

رأسة كفاءة إنزيم كلوكوز أيزوميريز المنتج من عزلة محلية من البكتريا Streptomyces sp. HM5 في تحويل الكلوكوز إلى الفركتوز

حميد عبود جبر, محمد عمر محي الدين, باسل كامل دلالي

دراسة كفاءة إنزيم كلوكوز أيزوميريز المنتج من عزلة محلية من البكتريا Streptomyces sp. HM5 في تحويل الكلوكوز إلى الفركتوز

حميد عبود جبر, محمد عمر محي الدين, باسل كامل دلالي

جامعة ديالى / كلية العلوم قسم الكيمياء, جامعة بغداد / كلية الزراعة قسم علوم الأغذية والتقانات الاحيائية, وزارة الزراعة

الخلاصة

تمهيد : - يقوم انزيم الكلوكوز ايزوميريز بتحويل الكلوكوز الى الفركتوز . وقد استخدم هذا الانزيم منذ زمن طويل لانتاج شراب الذرة الغني بالفركتوز وتم تفضيله على الطرائق الكيميائية المستخدمة لهذا الغرض . تتميز بعض الاحياء المجهرية ولاسيما البكتريا الخيطية من جنس الـ Streptomyces بقابليتها على انتاج هذا الانزيم . يهدف هذا البحث الى دراسة كفاءة انزيم الكلوكوايزوميريز المنتج من بكتريا الـ Streptomyces sp.HM5 في تحويل سكر الكلوكوز الى الفركتوز في ثلاث خامات صناعية هي شراب كلوكوز الذرة وعصير التمر (الدبس) والكلوكوز النقي لغرض تحديد امكانية استخدام الفركتوز كبديل عن الكلوكوز في العديد من الصناعات الغذائية . حضرت نماذج من شراب كلوكوز الذرة وعصير التمر والكلوكوز النقي القياسي ، كما استخدم انزيم الكلوكوايزوميريز المنتج من عزلة محلية Streptomyces sp.HM5 والمنقى جزئياً . وتم تقدير السكريات الكلية والمختزلة ودرجة الدوران النوعي ، كما تم تحليل النواتج باستخدام تقنية كروماتوغرافيا الصفائح الرقيقة (TLC) . تم تعيين الظروف المثلى لتحويل الكلوكوز الى الفركتوز والتي شملت على تحديد الزمن الامثل للتحويل والتركيز الامثل للمادة الخاضعة والتركيز الامثل للانزيم . اظهرت النتائج ان الزمن الامثل لتحويل الكلوكوز الى الفركتوز في الخامات الثلاث تراوح بين 35 - 40 ساعة ، وان التركيز الامثل لكل من شراب كلوكوز الذرة والكلوكوز النقي وعصير التمر هو 20 % ، 30 % و 10 % على التوالي . وان افضل حجم للانزيم هو 0.5 مل عندما تكون الفعالية النوعية للانزيم هي 10.8 وحدة / مل . نستنتج من هذه الدراسة انه بالامكان استخدام انزيم الكلوكوز ايزوميريز

رأسة كفاءة إنزيم كلوكوز أيزوميريز المنتج من عزلة محلية من البكتريا Streptomyces sp. HM5 في تحويل الكلوكوز إلى الفركتوز

حميد عبود جبر, محمد عمر محي الدين , باسل كامل دلاي

المنتج من العزله المحلية لبكتريا Streptomyces sp.HM5 في تحويل الكلوكوز في شراب كلوكوز الذرة المستخدم على نطاق واسع في العديد من الصناعات الغذائية الى الفركتوز مما يؤدي رفع حلاوة المنتج وبالتالي امكانية تقليل الكمية المستخدمه من السكريات الداخلة في صناعات تلك المنتجات الامر الذي يحقق جدوى اقتصاديه لهذه المنتجات .

الكلمات المفتاحية : - الكلوكوز ايزوميريز ، البكتريا الخيطية ، تحويل الكلوكوز الى الفركتوز

Abstract

Glucose isomerase is an enzyme which can convert glucose to fructose. This enzyme was used for producing High Fructose Corn Syrup (HFCS) for a long time ago. The enzymatic method is better than chemical method for producing HFCS. There are some organisms such as Streptomyces can produce this enzyme. The aim of this research is to study the efficiency of glucose isomerase produced from local isolate of Streptomyces by determination of the conversion of glucose to fructose in three sources (Corn syrup; date syrup and standard glucose).

Three samples were used as a substrate glucose corn syrup, date syrup and standard glucose solutions. Partial purified enzyme (glucose isomerase) produced from Streptomyces sp. HM5 was also used. Total and reduced sugars were determined by spectrophotometric method, specific rotation and TLC technique. The optimizations of time, substrate and enzyme concentrations were also studied.

The results indicate that the optimum time for conversion glucose to fructose was 35 – 40 hours in three substrates. The optimum concentration of glucose corn syrup, standard glucose and date syrup were 30; 20 and 10% respectively. The optimum volume of enzyme is 0.5 ml with specific activity equal to 10.80 U/ml.

The applied study shows that can be convert glucose to fructose in glucose corn syrup by using glucose isomerase produced from Streptomyces sp. HM5 and the product can be use in many foods industries because of its higher sweeteners with low cost.

رأسة كفاءة إنزيم كلوكوز أيزوميريز المنتج من عزلة محلية من البكتريا Streptomyces sp. HM5 في تحويل الكلوكوز إلى الفركتوز

المقدمة :

تمثل عملية التحويل الأنزيمية (Isomerization) للكلوكوز إلى الفركتوز الأساس في صناعة شراب الذرة الغني بالفركتوز وقد أستعمل 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% [26] (1979) Vankatasubramanian، وذلك نظراً لارتفاع أسعار السكر مقارنة بأسعار شراب الذرة الغني بالفركتوز وزيادة الطلب عليه إذ إن معدل استهلاك الفرد الأمريكي من السكر بلغ حوالي 50 كغم/سنة Stephen and [23] (2003) Suraez علاوة على ما تقدم فإن الفركتوز يتميز عن الكلوكوز ببعض الخصائص الفيزيائية والوظيفية كقابليته العالية للذوبان في الماء وميله القليل للتبلور وارتفاع حلاوته التي تعادل 2.34 و 1.73 مرة من حلاوة الكلوكوز والسكروز على التوالي مما جعلته يلعب دوراً مهماً في التطبيقات الصناعية, Pritham [11] (1970) Atiken& etal [20] (1998)

مواد وطرائق العمل:

1. الكائن المجهرى

استخدمت في هذه الدراسة عزلة من البكتريا Streptomyces sp. HM5 ثم عزلها وتشخيصها في دراسة سابقة محي الدين وجماعته (2004) [4] والمحفوظه في وسط مائل من Yeast extract – malt agar . نشطت العزله في الوسط نفسه بدرجة حراره 30 م مدة 48 ساعه قبل الشروع في استخدامها .

