المجلـة الليبيـة للغـذاء والتغذيـة
LIBYN JOURNAL OF
FOOD & NUTRITION

دراسة أفضل شروط لانتاج أنزيم جلوكوز ايزوميراز من بكتيريا الـ *Streptomyces* spp.

لما محمد عساف*

قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة حلب

المستخلص:

عزلت بكتريا *Streptomyces* من تربة حقل مزروع بالذرة، وشخصت العزلات مظهرياً وفيزيولوجياً وحيوياً حسب المشروع الدولي للستربتومايسيس ISP، وغربلت العزلات لتقييم قدرتها على انتاج انزيم جلوكوزايزوميراز باستخدام وسط كازئين نشا اغار (CSA) وذلك اعتماداً على كثافة النمو كمؤشر على استهلاك سكر الزايلوز، وتمت دراسة العوامل المؤثرة على انتاج أنزيم جلوكوز ايزوميراز من جراثيم *Streptomyces*، حيث كان أفضل زمن للتحضين هو96 ساعة، بلغت الفعالية الانزيمية العظمى (1066.67) وحدة/ل والفعالية النوعية (138) وحدة/غ، وكان أفضل نمو جرثومي وأعلى إنتاجية للإنزيم (1010) وحدة/ل والفعالية النوعية (162.64) وحدة/غ عند درجة حرارة تحضين 30 م، كما كان أعلى انتاج للإنزيم (1066.67) وحدة/ل وأعلى فعالية نوعية (151.3) وحدة/غ عند الأس الهيدروجيني7 (pH7)، ووجد أن استبدال سكر الزايلوز بسكريات أخرى، لم تستطع هذه السكريات إعطاء إنتاجية للإنزيم أكثر من الإنتاجية التي أعطاها سكر الزايلوز، حيث أعطى سكر الزايلوز أعلى فعالية أنزيمية وصلت الى (1066.67) وحدة/ل وفعالية نوعية (140.17) وحدة/غ، ولدى دراسة الشروط الأمثل لتحويل الجلوكوز الى فركتوز عند درجات حرارة مختلفة وبأزمنة مختلفة، تمكنت درجة الحرارة 70مْ لمدة 60 دقيقة من إعطاء أعلى تركيز للفركتوز وأعلى فعالية أنزيمية بلغت (826.67) وحدة/ل وأعلى فعالية نوعية وصلت الى (115.62) وحدة/غ وذلك ناتج عن كتلة حيوية بوزن (7.15)غ.

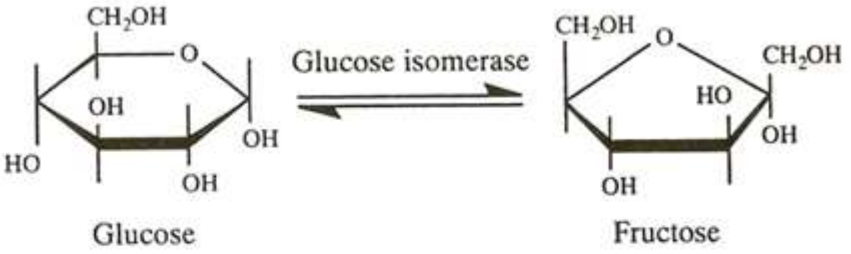
الكلمات المفتاحية.: *Streptomyces*، جلوكوز ايزوميراز، انتاجية، فعالية نوعية

*للمراسلة: lamaassaf403@gmail.com

المقدمة :

يعد إنزيم جلوكوزز ايزوميراز (GI) أحد الانزيمات الداخلية(Intracellular enzyme) ، والمنتج من قبل أنواع مختلفة من الأحياء الدقيقة كالبكتريا والخمائر والأعفان، وتعد البكتريا المصدر الأكبر لإنتاج الإنزيم ولاسيما البكتريا الخيطية كالأكتينوميسيتات (*Actinomyces*) التي تعد مصدراً غنياً لإنتاج المضادات الحيوية والإنزيمات التركيبية، *كما* ينتج من الا *Bacillus*، والـ *Corynebacterium*والـ *Arthobacter spp.*، والـ*Escherichia coli*، يتبع إنزيم جلوكوزز إيزوميراز إلى إنزيمات التماكب وهو ثالث الإنزيمات من حيث الأهمية التصنيعية والتطبيقية والطبية بعد إنزيمي الأميلاز والبروتيناز، فهو يحفز التماكب العكسي من D–جلوكوزز إلى D–فركتوز، واكتسب اكتشافه أهمية من الناحية الصناعية والتجارية لما يتميز به الفركتوز من خصائص فيزيائية ووظيفية جعلته يؤدي دوراً مهماً في التطبيقات التصنيعية أو الصناعية (حميد واخرون، 2010)، حيث استعمل شراب الذرة عالي الفركتوز High Fructose Corn Syrup (HFCS) كبديل طبيعي للسكروز في صناعة المشروبات الغازية والمعجنات والأغذية المصنعة، كما أن الفركتوز أقل ميلاً للتبلور وأكثر ذوباناً في الماء من الجلوكوز وبالتالي يمنع ظاهرة التسكر، كما يمنع ظاهرة الترمل لذلك فقد استعمل في صناعة المثلجات والألبان Amchanndran *et al*, (2013)، و تمثل عملية التحويل الانزيمية (Isomerization) للجلوكوزز الى الفركتوز الأساس في صناعة شراب الذرة عالي الفركتوز وقد استعمل هذا المنتج كبديل عن سكر المائدة (السكروز) في العديد من الصناعات الغذائية كصناعة المشروبات الغازية بنسبة 50% وصناعة المعجنات بنسبة 22% والأغذية المصنعة بنسبة 23% وصناعات أخرى بنسبة 4%، وذلك نظراً لارتفاع أسعار السكر مقارنة شراب الذرة عالي الفركتوز وزيادة الطلب عليه اذ يبلغ معدل استهلاك الفرد من السكر حوالي 50كغ/سنة، ويتميز الفركتوز عن الجلوكوز ببعض الخصائص الفيزيائية والوظيفية كقابليته العالية للذوبان في الماء وميله القليل للتبلور وارتفاع حلاوته التي تعادل 2.34 و 1.73مرة من حلاوة الجلوكوز والسكروز على التوالي مما جعلته يلعب دوراً مهماً من التطبيقات الصناعية(Bhavana *et al*, 2014)

