Characterization of Partial purified alpha-amylase enzyme produced from locally isolate *Bacillus licheniformis*

توصيف انزيم الألفا-اميليز المنقى جزئياً والمنتج من بكتريا *Bacillus licheniformis* المعزولة محلياً

أ.م. د. ناجح هاشم كاظم انتصار كاظم حميد
[1] قسم علوم الحياة / كلية العلوم/جامعة كربلاء
*البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني

المستخلص

تم انتاج انزيم الالفا-اميليز من العزلة رقم 5والتي انتخبت لكفاءتها بالانتاج من بين 24 عزلة من بكتريا *Bacillus* spp لدراسة سابقة تعود لنفس الباحث ، وشخصت هذه العزلة استناداً الى الصفات المظهرية والفحوصات المجهرية والبايوكيميائية على انها *Bacillus licheniformis* ، اخضع المستخلص الإنزيمي الخام المنتج من العزلة قيد الدراسة الى التنقية الجزئية بدءاً بالترسيب بكبريتات الأمونيوم بنسبة اشباع 60% ثم الديلزة واعقبها خطوة التبادل الأيوني بطريقة الدفعة الواحدة بالمبادلDEAE- Sepharose CL-6B واخيرا خطوة الترشيح الهلامي باستعمال الهلام Sephadex G-75 وكانت الحصيلة الإنزيمية النهائية 34.144% وعدد مرات التنقية 4.286 مرة. قدر الوزن الجزيئي للإنزيم 56.25 كيلودالتن وذلك بطريقة الترشيح الهلامي انفة الذكر وكان الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم هو7 بينما يتراوح مدى الرقم الهيدروجيني للثبات بين (5-8) . ان درجة الحرارة 50م تعد المثلى للفعالية الإنزيمية بينما درجة حرارة الثبات تراوحت بين (20-60)م ، وكانت قيم ثابت ميكالس منتن (Km) والسرعة القصوى (Vmax) هي 7.134 ملغم/مللتر و66.666 ملغم/مللتر/دقيقة على التوالي ، وكان لاملاح كلوريد الكالسيوم والمغنيسيوم تأثيرمنشطاً للإنزيم المنتج . كان سكر المالتوز بقيمة جريان نسبي Relative flaw (Rf) تساوي 0.5 هو المنتج الرئيسي لتحلل النشأ الذائب بوساطة انزيم الألفا-اميليز المنقى جزئيا وذلك باستعمال تقنية كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة Thin Layer Cromotography (TLC).

Abstract

Alpha-amylase enzyme produced from No.5 isolate which its efficiency in production among 24 isolates as *Bacillus* spp .This isolates was identified depending on the morphological character ,microscopical and biochemical tests . The crud enzyme extract which produced from isolated in this study wwere partial purified starting by using 60% saturation ammonium sulphate precipitation and dialysis , followed by batch manner ion exchange by using DEAE-Sepharose CL-6B and finally gel filtration step by using Sephadex G-75 The yield enzyme was 34.144% and the purification fold was 4.286. The molecular weight of enzyme was estimated to 56.25 KD as then gel filtration nose and way above. The optimum pH of enzyme activity was 7, whil the rang of pH stability from 5 to 8. The optimum temperature for enzyme activity was 50 c̊ ,while the rang of heat stability was from from 20-60 c̊. Mechalis mention constant (Km) and maximum velocity (Vmax) valus were 7.143 mg/ml and 66.666 mg/ml/min respectively.The effect of Calcium and magnesium chloride metal ions were activator for enzymes produced. Maltose sugar was Relative flaw Rf value equal to 0.5 is the main product of hydrolysis of starch by alpha-amylase enzyme that's partial purified by using thin layer Chromatography (TLC) Thin Layer Cromotography technique.

المقدمة

تعرف جميع الأميليزات (Amylases) بالإنزيمات المحللة للنشأ التي تقوم بتحليل الاواصر الكلايكوسيدية في النشأ والكلايكوجين والسكريات المتعددة المشتقة منها للحصول على نواتج مختلفة مثل الديكسترين و المالتوز و متعددات صغيرة من الكلوكوز ووحدات كلوكوزمفردة (1). تنتشر هذه الإنزيمات بصورة واسعة بين افراد المملكة الحيوانية والنباتية والأحياء المجهرية(2) . 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(3). يعد النشأ المكون الرئيسي أو الأساسي للعديد من المحاصيل المهمة اقتصادياً مثل القمح والرز والذرة والبطاطس وكذلك فان النشأ يعتبرالشكل الأكثر وفرة من مخزون السكريات للنباتات ويشكل مصدر

رخيص الثمن لإنتاج العديد من العصائر التي تحتوي على الكلوكوز وسكر الفواكه أوالمالتوز، والتي تستخدم على نطاق واسع في الصناعات الغذائية (4).بالإضافة إلى ذلك، فإن السكريات المنتجة من النشا يمكن تخميرها لإنتاج الإيثانول والأحماض الأمينية والأحماض العضوية وغيرها (5). تم استعمال الطرائق البايولوجية في العقود الاخيرة للحصول على سكر عالي النقاوة من النشاء وذلك باستعمال الإنزيمات المحللة للنشأ (الاميلزات) ومنها الالفاميليز(α-amylase) والكلوكوآميليز (glucoamylase) وهذه العملية اصبحت مشجعة تجارياً لصناعات التقانة الحيوية. اذ بدأت طريقة التحلل الإنزيمي بمعاملة النشأ بإنزيم الألفا أميليز (α -amylase) لإنتاج سكريات قليلة الوحدات(oligosaccharides) والخطوة الثانية في انتاج الكلوكوز تتم بوساطة إنزيم الكلوكوأميليز (glucoamylase) الذي يعمل على تحطيم الأواصرالكلايكوسيدية(α-1-6) الموجودة بين السلاسل السكرية لينتج جزيئة كلوكوز بسيطة (simple glucose) (6). ولدراسة إنزيمات الآميليزات وخواصها الحركية لابد من تنقيتها حد التجانس ، أي التخلص من المواد الموجودة مع الانزيم جميعها لتجنب حدوث الاستنتاجات الخاطئة ولاتتم التنقية إلا عبر مجموعة من خطوات متدرجة ومدروسة ويفترض ان تزداد خلالها الفعالية النوعية للانزيم في كل خطوة (7) .اذ اتبعت طرق عدة لتنقية الإنزيمات ، مثل الترشيح الفائق (UItra filteration) والنضح الغشائي (Dialysis) وكروموتوغرافيا الترشيح الهلامي (Gel filteration) التي تعتمد على الوزن الجزيئي وطرق أخرى تعتمد على محصلة الشحنات كما في تقنية كروموتوغرافيا التبادل الأيوني(Chromatography Ion Exchange) ، أو الترسيب بفعل الأملاح مثل كبريتات الأمونيوم التي تعتمد على أساس معادلة الشحنات على سطح البروتين بفعل الملح وتعد هذه الطريقة هي الأكثر شيوعاً كون كبريتات الأمونيوم ذات ذائبية عالية ولا تمتلك تأثيرات جانبية على البروتينات (8) ومما تقدم هدفت هذه الدراسة الى امكانية توصيف انزيم الألفا-اميليز المنتج والمنقى جزئياً من عزلة بكتيرية محلية من خلال المحاور الآتية:

1. تشخيص العزلة البكتيرية المنتخبة لانتاج انزيم الالفا-اميليز .
2. التنقية الجزئية للإنزيم بالطرائق المتاحة .
3. توصيف الإنزيم المنتج.

المـواد و طرائـق العمـل

- عزلت بكتريا.*Bacillus* spp من التربة (من مناطق مختلفة من محافظة كربلاء المقدسة) حسب الطريقة الموصوفة من قبل(9) وشخصت أوليا من خلال تصبيغ البكتريا بصبغة كرام و اختبار تكوبن السبورات .والتي تم الحصول عليـها مـن دراسـة سابقـة لنفس الباحث ،كليـة العلوم / قسم علـوم الحيـاة فـي جامعة كربلاء.

أخضعـت جميــع العــزلات البكتيرية للغربلــة الكميـــة الخاصـــة لإنتاج انزيم الالفا-اميليزباستعمال الوسط الإنتاجي soluble starch yeast extract trypton medium(SYT) الموصوف من قبل (10) لغربلة عزلات بكتريا *Bacillus* spp 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 المغنيسيوم المائية ($MgSO_4$)$7H_2O$.

