فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال دوم، شماره دوم، تابستان ۱۳۹۳

تعیین خصوصیات بیوشیمیایی آلفاآمیلاز باکتری *Anoxybacillus* sp. به دست آمده از چشمه آب گرم قینرجه، مشکین شهر

مرجان کاظمی[۱]، محمودرضا آقامعالی[۲]*، سید محسن اصغری[۳]، عبدالعلی وارسته[۴]

۱- دانشجو کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان
۲- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان
۳- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان
۴- دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان

چکیده

آنزیم‌های آمیلولیتیک از مهم‌ترین آنزیم‌ها در صنایع غذایی، دارویی، شوینده‌ها و بیوتکنولوژی به شمار می‌آیند. امروزه جداسازی این آنزیم‌ها از میکروارگانیسم‌های ترموفیل بسیار مورد توجه قرار گرفته است. آلفاآمیلازها اتصال بین پیوند گلیکوزیدی آلفاآمیلاز بین دو واحد گلوکز مجاور در زنجیره‌ی آمیلوز خطی را می‌شکنند و در نهایت واحدهای گلوکز، مالتوز و مالتوتریوز ایجاد می‌کنند. اگرچه بسیاری از میکروارگانیسم‌ها این آنزیم را تولید می‌کنند، اما معمولا برای کاربردهای صنعتی بیش‌تر از *Bacillus licheniformis*، *Bacillus amyloliquifaciens* و *Aspergillus niger* استفاده می‌شود. در این پژوهش یک گونه *Anoxybacillus* sp. تولید کننده آنزیم‌های آمیلولیتیک شناسایی شد. ابتدا آنالیز 16SrDNA انجام شد، سپس شرایط رشد باکتری مورد ارزیابی قرار گرفت. در مرحله بعد، آنزیم آلفاآمیلاز به صورت جزئی تخلیص شد و خصوصیات بیوشیمیایی آن مانند اثر دما، pH و پایداری آنزیم در برابر عوامل دناتوره کننده مانند SDS مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد شرایط بهینه برای رشد باکتری بعد از ۲۰ ساعت، دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و pH ۷ بود و همچنین بیش‌ترین فعالیت آنزیم، بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون، در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد و pH ۶ به دست آمد. به طور کلی، این آنزیم در مقایسه با گونه‌های مشابه دیگر دارای دمای بهینه بالاتری بود و پایداری آن در برابر SDS مشابه بود.

واژگان کلیدی: *آلفاآمیلاز ، دناتورانت، ترموفیل*، Anoxybacillus

تاریخ دریافت: تیر ۹۳ تاریخ پذیرش: شهریور ۹۳

* نویسنده مسئول: aghamaali@guilan.ac.ir

مقدمه

سنتز، تجزیه، تغییر و تبدیل کربوهیدرات‌ها از واکنش‌های مهم در طبیعت هستند. تجزیه کربوهیدرات‌ها توسط گروه آنزیمی گلیکوزیدهیدرولازها[1] و پلی‌ساکاریدلیازها[2]، تغییر و تبدیل آن‌ها توسط کربوهیدرات‌استرازها[3] و سنتز آن‌ها توسط گروه آنزیمی ترانسفرازها[4] انجام می‌شود (Pandey et al., 2000).

گلیکوزیدهیدرولازها گروهی از آنزیم‌ها هستند که پیوندهای گلیکوزیدی را در کربوهیدرات‌ها هیدرولیز می‌کنند. طبق تقسیم‌بندی پایگاه داده Carbohydrate-Active enZymes (CAZy) Database، تا به امروز، خانواده GHها به ۱۳۲ گروه تقسیم می‌شوند (Kahar et al., 2013). آمیلازها به طور کلی به دو گروه، اندوآمیلازها[5] (α- آمیلاز) و اگزوآمیلازها[6] (β- آمیلاز، گلوکوآمیلاز و گلوکوزیداز) تقسیم می‌شوند. گروه اول پیوندهای گلیکوزیدی درونی زنجیره گلوکزی در نشاسته را شکسته، الیگوساکاریدهایی با طول‌های مختلف ایجاد می‌کند. از طرف دیگر، اگزوآمیلازها از انتهای غیراحیاکننده پلی‌ساکاریدها فعالیت کرده، محصولاتی با وزن مولکولی پایین مانند گلوکز و مالتوز تولید می‌کنند (Chai et al., 2012). اندو آلفاآمیلاز، آنزیم خارج سلولی است که به طور تصادفی اتصال آلفا ۱-۴ بین دو واحد گلوکز مجاور در زنجیره آمیلوز خطی را می‌شکند و درنهایت واحدهای گلوکز، مالتوز و مالتوتریوز را به وجود می‌آورد. آمیلازها یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های صنعتی هستند که می‌توانند در برخی صنایع از قبیل صنایع غذایی، منسوجات، شوینده‌ها و تولید بیواتانول‌ها مورد استفاده قرار گیرند (Akcan et al., 2012; Fincan et al., 2014).

