مقاله تحقیقی

بهینه‌سازی تولید آنزیم α-آمیلاز توسط باکتری *Bacillus alkalitelluris* با استفاده از روش سطح پاسخ

مهدی ابراهیمی[۱،*]، فاطمه نوربخش[۲]

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

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

محل انجام تحقیق: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۲/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۶/۲/۲۲

فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران
جلد ۱۲- شماره ۱- بهار ۱۳۹۶

چکیده

آنزیم α-آمیلاز می‌تواند با هیدرولیز پیوندهای α(۱→۴) گلیکوزیدی در پلی‌ساکاریدها و الیگوساکاریدها از جمله نشاسته، آنها را هیدرولیز نموده و دی و الیگوساکاریدهای کوچکتر را تولید نماید. با توجه به اینکه نشاسته به عنوان یکی از فراوان‌ترین پلی‌ساکاریدهای موجود در طبیعت محسوب می‌شود، استفاده از آنزیم α-آمیلاز برای تجزیه و تبدیل این ماده اولیه به محصولی با ارزش افزوده بیشتر بسیار مورد توجه قرار گرفته است. در این مطالعه میزان تولید آنزیم آمیلاز با بهینه‌سازی دو پارامتر دما و pH با استفاده از روش سطح پاسخ مورد بررسی قرارگرفته است. باکتری *B. alkalitelluris* در محیط LBبراث کشت اولیه داده شد. با استفاده از روش طرح مرکب مرکزی و در نظر گرفتن ۵ سطح برای دو پارامتر دما و pH مجموعا ۱۳ آزمایش طراحی شد. سپس هر آزمایش بصورت مجزا در آزمایشگاه با سه تکرار انجام شده و در نهایت میزان فعالیت آنزیم α-آمیلاز در هر آزمایش با استفاده از روش DNS بدست آمد. نتایج این مرحله با استفاده از روش سطح پاسخ مورد ارزیابی قرارگرفته و در نهایت شرایط بهینه برای دو فاکتور دما و pH بصورت به ترتیب °C ۳۸ و ۸/۵ تعیین شد. به منظور بررسی شرایط بهینه پیشنهادی، آزمایشی با درنظر گرفتن شرایط بهینه پیشنهادی انجام شده و میزان تولید آنزیم با شرایط غیربهینه مقایسه‌شد. با توجه به نتایج بدست میزان تولید آنزیم تحت شرایط بهینه نسبت به شرایط غیربهینه ۱۱۴/۲درصد افزایش داشت.

واژه های کلیدی: α-آمیلاز، *Bacillus alkalitelluris*، روش سطح پاسخ، طرح مرکب مرکزی، طراحی آزمایشات

مقدمه

α-آمیلاز (α-1 ,4-D glucan glucanohydro lases ,E.C.3.2.1.1) آنزیم خارج سلولی است که به طور تصادفی پیوندهای داخلی α(۱→۴) خطی آمیلو پکتین منشعب در مولکول نشاسته را به الیگوساکاریدهای کوتاه می‌شکند و در نتیجه واحدهایی با وزن مولکولی پایین تولید می‌کند. 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 مایع-کننده نیز گفته می‌شود (۱-۳).

بدلیل نقش مهم آمیلازها در تجزیه نشاسته، امروزه صنایع مختلف تجزیه نشاسته از جمله صنایع غذایی، تخمیری، نساجی، کاغذسازی و تولید پودرهای ظرف-شویی بصورت وسیعی از آمیلازها استفاده می‌کنند. صنایع جدید امروزی نظیر صنایع پزشکی، کلینیکی و آنالیز شیمیایی نیز بر حسب مورد، محل مصرف این

آنزیم هستند. به همین دلیل امروزه α-آمیلاز یکی از مهمترین محصولات فروشی شرکت‌های مختلف تولیدکننده آن برای استفاده در صنایع مختلف می‌باشد (۴).

امروزه در تولید شوینده ها، از آنزیم‌های زیاد استفاده می‌شود. شوینده های فاقد آنزیم خورده شدن و زبرشدن سطوح پارچه‌ای و چوبی می‌شوند. ولی شوینده های آنزیمی از این حیث دارای شرایط ملایمتری بوده و آسیب کمتری به سطح مورد نظر وارد می‌کنند. چون یکی از عمده ترین مواد غذایی مصرفی نشاسته بوده و محیط شوینده ها هم اکثراً قلیایی و با حرارت بالا است، α-آمیلازهای مقاوم به حرارت و قلیا یکی از مهمترین آنزیم‌های تشکیل‌دهنده شوینده های آنزیمی می‌باشند (۵).

