

## استخلاص وتنقية إنزيم كلوكوز أيزوميريز المنتج من عزلة محلية من البكتريا

### *Streptomyces sp. HM5*

باسل كامل دلالي\* حميد عبود جبر\*\* محمد عمر محي الدين\*\*

#### الملخص

تم استخلاص إنزيم كلوكوز أيزوميريز من خلايا البكتريا *Streptomyces sp. HM5* التي نميت وفق الظروف المثلى لانتاج الأنزيم وكان افضل محلول لاستخلاص الأنزيم هو 0.1% من محلول ستايل ثلاثي مثيل أمونيوم برومايد (CTAB) مقارنة مع استعمال 0.1% من كل من الكلوروفورم والتلون والصوديوم دودسايل سلفايت (SDS) والتون 80 وثنائي مثيل سلفوكسايد (DMS) كلاً على حدة. اخضع الأنزيم لعدة خطوات تنقية اشتملت على تركيز مستخلص الأنزيم الخام بكريتات الأمونيوم وبنسبتي إشباع تراوحت بين 25-75% ثم الديلزلة وامرار المحلول الأنزيمي على عمود كروموتوكرافيا التبادل الأيوني نوع DEAE-Cellulose ثم الترشيح الهلامي على عمود Sephacryl S-200SF وبلغ عدد مرات التنقية 5.34 مرة وبمحصيلة أنزيمية مقدارها 18.89%.

#### المقدمة

تعتمد طريقة استخلاص الإنزيمات الميكروبية على نوع الإنزيم سواء كان افرازه داخل الخلية أو خارجها وعلى طريقة استعماله سواء كان بشكل مقيد أو حر. وتشير معظم المصادر إلى ان إنزيم كلوكوز أيزوميريز هو من الإنزيمات الداخلية Intracellular enzyme (19).

تستخلص الإنزيمات الميكروبية الداخلية إما بالسحق الميكانيكي لجدران الخلايا باستعمال التجنيس أو السحق القاشط Abrasive grinding أو باستعمال الذبذبات الصوتية sonic osillation (5، 7، 8، 15). أو باستخدام الطرائق الكيميائية كما في استخدام المذيبات العضوية والمنظفات (Detergents) بنسبة معينة (7، 11). أو باستخدام الطرائق الإنزيمية كما في استخدام اللايسوزايم Lysozyme الذي يحلل جدران الخلايا الميكروبية (20).

إن استعمال أي من الطرائق يؤدي إلى تحلل جدران الخلايا وتحرر الإنزيمات من داخل الخلية إلى وسط النمو. استعملت في هذه الدراسة بعض المذيبات العضوية لغرض استخلاص الأنزيم من بكتريا *Streptomyces sp. HM5* نظراً إلى كفاءة هذه الطريقة وسهولة استخدامها (7). أما فيما يتعلق بتنقية الأنزيم فقد وردت طرائق متعددة لتنقية الأنزيم المنتج من الأحياء المجهرية، وجدير بالذكر انه لا يوجد ترتيب ثابت لخطوات تنقية الإنزيمات ولكن مع ذلك فإن المعاملة الحرارية - إذا كان بالإمكان استعمالها - والترسيب بكريتات الأمونيوم أو المذيبات العضوية أو التركيز بالتجفيد أو الترشيح الفائق تمثل المراحل المبكرة في عمليات التنقية لغرض تركيز الأنزيم وتخليصه من أكبر كمية ممكنة من الماء الموجود في مستخلصه ومن ثم تقليص حجمه ورفع كفاءة التنقية (1، 18). يعقب عملية التركيز امرار المحلول الأنزيمي على عمود مبادل ايوني يعقبها أما عملية البلورة (crystallization) (13، 17). أو الترشيح الهلامي (2، 12) لضمان رفع كفاءة التنقية.

اطروحة دكتوراة للباحث الثاني.

\* جامعة جنوب داكوتا-الولايات المتحدة الامريكية.

\*\* كلية الزراعة، جامعة بغداد، بغداد، العراق.

تاريخ تسلم البحث: 1/2006.

تاريخ قبول البحث: 1/2009.

وهدفت هذه الدراسة إلى استخلاص الأنزيم المنتج تحت الظروف المثلى من البكتريا *Streptomyces sp.* HM5 في دراسة سابقة (4) وباستعمال 0.1% من CTAB وتنقيته بتركيزه أولاً بكبريتات الأمونيوم ثم ديلزة اغلول الأنزيمي وامراره على عمود مبادل ايوني واخيراً إجراء عملية الترشيح الهلامي.

