إنتاج إنزيم كلوكوز أيزوميريز من عزلة محلية من البكتريا *Streptomyces* sp. HM5

2. تعيين الظروف المثلى لإنتاج الإنزيم بطريقة المزارع المغمورة*

محمد عمر محي الدين — جامعة بغداد / كلية الزراعة — قسم علوم الاغذية والتقانات الاحيائية

حميد عبود جبر — جامعة ديالى / كلية العلوم — قسم الكيمياء

باسل كامل دلالي — وزارة الزراعة

الملخـــــص

استهدفت هذه الدراسة تحديد الظروف المثلى لإنتاج إنزيم كلوكوز أيزوميريز من عزلة محلية من البكتريا ***Streptomyces* sp. HM5** وكانت الظروف المثلى لإنتاج الإنزيم بطريقة المزارع المغمورة هي باستخدام وسط سائل يحتوي على سكر الزايلوز بوصفه مصدرا وحيدا للكاربون ومادة حاثة لإنتاج الإنزيم وبتركيز 1.5% والببتون مصدرا للنتروجين وبتركيز 1% وكبريتات المغنيسيوم وكلوريد الكوبلت مصدرا للأملاح المعدنية وبتركيز 0.05% من كل منها وبرقم هيدروجيني ابتدائي مقداره 7.5 بعد 72 ساعة من الحضن بدرجة حرارة 35°م وقد امكن تحت هذه الظروف الحصول على فعالية إنزيمية بلغت 9.59 وحدة/مل وبنسبة زيادة بلغت حوالي 192% قبل تعيين الظروف المثلى.

* جزء من أطروحة دكتوراه للباحث الثاني

المقـــــــدمة

يعد إنزيم كلوكوز أيزوميريز احد إنزيمات التناظر Isomerases وتحفز تلك الإنزيمات التفاعلات العكسية المتضمنة تغيير احدى مشابهات المركب إلى شبيه اخر مثل تحويل المركبات من الاشباه الهندسية Cis إلى الاشباه الهندسية Trans وبالعكس وتحويل المركبات الالديهايدية إلى الكيتونية وبالعكس وتحويل المركبات الاينولية إلى الكيتونية وبالعكس(Nelson & Cox , 2000). وسمي الإنزيم في بداية اكتشافه بإنزيم D-xylose isomerase وذلك لكون الزايلوز يعد مادة حاثة (Inducer) لإنتاجه.

وبعد معرفة قابلية الإنزيم على تحويل الكلوكوز والزايلوز كمواد خاضعة إلى الفركتوز D-xylose isomerase الحقيقي الذي يعمل على الزايلوز فقط. واطلقت لجنة الإنزيمات التابعة للاتحاد العالمي للكيميائيين الحياتين تسمية D-xylose ketol isomerase (EC5.3.5.1) ، غير ان الاسم الشائع له والمتداول في بعض المراجع العلمية هو كلوكوز أيزوميريز (Bhosale & etal . ,1996).

لقد عرفت اهمية إنزيم كلوكوز أيزوميريز التطبيقية منذ منتصف القرن الماضي عندما اكتشفت قابليته في تحويل الكلوكوز إلى الفركتوز وإنتاج الشراب الغني بالفركتوز High fructose syrup (HFS) (Anon , 1975 ; Schenck , 2000), كذلك إنتاج شراب الذرة الغني بالفركتوز (High fructose corn syrup (HFCS (Gray & etal., 1978 ; Proter & etal 1984) الذي استخدم كبديل عن السكروز في العديد من الصناعات الغذائية (Vankatasubramanican & Harrow ,1979) كما يتميز سكر الفركتوز عن الكلوكوز ببعض الخصائص الفيزيائية والوظيفية كميله القليل للتبلور وقابليته العالية للذوبان في الماء فضلا عن ارتفاع حلاوته التي تعادل 2.34 و1.73 مرة بقدر حلاوة الكلوكوز والسكروز على التوالي (Pritham ,1998) والتي جعلت من سكر الفركتوز يؤدي دورا مهما في بعض التطبيقات الصناعية (Hanover & White ,1993) ,مما شجع من استخدامه كبديل عن سكر الكلوكوز والسكروز في تلك التطبيقات.

انـتج إنـزيم كلوكـوز أيزوميريـز مـن المصـادر الميكروبيـة لاول مـرة مـن بكتريـا *Pseudomonas hydrophila* من قبل Marshall & Kooi , 1957 ثم توالت الأبحاث على إنتاجه من مصادر ميكروبية متعددة.

وفي هذه الدراسة جرت محاولة لتعيين الظروف المثلى لإنتاج إنزيم كلوكوز أيزوميريز من عزلة محلية من البكتريا *Streptomyces* sp HM5 وبطريقة المزارع المغمورة بهدف استخدامه في العديد من المجالات التطبيقية.

المواد وطرائق العمل

الكائن المجهري

استخدمت في الدراسة عزلة محلية من البكتريا *Streptomyces* sp. HM5 والمعزولة والمشخصة في مختبرات التقانات الاحيائية في كلية الزراعة / جامعة بغداد (محي الدين وجماعته ، 2004) ، والمحفوظة في وسط مستخلص الخميرة – مستخلص المالت Yeast extract-malt extract المؤلف من اذابة 0.4 غم من كل من الكلوكوز وخلاصة الخميرة و1.0 غم من خلاصة المالت و1.8 غم من الاكر في 100 مل من الماء المقطر وعدل الرقم الهيدروجيني للوسط إلى 7.3 وعقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121°م وضغط 15 باوند/انج^2 مدة 15 دقيقة وحضرت اوساط مائلة (Slant) منه.

تحضير اللقاح البكتيري

حضر عالق الخلايا وذلك بنقل 2-loop full من مزارع العزلة المنتجة للإنزيم إلى انبوبة اختبار حاوية على 5 مل من الماء المقطر المعقم ، رجت الانبوبة جيدا ثم حسب عدد الابواغ باستعمال شريحة Haemocytometer بعدها حضرت التخافيف اللازمة للحصول على الحجم المطلوب من اللقاح (بوغ/مل).

إنتاج الإنزيم

اسـتعملت طريقـة المـزارع المغمـورة submerged culture المـذكورة مـن قبـل Park & etal. , 1976 و Lobanok & etal . , 1998 باستعمال حاضنة هزازة لإنتاج الإنزيم ، إذ لقحت دوارق زجاجية سعة 300 مل حاوية على 50 مل من وسط الأساس السائل

المعقم ذي رقم هيدروجيني 6.8 والمكون من اذابة 10 غم من الببتون و2.5 غم من خلاصة الخميرة و10 غم من دي–زايلوز و5 غم من كل من كلوريد الصوديوم وخلاصة لحم البقر beef extract و0.5 غم من كبريتات المغنيسيوم المائية ($MgSO_4.7H_2O$) في لتر من الماء المقطر. لقحت الدوارق بمللتر واحد من عالق الابواغ. بحيث يكون حجم اللقاح في وسط الإنتاج حوالي 10^5 بوغ/مل حضنت الدوارق بدرجة حرارة 30°م مدة 48 ساعة وبسرعة تحريك 150 دورة/دقيقة. فصلت الكتلة الحيوية من وسط النمو بالنبذ المركزي المبرد وعلى سرعة 15000 دورة/دقيقة مدة 15 دقيقة على درجة 4°م. تم التخلص من الرائق أما الراسب الذي يمثل الخلايا الكاملة فقد تم غسلها بالماء المقطر بحجم يعادل حجم وسط الإنتاج (50 مل) ونبذت مركزيا تحت نفس الظروف المذكورة انفا. كررت العملية مرتين وتم التخلص من الرائق واستعمل الراسب في المرحلة الأخيرة لعملية الغسل لاستخلاص الإنزيم من الخلايا.

