

مقاله تحقیقی

شناسایی اثر pH به عنوان فاکتور موثر بر تولید آنزیم α -آمیلاز توسط باکتری *Bacillusalkalitelluris*هاله عزیزی^۱، مهدی ابراهیمی^{۲*}، فاطمه نوربخش^۱

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، پیشوا، ایران
 ۲. گروه بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، پیشوا، ایران

*مسئول مکاتبات: آدرس الکترونیکی: mehd_ebrahimi@yahoo.com , ebrahimi@iauvaramin.ac.ir

محل انجام تحقیق: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا

تاریخ پذیرش: ۹۶/۹/۱۸

تاریخ دریافت: ۹۵/۷/۷

چکیده

آنزیم α -آمیلاز پیوندهای (۴→۱) α گلیکوزیدی را در نشاسته هیدرولیز نموده و منجر به تولید دی ساکاریدها الیگوساکاریدهای کوچکتر می شود. این آنزیم به عنوان یکی از پرکاربردترین آنزیمها در صنایع مختلف محسوب شده بخش بزرگی از بازار آنزیمها را به خود اختصاص می دهد. در این مطالعه با استفاده از روش پلاکت-برمن فاکتورها کشت و تولید آنزیم α -آمیلاز در باکتری *Bacillusalkalitelluris* به منظور شناسایی فاکتورهای موثر مورد ارزیابی قرار گرفته است. به منظور شناسایی محیط کشت مناسب، باکتری در دو محیط کشت R2A (محیط کشت پیشنهادی) LB برات کشت داده شد. با توجه به سینتیک رشد باکتری، محیط کشت LB برات برای ادامه مراحل انتخاب شد. سپس 'فاکتور(نشاسته، عصاره مخمر، پپتون، کلرید کلسیم، دمای انکوباسیون، زمان انکوباسیون و pH) به منظور طراحی آزمایشات با روش پلاکت-برمن انتخاب و میزان تولید آنزیم در آزمایشات طراحی شده اندازه گیری شد. اثر فاکتورها استفاده از نمودار پارتو و در نظر گرفتن خط مرجع ارزیابی شد. در نهایت pH به عنوان موثرترین عامل از میان ۷ فاکتور مورد بررسی شناسایی شد. با توجه به قلیادوست بودن باکتری می توان نتیجه گرفت که عامل pH به عنوان یک القاگر برای تولید آنزیم α -آمیلاز در باکتری *Bacillusalkalitelluris* عمل می نماید.

واژه های کلیدی: α -آمیلاز، *Bacillusalkalitelluris*، پلاکت-برمن، طراحی آزمایشها

مقدمه

زیادی در مطالعات بیوتکنولوژی هستند (۲). آلفا آمیلاز (اندو ۴۱ - آلفا-D-گلوکان گلوکانو هیدرولاز (E.C.3.2.1.1) آنزیمهای خارج سلولی هستند که بطو تصادفی پیوند آلفا-۴۱ بین واحدهای گلوکز مجاور د زنجیره خطی آمیلوز می شکنند و در نهایت واحدهای گلوکز، مالتوز و مالتوتریوز را تولید می کنند. تبدیل نشاسته به شربت قند(گلوکز، مالتوز، مالتوتریوز دکسترین یا شربت فروکتوز) بخش عمده ای از صنعت فراوری نشاسته است. همچنین آلفا آمیلاز دارا

نشاسته یک منبع عالی کربن در طبیعت و محصول ذخیره ای اصلی بسیاری از محصولات مهم از لحاظ اقتصادی است. از این رو صنعت فرآوری نشاسته به میزان وسیعی رشد بسیار چشمگیری را داشته است (۱). پنج گروه از آنزیمها نقش کلیدی را در هیدرولیز نشاسته بازی می کنند. این آنزیمها حدود ۳۰٪ تولید آنزیم جهانی را دربرمی گیرند. آمیلازها در بین مهمترین آنزیمهای صنعتی قرار دارند که دارای اهمیت

در دمای 30°C به مدت ۴۸ ساعت با سرعت همزن ۱۳۵ دور در دقیقه انکوبه شد. پس از رشد باکتری، سینتیک رشد باکتری به منظور مقایسه تاثیر نوع محیط کشت در دو محیط R2A براث و LB براث تعیین شد. به این منظور، ۵ میلی‌لیتر از کشت ۴۸ ساعته باکتری در محیط R2A براث به ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت R2A و LB براث انتقال یافته و میزان جذب نوری هر محیط کشت در زمان‌های ۰، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت در طول موج ۶۰۰nm ثبت شد. در این مرحله از محیط کشت تلقیح‌نشده به عنوان کنترل استفاده شد.

