مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره هشتم، شماره چهارم، زمستان ۱۳۸۸، ۳۱۶-۳۰۳

تعیین خصوصیات سویه بومی گونه باسیلوسی مولد آنزیم آلفا آمیلاز مقاوم به دما

ایرج رسولی[۱]، سید لطیف موسوی گرگری[۲]، رحیم سروری زنجانی[۳]، شکیبا درویش علیپور آستانه[٤]

دریافت مقاله: ۸۷/۱۱/۲۹ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۸۸/٤/۲۳ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۸۸/۸/۷ پذیرش مقاله: ۸۸/۸/۱۳

چکیده

زمینه و هدف: آنزیم آلفا آمیلازهای مقاوم به دما کاربردهای تجاری وسیعی در فرآوری نشاسته، تخمیر و تهیه محصولات کربوهیدراتی دارد و جایگزین هیدرولیز شیمیایی نشاسته در فرآوری صنعتی شده است. هدف خصوصیات سویه بومی گونه باسیلوس مولد آنزیم آلفا آمیلاز مقاوم به دما بوده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی باسیلوس جدا شده با نام *B.licheniformis* shahed-07 با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی شناسایی شد. این باسیلوس در محیط مایع برای تولید آلفا آمیلاز کشت داده شد. محیط‌های تولید آنزیم با استفاده از منابع مختلف کربنی و نیتروژنی ارزیابی و محیط مناسب فرموله گردید. پایداری آنزیم تولیدی، پس از تخلیص نسبی آن، در برابر تغییرات دما، pH، فلزات یونی و عوامل کلاته‌کننده ارزیابی شد.

یافته‌ها: حداکثر میزان آنزیم، در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و pH =۷ در طی ۲۶ ساعت تولید شد. با افزودن ۰/۵٪ تریپتوفن به محیط کشت، میزان تولید آنزیم تا ۲۰۲٪ افزایش یافت در حالی که ۰/۵٪ پپتون و لیزین به شدت موجب افت تولید شد. در مقایسه با آنزیم ناخالص، خلوص آنزیم نیمه تخلیص شده ۳/۷۷ برابر و فعالیت آنزیمی آن ۳۲/۶۴ برابر بود. این آنزیم در ژل الکترفورز SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) با ۰/۲٪ نشاسته تک باند با وزن مولکولی ۶۰۰۰۰ دالتون فعالیت آمیلولیتیکی نشان داد. فعالیت مطلوب آنزیم در ۷۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۷/۵ بود، این آنزیم هم‌چنین در دامنه pH بین ۶ تا ۷ به مدت ۲۴ ساعت پایداری داشت. یون جیوه به طور کلی بازدارنده فعالیت آنزیم بوده و یون‌های منگنز، آهن، کبالت و کلسیم سبب افزایش فعالیت آن شدند.

نتیجه‌گیری: سویه *B.licheniformis* Shahed-07 سطح مطلوبی از آلفا آمیلاز مقاوم به دما، متناسب با ویژگی‌های مورد نیاز فرآوری نشاسته و صنایع غذایی تولید می‌کند. فرآیند تولید، بعد از بهینه‌سازی، می‌تواند در سطح تجاری مطرح شود.

واژه‌های کلیدی: باسیلوس لیکنی‌فرمیس، آلفا آمیلاز، بهینه‌سازی، محیط تولید

۱- (نویسنده مسئول) استاد گروه آموزشی زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد تهران
تلفن: ۵۱۲۱۲۶۰۰، دورنگار: ۵۱۲۱۲۶۰۱، پست الکترونیکی: rasooli@shahed.ac.ir
۲- دانشیار گروه آموزشی زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد تهران
۳- استادیار گروه آموزشی میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...
٤- کارشناس ارشد گروه آموزشی زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد تهران

مقدمه

آمیلاز از جمله مهم‌ترین آنزیم‌هایی است که در بیوتکنولوژی نوین اهمیت قابل توجهی دارد. این آنزیم حدوداً ۲۵٪ بازار جهانی آنزیم‌های تجاری را به خود اختصاص داده [۲-۱] و جایگزین هیدرولیز شیمیایی نشاسته در فرآوری صنعتی شده است [۳]. اگرچه بسیاری از گیاهان، جانوران و میکروارگانیسم‌ها توانایی تولید آنزیم آمیلاز را دارند، ولی این آنزیم با منشاء میکروبی مصارف صنعتی داشته و در زمینه‌های بالینی، دارویی، شیمی تجزیه و در فرآوری نشاسته، تخمیر و تهیه محصولات کربوهیدراتی کاربردهای وسیعی دارد. هم‌چنین در تولید شربت گلوکز، صنایع نساجی، تخمیر و صنایع غذایی حائز اهمیت است. علاوه بر این در تهیه خوراک دام، غذا، داروسازی و مواد پاک کننده استفاده‌های متنوعی دارد [۴-۵].

مقاومت در برابر دما، از ویژگی‌های مطلوب برای آنزیم‌های صنعتی محسوب می‌شود. هم‌اکنون آلفا آمیلازهای مقاوم به دما گونه مزوفیل *B. licheniformis* [۶] و دوگونه باسیلوس *Bacilus sp.*ANT-6 [۷] و *Bacilus sp.*ASMIA-2 [۸] در دسترس است. فعالیت آنزیمی در طیف وسیعی از ارگانیسم‌ها از جمله گیاهان، قارچ‌ها و باکتری‌ها وجود دارد [۹]. در این بین، جنس باسیلوس طیف وسیعی از آنزیم‌های خارج سلولی شامل پروتئاز و آمیلاز را تولید می‌کنند که کاربرد مهمی در صنعت دارند. ازجمله ویژگی آن‌ها می‌توان به کاهش در هزینه خنک کننده‌ها، حلالیت بهتر سوبسترا وکاهش ویسکوزیته که هم زدن نمونه و پمپاژ آن را تسهیل کرده و خطر آلودگی را کاهش می‌دهد، اشاره کرد. در درجه حرارت بالا (۱۱۰-۱۰۰ سانتی‌گراد) نشاسته ژله‌ای شده و با تجزیه به وسیله آلفا آمیلاز در دمای ۹۰-۸۰ سانتی‌گراد با صرف هزینه کم‌تری ذوب می‌گردد. بنابراین جستجوی آلفا آمیلازهای مقاوم به دما و یا ترموفیل ضروری است [۲]. با فرض بر این که هیچ نوع انتخاب طبیعی برای آنزیم‌هایی که در دماهای بالا فعال هستند در محیط طبیعی وجود ندارد و با وجود منبع طبیعی آلفا آمیلاز مقاوم دمایی در باسیلوس لیکنی‌فرمیس، این باکتری به عنوان یک ارگانیسم مزوفیل، مورد توجه قرار می‌گیرد. زیرا آنزیم‌های مقاوم دما معمولاً ثبات بیشتری داشته و در درجه حرارت معمولی فعالیت کمتری دارند و درجه حرارت مطلوب آنزیم معمولاً به درجه حرارت رشد ارگانیسم تولیدکننده بستگی دارد [۱۰].

