تحديد الظروف المثلى لإنتاج إنزيم L-arabinose isomerase من العزلة المحلية *Bacillus subtilis* AH1 .

علي حامد طامي **حميد عبود جبر***
* استاذ مساعد - قسم علوم الأغذية - كلية الزراعة - جامعة بغداد . alihamedtame@yahoo.com

المستخلص

تم تحديد الظروف المثلى لإنتاج إنزيم الارابينوز ايزوميريز من العزلة المحلية *Bacillus subtilis* AH1 بطريقة المزارع المغمورة فتبين ان افضل تلك الظروف هو باستخدام وسط يحتوي على الكالاكتوز بتركيز 2 % مصدراً للكاربون والارابينوز بتركيز 0.15 % مادة حاثة لإنتاج الإنزيم وخلاصة الخميرة والببتون بتركيز 1% لكل منهما مصدراً للنتروجين وكبريتات المغنيسيوم وكبريتات المنغنيز بتركيز 0.02 % و 0.002 % على التوالي ، مصدراً للايونات المعدنية وبرقم هيدروجيني 7.5 بعد 48 ساعة من الحضن في درجة حرارة 30 °م .

الكلمات المفتاحية: إنزيم ارابينوز ايزوميريز ، بكتريا *Bacillus subtilis* AH1 .

المقدمة

يعد إنزيم (L-AI EC. 5.3.1.4) L–arabinose isomerase من الإنزيمات التي تنتج داخل الخلايا Intracellular enzyme ، وهو من الانظمة البايولوجية إذ يحفز التفاعل العكسي لتحويل سكر الارابينوز L– arabinose الى سكر الرايبولوز L– ribulose ضمن مسار الفوسفات الخماسي Pentose phosphate pathway كما يعمل على تحويل سكر الكالاكتوز D– Galactose الى سكر D - Tagatose بعملية التحويل Isomerization ايضا خارج جسم الكائن الحي (Jin-Ha) Kim واخرون ، 2010) وحاليا تعد إنزيمات الايزوميريز ذات اهمية كبيرة لأنها تؤدي دوراً مهماً في تركيب السكريات غير المألوفة والتي تصنف كونها من السكريات النادرة (Izumori ، 2002) ، لوجودها بالطبيعة بكميات قليلة فضلا عن ارتفاع تكاليف إنتاجها كيميائياً .

تم إنتاج انزيم ارابينوز ايزوميريز من عدة مصادر بكتيرية استخدم في إنتاج سكر تاكاتوز D– Tagatose إلا ان القليل منه تمت تنقيتهُ وتشخيصهُ (Roh واخرون ، 2000 ؛ Kim واخرون ، 2002 ؛ Jorgenson واخرون ، 2004 ؛ Lee D.W واخرون ، 2005 ؛ Kim وOh ، 2005). ونظراً للأهمية التطبيقية لأنزيم ارابينوز ايزوميريز L– arabinose isomerase فقد ركزت البحوث والدراسات على إنتاجه من الأحياء المجهرية .

يعد السكر الكيتوني التاكاتوز هو الايزوميـر Isomer للسكر الالديهيدي الكالاكتوز وابيمير Epimer للسكر الكيتوني فركتوز في ذرة كاربون رقم 4 ، تم التعرف عليه كأحد المركبات الموجودة في افرازات الصمغ التي تفرزها شجرة الكاكاو(*Sterculia setigera*) (Hirst واخرون ، 1949) ، يتميز سكر التاكاتوز بحلاوته العالية التي تعادل حوالي 92% من حلاوة سكر السكروز ويعطي المذاق نفسه (Tomomi ، 2012). كما يعد من السكريات المنخفضة الطاقة إذ يعطي أقل من نصف السعرات التي يعطيها سكر السكروز أي ما يعادل 1.5 / غم سكر تقريباً (Deok-Kun ، 2007) وذكر ايضاً كل من Livesey و Brown ، (1996) بأن السكر خال من السعرات الحرارية في تجارب اجراها على الجرذان . ويمكن استخدام التاكاتوز في الصناعات الغذائية اذ صنف من منظمة الغذاء والدواء Food and Drug Administration (FDA) بأنه من المواد التي يمكن استخدامها بأمان Generally regarded as save (GRAS) (Gilbert ، 2002).

ويتميز التاكاتوز بأنه لا يرفع نسبة الكلوكوز في الدم لأنه يتأيض بطريقة مختلفة عن تأيض السكروز وليس له تاثير على مرضى السكري اي لايوجد لهُ ما يسمى بالتاثير الملين Laxative effect او رفع

تاريخ تسلم البحث 20 / 8 / 2014 .
تاريخ قبول النشر 21 / 12 / 2014 .
البحث جزء من رسالة ماجستير للباحث الاول
http://www.agriculmag.uodiyala.edu.iq/

معامل السكر في الدم Glycemic index بعكس بقية السكريات الالديهايدية من نوع Polyols (Chiu ، 2011). كما ان التاكاتوز لا يسبب تسوس الاسنان (Lu و Levin ، 2002). وأنه ينظم توازن الرطوبة النسبية Equilibrium relative humidity (ERH) وبذلك يمكن استخدامهُ في تنظيم رطوبة الاغذية (Grant و Bell ، 2012).

كل هذه الصفات شجعت المهتمين في مجال تصنيع الاغذية على استخدام التاكاتوز بديلاً عن السكروز .

