# دراسة بعض خواص إنزيم كلوكوز أيزوميريز المنتج من عزلة محلية من البكتريا Streptomyces sp. HM5

**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 الكلكوزايزوميريز بتحويل الكلكوزالى الفركتوزوالزايلوزالى الزايلولوز . وينتج هذا الانزيم من العديد من الاحياء المجهريه ولاسيما بكتريا Streptomyces ، وقد حظي هذا الانزيم بدراسات عديده من حيث الانتاج والتنقية والتوصيف لما له اهمية في استعماله في مجالات متعدده في الصناعات الغذائية والدوائية. يهدف هذا البحث الى دراسة بعض خواص انزيم الكلوكوز ايزوميريزالمنتج من عزلة محلية من بكتريا الـ Streptomyces sp. HM5 والمنقى جزئيا . تتضمن تلك الخواص دراسة الوزن الجزيئي ، الـ pH الامثل للفعالية والثبات ، درجة الحرارة المثلى للفعالية والثبات ، حساب طاقة التنشيط وقابلية الانزيم للاحتفاظ بفعاليتة بعد معاملتة بدرجات حرارية مختلفة وحساب بعض الثوابت الحركيه الانزيمية مثل Vmax والـ Km ودراسة تخصيصية الانزيم تجاة الكلوكوز والفركتوز والزايلوز كمواد خاضعة . تم استخدام انزيم الكلوكوزايزميريز المنتج من عزلة محلية من بكتريا الـ Streptomyces sp.HM5 والمنقى جزيئا. وتم تعيين الوزن الجزيئي باستخدام تقنية الترشيح الهلامي والهجرة الكهربائية . كما تم تعيين الفعالية الانزيمية بطريقة لونيه باستخدام جهاز الامتصاص الضوئي وعلى طول موجي 560 نانوميتيرومنها تم معرفة الـ pH الامثل ودرجة الحرارة المثلى للفعالية الانزيمية والثبات والفة الانزيم للمواد الخاضعة(الكلكوز، الفركتوز، الزايلوز) بينت النتائج بان الوزن الجزيئي للانزيم يبلغ 178000 ، كما ان الـ pH الامثل للفعالية بلغ 8 وان درجة الحراة المثلى للفعالية كانت 60 م . كما ان للانزيم الفة عالية تجاة الزايلوز مقارنة بالكلوكوز والفركتوز. حيث بلغت قيمةVmax / Km للزايلوز47.41x10-6 في حين للكلوكوز والفركتوز كانت10.75x10-6 و 5.42x10-6 علىالتوالي . تبين من هذه الدراسة بان الانزيم يتكون من وحدتين متماثلين وانه يعتبر من الانزيمات ذات الوزن الجزيئي العالي وان للانزيم الفة عالية تجاة الزايلوز .

**الكلمات المفتاحية** ( الكلوكوز ايزميريز ، الترشيح الهلامي ، الهجرة الكهربائية )

## المقدمـــــــــة

يساعد إنزيم كلوكوز ايزوميريز على تحفيز تفاعل تحويل كلوكوز إلى الفركتوز والزايلوز وقد اكتسب اكتشاف هذا الأنزيم أهمية من الناحية الصناعيـة والتجاريـــة في توفيـر شراب الـذرة الغني بالفركتوز High Fructose Corn Syrup والذي استعمل كبديل طبيعي للسكروز في العديد من الصناعات الغذائية كصناعة المشروبات الغازية والمعجنات والأغذية المصنعة [16] ( 1979 ) Vankatasubramanicanويختلف تركيب الأنزيم ومحتواه من الحوامض الأمينية تبعاًلاختلاف مصدره ; [10] ( 1984 ) Hoschke;] [8] ( 1996 ) Deshmukhويتفاوت نتيجة لذلك الوزن الجزيئي للإنزيم فضلاً عن الطريقة المستعملة في التقدير إذ يتراوح الوزن الجزيئي بين حوالي 120-200 كيلو دالتون ( Deshmukh [8]( 1996كما إن الرقم الهيدروجيني الأمثل ودرجة الحرارة المثلى لفعالية وثبات الأنزيم يختلف هو الآخر تبعاً لاختلاف مصدر الأنزيم [6] (2000) Belefaquihويتراوح الرقم الهيدروجيني الأمثل ودرجة الحرارة المثلى لفعالية إنزيم كلوكوز ايزوميريز بين 7-9 و60-80°م على التوالي اما فيما يتعلق بتخصصية الأنزيم فقد أشارت معظم الدراسات إلى إن إنزيم كلوكوز ايزوميريز يستطيع العمل على اكثر من مادة خاضعة من السكريات الخماسية والسداسية الالديهايدية والكيتونية والسكريات المفسفرة إلاّ إن الزايلوز والكلوكوز يعدان من اكثر المواد الخاضعة شيوعاً لعمل الأنزيم .وتحدد الملائمة النسبية لمواد التفاعل المختلفة لإنزيم معين من قيمة ثابت ميكالس Km علاوة على النسبة بين السرعة القصوى إلى قيمة ثابت ميكالس Vmax/Km إذ إن افضل مواد تفاعل هي التي تمتلك اقل قيمة من قيم ثابت ميكالس واعلى قيمة من النسبة بين السرعة القصوى إلى قيمة ثابت ميكالس وبالعكس[13] ( 1976) Segel .

