توصيف أنزيم ألفا – أميليز المنتج من عزلة محلية من بكتريا *Bacillus licheniformis* R5

رنـا عبدالله حسين محمد عمر محي الدين
كلية الزراعة - جامعة بغداد

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

الخلاصة

تم إجراء هذا البحث في كلية الزراعة- جامعة بغداد في عام 2004 وقد بينت نتائج توصيف أنزيمα – amylase المنتج من البكتريا *Bacillus licheniformis* R5 بأن الوزن الجزيئي بلغ 56000 دالتون عند تقديره بالترشيح الهلامي باستعمال عمود Sephacryl S – 200 وأن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الانزيم بلغ 8,0 وتراوح الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الانزيم بين 7,0 – 9,0 أما درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم فبلغت 50° م عند الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الانزيم كذلك بلغت قيمة طاقة التنشيط لتحويل المادة الاساس (النشأ) الى نواتجه 17500 كيلوسعرة \ مول أما طاقة مسخ الانزيم فكانت 64000 كيلوسعرة \ مول. أظهرت دراسة الثوابت الحركية أن قيم ثابت ميكالس (Km) للانزيم تجاه النشأ والكلايكوجين والاميلوز بلغ 0,44% و 0,34% و0,28% على التوالي مما يعني أن الانزيم أكثرألفة لتحليل الاميلوز قياساً مع النشأ والكلايكوجين ووجد أن نشاط الانزيم يزداد بنسبة 138,8% عند إضافة 0,6 ملي مولار من كلوريد الكالسيوم الى محلول التفاعل كما وجد أن الثبات الحراري للانزيم يزداد بوجود كلوريد الكالسيوم وبتراكيز (0,1 – 0,6) ملي مولار عند درجة الحرارة 70°م و 80°م على التوالي إذ إحتفظ الانزيم بكامل فعاليته عند 70°م وإحتفظ بحوالي 95.3% من فعاليته بوجود 0.6 ملي مولار من كلوريد الكالسيوم و100% بوجود 1,0 ملي مولار عند درجة الحرارة 80°م.

الكلمات المفتاحية : توصيف انزيم الفا اميليز ، بكتريا *Bacillus licheniformis* R5

المقدمة

تعد الانزيمات من المواد التي تنتج بكثرة من قبل الاحياء المجهرية إذ تعد خزيناً لا ينضب لمختلف أنواع الانزيمات والتي يبلغ عددها 2500 أنزيم ، في حين أن المستعملة منها في مجالات مختلفة لا يتجاوز 25 نوعاً. يتم انتاج هذه الانزيمات بكميات تقدر بآلاف الاطنان سنوياً حيث تحتل الاميليزا ت المرتبة الاولى. إن انتاج الانزيمات من الاحياء المجهرية بصفات معينة تفتقر الى انتاجها من مصادر طبيعية بسبب تدني كلفة الانتاج وامكانية استغلال بعض المواد الاولية في تنمية الاحياء المجهرية لتخليص البيئة من المشاكل التي تسببها هذه المواد ، فضلاً عن امكانية الحصول على انزيمات بمواصفات نوعية خاصة قد لا تتوفر في غيرها كالانزيمات المتحملة للحرارة العالية او الانزيمات التي تعمل في ارقام هيدروجينية متطرفة او الانزيمات التي لا تتأثر ببعض المثبطات (Hagihara, *et al.*, 2001). ونظراً للاستعمالات المتنوعة لانزيم α – amylase في العمليات الصناعية مثل المواد الغذائية والتخمير والمنسوجات والصناعات الورقية والادية ،فأن المراجع العلمية تبين وبشكل مستمر لعدد غير قليل من البحوث والدراسات حول هذا الانزيم من الاحياء المجهرية [Segel, 1976; Ramesh, & Lonsane, 1989; Rivera, et al., 2003] بل أن ثمة محاولات لتطفير الاحياء المجهرية المنتجة للانزيمات أوكلونة Cloning هذا الانزيم من أحياء مجهرية أخرى غير تلك التي تنتجها بهدف تحسين الانتاجية (Segel, 1976; Crueger, & Crueger, 1989) كما جرت في البلد محاولات عديدة لانتاج هذا الانزيم من الاحياء المجهرية وتنقيته وتوصيفه [حكمت، 1982; محي الدين، 1989 ;الصفار، 1998] . تهدف هذه الدراسة الى استخلاص انزيم α-amylase من عزلة محلية ودراسة الخصائص والصفت الحركية للإنزيم.

توصيف انزيم α-amylase بكتريا *Bacillus licheniformis*

البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الاولى

المواد وطرائق العمل

إستخدمت في هذه الدراسة بكتريا *Bacillus licheniformis* R5 التي تم عزلها وتشخيصها من عزلة محلية لبكتريا *Bacillus licheniformis* بطريقة المزارع المغمورة وتم إنتاج الانزيم من هذه البكتريا بالطريقة المذكورة في تلك الدراسة (حسين،2010).

توصيف الانزيم

تعيين الوزن الجزيئي للانزيم

تم تعيين الوزن الجزيئي للانزيم بتقنية الترشيح الهلامي باستخدام عمود Sephacryl S – 200 ذو أبعاد (1,6 × 44) سم ومحلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ ذو الرقم الهيدروجيني 7,0 في موازنة العمود وإسترداد كل من الدكستران الازرق والمحاليل القياسية (Ovalbumin ، (Bovine serum albumin) BSA، Ferratin ، Ovaltransferrin) والانزيم بسرعة جريان 30 مل \ ساعة وبواقع 2 مل للجزء الواحد وقدر حجم الفراغ (Vo) Void Volumn للعمود بامرار محلول الدكستران الازرق وأحتسب حجم الاسترداد بقياس الامتصاصية على طول موجي 500 نانوميتر، أما حجم الاسترداد للبروتينات القياسية والانزيم المنقى (Ve) Void Enzyme فقدرت بغياب الامتصاصية على طول موجي 280 نانوميتر بشكل مستقل لكل بروتين وتم تعيين الوزن الجزيئي للانزيم من المنحنى القياسي للعلاقة بين نسبة الاسترداد لكل بروتين قياسي الى حجم الاسترداد للدكستران الازرق (Ve \ Vo) مقابل لوغاريتم الاوزان الجزيئية للبروتينات القياسية .

تعيين الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم

حضرت محاليل المواد الاساس المتضمن 1 غم من النشأ باستعمال محلول الخلات الدارئ بأرقام هيدروجينية (4,0 – 5,0) ومحلول الفوسفات الدارئ (6,0 – 8,0) ومحلول الكلايسين الدارئ برقم هيدروجيني (9,0) بتركيز 0.1 مولاري وقدرت الفعالية الانزيمية بطريقة Hagihara, *et al*., (2001) ورسمت العلاقة بين قيم الارقام الهيدروجينية المختلفة مقابل الفعالية النوعية للانزيم لتعيين الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم.