يعد إنتاج شراب الذرة عالي الفركتوز باستخدام انزيم الجلوكوز ايزوميراز (Glucose isomerase) التطبيق الصناعي الرئيسي لتكنولوجيا الإنزيمات من خلال تحويل الجلوكوز إلى الفركتوز، الذي يحفزه أنزيم إيزوميراز الجلوكوز ذو الأصل الميكروبي، حيث تقوم عملية الايزوميراز بتحويل حوالي 45٪ من سكرالجلوكوز الموجود في نشا الذرة إلى الفركتوز. وذلك بفسفرة الجلوكوز بتنشيط السكريد عن طريق الفسفرة على ذرة الكربون السادسة، ثم تتم عملية التحويل من الجلوكوز 6–فوسفات إلى الفركتوز 6–الفوسفات بواسطة أنزيم الجلوكوز ايزوميراز Bhosale *et al*, (1996) , ويبين الشكل رقم (1) آلية عمل الايزوميراز:



الشكل (1) آلية عمل الايزوميراز

أهداف البحث:

1- الحصول على عزلات نقية لجنس *Streptomyces* من التربة.

2- دراسة أفضل الشروط اللازمة لانتاج أنزيم جلوكوزز ايزوميراز من جراثيم *Streptomyces*.

3- دراسة أفضل الشروط اللازمة لتحويل الجلوكوز الى فركتوز والتي تعطي أفضل إنتاجية.

4- تقدير فعالية انزيم جلوكوزز ايزوميراز وتحديد وزن الكتلة الحيوية.

الدراسات السابقة:

استخلص Chen وزملاؤه عام 1979هذا الإنزيم من بكتريا *Streptomyces flavogrises* باستخدام المذيبات العضوية بوجود منظم يحوي على 0.1 % من أستيل ثلاثي مثيل بروميد الأمونيوم (Acetyl tri-methyl bromide)(CTMB) الذي يعمل على مهاجمة الروابط في جدر الخلايا اثناء التحضين عند درجة حرارة37 م° لمدة ساعتين والتحريك المستمر يعقبها الطرد المركزي بسرعة 12000 دورة في الدقيقة لمدة 15 دقيقة ثم فصل الراسب واستعمل الرائق كمحلول إنزيمي(Chen and Anderson, 1979).

درس Habeeb واخرون عام 2016 تأثير أهم العوامل على إنتاج أنزيم الجلوكوز إيزوميراز من جراثيم *Streptomyces* وبلغ الحد الأقصى من انتاج الانزيم 13.6 U/ml عند استخدام وسط يحوي 1 ٪ من الزيلوز كمصدر وحيد للكربون وكمحفز لإنتاج الأنزيم، بالإضافة إلى 0.05 ٪ كبريتات الماغنيسيوم و0.05 ٪كلوريد الكوبالت كمصادر معدنية، ودرجة حموضة pH 7خلال 48 ساعة تحضين عند درجة حرارة 25 مْ وبلغ النشاط الأنزيمي 13.6 U/ml، وأشارت النتائج إلى زيادة النشاط بنسبة 175 ٪ مقارنة مع 7.44 U/ml قبل تطبيق الشروط المثلى(Habeeb *et al*, 2016).

تمت دراسة كفاءة انزيم الجلوكوز ايزميراز المنتج من قبل بكتريا الـ *Streptomyces sp. HM5* لتحويل الجلوكوز الى الفركتوز، حيث حضرت ثلاث عينات من شراب جلوكوزز

الذرة وعصير التمر والجلوكوز النقي، وقدرت نسبة الفركتوز المنتج باستخدام تقنية كروماتوغرافيا الصفائح الرقيقة (TLC)، أظهرت النتائج ان الزمن الأمثل لتحويل الجلوكوز الى الفركتوز في الخامات الثلاث تراوح بين 35-40 ساعة وان التركيز الأمثل لكل من شراب جلوكوزز الذرة والجلوكوز النقي وعصير التمر 20 %و30%و10%على التوالي، وان أفضل حجم للأنزيم هو 0.5 مل عند فعالية نوعية للأنزيم هي 10.8 U/ml (Breed *et al*, 1979)

عزلت بعض الجراثيم من تربة مدينة سيرادو البرازيلية *Aspergillus niger* و *Streptomyces spp.* واستخدمت كمصادر لأنزيم جلوكوزز أميلاز (GA) والجلوكوز ايزوميراز (GI)، وبعد التوصيف، أظهرت GA و GI درجة الحموضة الأمثل 4.5 و 8 على التوالي، كما أظهرت GA أعلى نشاط عند درجة حرارة 60م° وGI عند 85مْ، كما احتفظ GA و GI بـ 65% و 80٪ على التوالي من النشاط الأولي بعد 180 دقيقة من التحضين، وتم إنتاج شراب الفركتوز 42 ٪ (وزن / حجم) بعد 96 ساعة من التفاعل(.Storey and Chakrabati, 1979).

تم تحويل الجلوكوز الى الفركتوز في مفاعل سريري باستخدام انزيم جلوكوزز ايزوميراز المدمص على السطح الخارجي للألومينا، استخدم سكر الجلوكوز بنسبة 36 غرام و 50 غرام لكل 100مل من المحلول عند درجة حرارة 60مْ، كما تمت إضافة شوارد المغنيزيوم والكوبالت للوسط، واستخدمت 200-400 وحدة من الانزيم لكل غرام من السكر، وخلال 40 يوم تم تحويل حوالي 85% من الجلوكوز الى الفركتوز.(Yang *et al*, 2015).

وفي عام 2008 قام الباحث Kazemi بتحويل الجلوكوز الموجود في عصير التمر إلى شراب الذرة عالي الفركتوز باستخدام أنزيم جلوكوزز إيزوميراز للاستغناء عن عملية تحلل السكروز بسبب نسبة السكروز القليلة في عصير التمر المستخدمة، فقد وجد أن كمية الفركتوز المنتجة تزداد بزيادة درجة الحرارة، بالإضافة لأن إنزيم الجلوكوز إيزوميراز المقيد يكون ذو نشاط واستقرار أعلى عند درجة حرارة 50-60 مْ و pH= 7-7.7. .(Kazemi *et al*, 2006).