2. إنتاج الأنزيم

جرى إنتاج الأنزيم من البكتريا بطريقة المزارع المغمورة وفق الظروف المثلى للإنتاج والتي تم التوصل إليها في دراسة سابقة، محي الدين وجماعته (2004) [5]

رأسة كفاءة إنزيم كلوكوز أيزوميريز المنتج من عزلة محلية من البكتريا *Streptomyces sp. HM5* في تحويل الكلوكوز إلى الفركتوز

3. استخلاص الأنزيم وتنقيته

تم استخلاص الأنزيم وفق الطريقة المثلى للاستخلاص والتي تم التوصل إليها في دراسة سابقة ، محي الدين وجماعته (2004) [5] وجرت عملية التنقية الجزئية للإنزيم والتي تمثلت بتركيز الإنزيم بترسيبه باستعمال كبريتات الأمونيوم ونسبة إشباع نهائية تعادل 75% أعقبها عملية ديلزة المستخلص الأنزيمي وبنفس الأسلوب المذكور في دراسة سابقة ، محي الدين وجماعته (2004) [3]

4. الخامات الصناعية

أ - شراب كلوكوز الذرة Corn glucose syrup

وهو مجهز من شركة Cerestar الهولندية إلى معمل بسكولاتة بغداد نسبة المادة الجافة 80% تمثل الكلوكوز والمالتوز والمالتوترايوز وسكريات متعددة أخرى ونسبة حوالي 55 و 20 و 10 و 5% من نسبة المادة الجافة على التوالي.

ب - عصير التمر (الدبس)

وهو خاص للتصدير ومجهز من معمل كربلاء نسبة المواد الصلبة فيه تصل إلى 68% ويمثل الكلوكوز 36-38% منها فيما يمثل الفركتوز 24-26% منها.

ج - الكلوكوز القياسي (D-glucose)

وهو مجهز من شركة Fluka وبنقاوة 99.1%.

5. تقدير السكريات الكلية والمختزلة

اشتملت الطريقة اللونية التي أوردتها [24] (1956) Ting لتقدير السكريات الكلية والمختزلة في الخامات الصناعية والمعاملات الأنزيمية خلال عملية تحول الكلوكوز إلى الفركتوز وتم احتساب النسبة المئوية للتحول من المعادلة التالية

حسب ما ذكرها [12] (1996) Bazara& Hassan

$$\text{النسبة المئوية للتحول} = \frac{\text{كمية الفركتوز الحقيقية الناتجة بعد التحول}}{\text{كمية الكلوكوز قبل التحول}} \times 100$$

رأسة كفاءة إنزيم كلوكوز أيزوميريز المنتج من عزلة محلية من البكتريا *Streptomyces sp. HM5* في تحويل الكلوكوز إلى الفركتوز

6 - قياس درجة الدوران النوعي Specific rotation

قيست درجة الدوران النوعي للمحاليل القياسية ونماذج المعاملات الأنزيمية وفق الطريقة التي ذكرها النداوي (2000)[2] وموسى (1984) [6] باستعمال جهاز الاستقطاب الضوئي Polarimeter نوع Karlkolb وجرت القراءة في درجة حرارة المختبر وعدلت إلى درجة حرارة جميع النماذج بعد تصفير الجهاز بمحلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز مولاري و برقم هيدروجيني مساوٍ لـ (8).

7 - الفصل بكموتوكرافيا الطبقة الرقيقة Thin Layer Chromatography (TLC)

اتبعت الطريقة التي ذكرها النداوي (2000)[2] وموسى (1984) [6] ; AL-Tai (1987)[9] للكشف النوعي عن نواتج التحول الأنزيمية على صفائح زجاجية جاهزة من رقائق السليكا نوع Silica gel 60 F254 المجهزة من شركة Merck وبأبعاد 10 × 20 سم ويسمك 0.25 ملم بعد تنشيطها في فرن بدرجة حرارة 110°م لمدة ساعة ونصف.

8 - تعيين الظروف المثلى لتحويل الكلوكوز إلى الفركتوز في الخامات الصناعية باستخدام إنزيم كلوكوز أيزوميريز .
وشملت على : -

أ. تعيين الزمن الأمثل لتحويل الكلوكوز إلى الفركتوز

أخذ 50 مل من الخامات الصناعية المحضرة بتركيز 20% في دارئ فوسفات البوتاسيوم تركيزه 0.1 مولاري و برقم هيدروجيني مقداره (8) و اضيف 10 مل من كبريتات المغنيسيوم المائية بتركيز 0.05% و 5 مل من محلول الإنزيم المنقى جزئيا حسب الفقرة (3) من هذه الدراسة وفعالية مقدارها 10.8 وحدة/مل وحضن محلول التفاعل في 60°م مدة 50 ساعة مع التحريك المستمر .

سحب 5 مل من مزيج التفاعل كل 5 ساعات وبرد في حمام ثلجي لايقاف التفاعل وحسب تركيز الكلوكوز والفركتوز بالطريقة اللونية وقياس درجة الدوران النوعي الفقرة (5 و 6) من هذه الدراسة بالنسبة لشراب كلوكوز الذرة والكلوكوز النقي في حين اقتصررت الطريقة اللونية بالنسبة لعصير

رأسة كفاءة إنزيم كلوكوز أيزوميريز المنتج من عزلة محلية من البكتريا *Streptomyces sp. HM5* في تحويل الكلوكوز إلى الفركتوز

التمر لان هذه الطريقة تتطلب ان يكون النموذج رائقا وعديم اللون ، كما تم احتساب النسبة المئوية للتحويل % Isomerization كما ورد في الفقرة (5) من هذه الدراسة واجري الكشف النوعي عن نواتج التفاعل في جميع المعاملات الإنزيمية بطريقة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC الفقرة (7) من هذه الدراسة.

ب. تعيين التركيز الأمثل للخامات الصناعية لتحويل الكلوكوز إلى الفركتوز

اتبعت الطريقة الواردة في (8-أ) من هذه الدراسة لمتابعة تحول الكلوكوز إلى الفركتوز مع استخدام تراكيز مختلفة وهي (10 ، 20 ، 30 ، 40) % من كل من شراب كلوكوز الذرة وعصير التمر والكلوكوز النقي مع تثبيت الزمن الأمثل لعملية التحويل في ضوء نتائج التجربة السابقة. اجريت كافة العمليات الحسابية والكشف النوعي لنواتج التحويل بنفس الأسلوب الوارد في الفقرة (8-أ) من هذه الدراسة.

