مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره دوم، شماره هفتم، تابستان ۱۳۹۱

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

# بررسی پروفیل آنزیمی باکتری *باسیلوس آمیلولیکوئیفاسینس BEH 111* و تعیین ویژگی های آنزیم آلفا-آمیلاز تولید شده بوسیله این باکتری

**الهام آریاپور[۱]، پروین شریعتی*[۲]، فاطمه تابنده[۲]، باقر یخچالی[۳]**

*[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی ،دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، اصفهان، ایران*
*[۲] استادیار، گروه زیست فناوری صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری (NIGEB)، تهران، ایران*
*[۳] دانشیار، گروه زیست فناوری صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری (NIGEB)، تهران، ایران*

## چکیده

**سابقه و هدف:** آمیلازها، یکی از آنزیم های عمده صنعتی هستند که حدود ٪۲۵ از بازار جهانی آنزیم ها را به خود اختصاص می دهند. این آنزیم ها در صنایع مختلف مثل نساجی، کاغذ سازی، داروسازی و صنایع غذایی مانند شیرین سازی و فرآوری نشاسته، استفاده می شوند. تحقیقات بسیاری در ارتباط با کاربرد آنزیم های آمیلولیتیک تولید شده توسط اعضاء جنس باسیلوس، در زمینه های مهم تولید قند، آبجو، صنایع غذایی، شوینده ها انجام شده است. گستردگی کاربرد آنزیم های آمیلولیتیک ، موجب می شود که تحقیقات برای مشخص شدن ویژگی های آنزیم ها ادامه داشته باشد. به همین دلیل، در این پژوهش، بررسی روی پروفیل آنزیمی آمیلولیتیک باکتری بومی و تعیین ویژگی های آن انجام شد.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه، پروفیل آنزیمی باکتری *باسیلوس آمیلولیکوئیفاسینس BEH 111*، با استفاده از روش های، SDS PAGE، زایموگرام و TLC تعیین شد. وزن مولکولی آلفا-آمیلاز، با استفاده از روش SDS PAGE تخمین زده شد. جهت سنجش کمی فعالیت آنزیم α-آمیلاز، از معرف دی نیتروسالیسیلیک اسید (DNS) استفاده شد. بررسی ویژگی های آنزیم جهت تایین بیشیته فعالیت آنزیم با روش DNS در شرایط مختلف دما، pH، غلظت سوبسترا (نشاسته) و زمان اجرا شد.

**یافته ها:** وزن مولکولی آلفا-آمیلاز، با استفاده از روش SDS PAGE ،۵۵ کیلودالتون تخمین زده شد. جهت سنجش کمی فعالیت آنزیم α-آمیلاز، از معرف دی نیتروسالیسیلیک اسید (DNS) استفاده شد. بررسی ویژگی های آنزیم نشان داد که بیشیته فعالیت این آنزیم در ۵۰ درجه سانتی گراد، pH ۷، در حضور غلظت ٪۲ از نشاسته، طی ۹۰ دقیقه است. میزان فعالیت آنزیم در این شرایط U/L ۸۲۲۲ می باشد.

**نتیجه گیری:** این مقدار بالای فعالیت آنزیم تولید شده توسط *باسیلوس آمیلولیکوئیفاسینس BEH 111*، می تواند از نظر اقتصادی شایان توجه باشد. علاوه بر این توانایی فعالیت آن در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد و بالاتر، استفاده از آن را در فرآیندهایی که در دماهای بالا انجام می شوند، امکان پذیر می کند. شرایط pH بهینه ۶ تا۷ ، جهت فعالیت بالای این آنزیم، امکان استفاده در فرآیندهایی مثل مایع سازی و ژلاتینه کردن نشاسته را ایجاد می کند.

**کلمات کلیدی:** *باسیلوس آمیلولیکوئیفاسینس BEH 111*، کروماتوگرافی لایه نازک، دی نیترو سالیسیلیک اسید،α- آمیلاز

## مقدمه

آلفا-آمیلازها در واقع اندوآمیلازها هستند که هیدرولیز مهم و اولیه نشاسته به الیگوساکاریدهای کوتاه تر را از طریق شکست پیوندهای گلیکوزیدی آلفا-D-۱و۴ کاتالیز می کنند. آلفا-آمیلازها توانایی عبور از روی پیوندهای آلفا-۱و۶ را دارند و می توانند واحدهای گلوکز داخلی را هم آزاد کنند.