آنزیم‌های این خانواده دارای خصوصیات مشترکی هستند: پیوندهای α- گلیکوزیدی را هیدرولیز می‌کنند و محصولات آنومری آلفا، به شکل منومر یا اولیگوساکارید پیوندهای گلیکوزیدی α-۱،۴ یا α-۱،۶ و یا ترکیبی از هر دو را ایجاد می‌کنند. به علاوه توالی آمینواسیدی آن‌ها دارای ۴

1- Glycoside hydrolases (GHs)
2- Polysacharidases (PLs)
3- Carbohydrate esterases (CEs)
4- Glycosyltransferases (GTs)
5- Endoamylases
6- Exoamylases

ناحیه حفاظت شده است و یک ساختار 8(β/α)[1] دارد. همچنین باقی مانده‌های کاتالیتیکی این آنزیم‌ها، آسپارتات ۲۰۶، گلوتامات ۲۳۰ و آسپارتات ۲۹۷ هستند. اغلب آنزیم‌های تجزیه کننده نشاسته، دارای جایگاه اتصال کربوهیدرات[2] هستند (Kahar et al., 2013; Janecek, 2002). آلفاآمیلازها به طور عمومی در میان شاخه‌های جانوری، گیاهی و میکروبی توزیع شده‌اند. این آنزیم‌ها از منابع قارچ، مخمر، باکتری و *Actinomycetes* به دست می‌آیند و منابع قارچی و باکتریایی برای کاربرد در صنعت غالب هستند (Gupta et al., 2003).

خانواده Bacillaceae یک منبع خوب باکتریایی برای تولیدات زیستی و تبدیلات زیستی سلول و آنزیم هستند. در مقابل *Bacillus* و *Geobacillus*، *Anoxybacillus* یک جنس جدید است که در سال ۲۰۰۰ پیشنهاد شد. نام‌گذاری *Anoxybacillus*ها به دلیل خصوصیت بی‌هوازی بودن آن‌ها بود، هر چند که در سال‌های اخیر گونه‌های هوازی *Anoxybacillus* نیز شناسایی شده‌اند. بنابراین، آن‌ها می‌توانند هوازی[3]، بی‌هوازی اختیاری[4] یا هوازی اختیاری[5] باشند (Goh et al., 2013).

باکتری‌ها بر اساس دمای رشد بهینه به ۴ گروه طبقه‌بندی می‌شوند: سایکروفیل‌ها[6] (۲۵-۵ درجه سانتی‌گراد)، مزوفیل‌ها[7] (۴۵-۱۵ درجه سانتی‌گراد)، ترموفیل‌ها[8] (۸۰-۴۵ درجه سانتی‌گراد) گراد) و هایپرترموفیل‌ها[9] (≥۸۰ درجه سانتی‌گراد). آنزیم‌هایی که به وسیله باکتری‌های ترموفیل و هایپرترموفیل تولید می‌شوند به طور معمول پایدار حرارتی هستند و به عنوان ترموزیم‌ها[10] (یا ترموآنزیم‌ها) شناخته می‌شوند. به علاوه آنزیم‌های تولید شده به وسیله مزوفیل‌ها مزوزایم نامیده می‌شوند. فاکتورهای موثر در پایداری شامل افزایش میان‌کنش‌های بین مولکولی از قبیل پیوند هیدروژنی، میان‌کنش‌های الکترواستاتیکی، میان‌کنش‌های هیدروفوبیک، پیوندهای دی‌سولفیدی و

