Zagazig J. Agric. Res., Vol. 39 No. (6) 2012 1185-1197

Zagazig Journal of Agricultural Research

www.zu.edu.eg/agr/journals

دراسة العوامل المؤثرة في إنتاج أنزيم ألفا-اميليز من عزلات محلية من بكتيريا الـ *Bacillus*

إيثار زكي ناجي* - أغاريد علي حسين - محمد أحمد جاسم

قسم علوم الأغذية - كلية الزراعة - جامعة تكريت – محافظة صلاح الدين – العراق

الملخص

تم الحصول على 26 عزلة من البكتيريا المتحملة للحرارة والمحللة للنشا من جنس *Bacillus* من مجموع 68 عينة من ترب مختلفة أخذت من مدينة تكريت/محافظة صلاح الدين. أخضعت هذه العزلات لعمليتي الغربلة الأولية والثانوية لإنتقاء العزلة الأكفأ انتاجاً لأنزيم ألفا- أميليز، فتبين من نتائج العمليتين أن العزلة E3 هي أكفأ تلك العزلات (5.53 وحدة/ملجم)، وأظهرت فحوص التشخيص أن العزلة المنتخبة تعود إلى البكتيريا *Bacillus cereus*. ثبت من خلال الدراسة أن الظروف المثلى لإنتاج أنزيم ألفا - أميليز من هذه العزلة المنتخبة بطريقة المزارع المغمورة تتمثل باستعمال 30 مل من بيئة الإنتاج حيث أعطت أعلى قيمة للفعالية النوعية بلغت 5.32 وحدة/ملجم بالمقارنة مع النسب التي تراوحت بين 15- 55 مل المستخدمة في التجربة والتي بلغت فيها الفعالية النوعية القيم 1.27 ، 3.60 ، 4.03 ، 4.20 ، 3.98 ، 2.54 و2.13 وحدة/ ملجم على التوالي، كما أن استخدام نسبة لقاح 3% هي الأفضل في الإنتاج (4.92 وحدة/ملجم) في حين أعطت النسب الأخرى (1- 8%) فعالية نوعية بلغت 2.62 و2.92 و4.11 و3.43 و 2.55 و 2.08 و1.72 وحدة/ ملجم على التوالي. ولوحظ زيادة كفاءة الإنتاج بزيادة وقت التحضين من 8 إلى 24 ساعة، حيث أصبحت 1.36 ثم 4.54 و 5.88 وحدة/ ملجم على التوالي مع ملاحظة انخفاضها تدريجياً وبصورة بسيطة بعد زيادة الوقت عن 24 ساعة حيث وصلت إلى 5.66و4.32 و3.74 وحدة/ ملجم في الأوقات 32 ، 40 ، 48 ساعة على التوالي. أما تأثير درجة حرارة التحضين فقد أثبتت درجة 40°م تميزها في هذا المجال (5.83 وحدة/ ملجم) بالمقارنة مع درجات الحرارة الأخرى المستخدمة في الدراسة، وأن الرقم الهيدروجيني الأفضل لفعالية الإنزيم الخام المنتج بالظروف المحددة هو 7 .

الكلمات الاسترشادية : ألفا-أميليز، المزارع المغمورة ، *Bacillus cereus*.

المقدمة

يحتل إنتاج الأنزيمات الميكروبية مساحة واسعة من عالم التقنية الإحيائية ولاسيما الأنزيمات التي لها استعمالات صناعية وطبية وغذائية وفي مقدمتها الأنزيمات المحللة مائياً hydrolysis ومنها إنزيمات الأميليز، وأحد هذه الأنزيمات هو ألفا-أميليز (E.C.3.2.1.1.) (endo-1,4-α-D-glucan glucanohydrolase وهو من الأنزيمات التي تعمل داخلياً وبصوره عشوائية على الروابط الجلوكوزيدية ألفا 1,4 الرابطة بين وحدات الجلوكوز المكونة للنشا والمواد المشابهة Calik and Ozdamar, 2001; Pandey *et al.*, 2000; Bordbar *et al.*, 2005 وأيضا (Asgher *et al.*, 2007).

أثبتت الدراسات السابقة إمكانية إنتاج إنزيم ألفا-أميليز من البكتيريا إضافة إلى وجوده في النباتات والحيوانات (Kathiresan and Manivannan, 2006)، حيث شخص نوعان منها في الأحياء المجهرية هما ألفا-أميليز وجلوكو-أميليز. وتمثل الاميليزات حوالي 25- 30% من سوق إنتاج الانزيمات (Rao *et al.*, 1998; Sidhu *et al.*, 1997; Van der Maarel *et al.*, 2002; Burhan *et al.*, 2003; Sivaramakrishnan *et al.*, 2006 وSudharhsan *et al.*, 2007). ويعد أنزيم ألفا-أميليز من أكثرها استثماراً في الصناعة (Babu and Satyanarayana, 1993)، وتختلف أنواعه المنتجة لما لها من تطبيقات صناعية وغذائية وعلى درجة عالية من التنوع، حيث تعددت تطبيقات استخدامه، منها ما كان في المجالات السريرية والطبية أو الكيمياء التحليلية، فبالإضافة إلى استخدامه في تحليل النشا لإنتاج شراب كل من الجلوكوز والفركتوز، وجد له استخدامات في تحسين نوعية الخبز وإنتاج إيثانول الوقود وفي صناعة الورق والمنسوجات وفي صناعة المساحيق ومواد التنظيف سواء المستعملة منها في غسل الأواني أو الملابس وفي صناعة التقطير (Hendriksen *et al.*, 1999; Ohdan *et al.*, 2000; Lim *et al.*, 2003; Ramachandran *et al.*, 2004; Anto *et al.*, 2006; Gangadharan *et al.*, 2006 as well as Nusrat and rahman, 2007)، وقد أدت هذه الاستخدامات المختلفة إلى زيادة الطلب على هذا الإنزيم

* **Corresponding author: Tel.** : +9647702538027
E-mail address: etze_957@yahoo.com

وكذلك البحث عن طرق لإنتاجه. وحاليا تم الاستعاضة عن التحلل الحامضي بالتحلل الانزيمي في حوالي 75% من عمليات تحلل النشا، وذلك يعود الى فوائد عدة منها رفع كفاءة الإنتاج (Pandey *et al.*, 2000; Kandra, 2003 and Nusrat and Rahman, 2007)، إضافة إلى خصوصية التفاعل وثبات المنتج وانخفاض الطاقة المطلوبة وتحديد معاملات المعادلة المستخدمة (Satyanarayana *et al.*, 2005)، ونظراً لهذا فإن هنالك توجهات نحو تطوير إنتاج إنزيمات بمواصفات خاصة تمكن من استخدامها في صناعات عدة (Burhan *et al.*, 2003 و Sivaramakrishnan *et al.*, 2006).

