

غربلة عزلات من الستربتومايسس المنتجة لانزيم الدكستراليز وتحديد الظروف المثلى لإنتاج الانزيم باستخدام تخمرات الحالة الصلبة

SCREENING OF STREPTOMYCETES ISOLATES PRODUCING DEXTRANASE AND

DETERMINATION OF OPTIMUM CONDITIONS FOR DEXTRANASE PRODUCTION BY SOLID STATE FERMENTATION

ملیكة علیی¹، غازی منعم²، أماني عبد الوهاب³

¹ مختبر ايكوبولوجيا الحيوان، المدرسة العليا للأساتذة، القبة الجزائر العاصمة، الجزائر.

² قسم التقانات الحياتية / كلية العلوم جامعة بغداد.

³ مركز البحوث الطبية الكلية الطبية جامعة النهرين.

Doi 10.5281/zenodo.7990916

تاريخ القبول: 12 فيفري 2023

تاريخ الوصول: 08 جانفي 2023

الملخص (Abstract):

يعد أنزيم الدكسترانيز من الأنزيمات المهمة، إذ يعمل على تكسير الدكستران المتواجد في الصفيحة الجرثومية وكذا زيادة كفاءة المضادات الحيوية في القضاء على البكتيريا المسببة لمرض شغاف القلب. في هذه الدراسة تم غربلة (21) عزلة من الستربتومايسس لمعرفة قدرتها على إنتاج أنزيم الدكسترانيز في الأوساط الصلبة والمغمورة، انتخبت العزلة (*Streptomyces sp. AM*) لكونها الأغزر إنتاجا للأنزيم. استخدم نظام تخمرات الحالة الصلبة لتحديد الظروف المثلى لإنتاج الإنزيم من العزلة المنتخبة حيث تضمنت انتخاب وسط سحالة الرز المرطب بواسطة TDY بنسبة ترطيب (1/2) (حجم/وزن) وبرقم هيدروجيني ابتدائي 7.0 وبنسبة لقحة 8% والحضن بدرجة حرارة 28 °م لمدة 72 ساعة، استخلص الإنزيم باستخدام محلول الفوسفات المنظم، بتركيز 0.2 مولار ورقم هيدروجيني 6.0.

الكلمات المفتاحية: دكسترانيز، ستربتومايسس، تخمرات الحالة الصلبة، الظروف المثلى.

ABSTRACT : Dextranases have a practical use in the depolymerisation of a various troublesome microbial dextran deposits. Dextranases also improve the efficacy of antibiotics in the treatment of endocarditis. Twenty one local isolates of *Streptomyces sp.* were tested for their ability to produce dextranase by using both solid and submerged cultures. The isolate *Streptomyces sp. AM* was selected based on its high production of the enzyme. Optimum conditions for dextranase production using solid state fermentation were determined by growing bacteria on rice bran moistened with TDY (3%TSB, 2% dextran T70, 0.1% yeast extract) as production medium with an initial pH 7.0 and a moisture level of 2:1 (v/w), using 8% inoculum, incubation at 28 °C for 72 hours. The enzyme extraction was carried out using phosphate buffer (0.2 M, pH 6.5)

Key words: Dextranase, Streptomyces, Solid state fermentation, Optimization.

1. المدخل (Introduction):

يعد أنزيم الدكسترانيز (EC 3. 2. 1.11) من أنزيمات التحلل المائي الذي يقوم بتحليل الروابط الكلايكوسيدية من نوع (1-6) α الموجودة في الدكستران (1). وتعدّ الأحياء المجهرية من المصادر الإنزيمية المهمة بسبب قصر دورة حياتها وانخفاض كلفة الأوساط الغذائية المستعملة في الإنتاج وسهولة زيادة إنتاجية الإنزيم باعتماد الطرق البيوكيميائية والوراثية.

توجّهت اهتمامات الكثير من الباحثين إلى دراسة أنزيم الدكسترانيز نظراً لأهميته الصناعية والطبية المتزايدتين إذ أنه يساعد على تحطيم الصفيحة الجرثومية وبالتالي منع تسوّس الأسنان من خلال التأثير في خلق الدكستران الذي يعدّ عاملاً مهماً في التصاق المكورات المسببة *Streptococcus* بجدار الأسنان، وزيادة كفاءة المضادات الحيوية في القضاء على البكتيريا المسببة لالتهاب شغاف القلب وذلك بتحطيمه لطبقة الدكستران المحيطة بالخلايا لبكتيرية، اختزال الدكستران ذي الأوزان الجزيئية العالية إلى دكستران بأوزان جزيئية واطنة واستخدامه بديلاً للبلازما، إزالة اللزوجة المتكوّنة بفعل الدكستران التي من شأنها أن تشكّل عائقاً أثناء عمليات تصنيع السكر وتحويله (2، 3، 4).

يصنّف أنزيم الدكسترانيز، حسب طريقة عمله، إلى دكسترانيز التّكسير الداخلي والخارجي. حيث يحلّل أنزيم الدكسترانيز التّكسير الداخلي الدكستران مائياً إلى قطع من السكريات المحدودة (Oligosaccharide) بأطوال مختلفة وبطريقة عشوائية من داخل الدكستران. في حين يحلّل دكسترانيز التّكسير الخارجي الدكستران إلى أيزومالتوز بدءاً من النهاية المختزلة (2).

يُنتج أنزيم الدكسترانيز من النباتات الرّاقية وأنسجة الثدييات فضلاً عن الفطريات و البكتيريا، غير أن المصدر الميكروبي يعدّ من أفضل المصادر المنتجة للأنزيم (5). أظهرت الدراسات إنتاج الأنزيم من البكتيريا مثل *Penicillium notatum*, *Aspergillus carneus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus mutans* وغيرها الكثير.. (4، 5) *Fusobacterium fusiform*

نظراً لندرة الدراسات وقلتها حول إنتاج هذا الإنزيم من بكتيريا الستربتوميسين بواسطة تخمّرات الحالة الصلبة، توجّهنا إلى تطبيق هذا النظام في الإنتاج لما يتميز به من سهولة في التطبيق واستخدام أوساط غذائية قليلة الكلفة وإمكانية الحصول على إنتاجية عالية للأنزيم فضلاً عن عدم احتياجه للتهوية المستمرة وما يتبع ذلك من توفير الطاقة. تهدف هذه الدراسة إلى غربة عزلات محلية عراقية من بكتيريا الستربتوميسين وانتخاب العزلة الأغزر إنتاجاً للأنزيم الدكسترانيز بالإضافة إلى تحديد الظروف المثلى لإنتاج الإنزيم من بكتيريا الستربتوميسين باستخدام نظام تخمّرات الحالة الصلبة لمحاولة تحسين قدرتها الإنتاجية.

2. المواد والطرائق (Materials and methods):

1.2. السلالات المستخدمة:

تم الحصول على (21) عزلة تعود لجنس *ستربتوميسيس* من: قسم علوم الحياة كلية العلوم الجامعة المستنصرية، قسم علوم الحياة كلية العلوم جامعة بغداد، معهد الهندسة الوراثية للدراسات العليا جامعة بغداد، مركز البحوث الطبية كلية الطب جامعة النهرين. العراق

2.2. الأوساط المستخدمة:

1.2.2 وسط أكار مستخلص الخميرة مستخلص المالت Yeast extract malt extract agar:

يتكون هذا الوسط من 3 غ مستخلص الخميرة، 3 غ مستخلص المالت، 5 غ باكتو بيبتون، 10 غ كلوكوز، 10.3 غ سكروز.