1- TIM Barrel
2- Carbohydrate Binding Module (CBM)
3- Aerobe
4- Facultative Anaerobe
5- Facultative Aerobe
6- Psychrophiles
7- Mesophile
8- Thermophile
9- Hyperthermophile
10- Thermozymes

اتصالات فلزی و ساختار کانفورماسیون مناسب مانند سفتی[1] بیش‌تر، فشردگی[2] بیش‌تر، پایداری آلفا- هلیکس و کاهش انرژی آنفولدینگ است (Kikani et al., 2010).

از آن جایی که آنزیم‌های هومولوگ ترموفیل و مزوفیل، با وجود تفاوت بسیار زیاد در پایداری حرارتی، اغلب دارای مکانیسم کاتالیتیکی یکسان، هومولوژی توالی بالا و ساختار سه بعدی مشابه هستند، بنابراین مقایسه این آنزیم‌های هومولوگ یک فرصت منحصر به فرد برای روشن شدن استراتژی سازگاری حرارتی است (Fitter et al., 2001).

مواد و روش‌ها

Master Mix مورد استفاده برای PCR از شرکت Amplicon و سایر مواد مورد استفاده مانند DNS، SDS، کلرید کلسیم، آمونیوم سولفات از شرکت مرک خریداری شد.

شناسایی گونه باکتری

باکتری *Anoxybacillus* گرفته شده از چشمه‌های آب‌گرم قینرجه واقع در شهرستان مشکین‌شهر در محیط کشت جامد حاوی عصاره مخمر ۰/۳ درصد، آگار ۲ درصد، سوی پپتون ۰/۵ درصد، سدیم کلرید ۰/۵ درصد و عصاره مخمر ۰/۲ درصد کشت داده شد. سپس به منظور شناسایی گونه باکتری، تکثیر ژن 16SrDNA توسط دستگاه PCR BioRad با روش کلونی PCR و با استفاده از پرایمرهای عمومی انجام شد. محصول به دست آمده توسط دستگاه الکتروفورز BioRad بر روی ژل آگارز ۱ درصد مشاهده و سپس تعیین توالی شد. نتیجه تعیین توالی در سایت www.ncbi.com، blast شده، سپس درخت فیلوژنی آن رسم شد.

تولید آنزیم آلفاآمیلاز

پس از گذشت ۲۴ ساعت از کشت جامد، باکتری در محیط کشت حاوی ترکیبات عصاره مخمر ۰/۳ درصد، سوی پپتون ۰/۵ درصد، سدیم کلرید ۰/۵ درصد و عصاره مخمر ۰/۲ درصد کشت شد

1- Rigidity
2- Packing

و به مدت ۲۰ ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. تلقیح باکتری به صورت ۱ درصد به محیط کشت تولید حاوی ترکیبات نشاسته محلول ۱ درصد، کلرید کلسیم ۰/۰۱ درصد، سولفات منیزیم هفت آبه ۰/۰۳ درصد، فسفات هیدروژن دی پتاسیم ۰/۱ درصد و عصاره مخمر ۰/۳ درصد با pH ۷/۵ در دمای ۶۰ درجه و در انکوباتور شیکردار صورت گرفت.

بعد از گذشت ۲۴ ساعت، محیط کشت تولید با سرعت ۹۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد توسط سانتریفیوژ یخچال‌دار Hettich، سانتریفیوژ شد. پروتئین‌های محلول به وسیله آمونیوم سولفات ۸۵ درصد در دمای چهار درجه سانتی‌گراد رسوب داده شدند. سپس رسوب به دست آمده در بافر تریس ۲۰ میلی‌مولار با pH ۷ حل و دیالیز شد.