## المواد وطرائق البحث

### الكائن المجهرى

استخدم في هذه الدراسة عذلة من بكتريا *Streptomyces sp.* HM5 تم عزلها وتشخيصها في دراسة سابقة (3) والمخفوفة في وسط مانل من Yeast malt extract agar المؤلف من إذابة 0.4 غم من الكلوكوز و1غم من خلاصة المالت و0.4 غم من خلاصة الخميرة و1.8 غم من الاكر في 100 مل من الماء المقطر، تنشط العذلة في الوسط نفسه بدرجة حرارة 30م مدة 48 ساعة قبل الشروع في استخدامها.

### إنتاج الأنزيم

جرى إنتاج الأنزيم من البكتريا *Streptomyces sp.* HM5 بطريقة المزارع المغمورة وفق الظروف المثلى للإنتاج والتي تم التوصل إليها في دراسة سابقة (4) تمثلت بتلقيح 50 مل من الوسط الغذائي المكون 1.5% من الزيلوز و1% من البيتون وذي رقم هيدروجيني ابتدائي 7.5 بلقاح من البكتريا أعلاه وبعد الحضان لمدة 72 ساعة في درجة حرارة 35 مئوية في حاضنة هزازة بسرعة 150 دورة/دقيقة، فصلت الكتلة الحيوية بالنبذ المركزي بسرعة 7000 gx دورة لمدة 20 دقيقة وفي درجة الحرارة 4م، غسلت الخلايا ثلاث مرات بالماء المقطر ونبذت مركزياً تحت الظروف المذكورة انفاً لتهيئتها لعملية الاستخلاص.

### استخلاص الأنزيم

اجري إنتاج الأنزيم كما تم ذكره في هذه الدراسة وتم استخلاص الأنزيم باستخدام طريقة المذيبات العضوية التي ذكرها Chen وجماعته (7). باستخدام 0.1% من كل من الكلوروفورم والتلوين والتوين 80، SDS، DMS وCTAB كلاً على انفراد وحضنت النماذج في 50 مل من المذيبات أعلاه على درجة 30 مئوية لمدة 24 ساعة في سرعة 150 دورة/دقيقة ونبذت مركزياً بسرعة 7000gx دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة بدرجة حرارة 4 مئوية. أهمل الراسب وجمع الرائق الذي عد المستخلص الخام للإنزيم وتم تقدير الفعالية الإنزيمية حسب الطريقة التي ذكرها Takasaki وجماعته (18). مع بعض التحويرات التي ذكرها Kaneko وجماعته (12).

### تنقية الأنزيم

#### تركيز الأنزيم

ركز المستخلص الخام للإنزيم بالترسيب بكبريتات الأمونيوم الصلبة وذلك بإضافتها إلى المستخلص الأنزيمي مع التحريك المستمر حين الإذابة بدرجة حرارة 4م وعلى مرحلتين تبعاً لما ذكره Hughes و Green (11) ففي المرحلة الأولى تم إيصال الاشباع إلى 25% ثم أجريت عملية النبذ المركزي بسرعة 5000 gx دورة/دقيقة لمدة 20 دقيقة وفي درجة حرارة 4م. تم التخلص من الراسب أما الرائق فقد أضيف إليه كبريتات الأمونيوم الصلبة بحيث تم إيصال الإشباع إلى 75% أجريت عملية النبذ المركزي مرة أخرى تحت الظروف السابقة نفسها. فصل الرائق وأذيب الراسب بأقل كمية من محلول فوسفات الصوديوم الدارى بتركيز 0.05 مولاري وبرقم هيدروجيني 7.5 والحاوي على كبريتات المغنسيوم بتركيز 0.005 مولاري. تم تقدير حجم المستخلص الأنزيمي والبروتين بطريقة Lowery وجماعته (16) والفعالية الإنزيمية والتنوعية للرائق والراسب لجميع مراحل الترسيب.

## الديليزة

تم ديلزة المستخلص الإنزيمي مقابل محلول فوسفات الصوديوم الدارئي بتركيز 0.05 مولاري وبرقم هيدروجيني 7.5 وباستعمال أكياس ديلزة لا تسمح بمرور المركبات ذات الأوزان الجزيئية التي تزيد على 10000 دالتون وفي درجة حرارة 4° م مدة 24 ساعة مع تبديل المحلول أعلاه ثلاث مرات.

## كروموتوكرافيا التبادل الأيوني

مرر المحلول الأنزيمي من الخطوة السابقة على عمود المبادل الأيوني السالب DEAE-cellulose الجهز من شركة Whattman واخضر وفقاً لما ذكره Whitaker وجماعته (21) وبأبعاد 1.6 × 22 سم والذي تمت موازنته بمحلول فوسفات الصوديوم الدارئي بتركيز 0.05 مولاري وبرقم هيدروجيني 7.5 والحاوي على كبريتات المغنسيوم بتركيز 0.005 مولاري. جمعت الأجزاء المفصولة من العمود بجهاز جامع الأجزاء fraction collector وبسرعة جريان مقدارها 36 مل/ساعة وبواقع 2.4 مل للجزء الواحد.