## المواد وطرائـــــق العمـــــل:

1. الكائن المجهري

استخدمت في هذه الدراسة عزلة محلية من البكتريا Streptomyces sp. HM5 تم عزلها وتشخيصها في دراسة سابقة ، محي الدين وجماعتة ( 2004 ) [3]

2. إنتاج الأنزيم

تم إنتاج الأنزيم من البكتريا باستخدام طريقة المزارع المغمورة وفق الظروف المثلى للإنتاج التي تم تثبيتها في دراسة سابقة ، محي الدين وجماعتة ( 2004 ) [4]

3. استخلاص الأنزيم وتنقيته

جرى استخلاص الأنزيم بمحلول ستايل تراي مثيل أمونيوم بروماید بتركيز 0.1% وتم تنقية المستخلص الخام للإنزيم بسلسلة من الخطوات تضمنت تركيز الأنزيم بالترسيب بكبريتات الأمونيوم ثم الديلزة ، وامرار المحلول الأنزيمي على عمود التبادل الآيوني بعمود DEAE-cellulose واخيراً التنقية بكروموتوكرافيا الترشيح الهلامي بعمود Sephacryl S – 200 SFالتي ذكرها جبر ( 2004 ) [2] .

استخدم الأنزيم المنقى جزئيا في جميع التجارب المتعلقة بدراسة خواص الأنزيم في هذا البحث.

4. تقدير فعالية الأنزيم

قدرت فعالية الأنزيم حسب الطريقة التي ذكرها [15] ( 1969 ) Takasakiمع بعض التحويرات التي ذكرها [11] ( 2000 ) Kanekoوعرفت وحدة الفعالية بأنها كمية الأنزيم التي تحرر واحد مايكرومول من الفركتوز في الدقيقة الواحدة تحت ظروف التجربة.

5 - تعيين الوزن الجزيئي : - عين الوزن الجزيئي للإنزيم بطريقتين:-

أ – طريقة الترشيح الهلامي

باستخدام عمود Sephacryl S -200 SF وبابعاد ( 48 x 1.6 سم ) .وجرت موازنة العمود واسترداد الإنزيم بمحلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.05 مولاري وبرقم هيدروجيني 7.5 والحاوي على كبريتات المغنسيوم بتركيز 0.005 مولاري وبمعدل جريان 36 مل/ساعة وبواقع 2.4 مل للجزء الواحد. واشتملت البروتينات القياسية على Bovin serum albumin وزنه الجزيئي 67 كيلو دالتون وOvaltran ferrin وزنه الجزيئي 76 كيلو دالتون وFerritin وزنه الجزيئي 440 كيلو دالتون وThyro globulin وزنه الجزيئي 660 كيلو دالتون. عين الوزن الجزيئي من المنحنى القياسي للعلاقة بين نسبة حجم الاسترداد لكل بروتين قياسي إلى حجم استرداد الدكستران الأزرق مقابل لوغارتيم الوزن الجزيئي لذلك البروتين.

ب - طريقة الترحيل الكهربائي Electrophoresis

اتبعت طريقة الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الاكريلامايد وبوجود Sodium dodecyl sulfate (SDS) تبعاً لطريقة [12] ( 1970 ) Laemmli والموصوفة من قبل [9] ( 1990 ) Grafin. حسبت الحركة النسبية Relativ mobility (Rm) لحزم البروتينات القياسية أعلاه (الفقرة 5-أ) وللأنزيم من العلاقة بين المسافة التي قطعتها الحزم البروتينية (سم) مقسومة على المسافة التي قطعتها صبغة البروموفينول الزرقاء (سم).استخرج الوزن الجزيئي برسم العلاقة بين لوغارتيم الأوزان الجزيئية للبروتينات القياسية مقابل حركتها النسبية في الهلام.

6. تعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم

قدرت الفعالية الأنزيمية وفق الفقرة (4) مع استخدام محلول الخلات الدارئ برقم هيدروجيني 4 و5 ومحلول فوسفات الصوديوم الدارئ برقم هيدروجيني 6 ، 7 ، 8 ومحلول الكلايسين – هيدروكسيد الصوديوم برقم هيدروجيني 9 و10 و11 و12 وحضرت جميع المحاليل الدارئة بتركيز 0.1 مولاري. ورسمت العلاقة بين قيم الأرقام الهيدروجينية المختلفة مقابل فعالية الأنزيم لتعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل للفعالية الأنزيمية

7. تعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية الإنزيم

قدرت الفعالية الأنزيمية وفق الفقرة (4) وعلى مدى من درجات الحرارة تراوحت بين 30-90°م وعند الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم. رسمت العلاقة بين درجات الحرارة مقابل فعالية الأنزيم لتعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية الأنزيم [8]( 1996 ) Deshmukh

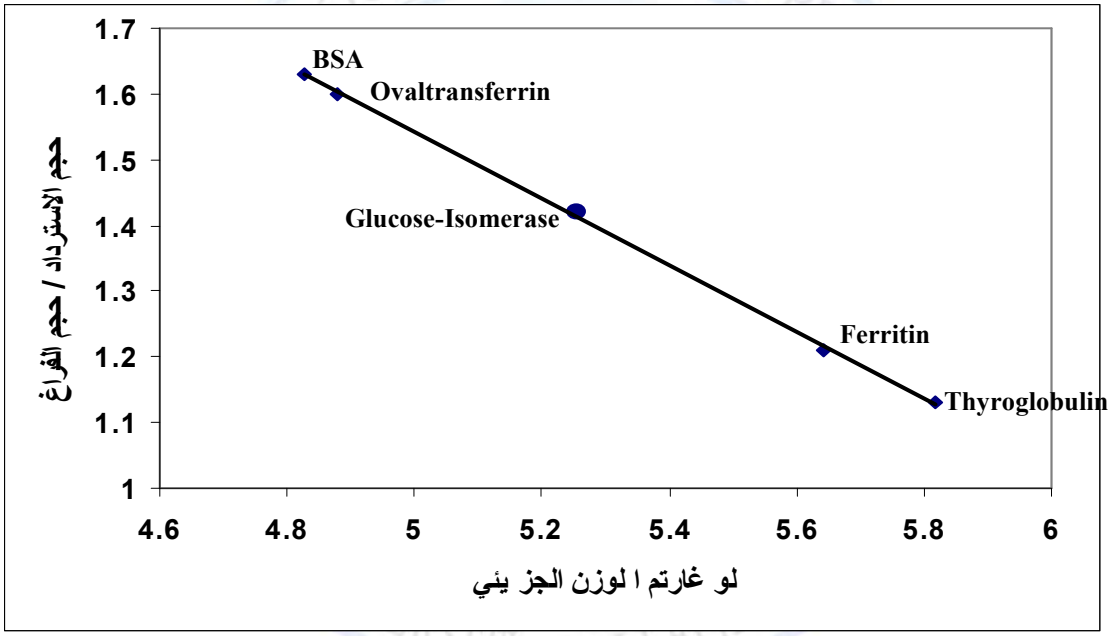
8. تعيين تخصص الأنزيم

حضرت تراكيز مختلفة من كل من الزايلوز والفركتوز تراوحت بين 0.1-1 مولاري في محلول فوسفات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.1 مولاري وبرقم هيدروجيني 8 وقدرت الثوابت الحركية للإنزيم والتي شملت على ثابت ميكالس Kmوالسرعة القصوى Vmax ورسمت العلاقة بين مقلوب السرعة الأولى 1/V وتراكيز المادة الأساس [S] بطريقة Lineweaver-Burk reciprocal plot وذلك لتحديد تخصصية الأنزيم تجاه المادة الأساس .

