



جداسازی یک سویه بومی باسیلوس لیکنی فورمیس تولید کننده

آنزیم آلفا آمیلاز از منابع گرم استان سمنان

دکتر مجید مقبلی^{۱*}، حمید نوشیری^۲

^۱ استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، گروه میکروبیولوژی

^۲ کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، گروه میکروبیولوژی

چکیده

سابقه و هدف: آمیلاز یکی از آنزیم‌های صنعتی مهم می‌باشد که در صنایع غذایی، تولید شوینده‌ها، تولید گلوکز، نساجی و کاغذسازی کاربرد دارد. باسیلوس‌ها، از مهم‌ترین میکروارگانیسم‌های تولید کننده آمیلاز و پروتئاز می‌باشند. هدف از این پژوهش جداسازی باسیلوس گرمادوست مولد آنزیم آلفا - آمیلاز از منابع گرم استان سمنان و تعیین فعالیت آنزیم آلفا - آمیلاز می‌باشد. مواد و روش‌ها: به صورت تصادفی نمونه‌های خاک و کود از محیط و آب از چشمه‌های آب گرم استان جمع‌آوری شد. پس از تهیه رقت، نمونه‌ها بر روی محیط کشت نشاسته آگار کشت و سپس از نظر تولید آمیلاز مورد بررسی قرار گرفتند. فعالیت آنزیم آلفا - آمیلاز تولیدی به وسیله باکتری‌های جدا شده با استفاده از روش دی نیتروسالیسیلیک اسید (DNS) اندازه‌گیری شد. یافته‌ها: از بین ۱۰ نمونه باکتری تولید کننده آمیلاز جدا شده، دو نمونه دارای بیشترین میزان فعالیت ۱۰۴/۵۰/ml و ۶۱/۲۰/ml بودند. هر دو نمونه متعلق به جنس باسیلوس‌ها بوده که اولی مزوفیل و دومی گرمادوست بود. با توجه به جدول باسیلوس‌های کتاب برگه مشخص گردید که نمونه گرمادوست متعلق به گونه باسیلوس لیکنی فورمیس می‌باشد. نتیجه‌گیری: با توجه به مصرف بالای آنزیم آمیلاز و عدم تولید این آنزیم در ایران، سویه باکتریایی باسیلوس لیکنی فورمیس جدا شده در این پژوهش باتوان تولید ۶۱/۲۰/ml آنزیم آمیلاز می‌تواند پس از تغییرات ژنتیکی به عنوان یک کاندید مناسب جهت تولید این آنزیم مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: باسیلوس لیکنی فورمیس، آلفا آمیلاز، چشمه آب گرم

دریافت مقاله: خرداد ۸۸ پذیرش برای چاپ: مرداد ۸۸

مقدمه

آنکه یک سویه صنعتی خوب مقدار زیادی آنزیم با تراکم بالا تولید کند. عموماً سویه وحشی آنزیم مطلوب را در مقادیر کمتر از نیاز تجارتهای تولید می‌کند. در مرحله بعد باید مهار کاتالیتیکی را کاهش داده یا رفع کرد که برای انجام این کار می‌توان از تغییرات ژنتیکی و یا بهینه‌سازی محیط استفاده کرد. آمیلازها، پروتئازها، لیپاز و سلولاز از مهم‌ترین آنزیم‌های ارزشمند از نظر تجاری هستند (۱ و ۲).

آمیلازها آنزیم‌هایی هستند که نشاسته را هیدرولیز می‌کنند. صنایع تبدیلی نشاسته به گلوکز، تولید الکل از منبع نشاسته‌ای، صنایع

اغلب میکروارگانیسم‌ها آنزیم‌هایی را که یک واکنش را هدایت می‌کنند تولید می‌نمایند، اما مقدار آنزیم‌های تولید شده در ارگانیسم‌های مختلف متفاوت است. در هنگام شناسایی یک میکروارگانیسم مولد یک آنزیم مطلوب، برای تبدیل آن به سویه مناسب در مقیاس تجارتهای چند مرحله ضروری است. نخست

