انتاج وتنقية وتوصيف انزيم Transglutaminase من العزلة المحلية لبكتريا *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92 واستعماله في بعض المنتجات الغذائية

اطروحة مقدمة الى

مجلس كلية الزراعة – جامعة البصرة

وهي جزء من متطلبات درجة دكتوراه فلسفة في علوم الاغذية

(تقانات احيائية)

من قبل

عبدالرضا عاتي جعفر الجويبراوي

ماجستير علوم أغذية

2013

باشراف

أ.د. علاء جبار عبد المنعم

أ.د. امال كاظم غضبان الاسدي

1443 هـ

2021 م

بسم الله الرحمن الرحيم

﴿وَيَسْأَلُونَكَ عَنْ الرُّوحِ قُلْ الرُّوحُ مِنْ أَمْرِ رَبِّي وَمَا أُوتِيتُمْ مِنْ الْعِلْمِ إِلاَّ قَلِيلاً﴾

صدق الله العلي العظيم

الإسراء الآية ٨٥

توصية الأستاذين المشرفين

نشهد أن إعداد هذه الاطروحة جرت تحت إشرافنا في قسم علوم الأغذية - كلية الزراعة - جامعة البصرة وهي جزء من متطلبات نيل درجة الدكتوراه فلسفة في علوم الأغذية (تقانات احيائية)

التوقيع
المشرف : د. علاء جبار عبد المنهل
الدرجة العلمية :
الاختصاص الدقيق : تقانات احيائية
التاريخ : / / 2021

التوقيع
المشرف : د. امال كاظم غضبان الاسدي
أستاذ الدرجة العلمية : أستاذ
الاختصاص الدقيق : تقانات احيائية
التاريخ : / / 2021

توصية رئيس القسم

بناءً على توصية الاستاذين المشرفين أحيل هذه الاطروحة إلى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها .

التوقيع
الاسم : د. وسن كاظم عبدالرزاق
الدرجة العلمية : أستاذ مساعد
التاريخ : / / 2021

بسم الله الرحمن الرحيم

إقرار لجنة مناقشة

نشهد بأننا لجنة المناقشة قد اطلعنا على اطروحة الطالب (عبدالرضا عاتي جعفر الجويبراوي) الموسومة: (انتاج وتنقية وتوصيف انزيم Transglutaminase من العزلة المحلية لبكتريا *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92 واستعماله في بعض المنتجات الغذائية) وقد ناقشنا الطالب في محتوياتها وفيما له علاقة بها , ووجدنا بانها جديرة بالقبول لنيل درجة الدكتوراه فلسفة في علوم الاغذية (تقانات احيائية) وبتقدير امتياز.

رئيس اللجنة

التوقيع :
الاسم : أ.د. رياض شمخي علي
المرتبة العلمية : أستاذ
الاختصاص الدقيق : تكنولوجيا اغذية
العنوان : كلية الزراعة / جامعة الكوفة
التاريخ : 5 / 12 / 2021

عضو اللجنة

التوقيع :
الاسم : أ.د. ضياء فالح عبدالله
المرتبة العلمية : أستاذ
الاختصاص الدقيق: انزيمات
العنوان : كلية الزراعة / جامعة البصرة
التاريخ : 5 / 12 / 2021

عضو اللجنة

التوقيع :
الاسم : أ.م.د. ناجح هاشم كاظم
المرتبة العلمية : استاذ مساعد
الاختصاص الدقيق : تقانات احيائية
العنوان : كلية العلوم / جامعة كربلاء
التاريخ : 5 / 12 / 2021

عضو اللجنة

التوقيع :
الاسم : أ.م.د. قيثار رشيد مجيد
المرتبة العلمية : استاذ مساعد
الاختصاص الدقيق : احياء مجهرية
العنوان : كلية الزراعة / جامعة البصرة
التاريخ : 5 / 12 / 2021

عضو اللجنة

التوقيع :
الاسم : أ.م.د. شيماء ذياب جدوع
المرتبة العلمية : أستاذ مساعد
الاختصاص الدقيق : تقانات احيائية
العنوان : كلية الزراعة / جامعة البصرة
التاريخ : 5 / 12 / 2021

عضو اللجنة (المشرف)

التوقيع :
الاسم :أ. د. علاء جبار عبد
المرتبة العلمية : أستاذ
الاختصاص الدقيق : تقانات احيائية
العنوان : كلية الزراعة / جامعة البصرة
التاريخ : 5 / 12 / 2021

عضو اللجنة (المشرف)

التوقيع :
الاسم :أ. د. امال كاظم غضبان
المرتبة العلمية : أستاذ
الاختصاص الدقيق : تقانات احيائية
العنوان : كلية الزراعة / جامعة البصرة
التاريخ : 5 / 12 / 2021

