الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة جيجل
كلية العلوم الدقيقة وعلوم الطبيعة والحياة
قسم البيولوجيا الجزيئية والخلوية

جامعة محمد الصديق بن يحيى
كلية علوم الطبيعة و الحياة
المكتبة
رقم الجرد : 1462

مذكرة تخرج

لنيل شهادة الدراسات العليا (D.E.S) في البيولوجيا
تخصص: ميكروبيولوجيا

الموضوع

إنزيمات الدكسترانيز الميكروبية : مصادرها،إنتاجها و تطبيقاتها

من إعداد الطلبة:
- مسبوط بلقاسم
- قاسمي سمية
- فنير حسيبة

لجنة المناقشة:
- د. إيدوي الطيب: مناقشا
- د. صيفور محمد: مشرفا

مكتبة الكلية

دفـــــعة 2009

شكر و تقدير

لنا الشرف العظيم و العرفان الكبير بعد أن أنهينا بحثنا بالتوفيق من الله تعالى أن نتقدم بجزيل الشكر و خالص الامتنان إلى الأستاذ المشرف " صيفور محمد " لتفضله بقبول الإشراف على بحثنا و لما بذله من جهد جهيد و توجيه رشيد وكذا نتقدم بالشكر الجزيل

إلى كل من :

- أساتذة كلية العلوم .

إلى كل من مد لنا يد المساعدة لإنجاز هذه المذكرة من قريب أو بعيد.

المحتويات

الموضوع	رقم الصفحة
المقدمة	01
الفصل الأول: إنزيم الدكسترانيز: تعريفه ومصادره	02
I-1- تعريف إنزيم الدكسترانيز	02
I-2- آلية عمل إنزيم الدكسترانيز	02
I-3- مصدر إنزيم الدكسترانيز	03
I-3-1- مصادر إنزيم التكسير الداخلي	03
I-3-2- مصادر إنزيم التكسير الخارجي	04
I-4- تصنيف إنزيم الدكسترانيز	04
I-5- الكشف والتحديد	06
الفصل الثاني: إنتاج إنزيم الدكسترانيز	08
II-1- العوامل التي تؤثر على إنتاج إنزيم الدكسترانيز	08
II-1-1- المصدر الكاربوني	08
II-1-2- المصدر النيتروجيني	09
II-1-3- تأثير بعض المواد على إنتاجية الإنزيم	09
II-1-4- الأس الهيدروجيني	10
II-1-5- درجة الحرارة	12
II-1-6- فترة الحضن	12
الفصل الثالث: دراسة خصائص وتنقية إنزيم الدكسترانيز	14
III-1- طرق تنقية إنزيم الدكسترانيز	14
III-2- خصائص إنزيم الدكسترانيز	15
III-2-1- تعيين الوزن الجزيئي لإنزيم الدكسترانيز	15
III-2-2- الخصائص الفزيائية لإنزيم الدكسترانيز	15
III-2-3- الخصائص الحركية لإنزيم الدكسترانيز	16
III-2-4- الثباتية الإنزيمية للدكسترانيز	17
III-2-4-1- تأثير الأس الهيدروجيني على ثباتية الإنزيم	17
III-2-4-2- تأثير درجة الحرارة على ثباتية الإنزيم	17
III-2-5- تخصص إنزيم الدكسترانيز	17
III-2-6- تأثير بعض المواد على فعالية الإنزيم	18
الفصل الرابع: الإستخدمات التطبيقية لإنزيم الدكسترانيز	21
IV-1- الإستخدمات الطبية	21
IV-2- الإستخدمات الصناعية	21
IV-3- إنزيم الدكسترانيز والتقنيات الجزيئية	22
الخاتمة	23
قائمة المراجع	24

I- المصطلحات بالعربية

Aspartic Acid	حمض الأسبرتيك
Actinomycete	البكتريا الخيطية
Polyacrilamid gel	هلام متعدد الأكريلاميد
Acetic Acid	حمض الأستيك
Amplification	تضخيم
Antibiotic	المضاد الحيوي
Bleu dextrane agarose	الدكستران الأزرق-أغاروز
Clonage	إستنساخ
Carbohydrate	الكاربوهيدرات
Cyclodextran	الدكستران الحلقي
Crystallization	البلورة
Denaturation	تشوه
Dextran	الدكستران
Dextrine	الدكسترين
Dextranase C	الدكسترانيزC
Dextranase D	الدكسترانيز D
Endodextranase	دكسترانيز التكسير الداخلي
Exodextranase	دكسترانيز التكسير الخارجي
Endocarditis	إلتهاب شغاف القلب
Ethanol	الإيثانول
Glucan	جليكان
Glycocalyx	جليكوكاليكس
Glucose polymers	متعدد الجلوكوز
Hydrolase	إنزيمات التحليل الماني
Homopolymer	بولمبير متجانس
Isomaltosccharide	إيزومالتوسكريد
Isomaltodextrine	إيزومالتودكسترين
Lysozyme	الليزوزيم
Monomeric proteine	بروتين أحادي
Moulds	الأعفان
2Mercapto ethanol	2 ميركابتو إيثانول
Oligosacconides	السكريات المحدودة
Phylogenetic Analysis	التحليل بالشجرة الوراثية
Procecs syrups	المشروبات المعالجة
Sephadex	السيفادكس
Trypsine	التربسين
Thermophyle	محبة للحرارة
Thiol	ثيول

II- المختصرات

CMS : Carboxymethyle- sepharose
DEAE : Diethylaminoethyl
DTT : Dithiotheitol
EDTA : Ethylene diaminetetraacetic acid
HPLC : High Performance Liquide Chnomatography
IM : Isomaltose
Km : Michaelis Constant
PAGE : polyacylemide gel electro-phoresis
PCR : polymerase chain reaction
SSF : Solid State Fermentation
SDS : Sodium Dodecyl Sulghate
TSA : tryptic soy agar

III- قائمة الجداول:

الرقم	العنوان	الصفحة
الجدول(1)	بعض المصادر الميكروبية لإنزيم الدكسترانيز	05
الجدول(2)	خصائص إنزيم الدكسترانيز المنتج من بعض الأنواع الميكروبية	20

IV- قائمة الأشكال:

الرقم	العنوان	رقم الصفحة
الشكل01	عمل إنزيم الدكسترانيز على الدكستران وإيزومالتودكسترين ومختلف الإيزومالتودكسترين	03
الشكل02	الصفيحة الزجاجية للسيفادكس بعد الكشف عن الفعالية الإنزيمية لإنزيم الدكسترانيز	07
الشكل03	ملاحظة إنزيم الدكسترانيز المنتج من مستعمرات في وسط الأجار غني بالدكستران الأزرق	07
الشكل 04	تأثير الأس الهيدروجيني على إنتاج إنزيم الدكسترانيز النتج من بكتيريا *Streptomyces* sp AM باستخدام تخمرات الحالة الصلبة .	11
الشكل 05	تأثير درجة الحرارة على إنتاج إنزيم الدكسترانيز النتج من بكتيريا *Streptomyces* sp AM باستخدام تخمرات الحالة الصلبة	13

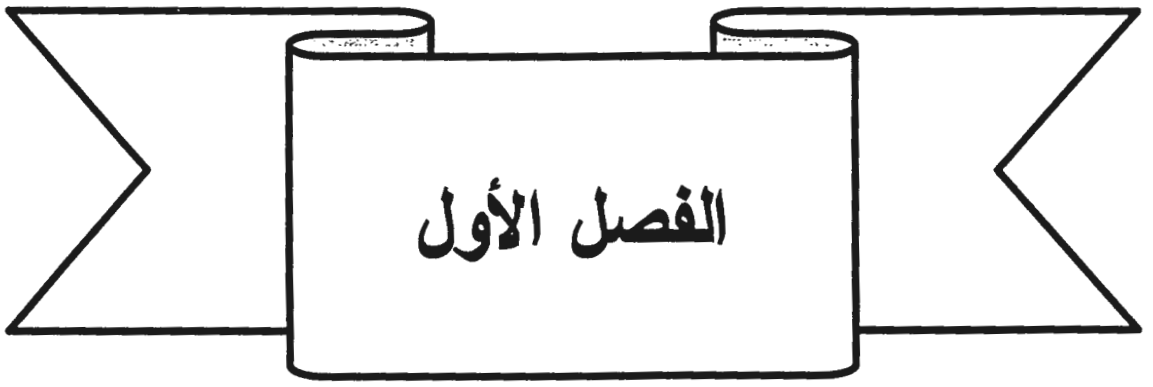
المقدمة

المقدمـــــة:

الدكستران عبارة عن وحدات جلوكوز(Glucose polymer) ترتبط أساسا بسلاسل جلايكوزيدية α(1→6) الناتجة من السكروز بواسطة إنزيم الدكستران سكريز (EC 2.4.1.5) (Dextransucrase)، ويشكل عائقا كبيرا في الصناعات السكرية (Mariscal and Munguia,1991)، كما أنه يساهم في تشكيل الصفيحة الجرثومية مؤديا بذلك إلى تسوس الأسنان (Staat et al.,1973). لذا توجهت إهتمامات الكثير من الباحثين إلى دراسة إنزيم الدكسترانيز(α -1.6-glucanohydrolase EC 3.2.1.11) نظرا لأهميته الصناعية والطبية المتزايدتين حيث يعد من الإنزيمات المحللة للدكستران وذلك بتحليله للرابطة الجلايكوزيدية α(1→6) (Szczodrak et al.,1994). وقد صنف حسب طريقة عمله إلى إنزيمات التكسير الداخلي (Endodextranase) وإنزيمات التكسير الخارجي (Exbdextaranase) (Abdel-Aziz et al.,2007). ومنذ الأبحاث الاولى التي أجريت على إنزيم الدكسترانيز المنتج من بكتريا *Cellvibrio fulva* سنة 1940م تم إنجاز أكثر من 1500 بحث علمي وأكثر من 100 اكتشاف حول الإنزيمات المحللة للدكستران الموجودة في عدد من المجموعات الميكروبية.

تعد الفطريات من أهم المصادر التجارية للدكسترانيز بالإضافة إلى الكائنات الراقية التي تملك أيضا هذه الإنزيمات (Khalikova et al.,2005)، فقد تم إنتاجه من الفطريات مثل *Penicillium* sp. وكذلك من بكتيريا *Streptococcus* sp. .

ونتطرق في بحثنا إلى إنزيم الدكسترانيز الميكروبي ومصادره وطرق إنتاجه وتنقيته وكذا بعض تطبيقاته.



إنزيم الدكسترانيز تعريفه ومصادره

I- إنزيم الدكسترانيز: تعريفه ومصادره

I-1- تعريف إنزيم الدكسترانيز:

الدكسترانيز هو أحد إنزيمات التحلل المائي (Hydrolase) له القابلية على تحليل الرابطة الجلايكوزيدية α(1→6) في متعدد السكريات الدكستران (Dextran)، ولقد حاز إنزيم الدكسترانيز على التسمية النظامية له طبقا للجنة الإنزيمات التابعة للإتحاد العالمي للكيمياء الحيوية (EC: 1,6 α-glucan 6-glucanohydrolase 3.2.1.11) (عليلي،2001)، وعرف Khalikova وجماعته (2005) إنزيم الدكسترانيز بأنه يشكل من مجموعة مختلفة من carbohydrases وTransferases. كما عرفه أيضا Tamura وجماعته (2007) بأنه عبارة عن إنزيم يفكك الرابطة α(1→6) في الجليكان (glucan) ويمنع بذلك تشكل الجليكان غير القابل للذوبان في الماء، هذا الإنزيم يكبح إلتصاق البكتيريا المسببة لتسوس الأسنان ويمنع تسوس الأسنان عند الفئران. يقوم إنزيم الدكسترانيز (α1→6-glucanohydrolase) بإماهة الرابطة الجلايكوزيدية α(1→6) في جزيئة الدكستران، هذا الإنزيم يقطع الرابطة محررا جزيئات إيزومالتوسكريد (Isomaltosaccharides) قصيرة (Larsson et al.,2003) .