مواد وطرائق البحث:

1-جمع عينة التربة وعزل الجراثيم:

جمعت عينات التربة من عمق (10-15) سم من أرض كانت مزروعة بالذرة بأدوات معقمة، ونقلت الى مخابر كلية الزراعة في جامعة حلب، ثم جففت عند درجة حرارة الغرفة لمدة أسبوع، بعد ذلك خلط 1 غرام من هذه العينة مع 9 مل من الماء المقطر المعقم، ووضعت في حمام مائي مدة 1ساعة عند درجة حرارة 55مْ وذلك لضمان انتاج الأبواغ، ثم أجريت سلسلة تخفيفات ولغاية التخفيف السادس على أطباق بتري تحوي وسط كازئين نشاء الاغار(CSA)، وأضيف الأكتيديون (Cycloheximide) بتركيز 100µg/ml لمنع نمو الفطريات، ثم حضنت الأطباق لمدة 3أيام عند

30مْ، وبعدها تم اختيار المستعمرات المناسبة لإعادة زرعها على الوسط ذاته عدة مرات للحصول على عزلات نقية، ثم فحصت العزلات مجهرياً، وحددت المستعمرات على أساس مظهر المستعمرة (مسحوق، ملون) وحوافها (ناعم / خشن)، وحفظت عند الدرجة 4مْ.
.(Palazzi and Attilio, 1998)

2- تشخيص العزلات:

شخصت العزلات تبعاً للطرائق المتبعة في المشروع الدولي للستربتومايسيس ISP(International Streptomyces project)، وذلك باستخدام الطرائق المظهرية والفيزيولوجية وهي لون المشيجة الهوائية والأرضية وقدرتها على انتاج الصبغات، وشكل الأبواغ، كما استخدمت بعض الاختبارات الكيميوحيوية كاختبار الأوكسيديز، واختبار إستخدام السيترات، واختبار التحلل المائي للنشاء، واختبار تحلل الكازئيين، واختبار السكروز، واختبار تحلل الجيلاتين، واختبار التحلل المائي للدهون واختبار كبريتيد الهيدروجين، وانتاج الميلانين، واستهلاك بعض السكريات وهي الجلوكوز والمالتوز والفركتوز والنشا، والزايلوز والسكروز.(Parker *et al*, 2010).

3- فصل الجراثيم لتقييم قدرتها على انتاج أنزيم جلوكوزز ايزوميراز :

جرت عملية الفصل على مرحلتين، المرحلة الأولى وهي مرحلة الفصل الأولى زرعت العزلات بنقل loop بواسطة ابرة التلقيح من المستعمرات الى وسط الإنتاج الصلب الحاوي على مادة حاثة على انتاج الأنزيم وهي سكر الزايلوز ثم قورنت كثافة النمو بين العزلات، اذ تتناسب قابلية انتاج الانزيم طردياً مع كثافة النمو (Sathya and Ushadevi, 2014)، وقد استخدم الوسط التالي للغربلة 10 غ ببتون، 2.5 غ مستخلص الخميرة و 10غ كسيلوز و 5 غ كلوريد الصوديوم و 5 غ مستخلص اللحم البقري و 0.5 غ كبريتات الماغنيسيوم المائية ($MgSO_4.7H_2O$) و 18غ آجار في 1 ليتر من الماء المقطر وضبط الـ pH إلى 6.8.

المرحلة الثانية هي مرحلة الفصل الغربلة الثانوية باستخدام الوسط السابق مع استبعاد الآجار، حيث أجريت المقارنة بين العزلات على أساس تقدير الفعالية الإنزيمية للمستخلصات الخام للإنزيم المنتج بوجود سكر الجلوكوز كركيزة.(Sathya and Ushadevi , 2014).

4- استخلاص إنزيم جلوكوزز إيزوميراز من البكتريا المعزولة:

علقت الخلايا البكتيرية في 50 مل من محلول الاستخلاص 0.1 % من ستيل ثلاثي مثيل بروميد الأمونيوم (CTAB) في دوارق بسعة 300 مل، ووضعت في حاضنة هزازة مدة 24 ساعة وعند سرعة 150 دورة/دقيقة ودرجة حرارة 30مْ ، ثم فصل السائل الناتج بالطرد المركزي عند سرعة 8000 دورة /دقيقة مدة 15 دقيقة وحرارة 4مْ، أهمل الراسب وجمع الرائق الذي اعتبر مستخلصاً خاماً للإنزيم، ومن ثم قدرت فعاليته الإنزيمية.(Silva *et al*, 2009).

5- وزن الكتلة الحيوية الجافة:

بعد التحضين على البيئة السائلة، وزنت الكتلة الحيوية التي تم الحصول عليها وذلك بعد غسلها مرتين بالماء المقطر، وتجفيفها على ورقة الترشيح عند الدرجة 105مْ وقدرت نسبتها المئوية حسب ما ذكره

(Srivastava *et al*, 2010.)

<u>6- قياس فعالية إنزيم جلوكوزز إيزوميراز</u>

أضيف 0.2 مل من مستخلص الإنزيم إلى محلول التفاعل المكون من 0.5 مل من محلول فوسفات البوتاسيوم المنظم (0.2 M،pH8)، و 0.1 مل من محلول $MgSO_4.7H_2O$ (0.1 M)و 0.1 مل من محلول $CoCl_2·6H_2O$ (0.01 M) و 0.2 مل من محلول الجلوكوز (1M) وحضن مزيج التفاعل في حمام مائي عند درجة حرارة 70°م لمدة 60 دقيقة. تم أوقف التفاعل بإضافة 0.1 مل من محلول حمض البيركلوريك $HClO_4$، وللكشف عن الفركتوز الناتج أضيف 0.2من محلول Cysteine–Hydrochloride بتركيز (1.5 %)، و 6 مل من حمض الكبريتيك H_2SO_4بتركيز 70 % و 0.2 مل من محلول الكاربازول بتركيز 0.12 % المحضر بالكحول الايثيلي إلى محلول التفاعل ورج الخليط جيداً بواسطة ال Vortex وقيست الامتصاصية بالمطياف الضوئي عند طول موجي 560 نانومتر، وقدر تركيز الفركتوز المتحرر بفعل الإنزيم بالاستعانة بالمنحنى القياسي لمحلول الفركتوز، وتعرف وحدة الإنزيمUnit بأنها كمية الإنزيم التي تحرر ميكرومول واحد من الفركتوز خلال دقيقة واحدة عند ظروف التفاعل

.(Storey and Chakrabati, 1990)

<u>7-المنحنى القياسي للفركتوز:</u>

حضرت تراكيز متدرجة من محلول الفركتوز ذو التركيز 2.5 مل مول/ل: على الشكل التالي- 0-0.1-0.2-0.3-0.4-0.5-0.75 1 mmol، ونقل 1مل من المحاليل المحضرة إلى أنبوب اختبار وأضيف اليها 0.2 مل من محلول Cysteine–Hydrochloride بتركيز 1.5% و6 مل من حمض الكبريتيك بتركيز 70% و 0.2 مل من محلول الكاربازول بالكحول الإيثلي بتركيز 0.12% ومزج الخليط بشدة في جهاز Vortex ثم قيست الامتصاصية على طول موجي 560 نانومتر باستخدام جهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometer) وبعد تصفيره باستعمال محلول الشاهد (Thirumurugan and Vijayakumar, 2013).

