مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية . (2017) المجلد (33) . العدد 1 . الصفحات: 155-130

دراسة بعض الصفات الحركية لعمل إنزيم غلوكوز إيزوميراز المنتج من عزلة محلية من بكتريا *Streptomyces roseiscleroticus SH(10)*

سهى حبيب* صباح يازجي** لينا الأمير***

الملخص

درس تأثير كل من درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني وتركيز الركيزة (**glucose**) وتركيز بعض الشوارد المعدنية (Mg^{+2}, Co^{+2}, Ca^{+2}, Ag^{+}, Mn^{2+}, Hg^{+2}, Cu^{2+}) في فعالية إنزيم غلوكوز إيزوميراز المنتج من بكتريا *Streptomyces roseiscleroticus* المعزولة من تربة محلية من مناطق مختلفة من سورية.

ووجد أن الفعالية العظمى للإنزيم كانت عند درجة الحرارة 60° م والرقم الهيدروجيني 7 وتركيز 0. 8 مول من الركيزة (الغلوكوز) وقد بقي الأنزيم مستقراً ضمن مجال درجة الحرارة 60-30م° والرقم الهيدروجيني 9-7 كما تبين أن الشوارد المعدنية (Mg^{+2}, Co^{+2}, Ca^{+2}, Mn^{+2}) أثرت إيجابياً على نشاط إنزيم غلوكوز إيزوميراز، بينما أدت شوارد (Cu^{+2} , Ag^{+}, Hg^{+2}) دوراً مثبطاً له وكان أفضلها مزيج من شوارد الكوبالت والمغنزيوم.

الكلمات المفتاحية: غلوكوز إيزوميراز، البكتيريا الخيطية، كزيلوز، التخمر المغمور.

* طالبة دكتوراه، قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة. جامعة دمشق، سوريا.

** أستاذ، قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة. جامعة دمشق، سوريا.

*** أستاذ مساعد في الهيئة العامة للتقانة الحيوية، قسم التقانات الغذائية والصناعية، ص.ب3062 دمشق، سوريا.

A study of some kinetic properties of glucose produced from a local isolate isomerase activity *Streptomyces spp. SH(10)*

S. Habeeb[*], S. Yazaji[**], and, L. Al-Amir[***]

Abstract

The effect of temperature, pH, concentration of substrate (glucose), and the effect of some metallic ions on glucose isomerase activity was studied. The enzyme was produced by submerged fermentation of *Streptomyces roseiscleroticus* SH10 isolated from local soils. Maximum enzyme activity was found at pH 7, temperature 60°C and 0.8 mol of glucose as a substrate, and the enzyme remains stable at pH = 7-9 and temperature 30-60°C.

Glucose isomerase was activated by ions (Mg^{+2}, Ca^{+2}, Mn^{+2}, Co^{+2}) while another ions (Cu^{+2}, Ag^{+}, Hg^{+2}) played an inhibition role. A mixture of cobalt and magnesium ions exhibited highest activation rate.

Keywords: Glucose isomerase, xylose, Submerged fermentation *Streptomyces sp.*

[*] Research assistant, National Commission for Biotechnology, Department of food and industrial biotechnology – Damascus.
[**] Professor, Food Science Department, Faculty of Agriculture, Damascus University.
[***] Assistant professor، National Commission for Biotechnology, Department of food and industrial biotechnology.

المقدمـة

عد الإنزيمات عوامل محفزة ذات طبيعة بروتينية، كما أنها مسؤولة عن عدد من التحولات الكيميائية الضرورية لاستدامة الحياة، تؤدي الإنزيمات دوراً هاماً في كافة مجالات الحياة فهي تستخدم في صناعة العصائر والمعجنات والأدوية والمنظفات (Novo، 2004). يتبع إنزيم غلوكوز إيزوميراز (GI) إلى إنزيمات التماكب، وهو ثالث الإنزيمات من حيث الأهمية الصناعية والتطبيقية والطبية، بعد إنزيمي أميلاز وبروتياز (Prashant وزملاؤه 2010)، فهو يحفز المماكبة العكسية من D- غلوكوز إلى D- فركتوز وكذلك من D- زيلوز (سكر الخشب) إلى D-زيلولوز (Juan وAnders، 2013). اكتسب اكتشاف هذا الإنزيم أهمية من الناحية الصناعية والتجارية لما يتميز به الفركتوز من خصائص فيزيائية، ووظيفية، والتي جعلته يؤدي دوراً مهماً في التطبيقات الصناعية (Borges وزملاؤه 2006)، حيث استعمل شراب الذرة الغني بالفركتوز High Fructose Corn Syrup (HFCS) كبديل طبيعي للسكروز في العديد من الصناعات الغذائية كصناعة المشروبات الغازية والمعجنات والأغذية المصنعة (Schenck، 2000 ; Sangeetha وزملاؤه 2005; Lima وزملاؤه 2011)، ولأسباب اقتصادية تم تفضيل الطريقة الإنزيمية على الطريقة الكيميائية في تحويل غلوكوز إلى فركتوز، وشجع ارتفاع أسعار السكر مقارنة بأسعار شراب الذرة الغني بالفركتوز على التوسع في إنتاج هذا الأخير (Stephen وSuraez ، 2003).