B. alkalitelluris، باکتری گرم مثبت، بی‌هوازی اختیاری و میله‌ای شکل می‌باشد. کلنی آن بر روی محیط R2A، خامه‌ای، صاف و دایره‌ای شکل است. در دمای بین ۴۰ °C- ۱۵ و pH بین ۱۱-۷ دارای رشد است که حداکثر رشد در دمای ۳۰ °C و pH ۹-۵/۹ رخ می-دهد (۶). با توجه به ویژگی مقاومت به pH قلیایی در این باکتری انتظار می‌رود پروتئین‌های تولیدشده توسط این باکتری (از جمله آنزیم α-آمیلاز) نیز قابلیت مقاومت به pH را داشته باشند. بهمین دلیل در این مطالعه سعی شده است تا با استفاده از روش بسیار کارآمد سطح پاسخ[1]میزان تولید آنزیم α-آمیلاز توسط این باکتری افزایش یابد تا زمینه با استخراج و انجام مطالعات بیوشیمیایی و تکمیلی در مورد این آنزیم فراهم شود.

مواد و روش ها

کشت اولیه باکتری

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 تهیه‌شد. به منظور تهیه کشت فعال، باکتری توسط سرنگ به محیط کشت R2A براث تلقیح شد. این محیط کشت در دمای ۳۰°C به مدت ۴۸ ساعت با سرعت همزن ۱۳۵ دور در دقیقه انکوبه شد.

تولید آنزیم آمیلاز

از محیط کشت LB براث به عنوان محیط تولید آنزیم آمیلاز استفاده شد. پس از ۴۸ ساعت کشت باکتری در دمای ۳۰°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 قرارگرفت.

سنجش فعالیت α-آمیلاز

فعالیت آنزیم α-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-هیدروکسی۳و۵-دی نیتروبنزوئیک اسید، ۳۰ گرم سدیم پتاسیم تارتارات و ۲۵ میلی لیتر سود ۲ مولار در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر تهیه‌شد (۹). برای سنجش فعالیت آنزیم، ۲۵۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی و ۲۵۰ میکرولیتر بافراستات ۰/۰۵ مولار و ۱/۵ میلی لیتر محلول نشاسته ۲ درصد (w/v) به بافر استات افزوده شد. این مخلوط به مدت ۱ ساعت در دمای ۵۰°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 آزادشده (میکرومولار) در واحد زمان (دقیقه) تعریف می‌شود.

طراحی آزمایشات با استفاده از طرح مرکب مرکزی

به منظور بهینه‌سازی شرایط تولید با در نظر گرفتن دو فاکتور دما و pH، از طرح مرکب مرکزی[2]استفاده شد. در این طرح هر دو پارامتر در ۵ سطح (۱/۴+، ۱+، ۰، ۱-و ۱/۴-) در نظر گرفته شدند و در مجموع ۱۳ آزمایش توسط نرم‌افزار Minitab 17 طراحی‌شد (۱۱). تمامی آزمایشات طبق الگوی مشخص‌شده در جدول ۱ با ۳ بار تکرار در آزمایشگاه انجام شده و در نهایت نتایج بدست

[1] Response surface methodology

[2] Central composite design

آمده با کمک نرم‌افزار Minitab 17 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرارگرفت.

جدول ۱ - طراحی آزمایش و نتایج مربوطه به تغییرات اعمال شده بر روی۲ فاکتور دما و pH با استفاده از طرح مرکب مرکزی.

آزمایش	pH	دمای انکوباسیون (°C)	واحد آنزیمی(U)
۱	۷	۳۵	۰/۰۷۳
۲	۱۰	۳۵	۰/۰۵۷
۳	۷	۴۵	۰/۰۴۸
۴	۱۰	۴۵	۰/۰۳۰
۵	۶/۳	۴۰	۰/۰۳۲
۶	۱۰/۶	۴۰	۰/۰۲۶
۷	۸/۵	۳۲	۰/۰۷۵
۸	۸/۵	۴۷	۰/۰۸۸
۹	۸/۵	۴۰	۰/۰۴۲
۱۰	۸/۵	۴۰	۰/۰۹۶
۱۱	۸/۵	۴۰	۰/۰۹۶
۱۲	۸/۵	۴۰	۰/۰۹۶
۱۳	۸/۵	۴۰	۰/۰۹۶

نتایج

نتایج حاصل از آزمایشات طراحی شده با استفاده از روش مرکب مرکزی در جدول ۱ نشان داده شده است.