يتميز إنتاج الإنزيمات من الأحياء المجهرية بمجموعة سمات تفتقر إليها إنتاجها من مصادرها الطبيعية النباتية أو الحيوانية الأخرى، منها تدنى كلفة الإنتاج وإمكانية استغلال بعض المواد الأولية فى تنمية الأحياء المجهرية لتخليص البيئة من المشاكل التى تسببها هذه المواد، فضلاً عن إمكانية الحصول على إنزيمات بمواصفات نوعية خاصة قد لا تتوفر في غيرها كالإنزيمات المتحملة للحرارة العالية أو الإنزيمات التى تعمل فى أرقام هيدروجينية متطرفة أو الإنزيمات التى لا تتأثر ببعض المثبطات (Hagihara *et al.*, 2001; Suvd *et al.*, 2001 and Nonaka *et al.*, 2003). وقد درس استخدام الأحياء المجهرية مثال الفطريات والبكتيريا والخمائر لإنتاج هذا الإنزيم (Ivanova *et al.*, 2001) مع هذا فإن الإنزيم المنتج من المصادر البكتيرية والفطريات قد وجد مجالات واسعة للإستخدام فى الصناعة (Pandey *et al.*, 2000)، كما أثبتت أنواع الـ *Bacillus* التى تتحمل الحرارة والمعزولة من التربة (Niaz *et al.*, 2010; Reilly, 1991) بأنها الأفضل فى هذا المجال باستخدام طريقة الأوساط المغمورة الهزازة (Mamo and Gessesse, 1999).

إن إنتاج إنزيم ألفا-أميليز من الأحياء المجهرية يتأثر بعوامل عدة أهمها السلالة وتركيب الوسط وطريقة التنمية والمتطلبات الغذائية لنمو الخلايا والأيونات المعدنية والرقم الهيدروجيني ودرجة الحرارة والوقت اللازم للتحضين أو التنمية إضافة إلى تحمل هذه الأحياء للحرارة، كما أن أى من التطبيقات المنفذة للإنزيم المنتج تحتاج إلى خواص أو صفات فريدة مع مراعاة للتخصص والثباتية ودرجات الحرارة المثلى والرقم الهيدروجيني (McTigue *et al.*, 1995)، وعليه فإن عزل الأحياء المجهرية المتميزه يمكن أن تجهز أو تمكن من إكتشاف أميليزات جديدة وغير مألوفة ملائمة في تطبيقات صناعية جديدة (Gupta *et al.*, 2003; Wanderley *et al.*, 2004 and Asgher *et al.*, 2007).

ونظراً للإستعمالات المتنوعة لإنزيم ألفا-أميليز والتى تتطلب وجود خواص محددة فيه، وحسب مجال الاستعمال، عليه فأن المحاولات مستمرة للحصول على هذا الإنزيم من عزلات جديدة من الأحياء المجهرية، وهذا كان الهدف من إجراء هذه الدراسة.

مواد وطرق البحث

عزل البكتريا المنتجة لأنزيمات الأميليز

مصدر العزلة

استعمل لهذا الغرض 68 عينة من ترب زراعية أخذت من مواقع مختلفة في مدينة تكريت/ محافظة صلاح الدين، جمهورية العراق بوزن 50 جرام لكل منها بإتباع الطريقة المقترحة من قبل (Oganmwongi *et al.*, 2008) وذلك بعد تحديد المنطقة الزراعية المراد أخذ النماذج منها وبمساحة (5 x 5 cm) ثم أخذ النماذج منها بعمق 7.5 cm بواسطة مجرفة، بعدها وضعت نماذج التربة فى أكياس من البولي اثيلين وخزنت على درجة 4°م لحين الاستخدام.

طريقة العزل

اعتمدت طريقة العزل على الطريقة التى أوضحها (Devi *et al.*, 2010)، حيث أجريت تخفيفات عشرية لنماذج التربة في ماء البپتون Peptone water عن طريق إضافة 10 جرام من التربة إلى 90 مل من المحلول الفسيولوجي واجراء عدة تخفيفات (10^{-2} - 10^{-5}) ثم معاملتها بالحرارة 65°م لمدة 20 دقيقة بناءًا على ما ذكره (Aslim *et al.*, 2002) حيث تؤدي هذه المعاملة إلى القضاء على جميع الخلايا الخضرية الحساسة للحرارة مع المحافظة على جراثيم جنس *Bacillus* مما يسهل عملية العزل، وبعد التبريد نشر 0.1 مل من التخفيفات المناسبة على سطح وسط الآجار المغذي المحتوي على النشا في أطباق بتري وحضنت الأطباق على 37°م لمدة 24 ساعة. نقلت بعدها المستعمرات المتميزة فى نموها إلى الوسط نفسه بالتخطيط لاختبار مقدرة البكتيريا على تحليل النشا بوضع بضع قطرات من محلول اليود حول منطقة النمو على الوسط وملاحظة تكون هالة شفافة حول النمو دلالة على تحلل النشا ثم قيس قطر النمو وقطر منطقة التحلل لكل عزلة لاحتساب قدرة العزلات على تحليل النشا حسب الطريقة الموضحة بواسطة (Nusrat and Rahman, 2007) وذلك حسب المعادلة الآتية :

$$\text{كفاءة إنتاج العزلات للإنزيمات المحللة للنشا} = \frac{\text{قطر منطقة التحلل}}{\text{قطر منطقة النمو}}$$

تم اختيار العزلات المتميزة فى إنتاج الإنزيم والتي اشتملت على 7 عزلات وتقدير كفاءتها في إنتاج أنزيم ألفا-أميليز اعتماداً على الطريقة الموضحة من قبل (Nusrat and Rahman, 2007) مع بعض التعديل وذلك عن طريق تنميتها في دوارق زجاجية بحجم 250 مل تحوى 50 مل من بيئة للإنتاج تتكون من (جرام / لتر) (15 Nutreint Broth; 10 Soluble starch; 2 NaCl; 1 KH_2PO_4; 2.5 K_2HPO_4; 2 $(NH_4)_2SO_4$; 0.2 $CaCl_2$; 0.5 $MgSO_4$) بعد تعديل الرقم الهيدروجيني إلى 7 ، باستخدام حاضنة هزازة بسرعة 160 – 180 دورة/ دقيقة عند درجة حرارة 37°م لمدة 48 ساعة، ثم رسبت البكتيريا بالطرد المركزي 10000 xg لمدة 20 دقيقة واعتبر الراشح المستخلص الخام للإنزيم.

تقدير فعالية إنزيم ألفا-أميليز

اتبعت الطريقة التى وصفها (Devi *et al.,* 2010) فـي تقـدير فعاليـة الإنـزيم باسـتعمال كاشـف DNSA (3,5-dinitrosalicylic acid reagent) إذ أضـيف 0.1 مل من المستخلص الإنزيمى من دون تخفيفه أو بعد تخفيفه حسب الحاجة إلى مزيج متكون من 0.5 مل من محلول المادة الأساس (1% محلول النشا) مع 0.4 مل من محلـول منظم مـن الفوسـفات Phosphate buffer في حمام مائي بحرارة 37°م مدة 10 دقائق. اضيف 1 مل من كاشـف DNSA لإيقاف التفاعل ثم وضـعت الأنابيب في حمـام مغلـي مـدة 5 دقـائق وبـردت مباشـرة بمـاء الصـنبور وأضـيف لكـل أنبوبـة 10 مـل مـن المـاء المقطـر وقيسـت الامتصـاصـية علـى 540 نـانومتر واسـتخرجت كميـة المـالتوز المتحـررة مـن المنحنى القياسي. وعرفت وحدة الفعاليـة (Unit) بأنهـا كميـة الانـزيم التـي تحـرر واحـد ميكرومول من السكريات المختزلة على صورة مالتوز في الدقيقة الواحدة تحت ظروف التجربة.