آدرس نویسنده مسئول: گروه زیست فناوری صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری (NIGEB) ، تهران،ایران
Email: shariati@nigeb.ac.ir
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۱۱/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۲/۳۱

محصولات حاصل از عمل آلفا-آمیلاز، الیگوساکاریدهایی با طول های متفاوت و کنفیگوراسیون α و دکسترین های آلفا-limit است که یک مخلوط از مالتوز، مالتوتریوز و الیگوساکاریدهایی دارای ۸-۶ واحد گلوکز، تشکیل می دهند (۶). آمیلازها، یکی از اصلی ترین آنزیم های صنعتی هستند که حدود ٪۲۵ از بازار جهانی آنزیم ها را به خود اختصاص می دهند. این آنزیم ها در صنایع مختلف مثل نساجی، کاغذ سازی، داروسازی و صنایع غذایی مانند شیرین سازی و فرآوری نشاسته، استفاده می شوند (۱، ۲). تحقیقات بسیاری در ارتباط با کاربرد آنزیم های آمیلولیتیک تولید شده توسط اعضاء جنس باسیلوس، در زمینه های مهم تولید قند، آبجوسازی، صنایع غذایی، شوینده ها انجام شده است (۴). ویژگی های آلفا-آمیلازها مثل مقاومت نسبت به گرما و pH باید با کاربردهای آن متناسب باشد. بنابر این، گستردگی کاربرد آنزیم ها، موجب می شود که تحقیقات برای مشخص شدن ویژگی های آنزیم ها ادامه داشته باشد. نرخ هیدرولیز نشاسته، توسط آلفا-آمیلاز وابسته به شرایطی مثل دما، pH، منشا سوبسترا، غلظت سوبسترا، غلظت آنزیم، وجود یا عدم وجود یون کلسیم و دیگر عوامل پایدارکننده آنزیم است (۲). آنزیم های مقاوم به گرما جهت استفاده در صنایعی که با دماهای بالا همراه هستند، بسیار مورد توجه می باشند. آنزیم های با گستره فعالیت در pH ۶ تا ۷ از نظر تجاری ترجیح داده می شوند (۶). به همین دلیل، در این پژوهش، بررسی روی پروفیل آنزیمی باکتری بومی و تعیین ویژگی های آن انجام شد.

## مواد و روش ها

*باسیلوس آمیلولیکوئیفاسینس BEH III*، از میکروارگانیسم هایی که طی تحقیقی با عنوان: جدا سازی و شناسایی یک سویه بومی باکتریایی مناسب مولد آنزیم های آمیلولتیکی، که توسط خانم دکتر پروین شریعتی در پژوهشگاه ملی ژنتیک و زیست فناوری انجام شده است، انتخاب شد.طبق گزارشات پیشین، این باکتری دارای فعالیت آمیلولیتیکی بسیار زیادی بوده است.

**محیط کشت اختصاصی تولید آنزیم آلفا-آمیلاز**

باکتری مورد نظر در محیط کشت حاوی، $K_2HPO_4$، ۱۴ گرم در لیتر، $KH_2PO_4$، ۶ گرم در لیتر، NaNo۳، ۲ گرم در لیتر، Trisodium citrate، ۱ گرم در لیتر، عصاره مخمر، ۵ گرم بر لیتر و نشاسته، ۱۰ گرم در لیتر، کشت داده شد و هر ۴ ساعت از آن نمونه برداری شد. نمونه ها، تحت rpm ۵۰۰۰ و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و سوپرناتانت به عنوان محلولی که حاوی آنزیم بود، جداسازی گردید.

**کروماتوگرافی لایه نازک[1]**

آنالیز متابولیت های حاصل از فعالیت آنزیم، توسط کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) انجام شد. ۱۵۰ ماکرولیتر از سوپرناتانت حاوی آنزیم را با ۱۵۰ ماکرولیتر از ترکیب سدیم فسفات ۱/. مولار با pH ۷ و نشاسته ٪۱راباهم مخلوط شده و ویال حاوی این مواد را در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد و به مدت ۵/۱ ساعت انکوبه گشت و هر ۳۰ دقیقه از آن نمونه برداری شد. سپس ۱ ماکرو لیتر از نشانگر (حاوی گلوکز، مالتوز، مالتوتریوز، مالتوتتراوز، مالتوپنتاوز) و هر کدام از نمونه ها را با فاصله ۲ سانتی متر از پایین ورقه TLC لکه گذاری شد (۱۷).

**تعیین وزن مولکولی آنزیم**

وزن مولکولی آلفا-آمیلاز با استفاده از روش الکتروفورز ژل سدیم دودسیل سولفات[2] (SDS PAGE)، تعیین شد. ملاک تعیین وزن پروتئین ها در این روش، یک نشانگر پروتئینی بود که از شرکت Fermentas، تهیه شد (۱۴).