ينتج إنزيم غلوكوز إيزوميراز من قبل أنواع مختلفة من الأحياء الدقيقة كالبكتريا والخمائر والفطريات (Borges وزملاؤه 2006). وتعد البكتريا المصدر الرئيسي لإنتاج الإنزيم ولاسيما البكتريا الخيطية منها الأكتينوميسيتات التي تعد مصدراً غنياً في إنتاج المضادات الحيوية والإنزيمات الصناعية (Ningthoujam وزملاؤه 2009; Prashant وزملاؤه 2010).

قام Bhasin (2011) بدراسة خصائص إنزيم غلوكوز إيزوميراز الناتج، واستنتج أن الفعالية العظمى للإنزيم كانت عند درجة الحرارة 75°C، وعند الرقم الهيدروجيني 7، كما أن استقرارية الإنزيم كانت عند الرقم الهيدروجيني 9-7، وكان أفضل تركيز للركيزة (سكر الغلوكوز) هو 1.2 مول، كما ساهمت بعض الشوارد المعدنية مثل Co^{+2} وMg^{+2} و Ca^{+2} و Zn^{+2} في زيادة الفعالية الإنزيمية، بينما شوارد Ag^{+} Cu^{+2}, Ba^{+2}, Hg^{+2} فقد أدت إلى تثبيط الإنزيم حيث فقد الإنزيم فعاليته عند وجود هذه الشوارد. وفي دراسة أخرى كانت الفعالية العظمى للإنزيم عند درجة حرارة 60° م ورقم حموضة 8، واستقرارية الإنزيم كانت عند درجة حرارة $T<$ 60°م ورقم حموضة 10-8. (Muhyaddin وزملاؤه، 2008)، وفي بحث سابق (حبيب وزملاؤه،2014) تم عزل وتشخيص عزلات من بكتريا ستربتومايسيس منتجة لإنزيم غلوكوز إيزوميراز من ترب محلية، وفي دراسة أخرى تم تطبيق التطفير بالأشعة فوق البنفسجية لزيادة إنتاجية (حبيب وزملاؤه، 2015)، كما تمت أمثلة ظروف إنتاج إنزيم غلوكوز إيزوميراز وتم التوصل إلى الشروط المثلى لإنتاج إنزيم غلوكوز

إيزوميراز وهي درجة حرارة تحضين 25°م، والرقم الهيدروجيني 6، ومدة الحضن 48 ساعة، وتركيز الركيزة (سكر الزيلوز) 1.5% وبوجود كل من كبريتات المغنزيوم وكلوريد الكوبالت بتركيز 0.05% لكل منهما كمصدر للشوارد المعدنية.

هدف البحث

نظراً للأهمية التجارية والصناعية لإنزيم غلوكوز إيزوميراز، فقد هدف البحث إلى دراسة بعض الصفات الفيزيوكيميائية لأنزيم غلوكوز إيزوميراز المنتج من *Streptomyces roseiscleroticus* المعزولة محلياً بطريقة التخمير المغمور، حيث شملت الدراسة تأثير كل من درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني وتركيز الركيزة (glucose) وتركيز بعض الشوارد المعدنية (Mg^{+2}, Mn^{+2},Ag^{+}, Cu^{+2},Hg^{+2}, Ca^{+2}) في فعالية إنزيم غلوكوز إيزوميراز المنتج.

المواد والطرائق

المواد المستخدمة:

محلول موقي الخلات برقم هيدروجيني 4 و5، ومحلول موقي فوسفات الصوديوم برقم هيدروجيني 6 و7 و8، ومحلول موقي الغلايسين هيدروكسيد الصوديوم برقم هيدروجيني 9 و10 و11 جميعها بتركيز 0.1 مولار.

2- السلالة المستخدمة:

استخدمت في هذه الدراسة *Streptomyces roseiscleroticus*، المشخصة في مخابر الهيئة العامة للتقانة الحيوية (حبيب وزملاؤه، 2014)

3-إنتاج إنزيم غلوكوز إيزوميراز:

تم إنتاج إنزيم غلوكوز إيزوميراز بطريقة التخمر المغمور وباستخدام الوسط التالي (10غ ببتون، 2.5 غ مستخلص الخميرة، 5غ كلوريد الصوديوم، 5غ مستخلص اللحم البقري، 0.5غ من كل من كبريتات المغنزيوم المائية $MgSO_4.7H_2O$ وكلوريد الكوبالت $CoCl_2$، في ليتر من الماء المقطر) ووزع الوسط في دوارق سعة 250 مل بحجم 50 مل في كل دورق وعقم بالموصدة ثم أضيف سكر الزيلوز بتركيز15غ/ليتر باستخدام المرشح الميكروبيولوجي وعدل الرقم الهيدروجيني إلى 6، لقحت الدوارق ب 1% من المعلق البوغي (10^5 خلية /مل) من *S. roseiscleroticus* SH(10) وحضنت الدوارق في الحاضنة الهزازة بسرعة 150 دورة/ د عند درجة حرارة 25 °م، ومدة الحضن 48 ساعة وبعد انتهاء مدة التخمر أجريت عملية طرد مركزي للمزرعة الناتجة بسرعة 8000 دورة/ د لمدة 15 دقيقة ومن ثم استخلص الإنزيم من بكتيريا ستربتومايسيس بتعليق 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 بسرعة 150 دورة/دقيقة وحرارة 30 مْ مدة 24 ساعة، ثم نبذ

السائل الناتج مركزيا بسرعة 8000 دورة/ دقيقة مدة 15 دقيقة وحرارة 4 مْ (Chen وAnderson، 1979)، أهمل الراسب، وجمع الرائق الذي اعتبر مستخلصاً خاماً للإنزيم، ومن ثم قدرت فعاليته الإنزيمية(Dische وزملاؤه،1951)، (Bhasin، 2012).