هدف اصلی برای آنزیم‌های مهم صنعتی، غربال‌گری گونه‌های جدید از باکتری‌های تولیدکننده آمیلاز است که در تکنولوژی صنعتی مدرن مورد استفاده باشند و هر یک از این موارد با ویژگی منحصر به فرد به اختصاصی بودن شرایط، پایداری، درجه حرارت و pH وابسته است. غربال کردن میکروارگانیسم‌های مولد آلفا آمیلاز می‌تواند دست‌یابی به آمیلازهای با صفات متنوع را تسهیل کند. در این مقاله غربال‌گری، شناسایی و شرایط تولید آلفا آمیلاز مقاوم به دما در گونه‌ای از باسیلوس بومی مورد توجه و بحث قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه آزمایشگاهی *B.licheniformis* Shahed-07 که سویه‌ای از باکتری مقاوم به دما است در دانشگاه شاهد غربال‌گری شد. سوسپانسیون خاک در سرم فیزیولوژی رقیق شده و در محیط شماره (۱) شامل ۲٪ پپتون، ۱٪ عصاره مخمر، ۱٪ کلرید سدیم، ۱٪ نشاسته و ۲٪ آگار با pH برابر ۷ در سطح محیط گسترش داده و در حرارت ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت گرماگذاری شد. بعد از مشاهده کلنی، باکتری از محیط شماره (۱) به محیط

شماره (۲) محتوی محلول نشاسته۱٪، عصاره مخمر۰/۲٪، پپتون ۰/۵٪، سولفات منیزیوم ۰/۱٪، کلرید سدیم ۰/۱٪، کلرید کلسیم ۰/۰۲٪، آگار ۲٪ و pH برابر ۷ انتقال داده شد. این کشت‌ها نیز در ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای ۴۸ ساعت گرماگذاری شد. مشخصات ظاهری و مرفولوژیکی کلنی‌ها به گونه‌های باسیلوس مشابه بود. کلنی‌های مولد آمیلاز به کمک معرف لوگل شناسایی شدند. سویه غربال شده از نظر مورفولوژیکی و به کمک آزمایشات بیوشیمیایی مورد شناسایی قرار گرفت.

محیط تولید آنزیم: محیط پایه شامل محلول نشاسته ۱٪، مالتوز ۱٪، سولفات آمونیم ۰/۲٪، کلرید کلسیم 10^{-4} مول، کلرید منیزیم ۰/۰۲٪، دی پتاسیم هیدروژن فسفات ۰/۱ مول در pH=۷ در حرارت ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه استریل شد. در فلاسک‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری که شامل ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت است، به میزان ۱٪ از کشت ۱۸ ساعته تلقیح و در حرارت ۵۵ درجه سانتی‌گراد (به استثنای آزمایش‌هایی که برای تعیین درجه حرارت مناسب انجام شد) در۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۱۴۴ساعت گرماگذاری شد. نمونه‌ها ۳ بار (به فاصله ۲ ساعت) سانتریفوژ گردیدند. سلول‌ها به کمک سانتریفوژ (۸۰۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه) در ۴ درجه سانتی‌گراد رسوب داده شدند و محلول رویی برای بررسی سنجش آنزیم مورد استفاده قرار گرفت.

بهینه‌سازی محیط کشت و شرایط رشد باکتری: در ابتدا ارگانیسم در یک محیط پایه مایع با pH برابر ۷، در ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ تا ۹۶ ساعت گرماگذاری شد. برای مطالعه تأثیر منبع نیتروژن، به محیط پایه شامل (وزنی/حجمی) محلول ۱٪ نشاسته، هر یک از منابع نیتروژن آلی و معدنی شامل تریپتون، پروتئازپپتون و عصاره مخمر با غلظت (وزنی/حجمی) ۰/۵٪ افزوده شد. هم‌چنین تأثیر تغییرات دامنه pH بین ۵ تا ۱۰ و درجه حرارت از ۳۰ تا ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد در تولید آلفا آمیلاز باکتری مورد بررسی قرار گرفت. در تمامی موارد، از یک کشت ۱۸ ساعته به میزان (حجمی/حجمی) ۲٪ به فلاسک‌های ۵۰۰ میلی لیتری که شامل ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت بود، تلقیح شد. کشت‌ها در دوفاز، لرزشی با ۱۵۰ دور در دقیقه و هم‌چنین در حالت سکون گرماگذاری شدند. تولید آنزیم برحسب میزان رشد باکتری در فواصل زمانی ۲ ساعت، به کمک اندازه‌گیری کدورت نسبی در۶۰۰ نانومتر و تعیین وزن خشک توده سلولی مورد بررسی قرار گرفت.

تخلیص نسبی آمیلاز: مایع رویی محیط کشت مایع، بعد از سانتریفیوژ در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه به کمک سولفات آمونیوم در دامنه غلظتی ۶۰-۴۰٪ تغلیظ شد، بعد از سانتریفیوژ در ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵دقیقه، رسوب حاصل در بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مول با pH ۷ حل شد.

سنجش غلظت پروتئین: غلظت پروتئین آنزیم به روش Loury اندازگیری [۱۱] و با استفاده از سرم آلبومین به عنوان استاندارد، محاسبه شد.

