Optimization of some amylolytic enzymes (amylases) production by locally isolates of *Bacillus* spp

دراسة الظروف المثلى لأنتاج بعض الإنزيمات المحللة للنشأ (الأميليزات) من بكتريا *Bacillus* spp المعزولة محلياً

أ.م.د. ناجح هاشم كاظم [1] انتضار كاظم حميد
جامعة كربلاء /[1] قسم علوم الحياة / كلية العلوم

البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني

الخـــلاصـة

تم الحصول على 24 عزلة بكتيرية تابعة لجنس الـ *Bacillus* spp منتجة للإنزيمات المحللة للنشأ من 75 عزلة تم عزلها من 12 عينة تربة جمعت من مناطق مختلفة لمحافظة كربلاء المقدسة وكانت العزلتين رقم 5 و17 هما الأكفأ في انتاج انزيمي الألفا-اميليز والكلوكواميليز على التوالي .وتم تحديد الظروف البيئية والمزرعية المثلى لأنتاج انزيم الألفا-اميليز من العزلة رقم 5 وذلك باستعمال الوسط الأنتاجي Soluble starch Yeast extract Trypton medium(SYT) الذي يحتوي على سكر اللاكتوز بتركيز 1% مصدراً للكاربون وخليط من مستخلص الخميرة والتربتون بتركيز 0.2 % مصدراً للنتروجين ودعم هذا الوسط بـ (كلوريد الصوديوم $NaCl_2$ وكلوريد الكالسيوم $CaCl_2$ وكبريتات المغنيسيوم $MgSO_4$ وفوسفات البوتاسيومK_2HPO_4 , KH_2PO_4) بتركيز كلي 0.26 % كمصدر للاملاح المعدنية ، وعدل الرقم الهيدروجيني الابتدائي للوسط الى 7 وتم التلقيح بحجم لقاح 5% ، وتم الحضن لمدة 24 ساعة على درجة حرارة 42م ، وسرعة رج 120 دورة/دقيقة، واما الظروف االبيئية والمزرعية المثلى لأنتاج انزيم الكلوكواميليز من العزلة رقم 17 حددت باستعمال الوسط الأنتاجي (SYT) الذي يحتوي على النشأ الذائب بتركيز 1% كمصدر للكاربون ومستخلص الخميرة بتركيز0.2% مصدراً للنتروجين ودعم هذا الوسط ب(كلوريد الصوديوم $NaCl_2$ وكلوريد الكالسيوم $CaCl_2$ وفوسفات البوتاسيوم K_2HPO_4 , KH_2PO_4) بتركيز كلي 0.26 % كمصدر للاملاح المعدنية ، وعدل الرقم الهيدروجيني الابتدائي للوسط الى 6.5 وتم التلقيح بحجم لقاح 5% ، وتم الحضن لمدة 24 ساعة على درجة حرارة 37م ، وسرعة رج 120 دورة/دقيقة .

Abstract

Twenty *Bacillus* spp bacterial isolates (amylolytic enzyme producers) were obtained from 75 isolates which isolated from 12 soil samples from different parts of holly Karbala governorate , isolates number 5 and 17 were the most efficient for alpha-amylase and glucoamylase production respectively . Optimum environmental and culture condition has been determined for the production of alpha-amylase enzyme from isolate No. 5 by using the production media Soluble starch Yeast extract Trypton medium (SYT) that contains lactose with concentrate 1% as source of carbon and mixture of yeast extract and trypton with concentration 0.2% as source of nitrogen, the media wase support by $NaCl_2$, $CaCl_2$, $MgSO_4$, KH_2PO_4 and K_2HPO_4) with total concentration 0.26 as source of mineral salts . The primary pH adjusted to 7 , inoculum size was 5% and incubate for 24 hours in 42ċ and 120 rpm/min. While the optimization of glucoamylase production from *Bacillus licheniformis* isolate no. 17 have been determined by using production medium (SYT) that contains soluble starch with concentration 1% as source of carbon and yeast extract with concentration 0.2 % as source of nitrogen. The media was supported by (Nacl , $CaCl_2$, KH_2PO_4 and K_2HPO_4) with total concentration 0.26 as source of mineral salts. The The primary pH adjusted to 6.5 , inoculum size was 5% and incubate for 24 hours in 37ċ and 120 rpm/min.

1-المقدمـــــة

نظراً لزيادة الحاجة الماسة لعمليات مستدامة جديدة وصديقة للبيئة لتحل محل العمليات الكيميائية والحاجة الى ادوات التكنولوجيا الحيوية الجديدة التي تنطوي على استعمال التكنولوجيا الإنزيمية في التقانة الحيوية . ولقابلية بعض الأحياء المجهرية في انتاج مواد ذات اهمية تطبيقية مثل الإنزيمات والمضادات الحيوية والأحماض العضوية وغيرها، مازالت تجذب اهتمام العديد من الباحثين لعزل واكتشاف سلالات من الأحياء المجهرية ذات الكفاءة العالية في الأنتاج والمستقرة وراثيا، وواحدة من التفاعلات الإنزيمية التي تنفذ على نطاق صناعي واسع هي الإنزيمات المحللة للنشأ (Amylases) (1) .يعد النشأ المكون الرئيسي أو الأساسي للعديد من المحاصيل المهمة اقتصادياً مثل (القمح والرز والذرة والبطاطس)(2). وكذلك فان النشأ يعتبرالشكل الأكثر وفرة من مخزون السكريات للنباتات ويشكل مصدر رخيص الثمن لإنتاج العديد من العصائر التي تحتوي على الكلوكوز ، والتي تستخدم على نطاق واسع في الصناعات الغذائية (3). بالإضافة إلى ذلك، فإن السكريات المنتجة من النشا يمكن تخميرها لإنتاج الإيثانول والأحماض الأمينية والأحماض العضوية وغيرها (4). ان عملية تحويل النشا إلى الكلوكوز تتكون من خطوتين هما الأماعة والتسكر. وان هذه العملية تحتاج الى طاقة كبيرة وبالتالي زيادة تكلفة إنتاج المنتجات النشوية. لذلك تركزت العديد من البحوث لاختزال تلك الطاقة من خلال تعريض النشأ الخام الى انزيمات التحلل النشوي .اذ تعمل الأميليزات على تحلل جزيئة النشأ لتعطي منتجات متنوعة صغيرة الوزن الجزيئي مثل الديكسترينات والمالتوز والكلوكوز (5). وتشكل الإنزيمات المحللة للنشأ 30% من الانتاج العالمي للإنزيمات الصناعية (6) فضلا عن الأهمية الكبيرة لهذه الإنزيمات التي فتحت افاقاً جديدة للعديد من عمليات التكنولوجية الحيوية التجارية بما في ذلك الطاقة المتجددة ، المستحضرات الصيدلانية ، والتسكر وتسييل النشأ ، صناعة المنظفات ، صناعة الورق والمواد الغذائية والخبز ومعالجة العلف الحيواني لتحسين الهظم (5). تنتشر هذه الإنزيمات بصورة واسعة بين افراد المملكة الحيوانية والنباتية والأحياء المجهرية (7). ولكن تعد الأحياء المجهرية (البكتريا والفطريات والخمائر)اكثرها استخداماً لانتاج الإنزيمات المحللة للنشأ لأنها اكثر استقراراً من حيث التنوع الوراثي وسهولة التلاعب الوراثي للحصول على الإنزيمات المرغوبة بالأضافة الى ذلك تكلفتها البسيطة وامكانية التحكم بظروف نموها وانتاجها (8). وكما تقدم هدفت هذه الدراسة الى امكانية الحصول على بكتريا محلية تابعة لجنس الـ*Bacillus* spp منتجة للإنزيمات المحللة للنشأ من خلال المحاور الآتية :

1. عزل بكتريا *Bacillus* spp من التربة المنتجة لبعض انزيمات الاميليز وانتخاب العزلة الأكفأ منها للأنتاج.
2. تحديد الظروف البيئية والمزرعية المثلى لأنتاج تلك الإنزيمات من العزلة المنتخبة.

2-المـــواد و طـــرائــق العمـــل

العزلة البكتيرية

أتبعت طريقة (9) في عزل وتنقية بكتريا *Bacillus* spp ، حيث نظفت عينات التربة من بقايا النباتات ثم وزن 1غم منها وأضيف لها 99 مل من محلول الملح الفسلجي وبذلك أصبح التخفيف 100:1 وعملت منه تخافيف متسلسلة لغاية 1×10^{-6} ووضعت التخافيف في حمام مائي بدرجة حرارة80م لمدة 30 دقيقة ، وبعد إخراج الانابيب تركت لتبرد بدرجة حرارة الغرفة ، تم نشر 0.1 مللتر في اطباق بتري معقمة حاوية على وسط الاكار المغذي من كل تخفيف بوساطة الناشر (L- Shape) المعقم (عمل مكررين لكل تخفيف) وحضنت بدرجة حرارة 37م لمدة 48 ساعة.