تقدير البروتين

قدر تركيز البروتين في المراحل المختلفة من الدراسـة استناداً الى طريقـة (Bradford, 1977) وذلك لحساب الفعالية النوعية والتي تم مـن خلالها اختيـار العزلـة الاكفأ والظروف الأمثل فى إنتاج الإنزيم.

تشخيص العزلة المنتخبة

الخواص المزرعية والفحص المجهري

درسـت خـواص المسـتعمرة المنتخبـة الناميـة مـن حيـث الشـكل والحجـم واللـون والحافـة علـى البيئـة. ثـم فحصـت الخلايـا البكتيريـة مجهريـاً مـن مـزارع بعمـر 24 سـاعة بصـبغها بصـبغة جـرام حسب طريقـة (Seely and Vandermark, 1981) لتحديد خواصها من حيث الشكل واستجابتها لصبغة جرام.

الاختبارات الفسيولوجية والكيميائية الحيوية

أجريت عدة اختبارات كيموحيوية تأكيدية اشتملت على الاختبـارات [(TSI) Triple Sugar Iron Test; (Indole) Indole Test; (Cimmon Citrate) Citrate utilization Test; (MR) Methyl Red Test; (VP) Voges-Proskauer Test].

إضافة إلى اختبارات تخمر السكريات والتى اشتملت على (Glucose; Arabinose; Raffinose; Mannitol; Xylose) واختبار قابلية النمو في نسبة (NaCl 7%)، كما أجرى اختبار قابلية العزلة على إنتاج إنزيم الليسيثنيز Lecithinase باستخدام Mannitol egg yolk agar تبعـا لطريقـة (Donvan, 1958). وتـم حفـظ المـزارع البكتيرية المنتجة للإنزيمـات المحللـة للنشـا فـى آجـار النشـا المائل (Starch agar slants) في37°م مـدة 24 سـاعة وحفظت في الثلاجة مع إعادة تنشيط المزارع عند الحاجة في وسط الآجار المغذي السائل لمدة 18- 24 ساعة على درجة 37°م.

تعيين الظروف المثلى لإنتاج الإنزيم

درس تأثير عوامل عدة لتعيين الظروف المثلى لإنتاج الإنزيم من العزلـة المحليـة *B. cereus* E3. ثم استخلص الإنزيم وقدرت فعاليته وتركيز البروتين واحتسبت الفعالية النوعية وفق المعادلة الآتية:

$$\text{الفعالية النوعية (وحدة/ ملجم)} = \frac{\text{فعالية الانزيم (وحدة / مل)}}{\text{تركيز البروتين (ملجم / مل)}}$$

تأثير حجم الوسط الزرعى فى فعالية إنتاج الإنزيم

تـم اسـتخدام حجـوم مختلفـة اشـتملـت علـى (15 ,20 ,25 ,30 ,35 ,40 ,45 ,50 ,55) مل من بيئة الإنتاج في تنمية العزلة المنتخبة.

تأثير حجم اللقاح فى فعالية إنتاج الإنزيم

استخدمت النسب (1 ، 2 ، 3 ، 4 ، 5 ، 6 ، 7 ، 8)% من اللقاح والإنتاج حسب الظروف المحددة.

تعيين زمن التخمر (مدة الحضانة) المثلى لإنتاج الإنزيم

حضـنت الـدوارق الحاويـة علـى بيئـة الإنتـاج بعـد تلقيحها عند درجـة 37°م علـى فتـرات زمنيـة اشـتملت علـى (8 ,16 ,24 ,32 ,40 ,48) ساعة.

تعيين درجة الحرارة المثلى لإنتاج الإنزيم

حضنت بيئة إنتاج الإنزيم المحضرة في ضـوء النتـائج التـي تمخضـت عنهـا التجـارب السـابقة بـدرجات حـرارة مختلفة تراوحت بين (30-55)°م لمدة 24 ساعة.

تعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم

حضر الإنزيم في ضوء النتائج التي تمخضت عنها التجارب السابقة، ثم حضرت محاليل (1% محلول النشا مع الإنزيم) في مدى من الأرقام الهيدروجينية تراوحت بين (4 - 9)، بعدها احتسبت الفعالية النوعية لتحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم.

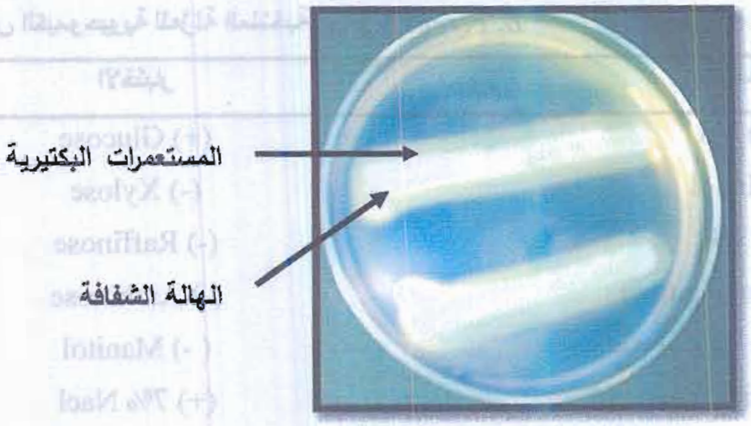
النتائج والمناقشة

تعد الأحياء المجهرية خزيناً لا ينضب لمختلف أنواع الإنزيمات، وتنتج هذه الإنزيمات بكميات تقدر بآلاف الأطنان سنوياً تحتل فيها الأميليزات المرتبة الأولى إلى جانب البروتيزات بل أن أول إنزيم تم إنتاجه تجارياً هو الأميليز(Crueger and Crueger, 1989)، وتعد انواع الـ *Bacillus* من أهم مصادر إنتاج هذا الإنزيم ومنها *Bacillus cereus* Nigam and Singh, 1996) وPandey *et al*., 2000)، على الرغم من أن أغلب الدراسات السابقة والمتوفرة تدور حول إنتاج بيتا-أميليز منها (Nanmori *et al.*, 1993 and Oyama *et al.*, 2003)، في حين هناك دراسات محدودة حول إنتاج إنزيم ألفا-أميليز (Anto *et al.*, 2006). لذا كانت هنالك محاولات عدة من أجل إنتخاب عزلات متميزة في إنتاجها لهذا الإنزيم، منها دراستنا هذه، حيث تم انتقاء 68 مستعمرة من البكتيريا المنتجة له والمتحملة للحرارة العالية من الترب التي جمعت من مناطق مختلفة من مدينة تكريت التابعة لمحافظة صلاح الدين وعلى بيئة الأجار المغذي المحتوى على النشا بنسبة 1% من بين عدد كبير من المستعمرات التي ظهرت على هذا الوسط عند تحضينها عند 37°م. ثم أخضعت العزلات البكتيرية التي تم إنتقائها من الخطوة السابقة إلى عملية غربلة أولية للتعرف على مقدرتها على تحليل النشا كدليل لإنتاج الإنزيمات فتم تخطيطها على وسط أجار النشا بشكل خط مستقيم وحضنت عند 37°م مدة 24 ساعة ويوضح الشكل 1 طبيعة هذا النمو والهالة الشفافة المتكونة حول النمو والتي اعتمدت في الغربلة الأولية لهذه العزلات على اساس كفاءتها في إفراز الأميليز اللازم لتحليل النشا.