تعيين الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الانزيم

مزج 1 مل من محلول الانزيم مع 1 مل من المحاليل الدارئة ذات الارقام الهيدروجينية المختلفة المذكورة سابقاً وحضنت الانابيب بدرجة 35°م مدة نصف ساعة ثم بردت مباشرةً في حمام مائي وقدرت فعالية الانزيم المتبقية وعبر عنها كنسبة مئوية (%) من الفعالية لأفضل رقم هيدروجيني .

تعيين الدرجة الحرارية المثلى لفعالية الانزيم

قدرت فعالية الانزيم على مدى من درجات الحرارة تراوحت بين (35 – 70)°م .

تعيين الثبات الحراري للانزيم

حضن 2 مل من المحلول الانزيمي في أنابيب إختبار بدرجات حرارة مختلفة تراوحت بين (25 – 80)°م على الرقم الهيجروجيني الامثل (8,0) لثبات الانزيم مدة 30 دقيقة ثم بردت الانابيب مباشرةً في حمام ثلجي وقدرت فعالية الانزيم المتبقية.

تقدير طاقة التنشيط للانزيم

قدرت طاقة التنشيط بتحويل المادة الاساس الى ناتج Transformation Ea وطاقة المسخ Denaturation Ea عن طريق رسم العلاقة بين لوغاريتم Vmax المقدرة في مدى من درجات الحرارة تراوحت بين (35 – 70)°م مقابل مقلوب درجات الحرارة المطلقة (K^o) وتم حساب طاقة التنشيط وطاقة المسخ من الانحدار slope (Segel,1976) وفق العلاقة الناتجة، حيث ان R تمثل معامل الارتباط :

$$\text{Slope} = \frac{E}{2,3R}$$

تعيين الثوابت الحركية للانزيم

حضرت تراكيز مختلفة من المادة الاساس (النشأ) تراوحت بين (0.05 – 1.00)% في محلول فوسفات البوتاسيوم الدارىء بتركيز 0.1 مولاري برقم هيدروجيني 0,8 [Plumel, 1949] وقدرت قيم ثابت ميكالس (Km)

والسرعة القصوى (Vmax) من رسم العلاقة بين السرعة الاولية (V) وتراكيز المواد الاساس (S)(Segel,1976) باربع طرائق شملت:

1- Lineweaver – Burk reciprocal Plot
2- Hance – Woolf Plot
3- Woolf – Augustinsson – Hofstee Plot
4- Eadie – Scatchard Plot

وفق ما ذكر في (1976) , Segel .

دراسة تأثير كلوريد الكالسيوم

مزج 4,0 مل من محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ ذو الرقم الهيدروجيني 0,8 الحاوي على تلاكيز مختلفة من كلوريد الكالسيوم تراوحت بين (0 – 0,1) ملي مولار مع 5,0 مل من المادة الاساس ثم أضيف إليه 1,0 مل من الانزيم وحضن المزيج في 50°م مدة 10 دقائق وقدرت فعالية الانزيم وعبرت عن فعالية الانزيم النتبقية كنسبة مئوية من فعالية الانزيم المقدرة بغياب كلوريد الكالسيوم

الثبات الحراري للانزيم بوجود كلوريد الكالسيوم :

تم إضافة 2 مل من محلول فوسقات البوتاسيوم الدارئ ذو الرقم الهيدروجيني 0,8 الحاوي على 6,0 ملي مولار منكلوريد الكالسيوم الى 2 مل من المحلول الانزيمي وحضن في حمام مائي مدة 30 دقيقة في درجات حرارة تراوحت بين (50 – 90)°م وقدرت فعالية الانزيم . تم تكرار هذه العملية باستخدام 1 ملي مول من كلوريد الكالسيوم بدلاً من 6,0 ملي مول .

قابلية الانزيم على تحليل النشأ

تحليل النشأ

اضيف 1 مل من المحلول الانزيمي الى مزيج من 5 مل من محلول النشأ بتركيز 2% المحضر في محلول الفوسفات الدارىء بتركيز 1,0 مولاري برقم هيدروجيني 8,0 (Plumel, 1949) مع 4 مل من محلول الفوسفات الدارىء نفسه وحضن المزيج بدرجة حرارة 50°م وتم متابعة تحلل النشأ في مزيج التفاعل مدة ساعة واحدة مع سحب 2 مل من محلول التفاعل على مدد متعاقبة هي (5 ، 10 ، 20 ، 30 و 60) دقيقة وتقدير السكريات الناتجة عن تحلل النشأ عن طريق تقدير الفعالية [Hagihara, *et al*., 2001].

كروماتوغرافي الطبقة الرقيقة TLC

تبعت طريقة كروماتوغرافي الطبقة الرقيقة الموصوفة من قبل(1988) Jensen, *et al*., لملاحظة تحلل النشأ الى مكوناته من المالتوز والسكريات الاخرى فقد استخدم لهذا الغرض صفائح الطبقات الرقيقة Thin-Layer Plates من نوع Silica gel G60 والمجهزة من شركة Merck بابعاد 20 × 20 سم . اجري الفحص بحرارة الغرفة بوضع 10 مايكروليتر من محاليل السكريات القياسية (المالتوز ، الكلوكوز) بتركيز 2 % فضلاً عن النماذج المأخوذة من تحلل النشأ بعد (5 ، 10 ، 20 ، 30 و 60) دقيقة وفقاً لطريقة تحليل النشأ وتم وضع الصفيحة في حوض زجاجي واجري الفصل باستخدام مزيج من المذيبات الاتية (2 : n-Butanol – Ethanol – Water (5 : 3 وبعد انتهاء الفصل جففت الصفيحة ثم رشت بكاشف حامض الكبريتيك ذو تركيز 50% ووضعت في فرن حراري هوائي بدرجة 110°م مدة 30 دقيقة لحين تطور لون البقع المفصولة . قدرت الحركة النسبية للبقع (Rf) وفق المعادلة الاتية:

$$\text{الحركة النسبية (Rf)} = \frac{\text{المسافة التي تقطعها المواد المفصولة (البقع) (سم)}}{\text{المسافة التي يقطعها محلول الفصل (سم)}}$$

