تحسين انتاجية انزيم الفا –اميليز(α-amylase) الثابت حراريا″ من العزلة المحلية *Bacillus licheniformis* H14.

هالة مشعل علي* غازي منعم عزيز* صبحي جواد حمزة*

تاريخ قبول النشر 1 /3 /2010

الخلاصة

تم الحصول على(28) عزلة من البكتريا العائدة الى جنس الـ*Bacillus*المعزولة من التربة,واختبرت قابليتها على انتاج انزيم الفا –اميليز الثابت حراريا باستخدام الوسط الانتاجي الصلب ، وتميزت (15) عزله بقابليتها المختلفة على انتاج الانزيم وذلك بتكوينها هالة شفافة حول المستعمرة البكتيرية بعد تغطية الطبق بمحلول اليود (كاشف لوكال), ثم انتخبت العزلة المحلية*Bacillus sp*.H14 كونها الاغزر انتاجا للانزيم بفعاليه نوعيه (48.70وحدة /ملغم بروتين) باستخدام المزارع المغمورة واظهرت فحوص التشخيص ان العزلة *Bacillussp*.H14 تعود الى البكتريا *B.licheniformis*ورمزت لها *B.licheniformis* H14 .

تم تحسين انتاجية الانزيم من العزلة المحلية *B.licheniformis* H14 باستخدام الطريقة الفيزيائية باستخدام المطفر الفيزيائي (الاشعة فوق البنفسجية Ultraviolet light)والطريقة الكيميائية باستخدام المطفر الكيميائي (النايتروزوكوانيدين Nitrosoguanidine).اظهرت نتائج التطفير الفيزيائي بالاشعة فوق البنفسجية واعتماد نسبه القتل 90% تميز العزلة المحلية الطافرة*B.licheniformis* HM14 بانتاجها العالي للالفا- اميليز بفعالية نوعية (102.10وحدة /ملغم بروتين)كذلك اظهرت نتائج التطفير الكيميائي بالنايتروزوكوانيدين واعتماد نسبة القتل 90% تميز العزلة المحلية الطافرة *B.licheniformis* HM4 بانتاجها العالي للالفا –اميليزبفعالية نوعية (100.94وحدة /ملغم بروتين) . حددت الظروف المثلى لانتاج الانزيم بطريقة المزارع المغمورة لكلا العزلتين الطافرتين *B.licheniformis* HM14 و*B.licheniformis* HM4 بإستخدام النشأ مصدراً كاربونياً 1.5% ، و الببتون مصدرًا نايتروجينياً بتركيز 1.5% ، و كلوريد الكالسيوم 0.02% ، و كلوريد الصوديوم 0.05% ، و فوسفات المغنيسوم 0.05% و فوسفات الصوديوم ثنائية الهيدروجين 0.16% على التوالي ، و لقح الوسط الانتاجي بعدد خلايا 1×10^8 خلية / مليليتر عند رقم هيدروجيني ابتدائي مقداره 5 بعد 72 ساعة من الحضن بدرجة حرارة 50م° بالحاضنة الهزازة بسرعة 150 دورة/دقيقة.

الكلمات المفتاحية:*Bacillus licheniformis* , α-amylase , Thermostability

المقدمة

الأميليزات هي الأنزيمات التي لها القدرة على تكسير وتحطيم المعقدات النشوية الكبيرة(كالنشأ) الى عديد السكريد البسيط (الكلوكوز) [1] . ينتج الالفا-اميليز من مصادر مختلفة كالنباتات وتعد البكتريا و الفطريات المنتج الرئيسي لها ويهاجم الالفا- اميليز اواصر ∝-1,4glucosidiclinkage الموجودة في النشأ وبصورة عشوائية [2]. للأميليزات تطبيقات مهمة في العديد من المجالات مثل: الصناعات الغذائية والتخمرات والمنسوجات وصناعة الورق[3]

تم تحسين إنتاجية الأنزيمات من الأحياء المجهرية بطرائق مختلفة منها الفيزيائية والتي تستخدم فيها العديد من المطفرات الفيزيائية Physical mutagens مثل الأشعة فوق البنفسجية (Ultraviolet light) وأشعة x-rays والأشعة المؤينة(γ- rays) والأشعة الكهرومغناطيسية والمطفرات الكيميائية (Chemical mutagens) مثل: النايتروزوكوانيدين) Nitrosoguanidine و Nitrousacid والايثيديوم بروماير Ethidium bromide وغيرها [4] .

درس تأثير عوامل مختلفة في إنتاج الانزيم من البكتريا *B.licheniformis* HM14 و *B.licheniformis* HM4 وشملت مكونات الوسط الغذائي كالمصدر الكربوني والنايتروجيني والرقم الهيدروجيني ودرجة الحرارة وتركيز كلوريد الكالسيوم ومدة الحضانة (مدة التخمر). ويهدف البحث الى الحصول على عزلة محلية كفؤة من بكتيريا *Bacillus sp*. المنتجة لانزيم الفا-اميليز الثابت حراريا″وتشخيصها وتحسين انتاجيتها باستخدام طرائق التطفير الفيزياوية والكيمياوية ودراسة الظروف المثلى لها.

*جامعة بغداد /كلية العلوم /قسم التقنيات الاحيائية

البحث مستل من رسالة ماجستير.

المواد وطرائق العمل:

تشخيص العزلات المحلية المنتجة لأنزيم الفا – أميليز:

تم تشخيص العزلات المحلية المنتجة لأنزيم الفا – أميليز وتبعاً للفحوصات المجهرية والأختبارات الكيموحيوية والموصوفة في[5] .

