. دامنه وسیع دما بین (٣٥°C تا ٨٠°C) برای رشد و تولید بهینه آلفاآمیلاز در باکتری‌ها گزارش شده است (Burhan *et al.*,2003). در پژوهشی Satio and Yamamoto (1975) نیز اظهار داشتند که تفاوت‌های موجود در بهینه دما در جنس‌های مختلف ممکن است بدلیل تأثیر دما در سطح تولید آلفاآمیلاز باشد. به عبارت دیگر زمانی که دمای انکوباسیون افزایش می‌یابد همراه با افزایش در سطح تولید آنزیم‌های تثبیت شده به سلول، میزان آلفاآمیلاز آزاد شده از سلول توسط باکتری *B. stearothermophilus* کاهش می‌یابد، که نشان می‌دهد فعالیت آلفا-آمیلازی کل (آزاد شده و تثبیت شده به سلول) کم و بیش در هر دو دما یکسان خواهد بود. این موضوع اشاره بر آن دارد که تفاوت مشاهده شده ممکن است بدلیل اثر مستقیم دما بر تولید آلفا-آمیلاز نباشد. بنابراین توضیح دیگر می‌تواند این باشد که دما ممکن است به طور غیر مستقیم

سطح آلفاآمیلاز رها شده از سلول را در محیط کشت تحت تأثیر قرار دهد (Mamo and Gessesse, 1999). بعضی از آنزیم‌های تولید شده در داخل سلول قابلیت انتشار در محیط کشت را نداشته و فقط در تشکیل بلوک‌های ساختمانی و اجزاء سلولی دخیل هستند. اما پاره-ای دیگر از این آنزیم‌ها در داخل سلول تجمع نیافته و به منظور تجزیه مواد غذایی پیرامون برای فعالیت‌های عملکردی سلول و تولید ترکیبات پیچیده‌تر از طریق فرآیند آنابولیسم به محیط رشد باکتری آزاد می‌شوند (Priest, 1977). May و Elliott (1968) دریافتند که در *Bacillus subtilis* حذف دیواره سلولی به طور چشمگیری با تولید آنزیم خارج سلولی تداخل ایجاد می‌کند. بنابراین آنزیم آلفاآمیلاز جزء دسته آنزیم‌های خارج سلولی محسوب می‌شود. سلول‌های باکتریایی مکانیسم‌های مختلفی دارند که به آن‌ها امکان کنترل دقیق ترشح آنزیم را می‌دهد. تغییرات در طبیعت پوشش سلول می‌تواند رها-سازی آنزیم‌های خارج سلولی را به محیط کشت تحت تأثیر قرار دهد (Antranikian, 1990). دما یکی از فاکتورهایی است که این چنین تغییراتی را در غشاء سلولی و دیواره سلولی القاء می‌کند. هم چنین گزارش شده که در باسیل‌ها لایه پروتئینی سطحی (لایه- S) کنترل آزادسازی آنزیم‌های خارج سلولی را در اختیار دارد. تغییر در این لایه سطحی می‌تواند با تفاوتی در سطح اکسیژن القاء شده باشد. بنابراین، دمای انکوباسیون ممکن است با تحت تأثیر قرار دادن ساختارهای ماورائی غشاء سلولی و یا لایه- S با تغییر در سطح اکسیژن حل شده باعث تفاوت‌هایی در بهینه‌های دما برای رشد و تولید آنزیم شود (Mamo and Gessesse, 1999). آلفاآمیلازهای جنس باسیلوس پایداری گرمایی دارند و این ویژگی مطلوبی در صنایع ذوب نشاسته به شمار می‌رود. علی رغم مطالعات زیادی که روی آلفاآمیلاز مقاوم به دمای بالا در *Bacillus licheniformis* انجام شده است، اما منشاء طبیعی تحمل‌پذیر بودن دمای بالا هنوز به صورت یک معما باقی مانده است به این معنی که آیا *B. lichenifromis* آلفاآمیلاز مقاوم به دمای بالا را به صورت تصادفی تولید می‌کند و یا تحت شرایط انتخابی در دمای بالا یا دیگر شوک‌های محیطی آلفاآمیلاز تولید می‌شود (Rasooli *et al.*,2009). این موضوع می‌تواند منشاء ژنتیکی داشته و به تغییرات در توالی آمینواسیدها و ساختار آنزیم نسبت داده شود. اما در برخی منابع نیز آمده است که پایداری و فعالیت آلفاآمیلاز در حضور یون کلسیم و ایجاد یک پیوند سه گانه‌ی کلسیم- سدیم- کلسیم افزایش می‌یابد، این پیوند کلسیمی باعث اتصال نواحی A و B آنزیم شده و مقاومت و پایداری دمایی آن را افزایش می‌دهد (Machius *et al.*,1995). با توجه به فراوانی وجود یون‌های فلزی مختلف از جمله کلسیم در آب چشمه‌های آبگرم این مسئله توجیه پذیر است. برای سنجش دمای بهینه فعالیت آلفاآمیلاز با توجه به دمای چشمه مبدأ باکتری (۸۲°C) میزان فعالیت آنزیم در شرایط دمایی بین ۳۰°C تا ۱۰۰°C و با فواصل ۱۰°C مورد بررسی قرار