تولید آنزیم آمیلاز و تعیین پارامترهای دما و pH بهینه آنزیم آمیلاز

از محیط کشت LB براث به عنوان محیط تولید آنزیم آمیلاز استفاده شد. پس از ۴۸ ساعت کشت باکتری در دمای 30°C و سرعت همزن ۱۳۵ دور در دقیقه، محیط کشت با دور ۵۰۰۰ (دور در دقیقه) سانتریفیوژ شده و سوپ رویی که حاوی آنزیم آمیلاز است برای سنجش فعالیت آنزیم مورد استفاده قرار گرفت.

فعالیت آنزیم آمیلاز بر اساس روش برنفلد و با استفاده از سوبسترای نشاسته تعیین گردید. برای این منظور ابتدا معرف DNS با انحلال یک گرم پودر ۲- هیدروکسی ۳ و ۵-دی نیتروبنزواتیک اسید، ۳۰ گرم سدیم پتاسیم تارتارات و ۲۵ میلی‌لیتر سود ۲ مولار در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر تهیه شد (۹). برای سنجش فعالیت آنزیم، ۲۵۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی و ۲۵۰ میکرولیتر بافر استات ۰/۰۵ مولار و ۱/۵ میلی‌لیتر محلول نشاسته ۲ درصد (w/v) به بافر استات افزوده شد. این مخلوط به مدت ۱ ساعت در دمای 50°C انکوبه شد. سپس دو میلی‌لیتر از این مخلوط به ۲ میلی‌لیتر معرف DNS اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد. در مرحله بعد جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۴۰nm قرائت گردید (۱۰). هر واحد فعالیت آنزیم α -آمیلاز بصورت مقدار قند مالتوز آزاد شده (میلی‌مولار) در واحد زمان (دقیقه) تعریف می‌شود.

کاربردهای فراوانی در صنایع مختلف از جمله، صنایع منسوجات، کاغذ، آجوسازی، پخت و پز و تقطیر، تهیه اسیدهای هاضمه، تولید ورقه‌ها و نیز صنعت دارویی است (۳). آلفا آمیلاز از چندین منبع قارچی، مخمر، باکتریها و اکتینومیسیت‌ها استخراج شده است (۴). خصوصیات پایداری در دما و محیط‌های قلیایی، از جمله ویژگی‌هایی مهم برای کاربردهای صنعتی آمیلاز جدا شده از موجودات قلیادوست می‌باشد (۵). آلفا آمیلازهای میکروبی برای فرایندهای صنعتی بطور عمده از خانواده باسیلوس‌ها مانند

amyloliquefaciens Bacillus

Bacillus subtilis و *Bacillus glicheniformis* استخراج می‌شوند. بطوریکه آنها قادر به ترشح آمیلاز به مایع رویی محیط کشت در زمان غوطه ورسازی هستند. آمیلاز استخراج شده از جنس باسیلوس نقش مهمی در صنعت ابفا می‌کند (۱).

بسیاری از گونه‌های باسیلوس قلیادوست از دامنه وسیعی از محیط‌های قلیایی، مانند دریاچه‌های کربنات سدیم، صحراها و خاکهای خشک جدا شده‌اند (۶، ۷). حداقل ۱۹ گونه باسیلوس قلیادوست تا به امروز شناسایی شده‌اند. این باکتریها مرکب از ۶۰ گروه tRNA در جنس باسیلوس هستند که توجه زیادی را در ارتباط با کاربردهای صنعتی، تحقیق‌های بیوتکنولوژی جلب کرده‌اند. *Bacillus alkalitelluris* یک گونه از جنس باسیلوس است که به دلیل پایداری قلیایی به عنوان یک میکروارگانیسم قلیادوست مورد توجه قرار می‌گیرد (۸). هدف این پژوهش، شناسایی فاکتورهای موثر در تولید α -آمیلاز از میان فاکتورهای رشد باسیلوس *alkalitelluris* می‌باشد.

مواد و روش‌ها

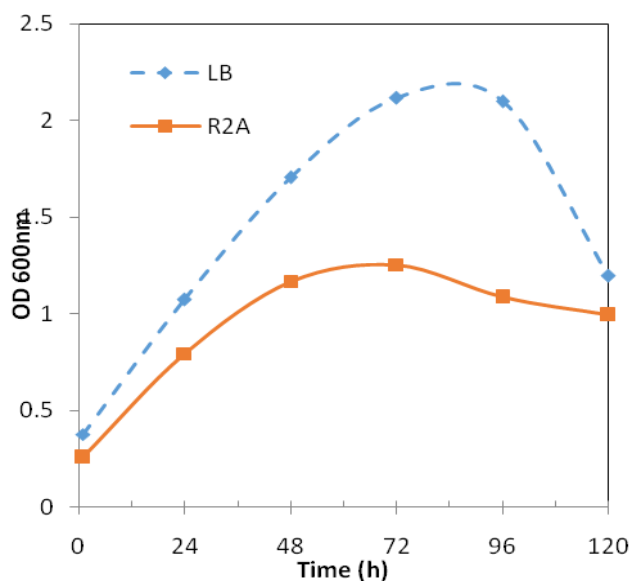
تمامی مراحل کشت و تلقیح باکتری با رعایت شرایط استریل به منظور پیشگیری از آلودگی توسط سایر میکروب‌ها انجام شد. باکتری *B. alkalitelluris* (KCTC3947) به صورت پودر لیوفیلیزه، از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه شد. به منظور تهیه کشت فعال، باکتری توسط سرنگ به محیط کشت R2A براث تلقیح شد. این محیط کشت