استخلاص الإنزيم

استخلص الإنزيم من الخلايا الكاملة حسب الطريقة التي ذكرها Chen & etal.,1979a التي تتلخص بتعليق الخلايا في 50 مل من محلول الاستخلاص Cetyl trimethyl ammonium bromide بتركيز 0.1% في دوارق سعة 300 مل وحضنت في حاضنة هزازة وعلى سرعة 150 دورة/دقيقة وبدرجة حرارة 30°م مدة 24 ساعة ونبذت مركزيا بسرعة 15000 دورة/دقيقة مدة 15 دقيقة وبدرجة 4°م. اهمل الراسب وجمع الرائق الذي عد المستخلص الخام للإنزيم.

تقدير فعالية الإنزيم

قدرت فعالية الإنزيم في المستخلص الخام حسب الطريقة المذكورة من قبل Takasaki & etal., 1969 مع بعض التحويرات التي ذكرها Kaneko & etal., 2000 وتم الكشف عن كمية الفركتوز الناتج بفعل الإنزيم حسب الطريقة التي ذكرها Disch & Borenfreuna 1951, بالاستعانة بالمنحنى القياسي لمحلول الفركتوز وعرفت وحدة فعالية الإنزيم Unit بكونها كمية الإنزيم التي تحرر مايكرمولا واحدا من الفركتوز في الدقيقة الواحدة تحت ظروف التجربة.

تقدير الكتلة الحيوية

اتبعت الطريقة المذكورة من قبل Lobanok & etal ., 1998 حيث جمعت الكتلة الحيوية بعد انتهاء مدة التخمر بالنبذ المركزي على سرعة 15000 دورة/دقيقة مدة 15 دقيقة وعلى درجة 4°م وغسلت الخلايا بالماء المقطر مرتين مع النبذ المركزي تحت نفس الظروف السابقة ثم جففت بدرجة حرارة 105°م مدة 24 ساعة واحتسب وزن المادة الجافة على أساس غم/100مل.

تعيين الظروف المثلى لإنتاج الإنزيم

درس تأثير عدد من العوامل لتحديد الظروف المثلى لإنتاج الإنزيم من العزله المحلية لبكتريا *Streptomyces* sp. HM5 تضمنت مايلي :

تحديد مصدر الكاربون الامثل لإنتاج الإنزيم

درس تأثير عدد من مصادر الكاربون في إنتاج الإنزيم اشتملت على الكلوكوز والكالاكتوز والسكروز والمانوز والارابينوزبالاضافة الى الزايلوز بتركيز 1% في الوسط الأساس السائل لانتاج الانزيم .

تحديد التركيز الامثل للزايلوز

درس تأثير تراكيز مختلفة من الزايلوز كافضل مصدر كاربوني انتخب من التجربة السابقة في الوسط الأساس السائل المستعمل في إنتاج الإنزيم وشملت تلك التراكيزعلى النسب التالية 1 و1.5 و2 و2.5 و 3% .

تحديد مصدر النتروجين الامثل لإنتاج الإنزيم

استبدل مصدر النتروجين في والوسط السائل المستخدم في انتاج الانزيم بمصادر نتروجينية عضوية شملت الببتون والتربتون والبروتيوز – بيتون ، واليوريا ومصادر نتروجينية لا عضوية شملت كلوريد الامونيوم وكبريتات الامونيوم. واضيفت المصادر المذكورة إلى وسط الإنتاج بتركيز 1% مع الاخذ بنظر الاعتبار استعمال التركيز الامثل للمصدر الكاربوني المتمثل بالزايلوز والذي تم تحديده على ضوء النتائج المتحققة في الفقرة السابقة .

تحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لإنتاج الإنزيم

استعمل وسط الأساس السائل المستخدم لانتاج الانزيم مع تعديل نسبة الزايلوز إلى 1.5% في وسط الإنتاج في هذه التجربة والتجارب اللاحقة بناءً على نتائج تحديد مصادر الكاربون والنتروجين المذكورة انفاً.

إذ حضر الوسط بارقام هيدروجينة تراوحت من 6–8 بفارق نصف درجة من وسط لآخر لتحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لإنتاج الإنزيم.

تحديد درجة الحرارة المثلى لإنتاج الإنزيم.

حض وسط الإنتاج الملقح بخلايا البكتريا بدرجات حرارة مختلفة تراوحت من 25 – 45مْ بفارق 5 درجات حرارية من وسط لآخر ومدة 48 ساعة لتحديد درجة الحرارة المثلى لإنتاج الإنزيم مع مراعاة الظروف المثلى المتحققة في التجارب السابقة.

تحديد مصادر الايونات المعدنية المثلى لإنتاج الإنزيم

استبدلت ايونات المغنسيوم المستعملة في وسط الإنتاج السائل بمصادر معدنية بتركيز 0.05% اشتملت على ايونات الكوبلت وايونات المنغنيز ومزيج من ايونات المغنسيوم والكوبلت بنسبة 1 : 1 في حين تركت معاملة أخرى من دون اضافة للايونات المعدنية مع الآخذ بنظر الاعتبار الظروف المثلى كافة والمتحققة في التجارب السابقة.