گرفت. نتایج نشان می‌دهد دمای بهینه برای فعالیت آلفاآمیلاز در واکنش سنجش آنزیمی برای سویه *B. licheniformis*-AZ2 ۸۰°C می باشد. دماهای بهینه مختلفی برای فعالیت آلفاآمیلازها در جنس‌های مختلف باسیلوس گزارش شده است که نتایج بدست آمده با نتایج Mamo و Gessesse (1999)، Velcheva و Galabova (1985) و Farahmand *et al.* (2008) با بهینه فعالیت ۷۵°C تا ۸۰°C ، ۸۰°C تا ۹۰°C و ۸۰°C به ترتیب در سویه‌های *Bacillus* sp. Strain WN11 (Mamo and Gessesse, 1999)، *Bacillus licheniformis* MB-80 (Velcheva and Galabova, 1985) و *Anoxybacillus pushchinoensis* (Farahmand *et al.*,2008) مطابقت دارد.



شکل ۳- تأثیر دما بر رشد باکتری، تولید و فعالیت آلفاآمیلاز.

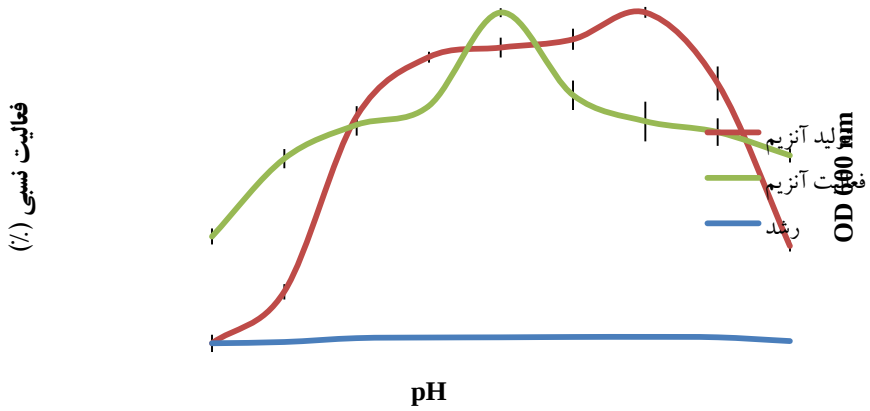
Figure 3- Effect of temperature on bacterial growth, alpha amylase production and activity.

تأثیر pH بر رشد، تولید و فعالیت آلفاآمیلاز

با توجه به مطالعات مشابه انجام شده (Rasooli *et al.*, 2009) تولید آلفاآمیلاز و رشد باکتری *B. licheniformis*-AZ2 در دامنه pH معادل ٤ تا ۱۱ مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که در شکل ٤ مشاهده می‌شود افزایش pH از ٦ تا ۹ در ٤۰°C محرکی برای رشد و تولید آنزیم بود به طوری که در pH=۹ با بیشینه تراکم سلولی، تولید آنزیم نیز افزایش یافت، pH آب چشمه در زمان نمونه‌برداری ٦/٥ بوده است. این تفاوت بین pH مبدأ باکتری و pH بهینه رشد را نشان می‌دهد. Farahmand *et al.* (2008) نیز آزمایش مشابهی را روی باکتری‌های جداشده از چشمه آبگرم خرقان انجام دادند که pH چشمه معادل ٥/٨ بوده اما بهینه رشد در pH حدود ۷ تا ۸ گزارش شده است. شباهت نتایج این دو آزمایش نشان می‌دهد که تفاوت‌های دیده شده بین pH آب چشمه و pH بهینه محیط کشت