لقد إختلفت الدراسات حول تركيب إنزيم الدكسترانيز فقد أشارChaiet وجماعته عام 1970م أن هذا الإنزيم ذو وزن جزيئي يقدر بـ 42 كيلو دالتون عند *Actinomycetes* ، ويتألف من 343 حامضا أمينيا بنسبة عالية من حامض الأسبارتيك (Aspartic Acid) والسيرين (عليلي،2001). كما أن Arnold وجماعته (1998) بعدما أجروا تجارب على فطر *Sporothrix schenkii* توصلوا إلى أن الإنزيم المفرز من هذا الفطر عبارة عن بروتين أحادي (monomeric proteine) ذو وزن جزيئي 79 كيلودالتون. وقد توصل Koenig وDay (1988) أن إنزيم الدكسترانيز المنتج من *Lipomyces starkeyi* من البروتينات السكرية لاحتوائه على نسبة 8% من الكاربوهيدرات (Carbohydrates) المرتبطة بالجزء البروتيني للإنزيم.

I-2-آلية عمل إنزيم الدكسترانيز:

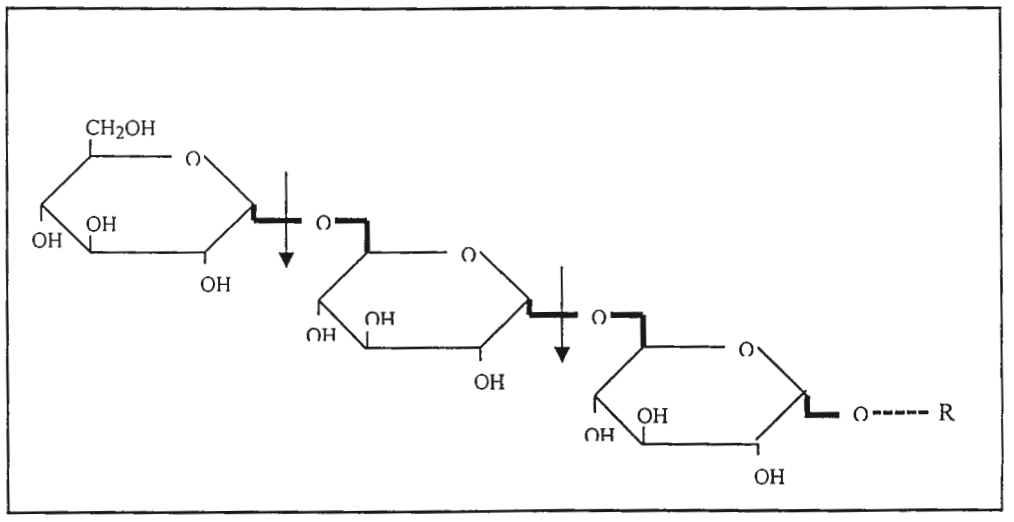
إقترح Bailey وClarke عام 1959م آلية عمل إنزيم الدكسترانيز المنتج من بكتيريا *Lactobacillus bifidus* حيث يعمل الإنزيم على كسر الروابط الجلايكوزيدية α(1→6) في جزيئة الدكستران بصورة عشوائية محررا بذلك مزيجا من الأيزومالتوتريوز (IM3) وأيزومالتوتتروز(IM4) وأيزومالتوبنتوز(IM5) وسكريات متعددة (عليلي،2001).

وصف Bourne وجماعته (1962) عمل الدكسترانيز بتحليله للدكستران كثير التفرع وأيزومالتودكسترين (Isomaltodextrine) والأيزومالتودكسترين المحور الذي يحتوي على مالا يقل عن ثلاث روابط جلايكوزيدية، حيث يبدأ بتحليل هذه المركبات عند الروابط α(1→6) والنهايات الطرفية كما هو موضح في الشكل(1) محررا بذلك الجلوكوز والأيزومالتوتتروز مع نسبة كبيرة من الأيزومالتوز.

ويتضمن عمل إنزيم الدكسترانيز المنتج من بكتيريا *Lactobacillus bifidus* مرحلتين وهما:

1- يقوم الإنزيم الخارج الخلوي بإختزال متعدد السكريات إلى دكسترين(Dextrine).

2- يقوم إنزيم الدكسترانيز بتحليل الدكسترين مائيا إلى جلوكوز (عليلي،2001).



الشكل(1): عمل إنزيم الدكسترانيز على الدكستران وأيزومالتو دكسترين ومختلف الأيزومالتو دكسترين (Bourne et al.,1962).

—— : الرابطة الجلايكوزيدية α(1→6)

--- : الرابطة α

R : جلوكوز، فركتوز، سوربيتول أو مجموعة ميثيل

←— : النقطة الرئيسية للإماهة .

I-3- مصدر إنزيم الدكسترانيز:

تنتج الإنزيمات المستخدمة تجاريا من أنسجة النباتات والحيوانات ومن بعض الكائنات الحية. إن إنزيم الدكسترانيز الذي يحلل الروابط الجلايكوزيدية α(1→6) السائدة في الدكستران والبوليمير المتجانس (Homopolymer) المكون من الجلوكوز يكون ذو مصدر ميكروبي وفطري (Finnegan et al.,2004)، وتتمثل المصادر الصناعية لهذا الإنزيم في أنواع *Penicillium, Chaetomium* وينتج أيضا من خميرة *Lipomyces starkeyi* (Koenig and day, 1988).

يوجد إنزيم الدكسترانيز في مختلف المجموعات الميكروبية، في أنسجة الإنسان، الحيوان وفي الحشرات (Khalikova et al., 2005) ، وتم الحصول عليه بأنواعه من مصادر مختلفة، حيث ينتج دكسترانيز التكسير الخارجي غالبا من المصادر الحيوانية ومثال ذاك أمعاء الخنزير، أنسجة الثدييات، والأعفان (moulds) ،أما دكسترانيز التكسير الداخلي فينتج عادة من المصادر البكتيرية (Bourne et al.,1962) .

I-3-1- مصادر إنزيم التكسير الداخلي:

هناك إنزيمات التكسير الداخلي ذات المصدر الفطري مثل: *Penicillium* (*Penicillium luteum* , *Penicillium funiculosum* , *Penicillium lilacinum* , *Penicillium notatum* ,

Penicillium acualeatum) والتي تحلل الدكسترات الحلقي (Cyclo Dextran) إلى الأيوزمالتوز(IM) والجلوكوز، حيث وجد بأن الإنزيمات التي تفرز خارج الخلية ذات المصدر الفطري لها فعالية إنزيمية عالية مقارنة مع الإنزيمات ذات المصدر البكتيري، كما ينتج من فطريات أخرى مثل: *Sporothrix schenkii, Fusarium sp* *Aspergillus carneus* . إنزيمات التكسير الداخلي ذات المصدر البكتيري مثل: *Pseudomonas, Bacillus,* *Bacteroides, Streptococcus, Brevibacterium.* . إنزيمات التكسير الداخلي المنتجة من الخمائر مثل: *Lipomyces starkeyi* (Khalikova et al., 2005).

I-3-2- مصادر إنزيم التكسير الخارجي :

إنزيمات التكسير الخارجي المنتجة من الخمائر مثل : *Lipomyces lipofer* (Khalikova et al.,2005) ويمثل الجدول (1) بعض مصادر إنتاج إنزيم الدكسترانيز.

I -4- تصنيف إنزيم الدكسترانيز:

إن الإنزيمات المحللة للدكسترات تتشكل من عدة مجموعات مختلفة من Carbohydrases و Transferases هذه الإنزيمات تصنف إلى إنزيمات التكسير الداخلي والتكسير الخارجي وهذا حسب طريقة عملها وتسمى عادة بإنزيمات الدكسترانيز وأيضا على أساس نوع التفاعلات المحفزة ونوعية النواتج . هذه الإنزيمات صنفت إلى عدة أنواع منها:

, Glucan-1,6- α-D-glucosidase (EC 3.2.1.70)

, Dextranase(EC 3.2.1.11)

, Glucan-1,.6- α-isomaltosidase (EC 3.2.1.94)

, Dextran-1,.6-isomaltotriosidase(EC 3.2.1.95)

وفروع (EC 3.2.1.115) Dextran exo-1,2- α.glucosidase ,

. (CITase) Cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase

كما يوجد (EC 3.2.1.20) α.glucosidase الذي يحفز تفاعلات مشابهة لتفاعلات Exodextranase (EC 3.2.1.70) (Khalikova et al., 2005). وقد صنف هذا الإنزيم من قبل Johnson عام 1991م إلى نوعين هما:

أ- دكستراتيز التكسير الداخلي: Endodextranase (EC 3.2.1.11) .

ب- دكستراتيز التكسير الخارجي:Exodextranase (EC 3.2.1.70) .

إذ عرف دكسترانيز التكسير الداخلي بكونه يحلل مادة التفاعل (الدكسترات) مائيا إلى عدة قطع من السكريات المحدودة (Oligosaccharides) بأطوال مختلفة وبصورة عشوائية من داخل الدكسترات فيما يحلل إنزيم التكسير الخارجي الدكسترات مائيا إلى إيزومالتوز (Isomaltose IM) بدءا بالنهاية غير المختزلة (عليلي،2001). هناك تصنيف آخر لإنزيمات الدكسترانيز يعتمد أساسا على التشابه في سلسلة الأحماض الآمنية المشكلة لها، حيث تنقسم إلى glycosylhydrolase و glycosyltransferase. (Aoki and Sakano,1997,

Khalikova et al., 2005). وقد صنف إنزيم الدكسترانيز المنتج من بكتيريا *Arthrobacter* sp. والفطر *Penicillium minioluteum* ضمن عائلة glycosylhydrolases في العائلة 49 وذلك على أساس تشابههما في سلسلة الأحماض الأمينية المشكلة لهما (Henrissat and Bairoch, 1996) .

الجدول(1): بعض المصادر الميكروبية المنتجة لإنزيم الداكسترانيز

مصادر الإنتاج	نواتج التحلل	نوع الدكسترانيز	المراجع
أ- الفطريات			
Penicillium sp.	جلوكوز، إيزومالتوزIM إيزومالتوتريوزIM_3	تكسير داخلي	Bourne et al.,1962
Lipomyces starkeyi	—	—	Koenig and Day,1988
Sporothrix schenckii	جلوكوز،IM	—	Arnod et al.,1998
Penicillium minioluteum	—	—	Larsson et al., 2003
Chatomium gracile	جلوكوز، IM	تكسير داخلي	Khalikova et al., 2005
Aspergillus globiformis	IM	تكسير خارجي	Khalikova et al., 2005
ب-البكتيريا			
Acetobacter capsulatum	—	—	Suzuki et al.,1999
Paenibacillus	—	تكسير داخلي	Finnegan et al., 2004
Streptococcus criceti	—	—	Tamura et al., 2007
جـ-البكتيريا الخيطية *(Actinomycetes)*			
Actinomyces sp.	سكريات متعددة	تكسير داخلي	Staat et al.,1973
Actinomyces israelii	—	تكسير داخلي	Schachtele al.,1975
Streptomyces sp. AM	—	—	عليلي،2001

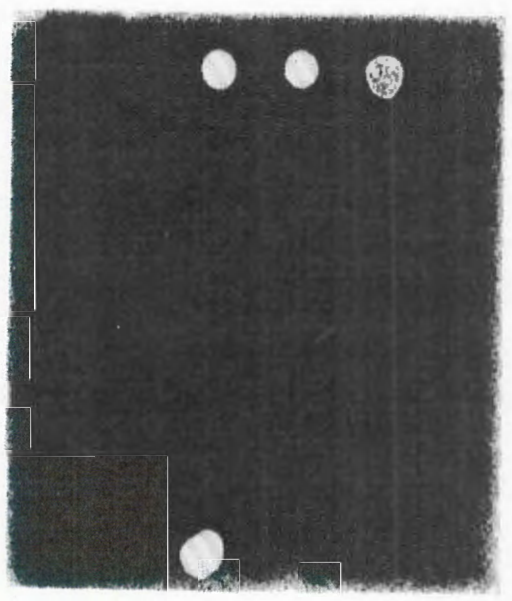
—: غير محدد.

