تحديد الظروف المثلى لانتاج انزيم L- arabinose isomerase من عزلة محلية من بكتريا *Bacillus stearothermophilus* HB4

حميد عبود جبر
قسم علوم الأغذية والتقانات الإحيائية - كلية الزراعة - جامعة بغداد
E-mail: dr_hameedm59@yahoo.com

المستخلص

تم الحصول في هذه الدراسة على 12 عزلة محلية نقية من بكتريا *Bacillus stearothermophilus* من بين اكثرمن 40 عزلة من مصادر مختلفة من الترب العراقية . اخضعت هذه العزلات الى الغربلة الاولية والثانوية من حيث قدرتها على انتاج انزيم L-arabinose isomerase فكانت العزله B4 الاغزر انتاجا وبفعالية انزيمية بلغت 35 وحدة / مل . اظهرت الاختبارات المظهرية والمزرعية والفسلجية والكيموحيوية للعزلة B4 عائديتها إلى البكتريا *Bacillus stearothermophilus* ورمز لها HB4 . تم تحديد الظروف المثلى لانتاج انزيم الارابينوز ايزوميريز من العزلة المحلية المذكورة بطريقة المزارع المغمورة فتبين ان افضل تلك الظروف هي باستخدام وسط يحتوي على الكليسرول بتركيز 1.5% كمصدر للكاربون والارابينوز بتركيز 0.15% كماده حاثة لانتاج الانزيم وخليط متساوٍ من الكازين وخلاصة الخميرة وخلاصة اللحم البقري بتركيز 1 % كمصدرللنتروجين وكبريتات المغنيسيوم والمنغنيز بتركيز 0.15% و 0.02 % على التوالي ، كمصدر للايونات المعدنية وبرقم هيدروجيني 7.5 بعد 72 ساعة من الحضن على درجة حرارة 55 مْ . وتحت هذه الظروف بلغت الفعالية الانزيمية 55 وحدة /مل للعزلة B_4 وبزيادة قدرها حوالي 150 % مقارنة بنفس العزلة قبل تحديد الظروف المثلى لانتاج الانزيم .

الكلمات المفتاحية : أنزيم ارابينوز ايزوميريز ، بكتريا *Bacillus stearothermophilus* HB4

المقدمة

يعتبر أنزيم (L - arabinose isomerase (L-AI EC 5.3.1. 4 من الانزيمات الداخل خلوية وهو في الانظمة البايولوجية يحفز التفاعل العكسي لتحويل الارابينوز (L – arabinose) الى الرايبولوز L-ribulose ضمن مسار الفوسفات الخماسي Pentose phosphate path way أو مسار الـ phosoho ketolase (Patrick و Lee ،1968 ؛ Ponnandy وآخرون ، 2008 ؛ Kim وآخرون ، 2010) كما ان للانزيم القابلية على تحويل الكالكتوز (D-galactos) الى التاكاتوز (D- tagatose) خارج الجسم الحي (*invitro*) لذلك يعتبر هذا الانزيم من الانزيمات الواعدة لانتاج السكريات النادره مثل سكرالتاكاتوز (Izumori ، 2002).

تشير المصادر الى امكانية انتاج هذا الانزيم من عدد من الاحياء المجهرية ولكن عدد قليل من هذه المصادر تم تنقية الانزيم فيها (Roh وآخرون ، 2000 ؛ Kim وآخرون ، 2002 ؛ Jorgensen وآخرون ، 2004 ؛ Lee وآخرون ، 2005 ؛ Zhang وآخرون،2007) .

يعدّ السكر الكيتوني التاكاتوز هوالايزومر للسكر الالديهيدي الكالكتوز. ويتميز التاكاتوز بحلاوته العالية التي تعادل 92% من حلاوة سكر السكروز ويعطي نفس المذاق (Zehner ، 1988) كما يعتبر من السكريات الخالية من السعرات الحرارية (Livesey و Brown ،1996).

ويمكن استخدامه في الصناعات الغذائية اذ يصنف من المواد الممكن استخدامها بامان Generally recognized as safe (GRAS) ، ويتميز التاكاتوز بانه لا يرفع نسبة الكلوكوز بالدم لانه يتايض بطريقة مختلفة عند تايض السكروز وليس له تاثير على مرضى السكري اي لايوجد له

تاريخ استلام البحث 13 / 10 / 2011 .
تاريخ قبول النشر 3 / 1 / 2011 .

ما يسمى بتأثير Axative effect او رفع معامل الكلوكوز Glycemic index بعكس بقية السكريات الالديهايدية من نوع polyols (Marzur ، 1989) . كما ان التاكاتوز لا يسبب تسوس الاسنان (Lu و Levin ، 2002 ؛ Zehner وآخرون ، 1995) فضلا عن ان التاكاتوز ينظم توازن الرطوبة النسبية Equilibrium relative humidity (ERH) وبذلك يمكن استخدامه في تنظيم الرطوبة للاغذية.

كل هذه الصفات شجعت المهتمين في الصناعات الغذائية على استخدام التاكاتوز كبديل عن السكروز (Marzur ، 1989)

هناك عدة طرق كيميائية استخدمت لتصنيع التاكاتوز ، تضمنت انتاجه من تحلل اللاكتوز لانتاج الكالكتوز اولا ، ثم يتم تحويل الاخير الى التاكاتوز وبمساعدة هيدروكسيد الكالسيوم $Ca(OH)_2$ كعامل مساعد (Beadle وآخرون ، 1992) ، ولكن يرافق الطرائق الكيمياوية بعض المساوئ بسبب تكون بعض المعقدات الكيمياوية التي تتطلب خطوات تنقية أضافية للتخلص من النواتج العرضية .لذلك اتجهت جهود الباحثين لايجاد انزيمات خاصة من مصادر ميكروبية لانتاج التاكاتوز .

ومن بين تلك الدراسات اشار Izumori و Tsuzak (1988) الى انتاج التاكاتوز بواسطة انزيم galactitol dehydrogenase الذي بنتج من بكتريا *Mycobactrium smegmatis* او من بكتريا – *Enterobacter agglomerans* (Muniruzzaman وآخرون ، 1994) أو من بكتريا *Arthrobacter globiformis* (Izumori وآخرون ، 1984) اذ يقوم هذا الانزيم يتحويل الكالكتيتول (galactitol) الى التاكاتوز ويعتبر انتاج الاخير من هذه المصادر مكلف نسبيا . كما لاقت العمليات البايولوجية لانتاج التاكاتوز باستخدام انزيم الارابينوز ايزميريز في السنوات الاخيرة اهتماما كبيرا وذلك لكثرة المصادر الميكروبية المنتجة لهذا الانزيم ، فضلا عن اجراء العديد من عمليات الكلونة التي اجريت لهذا الانزيم بنقل الجين الذي يشفر لانتاجة من العديد من انواع البكتريا المنتجة له الى بكتريا *Escherichia coli* (Patrick و Lee ، 1968) وتتميز الطرائق الانزيمية باعطاءها نواتج أكثر نقاوة مقارنة بالطرائق الكيمياوية .

تهدف الدراسة الحالية الحصول على عزلة محلية قادرة على انتاج انزيم أرابينوز ايزوميريز ودراسة الظروف المثلى لانتاجة ، خصوصا تلك المتعلقة بالمصادر الكاربونية والنتروجينية والايونات المعدنية وظروف درجة حرارة الحضن والرقم الهيدروجيني (pH) ومدة التخمير .

المواد وطرائق البحث

أولا – مصادر العزل

اشتملت مصادر العزل على 40 عينة من التربة تم الحصول عليها من حقول المزارع المختلفة في كلية الزراعة / جامعة بغداد .

ثانيا - الأوساط الزرعية : - شملت الاوساط الزرعية على : -

1-الوسط الاساس الصلب

ويتالف من : الكليسرول (1 غم) ، الارابينوز (0.15 غم) ، التربتون (0.5 غم) ، خلاصة لحم البقر (0.3 غم) ، الآكر (1.5 غم) .اذيبت المواد في كمية من الماء المقطر وعدل الرقم الهيدروجيني للوسط الى 7 واكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر ، وعقم بالمؤصدة على درجة 121 مْ مدة 15 دقيقة وبضغط بخاري يعادل 15 باوند / انج^2 . باستثناء الكليسرول والارابينوز اذ عقما على انفراد ثم اضيفا الى مكونات الوسط بعد التعقيم واستعمل هذ ا الوسط في مرحلة الغربلة الاولية (Givry و Duchiron ، 2008) .