واقعی بوده و ممکن است تحت تأثیر تفاوت‌های موجود بین آب چشمه‌ها و ترکیبات محیط کشت‌های مصنوعی باشد زیرا اطلاع دقیقی از عناصر و املاح موجود در آب چشمه‌ها در دست نیست. از طرف دیگر تحمل غلظت‌های بالای نمک بوسیله این باکتری (۹۰ گرم بر لیتر) می-تواند نشانه نمک دوست بودن این باکتری و توجیه‌کننده بهینه تولید آنزیم در pH های قلیایی (در حدود ۹) باشد. قبلاً نیز pH=۹ به عنوان pH بهینه برای سویه‌های *Bacillus licheniformis* SPT27 و *Bacillus* sp. DM-15 گزارش شده است. در مورد اول مبدأ جداسازی این سویه مشخص نیست اما در مورد سویه دوم از چشمه آبگرم سیفتهان واقع در نجده، ترکیه جداسازی شده است (Dharani Aiyer, 2004; Akcan *et al.*, 2011). نتایج همچنین نشان داد باکتری در pHهای پایین‌تر از ۵ و بالاتر از ۱۰ رشد رضایت بخشی نداشت و در نتیجه آن تولید آلفاآمیلاز نیز به طور معنی‌داری در این pHها کاهش یافت. در بین پارامترهای بررسی شده، pH محیط کشت نقش مهمی را در تغییرات فیزیولوژیکی ارگانیسم و تولیدآنزیم ایفا می‌کند (Rasooli *et al.*, 2008). تغییر pH در طی رشد ارگانیسم بر روی پایداری آنزیم تولید شده موثر است. هم چنین معلوم شده است که ترکیب دیواره سلولی و غشای پلاسمایی میکرو ارگانیسم‌ها تحت تأثیر pH قرار می‌گیرد و با تغییر در طبیعت دیواره سلولی و غشای سلولی ممکن است دامنه دمای رشد میکرو ارگانیسم‌ها را نیز تحت تأثیر قرار دهد (Mamo and Gessesse, 1999). اسیدیته بهینه رشد و تولید آنزیم در بیشتر سویه‌های باسیلوس که به طور تجاری برای تولید آلفاآمیلاز مورد استفاده قرار می‌گیرند، بین ٦ تا ۹ است (Rasooli et al., 2008). دامنه pH بین ۵ تا ۹ برای تولید آلفاآمیلاز بهینه در سویه‌های باکتریایی *B. subtilis* CM3 (Swain *et al.*,2006)، *B. brevis* (Tsvetkov and Emanuilov, 1989)، *B. coagulans* (Medda and Chandra, 1980)، *B. licheniformis* CUMC305 (Krishnan and Chandra, 1983)، *B. thermooleovorans* NP54 (Malhotra *et al.*,2000)، *B. subtilis* (Baig *et al.*, 1984)، *B. subtilis* AX20 (Najafi *et al.*, 2005)، *B. licheniformis* (Hung *et al.*, 2003) نیز گزارش شده است. اثر pH بر پایداری و فعالیت آلفاآمیلاز، بهینه‌هایی را نشان می‌دهد که وابسته به زمان است علاوه بر این اثرpH و دما نیز با یکدیگر مرتبط هستند. دما نه تنها می‌تواند بهینه pH را تحت تأثیر قرار دهد بلکه pH نیز می‌تواند منحنی پایداری دمایی را نیز تحت تأثیر قرار دهد (Hamad Ashraf, 2004). به طور کلی بهینه فعالیت آلفاآمیلازهای حاصل از سویه *Bcillus licheniformis* در pHهای اسیدی، پایین است و ساختار آن به گونه‌ای است که تحمل بیشتری نسبت به pHهای قلیایی نشان می‌دهد (Shaw *et al.*, 1986). در این مطالعه بیشترین فعالیت آلفاآمیلازی در حضور بافر Tris- HCl با pH= ۷ بدست آمد. با توجه به رشد باکتری در غلظت‌های بالای نمک و pH=۹ و خصوصیات