سنجش فعالیت آلفاآمیلاز

۵۰ میکرولیتر از محلول نشاسته ۱ درصد حاوی تریس ۲۰ میلی‌مولار، کلرید کلسیم ۱۰ میلی‌مولار و نشاسته ۱ درصد، به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد در بن‌ماری Memmert انکوبه شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از محصول دیالیز شده به آن اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از گذشت ۱۰ دقیقه، ۱۰۰ میکرولیتر از معرف DNS (۱ درصد DNS، ۳۰ درصد سدیم پتاسیم تارتارات، ۲۰ میلی‌لیتر NaOH ۲ نرمال) به آن اضافه شد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد. در نهایت ۱ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه شد و جذب آن در ۵۴۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر BiowaveII-WPA قرائت شد. میزان فعالیت آمیلولیتیکی با استفاده از محلول ۱ درصد نشاسته و منحنی استاندارد قند گلوکز به روش دی‌نیتروسالیسیلیک‌اسید (DNS) بر حسب واحد بین‌المللی اندازه‌گیری شد. هر واحد فعالیت آمیلازی (U) مقدار فعالیت آنزیمی است که یک میکرومول قند احیاءکننده را در یک دقیقه آزاد می‌کند.

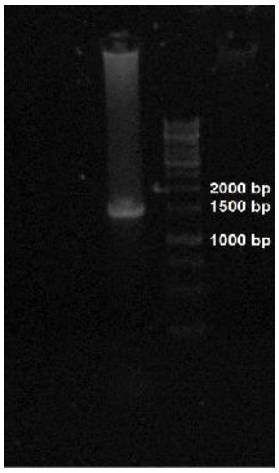
بررسی اثر دما، pH و SDS[1]

فعالیت محلول آنزیمی به دست آمده در دماهای ۹۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری و نمودار آن رسم شد. همچنین فعالیت آنزیمی در pHهای مختلف بین ۳ تا ۱۱ تعیین شد. به علاوه، پایداری آنزیم در برابر درصدهای مختلف دناتورانت SDS، ۱-۰ درصد، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق مورد بررسی قرار گرفت و نمودار فعالیت برحسب درصدهای مختلف SDS رسم شد.

نتایج و بحث

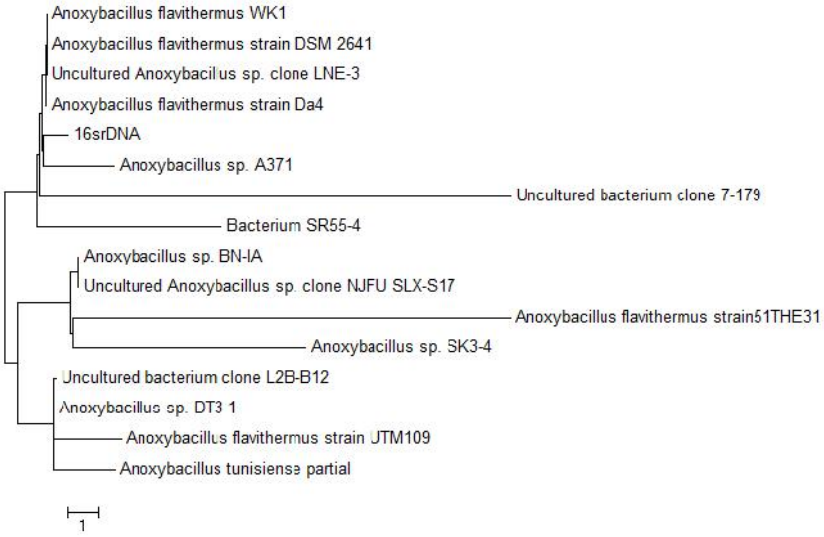
شناسایی گونه باکتری

به منظور شناسایی گونه مورد نظر، محصول کلونی PCR، ابتدا روی ژل آگارز ۱ درصد در محدوده باند ۱۵۰۰ جفت باز مشاهده (شکل ۱) و برای بررسی کامل‌تر تعیین توالی شد. توالی مذکور blast شد و درخت فیلوژنتیکی آن رسم شد (شکل ۲). با توجه به نتایج حاصل از درخت فیلوژنی توالی 16SrDNA، گونه مذکور نزدیک به باکتری *Anoxybacillus* sp. A371 است.