المواد وطرائق البحث

شملت مصادر العزل اربع عينات من التربة تم الحصول عليها من منطقة (ابو غريب) ومنطقة الدورة وحدائق كلية الزراعة / جامعة بغداد. واستعمل في العزل وسط الاساس السائل وفق ماذكره Zhang واخرون ، (2007) ، ولانتاج الإنزيم استعملت طريقة المزارع المغمورة حسب الطريقة التي ذكرها Lobanok واخرون ، (1998) ، بأستعمال حاضنة هزازة ، إذ لقحت دوارق زجاجية سعة 300 مل حاوية على 50 مل من وسط السائل الاساسٌ بـ 4 مل من عالق البكتريا ويحتوي 1مل من العالق ما يقارب 3 x 10^8 خلية / مل حضنت الدوارق في درجة حرارة 30 ºم لمدة 48 ساعة بسرعة تحريك بلغت 150 دورة / دقيقة ، فصلت الكتلة الحيوية من وسط الإنتاج بالنبذ المركزي المبرد على سرعة 8000 دورة / الدقيقة لمدة 20 دقيقة على درجة حرارة 4 ºم. تم التخلص من الرائق ، أما الراسب الذي يحوي الخلايا الكاملة فقد تم غسلها بماء مقطر بحجم يعادل حجم وسط الإنتاج 50 مل ونبذت الخلايا مركزيا بالطريقة نفسها كررت العملية مرتين وتم التخلص من الرائق واستعمل الراسب الناتج لاستخلاص الإنزيم من الخلايا.

تم استخلاص الإنزيم من الخلايا الكاملة حسب الطريقة التي ذكرها Chen واخرون ، (1979)، وقدرت الفعالية الإنزيمية وفق ما ذكره Zhang واخرون ،(2007) مع بعض التحويرات وذلك بتقدير التاكاتوز المتكون باستعمال سكر الكالاكتوز كمادة اساسية ، حيث اضيف 0.1 مل من مستخلص الإنزيم الى محلول التفاعل المتكون من 0.5 مل من محلول دارئ فوسفات البوتاسيوم تركيزه 0.1 مولاري ذو (pH 7.5) و 0.2 مل من محلول الكالاكتوز تركيزه 0.5 مولاري ، وحضن المزيج في درجة حرارة 50º م لمدة 30 دقيقة في حمام مائي ، ثم اوقف التفاعل بأضافة 1 مل من محلول حامض البيروكلوريك بتركيز 0.5 مولاري ، تم الكشف عن التاكاتوز Tagatose الناتج من التفاعل الإنزيمي حسب الطريقة التي ذكرها Dische و Borenfreund ،(1951) . وعرفت الوحدة الإنزيمية بأنها كمية الإنزيم التي تحرر مايكرومول واحد من التاكاتوز في الدقيقة الواحدة تحت ظروف التجربة.

النتائج والمناقشة

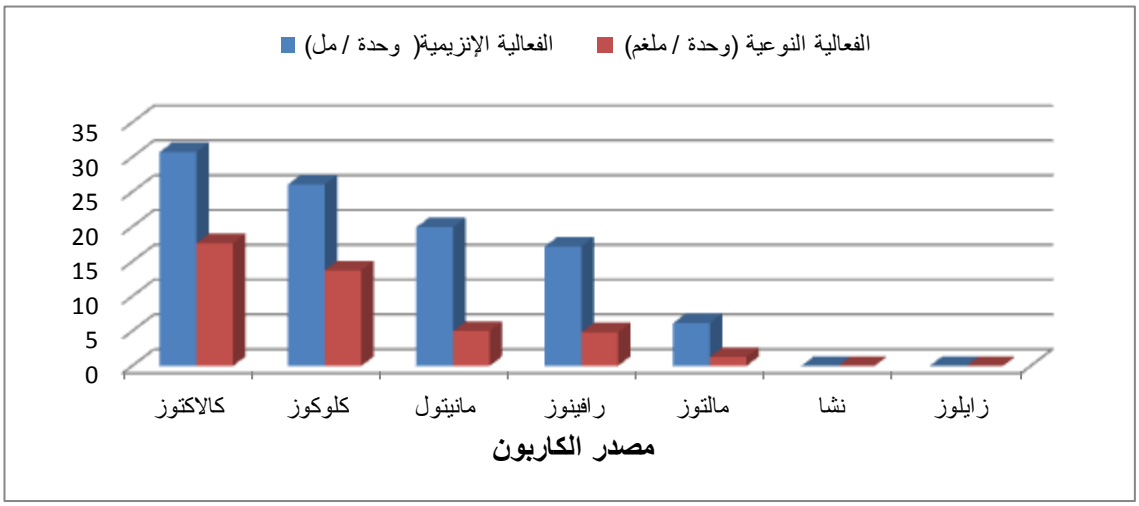
شخصت العزلة حسب المراجع العلمية المعتمدة في تشخيص الاحياء المجهرية (Harrigan و Mac Cance ، 1979 ؛ Logan وDe Vos ، 2009) اتضح ان العزلة تعود الى البكتريا *Bacillus subtilis* ورمز لها AH1 تميزا لها.