I-5- الكشف والتحديد:

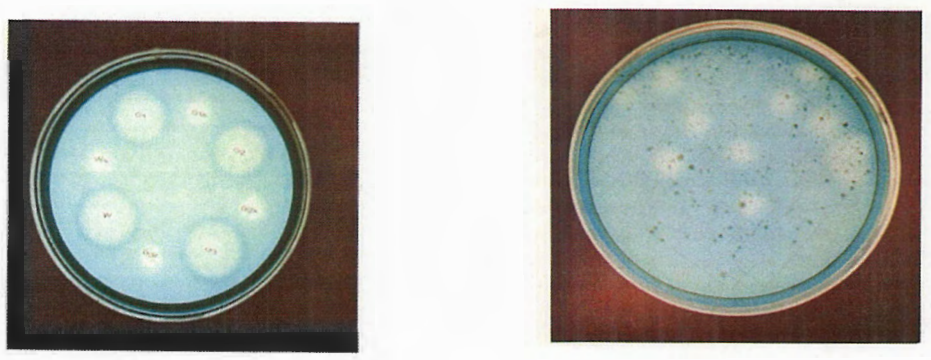
توجد طريقة كشف بسيطة تم تطويرها من أجل تسهيل الكشف عن الدكسترانيز(عند التجزئة بالكروماتوغرافيا السائلة أو في وسط زرعي بعد الزرع لعزلات ميكروبية مختلفة). ترتكز هذه الطريقة على مبدأ التحليل لطبقة رقيقة جدا من السيفادكس (cross-linked dextran) بواسطة إنزيم الدكسترانيز. كما وجد أنه يمكن تمييز أجزاء إنزيم الدكسترانيز بوضوح في مدة زمنية قصيرة حيث تمت التجربة وتم التوصل من خلالها إلى كشف وتحديد إنزيم الدكسترانيز المنتج من فطر. *Penicillium* sp في عينة سائلة وذلك بإستخدام السيفادكس G-200 ومزيج من إنزيم الدكسترانيز(α-1.6-glucan 6-glucanohydrolase EC3.4.21.4) والتربسين (trypsine) والليزوزيم (lysozyme) والنتيجة التي تم التوصل إليها هي إماهة طبقة السيفادكس التي لوحظت على شكل بقع توافق أجزاء إنزيم الدكسترانيز (Safarik, 1990) .

إستعمل Staat وجماعته (1973) محاليل مخففة لصفرة أسنان الإنسان حيث زرعت في وسط (Tryptic soy agar TSA) والذي يحتوي على 0.5% من الدكسترات الأزرق 2000 ، 0.5 % من الدكسترات T40، 0.2 % جلوكوز و 0.1 % من مستخلص الخميرة وبعد حضنها في غياب الأكسجين وجدوا أن إنزيم الدكسترانيز المنتج من الكائنات المجهرية يتم التعرف عليه بسهولة من خلال زوال لون المنطقة المحيطة بالمستعمرة كما هو موضح في الشكل (3)، وأن الكشف عن الدكسترانيز يتم بواسطة ترسيب الدكسترات مع الإيثانول ethanol . إن المناطق التي لا يترسب فيها الديكسترات توافق المناطق التي زال فيها اللون وهذا يشير إلى أن إرجاع. اللون دليل على عمل إنزيم الدكسترانيز. وأظهرت النتائج التي توصل إليها Mencier بأن الكائنات المجهرية المتواجدة في التربة التي تنتج الإنزيم الخارج خلوي والذي له القدرة على إماهة الدكسترات في وسط الأجار يسبب زوال لون الوسط الذي يحتوي على الدكسترات الأزرق. تمكننا هذه التغيرات من عزل إنزيم الدكسترانيز المنتج من الكائنات المجهرية المتواجدة في الصفيحة الجرثومية (Staat et al.,1973).

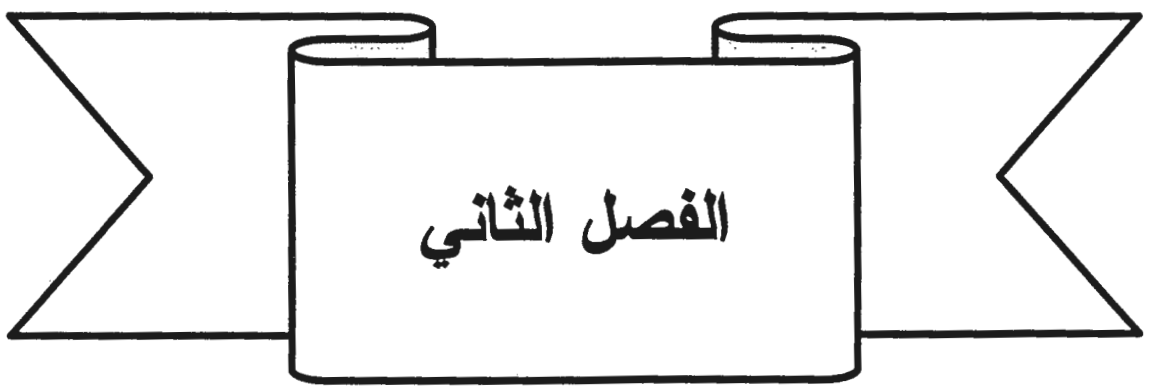
لغرض تحديد العزلة الأكثر إنتاجا لإنزيم الدكسترانيز قامت عليلي (2001) بإنتخاب أربع عزلات بكتيرية والتي زال اللون حول مستعمراتها على الوسط الصلب المحتوي على الدكسترات الأزرق، حيث تميزت العزلة AM بإنتاجها العالي للإنزيم مقارنة ببقية العزلات الأخرى، وعلى ضوء هذه النتائج إنتخبت العزلة *Streptomyces* sp. AM لقدرتها على الإنتاج العالي للإنزيم على الوسط الصلب.



الشكل (2): الصفيحة الزجاجية للسيفادكس بعد الكشف عن الفعالية الإنزيمية لإنزيم الدكسترانيز الذي يوجد في الأجزاء 5.4.3 (Safarik, 1990).



الشكل(03): ملاحظة إنزيم الدكسترانيز المنتج من مستعمرات في وسط الأجارالغني بالدكستران الأزرق (Staat et al., 1973).



الفصل الثاني

إنتاج إنزيم الدكسترانيز

II-إنتاج إنزيم الدكسترانيز:

أنتج إنزيم الدكسترانيز من العديد من المصادر الميكروبية البكتيرية والفطرية، وقد أختبرت العديد من البيئات للحصول على 23 دكستيرانيز مختلفة من عزلات فطرية مختلفة ولقد حددت العزلات الأكثر إنتاجا للإنزيم مثل *Penicillium purpurogenum* و *Paecilomyces lilacinus* ولوحظ أن الإنزيم ذو فعالية مثالية عند الأس الهيدروجيني (pH) 5.4 ودرجة الحرارة 65 درجة مئوية. وينتج إنزيم الدكسترانيز المتوفر في شكل تجاري بشكل رئيسي من فطر *Chaetomium gracile* كما أن العزلات البكتيرية تعد أيضا من المصادر المنتجة لإنزيم الدكسترانيز مثل *Arthrobacter globiformis* ، *Flavobacterium*، *Pseudomonas* وأنواع *Bacteroides* (Mariscal and Munguia, 1991). وتعتبر خميرة *Lipomyces starkeyi* من أهم المصادر المنتجة لإنزيم التكسير الداخلي بالرغم من أن هذا الأخير يتميز بفعالية إنزيمية ضعيفة (Koenig and Day , 1988) .

وجد أن العزلتين *Penicillium lilacinum* و *Penicillium funiculosum* تنموان بسرعة في وسط يحتوي على السكروز، وقد لوحظ أن الفعالية الإنزيمية ظهرت بسرعة في هذا الوسط، وبعد إعادة الزرع في وسط يحتوي على الدكستران لوحظ ظهور فعالية إنزيمية أعلى وذلك بعد ترشيح الوسط الزرعي، هذه الفعالية بلغت أقصاها بعد الحضن لمدة خمسة أيام وبعد إعادة زرعها لأربع مرات أخرى لوحظ ثبوتها بعد ذلك. من ناحية أخرى لوحظ أن الفعالية الإنزيمية تنخفض إلى القيمة الأصلية عند إعادة زرعها في وسط يحتوي على السكروز (Bourne et al .,1962).

II-1- العوامل التي تؤثر على إنتاج إنزيم الدكسترانيز:

إن إختيار الوسط الغذائي المناسب عامل مهم كونه يمثل البيئة الغنية بالمصادر المغذية لنمو الأحياء المجهرية التي منها تستمد الطاقة للقيام بوظائفها الحيوية ولهذا وجب إختبار الوسط الملائم لإنتاج الإنزيم، وقد درست العديد من العوامل المختلفة بنوعيتها وكميتها لمعرفة مدى تأثيرها على إنتاج إنزيم الدكسترانيز وشملت هذه العوامل مايلي:

II-1-1- المصدر الكاربوني:

بدراسة العلاقة بين تركيز الدكستران وكمية الإنزيم المنتج من طرف *Penicillium notatum* وجد أن الإنتاجية القصوى للإنزيم تكون في 100 مل من الوسط المحتوي على 1.5 % دكستران، 0.2% لكل من الملح المعدني ومستخلص الخميرة حيث تمثل أحسن الظروف التي تنتج من 14-16 وحدة إنزيمية لكل 1مل وذلك بعد أربعة أيام من الحضن، كما وجد بأن إنتاج إنزيم الدكسترانيز بكمية معتبرة من فطر *P. notatum* تكون معتبرة عندما ينمى هذا الفطر في وسط قاعدي يحتوي على مختلف الكاربوهيدرات (Carbohydrate) بحيث تكون مصدر وحيد للكاربون. كما وجد بأن فعالية تحليل الدكستران تكون صغيرة عندما يكون مصدر الكاربون هو الجلوكوز والمالتوز وأن الكاربوهيدرات الأخرى ليس لها أي تأثير على إنتاج إنزيم الدكسترانيز (Szczodrak et al.,1994).

أظهرت النتائج التي توصلت إليها عليلي (2001) إرتفاع إنتاج الدكسترانيز من *Streptomyces* sp.AM بإستخدام تخمرات الحالة الصلبة (SSF) عندما يكون تركيز الدكسترات في الوسط يساوي 2% ، إذ بلغت الفعالية الإنزيمية 2.13 وحدة/غ مادة صلبة بعدها لوحظ إنخفاض واضح في إنتاج الإنزيم عند التراكيز العالية من الدكسترات (2.5-3 %) ويمكن أن يعود ذلك إلى زيادة لزوجة الوسط بسبب زيادة تركيز الدكسترات مما يؤدي إلى إنخفاض كمية المواد الغذائية الضرورية للبكتيريا وانتشار الإنزيم مؤثرة بذلك في سرعة التفاعل التي تعتمد على إرتباط مادة التفاعل بالإنزيم. فيما أستعمل الدكسترات كمصدر وحيد للكاربون لإنتاج الإنزيم من بكتيريا *Cytophaga johnsonii* (Janson,1975). وكذلك عند بكتيريا *Bacillus* sp. (Khalikova and Usanov, 2002).