- قدرت الفعالية الإنزيمية للألفا اميليز المنتج من بكتريا *Bacillus* spp وذلك بتقدير كمية السكريات المختزلة بالطريقة الموصوفة من قبل (11) 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).

خطوات تشخيص بكتريا *Bacillus* spp

شخصت العزلة رقم 5 والمنتخبة لانتاج انزيم الالفا-اميليزتبعا لمصنف بيرجز (12) اذ تم الاعتماد على الصفات المظهرية والفحوصات المجهرية و الكيموحيوية في التشخيص.

التنقية الجزئية لانزيم الالفا-اميليز المنتج من العزلة رقم 5 التابعة لبكتريا *Bacillus* spp

تم تنمية هذه العزلة في الوسط الأنتاجي (SYTmedium) بعد تعديل مكوناته حسب الظروف المثلى التي تم الحصول عليها بدراسة سابقة لنفس الباحث و المكون من سكر اللاكتوز بتركيز 1% مصدراً للكاربون وخليط من مستخلص الخميرة والتربتون بتركيز 0.2 % مصدراً للنتروجين وهذا الوسط كان مدعم بـ (كلوريد الصوديوم $NaCl_2$ وكلوريد الكالسيوم $CaCl_2$ وكبريتات المغنيسيوم $MgSO_4$ وفوسفات البوتاسيومKH_2PO_4 , K_2HPO_4) بتركيز كلي 0.26 % كمصدر للاملاح المعدنية ، وعدل الرقم الهيدروجيني الابتدائي للوسط الى 7 وتم اتلقيحه بحجم لقاح 5% ، وكانت مدة الحضن 24 ساعة على درجة حرارة 42م ، وسرعة رج 120 دورة/دقيقة ، وبعدها تم فصل الكتلة الحيوية عن راشح المزرعة بوساطة الطرد المركزي بسرعة رج 10000 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة وذلك للحصول على الإنزيم الخام بشكل رائق. وجرت جميع مراحل التنقية تحت ظروف مبردة حسب الخطوات الآتية

1- الترسيب بكبريتات الأمونيوم :

تم ترسيب إنزيم الألفا – أميليز حسب ماتوصل اليه (13) مع بعض التحويروذلك بإذابة الراسب بمنظم فوسفات البوتاسيوم 0.1 مولر وبرقم هيدروجيني 7. اذ أضيفت أوزان معينة من كبريتات الأمونيوم تدريجياً بنسب إشباع (40 ، 60 ، 70 ، 80) %

الى 20 مللتر من المستخلص الإنزيمي بدرجة حرارة 4 م مع التحريك البطيء المستمر بوساطة المازج المغناطيسي لمدة ساعتين ثم نبذ المحلول لكل نسب الأشباع المستعملة قيد الدراسة بسرعة رج 5000 دورة /دقيقة بجهاز الطرد المركزي المبرد. وإذيب الراسب في 4 مللتر من محلول منظم الفوسفات البوتاسيوم 0.1مولر وبرقم هيدروجيني 7 وقدرت الفعالية الإنزيمية وتركيز البروتين وتم حساب الفعالية النوعية لتحديد نسبة الأشباع المثلى من كبريتات الأمونيوم لترسيب الإنزيم لغرض إستعمالها في الخطوات اللاحقة من عمليات التنقية.

2- الديلزة

أجريت عملية الديلزة باستعمال أكياس الديلزة بحجم مسامي 14000 دالتن حيال محلول 0.05 مولر منظم الفوسفات بإبداله ثلاث مرات خلال 18 ساعات و بعد انتهاء العملية تم تقدير الفعالية الإنزيمية وتركيز البروتين للإنزيم حسب ماجاء به (14) .

3- كروموتوغرافيا التبادل الأيوني بطريقة الدفعة الواحدة(batch wise)

تم استعمال قمع بخنر لاجراء عملية التنقية بطريقة الدفعة الواحدة (batch wise) اذ اضيف 20 مللتر من المستخلص الإنزيمي المركز بكبريتات الامونيوم الى القمع ومن ثم تم ترشيحه بوساطة مضخة التفريغ وتم تجميعه وقدرت له الفعالية الإنزيمية والبروتين وحفظ بالتجميد لحين استخدامه في خطوة التنقية اللاحقة .

استرداد الإنزيم

استرد الإنزيم الموجود في القمع بوساطة التدرج الملحي باستعمال محلول كلوريد الصوديوم وبتراكيز متدرجة (0.2 و0.3 و0.5 و0.7) مولر ومن ثم تم جمعه وقدرت له الفعالية الإنزيمية والبروتين .

4- الترشيح الهلامي باستعمال هلام Sephadex G-75

اضافة راشح المحلول الإنزيمي :

أضيف 4 مللتر من المحلول الإنزيم للألفا-اميليز الى سطح عمود الترشيح الهلامي بهدوء وأجريت عملية الفصل بوساطة محلول منظم الفوسفات ذو الرقم الهيدروجيني 7 بسرعة جريان 20 مللتر/ساعة وبواقع 3 مللتر للجزء الواحد وتمت قراءة الامتصاص للأجزاء المفصولة على طول موجي 280 نانومتر كما تم التحري عن الفعالية الإنزيمية لإنزيم الالفا اميليز في القمم البروتينية المفصولة ورسمت العلاقة بين الأمتصاص على 280 نانومتر وعدد الأجزاء ، وقدرت الفعالية الإنزيمية وتركيز البروتين في الأجزاء التابعة للقمة التي اظهرت فعالية انزيمية بعد جمعها تم قياس حجمها ومن ثم تم الاحتفاظ بها بالتجميد لغرض دراسة خصائص الإنزيم

توصيف الإنزيم

تقدير الوزن الجزيئي للإنزيم بطريقة الترشيح الهلامي

استعمل عمود السيفادكس G- 75 بأبعاد (90 × 1.4) سم اذ امكن تحديد حجم الفراغ Void Volume (Vo) للديكستران الأزرق وحجم الأسترداد elution Volume(Ve) للبروتينات القياسية كلاً على حده وبأسلوب وظروف الترشيح الهلامي المستعمل في خطوة تنقية الإنزيم، اشتملت هذه البروتينات على الإنزيم الكالاكتوسايديز وانزيم المحلل للجدار الخلوي Lysozyme وألبومين بياض البيض Ovalbumin والتي تبلغ أوزانها الجزيئية (114 ، 14 ، 44) كيلودالتن ، على التوالي .

تقدير حجم الفراغ (Vo)

قدر حجم الفراغ (Vo) باستعمال محلول الديكستران الأزرق ، إذ أضيف 4 مللتر من محلول رقم (محلول الديكستران الأزرق (Blue Dextran -2000) بتركيز 4 ملغم/مللتر) على الجدار الداخلي للعمود الزجاجي بالقرب من سطح الهلام وبشكل تدريجي ، وأجريت عملية الأسترداد لصبغة الديكستران الأزرق بمحلول منظم الفوسفات 0.2 مولر وبرقم هيدروجيني 7 ، وبسرعة جريان 20مللتلر/ ساعة وبواقع 3 مللتر للجزء الواحد وتمت قراءة الأمتصاص للأجزاء المنفصلة بجهاز المطياف الضوئي على طول موجي 600 نانومتر لتقدير حجم الفراغ للعمود.

تقدير حجم الأسترداد (Ve) للبروتينات القياسية

قدر حجم الأسترداد(Ve) للبروتينات القياسية كلاً على حده ، اشتملت هذه البروتينات على الإنزيم الكالاكتوسايديز، وانزيم المحلل للجدار الخلوي Lysozyme، وألبومين بياض البيض Ovalbumin، والتي تبلغ أوزانها الجزيئية (114 ، 14 ، 44) كيلودالتن ، على التوالي ، ثم أجريت عملية الترشيح الهلامي لهذه البروتينات بالظروف المستعملة في أسترداد الديكستران الأزرق نفسها وتم الأسترداد بمحلول منظم الفوسفات محلول (منظم الفوسفات 0.2 مولر وبرقم هيدروجيني 7) وتم قياس الأمتصاص للأجزاء المنفصلة عند طول موجي 280 نانومتر لغرض تحديد حجم الأسترداد(Ve) لكل بروتين قياسي ، وتم حساب الوزن الجزيئي لإنزيم الالفا آميليز النقي بوساطة المنحنى القياسي القياسي المتحصل من العلاقة بين حجم الأسترداد / حجم الفراغ (Ve/Vo) مقابل لوغاريتم الأوزان الجزيئية للبروتينات القياسية المستعملة في هذه الدراسة .

تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم

قدرت الفعالية الإنزيمية لإنزيم ألفا اميليز حيال مادة التفاعل (النشأ) المحضرة بارقام هيدروجينية مختلفة ، ورسمت العلاقة بين الفعالية الإنزيمية والرقم اهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم .

تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الإنزيم

مزج 2 مللتر من محلول الإنزيم النقي مع 2 مليلتر من المحاليل المنظمة ذات الارقام الهيدروجينية(2.0 -10.0) في أنابيب اختبار وحضنت في حمام مائي على درجة حرارة 45 م ولمدة 15 دقيقة ، وقدرت فعاية إنزيم الألفا اميليز لكل معاملة ومن ثم رسمت العلاقة بين الفعالية الإنزيمية والرقم الهيدروجيني لتحديد مدى الأرقام الهيدروجينية لثبات الإنزيم .

تحديد درجة الحرارة المثلى لفعالية الإنزيم

اضيف 0.1 مللتر من مستخلص الإنزيم الخام المنقى جزئياً الى 0.9 مللتر من محلول مادة الأساس1% (النشأ الذائب) ذو الرقم الهيدروجيني 7 وبواقع مكررين وتم الحضن بدرجات حرارية مختلفة تراوحت بين 20-90 م لمدة 15 دقيقة ، ثم اوقف التفاعل باضافة 1 مللتر من كاشف (3.5 DNSA) ومن ثم قدرت الفعالية الانزيمية ورسمت العلاقة بين فعالية إنزيم الألفا اميليز ودرجات الحرارة.

الثبات الحراري للإنزيم

تم حضن 3 مليلتر من محلول الإنزيم النقي في حمام مائي بدرجات حرارية مختلفة شملت (20 ، 25 ، 30 ، 35 ، 40 ، 45 ، 50 ، 55 ، 60 ، 65 ، 70 ، 75 ، 80 ، 85 ، 90) م لمدة 15 دقيقة ثم نقلت الأنابيب الحاوية على محلول الإنزيم مباشرة الى حمام ثلجي ومن ثم قدرت الفعالية الإنزيمية ورسمت العلاقة بين فعالية إنزيم الألفا اميليز ودرجات الحرارة لتحديد المدى الحراري لثبات الإنزيم .

تقدير الثوابت الحركية

استخدمت طريقة لينوفر– بورك لتقدير ثابت ميكالس (Km) والسرعة القصوى (Vmax) لإنزيم الألفا- أميليز المنقى من بكتريا *Bacillus licheniformis* قيد الدراسة باستعمال النشأ كمادة أساس للتفاعل وبتراكيز تراوحت بين (1-30) ملغم/مللتر.قدرت قيم ثابت ميكالس Km والسرعة القصوى Vmax بوساطة المنحنى المقلوب Reciprocal plot لتركيز مادة التفاعل مقابل السرعة الأولية تبعاً لمعادلة Lineweaver & Burk (15)

$$\frac{1}{V}=\frac{Km}{V_{max}}\times\frac{1}{[S]}+\frac{1}{V_{max}}$$

دراسة تأثير بعض الأيونات الفلزية والعوامل المختزلة والكلابية في فعالية الإنزيم

مزج محلول من الإنزيم مع حجم مماثل لكل من محاليل الايونات للحصول على تراكيز1 و 5 ملي مولر لكل محلول ثم حضنت بدرجة حرارة 45مْ لمدة 15 دقيقة اعقبها تقدير الفعالية الإنزيمية فضلاً عن تقدير الفعالية الإنزيمية للسيطرة (المحلول الإنزيمي دون معاملة بأي من الأيونات الفلزية أو عوامل مختزلة أو كلابية) وذلك لتحديد نسبة الفعالية المتبقية .

التحري عن نواتج تحلل النشأ بفعل انزيم الالفااميليزباستعمال كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة(TLC)

استعملت الطريقة الموصوفة من قبل (16) مع بعض التحوير باستعمال محلول النشأ بتركيز 1% حيث مزج 0.1 مللتر من الأنزيم المنقى مع 0.9 مللتر من محلول النشأ وحضن لمدة 15 دقيقة بدرجة حرارة 45 م وبعد ذلك وضع 3-5 مايكروليتر من محاليل السكريات القياسية فضلا عن النموذج بعد مدة التفاعل المذكورة على مسافات متساوية من صفيحة السليكا بأبعاد (20×20) سم ، ثم وضعت الصفيحة في حوض زجاجي حاوي على 100 مل من مزيج مذيبات الطور المتحرك (البيوتانول والايثانول والماء المقطر بنسبة 2:3:5 حجم/حجم/حجم على التوالي).وبعد انتهاء عملية الفصل تم رش الصفيحة برذاذ من كاشف تطوير واظهار اللون (ميثانول وحامض الكبريتيك 50:50 حجم/حجم) ومن ثم جففت الصفيحة بالفرن الكهربائي Oven على درجة حرارة 100مْ ولمدة 10 دقائق . سجلت ألوان البقع الناتجة من التحلل الإنزيمي حسب الجريان النسبي (Rf) لهذه البقع وقورنت مع ألوان وقيم الـ (Rf) للسكريات القياسية .

الجريان النسبي (Rf) = $\frac{\text{المسافة التي تحركت إليها البقع}}{\text{المسافة التي تحرك لها مزيج المذيبات}}$

النتائـــج والمناقشـــة

تشخيص بكتريا *Bacillus* spp المنتجة لانزيم الالفا-اميليز

تم تشخيص العزلة رقم 5 باعتبارها الألكفأ في انتاج انزيم الالفا-اميليز.

الصفات المزرعية والمجهرية

تميزت العزلة المنماة على الوسط الزرعي وسط الأكار المغذي الصلب (Nutrient agar) بكون مستعمراتها مسطحة الشكل غير منتظمة ومتباينة في الحجم ،خشنة غير لماعة ،موجبة لصبغة غرام وتتواجد اما مفردة او مزدوجة او مجاميع غير منتظمة واحياناً بشكل سلسلة مختلفة في الطول،لونها مائل الى الأبيض المسمر ومنتجة للسبورات.

الفحوصات الكيموحيوية

اجريت الفحوصات الكيموحيوية على العزلة رقم 5 المتحصل عليها من دراسة سابقة ، وكانت النتائج كما موضحة في الجدول رقم (1).

الجدول(1) نتائج الأختبارات الكيموحيوية لتشخيص بكتريا *Bacillus* spp للعزلة رقم 5

الاختبار	العزلة رقم 5
اختبار الحركة	+
اختبار الكاتليز	+
النمو في ظروف هوائية	+
اختبار فوجس بروسكور	+
اختبار استهلاك السترات	+
اختبار تحلل النشأ	+
اختبار اليوريز	-
اختبار الكازين	+
اختبار اختزال النترات	+
اختبار النمو في الظروف اللاهوائية	+
اختبار اسالة الجيلاتين	+

النمو في درجات حرارية مختلفة

درجات الحرارة	5c̊	10c̊	20c̊	30c̊	40c̊	50c̊	55c̊	65c̊
النتيجة	-	-	+	+	+	+	-	-

النمو في ارقام هيدروجينية مختلفة

الرقم الهيدروجيني	5	6	7	8	9	10
النتيجة	-	+	+	+	-	-

النمو في تركيز كلوريد الصوديوم Nacl

تركيز NaCl	%2	%5	%7	%10
النتيجة	+	+	-	-

ولوحظ ان العزلة رقم 5 من خلال اجراء اختبار تخمر السكريات كانت مخمرة للسكريات (D-مانوز و D- كلوكوز والمالتوز والزايلوز والمانتول والأرابينوز) ، ومن خلال نتائج الفحوصات انفة الذكر ونتائج الفحوصات الكيموحيوية الموضحة في الجدول (1) واستناداً الى مصنف بيرجز(12)، فأن مثل هذه الصفات تكون أقرب الى النوع *Bacillus licheniformis* للعزلة قيد الدراسة. وجد (17) ان الاحياء المجهرية المعروفة بانتاجها الواسع لإنزيمات الأميليز هي بكتريا *Bacillus* spp وتشمل بكتريا *B. amyloliquefaciens* و *B. licheniformis* و *B. stearothermophilus* و *Bacillus subtilis* وذلك لان لها القابلية على التطبع والتكيف مع البيئة وعدد من العوامل المؤثرة. وتوصل (18) ان بكتريا *Bacillus .licheniformis* ATCC 6346 انتجت انزيم الالفا-اميليز اذ بلغت الفعالية النوعية للمستخلص الخام 21.18 وحدة/ملغم بروتين .