تحديد الظروف المثلى لإنتاج الإنزيم:

1 – تحديد مصدر الكاربون الامثل

استعملت سبعة مصادر كاربونية مختلفة شملت الكالاكتوز ، والكلوكوز ، والمانيتول ، والارافينوز ، والمالتوز ، والنشأ والزايلوز كلاً على حدة وبتركيز 1 % في تنمية بكتريا *Bacillus subtilis* AH1 . ودرس تأثيرها في تحديد الإنتاج الامثل لإنزيم L-arabinose isomerase وبوجود سكر الارابينوز كمادة حاثة لإنتاج الإنزيم . اظهرت النتائج (الشكل 1) تفوق المعاملة التي استعمل الكالاكتوز فيها إذ بلغت الفعالية الإنزيمية 30.74 وحدة / مل والفعالية النوعية 17.62 وحدة / ملغم يليها الكلوكوز ، مانيتول ، رافينوز ، مالتوز ، نشأ ، وزايلوز إذ تراوحت الفعالية الإنزيمية عند استخدام هذه السكريات بين 6.14 - 26.08 وحدة / مل على التوالي ، وتراوحت الفعالية النوعية بين 1.28 – 17.62 وحدة / ملغم على التوالي . بينما لم تظهر أي فعالية إنزيمية بإستخدام النشأ والزايلوز مما يشير الى عدم

قدرة البكتريا على إنتاج الإنزيم بإستعمال هذه المصادر الكاربونية . وتختلف قابلية الاحياء المجهرية في إنتاج الإنزيم تبعاً لإختلاف نوع الكائن ونوع المصادر الكاربونية المستخدمة في إنتاج الإنزيم .



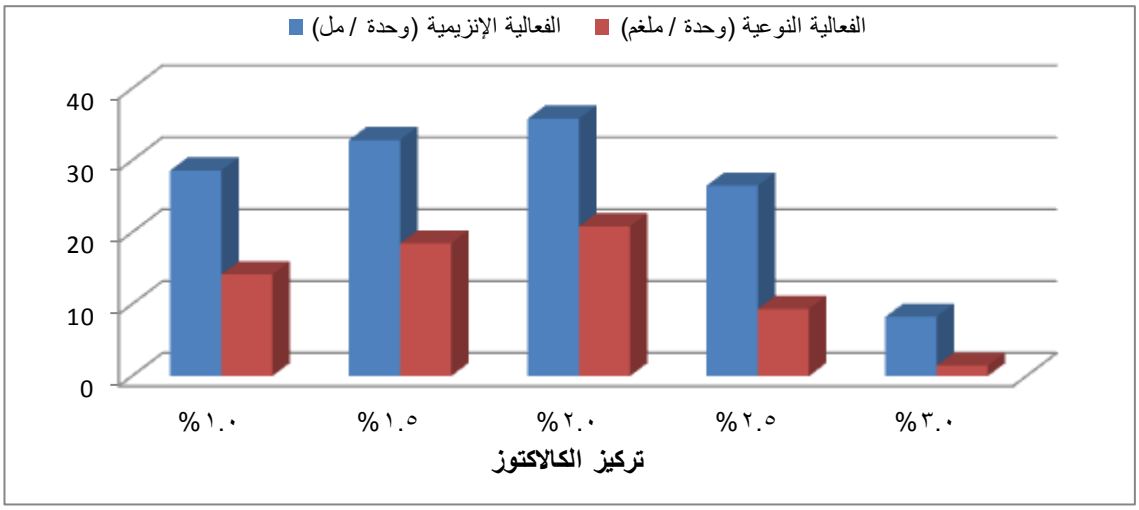
الشكل 1 . تاثير مصدر الكاربون في إنتاج إنزيم ارابينوز ايزوميريز من البكتريا *Bacillus subtilis* AH1 بوجود سكر الاربينوز مادة حاثة.

كما وجد Yanjun واخرون ، (2011) ان الوسط المستخدم في إنتاج إنزيم ارابينوز ايزوميريز من بكتريا *Anoxybacillus flavithermus* ينبغي ان يحتوي على الارابينوز مصدراً للكاربون . واشار كلٌ من Zheng واخرين ، (2012) الى اقصى إنتاج لإنزيم ارابينوز ايزوميرز تم الحصول عليه من بكتريا *Lactobacillus fermentum* CGMCC292 بإستخدام الكلوكوز مصدراً للكاربون. وبناءً على هذه النتائج فقد تم اختيار الكالاكتوز بوصفه مصدراً للكاربون في المراحل اللاحقة من الدراسة.

2 - التركيز الامثل للكالاكتوز

اظهرت النتائج الموضحة في (الشكل 2) ان افضل تركيز للكالاكتوز لغرض إنتاج الإنزيم هو 2% حيث ان الفعالية الإنزيمية والفعالية النوعية كانت 35.83 وحدة / مل 20.84 وحدة / ملغم على التوالي. إذ بلغت اقصاها عند التركيز 2% مقارنة مع بقية التراكيز من 1 – 3 % . مما يشير الى ان الكالاكتوز هو افضل مصدر للكاربون وبتركيز 2% بالمقارنة مع بقية التراكيز.