سنجش آلفا آمیلاز: فعالیت آلفا آمیلاز به کمک واکنش زیر مورد بررسی قرار گرفت: ۵۰ میکرولیتر محلول رویی کشت به انضمام ۴۵۰ میکرولیتر بافر Tris – HCl با pH برابر ۷/۵ و ۵۰۰ میکرولیتر محلول۱٪ وزنی/حجمی نشاسته تهیه شد. بعد از گرماگذاری واکنش فوق در ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه، واکنش آنزیمی به کمک افزودن ۲ میلی‌لیتر معرف ۵،۳ دی نیتروسالیسیلیک اسید متوقف شد [۱۲] و جذب نوری به کمک اسپکتروفتومتر UV/vis (Biofuge) در طول موج ۵۲۰ نانومتر اندازگیری گردید. (یک واحد فعالیت آنزیمی (U)

برابر مقدار آنزیمی است که بتواند ۱ میکرومول قند احیاء شده را در ۱ دقیقه از انتهای مولکول نشاسته آزاد سازد).

الکترفورز SDS-PAGE: برای تشخیص هموژن بودن و وزن مولکولی آنزیم تغلیظ شده، از ژل ۱۰٪ آکریل‌آمید به علاوه ۰/۲٪ نشاسته در ژل پایینی و قبل از اضافه کردن پرسولفات آمونیوم استفاده شد [۷]. بعد از الکترفورز، ژل به مدت ۱ ساعت با کوماسی‌بلو R250 در محلول متانول – اسید استیک - آب به نسبت حجمی (۴-۱-۵) رنگ‌آمیزی شد و سپس در همان محلول عمل رنگبری انجام گرفت. برای سنجش میزان فعالیت آمیلاز، SDS به کمک شستشوی ژل در درجه حرارت اتاق به روشی که در زیر اشاره می‌شود، برداشته شد. ابتدا ژل را در محلول ۵۰ میلی‌مولار دی سدیم فسفات، مونو سدیم فسفات با pH برابر ۷/۲ و ایزوپروپانول ۴۰٪ به مدت ۱ ساعت قرار داده بعد از طی دوره انکوباسیون، ژل در بافر۵۰ میلی‌مولار دی سدیم فسفات و مونو سدیم فسفات با pH برابر ۷/۲ قرار گرفت. در نهایت برای برگرداندن ساختار طبیعی و انجام فعالیت آنزیم، ژل به مدت ۱۸-۱۲ ساعت در محلول ۵۰ میلی مولار بافر سدیم فسفات با pH ۷/۲ به علاوه بتامر کاپتواتانول به غلظت ۵ میلی‌مولار و EDTA (Ethylene Diaminete Traacetic Acid) ۱ میلی‌مولار در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از طی مرحله انکوباسیون، ژل را به پلیت شیشه‌ای انتقال داده و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ الی ۵ ساعت گرماگذاری انجام گرفت. بعد از طی زمان مورد نظر، ژل به کمک محلول یدین (۵ گرم در لیتر ید و ۵۰ گرم در لیتر یدید پتاسیم) به مدت ۳۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شد. وجود باندهای شفاف، نشانه فعالیت آمیلاز و تجزیه نشاسته به کمک مولکول آنزیم بود. وزن مولکولی آنزیم در نهایت به کمک نشانگر استاندارد مشخص شد. (SigmaM3788, 36, 45, 55, 66, 84, 97, 116, 205 KDa).

تأثیر pH بر میزان پایداری و فعالیت آنزیم: میزان pH مطلوب بر فعالیت آنزیم به کمک تغییرات pH در واکنش سنجش آنزیمی [۱۲] با استفاده از بافرهای ۰/۱ مولار در دامنه pH بین ۵ تا ۱۰ (۵/۵-۵=pH استات سدیم/ اسید استیک، ۷-۶ = pH بافر فسفات سدیم، ۸-۷/۵ = pH بافر Tris-HCl، ۱۰-۹ =pH بافر Glycin/NaOH) بررسی شد. در تعیین میزان پایداری آنزیم در ابتدا محلول آنزیمی در بافرهای ۰/۱ مولار در دامنه pH بین ۵ تا ۱۰به مدت ۲۴ ساعت قرارگرفته و سپس فعالیت آنزیم منطبق بر روش ذکر شده، سنجش شد.

تأثیر درجه حرارت روی پایداری و فعالیت آنزیم: درجه حرارت مطلوب آنزیم با اندازگیری فعالیت آلفا آمیلاز در بافر ۰/۱ مولار Tris هیدروکلرید با pH ۷/۵ در دامنه حرارتی بین ۳۰ تا ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد بررسی شد. برای تعیین پایداری آنزیم در درجه حرارت مطلوب، فعالیت آن پس از ۲ ساعت انکوباسیون آنزیم در بافر ۰/۱ مولار Tris هیدروکلرید با pH ۷/۵، در دامنه حرارتی بین ۱۰۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت.

تأثیر فلزات یونی و عوامل کلاته‌کننده روی فعالیت آنزیم: برای بررسی تأثیر یون‌های فلزی و عوامل کلاته‌کننده بر فعالیت آمیلاز، هر یک از یون‌ها با غلظتی برابر ۲ میلی‌مول به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در حضور آنزیم انکوبه شده، سپس فعالیت آنزیمی در درجه حرارت و pH مطلوب بررسی شد.

نتایج

مشخصات گونه باکتری: باسیلوس غربال شده با کمک انواع پارامترهای بیوشیمیایی مورد شناسایی قرار گرفت،

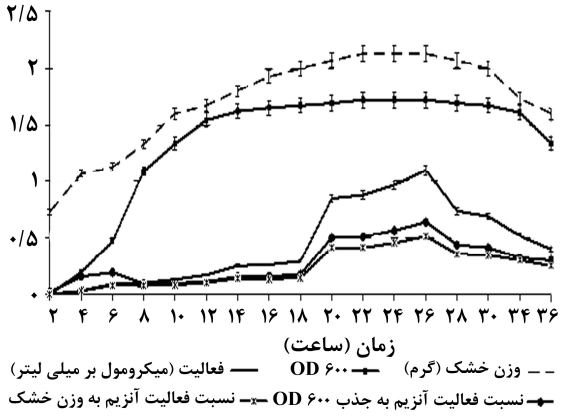
آزمایشات بیوشیمیایی مشابهت این سویه با باسیلوس لیکنی فرمیس را نشان داد (جدول۱).

