

## خالص سازی و بررسی برخی خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم آلفا آمیلاز مقاوم به حرارت باکتری *Bacillus cereus*

آزاده طاعتی<sup>۱</sup>، امین میرشمسی کاخکی<sup>۲\*</sup>، احمد آسوده<sup>۳</sup>، سعید ملک زاده شفارودی<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup>دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران.  
<sup>۲</sup>استادیار گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران.  
<sup>۳</sup>استاد گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران.  
<sup>۴</sup>دانشیار گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۱۱، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۴/۲۲

### چکیده

اهمیت اقتصادی قابل توجه و طیف وسیع کاربرد آمیلازهای مقاوم به حرارت در صنایع، نیاز برای تولید آمیلازها با خصوصیات مطلوب صنعتی را بطور چشمگیری افزایش داده است. فلور باکتریایی چشمه‌های آبگرم به واسطه تحمل بالا به حرارت و پایداری در pHهای متفاوت می‌توانند به عنوان منابع جدیدی برای تولید  $\alpha$ -آمیلاز مورد استفاده قرار گیرند. در این پژوهش چشمه آبگرم هیبرترمال قینرجه برای شناسایی فلور باکتریایی آبگرم به لحاظ میزان تولید  $\alpha$ -آمیلاز مورد بررسی قرار گرفت. کلون‌های باکتریایی احتمالی تولید کننده آمیلاز براساس ویژگی‌های بیوشیمیایی و همچنین روش‌های مولکولی شناسایی شدند. در مرحله بعد شرایط رشد باکتری ایزوله شده و تولید آنزیم آمیلاز نیز مورد بهینه سازی قرار گرفت و در نهایت بعد از تخلیص آنزیم از کلون‌های باکتریایی شناسایی شده خصوصیات بیوشیمیایی  $\alpha$ -آمیلاز از لحاظ کاربرد در صنعت بررسی گردید. نتایج این تحقیق نشان داد که کلون باکتری جدا شده از جنس *Bacillus* بوده و به لحاظ خصوصیت یک آنزیم آمیلاز مقاوم به حرارت و غیر وابسته به یون کلسیم می باشد. بطوری که آنزیم آمیلاز تخلیص شده در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد و  $\text{pH} \sim 8$  حداکثر فعالیت خود را نشان داده و در محدوده دمایی ۵۰-۷۰ درجه سانتیگراد ۸۰٪ از فعالیت هیدرولیزی خود را حفظ می‌کند. همچنین نتایج نشان داد که آنزیم در طیف وسیعی از pH قلیایی و اسیدی (۳-۱۰/۵) فعال و پایدار می‌باشد. بطور کلی براساس نتایج حاصل، این سویه باکتری می‌تواند منبع مناسبی جهت تولید آنزیم آمیلاز متحمل به حرارت با پایداری عملکردی بالا جهت کاربرد در صنعت باشد.

**واژه کلیدی:** آمیلاز، چشمه آب گرم، مقاوم به حرارت، یون کلسیم.

Borchert, 2000; Van der Maarel *et al.*, (2002; Janecek, 2009; Souza *et al.*, 2010).  
 $\alpha$ -آمیلاز (EC 3.2.1.1) شناخته شده‌ترین اندوآمیلاز است و سبب کاهش سریع ویسکوزیته محلول نشاسته می‌شود (Horváthová *et al.*, 2000). این آنزیم هیدرولیز پیوندهای داخلی  $\alpha$ -۴-O-گلیکوزیدی در پلی ساکاریدها با حفظ ساختار  $\alpha$ -آنومریک در محصولات را کاتالیز می‌کند (Mollania *et al.*, 2010; Janecek *et al.*, 2014). اکثر  $\alpha$ -آمیلازهای شناخته شده دارای یون کلسیم حفاظت شده هستند، که برای داشتن یک آنزیم پایدار و فعال ضروری شناخته می‌شود. گزارش شده است که یون کلسیم سبب افزایش فعالیت و پایداری حرارتی آنزیم و ایجاد یک ساختار فشرده می‌شود (Janecek *et al.*, 2000; Nielsen & Borchert, 2000; Sivaramakrishnan *et al.*, 2006).  
 گسترده‌ترین کاربرد  $\alpha$ -آمیلاز در صنایع نشاسته برای هیدرولیز نشاسته در فرآیند مایع سازی نشاسته به شربت‌های فروکتوز و گلوکز می‌باشد. در اکثر مراحل فرآوری نشاسته دمای بسیار بالا (بیش از ۹۰ درجه سانتیگراد) مورد نیاز است (Kikani & Singh, 2011). اگرچه باکتری‌های متعلق به جنس *Bacillus* برای تولید تجاری آمیلاز مقاوم به حرارت با نیم عمر و پایداری عملکردی بالا مورد استفاده قرار می‌گیرند (Bertoldo & Antranikian, 2002; Rasooli, 2008). اما، در مرحله هیدرولیز آنزیمی

امروزه آنزیم‌ها کاربرد بسیاری در صنایع غذایی، شوینده‌ها، کاغذ سازی، نساجی و حذف آلاینده‌های شیمیایی و نفتی دارند (Hmidet *et al.*, 2008; Suman & Ramesh, 2010; Asoodeh *et al.*, 2013). از میان آنزیم‌های صنعتی، آنزیم‌های آمیلولیتیک، گروه بزرگی از هیدرولازهای نشاسته و آنزیم‌های خویشاوند را تشکیل می‌دهند. این آنزیم‌ها روی نشاسته، پولولان، گلیکوژن و دیگر الیگو و پلی ساکاریدهای مربوطه فعال اند و تقریباً ۳۰٪ از بازار تجاری آنزیم‌ها را به خود اختصاص داده اند (Pandey *et al.*, 2000; Janecek, 2009; Kikani & Singh, 2011).

$\alpha$ -آمیلازها شناخته شده‌ترین آنزیم‌های آمیلولیتیک و متعلق به خانواده ۱۳ (GH13) گلیکوزید هیدرولازها هستند (Sivaramakrishnan *et al.*, 2006; Janecek *et al.*, 2014). اعضای خانواده  $\alpha$ -آمیلازها پروتئین‌های چند قلمرو<sup>۱</sup> هستند. قلمرو A حاوی قلمرو کاتالیتیکی اصلی در فرم بشکه  $(\beta/\alpha)_8$  است و به قلمرو B ختم می‌شود. قلمرو B، دومین کوچکی است در برگزیده لوپ سوم در محل اتصال رشته  $\beta_3$  به هلیکس  $\alpha_3$  است. قلمرو C، دومین ساندویچ- $\beta$  را شامل می‌شود. تیپ بشکه‌ای  $\alpha$ -آمیلاز در تمام اعضا خانواده  $\alpha$ -آمیلاز تایید شد که ساختار سه بعدی آنها در حال حاضر مشخص شده است (Nielsen &

<sup>1</sup>Domain

شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. سپس کلون‌های باکتریایی جهت سنجش فعالیت  $\alpha$ -آمیلازی در محیط کشت نشاسته آگار حاوی LB آگار به همراه یک درصد نشاسته (۱٪ w/v) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت کشت شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، بر روی محیط کشت محلول لوگول (معرف نشاسته) ریخته شد. سپس براساس قطر هاله سفید رنگ که نشان‌دهنده هیدرولیز شدن نشاسته و تولید آنزیم توسط کلون است، کلون‌ها جداسازی و انتخاب شدند

#### شناسایی مولکولی باکتری و آنالیز فیلوژنیک

در ابتدا شناسایی باکتری تولید کننده آمیلاز با استفاده دستورالعمل برگگی به روش بیوشیمیایی انجام گرفت (Bergey & Holet, 1996). سپس جهت تایید شناسایی باکتری توالی ژن رمزکننده *16S rDNA* مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. ژن *16S rDNA* باکتری تولید کننده آمیلاز توسط آغازگرهای عمومی 5'-AGTTTGATCCTGGCTCAG-3':8F و 5'-GGTTACCTTACGACGACTT-:1492R تکثیر شد (Asoodeh et al., 2010). جهت آنالیز روابط فیلوژنی، توالی مورد نظر در بانک ژن NCBI مورد جستجو و آنالیز BLAST قرار گرفت. در انتها، با استفاده از نرم افزار MEGA 5 و الگوریتم UPGMA درخت فیلوژنی ترسیم شد.