مقایسه سینتیک رشد باکتری *B. alkalitelluris* در دو محیط کشت R2A و LB برات در Error! Unknown switch argument نشان داده شده است. با توجه به این نمودار مشخص می‌شود که باکتری در محیط LB برات رشد بهتری در مقایسه با محیط R2A دارد. بطوریکه، در زمان‌های مشابه پس از تلقیح باکتری به محیط کشت میزان رشد باکتری در محیط LB برات بیشتر از R2A است. از طرفی در محیط کشت R2A پس از ۴۸ ساعت باکتری وارد فاز سکون می‌شود این در حالی است که در محیط کشت LB برات این زمان به ۷۲ ساعت افزایش می‌یابد. بنابراین، محیط کشت LB برات به عنوان محیط کشت تولید آنزیم در مراحل بعد مورد استفاده قرار گرفت.

شناسایی متغیرهای معنی دار با طراحی پلاکت-برمن

پلاکت-برمن به منظور غربال‌گری و بهینه‌سازی متغیرهای تخمیری استفاده می‌شود (۱۱). در این مرحله، ۷ پارامتر (نشاسته، عصاره مخمر، پپتون، کلرید کلسیم، دمای انکوباسیون، زمان انکوباسیون و pH) انتخاب شد. این پارامترها طی تخمیر غوطه‌وری در ۳ سطح (+۱، ۰، -۱) در نظر گرفته شدند و با استفاده از طرح پلاکت-برمن ۱۳ آزمایش توسط نرم‌افزار Minitab 17 طراحی شد (۱۱). تمامی آزمایشات طبق الگوی مشخص‌شده در جدول ۱ با ۳ بار تکرار در آزمایشگاه انجام شده و در نهایت با کمک نرم‌افزار Minitab 17 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

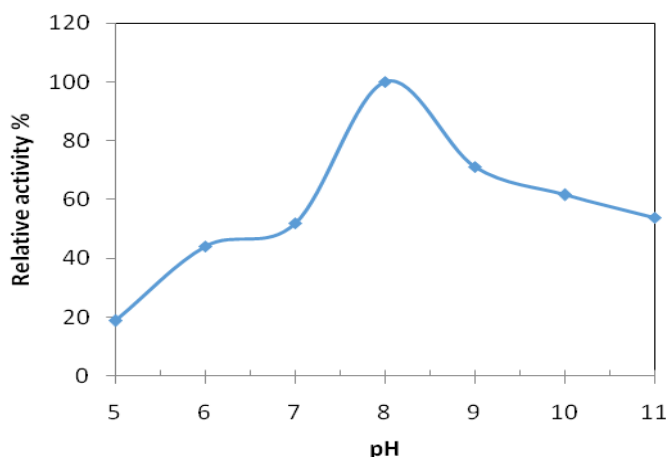
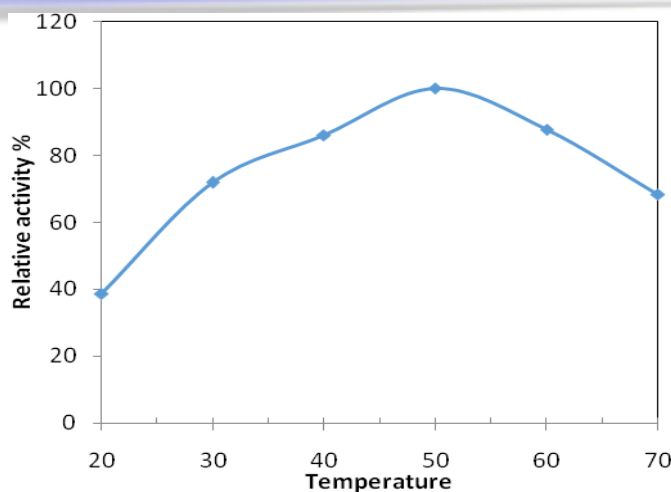
نتایج



نمودار ۱- مقایسه سینتیک رشد باکتری *B. alkalitelluris* در دو محیط R2A و LB برات.