4- تقدير فعالية إنزيم غلوكوز إيزوميراز:

قدرت فعالية الإنزيم وفق طريقة طريقة Disch وBorenfreund (1951) بإضافة 0.1 مل من مستخلص الإنزيم إلى محلول التفاعل المكون من 0.5 مل من محلول منظم فوسفات البوتاسيوم (pH = 8)، و0.2 مل من محلول $MgSO_4.7H_2O$ (0.05 مولار)، و0.2 مل من محلول ركيزة الغلوكوز (1 مولار)، وحضن مزيج التفاعل في حمام مائي عند درجة حرارة 60مْ، واستمر التفاعل الإنزيمي مدة 30 دقيقة. ثم أوقف التفاعل بإضافة 1مل من محلول حمض بيركلوريك $HClO_4$ (0.5 مولار)، وللكشف عن الفركتوز الناتج بفعل الإنزيم أضيف 0.2 مل من محلول Cysteine- Hydrochloride (بتركيز 1.5%)، و6 مل من حمض الكبريت بتركيز 70% و0.2 مل من محلول الكاربازول (بتركيز 0.12% المحضر بالكحول الاثيلي) إلى محلول التفاعل، ورج الخليط جيداً بوساطة Vortex (Bhasin، 2011).

قيست الامتصاصية بجهاز التحليل الطيفي الضوئي عند طول موجة 560 نانومتر. قدر تركيز الفركتوز المتحرر بالاستعانة بالمنحنى القياسي لمحلول الفركتوز. وتعرف وحدة الإنزيم Unit بانها كمية الإنزيم التي تحرر واحد ميكرومول من الفركتوز خلال دقيقة واحدة (Kozak، 2005).

5- تأثير بعض العوامل الفيزيوكيميائية على فعالية إنزيم غلوكوز إيزوميراز:

تأثير درجة الحرارة: قدرت فعالية الإنزيم على مدى من درجات الحرارة تراوحت بين-30° 90م ورسمت العلاقة بين درجات الحرارة مقابل الفعالية الإنزيمية لتعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية الإنزيم (Deshmukh وShankar، 1996).

الاستقرارية الحرارية: حضن 2 مل من المحلول الإنزيمي بدرجات حرارة مختلفة 30 و40 و50 و60 و70 و80 و90م° مدة 30 دقيقة وفق الطريقة التي ذكرها Deshmukh وShankar (1996) بردت الأنابيب مباشرة في حمام ثلجي ثم قدرت الفعالية الإنزيمية المتبقية لتحديد درجة الحرارة المثلى لثباتية الإنزيم.

تأثير الرقم الهيدروجيني: قدرت الفعالية الإنزيمية مع استخدام المحاليل الموقية التالية بدلاً من محلول فوسفات البوتاسيوم الموقي:

موقي الخلات برقم هيدروجيني 4 و5 وبتركيز 0.1 M.

موقي فوسفات الصوديوم برقم هيدروجيني 6 و7 و8 وبتركيز 0.1 M.

موقي الغلايسين هيدروكسيد الصوديوم برقم هيدروجيني 9 و10 و11 بتركيز 0.1 M (Salehi وزملاؤه، 2004).

الاستقرارية الحمضية: حضن محلول الأنزيم عند درجة الحرارة 30 °م لمدة 60 دقيقة في المحاليل الموقية المختلفة ضمن المجال (pH 4-11). ثم بردت وجرى قياس الفعالية المتبقية. (Deshmukh و Shankar، 1996).

تأثير تركيز الركيزة على فعالية الإنزيم: أضيفت تراكيز مختلفة من سكر الغلوكوز (0.2 – 0.4– 0.6– 0.8– 1.0– 1.2 مول) ثم قيست الفعالية الإنزيمية لتحديد التركيز الأمثل من الركيزة لإعطاء أعلى فعالية أنزيمية (Raykovska وزملاؤه،2001).

تأثير بعض الشوارد المعدنية: استبدل كبريتات المغنزيوم المستخدمة في مزيج التفاعل الإنزيمي ببعض الشوارد المعدنية وهي كبريتات المنغنيز و كلوريد الكالسيوم ونترات الفضة وكلوريد الزئبق وكبريتات النحاس ومزيج من كبريتات المغنزيوم وكلوريد الكوبالت، حيث أضيفت بحجم 100 ميكروليتر وبتركيز M 0.1 . (Bhasin ، 2011).