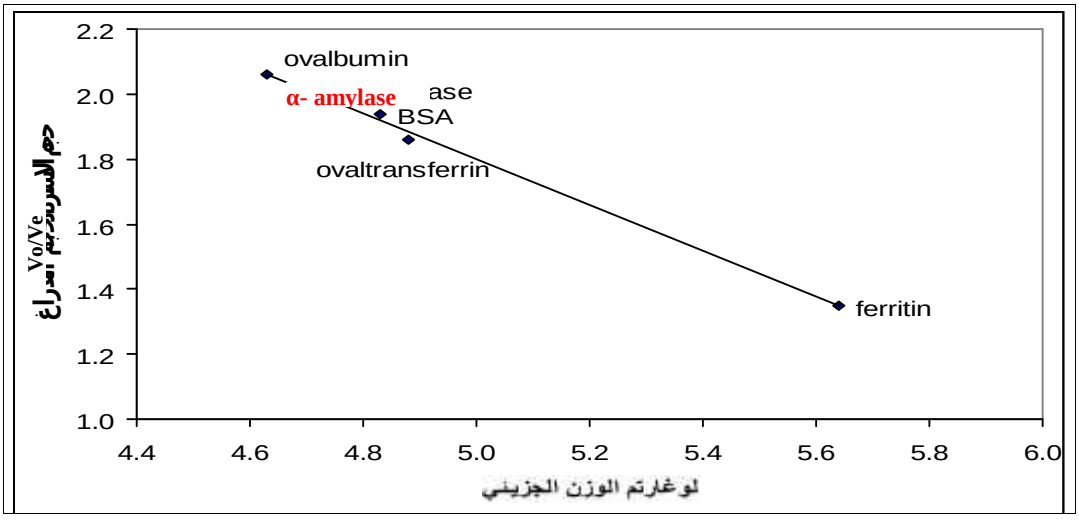
النتائج والمناقشة

توصيف الانزيم

الوزن الجزيئي

تم تقدير الوزن الجزئي لانزيم الفا – اميليز باتباع طريقة الترشيح الهلامي على عمود Sephacryl S-200 بابعاد (1.6 × 44) سم وتم تعيين حجم الفراغ (Vo) للعمود بالدكستران الازرق (10^6 × 2 دالتون) كما تم تعيين حجوم الاسترداد للبروتينات القياسية (Ve) والتي اشتملت على (Bovine Ovalbumin ، serum albumin، Ovaltransferrin، Ferritin) وأستخرجت منها قيم (Ve/Vo) للبروتينات القياسية فكانت 2,06 ، 1,94 ، 1,85 ، 1,35على التوالي .

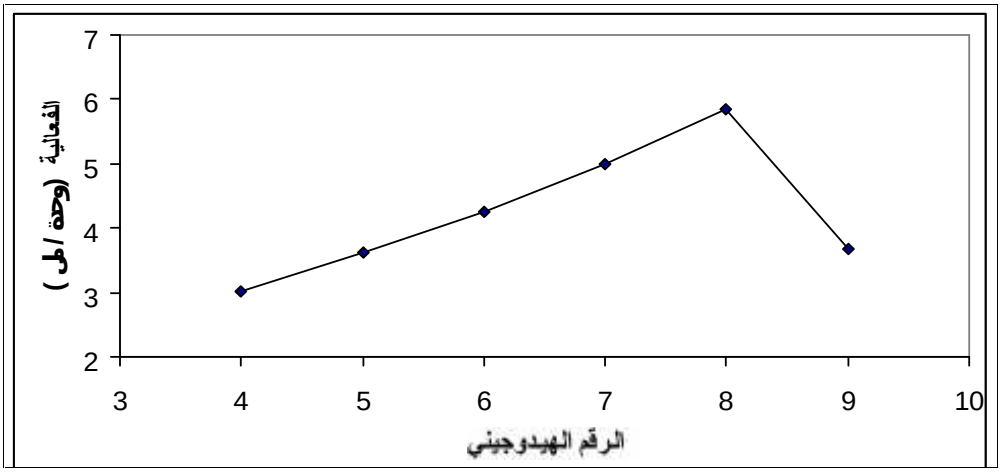
يوضح الشكل (1) المنحنى القياسي للوغاريتم الوزن الجزيئي مقابل قيم (Ve/Vo) للبروتينات القياسية والتي استعملت لتعيين الوزن الجزيئي لانزيم الفا – اميليز قيد الدراسة والذي قدر بحوالي 56.000 دالتون وتأتي هذه القيمة مقاربة لما توصل اليه (Pandey, *et al.*, 2000)اذ وجدوا ان الوزن الجزيئي لانزيم الفا – اميليز من سلالة من *B. licheniformis* يبلغ 57.700 دالتون وذلك باستعمال تقنية الترشيح الهلامي ومقاربة ايضاً لدراسة [Cha & Yu, 1993]فقد وجدوا ان الوزن الجزيئي لانزيم الفا – اميليز من سلالة من البكتريا *B. licheniformis* يبلغ 55.000 دالتون وذلك بطريقة الترحيل الكهربائي بوجود SDS ومخالفاً لما توصل اليه Saito , (1973) من ان الوزن الجزيئي للانزيم نفسه ومن البكتريا نفسها يبلغ 22.500 دالتون بطريقة الترشيح الهلامي . أن مقارنة الاوزان الجزيئية لانزيم الفا – اميليز المنتج من البكتريا قيد الدراسة مع نظائره ومن الاحياء المجهرية الاخرى يلاحظ انه قدر بحوالي 57.000 دالتون من البكتريا *Pseudomonas stutzeri* بطريقة الترحيل الكهربائي [Sakano, *et al.*, 1982] و 68.000 دالتون من البكتريا *Bacillus acidocaldarius* بطريقة الترحيل الكهربائي بوجود SDS (Buoncore, *et al.*, 1976) او 55.000 دالتون و 36.000 دالتون بطريقة الترحيل الكهربائي بوجود SDS وبالترشيح الهلامي على التوالي وذلك من البكتريا *Bacillus cereus* [Yoshigi, *et al.*, 1985] كما وقدر بحوالي 49.000 دالتون بطريقة الترحيل الكهربائي بوجود SDS من *Thermus sp.* [Shaw, *et al.*, 1995] و 42.000 دالتون بطريقة الترحيل الكهربائي بوجود SDS ايضاً من البكتريا *Thermococcus profundus* DT5432 .[Chung, *et al.*, 1995]



شكل1. المنحنى القياسي لتقدير الوزن الجزيئي لانزيم الفا- اميليز المنتج من البكتريا *B.licheniformis*

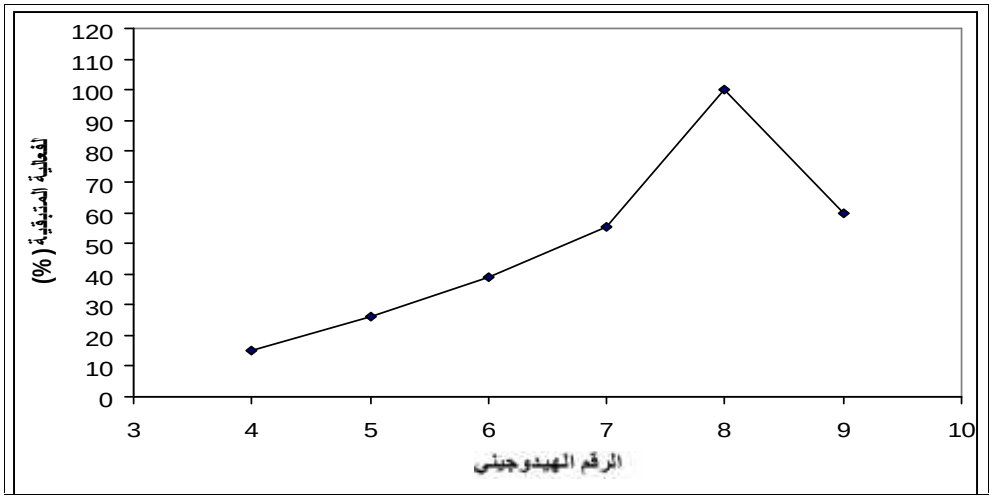
الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم وثباته

قدر الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية أنزيم α – amylase المنتج من قبل البكتريا *Bacillus licheniformis* R5 بمدى من أرقام هيدروجينية تراوحت بين 4,0 – 9,0 (الشكل 2) ولوحظ أن فعالية الانزيم تزداد بزيادة الرقم الهيدروجيني لمحلول التفاعل من 4,0 – 8,0 وأنها بلغت حدها الاقصى عند الرقم الهيدروجيني 8,0 مما يعني أنه يمثل الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم إذ لوحظ إنخفاض الفعالية بزيادة الرقم الهيدروجيني الى 9,0 .