أذيبت المكونات في (1) لتر ماء مقطر وضبط الرقم الهيدروجيني إلى 7.3 ثم أضيف 20 غ من الأكار.

2.2.2 وسط تربتك صويا آكار 3 Tryptic Soy Agar (TSA) %

أذيب 3 غ من الوسط في 100 مل ماء مقطر، ضبط الرقم الهيدروجيني إلى 7.3 ثم أضيف له 2 % أكار.

3.2.2 وسط مرق تريبتيكاز الصويا Trypticase Soy Broth (TSB):

أذيب 3 غ من الوسط في 100 مل ماء مقطر، ضبط الرقم الهيدروجيني إلى 7.3.

4.2.2 Trypticase Soy Broth-Dextran-Yeast Extract (TDY):

حضر الوسط بمزج 3% TSB مع 0.5 % دكستران T70 و 0.1 % مستخلص الخميرة، عدل الرقم الهيدروجيني إلى 7.0.

5.2.2 وسط الغريبل:

حضر وفقا لأماني عبد الوهاب (1998) حيث تم إضافة 0.5 % دكستران T70 بدلا من T40 و 0.5 % دكستران الأزرق 2000 و 0.1 % مستخلص الخميرة إلى وسط TSA المحضر وفقا للفقرة (2.2.2).

3.2. تحضير اللقحة Inoculum

1.3.2 تنشيط عزلات أكتينوبكتيريا الستربتومايسيس:

نشطت العزلات على وسط مائل من أكار مستخلص الخميرة - مستخلص المالت ذي الرقم الهيدروجيني 7.3 على درجة حرارة 28 °م لمدة 15 يوم. بعد فترة الحضانة ظهرت مستعمرات البكتيريا دائرية ذات سطح مجعد مغطى بطبقة ناعمة من الأبواغ رصاصية اللون. كما استخدم هذا الوسط لحفظ وإدامة العزلات البكتيرية.

2.3.2 تنمية الأكتينوبكتيريا

نميت عزلات بكتيريا الستربتومايسيس في وسط TSB ذي الرقم الهيدروجيني 7.3 على درجة حرارة 28 °م بسرعة رج 150 دورة/الدقيقة لمدة 24 ساعة.

4.2 الغريلة شبه الكمية (Semi quantitative screening):

شخصت المستعمرات المنتجة للإنزيم بتكوينها للهالة الشفافة وحددت مدة ظهورها (24 ساعة، 48 ساعة، 72 ساعة ...)

5.2 الغريلة الكمية (Quantitative screening):

1. اختيرت العزلات الأربع التي أظهرت تحللاً واضحاً للدكستران بتكوينها الهالة الشفافة حول المستعمرة في الغريلة شبه الكمية ونشطت في الوسط السائل TSB وحضنت بدرجة 28 °م لمدة 24 ساعة.

حضر وسط الإنتاج كما ورد في الفقرة (4.2.2) بحجم 50 مل في دورق مخروطي سعته 200 مل وبواقع ثلاث مكررات لكل عذلة، ثم تلقح الدوايق بعد التعقيم بحجم اللقحة (20 % من الوسط الإنتاجي) وحضنت الدوايق بحاضنة هزازة 150 دورة / دقيقة بدرجة 28 °م لمدة 3 أيام ثم نبذ المزروع البكري بسرعة 15000 ×g لمدة نصف ساعة بدرجة 4 °م، وذلك لفصل الكتلة الحيوية عن رشح المزرعة الحاوي على الأنزيم، عدل الرقم الهيدروجيني للرائق إلى 7 وقدرت فعالية الأنزيم بالطريقة الواردة في الفقرة (6.2) وتركيز البروتين (7.2).

6.2 تقدير فعالية الأنزيم:

اتبعت طريقة (Whitaker و Bernard) (1972) في تقدير فعالية أنزيم الدكسترانيز اعتماداً على السكريات المختزلة المتبقية باستعمال الدكستران T70 بتركيز 1%، مذاب في 0.1 مولار خلات الصوديوم، كمادة تفاعل.

تعرف وحدة فعالية الدكسترانيز وحدة/ مل (U/ml) بأنها كمية الأنزيم اللازمة لتحرير واحد مايكرومول من المالتوز بالدقيقة الواحدة تحت الظروف القياسية.

7.2 تقدير تركيز البروتين:

قُدر تركيز البروتين طبقاً للطريقة الموصوفة من قبل (Whitaker و Granum) (1980).

8.2 تحديد الظروف المثلى لإنتاج الأنزيم باستخدام تخمرات الحالة الصلبة:

1.8.2 تعيين وسط التخمر الصلب الأمثل لإنتاج الأنزيم:

استخدمت ثلاثة أوساط صلبة وهي نخالة الحنطة، سحالة الأرز، كوالح الذرة كمواضع أولية لتعيين الملائم منها لإنتاج الأنزيم، حيث استخدمت بمقدار 1:2 حجم/ وزن (سائل الترطيب / مادة صلبة).

2.8.2 تعيين المحلول الأمثل لاستخلاص الأنزيم:

لّح الوسط المنتخب سحالة الرز المرطب بمحلول TDY بنسبة 1:2 (حجم / وزن) (سائل ترطيب / المادة صلبة) بالأكينوبكتيريا (*Streptomyces sp. AM*) بحجم 20 % من وسط الإنتاج بدرجة 28 °م لمدة 4 أيام، ثم استخلص الأنزيم من المزرعة بإضافة 25 مل ماء مقطر أو محلول فوسفات البوتاسيوم المنظم (2 مولار ورقم هيدروجيني 6.5) ومزجت محتويات الدوايق مع التحريك لمدة 15 دقيقة، رشح الرائق باستخدام القطن، نبذ المزيج بجهاز الطرد المركزي 5000xg لمدة 20 دقيقة بدرجة 4 °م، قدر حجم الراشح، الفعالية الأنزيمية وتركيز البروتين.

3.8.2 تعيين نسبة الترتيب المثلى للإنتاج:

رتب الوسط الصلب سحالة الأرز بمحلول TDY بنسب ترتيب مختلفة (1:1، 1:2، 1:3، 1:4) (حجم/وزن) (سائل ترتيب/ مادة صلبة)

4.8.2 تعيين سائل الترتيب الأمثل للإنتاج:

لاختيار المحلول الأمثل لترتيب وسط سحالة الأرز، تم اختبار أربعة سوائل الترتيب: ماء مقطر، محلول الدكستران وسط TDY، وسط TY (3 % TSB، 0.1 % مستخلص الخميرة) بنسبة 1:2 (حجم / وزن).

5.8.2 تعيين فترة التخمير المثلى للإنتاج:

حضن وسط السحالة المرطب بـ TDY (1:2) (حجم/ وزن) والملح بالعزلة لمدة زمنية شملت (24، 48، 72، 96 و 120 ساعة) استخلص الأنزيم وقدرت الفعالية.

6.8.2 تعيين درجة الحرارة المثلى لإنتاج الأنزيم:

حضر وسط سحالة الأرز المرطب. TDY بنسبة (1:2) (حجم/ وزن) والملح بالأكسينوبكتيريا 20% من وسط الإنتاج بدرجات حرارة مختلفة 25، 30، 35، 40، 45 °م لمدة 3 أيام، استخلص الأنزيم وقدرت الفعالية.