**زایموگرام**

بعد از انجام الکتروفورز، ژل بوسیله تریتون[3] X-100 ٪۵ (v/v) به مدت ۱۵ دقیقه جهت حذف SDS، شست و شو داده شد. سپس، ژل محلول نشاسته ٪۲ در فسفات بافر، در ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شد. ژل در بافر فسفات در ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد و سپس بوسیله محلول لوگول (ید ٪۰.۳ در یدید پتاسیم ٪۳) به مدت ۳ دقیقه رنگ آمیزی گردید. محل اثر آنزیم بر روی ژل به صورت یک لکه زرد رنگ مشخص گردید. علاوه بر این، نمونه های ساعات مختلف نیز در ژل زایموگرام بررسی شد (۱۴).

**سنجش فعالیت آنزیم**

1-Thin Layer Choromatography
2-Sodium dodecyl sulfate
3- Triton

جهت سنجش فعالیت آنزیمی از روش برند فلد که بر اساس استفاده از معرف دی نیترو سالیسیلیک اسید ( DNS) می باشد، استفاده شد. ۱۵۰ ماکرولیتر از سوپرناتانت حاوی آنزیم با ۱۵۰ ماکرو لیتر از ترکیب سدیم فسفات۰/۱ مولار با pH ۷ و سوبسترا ۱٪ مخلوط گردید و ویال حاوی این مواد در دمای ۳۷ درجه سانتی گرادو به مدت ۱ ساعت انکوبه شد، پس از پایان این زمان ویال را بر روی یخ منتقل شده و به آن ۹۰۰ ماکرولیتر معرف DNS اضافه گردید. سپس ۵ دقیقه در آب در حال جوش قرار داده شد. واکنش به وسیله قرار دادن ویال بر روی یخ متوقف شد و جذب آن ها به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر، در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه گیری گردید. مقدار آنزیمی که ۱ میکروگرم مالتوز را طی ۱ دقیقه، از نشاسته ایجاد کند، یک واحد آنزیمی گفته می شود. از مالتوز در رقت های ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸، ۱ گرم بر لیتر جهت کشیدن نمودار استاندارد مالتوز استفاده گردید (۲).

### تعیین ویژگی های آنزیم آلفا-آمیلاز

### تعیین دمای بهینه فعالیت آنزیم

۱۵۰ ماکرولیتر از سوپرناتانت به همراه ۱۵۰ ماکرولیتر از سوبسترای محلول (۱٪) در بافر فسفات با pH ۷، به مدت ۱ساعت در دماهای ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۵، ۵۰، ۵۵ و ۶۰ درجه سانتی گراد انکوبه شد. و سپس توسط معرف DNS، فعالیت آنزیم اندازه گیری شد.

### تعیین pH بهینه فعالیت آنزیم

۱۵۰ ماکرولیتر از سوپرناتانت به همراه ۱۵۰ ماکرولیتر از سوبسترا که در سیترات بافر (۲۰ میلی مولار) با pH های ۵، ۵/۵، ۶، ۶/۵، فسفات بافر (۲۰ میلی مولار) با pH های ۷، ۷/۵، ۸، گلایسین NaOH بافر (۲۰ میلی مولار) با pH های ۸/۵، ۹، ۹/۵و ۱۰به میزان ۱٪ حل شده بود، در ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱ساعت انکوبه شد. سپس توسط معرف DNS، فعالیت آنزیم اندازه گیری شد.

### تعیین زمان بهینه فعالیت آنزیم

۱۵۰ ماکرولیتر از سوپرناتانت به همرا ۱۵۰ ماکرولیتر از سوبسترا که در بافر با pH ۷ به میزان ۱٪ حل شده بود، در ۵۰ درجه سانتی گراد انکوبه شد. هر ۳۰ دقیقه توسط معرف DNS، فعالیت آنزیم اندازه گیری شد.

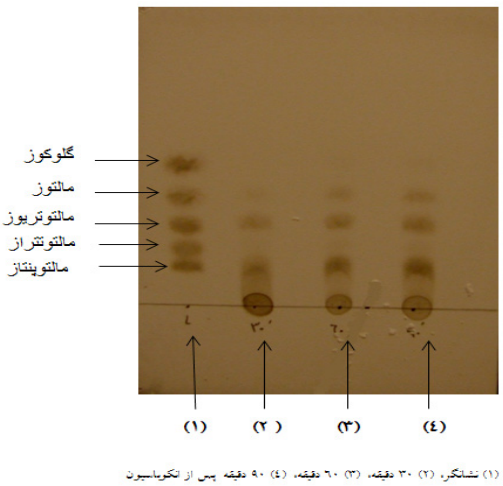
### تعیین درصد سوبسترا بهینه فعالیت آنزیم

نشاسته با نسبت های ۰/۵، ۱، ۱,۵، ۲ و ۲/۵ درصد در بافر با pH ۷ حل شد. سپس ۱۵۰ ماکرولیتر از سوپرناتانت به همراه ۱۵۰ ماکرولیتر از سوبسترا ، در ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱/۵ساعت انکوبه شد. و سپس توسط معرف DNS، فعالیت آنزیم اندازه گیری شد.