ثم حسب كل من قطر منطقة النمو (G) وقطر منطقة تحلل النشا (Z) واستخرجت منها قيمة Z/G التي اعتبرت دليلاً على قابلية العزلات على إنتاج إنزيمات الأميليز وكفاءتها في تحليل النشا، وأظهرت 26 عزلة قابليتها على تحليل النشا وتكون هالة شفافة واضحة حول منطقة النمو. ويوضح جدول 1 كفاءة العزلات على إنتاج إنزيمات الأميليز بدلالة قيمة Z/G. ويلاحظ من الجدول تباين هذه العزلات في تحليل النشا تبايناً واضحاً مع تميز سبعة عزلات منها وهي العزلات المرقمة (1، 6 ، 7 ، 14 ، 16 ، 17 و 18) والتي تراوحت كفاءتها في تحليل النشا ما بين 2.50 - 3.30، وقد رمز لهذه العزلات E1 إلى E7 على التوالي. وتقع هذه النتيجة ضمن المدى الذي ذكرته (الشيخلي، 2004) حيث توصلت إلى نسب تراوحت بين 4.00-1.08 في دراستها حول إنتاج إنزيم ألفا-أميليز من عزلات محلية من ترب في مدينة بغداد، ولكنها أعلى مما ذكره (Nusrat and Rahman, 2007) حيث أشار إلى نسب تراوحت بين 2.13 - 2.23 عند دراسته إنتاج إنزيم ألفا-أميليز من بعض أنواع بكتيريا *Bacillus*.

وأشارت نتائج الفحوص الأولية والتي أجريت على المستعمرات المنتخبة والتي تمثلت في صبغها بصبغة جرام وملاحظة احتوائها على الجراثيم وتحديد أشكالها ولقد وجد أنها جميعاً عصوية موجبة لصبغة جرام ومكونة للجراثيم. بعدها تم تقييم العزلات السبعة المنتخبة أرقام (1 ، 6، 7 ، 14 ، 16 ، 17 و 18) في قابليتها على إنتاج إنزيم ألفا-أميليز والتي تتوضح نتائجه في الشكل 2، وكما يظهر فيه، تميز العزلة E3 بإنتاجها حيث بلغت الفعالية النوعية لها 5.53 وحدة/ملجم في حين أعطت بقية العزلات قيماً بلغت 1.05 ، 1.15 ، 4.63 ، 3.38 ، 3.56 و2.81 وحدة/ملجم على التوالي، وعليه تم اختيارها لإنتاج الإنزيم. ثم أخضعت هذه العزلة المنتخبة كأفضل عزلة منتجة لإنزيم ألفا – أميليز لمجموعة من الاختبارات الكيموحيوية والتي تتوضح في الجدول 2، وبمقارنة نتائج هذه الاختبارات والفحوص بما تتوفر من معلومات في المراجع العلمية اعتماداً على Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Sneath, 1986) وGarrity *et al.*, 2005) يمكن القول أن العزلة قيد التشخيص تعود الى البكتيريا *B. cereus*. كما أظهرت العزلة المنتخبة قابليتها على إنتاج إنزيم الليسيثنيز Lecithinaseوعدم قدرتها على تخمير المانيتول حيث أعطت مستعمرات وردية محاطة بمنطقة تحلل على بيئة منتقاة من Mannitol egg yolk agar شكل 3. وهذا يتفق مع ما أورده (Mahdavi *et al.*, 2010) في دراسته حول إمكانية إنتاج إنزيم ألفا-أميليز من بكتيريا *B. cereus*، كما أشار إلى كونها أفضل من الـ *B. subtilis* في هذا المجال.

وفي دراسة تأثير العوامل المختلفة في كفاءة إنتاج إنزيم ألفا-أميليز من السلالة المحلية المنتخبة، يظهر الشكل 4 تأثير حجم البيئة في كمية الإنزيم المنتجة وقد أظهرت النتائج أن استخدام 30 مل من بيئة الإنتاج في دورق بحجم 250 مل هو الأفضل حيث أعطى أعلى قيمة للفعالية النوعية بلغت 5.32 وحدة/ملجم بالمقارنة مع الأحجام الأخرى والتي بلغت فيها الفعالية النوعية القيم 1.27 ، 3.60 ، 4.03 ، 4.20 ، 3.98 ، 2.54 ، 2.17 و 2.13 وحدة/ ملجم على التوالي. وكما يلاحظ من النتائج انخفاض في إنتاج الإنزيم عند زيادة حجم بيئة الإنتاج وهذا قد يعود إلى انخفاض مستوى التهوية الضرورية لنمو البكتيريا نتيجة لإنخفاض قابلية التحريك، وكذلك انخفاضه عند انخفاض الحجم وهذا قد يعزى إلى عدم كفاية المغذيات المتوفرة في البيئة لنمو البكتيريا وهذا يتفق مع ما ذكره (Riaz *et al.*, 2003). وقد اثبتت الدراسات السابقة أهمية حجم بيئة التخمر في توفير كمية الهواء الملائمة والمغذيات الضرورية لنمو البكتيريا وبالتالي لإنتاج الإنزيم (Mimura and Shinichi, 1999 و Ivanova *et al.*, 2001) وعليه تم اختيار هذا الحجم في التجارب اللاحقة من إنتاج الإنزيم.



شكل 1. المستعمرات البكتيرية موضحة الهالة الشفافة المحيطة بها نتيجة لإنتاجها إنزيم ألفا-أميليز

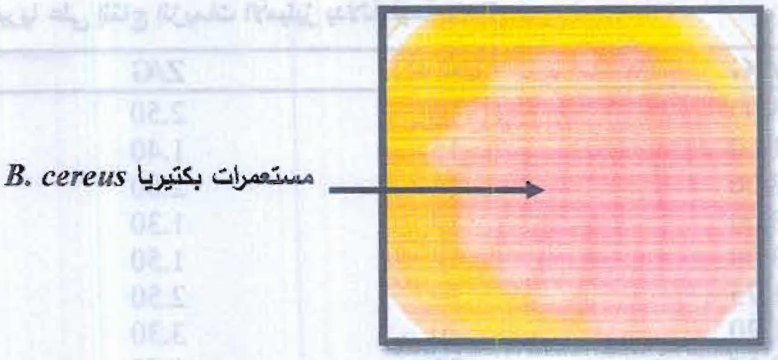
جدول 1. كفاءة عزلات البكتيريا على إنتاج إنزيمات الأميليز بدلالة قيمة Z/G