7.8.2 تعيين الرقم الهيدروجيني الابتدائي الأمثل:

لتحديد الرقم الهيدروجيني الابتدائي الأمثل لإنتاج أنزيم الدكسترانيز من (*Streptomyces* sp AM)، تم تلقيح وسط الإنتاج بلقحة 20 % وتم استخدام حجوم محسوبة من محلول 1 عياري من هيدروكسيد الصوديوم المعقم للوصول إلى الأرقام الهيدروجينية الآتية: 5.8، 6.2، 6.6، 7.0، 7.4، 7.8، 8.2 وبواقع 3 مكررات لكل معاملة وحضنت الدوائر بدرجة 28 °م لمدة 3 أيام، ثم استخلص الأنزيم وقدرت الفعالية

8.8.2 تعيين التركيز الأمثل للمادة الأساس (دكستران):

حضر وسط الإنتاج كما ورد سابقا بمحلول TDY وبرقم هيدروجيني 7.0 مع إضافة تراكيز مختلفة من مادة الدكستران T70 إذ شملت (0%، 0.5%، 1%، 1.5%، 2%، 2.5%، 3%) وحضنت الدوائر بدرجة 28 °م لمدة 3 أيام، ثم استخلص الأنزيم، وقدرت فعاليته.

9.8.2 تعيين حجم اللقحة الأمثل لإنتاج الأنزيم

حضر وسط الإنتاج وفق ما ذكر سابقا ولقح بنسب مختلفة من اللقحة شملت 2 % و 4%، 6%، 8%، 10%، 12% و 20% من وسط الإنتاج وحضن بدرجة 28 °م لمدة 3 أيام، ثم استخلص الأنزيم وقدرت فعاليته.

3. النتائج والمناقشة (Discussion and results):**1.3 الغريلة شبه الكمية:**

في هذه الدراسة تم استخدام 21 عزلة محلية عراقية من الستريبتومايس حيث نميت على وسط الغريلة الوارد ذكره في الفقرة 5.2

أظهرت النتائج الموضحة في الجدول (1.3) أنّ أربع عزلات من مجموع 21 عزلة لها قابلية على إنتاج إنزيم الدكسترايناز اعتمادا على ظهور الهالة الشفافة حول مستعمراتها النامية لفترات زمنية مختلفة، مما يدل على أن إنزيم الدكسترايناز المنتج من هذه العزلات ذو إفراز خارجي لقدرته على تكسير الدكستران مسببا بذلك ظهور منطقة شفافة على وسط الاكار الحاوي على الدكستران الأزرق 2000 (8).

وتشير النتائج الأولية إلى إنتاج إنزيم الدكسترايناز من عزلة (*Streptomyces sp. AM*) بعد 24 ساعة مع استمرار تزايد قطر الهالة الشفافة باستمرار زيادة فترة الحضانة، ويدل هذا على كفاءة هذه العزلة في إنتاج إنزيم الدكسترايناز كما يوضح الجدول (1.3) تباين العزلات المنتجة في فترة انتاجها للإنزيم من خلال تكوينها للهالة الشفافة، فقد لوحظ أنّ العزلة 4J تنتج الإنزيم بعد 48 ساعة من الحضانة، فيما انتخبت العزلتين S.C و 6C المنتجة للإنزيم خلال 72 ساعة من خلال تكوينها للهالة الشفافة حول المستعمرة.

قد يعود سبب اختلاف العزلات الأربع في فترة إنتاجها للإنزيم على الوسط الصلب إلى احتمال اختلاف موقع وجود الإنزيم و اختلاف الظروف المثلى لإنتاجه (9)، وتبين أنّ أكثر من 90 % من إنزيم الدكسترايناز يوجد في سيتوبلازم بكتيريا 903 (*Streptococcus mitis* ATCC) (10).

2.3 الغلبة الكمية:

لغرض تحديد العزلة الكفؤة لإنتاج الإنزيم باستخدام المزارع المغمورة، تمّ انتخاب العزلات الأربع التي أعطت هالة شفافة حول مستعمراتها على الوسط الصلب والتي اشتملت على 4J, 6C, S.C, AM وقد تميّزت العزلة AM بإنتاجها العالي للإنزيم مقارنة ببقية العزلات الأخرى (الشكل 1.3) حيث بلغت الفعالية النوعية للإنزيم المنتج 1.36 وحدة/ملغم بروتين في حين تراوحت الفعالية النوعية للإنزيم المنتج من بقية العزلات بحدود (0.536 - 0.623) وحدة /ملغم بروتين. تمّ متابعة إنتاج إنزيم الدكسترايناز من العزلة الأغزر إنتاجا (AM) لمدد حضانة مختلفة شملت 24 ساعة ، 48 ساعة 72 ساعة فأظهرت النتائج أنّ إنتاج الإنزيم يبدأ بعد 24 ساعة من الحضانة وأن أقصى إنتاج له كان بعد 72 ساعة حيث قدرّت الفعالية النوعية بـ 1,39 وحدة / ملغم بروتين ، في حيث بلغت الفعالية النوعية للإنزيم المنتج بـ 0.38 و 0.62 وحدة /ملغم بروتين بعد فترة حضانة 24 ساعة و 48 ساعة على التوالي (الشكل 2.3) وعلى ضوء هذه النتائج انتخبت العزلة (*Streptomyces sp. AM*) لقدرتها على الإنتاج العالي للإنزيم على الوسط الصلب والسائل، واعتُبرت مصدرا لإنتاج الإنزيم وتحديد الظروف المثلى لإنتاجه.

جدول (1.3): الغلبة شبه الكمية لعزلات الستربتوميسيس المنتجة لإنزيم الدكسترايناز

رمز العزلة	مدة ظهور الهالة الشفافة (ساعة)			
	24	48	72	96
AM	+	++	+++	++++
S. Liv	-	-	-	-
6 A	-	-	-	-
6 N	-	-	-	-

-	-	-	-	INT
-	-	-	-	63
+++	++	-	-	S.C
-	-	-	-	13 A
+++	++	+	-	4 J
-	-	-	-	12 J
-	-	-	-	6 C
+++	++	-	-	14 S
-	-	-	-	37. LMS
-	-	-	-	SH3
-	-	-	-	9 A
-	-	-	-	1
-	-	-	-	1 P
-	-	-	-	25 J
-	-	-	-	5 S
-	-	-	-	8 A
-	-	-	-	13 N

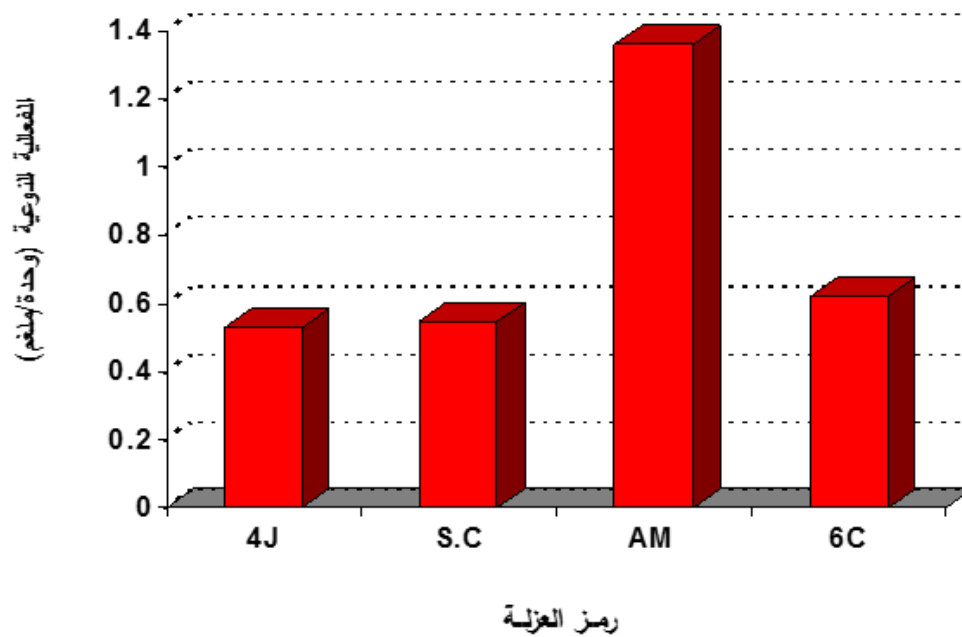
-: عدم ظهور الهالة الشفافة

+: قطر الهالة المتكوّنة حول المستعمرة (1 - أقل من 1.5 ملم)