جدول۱- مقایسه مشخصات بیوشیمیایی B.licheniformi Shahed-07 با مشخصات B.licheniformis استاندارد

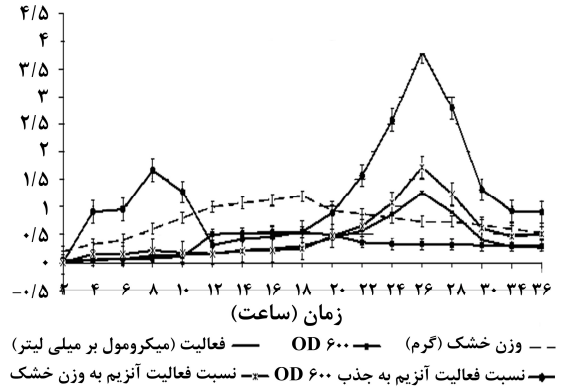
مشخصات بیوشیمیایی	*B.licheniformis*	Shahed-07	مشخصات بیوشیمیایی	*B.licheniformis*	Shahed-07
اسپور کروی با موقعیت مرکزی	-	-	لیپاز(روغن زیتون)	d	+
کریستال‌های پا را اسپورال	-	-	تشکیل گاز از نیترات	d	-
کاتالاز	+	+	رشد در pH =۵		+
رشد بی‌هوازی	+	+	نیاز به فاکتورهای رشد	-	-
تست VP	+	+	تولید اسید از فروکتوز		+
pH مایع VP (<۶)	+	+	تولید اسید از گالاکتوز		+
pH مایع VP (>۷)	-	+	تولید اسید از گلیسرول		+
تولید اسید از D- گلوکز	+	+	تولید اسید از لاکتوز		_
تولید اسید از L- آرابینوز	+	+	تولید اسید از مالتوز		+
تولید اسید از D- مانیتول	+	+	تولید اسید از سوکروز		+
هیدرولیز توئین۸۰	+	+	استفاده از سیترات	+	-
هیدرولیز اوره	-	+	تجزیه تایروزین	-	+
تشکیل گاز از گلوکز	(-)^{P}	-	مصرف استات		+
هیدرولیز کازئین	+	+	مصرف گلیسرول		+
هیدرولیز نشاسته	+	+	مصرف گلایسین		+
هیدرولیز ژلاتین	+	+	مصرف مانیتول		+
رشد در کلراید سدیم ۲٪	+	+	مصرف تارتارات		+
رشد در کلراید سدیم ۵٪	+	+	رشد در pH ۶/۸	+	+
رشد در کلراید سدیم ۷٪	+	+	رشد در pH ۵/۷	+	+
رشد در NaCl ۱۰٪	ND	-	هیدرولیز آرژنین	+	+
دی آمیناسیون فنیل آلانین	-	-	رشد در ۵ درجه سانتی‌گراد	-	-
تشکیل ایندول	-	-	رشد در ۱۰ درجه سانتی‌گراد	-	-
تشکیل دی هیدروکسی استون	ND	-	رشد در ۳۰ درجه سانتی‌گراد	+	+
احیاء نیترات به نیتریت	+	+	رشد در ۴۰ درجه سانتی‌گراد	+	+
نیازبه Nacl ,Kcl برای رشد	-	-	رشد در ۵۰ درجه سانتی‌گراد	+	+
دی کربوکسیلاسیون لایزین	-	+	رشد در ۵۵ درجه سانتی‌گراد	+	+
اکسیداز	d	+	رشد در ۶۵ درجه سانتی‌گراد	+	-

- = حداقل ۹۰٪ سویه‌ها دارای جواب منفی، += حداقل ۹۰٪سویه‌ها دارای جواب مثبت،ND=نتایج تعیین نشده است. d =کمتر از ۹۰٪ پاسخ مثبت یا منفی دارند، (-)^{P} گاز کمی تولید شده است. جاهای خالی= متغیر.

تولید آمیلاز: نتایج این مطالعات روی رشد سلول و میزان تولید آلفا آمیلاز در محیط پایه‌ای شامل ۱٪ نشاسته به عنوان القاءکننده تولید آنزیم در سویه *B.licheniformis* Shahed-07 در دو حالت لرزش و سکون در نمودارهای ۱ و ۲ نشان داده شده است. آزمایشات نشان داد که تولید آنزیم در *B.licheniformis* Shahed-07 هنگامی به حداکثر میزان خود می‌رسد که جمعیت توده سلولی در فلاسک لرزشی به حداکثر مقدار خود رسیده باشد (نمودار ۱). منحنی تولید آنزیم در فاز رکود رشد افزایش می‌یابد (نمودار ۲).

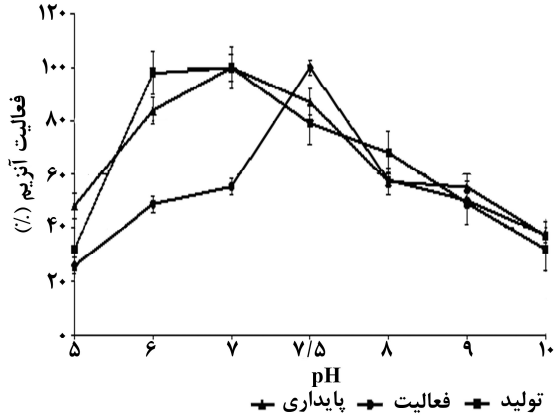


نمودار ۱- روند تولید آلفا آمیلاز در فلاسک‌های لرزشی

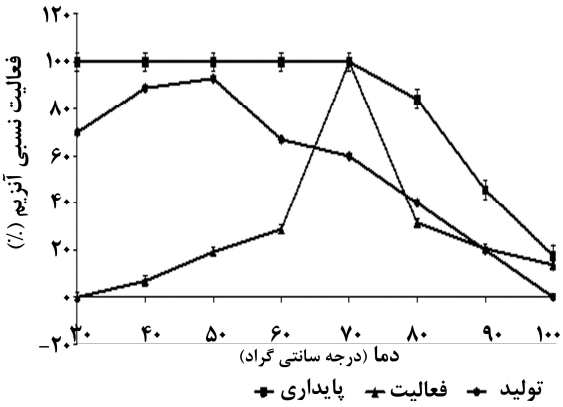


نمودار ۲- تولید آلفا آمیلاز در فلاسک‌های راکد

بهینه‌سازی شرایط رشد باکتری: درجه حرارت و pH مطلوب رشد و تولید آنزیم به ترتیب ۵۰ درجه سانتی‌گراد و ۷ تعیین شد (نمودارهای ۳ و ۴). سویه مورد نظر در دامنه درجه حرارت مورد آزمایش به خوبی رشد داشت و بیشینه تولید آنزیم در گرماگذاری محیط کشت با درجه حرارت ۵۰ درجه سانتی‌گراد به دست آمد. ولی تولید آنزیم در درجه حرارت گرماگذاری بالای ۵۵ درجه سانتی‌گراد کاهش داشت (نمودار ۴).