تمت متابعة الامتصاصية على طول موجي 280 نانومتر للأجزاء المفصولة في مرحلة الغسل washing وعند وصول الامتصاصية إلى الخط الأساس base line جرت عملية استرداد Elution البروتينات المرتبطة بالمبادل الأيوني السالب باستعمال محلول فوسفات الصوديوم الدارئي مع محلول كلوريد الصوديوم بتركيز تراوحت من 0 - 1 مولاري وبأسلوب التدرج الملحي الخطي Linear salt gradient وتم متابعة الامتصاصية للأجزاء المفصولة من العمود على طول موجي 280 نانومتر وقدرت فعاليتها وتركيز البروتين فيها وركزت هذه الأجزاء باستعمال بولي اثلين كليكول نوع PEG-13000-14000 (14).

## كروموتوكرافيا الترشيح الهلامي

مرر المحلول الأنزيمي من الخطوة السابقة على عمود الترشيح الهلامي SephaerylS-200SF الاخضر وفقاً لتعليمات الشركة المجهزة Fine chemical spharmacia وبأبعاد 1.6 × 48 سم واجريت عملية الغسل Washing والاسترداد Elution بمحلول فوسفات الصوديوم الدارئي المذكور في خطوة التنقية السابقة وبسرعة جريان مقدارها 36 مل/ساعة وتمت متابعة الامتصاصية للأجزاء المفصولة على طول موجي 280 نانومتر. جمعت الأجزاء الفعالة وقيس حجمها وقدرت فعاليتها وتركيز البروتين فيها ثم ركزت باستخدام بولي اثلين كليكول نوع PEG 13000-14000. ووزع في أنابيب اختبار بواقع 1 مل واحتفظ به في المجمدة بدرجة حرارة - 18 مئوي.

## تقدير فعالية الأنزيم

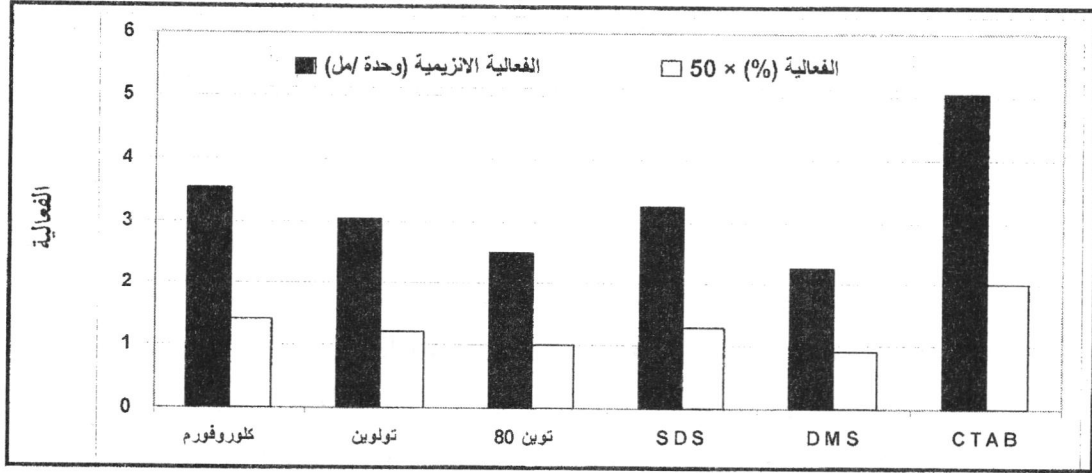
قدرت فعالية الأنزيم حسب الطريقة التي ذكرها Takasaki وجماعته (18) مع بعض التحويلات التي ذكرها Kaneko وجماعته (12). وعرفت وحدة الفعالية بأنها كمية الإنزيم التي تحرر مايكرومول واحد من الفركتوز في الدقيقة الواحدة تحت ظروف التجربة.