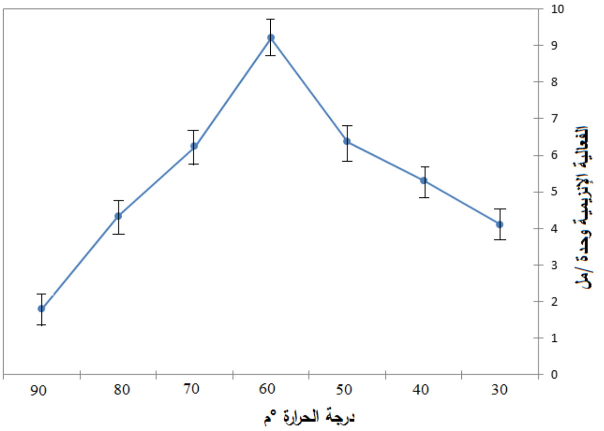
6- التحليل الإحصائي:

حسبت المتوسطات الحسابية والانحرافات المعيارية لجميع النتائج بواقع ثلاثة مكررات، وقد خضعت هذه النتائج للتحليل الإحصائي باستخدام البرنامج XLSTAT 2008 مع تعيين الفروق المعنوية عند مستوى ثقة 1%.

النتائج والمناقشة

أولا"- درجة الحرارة المثلى للأنزيم:

أجري التفاعل الإنزيمي بدرجات حرارة تراوحت بين 30-90 °م، فأظهرت النتائج كما هو موضح في الشكل (1) ازدياد فعالية الإنزيم مع زيادة درجة الحرارة حتى بلغت أقصاها عند درجة الحرارة 60م° إذ بلغت الفعالية الانزيمية 9.2 وحدة/مل ثم انخفضت بزيادة درجة الحرارة لتصل إلى 1.8 وحدة/مل عند درجة الحرارة 90 °م.

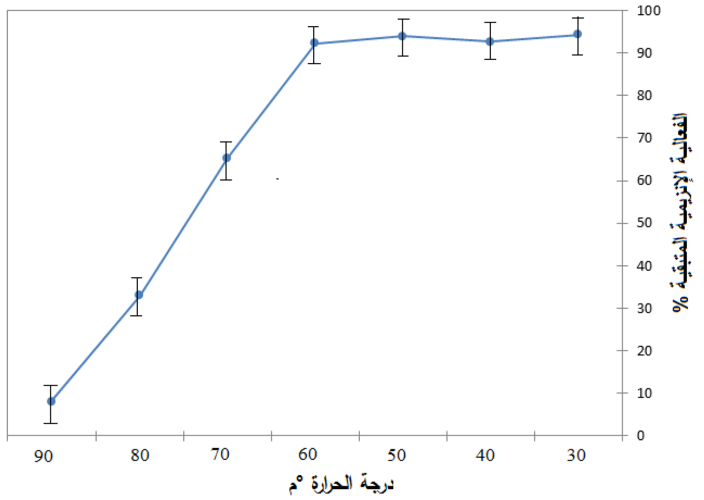


الشكل (1) : تأثير درجة الحرارة على فعالية إنزيم غلوكوز إيزوميراز.

وأكدت نتائج التحليل الإحصائي أن قيمة الفعالية عند درجة الحرارة 50 °م تختلف اختلافاً ظاهرياً (غير معنوي) عن قيمة الفعالية عند درجة الحرارة 70 °م، كذلك تختلف قيمة الفعالية عند درجة الحرارة 30 °م تختلف اختلافاً ظاهرياً عن قيمة الفعالية عند درجة الحرارة 80 °م. بينما تختلف قيمة الفعالية عند درجة الحرارة 60 °م اختلافاً معنوياً عن جميع القيم التي تم الحصول عليها عند مستوى ثقة 0.01.

ويعزى ذلك إلى زيادة سرعة التفاعلات الانزيمية مع ارتفاع درجة الحرارة بسبب زيادة الطاقة الحركية للجزيئات ومن ثم زيادة التصادمات بين جزيئات الإنزيم وجزيئات المادة الأساس أما انخفاض الفعالية الإنزيمية الشديد عند درجات الحرارة العالية فإنه يعود إلى امتصاص الجزيئات المتفاعلة لطاقة عالية مما يؤدي إلى تغيير تركيب الإنزيم ومن ثم مسخه وفقدانه جزءاً من فعاليته. (Segel، 1976). وقد اتفقت نتائج هذه الدراسة مع ما وجده (Anderson وزملاؤه، 2000) من أن إنزيم غلوكوز ايزوميريز المنتج من بكتريا *Streptomyces murinus* أظهر أقصى فعالية إنزيمية عند درجة الحرارة 60 °م في أثناء حضن الإنزيم بدرجات حرارة مختلفة مدة ساعة. بينما كانت درجة الحرارة المثلى لفعالية الإنزيم هي 75 °م وفق ما ذكره Bhasin (2011).

ثانياً: تحديد مجال الاستقرارية الحرارية للأنزيم: أظهرت نتائج حضن انزيم غلوكوز إيزوميريز المنتج من العزلة *Streptomyces sp.* SH10 بدرجات حرارة تراوحت بين 30-90 °م مدة 30 دقيقة أن الإنزيم احتفظ بكامل فعاليته بدرجة حرارة تراوحت بين 30–60 °م (شكل 2)، بعدها انخفضت الفعالية الإنزيمية تدريجياً وفقد 35% من فعاليته تقريبا عند حرارة 70°م وفقد 67% منها عند حرارة 80 °م، بينما فقد 92% من هذه الفعالية عند حرارة 90 °م. ويعزى سبب انخفاض فعالية الإنزيم قيد الدراسة بارتفاع درجة الحرارة إلى تأثير الحرارة في تركيب جزيئة الإنزيم ومن ثم مسخه (Meng وزملاؤه، 1993).