آمیلاز ابتدا با اندازه‌گیری فعالیت آنزیم در دما و pH متغیر، شرایط بهینه برای این دو فاکتور تعیین شد. نتایج بررسی دما و pH بهینه به ترتیب در نمودارهای ۲ و ۳ نشان داده شده است. با توجه نمودارهای مربوطه، بیشترین فعالیت آنزیمی مشاهده شده در دمای ۵۰°C و pH=۸ می‌باشد (Error! Unknown switch argument).

پارامترهای دما و pH نقش مهمی در فعالیت آنزیم دارند و بنابراین در هر آنزیم لازم است تا تمامی اندازه‌گیریهای فعالیت آنزیمی در دما و pH بهینه انجام شوند. با توجه به اینکه تاکنون هیچ گزارشی در زمینه مطالعه دما و pH بهینه آنزیم آمیلاز باکتری *B. alkalitelluris* ارائه نشده است، در این مطالعه به منظور دستیابی به شرایط بهینه سنجش فعالیت α -



نمودار ۲- تعیین دما و pH بهینه آنزیم α -آمیلز باکتری *B. alkalitelluris*

(argument). با در نظر گرفتن خط مرجع^۲ که برابر با ۲/۷۷ است، پارامترهای بیشتر از این خط به عنوان پارامترهای موثر و مابقی ناموثر شناخته می‌شوند. بر این اساس از میان پارامترهای مورد بررسی تنها پارامتر pH در تولید آمیلز توسط *B. alkalitelluris* موثر شناخته می‌شوند.

بحث

در میان باکتریها، گونه‌هایی که در مناطق حاد از نظر دما، pH، فشار و غلظت نمک حضور دارند به دلیل دارا بودن ویژگیهایی که این میکروارگانیسم‌ها را با شرایط مورد نظر سازگار نموده است توانسته‌اند نظر محققین را به خود جلب نمایند. علاوه بر زمینه‌های

شناسایی فاکتورهای موثر بر تولید آمیلز با روش پلاکت-برمن

به منظور شناسایی فاکتورهای موثر، ۷ پارامتر شامل غلظت کلرید کلسیم، پپتون، عصاره مخمر، نشاسته، pH، زمان انکوباسیون و دمای انکوباسیون با توجه به مطالعات پیشین انتخاب شده و با روش پلاکت-برمن آزمایشات مربوطه طراحی و مورد بررسی قرار گرفتند (Error! Unknown switch argument).

تاثیر هر پارامتر در تولید آنزیم آمیلز با در نظر گرفتن نتایج بدست آمده از ۱۳ آزمایش طراحی شده تعیین شد. اثرات این پارامترها در نمودار پارتو^۱ با یکدیگر مقایسه شده است (Error! Unknown switch argument).

²Reference line

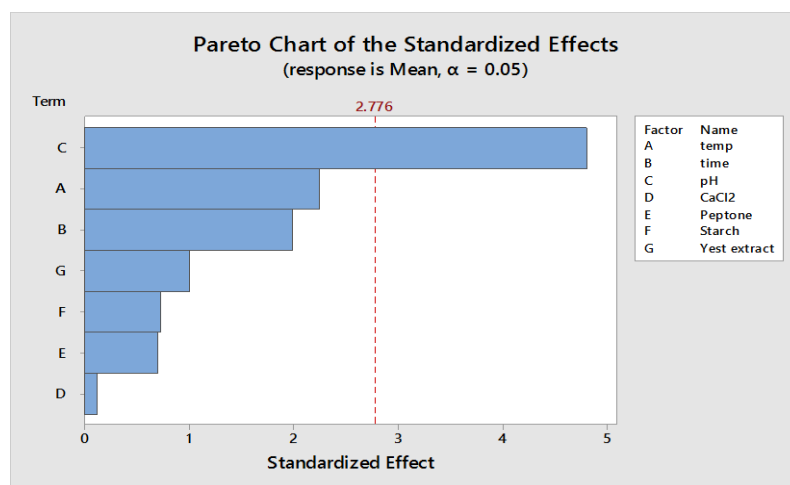
¹Pareto chart

مطالعات بسیاری در زمینه کشف میکروارگانیسم‌های جدید از منابع دارای شرایط حاد زندگی مانند اعماق دریا، چشمه های آب گرم، دریاچه‌های نمکی و غیره صورت می‌گیرد.

پژوهشی بسیار گسترده در مطالعه این میکروارگانیسم-ها، آنها به دلیل دارا بودن متابولیت‌ها و سایر ترکیبات دارای اهمیت بیوتکنولوژیک و صنعتی از نظر اقتصادی نیز حائز اهمیت می‌باشند. با این رویکرد، امروزه

جدول ۱ طراحی آزمایش و نتایج مربوطه به تغییرات اعمال شده بر روی ۷ فاکتور به روش پلاکت - برمن.