إختبار قدرة العزلات البكتيرية على انتاج أنزيم الفا- أميليز:

تم التحري عن قابلية العزلات المحلية لبكتريا الـ *Bacilus sp.* على انتاج الفا- اميليز بتحضير الوسط الانتاجي على وفق ماذكره[6] وباستعمال محلول اليود وذلك عن طريق تغطية الطبق بمحلول اليود ثم بعدها قياس قطر المستعمرة البكتيرية (growth) او النمو البكتيري وقطر منطقة التحلل (Zone) او الهالة المتكونة لكل عزلة ، ومنها احتسبت قدره او الهالة المتكونة لكل عزلة، ومنها احتسبت قدرة العزلات على تحليل النشأ وعلى النحو الأتي:

$$\text{كفاءة العزلات لإنتاج الأنزيمات المحللة للنشا} = \frac{\text{قطر منطقة التحلل(الهالة المتكونة)}}{\text{قطر المستعمرة البكتيرية(النموالبكتيري)}}$$

أما إختيار العزلة الاكفأ على إنتاج أنزيم الفا- أميليز باستعمال الوسط الانتاجي المذكور في[6] والذي تم تحويره باضافة مركب فوسفات الصوديوم ثنائية الهيدروجين $NaH_2PO_4.\ 2H_2O$ وبتركيز 0.16%.

تقدير فعالية أنزيم ألفا-أميليز:

قدرت فعالية أنزيم ألفا – أميليز وبالاعتماد على المنحنى القياسي للمالتوز وفق الطريقة الموصوفة من قبل [8,7] واعتمادا على السكريات المختزلة المتحررة نتيجة التحلل المائي للنشأ بفعل الانزيم. أما طريقة تقدير البروتين فقد قدرت وفق الطريقة الموصوفة من قبل[9].

التطفير الوراثي (Mutagensis):

التطفير الفيزيائي باستعمال الاشعة فوق البنفسجية (Physical Mutagensis by using ultraviolet light (uv.)) وأتبعت الطريقة الموصوفة من قبل[12,11,10] وباحتساب نسبة القتل Killing Percentage بعدد الخلايا المتبقية وتطبيق القانون الاتي:

$$\text{النسبة المئوية للقتل} = \frac{\text{عدد الخلايا الاصلية-عدد الخلايا المتبقية}}{\text{عدد الخلايا الاصلية}} \times 100$$

وأختير تركيز المطفر الذي يعطي 90% نسبة قتل للخلايا المعرضة او المعاملة.

التطفير الكيميائي باستعمال المطفر الكيميائي النايتروزوكوانيدين (Chemical Mutagensis by using Nitrosoguanidine (NIG)) أتبعت الطريقة الموصوفة من قبل[10] واختير تركيز المطفر الذي يعطي 90% نسبة قتل للخلايا المعرضة أو المعاملة.

تحديد الظروف البيئية المثلى لانتاج الفا- اميليز:

تعيين المصدر الكربوني الامثل لانتاج الانزيم:

اختيرت مصادر كربونية مختلفة (كلوكوز glucose, سوربيتولsorbitol, مانيتول mannitol, نشأstarch, مالتوزmaltose, سكروزsucrose, لاكتوزlactose, كليسرولglycerol, كالاكتوزgalactose) وبتركيز 1% لتعيين المصدر الكربوني الامثل لانتاج الانزيم من البكتيريا HM4 *B.licheniformis* HM14, فضلا عن ذلك تم تعيين التركيز الامثل للمصدر المنتخب باضافته الى الوسط وبتراكيز مختلفة هي: (2.5,2.0,1.5,1.0,0.5,0)% .

تعيين المصدر النايتروجيني الامثل لانتاج الانزيم:

أختيرت مصادر نايتروجينية عضوية ولاعضوية عدة وقد اشتملت المصادر العضوية على كل من: (الكازائين casein, التربتون tryptone, الببتون peptone, خلاصة الخميرةyeast extract والجيلاتينgelatin و خلاصة اللحم meat extract) , اما المصادر اللاعضوية فاشتملت على :(كبريتات الامونيوم , نترات الصوديوم، نترات البوتاسيوم). وأضيفت هذه المصادر بتركيز 0.7% . ثم تم تعيين التركيز الامثل للمصدر النايتروجيني المنتخب باضافته الى الوسط المنتخب وبتراكيز مختلفة هي: (2.0,1.5,1.0.7,0.5,0.3)%.

تأثيرتراكيز مختلفة من كلوريد الكالسيوم في انتاج الانزيم:

درس تأثير تراكيز مختلفة من كلوريد الكالسيوم وهي : (0.05,0.03,0.02,0.015,0.01,0) % على انتاج الفا – اميليز من البكتيريا *B.lichinformis* HM4, HM14 في الوسط الانتاجي السائل لتحديد التركيز الامثل له.

تعيين الرقم الهيدروجيني الابتدائي الامثل لانتاج انزيم الفا- اميليز:

حضر الوسط الامثل للانتاج بارقام هيدروجينية مختلفة هي: (9,8,7,6,5,4) لتحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لانتاج انزيم الفا- اميليز من العزلتين المحليتين الطافرتين *B.licheniformis* HM4, HM14 .

تعيين درجة الحرارة المثلى لانتاج انزيم الفا- اميليز:

حضن الوسط الامثل لانتاج الانزيم في درجات حرارية مختلفة هي: (65,60,55,50,45,40) مْ لتحديد درجة الحرارة المثلى لانتاج الانزيم من العزلتين المحليتين الطافرتين *B.licheniformis* HM4, HM14.