## النتائج والمناقشة

1- الوزن الجزيئي للإنزيم

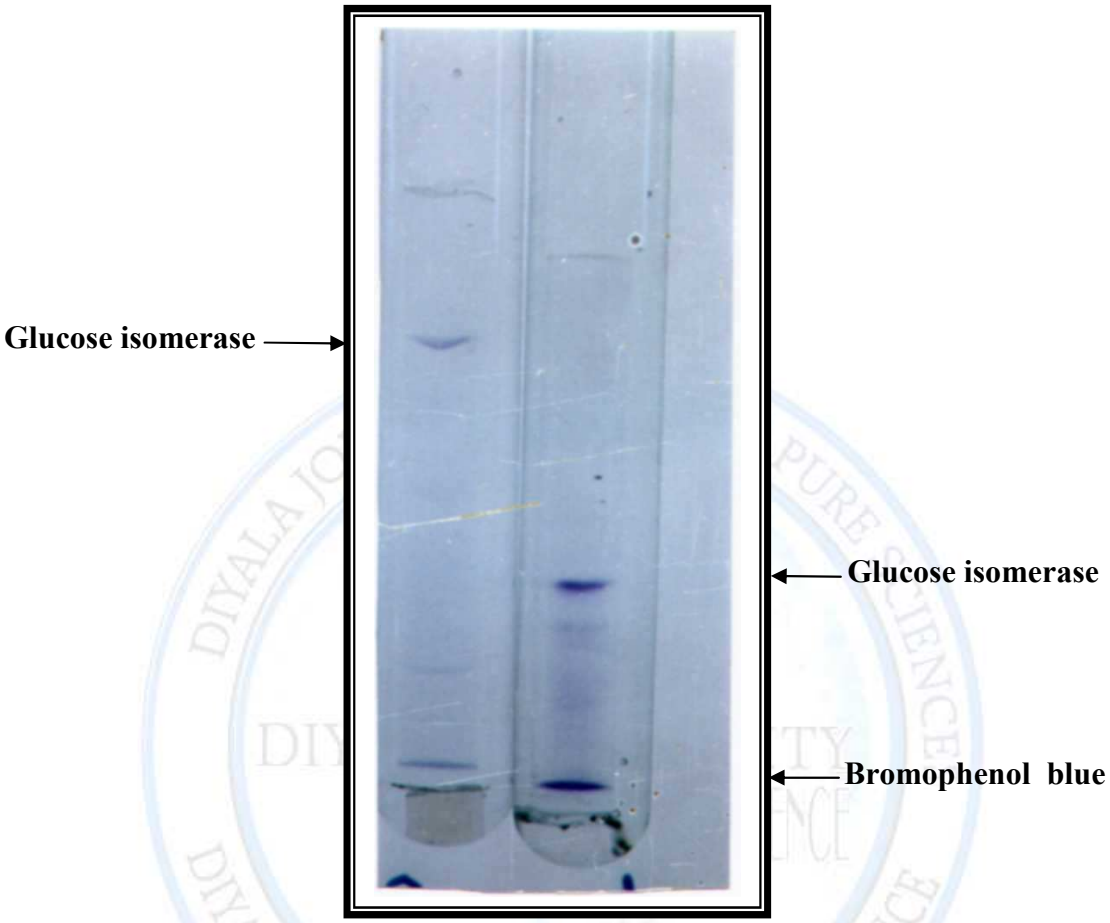
يوضح الشكل (1) المنحنى القياسي للوغارتيم الوزن الجزيئي مقابل نسبة حجم الاسترداد/حجم الفراغ (Ve/Vo) للبروتينات القياسية المستخدمة في عمود الترشيح الهلامي وقدر الوزن الجزيئي لإنزيم كلوكوز ايزوميريز من خلاله هذه العلاقة فكان 178000 دالتون.




**شكل (1) المنحنى القياسي للعلاقة بين لوغارتم الوزن الجزيئي ونسبة حجم الاسترداد إلى حجم الفراغ (Ve/Vo) لعدد من البروتينات القياسية لتقدير الوزن الجزيئي لانزيم كلوكوز ايزوميريز المنتج من Streptomyces sp. HM5 بطريقة الترشيح الهلامي باستعمال عمود معبأ بهلام Sephacryl S-200 SF وبابعاد (1.6 × 48) سم**

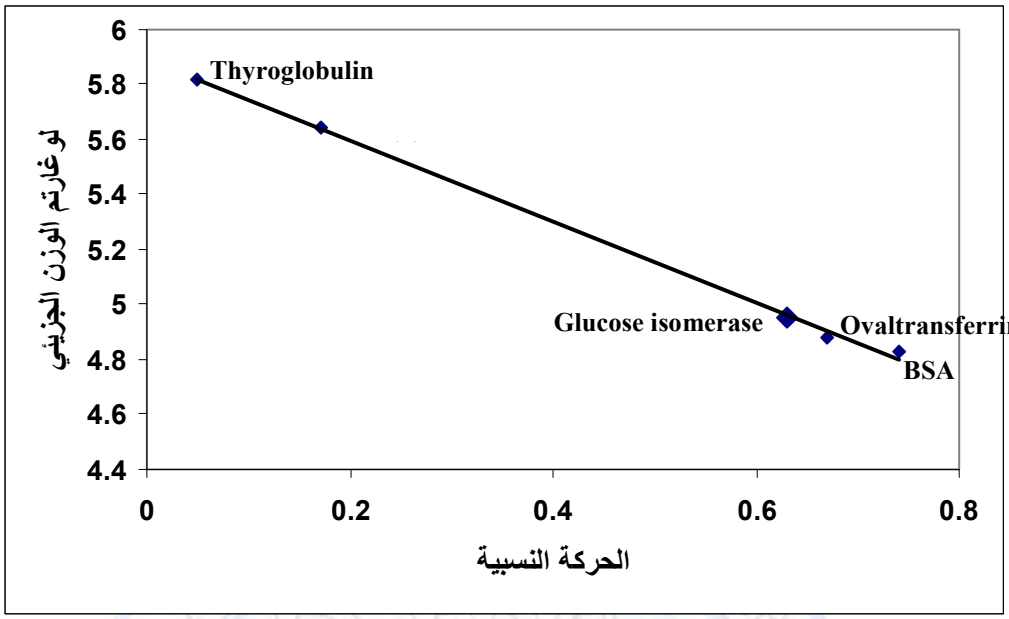
وهذا يعني إن الإنزيم من البروتينات ذات الأوزان الجزيئية الكبيرة بعض الشيء مما قاد إلى الاعتقاد إن يكون مؤلفاً من اكثر وحدة بروتينية واحدة وعليه اخضع الأنزيم إلى الترحيل الكهربائي باستعمال SDS كمادة ماسخة Anionic detergent [13] ( Segel (1976 مع معاملته بمركب 2-ميركابتو ايثانول (2-Mercapto ethanol) لكونه عاملاً مختزلاً يسهم في تكسير الجسور الكبريتيدية للسلاسل البروتينية ووحداتها [14] ( Stryer( 1981