نسبی نمک دوستی که این سویه از خود نشان می‌دهد، سویه مورد نظر برای رشد، متابولیسم و تولید آلفاآمیلاز به pHهای قلیایی نیاز داشته ولی بهینه پایداری و فعالیت آلفاآمیلاز بدست آمده در pH=۷ رخ می‌دهد، که تفاوت تقریبی بین pH تولید و فعالیت آلفاآمیلاز را توجیه می‌کند. مشابه این رفتار در سویه *Bacillus* sp. DM-15 که به‌لحاظ خصوصیات رشدی کمی قلیا دوست بوده اما فعالیت آلفاآمیلاز بدست آمده از آن در شرایط pH کمی اسیدی اتفاق می‌افتد، مشاهده شده است (Akcan *et al.*, 2011). در پژوهشی Rasooli *et al.* (2009) نیز گزارش کردند که آنزیم مورد نظر بیشترین فعالیت خود را در pH=۷/۵ داشته و فعالیت آن در pHهای ۷ و ۸ (بالاتر و پایین‌تر) نسبت به pH بهینه به میزان قابل توجهی کاهش یافته است. اهمیت pH فعالیت آلفاآمیلازها به کاربرد این آنزیم‌ها در صنعت برمی‌گردد. آلفاآمیلازهای مختلفی با دامنه تحمل به pHهای اسیدی و یا قلیایی وجود دارند که هر کدام بسته به نیاز در صنایع مختلف به کار می‌روند. برای مثال در صنایع شویندگی این آنزیم‌ها بایستی نسبت به pHهای قلیایی تحمل بالایی داشته باشند. یا در صنعت مایع‌سازی نشاسته که در pH ٤/٥ انجام می‌شود، بایستی نسبت به pHهای اسیدی تحمل بالایی داشته باشند. آلفاآمیلازهای با تحمل به اسیدیته بالا نیز اغلب توسط قارچ‌ها از جمله گونه‌های مختلف *Aspergillus* تولید می‌شوند (Hamad Ashraf, 2004). آلفاآمیلاز مورد نظر ما دارای فعالیتی بهینه در اسیدیته خنثی بوده و می‌تواند کاربردهایی در زمینه صنایع ذوب نشاسته داشته باشد.



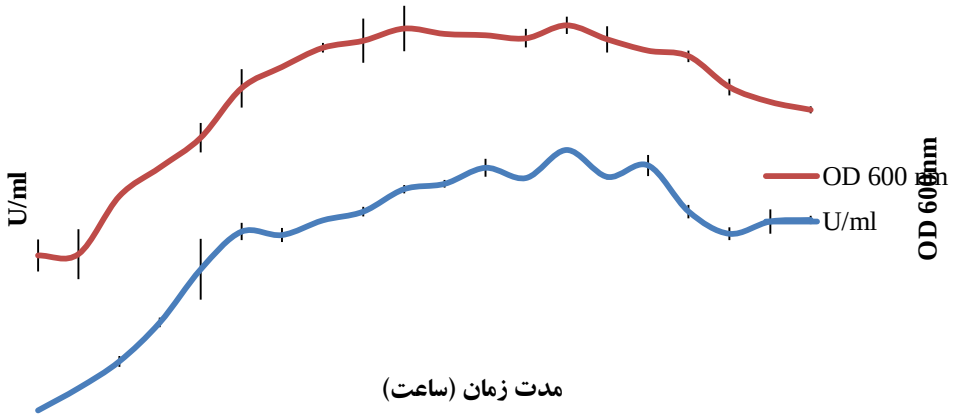
شکل ٤- تأثیر pH بر رشد باکتری، تولید و فعالیت آلفاآمیلاز.

Figure 4- Effect of pH on bacterial growth, alpha amylase production and activity.