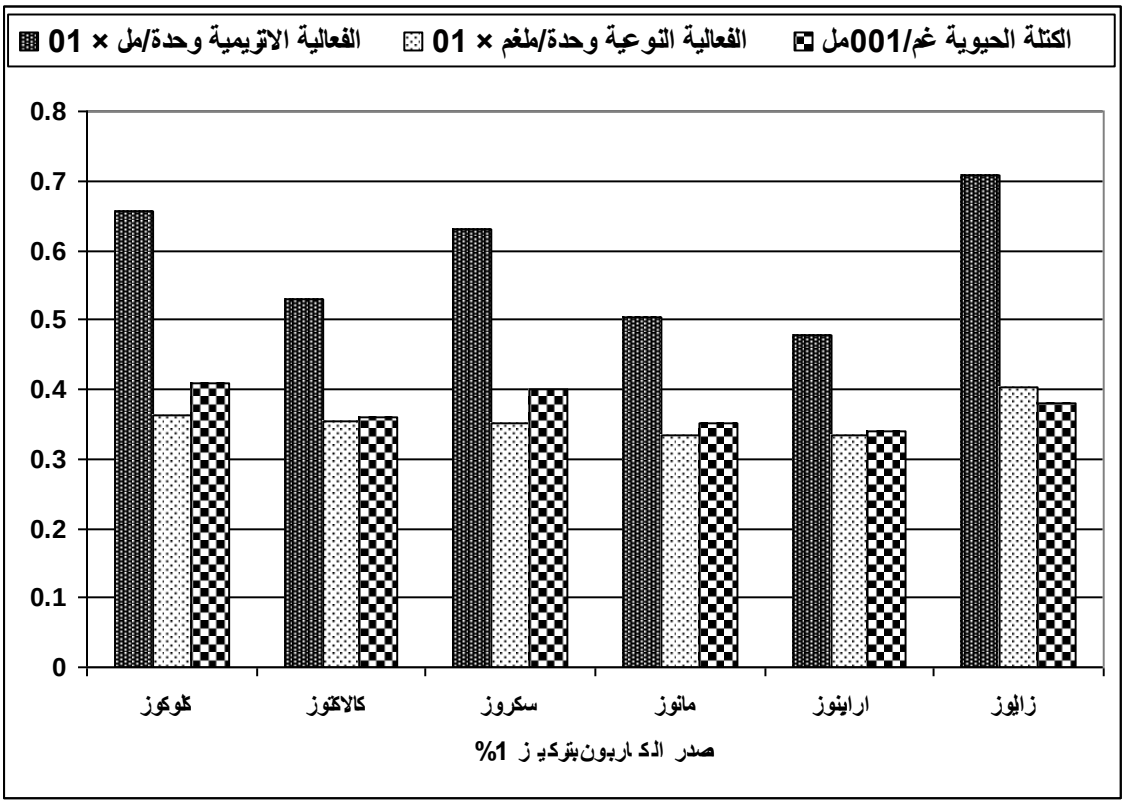
تحديد مدة الحضانة المثلى لإنتاج الإنزيم

تمت متابعة إنتاج الإنزيم من قبل البكتريا قيد الدراسة في الظروف المثلى المحددة في ضوء التجارب المذكورة انفا على مدى 96 ساعة من الحضن في 35°م كل 24 ساعة من حيث الفعالية الإنزيمية والفعالية النوعية والكتلة الحيوية.

النتائج والمناقشة

1- تحديد مصدر الكاربون الأمثل لإنتاج الإنزيم

وجد ان افضل المصادر الكاربونية المستعملة هو الزايلوز إذ بلغت الفعالية الإنزيمية 7.07 وحدة/مل والفعالية النوعية 4.02 وحدة/ملغم (شكل 1) يليه الفركتوز والسكروز والكالاكتوز ثم المانوز واخيرا الارابينوز.



شكل (1) تأثير مصدر الكاربون في إنتاج إنزيم كلوكوز أيزوميريز من البكتريا *Streptomyces sp.* HM5

وبناءً على هذه النتائج فقد استعمل الزايلوز بوصفه مصدرا للكاربون في وسط إنتاج الإنزيم في المراحل اللاحقة من هذه الدراسة لكونه يحفز إنتاج الإنزيم بمعدلات عالية مقارنة مع مصادر الكاربون الأخرى. وتتفق هذه النتائج مع ما وجده Park & etal.,1976 ; Dalaly & Abdullah ,1986 من ان استبدال الزايلوز بالكلوكوز في البيئة المستعملة لإنتاج إنزيم كلوكوز أيزوميريز من بكتريا *Streptomyces* sp. تسبب في كبح إنتاج الإنزيم لذلك عّدَ الزايلوز مادة حاثة وضرورية لإنتاج الإنزيم.

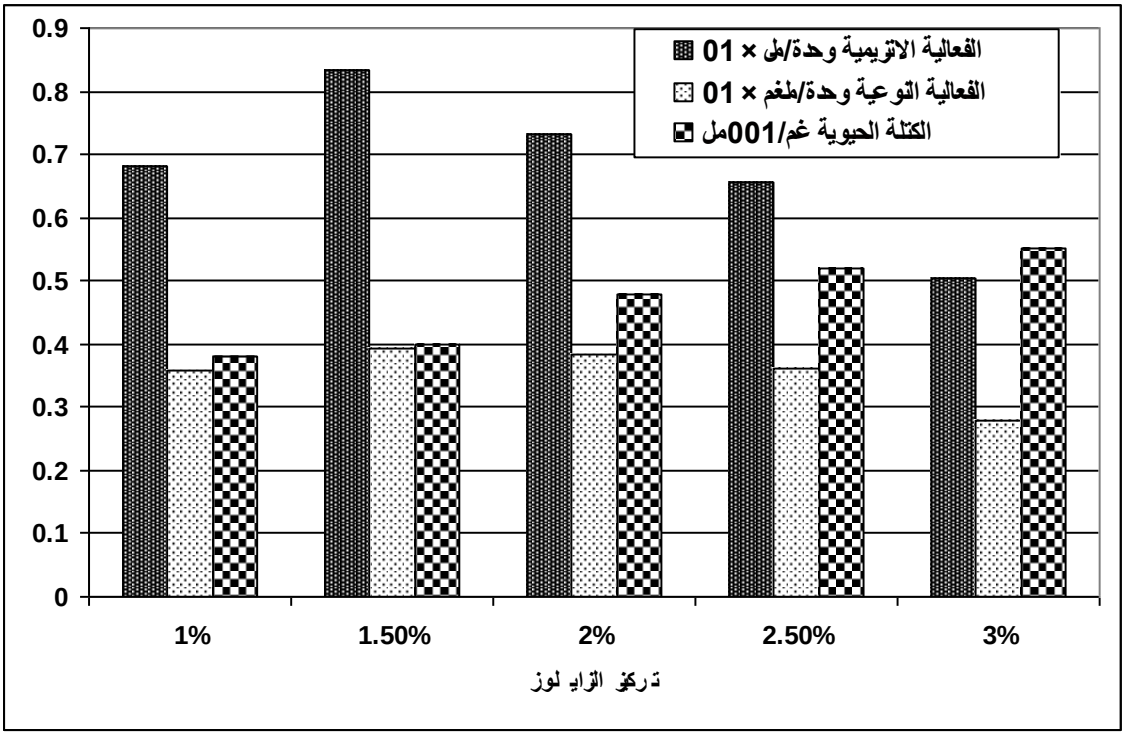
كما وجد Hong & etal.,1991 ان إنتاجية إنزيم كلوكوز أيزوميريز من بكتريا *Streptomyces luteogriseus* تتاثر بدرجة كبيرة باختلاف مصدر الكاربون إذ بلغت الإنتاجية بدلالة الفعالية 3.97 و1.6 و1.4 و1.09 و0.92 وحدة/مل بوجود الزايلوز والكالاكتوز والمانوز والفركتوز والسكروز والكلوكوز في وسط الإنتاج على التوالي.