## یافته ها

### کروماتوگرافی لایه نازک

پس از انجام کروماتوگرافی لایه نازک برای محصولات حاصل از عملکرد آنزیم *باسیلوس آمیلولیکوئیفاسینس BEH III*، روی نشاسته و مشاهده محل قرار گیری لکه ها و مقایسه آن ها با نمونه استاندارد، مشخص شد که آنزیم تولید شده توسط این باکتری، پس از تجزیه نشاسته، مالتوپنتاوز، مالتوتریوز، مالتوز و با گذشت زمان بیشتری از انکوباسیون (۹۰ دقیقه)، مقادیر بسیار کمی گلوکز تولید کرده است. این یافته موید این مطلب بود که آنزیم مورد نظر، از نوع آلفا-آمیلاز است. نتایج حاصل در شکل شماره ۱ نمایش داده شده است.

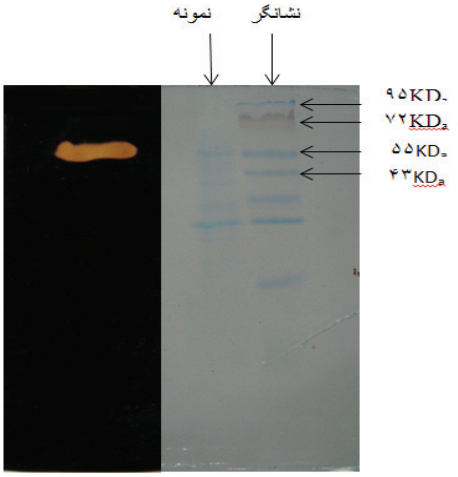


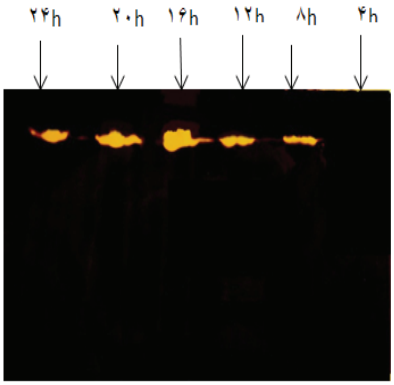

شکل ۱- آنالیز متابولیت های حاصل از تجزیه نشاسته توسط آنزیم آلفا-آمیلاز بوسیله کروماتوگرافی لایه نازک.

### تعیین وزن مولکولی آنزیم و زایموگرام

فقط یک باند در ژل زایموگرام مشاهده شد و با توجه به این

که فقط آنزیم آلفا-آمیلاز توسط *باسیلوس آمیلولیکوئیفاسینس BEH III* تولید شده است، وزن مولکولی این آنزیم ۵۵ کیلو دالتون تعیین شد (شکل ۲). آنزیم های تولیدی در ساعات مختلف نیز در ژل زایموگرام بررسی شد که در همه ساعات فقط آنزیم آلفا-آمیلاز تولید می شد. در ساعت ۴، تولید آنزیم دیده نمی شود و ساعت ۱۶، زمان تولید بیشترین میزان آنزیم است (شکل ۳).