تأثیر مدت زمان انکوباسیون

تولید آلفاآمیلاز و رشد باکتری در مقاطع زمانی مختلف در شکل ۵ نشان داده شده است. بیشترین تولید آلفاآمیلاز و رشد ارگانیسم ۸٤ ساعت پس ازتلقیح محیط تولید مشاهده گردید. در پژوهشی Park and Rivera (1982) اشاره بر این موضوع داشتند که مدت زمان انکوباسیون اساساً تحت ویژگی‌های ارگانیسم کشت شده و الگوی تولید آنزیم آن قرار می‌گیرد. در سویه‌های *Bacillus megaterium* Aq-2007 (Bhutto and Dahot, 2010)، *Bacillus* sp. Strain KCPSS-12ss (Suman and Ramesh, 2010)، SPT27 *Bacillus licheniformis* (Dharani Aiyer, 2004) و *Bacillus licheniformis* shahed-07 (Rasooli *et al.*, 2009) بیشترین تولید آلفاآمیلاز به ترتیب پس از ۱۲، ۲٤، ۲٤ و ۲٦ ساعت انکوباسیون گزارش شده است. هم چنین Huang *et al.* (2003) گزارش کردند که بیشترین تولید آلفاآمیلاز توسط *B. subtilis* JS-2004 پس از ٤۸ ساعت انکوباسیون بدست آمده و پس از ۹٦ ساعت بتدریج تولید آنزیم کاهش یافته است. بیشترین تولید آلفاآمیلاز توسط *Bacillus licheniformis*-AZ2 نیز زمانی مشاهده شد که جمعیت توده سلولی در فلاسک لرزشی به اوج خود رسید (شکل ۵). پس از این مدت زمان رشد باکتری و تولید آلفاآمیلاز بتدریج کاهش یافت. این کاهش می‌تواند بدلیل اثر مهار کاتابولیتی قند-های آزاد شده در محیط بر تولید آنزیم، دناتوره شدن آنزیم بدلیل میانکنش آن با سایر اجزاء محیط کشت، تغییر اسیدیته و یا بدلیل تخلیه مواد غذایی در دسترس میکروارگانیسم باشد (Ghasemi *et al.*, 2007; Akcan, 2011). گفته شده تولید آنزیم در ارتباط با رشد میکروارگانیسم قرار دارد و رشد میکروارگانیسم ممکن است به دلیل مواد غذایی ناکافی به مرحله‌ای برسد که به طور غیر مستقیم تولید متابولیت‌های ثانویه را ارتقاء بخشد (Akcan *et al.*, 2011). در برخی از منابع زمان تولید آنزیم به فاز رشد باکتری نسبت داده شده است. Wanderley *et al.* (2004) اعتقاد داشتند که القاء بیشتر تولید آلفاآمیلاز در *Crypyococcus flavus* اتفاق نمی‌افتد، مگر زمانی که رشد به فاز سکون خود رسیده باشد و سایر منابع در دسترس از جمله قندهایی که به سادگی در دسترس هستند از محیط تخلیه شده باشند. Sudharhsan *et al.* (2007) نیز به این موضوع اشاره داشتند که معمولاً تولید آلفاآمیلاز طی فاز لگاریتمی رشد آغاز شده و در اوائل فاز سکون به بالاترین میزان خود می‌رسد. هم چنین تشخیص داده شده است که شرایط محیط رشد تأثیر زیادی بر تولید آلفاآمیلاز دارد. در پژوهشی Ghosh and Chandra (1984) اظهار داشتند نیازهای غذایی و ویژگی‌های کشت CBML-152 *Bacillus apiariues* ، تولیدکننده آلفاآمیلاز مقاوم به دمای بالا، پتانسیل‌های این سویه را برای تولید صنعتی آلفاآمیلاز نشان می‌دهد. این سویه یک طبیعت رشد دو فازی را در محیط پیچیده نشان می‌دهد. تحت شرایط کشت ساکن و

لرزشی، بیشترین میزان تولید آنزیم به ترتیب در ابتدای فاز لگاریتمی و ابتدای فاز سکون آن بدست می‌آید. بهینه مدت زمان انکوباسیون برای تولید آلفاآمیلاز توسط این سویه در کشت‌های ساکن و لرزشی به ترتیب ۳۸-۳۲ ساعت و ۲۵-۲۰ ساعت بوده است. هم چنین Ul-Haq *et al.* (2010) گزارش دادند استفاده از فرمانتور برای تولید آلفاآمیلاز در سویه موتانت *Bacillus amyloliqeifaciens* EMS-6 علاوه بر افزایش ۱/٤ برابری در تولید آنزیم، مدت زمان انکوباسیون را از ۷۲ ساعت به ٤۸ ساعت کاهش داد که می‌تواند بدلیل شرایط رشد متفاوت به لحاظ همزدن، هوادهی و سطح اکسیژن بالاتر در شرایط فرمانتور باشد. همانطور که در شکل ۵ نیز مشاهده می‌شود، تولید آنزیم در این سویه از ابتدای فاز لگاریتمی آغاز شده و همگام با رشد ارگانیسم میزان آن افزایش یافته است و در فاز سکون به حداکثر میزان خود رسیده است و پس از آن میزان تولید آنزیم احتمالاً بدلیل اثر مهار کاتابولیتی قندهای آزاد شده در محیط بر تولید آنزیم کاهش یافته است.



شکل ۵- تأثیر مدت زمان انکوباسیون بر رشد باکتری و تولید آنزیم آلفاآمیلاز.

Figure 5- Effect of incubation time on bacterial growth, alpha amylase production and activity.

