تنقية أنزيم ألفا – أميليز المنتج من بكتريا *Bacillus licheniformis* R5

رنـا عبدالله حسين محمد عمر محي الدين
كلية الزراعة / جامعة بغداد
E.mail : rna19792002@yahoo.com

تاريخ استلام البحث : 2015/8/5 تاريخ قبول النشر : 2016/2/1

الخلاصة

تم إجراء هذا البحث في كلية الزراعة- جامعة بغداد في عام 2004 حيث تم تنقية أنزيم amylase – α المنتج من البكتريا *Bacillus licheniformis* R5 وفق الظروف المثلى لانتاج الأنزيم بعدة خطوات إشتملت على الامتزاز بالنشأ والترسيب بكبريتات الامونيوم بنسبة إشباع 40 – 80% حيث كانت فعالية الانزيم وفعاليته النوعية 14,016 وحدة / مل و 114,885 وحدة / ملغم على التوالي . اما عدد مرات التنقية التي امكن تحقيقها فكانت 11,8 مرة وبحصيلة مقدارها 45,2% .تم اجراء الترشيح الهلامي على عمود Sephacryl S – 200 إذ قدرت فعالية الانزيم فيها وفعاليته النوعية فكانت 18,437 وحدة / مل و 392,277 وحدة / ملغم على التوالي وكان عدد مرات التنقية 40.4 مرة وبحصيلة أنزيمية مقدارها 35.29%. بينت نتائج الكشف عن نواتج تحلل النشأ بفعل الانزيم المنتج في الدراسة وبطريقة كروموتوغرافي الطبقة الرقيقة (TLC) Thin – Layer Chromatography إحتواء هذه النتائج على السكريات المتعددة Polysaccharides في 20 دقيقة الاولى من زمن التفاعل وأن الكلوكوز والمالتوز لا يظهران كنواتج للتحلل إلا بعد 30 دقيقة أو أكثر على زمن التفاعل.

الكلمات المفتاح : انزيم الفا-اميليز ، بكتريا *Bacillus licheniformis* R5

المقدمة

يشغل انتاج الانزيمات مساحة واسعة من عالم التقانة الاحيائية ولاسيما تلك الانزيمات التي لها استعمالات صناعية وطبية وغذائية تتقدمها الانزيمات المحللة مائياً hydrolysis ومنها تلك المجموعة من الانزيمات التي تدعى بأنزيمات الاميليز Amylolylic enzymes او الاميليزات Amylases. تعد الاميليزات من الإنزيمات الرئيسية المستخدمة في الصناعة. هذه الانزيمات تحلل جزيئات النشا إلى البوليمرات والتي تتكون من وحدات الجلوكوز. للاميليزات تطبيقات عديدة في العمليات الصناعية مثل المواد الغذائية والتخمير والصناعات الدوائية. يمكن الحصول عليها من النباتات والحيوانات والكائنات الحية الدقيقة. تعتبر الانزيمات من أهم المواد وأكثرها إنتاجاً من قبل الاحياء المجهرية إذ تعد خزيناً لا ينضب لمختلف أنواع الانزيمات والتي يصل عددها الى 2500 أنزيم ، في حين أن المستعملة منها في مجالات مختلفة لا يتجاوز 25 نوعاً وتنتج هذه الانزيمات بكميات تقدر بآلاف الاطنان سنوياً حيث تحتل الاميليزا ت المرتبة الاولى بل أن أول أنزيم تم إنتاجه تجارياً هو الاميليز الفطري والذي أطلق عليه Taka diasetase والذي أستعمل كعامل صيدلاني Pharmaceutical agent في معالجة عسر الهضم وكان ذلك في الولايات المتحدة الامريكية عام 1894(Crueger & Crueger, 1989). كذلك يتم انتاجه من الكائنات الحية الدقيقة ،*Bacillu slicheniformis* ،*Bacillus stearothermophilus* *Bacillus amyloliquefaciens* والمستخدم في العديد من العمليات الصناعية مثل المواد الغذائية والتخمير والمنسوجات والصناعات الورقية Pandey, et al., 2003) (Konsoula, & Liakopoulou- Kyriakides, 2007;. يتميز إنتاج الانزيمات من الاحياء المجهرية بمجموعة من الصفات تفتقر إليها إنتاجها من مصادرها الطبيعية الاخرى منها إنخفاض كلفة الانتاج وإمكانية إستغلال بعض المواد الاولية في تنمية الاحياء المجهرية لتخليص البيئة من المشاكل التي تسببها هذه المواد فضلاً عن إمكانية الحصول على أنزيمات بمواصفات نوعية خاصة قد لا تتوفر في غيرها كالانزيمات المتحملة للحرارة العالية أو الانزيمات التي تعمل على أرقام هيدروجينية متطرفة أو الانزيمات التي لا تتأثر

بعض المثبطات Hagihara, *et al*., 2001; Nigam, *et al*., 2000; Walsh] & Hedson, 1994 .

