

## خالص‌سازی و تعیین ویژگی‌های آمیلوپولولاناز مقاوم به حلال و نمک‌دوست خارج سلولی جدا شده از آرکی نمک‌دوست *Halorubrum* سویه Ha25

**مریم سیروسی:** دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، دانشگاه تهران، ایران، msiroosy@ut.ac.ir\*\*  
**محمدعلی آموزگار:** دانشیار میکروبیولوژی، دانشگاه تهران، ایران، amoozegar@ut.ac.ir\*\*  
**خسرو خواجه:** استاد بیوشیمی، دانشگاه تربیت مدرس، ایران، khajeh@modares.ac.ir  
**مهران حبیبی رضایی:** دانشیار بیوشیمی، دانشگاه تهران، ایران، mhabibi@khayam.ut.ac.ir\*\*\*  
**مصطفی فاضلی:** کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه تهران، ایران، mfazeli65@gmail.com\*\*

### چکیده

**مقدمه:** نمک‌دوست‌ها، به ویژه هالوآرکی‌ها یکی از مهم‌ترین گروه‌های میکروارگانیسم‌های افراطی‌دوست هستند. هیدرولازهای نمک‌دوست بسیار مطالعه شده‌اند و برای کاربردهای صنعتی و زیست فن‌آوری مورد توجه هستند. با توجه به اهمیت هیدرولازهای نمک‌دوست، مطالعه حاضر اولین گزارش در مورد خالص‌سازی آنزیم آمیلوپولولاناز از یک آرکی نمک‌دوست است.

**مواد و روش‌ها:** آرکی نمک‌دوست *Halorubrum* سویه Ha25 آنزیم آمیلوپولولاناز خارج سلولی نمک‌دوست و مقاوم به حلال را در غلظت بالای نمک سدیم کلراید تولید می‌کند. به منظور خالص‌سازی آنزیم، از رسوب‌دهی پروتئین‌ها با حلال اتانول و کروماتوگرافی تعویض آنیونی استفاده شده و جرم مولکولی آنزیم بعد از تخلیص، به کمک روش SDS-PAGE تعیین شد. بعد از تخلیص آنزیم، ویژگی‌های آنزیم بررسی شد. به منظور تعیین پایداری آنزیم در حضور حلال‌های آلی، محلول آنزیمی به طور جداگانه در مجاورت هفت حلال آلی قرار گرفت. در انتها محصول عملکرد آنزیم روی دو سوبسترای نشاسته و پولولان به روش کروماتوگرافی لایه‌ی نازک بررسی شد.

**نتایج:** جرم مولکولی آنزیم به کمک روش SDS-PAGE به میزان ۱۴۰ kDa تعیین شد. بیشینه‌ی فعالیت آمیلولیتیک و پولولیتیک آنزیم در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد بود. اسیدیته بهینه برای فعالیت آمیلولیتیکی ۷/۰ و برای فعالیت پولولیتیکی ۷/۵ تعیین شد. آنزیم در محدوده وسیع غلظتی صفر تا ۴/۵ مولار از نمک NaCl فعال بود. اثر حلال‌های آلی مختلف روی فعالیت پولولیتیک و آمیلولیتیک آنزیم آمیلوپولولاناز نشان داد که آنزیم در حضور حلال‌های غیر قابل اختلاط با آب دارای پایداری بیشتری نسبت به حلال‌های قابل اختلاط با آب است. تنها محصول عملکرد آنزیم روی هر دو سوبسترای نشاسته و پولولان، گلوکز تعیین شد.

**بحث و نتیجه‌گیری:** آرکی نمک‌دوست *Halorubrum* سویه Ha25، آنزیم آمیلوپولولاناز نمک‌دوست و گرمادوست را تولید می‌کند. با توجه به فعالیت آنزیم در شرایطی نظیر دما و شوری بالا و آب فعال کم، این آنزیم گزینه‌ای مناسب به منظور کاربردهای زیست فن‌آوری، نظیر تیمار پساب‌های دارای شوری بالا، حلال‌های آلی و ترکیبات نشاسته‌ای است.

**واژه‌های کلیدی:** آمیلوپولولاناز نمک‌دوست، خالص‌سازی پروتئین، آرکی نمک‌دوست افراطی، *Halorubrum* مقاومت به حلال آلی

\* نویسنده مسئول مکاتبات

\*\* آزمایشگاه اکستریموفیل‌ها، بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی و قطب تبارزایی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، ایران

\*\*\* آزمایشگاه بیوتکنولوژی پروتئین، گروه سلولی و مولکولی، دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، ایران

## مقدمه

هالوآرکی‌ها در راسته *Halobacteriales* و خانواده‌ی *Halobacteriaceae* قرار داشته و نمک‌دوست‌های افراطی<sup>۱</sup> هستند که برای رشد به حداقل ۱/۵ مولار از نمک NaCl نیاز دارند (۲). نمک‌دوست‌ها، میکروارگانیسم‌های افراطی دوستی هستند که قابلیت بقا و رشد در محیطی با میزان شوری بالا را داشته و منبعی برای آنزیم‌های نمک‌دوست هستند (۳). بسیاری از فرآیندهای صنعتی در شرایط فیزیکی و شیمیایی سختی انجام می‌شوند که برای عملکرد بسیاری از آنزیم‌های معمول، مناسب نیست. از این‌رو، یافتن آنزیم‌های افراطی دوستی<sup>۲</sup> که بتوانند در شرایطی مانند شوری و دمای بالا فعالیت داشته باشند، بسیار ارزشمند است. در سال‌های اخیر توجه به آنزیم‌های تولید شده توسط میکروارگانیسم‌های افراطی دوست که توانایی فعالیت در شرایط سخت را دارند، افزایش یافته است (۴). آنزیم‌های نمک‌دوست جدا شده از آرکی‌های نمک‌دوست می‌توانند دارای کاربردهای متعددی در صنایع باشند زیرا در غلظت بالای نمک، دمای بالا و آب فعال کم دارای فعالیت هستند (۵). پروتئین‌های آرکی‌های نمک‌دوست در مقایسه با پروتئین‌های معمولی به واسطه‌ی تعداد کمتر اسیدهای آمینه آب‌گریز و اسیدهای آمینه‌ای با بار منفی که در سطح خود دارند، می‌توانند در غلظت بالای نمک که در داخل و خارج سلول با آن روبرو هستند پایدار باشند (۶).