<u>8- دراسة الظروف الأمثل لانتاج الأنزيم:</u>

حضر 50 مل من الوسط الأساسي لإنتاج الأنزيم والمكون من (10غ ببتون و 2.5 غ مستخلص الخميرة و 1 غرام زيلوز و 5 غرام كلوريد الصوديوم و 5 غ مستخلص اللحم البقري و 0.5 غ كبريتات المغنزيوم المائية ($MgSO_4.7H_2O$) وعدلت الـpH الى 7 في دورق 250 مل وتم إضافة 0.5 مل من معلق الخلايا، هزت الدوارق على حاضنة هزازة لمدة 250 د/د عند درجات حرارة

مختلفة، تم تقدير النمو البكتيري تبعاً للكتلة الحيوية المتشكلة مأخوذة على أساس المادة الجافة (Messing and Fillbert, 1975).

1- أفضل زمن للتحضين:

حضنت الدوارق عند درجة حرارة 30 مْ لمدة (12 و24 و36 و48 و60 و72 و84 و96 و120) ساعة وذلك لتحديد مدة التخمير الأفضل.

2- أفضل درجة حرارة تحضين:

حضنت الدوارق عند درجات حرارة تحضين مختلفة (20 و25 و30 و37 و45) لمدة 96 ساعة. وعند الانتهاء من التحضين، ثم تقدير النمو البكتيري وانتاجية الانزيم عند كل درجة حرارة.

3- أفضل مصدر كربوني:

استبدل سكر الزايلوز في الوسط التخميري بسكريات أخرى وذلك عند نفس التركيز المستخدم (1%) لمعرفة السكر الأفضل لعمليات التخمير.

4- أفضل درجة أس هيدروجيني (pH):

حضنت الدوارق عند درجات حموضة مختلفة تتراوح من 5.5 الى 9 عند درجة حرارة 30 مْ لمدة 96 ساعة، بعد ذلك ثم قدر النمو البكتيري وفعالية الانزيم .(White, 2017).

9- دراسة الزمن الأمثل لتحويل الجلوكوز الى فركتوز:

أضيف 0.2 مل من مستخلص الإنزيم إلى محلول التفاعل المكون من 0.5 مل من محلول فوسفات البوتاسيوم المنظم (0.2 M،pH8)، و 0.1 مل من محلول $MgSO_4.7H_2O$ (0.1 M)و0.1 مل من محلول $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (0.01 M) و0.2 مل من محلول الجلوكوز (1M) وحضن مزيج التفاعل في حمام مائي عند درجات حرارة مختلفة و بأزمنة مختلفة وهي (60مْ لمدة 90دقيقة) و(65مْ لمدة 75دقيقة) و(70مْ لمدة 60 دقيقة) و(75مْ.لمدة 40 دقيقة) و(80مْ لمدة 30 دقيقة) و(85مْ لمدة 10 دقائق)، تم أوقف التفاعل بإضافة 0.1مل من محلول حمض البيركلوريك $HClO_4$، وللكشف عن الفركتوز الناتج بفعل الإنزيم أضيف 0.2 من محلول Cysteine-Hydrochlorideبتركيز(1.5 %)، و6 مل من حمض الكبريتيك بتركيز 70 % و 0.2 مل من محلول الكاربازول بتركيز 0.12 % المحضر بالكحول الايثيلي إلى محلول التفاعل ورج الخليط جيداً بواسطة جهاز الرجاج وقيست الامتصاصية بالمطياف الضوئي عند طول موجي 560 نانومتر.(Yang *et al*, 2015).

النتائج والمناقشة:

1- الصفات المظهرية والمجهرية والحيوية لعزلات *Streptomyces*:

شخصت عزلات *Streptomyces* مظهرياً، باستخدام المجهر الضوئي بعد صبغها بصبغة غرام اذ ظهرت بشكل خلايا عصوية طويلة موجبة الغرام، ذات مستعمرات ملساء ومجعدة يتراوح مجال قطرها 1−2سم، تأخذ شكل الخيوط تحت المجهر، وتترتب الأبواغ الخارجية بشكل سلاسل حلزونية، وقد وجد أن هذه الصفات مشابهة لصفات *Streptomyces* حسب ماورد في تصنيف بيرجي (Breed et al, 1957). كما بين الفحص المجهري أن البكتريا تكون مستعمرات صلبة ذات سطح ناعم ولون أبيض طباشيري، تفوح منها رائحة التربة المبللة بشكل واضح.

وبالفحص المجهري تبين أن المشيجة الهوائية متفرعة وغير مقسمة، تحتوي في نهايتها على سلسلة من الأبواغ يتراوح عددها من 3 الى 14 بوغة، كما كان لها القدرة على انتاج الصبغات كما هو مبين من الشكل رقم (2).

الشكل (2) نمو عزلة *Streptomyces* على وسط CSA

وصفت العزلات فيزيولوجياً من خلال عدد من الاختبارات الكيميائية الحيوية كما هو موضح في الجدول رقم (1) اذ استطاعت العزلة من تحليل التايروزين والنشاء والجيلاتين وإنتاج أنزيم الكاتاليز، واستطاعت من تحلل Tween 80 وسكر الجلوكوز والفركتوز والزايلوز كمصدر كربوني، ولكنها لم تستهلك السترات كمصدر للكربون وليس لها القدرة على انتاج غاز H_2S، وعند تنميتها على ذات الوسط بعد إضافة نسبة معينة من بعض السكريات استطاعت استهلاك سكر الجلوكوز والفركتوز والسيللوز والكازئين والزايللوز والنشاء ولم تستطع استهلاك السكروز، وهذا يتوافق مع البحث .(Yang *et al*, 2015). وفيما يلي جدول رقم (1) يوضح نتائج هذه الاختبارات:

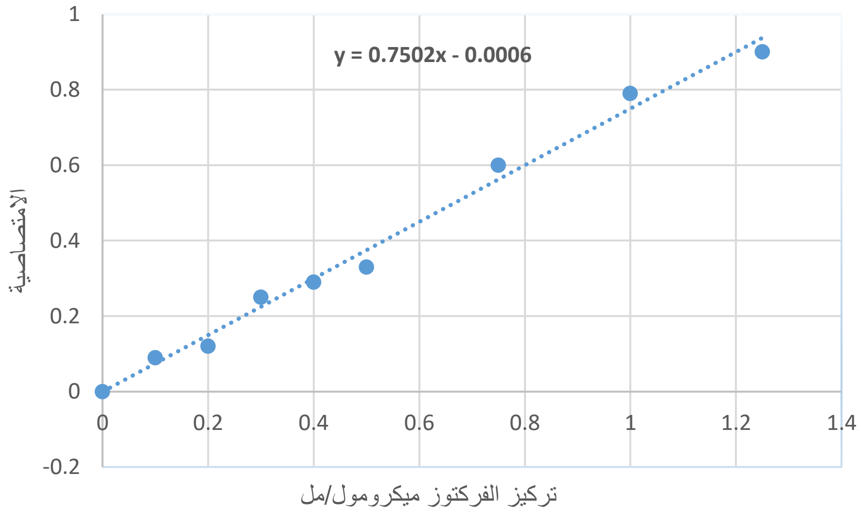
جدول(1) نتائج الاختبارات الكيميائية الحيوية لعزلة *streptomyces spp*

اسم الاختبار	نتيجة الاختبار
Oxidase	+
Citrate	−
H_2S	−
Lipedate	+
Gelatin	+

Starch	+
Sucrose	−
Glucose	+
Xylose	+
Tyrosin	+
Casein	+

2-قياس فعالية الأنزيم:

قيست الامتصاصية عند طول موجة 560 نانومتر باستخدام جهاز المطياف الضوئي (السبكتروفوتومتر) الذي تم تصفيره باستخدام محلول الشاهد المؤلف من جميع المحاليل السابقة عدا الفركتوز كما هو مبين في الشكل رقم (3)، حيث رسم المنحني القياسي لقيم الامتصاصية مقابل تراكيز الفركتوز وذلك لثلاثة مكررات لكل تركيز عند طول موجة 560 نانومتر، وقيست كمية الفركتوز الناتجة عن تحويل الجلوكوز الى الفركتوز بوجود أنزيم جلوكوزز ايزوميراز بالمعادلة التالية: Y=0.7502X−0.0006.

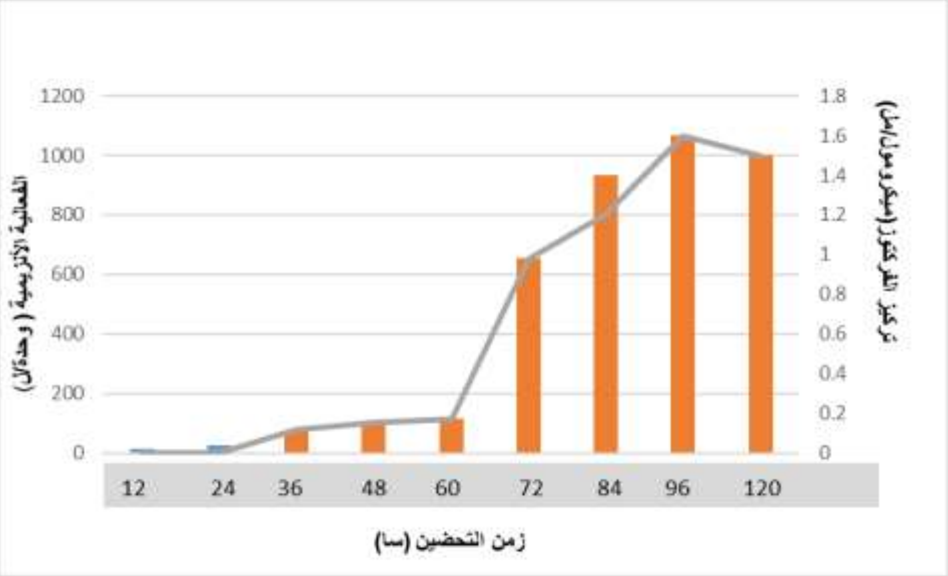


الشكل (3) المنحني القياسي لتراكيز الفركتوز على طول موجة 560 نانومتر

3- تأثير زمن التحضين:

أوضح الشكل رقم (4) تاثير زمن التحضين على انتاج أنزيم جلوكوزز ايزوميراز من قبل جراثيم *streptomyces*، وأظهرت النتائج أنه تم بدء انتاج الأنزيم بعد 24 ساعة من التحضين، ووصل نمو الخلايا الى أعلى مستوى له بعد 96 ساعة من التحضين، في حين بلغت الفعالية الانزيمية العظمى (1066.67) وحدة/ل وفعالية نوعية (138) وحدة/غ بعد 96 ساعة. وبذلك يكون أفضل زمن للتحضين هو 96 ساعة، وهذا يتوافق مع البحث .(Yassien *and* Fatani, 2018)، حيث بين Yassienو Fatani أن أفضل زمن لانتاج الانزيم واعطائه أعلى فعالية كان بعد أربعة أيام

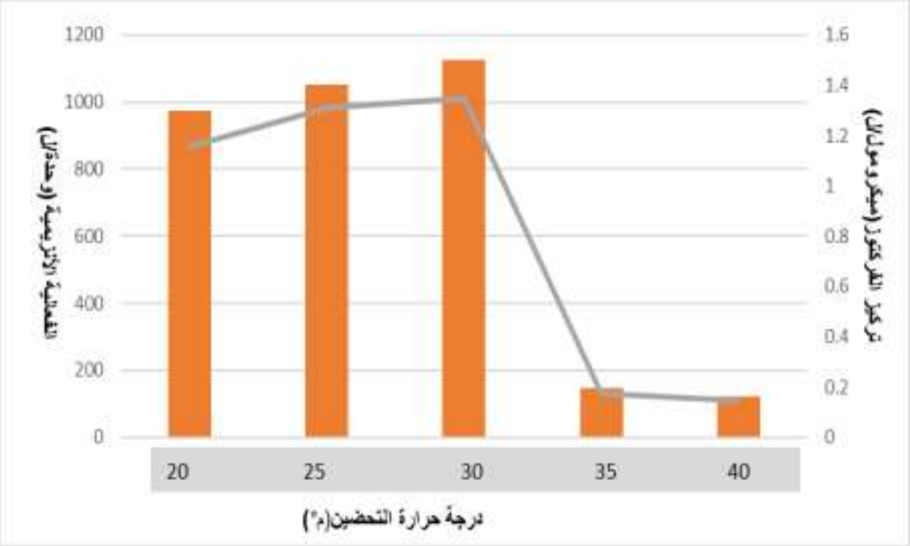
وفي اليوم الرابع تكون الجراثيم في طور النشاط والتي تستطيع فيه إعطاء أعلى إنتاجية من الانزيم، وقد كانت الاختلافات بين النتائج ذات دلالة إحصائية عند مستوى الدلالة (α= 0.05)وذلك بالعودة الى اختبار T.