في حين اشار Joo& Rhee, 1997 إلى ان إنتاجية إنزيم كلوكوز أيزوميريز من العزلة J-59 *Streptomyces chibaensis* كانت عند حدودها القصوى باستعمال الزايلوز

بنسبة 0.4−1% كمصدر للكاربون إذ بلغت فعالية الإنزيم 3.46 وحدة/مل مقارنة بالفعالية الإنزيمية التي تراوحت من 0.2−0.43 وحدة/مل عند استعمال مصادر أخرى مختلفة للكاربون شملت على الكلوكوز والمانوز والفركتوز والرايبوز والارابينوز والسوريتول.

2- تحديد التركيز الأمثل للزايلوز

تبين النتائج الموضحة في الشكل (2) ان افضل تركيز للزايلوز لغرض إنتاج الإنزيم بفعالية إنزيمية وفعالية نوعية عالية هو 1.5% كما لوحظ زيادة في الكتلة الحيوية للبكتريا مع زيادة تركيز الزايلوز في الوسط.



شكل (2) تأثير تركيز الزايلوز في إنتاج إنزيم كلوكوز أيزوميريز من البكتريا *Streptomyces sp*. HM5

ان الزيادة في الفعالية الإنزيمية والفعالية النوعية لم تكن متوافقة مع الزيادة في الكتلة الحيوية. فمثلا بلغت الكتلة الحيوية عند التركيز 3% حوالي 0.55 غم/100مل وان الفعالية الإنزيمية والفعالية النوعية كانت 5.05 وحدة/مل و2.80 وحدة/مل على التوالي في حين كانت

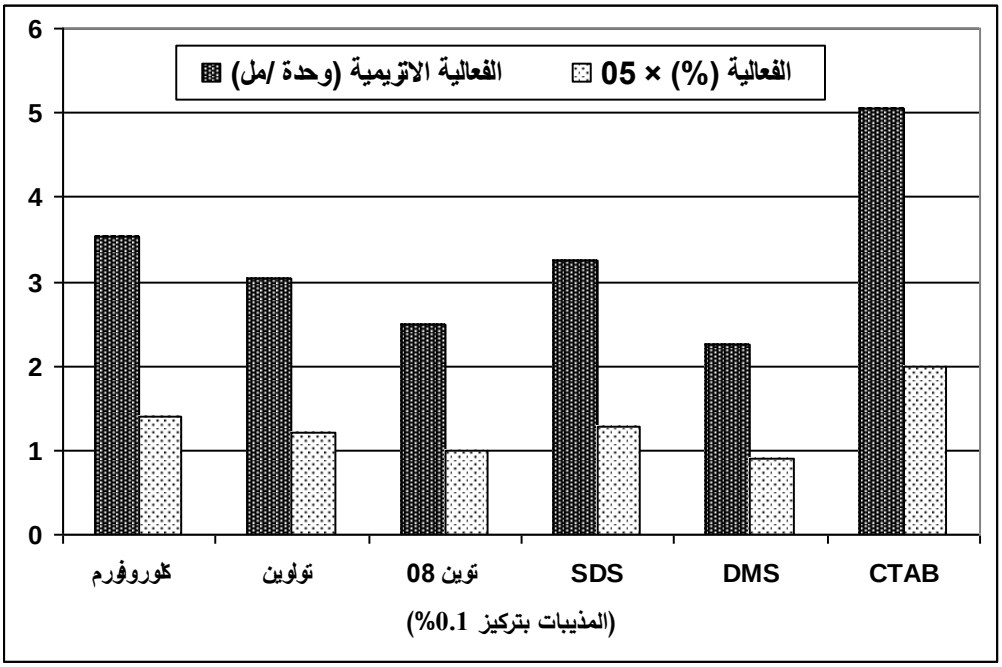
الكتلة الحيوية عند التركيز 1.5% حوالي 0.4 غم/100مل والفعالية الإنزيمية والفعالية النوعية عند اقصاها إذ بلغت 8.33 و3.92 وحدة/مل على التوالي.

وهذا يعني ان زيادة الكتلة الحيوية والذي تتبعه زيادة في الكمية المنتجة من الإنزيم لا يعني بالضرورة زيادة الفعالية الإنزيمية أو الفعالية النوعية لذلك الإنزيم. وهذا يتفق مع ما وجده Joo & Rhee ,1997 الذي وجد ان الكتلة الحيوية لبكتريا *Streptomyces chibaensis* T-59 ازدادت من 0–0.4 غم/100مل بزيادة تركيز الكلوكوز من 0–0.5 في حين بلغت الفعالية الإنزيمية اقصاها 2.7 وحدة/مل عند التركيز 0.15% من الكلوكوز بعدها انخفضت إلى 0.95 وحدة/مل عند التركيز 0.5% من الكلوكوز.

وعلى ضوء ما تقدم من نتائج فقد اعتمد على استعمال الزايلوز بتركيز 1.5% كافضل تركيز في الوسط المستعمل لإنتاج الإنزيم من العزلة المحلية *Streptomyces* sp. HM5 في المراحل اللاحقة من هذه الدراسة.

3- تحديد مصدر النتروجين الأمثل لإنتاج الإنزيم

اختبر عدد من المصادر العضوية واخرى غير العضوية واضيفت بتركيز 1% إلى وسط الإنتاج لدراسة تاثيرها في إنتاج إنزيم كلوكوز أيزوميريز من العزلة المحلية Streptomyces sp. HM5 ووجد ان افضل تلك المصادر يتمثل بالببتون إذ بلغت الكتلة الحيوية 0.45 غم/100مل والفعالية الإنزيمية والفعالية النوعية 8.83 و4.09 وحدة/ملغم على التوالي يلي ذلك التربتون والبروتيوز–ببتون واليوريا بينما انخفضت الكتلة الحيوية والفعالية الإنزيمية والفعالية النوعية في الاوساط الحاوية على المصادر غير العضوية بشكل كبير.



شكل (3) مقارنة كفاءة المذيبات المختلفة في استخلاص إنزيم كلوكوز أيزوميريز المنتج من بكتريا *Streptomyces sp.* HM5