* آدرس برای مکاتبه: دامغان، جاده چشمه علی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی تلفن: ۰۹۱۲ ۲۲۱ ۸۶۱۲
پست الکترونیک: Moghbeli552@gmail.com

(۱۰). در سال ۲۰۰۸ آمیلازی از یک باسیلوس جدا گردید که با بقیه آمیلازهای باسیلوسی از نظر ترادف اسید آمینه‌ای تفاوت زیادی داشت و به عنوان یک آمیلاز جدید معرفی گردید (۱۱). نیاز سالیانه آمیلاز مصرفی در ایران بالغ بر ۱۰۰ تن در سال است که متأسفانه تمامی آن از خارج کشور وارد می‌شود. هدف از این پژوهش، جداسازی یک سویه باسیلوس گرمادوست از منابع گرم طبیعی استان سمنان و بهینه سازی آن به منظور تولید آمیلاز است.

مواد و روش ها

الف) تهیه و کشت نمونه ها

تهیه نمونه آب: برای نمونه‌گیری از چشمه آب گرم یک لوله ۵۰ میلی لیتری استریل و یک ظرف چهار لیتری تهیه شد. لوله ۵۰ میلی لیتری به عمق حدود نیم متری آب چشمه منتقل و درب آن باز شده و پس از پر شدن، در زیر آب در آن بسته شده و سپس به منظور کشت به آزمایشگاه منتقل گردید. از ظرف چهار لیتری نیز برای ساخت محیط کشت از آب چشمه استفاده شد. تهیه نمونه خاک: از سه منطقه داخل دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان که تحت تاثیر دمای روزانه بالا قرار دارند با استفاده از یک دستکش استریل خاک به داخل لوله ۵۰ میلی لیتری انتقال داده و به آزمایشگاه منتقل گردید.

تهیه نمونه کود حیوانی: از یکی از دامداری های اطرف دامغان که دارای کود دامی گرم با دمای حدود ۵۵ درجه سانتی گراد می باشد با استفاده از یک کیسه فریزر حدود ۲۰ گرم جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید.

کشت نمونه آب: با توجه به اینکه ترکیب شیمیایی چشمه آب گرم مشخص نبود، از آب چشمه برای تهیه محیط کشت نشاسته آگار استفاده شد. در واقع به جای آب مقطر، از آب چشمه آب گرم برای تهیه محیط نشاسته آگار استفاده شد و سپس اتوکلاو گردید. پس از آماده شدن پلیت های محیط کشت، از نمونه آب به ترتیب ۱/۵mL، ۳mL و ۴/۵mL در شرایط استریل در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ کرده و رسوب حاصله در ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی آن سوسپانسیون شده و سپس بر روی پلیت های نشاسته آگار تهیه شده کشت داده شدند. همچنین ۱۰۰

تولید کاغذ، صنایع نساجی، صنایع غذایی و صنایع تولید کننده شوینده ها مهم ترین زمینه های کاربردی آمیلازها می باشند (۲، ۳ و ۴). آلفا آمیلازها به وسیله تعداد زیادی از باکتری ها و قارچها تولید می شوند. این آنزیمها بر اساس میزان مایع سازی نشاسته (اثر ساکاروزنیک)، pH بهینه، محدوده دمایی و میزان پایداری طبقه بندی می شوند. مهم ترین باکتری های تولید کننده آلفا آمیلاز عبارتند از: باسیلوس سوبتیلیس، باسیلوس سرئوس، باسیلوس آیلولیکوفاشینس، باسیلوس کوآگولانس، باسیلوس پلی میکسا (نام جدید آن *Paenibacillus polymyxa*)، باسیلوس استرئوترموفیلوس (نام جدید آن *Geobacillus stearothermophilus*)، باسیلوس کالدولیتیکوس و جنس هایی مانند میکروکوکوس، سودوموناس، آرتروباکتر، اشیشیا، پروتئوس، ترمونوسپورا و سراشیا (۵ و ۶). از قارچ های مهم تولید کننده می توان پیسیلومیسس (*Paecilomyces*) را نام برد که آلفا آمیلاز مقاوم به حرارت و فعال در مجاورت کلسیم و کبالت تولید می کند (۷).