نشاسته که بلافاصله بعد از ژلاتینه شدن صورت می‌گیرد، pH دوغاب نشاسته در حدود ۴/۵ است؛ درحالیکه pH بهینه بسیاری از  $\alpha$ -آمیلازهای صنعتی تقریباً ۶-۷ است و در pHهای اسیدی ناپایدارند (Hassan et al., 2011; Asoodeh et al., 2013). در سال‌های اخیر، تلاش جهت یافتن  $\alpha$ -آمیلازهای مقاوم به حرارت و فعال در pH پایین که امتیازاتی برای افزایش کارایی فرآوری نشاسته است، انجام گرفته است (Kaneko et al., 2005; Sajadi et al., 2005; Hmidet et al., 2008; Mollania et al., 2010; Bai et al., 2012; Asoodeh et al., 2013).

در تحقیق حاضر، خالص سازی و بررسی خصوصیات بیوشیمیایی  $\alpha$ -آمیلاز متعلق به *Bacillus sp.* جدا شده از چشمه آبگرم قینرجه با هدف شناسایی آنزیم  $\alpha$ -آمیلاز با خصوصیات مطلوب مورد مطالعه قرار گرفته است.

#### مواد و روش‌ها

نمونه‌های آب از چشمه آبگرم قینرجه واقع در استان اردبیل در ۱۵ کیلومتری جنوب غربی شهرستان مشکین شهر و در ارتفاع ۱۲۴۰ متری دامنه شمالی سبلان (۳۸°۱۷' عرض شمالی و ۱۴°۴۷' طول شرقی)، جمع آوری شد. نمونه‌ها در محیط کشت LB<sup>۲</sup> آگار حاوی ۰/۱٪ (w/v) تریپتون یا پپتون، ۰/۵٪ (w/v) NaCl و ۰/۵٪ (w/v) عصاره مخمر و ۰/۱٪ (w/v) آگار کشت

<sup>2</sup> Luria broth

### بهینه‌سازی شرایط تولید آنزیم توسط باکتری

جهت تعیین دمای بهینه برای رشد باکتری و تولید آنزیم سه دمای ۳۷، ۴۲ و ۵۰ درجه سانتیگراد و همچنین، برای انتخاب محیط کشت بهینه چهار محیط کشت مختلف شامل: (M1) LB مایع، نشاسته ۱٪ (w/v)؛ (M2) LB مایع، نشاسته ۱٪ (w/v)، پپتون ۱٪ (w/v)، فروکتوز ۱٪ (w/v)؛ (M3) نشاسته ۱٪ (w/v)، پپتون ۱٪ (w/v)؛ (M4) مالتوز ۱٪ (w/v)؛ (M5) پپتون ۱٪ (w/v)، مالتوز ۱٪ (w/v)؛ (M6) مالتوز ۱٪ (w/v)، پپتون ۱٪ (w/v)؛ (M7) مالتوز ۱٪ (w/v)، پپتون ۱٪ (w/v)؛ (M8) مالتوز ۱٪ (w/v)، پپتون ۱٪ (w/v)؛ (M9) مالتوز ۱٪ (w/v)، پپتون ۱٪ (w/v)، فروکتوز ۱٪ (w/v)؛ (M10) مالتوز ۱٪ (w/v)، پپتون ۱٪ (w/v)، فروکتوز ۱٪ (w/v)؛ (M11) مالتوز ۱٪ (w/v)، پپتون ۱٪ (w/v)، فروکتوز ۱٪ (w/v)، عصاره مخمر ۱ (w/v) مورد ارزیابی قرار گرفتند. به منظور بررسی شرایط بهینه رشد در دوره‌های زمانی هر ۴ ساعت به مدت ۸۴ ساعت از محیط کشت حاوی باکتری نمونه‌گیری انجام قرائت OD در طول موج ۶۰۰ نانومتر انجام گرفت. برای تعیین دما و محیط کشت بهینه برای تولید آنزیم، ابتدا نمونه به مدت ۱۵ دقیقه با دور rpm ۱۲۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد و روش‌ناور جهت سنجش فعالیت آنزیم مورد بررسی قرار گرفت (Aiyer et al. 2004; Vahidi et al., 2005).

### خالص‌سازی آنزیم

برای این منظور، سولفات آمونیوم (۸۵٪) به عصاره آنزیم خام افزوده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگه‌داری شد. رسوب حاصل از غلظت اشباع ۸۵ درصدی سولفات آمونیوم در کمترین مقدار بافر Tris-HCl

۲۰ میلی مولار با  $\text{pH} \sim 7.4$  (بین ۲ تا ۴ میلی لیتر) حل و درون کیسه الترافیلتراسیون با توانایی نگهداری ۱۲ کیلودالتون دیالیز گردید (Asoodeh et al., 2013). محلول دیالیز شده از ستون کروماتوگرافی تبادل یونی، از نوع Q-sepharose (۵×۲ سانتی متر) که یک تبادل کننده قوی آنیونی است، عبور داده شد. سپس این ستون با بافر Tris-HCl ۲۰ میلی مولار با  $\text{pH} \sim 7.4$  به pH مورد نظر رسید. پس از بارگیری نمونه، ستون با بافر Tris-HCl ۲۰ میلی مولار با غلظت‌های ۰/۰-۸/۱ مولار NaCl شست شو داده شد. تمامی فرکشن‌های خروجی ستون جمع‌آوری شد و OD<sub>280</sub> آنها برای بررسی فعالیت حضور پروتئین خوانده شد. همچنین در نهایت این فرکشن‌ها از لحاظ وجود آنزیم ارزیابی شدند (Asoodeh et al., 2010, 2013).

### سنجش فعالیت و غلظت آنزیم

جهت سنجش فعالیت آنزیم، در هر مرحله از روند خالص‌سازی از روش Bernfeld (1955) تغییر یافته توسط Sigma-Aldrich™ استفاده شد. برای سنجش میزان فعالیت آنزیم در هر مرحله، آنزیم تخلیص شده به بافر فسفات با  $\text{pH} \sim 6.5$  حاوی نشاسته محلول ۱٪ اضافه شد. در ادامه فعالیت آنزیم با روش DNS<sup>۳</sup> سنجیده شد که مبتنی بر غلظت قند احیاء شده است. همچنین به منظور اطلاع از غلظت پروتئین در هر

<sup>3</sup> 3,5-dinitrosalicylic acid

میلی لیتر آب دیونیزه، یک گرم کوماسی بلو R- 250 رنگ آمیزی شد. زایموگرام طبق دستور العمل تغییر یافته لیم و همکاران (2003) انجام گرفت. جهت زایموگرام ژل جداکننده ۱۲ درصد به همراه یک درصد نشاسته تهیه شد (Asoodeh *et al.*, 2013). پس از پایان الکتروفورز، برای حذف اثر SDS، ژل در بافر رناتوراسیون (شامل بافر 20 Tris-HCl میلی مولار با pH~۴/۷ و محلول ترایتون X-100 ۲/۵ درصد) قرار گرفت. در انتها ژل برای رنگ آمیزی ژل در محلول لوگول قرار داده شد.