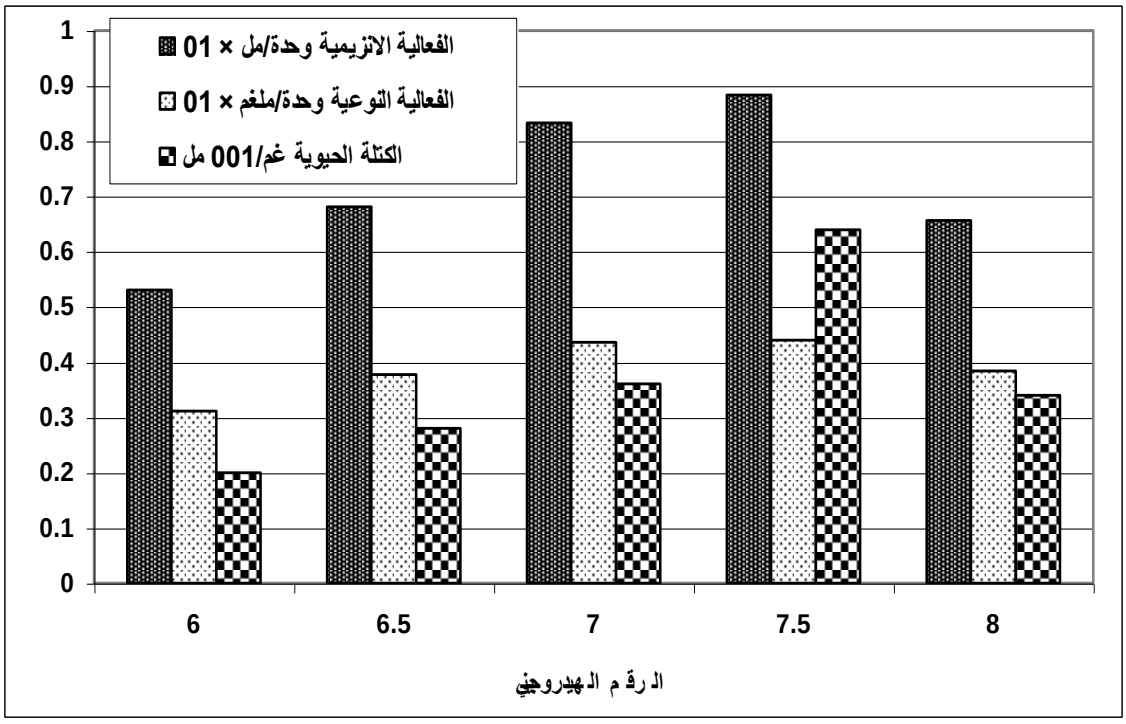
وعلى ضوء هذه النتائج فان المصادر النتروجينية العضوية تعد عموما افضل من المصادر النتروجينية غير العضوية في إنتاج الإنزيم من العزلة المحلية كما ان الببتون يعد افضل المصادر النتروجينية العضوية لذلك فقد استعمل كمصدر للنتروجين في الوسط المعد لإنتاج إنزيم كلوكوز أيزوميريز في التجارب اللاحقة من هذه الدراسة.

وتتفق هذه النتائج مع ما وجده Park &etal, 1976; Joseph& Murthy ,1977 حول استعمال الببتون بنسبة 1% في الاوساط المعقمة لإنتاج إنزيم كلوكوز أيزوميريز من الاحياء المجهرية المختلفة إلاّ ان عدد من الباحثين اشاروا إلى ان استعمال نقيع الذرة يعد افضل مصدر نتروجيني عضوي لإنتاج إنزيم كلوكوز ايزوميريز(Chen & etal.,1979a ; Hong &etal.,1991; Joo & Rhee,1997) .

4- تحديد الرقم الهيدروجيني الابتدائي الأمثل لإنتاج الإنزيم

لوحظ زيادة الكتلة الحيوية المتكونة وإنتاجية الإنزيم بدلالة الفعالية الإنزيمية والفعالية النوعية بزيادة الرقم الهيدروجيني لغاية 7.5 ثم عاد إنتاج الإنزيم والكتلة الحيوية فشهد انخفاضا

بزيادة الرقم الهيدروجيني الابتدائي إلى 8 ، إذ بلغت الكتلة الحيوية المتكونة 0.34 غم/100مل والفعالية الإنزيمية والفعالية النوعية 6.65 و3.84 وحدة/مل على التوالي عند pH مساوٍ لـ 8 بعد ان كانت قد بلغت 0.64 غم/100مل و8.83 و4.4 وحدة/ملغم على التوالي في الرقم 7.5 (شكل 4) عليه عد الرقم الهيدروجيني الأمثل 7.5 الأمثل لإنتاج الإنزيم واعتمد في التجارب اللاحقة.

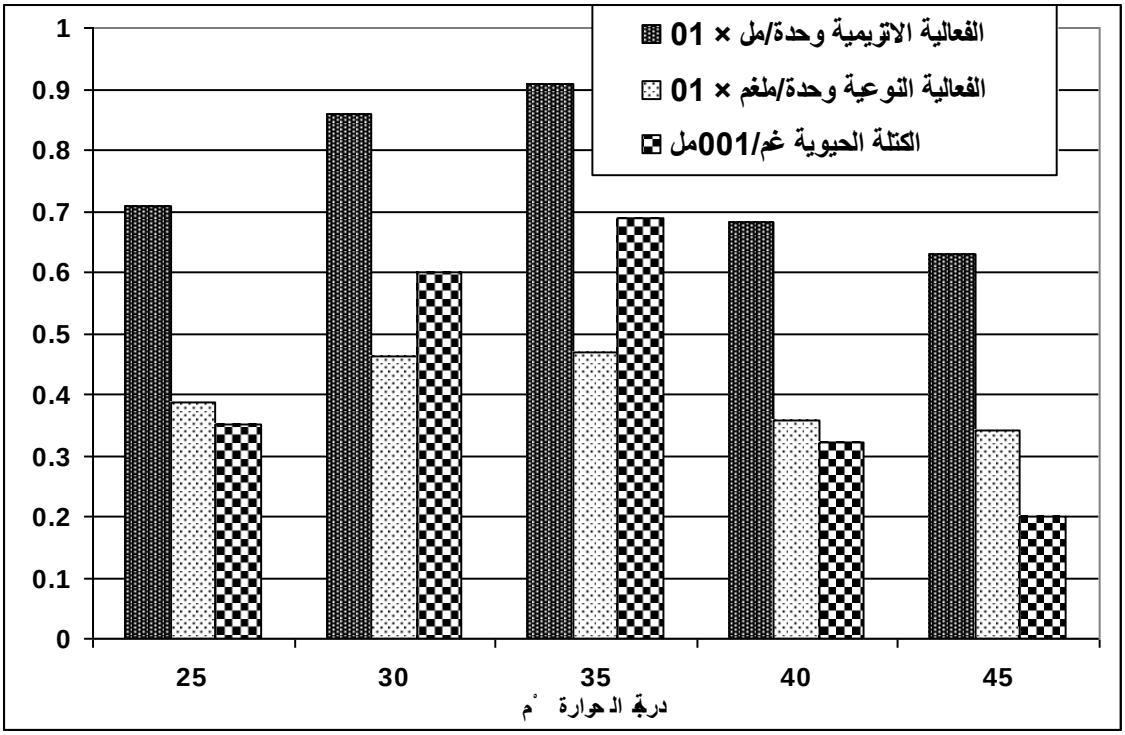


شكل (4) تأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي في إنتاج إنزيم كلوكوز أيزوميريز من البكتريا *Streptomyces sp.* HM5 وباستعمال الزايلوز بتركيز 1.5% والببتون 1% مصدرا للكاربون والنتروجين على التوالي

وقد تباينت الدراسات في تحديد الرقم الهيدروجيني الابتدائي الأمثل لإنتاج إنزيم كلوكوز أيزوميريز إذ اشار كل من Chen &etal., 1979a و Bok &etal 1984 و Pedersen ,1993و Kown &etal.,1987 والعبيدي , 2004 إلى الرقم الهيدروجيني الأمثل لإنتاج الإنزيم يتراوح بين 5–10 اعتمادا على نوع الكائن المجهري المستخدم لغرض إنتاج الإنزيم.