الشكل (4) تأثير زمن التحضين على إنتاجية أنزيم جلوكوزز ايزوميراز عند 7pH ودرجة حرارة 30

4- تأثير درجة حرارة التحضين:

لوحظ عند دراسة تأثير درجة حرارة التحضين على النمو البكتيري وإنتاج الانزيم أن الجراثيم استطاعت ان تعطي كفاءة نمو جيدة ضمن مجال حراري من (25– 35) مْ، وكان أفضل نمو جرثومي واعلى إنتاجية للانزيم (1010) وحدة/ل عند درجة حرارة 30 مْ تحضين، وهذه الدرجة الأفضل لعمل الجراثيم وانتاجها الانزيم، وهذا ماتوصل اليه (Ray *and* Rossell, 2016)، ويبين الشكل رقم (5) مدى تفوق الدرجة 30 مْ على باقي المعاملات ووجود فروق ذات دلالة إحصائية عند مستوى الدلالة (α= 0.05)

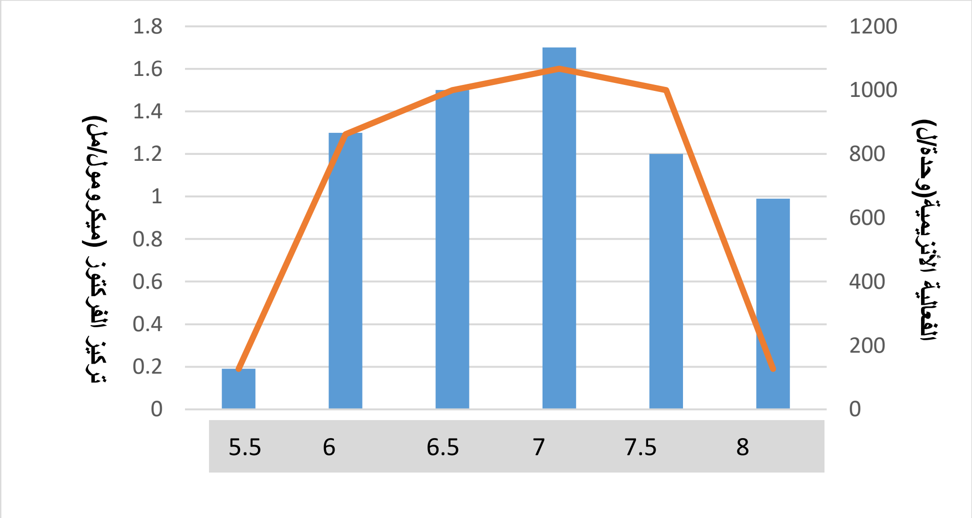


الشكل (5) تأثير درجة حرارة التحضين على إنتاجية أنزيم جلوكوزز ايزوميراز عند 7pH ولمدة 96 ساعة

5- تأثير الـpH :

لوحظ بأنه مع استخدام قيم مختلفة من الـpH تتراوح مابين (5.5-9.5) أصبحت pH الوسط النهائية ضمن المجال القلوي(8-8.5). وقد تم الحصول على أعلى نمو بكتيري وأعلى انتاج للأنزيم بعد 96 ساعة تحضين ضمن مجال pH 6.5-7.5. وبشكل عام تم الحصول على أعلى انتاج للانزيم (1066.67) وحدة/ل عند 7pH، وقد كانت الوهذا مأشار اليه البحث Williams, et al, 1983).

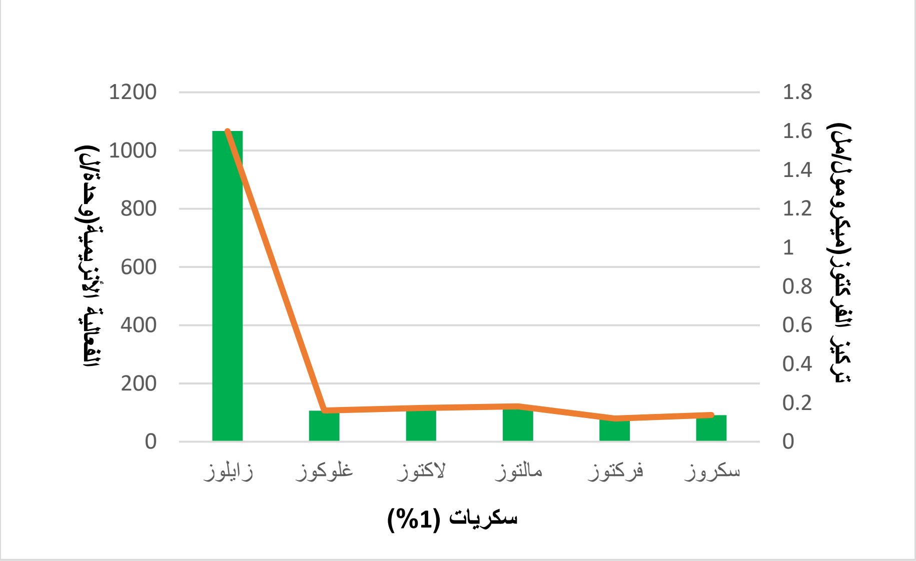
ويوضح الشكل رقم (6) الحصول على أعلى فعالية أنزيمية عند pH 7 وجود فروق ذات دلالة إحصائية عند مستوى الدلالة (α= 0.05)



الشكل (6) تأثير درجة الـpH على إنتاجية أنزيم جلوكوزز ايزوميراز عند درجة حرارة 30 مْ ولمدة 96 ساعة