نمونه	دمای انکوباسیون (°C)	زمان انکوباسیون (ساعت)	pH	کلرید کلسیم (g/l)	پپتون (g/l)	نشاسته (g/l)	عصاره مخمر (g/l)	فعالیت آمیلاز (U)
۱	۴۰	۷۲	۸/۵	۰/۳۷۵	۰/۶۲۵	۰/۲۵	۰/۳۷۵	۰/۱۹
۲	۴۰	۷۲	۱۰/۵	۰/۱۲۵	۰/۶۲۵	۱/۲۵	۰/۱۲۵	۰/۰۹
۳	۴۰	۷۲	۸/۵	۰/۳۷۵	۰/۳۷۵	۰/۲۵	۰/۱۲۵	۰/۰۲
۴	۴۰	۲۴	۱۰/۵	۰/۳۷۵	۰/۳۷۵	۱/۲۵	۰/۱۲۵	۰/۰۴
۵	۲۰	۷۲	۸/۵	۰/۱۲۵	۰/۳۷۵	۱/۷۵	۰/۳۷۵	۰/۰۵۵
۶	۴۰	۲۴	۸/۵	۰/۱۲۵	۰/۶۲۵	۱/۲۵	۰/۳۷۵	۰/۰۶۲
۷	۲۰	۲۴	۸/۵	۰/۳۷۵	۰/۶۲۵	۱/۷۵	۰/۱۲۵	۰/۰۵
۸	۲۰	۷۲	۱۰/۵	۰/۱۲۵	۰/۶۲۵	۰/۲۵	۰/۱۲۵	۰/۰۰۵
۹	۳۰	۴۸	۹/۵	۰/۲۵	۰/۵	۱	۰/۲۵	۰/۰۹۱
۱۰	۲۰	۲۴	۱۰/۵	۰/۳۷۵	۰/۶۲۵	۰/۲۵	۰/۳۷۵	۰/۰۰۲
۱۱	۲۰	۷۲	۱۰/۵	۰/۳۷۵	۰/۳۷۵	۱/۷۵	۰/۳۷۵	۰/۰۰۷
۱۲	۲۰	۲۴	۸/۵	۰/۱۲۵	۰/۳۷۵	۰/۲۵	۰/۱۲۵	۰/۰۰۸
۱۳	۴۰	۲۴	۱۰/۵	۰/۱۲۵	۰/۳۷۵	۰/۲۵	۰/۳۷۵	۰/۰۰۳



نمودار ۳ مقایسه اثرات پارامترهای مورد بررسی در تولید آنزیم α -آمیلاز.

پایین تر تولید می‌کند (۱۵-۱۲). به این ترتیب می‌تواند ویسکوزیته ایجاد شده توسط آمیلوپکتین در محیط را کاهش دهد و محیط را رقیق نماید. از همین نظر است که به آن آنزیم مایع‌کننده نیز گفته می‌شود. آنزیم α -آمیلاز کاربرد گسترده ای در زمینه‌های مختلف از

α -آمیلاز (α -1,4-D glucangluconohydrolases, E.C.3.2.1.1), آنزیم خارج سلولی است که بطور تصادفی پیوندهای داخلی α \rightarrow ۴ خطی را در مولکول نشاسته هیدرولیز نموده و آن را به الیگوساکاریدهای کوتاه می‌شکند و در نتیجه واحدهایی با وزن مولکولی

α -آمیلاز *B. alkalitelluris* جزء آنزیم‌های قلیادوست محسوب می‌شود و از این نظر حائز اهمیت می‌باشد. علاوه بر این، دمای بهینه این آنزیم در محدوده ۴۰ تا ۶۰°C است که این محدوده می‌تواند برای اغلب مصارف صنعتی قابل توجه باشد. این محدوده مشابه با دمای بهینه گزارش شده برای α -آمیلاز از سایر گونه‌های باسیلوس است. سدا بانو در سال ۲۰۱۱ بر روی *Bacillus subtilis* KIBGE HAS تحقیقی انجام داد و دمای بهینه برای فعالیت آنزیم را ۵۰°C گزارش کرد (۳). پرومیتا دب در سال ۲۰۱۳ دمای بهینه برای فعالیت آنزیم α -آمیلاز تولید شده توسط *Bacillus amyloliquefaciens* P-100 را ۵۰°C گزارش کرد (۲۲). محمد عبدول آل زازایی در سال ۲۰۱۱ دمای بهینه فعالیت α -آمیلاز حاصل از *Bacillus cereus* Ms6 را ۴۵°C گزارش کرد (۲۳). آنوپامادر سال ۲۰۱۱ بر روی *Bacillus aquimaris* VITP4 تحقیقی انجام داد و دمای بهینه برای فعالیت α -آمیلاز حاصل از آن را ۴۰°C گزارش کرد (۲۴). آناملای در سال ۲۰۱۱ دمای بهینه برای فعالیت α -آمیلاز تولید شده توسط *Bacillus creus* را ۶۵°C گزارش کرد (۲۰). ازدمیر در سال ۲۰۱۱ دمای بهینه برای فعالیت α -آمیلاز تولید شده توسط *Bacillus subtilis* را ۶۰°C گزارش کرد (۲۳). آشوینی در سال ۲۰۱۱ دمای بهینه برای فعالیت α -آمیلاز حاصل از *Bacillus sp. marini* را ۴۰°C گزارش کرد (۲). در تحقیقی دیگر که توسط هون‌کیم در سال ۲۰۱۲ بر روی *Bacillus sp. AAH-31* انجام داد، دمای بهینه برای فعالیت α -آمیلاز حاصل از آن را ۶۰°C گزارش کرد (۲۵). با توجه به این ویژگی‌ها، این آنزیم α -آمیلاز *B. alkalitelluris* می‌تواند گزینه مناسبی جهت مصارف صنعتی و بیوتکنولوژیک محسوب شود.