شکل۳- بررسی نوع آنزیم تولید شده بر حسب زمان های مختلف کشت

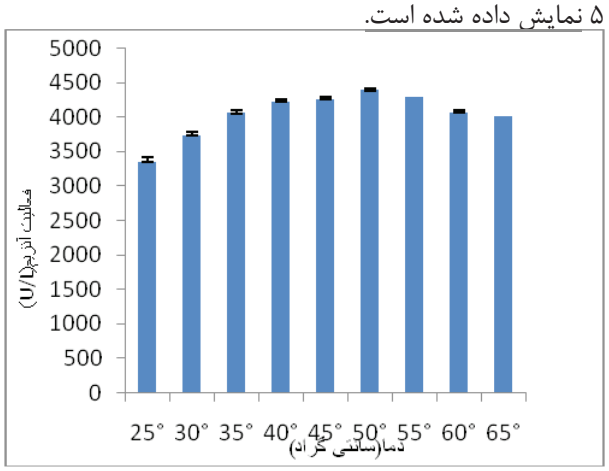
## ویژگی های آنزیم آلفا-آمیلاز

### تعیین دمای بهینه فعالیت آنزی آلفا-آمیلاز

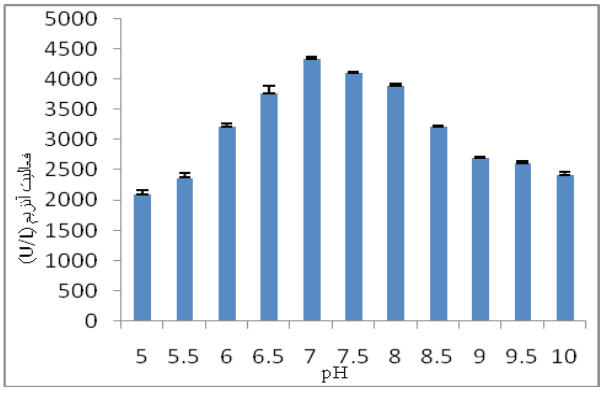
بررسی دمای مناسب جهت فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز تولید شده توسط *باسیلوس آمیلولیکوئیفاسینس BEH III* نشان داد که این آنزیم در گستره دمایی ۶۰-۳۵ درجه سانتی گراد، فعالیت بالایی را دارد. ولی بهترین دما برای فعالیت آن ۵۰ درجه سانتی گراد بود. در این حالت میزان فعالیت آنزیم U/L ۴۳۸۴ بود. نتایج بدست آمده در شکل شماره ۴، نشان داده شده است.

### تعیین pH بهینه فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز

آنزیم آلفا-آمیلاز بدست آمده از *باسیلوس آمیلولیکوئیفاسینس BEH III*، در محدوده ۶/۵ تا ۸ pH توانایی فعالیت بالایی را داشت ولی بهترین pH برای فعالیت آن ۷ pH بود. میزان فعالیت آنزیم در این pH ۴۳۳۴ U/L بود. نتایج حاصل در شکل ۵ نمایش داده شده است.




شکل ۴- بررسی دمای مناسب فعالیت آلفا-آمیلاز

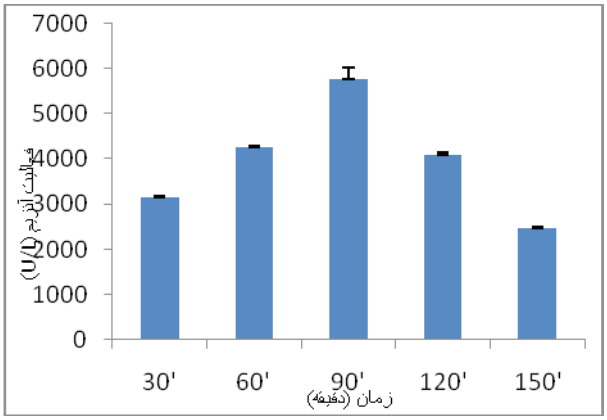



شکل۵- بررسی pH بهینه فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز

### تعیین مدت زمان بهینه فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز

بررسی نتایج نشان داد که بیشینه فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز بدست آمده از *باسیلوس آمیلولیکوئیفاسینس BEH III*، ۹۰ دقیقه پس از آغاز واکنش است. نتایج بدست آمده در شکل ۶، آمده است. . میزان فعالیت آنزیم در این مدت زمان، U/L

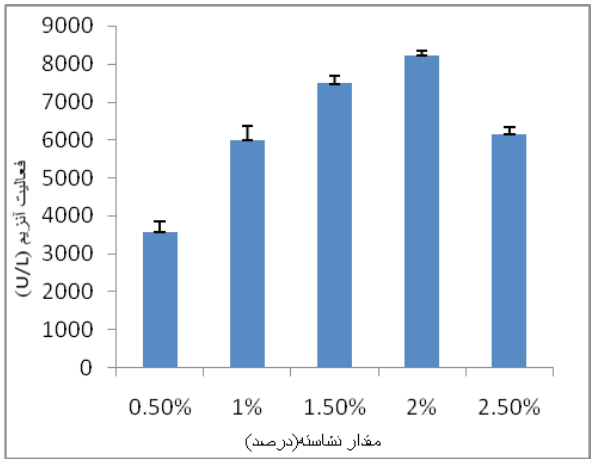
۵۷۸۲ گزارش شد.