التنقية الجزئية لإنزيم الألفا أميليز المنتج من بكتريا *Bacillus licheniformis* العزلة رقم 5

1- اختبار نسب اشباع مختلفة من كبريتات الأمونيوم لترسيب الإنزيم

أظهرت النتائج المبينة في الجدول (2) أن افضل نسبة اشباع كانت 60% كبريتات أمونيوم ، اذ بلغت الفعالية النوعية 198.081 وحدة/ملغم بروتين بحصيلة إنزيمية 87.128% وعدد مرات تنقية 1.980 مرة ، ورغم تقارب الحصيلة الإنزيمية وعدد مرات التنقية باستعمال النسب المشبعة (60 و 70)% ، إلا ان الفعالية النوعية باستعمال التركيز 70% كانت اقل إذ بلغت 171.916 وحدة/ملغم بروتين ، لذا فقد اختيرت نسبة الأشباع 60% لترسيب وتنقية إنزيم الألفا-أميليز .

الجدو(2) : تأثير نسب مختلفة من كبريتات الامونيوم في تركيز الألفا اميليز من بكتريا *Bacillus licheniformis* العزلة رقم 5

نسب الأشباع بالكبريتات %	الحجم (مللتر)	الفعاليةالإنزيمية (وحدة/مللتر)	تركيز البروتين (ملغم/مللتر)	الفعاليةالنوعية (وحدة/ملغم بروتين)	الفعالية الكلية (وحدة)	عدد مرات التنقية	الحصيلة الإنزيمية %
المستخلص الخام	4	2.5	0.025	100	50	1	100
20	4	3	0.030	100	12	1	24
40	4	5.501	0.045	144.467	24.804	1.446	49.608
60	4	10.891	0.055	198.081	43.564	1.980	87.128
70	4	10.315	0.060	171.916	41.260	1.719	82.520
80	4	10.961	0.075	152.236	43.84	1.822	87.685

يستعمل التركيز الملحي بوساطة كبريتات الأمونيوم بنسب اشباع مختلفة لغرض ترسيب الإنزيم في المستخلص الخام ، اذ يعمل الملح على معادلة الشحنات الموجودة على سطح البروتين وكذلك سحب طبقة الماء المحيطة به مما يعمل على ترسيب البروتين(8).

2- تركيز الإنزيم الخام

استعملت كبريتات الأمونيوم بنسبة اشباع 60% في الخطوة الأولى من لتنقية إنزيم ألألفا اميليز قيد الدراسة ويبين الجدول (3) انه قد تم تركيز حجم المستخلص الإنزيمي الخام من 100إلى 25 مللتر ، والتي تم ديلزتها من جراء هذا الترسيب والديلزة فقد ارتفعت الفعالية النوعية للإنزيم الى 266.3وحدة /ملغم بروتين الأمر الذي ادى ارتفاع عدد مرات التنقية لتصبح 1.179 مرة ، اما الحصيلة الإنزيمية فكانت 49.155%.

ساعدت خطوة الترسيب اعلاه في تحقيق نقاوة جيدة للإنزيم فضلاً عن تهيئة المستخلص الإنزيمي لخطوة التنقية اللاحقة .تتطابق هذه النتجة مع ماتوصل اليه (19) عند ترسيبه لإنزيم الأميليز المنقى من بكتريا *Bacillus licheniformis* EMS-6 بكبريتات الأمونيوم و نسبة أشباع 70% وكانت عدد مرات التنقية 1.815 . ودرست هذه النتيجة مع (20) عندما استعمل كبريتات الأمونيوم لترسيب إنزيم الألفا –اميليز المنقى من بكتريا *Nocardiopsis sp* وكانت نسبة الأشباع 60% وتم الحصول على الفعالية النوعية بمقدار20وحدة/ملغم بروتين ،اذ بلغ عدد مرات التنقية 1.4 مرة .

الجدول (3): خطوات تنقية إنزيم الألفا اميليز المنتج من *Bacillus licheniformis*

خطوة التنقية	الحجم (مللتر)	الفعالية الإنزيمية (وحدة/مل)	تركيز البروتين (ملغم/مل)	الفعالية النوعية (وحدة/ملغم بروتين)	الفعالية الكلية (وحدة)	عدد مرات التنقية	الحصيلة الإنزيمية %
المستخلص الخام	100	6.777	0.030	225.925	677.7	1	100
الترسيب بكبريتات الأمونيوم 60% والديلزة	25	13.315	0.050	266.3	333.12	1.179	49.155
التبادل الأيوني-DEAE sepharose	25	11.463	0.020	573.150	286.575	2.537	42.286
الترشيح الهلامي Sephadex G-75	20	11.57	0.012	964.166	231.4	4.286	34.144

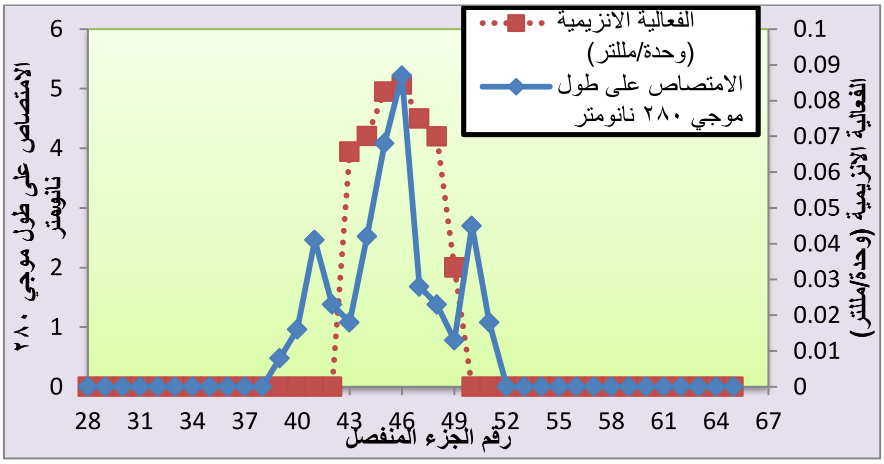
3-التنقية بأستعمال كروموتوغرافيا التبادل الأيوني DEAE-Sepharose CL-6B

اعقبت خطوة الترسيب بكبريتات الأمونيوم والديلزة والتي تعد خطوة تهيئة لتنقية الإنزيم ،وقد تم الحصول على إنزيم الألفا أميليز في محلول الغسل اذ بلغت الفعالية االنوعية لهذا الإنزيم 573.15 وحدة/ملغم بروتين وكانت عدد مرات التنقية 2.537 مرة وبحصيلة انزيمية 42.286% . واشار(19) ان انزيم الالفا اميليز المنقى من البكتريا *Bacillus Sp.* MNJ23 بعد استعمال المبادل الايوني DEAE cellulose بلغت الفعالية النوعية 2358 وحدة/ملغم بروتين ، وعدد مرات التنقية مقدارها 3 مرة وبحصيلة انزيمية 27% .استعملت العديد من الدراسات كروموتوغرافيا التبادل الأيوني لتنقية انزيم الألفا اميليز فقد استخدم (21)

المبادل الأيوني DEAE-Sepharose لتنقية انزيم الأميليز من بكتريا *Bacillus licheniformis* وكانت عدد مرات التنقية 8.4 مرة بحصيلة انزيمية 46%. استعمل المبادل الأيوني DEAE-Sepharose في كثير من تجارب التنقية للإنزيمات اذ يمتلك العديد من الصفات المرغوبة مثل سهولة تحضيره وبالأضافة الى سعة الأمتزاز العالية وقدرة على فصل المواد للحصول على نقاوة جيدة وامكانية استعماله بطريقة الوجبة والعمود فضلا عن امكانية اعادة تنشيطه واستعماله عدة مرات في تطبيقات واسعة (22).