#### بررسی اثر دما و pH بر فعالیت و پایداری آنزیم آمیلاز

برای بررسی اثر pH های مختلف بر فعالیت آنزیم محدوده pH های ۱۰-۳ انتخاب شدند. برای این کار سه سیستم بافری زیر آماده شد: بافر استات سدیم ۵۰ میلی مولار (pH تقریبی ۵-۳)، بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (pH تقریبی ۷/۵-۵/۵)، بافر Tris-HCl 50 میلی مولار (pH تقریبی ۸-۱۰). برای اندازه گیری پایداری pH آنزیم با بافرهای فوق که حاوی یک درصد نشاسته در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. برای بررسی اثر دما، فعالیت آنزیم در محدوده دمایی ۳۰-۹۵ درجه سانتیگراد در فواصل دمایی ۵ درجه در pH اپتیم آنزیم انجام گرفت. حداکثر فعالیت آنزیم به عنوان ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد و بر اساس آن درصد فعالیت

مرحله از روند خالص سازی، از روش تغییر یافته برادفورد استفاده شد (Bradford, 1976) و سپس با استفاده از غلظت های مختلف سرم آلبومین گاوی (BSA) (غلظت های بین ۱-۰/۰۳) نمودار استاندارد رسم گردید.

#### الکتروفورز SDS-PAGE

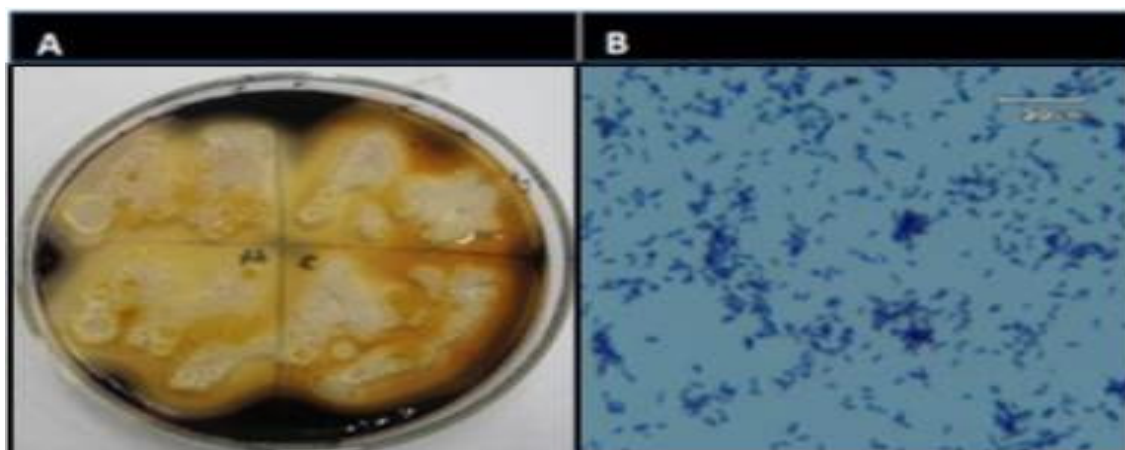
به منظور بررسی میزان پروتئین های حذف شده یا رسوب کرده در طی مراحل خالص سازی آنزیم، اطمینان از خالص سازی کامل نمونه در کروماتوگرافی و تعیین وزن مولکولی نمونه آنزیم تخلیص شده، از روش الکتروفورز پلی آکرلیل آمید-سدیم دودسیل سولفات<sup>۴</sup> استفاده شد. بافرهای الکتروفورز SDS-PAGE بر طبق سیستم بافر لائملی (Laemmli, 1970) اجرا شد. در این تحقیق از ژل جداکننده ۱۲ درصد و ژل متراکم کننده ۲ درصد استفاده شد. سپس فراکشن های حاوی آنزیم به نسبت ۴:۱ با بافر نمونه حاوی: ۳/۹ میلی لیتر آب مقطر دیونیزه، ۱/۰ میلی لیتر Tris base ۰/۵ مولار با pH~۶/۸، ۰/۸ میلی لیتر گلیسرول، ۱/۶ میلی لیتر SDS ۱۰ درصد، ۰/۴ میلی لیتر ۲-مرکاپتواتانول و ۰/۴ میلی لیتر برموفنل بلو یک درصد مخلوط گردید. این مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد حرارت داده شد و سپس بر روی ژل بارگذاری شد. ژل با محلول حاوی ۴۰۰ میلی لیتر متانول، ۱۰۰ میلی لیتر اسید استیک، ۵۰۰

<sup>4</sup>SDS -Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS- PAGE)

### نتایج و بحث

نتایج آنالیز بیوشیمیایی و بررسی میکروسکوپی نشان داد که باکتری مورد نظر گرم مثبت به فرم باسیل (میله‌ای شکل) بوده و فعالیت آمیلازی قابل توجهی دارا می‌باشد و با توجه به این اصل که اکثر باکتری‌های باسیلوس گرم مثبت بوده و به لحاظ مورفولوژی میله‌ای شکل و استوانه‌ای شکل می‌باشند، احتمالاً باکتری مورد نظر نیز از گونه‌های جنس باسیلوس است (شکل ۱). همچنین نتایج نشان داد که توالی ۱۰۲۱ جفت بازی تکثیر شده مربوط به ناحیه *16S rDNA* با قطعات این ژن از منابع باکتریایی مختلف همولوژی دارد. با توجه به همولوژی ۹۸ درصدی توالی *16S rDNA* بدست آمده با توالی های مربوط به گونه *Bacillus cereus* باکتری مورد نظر نیز به این گونه تعلق دارد (شکل ۲).

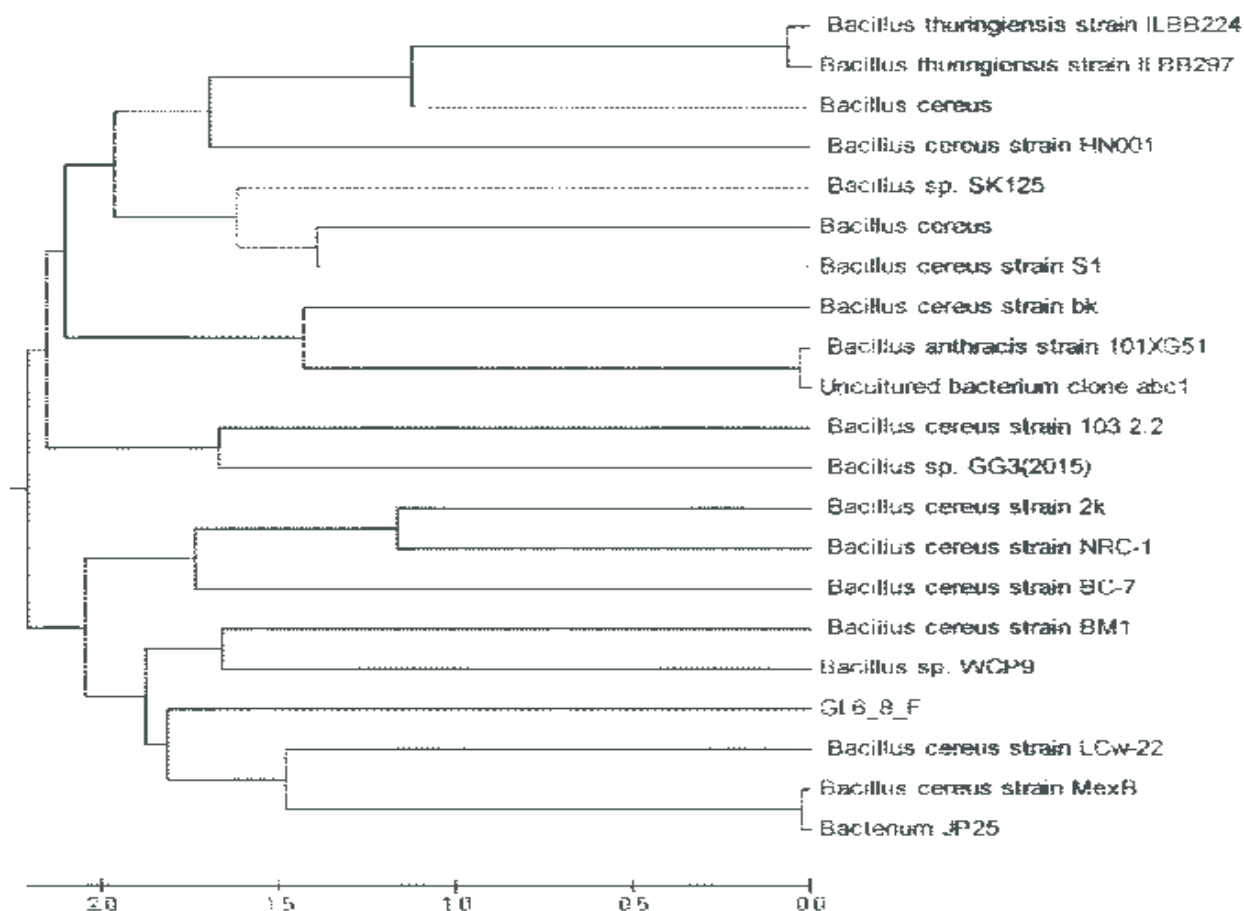
آنزیم در دماهای متفاوت اندازه‌گیری شد. جهت بررسی پایداری دمایی آنزیم محدوده دمایی فوق در نظر گرفته شد. آنزیم به مدت ۴۵ دقیقه درون بن ماری در pH اپتیمم قرار گرفت. وابستگی و عدم وابستگی به یون کلسیم به منظور بررسی وابستگی و عدم وابستگی فعالیت آنزیم به یون کلسیم، تست پایداری آنزیم در حضور غلظت ۵ میلی مولار از یون کلسیم ( $\text{CaCl}_2$ ) انجام شد. برای این منظور آنزیم خالص شده در سیستم بافری مشابه با غلظت ۵ میلی مولار از یون کلسیم ( $\text{CaCl}_2$ ) دیالیز شد و سپس روند سنجش مشابه مرحله قبل بدون یون کلسیم انجام و نتیجه برای وابستگی یا عدم وابستگی به یون کلسیم بررسی شد (Asoodeh et al., 2013).