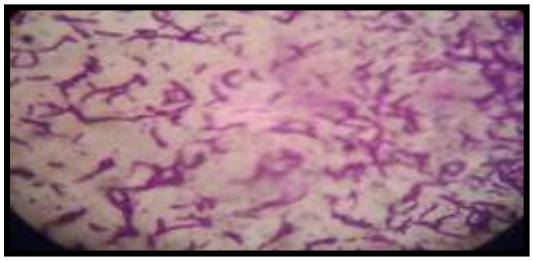
تحديد مدة الحضانة المثلى لانتاج انزيم الفا- اميليز:

تم متابعة انتاج الانزيم من العزلتين المحليتين الطافرتين *B.licheniformis* HM4, HM14 بمدد زمنية مختلفة : (96,72,48,24) ساعة لتحديد المدة الزمنية المثلى لانتاج الانزيم.

النتائج والمناقشة:

تشخيص الجنس *Bacillus*:

أمكن في هذه الدراسة الحصول على (28) عزلة من التربة تعود لجنس العائلة العصوية شخصت عن الاجناس الاخرى اعتماداً على الصفات المظهرية والكيموحيوية وكما هو مذكور في[5] وكما موضح في الشكل (1).



الشكل (1): الخلايا العصوية الموجبة لصبغة غرام للعزلة المحلية *B. licheniformis* H 14 منماة على وسط اكار النشا على درجة حرارة 50م° و لمدة 24 ساعة وبقوة تكبير (100 X).

التحري عن قابلية العزلات المحلية لبكتيريا *Bacillus sp.* على انتاج الفا-أميليز في الوسط الصلب:

أخضعت عزلات بكتيريا *Bacillus sp.* المحلية جميعها الى فحص قدرتها على انتاج انزيم الفا-أميليز, بتنميتها على الوسط الصلب لانتاج الفا –اميليز وتميزت العزلات: (H27,H24,H18,H17,H14) بانتاجها العالي الانزيم مع امتلاكها نسبة تحلل مقدارها (4.5-1.0) , وتميزت العزلةH14 باعلى نسبة تحلل للنشأ مقدارها (4.5)، وكما موضح في الجدول (1) والشكل(2).

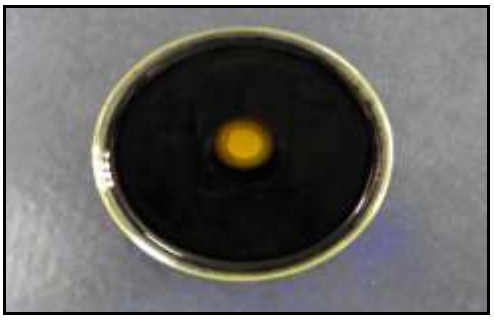
الجدول (1): الغربلة شبه الكمية لعزلات العائلة العصوية المنتجة لأنزيم الفا- اميليز.

رمز العزلة	النسبة Z / G
H1	0
H2	0
H3	0
H4	1.3
H5	1.2
H6	1.5
H7	0
H8	0
H9	0
H10	0
H11	0
H12	1.0
H13	1.1
H14	4.5
H15	0
H16	0
H17	2.6
H18	2.6
H19	1.2
H20	0
H21	0
H22	1.1
H23	1.3
H24	2.0
H25	1.6
H26	0
H27	2.0
H28	1.8

النسبه **(Z / G)**: كفاء العزلات المطفرة لانتاج الفا-اميليز.

Z: قطر الهالة المتكونة (ملم).

G: قطر المستعمرة البكتيرية (ملم)



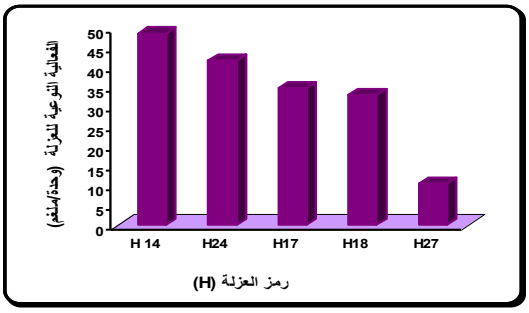
الشكل (2): قدرة العزلة البكتيرية *Bacillus sp.* H14على تحليل النشأ و تكوينها الهالة الشفافة حول المستعمرة البكتيرية.

اختبار العزلة الاكفأ في انتاج ألفا- أميليز في المزارع المغمورة:

أختيرت قدرة العزلات (H27,H24,H18,H17,H14) التي اعطت اعلى نسبة تحلل على الوسط الصلب على انتاج الانزيم في المزارع المغمورة لتحديد العزلة الاكفأ في الانتاج وتشير النتائج المبنية في الجدول (2) والشكل(3) ان العزلة H14 تميزت بانتاجها العالي للانزيم , اذ بلغت الفعالية النوعية للانزيم المنتج من هذه العزلة 48.7 وحدة/ملغم بروتين بينما بلغت الفعالية النوعية لبقية العزلات بين(10.4-41.8) وحدة/ملغم بروتين.

الجدول (2) الغربلة الكمية لعزلات العائلة العصوية المنتجة للألفا – اميليز.