II-1-2- المصدر النيتروجيني:

بالإضافة إلى مصدر الكاربون، بعتبر الأزوت من العوامل التي تؤثر على إنتاجية الدكسترانيز. فقد أستعمل مستخلص الخميرة والنيوبيبتون (Neopeptone) كمصدر للآزوت العضوي فيما أستعمل كلوريد الأمونيوم كمصدر للأزوت اللاعضوي عند فطر *Sporothrix schenkii* (Arnold et al.,1998). كما وجد أن مستخلص الخميرة عامل مهم لإنتاج إنزيم الدكسترانيز من فطر *P. acualeatum* كمصدر للأزوت العضوي فيما أستخدم $NaNO_3$ كمصدر للأزوت اللاعضوي (Erhardt et al.,2008) . أستعمل أيضا مستخلص الخميرة في إنتاج الإنزيم من بكتيريا *Streptococcus mutans* (Staat et al.,1973) وكذلك من فطر *Paecilomyces lilacinus* (Mariscal and Munguia, 1991)، بالإضافة إلى فطر *P. notatum* (Szczodrak et al.,1994) وأستعمل $NaNO_3$ في إنتاج الإنزيم من *P. notatum* كمصدر للأزوت اللاعضوي وكبريتات الأمونيوم في إنتاجه من فطر *Paecilomyces lilacinus* (Mariscal and Munguia, 1991). وفي دراسة قام بها Janson (1975) أستعمل البيبتون (peptone) كمصدر للأزوت العضوي عند بكتيريا *Cytophaga johnsonii* وأستعمل أيضا عند بكتيريا *Bacillus* sp. (Khalikova and Usanov, 2002).

II-1-3- تأثير بعض المواد على إنتاجية الإنزيم:

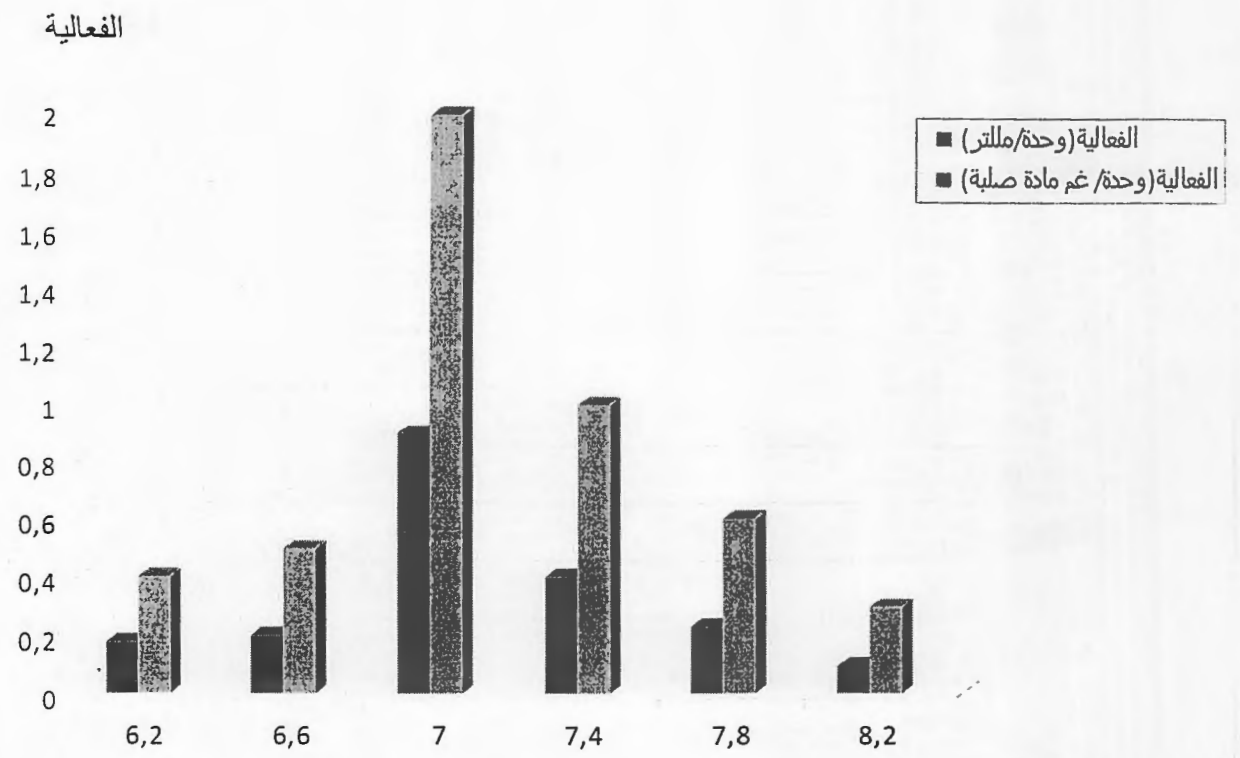
توجد مركبات تؤثر على إنتاجية الإنزيم منها KH_2PO_4 التي تقوم بتنشيط عملية الإنتاج عند فطر *P. notatum* (Szczodrak et al.,1994) وKH_2PO_4، $MgSO_4$ التي تحفز عملية الإنتاج من فطر *Paecilomyces lilacinus* (Mariscal and Munguia, 1991). كما تؤثر KCl، $FeSO_4$، $MgSO_4$ و $CaCl_2$ على إنتاجه من فطر *P. acualeatum* (Erhardt et al., 2008) . ووجد أن KH_2PO_4 و $CaCl_2$ $MgSO_4$ و NaCl أيضا لها تأثير على إنتاج الدكسترانيز من فطر *Lipomyces starkeyi* (Koenig and Day,1988).

II-1-4- الأس الهيدروجيني (pH):

يتغير إنتاج إنزيم الدكسترانيز من الأحياء المجهرية بإختلاف الأس الهيدروجيني (pH) للوسط الإنتاجي الذي يؤثر في نمو الأحياء المجهرية وفعاليتها وبالتالي في العمليات الأيضية خاصة عمليات التخليق الحيوي وإنتاج الإنزيمات.

فقد توصل Suzuki وجماعته (1999) إلى أن الأس الهيدروجيني الأمثل لإنتاج الإنزيم من بكتيريا *Acetobacter capsulatum* ATCC 11894 كان 5.2 وقد أشار Koenig وDay (1988) إلى أن إنتاج الإنزيم من فطر *Lipomyces starkeyi* كان أفضل بين الأس الهيدروجيني (3.0 - 5.0) في حين ذكر Mariscal و Munguia (1991) أن الأس الهيدروجيني الأمثل لإنتاج الإنزيم من فطر *Paecilomyces lilacinus* كان 5.4 . وبين Arnold وجماعته (1998) أن أعلى إنتاجية لإنزيم الدكسترانيز المنتج من فطر *Sporothrix schenkeii* عند الأس الهيدروجيني 5.

فيما يتطلب إنتاج إنزيم الدكسترانيز من فطر *P. notatum* أسا هيدروجينيا مساويا لـ 5.5 (szczodrak et al.,1994) ومن خلال دراسة أجراها Barrett وجماعته (1987) توصل إلى أن الأس الهيدروجيني 5.4 أعطى أعلى إنتاجية لإنزيم الدكسترانيز C (Dextranase C) بينما كان الأس الهيدروجيني 5.2 الأمثل لإنتاج إنزيم الدكسترانيزD (Dextranase D) من بكتيريا *S. sobrinus* . وعموما نلاحظ أن الأس الهيدروجيني الأمثل لإنتاج إنزيم الدكسترانيز من الفطريات يكون عند رقم هيدروجيني مساويا تقريبا لـ 5. ولتحديد تأثير الرقم الهيدروجيني في إنتاج إنزيم الدكسترانيز من بكتيريا *Streptomyces* sp. AM قامت عليلي (2001) بتحضير وسط غذائي بأسس هيدروجينية مختلفة (8.2،7.8،7.4،7،6.6،6.2) حيث بينت النتائج الموضحة في الشكل 04 أن الأس الهيدروجيني 7 كان الأفضل لإنتاج الإنزيم حيث أعطى أعلى فعالية إنزيمية والتي قدرت بـ 2.12 وحدة/غ مادة صلبة، بينما لوحظ إنخفاض فعالية الإنزيم بانخفاض وارتفاع الأس الهيدروجيني عن 7. في دراسة أجريت على بكتريا *Cytophaga johnsonii* وجد أن الأس الهيدروجيني الأمثل لإنتاج الدكسرانيز يتراوح بين (6-7) (Janson, 1975). كما أن الأس الهيدروجيني يؤثر في إنتاج الإنزيم من خلال تأثيره في صفات الوسط الغذائي كذوبانية المواد الغذائية وإنتقالها وتأينها وتركيز البيكاربونات المتكونة من ذوبان ثاني أكسيد الكاربون مما يؤثر على نمو الكائن الحي وإنتاجية الإنزيم.



الشكل(04): تأثير الأس الهيدروجيني على إنتاج إنزيم الدكسترانيز المنتج من بكتيريا *Streptomyces* sp. AM باستخدام تخمرات الحالة الصلبة (عليلي،2001).

مكتبة الكلية

II-1-5- درجة الحرارة:

تعد درجة الحرارة من العوامل التي تؤثر بشكل كبير في عملية التخليق الحيوي للإنزيمات من جهة ونمو الأحياء المجهرية من جهة أخرى.

