جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله دنیای میکروب ها
سال دوم، شماره سوم، پاییز ۱۳۸۸
صفحات ۱۶۰-۱۵۵

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 آزاداسلامی، 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 شوینده ها، 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 ـ آمیلاز از منابع گرم استان سمنان و تعیین فعالیت آنزیم آلفا ـ 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 ـ آمیلاز تولیدی به وسیله باکتری‌های جدا شده با استفاده از روش دی‌نیتروسالیسیلیک اسید (DNS) اندازه‌گیری شد.

یافته ها: از بین ۱۰ نمونه باکتری تولیدکننده آمیلاز جدا شده، دو نمونه دارای بیشترین میزان فعالیت ۱۰۴/۵u/ml و ۶۱/۲u/ml بودند. هر دو نمونه متعلق به جنس باسیلوس‌ها بوده که اولی مزوفیل و دومی گرمادوست بود. با توجه به جدول باسیلوس‌های کتاب برگی مشخص گردید که نمونه گرمادوست متعلق به گونه باسیلوس لیکنی فرمیس می‌باشد.

نتیجه گیری: با توجه به مصرف بالای آنزیم آمیلاز و عدم تولید این آنزیم در ایران، سویه باکتریایی باسیلوس لیکنی فرمیس جدا شده در این پژوهش باتوان تولید ۶۱/۲u/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

اغلب میکروارگانیسم‌ها آنزیم‌هایی راکه یک واکنش را هدایت می کنند 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 تجارتی چند مرحله ضروری است. نخست آنکه یک سویه صنعتی خوب مقدار زیادی آنزیم با تراکم بالا تولید کند. عموما سویه وحشی آنزیم مطلوب را در مقادیر کمتر از نیاز تجارتی 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 استفاده‌کرد. 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 نشاسته ای، صنایع

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

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

تولید کاغذ، صنایع نساجی، صنایع غذایی و صنایع تولید کننده شوینده‌ها مهم‌ترین زمینه‌های کاربردی آمیلازها می‌باشند (۲، ۳ و ۴). آلفا آمیلازها به‌وسیله تعداد زیادی از باکتری‌ها و قارچ‌ها تولید می‌شوند. این آنزیم‌ها بر اساس میزان مایع‌سازی نشاسته (اثر ساکاروژنیک)، pH بهینه، محدوده دمایی و میزان پایداری طبقه بندی می‌شوند. مهم‌ترین باکتری‌های تولید کننده آلفا آمیلاز عبارتند از: باسیلوس سوبتیلیس، باسیلوس سرئوس، باسیلوس آمیلولیکوفاشینس، باسیلوس کوآگولانس، باسیلوس پلی میکسا (نام جدید آن *Paenibacillus polymyxa*)، باسیلوس استئاروترموفیلوس (نام جدید آن *Geabacillus stearothermophilus*)، باسیلوس کالدولیتیکوس و جنس‌هایی مانند میکروکوکوس، سودوموناس، آرتروباکتر، اشریشیا، پروتئوس، ترمومونوسپورا و سراشیا (۵ و ۶). از قارچ‌های مهم تولید کننده می‌توان پیسیلومیسس (*Paecilimyces*) را نام برد که آلفا آمیلاز مقاوم به حرارت و فعال در مجاورت کلسیم و کبالت تولید می‌کند (۷).