رقم العزلة	Z/G	رقم العزلة	Z/G
1	2.50	14	3.00
2	1.40	15	1.60
3	2.00	16	3.00
4	1.30	17	3.00
5	1.50	18	3.00
6	2.50	19	1.75
7	3.30	20	1.20
8	1.50	21	2.12
9	1.80	22	1.25
10	1.60	23	2.40
11	1.20	24	1.60
12	1.25	25	1.50
13	1.80	26	1.68

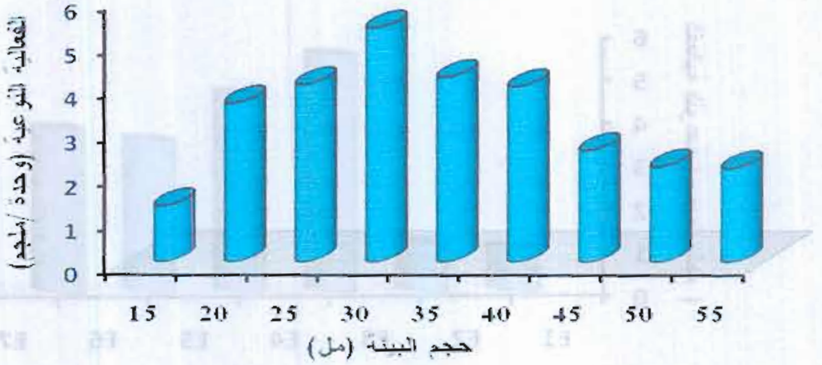
شكل 2. كفاءة العزلات المنتخبة من الغربلة الأولية فى إنتاج إنزيم ألفا-أميليز من خلال تقدير الفعالية النوعية للإنزيم فى رواشح مزارع هذه العزلات

جدول 2. الخواص الكيموحيوية للعزلة المنتخبة من ***B. cereus* E3**

الاختبار	البيئة
(+) Glucose	(+) Vp
(-) Xylose	(-) Indol
(-) Raffinose	(-) TSI
(-) Arabinose	(+) Cimmon citrate
(-) Manitol	(+) Starch hydrolysis
(+) 7% Nacl	(+)Lecithinase
(-) MR	



شكل 3. مستعمرات *B. cereus* تظهر وردية محاطة بمنطقة تحلل لبيئة منتقاة من Mannitol egg yolk agar بعد التحضين عند درجة 37°م لمدة 24-48 ساعة



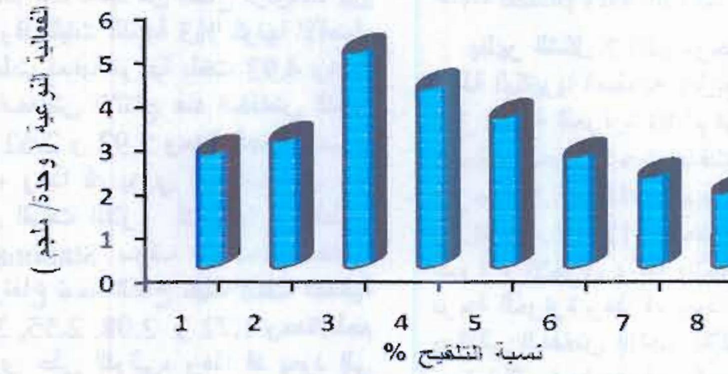
شكل 4. تأثير حجم البيئة فى إنتاج إنزيم ألفا-أميليز من بكتيريا *B. cereus* المحضنة لمدة 48 ساعة على درجة 37°م

أما فى دراسة تأثير نسبة التلقيح فى إنتاج إنزيم ألفا-أميليز، فقد تم استخدام عدة نسب من اللقاح تراوحت بين 1- 8 % (شكل 5) وقد أثبتت النسبة 3% كونها الأفضل فى الإنتاج حيث أعطت فعالية نوعية بلغت 4.92 وحدة/ ملجم، مع ملاحظة انخفاض الإنتاج عند انخفاض النسبة بفعالية نوعية بلغت 2.62 و 2.92 وحدة/ملجم للنسب 1 و2% على التوالي، وهذا قد يؤدي إلى انخفاض نمو البكتيريا، وبهذا فان الوقت اللازم لدخولها في الطور الثابت Stationary phase سوف يزداد، وانخفاض الإنتاج أيضاً عند ارتفاع نسبة اللقاح حيث بلغت الفعالية النوعية 4.11 ,3.43 ,2.55 ,2.08 و 1.72 وحدة/ملجم للنسب الباقية الاخرى على التوالي، وهذا قد يعود إلى زيادة عدد الخلايا البكتيرية النامية وبذلك تصبح المغذيات غير كافية لتغطية احتياجاتها للنمو وبالتالي يتأثر إنتاج الانزيم. وهذا يتفق مع ما أشار إليه (Allan *et al.*, 1996) فى بيانه تأثير نسبة اللقاح على نمو البكتيريا وإنتاج إنزيم ألفا-أميليز.

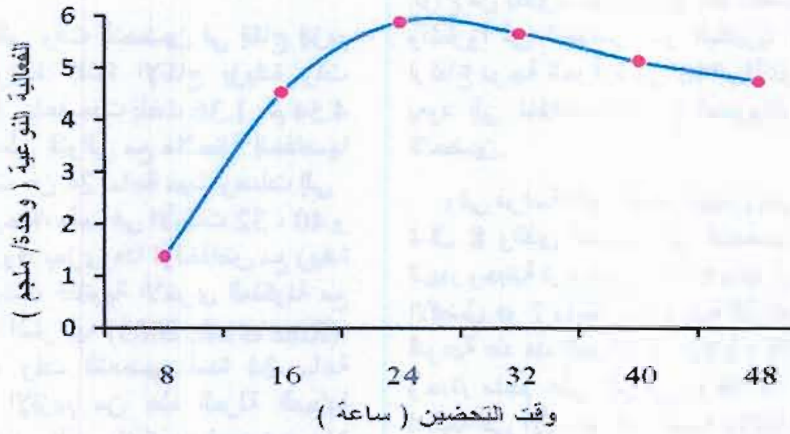
وأظهرت دراسة تأثير وقت التحضين في إنتاج إنزيم ألفا-أميليز(شكل 6) زيادة كفاءة الإنتاج بزيادة وقت التحضين من 8 إلى 24 ساعة حيث بلغت 1.36 ثم 4.54 و 5.88 وحدة/ ملجم على التوالي مع ملاحظة إنخفاضها تدريجياً بعد زيادة الوقت عن 24 ساعة حيث وصلت إلى 5.66، 4.32 و3.74 وحدة/ ملجم فى الأوقات 32 ، 40 و 48 ساعة على التوالي وقد يعزى هذا الإنخفاض مع زيادة الوقت الى تجمع المكونات الثانوية الأخرى المتكونة مع مكونات البيئة، وهذا ما أشار إليه (Riaz *et al.*, 2003). ونتيجة لذلك تم تحديد وقت التحضين لمدة 24 ساعة كأفضل وقت لإنتاج الإنزيم من هذه العزلة المحلية المنتخبة، وهذه النتيجة هي اقل مما ذكره (Nusrat and Rahman, 2007) حيث أشار إلى وقت تحضين مقداره 72 ساعة لأفضل إنتاجية من إنزيم ألفا-أميليز من احد انواع بكتيريا *Bacillus* ، ولكنها أعلى مما أشار إليه (Mahdavi *et al.*, 2010) عند حصوله على عزلة منتخبة من بكتيريا *B. cereus* متميزة فى إنتاجها لإنزيم ألفا-أميليز حيث بين أن أعلى إنتاج لها من الإنزيم كان عند تحضينها لمدة 18 ساعة عند درجة حرارة 35°م ورقم هيدروجيني 6.5، فى حين كانت هذه النتيجة الأقرب إلى ما أشار إليه (Suman and Ramesh, 2010) حيث ذكر أن إنتاجية الإنزيم تزداد بزيادة وقت التحضين حتى 24 ساعة ثم تبدأ بعدها بالانخفاض التدريجي، وعلل هذا الانخفاض في الفعالية الى تراكم البروتييزات في البيئة الإنتاجية كمنتجات ثانوية لنمو البكتيريا والتي ترتبط مع دخول البكتيريا مرحلة تكوين الجراثيم Sporulation process وذلك في نهاية مرحلة Exponential growth phase. وهذا ما أكده أيضاً (Sudharhsan *et al.*, 2007) حيث أشار إلى فترة تحضين مقدارها 21 ساعة وأشار إلى أن إنتاج الإنزيم يبدأ عند دخول البكتيريا مرحلة الطور اللوغارتمي Log phase إلى بداية الطور الثابت Stationary phase.