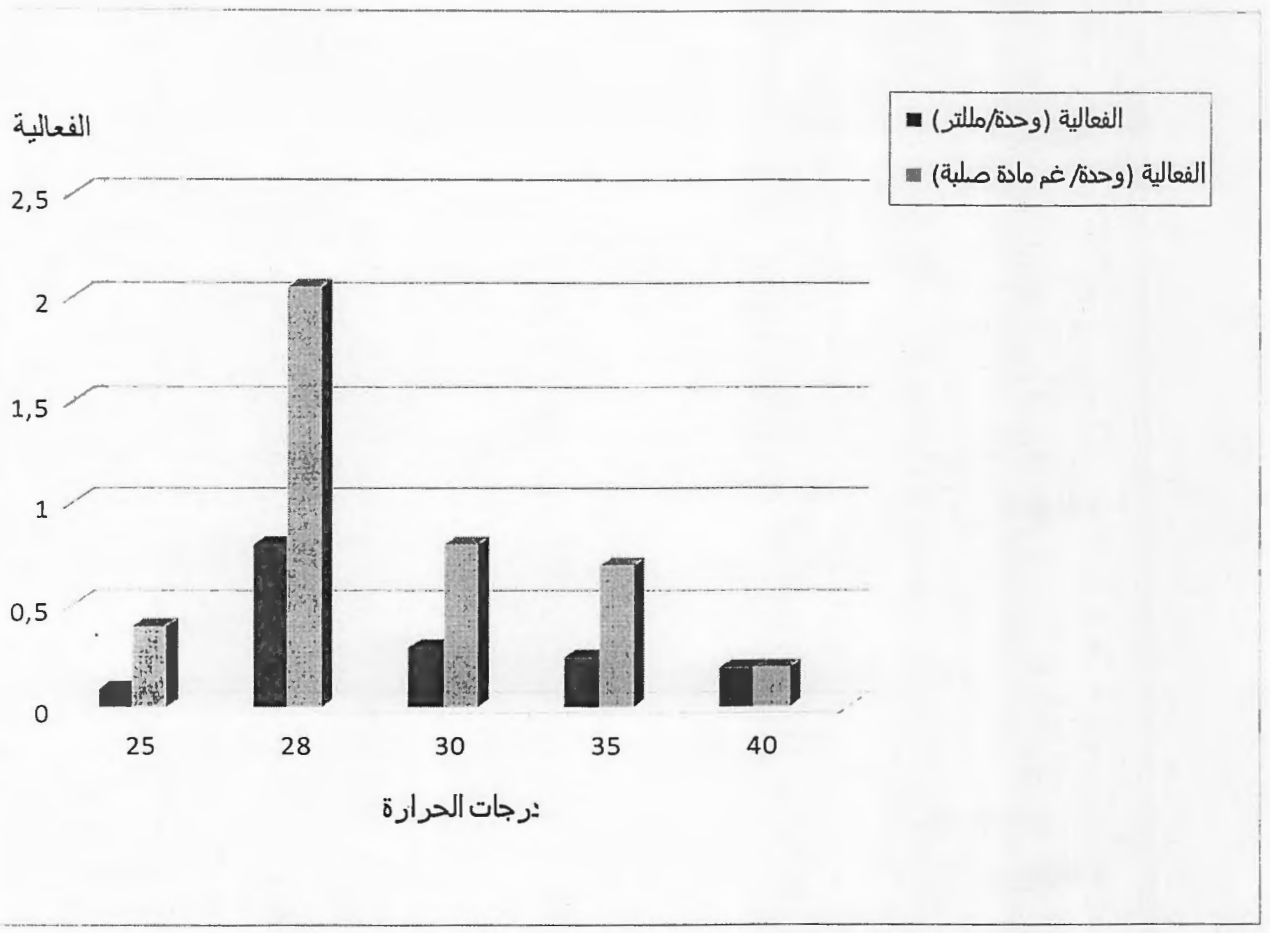
لقد توصل Arnold وجماعته (1998) من خلال دراسة أجراها إلى أن درجة حرارة 20°م تعد الدرجة المثلى لنمو الفطر *Sporothrix schenkeii* وإنتاج إنزيم الدكسترانيز، وأستخدم Szczodrak وجماعته (1994) درجة حرارة 30°م لإنتاج الإنزيم من الأحياء المجهرية المعزولة من الصفيحة الجرثومية للأسنان بدرجة حرارة 37°م خلال فترة 72- 96 ساعة من الحضن، كما توصل Mariscal و Munguia(1991) من خلال دراسة أجريت على فطر *Paecilomyces lilacinus* أن درجة الحرارة الملائمة لإنتاج إنزيم الدكسترانيز هي 28°م. ووجد كل من Koenig و Day (1989) أن درجة الحرارة 30°م تعد الدرجة المثلى لإعطاء إنتاجية إنزيمية عالية لإنزيم الدكسترانيز المنتج من فطر *Lipomyces starkeyi*.

درس تأثير درجات الحرارة المختلفة على إنتاج إنزيم الدكسترانيز من العزلة *Streptomyces* sp.AM باستخدام تخمرات الحالة الصلبة وتم تحديد درجة الحرارة المثلى لإنتاج الإنزيم، حيث أشارت النتائج أن إنتاجية الإنزيم بلغت أقصاها عند درجة حرارة 28°م. إذ بلغت الفعالية الإنزيمية 2.10 وحدة/غم مادة صلبة، ولوحظ أنه عند زيادة درجة الحرارة عن 28°م يؤدي إلى انخفاض في الفعالية الإنزيمية، كما أن استخدام درجة الحرارة أقل من 28°م لا تعطي فعالية عالية، كما يوضح الشكل 05 (عليلي،2001). ويعود انخفاض الفعالية الإنزيمية بانخفاض درجة الحرارة لعدم ملائمة هذه الدرجة لنمو هذه العزلة البكتيرية حيث يتباطأ النمو ويتأخر التخليق الإنزيمي، 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.

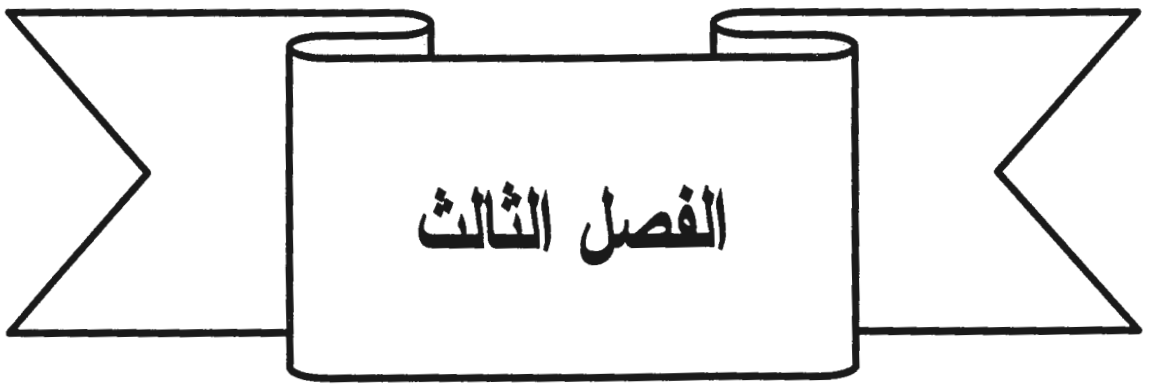
II-1-5 : فترة الحضن:

لقد تباينت أوقات الحضن اللازمة للحصول على إنتاج أمثل لإنزيم الدكسترانيز، حيث وجد أن إنتاج الإنزيم من *Lipomyces starkeyi* يتطلب مدة 72 ساعة (Koenig and Day,1988)، كما أشير إلى أن أفضل إنتاج إنزيم الدكسترانيز المنتج من فطر *P. notatum* كان بعد أربعة أيام من الحضن (Szczodrak et al.,1994)، بينما كانت مدة 120 ساعة ضرورية لإنتاج إنزيم الدكسترانيز من فطر *Sporothrix schenkeii* بدرجة حرارة 20°م (Arnold et al.,1998).

قامت عليلي (2001) بمتابعة إنتاج إنزيم الدكسترانيز من بكتيريا *Streptomyces* sp.AM خلال فترات حضن مختلفة حيث وجد أن الزيادة التدريجية في إنتاجية الإنزيم تكون بزيادة فترة الحضن، حيث وصلت إلى أقصاها خلال 72 ساعة من الحضن إذ قدرت الفعالية الإنزيمية بـ1.87 وحدة/غم مادة صلبة ثم بدأت بالإنخفاض التدريجي بزيادة فترة الحضن. و فسرت إنخفاض فعالية الإنزيم عند إطالة فترة الحضن بالتغيرات البيئية للوسط الغذائي وحصول التحلل الذاتي للخلايا مع إفراز مواد وإنزيمات داخلية و التي يكون لها تأثير غير مرغوب فيه على إنتاجية الإنزيم وفعاليته.



الشكل(04): تأثير درجة الحرارة على إنتاج إنزيم الدكسترانيز المنتج من بكتيريا *Streptomyces* sp.AM باستخدام تخمرات الحالة الصلبة (عليلي،2001).



دراسة خصائص وتنقية إنزيم الدكسترانيز

III- دراسة خصائص وتنقية إنزيم الدكسترانيز:

III-1- طرق تنقية إنزيم الدكسترانيز:

إن دراسة الخصائص الفزيائية والكميائية للإنزيم تتطلب أولا تنقيته لغرض التخلص من الشوائب والبروتينات غير المرغوب فيها الموجودة في المستخلص الإنزيمي. و تهدف تنقية الإنزيم إلى تهيئته لأن يكون ملائما للإستخدمات التحليلية والطبية والصناعية.

قام Koenig و Day (1989) بدراسة حصل فيها على إنزيم الدكسترانيز من فطر *Lipomyces starkeyi* بعدد مرات تنقية بلغ 43 مرة بكروماتوغرافيا التبادل الأيوني باستخدام المبادل كاربوكسي ميثيل سيفاروز (Carboxymethyle- sepharose) (CMS) ثم كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي بإستخدام (Biogel A-0.5m) وتمت عملية الميز للأجزاء الفعالة ثم ترسيبها بالإيزوبربانول. أظهر محلول الإنزيم المنقى 4 أشرطة على هلام متعدد الأكريلاميد(polyacrilamide gel) بوجود المواد الماسخة SDS. و تمكن Suzuki وجماعته(1999) من تنقية إنزيم الدكسترانيز من بكتيريا *Acetobacter capsulatum* ATCC11894 حيث شملت التنقية مرحلتين هما: مرحلة طرد مركزي في درجة حرارة 4°م وبسرعة 20.000 دورة لمدة 20 دقيقة ومرحلة الميز بإضافة 50 ميلي مولار من محلول الأسيتات(pH 4.5) في درجة حرارة 4°م خلال 2 إلى 3 أيام.

في دراسة أخرى لتنقية الإنزيم من البكتيريا *Streptococcus sobrinus* جاءت خطوة الترشيح الهلامي في عمود (Biogel A-0.5m) بعد خطوة التبادل الأيوني بإستخدام عمود كاربوكسي ميثيل سيفاروز (CMS) وكان عدد مرات التنقية 43.3 مرة بحصيلة إنزيمية قدرها 70% (Koenig and Day,1988)، وتمكنت عليلي (2001) من تنقية إنزيم الدكسترانيز من العزلة المحلية *Streptomyces* sp.AM وإشتملت خطوات التنقية على كروماتوغرافيا التبادل الأيوني للمستخلص الإنزيمي بإستخدام كروماتوغرافيا التبادل الأيوني على عمود DEAE-cellulose والمعايرة بمحلول الفوسفات المنظم بتركيز 0.005 مولار وبرقم هيدروجيني 7.0 حيث بلغ عدد مرات التنقية في هذه الخطوة 1.4 مرة وحصيلة إنزيمية 68.3% كما إرتفع عدد مرات التنقية إلى 2.8 مرة بحصيلة إنزيمية بلغت 49.1% في خطوة ميز الإنزيم إتجاه السكروز لمدة 3 ساعات حيث تعد هذه الخطوة مناسبة لإزالة بعض المكونات غير الفعالة في المحلول الإنزيمي وجاءت خطوة الترشيح الهلامي بإستخدام عمود سيفاروز 4B بعد عملية الميز وكانت الفعالية النوعية للأجزاء المستردة 13 وحدة/ملغ بروتين وقد حققت هذه الخطوة تنقية مقدارها 8.7 مرة مع حصيلة إنزيمية مقدارها 47.9%.

تمكن الباحث Barrett وجماعته (1987) من تنقية إنزيم الدكسترانيز من بكتيريا *Streptococcus sobrinus* مستخدما الترسيب بكبريتات الأمونيوم كخطوة أولى وجمع الراسب ثم أجريت له عملية الميز، وضع المحلول الإنزيمي بعد ذلك على عمود Hemoglobine cepharose 4B الموصول بعمود يحتوي على الدكستران الأزرق-أجاروز-(bleu dextran agarose) في درجة حرارة 4°م ثم أجريت عملية الترشيح الهلامي، حيث تمكن من فصل شكلين إنزيميين(D وC) وتم تحديد أوزانها الجزيئية بإستخدام طريقة الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الأكريلاميد بوجود المواد الماسخة SDS (SDS-PAGE) وقدرت بـ 175.000 دالتون لـ C و 160.000

دالتون لـ D . وتضمنت تنقية إنزيم الدكسترانيز المنتج من فطر *Sporothrix schenkii* عدة مراحل شملت في البداية معايرة الإنزيم الخام بحامض الأستيك (Acetic Acid) مع إضافة كبريتات الأمونيوم $(NH_4)_2 SO_4$ ثم أجريت له عملية طرد مركزي وتبعتها عملية الميز. ونقي الإنزيم بعد ذلك بإستخدام عمود DEAE -Boigel وبعدها أخضع الراشح إلى تقنية HPLC (Arnold et al.,1998).