رمز العزلة	الفعالية النوعية (وحدة/ملغم بروتين)
H14	48.70
H24	41.8
H17	34.80
H18	33.0
H27	10.4



الشكل (3): الغربلة الكمية للعزلات الكفوءة للعائلة العصوية المنتجة للألفا – أميليز

تشخيص العزلات الكفوءة المنتجة لانزيم الفا-اميليز:

توضح النتائج المبنية في الجدول (3) الفحوصات المجهرية والاختبارات الكيموحيوية للعزلات المنتجة لانزيم الفا-اميليز ودلت النتائج المستحصلة ان العزلة H14 تعود الى البكتيريا *B.licheniformis* H14

الجدول (3) الإختبارات المجهرية و الكيموحيوية للعزلات المحلية العائدة لبكتيريا *Bacillus sp.* المنتخبة من عمليتي الغربلة النوعية و الكمية المنتجة لأنزيم ألفا – أميليز و تبعاً للمفتاح المبسط لـ (parry) و جماعته (1983).[13]

العزلة	الجنس	تصبغ غرام	الصبغة العاملية	انبعاث الاكسجين	تحلل النشا	تحمل الملح	تخمر السكر	تحلل الجلاتين	الكاتلاز
H14	*B.licheniformis*	+	+	+	-	+	مغمور	مغمور	+
H17	*Bacillus sp.*	-	-	-	+	+	مغمور	مغمور	+
H18	*Bacillus sp.*	-	-	-	+	+	مغمور	مغمور	+
H24	*B.licheniformis*	+	+	+	+	-	مغمور	مغمور	+
H27	*B.licheniformis*	+	+	+	+	-	مغمور	مغمور	+

(+)نتيجة موجبة
(-)نتيجة سالبة

تحسين انتاجية العزلة *B.licheniformis* H14 باستخدام التطفير الفيزيائي والكيميائي:

تحديد المدة الزمنية المثلى للتطفير بالاشعة فوق البنفسجية:

درس تأثير مدد زمنية مختلفة (20,15,10,5) ثانية لتعريض البكتيريا *B.licheniformis* H14 الى الاشعة فوق البنفسجية بطول موجي 253.7 نانوميتر واختيرت المدة 10 ثانية كونها المدة المناسبة لاعطاء نسبة قتل 90% وعدت الخلايا المختارة خلايا طافرة للعزلة H14 *B.licheniformis* لاعطاء نسبة قتل 92.5%. أدخلت المستعمرات الطافرة لعمليتي الغربلة النوعية (شبه الكمية) والثانوية (الكمية) لاختيار العزلة الاكفأ على انتاج الفا-اميليز واظهرت العزلة الطافرة *B.licheniformis* كفاءة عالية في انتاج انزيم الفا-اميليز قياساً بالعزلة الاصلية فكانت نسبة تحلل (Z/G) لها(7.6) وبلغت الفعالية النوعية للانزيم المنتج منها 102.10وحدة/ملغم بروتين وكما موضح في الجدولين (4) و(5).

الجدول (4): الغربلة شبه الكمية لعزلات *B. licheniformis* H14 الطافرة المنتجة لأنزيم الفا – اميليزبعد تعريضها للاشعة فوق البنفسجية.

رمز العزلة	النسبة Z / G
HM1	3.37
HM2	5.0
HM3	4.14
HM4	3.12
HM5	3.71
HM6	3.0
HM7	6.0
HM8	5.0
HM9	5.0
HM10	5.0
HM11	4.66
HM12	5.5
HM13	6.0
HM14	7.6
HM15	5.4

النسبه **(Z / G)**: كفاء العزلات المطفرة لانتاج الفا-اميليز.

Z: قطر الهالة المتكونة (ملم).

G: قطر المستعمرة البكتيرية (ملم).

الجدول (5): الغربلة الكمية لعزلات *B. licheniformis* H14 الطافرة المنتجة للألفا – اميليز بعد تعريضها للأشعة فوق البنفسجية.

رمز العزلة	الفعالية النوعية (وحدة/ملغم بروتين)
HM1	45.73
HM2	77.58
HM3	71.35
HM4	44.55
HM5	45.97
HM6	37.12
HM7	43.51
HM8	75.50
HM9	79.20
HM10	87.00
HM11	86.20
HM12	87.00
HM13	71.25
HM14	102.10
HM15	69.61

ان تأثير الاشعة فوق البنفسجية يكون بشكل مباشر في المادة الوراثية للخلية (DNA) Deoxyribnucleicacid مسبباً قتل الخلايا نتيجة حدوث ازدواج ثنائي لقواعد البريميدين (الثايمين) والذي يمكن اصلاحه بوساطة نظام الضوء والظلام لاصلاح الDNA المعطوب وعند عدم اصلاح هذا العطب في اشرطة الـDNA فهذا يؤدي الى موت الخلية وحصول القتل للخلايا المعاملة[12].

تحديد المدة الزمنية المثلى للتطفير بالنايتروزوكوانيدين وبتركيز (400 مايكروغرام/مليليتر):

درس تأثير المطفر الكيميائي النايتروزوكوانيدين وبتركيز 400مايكروغرام/مليليتر[14] وبمدد زمنية مختلفة ترواحت بين (1.5,1.0,0.5) ساعة. واظهرت الدراسة ان افضل مدد زمنية لاجراء عملية التطفير لبكتيريا *B.licheniformis* H14 كانت بعد مرور ساعة واحدة من المعاملة اذ كانت نسبة القتل للخلايا 90% والحصول على خلايا طافرة تحت هذه الظروف. أدخلت هذه المستعمرات الطافرة لعمليتي الغربلة النوعية (شبه الكمية) والثانوية (الكمية) لاختبار العزلة الاكفأ في انتاج الفا-اميليز وتميزت العزلة الطافرة *B.licheniformis* H14 كونها الاغزر انتاجاً قياساً بالعزلة الاصلية فكانت نسبة تحلل (Z/G) لها(7.5) وبلغت الفعالية النوعية للانزيم المنتج منها 100.94 وحدة/ملغم بروتين وكما موضح في الجدولين (6) و(7). ان تأثير المطفر الكيميائي النايتروزوكوانيدين يكون عن طريق حدوث طفرة تحول(انقلاب) Transition Mutation للقواعد النايتروجينية من النوع GC الىAT , وكذلكATالى GC في شريط ال DNA ومن ثم حدوث الطفرة[10].