شكل 2. منحنى الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية أنزيم الفا- اميليز المنتج من البكتريا *B.licheniformis* R5

أما ثبات الانزيم تجاه الارقام الهيدروجينية فقد تم بحضن الانزيم في 35°م مدة 30 دقيقة في محاليل دارئة تراوحت بين 4,0 – 9,0 أيضاً أظهرت النتائج (الشكل 3) أن الانزيم يفقد نسبة عالية من فعاليته في الارقام الهيدروجينية الحامضية إذ إحتفظ الانزيم بحوالي 15% فقط من فعاليته بالرقم الهيدروجيني 4,0 بينما إحتفظ بحوالي 60% من فعاليته عند حضنه بالرقم الهيدروجيني 9,0 مما يعني أنه أكثر ثباتاً تجاه الارقام الهيدروجينية القاعدية منها للارقام الحامضية .

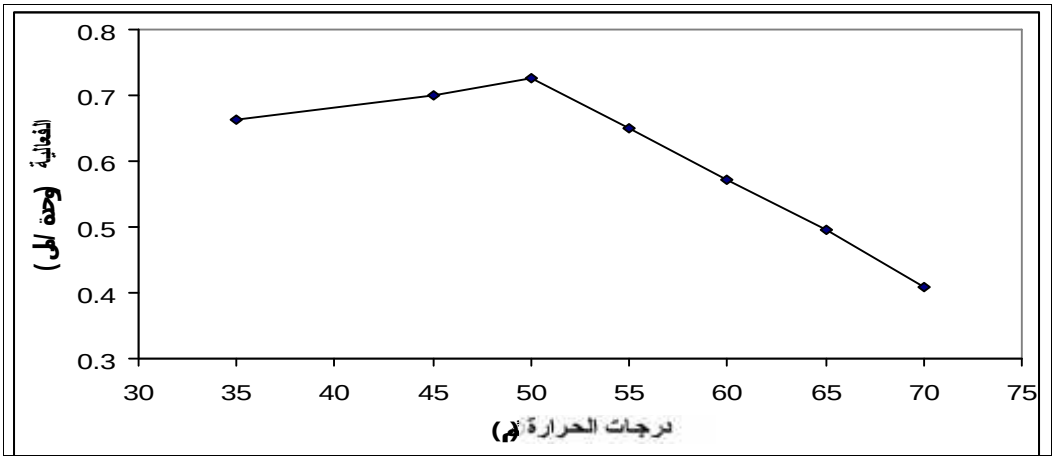


شكل3. منحنى الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات انزيم الفا-اميليز المنتج من البكتريا *B.licheniformis* R5

ويختلف تأثير الرقم الهيدروجيني في فعالية الانزيم عن الرقم الهيدروجيني في ثباته اذ ان تأثير الاول يظهر على حالة التأين لكامل مكونات محلول التفاعل من الانزيم والمادة الاساس والمرافقات الانزيمية ان وجدت فأن الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم يمثل الرقم الهيدروجيني الذي تكون عنده جميع مكونات التفاعل في افضل حالة ايونية ولاسيما الاحماض الامينية الموجودة في الموقع الفعال من الانزيم مما يدفع بالتفاعل الى الامام بمعدلات عالية ، اما تأثير الثاني فيظهر في الانزيم وحده وينعكس عليه من خلال تغيير شكله الفراغي جراء تغيير عدد من الاواصر المثبتة للتركيب الثانوي والثالثي Whitaker & Segel , 1976 ; Bernhard , 1972] ;دلالي ، 1983 Crabb & Shetty , 1999 ; Nielsen et al., 2001 ; الدليمي ، 2002]. وهذا يعني ان الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم وثباته يختلف باختلاف تركيب الانزيم وشكله الفراغي ومكوناته من الاحماض الامينية ، ولاسيما تلك التي تشارك في التفاعل الانزيمي في الموقع الفعال وثابت تأين هذه الاحماض . من هنا يبين اختلاف انزيم الفا- اميليز من المصادر المختلفة في كل من الرقم الهيدروجيني الامثل لفعاليته وثباته .

درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم وثباته

أُجري التفاعل الانزيمي بدرجات حرارة تراوحت بين (35 – 70)° م وأظهرت النتائج (الشكل 4) إزدياد الفعالية بزيادة درجة الحرارة والتي بلغت أقصاها في 50°م ثم حصول إنخفاض في الفعالية بزيادة درجة الحرارة وصولاً الى 70°م يرجع سبب الزيادة في سرعة التفاعلات الانزيمية بارتفاع درجة الحرارة الى زيادة التصادمات بين جزيئات الانزيم وجزيئات المادة الاساس بفعل زيادة الطاقة الحركية للجزيئات في درجات الحرارة العالية , Segel] 1976] أما إنخفاض فعالية الانزيم في درجات الحرارة العالية خلاف درجات الحرارة المثلى فقد يكون ناجماً عن تغييرالتركيب الثلاثي للانزيم مع إحتمال حصول مسخ Denaturation فيه مما يسبب تغيراً في الموقع الفعال للانزيم وفقدان فعاليته بالكامل [دلالي ، 1983].

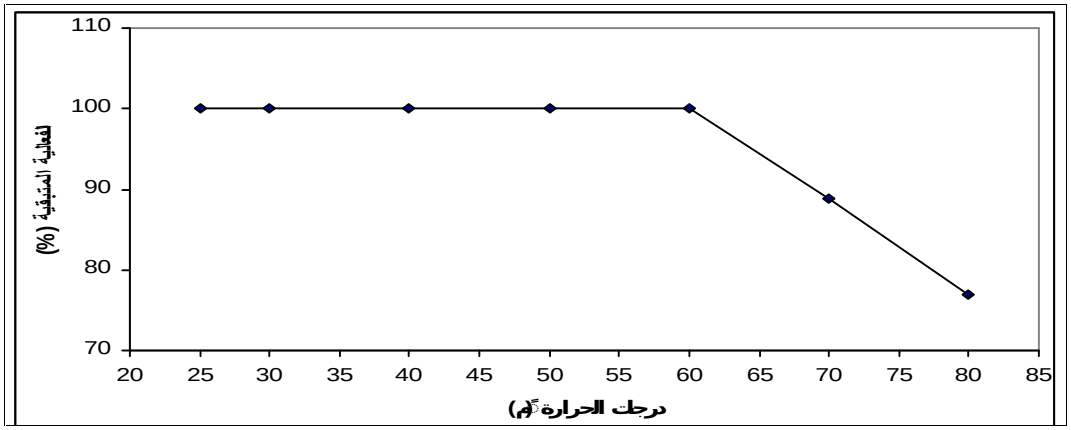


شكل 4. منحنى درجة الحرارة المثلى لفعالية انزيم الفا-اميليز المنتج من البكتريا *B.licheniformis* R5

اما النتائج الموضحة في الشكل (5) فتمثل الثبات الحراري للانزيم مابين 25°م الى 80°م اذ يلاحظ ان الانزيم احتفظ بكامل فعاليته عند معاملته بدرجات الحرارة من 25°م الى 60°م وبحوالي 87.5% من فعاليته الاصلية عند معاملته في 70°م لكنه لم يحتفظ الا بحوالي 72.5% من فعاليته عند 80°م .