2- الوسط الاساس السائل :

حضر هذا الوسط وفق ماذكره Deok-Kun وآخرون (2001) مع اجراء بعض التحويرات و يتكون من الكليسرول (اغم) ، الارابينوز (0.15 غم) ،خلاصة الخميرة (0.5غم) ، خلاصة لحم البقر (0.5غم) ،الكازين (1 غم) فوسفات البوتاسيوم القاعدية 1.5 غم) ، فوسفات البوتاسيوم الحامضية (0.25 غم) وكبريتات المغنيسيوم السباعية التميؤ (0.15 غم). اذيبت المواد في كمية

من الماء المقطر وعدل الرقم الهيدروجيني للوسط الى 7 واكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر . عقم الوسط بالمؤصدة على درجة 121 مْ مدة 15 دقيقة وبضغط بخاري يعادل 15 باوند / انج^2. باستثناء الكليسرول والارابينوز تم تعقيمهماعلى انفراد ثم اضيفا الى مكونات الوسط بعد التعقيم واستعمل هذا الوسط في مرحلة الغربلة الثانوية.

ثالثا : العزل والعزيلة الاولية

علق 15 غم من انموذج التربة بعد غربلته وازاله الاعشاب منه في 100 مل ماء مقطر، عوملت نماذج التربة بالحرارة على درجة 80 م لمدة 15 دقيقة وحضرت تخافيف عشرية بماء الببتون المعقم والمحضر باذابة 0.1 غم من الببتون في 100 مل ماء مقطر . نقل 0.1 مل من التخفيفات المناسبة الى اطباق بتري معقمة تحتوي على وسط صلب معقم من الـ Nutrient agar . ثم اجريت عملية نشر الانموذج على سطح الوسط الصلب بطريقة streaking والناشر L-shap (الدليمي ، 1988) . حضنت الاطباق على درجة الحرارة 55 مْ مع متابعة النمو يوميا ولمدة 2– 3 يوم . التقطت مستعمرات البكتريا النامية بصورة مفردة واعيد زراعتها على الوسط الاساس الصلب المذكور أنفاً والحاوي على الارابينوز كونه مادة حاثة لانتاج انزيم الارابينوز ايزوميريز بطريقة التخطيط ثم كررت العملية لاكثر من مرة بهدف الحصول على عزلات نقية مع ملاحظة كثافة النموذج في كل مرة وفحصت تحت المجهر للتاكد من نقاوة العزلة .

رابعا : الغربلة الثانويـــة

حضر عالق العزلات التي تميزت بمعدلات عالية من النمو في مرحلة الغربلة الاولية وذلك بنقل عروتين منها بابرة التلقيح loopfull الى انبوبة اختبار حاوية على 5 مل من الماء المقطر المعقم ورجت الانبوبة جيدا ثم تم احتساب عدد المستعمرات / مل . بعدها حضرت التخفيفات اللازمة للحصول على الحجم المطلوب من اللقاح (مستعمره/ مل).استخدمت طريقة المزارع المغمورة باستعمال حاضنة هزازة لانتاج الانزيم . اذ لقحت دوارق زجاجية سعة 300 مل حاوية على 50 مل من وسط الاساس السائل المعقم والمذكور أنفاً وبواقع 1 مل من عالق العزلة بحيث يكون حجم اللقاح في وسط الانتاج حوالي 1 $X\ 10^8$ خلية / مل .

حضنت الدوارق بدرجة حرارة 55 مْ لمدة 72 ساعة وبسرعة تحريك 200 دورة /دقيقة . ولغرض أستخلاص الانزيم فصلت الكتلة الحيوية من وسط النمو بالنبذ المركزي المبرد على سرعة 14000 دورة / دقيقة مدة 20 دقيقة مع درجة حرارة 4 م وجرى التخلص من الرائق اما الراسب الذي يمثل الخلايا الكاملة فقد تم تعليقها بمحلول منظم من فوسفات الصوديوم برقم هيدروجيني 7.5 حطمت الخلايا بجهاز الـ Ultra sonic نوع (250 W, pulse on 1 s ; pulse off 3s) ولمدة 40 دقيقة على درجة حرارة 4 ْم ثم اجريت عملية النبذ المركزي باستخدام نفس الظروف السابقة حسب الطريقة التي ذكرها Zhang وآخرون (2007) للتخلص من حطام الخلايا في الجزء الراسب . اما الرائق فعد المستخلص الخام للانزيم .

خامسا : تقدير الفعالية الانزيمية

قدرت الفعالية الانزيمية وفق ما ذكره Zhang وآخرون (2007) مع بعض التحويرات وذلك بتقدير التاكاتوز (D-tagatose) المتكون (كسكر كتيوني) وباستعمال سكر الكالكتوز (D - galactose) كمادة اساس . حيث اضيف 0.1 مل من مستخلص الانزيم الى محلول التفاعل المتكون من 0.5 مل من محلول دارىء فوسفات البوتاسيوم تركيزه 200 مليمول (pH له يعادل 7) ، و 0.2 مل من محلول الكالكتوز تركيزه 50 مليمول (كمادة اساس) ، حضن المزيج لمدة 60 دقيقة على حرارة 50 مْ . ثم اوقف التفاعل باضافة 1 مل من محلول حامض البير كلوريك ($HClO_4$) تركيزه 0.5 مولاري . واجري الكشف عن التاكاتوز المتكون بحسب الطريقة التي ذكرها Dische و Borenfreund (1951) وذلك باضافة 0.2 مل من محلول Cysteine – Hydrochloride تركيزه 1.5 % و 6 مل من محلول حامض الكبريتيك تركيزه 70 % و 0.2 مل من محلول الكاربازول تركيزه %

0.12 محضر بالايثانول الى محلول التفاعل ومزج الخليط جيدا باستعمال مازج الانابيب Vortex . قيست الامتصاصية على طول موجي 560 نانوميتير في جهاز نوع 4050UV/ Visible مجهز من شركة LKB السويدية مقابل محلول كفء (Blank) الذي تم تحضيره باتباع الخطوات المذكورة اعلاه مع مراعاة أضافة الانزيم الى محلول التفاعل بعد ايقاف التفاعل باستعمال حامض البيركلوريك . أستخرج تركيز التاكاتوز المتحرر بفعل الانزيم على المادة الاساس الكالكتوز بالاستعانة بالمنحنى القياسي لمحلول التاكاتوز المعّد لهذا الغرض . وعرفت وحدة فعالية الانزيم (Unit) بانها كمية الانزيم التي تحرر مايكررومولا واحدا من التاكاتوز في الدقيقة الواحدة تحت ظروف التجربة .

سادسا : تشخيص العزلة

اجريت مجموعة من الاختبارات لتشخيص العزلة التي تميزت بكفائتها لانتاج انزيم أرابينوز ايزوميريز من خلال مرحلتي الغربلة الاولية والثانوية . وشملت تلك الاختبارات على : -

١) الفحوصات المظهرية : شكل المستعمرات على الوسط الصلب واحجامها والوانها وحافاتها.

٢) الفحوصات المجهرية : فحصت الخلايا الخضرية مجهريا للتعرف على شكلها ولمعرفة مدى أستجابتها لصبغة كرام واحتوائها على السبورات بطريقة التصبيغ باستخدام صبغة Malachite green وموقع هذة السبورات داخل الخلايا الخضرية (Fischer ، 1974)

٣) الفحوصات الفسلجية والكيموحيوية: شملت هذه الفحوصات دراسة تخمر الكلوكوز وانتاج الحامض او الغاز او الـ Acetoin واختبار تحلل الكازين على وسط casein agar ، وتحلل النشأ على وسط starch agar واختبار تحلل الجلاتين على وسط Nutrient gelatin broth وفحص النمو بدرجات حرارة 20 مْ و 65 مْ والنمو بظروف لا هوائية على وسط Nutrient agar حاوي على Na-thioglycolate بتركيز 0.5 غم / لتر ، والنمو على وسط sabouraud dextrose agar بتركيز 66غم / لتر ، والنمو على وسط Nutrient agar بوجود الازايد بتركيز 0.02% وفحص السترات للاستفادة منه كمصدر للطاقة اجريت تلك الفحوصات حسب الطرق المذكورة من قبل Harrigan و Mac Cance (1976) و Harry وآخرون (1981) .

سابعاً : تعيين الظروف المثلى لانتاج الانزيم والتي شملت على:

1 – تحديد مصدر الكاربون الامثل

درس تاثير عدد من مصادر الكاربون في انتاج الانزيم أشتملت على الكليسرول والكلوكوز والكالكتوز بطريقة المزارع المغمورة مع استخدام الارابينوز في كل التجارب كونه مادة حاثة لانتاج الانزيم (Maharani ، 1970 ؛ Zhang وآخرون ، 2007) . وتم استخلاص الانزيم وتقدير فعاليتة بنفس الطريقة التي ذكرت سابقا .