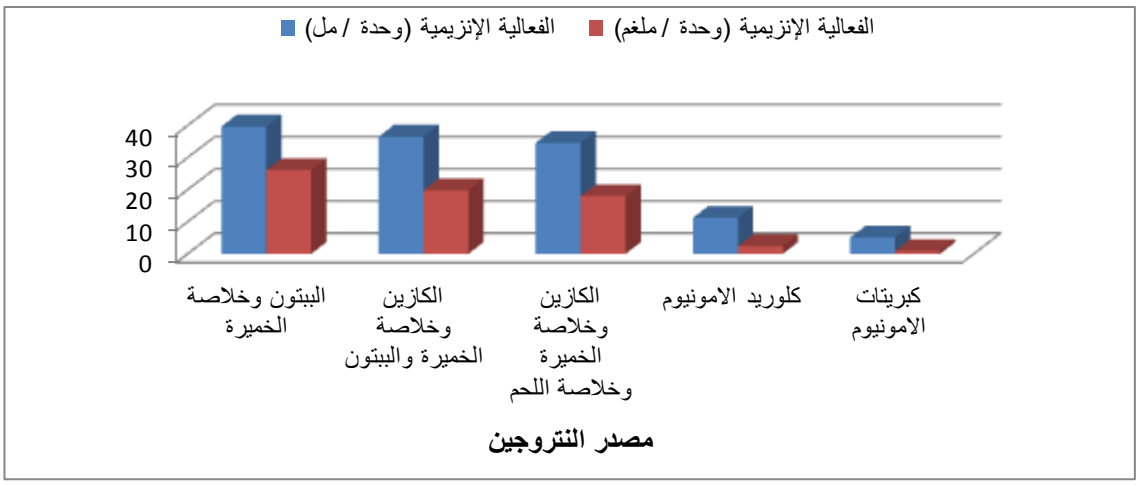
وجاءت هذه النتائج متباينة مع النتائج التي توصل اليها عدد من الباحثين عند دراسة تأثير التركيز الامثل في إنتاج إنزيم الارابينوز ايزوميريز فقد اشار Zakaria ، (2001) إلى ان افضل تركيز من الكالاكتوز لإنتاج إنزيم ارابينوز ايزوميريز من بكتريا *Mycobacterium smegmatis* هو 0.5 %. بينما استعمل Moez واخرون ، (2010) الكلوكوز بتركيز 0.5 % في وسط إنتاج الإنزيم ارابينوز ايزوميريز من بكتريا *Lactobacillus sakei* 23k.



الشكل 2 . تحديد التركيز الامثل من الكالاكتوز لإنتاج إنزيم ارابينوز ايزوميريز المنتج من العزلة المحلية لبكتريا *Bacillus subtilis* AH1 بوجود سكر الارابينوز كمادة حاثة.

3 - مصدر النتروجين الامثل

وضحت النتائج المبينة في (الشكل 3) ان افضل المصادر للنتروجينية لإنتاج لإنزيم ارابينوز ايزوميرز من العزلة المحلية *Bacillus subtilis* AH1 هو استخدام البيتون وخلاصة الخميرة بتركيز 1% لكل منهما ، إذ بلغت الفعالية الإنزيمية 39.65 وحدة / مل والفعالية النوعية 25.97 وحدة / مل مقارنة مع بقية المعاملات التي تراوحت فيها الفعالية الإنزيمية بين 5.08 - 36.47 وحدة / مل والفعالية النوعية 0.88 - 19.78 ملغم / مل. اتفقت هذه النتيجة مع ما ذكره Roh واخرون ، (2000) ان استخدام البيتون وخلاصة الخميرة بتركيز 0.75 ، 0.45 % على التوالي اعطى أعلى فعالية إنزيمية لإنزيم الارابينوز ايزوميريز للجين المكلون في بكتريا *E. coli* ، وعلى خلاف النتائج السابقة. فقد اشار Givry و Duchiron ، (2008) الى ان استخدام المصادر النتروجينية اللاعضوية مثل سترات الصوديوم كمصدر للنتروجين في إنتاج الإنزيم من بكتريا *Lactobacillus bifermentans* اعطى اعلى فعالية إنزيمية إذ بلغت 9.4 وحدة / مل تحت ظروف التجربة. ان اسباب هذا التباين في نوع المصدر النتروجيني وتركيزه الذي يعتمد على الكائن المجهري في إنتاج الإنزيم قد يعود الى نوع الاحياء المجهرية المستخدمة.

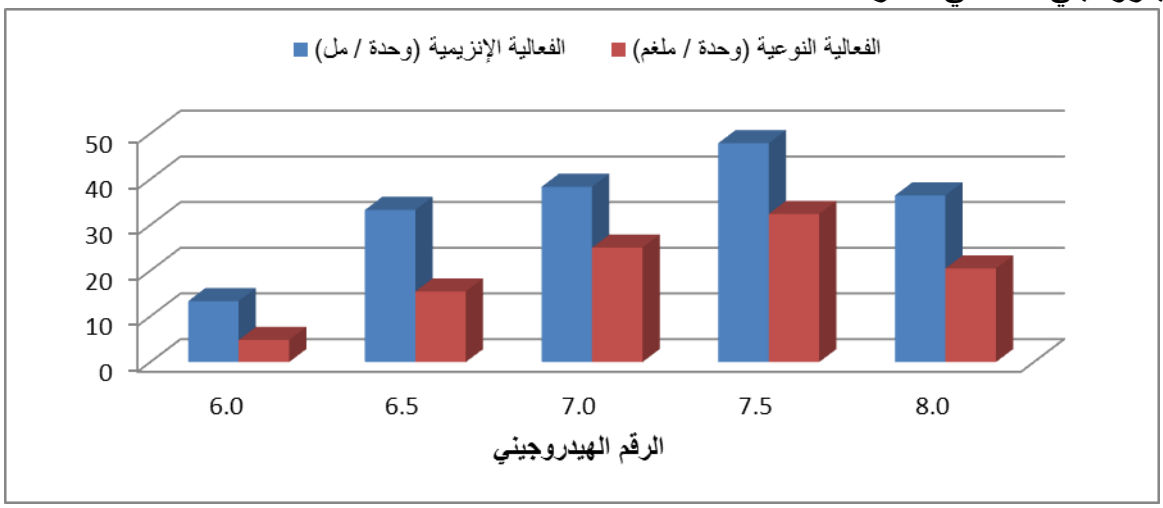


الشكل 3 . تأثير مصدر النتروجين في إنتاج إنزيم ارابينوز ايزوميريز من العزلة المحلية لبكتريا *Bacillus subtilis* AH1 بإستعمال مصادر نتروجينة مختلفة.