III-2-خصائص إنزيم الدكسترانيز:

III-2-1-تعيين الوزن الجزيئي لإنزيم الدكسترانيز:

يختلف الوزن الجزيئي لإنزيم الدكسترانيز بإختلاف المصدر الميكروبي المنتج حيث تم تقدير الوزن الجزيئي لإنزيم الدكسترانيز المنتج من طرف *Streptomyces* sp.AM بإستخدام طريقة الهجرة الكهربائية في هلام متعدد الأكريلاميد بوجود المواد الماسخة SDS (SDS-PAGE) وكان بحدود 20420 دالتون (عليلي،2001). كما وجد أن إنزيم الدكسترانيز المنتج من *S. schenkii* عبارة عن بروتين مونوميري (Monomeric protein) مكون من وحدة واحدة ذو وزن جزيئي قدره 79.000 دالتون (Arnold et al.,1998). كما وجد Suzuki وجماعته (1999) أن إنزيم الدكسترانيز المنقى من *Acetobacter capsulatum* ATCC11894 ذو وزن جزيئي قدره 152.000 دالتون.

ولوحظ في دراسة أخرى إنتاج إنزيمين من بكتيريا *S. sobrinus* بوزنين جزيئيين قدرهما (175.000و 160.000 دالتون) و تم تحديد وزنهما بطريقة الهجرة الكهربائية في هلام متعدد الأكريلاميد بوجود SDS (Barrett et al.,1987) . وفي دراسة أجراها Sun وجماعته (1995) على الإنزيم المنتج من *Escherichia coli* والذي تم نسخه من بكتيريا *S. sobrinus* UAB 108 لوحظ أنه بعد تنقية الإنزيم وترحيله على هلام متعدد الأكريلاميد أعطى شريطا واحدا وكان وزنه الجزيئي بحدود 43.000 . ووجد أن إنزيمي الدكسترانيز المنتجين من فطر *Penicillium aculeatum* ATCC 10409 ذو وزنين جزيئيين 59.000 دالتون و 80.000 دالتون (Erhardt et al.,2008).

III-2--2 الخصائص الفيزيائية لإنزيم الدكسترانيز:

تختلف الظروف المثلى التي تعمل فيها إنزيمات الدكسترانيز، حيث تعمل بأسس هيدروجينية ودرجات حرارة مختلفة ويعود هذا الإختلاف إلى تعدد المصادر المنتجة لها. فقد تم تحديد كلا من الأس الهيدروجيني الأمثل ودرجة الحرارة المثلى للفعالية الإنزيمية لإنزيم الدكسترانيز المنتج من فطر *P. lilacinum* والمقدرة بـ(5.5-4.5) و(50-45)°م على التوالي أما بالنسبة لفطر *P. funiculosum* فقد قدرت ب(5-4.3)و (50-45)°م (Bourne et al.,1962) بينما تم التوصل إلى أن إنزيم الدكسترانيز المنتج من فطر *Lipomyces starkeyi* يكون فعالا في مدى الأس الهيدروجيني (4.0-2.5) ودرجة حرارة (30-25)°م (Koenig and Day, 1988)، غير أنه تم الحصول على أمثل فعالية إنزيمية للإنزيم المنتج من *Paecilomyces lilacinus* في درجة حرارة 65°م وأس هيدروجيني 5.4 (Mariscal et Munguia, 1991). ووجد بأن الإنزيم المنتج من *P. notatum* يكون فعالا في الأس

الهيدروجيني 5 ودرجة حرارة 50°م (Szczodrak et al., 1994) . وفي دراسة أجريت على فطر *Sporothrix schenkii* تم من خلالها تحديد الأس الهيدروجيني الأمثل ودرجة الحرارة المثلى للفعالية الإنزيمية والمقدرة بـ5 و55°م على التوالي (Arnold et al., 1998). وكانت الفعالية المثلى للإنزيميين المنتجين من فطر *Penicillium aculeatum* ATCC 10409 عند الأسين الهيدروجيين 4.6 و5 (Erhardt et al., 2008).

وتم الحصول على أعلي فعالية إنزيمية للإنزيم المنتج من *Acetobacter* ATCC 11894 *capsulatum* عند درجة حرارة 45°م. (Suzuki et al.,1999) ، وكانت الفعالية الإنزيمية المثلى للإنزيم المنتج من بكتيريا *Arthrobacter globiformus* عند الأس الهيدروجيني 6 ودرجة حرارة 45°م (Khalikova et al., 2005) كما أجريت دراسة على بكتيريا *Paenibacillus* strain Dex701B ووجد أن إنزيم الدكسترانيز المنتج يكون ذو فعالية مثلى عند الأس الهيدروجيني 5.5 ودرجة حرارة 60°م (Finnegan et al., 2004).

III-2-3: الخصائص الحركية لإنزيم الدكسترانيز:

يعبر ثابت ميكايليس مانتن (Michaelis Menten) Km لإنزيم الدكسترانيز عن ألفة الإنزيم إتجاه مادة التفاعل (الدكسترات) ولهذا أجريت عدة دراسات لغرض تحديد قيمته. فقد وجد أن قيمة Km لإنزيم الدكسترانيز المنتج من بكتيريا *S. sobrinus* كانت بحدود 1.1 ميلي مولار بالنسبة للدكسترانيز C و 1.25 ميلي مولار بالنسبة للدكسترانيزD وهذا باستخدام الدكسترات T-2000 (Barrett et al., 1987). كما تم التوصل إلى أن قيمة ثابت ميكاليس مانتن لإنزيم الدكسترانيز المنتج من *Lipomyces starkeyi* بلغت 0.094 ميلي مولار عند استخدام الدكسترات T-70 كمادة التفاعل (Koenig and Day,1989) . ومن خلال دراسة أجريت على إنزيم الدكسترانيز المنتج من *Paecilomyces lilacinus* وجد أن قيمة Km لهذا الإنزيم تجاه الدكسترات كمادة تفاعل كانت بحدود 0.26 غرام/لتر(Mariscal and Munguia ,1991). كما تمت الإشارة إلى أن قيمة Km لإنزيم الدكسترانيز المنتج من *Sporothrix schenkii* كانت بحدود (0.003±0.067)% (وزن/حجم) وهذا باستخدام الدكسترات الذائب كمادة تفاعل (Arnold et al., 1998). كما أن قيمة Km للإنزيمين المنتجين من *Penicillium aculeatum* تكون بحدود (0.2±0.9)% بالنسبة للدكسترانيزI و (0.2± 1.3) % بالنسبة الدكسترانيز II أما Vmax فكانت بحدود (30 ± 770)% بالنسبة للدكسترانيزI و (70 ± 1670) % بالنسبة للدكسترانيز II (Erhardt et al., 2008).

قامت عليلي (2001) بإستخدام الدكسترات T70 والدكسترات الأزرق 2000 كمادتي تفاعل لإنزيم الدكسترانيز المنتج من بكتيريا *Streptomyces* sp.AM لتعيين ثابت ميكاليس (km) وقيمة السرعة القصوى (Vmax) حيث كانت معدلات هذا الثابت مقاربة لـ 2.6 ملغم/مللتر عند إستخدام الدكسترات الأزرق 2000 و4.2 ملغم/مللتر عند إستخدام الدكسترات T70 وبلغت معدلات قيم السرعة القصوى Vmax 0.38 ميلي مولار/ دقيقة لتفاعل الدكسترانيز عند إستخدام الدكسترات الأزرق 2000 و0.32 ميلي مولار/دقيقة بإستخدام الدكسترات T70.

III-2-4- الثباتية الإنزيمية للدكسترانيز:

III-2-4-1- تأثير الأس الهيدروجيني على ثباتية الإنزيم :

أشارت العديد من الدراسات إلى تأثير الأس الهيدروجيني في ثباتة إنزيم الدكسترانيز حيث بينت نتائج الدراسة التي قام بها Arnold وجماعته (1998) أن الأس الهيدروجيني الأمثل لثباتية الإنزيم المنتج من فطر *Sporothrix schenkii* يتراوح بين (4.5-4.7) فيما وجد أن إنزيم الدكسترانيز المنتج من فطر *Paecilomyces lilacinus* أظهر ثباتا كاملا للفعالية في الأس الهيدروجيني 5.4 (Mariscal and Munguia, 1991). وقد أوضحت دراسة أخرى أن الأس الهيدروجيني الأمثل لثباتية الإنزيم المنتج من *Acetobacter capsulatum* ATCC 11894 كانت ضمن حدود (5.4-4.1) (Suzuki et al., 1999)، فيما ذكر أن الدكسترانيز المنتج من بكتيريا *Flavobacterium* sp. M73 ذو ثباتية جيدة في مجال الأس الهيدروجيني (12-6.5) (Khalikova et al., 2005). ولوحظ أن الأس الهيدروجيني الأمثل لثباتية الإنزيم المنتج من *A. israelii* كانت ضمن حدرد (7-5.6) (Schachtele et al.,1975). وفي دراسة قامت بها عليلي (2001) لدراسة تأثير الأس الهيدروجيني في ثبات الإنزيم من *Streptomyces* sp.AM بينت النتائج أن إنزيم الدكسترانيز يكون ذو ثباتية إنزيمية جيدة في مجال الأس الهيدروجيني (5-7) ، حيث لوحظ أن الإنزيم قد إحتفظ بما يقارب 90% من الفعالية ضمن هذا المجال وقد لوحظ إنخفاض في ثبات الإنزيم عند الأسس الهيدروجينية البعيدة عن هذا المجال غير أنه بقي محتفظا بما يقارب (20-40)% من فعالته في الأسس الهيدروجينية الحامضية (4-4.5) و بـ 30-45% من فعاليته في الأسس الهيدروجينية 7.5 و8.

III-2-4-2- تأثير درجة الحرارة على ثباتية الإنزيم :

بينت النتائج التي تم التوصل إليها أن إنزيم الدكسترانيز المنتج من بكتيريا *Streptomyces* sp.AM ذو ثباتية عند درجة حرارة 40°م لمدة 50 دقيقة وهذا يعود إلى تأثير درجة الحرارة في التركيب الثلاثي للبروتين مما يؤدي إلى تشوه بنيته وفقدان فعاليته (عليلي،2001).

III-2-5- تخصص إنزيم الدكسترانيز:

من خلال نتائج الدراسات التي قام بها العديد من الباحثين حول تخصص إنزيم الدكسترانيز تبين أن الإنزيم له درجة عالية من التخصص تجاه الدكسترات كمادة التفاعل، إذ لوحظ أن الدكسترانيز له ألفة عالية في تحطيم الدكسترات فقط لتخصصه في تكسير الرابطة الجلايكوزيدية $\alpha(1\rightarrow6)$ وتم توضيح ذلك من خلال تجربة أستخدمت فيها مواد تفاعل مختلفة شملت (مستخلص الخميرة ،النيوبيبتون والجلوكوز) ،(مستخلص الخميرة ، النيوبيبتون والدكسترات)،(مستخلص الخميرة والنيوبيبتون)وبتركيز 6.4، 6.2 و1.5 ملغم/مللتر لكل منها على التوالي لمعرفة مدى تخصص الإنزيم تجاه هذه المواد حيث تم التوصل إلى أن الإنزيم له تخصص عالي تجاه الدكسترات فقط وكانت الفعالية الإنزيمية 96% مقارنة مع الجلوكوز بينما لم يبد فعالية في تحطيم بقية المواد إلا أنه لوحظ أن له القدرة على تحطيم السيفادكس G-200 حيث كانت الفعالية الإنزيمية 69 % مقارنة مع الجلوكوز. (Arnold et al., 1994).