با توجه به این جدول ، ضرایب مدل چند جمله ای درج دوم پس از تجزیه و تحلیل توسط نرم افزار و حذف عبارت‌های غیرمعنی‌دار توسط روش ox-Cox transformation توسط نرم‌افزار بصورت زیر ارائه شد:

-amylase (U) = -13.58 + 1.509 pH + 0.430 Temp - 0.0932 pH*pH - 0.00595 Temp*Temp+0.00294 H*Temp[۳]

کیفیت مدل توسط آنالیز واریانس (ANOVA) بررسی شد (جدول ۲). میزان احتمال F با میزان ۹/۸۸ دلالت بر معنی‌دار بودن مدل دارد و همچنین نشان می-دهد که ۰/۱۲ درصد احتمال وجود دارد که مدل، دچار اختلال شود. مقدار عددی ضریب رگرسیون(R^2) برای تولید α-آمیلاز ۸۷/۵۹ است که نشان‌دهنده میزان انطباق قابل قبول داده ها از مدل رگرسیون می‌باشد چنین نتیجه گرفت که مدل‌های رگرسیون به خوبی توانسته‌اند رابطه بین شرایط محیطی کشت (دمای انکوباسیون و pH) و تولید α-آمیلاز را نشان داده و پیش-بینی کنند. احتمال P معنادار بودن ضرایب و هم چنین

اهمیت واکنش‌های متقابل بین متغیرها را مشخص می کند. اثر خطی دمای انکوباسیون در میزان تولید α آمیلاز معنی‌دار است (P <۰/۰۵). اثر خطی pH در میزا تولید α-آمیلاز معنی‌دار نمی‌باشد (P >۰/۰۵). همچنین اثرات متقابل pH و دمای انکوباسیون بر تولید α-آمیلا معنی‌دار نیست (P >۰/۰۵). در مورد اثرات درجه دو هر دو عامل (pH^2 و دما[۲]) معنی‌دار می‌باشند (۰/۰۵ P). علاوه براین، مدل نهایی دارای عدم برازش غیرمعنی دار است که نشان‌دهنده پردازش خوب مدل می‌باش معنی‌دار بودن آزمون عدم برازش برای یک مدل بیانگ این است که نقاط به خوبی اطراف مدل قرار نگرفته‌اند

[۳] عبارت Temp بر Temperature به معنی دما دلالت دارد.

نمی‌توان از مدل برای پیشگویی مقادیر متغیرهای تابع استفاده نمود. بنابراین با عدم معنی‌داری آزمون عدم برازش، می‌توان دریافت مدل ارائه شده توسط نرم‌افزا به خوبی می‌تواند بر داده های مورد بررسی منطبق شو

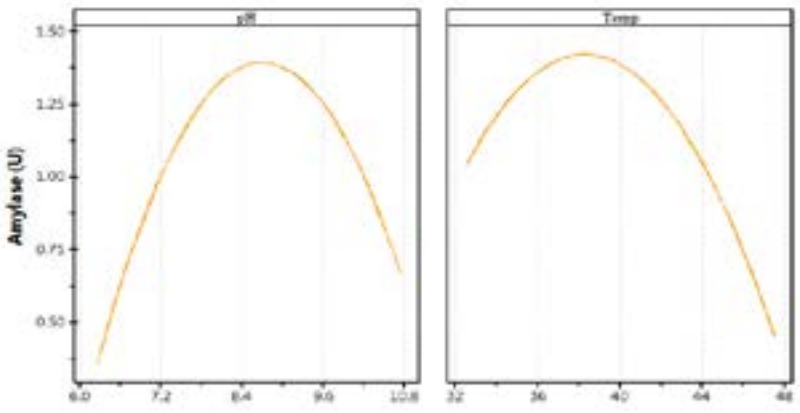
جدول ۲ - نتایج تحلیل واریانس برای مدل درجه دوم.