المواد وطرائق العمل

إستخدمت في هذه الدراسة بكتريا *Bacillus licheniformis* R5 التي تم عزلها وتشخيصها في لدراسة سابقة وتم إنتاج الانزيم من هذه البكتريا بالطريقة المذكورة في تلك الدراسة (حسين ، محي الدين ؛2010).

تنقية الانزيم Protein purification

إمتزاز الانزيم Enzyme adsorption

أُجريت عملية إمتزاز الانزيم بالنشأ حسب الطريقة الموصوفة من قبل Ha (Ha, *et al*., 2001) حيث تم إنتاج الانزيم بحجم 300 مل من وسط الانتاج تحت الظروف المثلى التي حددت في دراسة سابقة (حسين، محي الدين ؛2010). أضيف 50 غم من النشأ الى 300 مل من المستخلص الخام للانزيم وترك في الثلاجة لمدة 18 ساعة مع التحريك ورشح بمضخة تفريغ باستخدام ورقة ترشيح (Whatman1) مع إجراء غسل للنشأ ثلاثة مرات بالماء المقطر البارد وعلق النشأ المتجمع فوق ورقة الترشيح بحوالي 100 مل من محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ بتركيز 0.05 مولاري برقم هيدروجيني 6.5 والحاوي على 1% (وزن \ حجم) من المالتوز وحضنت بدرجة 40°م مدة ساعة واحدة ثم رشح واحتفظ بالراشح وغسل النشأ باستعمال 100 مل آخر من محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ . جمع الراشح من الخطوة الاولى مع الراشح من الخطوة الثانية وقدر حجمه كما قدرت فعالية الانزيم وفعاليته النوعية في الراشح .

التركيز بكبريتات الامونيوم Ammonium sulfate concentration

أُجريت عملية تركيز الانزيم باضافة كمية من كبريتات الامونيوم لايصال نسبة إشباعه في المحلول الانزيمي المستحصل من الخطوة السابقة والبالغ حجمه 200 مل الى 80% (Englard &Siefter. 1990)حيث تمت الاضافة في حمام ثلجي مع المزج المستمر لليوم التالي بعدها أجري الطرد المركزي بسرعة 10000 × g مدة عشرين دقيقة ،جمع الراسب في أقل كمية من محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ مع إجراء الديلزة لليلة كاملة بغية التخلص من الاملاح وإستعمل PEG (Polyethylene glycol) لغرض تركيز الانزيم ثم قدر حجم محلول الانزيم و فعالية الانزيم وفعاليته النوعية .

كروموتوغرافيا الترشيح الهلامي Gel filtration chromatography

تحضير هلام Sephacryl gel S – 200 preparation Sephacryl S - 200

حضر هلام Sephacryl S – 200 بغسل 30 غم منه بمحلول فوسفات البوتاسيوم المنظم ذو الرقم هيدروجيني 7.0 مرتين (Jensen, et al., 1988) وعلق بكمية مناسبة من المحلول ذاته مع إجراء عملية إزالة الغازات (Degassing) بواسطة مضخة تفريغ وعبئ المزيج في عمود زجاجي ليعطي هلاماً بأبعاد (1.6 × 44) سم وأُجريت موازنة العمود بمحلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ.

إضافة العينة والاسترداد Addition and recovery of sample

أُجريت هذه العملية باستخدام محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ ذو الرقم الهيدروجيني 7.0 بسرعة جريان مقدارها 30 مل \ ساعة وتمت متابعة الامتصاصية للاجزاء المفصولة على طول موجي 280 نانوميتر فضلاً عن تقدير فعالية الانزيم .جمعت الاجزاء الفعالة وقيس حجمها وقدرت فعاليتها وتركيز البروتين فيها ووزعت في أنابيب إختبار وحضنت بالتجميد .