5- تحديد درجة الحرارة المثلى لإنتاج الإنزيم

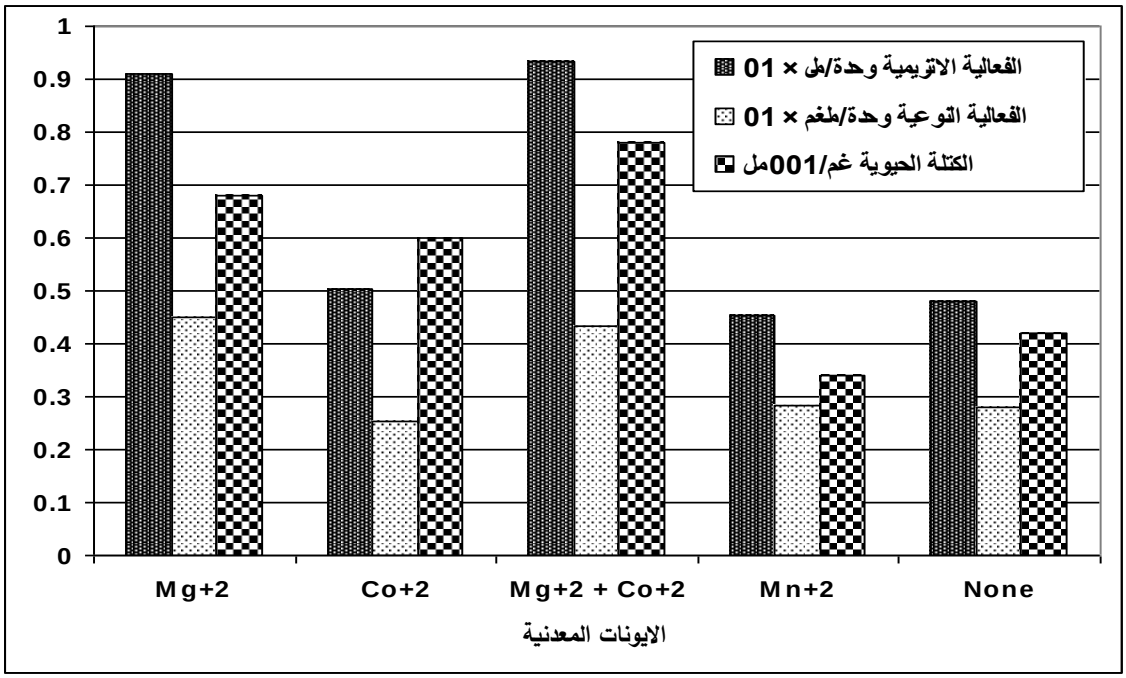
اظهرت النتائج الموضحة في الشكل (5) ان درجة الحرارة المثلى لإنتاج الإنزيم هي 35°م إذ بلغت الكتلة الحيوية 0.69 غم/100مل في حين بلغت الفعالية الإنزيمية والفعالية النوعية 9.09 و4.69 وحدة/مل على التوالي. تعد هذه النتائج قريبة لما وجده الكثير من الباحثين الذين استعملوا درجة حرارة 30°م لإنتاج الإنزيم من البكتريا الخيطية (Park & etal., 1976 ; Joseph & Murthy ,1977 ; AL Tai & etal ,1987 : Joo & Rhee,1997). في حين وجد (Lobanok & etal.,1998). ان الحرارة المثلى للإنتاج هي 25°م من احدى العزلات التابعة لجنس *Streptomyces* ، فيما اشار Wang& etal,1998 ان درجة الحرارة 37°م تعد هي المثلى لإنتاج إنزيم كلوكوز أيزوميريز من بكتريا *Streptomyces lividans*.يعود هذا التباين بدرجة الحرارة المثلى لإنتاج الإنزيم إى اختلاف نوع الكائن المجهري المستخدم إذأن لدرجةالحرارة اثرا بارزا في تحديد نشاط وفعالية الاحياء المجهرية المختلفه حيث لها تاثير بارز على معدل النمو والايض والصفات الفسلجية.



شكل(5) تاثير درجة الحراره في انتاج انزيم كلوكوز ايزوميريز من البكتريا *Strepyomyces sp.* HM5 وباستعمال الزايلوز بتركيز 1.5% والببتون1% مصدرا للكاربون والنتروجين على التوالي ، والرقم الهيدروجيني للوسط 7.5

6- تحديد تأثير الايونات المعدنية في إنتاج الإنزيم

اظهرت النتائج في الشكل (6) تفوق المعاملة التي استعمل فيها ايونات المغنيسيوم والكوبلت معا من حيث كمية الكتلة الحيوية و الفعالية الإنزيمية المنتجة بالمقارنة مع بقية المعاملات إذ بلغت الكتلة الحيوية 0.78 غم/100مل والفعالية النوعية 9.34 وحدة/مل في حين اثرت المعاملة التي استعمل فيها المنغنيز سلبيا على الكتلة الحيوية وفعالية الإنزيم والفعالية النوعية إذ انخفضت إلى 0.34 غم/100مل و4.54 و2.83 وحدة/مل على التوالي.



شكل (6) تأثير الايونات المعدنية في إنتاج إنزيم كلوكوز أيزوميريز من البكتريا *Streptomyces sp.* HM5 وباستعمال الزايلوز بتركيز 1.5% والببتون 1% مصدرا للكاربون والنتروجين على التوالي ، والرقم الهيدروجيني للوسط 7.5 ودرجة الحرارة 35°م

أما اضافة ايونات الكوبلت فقط فكان تاثيرها اقل من تأثير اضافة المغنيسيوم لوحده في زيادة إنتاج الإنزيم مقارنة بالمعاملة التي لم يستعمل فيها أي من الأملاح المعدنية (معاملة السيطرة) إذ بلغت إنتاجية الإنزيم بدلالة فعاليته الإنزيمية وفي الوسط الحاوي على الكوبلت 5.05 وحدة/مل وفي الوسط الحاوي على المغنيسيوم 9.09 وحدة/مل وفي معاملة السيطرة 4.79 وحدة/مل.