## النتائج والمناقشة

## استخلاص الأنزيم

أظهرت النتائج الموضحة في الشكل (1) إن المركب ستايل ثلاثي مثيل امونيوم برومايد (CTAB) وهو من المنظفات الموجبة الشحنة Cationic detergent يعد افضل مذيب يمكن استعماله لاستخلاص الأنزيم من البكتريا قيد الدراسة بدلالة فعالية الأنزيم في المستخلص والتي بلغت 5.05 وحدة/مل في حين تراوحت الفعالية الانزيمية بين 2.26 - 3.53 وحدة/مل في مستخلصات المذيبات الأخرى. أي إن نسبة الزيادة في الفعالية الأنزيمية في المعاملة التي

استعمل فيها CTAB كمذيب للاستخلاص كانت أعلى بمقدار 30% مقارنة مع الفعالية الأنزيمية لأقرب معاملة وهي التي استعمل فيها الكلوروفورم كمذيب للاستخلاص. وقد يعود السبب في أفضلية استعمال CTAB كمذيب للاستخلاص إلى تركيب الجدار الخلوي لبكتريا *Streptomyces* الذي يذوب بدرجة أعلى في المذيبات ذات الشحنة الموجبة مثل CTAB مقارنة بالمذيبات ذات الشحنة السالبة مثل SDS أو المتعادلة مثل Tween 80 والتلويين والكلوروفورم.



شكل 1: مقارنة كفاءة المذيبات المختلفة في استخلاص إنزيم كلوكوز ايزوميريز المنتج من بكتريا *Streptomyces* sp. HM5

وتتفق هذه النتائج مع ما وجدته Chen وجماعته (7) الذين أشاروا إلى ارتفاع الفعالية الأنزيمية بمقدار 20% باستعمال CTAB مقارنة مع استعمال الطرائق الميكانيكية كطريقة التكسير بالموجات الصوتية أو التكسير بالحبيبات الزجاجية أو باستعمال المذيبات العضوية الأخرى كالكلوروفورم والتلويين. تنقية الأنزيم

يلخص الجدول (1) خطوات تنقية إنزيم كلوكوز ايزوميريز من البكتريا *Streptomyces* sp. HM5 تمثلت الخطوة الأولى منها بتركيز الأنزيم بالترسيب بكبريتات الأمونيوم حيث حققت هذه الخطوة تنقية جزئية للإنزيم بلغت 1.86 مرة وبمحصلة أنزيمية 33.44% إذ تقوم كبريتات الأمونيوم بمعادلة الشحنات الموجودة على سطح البروتين وإحداث اخلال Disruption بطبقة الماء المحيطة بالبروتين وخفض درجة تقيتها (degree of hydration) ومن ثم انخفاض ذائبية البروتين وترسيبه (10). إن شيوع استعمال كبريتات الأمونيوم في ترسيب البروتينات يعود إلى ذائبيتها وقلة أو انعدام تأثيرها في تركيب الأنزيم علاوة على توفرها ورخص ثمنها (19).

وقد أمكن زيادة عدد مرات التنقية إلى 2.43 مرة وبمحصلة بلغت 27.78% عند ديلزة المستخلص الأنزيمي المركز بكبريتات الأمونيوم مما يشير إلى إن فعالية الأنزيم تتأثر بهذه الأملاح إذ إن خطوة التنافذ الغشائي (الديلزة) تساعد في التخلص من الأملاح وأزالتها من المحلول الأنزيمي المركز (6).

أعقبت خطوة التركيز والديلزة خطوة تنقية الأنزيم باستعمال كروموتوكرافيا التبادل الأيوني وبين الشكل (2) عدم ظهور قمة واضحة للأجزاء غير المرتبطة بالمبادل (أجزاء الغسل) وإن الامتصاصية لها كانت قريبة جداً من الخط الأساس Base line أي إنها خالية من الفعالية الأنزيمية تماماً مما يؤكد ارتباط الأنزيم بالمبادل الأيوني السالب وإن محصلة الشحنات المحمولة على الأنزيم في الظروف المستخدمة هي شحنات سالبة في حين أمكن الحصول على قمة رئيسية واحدة مع ظهور قمم صغيرة يتراوح عددها من 2-5 قمم متداخلة مع المراحل الأخيرة للقمة الرئيسية وذلك عند إجراء عملية

استرداد الإنزيم بمحلول كلوريد الصوديوم بتركيز 0-1 مولاري وبأسلوب التدرج الملحي الخطي Linear salt gradient وبمقدار 2-3 أضعاف حجم العمود وبمعدل جريان 36 مل/ساعة. بلغ عدد مرات التنقية والحصيلة الأنزيمية التي أمكن الحصول عليها بهذه الخطوات 3.75 مرة و26.68% على الترتيب.