ج. تعيين تركيز المحلول الإنزيمي الأمثل لتحويل الكلوكوز إلى الفركتوز

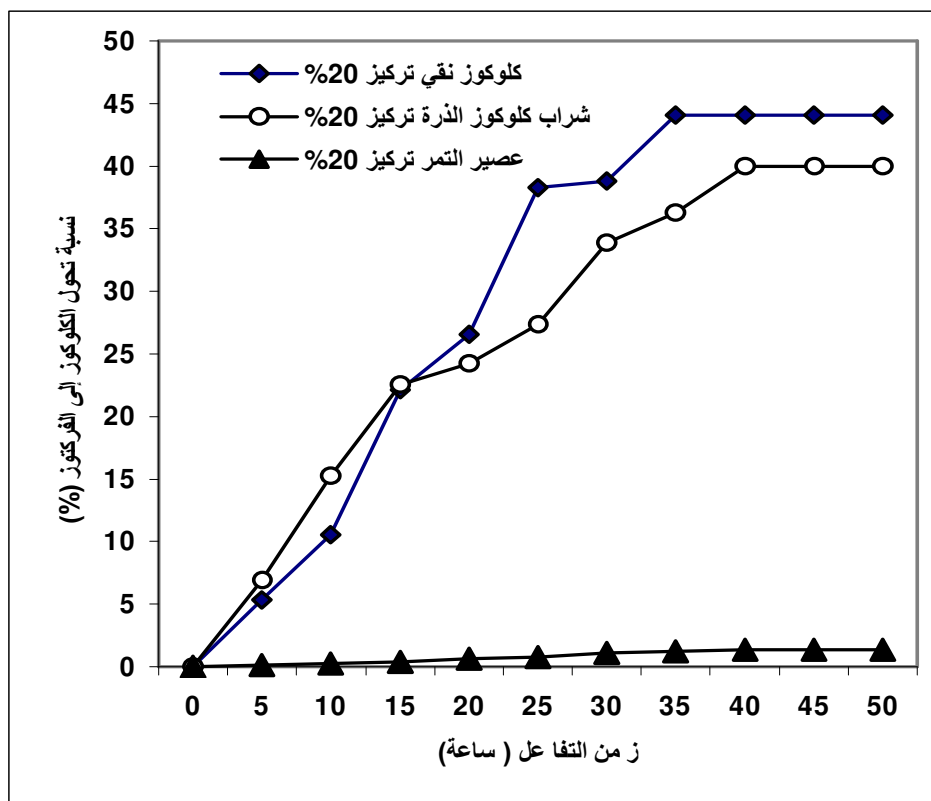
اتبعت الطريقة الواردة في (8-أ) من هذه الدراسة لمتابعة تحول الكلوكوز إلى الفركتوز مع استخدام حجوم مختلفة من المحلول الإنزيمي وهي (0.1 ، 0.3 ، 0.5 ، 0.7 ، 0.9) مل مع تثبيت الزمن الأمثل لعملية التحويل في ضوء نتائج التجربة الفقرة (8-أ) من هذه الدراسة والتركيز الأمثل من مصادر الخامات المختلفة للكلوكوز في ضوء نتائج التجربة (8-ب) من هذه الدراسة. اجريت كافة العمليات الحسابية والكشف النوعي لنواتج التحويل بنفس الأسلوب الوارد في الفقرة (8-أ) من هذه الدراسة.

النتائج والمناقشة:

1. تعيين الزمن الأمثل لتحويل الكلوكوز إلى الفركتوز

اظهرت النتائج الموضحة في الشكل (1) والمقاسة بالطريقة اللونية ان الزمن الأمثل لتحويل الكلوكوز النقي بتركيز 20% إلى الفركتوز هو 35 ساعة من التفاعل إذ بلغ تركيز الفركتوز 8.82 غم/100مل وبما ان تركيز الكلوكوز كان 20غم/100مل عند الشروع بالتفاعل عليه فنسبة التحويل خلال تلك المدة تكون 44.10%.

رأسة كفاءة إنزيم كلوكوز أيزوميريز المنتج من عزلة محلية من البكتريا *Streptomyces sp. HM5* في تحويل الكلوكون إلى الفركتور



شكل (1) الزمن الأمثل ونسبة تحول الكلوكون إلى الفركتور % (مقدرة بالطريقة اللونية) باستعمال إنزيم كلوكوز أيزوميريز المنقى جزئياً والمنتج من بكتريا *Streptomyces sp. HM5* في خامات مختلفة

وعند قياس درجة الدوران النوعي خلال التفاعل وجد أن نسبة التحول تزداد مع الزمن وتصل إلى حدها الأقصى بعد 35 ساعة من زمن التفاعل إذ تبلغ نسبة الفركتور : الكلوكون 45 : 55 وأن درجة الدوران النوعي كانت مساوية إلى -1.2 درجة جدول (1) . كما بينت نتائج طريقة كروموتوكرافيا الطبقة الرقيقة وجود تدرج واضح في زيادة نسبة الفركتور : الكلوكون مع زمن التفاعل شكل (2).

رأسة كفاءة إنزيم كلوكوز أيزوميريز المنتج من عزلة محلية من البكتريا *Streptomyces* sp. HM5 في تحويل الكلوكوز إلى الفركتوز



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 1

شكل (2) كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC (على صفائح نوع سليكا جيل 60 F245 بابعاد

(10 × 20) سم وبسمك 0.25 ملم وباستعمال نظام فصل مكون من ماء : بيوتانول : خلاص الاثيل بنسبة 1 : 5 : 1 ومحلول

رش مكون من 0.2% naphtharesorcinol وحامض الفسفوريك 85% بنسبة 9 : 1) لمحلول الكلوكوز النقي خلال فترات

زمنية مختلفة من تفاعل تحول الكلوكوز إلى الفركتوز بـكلوكوز ايزوميريز المنقى جزئيا والمنتج من بكتريا *Streptomyces* sp.

HM5

1-الكلوكوز القياسي 20%

2-الفركتوز القياسي 20%

3-12 بقع محلول التفاعل للكلوكوز النقي خلال فترات زمنية مختلفة من تفاعل التحول ابتداءً من 5 ساعات من زمن

التفاعل ولغاية 50 ساعة منه وبفارق 5 ساعات بين معاملة واخرى وعند استعمال شراب كلوكوز الذرة بتركيز 20% كمادة

رأسة كفاءة إنزيم كلوكوز أيزوميريز المنتج من عذلة محلية من البكتريا *Streptomyces sp. HM5* في تحويل الكلوكوز إلى الفركتوز

خاضعة فقد أظهرت النتائج في الشكل (1) ان الزمن الأمثل لتحويل الكلوكوز إلى الفركتوز يبلغ 40 ساعة من الشروع بالتفاعل وذلك عند قياس تراكيز المواد الناتجة بالطريقة اللونية إذ بلغ تركيز الفركتوز 3.84 غم/100مل وبما ان تركيز الكلوكوز في وسط التفاعل كان 9.6 غم/100مل عليه تكون نسبة التحول خلال تلك المدة الزمنية هي 40%.