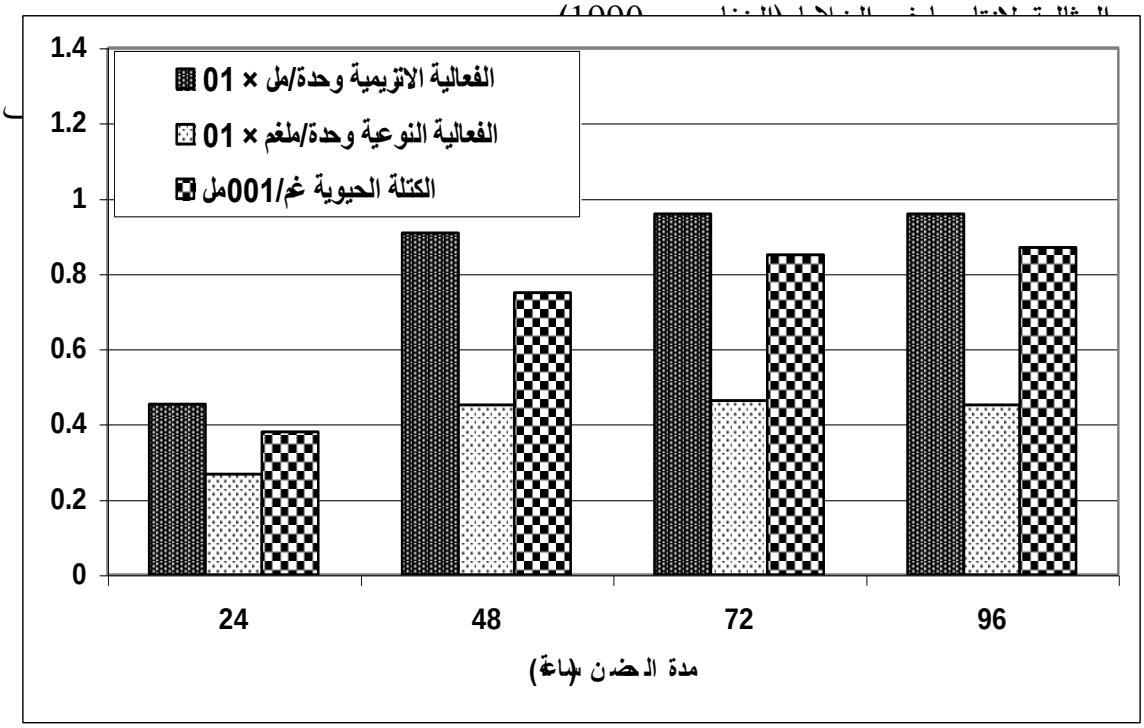
وفي ضوء هذه النتائج فقد استعملت ايونات المغنيسيوم والكوبلت معا بنسبة 0.05% من كل منهما في الوسط لإنتاج إنزيم كلوكوز أيزوميريز في المراحل اللاحقة من هذه الدراسة.

بصورة عامة فان وجود الايونات الموجبة ثنائية التكافؤ يعد ضروريا لإنتاج إنزيم كلوكوز أيزوميريز ويعتمد نوع تلك الايونات المطلوبة على نوع الكائن المجهري المعزول منه الإنزيم (Gaikwad & etal.,1992). وعلى هذا الأساس فقد تباينت الدراسات في تحديد نوع الايون وتركيزه الذي يجب ان يضاف للوسط المستعمل في إنتاج الإنزيم ، فقد اشار Chen & etal ., 1979a إلى ان اضافة ايونات المنغنيز أو الحديد Fe^{+2} إلى وسط إنتاج الإنزيم من بكتريا *Streptomyces flavogriseus* يؤدي إلى زيادة معنوية في إنتاج الإنزيم بخلاف ايونات الكوبلت التي لا تؤثر في الإنتاج سلبا أو ايجابا. وعلى النقيض من ذلك فقد اشار Bhosale & etal ., 1996 إلى ضرورة وجود املاح الكوبلت في الاوساط المستعملة لإنتاج إنزيم كلوكوز أيزوميريز ولا سيما من بكتريا *Streptomyces* المحبة للحرارة المعتدلة.

7- تحديد مدة الحضانة المثلى لإنتاج الإنزيم

لوحظ ان الكتلة الحيوية تزداد بزيادة مدة الحضن وبلغت اقصاها إلى 0.87 غم/100مل بعد 96 ساعة من الحضن ولم تكن تلك الزيادة متوافقة مع زيادة الفعالية الإنزيمية والفعالية النوعية إذ ارتفعت الفعالية الإنزيمية من 4.54 وحدة/مل بعد 24 ساعة من الحضن إلى 9.59 وحدة/مل بعد 72 ساعة من الحضن. ثم ثبتت الفعالية الإنزيمية بعد 96 ساعة من الحضن أما الفعالية النوعية فقد شهدت انخفاضا بعد 96 ساعة من الحضن إذ بلغت 4.51 وحدة/مل بعد ان كانت تزداد تدريجيا من 2.67 إلى 4.62 وحدة/مل للمدة من 24–72 ساعة من الحضن (شكل 7).

وجدير بالاشارة إلى ان تدهور إنتاجية الإنزيمات من الاحياء المجهرية بعد مدة الحضانة المثالية يعزى إلى دخول البكتريا مرحلة الثبوت العددي أو مرحلة الهلاك ولاسيما في المزارع المغلقة بسبب نفاذ مكونات الوسط وحدوث مجموعة من التغيرات فيها والتي تنعكس سلبا على الكتلة الحيوية وتسبب في تحلل الخلايا وتحرير إنزيمات محللة للبروتينات قد تؤثر في الإنزيم المطلوب إنتاجه ومن ثم هبوط فعاليته لذلك ينصح بوقف عمليات التخمر قبل الوصول إلى مرحلة تحلل الخلايا عندما يراد تحضير الإنزيمات وخصوصا الداخلية منها تحت الظروف



شكل (7) تأثير مدة الحضانة في إنتاج إنزيم كلوكوز أيزوميريز من البكتريا *Streptomyces sp.* HM5 وباستعمال الزايلوز بتركيز 1.5% والببتون 1% مصدرا للكاربون والنتروجين على التوالي ، والرقم الهيدروجيني للوسط 7.5 ودرجة الحرارة 35°م وبوجود املاح الكالسيوم والكوبلت بتركيز 0.05% من كل منهما

وعلى ضوء هذه النتائج فقد اختيرت مدة الحضن المثلى لانتا إنزيم كلوكوز أيزوميريز هي 72 ساعة ذلك لان اطالة مدة الحضن تعد غير مجدية اقتصاديا خصوصا عندما تكون الفروق في الفعالية الإنزيمية والنوعية طفيفة أو معدومة.

وتباينت الدراسات في تحديد مدة الحضن اللازمة لإنتاج إنزيم كلوكوز أيزوميريز تبعا لاختلاف نوع الكائن المجهري وظروف إنتاج الإنزيم خصوصا درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني للوسط إلاّ انها بشكل عام تراوحت بين 24 ساعة إلى اربعة أيام (Joseph &Murthy etal.,1977 ; Chen &etal,1979a ; Hong & etal.,1991; Joo & Rhee ,1997 ; العبيدي , 2004) .