4 - الرقم الهيدروجيني الامثل لإنتاج الإنزيم

اختبرت قابلية العزلة المحلية *Bacillus subtilis* AH1 على إنتاج إنزيم ارابينوز ايزوميريز باستخدام الوسط الاساسٌ السائل بأرقام هيدروجينية مختلفة تراوحت من 6.0 – 8.0 وبفارق 0.5 بين درجة واخرى ، إذ بينت النتائج في (الشكل 4) قابلية العزلة على إنتاج الإنزيم في قيم عند pH 7.5 حيث كانت الفعالية الإنزيمية والفعالية النوعية 47.92 وحدة / مل ، 32.42 وحدة / ملغم على التوالي . بينما تراوحت قيم الفعالية الإنزيمية والفعالية النوعية للمعاملات الاخرى بين 13.35 – 38.37 وحدة / مل ، 4.83 – 25.03 وحدة / ملغم على التوالي . عليه عُدَ الرقم الهيدروجيني الامثل لإنتاج إنزيم الارابينوز ايزوميريز من العزلة المحلية لبكتريا *Bacillus subtilis* AH1 هو 7.5 واعتمد في التجارب اللاحقة . فقد ذكر Manjasetty وChance، (2006) ان الرقم الهيدروجيني الامثل لإنتاج الإنزيم من بكتريا *E. coli* هو عند الرقم الهيدروجيني 7.4.

كما وجد Ponnandy Prabhu واخرون، (2008) ان الرقم الهيدروجيني الامثل لإنتاج الإنزيم من بكتريا *Bacillus licheniformis* هو 6.8 . وعلى خلاف ذلك فقد بين Lifang واخرون ، (2010) ان إنتاج الإنزيم من بكتريا *Acidothermus cellulolytics* يتطلب ان يكون الوسط ذا رقم هيدروجيني حامضي مقداره 5.2 .

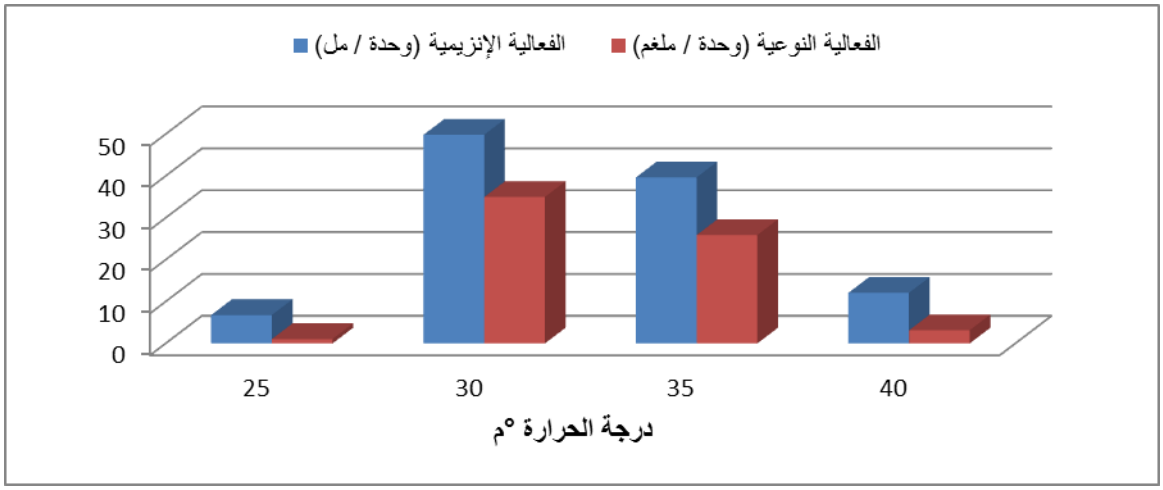


الشكل 4 . تأثير الرقم الهيدروجيني في إنتاج إنزيم الارابينوز ايزوميريز من بكتريا *Bacillus subtilis* AH1.

5 - درجة الحرارة المثلى لإنتاج الإنزيم

اظهرت النتائج الموضحة في (الشكل 5) ان درجة الحرارة المثلى لإنتاج الإنزيم هي 30°م إذ بلغت الفعالية الإنزيمية والفعالية النوعية 49.83 وحدة / مل ، 34.96 وحدة / ملغم على التوالي . بينما تراوحت الفعالية الإنزيمة والفعالية النوعية للمعاملات الاخرى ما بين 6.78 - 39.65 وحدة / مل ، 1.04 – 25.87 وحدة / ملغم على التوالي. تشير هذه النتائج الى ان الارتفاع او الانخفاض بدرجة الحرارة عن الدرجة الحرارية المثلى لإنتاج الإنزيم تؤثر سلبا على خفض الفعالية الإنزيمية والفعالية النوعية للإنزيم المنتج من البكتريا قيد الدراسة. فقد اشار Kim و Oh، (2005) إلى ان افضل درجة حرارة إنتاج للإنزيم كانت عند درجة حرارة 65 °م للإنزيم المنتج من بكتريا *Geobacillus thermodenitrificans*.