آنزیم‌های خانواده  $\alpha$ -آمیلاز دارای فعالیت‌های زیست‌فن‌آوری متعددی هستند و در صنایع مواد

شوینده، کاغذ، مواد غذایی و دارویی کاربرد دارند (۷). پولولانازها (پولولان-۶ گلوکانو هیدرولاز)، انواعی از آنزیم‌های شاخه شکن بوده و به خانواده‌ی آنزیمی  $\alpha$ -آمیلاز متعلق هستند. این آنزیم‌ها بسته به توانایی و یا عدم توانایی هیدرولیز پیوند گلیکوزیدی  $\alpha$ - (۱،۴) در نشاسته، آمیلوپکتین و الیگوساکاریدهای مربوطه به دو نوع I و II (آمیلوپولولاناز) تقسیم می‌شوند. نوع I بر خلاف نوع II قادر به هیدرولیز پیوند گلیکوزیدی (۱،۴)  $\alpha$ - نیست. هر دو نوع آنزیم I و II قادر به شکست پیوندهای گلیکوزیدی  $\alpha$ - (۱،۶) در پولولان بوده و مالتوتریوز را به عنوان محصول تولید می‌کنند. پولولان هیدرولاز نوع I (نئوپولولاناز) و پولولان هیدرولاز نوع II (ایزوپولولاناز)، توانایی هیدرولیز پیوند گلیکوزیدی  $\alpha$ - (۱،۴) را در پولولان داشته و پنوز و ایزوپنوز را تولید می‌کند (۸). پولولان هیدرولاز نوع III توانایی هیدرولیز پیوندهای گلیکوزیدی  $\alpha$ - (۱،۴) و  $\alpha$ - (۱،۶) را در پولولان داشته و مالتوتریوز، پنوز و مالتوز را به عنوان محصول تولید می‌کند (۹).

در این پژوهش، آنزیم آمیلوپولولاناز از آرکی نمک‌دوست *Halorubrum* سویه Ha25 تخلیص شده و وزن مولکولی آن تعیین شد. سپس ویژگی‌های کینتیکی آن نظیر  $V_{max}$  و  $K_m$  و هم‌چنین شرایط بهینه فعالیت آنزیم بررسی شد. محصولات حاصل از عملکرد آنزیم روی سوبستراهای نشاسته و پولولان نیز به کمک روش کروماتوگرافی لایه نازک تعیین شد. این مطالعه، اولین گزارش در خالص‌سازی آنزیم آمیلوپولولاناز نمک‌دوست از یک میکروارگانیسم نمک‌دوست است.

## مواد و روش ها

### سویه آرکیایی و شرایط کشت

آرکی نمک دوست سویه Ha25 از دریاچه نمک آران بیدگل در ایران جدا شد. بررسی های بیوشیمیایی، فنوتیپی و ریخت شناسی به همراه تعیین توالی ژن rRNA ۱۶S و بررسی شباهت توالی rRNA ۱۶S این سویه با سایر توالی های ثبت شده در پایگاه اطلاعاتی EzTaxon-e server، نشان داد که این سویه به جنس *Halorubrum* متعلق بوده و بیشترین شباهت را به گونه *Halorubrum chaoviator Halo-* (AM048786)  $G^T$  دارد (۱ و ۱۰). تولید آنزیم پولولاناز سویه Ha25 در شرایط هوایی، دمای ۴۰ درجه سانتی گراد، در انکوباتور شیکردار با حرکت دورانی ۲۰۰ دور در دقیقه و در محیط کشت دارای (w/v) ۲۳ درصد نمک تام (NaCl ۱۸/۴ درصد،  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  ۲/۷ درصد،  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  ۲/۳ درصد،  $KCl$  ۰/۵۴ درصد،  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  ۰/۰۵۸ درصد)، ۲ درصد مالتوز، ۰/۵ درصد پپتون گوشت، ۰/۵ درصد عصاره ی گوشت و (v/v) ۰/۰۴ درصد محلول عناصر کم مصرف، (۱۱) با اسیدیته ۷/۲-۷/۴، بعد از گذشت سه روز به بیشترین میزان خود رسید. مایع رویی این محیط کشت برای خالص سازی آنزیم استفاده شد.

### سنجش فعالیت آنزیمی و تعیین غلظت پروتئین

برای تعیین فعالیت پولولیتیکی و آمیلولیتیکی، از محلول پولولان ۰/۵ درصد و نشاسته ی محلول یک درصد در بافر Tris-HCl با غلظت ۵۰ میلی مولار، محتوی ۲۰ میلی مولار  $CaCl_2$  با اسیدیته ۸/۰ تا ۷/۵ (بافر A) به عنوان سوبسترا استفاده شد. به این صورت که

میزان ۵۰ میکرو لیتر از محلول آنزیمی با ۴۵۰ میکرو لیتر از محلول سوبسترا مخلوط شده و به مدت یک ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد گرما گذاری شد. بعد از گرما گذاری، میزان قندهای احیاء کننده با کمک معرف دی نیتروسالیسیلیک اسید تعیین شد (۱۲). به این ترتیب که میزان ۵۰۰ میکرو لیتر از معرف دی نیتروسالیسیلیک اسید به مخلوط واکنش آنزیمی اضافه شد و در آب جوش به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. بر حسب تعریف یک واحد آنزیم مقدار آنزیمی است که موجب هیدرولیز یک میکرومول سوبسترا در یک دقیقه در یک میلی لیتر محلول آنزیمی شود.

غلظت پروتئین نمونه ها با روش برادفورد تعیین شد. از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد استفاده شد (۱۳). غلظت پروتئین بخش های خارج شده از ستون، از طریق تعیین جذب نمونه ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر تعیین شد.

### خالص سازی آنزیم

تمام مراحل خالص سازی آنزیم در دمای ۴ درجه سانتی گراد انجام شدند. مایع رویی کشت سه روزه آرکی از طریق سانتریفیوژ محیط کشت به مدت ۲۰ دقیقه با دور  $9000 \times g$ ، از سلول ها و سایر مواد جامد جدا شد. یک حجم اتانول سرد مطلق منفی ۲۰ درجه سانتی گراد) به تدریج به مایع رویی محیط کشت در حال هم زدن، اضافه شد. رسوب پروتئینی حاصل به کمک سانتریفیوژ به مدت ۲۰ دقیقه با دور  $10000 \times g$  جدا شد و در کمترین میزان بافر A حل شده و ترکیبات نامحلول از طریق سانتریفیوژ مجدد به مدت ۲۰ دقیقه با

اشاره شد انجام شد. نیمرخ دمایی و دمایی بهینه‌ی فعالیت آمیلولیتیکی و پولولیتیکی، از طریق تعیین فعالیت آنزیمی با گرماگذاری مخلوط واکنش آنزیمی در محدوده دمایی بین ۳۵ تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد، با فواصل دمایی ۵ درجه سانتی‌گراد تعیین شد. مخلوط واکنش‌های آنزیمی به مدت یک ساعت در دماهای ذکر شده گرماگذاری شدند و بعد از این مدت معرف دی‌نیتروسالیسیلیک اسید به آن‌ها اضافه شد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار داده شد. برای تعیین غلظت بهینه نمک سدیم کلراید برای فعالیت آمیلولیتیکی و پولولیتیکی آنزیم، سنجش فعالیت آنزیمی در شرایطی انجام شد که مخلوط واکنش دارای صفر تا ۴/۵ مولار نمک بود.

#### تعیین پایداری دمایی و مقاومت آنزیم نسبت به حلال‌های آلی

به منظور تعیین پایداری دمایی آنزیم در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد، نمونه‌ی آنزیمی به مدت ۳۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سنجش باقیمانده فعالیت آنزیمی نمونه آنزیمی تیمار شده در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد، در فاصله زمانی بین ۵ تا ۳۵ دقیقه و هر ۵ دقیقه یک بار، در شرایط استاندارد سنجش آنزیمی انجام شد. فعالیت نمونه آنزیمی که تیمار دمایی نشده بود، ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد.