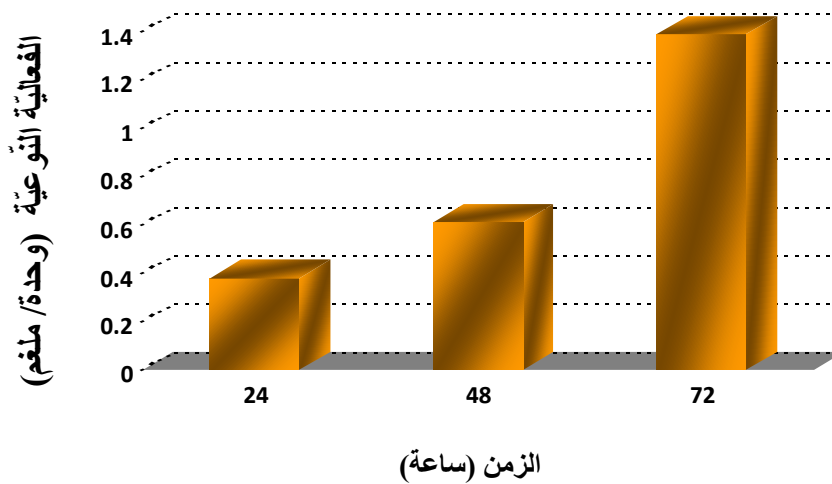
++: قطر الهالة المتكوّنة حول المستعمرة (1.5 - أقل من 3 ملم)

+++ : قطر الهالة المتكوّنة حول المستعمرة (3 - أقل من 4.0 ملم)

++++: قطر الهالة المتكوّنة حول المستعمرة (أكثر من 4.0 ملم)



الشكل (1.3): الغريلة الكمية للعزلات البكتيرية باستخدام الوسط السائل TDY



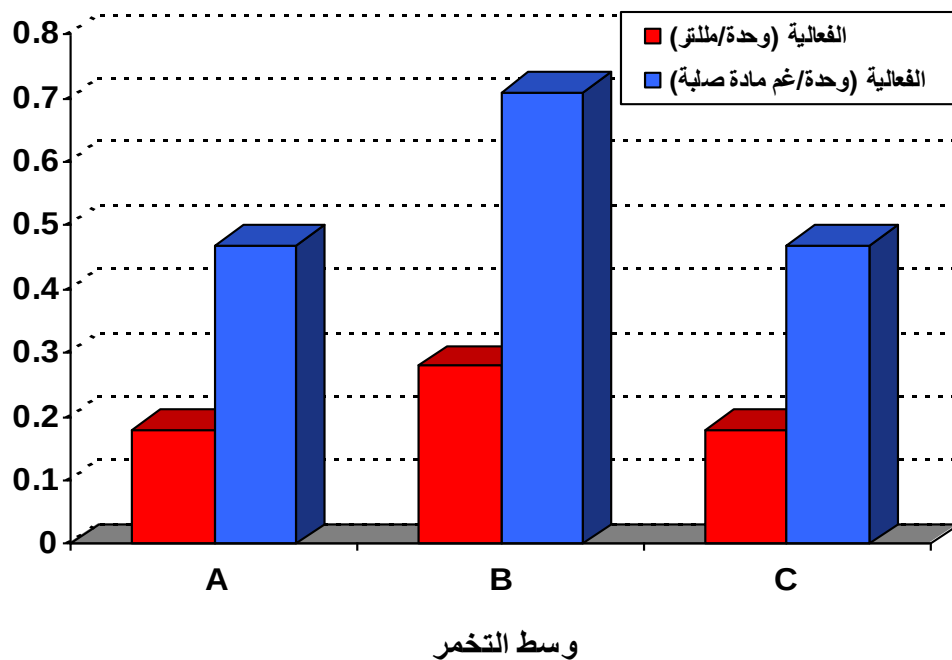
الشكل (2.3): إنتاج أنزيم الدكسترانيز من الأكتينوبكتيريا *Streptomyces* sp. AM بعد فترات حضان مختلفة.

33 تعيين الظروف المثلى لإنتاج إنزيم الدكسترانيز بواسطة تخمرات الحالة الصلبة:

1.3.3 اختيار وسط التخمر:

تهدف هذه الدراسة إلى استخدام تقنية تخمرات الحالة الصلبة للحصول على إنتاجية عالية من أنزيم الدكسترانيز من (*Streptomyces sp. AM*). ولهذا تم اختيار ثلاثة أوساط زراعية هي سحالة الرز، نخالة الحنطة وكوالح الذرة المرطبة بمحلول TDY بنسبة (1:2) (حجم / وزن المادة الصلبة) كل على حدة لانتقاء الوسط الزراعي الذي يعطي أفضل إنتاجية للإنزيم، تشير النتائج الموضحة في الشكل (3.3) أن وسط سحالة الرز أعطى إنتاجية عالية حيث بلغت فعالية الإنزيم 0.71 وحدة/ غم مادة صلبة، في حين بلغت فعالية الإنزيم في الوسطين نخالة الحنطة وكوالح الذرة 0.48 و 0.46 وحدة / غم مادة صلبة على التوالي.

حسب الخفاجي (1990) يمكن أن يعود تباين إنتاج الإنزيم في هذه الأوساط إلى عوامل عديدة تشمل طبيعة التركيب الداخلي للمادة الأساس ودرجة مساميتها وتأثير ذلك على نفاذ الخلايا الميكروبية ونموها إلى داخل المادة، لذلك يفضل اختيار المواد الهشة ذات المسامية العالية كأوساط ذاتية لسهولة النمو فيها.



الشكل (3.3): إنتاج أنزيم الدكسترانيز من العزلة المحلية *Streptomyces sp. AM* المنماة على أوساط صلبة مختلفة والمرطبة بوسط TDY بنسبة (1:2) (حجم/وزن).

A : كوالح الذرة

B : سحالة الرز

C : نخالة الحنطة

2.3.3 المحلول الأمثل لاستخلاص الإنزيم:

يوضح الشكل (4.3) أن أفضل محلول لاستخلاص أنزيم الدكسترانيز من وسط سحالة الرز هو محلول الفوسفات المنظم برقم هيدروجيني 6.5 مقارنة بالماء المقطر، إذ قدرت فعالية الإنزيم المستخلص بمحلول الفوسفات المنظم بـ 0.71

وحدة /غم مادة صلبة، في حين بلغت 0.36 وحدة /غم مادة صلبة عند استخدام الماء المقطر لاستخلاص الإنزيم، وقد يعود تفوق محلول الفوسفات المنظم، حسب حسن (1996)، لاحتوائه على أيونات تعمل على تسهيل إذابة الإنزيم وفصله عن بقية المكونات غير المذابة وكذلك المحافظة على الثبات وفعالية الإنزيم في المستخلص الخام.