أما عند قياس درجة الدوران النوعي فان نسبة الفركتوز : الكلوكوز بلغت 39.25 : 60.75 بعد مرور 40 ساعة من زمن التفاعل إذ بلغت درجة الدوران النوعي + 7.2 درجة (جدول 1). وظهر التحليل بطريقة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة لشراب كلوكوز الذرة التحول التدريجي للكلوكوز إلى الفركتوز خلال زمن التفاعل علاوة على ظهور بقع بمواقع تختلف عن مواقع بقع الكلوكوز مما يشير إلى احتواء شراب كلوكوز الذرة على نواتج تحلل تمثل سكريات أخرى غير الكلوكوز هذا من جانب ومن جانب آخر فان عدم تغير لون هذه البقع خلال زمن التفاعل يشير إلى عدم تحولها بفعل إنزيم كلوكوز أيزوميريز إلى سكريات أخرى مما يؤكد تخصص الإنزيم بالعمل على الكلوكوز دون غيره شكل (3).



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

شكل (3) كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC (وبالمواصفات المذكورة بالشكل 4-25) لمحلول شراب كلوكوز الذرة خلال فترات

زمنية مختلفة من تفاعل تحول الكلوكوز إلى الفركتوز بكلوكوز ايزوميريز المنقى جزئيا والمنتج من بكتريا *Streptomyces sp.*

HM5

رأسة كفاءة إنزيم كلوكوز أيزوميريز المنتج من عزلة محلية من البكتريا *Streptomyces sp. HM5* في تحويل الكلوكوز إلى الفركتوز

1- شراب كلوكوز الذرة 20% 2- كلوكوز قياسي 20% 3- فركتوز قياسي 20%

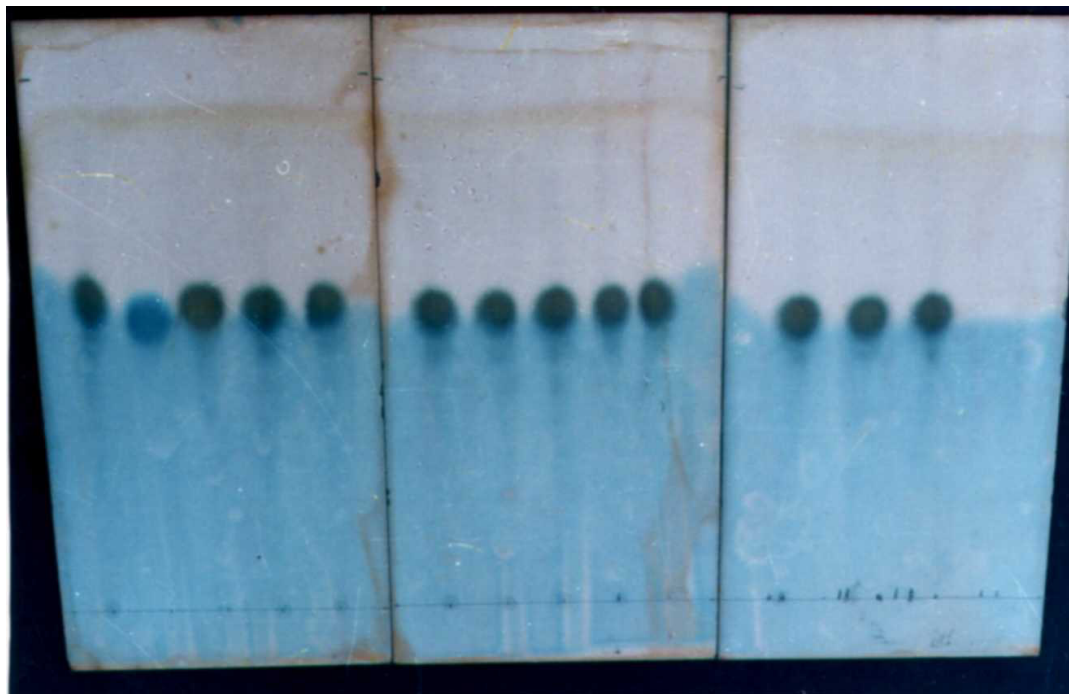
4-13 تمثل بقع محلول التفاعل لشراب كلوكوز الذرة خلال فترات زمنية مختلفة من تفاعل التحول ابتداءً من 5 ساعات من زمن

التفاعل ولغاية 50 ساعة منه وبفارق 5 ساعات بين معاملة واخرى

وعند استعمال عصير التمر بتركيز 20% كمادة خاضعة فقد أوضحت النتائج شكل (1) ان هناك زيادة طفيفة جدا في الحصلة المنتجة من الفركتوز خلال مدة التفاعل إذ بلغ تركيز الفركتوز 0.1 غم/100مل ولما كان تركيز الفركتوز عند الشروع بالتفاعل 7.4 غم/100مل عليه تكون نسبة التحول 1.36% فقط.

ان نسبة تحول الكلوكوز إلى الفركتوز عند استعمال عصير التمر كانت اوطأ بكثير مقارنة مع استعمال الكلوكوز النقي وشراب كلوكوز الذرة كمادة خاضعة تحت ظروف التفاعل نفسها. وقد يعزى ذلك إلى احتواء عصير التمر على بعض الأملاح المعدنية التي قد تسبب تثبيطا لعمل الإنزيم أو بسبب احتوائه على بعض البروتينات التي يحتمل تداخلها مع الإنزيم مسببة تأثيرا سلبيا على عمل الإنزيم أو قد يكون السبب تعرض الإنزيم إلى آلية التثبيط بالنواتج Feed back inhibition وذلك بسبب احتواء عصير التمر اصلا على الفركتوز الذي يشكل نسبة حوالي 39% من نسبة المواد الصلبة الكلية فيه مقارنة بالكلوكوز النقي وشراب كلوكوز الذرة الخاليين من الفركتوز تماما إذ ان الإنزيم يستطيع تحويل الفركتوز إلى الكلوكوز بسبب كون تفاعل التحول من التفاعلات العكسية مما يؤدي بالنتيجة إلى هبوط الفعالية الإنزيمية وانخفاض نسبة التحول في عصير التمر. كما أوضحت نتائج الفصل بكمونوتوكرافيا الطبقة الرقيقة شكل (4) ان عصير التمر يحتوي على تركيز عال من الفركتوز طغى لون بقعته البني على لون بقعة الكلوكوز الازرق ، كما ان الفروقات في نسبة تحول الكلوكوز إلى الفركتوز تكاد تكون طفيفة جدا أو معدومة في المعاملات التي استخدم فيها عصير التمر الإنزيم (النموذج من 4-13) مقارنة بالمعاملة القياسية لعصير التمر (نموذج رقم 3) .