تنقية عزلات بكتريا الـ *Bacillus* spp :

تمت عملية تنقية العزلات بنقل جزء من المستعمرات البكتيرية النامية بصورة منفردة على وسط الاكار المغذي بوساطة ناقل (loop) معقم ووضعت في اطباق جديدة حاوية على وسط الاكار المغذي وكررت العملية عدة مرات الى ان تم الحصول على عزلات نقية .

غربلة العزلات البكتيرية المنتجة لبعض الإنزيمات المحللة للنشأ (Amylases Enzymes)

A-الغربلة الاولية (شبه الكمية): استعملت الطريقة الموصوفة من قبل (10) لغربلة العزلات التي لها القابلية على إنتاج الإنزيمات المحللة للنشأ وذلك بنقل المستعمرة البكتيرية الى الاطباق الحاوية على وسط النشأ ونشرت بطريقة التخطيط ووضعت الاطباق في الحاضنة بدرجة حرارة 37 م لمدة (24-48) ساعة ، وبعد انتهاء فترة الحضن غمرت الاطباق بكاشف تحلل النشأ (Lugol's Solution) وتركت لمدة (1-2) دقيقة .ان ظهور المناطق المحيطة بالمستعمرات بشكل شفاف رائق وظهور المناطق البعيدة بلون أزرق دليل على إيجابية الاختبار.

B- الغربلة الثانوية (الكمية) : اخضعت جميع عزلات الـ *Bacillus* spp الموجبة للغربلة الأولية (النوعية) الى الغربلة الكمية.

تحضير اللقاح :تم استعمال المرق المغذي Nutrient broth لغرض تحضير اللقاح ، اذ وزع الوسط المذكور في انابيب مقاومة للحراره بحجم 10 مل لكل انبوبة ثم تم تعقيمها بالمؤصدة ، ثم لقح هذا الوسط بالمستعمرات البكتيرية المنماة على الوسط المغذي الصلب بـ 48 ساعة ، حضنت الانابيب لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37مْ للحصول على اللقاح ذو الكثافة الضوئية 0.2 على طول موجي 600 نانومتر (11).

تحضير وسط الانتاج :استعمل وسط الانتاج الموصوف من قبل (12) لغربلة عزلات بكتريا *Bacillus* spp لانتاج الانزيمات المحللة للنشأ (الفا -اميليز والكلوكواميليز) ، اذ تم تحضير الوسط soluble starch yeast extract trypton (SYT) medium المكون من غرام لكل لتر (10 غم من النشاء القابل للذوبان (soluble starch) و3غم تربتون(trypton) و 3 غم مستخلص خميرة (yeast extract) و1غم لكل من كلوريد الصوديوم (NaCl) ، وفوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين (K_2HPO_4) و 0.2 غم لكل من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين (KH_2PO_4) وكلوريد الكالسيوم ($CaCl_2$) وكبريتات المغنيسوم المائية $(MgSO_4)7H_2O$ ، وبعد اتمام الاذابة لهذه المواد عدل الرقم الهيدروجيني الى 7، ثم وزع الوسط بعدها في دوارق زجاجية سعة 100 مليلتر بواقع 20 مليلتر /دورق وعقم بجهاز المؤصدة ، وبعد انتهاء التعقيم اخرجت الدوارق وبردت الى درجة حرارة الغرفة لتهيئتها لعملية التلقيح .

التنمية في وسط الانتاج : تم تلقيح وسط الانتاج المذكور في الفقرة السابقة بحجم لقاح 5% من حجم الوسط بواقع ثلاث مكررات لكل عزلة التي شملتها الغربلة لمعرفة العزلات الاكفا في انتاج بعض انزيمات الاميليز (الفا اميليز والكلوكواميليز) ، وتم الحضن بالحاضنة الهزازة بسرعة رج 120 (دورة/دقيقة) وبدرجة حرارة 37مْ ولمدة 24 ساعة ، وبعد انتهاء مدة الحضن استعمل جهاز الطرد المركزي بسرعة 10000(دورة /دقيقة) لفصل الكتلة الحيوية عن راشح المزرعة الذي استخدم في تقدير الفعالية الانزيمية لكل من الفا اميليز والكلوكواميليز فضلا عن تقدير البروتين لحساب الفعالية النوعية التي اعتمدت مقياسا لتحديد افضل انتاج لكلا الإنزيمين قيد الدراسة.

أ- طريقة تقدير الفعالية الإنزيمية للألفا- اميليز باستعمال النشأ كمادة تفاعل

قدرت الفعالية الإنزيمية للألفا اميليز المنتج من بكتريا *Bacillus* spp وذلك بتقدير كمية السكريات المختزلة بالطريقة الموصوفة من قبل (13) مع بعض التحوير وذلك باستعمال 1% من النشأ الذائب كمادة اساس، وتعرف الوحدة الإنزيمية لإنزيم الالفا- اميليز بأنها (كمية الإنزيم اللازمة لتحرير مايكرومول واحد من المالتوز كسكر مختزل في الدقيقة الواحدة وتحت نفس ظروف التقدير).

ب- طريقة تقدير الفعالية الإنزيمية لإنزيم الكلوكواميليز

قدرت الفعالية الإنزيمية لإنزيم الكلوكواميليز المنتج من بكتريا *Bacillus* spp بإستعمال عدة الكلوكوز glucose kit بالطريقة الموصوفة من قبل(14) مع بعض التحويرات باستعمال المالتوز بنسبة (2 %) كمادة تفاعل .وتعرف الوحدة الانزيمية لإنزيم الكلوكواميليز بأنها (كمية الإنزيم اللازمة لتحرير مايكرومول واحد من الكلوكوز في الدقيقة الواحدة وتحت نفس ظروف التقدير).

تحديد الظروف المثلى لإنتاج انزيمي الالفا-اميليز والكلوكواميليز من عزلتي بكتريا *Bacillus* spp المنتخبة

تأثير مدة الحضن

تم تلقيح الوسط الانتاجي SYT medium بـ 5% من المزروع البكتيري وحضنت الدوارق بدرجة حرارة 37م بسرعة 120 دورة /دقيقة ولمدد مختلفة (6 و 24 و 48 و72) ساعه ومن ثم تم تقدير الفعالية الانزيمية والبروتين لكلا الانزيمين قيد الدراسة.

دراسة تأثير درجة حرارة الحضن

لقح الوسط الانتاجي بـ 5%من المزروع البكتيري وحضنت الدوارق جميعها بدرجات حرارية مختلفة (22 و 27 و 32 و 37 و 42 و 47 و 52) م وبسرعة رج 120 (دورة /دقيقة) وللمدة المثلى للحضن ومن ثم تم تقدير الفعالية الانزيمية والبروتين لكلا الانزيمين .

تأثير سرع الرج

تم تلقيح الوسط الانتاجي SYTmedium بـ 5% من المزروع البكتيري وحضنت الدوارق جميعها في حاضنات هزازة وبسرع رج مختلفه (0 و 80 و 120 و160) دورة/دقيقة بالمدة ودرجة الحرارة المثلى للحضن ومن ثم تم تقدير الفعالية الانزيمية والبروتين و الفعالية النوعية لكلا الانزيمين .

تأثير المصدر الكاربوني

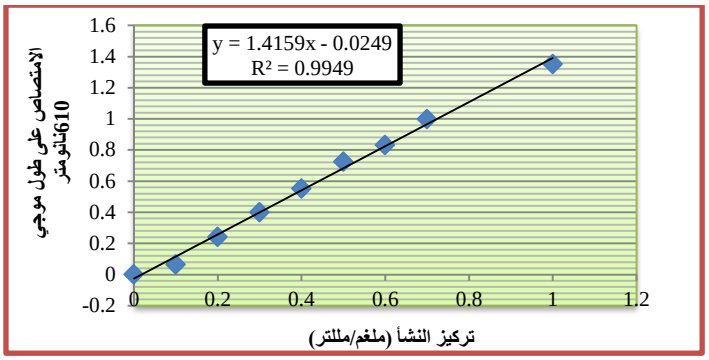
لقح الوسط الانتاجي SYTmedium بـ5% من حجم المزروع البكتيري وذلك لمعرفة نوع المصدر الكاربوني الأفضل للأنتاج وذلك باستعمال (بدون مصدر كاربوني، فوح الرز، النشاء الذائب، نشاء الذرة، الكلوكوز، المالتوز، اللاكتوز، الفركتوزوالديكستران) كبدائل لمصدر الكاربون الموجود في الوسط الانتاجي وحضنت الدوارق جميعا في الظروف المثلى من درجة حرارة الحضن ومدة الحضن وسرعة الرج لكلا الإنزيمين قيد الدراسة ، ومن ثم قدرت الفعالية الإنزيمية والبروتين لكلا الإنزيمين .