الجدول(6) الغربلة شبه الكمية للعزلات *B. licheniformis* H14 الطافرة المنتجة لأنزيم الفا- اميليز بعد تعريضها للمطفر الكيميائي النايتروزوكوانيدين بتركيز 400 مايكرو غرام/ مليليتر وبمدد زمنية مختلفة.

رمز العزلة	النسبة Z / G
HM1	3.12
HM2	3.37
HM3	5.5
HM4	7.5
HM5	3.33
HM6	1.56
HM7	6.0
HM8	5.0
HM9	5.0
HM10	3.33

النسبه **(Z / G)** : كفاءه العزلات المطفرة لانتاج الفا –اميليز .

Z: قطر الهالة المتكونة (ملم).

G: قطر المستعمرة البكتيرية (ملم).

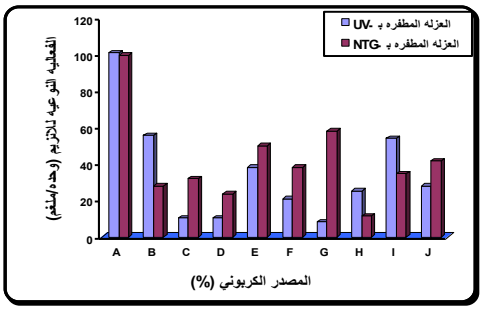
الجدول (7): الغربلة الكمية لعزلات *B. licheniformis* H14 الطافرة المنتجة لأنزيم ألفا – اميليز بعد تعريضها للمطفر الكيميائي النايتروزوكوانيدين بتركيز 400ميكروغرام /مليليتر وبمدد زمنية مختلفة.

رمز العزلة	الفعالية النوعية (وحدة/ملغم بروتين)
HM1	39.16
HM2	46.64
HM3	80.06
HM4	100.94
HM5	45.47
HM6	21.46
HM7	88.41
HM8	71.01
HM9	73.09
HM10	43.85

تعيين الظروف البيئية المثلى لانتاج الانزيم:

تحديد المصدر الكربوني الامثل لانتاج الانزيم:

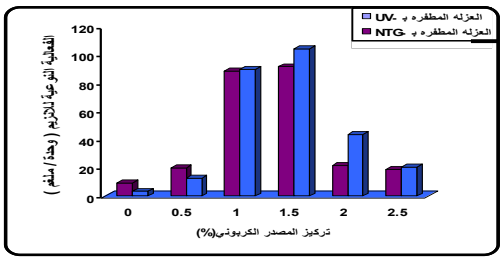
أستخدمت عشرة مصادر كربونية لدراسة تأثيرها في انتاج انزيم الفا-اميليز وبتركيز 1% لكل مصدر واظهرت النتائج ان احتواء وسط الانتاج على المصدر الكربوني النشأ هو الافضل في انتاج الانزيم لكلتا العزلتين المحليتين الطافرتين *B.licheniformis* HM14و *B.licheniformis* HM4 اذ بلغت الفعالية النوعية لهما100.94و99.5 وحدة/ملغم بروتين بوجود النشأ مصدراً وحيداً للكربون وعلى التوالي وكما موضح في الشكل (4).



الشكل (4): تأثير مصادر كاربونية مختلفة في انتاج الفا – أميليز من العزلتين المحليتين الطافرتين *B.licheniformis HM14* و *B. licheniformis HM4* وبتركيز (1%) .

A: Strach ***F: Fructose***
B: Glucose ***G: Lactose***
C: Maltose ***H: Mannitol***
D: Glycerol ***I: Sorbitol***
E: Galactose ***J: Sucrose***

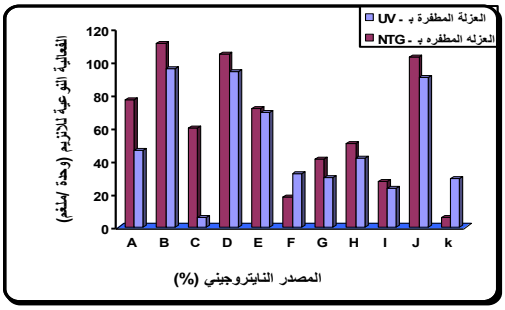
وهذه النتيجة جاءت مشابه لما ذكره[15] اذ ان افضل مصدر كربوني لانتاج الاميليزات من بكتيريا *Bacillussp.* هو النشأ. وأضيف النشأ الى الوسط الانتاجي بتراكيز مختلفة بوصفه مصدراً كربونياً لانتاج الفا-اميليز من العزلتين المحليتين الطافرتين *B.licheniformis* HM14و *B.licheniformis* HM4 . ولوحظ ان افضل تركيز للنشأكان 1.5% اذ بلغت الفعالية النوعية للعزلتين المحليتين الطافرتين 91.89 و 104.42 وحدة/ملغم بروتين وعلى التوالي وكما موضح في الشكل (5) .