6- تأثير السكريات الأخرى:

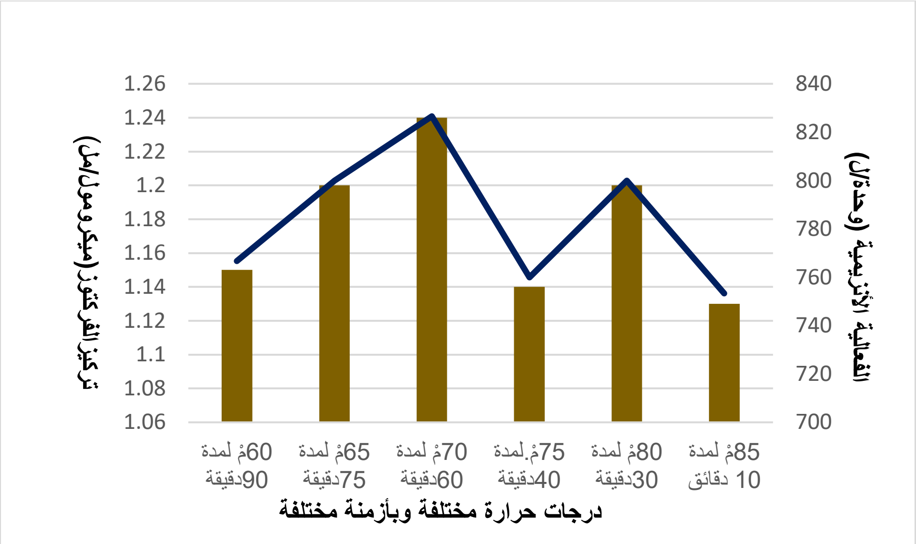
يوضح الشكل رقم(7) أنه عدم استطاعة جميع السكريات المستخدمة إعطاء إنتاجية أكبر من الانزيم التي تم الحصول عليها عليها عند اضافة 1% زايلوز الى الوسط، حيث أعطى سكر الزايلوز أعلى فعالية أنزيمية وصلت الى (1066.67) وحدة/ل وذلك كونه السكر الحاث لانتاج الأنزيم مقارنة بالسكريات الأخرى، وقد وجد فروق ذات دلالة إحصائية عند مستوى الدلالة (α= 0.05).



الشكل (7) إنتاجية أنزيم جلوكوزز ايزوميراز من سكريات مختلفة عند درجة حرارة 30مْ ولمدة 96 سا و7pH

7- أفضل شروط لتحويل الجلوكوز الى فركتوز:

بعد اجراء عملية الايزوميراز لتحويل الجلوكوز الى فركتوز عند درجات حرارة مختلفة وبأزمنة مختلفة استطاعت درجة الحرارة 70مْ لمدة 60 دقيقة إعطاء أعلى تركيز للفركتوز وأعلى فعالية أنزيمية بلغت (826.67) وحدة/ل وأعلى فعالية نوعية وصلت الى (115.62) وحدة/غ كما موضح في الشكل رقم (8) الذي بين تفوق درجة الحرارة 70مْ على باقي درجات الحرارة المستخدمة وذلك لمدة 60 دقيقة.



الشكل (8) تأثير معاملات مختلفة على تحويل الجلوكوز الى فركتوز

الخلاصة:

1- تم تشخيص عزلات *Streptomyces* مظهرياً باستخدام المجهر الضوئي بعد صبغها بصبغة غرام ظهرت بشكل خلايا عصوية طويلة موجبة الغرام، مستعمراتها ملساء ومجعدة، يتراوح مجال قطرها من 1-2 سم، وأخذت شكل الخيوط تحت المجهر، وترتبت الأبواغ الخارجية بشكل سلاسل حلزونية، وبالفحص المجهري تبين أن المشيجة الهوائية متفرعة وغير مقسمة، تحتوي في نهايتها على سلسلة من الأبواغ يتراوح عددها من 3 الى 14 بوغة، كما كان لها القدرة على انتاج الصبغات.

2-أفضل زمن للتحضين من أجل انتاج أنزيم جلوكوزز ايزوميراز من قبل جراثيم *streptomyces* هو96 ساعة، حيث بلغت الفعالية الانزيمية العظمى (1066.67 وحدة/ل) بعد 96 ساعة.

3- كان أفضل نمو جرثومي وأعلى إنتاجية للانزيم (1010) وحدة/ل والفعالية النوعية (162.64) وحدة/غ عند درجة حرارة 30 م تحضين.

4- تم الحصول على اعلى انتاج للانزيم (1066.67) وحدة/ل عند 7pH.

5-لم تستطيع السكريات المستخدمة التي تم استبدال سكر الزايلوز بها اعطاء إنتاجية انزيم أكبر من الإنتاجية التي تم الحصول عليها عند اضافة 1% زايلوز الى الوسط، حيث أعطى سكر الزايلوز أعلى فعالية أنزيمية وصلت الى (1066.67) وحدة/ل.

6-كانت درجة الحرارة 70مْ هي الأفضل لتحويل الجلوكوز الى فركتوز وذلك لمدة 60 دقيقة، حيث أعطت أعلى تركيز للفركتوز وأعلى فعالية أنزيمية بلغت (826.67) وحدة/ل.

المقترحات والتوصيات:

1ـ دراسة تأثير بعض العناصر المعدنية على انتاج أنزيم جلوكوزز ايزوميراز من جراثيم *Streptomyces*.

2ـ دراسة إنتاجية أنزيم جلوكوزز ايزوميراز من أحجام أكبر للوسط التخميري.

3ـ دراسة تأثير سكريات أخرى على انتاج أنزيم جلوكوزز ايزوميراز من جراثيم *Streptomyces*.

المراجع:

حميد عبود جبر ؛ محي الدين محمد عمر ؛ دلالي باسل كامل. 2010. دراسة كفاءة إنزيم جلوكوزز أيزوميريز المنتج من عزلة محلية من البكتريا Streptomyces sp. HM5في تحويل الجلوكوز إلى الفركتوز. علوم الأغذية والتقانات الاحيائية ،6(4)،8-11

Amchanndran, V., Pujar, N., Matey, T., Kulkarni, A., Ulkarni, S. (2013). Enzymatic Hydrolysis for Glucose. *International Journal of Science*, Engineering and Technology, *2*(10), 2-6.