كما تمت الإشارة إلى أن الفعالية الإنزيمية للدكسترانيز المنتج من فطر *P. funiculosum* بلغت أقصاها عند إستعمال الدكستران كمادة تفاعل بينما لوحظ إنخفاضها عند إستعمال السكروز. (Bourne et al.,1962). على خلاف دكسترانيز *P. luteum* و *P. aculeatum* إنتاج الدكسترانيز عند *P.notatum* غير مرتبط بالوزن الجزيئي للدكستران ووجد أن فعالية تحليل الدكستران تكون صغيرة عندما يكون مصدر الكاربون هو الجلوكوز والمالتوز (Szczodrak et al.,1994) أما عليلي (2001) فأستخدمت مواد تفاعل شملت الدكستران T70، النشاء، المالتوز، الجلوكوز والسكروز بتركيز 5 ميلي مولار لكل منها ووضحت النتائج تخصص إنزيم الدكسترانيز العالي تجاه الدكستران حيث كانت الفعالية المتبقية 100%. كما أن الإنزيم له القدرة على تحطيم السيفادكس G-25 ولكن بنسبة ضئيلة جدا، حيث قدرت الفعالية المتبقية بـ 0.2 %.

III-2-6- تأثير بعض المواد على فعالية الإنزيم:

يتوقف نشاط الكثير من الإنزيمات على توفر بعض الأيونات اللاعضوية في وسط التفاعل إذ أن هناك أيونات تعمل على التثبيط الكلي أو الجزئي لبعض الإنزيمات. حيث وجد أن الأملاح:$COCl_2$،$MnSO_4$،$FeSO_4$، $Al_2(SO_4)_3$، $MgSO_4$،KI، $Ca(NO_3)_2$، NaF و Fe^{3+} تزيد من فعالية إنزيم الدكسترانيز المنتج من فطر *sporothrix schenkii* غير أن $HgCl_2$، $Pb(NO_3)_2$، $CuSO_4$ و $ZnSO_4$ تعمل على تثبيط فعالية الإنزيم (Arnold et al.,1998)، في حين $COCl_2$ و $MgSO_4$ تزيد من فعالية الإنزيم من فطر *Paecilomyces lilacinus* (Mariscal and Munguia , 1991)، وقد وجد أن $KMnO_4$، Pb^{2+}، Hg^{2+} تعمل على التثبيط الكلي لإنزيم الدكستران المنتج من *Acetobacter capsulatum* ATCC 11894 (Suzuki et al., 1999). كما تم التوصل إلى أن فعالية الإنزيم المنتج من *A.israelii* لا تتأثر بالأيونات عند إضافتها بتركيز 1% والمشتملة على الكالسيوم، المنغنيز، المغنيزيوم وكبريتات الزنك، إلا أنه لوحظ تثبيط كلي للفعالية الإنزيمية عند إضافة كلوريد الزئبق ونترات الفضة كما أن هناك عوامل أخرى تؤثر في فعالية الإنزيم حيث تبين أن تركيز 10ميلي مولار لكل من EDTA وDTT لم تؤثر في فعالية الإنزيم حيث بلغت الفعالية المتبقية 10.3% لكل منها، (Schachtele et al., 1975)، كما أوضح كل من Koenig وDay (1989) أن وضع الإنزيم مع كل من EDTA وDTT بتركيز 5 ميلي مولار و2 ميركابتو إيثانول (Mercapto ethanol) بتركيز 5% كل على حدة بدرجة حرارة 50°م لمدة 5 دقائق لا تؤثر في فعالية الإنزيم إذ قدرت الفعالية المتبقية بـ 103%، 100% و103% على التوالي وتوصل Arnold وجماعته (1998) إلى أن إضافة EDTA وNa_2 بتركيز 2 ميلي مولار لا تكون له أي تأثير على الفعالية الإنزيمية لـ *Sporothrix schenkii*.

وقد وجدت عليلي (2001) أن فعالية الإنزيم المنتج من *Streptomyces* sp.AM لم تتأثر بوجود السيستايين، ثاني ثايو تريتول DTT و 2 مركبتو إثيانول بتركيز 2 ميلي مولار ولم تثبط فعالية الإنزيم بنسبة كبيرة عند وضعه مع 5 ميلي مولار من DTT والسيستايين إذ لم تتجاوز نسبة إنخفاض الفعالية عن 4 % و 8% على التوالي فيما إحتفظ الإنزيم بكامل فعاليته عند وضعه مع 5ميلي مولار من 2 مركبتو إثيانول. وقد دلت هذه النتائج على

عدم إحتواء الإنزيم على مجموعة الثيول (thiol) (SH-) في موقعه الفعال وبالتالي فقدان الروابط ثنائية الكبريت ضمن تركيب البروتين للإنزيم. كما أن إضافة المركب EDTA لم يثبط فعالية الإنزيم بنسبة كبيرة إذ بلغت الفعالية المتبقية للإنزيم عند وضعه مع EDTA بتركيز 2 ميلي مولار 98%.

الجدول (02) : خصائص إنزيم الدكسترانيز المنتج من بعض الانواع الميكروبية

المصدر الميكروبي	المصدر الأنزيمي	الكتلة الجزيئية (كيلودالتون)	الأس الهيدروجيني* pH	درجة الحرارة** (°م)	الأس الهيدروجيني لثباتية الإنزيم	درجة الحرارة لثباتية الانزيم	نواتج التحلل	المرجع
الفطريات								
	Penicillium notatum	55,8	4,8	50	-	-	$IM_2.TM_3\ IM_4$	Suzuki et al., 1994
	Sporothrix schenkii	79	05	-	4,7-4 ,5	°55م	IM_2	Arnold et al.,1998
	Paecilomyces lilacinus	-	5,4	28	-	-	-	Mariscal and Munguia., 1991
	Lipomyces starkeyi ATCC 20825	74	50	50	6-2,5	°55م	$IM_2.TM_3\ IM_4$	Koenig and Day,1988
	Lipomyces starkeyi IGC	23	05	50	7,5-3,5	°50م	$IM_2.TM_3\ IM_4,M_6$	Koenig and Day,1988
	Penicillium funiculosum NRRL 6014	67	05	5-5	10-03	°40م	-	Abd-Aziz et al ., 2007
البكتيريا	*Streptococcus sobrinus*							
	-Dextranase C	175	5,4	36	-	°44م	-	Barrett et al., 1987
	-Dextranase D	160	5,2	36	-	°44م		
	Streptomyces sp.AM	20	07	28	7-5	°40م	-	عليلي،2001
	Thermoanaerobacter sp. AB11AD	140	5,4	36	05	°75م	-	Finnegan et al., 2004
	Streptococcus mutans	-	5,5	35	-	-	IM_3	Staat et al., 1973

* : الأس الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم
** : درجة الحرارة المثلى لفعالية الإنزيم
- : غير محدد

الفصل الرابع

الإستخدامات التطبيقية لإنزيم الدكسترانيز

IV-الإستخدامات التطبيقية لإنزيم الدكسترانيز :

لقد توجهت إهتمامات الكثير من الباحثين إلى دراسة إنزيم الدكسرانيز المنتج من الأحياء المجهرية ويعود ذلك لإستخدامه في مجالات عديدة، إذ أنه يستعمل في التغذية وفي مجال طب الأسنان و في صناعة المنظفات، كما أن له أهمية في تحديد بنية الدكستران وبعض السكريات المتعددة (Khalikova et al., 2005).

IV-1- الإستخدامات الطبية :

يستعمل إنزيم الدكسترانيز في منع تسوس الأسنان بتحطيمه للصفيحة الجرثومية حيث أظهرت العديد من الدراسات أن الدكستران يدخل في تركيب طبقة صفرة الأسنان ولهذا أستعمل إنزيم الدكسترانيز في صناعة مواد منظفة كمعجون الأسنان (Safarik.,1990; Abdel Aziz et al., 2007; Mariscal and Manguai.,1991) . كما أن إنزيم الدكسترانيز المنتج من *S. mutans* يعمل على تحليل الجليكان (glucane) الذي يدخل في تركيب الصفيحة الجرثومية و هذا بالتغيير في تركيبته البنيوية (Barrett et al., 1987; Schachtele et al., 1975).

يستعمل الدكسترانيز أيضا في إعداد جال مميه يستعمل في معالجة مرض إلتهاب المعي (Abdel-Aziz et al., 2007). في حين أثبتت دراسة أخرى أن الدكسترانيز يزيد في فعالية إختراق المضاد الحيوي Temaflaxacine للجليكوكاليكس (Glycocalyx) المنتج من بكتيريا *S. sanguis* المسببة لمرض إلتهاب شغاف القلب (endocarditis) لدى الأرانب فقد أظهر الفحص المجهري الإلكتروني إختزال واضح في طبقة السكريات المتعددة المحيطة بخلايا *S. sanguis* عند إستعمال تركيز 7.4ميكروغرام / مللتر من المضاد الحيوي (antibiotic) والمضاف له 25 وحدة /مللتر من الإنزيم مما ينتج عنه زيادة فعالية المضاد الحيوي ضد هذه البكتيريا . (Mghir et al.,1994)

IV -2-الإستخدامات الصناعية :

إن تواجد الدكستران في صناعة السكر يعد مصدرا للعديد من المشاكل منها إحداث اللزوجة التي من شأنها أن تشكل عائقا أثناء عمليات تصنيع السكر وتحويله إذ يعمل على إعاقة الترشيح مؤديا بذلك إلى فقدان كميات معتبرة من السكروز مع زيادة في لزوجة العصائر والمشروبات المعالجة (process syrups) ، بالإضافة إلى إنخفاض المردود من السكروز نتيجة تثبيط عملية البلورة (Crystallization) (Khalikova et al.,2005). وقد وجد أن إحدى الحلول الحالية لتفادي مشاكل اللزوجة في صناعة السكر هي إستعمال إنزيم الدكسترانيز الذي يعمل على تخفيف الكتلة الجزيئية للدكستران و بالتالي تخفيض لزوجة العصائر (Mariscal and Munguia.,1991). كما أوضح Jimenez (2005) أن إستخدام إنزيم الدكسترانيز هي الطريقة الفعالة لإختزال كمية الدكستران وبالتالي إزالة اللزوجة، كما أنه يستعمل في مختلف الطرق التحليلية لقياس محتوى الجلوكان في العصائر السكرية والسكر الخام (Khalikova et al., 2005) . و بالإضافة إلى إستخدامه في الدراسات البنيوية لمتعدد الجلوكوز (polymers Glucose) (Abdel Aziz et al., 2007) .

IV-3- إنزيم الدكسترانيز والتقنيات الجزيئية :

إهتم الكثير من الباحثين بعملية إستنساخ (clonage) جينات إنزيم الدكترانيز وهذا بتعبيرها في عزلات ميكروبية مختلفة وذلك بغرض تحسين خصائصه الإنزيمية وبالتالي توسيع مجالات استعماله . اذ تم عزل الجينين المسؤولين عن فعالية تحليل الدكستران من بيكتيريا *Paenibacillus* strain Dex701B بحيث يشفر الجين الأول إلى بروتين طوله 795 حمض أميني ذو وزن جزيئي 68.6 كيلودالتون، ويشفر الجين الثاني لبروتين آخر طوله 600 حمض أميني بوزن جزيئي قدره 69.2 كيلودالتون، وتم إستنساخهما في بكتيريا *Escherichia coli*. و يتميز الإنزيم المنتج بفعالية قصوى عند درجة الحرارة 60°م ورقم هيدروجيني 5.5 مع الإحتفاظ بـ 70٪ من الفعالية بعد الحضن عند درجة حرارة 57°م لمدة 9 ساعات ونصف مع غياب مادة التفاعل على خلاف الإنزيم المنتج من بكتيريا *Paenibacillus* strain Dex 701B فتميز بفعالية قصوى عند درجة حرارة 70°م (Finnegan et al., 2004) .