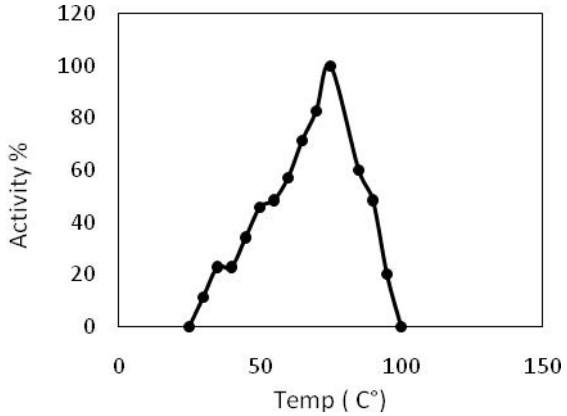
شکل ۱: مشاهده ژن 16SrDNA روی ژل آگارز

1- Sodium dodecyl sulfate

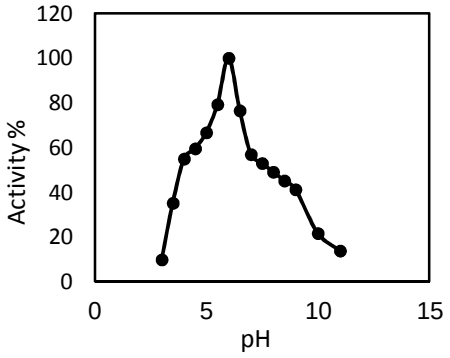


شکل۲: درخت فیلوژنتیکی بر اساس ژن 16SrDNA

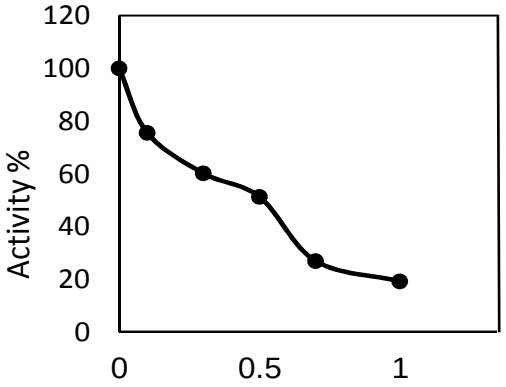
نمودار درصد فعالیت آنزیم در دماها و pHهای مختلف در شکل‌های ۳ و ۴ نشان داده شده است.



شکل ۳: اثر دما روی فعالیت آنزیم



شکل ۴: اثر pH روی فعالیت آنزیم



شکل ۵: اثر SDS روی فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز

نتایج به دست آمده از شکل ۳ نشان داد که دمای بهینه فعالیت این آنزیم ۷۵ درجه سانتی‌گراد است. در مطالعات پیشین دمای بهینه فعالیت آلفاآمیلاز گرفته شده از *Anoxybacillus flavithermus* sp. nov. و *Anoxybacillus* sp. IB-A، ۷۰ درجه سانتی‌گراد و دو آلفاآمیلاز کلون شده از دو گونه *Anoxybacillus* sp. ۶۰ درجه سانتی‌گراد و همچنین در آلفاآمیلاز جدا شده از *Anoxybacillus flavithermus* ۵۵ درجه سانتی‌گراد به دست آمد (Ozdemir et al., 2011; Chai et al., 2012; Hauli et al., 2013; Fincan et al., 2014).

به علاوه، با توجه به نتایج شکل ۴ مشاهده می‌شود که بیش‌ترین فعالیت آنزیم درpH ۶ به دست آمد. pH بهینه فعالیت برای آلفاآمیلازهای کلون شده از دو گونه *Anoxybacillus* sp. ، نمونه جدا شده از *Anoxybacillus flavithermus* sp. nov. ، آلفاآمیلازهای *Anoxybacillus flavithermus* و *Anoxybacillus sp.* IB-A به ترتیب ۸، ۶، ۷ و ۹ به دست آمد. (Ozdemir et al., 2011; Chai et al., 2012; Hauli et al., 2013; Fincan et al., 2014). pH بهینه برای آلفاآمیلاز موجود در گونه‌های مختلف جنس *Anoxybacillus* می‌تواند اسیدی، خنثی و قلیایی باشد. بیش‌تر آلفاآمیلازها در pHهای پایین ناپایدار هستند، (Liu et al., 2008; Sivaramakrishnan et al., 2006) در حالی که، آلفاآمیلازهای صنعتی هایپرترمال و اسیدی تا خنثی (pH ۶/۵-۶) هستند (Goyal et al., 2005). بنابراین آلفاآمیلازهایی با ویژگی‌های مناسب از قبیل فعالیت در دماهای بالاتر و فعالیت و پایداری بهینه درpHهای اسیدی، برای کاربردهای صنعتی مناسب هستند (Bai et al., 2012). با توجه به اینکه دمای بهینه این آنزیم ۷۵ درجه سانتی‌گراد و pH بهینه فعالیت آن ۶ است، به نظر می‌رسد آنزیم مذکور برای استفاده در صنعت مناسب باشد.