2- تحديد التركيز الامثل للكسيرول

درس تاثير تراكيز مختلفة من الكليسرول باعتباره افضل مصدر للكاربون أنتخب من التجربة السابقة في الوسط الاساسي السائل المستعمل لانتاج الانزيم وشملت تلك التراكيز على النسب من 1 – 2.5 % .

3 - تحديد مصدر النتروجين الامثل لانتاج الانزيم

استبدل مصدر النتروجين في الوسط السائل المستخدم بتركيز 1% في انتاج الانزيم والمتمثل بمصادر نتروجين شملت على الكازين أو خلاصة الخميرة أو خلاصة لحم البقر أو خليط متساوي منهما أو اليوريا كمصادر عضوية وكبريتات الامونيوم كمصادر لا عضوية . اضيفت المصادر المذكورة الى وسط الانتاج بتركيز 1 % مع الاخذ بنظر الاعتبار استعمال التركيز الامثل من المصدر الكاربوني والذي تم تحديده وفق الفقرة 1 و 2 أعلاه .

4 – تحديد الرقم الهيدروجيني (pH) الامثل للانتاج

استعمل الوسط السائل لانتاج الانزيم مع تعديل نسبة الكليسرول الى (1.5 %) واستخدم الكازين مع خلاصة اللحم والخميرة كمصدر للنتروجين بدلاً من المصادر النتروجينية العضوية وغير

العضوية الاخرى بناء على نتائج تحديد مصدر الكاربون والنتروجين المذكورة انفاً ، إذ حضر الوسط بارقام هيدروجينية تراوحت بين 6 – 8 بفارق نصف درجة من وسط لاخر لتحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لانتاج الانزيم .

5 - تحديد درجة الحرارة المثلى

حضن وسط الانتاج الملقح بخلايا البكتريا بدرجات حرارة مختلفة تراوحت من 45 – 65 مْ وبفارق خمس درجات حرارية من وسط لاخر ولمدة 72 ساعة لتحديد درجةالحرارة المثلى لانتاج الانزيم مع مراعاة الظروف المثلى المتحققة في التجارب السابقة .

6 - تحديد تاثير مصادر الايونات المعدنية المثلى لانتاج الانزيم :

استبدلت ايونات المغنيسيوم المستخدم في وسط الانتاج بمصادر معدنية مختلفة بتركيز 0.15 % من اي منهما واشتملت على Mn^{+2} والـ Co^{+2} والـ Mg^{+2} وخليط من املاح المغنيسيوم بتركيز 0.15 % والمنغنيز بتركيز 0.02 % في حين تركت معاملة اخرى من دون اضافة للايونات المعدنية مع الاخذ بنظر الاعتبار الظروف المثلى كافة المتحققة في التجارب السابقة .

7 - تحديد مدة الحضانة المثلى لانتاج انزيم:

تمت متابعة انتاج الانزيم من قبل البكتريا قيد الدراسة في الظروف المثلى المحددة في ضوء التجارب المذكوره آنفاً وعلى مدى 96 ساعة من الحضن في 55ْم وبواقع 24 ساعة من حيث الكتلة الحيوية والفعالية الانزيمية والفعالية النوعية .

ثامنا :تقدير البروتين

اتبعت طريقة Lowery وآخرين (1951) لتقديرتركيز البروتين اذ حضر المنحنى القياسي من(Bovine serum albumin (BSA بتراكيز متدرجة تراوحت من 0 الى 2 ملغم / مل واستخدم المنحنى القياسي لحساب تركيز البروتين في المستخلص الانزيمي المنتج بعد معاملته بنفس ظروف المحلول البروتيني القياسي .

تاسعا : تقدير الكتلة الحيوية

اتبعت الطريقة المذكورة من قبل Lobanok (1998) لتقدير الكتلة الحيوية حيث جمعت الكتلة الحيوية بعد انتهاء مدة التخمر بالنبذ المركزي على سرعة 15000 دورة / دقيقة مدة 15 دقيقة وعلى درجة 4ْم وغسلت الخلايا بالماء المقطر مرتين مع النبذ المركزي تحت نفس الظروف ثم جففت بدرجة الحرارة 105مْ لمدة 24 ساعة واحتسب وزن المادة الجافة على اساس غم / مل .

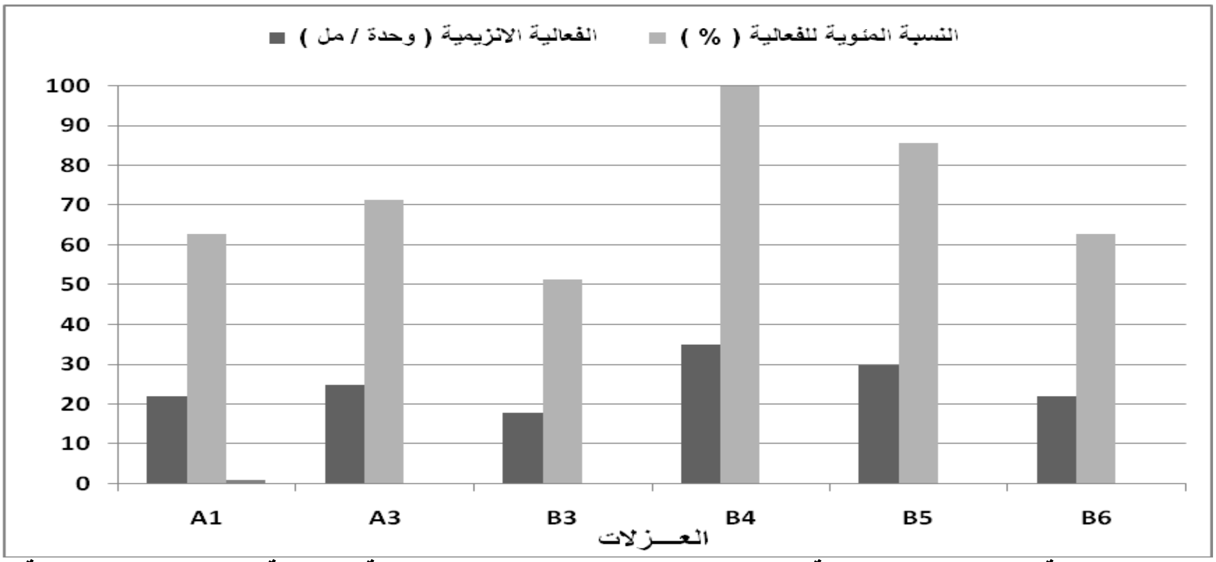
النتائج والمناقشة

أمكن في هذه الدراسة الحصول على 12 عزلة من البكتريا من بين 40 عزله تم الحصول عليها من مصادرمختلفة من ترب عراقية من كلية الزراعة / ابو غريب . وتميزت هذه العزلات بتكوينها مستعمرات واضحة وشفافة واحيانا غيرشفافة وغير منتظمة على الاوساط الصلبة . وعند تنمية هذه العزلات على الوسط الاساس ي الصلب والحاوي على الارابينوز كونه مادة حاثة لانتاج انزيم ارابينوزايزوميريز (Maharani ، 1970 و Zhang واخرون ، 2007) كانت ست عزلات منها وهي A1 ، A3 ، و B3 ، B4 ، B5 ، B6 ذات نمو كثيف وهي خاصية اتخذت معيارا للعزل في مرحلة الغربلة الاولية (جدول 1) . لذلك فقد وقع الاختيار على هذه العزلات لاخضاعها للغربلة الثانوية ، وتم حساب الفعالية الانزيمية بعد تنميتها على وسط اساس ي سائل يحتوي على الارابينوز كمادة حاثة لانتاج الانزيم بطريقة المزارع المغمورة ويوضح الشكل (1) نتائج الغربلة الثانوية . اذ يلاحظ تفوق العزلة B4 بانتاجيتها للانزيم مقارنه مع بقية العزلات قيد الدراسة اذ بلغت فعالية الانزيم 35 وحدة/مل للعزلة B4 مقارنه ببقية العزلات التي تراوحت فعاليتها بين 18 – 30 وحدة/مل اي بزيادة تعادل 15% تقريبا مع انتاجية أقرب العزلات لها وهي العزلة B5 لذلك وقع الاختيار على العزلة B4 لاكمال الدراسة عليها .