تقدير فعالية أنزيم ألفا – أميليز Assessing the effectiveness of the enzyme alpha -amylase

أتبعت الطريقة الموصوفة من قبل (Ramesh, & Lonsane, 1989) باستعمال كاشف DNSA (Di nitro salicylic acid) بدرجة حرارة 55º م وباستخدام النشأ الذائب في مزيج متكون من 0.5 مل من محلول المادة الأساس مع 0.4 مل محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ برقم هيدروجيني 6.5 وبتركيز 0.1 مولاري في تقدير فعالية الانزيم بعد إعداد المنحنى القياسي للمالتوز) ، وعرفت وحدة الفعالية (Unit) : بأنها كمية الانزيم التي تحرر1 مايكرمول من السكريات المختزلة على صورة مالتوز في الدقيقة الواحدة وتحت ظروف التجربة (Jensen, *et al*., 1988) وأحتسبت الفعالية النوعية (وحدة \ ملغم) من المعادلة التالية:

الفعالية (وحدة \ مل)
الفعالية النوعية (وحدة \ ملغم) = ----------
البروتين (ملغم \ مل)

تقدير تركيز البروتين protein concentration determination

قدر تركيز البروتين في المراحل المختلفة من الدراسة إستنادا الى طريقة Lowry, *et al*. (1951) .

قابلية الانزيم على تحليل النشأ Enzyme ability in starch analysis

أضيف 2 مل من المحلول الانزيمي الى مزيج من 5 مل من محلول النشأ بتركيز 2% المحضر من محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ ذو الرقم الهيدروجيني 8.0 مع 4 مل محلول الفوسفات الدارئ نفسه وحضن المزيج بدرجة حرارة 50°م وتممتابعة النشأ في مزيج التفاعل مدة ساعة واحدة مع سحب 2 مل من محلول التفاعل على مدد متعاقبة هي (5 ،10 ،20 ، 30 ،60) دقيقة ثم تم تقدير السكريات الناتجة عن تحلل النشأ .

كروموتوغرافي الطبقة الرقيقة TLC (Thin layer chromatography)

أتبعت طريقة كروموتوغرافي الطبقة الرقيقة الموصوفة من قبل Jensen, *et al*., (1988) مع ملاحظة تحلل النشأ الى مكوناته من المالتوز والسكريات الاخرى باستخدام صفائح الطبقة الرقيقة Thin – Layer plates من نوع Silica gel G60 . أجري الفحص بحرارة الغرفة بوضع 10 مايكروليتر من محاليل السكريات القياسية (المالتوز ، الكلوكوز) بتركيز 2% فضلاً عن النماذج المأخوذة من تحلل النشأ بعد (5 ، 10 ، 20 ، 30 ، 60) دقيقة .تم وضع الصفيحة في حوض زجاجي وأجري الفصل باستخدام مزيج من المذيبات الاتية (5: 3: 2) (Water، Ethanol، N- Butanol) وبعد إنتهاء الفصل جففت الصفيحة ورش بكاشف حامض الكبريتيك المحضر بتركيز 50% ووضعت في فرن حراري هوائي بدرجة 110° م مدة 30 دقيقة لحين تطور (قتامة) لون البقع المفصولة . قدرت الحركة النسبية (Rf) وفق المعادلة الاتية :

المسافة التي تقطعها المواد المفصولة (البقع) (سم)
الحركة النسبية (Rf) = ----------
المسافة التي يقطعها محلول الفصل (سم)

النتائج والمناقشة

تنقية الانزيم Enzyme purification

تم تنقية الانزيم بهدف التخلص من أكبر كمية ممكنة من المواد والبروتينات الموجودة معه لدراسة خواصه .