مصادقة عميد الكلية

اصادق على ما جاء في اقرار اللجنة اعلاه

التوقيع:
الاسم : أ.د. ساجد سعد حسن
المرتبة العلمية : أستاذ
التاريخ : / / 2021

الإهـــــــــداء

الى يد السماء التي صيَرت قفراء النفوس حدائق ورد

(الرسول الاعظم محمد صلى الله عليه واله وسلم)

الى الشجرة التي ٰحرمت من ظلها وأنا بنعومة أظافري أبي (رحمه الله)

الى ناظري ودقات قلبي التي توقفت بكورونا أمي الغالية (رحمها الله) التي

طالما انتظرت يوم حصولي على الدكتوراه

الى زوجتي الحبيبة التي ساندتني في مسيرتي الدراسية

الى فلذات كبدي اولادي البراعم (محمد و أمير)

الى العصا التي أتوكأ عليها دوماً إخوتي و أصدقائي...

اهدي ثمرة جهدي هذا...

عبدالرضا

شكر وتقدير

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على سيد المرسلين فخر الكائنات سيدنا محمد الصادق الأمين وعلى آله وصحبه الغر الميامين

يطيب لي وأنا أنهي دراستي هذه بعون من الله تعالى أن أتقدم بخالص شكري وامتناني وتقديري واحترامي إلى مشرفيّ أستاذيّ الفاضلين الاستاذ الدكتور امال كاظم غضبان الاسدي التي فارقة الحياة رحمها الله في بدية مشوار البحث والى استاذي ومشرفي الاستاذ الدكتور علاء جبار عبد المنهل لما أبداه من جهود علمية وتوجيهات وآراء سديدة طيلة مرحلة البحث فكان خير مرشد وعون وسند لي بارك الله فيه وجزاه الله عني ألف خير ووفقه لما يحب ويرضى، كما أتقدم بفائق الشكر والتقدير إلى عمادة كلية الزراعة ورئاسة قسم علوم الأغذية على إتاحة الفرصة وقبولي في الدراسات العليا

كما أتوجه بجزيل الشكر والامتنان إلى السادة رئيس وأعضاء لجنة المناقشة أساتذتي الأفاضل كل من الأستاذ الدكتور رياض شمخي علي والاستاذ الدكتور ضياء فالح عبدالله والاستاذ المساعد الدكتور قيثار رشيد مجيد والاستاذ المساعد الدكتور ناجح هاشم كاظم والاستاذ المساعد الدكتور شيماء ذياب جدوع لقبولهم مناقشة اطروحتي و لما أبدوه من آراء سديدة لإخراج الاطروحة بالمستوى العلمي المطلوب.

شكري وتقدير الى اساتذة قسم علوم الاغذية واساتذة الكلية جميعهم وبالخصوص الاستاذ الدكتور ام البشر حميد جابر والاستاذ الدكتور صباح مالك حبيب الشطي والاستاذ الدكتور علي حسين والاستاذ الدكتور علي خضير الركابي والاستاذ الدكتور ضياء فالح الفكيكي والدكتور قيثار رشيد مجيد والاستاذ الدكتور علاء كريم نعيمة والدكتور وائل الوائلي والدكتورة سوسن علي والدكتورة رغد رحيم والاستاذ الدكتور اسعد يحيى والدكتور جعفر محمد عويد والدكتور ازهر عبد العباس جعفر.

كما اتقدم بجزيل الشكر والتقدير الى الاخ الدكتور غسان فيصل محسن والدكتور احمد برغال من كلية العلوم جامعة البصرة والاخ الدكتور اسعد شامل عطية والدكتور قيصرعلي كريدي والدكتور علي حسن حرفش من كلية الزراعة جامعة ميسان والدكتور فاضل نعمة عبدالرضا من مركز علوم البحار جامعة البصرة والدكتور محمد رشيد زغير من كلية الصيدلة جامعة ميسان والدكتور وليد احمد محمود والدكتورة نجوى مسؤولة مختبر وهج الدنا في العاصمة بغداد ، وشكري وامتناني الى البكتريولوجي سليم حلو محمد مدير مختبر الصحة العامة في دائرة صحة ميسان والبكتريولوجي الاخ الغالي عباس جمعة سلطان مسؤول شعبة الاحياء المجهرية الغذائية والبكتريولوجية سوزان طالب سعودي والبكتريولوجي محمد جبر حميدي والبكتريولوجية شيماء ارزوقي والاخوة الاعزاء الكيمياوي سلام حسين حيدر مسؤول شعبة الكيمياء الغذائية والكيمياوي الدكتور احمد سالم شنته والكيمياوي سالم جبر سيد.

كما لا يفوتني ان اشكر اخوتي طلبة الدكتوراه الرائعين واخص بالذكر منهم الدكتور باسم عزيز جبر والدكتور مصطفى عدنان والدكتور رسول عقيل والاستاذ علي جاسم غالي لتعاونهم الجميل خلال فترة الدراسة والبحث.