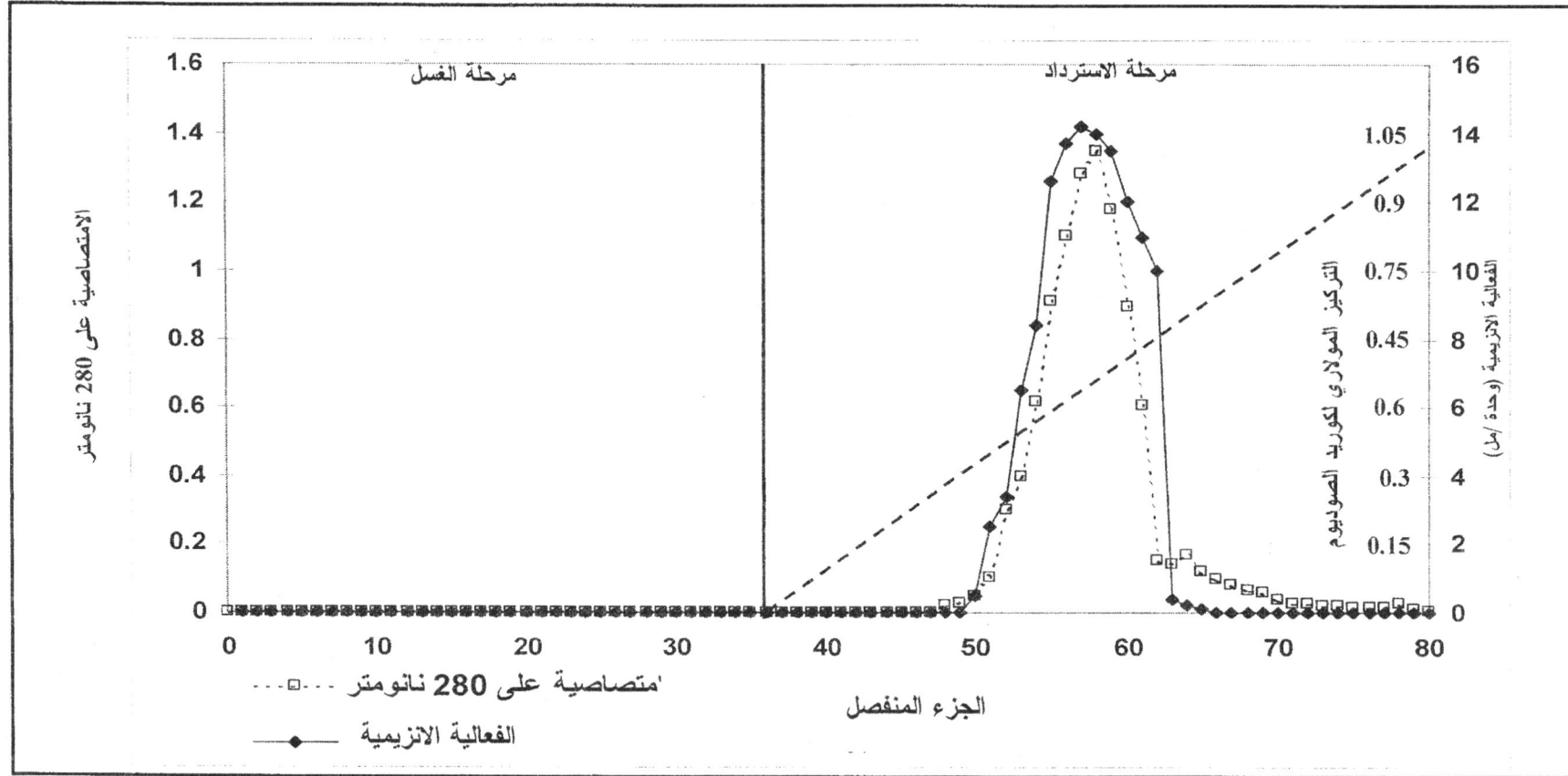
جدول 1: خطوات تنقية إنزيم كلوكوز أيزوميريز المنتج من *Streptomyces* sp.HM5

خطوات التنقية	الحجم (مل)	الفعالية الإنزيمية (وحدة/مل)	تركيز البروتين (ملغم/مل)	الفعالية النوعية (وحدة/ملغم)	عدد مرات التنقية	الفعالية الكلية (وحدة)	الحصيلة الأنزيمية (%)
المستخلص الخام	145	9.4	1.9	4.94	1	1363	100
الترسيب بكرياتات الامونيوم بنسبة اشباع (25-75%)	41	10.12	1.1	9.2	1.86	414.92	30.44
الديليزة Dialysis	35	10.82	0.9	12.02	2.43	378.70	27.78
التبادل الأيوني السالب باستخدام DEAE-cellulose وبأسلوب التدرج الملحي الخطي بتركيز 0-1 مولاري	20	14.10	0.76	18.55	3.75	282	20.68
الترشيح الهلامي باستعمال هلام Sephacryl S200-SF	15	17.17	0.65	26.41	5.34	275.55	18.89