یکی از مهم‌ترین سویه‌های صنعتی که در حال حاضر توسط شرکت‌های تولید کننده آلفا آمیلاز استفاده می‌شود Termamyl LC نام دارد. این سویه از گونه باسیلوس لیکنی‌فورمیس است که با روش‌های 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، ۰/۵۶٪ NH_4NO_3، ۰/۲۸٪ سیترات سدیم، ۰/۱۳٪ KH_2PO4، ۰/۰۵٪ $MgOSO_4$، ۱٪ $CaCl_2$، ۰/۵٪ پپتون، ۰/۲٪ عصاره مخمر و pH برابر با ۶/۸ استفاده می‌شود (۴ و ۵). تولید آلفا آمیلاز به وسیله چند ژن تنظیم می‌شود (۴). ژن آلفا آمیلاز باسیلوسی دارای اندازه ۱۹۴۸ باز بوده و ۴۸۳ اسید آمینه با پروتئینی با وزن مولکولی ۵۵۲۰۰ دالتون کد می‌کند. ژن آلفا آمیلاز باسیلوس لیکنی فورمیس ۶۴/۵٪ شباهت با آلفا آمیلاز ژئوباسیلوس استئاروترموفیلوس و ۸۰/۳٪ شباهت با آلفا آمیلاز باسیلوس آمیلولیکوفاشینس دارد (۸ و ۹). باکتری *Kocuria varians* شش شکل مختلف آلفا آمیلاز تولید می‌کند که دومین اتصال به نشاسته این اشکال به بقیه آمیلازها شباهت دارد (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 متاسفانه 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 میلی‌لیتری استریل و یک ظرف چهار لیتری تهیه شد. لوله ۵۰ میلی‌لیتری 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 سانتی‌گراد می‌باشد با استفاده از یک کیسه فریزر حدود ۲۰ گرم جمع‌آوری 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 پلیت‌های 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 پلیت‌های نشاسته آگار تهیه شده کشت داده شدند. همچنین ۱۰۰

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

میکرولیتر نیز از نمونه آب به‌طور مستقیم کشت داده شد.

کشت نمونه خاک و کود: یک گرم از نمونه‌های 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 نمونه‌های 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: نمونه‌های رشد کرده از نظر مشخصات کلنی بررسی و سپس از هر نوع کلنی به‌طور مجزا بر روی محیط کشت نوترینت آگار به‌صورت خطی کشت داده شد تا نمونه‌ها 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 کلنی‌های دارای هاله بزرگ‌تر برای مرحله بعد انتخاب شدند.

د) تایید فعالیت آمیلازی: پس از جداسازی سویه‌های 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 پپتون باکتریولوژیکال، $MgSO_4.7H_2O$ ۰/۵g/L، KCl ۰/۵g/L، ۱g/L نشاسته) اضافه گردید و در انکوباتور شیکردار به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد 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=۰.۵±۰.۰۵ به ۵۰mL از محیط تولید آمیلاز افزوده و در شیکر لرزان انکوباتور به مدت ۲۴۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در دور ۱۵۰rpm قرار داده شد. ۱/۵mL از محیط کشت به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۵۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردید و ۱mL از محلول رویی (آنزیم خام) جدا شده و

جدول ۱: غلظت‌های آنزیم و جذب آن‌ها با روش DNS.

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

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

ه) رسم منحنی استاندارد فعالیت آمیلاز: برای بدست آوردن میزان فعالیت آمیلازی نمونه‌های جدا شده، منحنی استاندارد فعالیت آمیلاز با استفاده از رقت‌های 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 باکتری‌ها: از بین باکتری‌های جدا شده یکی از انواع باسیلوس‌های گرم مثبت گرمادوست انتخاب و بر اساس جداول کتاب Bergey's Manual of Systematic Bacteriology و تست‌های بیوشیمیایی، باکتری‌های یاد شده در حد گونه تعیین هویت گردید (۱۳).

جدول۲: بررسی میزان آمیلاز تولیدی بوسیله باکتری های جدا شده از خاک و آب

زمان	۲٤ ساعت	٤۸ ساعت	۷۲ ساعت
نمونه	میزان تولید آمیلاز (u/ml)	میزان تولید آمیلاز (u/ml)	میزان تولید آمیلاز (u/ml)
خاک ۱	۲٦	٤۷/٦	۱۰٤/۹
خاک ۲	۱۱/۲۷	۳۸/۲	۵۸/۱٤
خاک ۳	۰	۲۵/۵	۳۲/۷
خاک ٤	۰	۱۵/۲	۲۰/۰۸
خاک ۵	۷/۹۷	۵۵/۳	۵۹/۹
آب ۱	۱٦/۱۲	۳۸/٤	٦۱/۲
آب ۲	۱۲/۱۱	۳۰/۳	٤۵/٤

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 مجموعا 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 ۴-۳ 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 (mnwc1) 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.