3.3.3 نسبة الترطيب المثلى:

تشير النتائج المبينة في الشكل (5.3) إلى ارتفاع قيمة الفعالية الإنزيمية بزيادة نسبة الترطيب وبلغت أقصاها عند نسبة الترطيب (1:2) (حجم/ وزن مادة صلبة) حيث بلغت 0.85 وحدة / غم مادة صلبة، بعدها انخفضت الفعالية عند نسب الترطيب (3: 1) و (4: 1) (حجم /وزن). يعود انخفاض الفعالية الإنزيمية عند نسبة الترطيب (1:1) والمقدرة بـ 0.47 وحدة/ غم مادة صلبة إلى تثبيط نمو الأحياء المجهرية نتيجة قلة الماء الحر الضروري للعمليات الحيوية للكائن الحي مما يؤدي إلى تكوين الاوبوغ بشكل مبكر فضلا عن تناقص كمية الماء بسبب التبخر عند استمرار مدة الحضان (11)، كما يعزى انخفاض الفعالية الإنزيمية عند نسب الترطيب العالية إلى زيادة في محتوى الماء وعرقلة انتقال الأكسجين مع تحديد انتقال المواد الغذائية في الوسط لقلّة الفراغات البينية نتيجة تماسك الوسط مما يؤدي إلى عدم استغلال الوسط من الأحياء المجهرية (11 و 12).

4.3.3 سائل الترطيب الأمثل:

يوضح الشكل (6.3) تفوق وسط الترطيب TDY عن بقية أوساط الترطيب الأخرى (TY، الماء المقطر، محلول الدكستران) حيث قدرت الفعالية الإنزيمية عند ترطيب وسط سحالة الرز بمحلول TDY 1.45 وحدة / غم مادة صلبة يليه الترطيب بمحلول TY ثم محلول الدكستران وأخيرا الماء المقطر.

وفقا لهذه النتائج يتبين أنّ محلول الترطيب TDY يحفز أكتينوبكتيريا الستربتومايس على إنتاج إيزيم الدكسترانيز.

5.3.3 فترة التخمر المثلى:

تمت متابعة إنتاج أنزيم الدكسترانيز من عزلة الستربتومايس خلال فترات حضان مختلفة، وتوضح النتائج المتحصلة من الشكل (7.3) إلى زيادة تدريجية في إنتاجية الإنزيم بزيادة فترة الحضان حيث وصلت إلى أقصاها خلال 72 ساعة من الحضان إذ قدرت الفعالية الإنزيمية بـ 1.87 وحدة / غم مادة صلبة، ثم بدأت بالانخفاض التدريجي بزيادة فترة الحضان، ويعود انخفاض فعالية الإنزيم عند إطالة فترة التخمر إلى التغيرات البينية في الوسط الغذائي وحصول التحلل الذاتي للخلايا مع إفراز مواد وأنزيمات داخلية التي يكون لها تأثير غير مرغوب فيه على إنتاج الإنزيم وفعاليتها (13).

6.3.3 درجة الحرارة المثلى لإنتاج الإنزيم:

درس تأثير درجات الحرارة المختلفة على إنتاج أنزيم الدكسترانيز، تشير نتائج الشكل (8.3) أن إنتاجية الإنزيم كانت أقصاها عند درجة 28⁰م، إذ بلغت الفعالية الإنزيمية 2.10 وحدة / غم مادة صلبة و لوحظ انخفاض في الفعالية الإنزيمية عند درجات الحرارة الأكثر من 28⁰م. كما أن استخدام درجة حرارة أقل من 28⁰م لا تعطي فعالية عالية، يعود انخفاض الفعالية الإنزيمية بانخفاض درجة الحرارة لعدم ملائمة هذه الدرجة لنمو الأكتينوبكتيريا حيث يتباطأ النمو ويتأخر التخليق الأنزيمي، غير أن انخفاض الفعالية الإنزيمية بزيادة درجة الحرارة له علاقة بمحتوى الوسط من الماء إذ يؤدي ارتفاع درجة الحرارة إلى تبخر الماء وبالتالي عدم نمو الخلايا (14).

يتطلب الحصول على إنتاجية عالية من الأنزيم تخمرات الحالة الصلبة ضبط درجة الحرارة والمحافظة عليها (12).

7.3.3 الرقم الهيدروجيني الأمثل لإنتاج الإنزيم:

تبين النتائج الموضحة في الشكل (9.3) أن الرقم الهيدروجيني 7.0 كان الأفضل لإعطائه أعلى فعالية أنزيمية التي قدرت بـ 2.12 وحدة/غم مادة صلبة، بينما لوحظ انخفاض فعالية الإنزيم بانخفاض وارتفاع الرقم الهيدروجيني عن 7.0، إذ تشير النتائج إلى انخفاض واضح للإنتاج عند الأرقام الهيدروجينية 7.4، 7.8 و 8.2 إذ بلغت الفعالية الإنزيمية 1.03 و 0.58، 0.325 وحدة / غم مادة صلبة على التوالي، ويعود هذا الانخفاض عند هذه القيم إلى تأثيرها في نمو الكائن الحي وفي ثباتية الإنزيم (15).

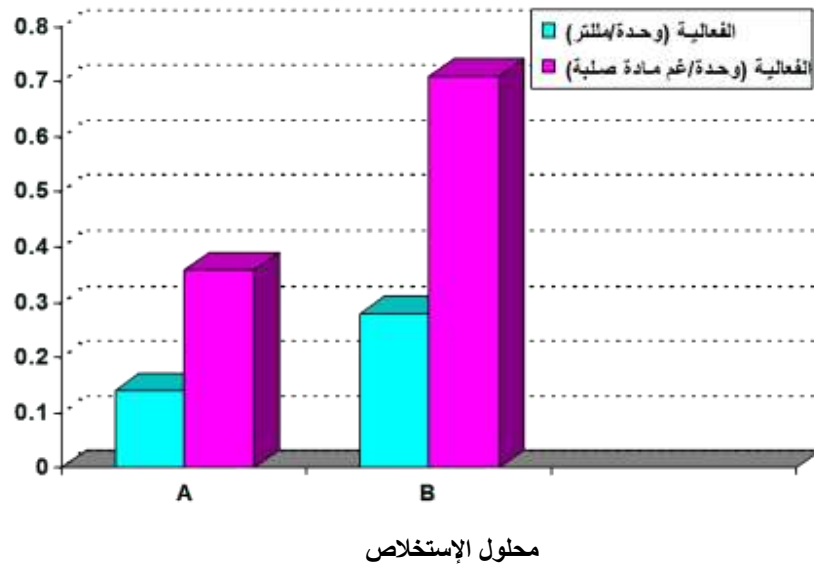
كما وجد أن الرقم الهيدروجيني يؤثر في إنتاج الأنزيم من خلال تأثيره في صفات الوسط الغذائي، كذائبية المواد الغذائية وانتقالها وتأييدها وتركيز البيكاربونات المتكونة من ذوبان ثاني أكسيد الكربون التي تؤثر في السعة الدرائة للوسط مما يؤثر على نمو الكائن الحي وإنتاجية الإنزيم (16)، لاحظ سميث (1987) أن نمو معظم الأحياء المجهرية وإنتاجها للمواد الأيضية يكون حساسا لتغيرات الرقم الهيدروجيني وأن القيمة المثلى للرقم الهيدروجيني لإنتاج الإنزيمات قد تختلف عن الرقم الهيدروجيني للنمو.