وفي دراسة أخرى تم إستنساخ الجين البنيوي للدكسترانيز من *S. sobrinus* 6715 strain VAB 66 فى بكتيريا E. coli وكانت النتيجة نقصان الوزن الجزيئى للإنزيم المنتج من E. coli (Barrett et al., 1986). كذلك تم أيضا إستنساخ الجين المسؤول عن إنتاج إنزيم الدكسترانيز من فطر *P. minioluteum* في خميرة *Pichia pastoris*، كما تم عزل الجين المشفر للدكسترانيز من *Lipomyces starkeyi* KSM 22 وتم إستنساخه وتحديد تتابعه النيكليوتيدي ثم التعبير عنه في خميرة *Saccharomyces cerevisiae* ، ويتكون الجين من 1842 زوج نيكليوتيدي ويشفر لبروتين طوله 608 حمض أميني ثم تم إستنساخه في *Pichia pastoris* وكانت إنتاجية الإنزيم أعلى بـ 4.2 مرة في *Pichia pastoris* منه في *Saccharomyces cerevisiae* (Hee-Kyoung et al., 2009) . إستعمل Tamura وجماعته (2007) طريقة تفاعل البلمرة المتكرر (PCR) والتي تهدف الى تضخيم (amplification) كمية الجين المسؤول عن إنتاج إنزيم الدكسترانيز من بكتيريا *S. creceti* strain E49 وتحديد تتابع نيكليوتيداته، وقد كان طوله 3960 نيكليوتيدة تشفر لـ1200 حمض أميني وكان وزنه المحسوب 128129.91 وقد تبين من خلال التحليل الوراثي باستخدام الشجرة الوراثية (Phylogenetic analysis) تشابه تسلسل الأحماض الأمينية لإنزيمات الدكسترانيز في *S. creceti* مع *S.sobrinus* و *S. downei*.

الخاتمة

الخاتمـــة :

يعتبر الدكستران من المركبات التي تتوزع بشكل كبير في الكائنات الحية المختلفة حيث يستخدم في مجالات عدة منها الصناعات الغذائية ، كما أن له أهمية كبيرة في صناعة مواد التجميل ومقابل ذلك نجد أنه يسبب مشاكل في المجال الصناعي خصوصا صناعة السكر وكذلك في المجال الطبي حيث تشكل البكتيريا المنتجة له الصفيحة الجرثومية للأسنان، ووجد بأن استعمال إنزيم الدكسترانيز هي الطريقة الفعالة للتخلص من كل هذه المشاكل وذلك بتحليله للدكستران .

وقد أجريت العديد من البحوث التي تناولت إنزيم الدكسترانيز من المصادر الميكروبية المختلفة وتم فيها تعيين خصائصه وطرق تنقيته وكذلك استنساخه من كائنات مجهرية إلى أخرى بالإضافة إلى تطبيقاته في العلوم الحيوية إذ يمكن أن يستعمل في البحث عن البنيات الأكثر تعقيدا للكاربوهيدرات و يتوقع أن تزيد تطبيقات الدكستران والإنزيمات المحللة له في المستقبل القريب ومثال ذلك صناعة السكر التي تتطلب إنزيمات الدكسترانيز الأكثر فعالية وثباتا للعمليات المختلفة . بالرغم من أن الدكسترانيز درس بشكل كبير ضمن سياق مرض الأسنان والصناعات السكرية إلا أن تقنيات عمله والبحث عن مصادر فعالة منتجة له تستحق دراسات أخرى .

قائمة المراجع:

- **المراجع باللغة العربية:**

مليكة عليلي.(2001). دراسة صفات إنزيم الدكسترانيز المنتج من الأكتينومايستات بواسطة تخمرات الحالة الصلبة. رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة بغداد.

- **المراجع باللغة الأجنبية:**

-**Abdel Aziz**, M.S.,Talkhan, F.N.and Janson, J.C.(2007). Purification and characterization of dextranase from a new strain of *Penicillium funiculosum*. J.Appl. Sci. Res. 3(11) :1509-1516

- **Aoki**.H. and sakano, y.(1997). A clasification of dextran-hydrolysing enzymes based on amino acid sequence similarities. Boichem . J.323: 859-861.

- **Arnold**, W.N., Nguyen, T.B.P. and Mann, L.C.(1998). Purification and characterization of a dextranase from *Sporothrix schenkii* . Arch. Microbiol. 170 :91-98

- **Barrett**, J.F., Barrett, T.A. and Cutiss III, R.(1987).Purification and partial characterization of a multicomponent dextranase gene. Infect. Immun. 55(3) : 792-802.

- **Bourne**, E.J., Hutson, D.H. and Weigle, H.(1962).Studies on dextrans and dextranases. Boichem. J. 85 :158-163.

- **Erhardt**, F. A., stammen, S. and Jordening, H. J.(2008). Production, charcterization and (co˙)immobilization of dextranase from *Penicillium aculeatum*. Biotechnol. Lett. 30 : 1069-1073.

-**Finnegan**, P.M., Brumbley, S.M. O'shea, M. G. Nevalainen, H. and Bergovist, P. L. (2004). Isolation and characterization of genes encoding thermoactive and thermostable dextranases from two thermotolerant soil bacteria. Cur. Microbiol. 49 : 327-333.

-**Hee-Kyoung**, K., Park, J.y. Ahn, J.S., kim, S.H and kim, D.(2009). Cloning of a gene encoding dextranase from *Lipomyces starkeyi* and its expression in *Pichia pastoris*. J. Microbiol. Biotechnol. 19(2) : 172-177.

-**Henrissat**, B. and Bairoch, A.(1996). Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. Biochem. J. 316 : 695-696.

- **Janson**, J.C. (1975). Studies on dextran degrading enzymes.isolation and identification of a dextranase-producing strain of *Cytophaga johnsonii* and studies on the formation of the surface-bound enzyme. J. Microbiol. 88 : 205-208.

- **Jiménez**, E. R. (2005). The dextranase along sugar-making industry. Biotechnol. Appl. 22 :20-27.

- **Khalikova**, E. F. and Usanov, N. G. (2002). An insoluble colored substrate for dextranase assay. Appl. Biochem. Microbiol. 38(1) :89-93.

- **Khalikova**, E., Susi, P. and korpela, T. (2005). Microbial dextran hydrolyzing enzymes : Fundametals and Application.Microbiol. Molec. Biol. Rev. 69(2) : 306-325.

- **Koenig**, D. W. and Day, D. F. (1988). Production of dextranase by *Lipomyces starkeyi.* Biotechnol. Lett. 10(2) :117-122.

- **Koenig**, D. W. and Day, D. F. (1989). Induction of *Lipomyces starkeyi* dextranase Appl. Environ. Microbiol. 55(8) : 2079-2081.

-**Larsson**, A.. M., Andesson, R. Stahlberg, J. Kenne, L. and Jones, T. A . (2003). Dextran from *Penicillium minioluteum* : Reaction Course, Crystal structure, and Product complex. Structure. 11 :1111-1121.

- **Mariscal**, A.. G. and Munguia, A. L.(1991). Production and characterization of a dextranase from an isolated *Paecilomyces lilacinus* strain. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36 :327-331.

- **Mghir**, A.. S., Cremieux, A. C. Jambou, R. Muffat-Joly, M. Pocidals, J. J and Carbon , C. (1994). Dextranase enhances antibiotic efficacy in expermental viridans stretococcal Endocan ditis. Anfimicrob Agent Chematherapy 05 : 953-958.

-**Safarik**, I. (1990). Rapid detection of dextranases in liquid samples. Biomed. Biochim. Acta. 49(7) : 625-628.

- **Schachtele**, C. F., Staat, R. H. and harlander, S. K. (1975).Dextranases from oral bactéria : Inhibition of water-insoluble glucan production and adherence to smooth surfaces by *Streptococcus mutans*. Infect. Immun. 12(2) :309-317.

- **Staat**, R. H., Gawronski, T. H. and Schachtele, C. F.(1973). Detection and preliminery studies on dextranase- producing micro-organismes from human dental plaque. Infect. Immun. 8(6) :1009-1016.

-**Sun**, J. W., Wanda, S. y. and Curtiss III, R. (1995). Purification, characterization, and specificity of dextranase inhibitor (Dei) expressed from *Streptococcus sobrinus* VAB 108 gene cloned in *Eschericlria coli*. J. Bacteriol. 177(7) :1703-1711.

-**Suzuki**, M., Unno, T. and Okada, G. (1999). Simple purification and characterization of on extracellular dextrin dextranase from *Acetobacter capsulatum* ATCC11894. J. Appl. Glycosci. 46(4) : 469- 473.

- **Szczadrak**, J., Pleszczynska, M. and Feidurek, J.(1994). *Penicilium natatum* 1 a new source of dextranase. J. Ind. Microbiol. 13 :315-320.

- **Tamura**, H., Yamada, A. and Kata, H. (2007). Identification and characterization of a dextranase gene of *Streptococcus criceti*. Microbiol. Immun. 51(8) :720-732.

اللقب:	الإسم:	تاريخ المناقشة: 15 /2009/06
مسبوط	بلقاسم	المشرف : د. صيفور محمد
قاسمي	سمية	المناقش : د. إيدوي الطيب
فنير	حسيبة	

الموضوع :

إنزيمات الدكسترانيز الميكروبية : مصادرها، إنتاجها وتطبيقاتها

الملخص:

الدكسترانيز إنزيم يقوم بقطع الروابط الجلايكوزيدية α(1→6) في الدكستران متعدد السكريات و ينتج من مصادر متنوعة بكتيرية و فطرية وكذلك من الخمائر، إلا أن أهم مصدر منتج له هو المصدر الفطري وهو ذو أهمية تجارية كبيرة. ومن بين الكائنات المنتجة لهذا الإنزيم:

Penicillium sp. ،*Streptococcus* sp. و *Lipomyces starkeyi* .

صنف الدكسترانيز إلى صنفين رئيسيين هما إنزيمات التكسير الداخلي وإنزيمات التكسير الخارجي ولكل نوع خصائصه. يتم إنتاج هذا الإنزيم إعتمادا على أوساط مناسبة لتنمية الأنواع الميكروبية من أجل تحفيز وزيادة إنتاجه و يستعمل في مجالات عديدة مثل الصناعات السكرية والطب.

الكلمات المفتاحية : الدكسترانيز، الدكستران، إنزيمات التكسير الداخلي، إنزيمات التكسير الخارجي.

Resumé :

Dextranase est une enzyme qui hydrolyse les liaisons glucosidiques α(1→6) dans le polysaccharide dextrane. les dextranases proviennent de diverse sources ; bactérienne, fongique et levure, les champignons sont la source la plus importante . cette enzyme à plusieurs applications commerciales.

Il existe plusieurs types de microorganismes producteurs comme *Penicillium* sp., *Streptococcus* sp. et *Lipomyces starkeyi*,.....etc. les dextranases sont classées en endo- et exodextranase, dont chacun est caractérisés par des propriétés spécifiques. Cette enzyme est produite à grande échelle sur des milieux de culture adéquats à la croissance des microorganismes aussi qu'une production maximale.

Dextranase a trouvé des application diverses dans l'industrie des sucres, la medcine.

Mots clés : Dextranase, Dextrane, Endodextranases, Exodextranases .

Abstract :

Dextranase is an enzyme that hydrolyzes the α(1→6) glucosidic bond of the polysaccharide dextran. Dextranase has different origin : bacteria, fungi and yeast, while fungi are the most important source. this enzyme has a several commercial applications, *Penicillium* sp., *Streptococcus* sp.and *Lipomyces starkeyi*, are exemples of microorganismes producers of this enzyme.

Dextranase has often been classified into endo- and exodextranase , each group is characterized by specific properties.

It is produced at large scale using optimized culture media for growth to get the meximum production. Applications of dextranases include sugar industry , medcine.

Key words : Dextranase, Dextran, Endodextranases, Exodextranases .