4-كروموتوغرافيا الترشيح الهلامي

اعقبت خطوة التبادل الايوني خطوة الترشيح الهلامي بأستعمال هلام السيفادكس Sephadex G-75 ، اختير هذا الهلام لان حدود الفصل فيه للبروتينات تتراوح بين (3-80)كيلودالتن وهو المدى الذي يغطي الأوزان الجزيئية لإنزيمات الألفا-اميليز المنقاة من عزلات مختلفة من بكتريا *Bacillus licheniformis* إذ اشار(23) الى أن الأوزان الجزيئية لأنزيمات الألفا-أميليز تتراوح بين (50-60)كيلودالتن . يوضح الشكل(1) الترشيح الهلامي لإنزيم الألفا-اميليز ،اذ تم فصل ثلاث قمم بروتينية ، وبتقدير الفعالية الإنزيمية أظهرت القمة الثانية منها فعالية انزيمية في الأجزاء المنفصلة (43-49) وبعد جمع تلك الأجزاء بلغ حجمها 20 مللتر وبتقدير فعاليتها الإنزيمية فضلاً عن البروتين ، أمكن الحصول على فعالية نوعية 964.166 (وحدة/ملغم بروتين) وعدد مرات التنقية مقدارها 4.268 مرة وبحصيلة إنزيمية بلغت 34.144%. وان تطابق قمة البروتين مع قمة الفعالية الإنزيمية في الجزء المنفصل رقم 46 يعد احد أدلة النقاوة العالية للإنزيم المنفصل (24). ورد استعمال هلام السيفادكس Sephadex G-75 في العديد من الدراسات المتعلقة بتنقية إنزيم الألفا- أميليز من الأحياء المجهرية ، فقد استعمل هذا الهلام من قبل (25) لتنقية إنزيم الألفا-أميليز المنقى من بكتريا *Bacillus sp. YX-1* وان الفعالية النوعية قد بلغت 607 وحدة/ملغم بروتين وعدد مرات التنقية كان 34 مرة وبحصيلة إنزيمية 6.66%. في حين استعمل (26) هلام السيفادكس Sephadex G-100 لتنقية انزيم الألفا-أميليز من بكتريا *Bacillus licheniformis* فكانت عدد مرات التنقية 3.03 مرة وبحصيلة انزيمية بلغت 15.9%.

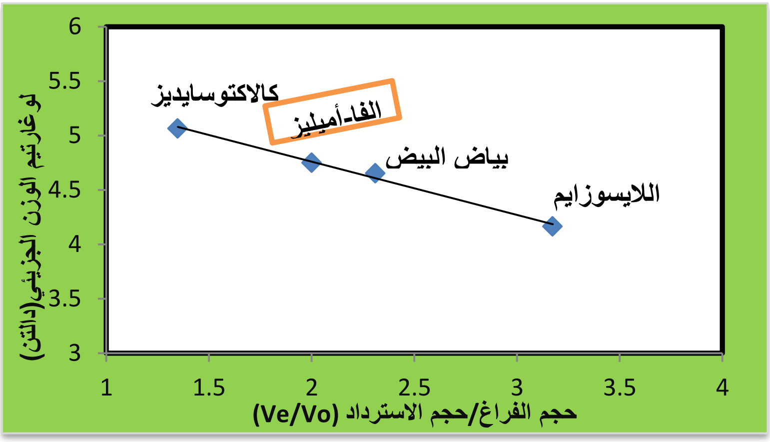


الشكل(1) كروموتوغرافيا الترشيح الهلامي لإنزيم الألفا- أميليز المنقى من بكتريا *Bacillus licheniformis* العزلة رقم 5 باستعمال عمود Sephadex G-75 بابعاد (90×1.4)سم والذي تمت موازنته بمحلول منظم الفوسفات 0.2 مولاري برقم هيدروجيني 7 بسرعة جريان 20مللتر/ساعة وبواقع 3مللتر/جزء.

توصيف الإنزيم المنقى

تقدير الوزن الجزيئي

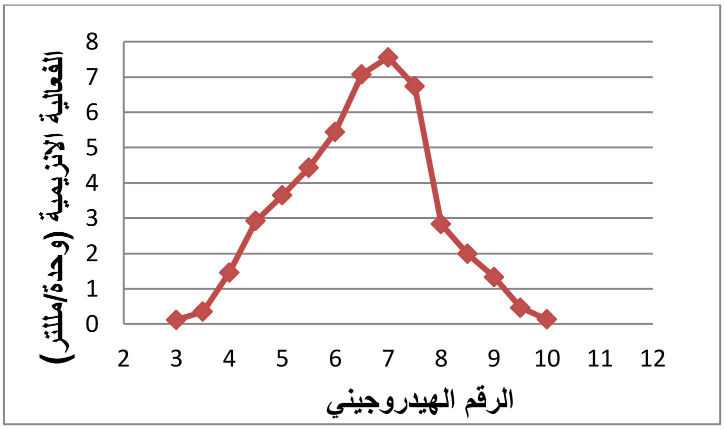
كما موضح في الشكل(2) تبين ان الوزن الجزيئي لإنزيم الألفا -اميليز قد بلغ (56.250)كيلودالتن ، وتتفق النتيجة المتحصلة من هذه الدراسة مع ماوجده (27) اذ بلغ الوزن الجزيئي لإنزيم الألفا اميليز المنقى من فاكهة المانكو (55.2) كيلو دالتن عند استعمال طريقة الترحيل الكهربائي . كما تتفق أيضاً مع مأشار اليه (28) بان الوزن الجزيئي لإنزيم الألفا أميليز المنقى من بكتريا *B. licheniformis* بلغت 58 كيلو دالتن .



الشكل(2) تقدير الوزن الجزيئي بطريقة الترشيح الهلامي لإنزيم الألفا-أميليز المنقى من *Bacillus licheniformis* العزلة رقم 5

الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية إنزيم الألفا- أميليز

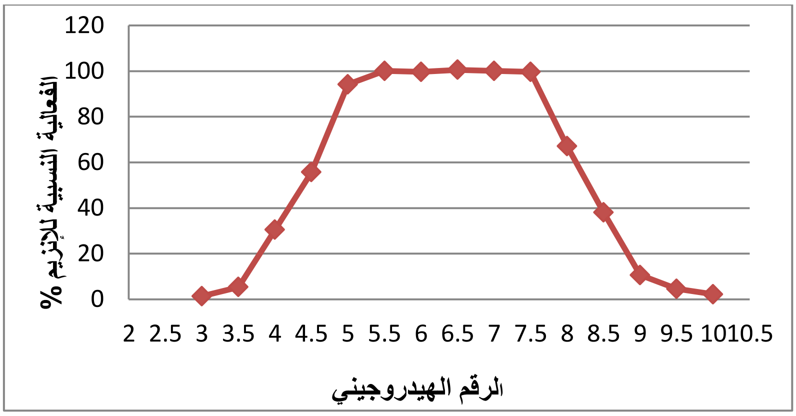
درس تأثير الرقم الهيدروجيني في فعالية إنزيم الألفا- أميليز ، وقد أظهرت النتائج المبينة في الشكل (3) ان الرقم الهيدروجيني 7 هو الأمثل لفعالية إنزيم الألفا- أميليزقيد الدراسة. ويمكن أن يعود تأثير الرقم الهيدروجيني لوسط التفاعل في ارتباط مادة التفاعل بالإنزيم والحالة الأيونية لثمالات الاحماض الأمينية في الموقع الفعال للإنزيم ويصبح الإنزيم غير قادر على تحويل معقد الإنزيم – مادة التفاعل الى ناتج ،فضلاً عن تأين مادة الأساس لذلك تنخفض الفعالية الإنزيمية بتغيير الرقم الهيدروجيني عن الحدود المثلى (29).و جاءت هذه النتائج متفقة مع ما أشير اليه (30) ان الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية انزيم الألفا – اميليز المنقى من *B. subtilis* كان عند الرقم الهيدروجيني 7. وتتفق هذه النتائج مع ماتوصل اليه(31) اذ اثبت ان الفعالية الإنزيمية المنقاة من تطفير بكتريا *Bacillus licheniformis* تصل عند اقصى فعالية عند الرقم الهيدروجيني 7 ضمن المعدل (4-8).