8.3.3 التركيز الأمثل للدكستران:

أظهرت النتائج الموضحة في الشكل (10.3) ارتفاع إنتاج إنزيم الدكسترانيز عند تركيز 2% من مادة الدكستران إذ بلغت الفعالية الإنزيمية 2.13 وحدة / غم مادة صلبة، بعدها لوحظ انخفاض واضح في إنتاج الإنزيم عند التراكيز العالية من الدكستران (2.5% - 3%) ويمكن أن يعود ذلك، وفقا لعبد الرزاق (1998)، إلى زيادة لزوجة الوسط بسبب زيادة تركيز الدكستران مما يؤدي إلى انخفاض جاهزية المواد الغذائية الضرورية للبكتريا وانتشار الإنزيم مؤثرة بذلك في سرعة التفاعل التي تعتمد على ارتباط المادة الأساس بالإنزيم، وقد عد التركيز 2% من الدكستران التركيز الأمثل لإنتاج الإنزيم من العزلة المحلية (AM) واعتمد ذلك في التجارب اللاحقة.

9.3.3 حجم اللقحة الأمثل:

من النتائج الموضحة في الشكل (11.3) زيادة تدريجية في إنتاج الإنزيم مع زيادة حجم اللقحة إلى حد 8 % حيث قدرت أعلى فعالية أنزيمية بـ 2.24 وحدة / غم مادة صلبة مع انخفاض واضح في الفعالية الإنزيمية بزيادة حجم اللقحة حيث بلغت 2.04 وحدة / غم مادة صلبة عند استخدام لقحة بحجم 10 % كذلك نجد أن تلقيح الوسط الغذائي بأحجام قليلة من اللقحة (أقل من 8 %) إلى الوسط قد أعطى إنتاجية منخفضة للإنزيم وقد يعود هذا الانخفاض في الفعالية إلى العدد القليل للخلايا وبالتالي عدم استغلال مكونات الوسط بكفاءة عالية وأن زيادة الخلايا عن الحدود المثلى يؤدي إلى تنافسها على المواد المغذية وزيادة المواد الأيضية السامة مما ينتج عنه انخفاض في إنتاج الإنزيم (11).

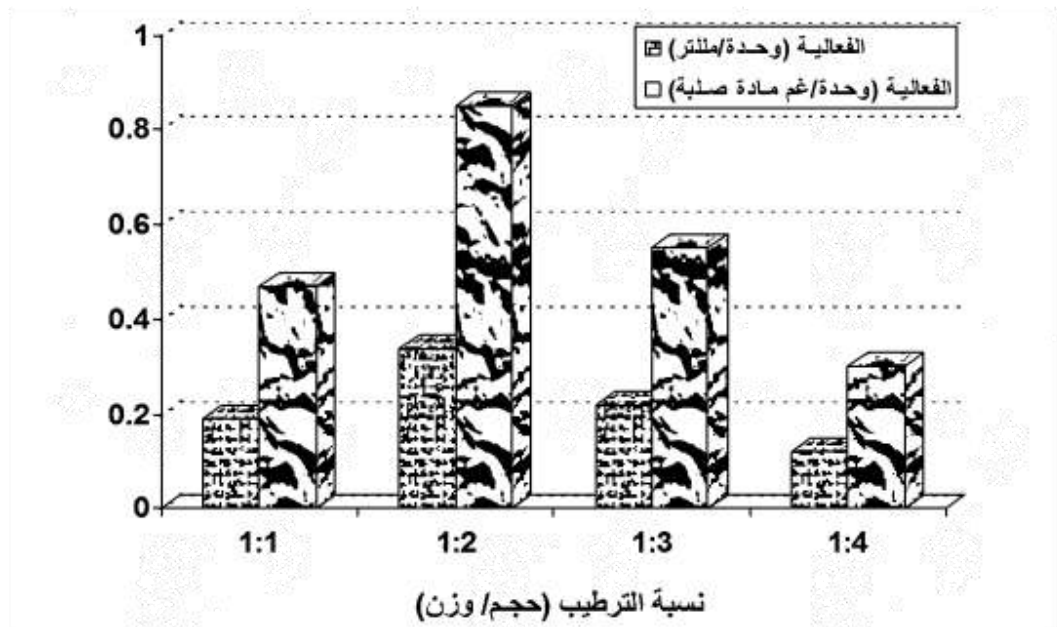


الشكل (4.3): تأثير الماء المقطر ومحلول الفوسفات المنظم بتركيز 0.2 مولار وبرقم هيدروجيني 6.5 في استخلاص أنزيم الدكسترانيز

من العزلة المحلية *Streptomyces* sp. AM

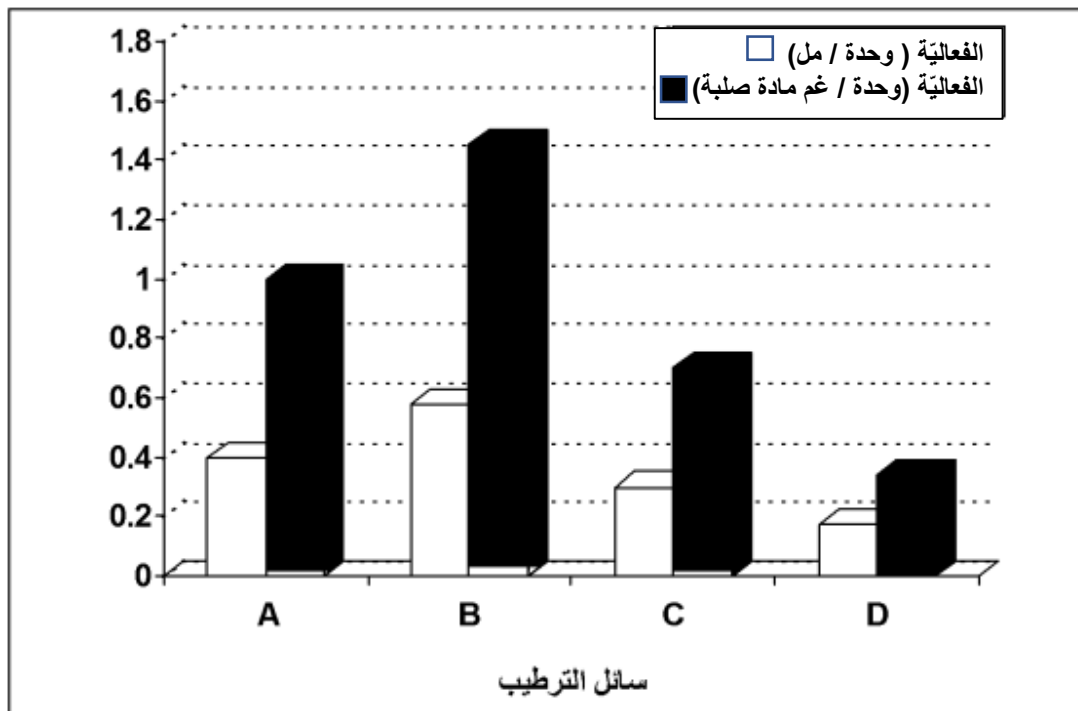
A : الماء المقطر

B : محلول الفوسفات المنظم بتركيز 0.2 مولار وبرقم هيدروجيني 6.5



الشكل (5.3): تأثير نسبة الترطيب المختلفة لوسط التخمر لسحالة الرز في إنتاج أنزيم الدكسترانيز من العزلة المحلية *Streptomyces*

sp.AM باستخدام وسط الترطيب TDY.