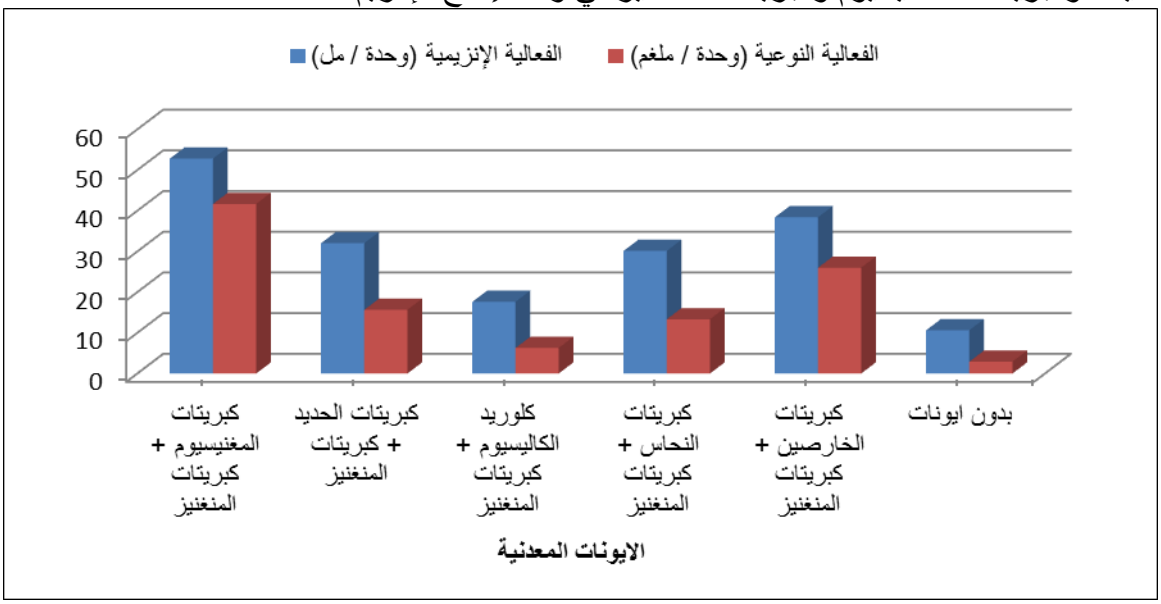
في حين ذكر Zhang واخرون، (2007) أن افضل درجة حرارة إنتاج للإنزيم ارابينوز ايزوميريز من بكتريا *Lactobacillus plantarum* كانت عند درجة حرارة 37°م .



الشكل 5 . تأثير درجة الحرارة في إنتاج إنزيم ارابينوز ايزوميريز من بكتريا *Bacillus subtilis* AH1.

6 . تحديد الايونات المعدنية المثلى لإنتاج الإنزيم

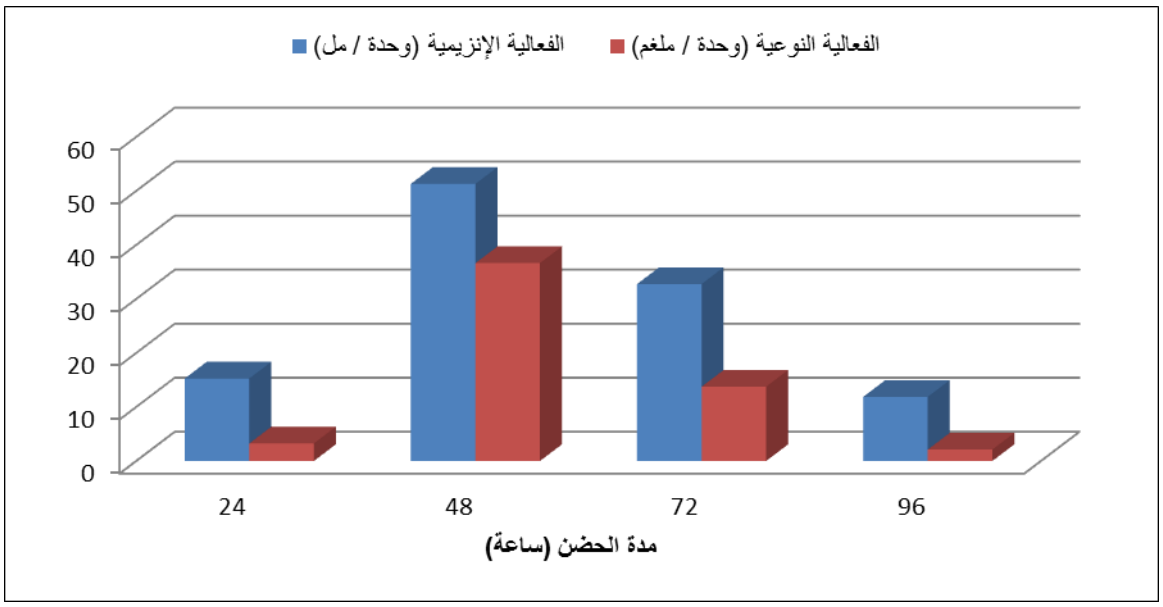
أُجريت هذه التجربة للوقوف على مدى تأثير الايونات المعدنية الداخلة في تركيب وسط التخمر في إنتاج إنزيم ارابينوز ايزوميريز ، ويتضح من (الشكل 6) ان افضل إنتاج كان عند احتواء وسط التخمر على ايونات المغنيسيوم وايونات المنغنيز إذ بلغت الفعالية الإنزيمية والفعالية النوعية 52.69 وحدة / مل ، 41.66 وحدة / ملغم على التوالي ، في حين تراوحت الفعالية الإنزيمية والفعالية النوعية للمعاملات الاخرى ما بين 10.60 – 38.37 وحدة / مل ، 2.89 – 25.99 وحدة / ملغم على التوالي . وبصورة عامة كان للايونات المعدنية المختلفة تأثير ايجابي في زيادة إنتاجية الإنزيم ومن ثم زيادة الفعالية الإنزيمية والفعالية النوعية مقارنة بمعاملة السيطرة التي لم يستخدم فيها اي من الايونات المعدنية المذكورة مما يشير الى ان إنتاج الإنزيم يتحفز بوجود هذه الايونات تبعاً لنوع الايونات الموجودة في الوسط . إذ ذكر Kim و Oh، (2005) ان الوسط المستخدم في إنتاج الإنزيم من بكتريا *Geobacillus thermodenitrificans* يتطلب وجود كبريتات المغنيسيوم . كما وجد Weng واخرون ، (2007) ان الإنزيم المنتج من بكتريا *Lactobacillus* SK1.002 يتطلب توافر كلوريد الصوديوم ، وكبريتات الحديد ، وكبريتات المغنيسيوم وكبريتات المنغنيز في وسط إنتاج الإنزيم.