الشكل (3) منحنى الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية إنزيم الألفا –أميليز المنقى من بكتريا *Bacillus licheniformis* العزلة رقم 5

الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات إنزيم الألفا- أميليز

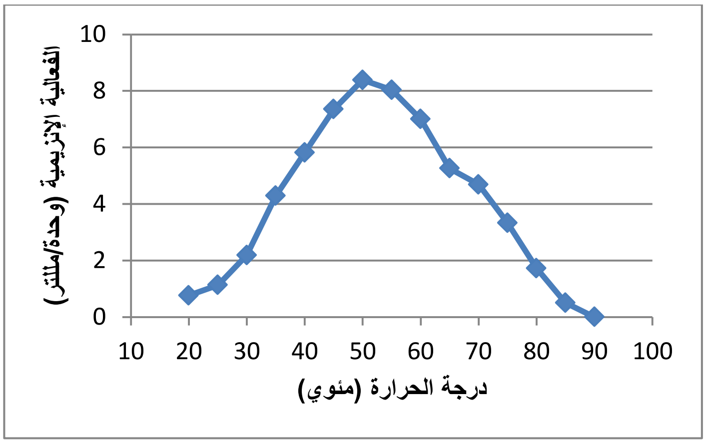
درس الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات إنزيم الألفا – أميليز المنقى من بكتريا *Bacillus licheniformis* العزلة رقم 5 ،الذي يعد من الصفات المهمة في تحديد ظروف التنقية وخزن الإنزيم ، اظهرت النتائج الموضحة في الشكل (4) ان الإنزيم يحتفظ بفعاليته عند المدى الهيدروجيني (5- 7.5) ، عند الحضن لمدة 15 دقيقة بدرجة حرارة 40م وهذا يعني ان الأنزيم يكون ثابت في هذا المدى . وتنخفض ثباتية الإنزيم عند قيم الرقم الهيدروجيني 8 اذ تبلغ فعالية الإنزيم المتبقية ، 67.025%.وايضاً تنخفض فعالية الإنزيم الى 55.699% عند الرقم الهيدروجيني 4.5. يعزى هذا الأنخفاض في فعالية الإنزيم عند القيم الهيدروجينية الحامضية والقاعدية المتطرفة الى مسخ الإنزيم الذي يؤدي الى تغيير في الموقع الفعال أو ربما تغيير التركيب الثانوي اوالثالثي للإنزيم بسبب كسرالاواصر التي تحافظ على هيئة أوتركيب الإنزيم وبالتالي فقدان الفعالية الإنزيمية (32). وتتفق هذه النتيجة مع ماتوصل اليه (33) اذ ذكر ان الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الألفا- أميليز المنقى من مالت الشعير المحلي يقع ضمن مدى(5-6) . وكما اشارايضاً ان ثبات انزيم الألفا- أميليز يكون عند الرقم الهيدروجيني 7 .



الشكل (4) منحنى الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات إنزيم الألفا-أميليز المنقى من بكتريا *Bacillus licheniformis* العزلة رقم 5

درجة الحرارة المثلى لفعالية الإنزيم

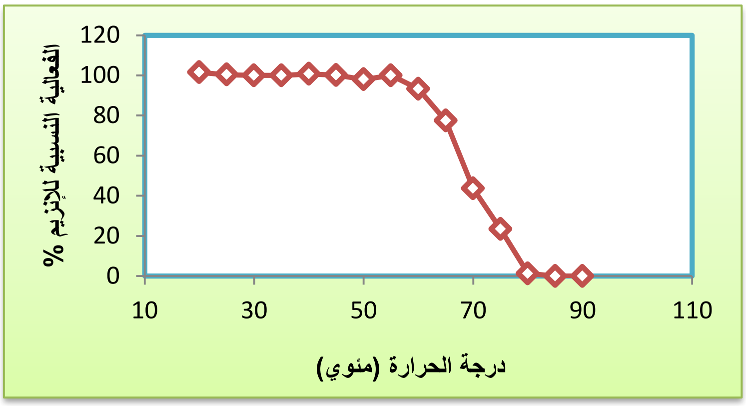
درس تأثيردرجة الحرارة المثلى لفعالية الأنزيم المنقى من بكتريا *Bacillus licheniformis* العزلة رقم 5 وقد تبين من ملاحظة الشكل (5) ان اعلى درجة حرارة لتحديد فعالية الأنزيم تقع عند الدرجة الحرارية 50 م اذ بلغت فعاليتها الانزيمية 8.388 وحدة/مللتر ، ويلاحظ ايضا عند الزيادة او الانخفاض عن درجة الحرارة المثلى لفعالية الإنزيم يؤدي الى الانخفاض في فعالية الانزيمية وهذه توافق ماشار اليه (34) بان فعالية الانزيم تكون في اقصاها عند الدرجات الحرارية الوسطى المتدرجة ضمن المدى الحراري 20-90 م والتي تتمثل بدرجات الحرارية من(50-75)م .هنالك دراسات تطابق النتائج المتحصلة من هذه الدراسة اذ اشار(35) الى ان معظم انزيمات الاميليز تكون في اقصى فعالية انزيمية عند الدرجة الحرارية 50 م لان معظم معدلات التفاعل تحدث عند هذه الدرجة الحرارية . بينما اشارت دراسات اخرى حول الفعالية الانزيمية لانزيم الاميليز فقد توصل (36) الى ان درجة الحرارة المثلى لفعالية انزيم الاميليز من بكتريا *B. amyloliquefaciens* كانت 60 م والحرارة المثلى من بكتريا *B. subtilis and Bacillus sp.* كانت 55 م .



الشكل (5) درجة الحرارة المثلى لتحديد فعالية انزيم الألفا-اميليز المنقى من بكتريا بكتريا *Bacillus licheniformis* العزلة رقم 5

الثبات الحراري للإنزيم

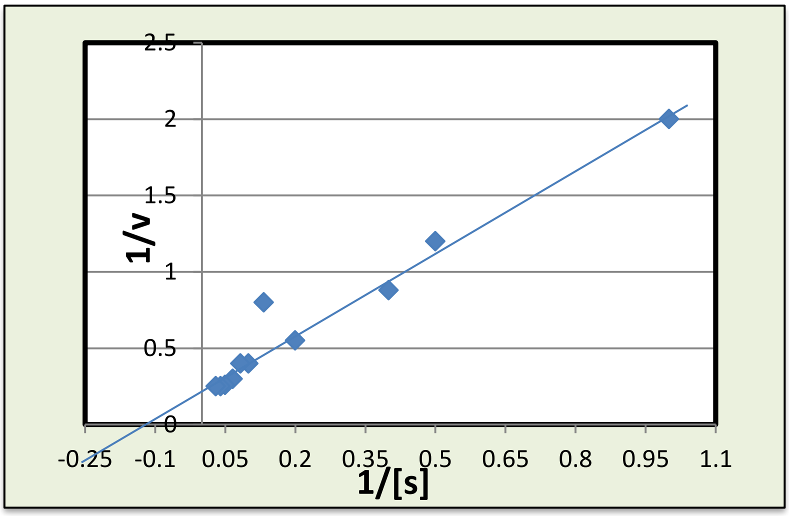
أظهرت نتائج حضن إنزيم الألفا- أميليز المنقى من بكتريا *Bacillus licheniformis* العزلة رقم 5 بدرجات حرارة تتراوح بين(20-90)م ولمدة 15 دقيقة ولوحظ ان الإنزيم احتفظ بكامل فعاليته بدرجات حرارة تراوحت بين(20-55)م كما في الشكل(6) وايضاً احتفظ بنسبة 93% من فعالية الإنزيم عند درجة الحرارة 60م وبعدها فقد كامل فعاليته عند درجة الحرارة 80م .ويمكن أن يعزى الأنخفاض في فعالية إنزيم الألفا أميليز المنقى في هذه الدراسة عند درجات حرارة اعلى من 65م نتيجة تأثير الحرارة العالية في التركيب الثلاثي للإنزيم (البروتين) وهذا قد يؤدي الى مسخ الإنزيم وفقدان فعاليته اذ تكون معظم الإنزيمات أكثر ثباتاً بدرجات الحرارة المنخفظة ولكي يتم الأحتفاظ بفعالية الإنزيمات كاملةً يفضل حفظها بدرجات حرارة واطئة (37). ان نتائج الثبات الحراري لإنزيم الألفا-اميليز متشابهة تقريبا مع ماتوصل اليه (8) ان معدل الثبات الحراري لإنزيم الألفا-اميليز المنقى *Bacillus* sp. I-3 يتراوح من (40-55)م . وكذلك اشار(38) ان انزيم الألفا-اميليز المنقى *Bacillus* sp. ANT-6 كان ثابت حراريا عند درجات الحرارة(40-50)م .