شکل ۱- (A) بررسی قابلیت تولید آنزیم آمیلاز کلنی باکتریایی جدا شده روی محیط کشت LB آگار حاوی به یک درصد نشاسته (w/v) و محلول لوگول در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد بعد از ۲۴ ساعت؛ (B) تصویر میکروسکوپی باکتری باسیلوس گرم مثبت جدا سازی شده با مورفولوژی میله‌ای شکل.

**Figure 1:**(A) Screening of bacterial isolate for capability of amylase production was done by starch hydrolysis plate assay method on agar medium with 1% (w/v) starch and lugol's solution at 37°C after 24-h incubation; (B) Microscopic image of gram-positive, rod shaped *Bacillus* bacterium.





شکل ۲- درخت فیلوژنی و مقایسه همولوژی توالی ۱۰۲۱ جفت بازی *16S rDNA* باکتری جدا شده با سایر توالی های ثبت شده در پایگاه NCBI. درخت فیلوژنی رسم شده با استفاده از الگوریتم UPGMA و نرم افزار MEGA5. درخت رسم گردیده است. علامت پیکان موجود در شکل توالی مورد بررسی را نشان می دهد.

**Figure 2-** Phylogenetic tree showing the relationship of *16S rDNA* sequences cloned sample (Red arrow) compared with previously described bacterium species *16S rDNA* sequences deposited in databases using UPGMA algorithm and MEGA5 software.

بهینه سازی شرایط رشد باکتری

مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۳). در مطالعات جداگانه، نتایج مشابهی در مورد باکتری *Bacillus sp.* *Bacillus Ferdowsicus* جدا شده از چشمه آبگرم فردوس و باکتری *Bacillus sp. DR90* جدا شده از چشمه آبگرم دیگ رستم بدست آمد،

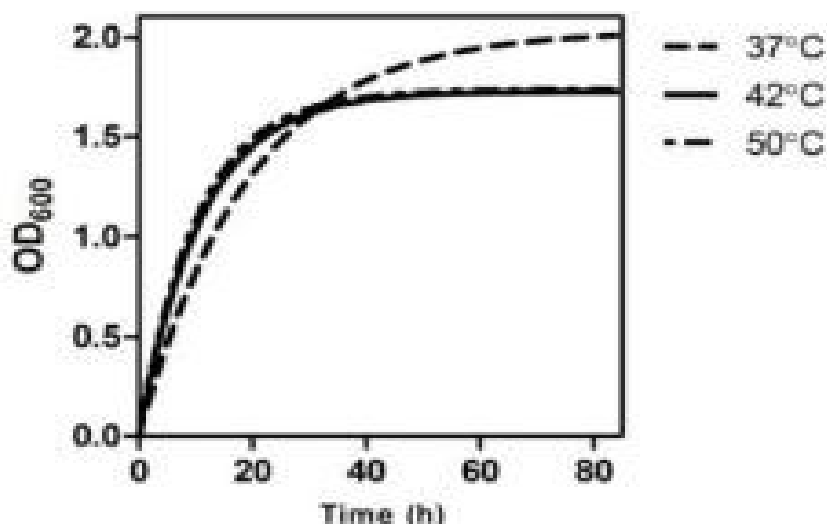
نتایج بررسی اثر دما نشان داده است که باکتری در هر سه دما رشد مطلوبی دارد ولی دمای ۴۲ درجه سانتیگراد به علت میزان و سرعت اولیه رشد بیشتر نسبت به دمای ۳۷ درجه و عدم اختلاف معنی دار با دمای ۵۰ درجه سانتی گراد،

### تخلیص آنزیم

به منظور بررسی خصوصیات بیوشیمیایی، تخلیص آنزیم با استفاده کروماتوگرافی انجام شد. نتایج حاصل نشان داد نمونه آنزیمی بدست آمده از ستون کروماتوگرافی نسبت به عصاره خام حاوی آنزیم در طی اجرای مراحل خالص سازی تقریباً ۳۳ برابر خالص تر شده، و آنزیم ۴۷/۱۵٪ از فعالیت خود را طی مراحل خالص سازی حفظ کرده است (جدول ۱). نتایج الکتروفورز-SDS PAGE آنزیم تخلیص شده تک باند با وزن مولکولی ۶۸/۳۵ کیلو دالتون را مشخص نمود (شکل ۵A). همچنین زایموگرام در Native-PAGE 12٪ درستی باند انتخاب شده به عنوان باند حاوی آنزیم را مورد تایید قرار داد (شکل ۵B). آنزیم‌های مشابه‌ای در سایر باکتری‌ها طی مراحل خالص سازی به میزان متفاوتی نسبت به عصاره خام آنزیم خالص شدند. آنزیم آلفا-آمیلاز *Geobacillus sp. LH8* ۱۳/۶ برابر با عملکرد ۱۰٪ (Mollania et al., 2010)، آنزیم آلفا-آمیلاز *Bacillus amyloliquifaciens TSWK1-1* ۱۳/۳ برابر با عملکرد ۴۵/۷۱٪ (Kikani & Singh, 2012)، آنزیم آلفا-آمیلاز *Bacillus sp. Ferdowsicous* ۲۳ برابر با عملکرد ۶۱٪ (Asoodeh et al., 2010)، آنزیم آمیلاز باکتری *Bacillus sp. DR90* با عملکرد ۴/۲٪ (Asoodeh et al., 2013) خالص سازی شدند.