تحضير ماءالرز(الفوح)

حضر ماء الرز وذلك بطهي الرز بالماء المغلي لمدة 15 دقيقة وبعد ذلك تم اجراء عملية الترشيح باستعمال قماش للحصول عليه بشكل رائق ، ثم خفف الفوح المتحصل عليه الى النسبة المطلوبة من السكريات (النشأ)

تقدير تركيز النشأ الموجود في ماء الرز

عمل المنحنى القياسي للنشأ حسب الطريقة الموصوفة بطريقة Health و Safety(2009)



شكل(1) المنحنى القياسي لتقدير النشأ بطريقة Health و Safety(2009).

تأثير تركيز المصدر الكاربوني

لقح وسط SYT medium الانتاجي بحجم لقاح 5% بعد تغيير المصدر الكاربوني الى مادة المصدرالأمثل ولكن بتراكيز مختلفة (0، 0.5، 1، 1.5 ، 2، 2.5 ، 3، 3.5، 4) % وتم الحضن بالظروف المثلى من درجة حرارة ومدة الحضن وسرعة الرج ومن ثم قدرت الفعالية الإنزيمية وتركيز البروتين لكلا الإنزيمين قيد الدراسة .

تأثير المصدر النتروجيني

لقح وسط SYT medium الانتاجي بحجم لقاح 5% وذلك بأستبدال المصدر الكاربوني نوعاً وتركيزاً وكذلك تم الحضن بالظروف المثلى من درجة حرارة ومدة حضن وسرعة الرج مع تغيير المصدر النتروجيني الى (بدون مصدر نتروجيني ، التربتون ، مستخلص الخميرة ، كلوريد الامونيوم ،فوسفات الامونيوم الهيدروجينية ،كبريتات الامونيوم و اليوريا) وايضا تم تشكيل توليفة من المصدر النتروجيني والتي اشتملت على (مستخلص الخميرة مع التربتون و التربتون مع اليوريا و مستخلص الخميرة مع اليوريا و تربتون مع كلوريد الامونيوم و مستخلص الخميرة مع كلوريد الامونيوم و تربتون مع فوسفات الامونيوم الهيدروجينية و مستخلص الخميرة مع فوسفات الامونيوم الهيدروجينية و تربتون مع كبريتات الامونيوم و مستخلص الخميرة مع كبريتات الامونيوم) ومن ثم قدرت الفعالية النوعية لكلا الإنزيمين الألفا-أميليز والكلوكواميليز.

تأثير تركز المصدر النتروجيني

لقح وسط SYT medium بحجم لقاح 5% وذلك بأستبدال المصدر الكاربوني نوعاً وتركيزاً وكذلك تم الحضن بالظروف المثلى من درجة حرارة ومدة حضن وسرعة الرج مع تغيير المصدر النتروجيني الى المصدر الأمثل ولكن بتراكيز مختلفة (0 و 0.2 و 0.4 و 0.6 و 0.8 و 1) % ومن ثم قدرت الفعالية النوعية لانزيمي الألفا-أميليز و الكلوكواميليز.

تأثير مصدر الاملاح المعدنية

لقح وسط SYT medium الانتاجي بحجم لقاح 5% وحسب الظروف المثلى للحضن من درجة حرارة ومدة حضن وسرعة الرج وكذلك نوع وتركيز المصدر الكاربوني ونوع وتركيز المصدر النتروجيني لكلا الإنزيمين مع تغيير نوع الأملاح المعدنية الى (بدون أملاح و كلوريد الصوديوم و فوسفات البوتاسيوم و كبريتات المغنيسيوم و كلوريد الكالسيوم و كلوريد الصوديوم مع فوسفات البوتاسيوم و كلوريد الصودوم مع كبريتات المغنيسيوم ، كلوريد الصوديوم مع كلوريد الكالسيوم و كلوريد الصوديوم مع كبريتات المغنيسيوم وكاوريد الكالسيوم وفوسفات البوتاسيوم و كبريتات المغنسيوم مع كلوريد الكالسيوم مع فوسفات البوتاسيوم) وبنفس التراكيز المذكورة في الوسط SYTmedium ، ومن قدرت الفعالية النوعية لانزيمي الألفا-أميليز و الكلوكواميليز .

تأثير تركيز مصدر الاملاح المعدنية

لقح وسط SYT medium الانتاجي بحجم لقاح 5% وحسب الظروف المثلى للحضن من درجة حرارة ومدة حضن وسرعة رج وكذلك نوع وتركيز المصدر الكاربوني ونوع وتركيز المصدر النتروجيني وحسب نوع الملح المعدني الأمثل لكلا الإنزيمين ولكن بتراكيز مختلفة (0 و 0.06 و 0.16 و 0.26 و 0.36 و 0.46 و 0.56)% ومن ثم قدرت الفعالية النوعية لإنزيمي الألفا-أميليز والكلوكواميليز.

تأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي

عدل الرقم الهيدروجيني لوسط انتاج الانزيمين الفا اميليز والكلوكواميليز الى (4 و 4.5 و 5 و 5.5 و 6 و 6.5 و 7 و 7.5 و 8) باستخدام 1عياري من هيدروكسيد الصوديوم أوحامض الهيدروكلوريك ولقح الوسط الانتاجي بحجم لقاح 5% من المزروع البكتيري وحسب الظروف المثلى للحضن لكلا الإنزيمين قيد الدراسة ومن ثم قدرت الفعالية النوعية لكلا الانزيمين لمعرفة الرقم الهيدروجيني الأمثل للأنتاج.

تأثير حجم اللقاح

لقح وسط انتاج انزيمي الفا اميليز والكلوكواميليز بحجوم لقاح مختلفة مقدارها (2.5 و 5 و5.5 و10)% مأخوذة من مزروع بكتيري منشط على وسط المرق بدرجة حرارة 37 مْ المغذي لمدة 24 ساعة وتم الحضن حسب الظروف المثلى من التجارب السابقة ومن ثم قدرت الفعالية النوعية لكلا الانزيمين لمعرفة حجم اللقاح الأمثل .

النتائج والمناقشة

العزل والتنقية :

تم عزل 75 مستعمرة مختلفة بالشكل والحجم وطبيعة القوام ونوع حافات المستعمرة وتم تنقيتها من خلال النقل المتكرر على اطباق تحتوي وسط الأكار المغذي وباستجابتها الموجبة لصبغة غرام وقابليتها على تكوين السبورات تم التاكد مبدئياً بانها تعود لجنس *Bacillus* spp.

غربلة عزلات بكتريا *Bacillus* spp لإنتاج بعض الإنزيمات المحللة للنشأ (الأميليزات)

A-الغربلة الأولية :

اخضعت العزلات التابعة لجنس *Bacillus* spp والبالغ عددها 75 عزلة الى غربلة اولية على على الوسط الزرعي الموصوف من قبل (10) وسط تحلل النشأ ، وأظهرت النتائج هنالك تفاوت في تكون المنطقة الشفافة حول المستعمرات البكتيرية النامية ، اذ لوحظ ان 24 عزلة من بكتريا *Bacillus* spp كانت ايجابية لهذا الأختبار. وبناءاًعلى ماتقدم فقد استبعدت العزلات الغير مكونة للمنطقة الشفافة او التي كونت هالة ذات قطرصغير ، في حين اخضعت بقية العزلات للغربلة الثانوية.

B-الغربلة الثانوية :

تم اخضاع جميع العزلات الموجبة للغربلة الأولية (النوعية) والتي عددها 24 عزلة لغرض تحديد الأكفأ منها في انتاج بعض الإنزيمات المحللة للنشأ (الفا اميليز والكلوكواميليز) ، وقد اقتصرت عملية الغربلة على الإنزيمات الخارج خلوية لكون عملية فصل هذه الإنزيمات من أوساط النمو تمتاز بسهولتها فضلاً عن كونها غير مكلفة (15) .اظهرت النتائج المبينة في جدول (1) ان لبعض العزلات البكتيرية القابلية على إنتاج الإنزيمين معاً ولكن بدرجات متفاوتة .