الشكل 6 . تأثير الايونات المعدنية في إنتاج إنزيم ارابينوز ايزوميريز من بكتريا *Bacillus subtilis* AH1.

7 – مدة الحضانة

اظهرت النتائج الموضحة في (الشكل 7) أن إنتاج الإنزيم خلال الـ 24 ساعة الاولى كان منخفضاً إذ كانت الفعالية الإنزيمية والفعالية النوعية 15.26 وحدة / مل ، 3.25 وحدة / ملغم على التوالي ، في حين ظهرت زيادة ملحوظة بعد مرور 48 ساعة من مدة الحضن وبلغت الفعالية الإنزيمية والفعالية النوعية 51.31 وحدة / مل ، 36.64 وحدة / ملغم على التوالي ومع استمرار مدة الحضن الى 72 ، 96 ساعة يلاحظ انخفاض في كمية إنزيم ارابينوز ايزوميريز المنتجة وهذا يعني ان جزءاً غير قليل من الإنزيم المنتج من البكتريا قد يكون تعرض الى التدهور اما بفعل ما طرأ من تغيرات على وسط الإنتاج ولاسيما انخفاض الرقم الهيدروجيني بسبب عمليات التخمر وما يرافقها من انخفاض في حموضة الوسط ، او بسبب افرازات إنزيمات اخرى من البكتريا نفسها الى وسط الإنتاج ومنها الإنزيمات المحللة للبروتين (Proteases) فضلاً عن دخول البكتريا في مرحلة الثبوت العددي او مرحلة الهلاك ولاسيما في المزارع المغلقة بسبب نفاد مكونات الوسط مما يؤثر سلبا على إنتاجية الإنزيم المطلوب لذلك ينصح بوقف عمليات التخمر قبل الوصول الى مرحلة تحلل الخلايا او ثبوت عددها عندما يراد إنتاج الإنزيمات الداخلية (الخفاجي ، 1990) . بينما اتفقت هذه النتيجة مع ما وجدهُ Dong-Woo واخرون ،(2004) إذ ذكر ان افضل إنتاج للإنزيم ارابينوز ايزوميريز عند مدة حضن 48 ساعة من بكتريا *Thermotoga maritima*، في حين وجد Zheng واخرون ،(2012) ان مدة الحضانة المثلى لإنتاج إنزيم ارابينوز ايزوميريز من بكتريا *Lactobacillus fermentum* هي 16 ساعة .



الشكل 7 . تأثير مدة الحضن في إنتاج إنزيم ارابينوز ايزوميريز من بكتريا *Bacillus subtilis* AH1.

المصادر

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

Chen, W.P. , A.W. Anderson and Y.W. Han . 1979. Extraction of glucose Isomerase from Streptomyces flavogriseus. Appl. Environ. Microbiol. 37: 324-331.

Chiu, C.J. , S. Liu , W.C. Willet , T.M. Wolever , J.C. Brand-Miller , A.W. Barclay and A. Taylor . 2011. Informing Food Choice and Health Outcomes by use of the Dietary Glycemic Index. Nutr Rev. 69(4):231-42.

Deok-Kun, Oh , 2007. Tagatose: properties, application, and biotechnological processes. Appl. Microbiol. Biotechnol. 76(1):1-8.

Dische, Z. and E.A. Borenfreund . 1951. A new spectrophotometric methods for the detection and determination of keto sugar and trioses. J. Biol. Chem.192: 583-587.

Dong-Woo Lee , H. J. Jang , E. A. Choe , B. C. Kim , S. J. Lee , S. B. Kim , Y. H. Hong , and Y. R. Pyun . 2004. Characterization of a Thermostable L-Arabinose (D-Galactose) Isomerase from the Hyperthermophilic Eubacterium Thermotoga maritima. Applied and Environmental Microbiology, Mar. , p. 1397–1404.

Gilbert, V. Levin . 2002. Tagatose, the new GRAS sweetener and health product. Journal of Medical Food. 5(1):23-36.

Givry, S. and F. Duchiron . 2008. Optimization of culture medium and growth condition for production of L-arabinose isomerase and D-xylose isomerase by Lactobacillus bifermentans. Mikrobiologiia. 2008 May-Jun. , 77(3):324-30.

Grant, L.D. and L.N. Bell . 2012. Physical and chemical stability of tagatose powder. J. Food Sci. 77(3):C 308-13.

Harrigan, M.F. and M.E. MacCance . 1976. Laboratory Methods in Food and Dairy microbiology. Academic Press. New York.