الشكل (6.3): إنتاج أنزيم الدكسترانيز من *Streptomyces sp. AM* باستخدام وسط السحالة المرطب بمحاليل مختلفة بنسبة (1:2)

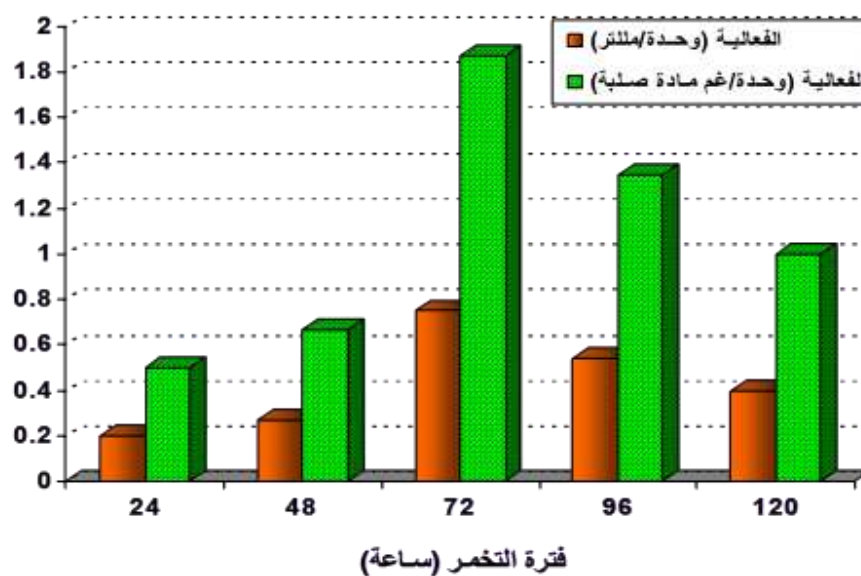
(حجم/ وزن).

TY :A

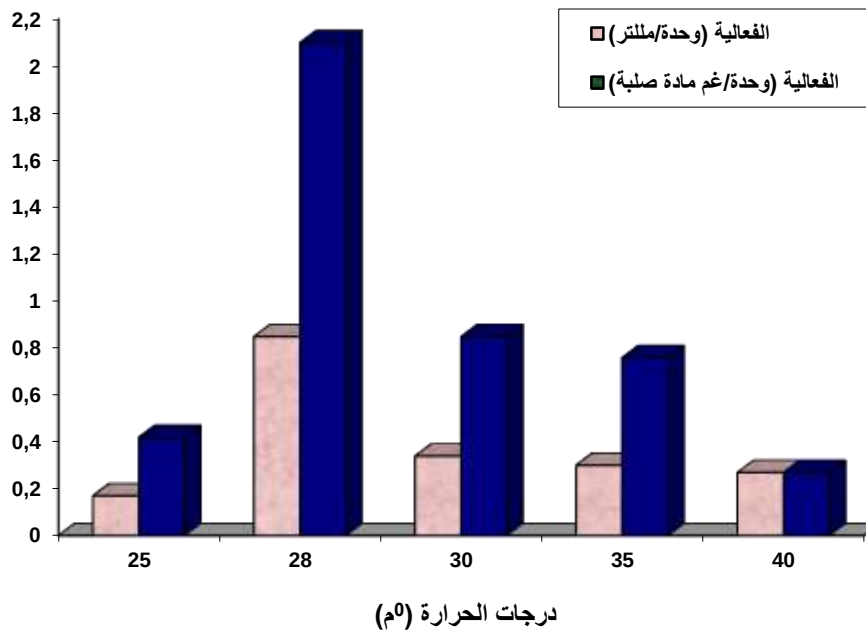
TDY :B

C: محلول الدكستران

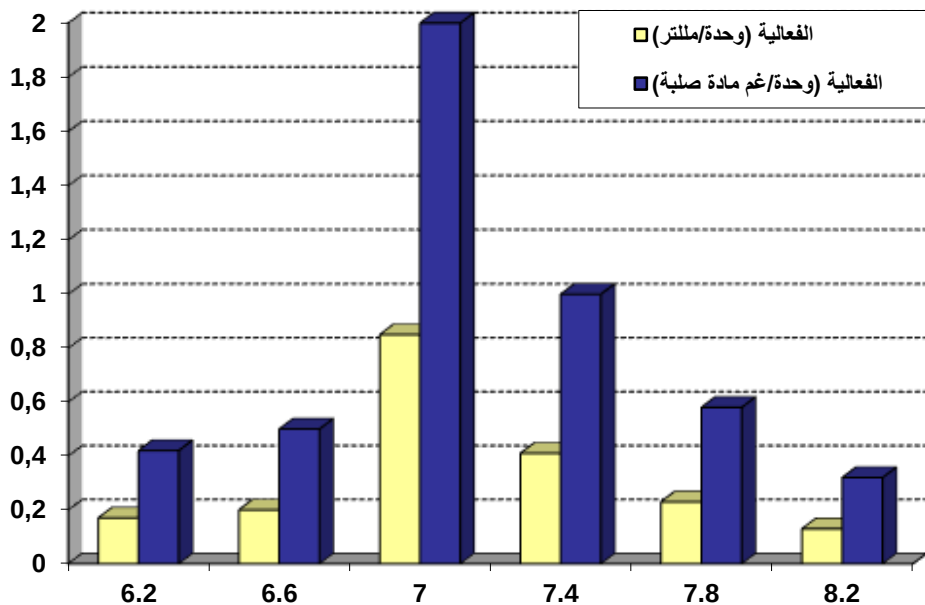
D: ماء مقطر



الشكل (7.3): إنتاج الدكستراينز من *Streptomyces* sp. AM عند تنميتها في وسط السحالة المرطب بـ TDY بنسبة (1:2) (حجم/وزن) لمدد حضن مختلفة.