شکل۶-نمودار تعیین مدت زمان بهینه فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز

### تعیین میزان بهینه سوبسترا فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز

نتایج نشان داد که بیشترین میزان فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز بدست آمده از *باسیلوس آمیلولیکوئیفاسینس BEH III*، در حضور مقدار ۲ درصدی نشاسته است. همان طور که در شکل ۷ مشاهده می شود، میزان فعالیت آنزیم در این حالت، U/L ۸۲۲۲ بوده است.




شکل۷- نمودار تعیین میزان بهینه سوبسترا فعالیت آنزیم

## بحث

*باسیلوس آمیلولیکوئیفاسینس قسمت* عمده تولید جهانی آلفا-آمیلاز را به خود اختصاص داده است (۱۲). آلفا-آمیلاز حاصل از این باکتری در صنایع مختلف، مخصوصاً صنایع غذایی استفاده می شود. آلفا-آمیلاز بدست آمده از *باسیلوس آمیلولیکوئیفاسینس BEH III* اولین آنزیمی بود که در مقیاس صنعتی برای مایع سازی و شیرین سازی نشاسته استفاده شد (۱۰). به دلیل اهمیت آلفا-آمیلازها در بخش صنعتی و اختصاص دادن ۱۵ تا ۲۰ درصد بازارهای جهان در بخش شیرین سازی به خود و همچنین اهمیت سویه های بومی برای تولید این آنزیم ها، این پژوهش با هدف بررسی سویه بومی با توانایی تولید میزان بالای آنزیم آلفا -آمیلاز، انجام شد، به گونه ای که بتوان از آن در صنعت استفاده کرد. برای این منظور، با استفاده از روش های TLC، PAGE،Native PAGE، پروفایل آنزیمی *باسیلوس آمیلولیکوئیفاسینس BEH III* تعیین شد. پس از انجام کروماتوگرافی لایه نازک برای محصولات حاصل از عملکرد آنزیم *باسیلوس آمیلولیکوئیفاسینس BEH III*، روی نشاسته و مشاهده محل قرار گیری لکه ها و مقایسه آن ها با نمونه استاندارد، مشخص شد که آنزیم تولید شده توسط این باکتری، پس از تجزیه نشاسته، مالتوپنتاوز، مالتوتریوز، مالتوز، و با گذشت زمان بیشتری از انکوباسیون (۹۰ دقیقه)، مقادیر بسیار کمی گلوکز تولید کرده است. این موضوع تایید می کند که آنزیم مورد نظر، از نوع آلفا-آمیلاز است. الگوی کروماتوگرافی لایه نازک در تحقیقاتی که توسط محققین دیگر (۲، ۷، ۸). انجام شده، نیز نشان دهنده تولید متابولیت های مالتوز، مالتوتریوز، مالتوتتراوز و مقدار بسیار کمی گلوکز از نشاسته، توسط آنزیم آلفا-آمیلاز می باشد. در ژل زایموگرام فقط یک هاله دیده شد، پس باکتری باسیلوس آمیلولیکوئیفاسینس BEH 111، فقط قادر به تولید آنزیم آلفا-آمیلاز است. علاوه براین، نمونه های بدست آمده از ساعات مختلف کشت نیز فقط در یک باند قرار گرفته و وزن مولکولی همه آن ها نیز یکسان بود. بنابر این، این باکتری در تمام طول مدت انکوباسیون فقط یک نوع آنزیم که همان آلفا-آمیلاز است، تولید می کند. با توجه به شدت هاله های ایجاد شده مشخص است، بیشینه میزان تولید آنزیم آلفا-آمیلاز، ۱۶ ساعت پس از انکوباسیون اتفاق می افتد. ازمقایسه ژل های SDS-PAG و زایموگرام نیز مشخص شد که وزن این آلفا-آمیلاز، ۵۵ کیلو دالتون است. وزن