ذكر ان درجة الحرارة المثلى لانزيم الفا – اميليز من مصادرة الميكروبية تتراوح بين 30°م الى 95°م وغالباً ما تتميز الانزيمات التي

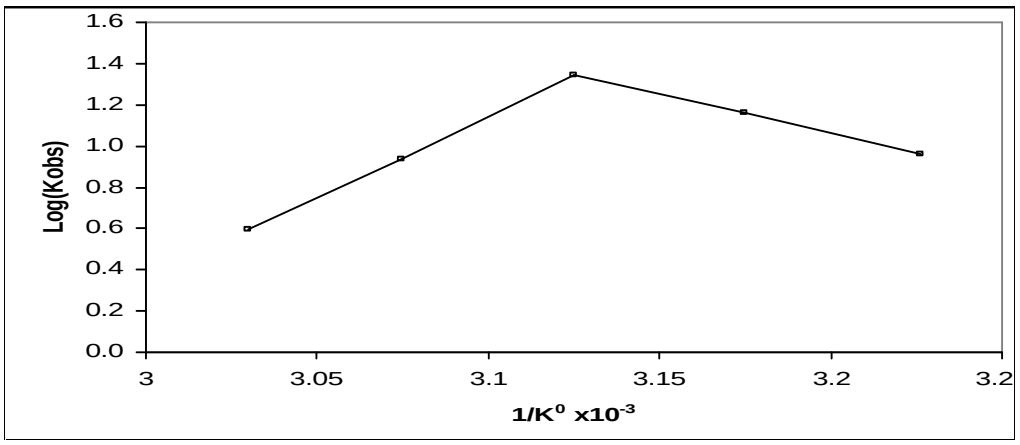
تملك درجة حرارة مثلى عالية بثباتها الحراري العالي [Kirshnan & Bolton, *et al*., 1997; Hagihara, *et al*., 2001] . ويعد التحري عن انزيم الفا – اميليز بثبات حراري عال احد الاهداف المهمة التي توختها العديد من الدراسات ذلك لان مثل هذه الانزيمات غالباً ما تستعمل في ظروف حرارة عالية [Chiang, *et al*., 1979 ; Anderson, *et al* ., 1983 ; Crueger and Crueger , 1989 ; Kock, 1991 ; *et al*., 1999 ; Marchal, *et al*.]. ويشير [Lin, *et al*., 1998] الى ثمانية انواع من البكتريا التابعة لجنس *Bacillus* تنتج انزيم الفا – اميليز تتراوح حدود درجة حرارته المثلى ما بين 63 – 90 ْم. اشار(Pandey, *et al*., 2000)الى احد عشر نوعاً من البكتريا التابعة الى الجنس نفسه تنتج انزيم الفا – اميليز تتراوح حدود درجة حرارته المثلى ما بين 50 –90 ْم بينها اثنان من بكتريا *B. licheniformis* بخواص مختلفة تماماً بما في ذلك درجة الحرارة المثلى اذ تبلغ 50 ْم للانزيم المنتج من احدهما و 90 ْم للانزيم من البكتريا الثانية.



الشكل (5): الثبات الحراري لانزيم الفا-اميليز المنتج من البكتريا *B.licheniformis* R5

طاقة التنشيط

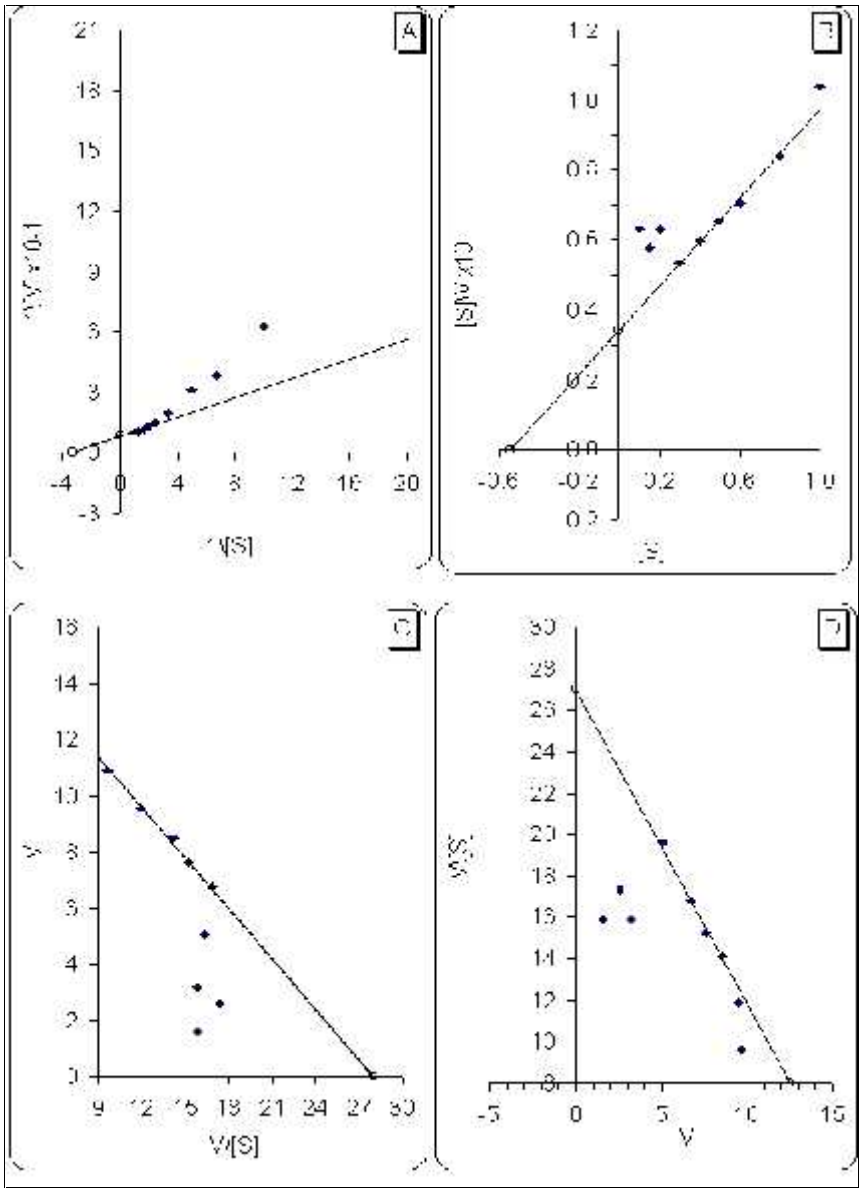
تم حساب طاقة التنشيط والتي تعرف بأنها اقل كمية من الطاقة اللازمة لتحويل المادة الاساس (النشأ) الى نواتج بفعل الانزيم [Whitaker , 1972] فضلاً عن حساب طاقة التنشيط لمسخ الانزيم وذلك من العلاقة بين لوغاريتم ثابت سرعة التفاعل ومقلوب درجة الحرارة المطلقة طبقاً لمعادلة ارينيوس وكماهو موضح في الشكل (6). فوجد ان طاقة التنشيط للتفاعل الانزيمي تبلغ 17,5 كيلوسعرة / مول وتقع هذه القيمة ضمن مدى طاقة التنشيط لمعظم التفاعلات الانزيمية والتي تتراوح بين 2.5 – 168 كيلو سعرة / مول [Whitaker , 1972]. اما طاقة التنشيط لمسخ الانزيم فكانت 64,1 كيلو سعرة / مول وتعطي هذه القيمة فكرة عن مدى ثباتية الانزيم بدرجات الحرارة العالية فكلما كانت هذه القيمة عالية كان الانزيم اكثر ثباتاً تجاه الحرارة وتتراوح قيمة طاقة التنشيط لمسخ الانزيم لمعظم التفاعلات الانزيمية بين 40 – 150 كيلو سعرة / مول [White, *et al*., 1973]لذلك يمكن عد انزيم الفا – اميليز قيد الدراسة من الانزيمات المقاومة لدرجات الحرارة العالية الى حد ما. ونادرة هي الدراسات التي اشارت الى طاقة تنشيط التفاعل لانزيم الفا – اميليز من الاحياء المجهرية عموماً ومن البكتريا خصوصاً فقد وجد Krishnan & Chandra, (1983)ان طاقة التنشيط لانزيم الفا – اميليز من سلالة من البكتريا *B. licheniformis* تبلغ 510 كيلوسعرة / مول. اما Yoshigi, *et al*., (1985) فقد قدر طاقة التنشيط لانزيم الفا – اميليز من البكتريا *B. cereus* بحوالي 41 كيلوسعرة / مول. وبشكل عام تتباين طاقة التنشيط للانزيمات المختلفة باختلاف مصادرها وتركيبها وطبيعة التفاعلات التي تسهم فيها [Segel , 1976 ; الدليمي ، 2002].