جدول 1 . كثافة النمو لعزلات البكتريا المنتجة لانزيم L- arabinose isomerase في مرحلة الغربلة الاولية على وسط حاوي على الكليسرول كمصدر للكاربون والارابيتوز كمادة حاثة لانتاج انزيم و بدرجة50مْ

التسلسل	رمز العزلة	*كثافة النمو
1	A1	+++
2	A2	++
3	A3	+++
4	A4	+
5	A5	++
6	A6	+
7	B1	++
8	B2	++
9	B3	++++
10	B4	+++
11	B5	++++
12	B6	+++

*كثافة نمو العزلات على وسط العزيلة الاولية حيث تمثل (+) نمو قليل ، (++) نمو متوسط ، (+++) نمو كثير ، (++++) نمو كثيف .



شكل 1 . مقارنة كفاءة العزلات المنتجة لانزيم ارابينوز ايزوميريز من حيث الفعالية الانزيمية (وحدة / مل) والنسبة المئوية للفعالية (%) في مرحلة الغربلة الثانوية .

تشخيص العزلة B4

اخضعت العزلة B4 المنتجة للانزيم من مرحلتي العزيلة الاولية والثانوية الى مجموعة من الاختبارات المظهرية والزرعية فضلا عن بعض الاختبارات الفسلجية والكيموحيوية .

اظهرت الاختبارات المظهرية للمستعمرات بانها مستعمرات واضحة وشفافة وبعض الاحيان غير شفافة وناعمة وذات حافات اونهايات كاملة ولاتتجاوز معدل اقطارها عن 3 ملم تقريبا .كما اظهرت الفحوصات المجهرية ان البكتريا عصوية مكونة للسبورات الطرفية وموجبة لصبغة كرام.

وبينت الفحوصات الكيموحيوية الموضحة في الجدول (2) ان العزلة B4 لها القابلية على انتاج الانزيمات المحللة للجلاتين والكازين والنشأ في حين كانت غير قادرة على الاستفادة من السترات

كمصدر لكاربون كما انها تميزت بنموها بدرجات حرارة بين 55 – 65 مْ وعدم النمو في درجة الحرارة 20 مْ او في الظروف اللاهوائية او على وسط Saubourd dextrose agar

جدول 2 . الخواص الكيموحيوية للعزلة B4 المنتجة لانزيم L –arabinose isomerase

الفحـــص	*النتيجة
النمو بدرجة حرارة 55- 65 مْ	+
النمو بدرجة حرارة 20 مْ	-
النمو في ظروف لا هوائية	-
النمو على وسط sabaured agar	-
النمو على وسط يحوي على ألـazide بتركيز 0.02%	-
انتاج الحامض من الكلوكوز	+
انتاج الغاز من الكلوكوز	-
انتاج الاسيتون من الكلوكوز	-
تحلل النشا	+
تحلل الجلاتين	+
تحلل الكازين	+
الاستفادة من الـ citrate	-

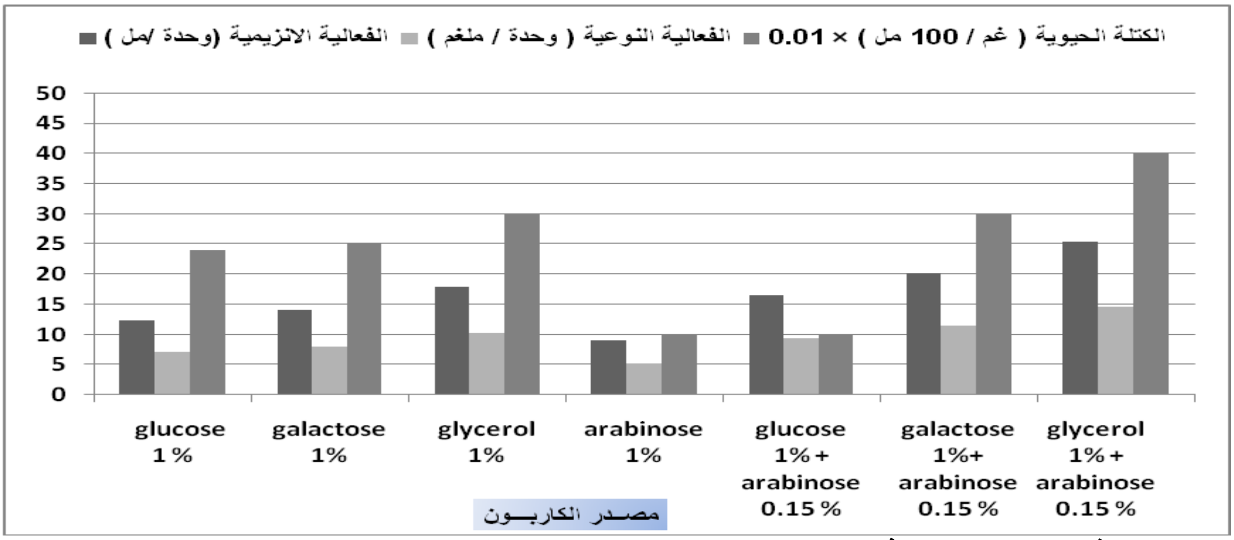
(+)* وجود نمو ، (-) عدم وجود نمو

كما تبين انها حساسة لوجود أزيد الصوديوم بتركيز 0.02 %. وعند مقارنة نتائج هذه الاختبارات مع ماتتوفر من المراجع العلمية الخاصة بتصنيف الاحياء المجهرية (Fischer ، 1974 و Harrigan و Mc Cance ، 1976) اتضح ان العزلة تعود الى البكتريا *Bacillus stearothemophilus* ورمز لها HB4 تميزا لها وتعريفا .

دراسة وتحديد الظروف المثلى لانتاج الانزيم

1 – تحديد مصدر الكاربون الامثل

وجد ان افضل المصادر الكاربونية المستعملة هو الكليسرول مع وجود الارابينوز كمادة حاثة على انتاج الانزيم اذ بلغت الفعالية الانزيمية 25.5 وحدة /مل والفعالية النوعية 14.57 وحدة / ملغم والكتلة الحيوية 0.4 غم /مل (شكل 2) يليه الكالكتوز مع الارابينوز ثم الكليسرول والكالكتوز والكلوكوز كلا على افراد وأخيرا االكلوكوز والارابينوز ثم الارابينوز لوحده . وبناءً على هذه النتائج فقد استعمل الكليسرول بوصفه مصدرا للكاربون في وسط انتاج الانزيم علاوه على وجود الارابينوز كمادة حاثة على انتاج الانزيم وتتفق هذه النتائج مع ما وجده كل من Yoon وآخرون (2003) و Baek وآخرون (2004) إلذين أشاروا الى استخدام الكليسرول كمصدر للكاربون في انتاج انزيم الارابينوز ايزوميريز من بكتريا *E. coli* وبكتريا *Geobacillus thermodenitrificans* على التوالي ، كما اشار Maharani (1970) الى ان استخدام الكليسرول كمصدر للكاربون والارابينوز كمادة حاثة في انتاج انزيم الارابينوز ايزوميريز كان افضل من استخدام الكلوكوز والاربينوز ، في حين استخدم Roh وآخرون (2000) الكلوكوز كمصدر للكاربون لانتاج الانزيم من بكتريا *E. coli* ايضا . وقد تعود تلك الاختلافات في تحديد افضل المصادر الى اختلاف الكائن المجهري المستخدم في انتاج الانزيم وما يمتلكه من نظم انزيمية لاستهلاك اي من مصادر الكاربون دون الاخر.



شكل 2 . تاثير مصدر الكاربون في انتاج انزيم ارابينوز ايزوميريز من البكتريا *Bacillus stearothermophillus* HB4 مع وجود الارابينوز بتركيز 0.15 % كمادة حاثة لانتاج الانزيم .