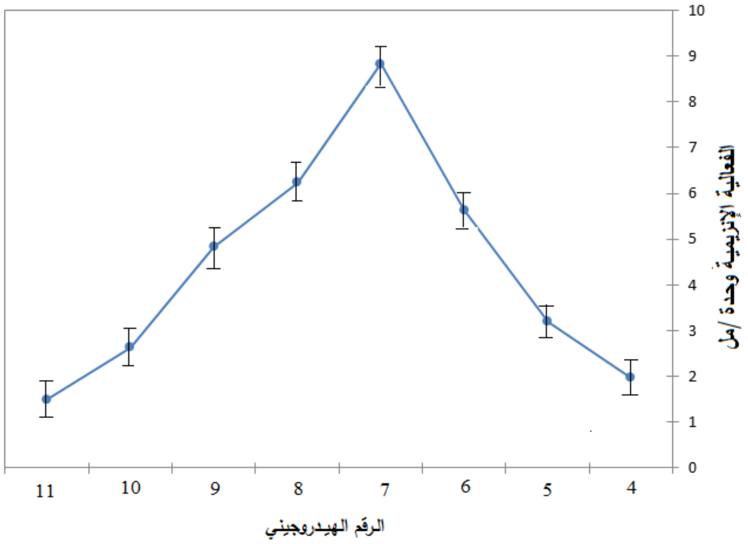
الشكل (2) تأثير درجة الحرارة على ثباتية إنزيم غلوكوز إيزوميراز.

أكدت نتائج التحليل الإحصائي أن قيمة الفعالية الإنزيمية عند درجة الحرارة 30 °م تختلف اختلافاً ظاهرياً (غير معنوي) عن مثيلاتها عند درجات الحرارة 60-50-40 °م ، وهنا نستنتج أن الفعالية قد بقيت شبه ثابتة في هذا المجال. وقد أكد التحليل الإحصائي أن قيم الفعالية الأخرى ذات دلالة معنوية، أي أن هناك اختلاف حقيقي في القيم المحددة. وقد تباينت الدراسات في تحديد الثبات الحراري لانزيم غلوكوز ايزوميريز وذلك حسب مصدر الإنزيم، حيث وجد Suekane وزملاؤه (1978) أن انزيم غلوكوز إيزوميريز المنتج من بكتريا *Streptomyces olivochromogenes* احتفظ بكامل فعاليته عند معاملته بدرجات حرارة 50 -30 °م مدة 30 دقيقة ثم انخفضت الفعالية بارتفاع درجة الحرارة المعاملة إذ فقد أكثر من 95% من فعاليته عند معاملته في 80 °م لنفس المدة الزمنية السابقة.

كما وجد Kaneko وزملاؤه (2000) عند حضن الإنزيم المنتج من بكتريا *Streptomyces olivoceoviridis* E-86 بدرجات حرارة مختلفة مدة 3 ساعات أن الإنزيم لا يتأثر بالمعاملات الحرارية لغاية 70 °م في حالة وجود كبريتات المغنيزيوم بينما تنعدم فعالية الإنزيم كلياً عند درجة الحرارة 85 °م و80 °م.

ثالثاً: تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل للأنزيم: قدر الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم بمدى من الأرقام الهيدروجينية تراوح بين (4-11) باستعمال محاليل موقية مختلفة. وبينت النتائج الموضحة في الشكل (3) أن الإنزيم أعلى فعالية عند الرقم الهيدروجيني 7. إذ أعطى الإنزيم اقصى فعالية إنزيمية مقدارها 8.8 وحدة/مل في حين انخفضت الفعالية عند الأرقام الهيدروجينية الحامضية حيث كانت 2 وحدة /مل عند الرقم الهيدروجيني 4،

كذلك عند الأرقام الهيدروجينية القاعدية انخفضت الفعالية إلى 1.5 وحدة /مل عند الرقم الهيدروجينى 11.



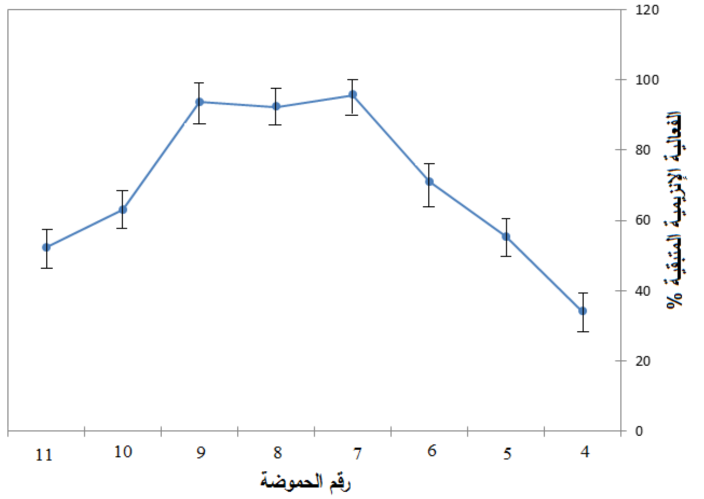
الشكل (3) : تأثير الرقم الهيدروجيني على فعالية إنزيم غلوكوز إيزوميراز

وأكدت نتائج التحليل الإحصائي أن قيمة الفعالية الإنزيمية عند الرقم الهيدروجيني pH=7 تختلف اختلافاً معنوياً عن قيم الفعالية عند الأرقام الهيدروجينية الأخرى المستخدمة حيث تفوقت عن باقي القيم.