رأسة كفاءة إنزيم كلوكوز أيزوميريز المنتج من عزلة محلية من البكتريا *Streptomyces sp. HM5* في تحويل الكلوكوز إلى الفركتوز



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

شكل (4) كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC (وبالمواصفات المذكورة بالشكل 4-25) لمحلول عصير التمر خلال فترات زمنية مختلفة من تفاعل تحول الكلوكوز إلى الفركتوز بـكلوكوز أيزوميريز المنقى جزئياً والمنتج من بكتريا *Streptomyces sp. HM5*

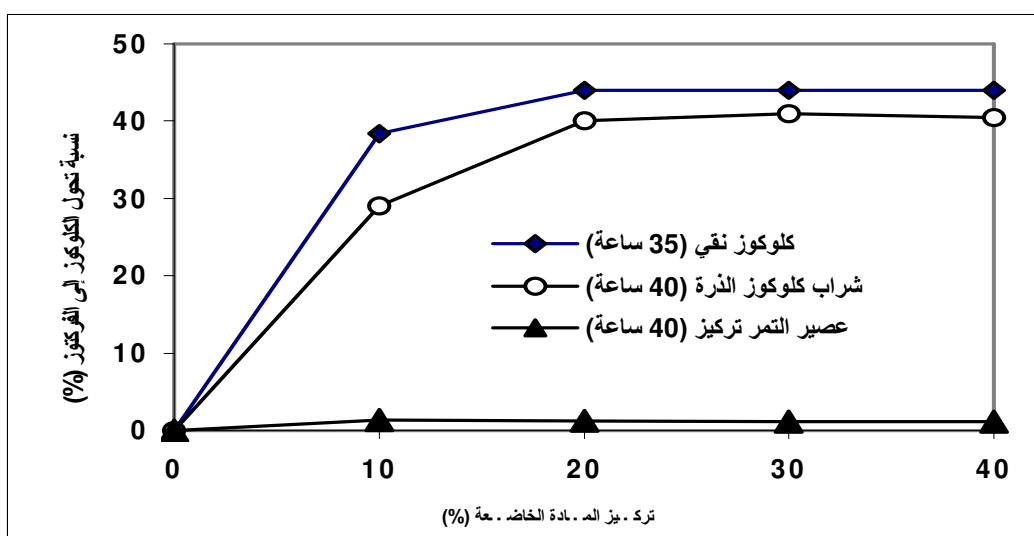
1-عصير التمر بتركيز 20%
 2-كلوكوز قياسي 20%
 3-فركتوز قياسي 20%
 4-13 تمثل بقع محلول التفاعل لعصير التمر خلال فترات زمنية مختلفة من تفاعل التحول ابتداءً من 5 ساعات من زمن التفاعل ولغاية 50 ساعة منه ويفارق 5 ساعات بين معاملة وأخرى

وقد تباينت الدراسات في تحديد الزمن الأمثل لتحويل الكلوكوز إلى الفركتوز تبعاً لاختلاف مصدر الإنزيم وطريقة استعماله بشكل حر أو مقيد Immobilized واختلاف نوع المادة الخاضعة وتركيزها

رأسة كفاءة إنزيم كلوكوز أيزوميريز المنتج من عزلة محلية من البكتريا *Streptomyces sp. HM5* في تحويل الكلوكون إلى الفركون

2. تعيين التركيز الأمثل للخامات الصناعية لتحويل الكلوكون إلى الفركون

أوضحت النتائج في الشكل (5) أن التركيز الأمثل لتحويل الكلوكون النقي إلى الفركون كان 20% إذ بلغ تركيز الفركون في محلول التفاعل 17.3 غم/100مل بعد 35 ساعة ونسبة تحول قدرت بحوالي 44%.



شكل (5) تأثير التراكيز المختلفة من الكلوكون النقي وشراب كلوكوز الذرة وعصير التمر على نسبة تحول الكلوكون إلى الفركون
% (مقدرة بالطريقة اللونية) باستعمال كلوكوز أيزوميريز المنقى جزئياً والمنتج من البكتريا *Streptomyces sp. HM5* عند الحضانة على درجة الحرارة 60°م وخلال الزمن الأمثل للتحويل لكل خامات

وعند قياس درجة الدوران النوعي لهذه المعاملات جدول (2) وجد أن تركيز 20% أيضاً يمثل أفضل تركيز لتحويل الكلوكون إلى الفركون إذ بلغت درجة الدوران النوعي -1.2 درجة والتي يقابلها نسبة تحول مقدارها 45 فركون : 55 كلوكوز.

رأسة كفاءة إنزيم كلوكوز أيزوميريز المنتج من عزلة محلية من البكتريا *Streptomyces sp. HM5* في تحويل الكلوكوز إلى الفركتوز

جدول (2) درجة الدوران النوعي لتراكيز مختلفة من محلول الكلوكوز النقي وشراب كلوكوز الذرة خلال الزمن الأمثل لتحويل

الكلوكوز إلى الفركتوز باستعمال إنزيم كلوكوز أيزوميريز

المادة الخاضعة	التركيز %	الزمن الأمثل للتحويل (ساعة)	درجة الدوران النوعي α	نسبة الفركتوز : الكلوكوز
الكلوكوز النقي	10	35	0.10+	62.00 : 38.00
	20	35	1.20-	55.00 : 45.00
	30	35	1.50-	55.00 : 45.00
	40	35	2.00-	55.00 : 45.00
شراب كلوكوز الذرة	10	40	5.00+	70.00 : 30.00
	20	40	7.85+	60.75 : 39.25
	30	40	12.50+	59.20 : 40.80
	40	40	16.50+	59.90 : 40.10

بينما كان التركيز الأمثل للتحويل باستعمال شراب كلوكوز الذرة كمادة خاضعة هو 30% إذ أعطى أقصى نسبة تحول والتي بلغت فيها حصيلة الفركتوز المتكونة 5.82 غم/100مل شكل (5). ولما كانت كمية الكلوكوز في الخامة المذكورة 14.19 غم/100مل عند الشروع في التفاعل عليه فإن نسبة تحول الكلوكوز إلى الفركتوز تصل إلى 41.01%.