یکی از مهم ترین سویه های صنعتی که در حال حاضر توسط شرکت های تولید کننده آلفا آمیلاز استفاده می شود Termamyl LC نام دارد. این سویه از گونه باسیلوس لیکنی فورمیس است که با روش های مهندسی ژنتیک چهار جهش بر روی ژن آلفا آمیلاز آن ایجاد شده و در نتیجه پایداری آنزیم تولیدی در دما و pH بالا و غلظت کلسیم پایین بیشتر شده است (۴).

به منظور تولید آلفا آمیلاز از فرمانتورهای ۲۰۰-۱۲۰ هزار لیتری و محیط کشت با ترکیب ۵٪ نشاسته، ۵۶٪ NH_4NO_3 ، ۲۸٪ سیترات سدیم، ۱۳٪ KH_2PO_4 ، ۵٪ MgOSO_4 ، ۱٪ CaCl_2 ، ۵٪ پپتون، ۲٪ عصاره مخمر و pH برابر با ۶/۸ استفاده می شود (۴ و ۵). تولید آلفا آمیلاز به وسیله چند ژن تنظیم می شود (۴). ژن آلفا آمیلاز باسیلوسی دارای اندازه ۱۹۴۸ باز بوده و ۴۸۳ اسید آمینه با پروتئینی با وزن مولکولی ۵۵۲۰۰ دالتون کد می کند. ژن آلفا آمیلاز باسیلوس لیکنی فورمیس ۶۴/۵٪ شباهت با آلفا آمیلاز ژئوباسیلوس استرئوترموفیلوس و ۸۰/۳٪ شباهت با آلفا آمیلاز باسیلوس آیلولیکوفاشینس دارد (۸ و ۹). باکتری *Kocuria varians* شش شکل مختلف آلفا آمیلاز تولید می کند که دومین اتصال به نشاسته این اشکال به بقیه آمیلازها شباهت دارد

جدول ۱: غلظت های آنزیم و جذب آن ها با روش DNS.

غلظت آنزیم (U)	جذب در ۵۴۰nm
۲۴	۰/۵۳۵
۳۰	۰/۵۹۸
۳۶	۰/۶۷۸
۴۲	۰/۷۳۷
۴۸	۰/۸۱۸
۵۴	۰/۸۸
۶۰	۰/۹۲۳
۶۶	۰/۹۸۲
۷۲	۱/۰۳۳
۷۸	۱/۰۹۴
۸۴	۱/۱۶
۹۰	۱/۲۵
۹۶	۱/۳۲
۱۰۲	۱/۴۱
۱۰۸	۱/۴۹

به لوله تست استریل اضافه گردید. سپس ۱mL نشاسته ۱ درصد به آن اضافه کرده و در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. در نهایت واکنش به وسیله اضافه کردن ۲mL معرف دی نیتروسالیسیلیک اسید (DNS) متوقف گردید و شدت رنگ (جذب) در ۵۴۰ نانومتر بررسی گردید. آنزیم آمیلاز استاندارد و DNS از شرکت سیگما، پیتون باکتریولوژیکال، نشاسته و محیط کشت برابین هارت اینفیوژن برات (B.H.I.) از شرکت مرک تهیه شدند.

ه) رسم منحنی استاندارد فعالیت آمیلاز: برای بدست آوردن میزان فعالیت آمیلازی نمونه های جدا شده، منحنی استاندارد فعالیت آمیلاز با استفاده از رقت های ۲۴، ۳۰، ۳۶، ۴۲، ۴۸، ۵۴، ۶۰، ۶۶، ۷۲، ۷۸، ۸۴، ۹۰، ۹۶، ۱۰۲ و ۱۰۸ واحد آمیلاز استاندارد سیگما (۳u/mg) و روش DNS و خواندن جذب در ۵۴۰nm رسم گردید.