الجدول رقم(1) الغربلة الثانوية لأنتاج إنزيم الألفا-أميليز والكلوكواميليز المنتج من بكتريا *Bacillus* spp

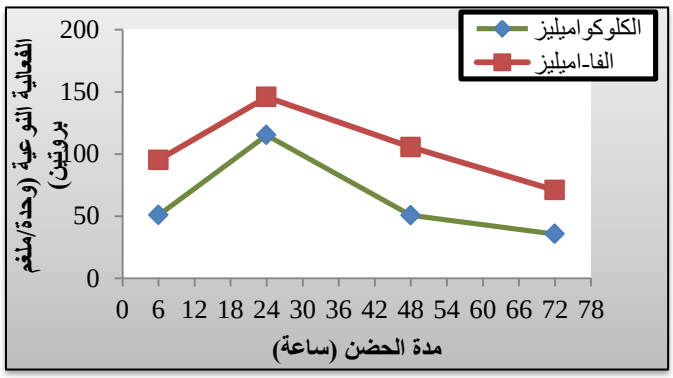
رقم العزلة	الفعالية الإنزيمية للالفا-اميليز وحدة/مللتر	الفعالية الإنزيمية للكلوكواميليز وحدة /مللتر	كمية البروتين ملغم/مللتر	الفعالية النوعية للالفا-اميليز وحدة/ملغم بروتين	الفعالية النوعية للكلوكواميليز وحدة/ملغم بروتين
1	9.00	7.043	0.057	157.895	123.561
2	7.150	4.887	0.091	78.571	53.626
3	9.620	4.833	0.078	123.333	61.962
4	6.040	5.176	0.052	116.154	99.538
5	9.570	4.0932	0.049	195.306	83.530
6	5.730	4.846	0.070	81.857	69.228
7	8.090	6.763	0.077	105.065	87.831
8	8.880	5.172	0.090	98.666	57.466
9	5.230	5.156	0.062	84.355	83.161
10	7.801	4.510	0.112	69.652	41.000
11	6.343	3.710	0.0780	81.320	47.564
12	6.050	5.045	0.083	72.892	60.783
13	7.520	5.278	0.074	101.622	71.324
14	9.020	4.815	0.066	136.666	72.955
15	3.417	4.127	0.076	44.961	54.302
16	9.201	4.780	0.0901	102.120	53.111
17	5.409	7.852	0.051	106.059	153.961
18	8.270	5.229	0.090	91.888	69.720
19	2.150	6.499	0.075	28.666	86.653
20	5.360	5.074	0.080	67.00	63.425
21	3.5	3.520	0.061	57.377	57.705
22	4.630	2.468	0.080	57.875	30.850
23	2.744	2.618	0.0740	37.081	35.378
24	6.839	3.353	0.070	97.700	47.900
LSD 0.05				1.764	5.499

وتشير تلك النتائج الى تفوق العزلة رقم 5 بإنتاجها للإنزيمات المحللة للنشأ (الالفا-أميليز) وتفوق العزلة رقم 17 بانتاجها لإنزيم الكلوكواميليز مقارنة مع بقية العزلات قيد الدراسة ، اذ بلغت الفعالية النوعية 195.306 و 153.961 (وحدة/ملغم بروتين) لكل من الإنزيمين الألفا-أميليز والكلوكواميليز على التوالي. وفي ضوء هذه النتائج تم اجراء الفحوصات التشخيصية وكذلك تمت دراسة الظروف البيئية والمزرعية المثلى للعزلة رقم 5 لأنتاج إنزيم الألفا-اميليز ،والعزلة رقم 17 لأنتاج إنزيم الكلوكواميليز .

تحديد الظروف المثلى لإنتاج إنزيمي الألفا-أميليز والكلوكواميليزللعزلتين رقم 5 و17

تأثير مدة الحضن

درس تأثير مدة الحضن في انتاج إنزيم الألفا –أميليز من العزلة رقم 5 بمتابعة انتاج الإنزيم كل 24 ساعة ولمدة ثلاث أيام ويتضح من الشكل (2) ان الفعالية النوعية لإنزيم الألفا-أميليز بلغت اقصاها الى 145.811 وحدة/ملغم بروتين بعد 24 ساعة ثم انخفضت بعد ذلك الى 70.923 وحدة/ملغم بروتين بعد 72 ساعة من التخمر. في حين وصلت الفعالية النوعية لإنزيم الكلوكواميليزمن العزلة رقم17 الى 115.250وحدة /ملغم بروتين بعد 24ساعة ثم انخفضت بعد ذلك الى 35.591 وحدة/ملغم بروتين بعد 72 ساعة من التخمر .تعد النتيجة المتحصلة من هذه الدراسة موافقة لما وجده (16) ان مدة حضن مقدارها 24 ساعة كانت المثلى لإنتاج الألفا- اميليز من بكتريا *Bacillus licheniformis* ، اشار ايضاً(11) ان مدة الحضن المثلى لأنتاج انزيم الكلوكواميليز المنتج من البكتريا المطفرة *Bacillus* sp. FME هي 24 ساعة .

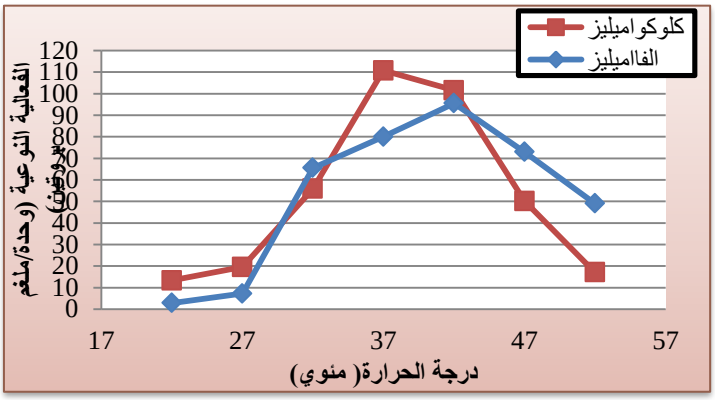


L.S.D (0.05) =5.92 و9.41 للالفا-اميليز الكلوكواميليز على التوالي

الشكل (2) تأثير مدة الحضن في انتاج إنزيمي الألفا-أميليز والكلوكواميليز من بكتريا *Bacillus* spp للعزلتين 5 و17

تأثير درجة حرارة الحضن

درس تأثير درجة حرارة الحضن في انتاج انزيمي الألفا-أميليز والكلوكواميليزللعزلتين 5 و17 من بكتريا *Bacillus* spp. ويتضح من الشكل (3) أن أعلى فعالية نوعية لإنزيم الفا –أميليز كانت باستعمال الدرجة الحرارية 42م اذ بلغت الفعالية النوعية 95.52 وحدة/ملغم بروتين والدرجة الحرارية 37م لإنتاج انزيم الكلوكوأميليز اذ بلغت الفعالية النوعية 110.724 وحدة/ملغم بروتين. وفي ضوء هذه النتائج فقد تم اختيار الدرجات الحرارية 37م و42م كافضل حرارة لانتاج الإنزيمين الكلوكواميليز واللألفا-أميليز على التوالي واعتمدت في التجارب اللاحقة كافة.



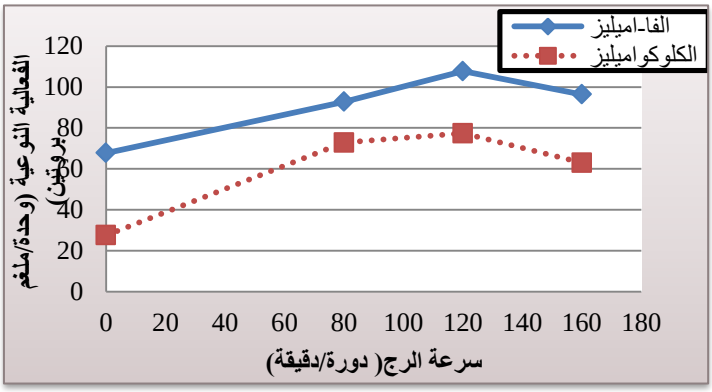
L.S.D (0.05) =1.865 و 0.749 للالفا-اميليز والكلوكواميليز على التوالي

الشكل(3) تأثير درجة الحرارة في انتاج انزيني الألفاااميليز والكلوكواميليز من بكتريا *Bacillus* spp للعزلتين 5 و17

ان لدرجة الحرارة تأثير مهم في بنية الإنزيم وانتاجيته ،اي ان درجات الحرارة العالية تؤثر على ايض الخلايا الحية (المتضمنة بتخليق البروتين والأنزيم) أو قد تعمل على مسخ العديد من الإنزيمات الحساسة فضلاً عن ذلك فانها قد تؤدي الى تغيير في بنية الإنزيم وتقليل نشاطه اي انها تعد عامل مؤثر لمعظم الفعاليات الحيوية فهي تؤثر في مختلف النشاطات الإنزيمية في الخلية (17). ان النتيجة المتحصلة من هذه الدراسة تؤيد ماورد في العديد من الدراسات فقد وجد (18) أن درجة الحرارة 42م هي المثلى لإنتاج انزيم الألفا-أميليز من البكتريا *Bacillus amyloliquefaciens* P-001 .