	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	احتمال F	احتمال P
مدل	۵۳۴/۹۱	۵	۱۰۶/۹۸	۹/۸۸	۰/۰۰۴
pH		۱	۳۱/۰۸	۲/۸۷	۰/۱۳۴
دما		۱	۹۲/۲۸	۸/۴۳	۰/۰۲۳
pH^2		۱	۳۰/۶۱	۲۸/۲۸	۰/۰۰۱
دما^۲		۱	۱۵/۴۰	۱۴/۲۳	۰/۰۰۷
دما*pH		۱	۰/۱۹۴	۰/۱۸	۰/۶۴۸
عدم برازش		۱	۷/۵۷	۴۲/۷۴	۰/۱۵۳

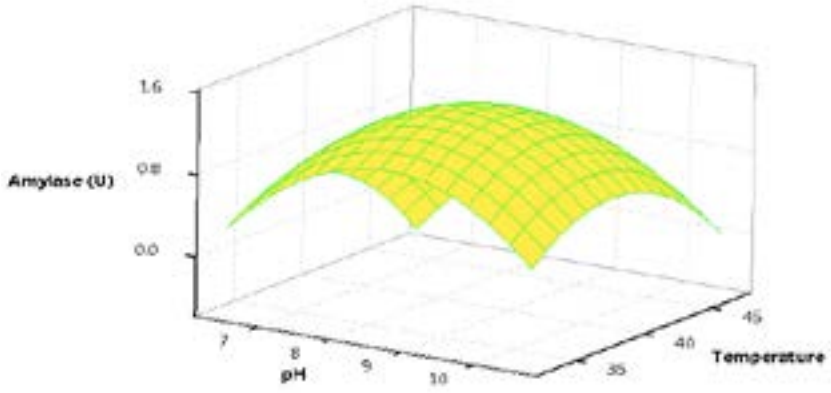
بررسی تاثیر پارامترها بر تولید α-آمیلاز و تعیین شرایط بهینه

در شکل نحوه تاثیر هر یک پارامترهای دما و pH بر تولید α-آمیلاز نشان داده شده است. با توجه به نمودار مشخص است که اثر هر دو پارامتر در محدوده مورد بررسی در تولید α-آمیلاز بصورت زنگوله‌ای شکل است. به این ترتیب که با افزایش pH از ۶/۳ تا حدود ۸/۵ میزان تولید آنزیم نیز افزایش دارد اما پس از pH ۸/۵ نمودار شکل نزولی بخود می‌گیرد. در مورد پارامتر دما نیز، با افزایش دما از ۳۲ °C تا ۳۸ °C روند تولید آمیلاز افزایشی است اما پس از آن روند کاهشی مشاهده می‌شود.

از آنجا که اثر همزمان پارامترها در پاسخ مور بررسی می‌تواند متفاوت از اثر هر یک به تنهایی باش نمودار سطح پاسخ بر اساس نتایج بدست آمده برای ا همزمان مقادیر متغیر از دو پارامتر دما و pH در تول آنزیم α-آمیلاز توسط نرم‌افزار Minitab 17 رسم ش (شکل ۲). با توجه به این نمودار مشخص است ک بیشترین تولید آنزیم α-آمیلاز در باکتری *alkalitelluris* در محدوده دمایی ۳۵-۴۰ °C و ۸-۹ pH قابل دستیابی است. بر این اساس شرایط دمایی و pH بهینه برای دستیابی به بیشترین مقدار تولید آنزیم ترتیب ۳۸ °C و ۸/۵ توسط نرم‌افزار تعیین شد.



شکل ۱ نمودار اثرات اصلی دو پارامتر دما و pH در تولید α-آمیلاز.



شکل ۲ - نمودار سطح پاسخ جهت نمایش اثر دو پارامتر دما و pH بر تولید α-آمیلاز.

به منظور بررسی صحت عملکرد مدل پیشنهادی در پیش‌بینی شرایط بهینه، دو آزمایش طراحی و انجام شد. در آزمایش نخست شرایط اولیه کشت باکتری و در آزمایش دوم شرایط بهینه پیشنهادی مورد استفاده قرارگرفت. بر اساس نتایج بدست آمده در این دو آزمایش میزان تولید آنزیم تحت شرایط اولیه U ۰/۰۹۲ و با در نظر گرفتن شرایط بهینه U ۰/۱۰۵ بدست آمد. به این ترتیب میزان تولید آنزیم α-آمیلاز توسط باکتری *B. alkalitelluris* تحت شرایط بهینه‌شده به میزان ۱۱۴/۲ درصد افزایش نشان می‌دهد.