الامتزاز على النشأ Starch adsorption

قدرت فعاليته وفعاليته النوعية فكانتا 6.878 وحدة \ مل و 43.809 وحدة \ ملغم على التوالي . وقد كان عدد مرات التنقية بهذه الخطوة 4.5 مرة وبحصيلة مقدارها 75% .يعتمد مبدأ التنقية على إستخدام البوليمرات ذات الاوزان الجزيئية العالية مثل النشأ على ألفة وإرتباط الانزيم قيد التنقية بهذه المواد لكونها تشكل المواد الاساس Substrate لهذه الانزيمات من جهة ولأن هذه البوليمرات تكون شبكة تتغلل في ثناياها الانزيم فتتقيد بها في ظروف وتعود فتنفصل عنها بتغير هذه الظروف من جهة ثانية Pandey, *et al*., 2001; (H، 2003) . وقد اتبعت طريقة الامتزاز على النشأ من قبل Ha, *et al*., (2001) كخطوة اولى لتنقية انزيم بيتا – اميليز. كما استعملها (1998)، Lin, *et al*. كخطوة اولى في تنقية الانزيم ايضاً ومن سلالة *Bacillus sp*. فحصل على فعالية نوعية قدرت بحوالي 77.8 وحدة / ملغم وحصيلة بلغت 40.5% وكان عدد مرات تنقية الانزيم بهذه الخطوة 59.8 مرة.

تركيز الانزيم بكبريتات الامونيوم Enzyme concentration with ammonium sulphate

إستعملت كبريتات الامونيوم لتشبيع الانزيم بنسبة 80% .جمع الراسب المتكون في كمية من المحلول

الدارئ وأخضعت لعملية التنافذ الغشائي (الديلزة) حيال محلول الدارئ نفسه بغية التخلص من الاملاح فبلغ حجم المحلول الانزيمي الذي جمع بعد عملية التنافذ الغشائي 71 مل وكانت فعالية الانزيم وفعاليته النوعية 14.016 وحدة \ مل و 114.885 وحدة \ ملغم على التوالي أما عدد مرات التنقية التي أمكن تحقيقها في هذه المرحلة فكان 11.8 مرة وبحصيلة مقدارها 45.2% (جدول 1) ويذكر أن كبريتات الامونيوم من أكثر الاملاح إستعمالا في تركيز الانزيمات لذوبانيتها العالية وقلة كلفتها مقارنة بالمذيبات العضوية وإنعدام تركيزها في الرقم الهيدروجيني 8.0 ومن ثم في ثبات الانزيم (Pandey, *et al*., 2001) .يعتمد التركيز بكبريتات الامونيوم على مبدأ معادلة الشحنات الموجودة على سطح البروتين والاخلال بطبقة الماء المحيطة به مما يؤدي الى ترسيبه بتاثير ما يعرف ب ' Salting out ' (Englard, & Seifter.1990) ويقصد به خفض ذوبانية الجزيئات في محلول ذات قوة ايونية عالية . وقد استعملت كبريتات الامونيوم من قبل Cha & Yu (1993) , في تركيز انزيم الفا – اميليز المنتج من البكتريا *B. licheniformis* وما بين نسبتي اشباع 40 – 80% فحصلا على انزيم مركز وبفعالية نوعية مقدارها 3.2 وحدة / ملغم وبحصيلة 100 %. أما Saito, (1973) فقد ركز الانزيم من سلالة اخرى من البكتريا نفسها فحصل على عدد مرات التنقية بلغ 58 مرة وبحصيلة قدرت بحوالي 70% وكانت الفعالية النوعية للانزيم 46.000 وحدة / ملغم. على ان Shaw *et al*., (1995) قد تمكن من تركيز الانزيم من *Thermus sp*. باستعمال كبريتات الامونيوم ما بين نسبتي الاشباع 50 – 80% بفعالية نوعية قدرت بحوالي 8.81 وحدة / ملغم وبحصيلة انزيمية بلغت 23% فقط . اما Yoshigi *et al*., (1985) فقد ركز الانزيم نفسه من سلالة من البكتريا *B. ceceus* NY-14 بكبريتات الامونيوم مابين نسبتي الاشباع 70-80% فكانت الفعالية النوعية للانزيم المركز 211 وحدة / ملغم وبحصيلة قدرت بحوالي 30% . على ان Buonocore *et al*., (1976) استعمل نسبتي اشباع 20-70% من كبريتات الامونيوم في تنقية الانزيم من بكتريا *B. acidocaldarius* فوجد ان ما يمكنه الحصول عليه من الانزيم يبلغ 76.4% وبفعالية نوعية مقدارها 53.8 وحدة / ملغم وكان عدد مرات التنقية 6.4 مرة.