و) تعیین هویت باکتری ها: از بین باکتری های جدا شده یکی از انواع باسیلوس های گرم مثبت گرمادوست انتخاب و بر اساس جداول کتاب Bergey's Manual of Systematic Bacteriology و تست های بیوشیمیایی، باکتری های یاد شده در حد گونه تعیین هویت گردید (۱۳).

میکرولیتر نیز از نمونه آب به طور مستقیم کشت داده شد.

کشت نمونه خاک و کود: یک گرم از نمونه های خاک و کود انتقال داده شده به آزمایشگاه جداگانه در ۹ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل سوسپانسیون شده و پس از ۱۰ دقیقه ساکن گذاشتن نمونه و راسب شدن ذرات سنگین، محلول رویی به ترتیب تا یک ده هزارم با سرم فیزیولوژی استریل رقیق شد. در مرحله بعد ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه های رقیق شده ۱/۱۰۰، ۱/۱۰۰۰ و ۱/۱۰۰۰۰ بر روی محیط کشت نشاسته آگار کشت داده شد.

ب) بررسی کلنی های رشد کرده و خالص سازی هر نمونه بطور جداگانه: نمونه های رشد کرده از نظر مشخصات کلنی بررسی و سپس از هر نوع کلنی به طور مجزا بر روی محیط کشت نوترینت آگار به صورت خطی کشت داده شد تا نمونه ها خالص گردند. سپس با استفاده از روش رنگ آمیزی گرم و اسپور تعیین هویت مقدماتی گردید.

ج) بررسی اولیه تولید آمیلاز: هر نمونه باکتری خالص شده بر روی محیط کشت نشاسته آگار کشت داده شد و پس از گرماگذاری به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه، با استفاده از لوگل هاله تجزیه نشاسته ارزیابی شد (۸) و کلنی های دارای هاله بزرگتر برای مرحله بعد انتخاب شدند.

د) تایید فعالیت آمیلازی: پس از جداسازی سویه های آمیلاز مثبت از روش DNS (۲ و ۱۲) برای بررسی میزان فعالیت آمیلاز تولیدی استفاده شد. برای این منظور یک لوپ پر از باکتری از پلیت تازه کشت داده شده به ۵۰mL محیط کشت تولید آمیلاز (۶g/L پیتون باکتریولوژیکال، ۰/۵g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، ۰/۵g/L KCl، ۱g/L نشاسته) اضافه گردید و در انکوباتور شیکردار به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد در دور ۱۵۰rpm گرماگذاری گردید. سپس ۱mL از محیط یاد شده به ۴mL آب مقطر استریل اضافه و در طول موج ۶۰۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر جذب آن سنجیده شد. در مرحله بعد ۱mL از محیط رقیق شده دارای $OD=0.5 \pm 0.05$ به ۵۰mL از محیط تولید آمیلاز افزوده و در شیکر لرزان انکوباتور به مدت ۲۴۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در دور ۱۵۰rpm قرار داده شد. ۱/۵mL از محیط کشت به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۵۰۰rpm سانتریفیوژ گردید و ۱mL از محلول رویی (آنزیم خام) جدا شده و

جدول ۲: بررسی میزان آمیلاز تولیدی بوسیله باکتری های جدا شده از خاک و آب

زمان	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
نمونه	میزان تولید آمیلاز (u/ml)	میزان تولید آمیلاز (u/ml)	میزان تولید آمیلاز (u/ml)
خاک ۱	۳۶	۴۷/۶	۱۰۴/۹
خاک ۲	۱۱/۲۷	۳۸/۲	۵۸/۱۴
خاک ۳	۰	۲۵/۵	۳۲/۷
خاک ۴	۰	۱۵/۲	۲۰/۰۸
خاک ۵	۷/۹۷	۵۵/۳	۵۹/۹
آب ۱	۱۶/۱۲	۳۸/۴	۶۱/۲
آب ۲	۱۲/۱۱	۳۰/۳	۴۵/۴