به منظور تعیین پایداری آنزیم در حضور حلال‌های آلی، نمونه‌ی آنزیمی در حضور غلظت (۷/۷) و ۲۰ و ۵۰ درصد حلال‌های آلی مختلف نظیر دی‌متیل سولفو کساید<sup>۵</sup>،  $\pi$ -بوتانول، دی‌متیل فرمامید<sup>۶</sup>، اتانول، ۲- پروپانول، استون و کلروفرم به مدت یک هفته در

دور  $10000 \times g$  جدا شدند. سپس این محلول علیه بافر A به مدت ۱۵ ساعت دیالیز شد. این محلول حاصل روی ستون گروماتوگرافی تعویض آنیونی Q-Sepharose (آمرشام بیوساینس<sup>۳</sup>، ابعاد ستون: ۱۵ سانتی‌متر در یک سانتی‌متر) که از قبل با بافر A به تعادل رسیده بود، قرار گرفت. ستون با همین بافر شستشو داده شد تا جایی که غلظت پروتئین‌های بخش‌های خارج شده از ستون به صفر رسید. سپس پروتئین‌های متصل به ستون از طریق یک شیب غلظت خطی از غلظت صفر تا یک مولار نمک سدیم کلراید در بافر A، با شدت جریان یک میلی‌لیتر در دقیقه از آن خارج شدند. بخش‌هایی از ستون که دارای فعالیت آمیلوپولولانازی بودند، جمع‌آوری شده و برای مطالعات بیشتر بررسی شدند. جرم مولکولی و میزان خلوص آنزیم از طریق SDS-PAGE و با روش لاملی<sup>۴</sup> تعیین شد (۱۴). به منظور حذف نمک‌ها از مایع رویی محیط کشت برای انجام SDS-PAGE، نمونه به کمک سنتریکون تغلیظ شد و سپس با بافر A به حجم اولیه رسانده شد و این عمل چندین بار تکرار شد تا نمک‌ها از مایع رویی محیط کشت حذف شوند.

#### بررسی اثر دما، اسیدیته و غلظت نمک سدیم کلراید روی فعالیت آنزیم

اثر اسیدیته روی فعالیت آمیلولیتیکی و پولولیتیکی آنزیم در محدوده بین ۴/۵ تا ۱۰/۰ تعیین شد. برای این منظور از بافر مخلوط با غلظت ۵۰ میلی‌مولار (۴/۵-۵/۰، سدیم استات؛ ۷/۵-۶/۰، سدیم فسفات؛ ۸/۰-۹/۰، Tris-HCl؛ ۹/۵-۱۲/۰، Glycine-NaOH) و شرایط استاندارد تعیین فعالیت آنزیمی که در بالا به آن

تانک خارج شده و پس از خشک شدن، برای آشکار شدن لکه ها سولفوریک اسید و متانول ((v/v) ۱:۱) روی سطح کاغذ پاشیده شده و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت (۱۴). قندهای گلوکز (G1)، مالتوز (G2)، مالتوتریوز (G3)، مالتوتترائوز (G4)، مالتوپنتائوز (G5)، مالتوهگزانوز (G6)، مالتوهپتانوز (G7) و قند پنوز نیز به عنوان شاهد در کنار نمونه ها قرار گرفتند.

### نتایج

#### خالص سازی و تعیین ویژگی های آنزیم

آنزیم خارج سلولی آمیلوپولولاناز از محیط کشت سه روزه آرکی با روش رسوب دهی پروتئین ها به کمک حلال آلی اتانول و استفاده از ستون تعویض آنیونی تخلیص شد. نمونه پروتئینی حاصل از رسوب دهی با اتانول بر روی ستون Q-Sepharose قرار گرفت و بعد از شستشوی ستون با گرادیان خطی از نمک سدیم کلراید، آنزیم در غلظت ۰/۳۸ مولار از این نمک از ستون خارج شد. سه بخش دارای فعالیت از ستون به دست آمد (شکل ۱). خلاصه ای از مراحل مختلف خالص سازی در جدول ۱ نشان داده شده اند. جرم مولکولی آنزیم آمیلوپولولاناز با کمک SDS-PAGE به میزان ۱۴۰ کیلو دالتون تعیین شد (شکل ۲).

انکوباتور شیکردار با دمای ۲۰ درجه سانتی گراد و با حرکت دورانی ۱۵۰ دور در دقیقه قرار گرفت (۳۱). باقی مانده فعالیت آنزیمی هر روز سنجش شد. فعالیت نمونه آنزیمی که در مجاورت حلال قرار نگرفته بود، به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. سپس نیمه عمر فعالیت آمیلولیتیکی و پولولیتیکی آنزیمی تعیین شد.

#### تعیین ویژگی های کینتیکی $V_{max}$ و $K_m$ آنزیم

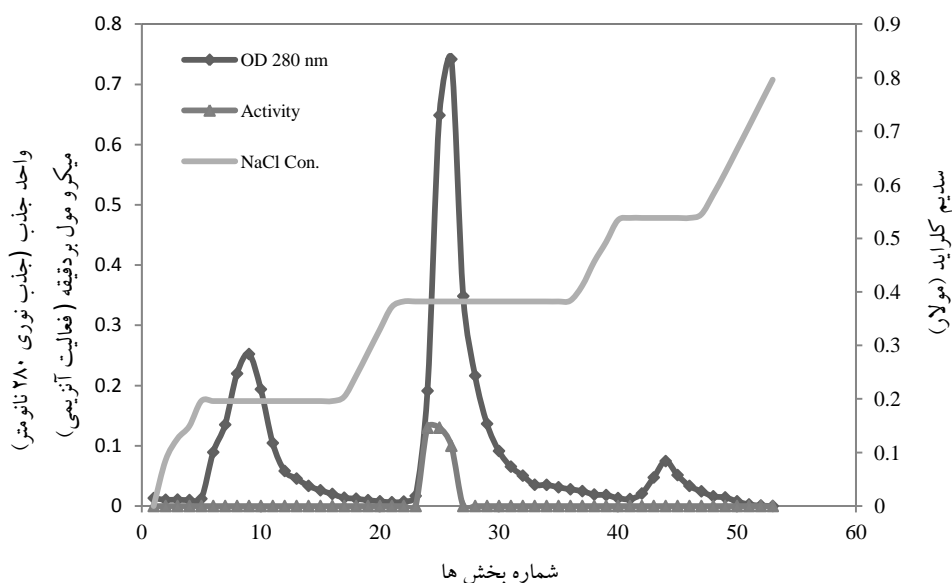
ویژگی های کینتیکی آنزیم، توسط گرماگذاری نمونه آنزیمی با غلظت های مختلف نشاسته ی محلول و پولولان در بافر A به عنوان سوسترا در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ دقیقه تعیین شد. مقادیر  $V_{max}$  و  $K_m$  آنزیم از طریق رسم منحنی لاین ویور برک<sup>۷</sup> به دست آمد.