ترکیبات محیط کشت و شرایط محیطی نقش مهمی در رشد و تولید متابولیت‌ها توسط میکروارگانیسم‌ها دارند. در *B. alkalitelluris*، میزان رشد باکتری در محیط LB اثرات در مقایسه با محیط R2A به میزان قابل توجهی بهبود می‌یابد. این امر

جمله پزشکی، دارویی، تجزیه و تحلیل‌های شیمیایی و دیگر صنایع همچون نساجی، کاغذسازی، صنعت تخمیر و غذا دارد. با وجود تنوع منابع تولیدکننده آمیلاز، به دلیل تنوع و گستره بالای زمینه‌های کاربردی این آنزیم و نیاز به استفاده از آن در زمینه‌های جدید، همچنان دستیابی به آمیلازهای دارای ویژگی‌های عملکردی جدید مورد توجه محققین قرار دارد (۱۲).

بسیاری از گونه‌های باسیلوس قلیادوست از دامنه وسیعی از محیط‌های قلیایی، مانند دریاچه‌های- قلیایی (دارای کربنات سدیم)، صحراها و خاک‌های خشک جدا شده اند (۶، ۷، ۱۶، ۱۷). حداقل ۱۹ گونه باسیلوس قلیادوست تا به امروز شناسایی شده‌اند که توجه زیادی را در کاربردهای صنعتی و تحقیقات بیوتکنولوژی جلب کرده‌اند. *Bacillus alkalitelluris* یک گونه از جنس باسیلوس است که به دلیل پایداری قلیایی به عنوان یک میکروارگانیسم قلیادوست مورد توجه قرار می‌گیرد (۸). انتظار می‌رود آنزیم‌های تولیدشده توسط این باکتری، از جمله α -آمیلاز نیز دارای مقاومت به pH قلیایی بوده (pH=۸) و از این نظر از آنها در زمینه‌هایی که نیازمند به عملکرد α -آمیلاز در شرایط قلیایی است استفاده نمود. بسته به میکروارگانیسم مورد نظر pH بهینه آنزیم‌های مربوطه از جمله α -آمیلاز متفاوت است. در سال ۲۰۱۳ بوزیک بر روی سویه‌های باسیلوس تحقیقی انجام داد و pH بهینه برای فعالیت آنزیم α -آمیلاز را pH=۸ گزارش کرد (۱۸). در تحقیقی دیگر که توسط اولها کویراک در سال ۲۰۱۰ بر روی *Bacillus sp. BKLP20H* انجام شد، pH بهینه برای فعالیت آنزیم α -آمیلاز pH=۸ گزارش شد (۱۹). آشوینی در سال ۲۰۱۱ pH بهینه برای فعالیت α -آمیلاز تولید شده از *Bacillus sp. marini* را pH=۷ گزارش کرد (۲). آناملای در سال ۲۰۱۱ pH بهینه را برای فعالیت α -آمیلاز حاصل از *Bacillus cereus* را pH=۱۱ گزارش کرد (۲۰). ساکسندر سال ۲۰۱۱ pH بهینه برای فعالیت α -آمیلاز حاصل از سویه‌های باسیلوس را pH=۶ گزارش کرد (۲۱). گوردین در سال ۲۰۱۱ بر روی *Bacillus megaterium* تحقیقی انجام داد و pH=۶/۵ را pH بهینه گزارش کرد (۴). طبق نتایج بدست آمده آنزیم

غربالگری فاکتورها برای تعیین فاکتورهای موثر را اثبات می‌کند. استفاده از این روش می‌تواند منجر به صرفه-جویی قابل توجهی در هزینه‌ها و همچنین زمان مطالعات برای بهبود فرایند تولید شود. علاوه بر این، فاکتورهای غیرموثر را می‌توان با فاکتورهای دیگر جایگزین نموده و اثرات آنها در تولید آنزیم آمیلاز مورد ارزیابی قرار گیرد.