وعند قياس درجة الدوران النوعي لهذه المعاملات جدول (2) وجد أن تركيز 30% أيضاً يمثل أفضل تركيز لتحويل الكلوكوز إلى الفركتوز إذ بلغت درجة الدوران النوعي 12.5+ درجة والتي يقابلها نسبة تحول مقدارها 40.8 فركتوز : 59.2 كلوكوز. وقد يعود سبب عدم زيادة التحول بزيادة تركيز المادة الخاضعة إلى تأثير مقاومة انتشار المادة الخاضعة داخل

جزيئة الإنزيم الذي يزداد بزيادة تأثير المادة الخاضعة [16] (1981) Helwiig-Nielsen

رأسة كفاءة إنزيم كلوكوز أيزوميريز المنتج من عزلة محلية من البكتريا *Streptomyces* sp. HM5 في تحويل الكلوكوز إلى الفركتوز

وعند استعمال عصير التمر وجد ان افضل تركيز كان 10% شكل (5) إذ كان تركيز الفركتوز الناتج من التحول فقط دون الموجود اصلا في عصير التمر هو 0.05 غم/100مل ولما كان تركيز الكلوكوز في عصير التمر 3.7 غم/100مل عند الشروع بالتفاعل عليه فان نسبة التحول قدرت بحوالي 1.35% فقط.

كما اظهرت نتائج الفصل الكروماتوجرافي شكل (6) تحول واضح للكلوكوز إلى الفركتوز في كل من معاملات الكلوكوز النقي وشراب كلوكوز الذرة وخصوصا في التراكيز من 20-40% من كل منهما بينما اظهرت بقع محلول التفاعل لعصير التمر تحول ضعيف جدا للكلوكوز إلى الفركتوز وفي جميع التراكيز المستعملة منه.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

شكل (6) كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة TLC (وبالمواصفات المذكورة بالشكل 4-25) لتراكيز

مختلفة من الخامات (مواد خاضعة) وعلاقتها بنواتج تحول الكلوكوز إلى الفركتوز باستعمال كلوكوز ايزوميريز المنقى جزئيا

والمنتج من بكتريا *Streptomyces* sp. HM5 بعد الحضان على 60°م وخلال الزمن الامثل للتفاعل لكل خامات

1- كلوكوز نقي 20%

2- 5 بقع محلول التفاعل للكلوكوز النقي وبتراكيز 10-40% وخلال الزمن الامثل للتفاعل 35 ساعة

رأسة كفاءة إنزيم كلوكوز أيزوميريز المنتج من عزلة محلية من البكتريا *Streptomyces sp. HM5* في تحويل الكلوكوز إلى الفركتوز

6- شراب كلوكوز الذرة بتركيز 20%

7-10 بقق محلول التفاعل لشراب كلوكوز الذرة وبتراكيز 10-40% وخلال الزمن الامثل للتفاعل 40 ساعة

11- عصير التمر بتركيز 20%

12-15 بقق محلول التفاعل لعصير التمر وبتراكيز 10-40% وخلال الزمن الامثل للتفاعل 40 ساعة

وعلى ضوء ما تقدم نستنتج ان افضل نسبة تحول امكن الحصول عليها هي 44-45% خلال 35 ساعة من زمن التفاعل

باستعمال الكلوكوز النقي بتركيز 20% وحوالي 41% و1.33% خلال 40 ساعة من زمن التفاعل باستعمال شراب كلوكوز الذرة

بتركيز 30% وعصير التمر بتركيز 10% على التوالي.

وقد تباينت الدراسات في تحديد التركيز الأمثل من المادة الخاضعة المستعملة في تحول الكلوكوز إلى الفركتوز تبعاً لاختلاف مصدر الإنزيم ونوع المادة الخاضعة واختلاف ظروف التفاعل. فقد اشار [8] (1979b) Abn & etal. إلى ان الحصلة المنتجة من الفركتوز تزداد طردياً من 5-29 غم/100مل بزيادة تركيز المادة الخاضعة (الكلوكوز النقي) من 20-60% بعد مرور 5-60 ساعة من زمن التفاعل. [كما اشار [13] (1980) Bahatia & Prabha إلى ان نسبة تحول الكلوكوز إلى الفركتوز خلال 12 ساعة من زمن التفاعل بلغت 58% عند استعمال متحلل الذرة كمادة خاضعة والحاوي على الكلوكوز بتركيز 18% وعند زيادة تركيز الكلوكوز إلى 36% و54% فان نسبة التحول انخفضت إلى 52 و43.6% على التوالي خلال المدة الزمنية نفسها باستعمال إنزيم كلوكوز أيزوميريز المنتج من بكتريا *Lactobacillus sp.* وعند استعمال متحلل البكاز كمادة خاضعة فان الإنزيم أعطى نسبة تحول تعادل 13.6% عندما كان تركيز الكلوكوز في المادة الخاضعة 18% وزادت إلى 26% بزيادة تركيز الكلوكوز إلى 54% خلال المدة الزمنية نفسها من التفاعل.

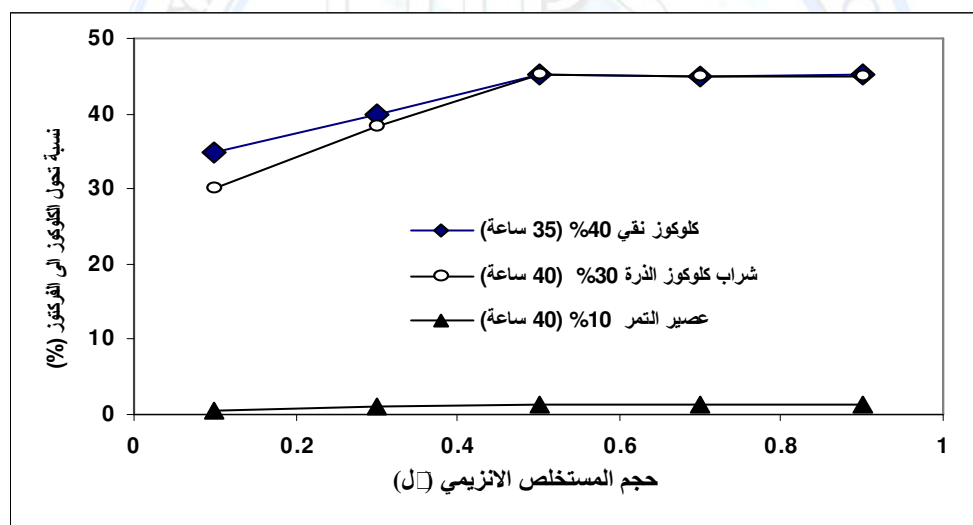
كما ذكر [12] (1996) Hassan & Bazara (في دراسة للظروف المثلى التي تؤثر في عملية تحول الكلوكوز إلى الفركتوز في مفاعل مستمر continuous reactor باستعمال إنزيم كلوكوز أيزوميريز المقيد والمنتج من بكتريا *Streptomyces sp.* ان نسبة التحول تراوحت من 27.6-45.5% باستعمال الكلوكوز النقي بتركيز من 30-60%

رأسة كفاءة إنزيم كلوكوز أيزوميريز المنتج من عزلة محلية من البكتريا *Streptomyces sp. HM5* في تحويل الكلوكون إلى الفركونز

وكانت تلك النسبة عند اقصاها باستعمال الكلوكون بتركيز تراوحت بين 34-36% مما يشير إلى أهمية تحديد التركيز الأمثل لعملية تحول الكلوكون إلى الفركونز.