فلوحظ ظهور حزمة واحدة للإنزيم نموذج رقم (1) شكل (2)




**شكل رقم ( 2 ) الترحيل الكهربائي لانزيم كلكوز ايزوميريز المنج من بكتريا Streptomyces Sp . HM5 على هلام متعدد الاكريلامايد بوجود ( SDS ) واستعمال الميركابتو ايثانول،(نموذج رقم 1 ) ، وبغيـــــــاب الـ SDS (نموذج رقم 2 ).**

وعند تقدير الوزن الجزيئي لهذه الحزمة والاستعانة بالمنحنى القياسي للعلاقة بين الحركة النسبية Relative mobility (Rm) للبروتينات القياسية ولوغارتيم الوزن الجزيئي شكل رقم (3) تبين إن الوزن الجزيئي للحزمة يبلغ 90000 دالتون تقريباً مما يشير إلى إن الأنزيم المنتج في هذه الدارسة يتألف من وحدتين ثانويتين متماثلتين.




**شكل (3) المنحنى القياسي للعلاقة بين الحركة النسبية (Rm) ولوغارتم الوزن الجزيئي لعدد من البروتينات القياسية لتقدير الوزن الجزيئي لانزيم كلوكوز ايزوميريز المنتج من Streptomyces sp. HM5 بطريقة الترحيل الكهربائي وبوجود SDS**

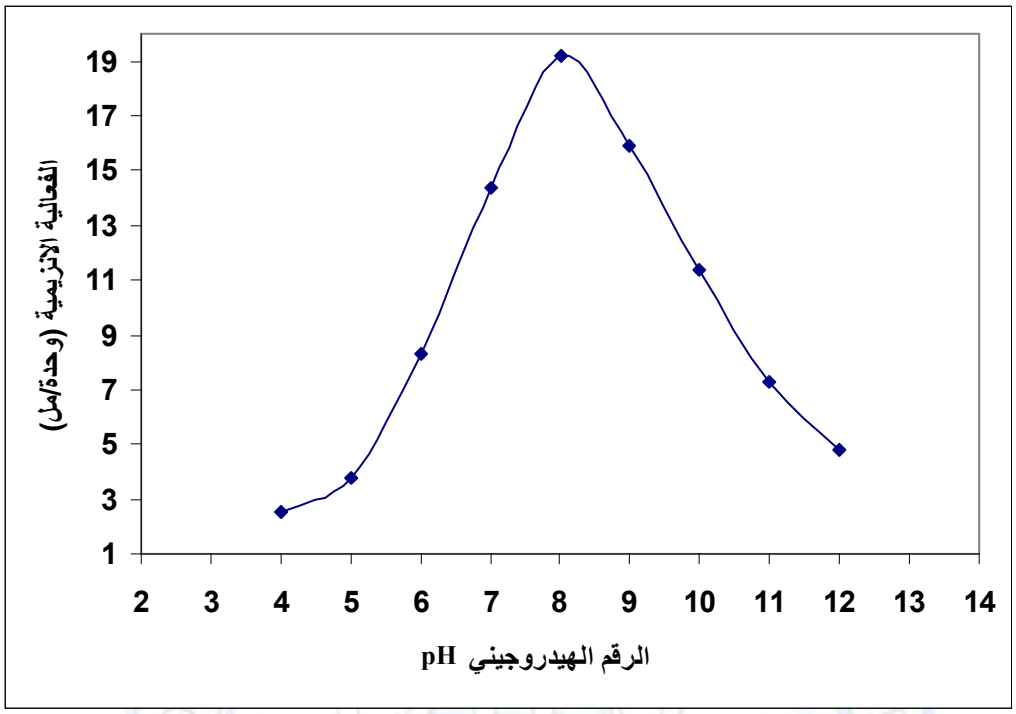
إن استعمال SDS يسهم في تحطيم التركيب الرباعي للبروتين عن طريق ارتباطه بشدة بالوحدات المكونة للإنزيم ومن ثم الغاء تأثير الشحنة أثناء عملية الفصل إذ يكون الفارق في الوزن الجزيئي للوحدات المكونة للإنزيم هو العامل الوحيد المحدد لعملية الفصل على هلام الاكريلامايد المتعدد [13] ( Segel (1976. وقد يكون الأنزيم محتوياً اساساً على بعض الجسور الكبريتيدية التي مصدرها الحامض الأميني السستئين (Cysteine) إذ ساعدت معاملة الانزيم بـ 2-Mercaptoethanol على تكسير هذه الجسور وفصل الإنزيم إلى وحداته الثانوية والتي ظهرت بوزن جزيئي اقل من الوزن الجزيئي الأساس للإنزيم.