تأثير سرعة الرج

يتضح من الشكل (4) ان انتاج الإنزيمين كان في اعلى مستوياته عند استعمال الحاضنة الهزازة وبسرعة رج 120 دورة/دقيقة إذ بلغت الفعالية النوعية (107.721 و 77.370) وحدة/ملغم بروتين لإنزيمي الألفا-أميليز والكلوكواميليز على التوالي، بينما كانت أوطأ فعالية نوعية باستعمال الحاضنة الساكنة إذ بلغت الفعالية النوعية 67.730 وحدة/ملغم بروتين لإنزيم الألفا-اميليز و 27.563 وحدة/ملغم بروتين لإنزيم الكلوكواميليز. ان استعمال الحاضنة الهزازة في انتاج الإنزيمات بوساطة الأحياء المجهرية الهوائية يسمح بالتجانس الأمثل لمكونات البيئة فضلاً عن تكوين نسبة من الأوكسجين داخل البيئة الانتاجية عن طريق الحركة الرحوية للرج بحيث يسمح للكائن المجهري من النمو في اتزان (19).وهنالك دراسة تتفق مع هذه النتائج المتحصل عليها في هذه الدراسة اذ استعمل (11) سرعة سرج 120 دورة/دقيقة لانتاج انزيم الكلوكواميليز من البكتريا المطفرة *Bacillus* sp. FME .

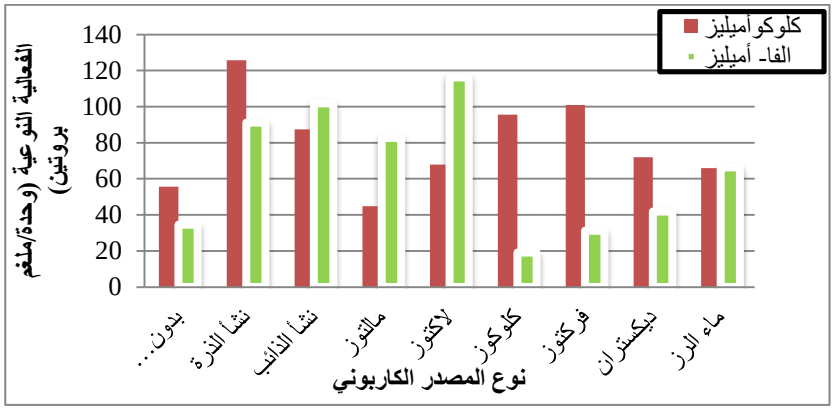


L.S.D (0.05) =2.666 و0.796 للالفا-اميليز الكلوكواميليز على التوالي

الشكل (4) تأثير سرعة الرج في إنتاج إنزيمي الألفا- أميليز والكلوكواميليز المنتجة من بكتريا *Bacillus spp* للعزلتين 5 و17

تأثير نوع وتركيز المصدر الكاربوني

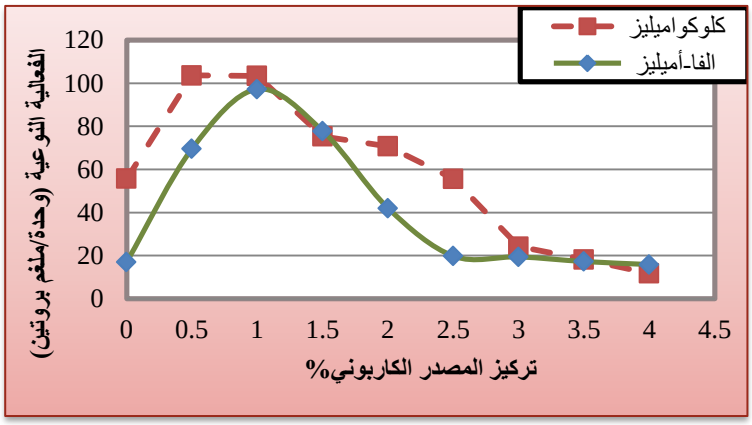
ان نوع وتركيز المصدر الكاربوني في الوسط الزرعي مهم كمصدر للطاقة لإنتاج الإنزيمات المحللة للنشأ (الفا-اميليز والكلوكواميليز) من بكتريا *Bacillus spp* المعزولة محليا ، وكما موضح في الشكل (5) لوحظ هنالك تباين في تأثير نوع المصدر الكاربوني في انتاج الإنزيمات المحللة للنشأ ، واظهرت تلك النتائج ان افضل مصدر كاربوني هو سكر اللاكتوز والنشأ الذائب ، في انتاج انزيمي الالفا-اميليز والكلوكواميليز على التوالي ، اذ بلغت الفعالية النوعية 116.220 و 125.655 وحدة/ملغم بروتين لكلا الأنزيمين على التوالي ، ومن الشكل رقم (6) اظهرت النتائج ان افضل تركيز كان 1% وبفعالية نوعية مقدارها 97.272 و 103.634 وحدة/ملغم بروتين لكل من سكر اللاكتوز والنشأ الذائب لأنتاج إنزيمي الألفا-اميليز والكلوكواميليز على التوالي . ان هذه النتائج تتوافق مع ماتوصل اليه (20) ان اللاكتوز يعد افضل مصدر كاربوني لأنتاج انزيم الألفا اميليز من البكتريا *Bacillus sp.* HPE 10 .



L.S.D (0.05) =4.67 و4.555 للالفا-اميليز الكلوكواميليز على التوالي

الشكل(5) تأثير نوع المصدر الكاربوني في انتاج انزيمي الألفا-اميليز والكلوكواميليز من بكتريا *Bacillus* spp للعزلتين 5 و17

تتفاوت الدراسات السابقة في استعمال تركيز المصدر الكاربوني الأمثل في انتاج الأميليزات فقد توصل (21) الى ان تركيز 1% من النشأ كافضل مصدر كاربوني هو الامثل لانتاج انزيم الاميليز من بكتريا *Bacillus spp* . وكذلك استعمل (22) تراكيز مختلفة للنشأ كافضل مصدر كاربوني لانتاج انزيم الاميليز من بكتريا *Bacillus tequilensis* RG-01 ووجد ان افضل تركيز كان 4% اذ بلغت الفعالية الانزيمية 5700 وحدة/مللتر وعند الزيادة او النقصان عن هذا التركيز الامثل يؤدي الى انفاض الفعالية الإنزيمية وتحت نفس الظروف البيئية والمزرعية .

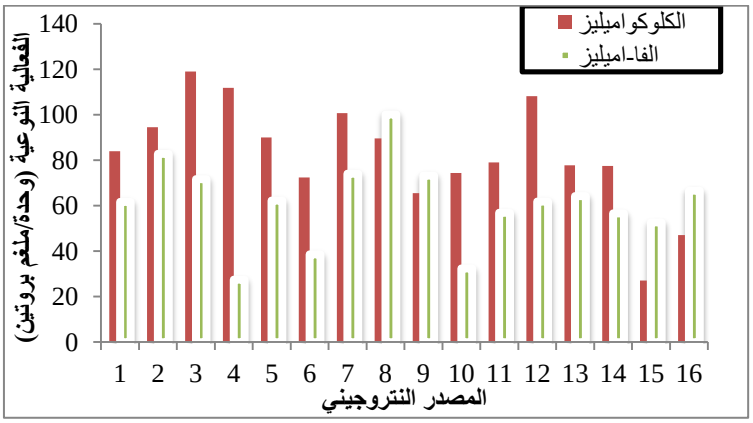


L.S.D (0.05) = 1.51 و 1.428 للالفا-اميليز الكلوكواميليز على التوالي

الشكل (6) تأثير تركيز المصدر الكاربوني في انتاج إنزيمي الألفا-اميليز والكلوكواميليز من بكتريا *Bacillus spp* للعزلتين 5 و17