#### کروماتوگرافی لایه ی نازک

نمونه آنزیمی در حضور پولولان ۰/۵ درصد و نشاسته محلول یک درصد در بافر A به عنوان سوسترا در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت دو ساعت گرماگذاری شد. فعالیت آنزیمی با قرار دادن مخلوط واکنش در دمای حدود ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه، متوقف شد. نمونه های حاصل از عملکرد آنزیم به شکل یک لکه روی کاغذ کروماتوگرافی قرار گرفتند و بعد از خشک شدن لکه ها، این کاغذ در تانک محتوی سیستم حلالی n-بوتانول، متانول و آب ((v/v) ۴:۲:۱) برای جدا کردن محصولات قندی تولید شده، قرار گرفت. وقتی حلال به بالای کاغذ رسید، کاغذ از

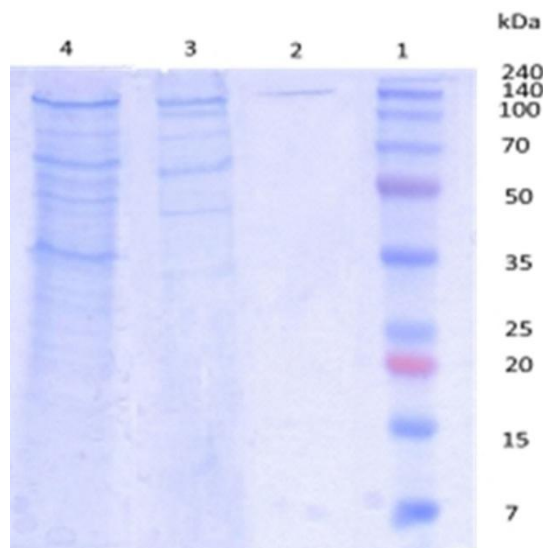
جدول ۱- خلاصه ای از مراحل مختلف خالص سازی آنزیم آمیلوپولولاناز از مایع رویی محیط کشت سویه Ha25

فعالیت کل (واحد آنزیمی)	پروتئین کل (میلی گرم)	فعالیت ویژه (واحد آنزیمی بر میلی گرم)	خالص سازی (برابر)	بازده (درصد)	مراحل خالص سازی
۴۵۰	۱۰۰	۴/۵	۱	۱۰۰	آنزیم خام
۱۴۰	۱۵/۵	۹	۲	۳۱	۵۰ درصد اتانول (v/v)
۱۶	۱/۱	۱۴/۵	۳/۲	۳/۵	Q-Sepharose



شکل ۱- کروماتوگرافی تعویض آنیونی به کمک ستون Q-Sepharose

فعالیت نسبی آمیلولیتیکی و پولولیتیکی آنزیم در اسیدیته ۴/۵ به ترتیب ۲۳ و ۳۱ درصد و در اسیدیته ۱۰/۰ به ترتیب ۴۴ و ۳۰ درصد تعیین شد (شکل ۳ الف). نیمرخ دمایی آنزیم در شکل ۳ ب نشان داده شده است. هر دو فعالیت آنزیمی در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد بیشینه است. در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، فعالیت نسبی پولولیتیکی و آمیلولیتیکی آنزیم، به ترتیب ۵۵ درصد و ۴۰ درصد تعیین شد. در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد، هر دو فعالیت آنزیمی تنها ۳۲ درصد از بیشترین میزان فعالیت خود را نشان می‌دهند. بیشینه‌ی فعالیت آمیلولیتیکی و پولولیتیکی به ترتیب در غلظت ۲/۰ و ۳/۵ مولار از نمک سدیم کلراید تعیین شدند. در غلظت ۴/۵ مولار از این نمک، ۴۴ درصد و ۳۱ درصد از فعالیت آمیلولیتیکی و پولولیتیکی آنزیم باقی ماند، در حالی که در غلظت صفر مولار از نمک سدیم کلراید، به ترتیب ۳۶ درصد و ۷ درصد از فعالیت بیشینه‌ی آنزیمی دیده شد (شکل ۳ پ).



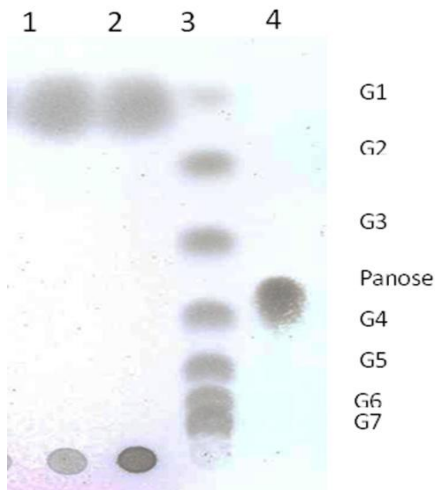
شکل ۲- تحلیل الکتروفوریتیک آنزیم خالص شده. در این شکل، پروتئین‌های موجود در هر مرحله‌ی خالص‌سازی نشان داده شده‌اند. ردیف ۱: شاهد جرم مولکولی ردیف ۲: کروماتوگرافی تعویض آنیونی ردیف ۳: رسوب اتانولی ردیف ۴: مایع رویی محیط کشت

اثر عوامل مختلف بر روی فعالیت آنزیم در شکل ۳ نشان داده شده‌اند. آنزیم هر دو فعالیت آمیلولیتیکی و پولولیتیکی خود را در محدوده‌ی وسیع اسیدیته از ۴/۵ تا ۱۰/۰ حفظ کرد. اسیدیته بهینه برای فعالیت آمیلولیتیکی ۷/۰ و برای فعالیت پولولیتیکی به میزان ۷/۵ تعیین شد.