بحث

آنزیم‌های α-آمیلاز به دلیل توانایی در هیدرولیز نشاسته، دارای پتانسیل بالایی برای استفاده در صنایعی مانند تولید غذا، شوینده، داروها، چرم، پارچه، آرایشی و کاغذ می‌باشند. با توجه به چنین زمینه گسترده از کاربردهای بیوتکنولوژیک و صنعتی آنزیم α-آمیلاز، به آنزیم‌های با ویژگی‌های منطبق با زمینه‌های کاربردی مورد نظر نیاز است. به همین دلیل، محققین بطور پیوسته در حال بررسی روش‌های تولید آنزیم‌هایی با خصوصیات سینتیکی و یا عملکردی مختلف می‌باشند. رویکردهای مختلفی از شناسایی و کشف گونه‌های جدید مولد آنزیم تا استفاده از تکنیک‌های مهندسی پروتئین برای دستیابی به این هدف مورد استفاده قرارگرفته‌اند.

در میان باکتری ها، گونه‌هایی که در مناطق حاد از نظر دما، pH، فشار و غلظت نمک حضور دارند به دلیل دارابودن ویژگیهایی که این میکروارگانیسم‌ها را با شرایط مورد نظر سازگار نموده است توانسته‌اند نظر محققین را به خود جلب نمایند. علاوه بر زمینه‌های پژوهشی بسیار گسترده در مطالعه این میکروارگانیسم‌ها، 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 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 (۷). *B. alkalitelluris* یک گونه مقاوم به قلیا است که انتظار می‌رود پروتئین‌های تولیدشده توسط این باکتری از جمله α-آمیلاز نیز قابلیت مقاومت نسبت به pH قلیایی داشته باشند (۸).

یکی از مهمترین مراحل در بررسی خصوصیات آنزیمی، تولید انبوه آنزیم مورد نظر است تا در ادامه بتوان به منظور تخلیص و تعیین ویژگی‌های آنزیم از آن استفاده نمود. در این مرحله رویکردهای مختلفی از بهینه‌سازی شرایط تولید تا کلون‌سازی ژن مربوطه در میزبان مناسب مورد استفاده قرارمی‌گیرند. در شرایطی که توالی ژن مورد نظر در دسترس نباشد، بهترین رویکرد استفاده از تکنیک‌های بهینه‌سازی شرایط تولید محسوب می‌شود. از آنجا که ژن آنزیم α-آمیلاز در باکتری *B.*

alkalitelluris هنوز شناسایی نشده است در این مطالعه سعی شده است تا با بهینه‌سازی شرایط تولید دستیابی به مقادیر بیشتری از این آنزیم جهت مطالعات بعدی فراهم شود.

رویکردهای مختلفی در زمینه بهینه‌سازی شرایط تولید مورد استفاده قرارمی‌گیرند. اولین قدم در فرایند بهینه‌سازی تولید، شناخت پارامترهای موثر در دستیابی به پاسخ مورد نظر است. امروزه از روش پلاکت—برمن[4] بجای روش‌های وقت‌گیر و هزینه‌بر یک متغییر در یک زمان[5] برای شناسایی پارامترهای موثر در فرایند مورد نظر از میان انبوه پارامترهای موجود استفاده می‌شود. در مطالعه‌ای که توسط عزیزی و همکاران انجام‌شد، پارامترهای متعدد تغذیه‌ای و رشد *B. alkalitelluris* مورد بررسی قرارگرفته و تنها فاکتور pH به عنوان فاکتور موثر در تولید α-آمیلاز گزارش شد (۷). با توجه به اهمیت فاکتور دما در فرایندهای تولید، در این مطالعه سعی شده است تا بهینه‌سازی شرایط با در نظر گرفتن هر دو فاکتور دما و pH انجام شود.