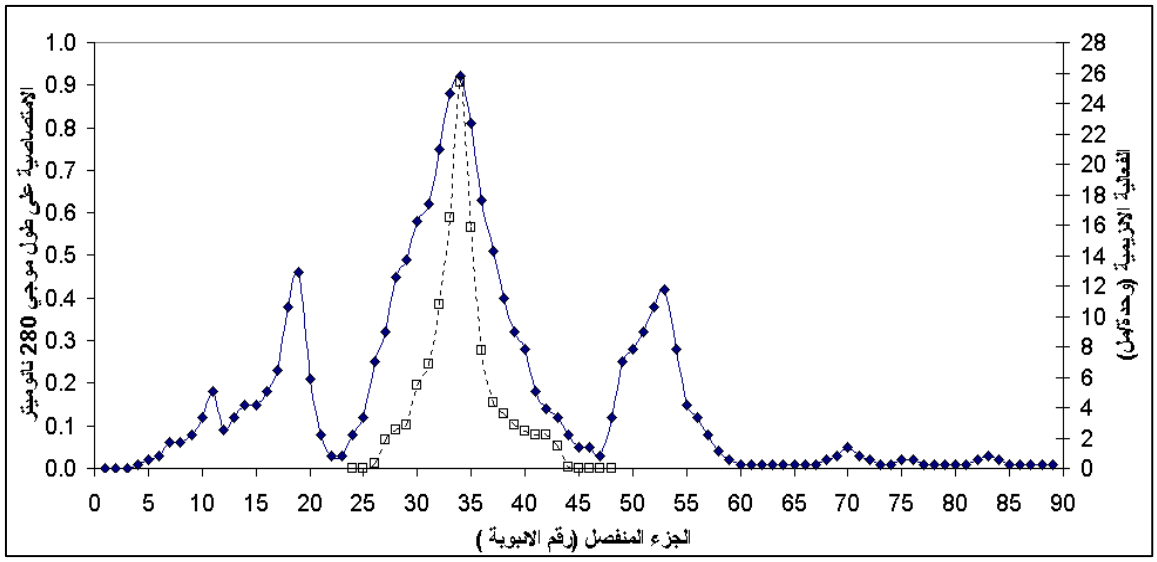
جدول 1. مراحل تنقية انزيم الفا – اميليز من البكتريا *B. licheniformis* R5

المرحلة	الحجم (مل)	الفعالية (وحدة/ مل)	البروتين (ملغم / مل)	الفعالية النوعية (وحدة / ملغم)	الفعالية الكلية	عدد مرات التنقية	نسبة النقاوة (%)
الانزيم الخام	300	6.118	0.630	9.711	1835.4	1	100
الامتزاز على النشأ	200	6.878	0.157	43.809	1375.6	4.5	.075
الترسيب بكبريتات الامونيوم بنسبة اشباع 40-80 %	71	14.016	0.122	114.885	995.1	11.8	54.2
الترشيح الهلامي على Sephacryl S-200	35	18.437	0.047	392.277	645.3	40.4	35.2

كروموتوغرافي الترشيح الهلامي Gel filtration chromatography

تمت عملية الترشيح الهلامي باستخدام عمود Sephacryl S – 200 حيث جرت موازنة العمود وإسترداد الانزيم بمحلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ ذو الرقم الهيدروجيني 7.0 يلاحظ من الشكل (1) أن أجزاء الاسترداد تضمنت أربع قمم بروتينية رئيسية كانت أحدى هذه القمم وهي القمة الثالثة حاوية على فعالية أنزيمية فقط أما القمم الاخرى فكانت خالية منها تماماً وكانت قمة الفعالية مطابقة الى حد كبير لقمة البروتين الثالثة هذه . إن مطابقة منحنى الفعالية والبروتين الى هذا الحد تعد إحدى الدلائل الاولية للنقاوة (Whitaker,1972). جمعت أجزاء هذه القمة وقدر حجمها فكان 35 مل