تأثير نوع وتركيز المصدر النتروجيني

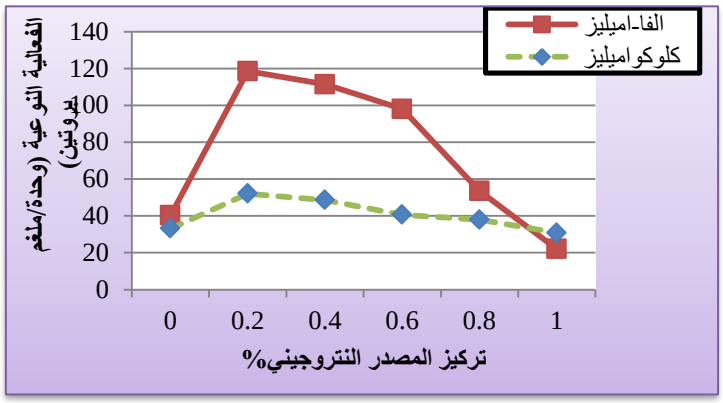
تم دراسة تأثيرنوع وتركيز المصدر النتروجيني في انتاج انزيمي الألفا- اميليز والكلوكواميليز من بكتريا *Bacillus spp* للعزلتين 5 و 17 وذلك باختبار عدد من المصادر النتروجينية منها عضوية وأخرى غير عضوية وبتراكيز مختلفة . واظهرت النتائج الموضحة في الشكل (7) والشكل (8) بان هنالك تأثير محفز للمصدر النتروجيني في انتاج الإنزيمين ، حيث كانت المعاملة التي تحتوي على المصدر النتروجيني المكون من الخميرة والتربتون وبتركيز 0.2 % هي المثلى في انتاج انزيمي الألفا-اميليز اذ بلغت الفعالية النوعية 138.939 وحدة /ملغم بروتين بالنسبة لإنزيم الألفا اميليز ،بينما بالنسبة لأنتاج انزيم الكلوكواميليز كان المصدر النتروجيني الأمثل هو مستخلص الخميرة وبتركيز 0.2% فقط اذ بلغت الفعالية النوعية 100.175وحدة/ملغم بروتين .



L.S.D (0.05) =5.454 و 3.749 للالفا-اميليز الكلوكواميليز على التوالي

الشكل(7) تأثير نوع المصدر النتروجيني في انتاج إنزيمي الألفا-اميليز والكلوكواميليز من بكتريا ***Bacillus spp*** للعزلتين 5 و 17

1- بدون مصدر نتروجيني
2- تربتون
3- مستخلص الخميرة
4- يوريا
5- كلوريد الأمونيوم
6- فوسفات الأمونيوم
7- كبريتات الأمونيوم
8- تربتون مع مستخلص الخميرة
9- تربتون مع اليوريا
10- مستخلص الخميرة مع اليوريا
11- تربتون مع كبريتات الأمونيوم
12- مستخلص الخميرة مع كبريتات الأمونيوم
13- تربتون مع كلوريد الأمونيوم
14 مستخلص الأمونيوم مع كلوريد الأمونيوم
15 تربتون مع فوسفات الأمونيوم
16 -مستخلص الخميرة مع فوسفات الأمونيوم



L.S.D (0.05) =1.32 و3.838 للالفا-اميليز الكلوكواميليز على التوالي

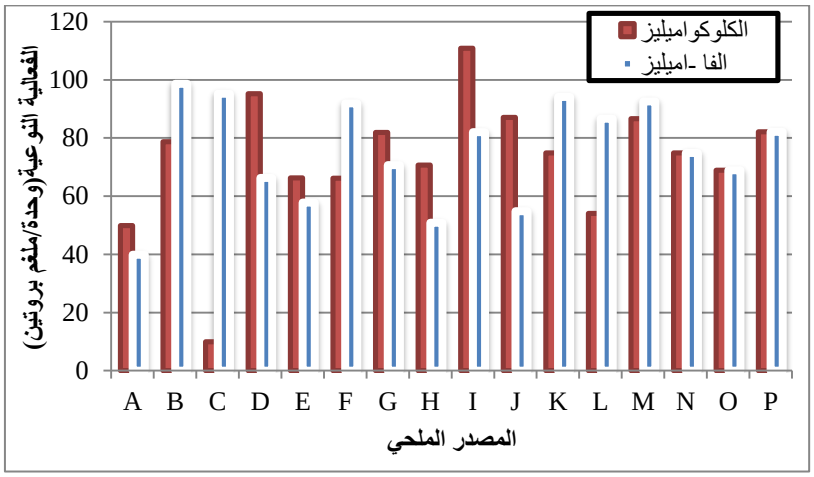
الشكل(**8**) تأثير تركيز نوع المصدر االنتروجيني في انتاج إنزيمي الألفا-اميليز والكلوكواميليز من بكتريا***Bacillus spp*** للعزلتين 5 و17

واعتمادا على هذه النتائج فقد جرت عملية انتاج الإنزيمين باختيار المصادر النتروجينية المثلى للانتاج لكلا الإنزيمين قيد الدراسة.هذه الدراسة تتوافق مع ماتوصل اليه(23)من ان افضل مصدر نتروجيني لأنتاج انزيم الألفا-أميايز من بكتريا *Thermoactinomyces thalophilus* F13 هو التربتون ومن ثم ياتي بعده مستخلص الخميرة.وايضاً اشار(24) بان مستخلص الخميرة هوافضل مصدر نتروجيني لتخليق انزيم الألفا- اميليز من بكتريا *Bacillus amyloliquefaciens* .يعد تركيز المصدر النتروجيني عاملا ضروريا لانتاج انزيم الاميليز بوساطة احياء المتنوعة (25) ، اشارت بعض الدراسات الى ان تخليق انزيم الأميليز بوساطة بكتريا *Bacillus sp* تصل اقصاها عند استعمال مستخلص الخميرة كمصدر نتروجيني وبتركيز 0.4% (26) .

تأثير الأملاح المعدنية

درس تأثير بعض الاملاح المعدنية في انتاج انزيمي الألفا-أميليز والكلوكوأميليز المنتج من بكتريا *Bacillus* spp للعزلتين 5 و17 على التوالي ، ويتضح من الشكل (9) ان الجمع لكل الاملاح المعدنية المستعملة في وسط الانتاج اظهرت تفوقاً في انتاج إنزيم الألفا-املیز وبفعالية نوعية مقدارها 98.703 وحدة/ملغم بروتين . بينما كانت المعاملة الحاوية على مزيج من (كلوريد الصوديوم وكبريتات المغنيسيوم وكلوريد الكالسيوم) اكفأ معاملة لأنتاج إنزيم الكلوكواميليز من العزلة رقم 17 اذ بلغت الفعالية النوعية 110.9 وحدة/ ملغم بروتين . وفي ضوء هذه النتائج تم اختيار تلك المعاملات المذكورة من المصادر الملحية لأنتاج انزيمي الألفا – اميليز والكلوكواميليز وتم استعمالهما في مراحل الدراسة اللاحقة جميعاً.

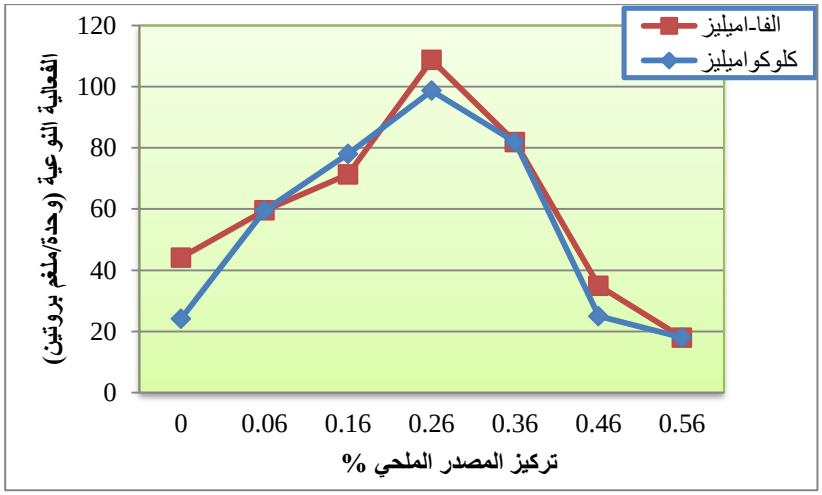
درست تأثير تركيز الأملاح المعدنية في انتاج انزيمي الالفا-اميليز والكلوكواميليزالمنتج من بكتريا *Bacillus spp للعزلتين* 5 و 17 على التوالي، وتبين من الشكل (10) ان تركيز المصدر الملحي 0.26 % كان اعلى انتاجاً لإنزيمي الألفا اميليز والكلوكواميليز اذ بلغت الفعالية النوعية لكليهما 108.676 و 98.676 وحدة/ملغم بروتين على التوالي . وفي ضوء هذه النتائج اختيرت تلك المعاملة المذكورة من تراكيز الاملاح المعدنية لانتاج انزيمي الالفا-اميليز والكلوكواميليزالمنتج من بكتريا *Bacillus spp* للعزلتين 5 و 17 وتم استعمالها في مراحل الدراسة اللاحقة جميعاً .