نتیجه گیری

سویه بومی *Bacillus licheniformis*-AZ2 سطح مطلوبی از آلفاآمیلاز مقاوم به دمای بالا (°C ۸۰) را تولید می‌کند. با توجه به آنچه در این تحقیق بدست آمد، می‌توان چنین نتیجه گرفت که این آنزیم از نظر صنعتی بسیار مهم و پر کاربرد بوده و دارای قابلیت مناسبی در فرآوری نشاسته و صنایع غذایی می‌باشد. فرآیند تولید صنعتی این آنزیم می‌تواند با بهینه‌سازی سایر ترکیبات محیط کشت، در سطح تجاری مطرح شود.

منابع

Akcan N (2011). High level production of extracellular Alpha-amylase from *Bacillus Licheniformis* ATCC 12759 in Submerged Fermentation. Romanian Biotechnology Letters 16: 6833-6840.

Akcan N, Uyar F, GÜven A (2011). Alpha- amylase production by *Bacillus subtilis* RSKK96 in submerged cultivation. Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi 17: 17-22.

Antranikian G (1990). Physiology and enzymology of thermophilic anaerobic bacteria degrading starch. FEMS Microbiology Reviews 75: 201-218.

Ashraf H, Rana K, Zainab H, Ul-Haq I (2005). Production of alpha amylase by a thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. Journal of Food Technology 3: 64-67.

Ashwini K, Gaurav K, Karthik L, Bhaskara Rao KV (2011). Optimization, production and partial purification of extracelluar α-amylase from *Bacillus* sp. Marini. Archives of Applied Science Research 3: 33-42.

Baig MA, Pazlarova J, Votruba J (1984). Kinetics of α-amylase production in a batch and fed-batch culture of *Bacillus subtilis*. Folia Microbiology 38: 77-80.

Baysal Z, Uyar F, Aytekin C (2003). Production of α-amylase by thermotolerant *Bacillus subtilis* in the presence of some carbon, nitrogen containing compounds and surfactants. Annals of Microbiology 53: 323-328.

Bernfield P (1955). Amylase alpha and beta. Methods of Enzymology 1: 149-158.

Bhutto MA, Dahot MU (2010). Effect of alternative carbon and nitrogen sources on production of alpha- amylase by *Bacillus megaterium*. World Applied Sciences Journal (Special Issue of Biotechnology & Genetic Engineering) 8: 85-90.

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

Cappuccino J, Sherman N (1996). Microbiology (a laboratory manual). Benjamin/ Cumming publishing company INC, USA, pp.13-16.

Dharani Aiyer PV (2004). Effect of C:N ratio on alpha amylase production by *Bacillus licheniformis* SPT27, African Journal of Biotechnology 3: 519-522.

Dordick JS (1991). Biocatalysis for industry. Plenum Press, New York, pp. 161–180.

El- Tayeb O, Mohammad F, Hashem A, Aboulwafa M (2007). Optimization of the industrial production of bacterial alpha amylase in Egypt. IV. Fermentor production and characterization of the enzyme of two strains of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliqueifaciens*. African Journal of Biotechnology 7: 4521-4536.

Farahmand M, Mozaffari NA, Mehrabian S, Khavari Nejad R (2008). Characterization of α-amylase produced by thermophilic bacteria isolated from Iranian hotspring waters. Pajouhesh and Sazandegi 81: 161-167.

Forgaty WM, Joyce AM (1974). Enzymes of *Bacillus* species, Part I. Process Biochemistry 9: 11-24.

Fogarty WM, Kelly CT (1980) Amylases, amyloglycosidases, and related gluconases. In: Rose AH (ed) Economic microbiology- microbial enzymes and bioconversions. Academic Press, New York, pp 115–170.

Ghasemi A, Khajeh K, Ranjbar B (2007). Stabilization of *Bacillus licheniformis* alpha-amylase by specific antibody which recognizes the N-terminal fragment of the enzyme. International Journal of Biological Macromolecules 41: 162-167.

Ghosh SB, Chandra AK (1984). Nutritional requirements and cultural characteristics of *Bacillus apiaries* CBML-152 for the production thermostable alpha-amylase. Zentralblatt Fur Bakteriologie-international journal of Medical Microbiology 139: 293-304.

Goyal N, Gupta JK, Soni SK (2005). A novel raw starch digesting thermostable α-amylase from *Bacillus* sp.I-3 and it's use in the direct hydrolysis of raw potato starch. Enzyme and Microbial Technology 37: 723-734.

Hamad Ashraf M (2004). Studies on the biosynthesis of alpha amylase by a mutant strain of *Bacillus* species. Ph.D. Thesis. University of the Punjab, Pakistan.

Hamilton LM, Kelly CT, Fogarty WM (1999). Purification and properties of the raw starch degrading α-amylase of *Bacillus* sp. IMD 434. Biotechnology Letters 21: 111–115.