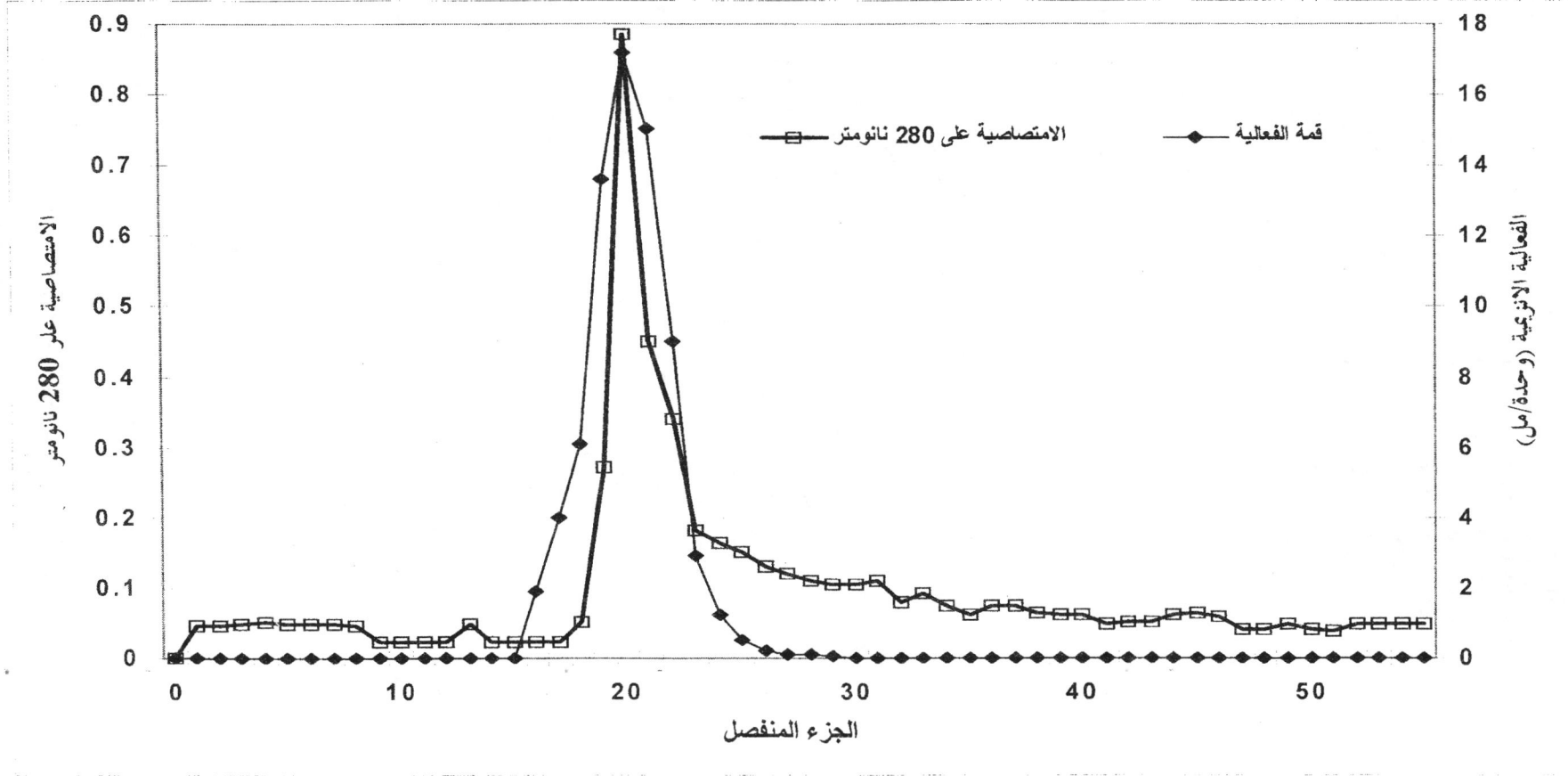
استكملت التنقية بخطوة أخرى هي خطوة الترشيح الهلامي على عمود Sephacryl S-200 SF. ويلاحظ من الشكل (3) إن الأجزاء المستردة من خطوة الترشيح الهلامي تضمنت ظهور قمة امتصاصية رئيسة واحدة فقط مع ظهور 5-6 قمم صغيرة قريبة من الخط الأساس وعند قياس الفعالية الأنزيمية للأجزاء المفصولة تبين ظهور قمة رئيسة مطابقة لقمة الامتصاصية الرئيسية مما يدل دلالة أولية على نقاوة الأنزيم. جمعت أجزاء هذه القمة وقدر حجمها وتركيز البروتين فيها علاوة على فعالية الأنزيم فوجد أنها تبلغ 17.17 وحدة/مل أما فعاليتها النوعية فكانت 26.41 وحدة/ملغم. كما ارتفع عدد مرات التنقية اثر هذه الخطوة إلى 5.34 مرة وبحصيلة أنزيمية مقدارها 18.89% (جدول 1).