يظهر الشكل 7 تأثير درجة حرارة التحضين في انتاج عزلة البكتيريا المنتخبة لإنزيم ألفا أميليز وكما يتضح منه تميز درجة الحرارة 40°م فى الإنتاج بالمقارنة مع بقية درجات الحرارة حيث بلغت الفعالية النوعية عند هذه الدرجة 5.83 وحدة/ ملجم بالمقارنة مع 2.62 ، 4.65 ، 4.10، 3.42 و 3.12 وحدة/ ملجم على التوالي لدرجات الحرارة الاخرى وكما يلاحظ انخفاض الفعالية بارتفاع درجة الحرارة وهذا قد يعود إلى التأثير في نمو البكتيريا وبالتالي انخفاض إنتاجها للإنزيم، وعليه تم تثبيت درجة حرارة التحضين هذه في التجربة اللاحقة. وهذا يتفق مع ما ذكره (Chengyi *et al.*, 1999; Haq *et al.*, 1997) فى حين حصل كل من (Nusrat and Rahman, 2007 وSudharhsan *et al.*, 2007) على أعلى فعالية في درجة حرارة 37°م عند دراستهم انتاج الانزيم من ثلاثة انواع من بكتيريا *Bacillus* عند تحضينها لمدة 72 ساعة وأشاروا لى انخفاض نمو البكتيريا وإنتاج الإنزيم عند ارتفاع درجة الحرارة إلى 40°م فأكثر وهذا الاختلاف قد يعود إلى اختلاف الأنواع المعزولة وكذلك طول فترة التحضين.

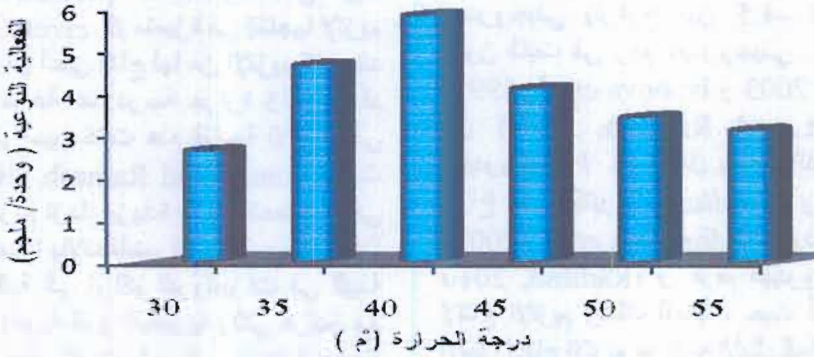
وفى دراسة تأثير الرقم الهيدروجى على فعالية الإنزيم شكل 8 والذى اشتمل على التحضين بمدى من الأرقام الهيدروجينية تراوح بين 4 - 8 وجد أن الرقم الهيدروجيني الافضل هو 7 بالمقارنة مع بقية الأرقام حيث بلغت الفعالية النوعية عند هذه القيم 1.55 ،3.62 ، 4.98 ، 5.98 و5.54 وحدة/ ملجم على التوالي، وهذا قد يعود إلى انخفاض فعاليته فى الأوساط الحامضية (Castro *et al.*, 1993 وRiaz *et al.*, 2003). وهذا يتفق مع ما أشارت إليه بعض الدراسات السابقة من أن إنتاج الإنزيم وثباته حساسة جداً تجاه درجة حرارة والرقم الهيدروجيني أثناء التحضين، حيث تنمو الأحياء المنتجة له فى رقم هيدروجيني يتراوح بين 4.5- 10.5 وأن الإنزيم يكون ثابت فى رقم هيدروجيني 6.5-8 على 40°م (Ivanova *et al.*, 1993 و Riaz *et al.*, 2003)، كما بين (Nusrat and Rahman, 2007) أن الرقم الهيدروجيني 7 هو افضل وسط لانتاج الانزيم من ثلاثة انواع من بكتيريا *Bacillus* وهذا ما أكده أيضا (Sudharhsan *et al.*, 2007)، وذكر (Suman and Ramesh, 2010) أن الرقم الهيدروجيني 7 هو الأفضل لإنتاج الإنزيم وكذلك لفعاليته، حيث أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لإنتاج الإنزيم هو نفسه الأمثل لفعاليته، كما أشار إلى ذلك (Mishra and Behera, 2008;Gupta *et al.*, 2003) حيث ذكروا أن الرقم الهيدروجيني ما بين 6 -7 هو الأنسب للنمو ولإنتاج الإنزيم، فى حين أشار (Femi-Ola and Olowe, 2011) إلى رقم هيدروجيني مساوياً لـ 6 .



شكل 5. تأثير نسبة التلقيح في إنتاج إنزيم ألفا-أميليز من عزلة بكتيريا *B. cereus* المنتخبة عند التحضين لمدة 48 ساعة عند درجة 37°م ورقم هيدروجيني 7



شكل 6. تأثير وقت التحضين في إنتاج إنزيم ألفا-أميليز من عزلة بكتيريا *B. cereus* المحلية المنتخبة عند التحضين على درجة 37°م ورقم هيدروجيني 7



شكل 7. تأثير درجة حرارة التحضين في إنتاج إنزيم ألفا-أميليز عند التحضين لمدة 24 ساعة ورقم هيدروجيني 7

شكل 8. تأثير الرقم الهيدروجيني فى فعالية إنزيم ألفا-أميليز الخام المنتج من عزلة بكتيريا *B . cereus* المنتخبة

المراجــع

الشيخلي، رنا عبد الله (2004). إنتاج إنزيم ألفا-أميليز من البكتريا R5 *Bacillus licheniformis* المعزولة محليا وتنقيته ودراسة خواصه. رسالة ماجستير- كلية الزراعة- جامعة بغداد.