به علاوه، پایداری آنزیم در برابر دناتورانت SDS نیز مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعات گذشته، دو آلفاآمیلاز کلون شده از دو گونه *Anoxybacillus sp.* در غلظت ۱ درصد SDS تقریبا مهار شد و تنها ۱۴-۳ درصد از فعالیت آن‌ها باقی ماند. همچنین آلفاآمیلاز به دست آمده از باکتری *Anoxybacillus flavithermus* در غلظت ۰/۵ درصد SDS، ۷۶ درصد از فعالیت خود را حفظ می‌کند. آلفاآمیلاز گرفته شده از باکتری *Anoxybacillus* sp. IB-A نیز در برابر SDS بسیار پایدار بود و فعالیت آن ۱۱۰/۳۹ درصد می‌شود (Chai etal., 2012; Fincan et al., 2014; Ozdemir et al.,2011; Hauli et al.,2013). در این مطالعه نتایج حاصل از دناتورانت SDS نشان داد که در غلظت ۰/۵ درصد SDS، نیمی از فعالیت آنزیم باقی ماند و در غلظت ۱ درصد، تقریبا ۱۹ درصد از فعالیت آن حفظ شد (شکل ۵). به طور کلی، با توجه به نتایج ذکر شده به نظر می‌رسد آنزیم مورد نظر از گونه‌های مشابه خود دارای عملکرد بهتری است. مطالعات بیش‌تر در این زمینه به منظور به دست آوردن خصوصیات کامل بیوشیمیایی این آنزیم ضروری به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه گیلان به دلیل حمایت‌های مالی و فراهم نمودن امکانات آزمایشگاهی و از جناب آقای مهندس رسا برای تهیه نمونه باکتری استفاده شده در این پژوهش مراتب تشکر و قدردانی خود را اعلام می‌دارند.

منابع

Akcan N., SerinB. and Uyar F. 2012. Production and optimization parameters of amylases from *Bacillus subtilis* RSKK96 under solid state fermentation, Chemical and Biochemical Engineering, Quarterly, 26(3): 233–239.

Bai Y., Huang H., Meng K., Shi P., Yang P., Luo A.H., Luo C., Feng Y., Zhang W. and Yao B. 2012. Identification of an acidic a-amylase from *Alicyclobacillus* sp. A4 and assessmentof its application in the starch industry. Food Chemistry, 131(2012): 1473–1478.

Chai Y.Y., Rahman R.N.Z.R.A., Illias M.d. R. and Goh K.M. 2012. Cloning and characterization of two new thermostable and alkalitolerant a-amylases from the *Anoxybacillus* species that produce high levels of maltose. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 39(5): 731–741.

Fincan S.A., Eneza B., Ozdemirb S. and Bekler F.M. 2014. Purification and characterization of thermostable α-amylase from thermophilic *Anoxybacillus flavithermus*. Carbohydrate Polymers, 102: 144–150.

Fitter J., Herrmann R., Dencher N.A., Blume A. and Hauss T. 2001. Activity and stability of a thermostable R-amylase compared to its mesophilic homologue: mechanisms of thermal adaptation. *Biochemistry,* 40: 10723–10731.

Goh K.M., Kahar U.M., Chai Y.Y., Chong C.S., Chai K.P., Ranjani V., Illias Md.R. and Chan K.G. 2013. Recent discoveries and applications of *Anoxybacillus*. Applied Microbiology and Biotechnology, 97: 1475–1488.