الشكل (5): تحديد تركيز النشأ الأمثل لأنتاج الفا – أميليز من العزلتين المحليتين الطافرتين *B. licheniformisHM14* و *B. licheniformisHM4*.

تحديد المصدر النايتروجيني الامثل لانتاج الانزيم:

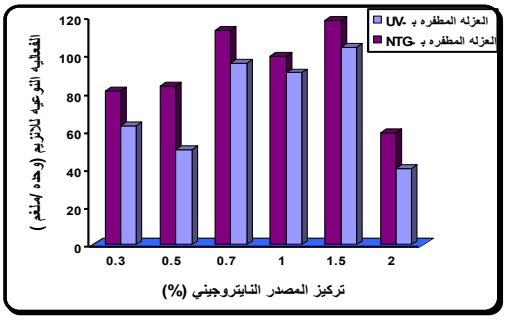
أختيرت مصادر نتروجينية عضوية ولاعضوية عدة لتحديد تأثيرها في انتاج انزيم الفا- اميليز من العزلتين المحليتين الطافرتين *B.licheniformis* HM14و *B.licheniformis* HM4 وأضيفت هذه المصادر بتركيز 0.7% الى الوسط الانتاجي. أظهرت النتائج ان الببتون هو الاكفأ في انتاج الفا-اميليز قياساً مع مصادر النايتروجين العضوية , اذ بلغت الفعالية النوعية 96.07 و 111.38 وحدة/ملغم بروتين للعزلتين على التوالي وكما موضح في الشكل (6).



الشكل (6): تأثير مصادر نايتروجينية مختلفة في انتاج ألفا – أميليز من العزلتين المحليتين الطافرتين *B.licheniformisHM14* و *B. licheniformisHM4* وبتركيز(0.7%).

A: مستخلص اللحم
B: الببتون
C: الجلاتين
D: نترات الصوديوم
E: اليوريا
F: التربتون
G: كبريتات الأمونيوم
H: خلاصة الخميرة
I: الكازائين
J: نترات البوتاسيوم
K: خلاصة الخميرة + الببتون

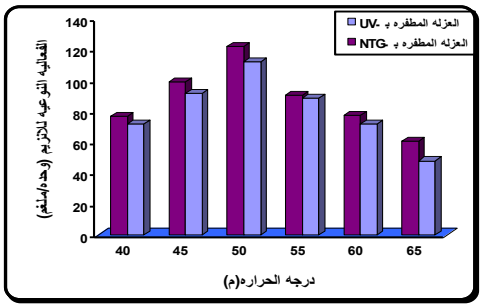
وهذا ماأكدته الدراسة التي قام بها[16] بأن الببتون من افضل المصادر النايتروجينية العضوية لانه يحافظ على ثبات تراكيز المكونات الموجودة في وسط الانتاج. ولاجل تحديد التركيز الامثل للببتون اضيف الى الوسط الانتاجي بتراكيز مختلفة بوصفه مصدراً وحيداً للنايتروجين لانتاج الفا- اميليز من العزلتين المحليتين الطافرتين *B.licheniformis*HM14 و *B.licheniformis* HM4 ولوحظ ان افضل تركيز للببتون كان 1.5% اذ بلغت الفعالية النوعية للعزلتين المحليتين الطافرتين 104.42 و 118.35 وحدة/ملغم بروتين وعلى التوالي وكما موضح في الشكل (7). ان الزيادة المتدرجة في تركيز الببتون في الوسط الانتاجي قابلتها زيادة في الفعالية الانزيمية , وهذه النتيجة جاءت مطابقة مع ماذكره [17] وجماعته. لقد اشارت الادبيات العلمية ان اهم عاملين لإنتاج الأميليزات من الأحياء المجهرية هما: المصدر الكربوني ، والمصدر النايتروجيني واعلى انتاجية للأمبليزات من بكتريا *B.licheniformis* أمكن الحصول عليها عندما تكون النسبة بين C/N في الوسط الانتاجي هي (1.0)[16].



الشكل (7): تأثير تراكيز مختلفة للببتون (0.3 – 2.0)% في انتاج الفا – اميليز من العزلتين المحليتين الطافرتين *B. licheniformis HM14* و *B. licheniformis* HM4 .

تعيين درجة الحرارة المثلى في إنتاجية الأنزيم:

درس تأثيرمدى من درجات الحرارة في انتاج أنزيم الفا- أميليز وبينت النتائج ان درجة الحرارة 50م° هي الأفضل لإنتاج الانزيم إذ بلغت الفعالية النوعية للأنزيم للعزلتين المحليتين الطافرتين *B.licheniformis* HM4, *B.licheniformis* HM14 112.08و 121.83 وحدة/ ملغم بروتين وعلى التوالي وكما موضح في الشكل(8)، هذه النتيجة جاءت مطابقة لما ذكره[17,15] حيث لاحظوا أن افضل درجة حرارية لأنتاج الاميليز من بكتريا *Bacillus sp.* هو 50C°.

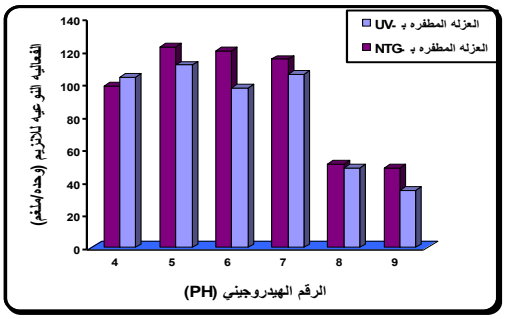


الشكل (8): تأثير درجات حرارية مختلفة (40 - 65)م° في انتاج الفا – اميليز من العزلتين المحليتين الطافرتين *B. licheniformisHM14* و *B. licheniformisHM4*.

تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لإنتاج الانزيم:

أختبرت قابلية العزلتين المحليتين الطافرتين ***B.licheniformis* HM4** , ***B.licheniformis*HM14** على انتاج الفا- أميليز

باستخدام الوسط الإنتاجي بأرقام هيدروجينية مختلفة واظهرت النتائج ان أفضل رقم هيدروجيني للإنتاج هو(5) إذ بلغت الفعالية التوعية للعزلتين المحليتين الطافرتين 111.38 و 122.52 وحدة/ ملغم بروتين، وعلى التوالي وكما موضح في الشكل(9) ، لقد عرفت بكتريا العائلة العصرية بقابليتها على النمو في ارقام هيدروجينية متنوعة بين (3-11) تقريباً، وان إنتاجها للأميليزات يكون ضمن حدود الرقم الهيدروجيني الأمثل لنموها.

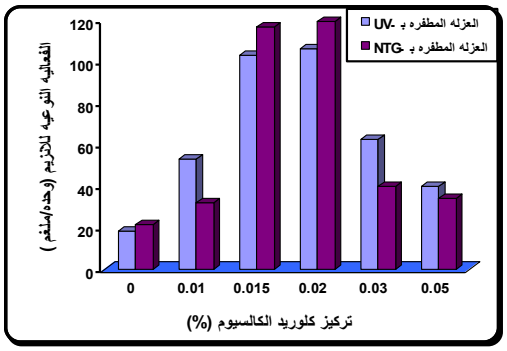


الشكل (9): تأثير قيم مختلفة من الرقم الهيدروجيني (4-9) في انتاج الفا – اميليز من العزلتين المحليتين الطافرتين *B. licheniformisHM14* و *B. licheniformisHM4*.

إذ لوحظ ان إنتاج الفا – أميليز من اجناس العائلة العصوية المختلفة يكون عند قيم هيدروجينية تتراوح من (3-11) ؛ مما يدل على إمتلاك أنواع هذا الجنس مدى واسع من الرقم الهيدروجيني للنمو وانتاج الأنزيم[18,15].

تحديد التركيز الأمثل لكلوريد الكالسيوم لإنتاج الأنزيم:

أستعملت تراكيز مختلفة من كلوريد الكالسيوم لتحديد التركيز الأمثل لإنتاج الفا- أميليز من العزلتين المحليتين الطافرتين *B.licheniformis* HM4, *B.licheniformis* HM14 واظهرت النتائج ان احتواء وسط الإنتاج على تركيز 0.02% هو الأفضل لإنتاج الأنزيم إذ بلغت الفعالية النوعية للأنزيم من العزلتين المحليتين الطافرتين 106.74 و 119.74 وحد/ ملغم بروتين وعلى التوالي وكما موضح في الشكل(10) .

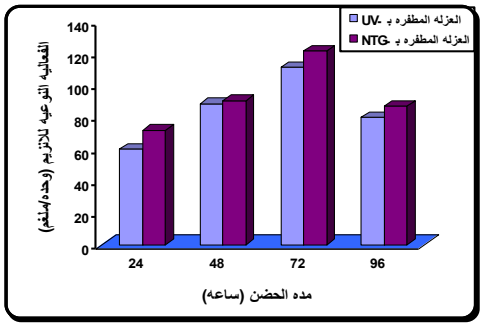


الشكل (10): تحديد تركيز كلوريد الكالسيوم الأمثل لانتاج الفا – اميليز من العزلتين المحليتين الطافرتين *B. licheniformisHM14* و *B. licheniformisHM4*.

ولوحظ ايضاً من النتائج اعلاه ان الفعالية الأنزيمية تزداد تدريجياً بزيادة تركيز كلوريد الكالسيوم في الوسط الانتاجي، وتنخفض عند التراكيز العالية وهذه النتيجة جاءت متوافقة مع ماذكره[17]. ان اضافة ايونات الكالسيوم ثنائية التكافؤ (Ca+2) الى الوسط تعد محفزات او منشطات للعديد من الأحياء المجهرية المنتجة للأنزيمات وخصوصاً أنزيمات الأميليز.

تحديد مدة الحضانة المثلى لإنتاج الأنزيم:

تم متابعة إنتاج أنزيم الفا- اميليز من العزلتين المحليتين الطافرتين *B.licheniformis* HM4, *B.licheniformis* HM14 في مدد زمنية مختلفة . واظهرت النتائج ان افضل إنتاج للأنزيم كان بعد 72 ساعة من الحضن اذ بلغت الفعالية النوعية للعزلتين المحليتين الطافرتين 111.38 و 121.83وحدة/ ملغم بروتين وعلى التوالي، وكما موضح في الشكل(11). واختلفت الأدبيات العلمية في تحديد المدة المثلى لإنتاج أنزيم الفا- أميليز من الأحياء المجهرية، فقد حددها كل من[17] بـ18 ساعة لبكتريا *Bacillus sp.*، بينما حددت المدة الزمنية لإنتاج الفا- اميليز من بكتريا *B.licheniformis* من(3-5) أيام وكما ذكره[19].



الشكل (11): تطور انتاج الفا – اميليز من العزلتين المحليتين الطافرتين *B.licheniformis* HM14 و *B. licheniformis* HM4.