نمودار ۳- تأثیر pH در تولید، پایداری و فعالیت آنزیم



نمودار ٤- تأثیر دما در تولید، پایداری و فعالیت آنزیم

سویه *B.licheniformis* Shahed-07 در محیط پایه شامل نشاسته محلول برای تولید آنزیم، کشت داده شد. تأثیر انواع منبع کربن و نیتروژن روی تولید آنزیم در شرایط کشت بسته، در حالت لرزشی بررسی شد. بین کربوهیدرات‌های تعریف شده، مالتوز و نشاسته رشدی

خوب همراه با تولید آمیلاز را نشان دادند، تولید آنـزیم بـه وسیله این سویه فقط در حـضور نـشاسته القـاء مـی‌شـود. نشاسته به نسبت ۲٪ حجمی روی تولید آنزیم تأثیر مثبت دارد و در این بین، بالاترین تولید آنزیم در حضور نـشاسته ثبت شـد. تریپتـوفن میـزان تولیـد آنـزیم را تـا ۲۰۲٪ در مقایسه با محیط پایه افزایش می‌دهد، درحالی که پپتون و لایزین مهار کاتابولیکی قوی را نشان داده و تا سطح ۰/۵٪ تولید را کاهش می‌دهد.

ویژگی‌های آلفا آمیلاز و بررسی پایداری آن: با خلوص نـسبی حـدود ۳/۷۷ فعالیـت آنـزیم حـدودا ۳۲/۶۴ برابـر افزایش یافت (جدول ۲).

جدول۲- مقایسه فعالیت آنزیم ناخالص و آنزیم نیمه خالص

مشخصات آنزیم	آنزیم ناخالص	آنزیم نیمه تخلیص شده	نسبت آنزیم ناخالص/آنزیم نیمه تخلیص شده
درصد فعالیت آنزیم (میکرومول برمیلی‌لیتر)	۱۰۰	۳۷۷/۰۸	۳/۷۷
میزان پروتئین (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	۲/۰۲	۰/۲۳	۰/۱۲
درصد فعالیت اختصاصی	۱۰۰	۳۲۶۴/۴۶	۳۲/۶۴

بـه کمـک ژل الکترفـورز SDS-PAGE محتـوی۰/۲٪ نشاسته، وزن مولکولی و هموژن بودن آنزیم تغلـیظ شـده، مشخص گردید و فعالیـت آمـیلازی آنـزیم همـوژن در ژل الکترفورز نیز نشان داده شد. وزن مولکولی این باند حـدود ۶۰ کیلو دالتون است. مطالعه روی شناسایی آلفا آمیلاز در عصاره خام نشان داد که حداکثر فعالیـت آن در pH برابـر ۷/۵ و درجـه حـرارت ۷۰ درجـه سـانتی‌گـراد اسـت (نمودارهای ۴ و ۳). عصاره خام آنزیم به مدت ۲۴ سـاعت در دامنه pH بین ۷-۶ در ۷۰ درجه سانتی‌گـراد پایـداری نشان می‌دهد (نمودار ۳). آنزیم در ۷۰ درجه سـانتی‌گـراد کاملاً پایدار است ولی در دمای ۸۰ و ۹۰ درجه سانتی‌گراد به ترتیب ۱۶٪ و ۵۴٪ فعالیت آن کاهش می‌یابـد (نمـودار ۴). فعالیت آنزیم در دامنه درجه حرارتـی بـین ۴۰ تـا ۷۰ درجه سانتی‌گراد افـزایش یافتـه و در دمـای بـالاتر از ۷۰ درجـه سـانتی‌گـراد کاهـشی در فعالیـت آنـزیم مـشاهده می‌شود.

تأثیر فلزات یونی و بازدارنده‌ها: در بـین فلـزات مـورد بررسی، جیوه اثر بازدارندگی بر فعالیـت آنـزیم دارد. ولـی یون‌هایی هم‌چون منگنـز، آهـن، کبالـت و کلـسیم سـبب افزایش فعالیت آنزیم به ترتیـب تـا میـزان ۳۲۳٪، ۲۲۳٪، ۱۴۹٪ و ۱۴۰٪ می‌شوند (جدول ۳).

جدول۳- تأثیر کاتیون‌های فلزی بر روی فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز تولید شده توسط B.licheniformis Shahed-07

کاتیون	درصد فعالیت آنزیم	کاتیون	درصد فعالیت آنزیم
منگنز	۳۲۳	شاهد	۱۰۰
روی	۷۵	کلسیم	۱۴۰
مس	۸۲	منیزیم	۱۰۸
نیکل	۴۹	آهن	۲۲۳
جیوه	۰	کبالت	۱۴۹

بحث

با شناسایی بیوشیمیایی باسیلوس غربال شده بومی، این سویه از باسیلوس به نام*B.licheniformis* Shahed-07 نام‌گذاری شد.

تولید آمیلاز: افزایش pH از ۵ تا ۷ محرکی برای تولید آنزیم است به طوری که در pH ۷ با بیشینه تولید آنزیم، رشد سلول نیز افزایش می‌یابد. بین پارامترهای فیزیکی، pH محیط کشت نقش مهمی در تغییرات مورفولوژیکی ارگانیسم و تولید آنزیم ایفا می‌کند. تغییرpH در طی رشد ارگانیسم بر روی پایداری آنزیم تولید شده مؤثر است. pH مطلوب رشد و تولید آنزیم در بیشتر سویه‌های باسیلوس که به طور تجاری برای تولید آلفا آمیلاز مورد استفاده قرار می‌گیرند، بین ۶ تا ۹ است [۱۳]. pH خنثی، برای تولید آنزیم در گونه‌های *B.thermoolevorans* NP54 [۱۴]، *B.coagulans* [۱۵]، *B.licheniformis* [۱۶]، *B.subtilis* JS-2004 [۷] و *B.brevis* [۱۷] نیز به عنوان pH مطلوب گزارش شده است. سویه *B.licheniformis* Shahed-07 نیز توانایی تولید آلفا آمیلاز و هیدرولیز نشاسته را داراست. آنزیم در درجه حرارت بین ۳۰ تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد تولید می‌شود.