Goyal N., Gupta J.K., and Soni S.K. 2005. A novel raw starch digesting thermostable α-amylase from *Bacillus* sp. I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potatostarch. Enzyme and Microbial Technology, 37: 723–734.

Gupt R., Gigras P., Mohapatra H., Goswami V.K. and Chauhan B. 2003. Microbial a-amylases: a biotechnological perspective. Process Biochemistry 38(11): 1599–1616.

Hauli I., Sarkar B., Mukherjee T. and Mukhopadhyay S.K. 2013. Isolation and identification of a novel thermo-alkaline, thermostable, SDS and chelator resistant amylase producing *Anoxybacillus* sp. IB-A from hot spring of Bakreswar, West Bengal (India): First report. Pelagia Research Library, 4(5): 202–212.

Janecek S. 2002. How many conserved sequence regions are there in the α-amylase family? Biologia Bratislava, 57(11): 29–41.

Kahar U.M., Chan K.G., Salleh M.Md., Hii S.M. and Goh K.M. 2013. A high molecular-mass *Anoxybacillus* sp. SK3-4 Amylopullulanase: characterization and its relationship in carbohydrate utilization. International Journal of Molecular Science, 14(6): 11302–11318.

Kikani B.A., Shukla R.J. and Singh S.P. 2010. Biocatalytic potential of thermophilic bacteria and *Actinomycetes*, microbial biotechnology, Rajkot-360 005.

Liu X.D. and Xu Y. 2008. A novel raw starch digesting a-amylase from a newly isolated *Bacillus* sp. YX-1: Purification and characterization. Bioresource Technology, 99: 4315–4320.

Miller G. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytic Chemistry, 31(3): 426-428.

Ozdemir S., Matpan F., Okumus V., Dundar A., Ulutas M.S. and Kumru M. 2011. Isolation of a thermophilic *Anoxybacillus flavithermus* sp. nov. and production of thermostable α-amylase under solid-state fermentation (SSF). Annals Microbiology, 62(4): 1367–1375.

Pandey A., Nigam P., Soccol C.R., Soccol V.T., Singh D. and Mohan R. 2000. Advances in microbial amylases. Biotechnology and Applied Biochemistry, 31: 135–152**.**

Sivaramakrishnan S., Gangadharan D., Nampoothiri K.M., Soccol C.R. and Pandey A. 2006. a-Amylases from microbial sources– an overview on recent developments. Food Technology and Biotechnology, 44: 173–184.

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 2, No. 2, Summer 2014

Biochemical characteristics of alpha amylase produced by *Anoxybacillus* sp. from Qinarjeh, Meshkin-Shahr

Marjan Kazemi[1], Mahmoud Reza Agha Maali[2]*, Seyed Mohsen Asghari[3], Abdolali Varasteh[4]

1- M.Sc. Student in Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.
2- Assistant Professor in Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.
3- Assistant Professor in Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.
4- Ph.D. Student in Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.

Received: July 2014 Accepted: September 2014

Abstract

Amylolytic enzymes are among the most important enzymes in food, pharmaceuticals, detergent industries and biotechnology. Alpha amylases cleave the linkage between adjacent glucose units in the linear amylose chain and ultimately generate glucose, maltose and maltotriose units. Although many microorganisms such as *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquifaciens* produce this enzyme, *Aspergillus niger* as most popular one is used in industrial applications. In the present study, a strain of amylolitic *Anoxybacillus sp*. was identified. 16SrDNA analysis was carried out and bacterial optimal growth and production was investigated. Moreover, enzyme was partially purified and biochemical properties such as temperature, optimum pH and the effect of denaturants like SDS on the stability of enzyme were evaluated. On the other hand, encoded gene of enzyme was amplified and sequenced. Results indicated that after 20 hours, the optimal conditions for bacterial growth were at 60ºC and pH of 7. Also, maximum enzyme activity was obtained at 75ºC at pH 6 after 72 h of incubation. Enzyme showed higher optimum temperature but similar stability against SDS in comparison with other similar.

Key words: *Alpha-amylase, Denaturant, Thermophile,* Anoxybacillus.

*Corresponding Author: aghamaali@guilan.ac.ir