Huang H, Ridgway D, Gu T, Moo-Young M (2004). Enhanced amylase production by *Bacillus subtilis* using a dual exponential feeding strategy. Bioprocess and Biosystem Engineering 27: 63-69.

Hung H, Ridgway D, Gu T, Moo- Young M (2003). A segregated model for heterologous amylase production by *Bacillus subtilis*. Enzyme and. Microbial Technology 32: 407-413.

Konsula Z, Liakopoulou-Kyriakides M (2004). Hydrolysis of starches by the action of an α-amylase from *Bacillus subtilis*. Process Biochemistry 39: 1745-1749.

Krishnan T, Chandra AK (1983). Purification and Characterization of α-amylase from *Bacillus licheniformis* CUMC305. Applied Environmental Microbiology 46: 430-437.

Kuddus M, Roohi R (2010). Microbial cold- active α- amylases: From fundamentals to recent developments. Current research Technology and Education. Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology 1265-1276.

Lonsone B, Ramesh MV (1990). Production of bacterial thermostable α-amylase by solid state fermentation. Advances in Applied Microbiology 35: 181-188.

Machius M, Declerck N, Huber H, Wiegand G (1998). Activation of *Bacillus licheniformis* α-amylase through a disorder→order transition of the substrate-binding site mediated by a calcium-sodium-calcium metal triad. Structure 6: 281-292.

Mahmoud SAZ, Abdel- Hafez AM, Mashhoor WA, Refaat AAA (1978). Utilization of industrial and agricultural by-products for fungal amylase production. Zentralbl Bakteriol Naturwiss 133: 115-120.

Malhotra R, Noorwez SM, Satyanarayana T (2000). Production and partial characterization of thermostable and calcium-independent α-amylase of an extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans* NP 54. Letters of Applied Microbiology 31: 378-384.

Mamo G, Gessesse A (1999). Purification and characterization of two raw starch digesting thermostable alpha amylase from a thermophilic *Bacillus*. Enzyme and Microbial Technology 25: 433-438.

May BK, Elliott WH (1968). Selective inhibition of extracellular enzyme synthesis by removal of cell wall from *Bacillus subtilis*. Biochemica et Biophysica Acta 166: 532-537.

Medda S, Chandra AK (1980). New strains of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus coagulans* producing thermostable α-amylase active at alkaline pH. Journal of Applied Bacteriology 48: 47-58.

Najafi MF, Deobagkar D, Deobagkar D (2005). Purification and characterization of an extracellular α-amylase from *Bacillus subtilis* AX20. Protein Expression and Purification 41: 349-354.

Pandey A, Nigam P, Soccol CR, Soccol VT, Singh D, Mohan R (2000). Advances in microbial amylases biotechnology. Applied Biochemistry 31: 135-152.

Park YK, Rivera BC (1982). Alchol production from various enzyme converted starches with or without cooking. Biotechnology and Bioengineering 24: 495-500.

Pretorius IS, Koch MJ, Britz HJ, Potgieter HJ, Lategan PM (1986). Numerical taxonomy of amylase producing *Bacillus* species. Journal of Applied Bacteriology 60: 351-360.

Priest FG (1977). Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. Bacteriology Reviews 41: 711-753.

Rasooli I, Darvish Alipoor Astaneh Sh, Borna H, Azizi Barchini K (2008). A thermostable α-amylase producing natural variant of *Bacillus* spp. isolated from soil in iran. American Journal of Agriculture and Biology Science 3: 591-596.

Rasooli I, Mousavi Gargari SL, Sorouri Zanjani R, Darvish Alipoor Astaneh Sh (2009). Characterization of a thermotolerant α-amylase producing natural variant of *Bacillus* species. Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences 8: 303-316.

Rick W, Stegbauer HP (1974). Alpha amylase measurement of reducing groups. In: II. Principles of Microbiology. 4th Ed. H.V. Bermeyer, Academic Press, New York, USA, pp. 885-915.

Satio N, Yamamoto K (1975). Regulatory factors affecting α-amylase production in *Bacillus licheniformis*. Journal of bacteriology 121: 848-856.

Shaw A, Bott R, Day AG (1986). protein engineering of α-amylases for low pH performance. Current Opinion in Biotechnology 10: 349-352.

Singh A, Singh N, Bishnoi NR (2009). production of cellulose by *Asperigillus heteromorphus* from wheat straw under submerged fermentation. International Journal of Enviromental Science and Engineering 1: 23-26.