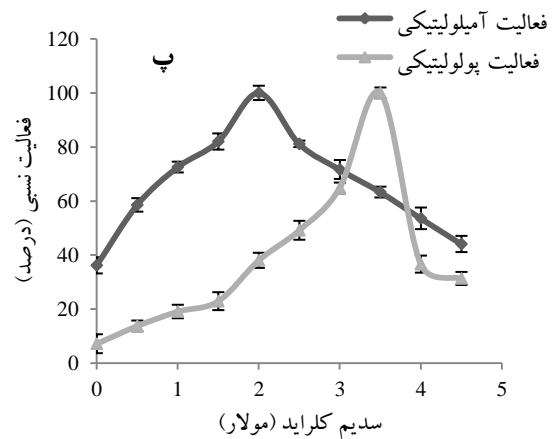
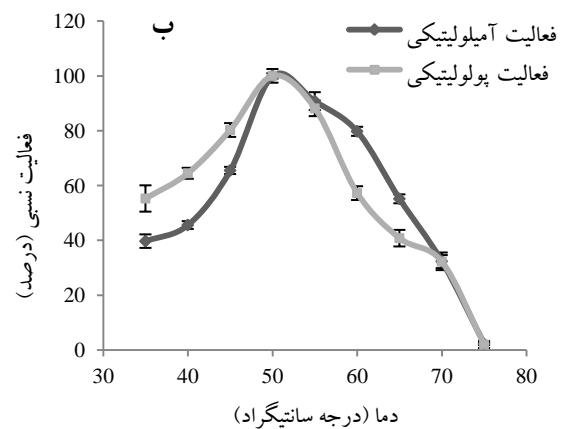
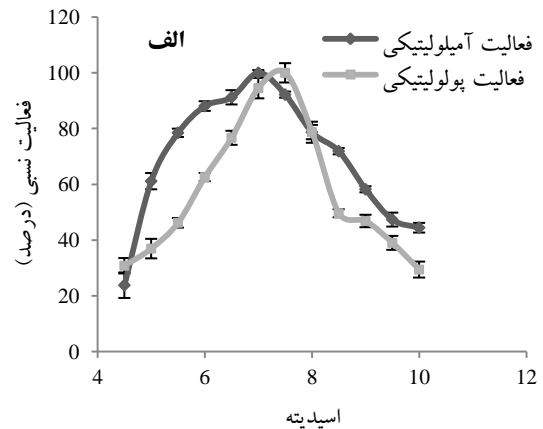
ویژگی های کینتیکی آنزیم از طریق سنجش استاندارد فعالیت آنزیمی و در حضور پولولان و نشاسته محلول به عنوان سوبسترا انجام شد. میزان  $V_{max}$  و  $K_m$  به کمک نمودار لاین ویوربرک تعیین شدند (شکل ۴). میزان  $K_m$  برای سوبسترای نشاسته محلول ۱/۸ میلی گرم بر میلی لیتر و برای سوبسترای پولولان ۴/۸ میلی گرم بر میلی لیتر تعیین شد. میزان  $V_{max}$  برای سوبسترای نشاسته محلول ۲۵ میکرومول بر دقیقه و برای سوبسترای پولولان ۱۰/۷ میکرومول بر دقیقه تعیین شد.

#### نحوه ی عملکرد آنزیم بر روی سوبسترای نشاسته محلول و پولولان

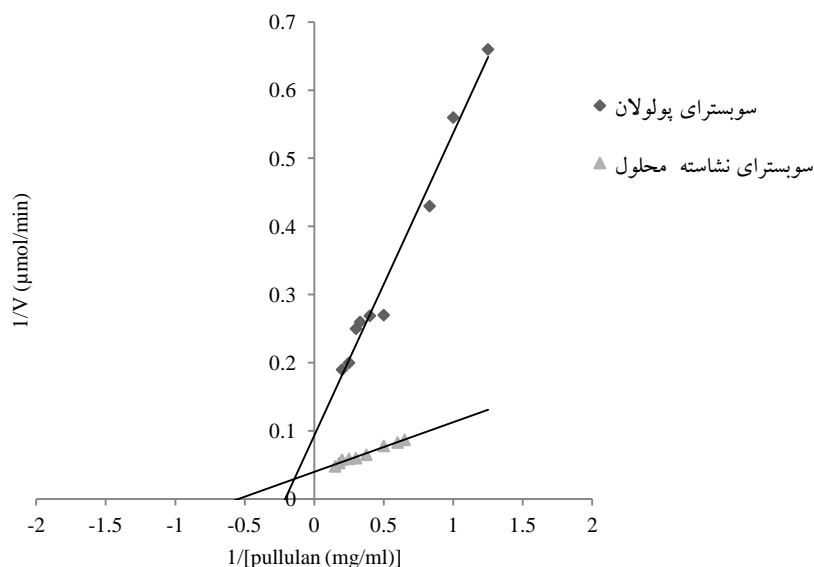
محصول عملکرد آنزیم بر روی دو سوبسترای نشاسته محلول و پولولان در شکل ۵ نشان داده شده اند. از آن جا که آنزیم خالص شده به شکل یک باند دارای هر دو فعالیت آمیلولیتیکی و پولولیتیکی روی SDS-PAGE دیده شد و به دلیل این که تنها محصول تولید شده توسط آنزیم حاصل از عملکرد بر روی هر دو سوبسترا تنها گلوکز بود، نوع آنزیم آمیلوپولولاناز تعیین شد (۱۶).



شکل ۵- الگوی عملکرد آنزیم آمیلوپولولاناز بر روی سوبسترای نشاسته محلول و پولولان. ردیف ۱: محصول عملکرد آنزیم روی سوبسترای نشاسته محلول ردیف ۲: محصول عملکرد آنزیم روی سوبسترای پولولان ردیف ۳: استاندارد قندی (قند یک کربنه تا هفت کربنه) ردیف ۴: قند پنوز (محصول اصلی عملکرد آنزیم نوپولولاناز)



شکل ۳- اثر اسیدیته (الف)، دما (ب) و غلظت های مختلف نمک سدیم کلراید (پ) بر روی فعالیت آمیلولیتیکی و پولولیتیکی آنزیم آمیلوپولولاناز. فعالیت آنزیمی مطابق با شرایط استاندارد اشاره شده در متن انجام شده است. بیشترین میزان فعالیت آنزیمی به عنوان ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شده است. فعالیت های آنزیمی به شکل فعالیت نسبی  $\pm$  انحراف معیار گزارش شده اند.

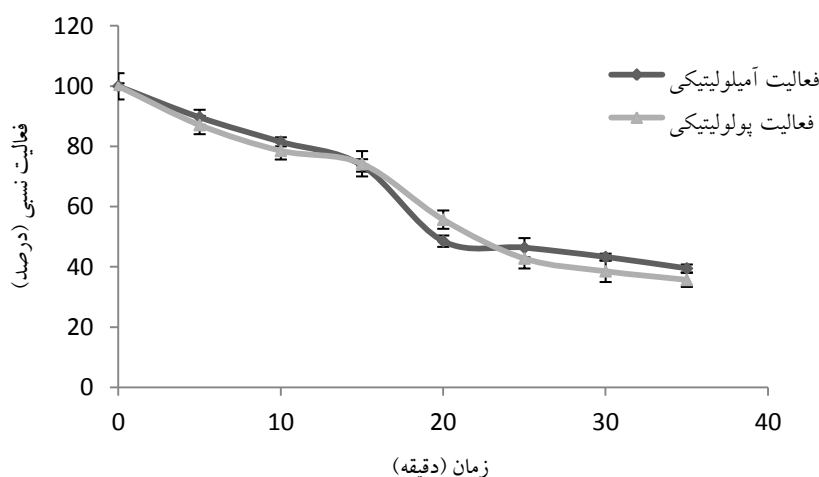


شکل ۴- منحنی لاین ویوربرک فعالیت آنزیمی با استفاده از نشاسته محلول و پولولان به عنوان سوبسترا. فعالیت آنزیمی مطابق با شرایط استاندارد تعیین شده است.

فعالیت پولولیتیکی و فعالیت آمیلولیتیکی به ترتیب ۳۶ درصد و ۳۹ درصد از فعالیت اولیه خود را نشان می‌دهند. پایداری دمایی آنزیم در شکل ۶ نشان داده شده است.

#### پایداری دمایی آنزیم و مقاومت به حلال‌های آلی

به منظور تعیین پایداری دمایی آنزیم در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد، نمونه آنزیمی به مدت ۳۵ دقیقه در این دما قرار گرفت. بعد از طی این زمان گرماگذاری، باقی مانده فعالیت آنزیمی سنجیده شد و مشخص شد



شکل ۶- پایداری حرارتی آنزیم آمیلوپولولاناز در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد. فعالیت آنزیمی بدون تیمار حرارتی به عنوان ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد. فعالیت‌های نسبی به شکل  $\pm$  انحراف معیار نشان داده شده‌اند.