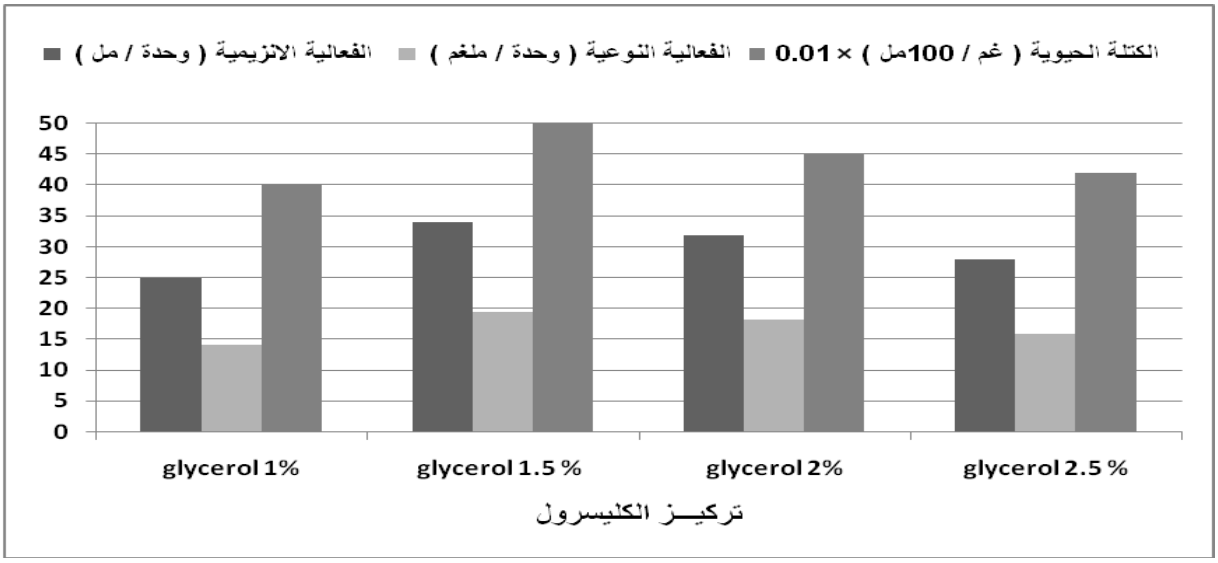
2– تحديد التركيز الامثل من الكلسيرول :

تبين النتائج الموضحة في الشكل (3) ان افضل تركيز للكليسرول لغرض انتاج الانزيم هو 1.5% حيث ان الفعالية الانزيمية والفعالية النوعية كانت 34 وحدة / مل و 19.4 وحدة / ملغم على التوالي ، وهي اعلى من قيمها عند التراكيز من 1 – 2.5 % . وجاءت هذه النتائج متوافقة مع زيادة الكتلة الحيوية عند تركيز الكليسرول 1.5% اذ بلغت الكتلة الحيوية 0.5 غم / 100 مل وهي اعلى من قيم الكتلة الحيوية لبقية المعاملات التي تراوح تركيز الكليسرول فيها من 1 – 2.5 % مما يشير الى ان الكليسرول هو افضل مصدر للكاربون وبتركيز 1.5% بالمقارنة مع بقية التراكيز(2.5% ; 2% ; 1%) وهذا يتفق مع ما وجده Deok- Kum وآخرون (2001) الذين استخدموا وسط انتاج انزيم الارابينوز ايزوميريز يحتوي على 1.5 % من الكليسرول مصدرا للكاربون .

في حين اشار Zakaria (2001) ان استخدام الكالكتوز بتركيز 0.5 % في وسط التنمية لانتاج انزيم الارابينوز ايزوميريز من بكتريا Mycobacterium smegmatis اعطى اعلى فعالية انزيمية تحت ظروف التنمية المستخدمة في تلك الدراسة .

3- تحديد مصدر النتروجين الامثل

تشير النتائج الموضحة في الشكل (4) ان افضل المصادر النتروجينية لانتاج انزيم أرابينوز ايزوميريز من العزله المحلية Bacillus stearothermophilus HB4 هو باستخدام الكازين وخلاصة الخميرة وخلاصة لحم البقر بتركيز 1% اذ بلغت الفعالية الانزيم 45 وحدة / مل والفعالية النوعية 25.71 ملغم / مل مقارنة مع بقية المعاملات التي تراوحت فيها الفعالية الانزيمية بين 18- 30 وحدة / مل والفعالية النوعية بين 10.28 – 17.14 ملغم / مل . اما عن الكتلة الحيوية فقد لوحظ ايضا زيادتها باستخدام كل من الكازين وخلاصة الخميرة ولحم البقر بالمقارنة مع مصادرالنتروجين الاخرى العضوية وغير العضوية حيث بلغت في هذه الحالة 0.5 غم / 100مل بالمقارنة مع بقية المعاملات التي تراوحت فيها الكتلة الحيوية بين 0.2 – 0.45 غم / 100 مل .



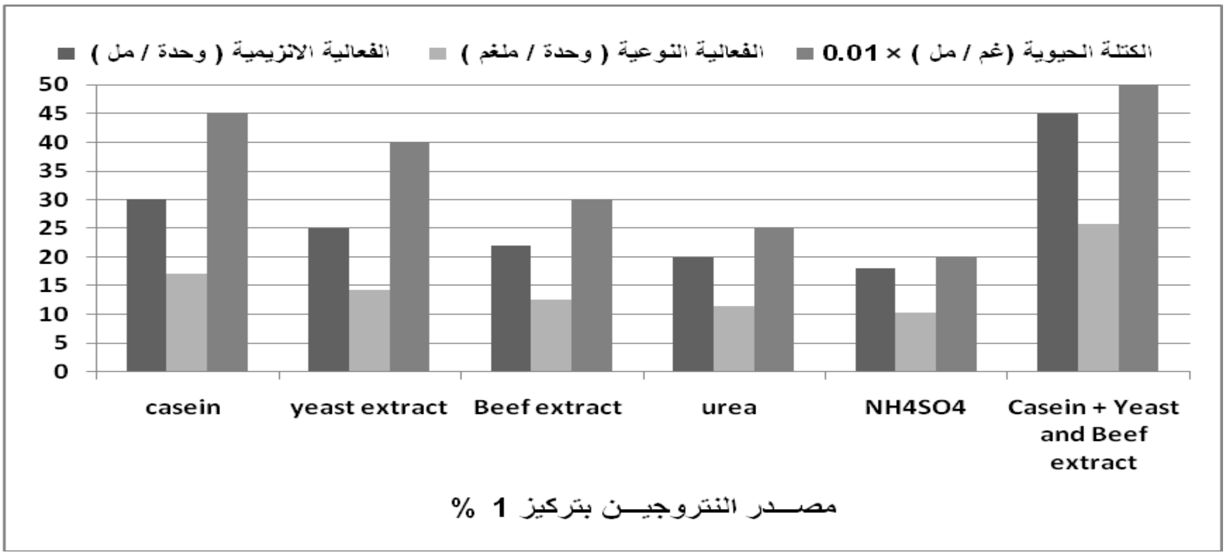
شكل 3 . تحديد التركيز الامثل من الكليسرول لانتاج انزيم ارابينوز ايزوميريز من عزلة محلية من بكتريا *Bacillus stearothermophilus* HB 4 مع وجودالارابينوز بتركيز 0.15 % كمادة حاثة لانتاج الانزيم.

قد يعود ارتفاع قيم الكتلة الحيوية والفعالية الانزيمية والفعالية النوعية عند استخدام الكازين وخلاصة الخميره واللحم البقري الى ان البكتريا المنتجة للانزيم قيد الدراسة انها من البكتريا التي تتطلب توفر مصادر بروتينية غنية بالاحماض الامينية الاساسية كالكازين وخلاصة الخميره واللحم ، لذا فان وجود مثل هذه المصادر النتروجينة يجفزها على النمو وانتاج الانزيم بمستوى اعلى مقارنه ببقية مصادر النتروجين ، على خلاف ماذكره Givry و Duchiron (2008) الذين أشاروا الى ان السلالة المنتجة لانزيم ارابينوز ايزوميريز من بكتريا *Lactobacillus bifermentans* تتطلب احتواء وسط انتاج الانزيم على مصدر نتروجيني لاعضوي مثل سترات الامونيوم حيث بلغت الفعالية الانزبمية 9.4 وحدة / مل وكانت اكثر بما يعادل 1.6 مرة مقارنة باستخدام وسط MRS للتنمية .