Hirst, E.L. , L. Hough and J.K.N. Jones . 1949. The structure of Sterculia setigera gum. Part 1. An investigation by the method of paper partition chromatography of the products of hydrolysis of the gum. J. Chem. Soc. 3145-3151.

Hye-Jung Kim and D. K. Oh . 2005. Purification and characterization of an L-arabinose isomerase from an isolated strain of Geobacillus thermodenitrificans producing D-Tagatose. Journal of Biotechnology . 120:162–173.

Izumori, K. 2002. Bio production strategies for rare hexose sugar . Natur Wissenscchaften, 89:120– 124.

Jin-Ha Kim, P. Ponnandy , Marimuthu Jeya, Manish Kumar Tiwari, Hee- Jung Moon, Raushan Kumar Singh, Jung-Kul Lee . 2010. Characterization of an L-arabinose isomerase from Bacillus subtilis. Appl. Microbiol Biotechnol, 85:1839– 1847. DOI 10.1007/s00253-009-2210-6.

Jørgenson, F. , O.C. 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. 120:162–173.

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.

Lee, D.W. , H.J. Jang , E.A. Choe , B.C. Kim , S.J. Lee , S.B. Kim , Y.H. Hong and Y.R. Pyun . 2004. Characterization of a thermostable L-arabinose D-Galactose isomerase from the hyperthermophilic eubacterium Thermotoga maritima. Appl. Environ Microbiol. 70:1397-1404.

Lifang, Cheng , M. Wanmeng , T. Zhang and B. Jiang . 2010. An L- arabinose isomerase from Acidothermus cellulolytics ATCC 43068: cloning, expression, purification, and characterization. Appl. Microbiol Biotechnol, 86:1089– 1097. DOI 10.1007/s00253-009-2322-z.

Livesey, G. and J.C. 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. Dikhtieviski and I.O. Kasakevich . 1998. Screening of glucose isomerase-producing microorganisms. World J. Microbiol. And Biotechnol.14: 259-262.

Logan, N.A. and P. De Vos . 2009. Genus 1. Bacillus. Bergey's manual of systemic bacteriology, Vol. 3:21-127.

Lu, Y. and G.V. Levin . 2002. Removal and prevention of dental plaque with D- Tagatose. Inc. Cosmet. Sci. 24:225- 234.

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.

Moez Rhimi , R. Ilhammami , G. Bajic , S. Boudebbouze , E. Maguin , R. Haser and N. Aghajari . 2010. The acid tolerant L-arabinose isomerase from the food grade Lactobacillus sakei 23K is an attractive D -Tagatose producer. Bio resource Technology, 101: 9171–9177.

Ponnandy, Prabhu , K. T. Manish , M. Jeya , P. Gunasekaran , I. W. Kim and J. K. Lee . 2008. Cloning and characterization of a novel L-arabinose isomerase from bacillus Licheniformis. Appl. Microbiol Biotechnol. , 81:283-290. DOI 10.1007/s00253-008-1652-6.

Roh, H.J. , P. Kim , Y.C. Park and J.H. Choi . 2000. Bioconversion of D-Galactose into D-Tagatose by expression of L-arabinose isomerase. Biotechnol Appl. Biochem. 31(Pt 1):1 –4.

Tomomi, F. , P. Jin-Hee. and L. Juyun . 2012. Sensory Characteristics and relative sweetness of Tagatose and other sweeteners. Journal of Food Science. 77(9): 323-328.

Weng, Wei-hui , H. Zhang and B. Jiang . 2007. Medium optimization and properties of L-arabinose isomerase produced by Lactobacillus SK1.002. Journal of Food Science and Biotechnology, 03.100-105.

Yanjun, Li , Z. Yueming , L. Anjun, and S. Yuanxia . 2011. Identification and characterization of a novel L-arabinose isomerase from Anoxybacillus flavithermus useful in D-Tagatose production. Extremophiles.15:441–450. DOI 10.1007/s00792-011-0375-2.

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

Zhang Hua , B. Jiang and B. Pen . 2007. Purification and characterization of L-arabinose isomerase from Lactobacillus plantarum producing D-Tagatose. World J. Microbiol Biotechnol. 23:641-646. DOI 10.1007/s11274-006-9274-6.

Zheng Xu , S. Li , F. Fenggen , L. Guixiang , F. Xiaohai , X. Hong and O. Pingkai . 2012. Production of D-Tagatose, a Functional Sweetener, Utilizing Alginate Immobilized Lactobacillus fermentum CGMCC2921 Cells. Appl. Biochem Biotechnol. 166:961–973. DOI 10.1007/s12010-011-9484-8.

OPTIMIZATION FOR L- ARABINOSE ISOMERASE PRODUCTION FROM LOCAL ISOLATE OF *Bacillus subtilis* AH1

Ali Hamed Tami **Hameed Abood Jaber***

***Assistant Prof. Dept. of Food Science – Coll. Of Agri. – Univ. of Baghdad-**

alihamedtame@yahoo.com

ABSTRACT

The optimum condition for production of L-arabinose isomerase from *Bacillus subtilis* AH1 were determined by submerged culture using broth medium containing 2 % Galactose as carbon source and 0.15 % of L-arabinose as inducer and 1 % of yeast extract and peptone respectively, as nitrogen source with 0.02 % of magnesium sulfate and 0.002 % manganese sulfate at pH of 7.5 after 48 hours of incubation at 30 °C.

Key words : L- arabinose isomerase , *Bacillus subtilis* AH1