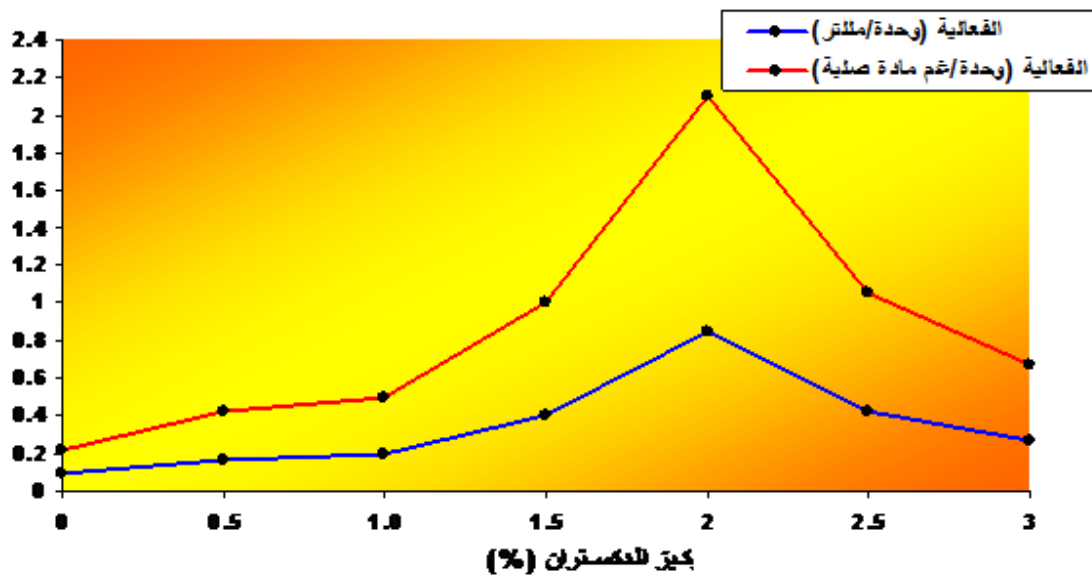


الشكل (8.3): تأثير الدراجات الحرارية المختلفة في إنتاج انزيم الدكستراينز

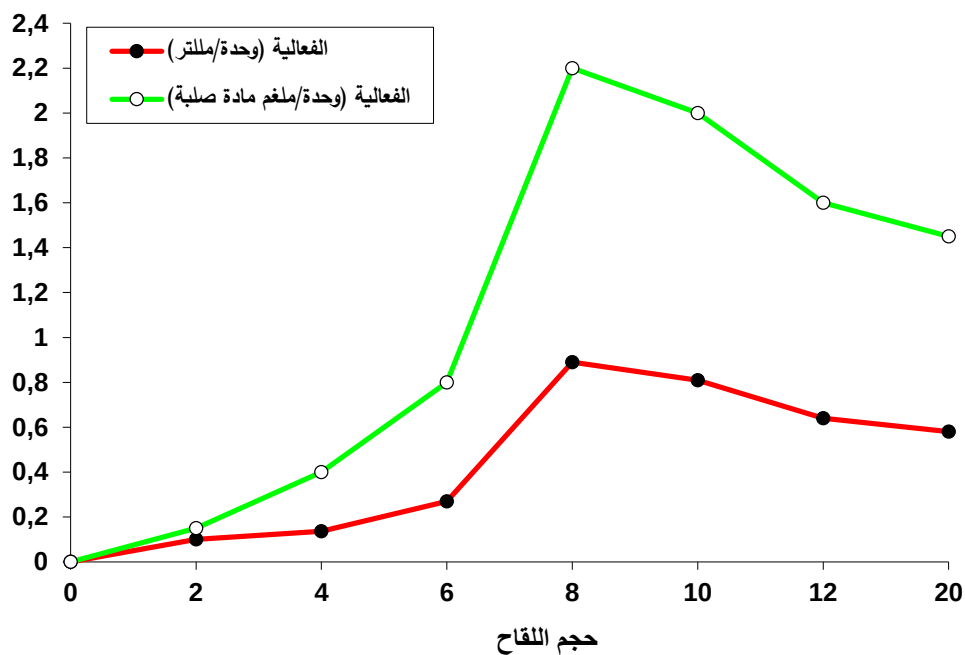


الرقم الهيدروجيني الابتدائي

الشكل (9.3): إنتاج انزيم الدكستراينز من العزلة المحلية *Streptomyces* sp. AM عند تنميتها في وسط سحالة الزر المرطب بوسط TDY وبأرقام هيدروجينية مختلفة.



الشكل (10.3): إنتاج انزيم الدكستراز من العزلة المحلية AM المنمأة في وسط سحالة الأرز المرطب بوسط TDY وبتراكيز مختلفة من الدكستروز.



الشكل (11.3): تأثير الأحجام المختلفة من اللقحة البكتيرية للعزلة المحلية AM باستخدام وسط سحالة الرز المرطب بوسط TDY.

المراجع: (References)

1. Alili, M., Abdelwahab, A., & Munim, G. (2018). Study of dextranase properties produced by *Streptomyces* sp. AM. *Journal of Biotechnology*, 280, S50–S51.
2. Wang, D., Lu, M., Wang, S., Jiao, Y., Li, W., Zhu, Q., & Liu, Z. (2014). Purification and characterization of a novel marine *Arthrobacter oxydans* KQ11 dextranase. *Carbohydrate Polymers*, 106, 71–76.
3. Wang, X., Zhang, Y., Li, M., Qin, Q., & Xie, T. (2022). Purification and characterization of dextranase from *Penicillium cyclopium* CICC–4022 and its degradation of dextran. *International Journal of Biological Macromolecules*, 204, 627–634. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.01.196>
4. Ren, W., Cai, R., Yan, W., Lyu, M., Fang, Y., & Wang, S. (2018). Purification and characterization of a biofilm-degradable dextranase from a marine bacterium. *Marine drugs*, 16 (2), 51.
5. Barzkar, N., Babich, O., Das, R., Sukhikh, S., Tamadoni Jahromi, S., & Sohail, M. (2022). Marine Bacterial Dextranases: Fundamentals and Applications. *Molecules*, 27(17), 5533.
6. Whitaker, J.R. & Bernard, R.A. (1972). Experiment for Introduction to Enzymology. The Wiber Press, Davis Inc., New York, USA.
7. Whitaker, J. R., & Granum, P. E. (1980). An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 280 nm. *Analytical biochemistry*, 109 (1), 156–159.
8. Staat, R. H., Gawronski, T. H., & Schachtele, C. F. (1973). Detection and preliminary studies on dextranase-producing microorganisms from human dental plaque. *Infection and immunity*, 8 (6), 1009–1016.
9. Johnson, I. H. (1991a). Dextranase activity of streptococcal isolates from human dental plaques. *Microbios*, 65 (264–265), 155–167.
10. Linder, L., Andersson, C., Sund, M. L., & Shockman, G. D. (1983). Protoplast formation and localization of enzymes in *Streptococcus mitis*. *Infection and immunity*, 40 (3), 1146–1154.
11. Abdullah, A. L., Tengerdy, R. P., & Murphy, V. G. (1985). Optimization of solid substrate fermentation of wheat straw. *Biotechnology and bioengineering*, 27 (1), 20–27.
12. Kim, J. H., Hosobuchi, M., Kishimoto, M., Seki, T., Yoshida, T., Taguchi, H., & Ryu, D. D. (1985). Cellulase production by a solid state culture system. *Biotechnology and Bioengineering*, 27 (10), 1445–1450.
13. Lonsane, B. K., & Ramesh, M. V. (1990). Production of bacterial thermostable α -amylase by solid-state fermentation: a potential tool for achieving economy in enzyme production and starch hydrolysis. *Advances in applied microbiology*, 35, 1–56.
14. Tengerdy, R. P. (1985). Solid substrate fermentation. *Trends Biotechnol.:(Netherlands)*, 3 (4).
15. Purohit F. G. & Marthur S. K. (1996). Enzyme bioaccelerators in Biotechnology Fundamental, Applications publishers. India.

16. Bull, A. T., & Bushell, M. E. (1976). Environmental control of fungal growth. *Filamentous fungi*. Edited by Smith, J. and D. Berry. (2): 1-26.

الخفاجي، زهرة محمود (1990). التّقنيّة الحيويّة، مطابع دار الحكمة للطباعة والنّشر، بغداد
سميث، جون (1987). أساسيات التّقنيّة الإحيائيّة. ترجمة عبد العزيز حامد ابو زنادة. عمادة شؤون المكتبات. جامعة
الملك سعود. الرياض.
حسن، شذى سلمان (1996). تقنيّة وتوصيف إنزيم البروتينيز القاعدي من عفن *Aspergillus oryzae* بطريقة
تخمّرات الحالة الصّلبة. رسالة دكتوراه. كليّة العلوم – جامعة بغداد العراق.
عبد الرزاق، امانى عبد الوهاب (1998). إنتاج أنزيم الدكسترانيز وتوصيفه من بكتيريا *Streptococcus salivarius*
المعزولة من فم الانسان. رسالة دكتوراه. كليّة العلوم – جامعة بغداد العراق.