تأثیر درجه حرارت بر تولید آنزیم به رشد ارگانیسم وابسته است. دامنه وسیع درجه حرارت بین ۳۵ تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد برای رشد مطلوب و تولید آنزیم در باکتری‌ها گزارش شده است [۱۸]. سویه‌ای از *B.subtilis* ترموفیلیک جداشده از شیر تازه گوسفند، در یک محیط با غلظت کم نشاسته در ۴۰ درجه سانتی‌گراد، بیشترین تولید آلفا آمیلاز مقاوم به دما خارج سلولی را داشت [۱۹]. غشای این جنس از باسیلوس تنوع وسیعی از آنزیم‌های خارج سلولی را داراست که در این بین، آمیلاز از نظر صنعتی مورد توجه قرار گرفته است. مشابه این گزارش در گونه *B.thermooleovorans* NP54 و *B.licheniformis* Shahed-07 نیز نشان داده شده است به طوری که حد مطلوب درجه حرارت رشد و تولید آنزیم برای این سویه‌ها ۵۰ درجه سانتی‌گراد است. آلفا آمیلاز سویه *B.licheniformis* Shahed-07 در ۲۶ ساعت به حداکثر تولید خود می‌رسد و پس از ۳۰ ساعت منحنی تولید آنزیم سیر نزولی می‌یابد (نمودارهای ۱ و ۲). این در حالی است که میزان تولید آنزیم در سویه *B.subtilis* JS-2004 در زمان ۴۸ ساعت پس از رشد به حداکثر می‌رسد و پس از ۹۶ ساعت منحنی تولید آنزیم سیر نزولی می‌یابد. با رسیدن جمعیت توده سلولی در فلاسک لرزشی به حداکثر

مقدار خود، تولید آنزیم نیز به حد اکثر خود رسید (نمودار ۱). افزایش تولید آنزیم در فاز رکود رشد (نمودار ۲) به عبارتی نشان می‌دهد زمانی که سلول‌ها به فاز رکود منحنی رشد برسند و دسترسی به سایر منابع کربن در محیط کشت برای آن‌ها کاهش یابد، القاء آنزیم صورت می‌گیرد [۲۱-۲۰].

بهینه‌سازی شرایط رشد باکتری: آزمایشات نشان داده است که شرایط کشت، تأثیر مهمی بر تولید آنزیم آمیلاز دارد. هنگامی که جمعیت سلولی در محیط کشت به فاز رکود رشد خود می‌رسد، میزان تولید آنزیم افزایش می‌یابد. بنابراین، تولید آنزیم رابطه‌ای با مراحل رشد میکروارگانیسم ندارد. تأثیر مثبت نشاسته به نسبت ۲٪ حجمی روی تولید آنزیم در این مطالعه نشان‌دهنده القایی بودن تولید آنزیم فقط در حضور نشاسته است. سبوس برنج و ذرت نیز حداکثر تولید آلفا آمیلاز را در مقایسه با نشاسته نشان می‌دهند. میزان تولید در مقایسه با نشاسته به طور ثابت تا ۸٪ افزایش یافته و بعد از آن منحنی سیر نزولی می‌یابد [۲۲].

تأثیر گلایسین، تریپتوفن، پپتون، تریپتون، لایزین و عصاره مخمر در محیط کشت بر میزان تولید می‌تواند قابل توجه باشد. با افزایش میزان تولید آنزیم تا ۲۰۲٪ در حضور تریپتوفن، می‌توان نشاسته و تریپتون را به عنوان منبع کربن و نیتروژن مطلوب گزارش نمود [۲۳]. تولید آمیلاز در میکروارگانیسم‌های مختلف به حضور یا عدم حضور منابع گوناگون نیتروژن و انواع اسید آمینه در محیط کشت وابسته است. منابع آلی نیتروژن هم‌چون عصاره مخمر و پپتون، بر تولید آنزیم اثر تحریک‌کنندگی دارند [۲۵-۲۴]. در گونه *Bacillus sp.* WN11 در صورت استفاده از پروتئاز پپتون و تریپتون به عنوان منبع نیتروژن، رشد بهتر و بالاترین تولید آنزیم در سطح فعالیت آنزیمی مشاهده شده است ولی در صورت استفاده از NO_3^-,NH_4^+ و اوره به عنوان منبع نیتروژن هیچ‌گونه رشدی مشاهده نشد. بنابراین نیازهای تغذیه‌ای متفاوت انواع ارگانیسم‌ها و سویه‌های میکروبی تولیدکننده آلفا آمیلاز می‌تواند به خصوصیت ژنتیکی آن‌ها وابسته باشد.

ویژگی‌های آلفا آمیلاز و بررسی پایداری آن: وزن‌های مولکولی متفاوتی برای آنزیم آمیلاز درگونه‌های مختلف باسیلوس و دیگر گروه‌های میکروارگانیسم گزارش شده است. به طوری که در گونه *B. stearothermophilus* وزن مولکولی آنزیم در دامنه بین ۶۸-۵۹ کیلو دالتون [۲۶]، گونه *Bacillus* ANT–6 وزن مولکولی برابر ۹۴/۵ کیلو دالتون، در *Bacillus clausii* برابر ۱۰۱ کیلو دالتون [۲۷] و در اکثر گونه‌های باسیلوس ۶۳ کیلو دالتون گزارش شده است.

درجه حرارت مطلوب فعالیت آلفا آمیلاز در سویه *B.licheniformis* Shahed-07، مشابه با آلفا آمیلاز گونه‌های دیگر باسیلوس، ۷۰ درجه سانتی‌گراد گزارش شده است. تحمل پذیری دمایی در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت برای آلفا آمیلاز گونه *B.licheniformis* CUMC 305 گزارش شده است [۱۶] آلفا آمیلاز در گونه‌ای از باسیلوس *Bacillus sp.* ANT-6 بعد از ۱۸ ساعت و۲۴ ساعت گرماگذاری در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و pH برابر ۱۰/۵ به ترتیب ۸۵/۵٪ و ۵۵٪ فعالیت آنزیمی خود را حفظ کرده است. گونه‌ای از *Bacillus stearothermophilus* که در حین فرآوری صنعتی سیب زمینی جدا شده است نیز توانایی تولید آلفا آمیلاز با

تحمل‌پذیری بالای دمایی را داراست. درجه حرارت مطلوب برای فعالیت این آنزیم، ۷۰ درجه سانتی‌گراد است ولی pH مطلوب برای فعالیت آنزیم نسبتاً کم و در دامنه بین ۶-۵/۵ است [۲۸].