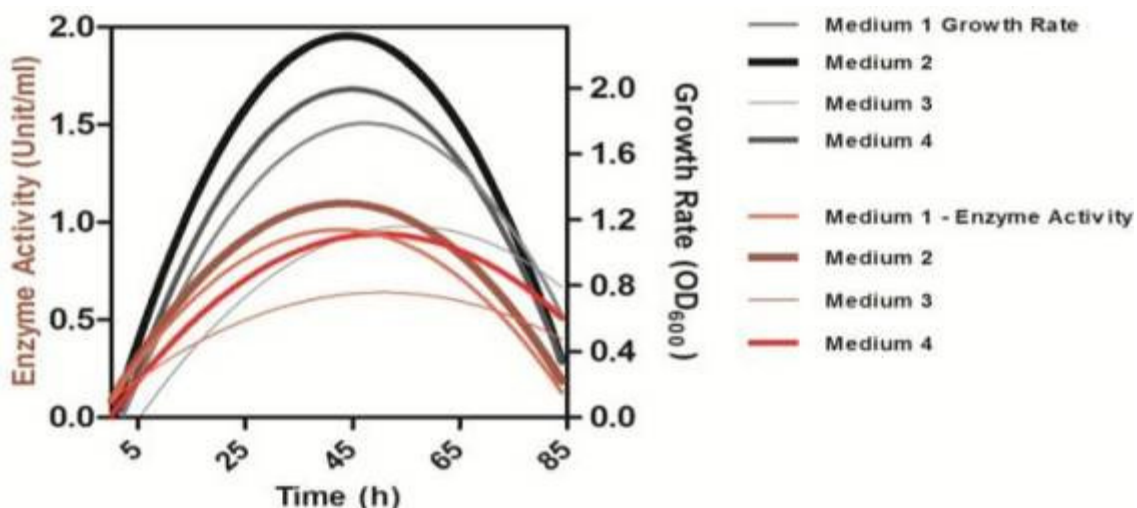
بطوریکه باکتری‌های جنس باسیلوس مورد مطالعه بیشترین سرعت رشد را در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد نشان دادند (Asoodeh et al., 2010, 2013). با این حال در مطالعه دیگر دمای اپتیمم رشد برای باکتری *B. subtilis DR8806* ۶۰ درجه سانتی گراد گزارش شده است (Asoodeh & Lagzian, 2012). همچنین نحوه رشد باکتری و میزان تولید آنزیم مورد بررسی در محیط کشت نشان داد که محیط کشت حاوی LB، نشاسته یک درصد، پپتون یک درصد و فروکتوز یک درصد، محیط کشت مناسب تری برای تولید آنزیم است. در این محیط کشت زمان فاز سکون به طور نسبی در مقایسه با سایر محیط‌های کشت، کاهش داشته است و سرعت رشد باکتری افزایش یافت. همچنین واحد فعالیت آنزیم یا در واقع میزان تولید آنزیم در این محیط کشت نسبت به سایر محیط کشت‌ها افزایش پیدا کرده بود (شکل ۴). آسوده و همکاران (2013) نشان دادند که باکتری *Bacillus sp. DR90* در محیط کشت حاوی نشاسته یک درصد، پپتون یک درصد، مالتوز یک درصد و عصاره مخمر یک درصد بیشترین سرعت رشد را دارا بوده؛ اما به لحاظ تولید آنزیم نتایج اختلاف معنی داری با محیط کشت M2 نشان نداد (Asoodeh et al., 2013). در تحقیق دیگر بیشترین میزان تولید آنزیم توسط باکتری *Bacillus sp.* در محیط کشت M2 گزارش شد (Asoodeh et al., 2010).





شکل ۳- اثر دما (۳۷، ۴۲ و ۵۰ درجه سانتی گراد) بر رشد باکتری.

Figure 3- Effect of temperature (37, 42 and 50°C) on the bacterial growth.



شکل ۴- تاثیر چهار محیط کشت مختلف بر سرعت رشد و میزان فعالیت آنزیمی. (M1) مایع LB، نشاسته ۱٪ (w/v)؛ (M2) مایع LB، نشاسته ۱٪ (w/v)، پپتون ۱٪ (w/v)، فروکتوز ۱٪ (w/v)؛ (M3) نشاسته ۱٪ (w/v)، پپتون ۱٪ (w/v)، مالتوز ۱٪ (w/v)؛ (M4) نشاسته ۱٪ (w/v)، پپتون ۱٪ (w/v)، مالتوز ۱٪ (w/v)، عصاره مخمر ۱٪ (w/v).

Figure 4- Effects of four different media on the enzyme activity and bacterial growth. (M1) LB broth + 1% starch; (M2) LB broth + 1% starch, peptone, and fructose; (M3) 1% starch + 1% peptone and 1% maltose; (M4) 2% yeast extract + 0.1% maltose, 1% starch and 1% peptone.

جدول ۱- مراحل خالص سازی آنزیم آمیلاز از باکتری *Bacillus cereus*

Table 1- Steps involved for the purification of amylase enzyme from *Bacillus cereus*.

مراحل خالص سازی Purification steps	غلظت پروتئین Total protein (mg/ml)	فعالیت Total activity (u/ml)	فعالیت ویژه Specific activity (u/mg)	ضریب خالص سازی Purification fold
عصاره خام Crude extract	82	1.4	0.017	1
محلول سوپر ناتانت رسوب ۸۵٪ سولفات آمونیوم Supernatant solution with 85% ammonium sulfate	0.007	0	0	0
دیالیز رسوب ۸۵ درصد سولفات آمونیوم Dialysis of 85% ammonium sulfate precipitation	3.5	0.947	0.270	15
نمونه حاصل از کروماتوگرافی Sample of chromatography	1.2	0.66	0.56	33

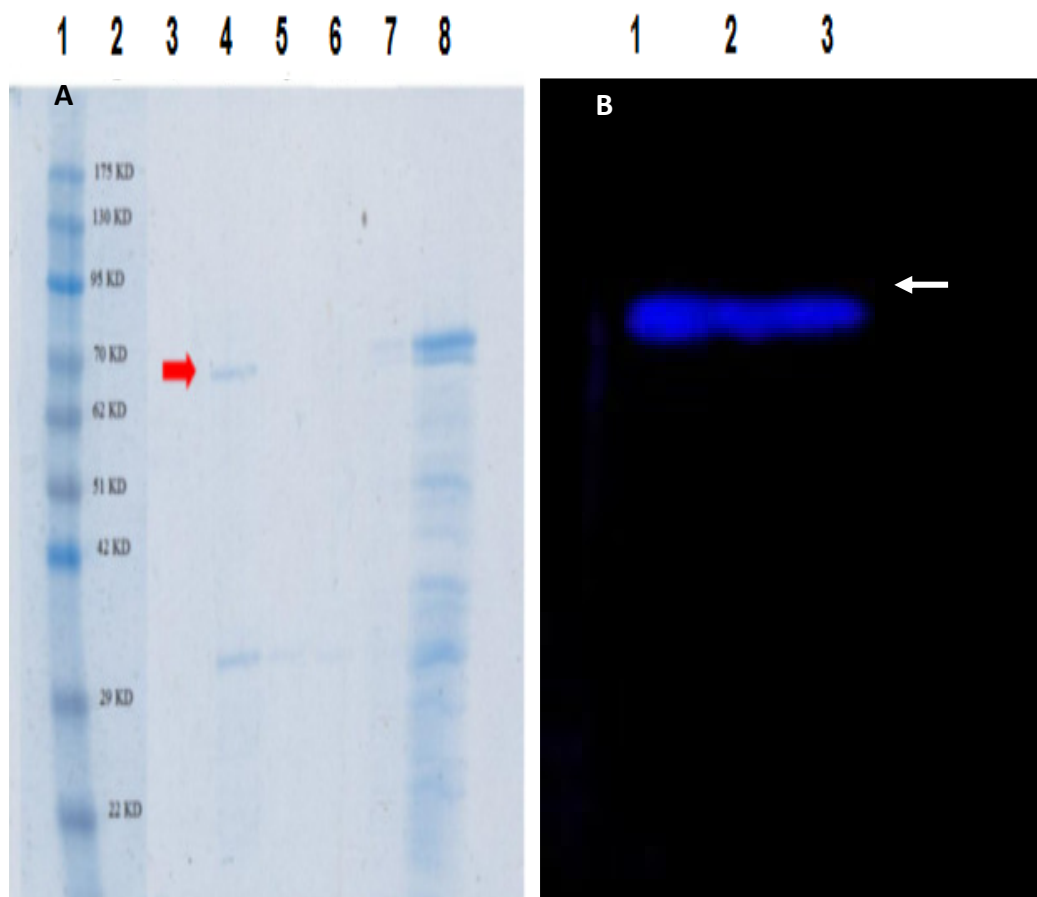
روند افزایشی فعالیت آنزیم تا رسیدن به بیشترین فعالیت در pH بهینه (۸ pH<sub>opt</sub>) ادامه یافته و در نهایت به علت خارج شدن از محدوده pH بهینه، فعالیت آنزیم رو به کاهش می‌رود. بطورکلی در بررسی پایداری آنزیم در pHهای مختلف همانطور که مورد انتظار است، آنزیم در pH بهینه خود بیشترین پایداری را داشته و ۱۰۰ درصد فعالیت خود را حفظ می‌کند. همچنین نتایج نشان می‌دهد که آنزیم در pHهای اسیدی ۳ و ۳/۵ فعالیت نسبی مناسبی داشته، با این حال آنزیم در این دامنه از pH پس از گذشت زمان ۶۰ دقیقه از انکوباسیون پایداری خود را از دست می‌دهد. در محدوده pH های ۵/۹-۸، آنزیم بصورت پایدار ۷۰ درصد از فعالیت آنزیمی خود را حفظ می‌کند (شکل ۶A، ۶B).