مولکولی آلفا-آمیلازهای حاصل از باسیلوس ها بسیار متفاوت است. در جدول شماره ۱ وزن مولکولی آلفا-آمیلاز حاصل از باکتری باسیلوس آمیلولیکوئیفاسینس BEH 111، با چند جنس و گونه دیگر مقایسه شده است (۶، ۱۴، ۵ ). گستردگی کاربرد آنزیم ها، موجب می شود که تحقیقات زیادی برای مشخص شدن ویژگی های آن ها انجام شودنرخ هیدرولیز نشاسته توسط آلفا-آمیلاز، وابسته به شرایطی مثل دما، pH، منشا سوبسترا، غلظت سوبسترا، غلظت آنزیم، وجود یا عدم وجود یون کلسیم و دیگر عوامل پایدارکننده آنزیم است. در سال ۱۹۹۲، تحقیقاتی روی Archaebacterium Natronococcus sp، انجام شد. آمیلاز تولیدی آن خالص سازی شد و وزن مولکولی این آنزیم، ۷۴ کیلودالتون اعلام گردید. بیشینه فعالیت آمیلاز، در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد و pH ۸/۷، در کلرید سدیم ۲/۵ مولار بود. آمیلاز بدست آمده در گستره ۸/۶ - ۶ pH دمای ۵۰ درجه سانتی گراد پایداری خود را حفظ می کرد (۱۱). همچنین، در سال ۱۹۹۵، آنزیم آلفا-آمیلاز تولید شده توسط Bacillus GM۸۹۰۱، که یک باکتری قلیادوست است، را خالص سازی و ویژگی های آن را تعیین کردند. این باکتری پنج آمیلاز قلیایی را در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد و pH ۱۰/۵ تولید می کرد. یکی از این آمیلازها خالص سازی شد و وزن مولکولی آن ۹۷ کیلودالتون اعلام گردید. بیشینه فعالیت آن آنزیم در pH ۱۱تا ۱۲ بود و پایداری خود را در گستره ۱۳ تا ۶ pH حفظ می کرده است. پایداری دمایی آن در حضور $Ca^{+2}$، افزایش پیدا می کرده است (۱۰).در تحقیقی که بر روی آلفا-آمیلاز حاصل از Bacillus SP.marini در سال ۲۰۱۱ انجام شد، مشخص شد بهینه فعالیت این آنزیم در ۴۰ درجه سانتیگراد، pH ۷و حضور نشاسته به میزان ۱٪ می باشد (۳). آلفا-آمیلاز بدست آمده از Bacillus subtilis نیز در دمای ۵۰-۷۰ درجه سانتی گراد، pH۷ و حضور نشاسته به میزان ۱٪ بیشینه فعالیت خود را نشان داد (۱۱). وزن مولکولی آنزیم آلفا-آمیلاز حاصل از Bacillus amyloliquifacienceTSWK1-1 ، ۴۳ کیلو دالتون گزارش شد. دما و pH بهینه جهت فعالیت این آنزیم آلفا-آمیلاز، به ترتیب ۷۰ درجه سانتی گراد و ۷ بود. علاوه بر این، این آنزیم از انواع آلفا-آمیلازهای غیر وابسته به کلسیم بود (۲). همانگونه که مشخص است، آلفا-آمیلازها با توجه به منبع تولید خود دارای ویژگی های بسیار متفاوتی هستند.در این تحقیق، اثر دما، pH، غلظت سوبسترا و مدت زمان واکنش، بر میزان فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز بررسی شد. و مشخص شد که بیشینه فعالیت در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد، pH مناسب، ۷، بهترین غلظت سوبسترا، ۲٪ و بهترین زمان جهت واکنش، ۹۰ دقیقه است.

جدول۱- مقایسه وزن مولکولی آلفا-آمیلاز حاصل از باکتری *باسیلوس آمیلولیکوئیفاسینس BEH III*، با چند جنس و گونه دیگر.

| وزن مولکولی (KDa) | نام باکتری |
|---|---|
| ۴۳ | Bacillus amyloliquifacien-ceTSWK1-1 |
| ۵۲ | Geobacillus species |
| ۵۸،۸ | Bacillus sp. HUTBS71 |
| ۱۰۰ | Bacillus licheniformis |
| ۹۴ | Alicyclobacillusacidocaldarius |
| ۳۰ | Bacillus sp. US 147 |

## نتیجه گیری

از آنجا که زمینه کاربرد آلفا-آمیلازها با توجه به ویژگی های آن ها بسیار گسترده است، تعیین ویژگی ها و خصوصیات این دسته از آنزیم ها می تواند در انتخاب صحیح و استفاده از آن ها بسیار موثر باشد. آلفا-آمیلازهایی که در گستره دمایی بالا و pH ۶-۷ فعالیت دارند، از نظر تجاری برای واکنش هایی که در دمای بالا انجام می شوند، مورد توجه هستند. استفاده از این آنزیم ها موجب کاهش زمان و هزینه در طی انجام این گونه فرآیندها می شود. میزان بالای فعالیت آنزیم تولید شده توسط *باسیلوس آمیلولیکوئیفاسینس BEH III*، می تواند از نظر اقتصادی شایان توجه باشد. علاوه بر این توانایی فعالیت آن در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد و بالاتر، استفاده از آن را در فرآیندهایی که در دماهای بالا انجام می شوند، امکان پذیر می کند. همچنین، شرایط pH بهینه ۶ تا۷ ، جهت فعالیت بالای این آنزیم، امکان استفاده در فرآیندهایی مثل مایع سازی و ژلاتینه کردن نشاسته را ایجاد می کند.