Allan, S., B.F. Henrik and B. Torbenvedel (1996). A method of designing alpha mutants, with pre-datermined properties alpha amylase varients and detergents containing the variants. Process Biochem., 31: 110–210 .

Anto, H., U. Trivedi and K. Patel (2006). Alpha-amylase production by *Bacillus cereus* MTCC 1305 using solid-state fermentation. Food Technol. Biotechnol., 44: 241-245.

Asgher, M., MJ. Asad, SU. Rahman and RL. Legge (2007). A thermostable α-amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. J. Food Eng., 79: 950-955.

Aslim, B., N. Sağlam and Y. Beyatli (2002). Determination of some properties of Bacillus isolated from soil. Turk J. Biol., 26: 41-48.

Babu, K.R. and T. Satyanarayana (1993). Parametric optimization of extracellular α-amylase production by thermophilic *Bacillus coagulans*. Folia Microbiol., 38: 77–80.

Bordbar, A.K., K. Omidiyan and R. Hosseinzadeh (2005). Study on interaction of α-amylase from *Bacillus subtilis* with cetyl trimethylammonium bromide. Colloids Surf. B: Biointerfaces, 40: 67–71.

Bradford, M. (1977). A rapid and sensitive method for the quantitation of macroorganisms quantities of protein using the principles of protein dye binding. Anal. Biochem., 72 : 248-254.

Burhan, A., U. Nisa, C. Gokhan, C. Omer, A. Ashabil and G. Osman (2003). Enzymatic properties of a novel thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkalophilic *Bacillus* spp. Isolate ANT-6. Process Biochem., 38: 1397–1403.

Calik, P. and T.H. Ozdamar (2001). Carbon sources affect metabolic capacities of *Bacillus* spp. for the production of industrial enzymes. Biochem. Eng. J., 8: 61–81.

Castro, G.R., M.A. Ferrero, B.S. Mendez and F. Sineriz (1993). Screening and selection of bacteria with high amylolytic activity. Acta Biotechnol., 13: 197–201.

Chengyi, W.H., M. Ming and R. Jiang (1999). Studies on the properties of alpha–amylase produced by *Bacillus pumilus* 289 (PBX96). Acta Microbial. Sci., 32: 400–404.

Crueger, W. and A. Crueger (1989). Biotechnology: A Test book of Industrial Microbiology 2nd edition. Sinauer Associate., Inc. Sutherland, M.AG., 1375 : 189-208.

Devi, L.S., P. Khaund and S. R. Joshi (2010). Thermostable α-amylase from natural variants of *Bacillus* spp. prevalent in eastern Himalayan Range. Afri. J. Microbiology Res., 4 (23): 2534-2542.

Donvan, N.K.O. (1958). A selective medium for *Bacillus cereus* in milk. J. Appli. Bacteriol., 21: 100-103.

Femi -Ola, T. O. and B. M. Olowe (2011). Characterization of alpha amylase from *Bacillus subtilis* BS5 isolated from Amitermes evuncifer silvestri. Res. J. Microbiol., 6(2): 140-146.

Gangadharan, D., S. Sivaramakrishnan, K.M. Nampoothiri and A. Pandey (2006). Solid culturing of *Bacillus amyloliquefaciens* for alpha amylase production. Food Technol. Biotechnol., 44 (2): 269–274.

Garrity, G.M., J.A. Bell and T. Lilburn (2005). The revised road map to the manual. In Brenner, Krieg, Staley and Garrity (ed.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., The Proteobacteria, Part A, Introductory Essays. Springer, New York, 159-220.

Gupta, R., P. Gigras, H. Mohapatra, V.K. Goswami and B. Chauhan (2003). Microbial α-amylase: a biotechnological perspective. Process Biochem., 38: 1599–1616.

Hagihara, H., K. Igarashi, Y. Hayashi, K. Endo, K. Ikawa-Kitayama, K. Ozaki, S. Kawai and S. Ito (2001). Novel α-amylase that is highly resistant to chelating reagents and chemical oxidants from the alkaliphilic Bacillus isolate KSM-K38. Appl. Environ. Microbiol., 67: 1744–1750.

Haq, I., H. Ashraf, S. Ali and M.A. Qadeer (1997). Submerged fermentation of alpha amylase by *Bacillus licheniformis* GCB–36. Biologia, 43: 39–45.

Hendriksen, H.V., S. Pedersen and H. Bisgard-Frantzen (1999). A process for textile warp sizing using enzymatically modified starches. Patent Application WO 99/35325.

Ivanova, V.N., E.P. Dobreva and E.I. Emanuilova (1993). Purification and charaterization of a thermostable alpha–amylase from *Bacillus licheniformis*. J. Biotechnol., 28: 277–289.

Ivanova, V., D. Yankov, L. Kabaivanova and D. Pashkoulov (2001). Simultaneous biosynthesis and purification of two extracellular *Bacillus hydrolases* in aqueous two alpha–amylase. Biochem. Eng. J., 8: 61–81

Kandra, L. (2003). α-Amylases of medical and industrial importance. J. Mol. Struct. (Theochem.), 66: 487–498.

Kathiresan, K. and S. Manivannan (2006). α-Amylase production by *Penicillium fellutanum* isolated from mangrove rhizosphere soil. Afr. J. Biotechnol., 5 (10): 829-832.

Lim, W.J., S.R. Park, C.L. An, J.Y. Lee, S.Y. Hong, E.C. Shin, E.J. Kim, J.O. Kim, H. Kim and H.D. Yun (2003). Cloning and characterization of a thermostable intracellular α- amylase gene from the hyperthermophilic bacterium Thermotoga martima MSB8. Res. Microbiol., 154 (10): 681-687.

Mahdavi, A., R.H. Sajedi, M. Rassa and V. Jafarian (2010). Characterization of an α-amylase with broad temperature activity from an acid-neutralizing *Bacillus cereus* strain. Iranian J. Biotechnol., 8(2): 103-111.

Mamo, G. and A. Gessesse (1999). Purification and characterization of two

raw-starch-digesting thermostable α-amylases from a thermophilic Bacillus. Enzyme and Microbial. Technol., 25: 433–438.

McTigue, M.A., C.T. Kelly, E.M. Doyle and W.M. Fogarty (1995). The alkaline amylase of the alkalophilic *Bacillus* spp. IMD 370. Enzyme and Microbial Technol., 17: 570–573.

Mimura, H. and N. Shinichi (1999). Physiological characteristics of *Bacillus* spp. Biocontrol Sci., 4: 105–108.

Mishra, S. and N. Behera (2008). Amylase activity of a starch degrading bacteria isolated from soil receiving kitchen wastes. Afri. J. Biotechnol., 7 (18): 3326-3331.

Nanmori, T., M. Nagai, Y. Shimizu, R. Shinke and B. Mikami (1993). Cloning of the beta-amylase gene from *Bacillus cereus* and characteristics of the primary structure of the enzyme. Appl Environ Microbiol., 59: 623-627.