3. تعيين تركيز الإنزيم الأمثل لتحول الكلوكون إلى الفركونز

أظهرت النتائج في الشكل (7) أن استعمال 0.5 مل من الإنزيم (5.41 وحدة) تعطي أفضل نسبة تحول من الكلوكون إلى الفركونز مقارنة مع الوحدات الإنزيمية الأخرى المستعملة باختلاف مصادر المادة الخاضعة إذ بلغت أقصى نسبة تحول 45.3% و 45.2% و 1.35% عند استعمال الكلوكون النقي وشراب كلوكوز الذرة وعصير التمر كمادة خاضعة على التوالي.



الشكل (7) تأثير استخدام حجوم مختلفة من إنزيم الكلوكون أيزوميريز المنقى جزئياً والمنتج من بكتريا *Streptomyces sp. HM5* وذو فعالية (10.8 وحدة/مل) في نسبة تحول الكلوكون إلى الفركونز (مقدرة بالطريقة اللونية) بعد الحضانة على 60°م وللمدة المثالية للتفاعل لكل مادة خاضعة

رأسة كفاءة إنزيم كلوكوز أيزوميريز المنتج من عزلة محلية من البكتريا *Streptomyces sp. HM5* في تحويل الكلوكوز إلى الفركتوز

وعند قياس درجة الدوران النوعي جدول (3) وجد ان استخدام 0.5 مل من المحلول الإنزيمي (5.41 وحدة) اعطت درجة دوران نوعي بلغت -1.2 درجة و +12.0 درجة باستعمال الكلوكوز النقي وشراب كلوكوز الذرة كمواضع خاضعة على التوالي والتي كانت تقابل أعلى نسبة من الفركتوز : الكلوكوز والتي بلغت 45 : 55 و 41 : 59 على التوالي.

جدول (3) درجة الدوران النوعي لمحلول شراب كلوكوز الذرة والكلوكوز النقي باستعمال حجوم مختلفة من انزيم كلوكوز

ايزوميريز

المادة الخاضعة	حجم المستخلص الانزيمي (مل)	الزمن الأمثل للتحويل (ساعة)	درجة الدوران النوعي α	نسبة الفركتوز : الكلوكوز
الكلوكوز النقي %20	0.1	35	1.10+	65.00 : 35.00
	0.3	35	0.22-	60.00 : 40.00
	0.5	35	1.20-	55.00 : 45.00
	0.7	35	1.20-	55.00 : 45.00
	0.9	35	1.20-	55.00 : 45.00
شراب كلوكوز الذرة %30	0.1	40	15.50+	70.00 : 30.00
	0.3	40	14.00+	62.00 : 38.00
	0.5	40	12.00+	59.00 : 41.00
	0.7	40	12.00+	59.00 : 41.00
	0.9	40	12.00+	59.00 : 41.00

كما اشارت نتائج الفصل بكموتوكرافيا الطبقة الرقيقة شكل (8) إلى ان هناك تحولا تدريجيا للكلوكوز إلى الفركتوز خصوصا في المعاملات التي استعمل فيها الكلوكوز النقي وشراب كلوكوز الذرة موادا خاضعة في حين لم يكن بالامكان

رأسة كفاءة إنزيم كلوكوز أيزوميريز المنتج من عزلة محلية من البكتريا *Streptomyces sp. HM5* في تحويل الكلوكوز إلى الفركتوز

تميز تغير ملحوظ في المعاملات التي استعمل فيها عصير التمر كمادة خاضعة بسبب ارتفاع نسبة الفركتوز أصلا في هذا المصدر وتغلب اللون البني المميز له (الفركتوز) على البقع المفصولة.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

شكل (8) كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC (وبالمواصفات المذكورة بالشكل 4-25) لمحلول الكلوكوز النقي وشراب كلوكوز الذرة وعصير التمر باستعمال حجوم مختلفة من إنزيم كلوكوز أيزوميريز المنقى جزئيا والمنتج من بكتريا *Streptomyces sp. HM5* وبفعالية 10.8 وحدة/مل بعد الحضانة على 60°م وخلال الزمن الأمثل لكل مادة خاضعة

5-1 بقع محلول الكلوكوز النقي باستعمال 0.1 و 0.3 و 0.5 و 0.7 و 0.9 مل من المحلول الإنزيمي على التوالي.

6-10 بقع محلول شراب كلوكوز الذرة باستعمال 0.1 و 0.3 و 0.5 و 0.7 و 0.9 مل من المحلول الإنزيمي على التوالي .

11-15 بقع محلول عصير التمر باستعمال 0.1 و 0.3 و 0.5 و 0.7 و 0.9 مل من المحلول الإنزيمي على التوالي.

وتأتي هذه التجارب منسجمة مع ما تم التوصل إليه في تجارب تحديد الظروف المثلى لعملية تحويل الكلوكوز إلى الفركتوز والتي سبق الإشارة إليها في هذه الدراسة والتي استعمل فيها 0.5 مل من المحلول الإنزيمي. وعلى ضوء ما تقدم نستنتج بأن الحصة المنتجة من الفركتوز والنسبة المئوية للتحويل تزداد بزيادة عدد الوحدات الإنزيمية أي بزيادة تركيز الإنزيم وعند

رأسة كفاءة إنزيم كلوكوز أيزوميريز المنتج من عزلة محلية من البكتريا *Streptomyces sp. HM5* في تحويل الكلوكوز إلى الفركتوز

بلوغ تلك الزيادة إلى اقصاها فانها تبقى ثابتة ولا تؤثر زيادة تركيز الإنزيم بعد ذلك على نسبة التحول. ويؤيد ذلك ما ذكره [21] (Segal 1976) من ان سرعة التفاعل الإنزيمي ومعدل التغير في النواتج عادة تتناسب طرديا مع تركيز الإنزيم بثبوت تركيز المادة الخاضعة وعند بلوغ سرعة التفاعل إلى اقصاها بمرور الزمن فان تلك العلاقة تتدهور وتصبح غير خطية إذ لا تتأثر سرعة التفاعل الإنزيمي بتركيز الإنزيم. كما اشار [7] (Abn &Byun. 1979a) في دراسة لمعرفة تأثير تركيز إنزيم كلوكوز أيزوميريز المنتج من بكتريا *Streptomyces sp. K-45* والمقيد بطريقة الارتباطات العرضية مع الكلوتارالديهيد على نسبة تحول الكلوكوز إلى الفركتوز إلى ان الحصيلية المنتجة من الفركتوز تزداد زيادة خطية مع زيادة تركيز الإنزيم المقيد. إذ بلغت تلك الحصيلية اقصاها وهي 1.8 و 2.7 و 4.1 ملي مول فركتوز / لتر عند استعمال 4.7 و 7.2 و 10 غم من الإنزيم المقيد على التوالي.