آلفا آمیلازهای جنس باسیلوس پایداری گرمایی دارند و این ویژگی مطلوبی در صنایع ذوب نشاسته به شمار می‌رود. علی‌رغم مطالعات زیادی که روی آلفا آمیلاز مقاوم گرمایی *B.licheniformis* انجام شد [۳۰-۲۹] منشاء طبیعی تحمل‌پذیر بودن دمای بالا به صورت یک معما باقی مانده است. به این معنی که آیا *B.licheniformis*، آلفا آمیلاز مقاوم دما را به صورت تصادفی تولید می‌کند و یا تحت شرایط انتخابی در درجه حرارت بالا و یا دیگر شوک‌های محیطی تولید می‌شود.

تأثیر فلزات یونی و بازدارنده‌ها: فاکتورهای خارجی هم‌چون کاتیون‌ها و افزاینده‌ها در فعالیت آنزیم مؤثر می‌باشند. اثر یون روی در بین آمیلازهای مختلف متفاوت است. برای مثال یون روی، بازدارندگی کامل روی *Schwanniomyces alluvius ,Bacillus cereus* NY14 داشته و در فعالیت آنزیم *Aspergillus kowachii* هیچ گونه اثری ندارد. اما ۴۶٪ اثر بازدارندگی روی آمیلاز مقاوم به دما در گونه‌ای از باسیلوس ترموفیلیک گزارش شده و ۱۳٪ بازدارندگی هم در آمیلازهای مقاوم به دما نشان داده شده است [۳۱]. آمیلاز مقاوم به دما *B. licheniformis* Shahed-07 در حضور یون روی، ۲۵٪ بازدارندگی نشان داده است (جدول ۳). فعالیت آنزیمی در گونه‌های باسیلوس آلکالوفیلیک و ترموفیلیک Ts-23 با حضور کلرید کلسیم ۱میلی‌مولار به بیشتر از ۱۱۵٪ می‌رسد این در حالی است که فعالیت آنزیم در *Bacillus stearothermophilus* ۱۲۲٪ افزایش یافته [۳۲] و در *B. licheniformis* Shahed-07 حدوداً ۱۴۰٪ بالا می‌رود. تأثیر حضور یون کلسیم روی آنزیم‌های مقاوم دمای *B. licheniformis*، *Pyrococcus juriosus*، *B. subtilis* JS-2004، *Thermococcus litoralis* [۳۳] نیز گزارش شده است. یون مس بر فعالیت آمیلاز *B. licheniformis* اثر بازدارندگی دارد [۱۶]. بازدارندگی یون‌های مس در فعالیت آمیلاز گونه *B. subtilis* JS-2004 ناشی از رقابت بین کاتیون‌های خارجی و کاتیون‌های همراه پروتئین آنزیم است که سبب کاهش فعالیت متالو آنزیم آمیلاز می‌شود. یون جیوه بر اسیدهای آمینه آندولی موجود در ساختار آمیلاز که در عملکرد آلفا آمیلاز میکروبی مؤثرند، اثر بازدارندگی دارد.

نتیجه‌گیری

سویه *B.licheniformis* Shahed-07 سطح مطلوبی از آلفا آمیلاز مقاوم به دما را تولید می‌کند که در فرآوری نشاسته و صنایع غذایی کاربرد دارد. تولید آنزیم آلفا آمیلاز توسط این سویه جدا شده و بومی می‌تواند با بهینه‌سازی فرآیند تولید، افزایش یافته و در سطح تجاری مطرح شود.

تشکر و قدردانی

در اینجا لازم است از معاونت پژوهشی و مرکز تحقیقات علوم پایه دانشگاه شاهد که با تأمین بودجه امکان اجرای این پژوهش را فراهم آوردند تشکر و قدردانی به عمل آید.

References

[1] Burhan A, Nisa U, Gokhan C, Omer C, Ashabil A, Osman G. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic Bacillus sp. Isolate ANT-6. *Process Biochem* 2003; 38: 1397-1403.

[2] Sidhu GS, Sharma P, Chakraborty K, Gupta JK. Strain improvement for the production of a thermostable alpha-amylase. *Enz. Microb Technol* 1997; 21: 525-30.

[3] Pandey A, Nigam P, Soccol CR, Soccol VT, Singh D, Mohan R. Advances in microbial amylases. *Biotechnol Appl Biochem* 2000; 31: 135-52.

[4] Gupta R, Gigras P, Mohapatra H, Goswami VK, Chauhan B. Microbial alpha-amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochem* 2003; 38: 1599-616.

[5] Leveque E, Janecek S, Haye B, Belarbi A. Thermophilic archaeal amylolytic enzymes - catalytic mechanism, substrate specificity, and stability. *Enz MicrobTechnol* 2000; 26: 3-14.

[6] Morgan FJ Priest FG. Characterization of thermostable α-amylase from *Bacillus licheniformis* NCTB 6346. *J Appl Bacteriol* 1981; 50: 104-14.

[7] Asgher M, Asad MJ, Rahman SU, Legge RL. A thermostable α-amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *J Food Engg* 2007; 79: 950-55.

[8] Teodoro CED, Martin MLL. Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus* sp. *Braz J Microbiol* 2000; 31: 298-302.

[9] Janecek S. Alpha-amylase family: molecular biology and evolution. *Prog Biophys Mol Biol* 1997; 67: 67-97.

[10] Danson MJ, Hough DW, Russell RJ, Taylor GL, Pearl L. Enzyme thermostability and thermoactivity. *Prot Engg* 1996; 9: 629-30.

[11] Lowry OH, Rosebrough N, Farr A, Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-76.

[12] Bernfeld P. Enzymes of Starch Degradation and Synthesis in, *Advances in Enzymology* In *Advances in Enzymology Vol. XII*. Nord, F. (ed). NY: Interscience Publ. 1951, pp. 379.

[13] Jin B, van Leeuwen J, Patel B. Mycelial morphology and fungal protein production from

starch processing wastewater in submerged cultures of *Aspergillus oryzae*. *Process Biochem* 1999; 34: 335-40.

[14] Malhotra R, Noorwez SM, Satyanarayana T. Production and partial characterization of thermostable and calcium-independent alpha-amylase of an extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans* NP54. *Lett Appl Microbiol* 2000; 31: 378-84.

[15] Medda S. and Chandra AK. New strains of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus coagulans* producing thermostable alpha-amylase active at alkaline pH. *J Appl Bacteriol* 1980; 48: 47-58.