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد تولید α -آمیلاز توسط باکتری *B. alkalitelluris* وابستگی بالایی به تغییرات pH محیط در مقایسه با سایر فاکتورهای محیط کشت دارد. به عبارت دیگر تغییر در pH محیط می‌تواند به عنوان یک عامل القاکننده موجب تحریک تولید α -آمیلاز در این باکتری شود.

تقدیر و تشکر

از همکاری صمیمانه جناب آقای راندی کارشناس محترم آزمایشگاه میکروبیولوژی واحد صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین به این وسیله از حمایت‌های سرکار خانم دکتر هنرمند جهرمی مدیر گروه میکروبیولوژی در انجام این پایان‌نامه کمال تشکر و قدردانی را داریم.

نشان می‌دهد که این محیط کشت بهتر می‌تواند نیازهای تغذیه‌ای این باکتری را تامین نماید. به منظور دستیابی به مقادیر انبوه از آنزیم‌ها، رویکردهای متفاوتی وجود دارد. با توجه به اینکه تاکنون ژن مربوط به آمیلاز *B. alkalitelluris* شناسایی نشده است استفاده از رویکردهای مهندسی ژنتیک می‌تواند وقت‌گیر و مستلزم صرف هزینه باشد. رویکرد دیگر استفاده از روشهای بهینه‌سازی شرایط کشت باکتری جهت تولید بیشتر آنزیم است طوریکه کمترین تداخل با رشد طبیعی آنزیم وجود داشته‌باشد. اولین قدم در فرایند بهینه‌سازی تولید، شناخت پارامترهای موثر در دستیابی به پاسخ مورد نظر است. امروزه از روش پلاکت-برمن^۳ بجای روش‌های وقت‌گیر و هزینه‌بر یک متغییر در یک زمان^۴ برای شناسایی پارامترهای موثر در فرایند مورد نظر از میان انبوه پارامترهای موجود استفاده می‌شود. در این تحقیق، از میان فاکتورهای متعدد موثر بر رشد باسیلوس، ۷ فاکتور با بررسی گزارشات موجود انتخاب شده و تاثیر آنها بر تولید آمیلاز توسط *B. alkalitelluris* با استفاده از روش پلاکت-برمن مورد ارزیابی قرار گرفت. در این میان تنها فاکتور pH به عنوان عامل موثر در این زمینه شناسایی شد. در مطالعات دیگری که در ارتباط با تولید آنزیم α -آمیلاز انجام شده است نیز pH به عنوان یکی از فاکتورهای موثر در تولید α -آمیلاز گزارش شده است. برهان در سال ۲۰۰۳ اثر pHهای ۵ تا ۱۳ را بر روی فعالیت آنزیم α -آمیلاز مطالعه کرد و $pH=9$ را pH بهینه گزارش کرد (۲۶). احمدی در سال ۲۰۱۱ در ارتباط با اثر pHهای ۳ تا ۹ بر روی فعالیت آنزیم α -آمیلاز تحقیقی انجام داد و $pH=8$ را بهترین برای تولید آنزیم α -آمیلاز می‌باشد (۲۷). ساجیتا در سال ۲۰۱۱ اعلام کرد که *Bacillus megaterium* در $pH=7/5$ بیشترین میزان تولید آنزیم α -آمیلاز را دارد (۲۸). آشوینی در سال ۲۰۱۱ بیان کرد که بهترین pH برای تولید آنزیم α -آمیلاز $pH=7$ بوده، در pHهای اسیدی و قلیایی تولید آنزیم به میزان قابل توجهی کاهش می‌یابد (۲). این نتایج اهمیت روش پلاکت-برمن به عنوان روشی در