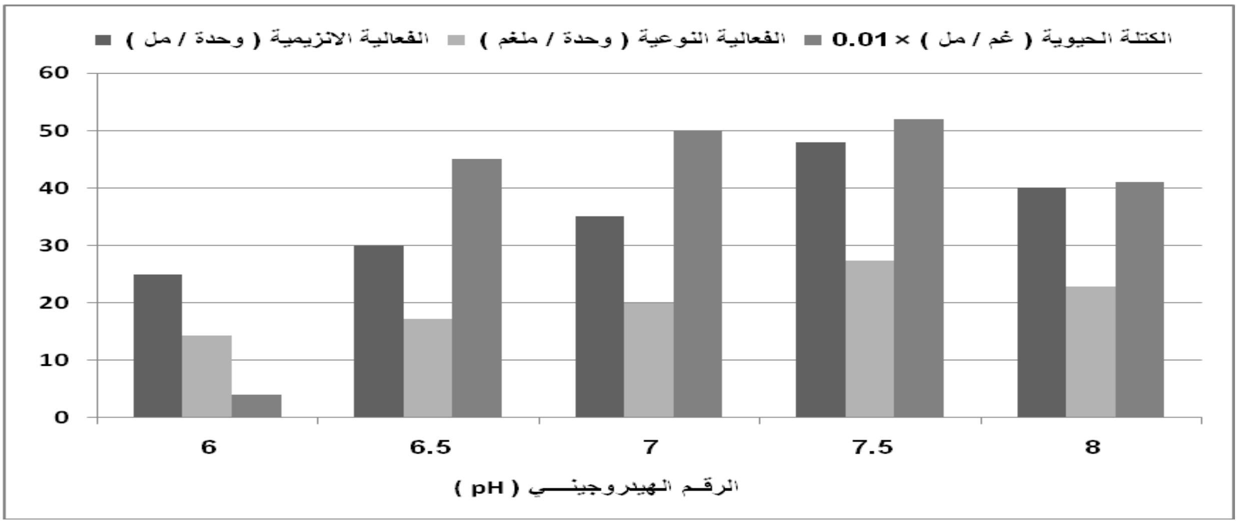
4 - تحديد الـ PH الامثل

استخدمت في هذه الدراسة مجموعة من المحاليل التي تراوحت قيم الرقم الهيدروجيني (pH) فيها بين 6 – 8 (شكل 5) لغرض انتاج الانزيم حيث لوحظ ان زيادة الكتلة الحيوية تشير الى زيادة الكمية المنتجة من الانزيم وكذلك زيادة الفعالية الانزيمية والنوعية في الظروف القاعدية التي تراوحت فيها الارقام الهيدروجينية بين 7.5 – 8 . في حين انخفضت كلا من الكتلة الحيوية والفعالية الانزيمية عند الظروف الحامضية مما يشير الى قدرة العزلة على انتاج أرابينوزايزوميريز في الظروف القاعدية وهذا يتفق مع ما وجده Zakaria (2001) و Lee وآخرون (2004) الذين اشاروا الى ان اقصى انتاجية للانزيم تتحقق ما بين الرقم الهيدروجيني 7.5 و 8.5 ، كما اشار Manjasetty و Chance (2006) الى ان الرقم الهيدروجيني الامثل لوسط انتاج الانزيم من بكتريا *E . coli* هو 4 .7 في حين اشار Baek وآخرون (2004) الى ان الرقم الهيدروجيني الامثل لانتاج الانزيم من بكتريا *Geobacillus thermodenitrificans* هو 6.8 .

وعلى خلاف ذلك فقد اشار Lee وأخرون (2005) الى ان انتاج الانزيم من بكتريا *Alicyclobacillus acidocaldarius* يتطلب ان يكون الرقم الهيدروجيني حامضي في حدود 5 .



شكل 4 . تاثير مصدر النتروجين في انتاج انزيم ارابينوز ايزميريز من بكتريا *Bacillus strearothermophilus* HB4 وباستعمال الكليسرول بتركيز1.5% مصدرا للكاربون مع وجود الارابينوز بتركيز 0.15 % كمادة حاثة لانتاج الانزيم .

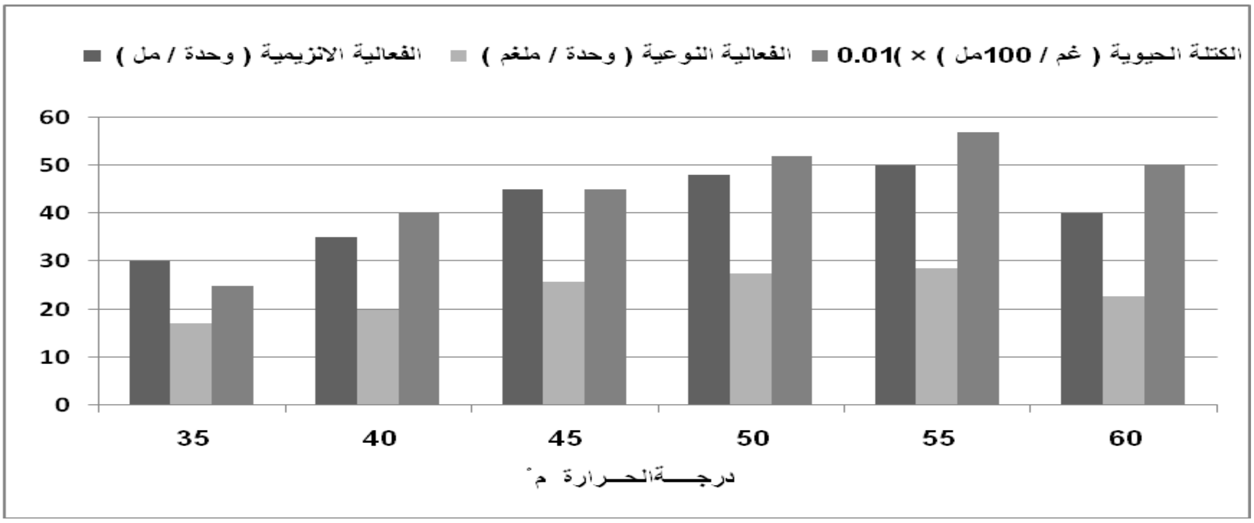


شكل 5 . تأثيرالرقم الهيدروجيني في انتاج انزيم لارابينوز ايزوميرريزمن بكتريا *Bacillus strearothermophilus* HB4 وباستعمال الكليسرول بتركيز1.5 % مصدرا للكاربون مع وجو الارابينوز بتركيز 0.15 % كمادة حاثة لانتاج الانزيم وخليط متساو من الكازين وخلاصة اللحم والخميرة بتركز1% مصدرا للنتروجين .

5- تحديد درجة الحرارة المثلى :

اظهرت النتائج الموضحة في الشكل (6) ان درجة الحرارة المثلى لانتاج الانزيم هي 55 مْ اذ بلغت الكتلة الحيوية 0.57 غم / 100مل في حين بلغت الفعالية الانزيمية 50 وحدة / مل والفعالية النوعية 28.5 ملغم / مل .وانخفضت الكتلة الحيوية والفعالية الانزيمية والفعالية النوعية عند درجات الحرارة 35- 45 مْ بسبب قد يعود الى كون هذا المدى من الدرجات الحرارية لايمثل الحد الامثل لنمو بكتريا *Bacillus stearothermophilus* والمستخدمة في هذه التجربة وبالتالي فان انخفاض معدل نموها يشير الى هبوط الكتلة الحيوبة وانخفاض الفعالية الانزيمية والفعالية النوعية . اما ارتفاع الحرارة الى 60 مْ فقد يؤثر هو الاخر على انخفاض معدلات النمو للبكتريا وبالتالي يؤثر على انتاج الانزيم وهبوط فعاليتة الانزيمية والنوعية. وقد تباينت النتائج التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة عن نتائج

بعض الباحثين الذين وجدوا ان الحرارة المثلى لانتاج انزيم أرابينوز ايزوميريز من البكتريا تتراوح بين 35 – 60 مْ ويعود هذا التباين الى اختلاف مصدر الانزيم (Yoon وآخرون ، 2003 ؛ Lee وآخرون ، 2004 ؛ Kim و Oh ، 2005) حيث لدرجة الحرارة تاثير واضح على معدلات النمو والايض للاحياء المجهرية المنتجة للانزيم .

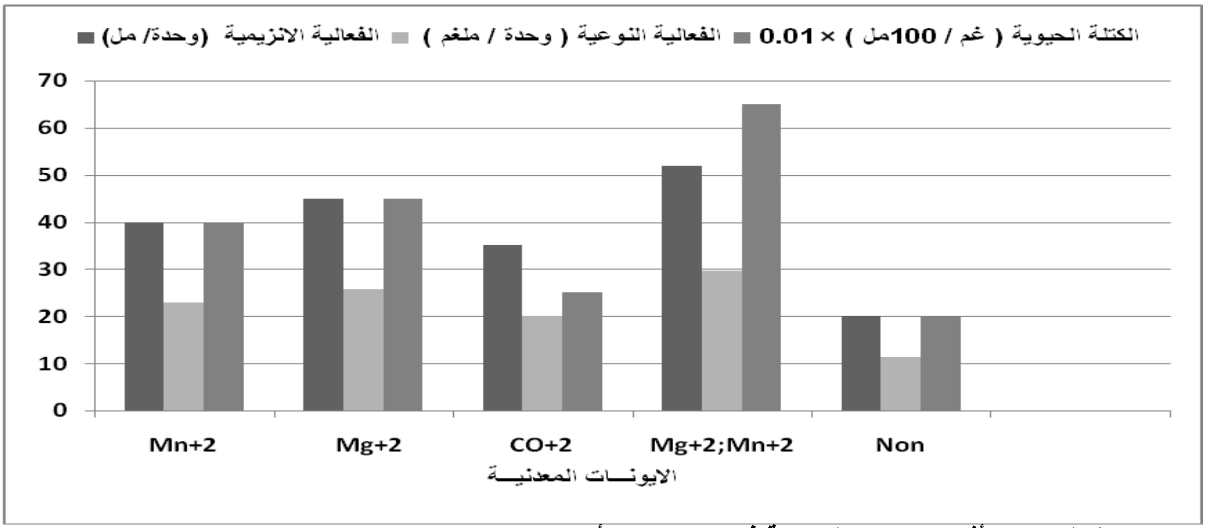


شكل 6. تأثير درجة الحرارة في انتاج انزيم أرابينوز ايزوميريز من بكتريا *Bacillus strearothermophilus* HB4 وباستعمال الكليسرول بتركيز1.5 % مصدرا للكاربون مع وجو الارابينوز بتركيز 0.15 % كمادة حاثة لانتاج الانزيم وخليط متساو من الكازين وخلاصة اللحم والخميرة بتركز1% مصدرا للنتروجين و بالرقم الهيدروجيني للوسط7.5