به علاوه در مطالعات مختلف، وزن مولکولی آنزیم‌های آمیلاز بین ۱۰ تا ۲۱۰ کیلو دالتون گزارش شده است (Souza *et al.*, 2010; Saranraj & Stella, 2013). بررسی اثر pH بر

بررسی اثر PH بر فعالیت و پایداری آنزیم

در بررسی اثر pH بر فعالیت آنزیم مشخص گردید که آنزیم دارای حداکثر فعالیت در ۸~pH است (۸ pH<sub>opt</sub>) و در دامنه وسیعی از pH برابر با ۳ تا ۱۰ دارای فعالیت قابل اندازه‌گیری و قابل ملاحظه‌ای است.

همچنین نتایج نشان داد فعالیت نسبی در دامنه pH ۳ تا ۵ رو به افزایش است و کاهش اندک در فعالیت آنزیم در محدوده pH ۵/۵ - ۷ احتمالاً به علت تغییر بافر pH ایجاد شده است.



شکل ۵- (A) ژل الکتروفورز SDS-PAGE ۱۲٪ برای آنزیم آمیلاز باکتری *Bacillus cereus* چاهک ۱، سایز مارکر پروتئین PS11؛ چاهک ۴. آنزیم آمیلاز تخلیص شده با روش کروماتوگرافی، این باند با فلش قرمز مشخص شده است؛ چاهک ۶. محلول رویی رسوب سولفات آمونیوم ۸۵ درصد؛ چاهک ۸. نمونه رسوب دیالیز شده. (B) زایموگرام آنزیم خالص شده. باند نمونه آنزیم خالص شده که به رنگ آبی روشن در شکل دیده می‌شود نشان دهنده هیدرولیز شدن نشاسته در آن منطقه و در نتیجه فعال بودن آنزیم است. ۱ و ۲. نمونه دیالیز رسوب ۸۵ درصد سولفات آمونیوم ۳. نمونه فرکشن حاصل از کروماتوگرافی.

**Figure 5-** (A) SDS-PAGE Electrophoresis on 12% polyacrylamide gel of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus cereus*. Lane 1: size marker, PSI1; Lane 4: purified amylase (Coomassie blue staining) from Q-Sepharose (Red arrow); lane 6: 85% ammonium sulfate supernatant; lane 8: dialyzed  $\alpha$ -amylase sample. (B) Native-PAGE of the purified enzyme. Lane 1,2: dialyzed 85% ammonium sulfate sediment. Lane 3: purified amylase from Q-Sepharose chromatography.

خودبخودی ساکینیمیدهای<sup>۵</sup> پپتیدی بین توالی‌های Asp-Gly و Asn-Gly، دفن گروه‌های یونیزه و نیروی الکترواستاتیک همراه شده با بار خالص بزرگ پروتئین می‌تواند از دلایل پایداری این پروتئین‌ها باشد (Creighton, 1993; Yang et al., 1993; Declerck et al., 2002). اگر آلفا-آمیلازی در دامنه وسیعی از pH فعال است، ممکن است به علت تغییر مقدار pKa نوکلئوفیل یا دهنده پروتون باشد. همچنین شبکه پیوندهای هیدروژنی محلی و دسترسی گروه‌های قابل تیتراسیون و دیگر گروه‌های باردار به حلال، نیروی الکترواستاتیک تحت تاثیر قرار می‌دهند. در نتیجه هر گونه تغییراتی در pKa نوکلئوفیل یا دهنده پروتون می‌تواند منجر به تغییر در پروفایل فعالیت pH گردد (Nielsen & Borchert, 2000; Declerck et al., 2002).

#### بررسی اثر دما بر فعالیت و پایدار آنزیم

نتایج نشان داد که آنزیم در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد حداکثر فعالیت خود را دارا بوده و در محدوده دمایی ۵۰ تا ۷۰ درجه سانتیگراد نیز بیش از ۸۰ درصد فعالیت خود را حفظ کرده است (شکل ۶C). در بررسی اثر دما بر پایداری آنزیم، مشاهده شد که از دمای ۳۵ تا ۶۵ درجه سانتیگراد تقریباً بیش از ۹۰ درصد فعالیت خود را و در دامنه دمایی ۷۰ تا ۸۵ درجه سانتیگراد تا ۷۰ درصد فعالیت خود را حفظ می‌کند و در نهایت

<sup>۵</sup> ساکینیمید یک ایمید حلقوی با فرمول  $C_4H_5NO_2$  است.

با توجه به خصوصیات ذکر شده، این آنزیم جزء آنزیم‌های قلیایی محسوب می‌شود. هم چنین این آنزیم در دامنه وسیعی از pH اسیدی یا قلیایی (۱۰-۳) فعال است که در کمتر آنزیم آمیلازی گزارش شده است. در مطالعات مختلف، آنزیم آلفا-آمیلاز اسیدی از ترمواسیدوفیل *Alicyclobacillus sp. A4* با pH بهینه ۴/۵ (Bai et al., 2012)؛ آنزیم آمیلاز متعلق به *Geobacillus sp. LH8* با pH بهینه ۵-۷ (Mollania et al., 2010)؛ آنزیم آمیلاز متعلق به *Bacillus sp. DR90* با pH بهینه ۴ (Asoodeh et al., 2013)؛ آنزیم آمیلاز استخراج شده از باکتری *B. amyloliquifaciens TSWK1-1* نیز با pH بهینه ۷ (Kikani & Singh, 2012) گزارش شده است. در پژوهشی نیز با مطالعه فعالیت آمیلازی سویه باکتریایی *Bacillus sp. KR-8104* نشان دادند که آنزیم بیشترین پایداری خود را در pH های اسیدی دارد. آنزیم آمیلاز خالص شده در تحقیق حاضر در محدوده pH ۵/۵-۸/۹ بیش از ۷۵ درصد از فعالیت خود را حفظ می‌کند (Sajadi & et al., 2005). نتایج مشابهی در مطالعه‌ی آمیلاز متعلق به *Bacillus sp. isolate A3-15* بدست آمده است به طوری که آنزیم دارای pH بهینه ۱۱ می‌باشد (Burhan, 2008).