إن سبب الانخفاض في الفعالية يعود إلى تأثر واحد أو أكثر من المجاميع الايونية الموجودة في الموقع الفعال للإنزيم أو المادة الأساسية أو كليهما بسبب تغير الحالة الايونية لهذه المجاميع وانعكس ذلك على قابلية الإنزيم للارتباط بالمادة الأساس Segel (1976) وجاءت النتائج متفقة مع ما تم الإشارة إليه من قبل العديد من الباحثين الذين ذكروا بأن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية انزيم غلوكوز ايزوميريز المنتج من معظم الأنواع التابعة لجنس *Streptomyces sp.* يتراوح بين 7-9 أي يقع ضمن الأرقام الهيدروجينية المتعادلة القاعدية (Pawan وDeshpande، 2000)، كما أن هذه النتيجة تتوافق مع ما توصل إليه Yassien وزملاؤه (2013) أن أفضل رقم حموضة لفعالية الإنزيم هو 7.

رابعاً: تحديد مجال الاستقرارية الحمضية للأنزيم: تم تعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات إنزيم غلوكوز إيزوميريز المنتج من بكتريا *Streptomyces* sp (SH10) بحضنه لمدة 60 دقيقة محاليل موقية تراوحت أرقامها الهيدروجينية بين 4-11. أظهرت النتائج الموضحة في الشكل (4) أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الإنزيم يتراوح بين 7-9 إذ احتفظ الإنزيم تقريباً بكامل فعاليته عند حضنه في هذا المدى من الأرقام الهيدروجينية في

حين فقد الإنزيم نسبة مرتفعة من فعاليته عن الأرقام الهيدروجينية الحامضية والقاعدية ، حيث فقد 64% من فعاليته عند pH=4، كذلك فقد 48% من هذه الفعالية عند pH=11.



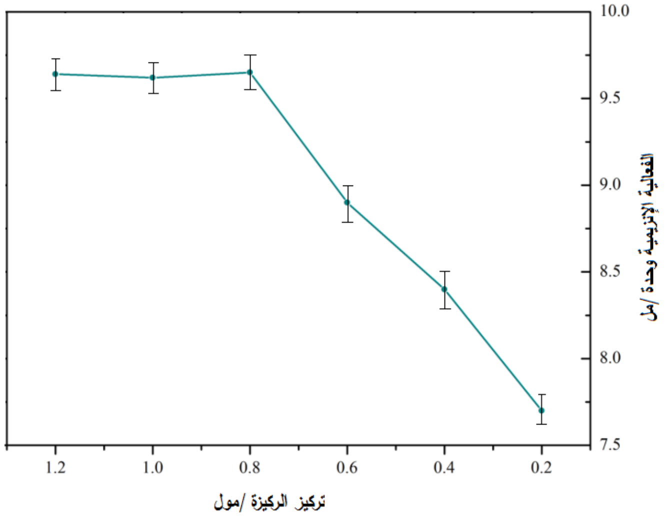
الشكل (4) : تأثير الرقم الهيدروجيني على ثباتية إنزيم غلوكوز إيزوميراز

أظهرت نتائج التحليل الإحصائي أن قيمة الفعالية الإنزيمية المتبقية عند الرقم الهيدروجيني 7 تختلف اختلافاً ظاهرياً عن باقي القيم عند أرقام الحموضة 9-8، وهنا نستنتج أن النسبة المئوية للفعالية المتبقية بقيت شبه ثابتة في هذا المجال. وقد أكد التحليل الإحصائي أن قيم الفعالية الأخرى ذات دلالة معنوية، أي أن هناك اختلافاً حقيقياً في القيم المحددة.

وقد يعود سبب الانخفاض في الفعالية عند القيم الهيدروجينية الحامضية أو القاعدية إلى حدوث تغيرات في تركيب جزيئة الإنزيم علاوة على تغير الحالة الأيونية للموقع الفعال للإنزيم (Anderson وزملاؤه 2000). حيث تعد مصدر الإنزيم والطبيعة الكيميائية للمحلول الموقي من العوامل المهمة التي تؤثر في تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الإنزيم، وقد تباينت نتائج الدراسات في تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الإنزيم، حيث وجد Belfaquih و Penninckx (2000) أن الإنزيم المنتج من العزلة *Streptomyces* sp. EC10 احتفظ بكامل فعاليته عند حضنه بقيم من الأرقام الهيدروجينية تراوحت بين 6-8، كذلك وجد Yassien وزملاؤه (2013) أن الإنزيم بقي مستقراً ضمن مجال من أرقام هيدروجينية تتراوح بين 6.5-7..