Bhavana, M., Talluri, V. P., Siva, K. K., Rajagopal, S. V. (2014). Optimization of culture conditions of Streptomyces (MTCC-11062) for the production of antimicrobial compound. *International Journal of PHarmacy and PHarmaceutical Sciences*. *6*(8), 0975-1491.

Bhosale, S.H., Rao, M.B., Deshpane, V. (1996**)**. Molecular and Industrial Aspects of Glucose Isomerase. *Division of Biochemical Sciences, National Chemical Laboratory*, *60*(2), 280–300.

Breed, R., Murry, E.G.D., Smith, N. (1957). Bergy,s Manual of determination bacteriology, *the Williams and Wilkins company*, 7th ed.

Chen, F., Anderson, A. W. (1979). Purification, Immobilization, and Some Properties of Glucose Isomerase from Streptomyces flavogriseust. *Department of Microbiology*, Oregon State University, Corvallis, *38*(6), 54-55.

Gaily, M. H., Sulieman, A.K., Abasaeed, A. E. (2013*)*.Kinetics of a Three-Step Isomerization of Glucose to Fructose Using Immobilized Enzyme. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, Technology and Innovation Plan (NSTIP) at King Saud University under Grant, *4*(1), 1-5.

Habeeb, S., Yazaji, S., Al-Amir, L. (2016). Optimization of glucose isomerase production from *Streptomyces* spp. SH10 using the response surface methodology. *International Food Research Journal* ,*23*(2),756-761.

Kazemi, V., Elmolook, A., Allah P., (2006). Fructose Enrichment Of Date Syrup Using Immobilized Glucose Isomerase Enzyme. *Biotechnology Engineering*, Assistant Professor of BBRC of Sharif University Of Technology, 1(9), 14-18.

Messing, R. A., Fillbert, A. M. (1975). Immobilized glucose isomerase for the continuous conversion of glucose to fructose. Food Chem, *23* (5), 920–923.

Palazzi, I .E, Attilio, C. (1998). general linearization of kinetics of1glucose isomerization to fructose by immobilized glucose isomerase. *institute of chemical and process*, *63*(3), 12-16.

Parker, K., Sala, M., Nwosu, V. C. (2010). High fructose corn syrup: Production, uses and public health concerns. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, *5*(5), 71 – 78.

Ray, R., Rossell, C. M. (2016). Microbial Enzyme Technology in Food Applications. *Food Science Department*, Institute of Agrochemistry and Food, Technology,Taylor & Francis. P.300

Sathya, R., Ushadevi, T. (2014). Isolation and screening of glucose isomerase producing marine *Streptomyces* species for fructose production. *Centre for Research and Development, PRIST University, Thanjavur, Tamil Nadu, India* Scholars Research Library, *6*(5),215-219

Silva, N., Fabio. P., Neves, V., Ramires, E. (2009). Production of glucose and fructose syrups from cassava (*Manihot esculenta* Crantz) starch using enzymes produced by microorganisms isolated from Brazilian -Cerrado soil. *College of Information Technology* (pp.1101-2061), Parbhani, School of Technology, India. ISSN

Srivastava, P., Shukla, S., Kumar, S. (2010). Isolation, Purification & Characterization of Glucose Isomerase Enzyme form Streptomyces species isolated from Parbhani Region. *Journal of Enzyme Research*, *1*(1), 7976–7657.

Storey, K. B., Chakrabati, J. C., (1990). One-Step Conversion of Cellulose to Fructose Using Coimmobilized Cellulase,fl-Glucosidase and Glucose Isomerase . *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *23*(139), 44-48.

Thirumurugan, D., Vijayakumar, I. R. (2013). A potent fish pathogenic bacterial killer Streptomyces sp. isolated from the soils of east coast region. *Department of Microbiology Bharathidasan*, *1*(3), 175-180.

Williams, S.T., Goodfellow, M., Alderson, G., Wellingation, A., Ellinton, E.M., Sneath, P.H., Sackin, M. J. (1983). Numerical classification of Streptomyces and related genera. *National Institutes of Health*, *129*(6),1743-813.

White, J. S., (2017). Sucrose, HFCS, and Fructose: History, Manufacture, Composition, Applications, and Production, Fructose, High Fructose Corn Syrup, Sucrose and Health. *Nutrition and Health*, *13*(2), 558-569.

Yang, Q. I., Zhou, S., Runge, T. (2015). Magnetically separable base catalysts for isomerization of glucose to fructose. *Department of Biological Systems Engineering* (p.474–484). University of Henry Mall, Madison, United States.

Yassien, M. A. M., Fatani, A. M. J. (2012). Optimization of glucose isomerase production by *Streptomyces albaduncus*. *African Journal of Microbiology Research*, *6*(12), 2976-2984.

المجلـة الليبيـة للغـذاء والتغذيـة

LIBYN JOURNAL OF
FOOD & NUTRITION

Study of the best conditions for producing Glucose isomerase from *Streptomyces* spp.

lama M. Assaf

* Dept. of Food science, Faculty of Agriculture, University of Aleppo

Abstract

Streptomyces bacteria were isolated from the soil of a field of maize, the isolates were diagnosed morphologically, physiologically and biologically according to the International Streptomyces Project (ISP), and isolates were screened to evaluate their ability to produce glucose isomerase enzyme using casein starch agar medium (CSA) based on the growth density as an indicator of the consumption of xylose sugar. Factors affecting the production of glucose isomerase enzyme from *Streptomyces spp*. bacteria were studied, where the best incubation time was 96 hours, the maximum enzymatic activity was (1066.67) units / liter and the specific activity was (138) units / g, and the best bacterial growth and the highest productivity of the enzyme was (1010) units / liter and efficacy The specificity is (162.64) units / g at an incubation temperature of 30 ° C, The highest production of the enzyme was (1066.67) units/l and the highest specific activity (151.3) units/g at pH7, and it was found that replacing xylose sugar with other sugars could not give the enzyme more productivity than the xylose sugar. Where xylose sugar gave the highest enzymatic activity that reached (1066.67) units/l and specific activity (140.17) units/g, and when studying the optimal conditions for converting glucose into fructose at different temperatures and at different times, the temperature of 70 ° C for 60 minutes managed to give the highest concentration of fructose .The highest enzymatic activity reached (826.67) units/l, and the highest specific activity reached (115.62) units/g, resulting from a biomass weighing (7.15)g.

Key words: Streptomyces, different media, isolation, biochemical tests

*Corresponding author: lamaassaf403@gmail.com