L.S.D (0.05) = 4.748 و 6.799 للالفا-اميليز الكلوكواميليز على التوالي

الشكل(9) تأثير نوع الملح المعدني في انتاج إنزيمي الألفا-اميليز والكلوكواميليز من بكتريا *Bacillus spp* للعزلتين 5 و 17

A- خالي من الأملاح والمعادن
B- جميع الأملاح
C -NaCl
D-$MgSO_4$
J- خليط من $MgSO_4$ و NaCl و K_2HPO_4 و KH_2PO_4
L- خليط من NaCl و K_2HPO_4 و KH_2PO_4
N - خليط من K_2HPO_4 و KH_2PO_4 و MgSO
P - خليط من $CaCl_2$ و K_2HPO_4 و KH_2PO_4
E- K_2HPO_4 و KH_2PO_4
F- $CaCl_2$
G- خليط من $MgSO_4$ و K_2HPO_4 و KH_2PO_4 و $CaCl_2$
H- خليط من K_2HPO_4 و KH_2PO_4 و $CaCl_2$ و NaCl
K- خليط من NaCl و $MgSO_4$
M- خليط من NaCl و $CaCl_2$
O- خليط $MgSO_4$ و $CaCl_2$



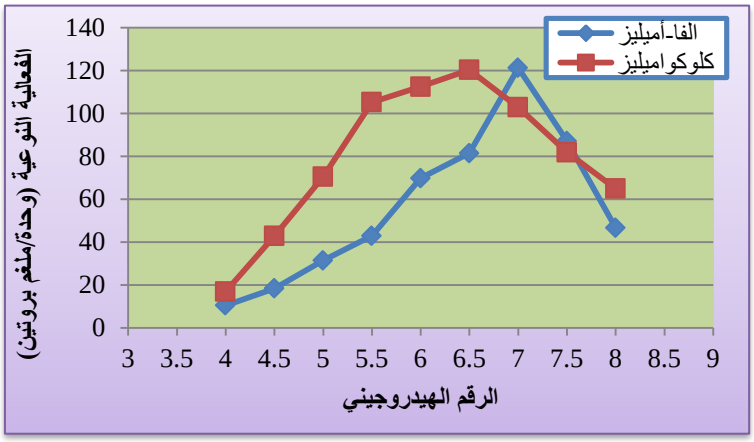
L.S.D (0.05) = 2.65 و 4.33 للالفا-اميليز الكلوكواميليز على التوالي

الشكل(10) تأثير تركيز نوع المصدر الملحي في انتاج إنزيمي الألفا-اميليز والكلوكواميليز من بكتريا *Bacillus spp* للعزلتين 5 و 17

تباينت الدراسات في استعمال الاملاح المعدنية في انتاج الإنزيمات المحللة للنشأ فقد استعمل (27) وسط انتاجي المدعم ببعض الاملاح المعدنية مثل (NaCl بتركيز 1.5% و$MgSO_4.7H_2O$ بتركيز 0.5% و KH_2PO_4 بتركيز 0.5% و $CaCl_2$ بتركيز 0.1% لانتاج انزيم الالفا-اميليز من بكتريا *Bacillus* spp اذ كانت الفعالية الإنزيمية 96 وحدة/غرام وهذه الاملاح المستعملة يطابق النتائج المتحصل عليها في هذه الدراسة .

تأثير الرقم الهيدروجيني الأبتدائي

يتضح من الشكل (11) ان أفضل رقم هيدروجيني ابتدائي لإنتاج انزيم الألفا-اميليز من بكتريا *Bacillus spp* من العزلة رقم 5 هو7 اذ بلغت الفعالية النوعية 121.182 وحدة/ملغم بروتين ، كمايتضح ايضاً أن أفضل رقم هيدروجيني ابتدائي لإنتاج انزيم الكلوكواميليز من العزلة رقم 17 هو6.5 اذ بلغت الفعالية النوعية 120.304 وحدة/ملغم بروتين . وبناءاً على ماتقدم من نتائج فقد تم تعديل الرقم الهيدروجيني لوسط الإنتاج الى 7 بالنسبة لإنتاج انزيم الألفا-أميليز وتعديل الرقم الهيدروجيني لوسط انتاج الكلوكواميليز الى 6.5 في مراحل الدراسة اللاحقة جميعها.



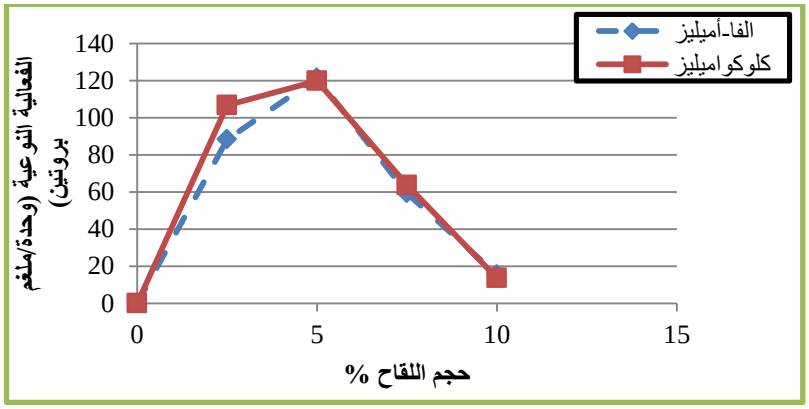
L.S.D (0.05) = 0.701 و3.897 للالفا-اميليز الكلوكواميليز على التوالي

الشكل(11) تأثير الرقم الهيدروجيني الأبتدائي الملحي في انتاج إنزيمي الألفا-اميليز والكلوكواميليز من بكتريا *Bacillus spp* للعزلتين 5 و 17

ويلاحظ ايضاً من الشكل(11) ان الفعالية النوعية لإنزيمي الألفا-اميليز والكلوكواميليز تنخفض عندنقصان و زيادة الرقم الهيدروجيننني الأمثل للأنتاج وذلك لان الرقم الهيدروجيني يلعب دور مهم في وسط النمو مما يؤدي الى تحفيز التغيرات الشكلية للكائن الحي لافراز الإنزيم (28).وتتفق النتيجة المتحصلة من هذه الدراسة مع ماتوصل اليه (29) في ان معظم سلالات بكتريا *Bacillus* تنمو عند الرقم الهيدروجيني الأمثل (6-7) لتنتج انزيم الألفا-اميليز. ويذكر ان الرقم الهيدروجيني يعد احد العوامل المزرعية التي ينبغي التحكم بها لتحقيق الانتاج بمستويات عالية من الإنزيمات الميكروبية ،وليس بالضرورة أن يتوافق الرقم الهيدروجيني الأمثل لأنتاج انزيم معين من الأحياء المجهرية مع الرقم الهيدروجيني الأمثل لنمو تلك الأحياء توافقاً تاماً فقد يكون هذا مختلفاً عن ذلك لأسباب تتعلق بالعوامل الداخل خلوية والخاصة بالتعبير عن الصفات الوراثية للإنزيم المراد انتاجه (30).

تأثير حجم اللقاح

تشير النتائج الموضحة في الشكل (12) الى ان انتاج الإنزيمين يصل الى اقصاه باستعمال حجم لقاح مقداره 5% اذ بلغت الفعالية النوعية لكلا الإنزيمين 121.408 و 119.758 وحدة/ملغم بروتين على التوالي ، لذا قد اعتمدت هذه النتيجة واستعملت في مراحل الدراسة اللاحقة جميعها. يعد حجم اللقاح حرجاً لأي عملية حيوية لذا يجب ان يضاف بالمستوى الأمثل (31). وان نسبة حجم اللقاح في الى الوسط الإنتاجي يعطي انتاجية مثلى لمختلف الإنزيمات اعتمادا على نوع الكائن الحي وظروف الأنتاج (32) .



L.S.D (0.05) = 0.671 و2.072 للالفا-اميليز الكلوكواميليز على التوالي

الشكل(12) تأثير حجم اللقاح في في انتاج إنزيمي الألفا-اميليز والكلوكواميليز من بكتريا *Bacillus spp* للعزلتين 5 و 17

وبالرجوع الى الشكل (12) يلاحظ انخفاض الفعالية النوعية للإنزيمين باستعمال حجوم كبيرة ، اذ انخفضت الى 15.43 و 13.67 وحدة/ملغم بروتين لإنزيمي الالفا-اميليز والكلوكواميليز على التوالي باستعمال حجم لقاح مقداره 10 % . ويمكن تفسير الأنخفاض الحاد بانتاج هذين الإنزيمين من بكتريا*Bacillus spp* عند استعمال حجوم كبيرة من اللقاح وذلك لإنخفاض مستوى المواد الغذائية نتجة استهلاكها لتكوين الكتلة الحيوية والنمو السريع للكائن الحي (31) .تباينت حجوم اللقاح المستعملة في انتاج انزيمي الألفا-أميليز والكلوكواميليز المنتجة من الاحياء المجهرية فقد استعمل (11) ايضاً حجم لقاح مقداره 5% من وسط اللقاح المحضر لإنتاج انزيم الكلوكواميليز من البكتريا المطفرة Mutated *Bacillus sp*. FME وتعد هذه الدراسة ايضاً مطابقة للنتائج المتحصل عليها .ان حجم اللقاح يلعب دور كبير في عملية التخمر لانتاج الإنزيمات اذ ان الزيادة في حجم اللقاح تؤدي الى انخفاض انتاج الإنزيم وذلك لان الحجوم الكبيرة من اللقاح تؤدي الى النمو السريع للكتلة الحيوية واستهلاك المواد الغذائية الموجودة في الوسط وهذا بدوره يؤثر بانتاج الإنزيمات (33).