Niaz, M., T. Iftikhar, R. Tabassum, Z.M. Anjum, H. Saleem, S.Q. Abbas and I.U. Haq (2010). α-Amylase production by *Bacillus licheniformis* under solid state fermentation conditions and it's cross linking with metalosalts to confer thermostability. Int. J. Agric. Biol., 12(5): 793-795.

Nigam, P. and D. Singh (1996). Enzyme and microbial systems involved in starch processing, Enzyme Microbial. Technol., 17: 770–779.

Nonaka, T., M. Fujihashi, A. Kito, H. Hagahara, K. Ozaki, S. Ito and K. Miki (2003). Crystal structure of calcium free α -amylase from *Bacillus* spp. strain KSM-K38 (Amy K38) and it's sodium on binding sites. J. Biol. Chem., 278 (27): 24818 –24824.

Nusrat, A. and S. R. Rahman (2007). Comparative studies on the production of extracellular α-amylase by three mesophilic Bacillus isolates. Bangladesh J. Microbiol., 24 (2): 129-132.

Oganmwongi, I.N., O.F. Igbinosa, O.A. Aiyegoro and E.E. Odjadjare (2008). Microbial analysis of different topsoil samples of selected site in Obafomi Awolowo University, Nigeria. Scientific Research and Essay., 3 (3): 120-124.

Ohdan, K., T. Kuriki, H. Takata, H. Kaneko and S. Okada (2000). Introduction of raw starch–binding domains into *Bacillus subtilis* alpha–amylase by fusion with the starch–binding domain of Bacillus cyclomaltodextrin glucanotramferase. Appl. Environ. Microbiol., 66:3058–3064.

Oyama, T., H. Miyake, M. Kusunoki and Y. Nitta (2003). Crystal structures of β-amylase from *Bacillus cereus* var. mycoides in complexes with substrate analogs and affinity-labeling reagents. J Biochem., 133: 467-474.

Pandey, A., P. Nigam, C.R. Soccol, V.T. Soccol, D. Sing and R. Mohan (2000). Advances in microbial amylases. Biotechnol. and Appli. Biochem., 31: 135–152.

Ramachandran, S., A.K. Patel, K.M. Nampoothiri, S. Chandran, G. Szakacs, C.R. Soccol and A. Pandey (2004). Alpha amylase from a fungal culture grown on oil cakes and it's properties. Braz. Arch. Biol. Technol., 47: 309–317.

Rao, M. B., A.M. Tanksale, M.S. Gathe and V.V. Deshpande (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62: 597–635.

Reilly, P.J. (1991). On an application filled to use alpha-amylase from transgenic *Bacillus licheniformis* in the starch industry, breweries and alcohol production. Bul. De L Acad. Nat. Med., 183: 1209–1210.

Riaz, N., I. Ul-Haq and M.A. Qadeer (2003). Characterization of α-amylase by *Bacillus subtilis*. Int. J. Agri. Biol., 5 (3) : 249-252.

Satyanarayana, T., J. Rao and M. Ezhilvannan (2005). α-Amylases. In Enzyme Technology. Pandey, A.; Webb, C.; Soccol, C.R. and Larroche C. (Eds.), Asiatech Publishers Inc., New Delhi, India, 189 – 220.

Seely, H.W. and P.J. Vandermark (1981). Enzymatic reactions. Microbes in action (A laboratory manual of microbiology. 3rd ed). Freemann, W.H. and Company. San Francisco, USA.

Sidhu, G.S., P. Sharma, T. Chakrabarti and J.K. Gupta (1997). Strain improvement for the production of a thermostable α-amylase. Enzyme and Microbial Technology, 21: 525–530.

Sivaramakrishnan, S., D. Gangadharan, K.M. Nampoothiri, N. Soccol and A. Pandey (2006). α-amylases from Microbial sources – An Overview on Recent Developments Food Technol. Biotechnol., 44 (2) :173–184 .

Sneath, P.H.A. (1986). Endospore-forming gram-positive rode and cocci. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Williams & Wilkins, Baltimore, USA., 1104-1207.

Sudharhsan, S., S. Senthilkumar and K. Ranjith (2007). Physical and nutritional factors affecting the production of amylase from species of *Bacillus* isolated from spoiled food waste. Afri. J. Biotechnol., 6 (4): 430-435.

Suman, S. and K. Ramesh (2010). Production of thermostable extracellular amylase from thermophilic *Bacillus* spp. J. of Pharmaceutical Sciences and Research, 2 (3): 149-154

Suvd, D., Z. Fujimoto, K. Takasa, M. Matsumura and H. Mizuno (2001). Crystal structure of *Bacillus stearothermophilus* α-amylase: possible factors determining the thermostability. J. Biochem., 129: 461-468.

Van der Maarel, M.J.E.C., B. Van der Veen, J.C.M. Uitdehaag, H. Leemhuis and L. Dijkhuizen (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the α-amylase family. J. Biotechnol., 94 : 137–155.

Wanderley, K.J., F.A.G. Torres, L.M.P. Moraes and C.J. Ulhoa (2004). Biochemical characterization of α-amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. FEMS Microbiology Letters, 231: 165–169.

STUDY ON THE FACTORS AFFECTING THE PRODUCTION OF ALPHA AMYLASE FROM LOCAL *Bacillus* Bacteria Isolates

Ethar Z. Naji*, Aghareed A. Hussain and M.A. Jasim

Food Sci. Dept., College of Agric., Tikrit Univ., Iraq

ABSTRACT

Obtained 26 isolates from thermophilic bacteria belonged to the genera *Bacillus* that hydrolyze starch were isolated from a total of 68 different soil samples taken from Tikrit/ Salah Al-Din province and subjected to primary and secondary screening processes to select the highest producer of α-amylase. It was found that isolate E3 was the highest producer of the enzyme (5.53 U/ mg), which was identified through cultural morphological and biochemical tests as *Bacillus cereus*. The results showed that the optimal conditions for the production of the enzyme alpha - amylase from the bacteria by submerged culture achieved by using 30 ml of the fermentation medium (5.32 U/mg) compared with 15-55 ml which gave amounted values (1.27, 3.60, 4.03, 4.20, 3.98, 2.54, 2.17, 2.13) U/mg, respectively. The effect of different inoculum size (1-8%) were tested for enzyme activity, among them 3% inoculum was found sufficient for the production of enzyme (4.92 U/mg) compared with (2.62, 2.92, 4.11, 3.43, 2.55, 2.08, 1.72 U/mg) for the other respectively. This study also showed that the rate of enzyme production was increased with the increasing of the fermentation period from 8 to 24h, it's became 1.36 then 4.54, 5.88 units/mg, respectively, with a note of falling gradually after increasing time of 24 h, reaching to 5.66, 4.32 and 3.74 units/mg at times 32, 40 and 48 h, respectively. The effect of temperature in the production of the enzyme from the isolated bacteria showed that, the maximum activity was obtained at 40°C (5.85 U/mg) compared with the rest temperatures used in the study, also the pH 7 was the best for the activity of the produced enzyme at indicated controlled condition for the production.

Keywords: α- amylase, submerged culture, *Bacillus cereus*.

* **Corresponding author: Tel. :** +9647702538027
E-mail address: etze_957@yahoo.com