وقد تباينت المراجع العلمية في تقدير الوزن الجزيئي للإنزيم وتحديد عدد الوحدات المكونة له ومدى احتواءه على الجسور الكبريتيدية التي يكونها الحامض الأميني السستئين تبعاً لاختلاف مصدر الأنزيم وطريقة القياس المتبعة[ Deshmukh [ 8 ] ( 1996 ).

2. الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الأنزيم

أظهرت النتائج شكل (4) إن الأنزيم اظهر فعالية عالية في مدى من الرقم الهيدروجيني تراوح بين 7- 9

وان الرقم الهيدروجيني الأمثل للفعالية مساوٍ لـ (8). إذ أعطى الأنزيم أقصى فعالية أنزيمية مقدارها 19-19 وحدة/مل في حين انخفضت الفعالية عند الأرقام الهيدروجينية الحامضية التي تراوحت بين 4-6 وكذلك عند الأرقام الهيدروجينية القاعدية التي تراوحت بين 10-12.




**شكل (4) منحنى الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية انزيم كلوكوز ايزوميريز المنتج من بكتريا Streptomyces sp. HM5 باستعمال المحاليل الدارئة الاتية:**

1-دارئ الخلات بتركيز 0.1 مولاري وبرقم هيدروجيني 4 و5

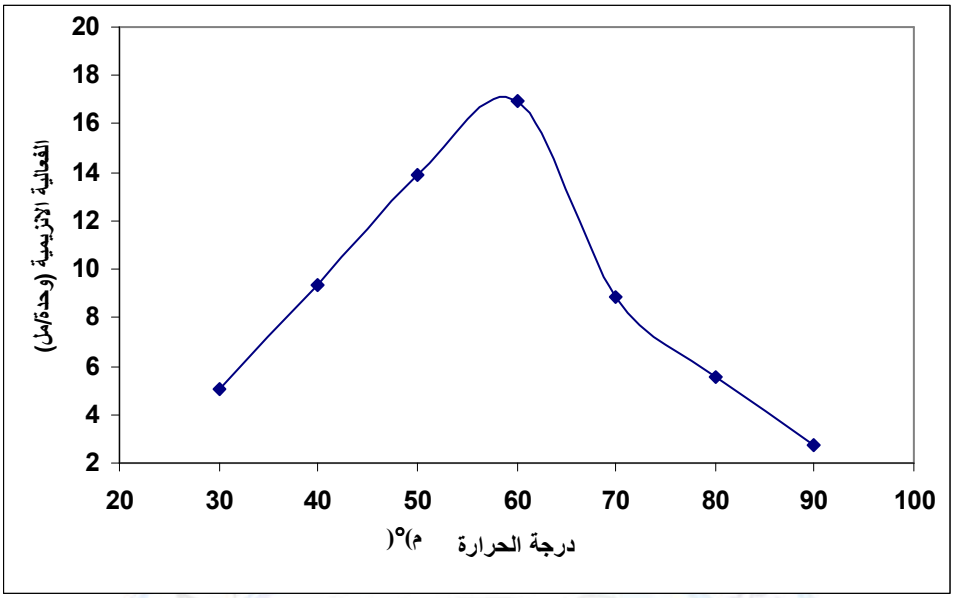
2-دارئ فوسفات الصوديوم بتركيز 0.1 مولاري وبرقم هيدروجيني 6 و7 و8

3- دارئ كلايسين-هيدروكسيد الصوديوم بتركيز 0.1 مولاري وبرقم هيدروجيني 9 و10 و11 و12

إن سبب الانخفاض يعود إلى تاثر واحد أو اكثر من المجاميع الايونية الموجودة في الموقع الفعال للإنزيم أو المادة الأساس أو كليهما بسبب تغير الحالة الايونية لهذه المجاميع وانعكس ذلك على قابلية الأنزيم للارتباط بالمادة الأساس Segel [14] ( 1976) .

3- تعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية الأنزيم

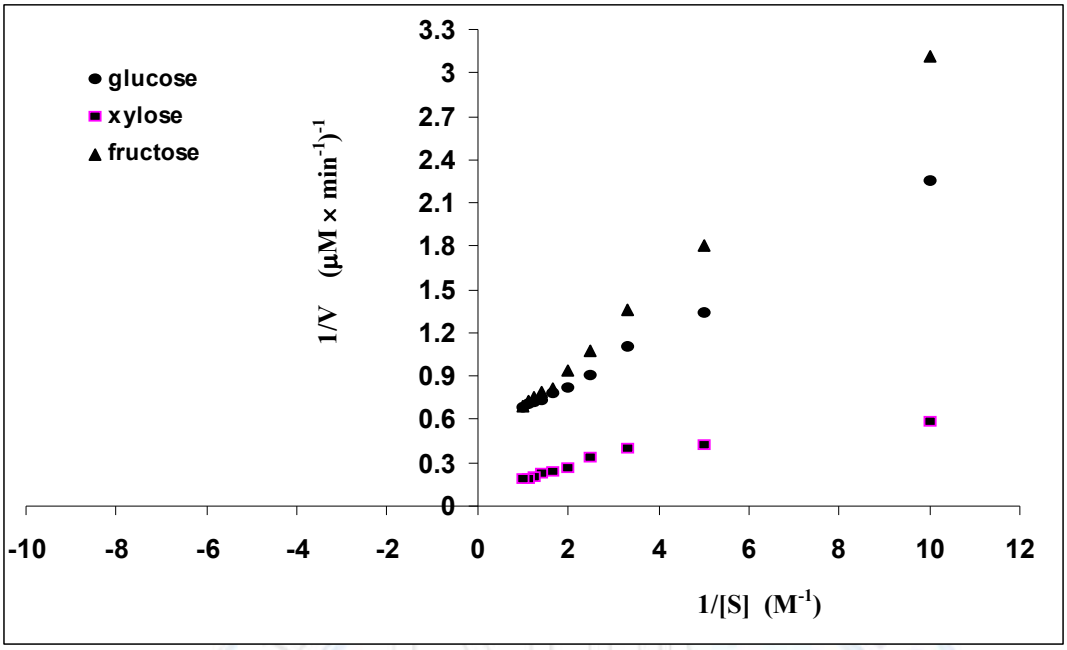
أظهرت النتائج شكل (5) ازدياد فعالية الأنزيم مع زيادة درجة الحرارة حتى بلغت أقصاها عند درجة




**شكل (5) منحنى درجة الحرارة المثلى لفعالية انزيم كلوكوز ايزوميريز المنتـــج من بكتريـــا Streptomyces sp. HM5 الحرارة 60°م إذ بلغت الفعالية الأنزيمية 16.91 وحدة/مل ثم انخفضت بزيادة درجة الحرارةالى 90°م. وعزى ذلك إلى زيادة سرعة التفاعلات الأنزيمية مع ارتفاع درجة الحرارة بسبب زيادة الطاقة الحركية للجزيئات ومن ثم زيادة التصادمات بين جزيئات الأنزيم وجزيئات المادةالاساس ، اما انخفاض الفعالية الأنزيمية الشديد عند الدرجات الحرارية العالية فانه يعود إلى امتصاص الجزيئات المتفاعلة لطاقة عالية مما يؤدي إلى تغير التركيب الثالثي للإنزيم ومن ثم مسخه وفقدانه جزء من فعاليته [13] ( Segel (1976.**

4 – تخصص الانزيم

استهدف هذا الجزء من الدراسه التعرف على تخصص الانزيم ودرجة الفته تجاه كل من الكلوكوزو Burke الزايلوزوالفركتوز باعتبارها مواد خاضعه وتم تقدير الثوابت الحركيه للانزيم Km و Vmaxبطريقة Lineweaver – Burke reciproca plot شكل (6)




**شكل (6) منحنيات Lineweaver-Burk reciprocal plot للعلاقة بين سرعة التفاعل (V) لانزيم كلوكوز ايزوميريز المنتج من بكتريا Streptomyces sp. HM5 وتراكيز مختلفة [S] من ثلاث مواد خاضعة هي الكلوكوز والزايلوز والفركتوز والفركتوز**

احتسبت نسبة Vmax/ Km لتفسير النتائج كما اشار لذلك [14] ( 1976) Segel .