در گذشته روش‌های تک متغیره برای تعیین شرایط بهینه مورد استفاده قرار می‌گرفت. اما از آنجا که در این روش اثر همزمان فاکتورهای مورد بررسی در نظر گرفته نمی‌شود بنابراین از دقت کافی در پیشگویی شرایط بهینه برخوردار نیستند. به همین دلیل، امروزه از روش سطح پاسخ که در آن علاوه بر اثر هر فاکتور، تاثیر همزمان فاکتورها نیز در مورد بررسی قرارمی‌گیرد بطور گسترده ای برای بهینه‌سازی شرایط تولید استفاده می‌شود. در این مطالعه نیز از روش سطح پاسخ برای بهینه‌سازی تولید α-آمیلاز توسط *B. alkalitelluris* استفاده شده است. با استفاده از این روش بهترین شرایط برای تولید α-آمیلاز با در نظر گرفتن دو فاکتور دما و pH به ترتیب ۳۸ °C و ۸/۵ پیشنهادشد. میزان تولید آنزیم α-آمیلاز تحت شرایط بهینه میزان ۱۱۴/۲ درصد نسبت به شرایط عدم بهینه افزایش نشان داد. در سایر مطالعات نیز اثر این فاکتورها در تولید α-آمیلاز مورد ارزیابی و بهینه-سازی قرارگرفته است. در مطالعه‌ای که توسط باکری و همکاران در ارتباط با بهینه‌سازی تولید α-آمیلاز توسط گونه باسیلوس انجام شد، بهترین شرایط دما و pH به ترتیب ۳۷ °C و ۶-۴ بدست آمد (۹). در مطالعه دیگر که توسط پائول و همکاران انجام شد این شرایط ب ترتیب ۳۷ °C و ۶ گزارش شد (۱۰). در مطالعه دیگر که توسط آنوپاما و جایارامان انجام شد دمای بهینه C ۳۷ و شرایط pH ۸ به عنوان شرایط بهینه پیشنهاد ش (۱۱). در مطالعات متعددی استفاده از روش سطح پاس برای بهینه‌سازی شرایط تولید آنزیم‌ها مورد استفاد قرارگرفته است. در مطالعه‌ای که در زمینه بهینه‌ساز تولید α-آمیلاز توسط *B. amyloliquefaciens* صور گرفت، میزان تولید این آنزیم پس از بهینه‌سازی پارامتر مورد نظر به میزان ۳ برابر افزایش یافت (۱۲). د مطالعه مشابه دیگری تولید آنزیم α-آمیلاز توسط *amyloliquefaciens* KCP2 با در نظر گرفتن ۳ پارام نشاسته، آمونیوم‌سولفات و کلریدکلسیم و با استفاده روش سطح پاسخ به میزان قابل توجهی افزایش داش (۱۳). در مطالعه دیگری با بهینه‌سازی ۴ پارامتر نشاست عصاره مخمر، کلریدسدیم و دما با استفاده از روش سط پاسخ، میزان تولید α-آمیلاز توسط *B. subtilis* 168 میزان ۳ برابر افزایش نشان داد (۱۴). رائو و همکاران روش سطح پاسخ برای بهینه‌سازی تولید α-آمیلاز بسی مقاوم به حرارت توسط *eobacillus thermoleovorans* استفاده کردند و ۷۰ درصد افزایش در میزان تولید α-آمیلاز تحت شرایط بهینه پارامترهای مورد نظر کشت را گزارش نمودند (۱۵ علاوه بر آنزیم α-آمیلاز، از روش سطح پاسخ برای بهینه سازی تولید آنزیم‌های دیگر مانند لیپاز و پروتئاز نی استفاده شده و در تمامی موارد گزارش شده میزان تولی محصول مورد نظر افزایش قابل توجهی را تحت شرای بهینه نشان می‌دهد (۱۶-۲۰). با توجه به نتایج بدس آمده از این مطالعه و سایر مطالعات مشابه استفاده روش سطح پاسخ می‌تواند به عنوان تکنیکی قدرتمند د بهینه‌سازی پارامترهای موثر در تولید محصولات زیست مورد استفاده قرارگیرد. علاوه براین، با استفاده از شرای بهینه بدست آمده در این مطالعه می‌توان تولید تول آنزیم α-آمیلاز توسط را تنها با تغییر در این دو پارام و بدون دخالت در سایر پارامترهای رشد باکتری به میزا قابل توجهی افزایش داد