تمامی این آنزیم‌ها به جهت فعال و پایدار بودن در pH های شدیداً اسیدی و بازی باید به لحاظ ساختار پروتئینی از ویژگی‌های مشابهی برخوردار باشند. عدم وجود عواملی نظیر تشکیل

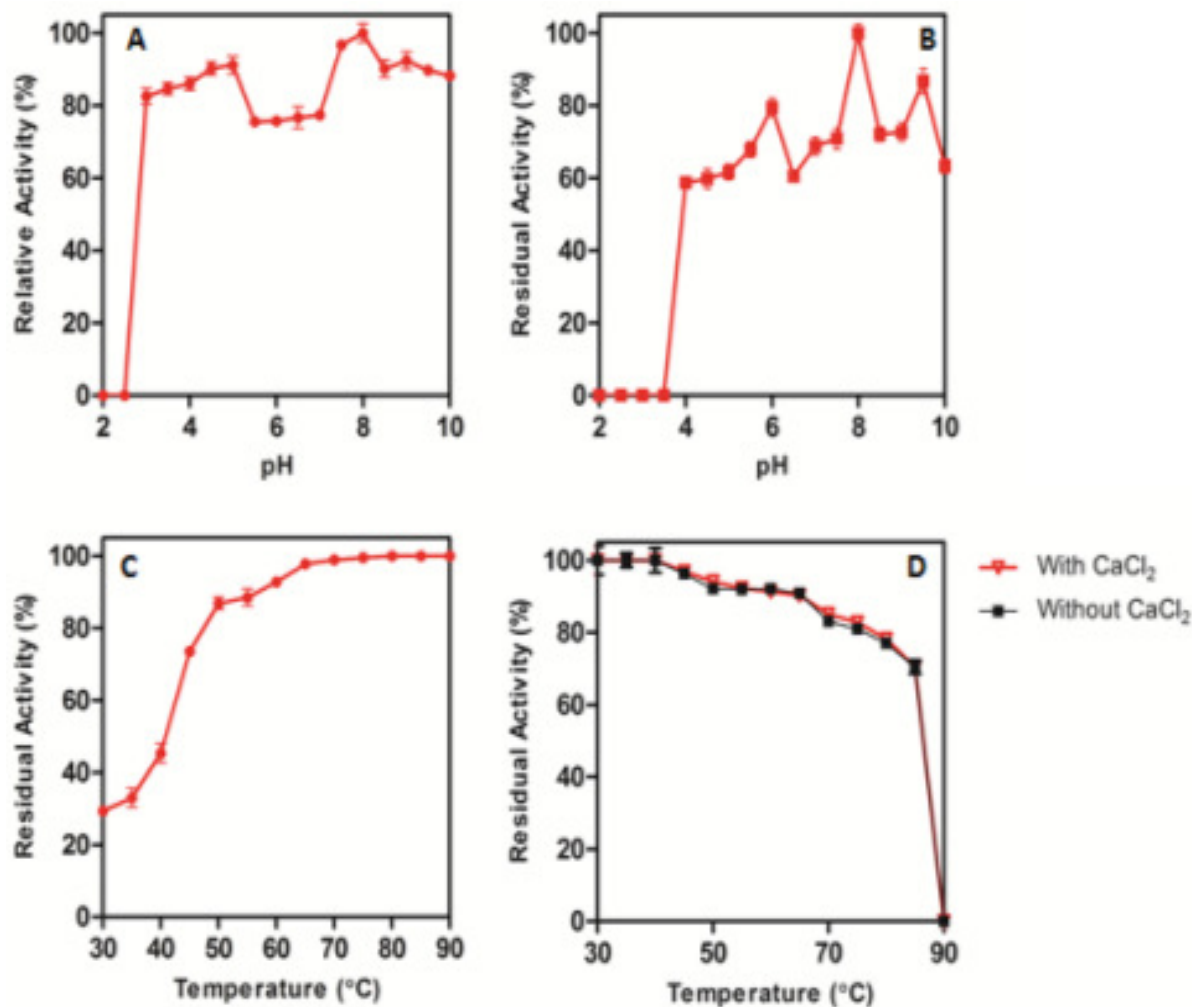
*B. amyloliquifaciens* و *Ferdowsicous* Asoodeh *et al.*, 2010; ) اشاره کرد ( *TSWK1-1* Mollania *et al.*, 2010; Bai *et al.*, 2012; Kikani & Singh, 2012). تمامی آنزیم‌های پایدار به حرارت از مکانیسم‌های مختلفی جهت ایجاد پایداری استفاده می‌کنند. مکانیسم‌های ایجاد کننده پایداری حرارتی شامل حضور یون‌های فلزی به ویژه کلسیم، جایگاه یون کلسیم، حضور اسید آمینه پرولین، دامیداسیون، عدم اکسیداسیون و وجود اسید آمینه‌های خاص در موقعیت‌های ویژه است (Nielsen & Borchert, 2000).

### نتیجه گیری کلی

با توجه به خصوصیات ذکر شده برای آنزیم آمیلاز خالص شده که شامل فعال بودن در دامنه وسیعی از pH و پایداری در pHهای قلیایی، فعالیت و پایدار بودن در دماهای بالا به طوریکه بیش از ۷۰ درصد از فعالیت خود را در محدوده دمایی ۷۰ تا ۸۵ درجه سانتی گراد حفظ می‌کند. هم چنین، عدم وابستگی به یون کلسیم این آنزیم را به آنزیمی مطلوب جهت کاربرد در صنعت به ویژه صنایع غذایی و شوینده تبدیل کرده است.

آنزیم در دمای ۹۰ درجه سانتیگراد فعالیت خود را از دست می‌دهد. همچنین پس از دیالیز شدن آنزیم با بافر حاوی یون کلسیم ( $\text{CaCl}_2$ ) با غلظت ۵ میلی مولار، هیچ گونه تاثیر قابل ذکر و محسوسی بر روی پایداری آنزیم مشاهده نشد. بر این اساس احتمالاً یون کلسیم در پایداری آنزیم تاثیر ندارد (شکل ۶D). با توجه به این نکته، آنزیم خالص شده جزء آنزیم‌های مقاوم به حرارت دسته بندی می‌گردد. آنزیم آمیلاز متعلق به باکتری *Alicyclobacillus sp. A4* در دمای ۷۵ درجه سانتی گراد از حداکثر فعالیت برخوردار است (Bai *et al.*, 2012). آمیلاز متعلق به *Bacillus sp. Ferdowsicous* دارای دمای بهینه ۷۰ درجه سانتی گراد است و در دمای ۷۵ درجه سانتی گراد بیش از ۷۵ درصد از فعالیت خود را حفظ می‌کند (Asoodeh *et al.*, 2010).

در گزارشی دیگر، آمیلاز مقاوم به حرارت فلور باکتریایی چشمه‌های آبگرم متعلق به گونه *Anoxybacillus beppuensis TSSC-1* در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد از حداکثر فعالیت برخوردار است (Kikani & Singh, 2012). در آمیلاز مورد تحقیق عدم وابستگی به یون کلسیم مشاهده شده است، این خصوصیت از مزایای آنزیم محسوب می‌گردد، در اندکی از آمیلازهای مقاوم به حرارت مشاهده شده است از این جمله می‌توان به آمیلاز *Geobacillus sp. LH8*، *Bacillus sp. Alicyclobacillus sp. A4*



شکل ۶- (A) تاثیر تغییرات pH بر فعالیت نسبی آنزیم. (B) تغییرات میزان پایداری آنزیم در pH های مختلف. (C) تاثیر دما بر فعالیت آنزیم (D) و بررسی پایداری آنزیم در دماهای مختلف در حضور و عدم حضور یون کلسیم.

**Figure 6-** (A) Effect of pH on relative activity of enzyme (B) Effect of pH on enzyme stability (C) Effect of temperature on enzyme activity (D) and effect of temperature on enzyme stability in the presence and absence of Ca<sup>2+</sup> ion.

#### منابع

- Aiyer PV (2004). Effect of C:N ratio on  $\alpha$ -amylase production by *Bacillus licheniformis* SPT 27. *African Journal of Biotechnology* 3: 519-522.
- Asoodeh A, Alemi A, Heydari A, Akbari J (2013). Purification and biochemical characterization of an acidophilic amylase from a newly isolated *Bacillus sp. DR90*. *Extremophiles* 17: 339-348.
- Asoodeh A, Chamani J, Lagzian M (2010). A novel thermostable, acidophilic  $\alpha$ -amylase from new thermophilic "*Bacillus sp. Ferdowsicus*" isolated from Ferdows hot mineral spring in Iran: Purification and biochemical characterization. *International Journal of Biological Macromolecules* 46: 289-297.