الشكل (6) منحنى الثبات الحراري لإنزيم الألفا-اميليز المنقى من بكتريا *Bacillus licheniformis* العزلة رقم 5

الثوابت الحركية لإنزيم الألفا-أميليز

أظهرت النتائج المبينة في الشكل (7) ان قيمة ثابت ميكالس لإنزيم الألفا-أميليز كانت 7.143 ملغم/مللتر والسرعة القصوى 66.666 ملغم/مللتر/دقيقة. وجاءت هذه النتائج قريبة الى ماتوصل اليه (39) بان ثابت ميكالس والسرعة القصوى لإنزيم الألفا-أميليز المنقى من بكتريا *B. acidocaldarius* RP1 بلغت 11.7 ملغم/مللتر و600 ملغم /ثانية على التوالي .



الشكل (7) منحنى لينوفر- بورك (Lineweaver- Burk) لتقدير ثابت ميكالس (Km) والسرعة القصوى (Vmax) لإنزيم الألفا-أميليز المنقى من بكتريا Bacillus licheniformis باستعمال النشأ كمادة تفاعل.

تأثير بعض ايونات المعادن والمواد الكيمياوية في فعالية الإنزيم

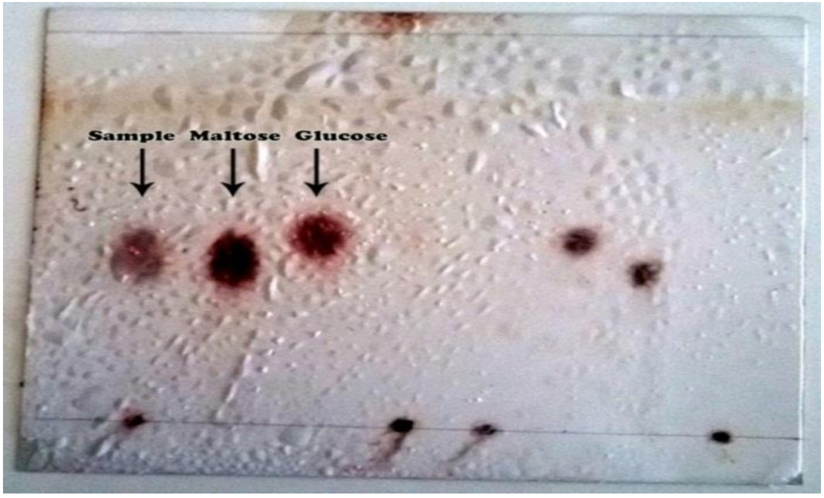
درس تأثير الأيونات المعدنية وبعض المواد الكيمياوية في فعالية إنزيم الألفا- أميليز المنقى من بكتريا *Bacillus licheniformis* اذ لوحظ ان لهذه الأيونات تأثيراً متبايناً في فعالية الإنزيم قيد الدراسة . يوضح الجدول(4) ان الإنزيم قد احتفظ بكامل فعاليته الإنزيمية بوجود بعض الأيونات الفلزية مثل كلوريد الكالسوم وكلوريد المغنيسيوم وكلوريد الصوديوم اذ لوحظ ان هنالك تأثيراً حاثاً بمقدار (49.682 و 30)% عند استعمال كل من التركيزين (1 و 5)ملي مولر على التوالي بالنسبة لايون الكالسيوم وبمقدار (18.843 و11.321)% بالنسبة لايون المغنيسيوم باستعمال التركيزين على التوالي ، اما بالنسبة لكلوريد الصوديوم كان له تأثيراً حاثاً ولكن فقط عند التركيز 1ملي مولر وبمقدار (2)% ، وفقدت فعاليته الإنزيمية تماماً في كلا التركيزين المستعمل في الدراسة بوجود كلوريد الزئبق و كلوريد الفضة عند التركيز 5 ملي مولر واحتفظت بقسم من فعاليتها الإنزيمية بمقدار 3.760% عند التركيز 1ملي مولر.وجاءت هذه النتائج المبينة في الجدول (4)متوافقة مع ما جاء به (40) بان الأيونات ثنائية التكافؤ مثل ايونات الكالسيوم والصوديوم والمغنيسيوم لها تأثيرا ايجابياً على إنزيم الألفا-أميليز المنقى من بكتريا *B. licheniformis* بينما ايونات الزئبق والفضة والنحاس والحديد والزنك والكوبلت والكادميوم والمنغنيز والنيكل والألمنيوم لهل تأثير تثبيطي على الفعالية الإنزيمية المنقاة من نفس لبكتريا المذكورة اعلاه.وقد بينت الدراسات ان هنالك تداخلاً قوياً بين هذه الأيونات وانزيم الألفا أميليز وهذا يعزى الى ان الأنزيم ربنا يمتلك عدة مواقع ارتباط بالأيونات المعدنية نوتعمل هذه الأيونات على تحفيز فعالية الإنزيم وزيادة الثبات الحراري اذ تقوم هذه الأيونات بحماية الإنزيم من المسخ الحراري وتحافظ على التوزيع الفراغي للموقع الفعال للإنزيم (41).

الجدول (4) تأثير بعض الأيونات المعدنية والمواد الكيمياوية في فعالية إنزيم الألفا –أميليز المنقى من بكتريا *Bacillus licheniformis* العزلة رقم 5

الأيون أو المادة الكيمياوية	التركيز ملي مولر	الفعالية المتبقية %
إنزيم غير معامل	-	100
كلوريد الصوديوم	1	102.295
	5	97.868
كلوريد الكالسيوم	1	149.682
	5	130.126
كلوريد المغنيسيوم	1	118..813
	5	111.321
كلوريد الحديديك	1	91..837
	5	91.837
كلوريد الزنك	1	73.713
	5	66.191
كلوريد النحاس	1	45.130
	5	39.865
كلوريد الزئبق	1	0
	5	0
كلوريد الفضة	1	3.760
	5	0
SDS	1	21.813
	5	13.559
EDTA	1	14.291
	5	9.026

التحري عن نواتج تحلل النشأ بفعل إنزيم الألفا-اميليز المنقى من بكتريا *Bacillus licheniformis* العزلة رقم5

تم التعرف على نواتج تحلل النشأ بفعل إنزيم الألفا-اميليز المنقى من بكتريا *Bacillus licheniformis* باستعمال طريقة الكروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) . ويلاحظ من الشكل (8) الذي يمثل نتائج فصل نواتج تفاعل انزيم الألفا-اميليز اعلاه بعدة مدة حضن 15 دقيقة مع 1% من النشأ (مادة اساس) والتي تظهر ان النشأ قد تحلل الى سكر المالتوز فقط ، ومن خلال تماثل قيم Rf البقع الناتجة مع قيم Rf سكر المالتوز القياسي . وتتشابه هذه الدراسة مع كل من الباحثين(42) و (43) عند استعمالهم طريقة الكروموتوغرافي الطبقة الرقيقة لتمييز نواتج تحلل النشأ . و اشار(44) عند دراسته لنواتج تحلل النشأ بفعل انزيم الألفا اميليز المنقى من بكتريا Brevibacillus Borstelensis R1 بطريقة (TLC) الى ان الناتج كان هو سكر المالتوز اذ اثبت ان هذا الإنزيم هو الفا –اميليز E.C: 3.2.1.1 (1,4-α-D-Glucan glucanohyrolase) .



الشكل (8) كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) لنواتج تحلل النشأ بفعل انزيم الألفا-اميليز المنقى من بكتريا *Bacillus licheniformis* العزلة رقم5

المصادر

1- **Jyoti, J.; Lal, N.; Lal ,R. and Kaushik, A. (2011).** Partial purification andcharacterization of an acidophilic extracellular α-amylase from *Bacillus licheniformis* JAR-26. *IJABR*. 2(3): 315-320.