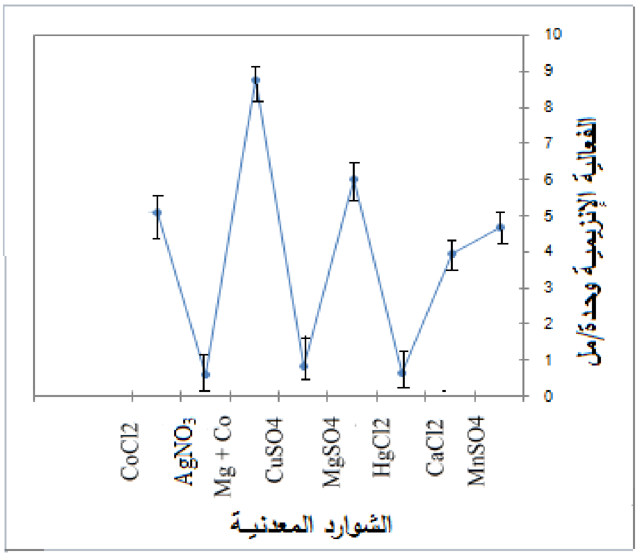
خامساً: تأثير تركيز الركيزة على فعالية الأنزيم: يبين الشكل (5) فعالية إنزيم غلوكوز إيزوميراز تبعاً لتركيز الركيزة، ويتضح من هذا الشكل زيادة النشاط الإنزيمي بشكل تدريجي مع زيادة تركيز الركيزة، و أعلى فعالية للأنزيم كانت عند استخدام 0.8 مول من الغلوكوز وبعد هذا التركيز لم تلاحظ أي زيادة ملموسة في الفعالية، وقد توصل Gong

وزملاؤه (1981) إلى أن أفضل تركيز للغلوكوز هو 1.33 مول، بينما كان أفضل تركيز للركيزة هو 0.92 مول (Ogbo و Odibo، 2007)، تشير نتائج التحليل الإحصائي إلى أن هناك فروق معنوية في قيم الفعالية لدى استخدام الغلوكوز بتراكيز0.2–0.4–0.6 مول، بينما كانت الفروق ظاهرية بين قيم الفعالية عند التراكيز 1.2 -1.0 -0.8 عند مستوى ثقة 0.01.



الشكل (4) : تأثير تركيز الركيزة (الغلوكوز) على فعالية أنزيم غلوكوز إيزوميراز

سادساً: تأثير بعض الشوارد المعدنية على فعالية الأنزيم: يلاحظ من الشكل (5) أن أيونات الـ (Mg^{+2}, Co^{+2}, Mn^{2+},Ca^{2+}) نشطت عمل أنزيم غلوكوز إيزوميراز لكن كانت الفعالية الإنزيمية في أقصى قيمة لها عند استخدام مزيج من شوارد الكوبالت والمغنزيوم حيث كانت الفعالية 8.8، أما أيونات الفضة والزئبق والنحاس فقد أدت دور مثبط حيث فقد الإنزيم فعاليته بوجود هذه الأيونات، وهذا يتوافق مع Fan وزملائه (2011) بأن أفضل فعالية للإنزيم عند إضافة مزيج من شوارد الكوبالت والمغنزيوم و أكد التحليل الإحصائي أيضاً أن جميع قيم الفعالية هذه ذات دلالة معنوية.I.



الشكل (6) : تأثير الشوارد المعدنية على فعالية أنزيم غلوكوز إيزوميراز

الاستنتاجات

- سجلت درجة حرارة مثلى لإنزيم غلوكوز إيزوميراز 60 °م.
- بقي الإنزيم مستقراَ في مجال من درجات الحرارة 30-60 °م ثم انخفضت الفعالية الإنزيمية وحدة/مل تدريجياً.
- سجل رقم هيدروجيني أمثلي لنشاط الإنزيم pH=7 .
- بقي الإنزيم مستقراَ في مجال من الأرقام الهيدروجبنية pH= 7-9.
- ازدادت الفعالية الأنزيمية عند استخدام الركيزة (الغلوكوز) بتركيز 0.8 مول .
- نشطت شوارد الـ (Mn^{2+},Co^{+2}, Ca^{+2}, Mg^{2+}) عمل إنزيم غلوكوز إيزوميراز، أما شوارد (Cu^{+2}, Ag^{+}, Hg $^{+2}$) فقد أدت دوراً مثبطاً للإنزيم، وكان أفضلها عند استخدام مزيج من شوارد الكوبالت والمغنزيوم.

المراجع

- حبيب سهى وصباح يازجي ولينة الأمير، 2014. غربلة عزلات محلية من بكتريا *Streptomyces* لتقييم قدرتها على إنتاج إنزيم غلوكوز إيزوميراز. بحث مقبول للنشر في مجلة بحوث جامعة دمشق للعلوم الزراعية.
- حبيب سهى وصباح يازجي ولينة الأمير، 2015. تحسين إنتاجية إنزيم غلوكوز إيزوميراز من بكتريا *Streptomyces* بالتطفير بوساطة الأشعة فوق البنفسجية. بحث مقبول للنشر في مجلة بحوث جامعة حلب.
- Anderson, A. K., S. B. Petersen and H. Frisner. 2000. Effect of pH on activity, thermostability and aggregation of glucose isomerase from *Sterptomyces murinus*. J. Biotechnol. (10): 150-161.
- Belfaquih.N. and M. J. Penninckx. 2000. A bifunctional β-xylosidase-xylose isomerase from *Sterptomyces sp.* Enzyme Microb. Technol. (27): 114-121.
- Bhasin.S. 2011. Studies on glucose isomerase from *Streptomyces sp.* [Ph.D. thesis], Gujarat University, Ahmedabad, Gujarat, India.
- Bhasin S., P.Sharma, P. Rajpal and H.A. Modi. 2012. comparative study of extraction methods for intracellularly produced glucose isomerase by *Streptomyces sp.SB–AII4*, International Research Journal of Biological Sciences. Vol. 2(10): 43-50.
- Borges E.A., A.A.U. Souza, A.E. Rodrigues and S.M. Souza. 2006. Isomerization in simulated moving bed reactor by glucose isomerase, Brazilian Archives of Biology and Technology, 49 (3): 491-502.
- Chen,W.P., A.W. Anderson, and Y.W. Han . 1979. Extraction of glucose isomerase from *Streptomyces flavogriseus*. Appl. Environ. Microbiol. (37): 785-787.
- Deshmukh, S. S. and V. Shankar. 1996. Glucose isomerase from thermophilic *Streptomyces thermonitrificans*: purification and characterization. Biotechnol. Appl. Biochem. (24): 65-72.
- Dische. Z. and A. Borenfreund. 1951. A new spectrophotometric method for the detection and determination of keno sugar and trioses. J. Biol. Chem. (192): 583-587.