تقريباً (جدول 1) وقدرت فعالية الانزيم فيها وفعاليتها النوعية فكانت 18.437 وحدة \ مل و 392.277 وحدة \ ملغم على التوالي ووجد أن حصيلة الانزيم في نهاية هذه المرحلة من التنقية بلغت 35.2% أما عدد مرات التنقية فكانت 40.4 مرة . ويذكر في هذا الصدد ان الخطوات التي اتبعت في الدراسات المختلفة لتنقية انزيم الفا – اميليز من الاحياء المجهرية اتسمت بتنوعها العالي. فقد قام Cha & Yu , (1993) بتنقية الانزيم من سلالة من البكتريا *B. licheniformis* بعدة خطوات اشتملت على تركيز الانزيم بكبريتات الامونيوم اعقبتها خطوة التبادل الايوني باستعمال DEAE -sephacryl ثم الترشيح الهلامي باستعمال Superose 6- chromatography واخيراً الترحيل الكهربائي بوجود SDS . اما Sakano *et al*., (1982) فقد استعمل في تنقية الانزيم من *Pseudomonas stutzeri* ثلاث خطوات وهي التركيز بكبريتات الامونيوم والترشيح الهلامي باستعمال Sephadex G-100 والتبادل الايوني باستعمال DEAE-cellulose وكان عدد مرات التنقية بعد هذه الخطوات 375مرة.



شكل 1. الترشيح الهلامي لتنقية أنزيم ألفا – أميليز *B.licheniformis*

نواتج تحلل النشأ بالانزيم Starch degradation by enzyme

تم التعرف على نواتج تحلل النشأ بفعل أنزيم α – amylase المنتج بطريقة كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC (Thin Layer chromatography) (Sonkamble, *et al* ., 2014) وذلك خلال ساعة واحدة من التفاعل الانزيمي (الشكل 2) وتم الاستدلال على نواتج التحلل بالمقارنة مع المالتوز والكلوكوز القياسيين وبالاستعانة بقيم الحركة النسبية Rf (الجدول 2) فلوحظ تكون ثلاث بقع على خط المالتوز القياسي تميزت إحدى هذه البقع بكبر حجمها ووضوحها لذا عدت البقعة الممثلة للمالتوز أما البقعة المتقدمة فكانت ذات قيمة Rf مساوية الى 0.30 مما يشير الى إحتمال كونه من البضيعات السكرية المالتوزية Maltooligosaccharides

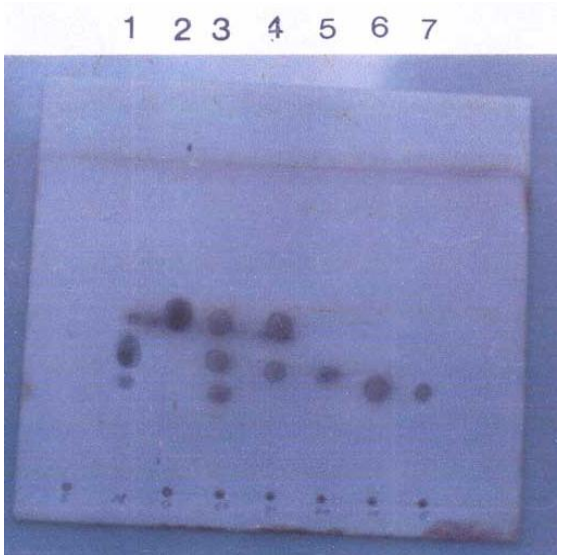
إن ظهور بقعتين إضافيتين على خط المالتوز القياسي الى جانب المالتوز نفسه يدل على أن المالتوز القياسي الذي إستعمل في هذه التجربة لم يكن نقياً نقاوة تامة بل كان ملوثاً بمقادير ضئيلة من الكلوكوز وإحدى البضيعات السكرية ويتضح أيضاً في هذه الدراسة أن نواتج تحلل النشأ بفعل الانزيم وخلال 20 دقيقة الاولى إشتملت على البضيعات السكرية المالتوزية التي لم يتم الكشف عنها بسبب عدم توفر البضيعات السكرية القياسية المؤلفة من عدد محدود من جزيئات الكلوكوز وأن قيم Rf لهذه البضيعات السكرية تكونت خلال الزمن المشار اليهِ تراوحت بين 0.33 الى 0.36