نتایج

الف) نتایج حاصل از کشت نمونه‌ها: از کشت نمونه چشمه آب گرم بر روی پلیت نشاسته آگار با توجه به مشخصات ظاهری دو نوع و از کشت نمونه‌های خاک مجموعاً شش نوع کلنی شناسایی گردید. اما از کشت نمونه کود بر روی محیط نشاسته آگار هیچ رشدی مشاهده نگردید. هر دو نمونه باکتری جدا شده از آب چشمه گرم، باسیل‌های گرم مثبت با طول حدود ۳-۴ میکرومتر و اسپور بیضی شکل و نزدیک به انتها بودند. تمامی جدایه‌های نمونه خاک نیز باسیلوس گرم مثبت و دارای اسپور بیضی شکل و نزدیک به انتها بودند. تنها نمونه کلنی شماره ۲ اسپور بزرگتر از قطر باکتری (swollen) را داشت.

ب) نتایج بررسی اولیه تولید آمیلاز بر روی محیط نشاسته آگار: در اطراف تمام باکتری‌های کشت داده شده هاله شفاف مشاهده گردید اما قطر هاله‌های ایجاد شده در مورد نمونه‌ها متفاوت بود که بیشترین قطر هاله مربوط به کلنی‌های ۱ نمونه خاک (mnsc1) و یک نمونه آب (mnwcl) بود.

ج) رسم منحنی استاندارد بررسی میزان آمیلاز: برای بررسی میزان آمیلاز ابتدا منحنی استاندارد بررسی میزان آمیلاز با استفاده از غلظت‌های مختلف آنزیم آلفا آمیلاز سیگما (۳u/mg) و روش DNS با استفاده از نرم افزار Excel ترسیم گردید. در جدول ۱ غلظت‌های مختلف آنزیم و جذب آن‌ها با روش DNS و منحنی آن در تصویر ۱ نشان داده شده است.

ه) بررسی میزان آمیلاز تولیدی به وسیله باکتری های جدا شده: برای

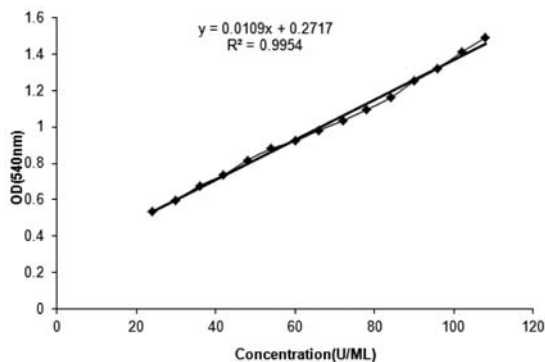
بدست آوردن مدت زمان مناسب تولید آمیلاز ابتدا پارامتر زمان بر روی نمونه شماره ۱ خاک (mnsc1) بررسی گردید به این صورت که باکتری در محیط تولید آمیلاز کشت داده شده و در انکوباتور شیکردار قرار داده شده و سپس میزان آمیلاز با استفاده از روش DNS و مقایسه با منحنی استاندارد در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت به ترتیب ۲۵/۲، ۴۶/۹۵، ۱۰۴/۶، ۷۸/۷ و ۲۰/۲ بود. به این ترتیب بیشترین میزان آمیلاز پس از ۷۲ ساعت گرماگذاری در محیط بود و پس از آن میزان آن کاهش داشت.

با توجه به این نتایج، میزان آمیلاز تولیدی به وسیله تمام نمونه‌های جدا شده طبق روشی که قبلاً توضیح داده شده بررسی گردید که نتایج در جدول ۲ آمده است.

همان‌گونه که ملاحظه می‌شود سویه شماره ۱ جدا شده از خاک (mnsc1) و نمونه شماره ۱ جدا شده از آب (mnwcl) به ترتیب بیشترین میزان تولید آمیلاز ۱۰۵u/ml و ۶۱/۲u/ml نسبت به بقیه سویه‌های جدا شده را داشتند. برای ارزیابی گرما دوست بودن باکتری‌های یاد شده در دماهای ۴۵، ۵۰، ۵۵، ۶۰ و ۶۵ کشت داده شدند. نتایج نشان داد که سویه mnwcl گرمادوست می‌باشد. با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی و قندی مطابق جداول کتاب برگگی (۱۴) مشخص شد که باکتری یاد شده متعلق به جنس و گونه باسیلوس لیکنی فورمیس می‌باشد.