## تشکر و قدردانی

بدینوسیله از همه همکاران محترم پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری و معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان در خصوص در اختیار گذاشتن فضای تحقیقاتی کمال تشکر را داریم.

## منابع

(1) Aiyer PV. Amylases and Their Applications.African Journal of Biotechnology, 2005;4:1525-1529.
(2) Annamala N, Thavasi R, Vijayalakshmi S, Balasubramanian T. Extraction, Purification and Characterization ofThermostable,Alkaline Tolerant a-Amylase from Bacillus cereus. Indian J Microbiol, 2011; 43:54-60.
(3) Ashwini K, Gaurav Kumar, Karthik L, BhaskaraRao K.V. Optimization, Production and Partial Purification of Extracellular a-Amylase from Bacillus sp. Marini.Archives of Applied Science Research, 2011; 3: 33-42.
(4) Bano S, Qader A, Aman A, Syed M, Azhar A. Purification and Characterization of Novel-Amylase from Bacillus subtilis KIBGE HAS. AAPS PharmSciTech, 2011; 12: 255-261.
(5) GangadharanD,RamachandranP,Paramasamy, Gunasekaran P, Ashok N. . a-Amylase Production by Bacillus amyloliquefaciens Using Agro Wastes as Feed Stock. Food Technol Biotechnol, 2010; 49: 336-340.
(6) GhollasiMarzieh. KhageKhosro.Naderi-ManeshHossein.GhasemiAtiyeh. Engineering of a Bacillus-Amylase with Improved Thermostability and Calcium Independency.ApplBiochemBiotechnol, 2010; 162 :444-459.
(7) HmidetNoomen. HaddarAnissa.NasriMoncef. A Novel-Amylase from Bacillus mojavensis A21: Purification and BiochemicalCharacterization. ApplBiochemBiotechnol, 2010; 162: 1018-1030.
(8) Joshi BH. A Novel Thermostable Alkaline a-Amylase from Bacillus circulans PN5: Biochemical Characterization and Production. Asian Journal of Biotechnology, 2010; 3:58-67.
(9) Kikani BA.Singh PS. Single Step Purification and Characterization of A Thermostable and Calcium independent alpha-amylase from Bacillus amyloliquifaciens TSWK1-1 isolated from TulsiShyam hot spring reservoir, Gujarat (India). International Journal of Biological Macromolecules, 2011; 48:676-681.
(10) Kim T U, Bu G, Jay Y J, Si M B, Yong C S. Purification and Characterization of a Maltotetraose-Forming Alkaline a-Amylase from an Alkalophilic Bacillus Strain, GM8901. Applied and Enviromental Microbiology, 1995; 61: 3105-3112.
(11) Kobayashi T, Kanai H, Hayashi T, Akiba T, Akaboshi R, Horikoshi K. Haloalkaliphilic Maltotriose-Forming ox-Amylase From the Archaebacterium Natronococcus sp. Strain Ah-36. Journal of Bacteriology, 1992; 174: 3439-3444.
(12) Manas R. Swain. ShaktimayKar.GourikuttiPadaja. Ramesh Ray. Parchial Characterization and Optimization of Production of Exteracellular Amylase from Bacillus Subtilis Isolated from Culturable Cow Dung Microbiology. Polish Journal of Microbiology, 2006 ; 55: 289-296.
(13) Priest F G, Godfellowl M, ShuteL A, Berkeley R C W. . Bacillus amyloliquefaciens sp. nov. norn. rev. International Journal of Systematic Bacteriol, 1987; 37: 69-71.
(14) SaeedaBano. AfsheenAman.Muhammad NomanSyed.AbidAzhar. Purification and Characterization of Novel Amylase from Bacillus Subtilis KIBGE HAS. AAPS PharmSciTech, 2011; 12:.225261.
(15) Saxena R K, Dutt K, Agarwal L, Nayyar P. A Highly Thermostable and Alkaline Amylase from a Bacillus sp. PN5. Bioresource Technology, 2006; 98: 260–265.
(16) SivaramakrishnanSwetha. NampoothiriKesavanMadhavan.Soccol Carlos Ricardo. Pandey Ashok. a-Amylases from Microbial Sources – An Overview on Recent Developments. Food Technol Biotechnol, 2006;44: 173-184.
(17) Zhao Wei ZJ. Wang Yu-guang. Zhou Hong-bo. A Marked Enhancement in Production of Amylase by Bacillus Amyloliquefaciens in Flask Fermentation Using Statistical methods J Cent.South Univ Technol, 2011;12:1054-1062.