6- تحديد الأيونات المعدنية في انتاج الانزيم :

يلاحظ من الشكل (6) تفوق المعاملة التي استعمل فيها ايونات Mg^{+2} و Mn^{+2} معا وبتركيز0.15 % و 0.02 % على التوالي ، من حيث الكتلة الحيوية والفعالية الانزيمية والفعالية النوعية بالمقارنة مع بقية المعاملات . اذ بلغت الكتلة الحيوية بحدود 0.65 غم / 100مل والفعالية الانزيمية 45 وحدة/مل والفعالية النوعية 25.7 وحدة / ملغم . بصورة عامة كان للايونات المعدنية المختلفة تاثير أيجابي في زيادة الكتلة الحيوية والفعالية الانزيمية والفعالية النوعية مقارنة بمعاملة السيطرة التي لم يستخدم فيها اي من الايونات المعدنية المذكورة مما يشير الى ان انتاج الانزيم يتحفز بوجود هذه الايونات. ولكن وجد ان اضافة ايونات الكوبلت كان لها تاثير اقل في زيادة الكتلة الحيوية والفعالية الانزيمية والفعالية النوعية مقارنة ببقية المعاملات.

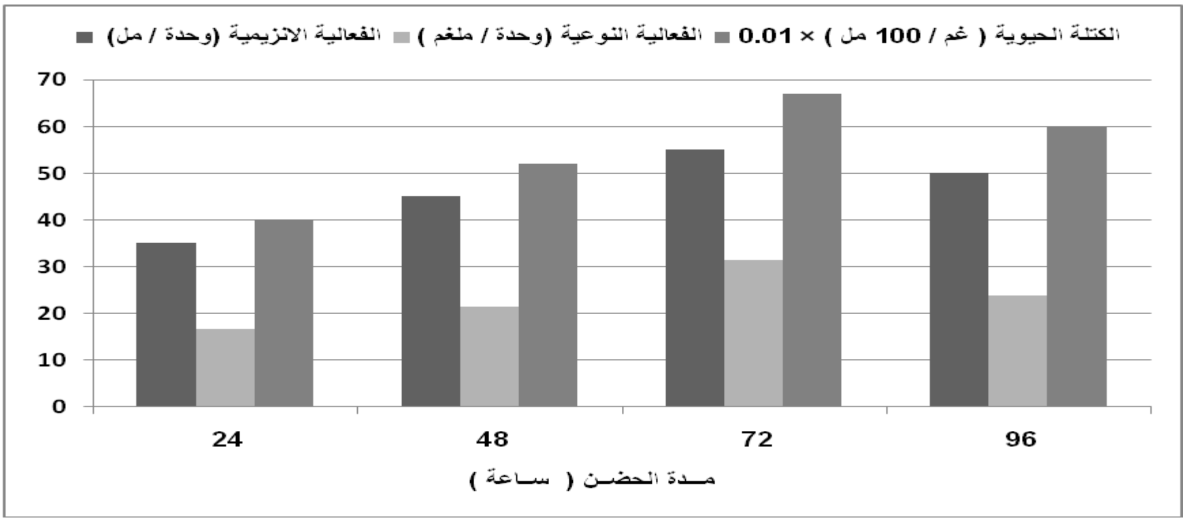
تتفق هذه النتائج مع ماوجده Zhang وآخرون (2007) إذ اشاروا الى ضرورة احتواء بيئة انتاج انزيم أرابينوز ايزوميريز من بكتريا *Lactobacillus plantarum* الى املاح المغنيسيوم واملاح المنغنيز بتركيز 0.2 % و 0.02 % على التوالي .في حين اشار Givry و Duchiron (2008) الى ان الانتاج من بكتريا *Lactobacillus bifermenans* يتطلب احتواء الوسط على مايقارب من 2.5mM من ايونات المنغنيز Mn^{+2} . بصورة عامة فان وجود الايونات المعدنية ثنائية التكافؤ يعدَ ضروريا لانتاج انزيم أرابينوز ايزوميريز (Lee وآخرون ، 2005 ؛ Rhimi و Bejar ، 2006) الا ان التباين في نوع الايونات المعدنية انما يعود الى نوع الكائن المجهري وظروف التنمية .



شكل 7 . تأثير الايونات المعدنية في انتاج انزيم أرابينوز ايزوميريز من بكتريا *Bacillus strearothermophilus* HB4 وباستعمال الكليسرول بتركيز 1.5 % مصدرا للكاربون بوجود الارابينوز بتركيز 0.15 % كمادة حاثة لانتاج الانزيم وخليط متساو من الكازين وخلاصة اللحم والخميرة بتركز 1% مصدرا للنتروجين و بالرقم الهيدروجيني للوسط7.5 ودرجة الحرارة 55 مْ .

7 - تحديد مدة الحضانة:

لوحظ ان الكتلة الحيوية تزداد مع زيادة مدة الحضانة (شكل 8) ، وبلغت اقصاها وهي 0.67 غم /100 مل بعد مرور 72 ساعة من الحضن وكانت تلك الزيادة متوافقة مع زيادة الفعالية الانزيمية والفعالية النوعية ، إذ ارتفعت الفعالية الانزيمية من 35 الى 55 وحدة / مل وارتفعت الفعالية النوعية من 20 الى 31.42 وحدة / ملغم بعد زيادة مدة الحضن من 24 الى 72 ساعة ، الا انه حدث انخفاض في الفعالية الانزيمية والفعالية النوعية بعد مرور 96 ساعة حيث بلغت الفعالية الانزيمية 50 وحدة / مل والفعالية النوعية 28.3 وحدة /ملغم ، وقد يعزى ذلك الى دخول البكتريا في مرحلة الثبوت العددي او الهلاك ولاسيما في المزارع المغلقة بسبب نفاذ مكونات الوسط او حدوث تغيرات في طبيعة الوسط الحامضية مما يؤثر سلباً على انتاج الانزيم وتحلل الخلايا ، وتحصل هذه الحالة كثيرا عندما يراد تحفيز انتاج الانزيمات وخصوصا الانزيمات الداخلية تحت الظروف المثالية لانتاجها (الخفاجي ، 1990) . وقد تباينت الدراسات في تحديد مدة الحضن اللازمة لانتاج انزيم أرابينوز ايزوميريز تبعا لاختلاف الكائن المجهري وظروف انتاج الانزيم خصوصا ما يتعلق منها بدرجة الحرارة والرقم الهيدروجيني الا نها بشكل عام تراوحت بين 24 – 72 ساعة (Roh وآخرون ،2000 و Givry و Duchiron ، 2008).



شكل 8 . تأثير مدة الحضن في انتاج انزيم أرابينوز ايزوميريز من بكتريا *Bacillus strearothermophilus* HB4 وباستعمال الكليسرول بتركيز1.5 % مصدرا للكاربون مع وجود الارابينوز بتركيز 0.15 % كمادة حاثة لانتاج الانزيم وخليط متساو من الكازين وخلاصة اللحم والخميرة بتركيز 1% مصدرا للنتروجين و بالرقم الهيدروجيني للوسط7.5 ودرجة الحرارة 55مْ ، وبوجود املاح المغنيسيوم والمنغنييز بتركيز 0.15 % و 0.02 % على التوالي .

المصـادر

الخفاجي ، زهرة محمود . 1990 . التقنية الحيوية – مطابع دار الحكمة للطباعة والنشر . جامعة بغداد جمهورية العراق .