³Plackett-Burman

⁴One parameter at a time

منابع مورد استفاده

1. Tabassum, R., Khaliq, S., Rajoka, M. I., Agblevor, F., 2014. Solid state fermentation of a raw starch digesting alkaline alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* RT7PE1 and its characteristics. *Biotechnol Res Int* .2014;495384.
2. Ashwini, K., Gaurav, K., Karthik, L., Bhaskara Rao, K., 2011. Optimization, production and partial purification of extracellular α -amylase from *Bacillus* sp. marini. *Arch Appl Sci Res* 3(1): 33-42.
3. Bano, S., Qader, S. A. U., Aman, A., Syed, M. N., Azhar, A., 2011. Purification and characterization of novel α -amylase from *Bacillus subtilis* KIBGE HAS. *Aaps Pharmscitech* 12(1):255-61.
4. Gurudeeban, S., Satyavaniand, K., Ramanathan, T., 2011, Production of extra cellular-amylase using *Bacillus megaterium* isolated from White Mangrove (*Avicennia marina*). *Asian J Biotechnol* 3(3): 310-6.
5. El-Shishtawy, R. M., Mohamed, S. A., Asiri, A. M., Gomaa, A. B., Ibrahim, I. H., Al-Talhi, H. A., 2014. Solid fermentation of wheat bran for hydrolytic enzymes production and saccharification content by a local isolate *Bacillus megaterium*. *BMC Biotechnol* 14(1): 29.
6. Ulukanli, Z., DIĞRAK, M., 2002. Alkaliphilic micro-organisms and habitats. *Turkish Journal of Biology* 26(3): 181-91.
7. Yumoto, I., Yamaga, S., Sogabe, Y., Nodasaka, Y., Matsuyama, H., Nakajima, K., 2003. *Bacillus krulwichiae* sp. nov., a halotolerant obligate alkaliphile that utilizes benzoate and m-hydroxybenzoate. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53(5): 1531-6.
8. Lee, J. C., Lee, G. S., Park, D. J., Kim, C. J., 2008. *Bacillus alkalitelluris* sp. nov., an alkaliphilic bacterium isolated from sandy soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 58(Pt 11): 2629-34.
9. Bernfeld, P., 1955. Amylases, α and β . *Methods in Enzymology* 1: Academic Press; pp. 149-58.
10. Miller, G. L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31(3): 426-8.
11. Asgher, M., Asad, M. J., Rahman, S., Legge, R., 2007. A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *Journal of Food Engineering* 79(3): 950-5.
12. Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., Chauhan, B., 2003. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry* 38(11): 1599-616.
13. Kandra, L., 2003. α -amylases of medical and industrial importance. *Journal of Molecular Structure* 666: 487-98.
14. Tangphatsornruang, S., Naconsie, M., Thammamongtham, C., Narangajavana, J., 2005. Isolation and characterization of an alpha-amylase gene in cassava (*Manihot esculenta*). *Plant Physiol Biochem* 43(9): 821-7.
15. Tester, R. F., Karkalas, J., Qi, X., 2004. Starch-composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science* 39(2): 151-65.
16. Li, Z., Kawamura, Y., Shida, O., Yamagata, S., Deguchi, T., Ezaki, T., 2002. *Bacillus okuhidensis* sp. nov., isolated from the Okuhida spa area of Japan. *Int J Syst Evol Microbiol* 52(Pt 4): 1205-9.
17. Yumoto, I., Hirota, K., Goto, T., Nodasaka, Y., Nakajima, K., 2005. *Bacillus oshimensis* sp. nov., a moderately halophilic, non-motile alkaliphile. *Int J Syst Evol Microbiol* 55(Pt 2): 907-11.
18. Božić, N., Ruiz, J., López-Santín, J., Vujčić, Z., 2011. Production and properties of the highly efficient raw starch digesting α -amylase from a *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a. *Biochemical Engineering Journal* 53(2): 203-9.
19. Kubrak, O. I., Storey, J. M., Storey, K. B., Lushchak, V. I., 2010. Production and properties of alpha-amylase from *Bacillus* sp. BKL20. *Can J Microbiol* 56(4): 279-88.
20. Annamalai, N., Thavasi, R., Vijayalakshmi, S., Balasubramanian, T., 2011. Extraction, purification and characterization of thermostable, alkaline tolerant alpha-amylase from *Bacillus cereus*. *Indian J Microbiol* 51(4): 424-9.
21. Saxena, R., Singh, R., 2011. Amylase production by solid-state fermentation of agro-industrial wastes using *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology* 42(4): 1334-42.
22. Deb, P., Talukdar, S. A., Mohsina, K., Sarker, P. K., Sayem, S. A., 2013. Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* P-001. *Springerplus* 2(1): 154.
23. Rajeshwara, A., 2011. Identification, characterization of novel halophilic *Bacillus Cereus* Ms6: a source for extra cellular A-amylase. *Advances in Environmental Biology* 5(5): 992-9.

24. Anupama, A. and Jayaraman, G., 2011. Detergent stable, halotolerant α -amylase from bacillus aquimaris vitp4 exhibits reversible unfolding. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*. 2(2): 366-376.
25. Kim, D. H., Morimoto, N., Saburi, W., Mukai, A., Imoto, K., Takehana, T., 2012. Purification and characterization of a liquefying alpha-amylase from alkalophilic thermophilic Bacillus sp. AAH-31. *Biosci Biotechnol Biochem* 76(7): 1378-83.
26. Burhan, A., Nisa, U., Gökhan, C., Ömer, 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(10): 1397-403.
27. Ahmadi, A., Ghobadi, S., Khajeh, K., Nomanpour, B., Dalfard, A. B., 2010. Purification of α -amylase from Bacillus sp. GHA1 and its partial characterization. *Journal of the Iranian Chemical Society* 7(2): 432-40.
28. Sajitha, N., Vasanthabharathi, V., Lakshminarayanan, R., Jayalakshmi, S., 2011. Amylase from an Estuarine Bacillus megaterium. *Curr Res J Biol Sci* 3(2): 110-5.