المصادر

1. **Baks, T., Janssen, A.E.M.,and Boom, R.M. (2006).** The effect of carbohydrates on _- amylase activity measurements. Enzyme Microbial Technology 39: 114-119.
2. **Haifeng, L.i., Zhenming, C., Xiaohong, W., Xiaohui, D., Liyan, M., Lingmei, G. (2006).** Purification and characterization of extra cellular amylase from the marine yeast *Aureobasidium pullulans* N13d and its raw potato starch digestion. *Enzyme Microbial Technology* Pp.12-145.
3. **Roy I,and Gupta MN (2004)**.Hydrolysis of starch by a mixture of glucoamylase and pullulanase entrapped individually in calcium alginate beads. Enzyme Microb. Technol. 34: 26-32.
4. **Polakovic M,and Bryjak J (2004).** Modelling of potato starch saccharification by an *Aspergillus niger* glucoamylase. Biochem. Eng. J. 2004 18: 57- 64.
5. **Asgher, M., Javaid Asad M., Rahman, S.U.,and Legge, R.L. (2007).** A thermostable _- amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *Journal of Food Engineering* 79: 950-955.
6. **Hmidet, N.; Bayoudh, A.; Berrin, J.G.; Kanoun, S., et al. (2008).** Purification and biochemical characterization of a novel α-amylase from *Bacillus licheniformis* NH1: Clon-ing, nucleotide sequence and expression of amyn gene in Escherichia coli. Process Biochemistry, 43, 499-510. doi:10.1016/j.procbio.2008.01.017.
7. **Fagade, O.E. and Ajayi, A.O .(2003).** Utilization of cornstarch assubstrate for â . Amylase by *Bacillus subtilis*. African J. of Biomedical Research, Vol. 6 (1) ; 37-42 . **.7**
8. **Burhan, A.1.; Nisa, U.; Gokhan, C.; Omer, C.;Ashabil, A. and Osman, G. (2003).** Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus sp*. isolate ANT-6. Process Biochem., 38,1397-1403.
9. **Aslim, B.; Yuksekdag, Z. N. & Beyatli, Y. (2002).** Determination of PHB growth quantities of certain *Bacillus* species isolated from soil. Turkish Electronic Journal Biotechnolog24-30.
10. **Suman, S. and Ramesh, K(2010**).Pharm. Sci. & Res. 2: 149-154.
11. **Rasooli, I., S.D.A. Astaneh, H. Borna and K.A. Barchini. (2008).** A thermostable α-amylase producing natural variant of *Bacillus* spp. isolated from soil in Iran. Am. J. Agri. and Biol. Sci., 3(3): 591-596.
12. K**umar, G.S.; Chandra, M.S.; Sumanth, M.; Vishnupriya, A.; Reddy, B.R. and Choi, Y.L.(2009**). Cellulolytic enzymes production from submerged fermentation different substrates by newly isolated *Bacillus* spp. FME. K S J Appl Biol Chem 52, 17-21.
13. **Miller G.L.,(1959)**. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar / *Anal. Chem.,* 31 (3): 426-8.
14. **Kingsley, G. R. and Getchell, G. (1969).** Direct ultramicro glucose oxidase method for determination of flucose in biologic fluids. Clinical Chem., 6, 466-475 .
15. **Vyas,SP. and Dixit, VK (2009).“** Pharmaceutical biotechnology” ,CBS Publication. Pp. 485-526.
16. **Božić, N., Ruiz, J., López-Santín, J. and Vujčić, Z. (2011).** Production and properties of the highly efficient raw starch digesting α-amylase from a *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a. Biochemical Engineering Journal, 53, 203- 209. doi:10.1016/j.bej.2010.10.014.

17. **Kuzu, S.B.; G¨uvenmez, H.K. and Denizci,A. A. (2012).** Production of a Thermostable and Alkaline Chitinase by *Bacillus thuringiensis* sub sp. kurstaki Strain HBK-51. Hindawi Publishing Corporation Biotechnolog Research International, 6: 10.1155/135498.
18. **Deb, P; Talukdar, SA; Mohsina, K; Sarker, PK; Sayem SMA .(2013).** Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* P-001. Springerplus 2:154.
19. **Stanbury, P. F. and Whitaker, A. (1984)** . Principles of fermentation technology . 1st ed. Pergamon Press , Oxford ..
20. **Kumar, M. ; Priyadharshini, A.D'. Suresh K, Saranya GM, Rajendran K and Kalaichelvan PT(2012)..** Production, Purification and Characterization of α-Amylase and Alkaline Protease by **Bacillus** sp. HPE 10 in a Concomitant Production Medium. Asian Journal of Plant Science and Research, 2 (3):376-382.
21. **Suribabu, K.; Govardhan ,T. L. and. Hemalatha, K. P. J.(2014) .** "Influence of carbon sources on α -Amylase production by *Brevibacillus* sp. Under submerged fermentation," Int. J. Res. Eng. Technol., vol. 3, no. 2, pp. 292–299.
22. **Tiwari, S.; Shukla, N.; Mishra, P.; and Gaur, R. (2014)** . Enhanced Production and Characterization of a Solvent Stable Amylase from Solvent Tolerant *Bacillus tequilensis* RG-01: Thermostable and Surfactant Resistant . Article ID 972763, 11.pages . http://dx.doi.org/10.1155/2014/972763.
23. **Okalo ,B.N.; Ezeogu, L.I. and Ebisike, C.O. (1996).** Raw starch digesting amylase from *Thermoactinomyces thalophilus* F13. World J. Microb. Biotechnol 12:637–638 .
24. **Sharma, N.; Vamil, R.; Ahmad ,S.; Agarwal, R. (2012).** Effect of different carbon and nitrogen sources on α-amylase production from *Bacillius amyloliquefaciens*.
25. **Alam, S.; Hong, J. and Weigand, W.A.(1989**) . Effect of yeast extract on α- amylase synthesis by *Bacillus amyloliquefaciens*. Biotechnol. Bioeng.; 33: 780-785.
26. **Santos, E.O. and Martins, M.L.L.(2003**). Effect of the Medium Composition on Formation of Amylase by *Bacillus sp*. J. Braz. Arch. Biol. and Technol.; 46: 129-134.
27. **Alghabpoor S., Panosyan, H.; Popov, Yu.;and Trchounian,A. (2013)**. PRODUCTION OF THERMOSTABLE ALPHA-AMYALSE BY *BACILLUS* SP. IRANIAN S2 USING SOLID STATE FERMENTATION 2(21), Alex Manoogian 1, 0025, Yerevan, Armenia; e-mail: sorour.sharifi@ymail.com.
28. **Gupta, R.; Gigras, P.; Mahopatra, H.; Goswami, V.K. and Chauhan, B. (2003)**. Microbial α-amylases: a biotechnological perspective. Process Biochem. 38: 1599 – 1616.
29. **Vidyalakshmi,R. ; Paranthaman ,R. and Indhumathi, J.(2009).“**Amylase production on submerged fermentation by *Bacillus* sp.," World Journal of Chemistry, vol. 4, no. 1, pp. 89–91.
30. **Vandenburg,B. (2003).** Extremophiles as a source for novel enzymes. Current opihicll in microbiology. 6(3):213-218.
31. **Sandhya, C. ; Adapa, L. K. ; Nampoothiri, K. M. ; Binod, P. ; Szakacs, G. ; Pandy, A. (2004)** . Extracellular chitinase production by *Trichoderma harzianum* in submerged fermentation . J. Basic Microbiol. , 44(1): 49-58 .
32. **Lee,Y.G.;Chung, K.C.; Wi, S.G.; Lee, J.C. and Bae, H.J. (2009).** Purification and properties of a chitinase from *Penicillium* sp. LYG 0704. Protein Expr and Purif.;65 (2):244-50.
33. **Riaz N, Haq IU, Qadeer ,MA (2003)**. Characterization of α-amylase by *Bacillus subtilis*. Int J Agr Biol 5(3):249–252.