إن زيادة قيمة Rf للبضيعات السكرية الناتجة عن تحلل النشأ بتقادم زمن التفاعل يشير الى إستمرار تحليل الاواصر1,4 - α الموجودة فيها لتكوين نواتج ذات أوزان جزيءية صغيرة أو حاوية على عدد من جزيئات الكلوكوز (Lowry, *et al*., 1951; Nielsen, *et al*., 2001) كما يلاحظ أن الكلوكوز والمالتوز بدأ بالظهور في نواتج تحلل النشأ بفعل الانزيم بعد مضي 60 دقيقة من زمن التفاعل مما يعني أن الانزيم يعود ويهاجم البضيعات السكرية الناتجة من تحلل النشأ الى وحداتها الاساسية المتمثلة بالمالتوز ومن ثم الكلوكوز غير أن ظهور الكلوكوز في نواتج التحلل وفي وقت مبكر من زمن التفاعل وهو 60 دقيقة يمكن أن يفسر باحدى الاحتمالين أولهما أن المستخلص المستعمل في تحليل النشأ من البكتريا *Bacillus licheniformis* R5 يحتوي الى جانب أنزيم α - amylase مقادير ولو ضئيلة من انزيم Glucoamylase الذي يتميز بتحليله للاميلوزات والاميلوبكتينات من النهايات غير المختزلة Non reducing ends وعلى نحو آصرة كلايكوسيدية إثرى أخُرى محررا بذلك الكلوكوز (Lowry, *et al*., 1951).

إن ظهور الكلوكوز والمالتوز في المراحل الاخيرة من التحلل الانزيمي للنشأ يؤيد النظرية التي تفترض أن أنزيمات ألفا – أميليز تعمل بآلية تعرف بـ Transglycolsylation اي الية نقل جزيئات السكرمن كلوكوسايد الى اخر (Nielsen, *et al*., 2001).

الجدول (2) : قيم Rf لكل من المالتوز والكلوكوز القياسيين ونواتج تحلل النشأ بفعل أنزيم الفا-اميليزمن البكتريا *Bacillus licheniformis* R5

زمن التفاعل	قيم Rf لنواتج التحلل		
	مستويات البقع		
	1	2	3
5	0.33	–	–
10	0.33	–	–
20	0.36	–	–
30	0.37	–	0.51
60	0.30	0.40	0.51
المالتوز القياسي	0.32	0.41	0.51
الكلوكوز القياسي	–	–	0.51



الشكل (2) : كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة لمحلول النشأ المتحلل بفعل أنزيم الفا-اميليز المنتج من قبل البكتريا *Bacillus licheniformis* R5

1- محلول المالتوز القياسي -2-محلول الكلوكوز القياسي -3-نواتج التحلل بعد 60 دقيقة من المعاملة الانزيمية 4- نواتج التحلل بعد 30 دقيقة من المعاملة الانزيمية -5- نواتج التحلل بعد 20 دقيقة من المعاملة الانزيمية 6- نواتج التحلل بعد 10 دقيقة من المعاملة الانزيمية -7- نواتج التحلل بعد 5 دقيقة من المعاملة الانزيمية

المصادر

حسين ، رنا عبدالله ؛ محي الدين ، محمد عمر (2010). الظروف المثلى لانتاج أنزيم ألفا – أميليز من عزلة محلية لبكتريا *Bacillus licheniformis* بطريقة المزارع المغمورة.(وقائع الندوة العلمية العاشرة الموسومة (العلوم الزراعية بين التراث والمعاصرة) لمركز إحياء التراث العلمي العربي . العدد (419) :124 – 136.

Buonocore, V.; Caporale, C.; Rosa, M.D.; and Bacorta, A.G. (1976). Stable, Indusible Thermo acidophilic α - amylase from *Bacillus acidocaldarius*. J. of Bacteriology. 128 (2): 515-521

Cha, W.S.; and Yu, E.K. (1993). Purification and characterization of *Bacillus licheniformis* α - amylase from genetically cloned E. coli. : NM 522. Bull. Korean Chem. Soc. 14 (3): 398-403.

Crueger, W.; and Crueger, A. (1989). Biotechnology: A Test book of Industrial Microbiology 2nd edition. Sinauer Associate., Inc. Sutherland, M.AG1375. pp. 189-208.

Englard, S; and Seifter, S. (1990). Precipitation techniques. Methods in Enzymology (ed. Hurray, E.D; and Dentscher, P). 182: 425-441.

Ha , Y.M. ; Lee , D.G. ; Yoon , J.H. ; Park , Y.H. ; and Kim , Y.J. (2001). Rapid and simple purification of a noval extracellular β- amylase from *Bacillus sp.* Biotechnology Letters. 23: 1435-1438.