بحث

آمیلاز از آنزیم‌های مهم صنعتی می‌باشد که مصارف مختلفی داشته و سالانه چند صد تن از آن مصرف می‌گردد. حدود ۵۰



شکل ۱: منحنی استاندارد بررسی میزان آمیلاز.

روش مشخص شد که یک نمونه جدا شده از خاک حدود ۱۰۵u/ml آمیلاز تولید می کند که این میزان نسبت به آمیلاز تولیدی توسط سویه های جدا شده از منابع طبیعی در منابع دیگر بیشتر است، اما متاسفانه این سویه گرمادوست نبود. در سال ۲۰۰۸ توسط Liu و همکاران سویه ای از جنس باسیلوس مقاوم به گرما با تولید ۵۳u/ml آمیلاز جدا گردید. در این تحقیق سویه دوم جدا شده از آب گرم، دارای توانایی تولید ۶۱/۲u/mg آمیلاز و متعلق به گونه باسیلوس لیکنی فورمیس بود. این گونه از مهم ترین گونه های مورد استفاده جهت تولید صنعتی آمیلاز است که با آزمایش های بیشتر می توان احتمال استفاده از این سویه جدا شده را بررسی کرد. در آینده می توان با ریبوتایپینگ و تعیین سکانس ژن آمیلاز آن جدید بودن سویه و آنزیم را بررسی کرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از مسئولین محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان به دلیل حمایت های اجرایی کمال امتنان را دارند.

باکتری و قارچ آمیلاز تولید می کنند. بارزترین آن ها گونه های باسیلوس نظیر باسیلوس سوبتیلیس و باسیلوس لیکنی فورمیس می باشند. سویه های مهم صنعتی تولید کننده آمیلاز از منابع طبیعی به خصوص منابع گرم مانند چشمه های آب گرم جدا شده اند (۳-۱). با توجه به این که برای تولید آنزیم های صنعتی نیاز به سویه مناسب و سپس تکنولوژی مربوطه می باشد هدف اصلی این پژوهش جداسازی سویه های گرمادوست تولید کننده آمیلاز از منابع گرم سمنان بود. به همین منظور مشابه اکثر تحقیقات به عمل آمده در این زمینه از خاک و آب چشمه آب گرم استفاده گردید. البته بر خلاف مقالات موجود از کود آلی نیز در این تحقیق استفاده گردید که فاقد سویه تولید کننده آمیلاز بود. از کشت نمونه ها، مطابق انتظار، تعداد و نوع کلنی های ایجاد شده از کشت خاک نسبت به آب بیشتر بود و تمامی جدایه ها نیز باکتری گرم مثبت اسپور دار بودند.

برای بررسی میزان دقیق آمیلاز تولیدی مانند اکثر منابع از روش DNS استفاده شد اما جهت رسم منحنی استاندارد از آنزیم استاندارد استفاده گردید در حالی که در منابع از غلظت های مختلف گلوکز استفاده شده است که دقت آن پایین تر از استفاده از غلظت های مختلف آنزیم استاندارد می باشد. با استفاده از این