[16] Krishnan T. and Chandra AK. Purification and Characterization of alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* CUMC305. *Appl Environ Microbiol* 1983; 46: 430-7.

[17] Tsvetkov VT. and Emanuilova EI. Purification and properties of heat stable alpha-amylase from Bacillus brevis. *Appl Microbiol Biotechnol* 1989; 31: 246-8.

[18] Lin LL, Chyau CC, Hsu WH. Production and properties of a raw-starch-degrading amylase from the thermophilic and alkaliphilic Bacillus sp. TS-23. *Biotechnol Appl Biochem* 1998; 28: 61-8.

[19] Konsula Z. and Liakopoulou-Kyriakides M. Hydrolysis of starches by the action of an alpha-amylase from *Bacillus subtilis*. *Process Biochem* 2004; 39: 1745-9.

[20] Huang H, Ridgway D, Gu T, Moo-Young M. A segregated model for heterologous amylase production by Bacillus subtilis. *Enz MicrobTechnol* 2003; 32: 407-13.

[21] Wanderley KJ, Torres FAG, Moraes L, and Ulhoa CJ. Biochemical characterization of alpha-amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 231: 165-9.

[22] Mamo G, and Gessesse A. Effect of cultivation conditions on growth and alpha-amylase production by a thermophilic Bacillus sp. *Lett Appl Microbiol* 1999; 29: 61-65.

[23] Narang S, and Satyanarayana T. Thermostable alpha-amylase production by an extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans*. *Lett Appl Microbiol* 2001; 32: 31-35.

[24] Hamilton LM, Kelly CT, Fogarty WM. Production and properties of the raw starch-digesting alpha-amylase of Bacillus sp. IMD 435. *Process Biochem* 1999; 35: 27-31.

[25] Hewitt CJ, and Solomons GL. The production of alpha-amylase (E.C.3.2.1.1) by *Bacillus amyloliquefaciens*, in a complex and a totally

defined synthetic culture medium. *J Indust Microbiol Biotechnol* 1996; 17: 96-99.

[26] Ben Ali M, Mhiri S, Mezghani M, Bejar S. Purification and sequence analysis of the atypical maltohexaose-forming alpha-amylase of the *B. stearothermophilus* US100. *Enz MicrobTechnol* 2001; 28: 537-42.

[27] Duedahl-Olesen L, Matthias Kragh K, Zimmermann W. Purification and characterisation of a malto-oligosaccharide-forming amylase active at high pH from *Bacillus clausii* BT-21. *Carbohyd Res* 2000; 329: 97-107.

[28] Wind RD, Buitelaar RM, Eggink G, Huizing HJ, Dijkhuizen L. Characterization of a new *Bacillus stearothermophilus* isolate: a highly thermostable α-amylase producing strain. *Appl Microbiol Biotechnol* 1994; 41: 155-62.

[29] Declerck N, Machius M, Joyet P, Wiegand G, Huber R, Gaillardin C. Engineering the thermostability of *Bacillus licheniformis* alpha-amylase. *Biologia* 2002; 57: 203-11.

[30] Nielsen JE. and Borchert TV. Protein engineering of bacterial alpha-amylases. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1543: 253-74.

[31] Mamo G. and Gessesse A. Purification and characterization of two raw-starch-digesting thermostable alpha-amylases from a thermophilic Bacillus. *Enz MicrobTechnol* 1999; 25: 433-8.

[32] Srivastava RAK. Purification and chemical characterization of thermostable amylases produced by *Bacillus stearothermophilus*. *Enz MicrobTechnol* 1987; 9: 749-54.

[33] Dong G, Vieille C, Savchenko A, Zeikus JG. Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding extracellular α-amylase from *Pyrococcus furiosus* and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 3569-76.

Characterization of a Thermotolerant α-amylase Producing Natural Variant of *Bacillus* Species

I. Rasooli[1], S.L. Mousavi Gargari[2], R. Sorouri Zanjani[3], Sh. Darvish Alipoor Astaneh[4]

Received: 17/02/09 **Sent for Revision: 14/07/09** **Received Revised Manuscript: 29/10/09** **Accepted: 14/11/09**

Background and Objectives: Thermotolerant α-amylases have had extensive commercial applications in starch processing, brewing and sugar production, and have almost completely replaced chemical hydrolysis of starch in the starch processing industry. The aim of this study was to determine the characterization of thermotolerant α-amylase producing natural variant of *bacillus* species

Materials and Methods: In this laboratory study, the isolated bacillus species known as *Bacillus licheniformis* Shahed-07 was identified by biochemical methods. The bacillus was cultured in liquid media to produce α-amylase. The enzyme production media were assessed controled and optimized for enzyme productivity using various carbon and nitrogen sources. The stability of the enzyme against temperature, pH, metal ions and chelating agents was then determined.

Results: Maximum enzyme production was achieved after 26 h cultivation at pH 7.0 and 50°C. Supplementation of medium with 0.5% Tryptophan enhanced the enzyme productivity to 202%, whereas Peptone and Lysin at 0.5% level showed a strong repression. In comparison with the crude α-amylase, the partially purified enzyme had 3.77 fold purity with 32.64 fold increased activity. This enzyme showed amylolytic activity with a single band of 6000 daltons on electrophoresis gel with 0.2% starch. The optimum activity was at pH 7.5 and 70°C. The crude enzyme was stable for 24 h at pH range of 6-7 at 70°C. Hg^{2+} was completely inhibitory to the enzyme activity, and Mn^{2+}, Fe^{2+}, Co^{2+} and Ca^{2+} increased the enzyme activity.

Conclusion: The *B. licheniformis* Shahed-07 strain produced high levels of thermotolerant α-amylase with characteristics suitable for application in starch processing and other food industries. The production process can be commercialized after further optimization for enhancing enzyme production.

Key word: *Bacillus licheniformis,* α-Amylase, Optimization, Production Medium

Conflict of interest: This research was funded by Shahed University.

Funding: None declared.

Ethical approval: The Ethical Committee of Shahed University approved the study.

1- Prof., Dept. of Biology, College of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran
(Corresponding author) Tel: (021) 51212600, Fax: (021) 51212601, E.mail: rasooli@shahed.ac.ir
2- Associate Prof., Dept. of Biology, College of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran
3- Assistant Prof., of Microbiology, Baghiyatollah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4- Master Science, Dept. of Biology, College of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, Iran