- Fan, X.L, F.Q. Wu and A.B. Daniel . 2011. A database of thermodynamic properties of the reactions of glycolysis, the
- tricarboxylic acid cycle, and the pentose phosphate pathway. Database, Article ID bar005, doi:10.1093.
- Gong C.S., L.F. Chen, M.C. Flickinger, L.C Chiang and G.T. Tsao .1981. Production of ethanol from D-xylose by using D-xylose isomerase and yeasts. Appl Environ Microbiol (41): 430–436.
- Juan, A.M. and R. Anders. 2013. Efficient Isomerization of Glucose to Fructose over Zeolites in Consecutive Reactions in Alcohol and Aqueous Media, J. Am. Chem. Soc, 135 (14): 5246–5249.
- Kaneko, T., S. Takahashi and K. Saito. 2000. Characterization 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.
- Kozak, M.J. 2005. Glucose isomerase from *Streptomyces rubiginosus*; potential molecular weight standard for small angle X-ray scattering. Appl. Cryst.(38): 555–558.
- Lima. D.M., P.Nascimento, F. Ribeiro and A. Sandra. 2011. Fructose Syrup: A Biotechnology Asset . Food Technol. Biotechnol. 49 (4): 424–434.
- Meng, M., M. Bagdasarian and J.G. Zeikus. 1993. Proc. Natl Acad. Sci. USA, (90) *8459*–8463.
- Muhyaddin, M.O., H.A. Jabur and B.K. Dalaly. 2008. Production of Glucose isomerase from local isolate of *Streptomyces sp. HM5* (Optimization of enzyme production conditions by submerged cultures), Diala Journal for HumanSciences Vol: 31.
- Ningthoujam.D.S., .S. Sanasam, S. Nimaichand and P. Sanjenbam. 2009. Screening and optimization studies of native anticandidal *actinomycetes* from Manipur (Indo-Burma Biodiversity Hotspot), India. 15th International Symposium on the Biology of

Actinomycetes (ISBA'15), Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 20-25.

- Segel, I. H. (1976). Biochemical Calculations. 2nd Edition, John Wiley and Sons, Inc. New York.
- Novo Nordisk, A/S. 2004. Enzymes at work . Bagsvaerd, Denmark.
- Ogbo F,G., and F.J.C. Odibo .2007. Some Properties of the thermostable xylose isomerase of *Saccharococcus caldoxylosilyticus* No.31. Biotechnology. (6):414-419.
- Pawan, S.A., and V.V. Deshpande. 2000. Charaterization of acid induced unfolding intermediates of glucose/xylose isomerase. Eur. J. Biochem. (267): 6331-6338.
- Prashant.S., S. Saurabh, K.C. Sanjay and V.S. Gomase. 2010. Isolation, Purification and Characterization of Glucose Isomerase Enzyme form *Streptomyces* Species Isolated from Parbhani Region. Journal of Enzyme Research, Vol. 1(2): 1-10.
- Raykovska.V., Angelova.P.D., Paskaleva.D., Stoeva.S., Abashev.J., Kirkov.L., and W.Voelter. 2001. Isolation and characterization of a xylose–glucose isomerase from a new strain *Streptomyces thermovulgaris 127*, var. 7-86, Biochemistry and Cell Biology, 79(2): 195–205.
- Salehi Z., Sohrabi M., Kaghazchi T. & Bonakdarpour B. (2004). Application of down flow jet loop bioreactors in implementation and kinetic determination of solid-liquid enzyme rections..Process Biochemistry. 40,(7), 2455-2460.
- Sangeetha. P.T., M.N. Ramesh, and S.G. Prapulla. 2005. Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides Trends Food Sci. Tech. (16): 442–457.
- Schenck, F.W. 2000. High Fructose syrups-review. Int. Sugar. (102): 285-288.
- Stephen. H., and N. Suraez. 2003. Sugar and sweetener: Situation and outlook. U.S. department of Agriculture.

- Suekane, M., M. Tamura and C. Tomimura. 1978. Physico-chemical and enzymatic properties of purified glucose isomerase from *Streptomyces olivochromogenes* and *Bacillus stearothermophilus*. Agri. Biol. Chem. 42(5): 909-917.
- Yassien, M. A. M., Fatani, J.A.A.M., and Asfour, H.Z. 2013. Purification, characterization and immobilization of glucose isomerase from *Streptomyces albaduncus*. African Journal of Microbiology Research. 7(21), pp. 2682-2688.

Received	**2015/60/02**	**إيداع البحث**
Accepted for Publ.	**2015/08/20**	**قبول البحث للنشر**