شكل6. منحنى ارينيوس لتقدير طاقة التنشيط لانزيم الفا-اميليز المنتج من البكتريا *B.licheniformis R5*

الثوابت الحركية للانزيم

اتبعت اربع معا دلات لاحتساب الثوابت الحركية لانزيم الفا – اميليز المنتج في هذه الدراسة والمتمثلة بكل من السرعة القصوى Vmax وثابت ميكاليس Km تجاه ثلاث مواد اساس هي النشأ والكلايكوجين والاميلوز . ويوضح الشكل (7) هذه الطرائق تجاه النشأ فقط . اما الجدول (1) فيوضح قيم Vmax و Km للانزيم تجاه المواد الثلاثة والمحسوبة بالطرائق الاربعة ومعدلات هذه القيم ، اذ يلاحظ ان معدلات قيم السرعة القصوى للانزيم تجاه المواد الاساس النشأ والكلايكوجين والاميلوز هي 13,22 ، 9,84 ، 7,78 مايكرومول / دقيقة وعلى التوالي . اما قيم ثابت ميكالس فهي 0,44 ، 0,43 و 0,28% وعلى التوالي ايضاً . ولما كان ثابت ميكالس يعبر عن الفة الانزيم تجاه المادة الاساس وانه كلما كانت قيمة ثابت ميكالس واطئة كلما كانت الفة الانزيم تجاه المادة الاساس عالية (Segel , 1976). عليه يمكن القول ان الفة الانزيم تجاه الاميلوز اكبر مقارنة مع النشأ والكلايكوجين.



شكل7. شكل الثوابت الحركية لانزيم الفا-اميليز المنتج من البكتريا *B.licheniformis* R5 تجاه المادة الاساس (النشأ)

A- LBP = Line weaver – Burk Reciprocal plot
B-HWP = Hance – Woolf Plot
C-WAHP = Woolf – Augustinsson – Hofstee Plot
D- ESP = Eadie – Scatchard Plot.

جدول 1. الثوابت الحركية لانزيم الفا – اميليز من البكتريا *B. licheniformis* R5 تجاه ثلاثة انواع من المواد الاساس

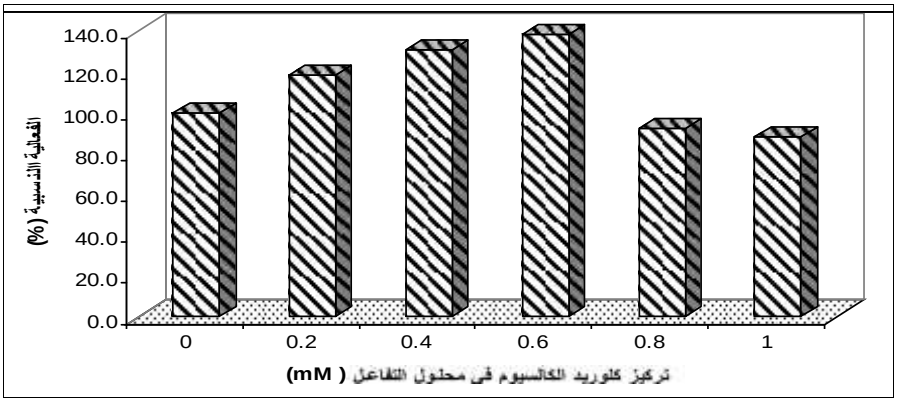
المادة الاساس	معادلة الحساب	(%) Km	Vmax mM / min
النشأ Starch	LBP	0.33	12.50
	HWP	0.54	15.88
	WAHP	0.43	12.00
	ESP	0.46	12.50
المعدل		0.44	13.22
الكلايكوجين Glycogen	LBP	0.38	9.00
	HWP	0.41	0.64
	WAHP	0.43	10.00
	ESP	0.49	10.70
المعدل		0.43	9.84
الاميلوز Amylose	LBP	0.25	7.69
	HWP	0.36	8.03
	WAHP	0.27	7.80
	ESP	0.25	7.60
المعدل		0.28	7.78

تتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه (Sakano, *et al.*, 1982)من ان قيمة ثابت ميكالس لانزيم الفا – اميليز من البكتريا *P. stutzeri* تجاه الاميلوز اصغر مقارنةً مع النشأ والكلايكوجين اذ قدر بحوالي 0,4 ملي مولار تجاه الاميلوز و 1,6 و 1,2 ملي مولار تجاه النشأ والكلايكوجين وعلى التوالي. توصل Yoshigi, *et al.*, (1985)الى نتيجة مقاربة اذ وجدوا ان الانزيم نفسه من البكتريا *B. cereus* يملك الفة اكبر تجاه الاميلوز مقارنةً مع الكلايكوجين والنشأ وذلك بدلالة ثابت ميكالس ، غير ان Chung, *et al.*, (1995)وجدوا ان الانزيم من *Archaeon Thermococcus Profundus* DT5432 يمتلك الفة اكبر تجاه الكلايكوجين والاميلوبكتين والاميلوز والنشأ بدلالة ثابت ميكالس التي بلغت قيمتها 0,05 ، 0,13 ، 0,47 ، 0,23% على التوالي وكانت السرعة القصوى للانزيم 9,6 و 12,2 و 9,4 و 9,4 ميكرومول / دقيقة للمواد الاساس المذكورة وعلى التوالي. ويذكر ان اختلاف الفة عمل الانزيم على المواد الثلاثة يعزى الى اختلاف التركيب الكيميائي لها ، اذ ان النشأ يتألف من الاميلوز وبنسبة 20-30% والاميلوبكتين وبنسبة 70-80% وان جزيئات الاميلوز تتألف من سلسلة مستقيمة من وحدات الكلوكوز المرتبطة مع بعضها عبر اواصر 1,4– α اما جزيئات الاميلوبكتين فهي متفرعة عبر اواصر 1,6- α . اما الكلايكوجين فيتميز بكونه يشبه الاميلوبكتين الى حد كبير لكن مصدره حيواني [Pandey, *et al.*, ; Sano, *et al.*,1985; 2000 . ولا يقتصر مهاجمة انزيم الفا – اميليز على هذه المواد وحدها بل يشتمل على جميع السكريات المعقدة او المتعددة Oligosaccharides التي تتألف من وحدات من الكلوكوز ترتبط مع بعضها بأواصر من نوع 1,4–α [Pandey, *et al.*, 2000 ; Nielsen, *et al.*, 2001 ; الدليمي ، 2002].

تأثير كلوريد الكالسيوم في فعالية الانزيم وثباته الحراري

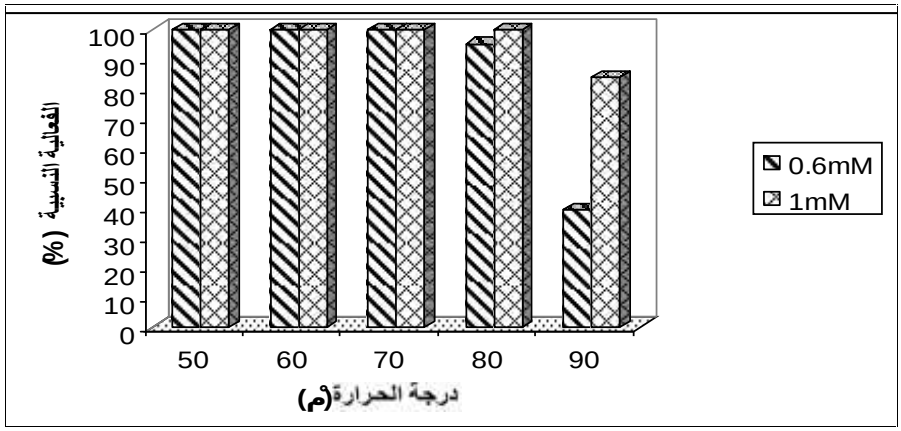
يوضح الشكل (8) تأثير كلوريد الكالسيوم في فعالية انزيم الفا – اميليز المنتج من البكتريا *B. licheniformis* R5 بتراكيز تراوحت بين 0 – 1,0 ملي مولار في وسط التفاعل اذ تلاحظ زيادة الفعالية بزيادة تركيز كلوريد الكالسيوم من 0 الى 0,6 ملي مولار فبلغت 138.8% من

فعاليته بغياب كلوريد الكالسيوم وعادت فعالية الانزيم الى الانخفاض بزيادة تركيز كلوريد الكالسيوم في وسط التفاعل اذ بلغت 88.3% من فعاليته الاصلية عند التركيز 1,0 مولار.



شكل 8.تأثير كلوريد الكالسيوم في فعالية أنزيم الفا-اميليز المنتج من البكتريا *B.licheniformis* R5

ويوضح الشكل (9) الثبات الحراري للانزيم بوجود تركيزين من كلوريد الكالسيوم هما 0,6 و 1,0 ملي مولار وبدرجات حرارة تراوحت بين 50 – 90ْم . ويلاحظ من الشكل ان الانزيم يحتفظ بكامل فعاليته بين درجتي الحرارة 50ْم الى 70ْم وبحوالي 95,3% و 39,5% من فعاليته عند معاملته في 80ْم و 90ْم على التوالي بوجود 0,6 ملي مولار من كلوريد الكالسيوم على ان زيادة تركيز كلوريد الكالسيوم الى 1,0 ملي مولار قد سبب زيادة في ثباتية الانزيم تجاه المعاملات الحرارية فأحتفظ بفعاليته على نحو كامل حتى 80ْم وانه لم يفقد الا ما يصل على 16,0% عند معاملته في 90ْم.



شكل 9. الثبات الحراري لأنزيم الفا-اميليز بوجود كلوريد الكالسيوم بتركيز 0.6 و 1.0 mM

وبمقارنة هذه النتائج مع ثبات الانزيم بغياب كلوريد الكالسيوم والذي لم يتجاوز 60ْم (الشكل5) يلاحظ ان وجود كلوريد الكالسيوم وبتركيز 1,0 ملي مولار مع الانزيم قد سبب زيادة الثبات الحراري للانزيم الى 80ْم مع احتفاظه بحوالي 84,0% من فعاليته في 90ْم .

وتأتي هذه النتائج متوافقة مع جميع الدراسات التي تناولت انزيم الفا – اميليز والتي اكدت ان ايونات الكالسيوم ترفع من الثبات الحراري للانزيم مثلما تؤثرفي فعاليته على نحو ايجابي [Nonaka, ; Savchenco, *et al*., 2002] .*et al*., 2003

ويمكن الاشارة الى ان (Lin, *et al*., 1998)قد لاحظوا ان الفعالية الحرارية Thermoactivity لانزيم الفا – اميليز المنتج من البكتريا *Bacillus sp*. يمكن ان تقاس في 90ْم بوجود 5 ملي مولار من ايونات الكالسيوم Ca^{+2} بدلاً من 70ْم وهي درجة الحرارة المثلى للانزيم بغياب ايونات الكالسيوم . وان (Cha & Yu , 1993)قد وجدا ان الانزيم من سلالة من البكتريا *B. licheniformis* يحتفظ على مدى من درجات الحرارة بين 40ْم الى 80ْم بوجود 1.0 ملي مولار من ايونات الكالسيوم وانه لا يفقد سوى 25% من فعاليته في 90ْم بوجود هذه الايونات.

المصادر

الدليمي ، خلف صوفي داود. 2002. الانزيمات الميكروبية والتقانات الحيوية. جامعة فيلادلفيا – الاردن.