الدليمي ، خلف صوفي داود . 1988. علم الاحياء المجهرية للاغذية ألجزء العملي . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . مطابع دار الكتب للطباعة والنشر . جامعة الموصل

Baek,D.H. , D.K. Oh , H.S. Sin and Y.J. Lee . 2004 . A new thermophile strain of *Geobacillus thermodenitificans* having L- arabinose isomerase activity for tagatose production *J. of Microbiol. Biotechnol*. 14 : 312-316 .

Beadle, J.R . , J.P Saunder and T.J. Wajad . 1992. Process for manufacturing tagatose *World patent* 92 / 12263.

Deok-Kun O.H , H. J Kim , S.A. Ryu ,H. J. Rho and P .Kim .2001 . Development of an immobilization method of L-arabinose isomerase for industrial production of tagatose , *Biotechnology letters* 23 :1859 – 1862.

Dische, Z. and E. Borenfreund .1951. A new spectrophotometric method for the detection and determination of keto sugars and trioses . *J. Biol. chem.* 192: 583-587 .

Fischer I. 1974 . Family I . Bacillaceae : *Bergey's manual of determinative bacteriology*. *8th ed.* 529- 551 .

Givry, S. and F. Duchiron .2008 .Optimization of culture medium and growth condition for production L-arabinose isomerase and D-xylose isomerase by *lactobacillus bifermentans*. *Microbiology*. 77 : 281-287

Harrigan,W.F.and E.M.Margaret . 1976 . Laboratory method in food and dairy microbiology . Academic press INC. New York . U.S.A.

Harry W. S. ,J. Paul and J. VanDemark . 1981 . *Microbes in Action: A Laboratory Manual Of Microbiology* , 3rd edition . W .H. Freeman and Company . San Francisco .

Izumori K. .2002. Bioproduction strategies for rare hexose sugars. *Natur wissenschaften* , 89:120-124.

Izumori K. and K. i . Tsuzak .1988 .Production of D- tagatose from D- galactitol by *Mycobactrium smegmatis* . *J. Ferment* . *Technol*. 66: 225-227.

Izumori K., T. Miyoshi , S. Tokuda and K. Yamabe .1984. Production of D- tagatose from ducitol by *Arthrobacter globiformis* . *Appl.Environ .Microbiol* . 46:1055 -1057.

Jorgensen f., O. Hansen and P. stougaard .2004 . Enzymatic conversion of D-galactose to D- tagatose: heterologous expression and characterization of a thermostable L- arabinose isomerase from *Thermoanaerobacter mathranii* . *Appl Microbiol Biotechnol*. 64:816 – 822.

Kim B.C ; H. S. Lee., E. Choe and Y. pyun .2002. Cloning , expression and characterization of L- arabinose isomerase from *Thermotoga neapolitana :* bioconversion of D-galactose to D- tagatose using the enzyme .FEMS *Microbiol lett.* 212:121-126

Kim H.J and D.K. Oh .2005. Purification and characterization of an L- arabinose isomerase from an isolated strain of *Geobacillus thermodenitrificans* producing D-tagatose . *J .Biotechnol*. 120:162- 173 .

Kim H.j ; P.u Prabh and J. Marimutha .2010. Characterization of an L- arabinose isomerase from *Bacillus subtilis* . *Appl Microbiol Biotechnol.* 85 : 1839-1847 .

Lee D.W , H.g.jan , E. choe , B. Kim , S. J. Lee and S.B. Kim .2004. Characterization of a thermostable L- arabinose(D- galactose) isomerase from the *Hyperthermophilic eubacterium thermotoga maritime* . *Appl Environ. Microbiol.* 70:1397- 1404 .

Lee S.J ,D. W. Lee , E. e Cho , Y. Hong , S.B Kim and Y . pyun .2005. Characterization of a themoacidophilic L- arabinose isomerase from *Alicyclobacillus acidocaldarius* : role of Lys-269 in pH optimum .*Appl Environ .Microbiol.* 71:7888- 7896.

Livesey, G . and J. Brown .1996 . D-tagatose is a bulk sweetener with zero energy determined in rats . *J. Nutr.* 126 :1601-1609 .

Lobanok , A.G. , L. I .Sapunova , Y.O. Dikhtievski , and I. O. Kazakevich .1998. Screening of Glucose isomerase producing microorganisk . *World J . Microbiolo.l. and Biotechnol.* 14 : 259 –262.

Lowery, O.H. ,N. J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall . 1951 . Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*. 193: 265- 275.

Lu.Y. and Levin G.V. 2002.Removel and prevention of dental plaque with D- tagatose .*Int.J. Cosmet. Sci.* 24 :225- 234.

Maharani C. (1970) . Induction and repression of L- arabinose isomerase in Bacteriophage- infected *Salmonella typhimurium* . *Journal of Virology*. 541- 547 .

Manjasetty B. and M. Chance .2006. Crystal structure of *Escherichia coli* L-arabinose isomerase (ECAI) , the putative target of biological tagatose production . *J . Mol. Biol* . 360 : 297 – 309.

Marzur A. W. 1989. Functional sugar subistitutes with reduced calories . *European patent* 341062.

Muniruzzaman S. , H . Tokunaga and K . Izumori .1994 . Isolation of *Enterobacter agglomerans* strain 221 e from soil , a potent D- tagatose producer from galactitol. *J. ferment. Bioeng*. 78:145-148

Patrick, J.W. and N. Lee . 1968 . Purification and properties of an L-arabinose isomerase from *Escherichia coli. J. Biol. Chem* . 243:4312-4318.

Ponnandy, P. , M.K. Tiwari , J.Maramuthu and G. paramasamy .2008. Cloning and characterization of a novel L- arabinose isomerase from *Bacillus licheniformis* . *Appl Microbiol. Biotechnol.* 81 :283 – 290.

Rhimi , M . and S. Bejar .2006. Cloning , purification and biochemical characterization of metallic – ions independent and thermoactive L-arabinose isomerase from the *Bacillus stearothermophilus* US100 strain. *Biochim* . *Biophys. Acta* . 1760: 191-199.

Roh H. J. , S.H.Yoon and S.H.Kim .2000 . Preparation of L-arabinose isomerase originated from *Escherichia coli* as a biocatalyst for D-tagatose production *Biotechnology letters* . 22:197- 199 .

Yoon ,S.H , P.Kim and D. K.Oh .2003. Properties of L- arabinose isomerase from *Escherichia coil* as biocatalyst for tagatose production . *World J . Microbiol.* , 19:47-51 .

Zakaria A. 2001 . Production of natural and rare pentoses using microoraganism and their enzymes. *Electronic J. of Biotechnol* . 4 : 103 -111.

Zehener L.R. .1988. D- tagatose as a low- calorie carbohydrate sugar and bulking agent . *European patent* 257626.

Zehner, L.R , G. Levin , J. Saunders and J. Beadle .1995 . D- tagatose as anti – hyperglycemic agent . *US pat* 5,447, 971 .

Zhang H. ; J iang B. and P. Beilei (2007) .Purification and characterization of L-arabinose isomerase from *Lactobacillus Plantarum* producing D-tagatose , *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23:641- 646.

.OPTIMIZATION FOR L- ARABINOSE ISOMERASE PRODUCTION FROM LOCAL ISOLATE OF *Bacillus stearothermophilus* HB4.

Hameed Abood Jabur
Dept. of Food Sci. & Biotech- Coll. Of Agri.- Univ. of Baghdad.
E. mail : dr_hameedm59@yahoo.com

ABSTRACT

In this study twelve of purred local isolate from *Bacillus stearo thermophilus* were obtained among 40 isolates from different sources of Iraqi soil. They were subjected to primary and secondary screening to select the isolate which produce the highest level of L- arabinose isomerase . It was found that the isolate B4 was the highest producer of the enzyme , with enzyme activity of 35 unit /ml. According to morphological and biochemical tests this isolate was identified as *Bacillus stearothermophilus* and designated as HB4 . The optimum conditions for production of L- arabinose isomerase from *Bacillus stearothermophilus* HB4 by submerged culture were achieved on broth medium containing 1.5% glycerol as carbon source and 0.15 % of L- arabinose as inducer and 1 % of mixture of casien, beef extract and yeast extract with equal quantity of each them as nitrogen source with 0. 15 % of magnesium sulfate and 0.02 % of manganese sulfate at pH of 7.5 after 72 hours of incubation at 55 C^{0} . Under these conditions The enzyme activity was 55 U/ ml with increasing about 150 % comparing with same isolate before optimization.

Key words :- L- arabinose isomerase ; *Bacillus stearothermophilus* HB4