ويذكر إن معظم المصادر العلمية اشارت إلى استعمال الترشيح الهلامي مع التبادل الأيوني في تنقية الإتريمات عموماً ومنها إنزيم كلوكوز أيزوميريز. فقد أشار Suckane وجماعته (17) إلى تنقية إنزيم كلوكوز أيزوميريز المنتج من بكتيريا *Streptomyces olivochromogenes* وبكتيريا *Bacillus stearotherophilus* بخطوتين شملت الأولى التبادل الأيوني باستعمال DEAE-Sephadex A-50 والثانية بالترشيح الهلامي بهلام Sephadex G-100 وهلام Biogel P-200 بالنسبة للبكتيريا الأولى والثانية على التوالي إذ بلغ عدد مرات التنقية والحصيلة الأنزيمية 3-7 مرات و43% للإنزيم من بكتيريا النوع الأول فيما بلغت 55 مرة و32% للإنزيم من بكتيريا النوع الثاني بعد مرحلة الترشيح الهلامي.

كما أجرى Shankar وDeshmukh (9) تنقية إنزيم كلوكوز أيزوميريز من بكتيريا *Streptomyces thermonitrificans* بخطوتي التبادل الأيوني ثم الترشيح الهلامي بعد تركيزه بكرياتات الامونيوم وحصل على عدد مرات تنقيه مقدارها 10.37 مرة وحصيلة أنزيمية مقدارها 15.15% في المراحل الاخيره من التنقية.



شكل 2: كروماتوغرافيا التبادل الأيوني لتنقية أنزيم كلوكوز ايزوميريز المنتج من *Streptomyces sp HM5* باستعمال عمود DEAE-cellulose بأبعاد (22×1.6) سم الموازن بمحلول فوسفات الصوديوم الدارئي بتركيز 0.05 مولاري وبرقم هيدروجيني 7.5 والحاوي على كبريتات المغنسيوم بتركيز 0.005 مولاري. جرى الاسترداد بالمحلول الدارئي نفسه وبسرعة جريان 36 مل/ساعة.



شكل 3: كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي لتنقية انزيم كلوكوز ايزوميريز المنتج من *Streptomyces sp HM5* باستعمال عمود Sephacryl S200-SF بابعاد (48×1.6) سم الموازن بمحلول فوسفات الصوديوم الدائري بتركيز 0.05 مولاري وبرقم هيدروجيني 7.5 والحاوي على كبريتات المغنيسيوم بتركيز 0.005 مولاري. جرى الاسترداد بالمحلول الدائري نفسه وبسرعة جريان 36 مل/ساعة.

في حين اشار Kaneko وجماعته (12) الى ان استعمال الترشيح الهلامي بعد خطوة التبادل الايوني في تنقية الانزيم المنتج من بكتريا *Streptomyces olivaceovirids* E-86 ادت الى استرداد الانزيم بمحصيلة مقدارها 33.2% وزيادة عدد مرات التنقيه الى 5.5 مرة.

خلصت هذه الدراسة الى ان افضل محلول لاستخلاص الانزيم هو CTAB مقارنة مع اخلايل الاخرى والتي استخدمت في هذه الدراسة وانه يمكن الحصول على الانزيم بنسبة تبلغ 18.89% وبعدها مرات تنقيه بلغ 5.34 مرة في حالة اتباع الخطوات المذكوره في هذه الدراسة والمتمثلة بالتركيز بكتريبات الامونيوم ثم التبادل الايوني واخيرا الترشيح الهلامي.