پولولیتیکی ۱۶۵ ساعت است. در غلظت ۲۰ درصد حلال های آلی قابل اختلاط با آب، نیمه عمر آنزیم کوتاهتر از حلال های آلی غیر قابل اختلاط با آب است. این موضوع در مورد حلال پروپانول و استون دیده نشد، به طوری که آنزیم در حضور غلظت ۲۰ درصد از حلال پروپانول کمترین نیمه عمر و در حضور حلال استون بیشترین نیمه عمر را دارا بود. در حضور غلظت ۵۰ درصد این حلال ها، همان الگوی مشاهده شده در مورد غلظت ۲۰ درصد دیده شد.

به منظور بررسی اثر حلال های آلی بر روی پایداری آنزیم، هفت حلال آلی با ارزش  $\log P_{OW}$  بین ۱/۹۷ تا ۱/۳۷۶- با غلظت های (v/v) ۲۰ و ۵۰ درصد با نمونه آنزیمی مخلوط شدند. فعالیت آنزیمی به مدت هفت روز سنجش شد. نیمه عمر فعالیت آمیلولیتیکی و پولولیتیکی آنزیم در جدول ۲ نشان داده شده است. همانطور که در جدول دیده می شود، نیمه عمر فعالیت آمیلولیتیکی در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد و در عدم حضور حلال های آلی ۲۵۰ ساعت و نیمه عمر فعالیت

جدول ۲- اثر حلال های آلی بر روی فعالیت آمیلولیتیکی و پولولیتیکی آنزیم آمیلوپولولاناز

غلظت حلال (۲۰ درصد)		غلظت حلال (۵۰ درصد)		Log $P_{OW}$	حلال آلی
نیمه عمر فعالیت پولولیتیکی (ساعت)	نیمه عمر فعالیت آمیلولیتیکی (ساعت)	نیمه عمر فعالیت پولولیتیکی (ساعت)	نیمه عمر فعالیت آمیلولیتیکی (ساعت)		
۱۶۵	۲۵۰	۱۶۵	۲۵۰	-	-
۱۵۰	۲۳۰	۱۶۰	۲۴۰	۱/۹۷	کلروفرم
۱۲۵	۲۱۵	۱۴۰	۲۲۰	۰/۸۸	n- بوتانول
۳۳	۵۳	۱۶	۴۰	۰/۰۷۴	پروپانول
۶۵	۱۰۱	۷۲	۸۲	-۰/۰۳۸	DMF
۱۵۵	۱۵۵	۱۶۰	۲۸۰	-۰/۲۰۸	استون
۵۷	۹۹	۵۰	۵۴	-۰/۲۲	اتانول
۴۶	۴۱	۴۴	۳۶	-۱/۳۹	DMSO

مشابه با جرم مولکولی آمیلوپولولاناز جدا شده از *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (۱۵۰ کیلو دالتون)، *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39 E (۱۴۰ کیلو دالتون)، *Thermococcus siculi* (۱۳۱ کیلو دالتون) است (۱۵، ۱۷، ۱۸ و ۱۹). دمای بهینه برای فعالیت آنزیم آمیلوپولولاناز سویه Ha25 (۵۰ درجه سانتی گراد) مشابه با دمای مشاهده شده برای فعالیت آنزیم های  $\alpha$ -آمیلاز نمک دوست جدا شده از *Haloferax mediterranei* و *Haloarcula hispanica*

## بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه برای اولین بار یک آنزیم آمیلوپولولاناز نمک دوست و مقاوم به حلال گزارش شده است. بررسی های بیوشیمیایی، فنوتیپی و تعیین توالی ژن rRNA ۱۶S نشان دادند که سویه Ha25 به جنس *Halorubrum* متعلق است. آنزیم تولید شده در محیط کشت مایع، به کمک رسوب دهی اتانولی و ستون تعویض آنیونی خالص شد. جرم مولکولی آنزیم آمیلوپولولاناز با کمک SDS-PAGE به میزان تقریبی ۱۴۰ کیلو دالتون تعیین شد. جرم مولکولی این آنزیم

آمیلازهایی که دارای این تحمل بالای نمک هستند، می‌توانند در تصفیه پساب‌های آلوده به ترکیبات نشاسته‌ای و دارای نمک بالا به کار بروند (۳۱). با توجه به این که که بسیاری از آنزیم‌ها عملکرد خود را در حضور حلال‌های آلی از دست می‌دهند، دستیابی به آنزیم‌هایی که به حلال‌های آلی مقاومت دارند بسیار ارزشمند بوده و دارای کاربردهای متعددی در صنایع است. عوامل متعددی نظیر تغییر ساختار فضایی آنزیم، از دست رفتن انعطاف‌پذیری و کاهش آب فعال اطراف آنزیم در از دست رفتن فعالیت آنزیم در حضور حلال‌های آلی نقش دارند. آنزیم‌هایی که به شکل طبیعی دارای مقاومت به حلال‌های آلی هستند می‌توانند دارای کاربردهای متعددی در جهت عملکرد در محیط‌های واجد این حلال‌ها باشند، زیرا در این صورت نیازی به استفاده از روش‌های مهندسی پروتئین در جهت ایجاد پایداری آنزیم‌های معمولی نیست (۳۳). بررسی نیمه عمر فعالیت آمیلولیتیکی و پولولیتیکی آنزیم در حضور غلظت ۲۰ و ۵۰ درصد حلال‌های آلی نشان داد که پایداری آنزیم در حضور حلال‌های آلی غیر قابل اختلاط با آب بیشتر از حلال‌هایی است که قابل اختلاط با آب هستند. در این مورد دو استثنا دیده شد، به این صورت که آنزیم در حضور حلال پروپانول کمترین و در حضور حلال استون بیشترین نیمه عمر را دارا بود. این نتایج نشان می‌دهند که پایداری آنزیم وابسته به قطبیت حلال مورد بررسی است، به این صورت که با افزایش قطبیت حلال میزان پایداری آنزیم کاهش پیدا می‌کند و برعکس. پایداری  $\alpha$ -آمیلازهای نمک‌دوست جدا شده از *Haloarcula* sp.، *Nesterenkonia* sp. strain F و *Thalassobacillus* sp. strain DF-E4 و strain S-1

است (۲۰ و ۲۱). در بسیاری از موارد دمای بهینه آنزیم‌های آمیلوپولولاناز بیشتر از ۵۰ درجه سانتی‌گراد بوده است. برای مثال دمای بهینه آمیلوپولولاناز جدا شده از *Pyrococcus furiosus* (۱۰۵ درجه سانتی‌گراد)، *Closteridium thermosulfurogenes* SVM17 (۷۰ درجه سانتی‌گراد) و *Geobacillus stearothermophilus* (۶۵ درجه سانتی‌گراد) بوده است (۲۲، ۲۳ و ۲۴). هر دو فعالیت آمیلولیتیکی و پولولیتیکی آنزیم آمیلوپولولاناز در محدوده‌ی وسیعی از اسیدیته حفظ می‌شوند، مشابه با آنچه که در مورد  $\alpha$ -آمیلازهای نمک‌دوست جدا شده از *Halomonas meridiana*، *Bacillus cereus* Ms6 و *Marinobacter* sp. EMB دیده شده است (۲۵، ۲۶ و ۲۷). در حالی که اسیدیته بهینه‌ای که برای فعالیت این آمیلوپولولاناز تعیین شده است بیشتر از مقادیر گزارش شده برای پولولاناز جدا شده از *Desulforuococcus mucosus* (pH ۵) و *Fervidobacterium pennavorans* Ven5 (pH ۶) و *P. woesei* (pH ۶) و آمیلوپولولاناز جدا شده از *Thermoanaerobacter* strain B6A (pH ۵) بوده است (۲۸، ۲۹ و ۳۰).