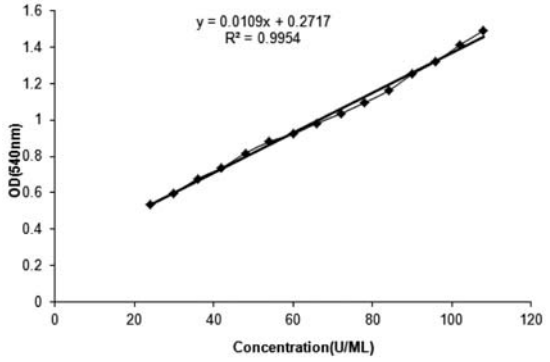
ه) بررسی میزان آمیلاز تولیدی به‌وسیله باکتری‌های جداشده: برای بدست آوردن مدت زمان مناسب تولید آمیلاز ابتدا پارامتر زمان بر روی نمونه شماره ۱ خاک (mnsc1) بررسی گردید به این صورت که باکتری در محیط تولید آمیلاز کشت داده شده و در انکوباتور شیکردار قرار داده شده و سپس میزان آمیلاز با استفاده از روش DNS و مقایسه با منحنی استاندارد در زمان های 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 به‌وسیله تمام نمونه‌های جدا شده طبق روشی که قبلا 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 (mnwc1) 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 mnwc1 گرمادوست می‌باشد. با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی و قندی مطابق جداول کتاب برگی (۱۴) مشخص شد که باکتری یاد شده متعلق به جنس و گونه باسیلوس لیکنی‌فورمیس 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.

باکتری و قارچ آمیلاز تولید می‌کنند. بارزترین آن‌ها گونه‌های باسیلوس نظیر باسیلوس سوبتیلیس و باسیلوس لیکنی‌فورمیس می‌باشند. سویه‌های مهم صنعتی تولیدکننده آمیلاز از منابع طبیعی به خصوص منابع گرم مانند چشمه‌های آب گرم جدا شده اند (۳-۱).

با توجه به این‌که برای تولید آنزیم‌های صنعتی نیاز به سویه مناسب و سپس تکنولوژی مربوطه می‌باشد هدف اصلی این پژوهش جداسازی سویه‌های 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 تولیدکننده آمیلاز بود. از کشت نمونه‌ها، مطابق انتظار، تعداد و نوع کلنی‌های ایجاد شده از کشت خاک نسبت به آب بیشتر بود و تمامی جدایه‌ها 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 حالی‌که در منابع از غلظت‌های مختلف گلوکز استفاده شده است که دقت آن پایین تر از استفاده از غلظت‌های مختلف آنزیم استاندارد می‌باشد. با استفاده از این روش مشخص شد که یک نمونه جدا شده از خاک حدود ۱۰۵u/ml آمیلاز تولید می‌کند که این میزان نسبت به آمیلاز تولیدی توسط سویه‌های 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 لیکنی‌فورمیس **بود.** این گونه از مهم‌ترین گونه‌های مورد استفاده جهت تولید صنعتی آمیلاز است که با آزمایش‌های بیشتر می‌توان احتمال استفاده از این سویه جدا شده را بررسی کرد. در آینده می‌توان 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 حمایت‌های اجرایی کمال امتنان را دارند.

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. Dobreva, 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 (Reviev article). J. Bacteriol, 2002; 94: 137-155
6) Shafiei M, Ziaee AA, Amoozegar 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., Statey J.T., Bergey’s manual systematic bacteriology, vol 2, part B, Springer.

Journal of Microbial World
Volume 2, No. 3, 2009

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

Majid Moghbeli[1], Hamid Noshiri[2]

[1]Assisstant Professor, Department of Microbiology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran
[2]M.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