Hagihara , H. ; Igarashi , K. ; Hayashi , Y. ; Endo , K. ; Kitayuma , K. ; Ozak , K. ; Kawa , O. ; and Ito , S. (2001). Noval Reagents and chemical oxidants from the

Ramesh, M.V.; and Lonsane, B.K. (1989). End product profiles of starch hydrolysis by bacterial α - amylase at different temperature and pH values. Biotechnology letters. 11 (9): 649-652.

Sakano, Y.; Kashiwagi, Y.; and Kobayashi, T. (1982). Purification and properties of an exo –α- amylase from *Pseudomonas stutzeri*. Agric. Biol. Chem. 46 (3): 639-646.

Saito, N.; and Yamamoto, K. (1975). Regulatory factors affecting α-amylase producing in *Bacillus licheniformis*. Journal of Bacteriology. 121 (3): 848-856.

Shaw, J.F.; Lin, F.P.; Chen, S.C.; and Chen, H.C. (1995). Purification and properties of an extracellular α - amylase from *Thermus sp*. Bot. Bull. Acad. Sin. 36: 195-200.

Sonkamble, V., Zore, g., and Kamble, L.(2014). A simple method to screen amylase inhibitors using thin layer chromatography. Science Research Reporter, 4(1): 85-88.

Walsh, G.; and Headson, D.R. (1994). Protein biotechnology. John Wiley and sons. New York, pp: 303-335.

Whitaker, J.R. (1972). Principles of Enzymology for the food science. Mercel Dekker. Inc. New York, USA.

Yoshigi, N.; Chikano, T.; and Kamimura, M. (1985). Purification and properties of an Amylase from Bacillus cereus NY –14. Agric. Biol. Chem. 49 (12): 3369-3376.

alkaliphilic *Bacillus* isolate KSM. K38. Applied and Environmental Microbiology. 67 (4): 1744-1750.

Jensen, B.; Olsen, J.; and Allermann, K. (1988). Purification of extracellular amylolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. Can. J. Microbial. 34: 218-223.

Konsoula, Z., and Liakopoulou-Kyriakides, M. (2007). Co-production of alpha-amylase and beta-galactosidase by*Bacillus subtilis* in complex organic substrates. Bioresour Technol. ;98:150–157.

Lin, L.L.; Chayau, C.C.; and Hsu, W.H. (1998). Production and properties of a raw – starch – degrading amylase from thermophilic and alkaliPhilic *Bacillus sp*. TS-23. Biotechnol. Appl. Biochem. 28: 61-68.

Lowry, O.H.; Rosobrough, N.; Far, A.L.; and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

Nielsen, J.E.; Borchert, T.V.; and Uriend, G. (2001). The determinants of α- amylase pH – activity profiles. Protein Engineering. 14 (7): 505-512.

Pandey, A., Nigam , P. ; Soccal, C.R. ; Soccal, V.T. ; Singh , D. ; and Mohan , R. (2000). Advances in Microbial amylase. Biotechnol. Appl. Biochem. 31: 135-152.

Pandey A., Nigam P., Soccol C.R., Soccol V.T., Singh D., Mohan R.(2003) Advances in microbial amylases.Biotechnol Appl Biochem;31(Pt 2):135–152

Purification of α- Amylase Produced from of *Bacillus Licheniformis R5*

Rana Abdullah Hussein Mohammed O.Muhyaddin
College of Agriculture / University of Baghdad

Abstract

This research is conducted at the College of Agriculture, University of Baghdad in 2004 where the α – amylase enzyme, which is produced by *Bacillus licheniformis* R5 under optimum conditions, is purified by several steps which includ adsorption to Starch and precipitation by Ammonium Sulphate at 40 – 80% saturation, where the effectiveness of the enzyme, also the quality and effectiveness is 14 016 units / ml and 114 885 units / mg , respectively. The number of purification times that could be achieved is 11.8 times and developed to 45.2%.

Gel filtration using the Sephacryl S- 200 column was used for purification. The purification folds and the yield of the enzyme at the end of these steps are 40.39 times and 35.20% respectively. The products obtained at various stages of the Starch hydrolysis by the enzyme performed by Thin – Layer Chromatography, showed that at the early steps of the reaction (after 20 min) only with the Oligosaccharides are appear while Glucose and Maltose, as the major products of the hydrolysis, are detectable after 30 min of the reaction time.

Keywords: ***α- amylase*** **Enzyme ,** ***Bacillus licheniformis R*****5.**

The research is Part of M.S.C for the 1st author