- Asoodeh A, Lagzian M (2012). Purification and characterization of a new glucoamylpullulanase from thermotolerant alkaliphilic *Bacillus subtilis* DR8806 of a hot mineral spring. *Journal of Process Biochemistry* 47: 806–815.
- Bai Y, Huang H, Meng K, Shi P, Yang P, Luo H, Luo C, Feng Y, Zhang W, Yao B (2012). Identification of an acidic  $\alpha$ -amylase from *Alicyclobacillus* sp. A4 and assessment of its application in the starch industry. *Journal of Food Chemistry* 131: 1437-1478.
- Bertoldo C, Antranikian G (2002). Extreme environments as a resource for microorganisms and novel biocatalysts. *Chemical Biology* 6: 51–60.
- Bergey DH, Holt J (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Bernfeld P (1955). Amylases,  $\alpha$  and  $\beta$  methods in enzymology. *Methods Enzymol* 1,149-158.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Burhan A (2008). Highly thermostable, thermophilic, alkaline, SDS and chelator resistant amylase from a thermophilic *Bacillus* sp. isolate A3-15. *Bioresource Technology* 99: 3071-3076.
- Creighton TE (1993). *Proteins: Structures and Molecular Properties*, 2nd ed., W.H. Freeman, New York, Ch 10.
- Declerck N, Joyet P, Gaillardin C, Masson JM, Huber R, Wiegand G (2002). Engineering the thermostability of *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase. *Biologia. Bratislava* 57: 203-211.
- Hassan SA, Ali SA, Abbasi A, Kamal M (2011). Purification and biochemical characterization of a  $\text{Ca}^{2+}$ -independent, thermostable and acidophilic  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. RM16. *African Journal of Biotechnology* 10: 6082–6089.
- Hmidet N, Bayouhd A, Berrin JG, Kanoun S, Juge N, Nasri M (2008). *Process Biochemistry Journal* 43: 499–510.
- Horváthová V, Janecek S, Sturdík E (2001). Amylolytic Enzymes: Molecular Aspects of Their Properties. *Gen. Physiol. Biophysics* 20: 7-32.
- Janecek S, Leveque E, Haye B, Belarbi A (2000). Thermophilic archaealamylolytic enzymes. *Enzyme and Microbial Technology* 26: 3-14.
- Janecek S, Svensson B, MacGregor EA (2014).  $\alpha$ -Amylase – an enzyme specificity found in various families of glycoside hydrolases *Cellular and Molecular Life Sciences* 71: 1149–1170.
- Kaneko T, Ohno T, Ohisa N (2005). Purification and characterization of a thermostable raw starch digesting amylase from a *Streptomyces* sp. isolated in a milling factory. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 69: 1073–1081.
- Kikani BA, Singh SP (2011). Single step purification and characterization of a thermostable and calcium independent  $\alpha$ -amylase from *Bacillus amyloliquifaciens* TSWK1-1 isolated from TulsiShyam hot spring reservoir, Gujarat (India). *International Journal of Biological Macromolecules* 48: 676–681.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of *bacteriophage T4*. *Nature* 227: 680–685.
- Lim WJ, Park SR, An CL, Lee JY, Hong SY, Shin EC, Kima EJ, Kim JO, Kim H, Yun HD (2003). Cloning and characterization of thermostable intracellular  $\alpha$ -amylase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MSB8. *Research in Microbiology* 154: 681–687.

- Mollania N, Khajeh K, Hosseinkhani S, Dabirmanesh B (2010). Purification and characterization of a thermostable phytate resistant  $\alpha$ -amylase from *Geobacillus sp. LH8*. International Journal of Biological Macromolecules 46: 27-36.
- Nielsen J, Borchert T (2000). Protein engineering of bacterial  $\alpha$ -amylases. Biochimica et Biophysica Acta 1543: 253-274.
- Pandey A, Lorroche C, Soccol CR, Singh D, Mohan R (2000). Advances in microbial amylases. Biotechnology and Applied Biochemistry 31: 135-152.
- Rasooli I, Astaneh SDA, Borna H, Barchini KA (2008). A thermostable  $\alpha$ -amylase producing natural variant of *Bacillus spp.* isolated from soil in Iran. American Journal of Agricultural and Biological Sciences 3: 591-596.
- Sajadi R, Naderi-Manesh H, Khajeh K, Ahmadvand R, Ranjbar B, Asoodeh A, Moradian F (2005). A Ca-independent  $\alpha$ -amylase that is active and stable at low pH from the *Bacillus sp. KR-8104*. Enzyme and Microbial Technology 36: 666-671.
- Saranraj P, Stella D (2013). Fungal Amylase - A Review. International Journal of Microbiological Research 4: 203-211.
- Sivaramakrishnan S, Gangadharan D, MadhavaNampoothiri K, Ricardo Soccol C, Pandey A (2006).  $\alpha$ -Amylases from Microbial Sources – An Overview on Recent Developments. Food Technology and Biotechnology 44: 173-184.
- Souza P, Oliveira E, Magalhães P (2010). Application of microbial  $\alpha$ -mylase in industry- A Review. Brazilian Journal of Microbiology 41: 850-861.
- Suman S, Ramesh K (2010). Production of a thermostable extracellular amylase from thermophilic *Bacillus species*. Journal of Pharmaceutical Sciences 2: 149-154.
- Vahidi, H, Shafaghi, B, Mirzabeigi, Z (2005). Culture medium optimization of  $\alpha$ -amylase producing organism *mocur spp.* using the variable size-simplex algorithm. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences 13: 20-22.
- Van der Maarel M, Van der Veen B, Uitdehaag J, Leemhuis H, Dijkhuizen L (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. Journal of Biotechnology 94: 137-155.
- Yang AS, Honig B (1993). On the pH dependence of protein stability. Journal of Molecular Biology 231: 459-474.

## Purification and biochemical characterization of a thermostable alpha-amylase from *Bacillus cereus*

Taati A.<sup>1</sup>, Mirshamsi A.\*<sup>2</sup>, Asoodeh A.<sup>3</sup>, Malekzadeh Shafaroodi S.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>M. Sc. Student, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

<sup>2</sup>Assistant professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

<sup>3</sup>Professor, Department of Chemistry, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

<sup>4</sup>Associate professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

### Abstract

Considerable economic importance and wide range of applications of thermo-stable amylases in various industries has significantly increased the demand for amylase production with optimal stability properties. Natural bacterial flora of hot springs can be used as new sources for  $\alpha$ - amylase production due to high tolerance to heat and stability in different pH ranges. In this study, Ghinarjeh hyperthermal hot spring was studied to identify the bacterial species that have amylase activity. Bacterial clones producing amylase were identified based on biochemical characteristics and molecular methods. In the next step, the growth conditions of isolated bacteria and amylase production were optimized. Finally, after extraction and purification of  $\alpha$ - amylase enzyme from isolated clones, biochemical characteristics were evaluated. The results showed that isolated bacterial clone is a member of the genus *Bacillus*, and also indicated that the purified enzyme is a thermostable, and calcium-independent amylase enzyme. The purified amylase showed maximum activity at pH 8, however the enzyme is active and stable in a broad range of acidic and alkaline pH (3.5- 10). The enzyme has maximum hydrolysis activity at 80°C and 80% of this activity remains at 50-70°C. According to this study, this bacterial strain can be suitable and promising source for production of high performance, thermostable amylase in order to use at industrial level.

**Keywords:** *amylase, Calcium, hot spring, thermostable,*

\* Corresponding Author: Mirshamsi A.

Tel: 051-38805726

Email: mirshamsi@ferdowsi.um.ac.ir