References

- 1) Boyer, E.W., and M. B. Ingle. Extracellular alkaline amylase from a *Bacillus* species. *J. Bacteriol*, 1972; 110:992-1000.
- 2) Ivanova, V., E. Dobрева, E. Emanuilova. Purification and characterization of thermostable alpha-amylase from *Bacillus licheniformis*. *J. Biotechnol*, 1993; 28, 277-289.
- 3) Upadek, H., and B. Kottwitz. Application of amylases in detergents. In J. H. van Ee, O. Misset, and E. J. Baas (ed.), *Enzymes in detergency*. Marcel Dekker, Inc., New York. 1997; p. 203-212
- 4) Van der Laan, J. M. May Novel amylolytic enzymes derived from the *B. licheniformis*, having improved characteristics. International patent, 1995; WO 95/35382.
- 5) Van der Maarel, M.J.E.C., Van der Veen, B., Uitdehaag J.C.M., and H. Leemhuis. Properties and applications of starch-converting enzymes of the alfa amylase family (Review article). *J. Bacteriol*, 2002; 94: 137-155
- 6) Shafiei M, Ziaee AA, Amoozgar MA., Purification and characterization of an organic-solvent-tolerant halophilic α -amylase from the moderately halophilic *Nesterenkonia* sp. strain F. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2011; 38(2): 275-81
- 7) Michelin M, Silva TM, Benassi VM, Peixoto-Nogueira SC, Moraes LA, Leão JM, Jorge JA, Terenzi HF, Polizeli Mde L., Purification and characterization of a thermostable α -amylase produced by the fungus *Paecilomyces variotii*. *Carbohydr Res.*, 2010; 2 (16): 2348-53.

- 8) Nakajima, R., T. Imanaka, and S. Aiba. Comparison of amino acid sequences of eleven different α -amylase. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 1986; 23: 355-60.
- 9) Nakajima, R., T. Imanaka, and S. Aiba. Nucleotide sequence of the *Bacillus stearothermophilus* α -amylase gene. *J. Bacteriol*, 1985; 163: 401-6.
- 10) Yamaguchi R, Tokunaga H, Ishibashi M, Arakawa T, Tokunaga M., Salt-dependent thermo-reversible α -amylase: cloning and characterization of halophilic α -amylase from moderately halophilic bacterium, *Kocuria varians*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011; 89(3): 673-84
- 11) Liu XD, Xu Y, A novel raw starch digesting alpha-amylase from a newly isolated *Bacillus* sp. YX-1: purification and characterization. *Bioresour Technol*. 2008, 99(10):4315-20.
- 12) Harley M, Prescott J., *Laboratory exercise in microbiology*, 2002; Fifth edition. The McGraw Hill,
- 13) Stefanova, M., E. Emanuilova. Characterization of a thermostable alphaamylase from *Bacillus brevis*. *Eur. J. Biochem.*, 1992; 207, 345-9.
- 14) Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T., *Bergey's manual systematic bacteriology*, vol 2, part B, Springer.



Isolation of a Native *Bacillus licheniformis* Amylase Producer from Hot Source of Semnan

Majid Moghbeli¹, Hamid Noshiri²

¹Assistant Professor, Department of Microbiology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran

²M.Sc Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran

Abstract

Background and Objectives: Amylase is one of the important industrial enzymes, which is used in the food industry, detergent production, glucose, textile, and paper making. *Bacillus* spp. are considered as a major amylase and protease producer microorganisms. The main purpose for the study is isolating amylase positive thermophile *Bacillus* spp. from hot sources of Semnan province.

Material and Methods: Soil, fertilizer and water samples were collected from environment and the hot springs. After dilution preparation, samples were cultured on starch agar medium and then, potential of amylase producing was measured. Alpha-amylase enzyme activity of isolates was measured using di-nitro salicylic acid (DNS) method.

Results: Among 10 amylase producing isolated bacteria, two samples showed the highest amylase activity, 104.5u/ml and 61.2u/ml respectively. Although both the samples were diagnosed as *Bacillus* spp. one of them was belong to mesophile species while another one was detected as thermophile *Bacillus*. The thermophile *Bacillus* has been detected as a member of *B. licheniformis* according to Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.

Conclusion: Due to high consumption of amylase enzymes and lack of producing the enzymes in Iran, The isolated *Bacillus licheniformis* in this study, with 61.2 U product per mL, can be introduced as candidate for produce the favorite amount of the enzyme after proper genetic manipulations.

Keywords: *Bacillus licheniformis*, amylase, hot spring

Correspondence to: Majid Moghbeli

Tel: (+98)912-2218612

E-mail: Moghbeli552@gmail.com

Journal of Microbial World 2009, 2(3), 155-160