أظهرت النتائج جدول (2) إن قيمة ثابت ميكالس Km كانت اقل بحوالي 4.5 مرة و2 مرة باستعمال الزايلوز مقارنة مع استعمال الفركتوز والكلوكوز على التوالي. إذ بلغت قيمة Km للإنزيم 0.120 و0.555 و0.238 مول تجاه كل من الزايلوز والفركتوز والكلوكوز على التوالي وكانت نسبة Vmax/Km للزايلوز على التوالي 8 مرات و4 مرات مقارنة مع الفركتوز والكلوكوز على التوالي مما يقود إلى الاستنتاج إن الأنزيم اكثر الفة تجاه الزايلوز يليه الكلوكوز فالفركتوز أي إن سرعة تحويل الأنزيم للزايلوز إلى زايلوز اكثر من سرعة الكلوكوز إلى الفركتوز أو تحويله الفركتوز إلى الكلوكوز.

**جدول (2) الثوابت الحركية وقيم Vmax/Km لانزيم كلوكوز ايزوميريز تجاه مواد خاضعة مختلفة**

| المادة الخاضعة | Km (مول) | Vmax µM/min/mg | Vmax/Km (×10-6) |
|---|---|---|---|
| الزايلوز | 0.120 | 5.69 | 47.41 |
| الفركتوز | 0.555 | 3.01 | 5.42 |
| الكلوكوز | 0.238 | 2.56 | 10.75 |

وتتفق هذه النتائج التي تم التوصل إليها في هذه الدراسة مع نتائج معظم الدراسات الأخرى التي أشارت إلى إن سرعة تفاعل إنزيم كلوكوز ايزوميريز مع الزايلوز أسرع بكثير مقارنة مع بقية السكريات الأخرى بسبب الألفة العالية للإنزيم تجاه هذه المادة الخاضعة [8] ( 1996 ) Deshmukh .

## المصـــــــــادر

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 - جبر ، حميد عبود انتاج وتنقية انزيم كلوكوز ايزميريز من عزلة محلية من بكتريا Streptomyces sp. HM5 مع دراسة بعض خواصه وتطبيقاتـه أطروحة دكتوراه . جامعـــــة بغداد/ كلية الزراعه.(2004 ).

3 - محي الدين ، محمد عمر وجبر ، حميد عبود ودلالي ، باسل كامل إنتاج إنزيم كلوكوز ايزوميريز من عزلة محلية من بكتريا Streptomyces sp. HM5 1- العزل والغربلة والتشخيص. مجلة ديالى للبحوث العلميه والتربويه . (2004) ؛ ( العدد24 ) : 89 - 109

4 - محي الدين ، محمد عمر وجبر ، حميد عبود ودلالي ، باسل كامل إنتاج إنزيم كلوكوز ايزوميريز من عزلة محلية من بكتريا Streptomyces sp. HM5 2- تعيين الظروف المثلى لإنتاج الإنزيم بطريقة المزارع المغمورة . مجلة ديالى للبحوث العلميه والتربويه. (2004) ؛ ( العدد 31 ) : 274 - 293

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

6- Belfaquih, N. and Penninckx, M. J. A bifunctional β-xylosidase-xylose isomerase from ***Sterptomyces sp. Ec10***. Enzyme Microb. Technol .(2000); 27: 114-121.

7 - Dalaly, B. K. and Abdullah, M. S. Isolation and partial characteization of glucose isomerase from *Streptomyces. Zanco* (Iraqi) . (1986); V. 4 (Supplement): 131-139.

8- Deshmukh, S. S. and Shankar, V. Glucose isomerase from thermophilic ***Streptomyces thermonitrificans***: purification and characterization. Biotechnol. Appl. Biochem. (1996) ; 24: 65-72.

9 . Garfin, D. E. Purification Procedures. electrophoretic methods. "In Methods in Enzymology". (1990); Vol. 185 (Edited. by Murray E. D. and Deutscher, P.) Academic Press, New York.

10. Hoschke, A.; Balogh, K.; Elaszio, E. and Hollo, J. Determination of functional groups in. glucose isomerase Starch /Stark .(1984);36(1):26-30.
11. Kaneko, T.; Takahashi, S. and Saito, KCharacterization of acid-stable glucose isomerase from Streptomyces sp. and development of single-step processes for high-fructose corn sweetener production. Biosci. Biotechnol. Biochem. (2000); 64 (5): 940-947.
12. Laemmli, U. K.. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. Nature (London). (1970) ; 227, 680-685.
13. Segel, I. H.. Biochemical Calculations. 2nd Edition, (1976) ; John Wiley and Sons, Inc. New York.
14. Stryer, L. Biochemistry 2nd Edition, (1981); W. H. Fereeman Company, New York.
15. Takasaki, Y.; Kosugi, and Kanbayashi, A.. Studies on sugar isomerization enzyme. Production, crystallization and some properties of glucose isomerase from ***Streptomyces sp***. Agric. Biol. Chem . (1969) ; 33: 1527-1534.
16. Vankatasubramanican, 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.
17. Whitaker, J. R. Principle of Enzymology for Food Science. Mareel Dekker, Inc. New York. (1972).