المصادر

- 1 - العبيدي ، سعد حسين خضير استخلاص وتوصيف إنزيم الكلوكوز ليزوميريز المنتج من البكتريا الخيطية المحلية ودراسة تحسين إنتاجه باستخدام أشعة كاما. أطروحة دكتوراه. كلية العلوم - جامعة بغداد. . (2004).
- 2 - النداوي ، علاء عائد عبيد دراسة حركية لتفاعل تحويل الكلوكوز إلى الفركتوز باستعمال راتنج الزيولايت والومينات الصوديوم المثبتة تحت ظروف الأمواج فوق الصوتية. أطروحة دكتوراه. كلية الزراعة - جامعة بغداد. . (2000).
- 3 - جبر ، حميد عبود) إنتاج وتنقية إنزيم كلوكوز أيزوميريز المنتج من عزلة محلية من بكتريا *Streptomyces sp. HM5* . مع دراسة بعض خواصه وتطبيقاته . اطروحة دكتوراه .جامعة بغداد / كلية الزراعة . . (2004)
- 4 - محي الدين ، محمد عمر وجبر ، حميد عبود ودلالي ، باسل كامل إنتاج إنزيم كلوكوز أيزوميريز من عزلة محلية من بكتريا *Streptomyces sp. HM5*
- 5 - العزل والغريلا والتشخيص. مجلة ديالى للبحوث العلمية والتربوية . 2006 (24) ، 89 - 109 .

رأسة كفاءة إنزيم كلوكوز أيزوميريز المنتج من عزلة محلية من البكتريا Streptomyces sp. HM5 في تحويل الكلوكوز إلى الفركتوز

6 - محي الدين ، محمد عمر وجبر ، حميد عبود ودلالي ، باسل كامل إنتاج إنزيم كلوكوز ايزوميريز من عزلة محلية من بكتريا Streptomyces sp. HM5

7- تعيين الظروف المثلى لإنتاج الإنزيم بطريقة المزارع المغمورة. مجلة ديالى للبحوث العلمية والتربوية . 2008 (31) 293 – 274

8- موسى ، طارق ناصر). استخدام الطريقة الكيميائية لتحويل كلوكوز عصير التمر إلى الفركتوز. رسالة ماجستير. كلية الزراعة – جامعة بغداد. (1984)

7- Ahn, B. Y. and Byun, S. M. Studies on whole cell immobilized glucose isomerase. I- Preparation and properties of whole cell immobilized glucose isomerase. Korean J. Food Sci. Technol. (1979a); 11(3): 192-199.

8- Ahn, B. Y. and Byun, S. M.. Studies on whole cell immobilized glucose isomerase. II- Operational studies on the batchwise and Continuous isomerization of D-glucose. Korean J. Food Sci. Technol. (1979b); 11(4): 249-257.

9 - Al-Tai, A. M.; Ali, Y. and Abdul-Razzak, S. H. Isomerization of glucose to fructose: Production and some properties of glucose isomerase from Streptomyces sp. strain C7. Enzyme Microb. Technol. (1987). ;9: 632-634.

10- Anon, Chem. Engineering News. Aug. (1975); 18, 53, 22. (Cited in Joseph, R. & Murthy, 1976).

11- Atiken, J. M.; Dunnigan, M. G. and Ford, J. A. International symposium on clinical and metabolic aspects of levulose, Clamc Limited Crew.(1970); 97-103.

12- Bazaraa, W. A. and Hassan, E. E. Response surface optimization for the continuous glucose isomerase process. J. Industrial Microbiology (1996); Vol. 17: 100-103.

رأسة كفاءة إنزيم كلوكوز أيزوميريز المنتج من عزلة محلية من البكتريا Streptomyces sp. HM5 في تحويل الكلوكوز إلى الفركتوز

- 13- Bhatia, M. and Prabhu, K. AProduction of high-fructose Syrup by a heat-Fixed Lactobacillus sp. Biotechnol. Bioeng.. (1980); 12: 1957-1977.
- 14- Chand, S. and Ghose, T. K. Bioconversion of cellulosic substance into energy chemical and microbial protein. International symposium (Indian Institute of Technology, New Delhi). (1976); pp. 573.
- 15- Dalaly, B. K. and Abdullah, M. S. Isolation and partial characteization of glucose isomerase from Streptomyces. Zanco (Iraqi) (1986); V. 4 (Supplement): 131-139.
- 16- Helwiig-Nielsen, B. Production of fructose-containing syrup with enzymes. International Sugar Journal, August (1981); 227-231.
- 17- Hemmingsen, S. H. Applied Biochemistry and Bioenginerring. (edited by wingard et al.,) (1979); Vol. 2 pp. 157-183 Academic press New York (cited in Deshmukh, S. S. and Shankar, V. 1996.).
- 18 -Kasumi, T.; Hayashi, K. and Tsumure, NPurification and enzymatic properties of glucose isomerase from Streptomyces griseofuscus S-41. Agric. Biol. Chem. (1981); 45 (3): 619-627.
- 19- Park, Y. K. and Toma, MIsoimerization of glucose semipurifie. d, cell bound and immobilized glucose isomerase of Streptomyces sp. J. Food Sci. (1975); 40: 1112-1114.
- 20- Pritham, G. HAndersons Essentials in Biochemistry. (1998); P. 74, Mosby, New York, N. Y. (Cited in Bazaraa, W. A. and Hassan, E. E. 1996).
- 21- Segel, I. H Biochemical Calculations. (1976).2 nd Edition, John Wiley and Sons, Inc. New York.
- 22- Schenck, F. W. High fructose syrup-review. Int. Sugar. (2000); 102: 285-288.

رأسة كفاءة إنزيم كلوكوز أيزوميريز المنتج من عزلة محلية من البكتريا Streptomyces sp. HM5 في تحويل الكلوكوز إلى الفركتوز

- 23- Stephen, H. and Suraz, N. sugar and sweetener: Situation and outlook. U. S. department of agriculture, (2003) June: 1-74.
- 24- Ting, S. V. Rapid colorimetric methods for simultaneous determination of total reducing sugar and fructose in citrus juices. J. Agric, Food Chem. (1956); 4(3): 263-266.
- 25- Tsumura, N.; Kasumi, T. and Ishikawa, M. Immobilization of glucose isomerase in microbial cells. Starch / Starke. (1978); 30 (12): 420-423.
- 26- Vankatasubramanian, K. and Harrow, L. S. Design and operation of a commercial immobilized glucose isomerase reactor design. Annals of the New York Academy of Science (1979); V. 326 (28): 141-154.