2- **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 .

3- **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.

4- **Abdul-Hussain,A.S. and Varriano ,E.(1982)** . Amylolysis of pear millet starch and its fraction by pear millet alpha amylase. ,Cereal Chem.59(5) 351-355th .

5- **Polakovic M,and Bryjak J (2004).** Modelling of potato starch saccharification by an *Aspergillus niger* glucoamylase. Biochem. Eng. J. 2004 18: 57- 64.

6- **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.

7- **Kornberg, A.(1990).** Why purify enzymes. In method In Enzymology VOI, 128(edited by Deutscher , M.P.) 1-5, Academic press. New York.

8- **Burgess. R. R. and Deutscher, M. P. (2009).** Guide to Protein Purification. In: "Methods in Enzymology ". (2nd ed). Elsevier.,New York, London.

9- **Aslim, B.; Yuksekdag, Z. N. & Beyatli, Y. (2002).** Determination of PHB growth quantities of certain *Bacillus* species isolated from soil. Turkish Electronic Journal Biotechnolog 24-30.

10- 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.

11- **Miller G.L.,(1959)**. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar / *Anal. Chem.,* 31 (3): 426-8.

12- **Logan,N.A. and Vose,P.D. (2009).** Bergey's Manual Systematic Bacteriology Second Edition .Volume Three.Newyork :Springer P.(21-128).

13- **Dennison , C. (2002).** A guide to protein isolation. Kluwer Academic Publishers. New York. ISBN: 0-306- 46868-9.

14- **El-Safey، EM and Ammar, MS. (2002).** –amylase production using NileHyacinth under solid-state fermentation (SSF) conditions. Int. Conf. for Develop. And the Environ. In the Arab world march 26-28, pp. 101-113.

15- **Lineweaver, H; Burk, D. (1934).** "The Determination of Enzyme Dissociation Constants". Journal of the American Chemical Society **56** (3): 658–666.

16- **Kimura, T. & Horikoshi, K.(1998)** .Production of amylase and pullulanases by an alkalopsychrotrphic *Micrococcus*sp. *Agricultural* and Biological Chemistry, **53**, 2963–2968.

17- **Pretorius IS, ; Potgieter HJ,and Lategan PM.(1986).** Numerical taxonomy of α-amylase producing Bacillus species. J. Appl. Bacteriol; 60:351-60.

18- **Vengadaramana A, Balakumar S, Vasanthy A;(2011**) . Purification and comparison properties of crude enzyme with purified α-amylase from *Bacillus licheniformis* ATCC 6346. European Journal of Experimental Biology; 1(3): 58-69.

19- I**kram-ul-haq, Muhammad mohsin javed, Uzma hameed and Fazal adnan .(2010)**. Kinetics and thermodynamic studies of alpha-amylase from Bacillus licheniformis mutant, Pak. J. Bot. Vol.42, pp. 3507- 3516.

20- **Stamford, T.L.M.; Stamford, N.P.; Coelho, L.C.B.B. and Araujo, J.M., (2001).**Production and characterization of a thermostable a-amylase from Nocardiopsis sp. endophyte of yam bean. Biores. Technol. 76, 137–141.

21- **Yasser, R.; Abdel-Fattah,1; Nadia A. Soliman,1 ;Nabil M.; El-Toukhy,2 ,Z. Konsoula and Liakopoulou-Kyriakides M.,(2006).** "Thermostable α- amylase production by *Bacillus subtilis* entrapped in calcium alginate gel capsules," Enzyme andMicrobial Technology, vol. 39, no. 4, pp. 690–696.

22- **Soo, C.C. and Cseke, L.J.(2004).** "Chapter 3: Extraction and purification of Proteins." CsekeLJ, Kaufman PB, Podila GK, Tsai CJ, editors.Handbook of Molecular and Cellular methods in Biology and medicine.2nd edition. Florida: CRC Press LLC, 45-65.

23- **Konsula, Z. and Liakopoulou-Kyriakides, M. (2004). Hy-drolysis of starches by the action of an *α*-amylase from *Bacillus subtilis*. *Process Biochemistry*, 39, 1745-1749. doi:10.1016/j.procbio.2003.07.003**

24- **Whitaker , J. R. (1972).** Principle of enzymology for the food science . Marcel Dekker , Inc .New York.n

25- **Liu, Y.H.; Lu, F.P.; Li, Y.; Yin, X.B., et al. (2008**) Char-acterisation of mutagenised acid resistant alpha-amylase expressed in *Bacillus subtilis* WB600. Applied Microbi-ology and Biotechnology, **78**, 85-94. doi:10.1007/s00253-007-1287-z.

26- **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.

27- **Rahman ,M. and Absar , N.(2001).** Purification, characterization and effect of physic-chemical Agents on the Stability of Amylase from Mango-pupl. Pakiistan Journal of Biological Sciences 4(1) : 98-102.

28- **Ready, N.S.; Nimmagadda, A. and Rao, R.S.S. (2003).** An overview of the microbial α-amylase family. *Afr. J. Biotechnol.* 2(12): 645 –648.

29- **Berg, J. M.; Tymoczko, J. L. and Stryer, L. (2002)**. Biochemistry (5th ed.), pp. 79-91, ISBN 0-7167 -0 4864.W.H. Freeman and Company, New York.

30- **Shafaat, S., Akram M. and Rehman A. (2011).** "Isolation and characterization of a thermostable Alpha-amylase from *Bacillus Subtillis*. *African Journal of Microbiology*. Research vol. 5 (20): 3334-3338.

31- **Lee, S.; Oneda,H. ; Minoda,M.; Tanaka, A. and Inouye, K.(2006).** Comparison of starch hydrolysis activity and thermal stability of two *Bacillus licheniformis* alpha-amylases and insights into engineering alpha-amylase variants active under acidic conditions. *J. Biochem.*, 139(6): 997- 1005.

32- **Illanes, A.; Altamirano, C. and Wilson, L. (2008**). Homogeneous Enzyme Kinetics. In "Enzyme Biocatalysis Principles and Applications, : Illanes,Andr´es (Editor). " Springer Science . Chapter: 3 .

33- **Straathof, A.; Panke, S. and Schmid , A. (2002).** The production of fine chemicals by biotransformations, Curr. Opin. Biotechnol , 13,548-556.

34- **Daniel RM, Peterson ME,and Danson MJ (2010).** The molecular basis of the effect of temperature on enzyme activity. Biochem. J., 425(2):353-360.

35- **Harki G.D. and Rakshit S.K. (2003).** Development in industrially Thermostable Enzymes: A Review Bioresource Technol. 89: 17 – 34.

36- **Nusrat A and Rehman S R, Bangladesh J. Microbiol, (2008**), 25 (1): 76- 78

37- **Struvay,C. and Feller,G. (2012).**Optimization to Low Temperature Activity in Psychrophilic Enzymes. Molecular Sciences Journal. 13:11643-11665

38- **Goyal, N.; Gupta, J.K. and Soni, S.K. (2005).** A novel raw starch digesting thermostable α-amylase from *Bacillus* sp.I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch. *Enzyme and Microb. Technol.*, 37, 723-734.

39- **Mamo, G. and Gessesse, A. (1997)** Thermostable amy-lase production by immobilized thermophilic *Bacillus* sp. *Biotechnology Techniques*, **11**, 447-450. doi:10.1023/A:1018437310837.

40- **Vengadaramana, A., Balakumar, S. and Arasaratnam, V. (2012).** Stimulation of thermal stability of *α*-amylase from *Bacillus icheniformis* ATCC 6346 by treating with ca- tions. Ceylon Journal of Science (Biological Sciences), 41, 35-44.

41- **Pandey, V.D. (2010).** Bioremediation of heavy metals by microalgae. In: Algal biotechnology, ed. Das MK (Daya Publishing House, Delhi) 287-296.

42- **Ayga, A.; Arikan, B.; Korkmaz, H.; Dincer, S.; Colak, O. (2008)** Highly thermostable and alkaline alpha amylase from halotolerant-alkaliphilic Bacillus sp. AB68.

43- **Gashaw,M.and Amare,G.(1999a).**Production of raw starch digesting amyloglucosidase by Aspergillus sp. GP-21 in solid-state fermentation. J. Ind. Microbio. and Biotechnol. Vol.22, pp. 622-626.

44- **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.