هر دو فعالیت آمیلولیتیکی و پولولیتیکی آنزیم در محدوده غلظت NaCl بین صفر تا ۴/۵ مولار دیده شده و فعالیت بهینه آن‌ها به ترتیب در غلظت ۲ و ۳/۵ مولار از نمک تعیین شد. این تحمل بالای نمک در آمیلازهای نمک‌دوست جدا شده از

*Har. hispanica*، *Hfx. mediterranei* و *Chromohalobacter* و *Nesterenkonia* sp. strain F و *sp. TVSP 101* نیز دیده شده است (۲۰، ۲۱، ۳۱ و ۳۲).

## References

- (1) Fazeli M, Amoozegar M A, Habibi Rezaei M, Siroosi M, Production of an extracellular halophilic Pullulanase by *Halorubrum* sp. strain Ha25 isolated from Aran-Bidgol lake. *Iranian Journal of Biology*, in press
- (2) Grant W D, Kamekura M, McGenity T J, Ventosa A. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Springer; 2001; 294–334. (*The Archaea and Deeply Branching and Phototrophic Bacteria*; vol 1).
- (3) Margesin R, Schinner F. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles* 2001; 5 (2): 73-83.
- (4) Adams M W W, Kelly R M. Enzymes from microorganisms in extreme environments. *Chem. Eng. News* 1995; 73 (51): 32-42.
- (5) Makhdoumi Kakhki A, Amoozegar M A, Mahmodi Khaledi E. Diversity of hydrolytic enzymes in haloarchaeal strains isolated from salt lake. *Int. J. Environ. Sci. Tech.* 2011; 8 (4): 705-714.
- (6) Mevarech M, Frolov F, Gloss L M, Halophilic enzymes: proteins with a grain of salt. *Biophys Chem* 2000; 86 (2): 155-164.
- (7) Sivaramakrishnan S, Gangadharan D, Nampoothiri K M, Soccol C R, Pandey A.  $\alpha$ -Amylases from microbial sources-an overview on recent developments. *Food Technol Biotechnol* 2006; 44 (2): 173-184.
- (8) Niehaus F, Bertoldo C, Kaehler M, Antranikian G. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1999; 51 (6): 711-729.
- (9) Doma nacute-Pytka M, Bardowski J, Pullulan degrading enzymes of bacterial origin. *Crit Rev Microbiol* 2004; 30 (2): 107-21.

نیز همانند آنچه که در این مطالعه دیده شد بسته به قطیبت حلال مورد بررسی دارد (۳۱، ۳۴ و ۳۵).  
 آنالیز محصولات قندی تولید شده حاصل از عملکرد آنزیم روی سوبستراهای نشاسته محلول و پولولان نشان داد که آنزیم تنها قند گلوکز را ایجاد می کند. این موضوع نشان می دهد که آنزیم قادر به شکست پیوندهای گلیکوزیدی (۱،۴)  $\alpha$ - و (۱،۶)  $\alpha$ - بوده و به این ترتیب نوع آنزیم، به احتمال زیاد آمیلوپولولاناز است. زیرا این آنزیم برخلاف سایر اعضای خانواده پولولانازها پنوز و ایزوپنوز را تولید نکرده و از طرفی قابلیت هیدرولیز پیوند گلیکوزیدی (۱،۴)  $\alpha$ - را دارد. به منظور بررسی تولید احتمالی مقادیر بسیار کم از مالتوتریوز توسط این آنزیم که در روش کروماتوگرافی لایه نازک مشخص نشده است، ولی از مشخصات آنزیم آمیلوپولولاناز است لازم است که از روش حساسی نظیر HPLC استفاده کرد.

نتایج تحقیق حاضر نشان می دهند که *Halorubrum* سویه Ha25 یک منبع تولید آنزیم آمیلوپولولاناز گرمادوست و نمک دوست افراطی است. تولید این آنزیم در شرایط سختی مانند دمای بالا، غظت نمک زیاد و آب فعال کم انجام شده و از این رو می تواند در چنین شرایطی که در صنایع بسیار دیده می شود، کاربرد داشته باشد.

- (10) Kim O S, Cho Y J, Lee K, Yoon S H, Kim M, Na H et al., Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA Gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J Syst Evol Microbiol* 2012; 62 (3): 716-21.
- (11) Dyall-Smith M. The Halohandbook: *Protocols for halobacterial genetics*. March 2009; [39] Available at: <http://www.microbiol.unimelb.edu.au/people/dyallsmith/resources/halohandbook/index.html>.
- (12) Miller G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal Chem* 1959; 31 (3) :426-428.
- (13) Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal biochem* 1976; 72 (1-2): 248-54.
- (14) Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970 (5259) ; 227: 680-5.
- (15) Chung Y C, Kobayashi T, Kanai H, Akiba T, Kudo T. Purification and Properties of Extracellular amylase from the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus profundus* DT5432. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61 (4): 1502-06.
- (16) Mrudula S, Gopal R, Seenayya G. Purification and characterization of highly thermostable amylopullulanase from a thermophilic, anaerobic bacterium *Clostridium thermosulfurogenes* SVM17. *MJM* 2011; 7 (2): 97-106.
- (17) Ganghofner D, Kellermann J, Staudenbauer W, Bronnenmeier K. purification and properties of amylopullulanase, a glucoamylase and an alpha glucosidase in the amylolytic enzyme system of *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*. *Biosci Biotechnol Biochem* 1998; 62 (2): 302-08
- (18) Mathupala S, Lowe S, Gregory Zeikus J. Sequencing of the Amylopullulanase (apu) Gene of *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E, and Identification of the Active Site by Site-directed Mutagenesis. *J Biol Chem* 1993; 268 (22): 16332-34.
- (19) Jiao Y, Ming-Sheng L, Xu J, Fang Y. A GH57 Family Amylopullulanase from Deep-Sea *Thermococcus siculi*: Expression of the Gene and Characterization of the Recombinant Enzyme. *Curr Microbiol* 2011; 62 (1): 222-8.
- (20) Hutcheon G, Bolhuis A. Characterisation of a highly stable  $\alpha$ -amylase from the halophilic archaeon *Haloarcula hispanica*. *Extremophiles* 2005; 9 (6): 487-95.
- (21) Perez-Pomares F, Ferrer J, Pire C, Marhuenda-Egea FC, Bonete MJ.  $\alpha$ -Amylase activity from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*. *Extremophiles* 2003; 7 (4): 299-306.
- (22) Dong G, Vieille C, Zeikus G. Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding amylopullulanase from *Pyrococcus furiosus* and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997; 63 (9): 3577-84.
- (23) Mrudula S, Reddy G, Gunda S. Purification and characterization of highly thermostable amylopullulanase from a thermophilic, anaerobic bacterium *Clostridium thermosulfurogenes* SVM17. *MJM* 2011; 7: 97-106.
- (24) Zareian S, Khajeh K, Ranjbar B, Dabirmanesh B, Ghollasi M, Mollania N. Purification and characterization of a novel amylopullulanase that converts pullulan to glucose, maltose, and maltotriose and starch to glucose and maltose. *Enzyme Microbial Technol* 2010; 46 (2): 57-63.
- (25) Al-ZaZaee M M, Gurumurthy D M, Rajeshwara A N. Identification, Characterization of Novel Halophilic *Bacillus Cereus* Ms6: a Source for Extra Cellular  $\alpha$ -Amylase. *Adv in Env Biol* 2011; 5 (5): 992-9.