الصفار ، منتهى عبدالكريم . 1998. انتاج انزيم الفا – اميليز من *Bacillus stearothermophilus* MAG3 بواسطة تخمرات الحالة الصلبة وتنقيته. رسالة ماجستير- كلية العلوم- جامعة بغداد.

حكمت ، امين داوود سلمان. 1982. انتاج انزيم الفا – اميليز بواسطة *Bacillus subtilis*. رسالة ماجستير- كلية الزراعة – جامعة بغداد.

دلالي ، باسل كامل . 1983. الانزيمات في التصنيع الغذائي .(ترجمة) : دار الكتب للطباعة والنشر. جامعة الموصل.

محي الدين ، محمد عمر ؛ هوشيار ، دانا فائق ؛ عمر ، عبدالكريم مفتاح. 1989. التحري عن انزيم الفا – اميليز المقاوم للحرارة في عزلات محلية من *Bacillus sp*. .. مجلة العلوم التطبيقية. 1 (3) : 73-86. قسم علوم الحياة - كلية العلوم – جامعة صلاح الدين.

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

Anderson, J.E.; Adams, D.M.; and Walter, J.D. M. 1983. Conditions under which Bacteria Amylases survive ultrahigh temperature sterilization. Journal of Food Sci. 48: 1622-1625.

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

Bolton, D.J.; Kelly, C.T.; and Fogarty, W.M. 1997. Purification and characterization of the amylase from *Bacillus flavothermus*. Enz. Microbial Technol. 20: 340-343.

Crabb, W.D.; and Shetty, J.K. 1999. Commodity scale production of sugers from starches. Current Option in Microbiology. 2: 252-256.

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

Chiang, J.P.; Alter, J.E.; and Sternberg, M. 1979. Purification and characterization of athermostable alpha – amylase from *Bacillus licheniformis*. Starke. 31 (3): 86-92.

Kock, R.; Spreinat, A.; Lemke, K.; and Antranikian, G. 1991. Purification and properties of a hyperthermoactive amylase from the archaebacterium *Pyrococcus woesei*. Arch. Microbial. 155: 572-578.

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

Marchal , L.M. ; Vandelaar , A.M.J. ; Goetheer , E. ; Pennink , E.B. S. ; Bergsma , J. ; Beeftink , H.H. ; and Trampers , J. 1999. Effect of temperature on the saccharide composition obtained after α -amylolysis of starch. Biotechnology and Bioengineering. 63 (3): 344-355.

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

Nonaka , T. ; Fujihashi , M. ; Kito , A. ; Hagahara , H. ; Ozaki , K. ; Ito , S. and Miki , K. 2003. Crystal structure of calcium. Free α -amylase from *Bacillus sp*. strain KSM-K38 (Amy K38) and its Sodium on binding sites. J. Biol. Chem. 278 (27): 24818 –24824

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

Chung , Y. C. ; Kobayashi , T. ; Kanal , H. ; Akiba , T. ; and Kudo , T. 1995. Purification and Properties of extracellular amylase from the hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus profundus* DT5432. Appl. Environ. Microbial. 61 (4): 1502-1506.

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

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

Hagihara , H. ; Igarashi , K. ; Hayashi , Y. ; Endo , K. ; Kitayuma , K. ; Ozak , K. ; Kawa , O. ; and Ito , S. 2001. Noval Reagents and chemical oxidants from the alkaliphilic *Bacillus* isolate KSM. K38. Applied and Environmental Microbiology. 67 (4): 1744-1750.

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

Krishnan, T.; and Chandra, A.K. 1983. Purification and characterization of amylase from *Bacillus lichenifermis* CUMC 305. Appl. Envron. Microbial. 46 (2): 430-437.

Calcium and Zinc. Biochemistry. 41 (19): 6193-6201.

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

Schumann, J.; Wrba, A.; Jaenicke, R.; and Stetter, K.O. 1991. Topogriaphical and enzymatic characterization of amylase from the extremely thermophilic eubacterium *Thermotoga maritima*. FEBS Lett. 282: 122-126.

Segel, I.H. 1976. Biochemical calculations. 2nd edition, John and sons. Inc. New York.

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

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

Whitaker, J.R.; and Bernhard, R.A. 1972. Experiment for introduction to enzymology. The wiber press Davis.

White, A.; Handler, P.; and Smith, E. 1973. Principles of Biochemistry. McGraw- Hill Book Company Publication, New York.

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

Plumel, M. 1949. General methods for handling proteins and Enzymes. Bull. Soc. Chim. Biol. 30: 129.

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

Rivera, H.; Hunguia, A.L.; Soberon, X.; and Rincon, G. S. 2003. α–amylase from *Bacillus licheniformis* mutants near to the catalytic site: effects on hydrolytic and transglycosylation site: effects on hydrolytic and transglycosylation activity. Protein Engineering 16 (7): 505-514.

Saito, N. 1973. A Thermophilic extracellular α-amylase from *Bacillus licheniformis*. Archives of Biochemistry and Biophysics. 155: 290-298.

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

Sano, M.; Sakano, Y.; and Kobayashi, T. 1985. Subsite structure and action mode of the α-amylase from *Thermoactinomyces vulgaris*. Agric. Biol. Chem. 49 (10): 2843-2846.

Savchenko, A.; Vielle, C.; Kang, S.; and Zeikus, J.G. 2002. *Pyrococcus furiosus* α - amylase is stabilized by

Characterization of α- Amylase Produced from a Local Isolate of *Bacillus licheniformis* R5

Rana Abdullah Hussein Mohammed O.Muhyaddin
College of agriculture / University of Al-Qadisiyah

Abstract:

This research is conducted at the College of Agriculture, University of Baghdad in 2004. The characterization of the purified enzyme shows that the molecular weight of the enzyme produced from the bacteria is 56.000 Daltons as it was determined by gel filtration on Sephacryl S- 200 column and the pH of the enzyme activity is 8.0 but the enzyme is more stable at pH range between 7.0 – 9.0, also the optimum temperature of the enzyme activity was 50°C at the optimum pH stability. The activation energy of the converted substrate (starch) of products was 17.500 cal \ mole while the activation energy of the denaturized enzyme is 64.000 cal \ mole.

The Kinetic studies show that the Michaels constant (Km) values of the enzyme using starch, glycogen and amylose as substrates are 0.44 mM, 0.43 mM and 0.28 mM respectively, revealing that the enzyme has a highest affinity to amylose in comparison with starch and glycogen , It was also found that the addition of calcium chloride to the reaction mixture increase the enzyme activity by 138.8% (Conc. of 0.6 mM) , also by measuring the thermo stability of the enzyme in the presence of calcium chloride with a concentration of (0.6 mM and 1.0mM) at (70 – 80)°C , the enzyme has kept its total activity at 70°C and 95.3% of its activity in the presence of 0.6 mM of calcium chloride and 100% in the presence of 1.0 mM at 80°C .

keywords : Characterization of α- Amylase , Local Isolate , *Bacillus licheniformis R5*

The search is part of MSc of 2nd author .