### المصادر

- 1- العبيدي، سعد حسين خضير (2004). استخلاص وتوصيف إنزيم الكلوكوزايزوميريز من البكتريا الخيطية المحلية ودراسة تحسين إنتاجه باستخدام أشعة كاما. أطروحة دكتوراه. كلية العلوم-جامعة بغداد، العراق.
- 2- دلاي، باسل كامل (1983). فهم الانزيمات مطابع جامعة الموصل. جامعة الموصل (ترجمه).
- 3- محي الدين، محمد عمر؛ حميد عبود جبر وباسل كامل دلاي (2004). إنتاج إنزيم كلوكوزايزوميريز من عزلة محلية من بكتريا *Streptomyces* sp. HM5. 1- العزل والغربلة والتشخيص. مجلة ديالى للبحوث العلمية والتربوية. 24: 89-109.
- 4- محي الدين، محمد عمر؛ حميد عبود جبر وباسل كامل دلاي (2004). إنتاج إنزيم كلوكوزايزوميريز من عزلة محلية من بكتريا *Streptomyces* sp. HM5. 2- تعيين الظروف المثلى لإنتاج إنزيم الكلوكوزايزوميريز بطريقة المزارع المغمورة. مجلة ديالى للبحوث العلمية والتربوية. 274: 31-293.
- 5- Bhatia, M. and K.A. Prabhu (1980). Production of high-fructose syrup by a heat-fixed *Lactobacillus* sp. *Biotechnol. Bioeng.* 12: 1957-1977.
- 6- Chen, W.P. and A.W. Anderson (1979). Purification, immobilization, and some properties of glucose isomerase from *Streptomyces*. *Appl. Environ. Microbiol.* 38:1111-1119.
- 7- Chen, W.P.; A.W. Anderson and, Y.W. Han (1979). Extraction of glucose isomerase from *Streptomyces flavogriseus*. *Appl. Environ. Microbio.*, 37: 785-787.
- 8- Chou, C.C.; M.R. Ladisch and G.T. Tsao (1976). Studies on glucose isomerase from *Streptomyces* sp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 32: 489-493.
- 9- Deshmukh, S.S. and V. Shankar (1996). Glucose isomerase from thermophilic *Streptomyces thermonitrificans*: purification and characterization. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 24: 65-72.
- 10- Englard, E.M. and S. Seifter (1990). Precipitation techniques. In: *Method in enzymology* (edited by Murray, E.D. and P. Dentscher), 182: 425-441.
- 11- Green, A.A. and W.L. Hughes (1955). Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solution of salts and organic solvents. *Method in Enzymology* Vol. 1: 67-78. (Edited by Colowick, S.P. and Kaplan, N.O.) Academic Press, INC. New York.
- 12- Kaneko, T.; S. Takahashi and K. Saito (2000). Characterization of acid-stable glucose isomerase from *Streptomyces* sp. and development of single-step processes for high-fructose corn sweetener production. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64 (5): 940-947.
- 13- Kasumi, T.; K. Hayashi and N. Tsumure (1981). Purification and enzymatic properties of glucose isomerase from *Streptomyces griseofuscus* S-41. *Agric. Biol. Chem.*, 45 (3): 619-627.
- 14- Kornberg, A. (1990). Why purify enzymes. "In: *Methods in Enzymology*" Vol. 182 (edited by Deutscher, M.P.) 1-5, Academic Press, New York.
- 15- Kwon, H.; M Kitada and K. Horikosh (1987). Purification and properties of D- glucose/xylose isomerase from alkalophilic *Bacillus* No. Kx-6. *Agri. Biol-Chem.*, 51(7): 1983-1989.

- 16- Lowery, O.H.; N.J. Roseborough; A.L. Farr and R.J. Randall (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:256-272.
- 17- Suekane, M.; M. Tamura and C. Tomimura (1978). Physico-chemical and enzymatic properties of purified glucose isomerase from *Streptomyces olivochromogenes* and *Bacillus stearothermophilus*. *Agri. Biol. Chem.*, 42(5): 909-917.
- 18- Takasaki, Y;S. Kosugi and A. Kanbayashi (1969). Studies on sugar isomerization enzyme. Production, crystallization and some properties of glucose isomerase from *Streptomyces* sp. *Agric. Biol. Chem.*, 33: 1527-1534.
- 19- Volesky, B. and I. Laong (1985). Microbial enzymes production, purification and isolation. *Critical reviews in Biotechnology*, 2: 119-146.
- 20- Wang, F.; R.D. Whitaker and C. A. Bat (1998). Production of glucose isomerase in a recombinant strain of *Streptomyces lividans*. *Appli. Microbiol. Biotechnol.*, 50: 65-70.
- 21- Whitaker, J.R. (1972). *Principle of Enzymology for Food Science*. Marcel Dekker, Inc. New York, USA.

## EXTRACTION AND PURIFICATION OF GLUCOSE ISOMERASE PRODUCED FROM LOCAL ISOLATE OF *Streptomyces* sp. HM5

B. K. Dalaly\*

H. A. Jabur\*\*

M. O. Muhyaddin\*\*

### ABSTRACT

Glucose isomerase was extracted from *Streptomyces* sp-HM5 that had grown under optimum conditions for enzyme production.

The optimum extraction process was performed with 0.1% Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) as compared with each of 0.1% Chloroform, Toluene, Tween 80, Sodium dodecyl sulfate (SDS), Dimethyl sulfoxide (DMS). Glucose isomerase was purified for several steps that included concentration of extracted crude enzyme by precipitation with ammonium sulfate at 25-75%, then dialysis, ion exchange chromatography by using DEAE-cellulose and gel filtration on Sephacryl S-200 SF colum. The purification folds and the yield of the enzyme was 5.34 and 18.89% respectively.

---

\* Univ. OF South Dakota- USA.

\*\* College of Agric., Univ. of Baghdad, Baghdad, Iraq.