- (26) Coronado M J, Vargas C, Hofemeister J, Ventosa A, Nieto J. Production and biochemical characterization of an  $\alpha$ -amylase from the moderate halophile *Halomonas meridiana*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2000; 183 (1): 67-71.
- (27) Duffner F, Bertoldo C, Andersen J T, Wagner K, Antranikian G. A new thermoactive pullulanase from *Desulfurococcus mucosus*: Cloning, sequencing, purification, and characterization of the recombinant enzyme after expression in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 2000; 182 (22): 6331-38.
- (28) Danson M J, Hough D W. The structural basis of protein halophilicity. *Comp. Biochem. Physiol.* 1997; 117 (3): 307-12.
- (29) Diger A, Antranikian G. Isolation and Characterization of a Heat-Stable Pullulanase from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus woesei* after Cloning and Expression of Its Gene in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995; 61 (2): 567-75.
- (30) Saha B, Lamed R, Lee C, Mathupala S. Characterization of an endo-Acting Amylopullulanase from *Thermoanaerobacter* Strain B6A. *Appl Environ Microbiol* 1990; 56 (4): 881-6.
- (31) Shafiei M, Ziaee A, Amoozegar M A. Purification and characterization of an organic-solvent-tolerant halophilic  $\alpha$ -amylase from the moderately halophilic *Nesterenkonia* sp. strain F. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2011; 38 (2): 275-81.
- (32) Prakash B, Madhukumar M S, Muralikrishna G, Sreeramulu K. Production, purification, and characterization of two extremely halotolerant, thermostable, and alkali-stable  $\alpha$ -amylases from *Chromohalobacter* sp. TVSP 101. *Process Biochem* 2009; 44 (2): 210-15.
- (33) Doukyua N, Ogino H. Organic solvent-tolerant enzymes. *Biochem Eng J* 2010; 48 (3): 270-82.
- (34) Fukushima T, Echigo A, Inoue A, Usami R. Organic solvent tolerance of halophilic  $\alpha$ -amylase from a haloarchaeon, *Haloarcula* sp. strain S-1. *Extremophiles* 2005; 9 (1): 85-9.
- (35) Xin Li, Yu Y Y. Characterization of an organic solvent-tolerant  $\alpha$ -amylase from a halophilic isolate, *Thalassobacillus* sp. LY18. *Folia Microbiologica* 2012; 57 (5): 447-53.

- 
- <sup>1</sup>. Extremophiles
  - <sup>2</sup>. Extremozymes
  - <sup>3</sup>. Amersham Biosciences
  - <sup>4</sup>. Laemmli
  - <sup>5</sup>. Dimethyl sulfoxide (DMSO)
  - <sup>6</sup>. N,N-Dimethyl formamide (DMF)
  - <sup>7</sup>. Lineweaver-Burk



## Purification and characterization of an extracellular halophilic and organic solvent-tolerant amylopullulanase from a haloarchaeon, *Halorubrum* sp. strain Ha25.

**Maryam Siroosi** \*\*

PhD student of Microbiology, University of Tehran, Iran, msiroosi@ut.ac.ir

**Mohammad Ali Amoozegar** \*\*\*

Associate Professor of Microbiology, University of Tehran, Iran, amoozegar@ut.ac.ir

**Khosro Khajeh**

Professor of Biochemistry, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, khajeh@modares.ac.ir

**Mehran Habibi Rezaei** \*\*\*

Assistant Professor of Biochemistry, University of Tehran, Iran, mhabibi@khayam.ut.ac.ir

**Mostafa Fazeli** \*\*

M.Sc. of Microbiology, University of Tehran, Iran, mfazeli65@gmail.com

### Abstract

**Introduction:** Halophiles, especially haloarchaea are one of the most important groups of extremophiles. Halophilic hydrolases have been studied worldwide and have been considered for biotechnology and industrial technologies. This study is the first report in amylopullulanase production in halophilic microorganisms.

**Materials and methods:** A halophilic archaeon, *Halorubrum* sp. strain Ha25, produced extracellular halophilic organic solvent-tolerant amylopullulanase. The enzyme was purified using ethanol precipitation and anion exchange chromatography method. Molecular mass of purified enzyme was determined by SDS-PAGE method. After purification, the enzyme was characterized. To study the effects of organic solvents in the stability of the enzyme, the enzyme solution was incubated in the presence of various organic compounds and then, residual enzyme activity was measured. Mode of action of the enzyme was determined by thin-layer chromatography.

**Results:** Molecular weight of the purified enzyme was estimated to be 140 kDa by SDS-PAGE method. Optimum temperature for amylolytic and pullulytic activities was 50 °C. Optimum pH for amylolytic activity was 7.0 and for pullulytic activity was 7.5. This enzyme was active over a wide range of concentrations (0-4.5 M) of NaCl. The effect of organic solvents on the amylolytic and pullulytic activities showed that this enzyme was more stable in the presence of non-polar organic solvents than polar solvents. The enzyme solely hydrolyzed pullulan and soluble starch to glucose.

**Discussion and conclusion:** *Halorubrum* sp. strain Ha25 produces thermophilic and extremely halophilic amylopullulanase. The catalytic function under multi extreme condition of high temperature, high salinity, and low water activity might possess biotechnological and commercial values such as treatment waste solutions with starch residues, high salt content and solvents.

**Key words:** Halophilic amylopullulanase, Protein purification, Extreme halophilic archaea, *Halorubrum*, Organic solvent-tolerance

\* Corresponding Author

\*\* Extremophiles Lab, Dept. of Microbiology, Fac. of Biology and Center of excellence in Phylogeny of Living Organisms, College of Science, University of Tehran, Iran

\*\*\* Protein Biotechnology Lab., Dept. of Cell and Molecular Biology, College of Science, University of Tehran, Iran

**Received:** April 6, 2013 / **Accepted:** October 7, 2013