المصادر:

1. Reddy, N.S.; Nimmagadda, A. and Rao, K. R. S. S. 2003. An overview of the microbial α- amylase family. Afri. J. Biotechnol. 2(12): 645-648.
2. Cornelis, P. 1987.Microbial amylase . Microbiol. sci. 4(11): 342 – 343.
3. Pandey, A.; Nigma, P.; Soccal, C.R.; Soccal, V.T.; Singh, D. and Mohan, R. 2000. Advances in Microbial amylase. Biotechnol. Appl. Biochem. 31: 135- 152.
4. Perry, J.J. and Staley, J.J. 1997. Microbiology: Dynamics and Diversity, P.P. 304- 312. Saunders college publishing.
5. Duguid, J.P. 1996. Genus *Bacillus.* In: "Collee, J.G.; Fraser, A.G.; Marmion, B.P. and Simmons, A. (14th ed.)". Practical Medical Microbiology. Vol. 1. Mackie and McCartney. p.p. 131 – 149.
6. Teodoro, C.E. and Martins, M.L.L. 2000. Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus sp.* Brazil. J. Microbiol. 31: 1 – 9.
7. Toye Ekunsaumi, 2001. uw – Washington country. Laboratory production and assay of amylase by Fungi and Bacteria.
8. Lin, L.L.; Hsu, WH and Chu, WS. 1997. A gene encoding for α- Amylase from thermophilhc *Bacillus sp.* Strain Ts- 23 and it's Expression in Escherichia coli. J. Appl. Microbiol. 82: 325- 334.
9. Bradford, M.1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of micro organism quantities of protein using the principles of protein – dye binding. Anal. Biochem. 72: 248 – 254.
10. Gerhardt, P.; Murray, R.G.E.; Costilow, R.N.,; Nester, E.W.; Wood, W.A.; Krieg, N.R. and Phillips, G.b. 1981. Manual of Methods for general Bacteriology. Section II, p.p. 221 – 242.
11. Carrasco, A . and Soro, C.1987. Mutagenesis of *Clostridium butyricum.* J. Appl. Bacteriol. 63: 539 – 543.
12. Mitra, S. 1996.Genetic Egineering. Principles and practice. p.p: 437 – 453.
13. Parry, J.M.; Turnbull, P.C. and Gibson, J. R. 1983. Methods and characterization tests. In: Acolour Atlas of *Bacillus sp*. Wolf medical publication Ltd.
14. Slavnova, V.S.; ChigaLeichik, A.D.; Mazanov, A.L.; Shevtsov, V.V. 1986. Chemical Mutagenesis and use of indirect enzymatic criteria for selecting virulent clones of *Bacillus thuringiensis.* Prik. Biokhim. Micrbiol. 22(4): 543 – 547.
15. UI – Haq, I.; Rani, S.; Ashraf, H. and Qadeer, M.A. 2002. Biosynthesis of Alpha-amylase by chemically treated Mutant of *Bacillus subtitis.* J. Biolo. Sci. 2(2): 73 – 75.
16. Aiyer, P.V.D. 2004. Effect of C:N ratio on alpha – amylase production by *Bacillus licheniforms sp.*T 27. African. J. Biotechnol. 3(10): 519 – 522.
17. Lin, L.L.; Hsu, WH and Chu, WS. 1998. Production and properties of a raw starch- degrading amylase from the thermophilic and al

licheniformis.J.Bacteriol.121:848–856.

19. Saito, N. 1973. A thermophilic Exracellular α-amylase from *Bacillus licheniformis*. Arch. Biochem. Biophys. 155: 290 – 298.

kaliphilic *Bacillus sp*. Ts- 23. Biotechnol. Appl.Biochem. 28: 61-68.

18. Satio, N. and Yamamoto, K. 1975. Regulatory Factors affecting α-amylase Production in *Bacillus*

Improvement of thermostable productivity α-amylase from local isolate *Bacillus licheniformis* H14.

Hala M . Ali *** ***Ghazi M . Aziz* ***Subhi J. Hamza****

*University of Baghdad /College of Science / Department of Biotechnology

Abstract:

(28)Bacterial local isolates of *Bacillus sp*. were obtained from soil samples. Isolates were tested for thermostable alpha- amylase production on solid media; fifteen isolates were able to develop clear zone around the bacterial growth after floating the plates with iodine reagent (Lugol's solution). There were further tested in submerged culture which led to selection of *Bacillus sp*. H14since it was the most efficient .Microbial and biochemical tests showed that the local isolate *Bacillus sp*.H14was refered to the species *B.licheniformis* that signed as H14 was refered to the species *B.licheniformis* H14 .,To get ahigher yield of alpha – amylase(48.70unit/mg protein) production from the local isolate *B.licheniformis* H14 . This study used different mutation ways such as physical way by using the physical mutagen (ultraviolet light) and chemical way by using the chemical mutagen (nitrosoguanidine). Physical mutation results showed that the local isolate *B.licheniformis* HM14 get higher yield of alpha – amylase production(102.10 unit/mg protein) according to killing percentage (90%) while the chemical mutation results showed that the local isolate *B.licheniformis* HM4 get higher yield of alpha –amylase production(100.94 unit/mg protein) from the two mutant local isolates (HM14 and HM4)were the best carbon source starch (1.5%), peptone (1.5%) as nitrogen source, calcium chloride (0.02%), sodium chloride (0.05%), magnicium phosphate (0.05%), sodium di –hydrogen phosphate (0.16%), at initial pH (5) and inoculum size $1*10^8$ cfu/ml at (50°C) For (72) hours, using shaking incubator at (150) rpm.