[4]Placket-Burman

One parameter at a time

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 هنرمندجهرمی مدیر گروه میکروبیولوژی در انجام این پایان‌نامه کمال تشکر و قدردانی را داریم

منابع مورد استفاده

1. Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., Chauhan, B., 2003. Microbial α-amylases: a biotechnological perspective. Process Biochemistry 38(11): 1599-616.
2. Kandra, L., 2003. α-Amylases of medical and industrial importance. Journal of Molecular Structure THEOCHEM 666: 487-98.
3. Tangphatsornruang, S., Naconsie, M., Thammarongtham, C., Narangajavana, J., 2005. Isolation and characterization of an α-amylase gene in cassava (Manihot esculenta). Plant Physiology and Biochemistry 43(9): 821-7.
4. Satyanarayana, T., Rao, J. U. M., Ezhilvannan, M., 2006. O-amylases 10, Enzyme Technology: 189.
5. Henrissat, B., 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. Biochemical Journal 280(2): 309-16.
6. 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.
7. Azizi, H., Ebrahimi, M., Noorbakhsh, F., 2015. pH acts as an inducer in production of α-amylase by Bacillus alkalitelluris. Iranian Journal of Biological Sciences 11(3): 39-47.
8. 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.
9. Bakri, Y., Ammouneh, H., El-Khouri, S., Harba, M., Thonart, P., 2012. Isolation and identification of a new Bacillus strain for amylase production. Research in Biotechnology 3(6): 11-18.
10. Paul, J. S., Lall, B. M., Jadhav, S. K., Tiwari, K. L., 2017. Parameter's optimization and kinetics study of α-amylase enzyme of Bacillus sp. MB6 isolated from vegetable waste. Process Biochemistry 52: 123-9.
11. Anupama, A., Jayaraman, G., 2011. Detergent stable, halotolerant α-amylase from bacillus aquimaris vitp4 exhibits reversible unfolding. Int J Applied Biol Pharmaceut Tech 2: 366-376.
12. Zhao, W., Zheng, J., Wang, Y. G., Zhou, H. B., 2011. A marked enhancement in production of amylase by Bacillus amyloliquefaciens in flask fermentation using statistical methods. Journal of Central South University of Technology 18(4): 1054-62.
13. Prajapati, V. S., Trivedi, U. B., Patel, K. C., 2014. A statistical approach for the production of thermostable and alklophilic alpha-amylase from Bacillus amyloliquefaciens KCP2 under solid-state fermentation. Biotech 5(2): 211–220.
14. Sumrin, A., 2011. Purification and medium optimization of α-amylase from Bacillus subtilis 168. African Journal of Biotechnology 10(11): 2119-29.
15. Uma Maheswar Rao, J. L., Satyanarayana, T., 2003. Statistical optimization of a high maltose-forming, hyperthermostable and Ca2+-independent alpha-amylase production by an extreme thermophile Geobacillus thermoleovorans using response surface methodology. Journal of Applied Microbiology 95(4): 712-8.
16. Kishan, G., Gopalakannan, P., Muthukumaran, C., Thirumalai Muthukumaresan, K., Dharmendira Kumar, M., Tamilarasan, K., 2013. Statistical optimization of critical medium components for lipase production from Yarrowia lipolytica (MTCC 35). Journal of Genetic Engineering and Biotechnology 11(2): 111-6.
17. Queiroga, A. C., Pintado, M. E., Malcata, F. X., 2012. Use of response surface methodology to optimize protease synthesis by a novel strain of Bacillus sp. isolated from Portuguese sheep wool. J Appl Microbiol 113(1): 36-43.
18. Rao Ch, S., Sathish, T., Mahalaxmi, M., Laxmi, G. S., Rao, R. S., Prakasham, R. S., 2008. Modelling and optimization of fermentation factors for enhancement of alkaline protease production by isolated Bacillus circulans using feed-forward neural network and genetic algorithm. J Appl Microbiol 104(3): 889-98.

19. Sharma, D., Kumbhar, B. K., Verma, A. K., Tewari, L., 2014. Optimization of critical growth parameters for enhancing extracellular lipase production by alkalophilic Bacillus sp. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 3(4): 205-11.

20. Vadlamani, S., Badhe, R. R., Parcha, S. R., 2013. Statistical optimization of alkaline protease production from newly isolated Pseudomonas species MTCC 16017. Malaysian Journal of Microbiology 9(4): 295-300.