المصـــــــــادر

1. الخفاجي ، زهرة محمود. (1990). التقنية الحيوية – مطابع دار الحكمة للطباعة والنشر. جامعة بغداد (تأليف).
2. العبيدي ، سعد حسين خضير. (2004). استخلاص وتوصيف إنزيم الكلوكوز أيزوميريز المنتج من البكتريا الخيطية المحلية ودراسة تحسين إنتاجه باستخدام أشعة كاما. أطروحة دكتوراه. كلية العلوم – جامعة بغداد.
3. محي الدين ، محمد عمر وجبر ، حميد عبود ودلالي ، باسل كامل (2004) إنتاج إنزيم كلوكوز ايزوميريز من عزلة محلية من بكتريا *Streptomyces* sp. HM5 1- العزل والغربلة والتشخيص. (البحث قيد النشر).
4. Al-Tai, A. M.; Ali, Y. and Abdul–Razzak, S. H. (1987). Isomerization of glucose to fructose: Production and some properties of glucose isomerase from Sterptomyces sp. strain C7. Enzyme Microb. Technol. 9: 632-634.
5. Anon, (1975). Chem. Engineering News. Aug. 18, 53, 22. (Cited in Joseph, R. & Murthy, 1976).
6. Bhosale, S. H.; Rao, M. B. and Deshpande ,V. V. (1996). Molecular and industrial aspects of glucose isomerase. Microbiol. Rev. 60 (2): 280-300.
7. Bok, S. H.; Seidman, M. and Wopat, P. W. (1984). Selective isolation of acidophilic Streptomyces strains for glucose isomerase productio. Appl. Environ. Microbiol. 47: 1213-1215.

8. Chen, W. P.; Anderson, A. W. and Han, Y. W. (1979a). Extraction of glucose isomerase from Streptomyces flavogriseus. Appl. Environ. Microbiol. 37: 785-787.
9. Chen, W. P.; Anderson, A. W. and Han, Y. W. (1979b). Production of glucose isomerase by Streptomyces flavogriseus. Appl. Environ. Microbiol. 37: 324-331.
10. Dalaly, B. K. and Abdullah, M. S. (1986). Isolation and partial characteization of glucose isomerase from Streptomyces. Zanco (Iraqi) V. 4 (Supplement): 131-139.
11. Dische, Z. and Borenfreund, E. A. (1951). A new spectrophotometric method for the detection and determination of keto sugar and trioses. J. Biol. Chem. 192: 583-587.
12. Gaikwad, S. M. , Rao, M. and Deshpande, V. V. (1992). D- glucose / xylose isomerase Streptomoyces: Differential roles of magnesium and cobalt ions. Enzyme Microb. Technol. 14: 317-320.
13. Gray, F.; Little, T.; Hurt, and patty, G. (1978). sugar and sweetener: Situation and outlook. U. S. department of agriculture 3: 4-8.
14. Hanover, L. M. and White, J. S. (1993). Manufacturing, composion and application of fructose. The American J. of Clinical Nutrition 58: 1245-1325.
15. Hong, S. S; Baek, J. K. , Lee, H. S.; Kuk, S. U. and Park; K. H. (1991). Isolation of glucose isomerase- Producing microorganisms, *Streptomyces luteogriseus* and determination of fermentation conditions. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 19 (3): 296-302.
16. Joo, G. J. and Rhee, I. K. (1997). Production of glucose isomerase from xy/b mutant *Streptomyces chibensis* J- 59. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 25 (1): 75-81.

17. Joseph, R.; S. and Murthy, V. S. (1977). Isolation of Streptomyces having high glucose isomerase activity and assessment of their efficiency in the production of fructose syrup. J. Food Sci. Technol. 14: 73-77.
18. Kaneko, T.; Takahashi, S. and Saito, K. (2000). Characteerization of acid-stable glucose isomerase from Streptomyces sp. and development of single-step processes for high-fructose corn sweetener production. Biosci. Biotechnol. Biochem. , 64 (5): 940-947.
19. Kwon, H.; Kitada, M. and Horikoshi, K. (1987) Purification and properties of D- glucose / xylose isomerase from alkalophilic Bacillus No. Kx-6. Agri. Biol-Chem. 51(7): 1983-1989.
20. Lobanok, A. G.; Sapunova, L. I.; Dikhtievski, Y. O. and Kazakevich, I. O. (1998). Screening of glucose isomerase-producing microorganisms. World J. Microbiol. & Biotechnol. 14: 259-262.
21. Marshall, R. D. and Kooi, E. R. (1957). Enzymatic conversion of D-glucose to fructose. Science. 125: 648-649.
22. Nelson, d. L. and Cox, M. M. (2000). Principles of Biochemistry. Worth Publishers, Madison and Avenue Inc. New York, USA.
23. Park, Y. K.; Chisaki, C. and Moretti, R. H. (1976). Characterization of cell bound glucose isomerase of Streptomyces bikiniensis. J. Food Sci. 41: 1383-1386.
24. Pedersen, S. (1993). Industrial aspects of immobilized glucose isomerase. Bioprocess Technol. 16: 185-208.
25. Pritham, G. H. (1998). Andersons Essentials in Biochemistry. P. 74, Mosby, New York, N. Y.

26. Proter, M. C.; Hartnagel, R.; Kowalsk, R; clemens, G.; Jasty, V.; J. and Awski, G. (1984). Safety evaluation of glucose isomerase derived from Flavobacterium arborescens and used in production of high fructose corn syrup. J. of Food Production, Vol. 47: 359-371.
27. Schenck, F. W. (2000) High Fructose syrups-review. Int. sugar. 102: 285-288.
28. Takasaki, Y.; Kosugi, and Kanbayashi, A. (1969). Studies on sugar isomerization enzyme. Production, crystallization and some properties of glucose isomerase from Streptomyces sp. Agric. Biol. Chem. 33: 1527-1534.
29. Vankatasubramanican, K. and Harrow, L. S. (1979). Design and operation of a commercial immobilized glucose isomerase reactor design. Annals of the New York Academy of Science V. 326 (28): 141-154.
30. Wang, F.; Whitaker, R. D. and Bath, C. A. (1998). Production of glucose isomerase in a recombinant strain of Streptomyces lividans. Appli. Microbiol. Biotechnol. 50: 65-70.

Production of Glucose isomerase from local Isolate of *Streptomyces* sp. HM5

2-Optimization of enzyme production conditions by submerged cultures

M. O. Muhyaddin
Dept. of Food Sci. & Biotech.
Coll. of Agric.
Univ. of Baghdad

H. A. Jabur
Dept. of Chemistry
Coll. of Science
Univ. of Diyala

B. K. Dalaly
Ministry of Agriculture

Abstract

This study was aimed to investigate the cultural requirements for production of glucose isomerase by locally isolated *Streptomyces* sp. HM5.

The optimum conditions for production of the enzyme by submerged culture was achieved on broth medium containing 1.5% of xylose as a sole carbon source and inducer for enzyme production , peptone with 1% as a nitrogen source and 0.05% of each one of magnesium sulfate and cobalt chloride as a metal ions source with an initial pH of 7.5 during an incubation period of 72 hours at 35°C.

This optimum conditions for enzyme activity attained 9.59 unit/ml. This means the enzyme activity increased about 192% in comparation with those before using optimum conditions.