Sudharhsan S, Senthikumar S, Ranjith K (2007). Physical and nutritional factors affecting the production of amylase from species of *Bacillus* isolated from spoiled food waste. African Journal of Biotechnology 6: 430-435.

Suman S, Ramesh K (2010). Production of a thermostable extracellular amylase from thermophilic *Bacillus* species. Pharmaceutical Sciences and Research 2: 149-154.

Swain MR, Kar SH, Padmaja G, Ray RC (2006). Partial characterization and optimization for production of extracellular α-amylase from *Bacillus subtilis* isolated from culturable cow dung microflora. Polish Journal of Microbiology 55: 289-296.

Thippeswamy S, Girigowda K, Mulimani VH (2006). Isolation and identification of α-amylase producing *Bacillus* sp. From dhal industry waste. Indian Journal of Biochemistry and Biophysics 43: 295-298.

Tsvetkov VT, Emanuilov EI (1989). Purification and properties of heat stable α-amylase from *Bacillus brevis*. Applied Microbiology and Biotechnology 31: 246-248.

Ul- Haq I, Shamim N, Ashraf H, Ali S, Qadeer MA (2005). Effect of surfectants on the biosynthesis of alpha amylase by *Bacillus subtilis* GCBM-25. Pakistan Journal of Botanics 37: 373-379.

Ul-Haq I, Ali S, Javed MM, Hameed U, Saleem A, Adnan F, Qadeer MA (2010). Production of Alpha-Amylase from a Randomly Induced Mutant Strain of *Bacillus amyloliqueifaciens* and Its Application As a Desizer in Textile Industry. Pakistan Journal of Botanic 42: 473-484.

Ul-Haq I, Ashraf H, Iqbal J, Qadeer MA (2003). Production of alpha amylase by *Bacillus licheniformis* using an economical medium. Bioresource Technology 87: 57-61.

Vaseekaran S, Balakumar S, Arasaratnam V (2010). Isolation and Identification of a Bacterial Strain Producing Thermostable α- Amylase. Tropical Agriculture Research 22: 1-11.

Velcheva P, Galabova D (1985). Influence of Na^+ and K^+ ions on the kinetic parameters of the enzyme action and thermal denaturation of thermostable alpha- amylase. Acta microbiologia Bulgarica 16: 67-72.

Wanderley KJ, Torres FAG, Moraes L, Ulhoa CJ (2004). Biochemical characterization of α-amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. FEMS Microbiology Letters 231: 165-169.

Ziaei Ziabari M, Faezi Ghassemi M, Ghaemi M (2008). Amylase production by native strain *Bacillus* sp. (BC18) A comparison between the free and immobilized cells forms. Journal of Biological Sciences Branch of Islamic Azad University of Lahijan 2: 55-66.

Alpha amylase production by a native thermophilic strain *Bacillus licheniformis*-AZ2 isolated from Qinarje Hot spring in Ardebil Province

Deljou A.*[1], Arezi I.[2]

[1]Assistant professor, Department of Agricultural Biotechnology, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.
[2]Msc. Students of Agricultural Biotechnology, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.

Abstract

Thermophilic microorganisms are the main sources of valuable thermostable hydrolytic enzymes hence they have very importance in different industries. In comparison with other amylolytic enzymes, application of alpha amylase in starch processing industries, fermentation and carbohydrate products is a great importance and they could also be substituted with chemical hydrolysis of starch in industries. Determination of optimal conditions for thermostable α-amylase production by native strain *Bacillus licheniformis* was the aim of this study. *Bacillus licheniformis* strain has been isolated from Qinarje Hotspring (Ardebil Prov.) recently which have been identified and registered as the name of *Bacillus licheniformis*-AZ2 in bacterial collection of agricultural biotechnology department of Bu-Ali Sina University. In this article, possibility of the amylolytic activity of this microorganism has been evaluated using Gram's iodine staining method. Results showed that maximum growth rate and also amylase production in basal medium conditions which was inoculated with 1% (V/V) inoculums achieved at 40˚C and pH=9, 84 hours after inoculation. Amylase assay also showed that the optimum enzyme activity was achieved at 80˚C and pH=7, so this enzyme has been considered to be thermostable. Our results showed that *Bacillus licheniformis*-AZ2 strain produced thermostable α-amylase with characteristics suitable for application in starch processing and other food industries.

***Keywords*:** *Bacillus licheniformis*- Thermostable α-amylase, Optimization, Production medium.

* Corresponding Author: Deljou A. Tel: +989181111567 Email: alideljou@yahoo.com