عبدالرضا

الخلاصة

تم الحصول على 31 عزلة بكتيرية من ثلاثة مصادر (التربة , روث الابقار , روث الجاموس) ومن اماكن مختلفة من محافظة البصرة , شخصت هذه العزلات بعد تنقيتها ودراسة صفاتها المظهرية والمجهرية وتبين انها تعود الى البكتريا الخيطية .

استعملت طريقة التخمرات السائلة والصلبة في غربلة العزلات البكتيرية لاختيار العزلة الاكفأ انتاجا لانزيم Transglutaminase اذ اظهرت النتائج تفوق انتاجية الانزيم (الخارجي) باستعمال تقنية تخمرات الحالة السائلة مقارنة" بتقنية المزارع الصلبة كما ان اعلى انتاجية انزيمية تم الحصول عليها من قبل العزلة ذات الرمز S13 بفعالية نوعية وصلت الى0.6751 وحدة / ملغم , شخصت العزلة باستعمال الاختبارات الكيموحيوية والفعالية التثبيطية والتي اكدت عائديتها الى جنس *Streptomyces* كذلك اجري اختبار 16S rRNA الذي من خلاله تبين ان العزلة البكتيرية المعزولة محليا عائدة الى *Streptomyces smyrnaeus* وسجلت في بنك الجينات NCBI تحت اسم *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92(LC495904) .

درست الظروف المثلى لانتاج الانزيم من بكتريا *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92 اذ وجد ان افضل وسط انتاج انزيمي هو الوسط Bahrim-B الذي اعطى اعلى فعالية نوعية 0.9374 وحدة / ملغم من بين سبعة اوساط انتاجية, كما بينت النتائج ان افضل مصدر كاربوني بديل كان مسحوق البطاطا المحلي عند نسبة استبدال 100% اما افضل مصدر نتروجيني كان الببتون مع فول الصويا بفعالية نوعية 1.1753 وحدة / ملغم ايضا درست افضل (درجة حرارة , رقم هيدروجيني, سرعة الاهتزاز , افضل حجم لقاح ومدة الحضن) وكانت اعلى فعالية نوعية عند (30 م° , 7 , 200 دورة بالدقيقة , 1 مل , 6 يوم) على التوالي.

تم تنقية الانزيم الخام باستعمال الترسيب بكبريتات الامونيوم عند نسبة تشبع (50 – 80)% اعقبها عملية التنافذ الغشائي (الديلزة) للمستخلص الانزيمي وقدرت الفعالية النوعية له والتي بلغت 6.1196 وحدة / ملغم بحصيلة انزيمية 64.20 % وبعدد مرات تنقية 4.6854 مرة ثم بعد ذلك اجريت خطوة الترشيح الهلامي باستعمال تقنية AKTA pure وذلك بامراره بعمود الفصل Superdex-G75 اذ لوحظ وجود ثلاث قمم للمستخلص الانزيمي وبعد تقدير الفعالية الانزيمية لكل قمه وجد انزيم MTGase في القمه الثالثة التي بلغت عندها الفعالية 0.1264 وحدة / مل , كما استعملت عملية الترشيح الهلامي لاكثر من مرة والتي بلغ فيها الحاصل الانزيمي 14.44% وبعدد مرات تنقية 5.973 مرة , ثم حددت نقاوة الانزيم باستعمال تقنية

الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الاكريل امايد بغياب المادة الماسخة للبروتين SDS ووجد ان الانزيم نقي لظهور حزمة بروتينية واحدة في الهلام .

درست صفات الانزيم المنقى اذ وجد ان الوزن الجزيئي للانزيم بوجود المادة الماسخة SDS-PAGE بلغ 34 كيلو دالتون , ظهر ان الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم هو 5.5 بفعالية انزيمية 0.1481 وحدة / مل , في حين تراوح المدى الامثل لثبات الانزيم بين (5 – 6.5) اما درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم كانت 45 م° والتي بلغت عندها الفعالية الانزيمية 0.1403 وحدة / مل كما اظهرثباتا حراريا اذ احتفظ بمعظم فعاليته عند الدرجات الحرارية التي تراوحت بين (25 – 50) م° لمدة 60 دقيقة من الحضن واحتفظ بكامل فعاليته عند 45 م° لمدة ساعتين , بلغت قيمة طاقة التنشيط لتحويل المادة الاساس الى نواتج 12.82 كيلوسعره / مول , في حين كانت قيمة طاقة مسخ الانزيم 75 كيلوسعره / مول , اما الثوابت الحركية فقد بينت الدراسة ان معدلات قيم السرعة القصوى Vmax وثابت ميكالس Km للانزيم بلغت 0.1835 وحدة / مل , 6.0322 ملي مولاري على التوالي باستعمال Z-Gln-Gly كمادة اساس Substrate .

تم دراسة تأثير المنشطات والمثبطات في فعالية الانزيم عند تركيز 5 و 10 ملي مولاري اذ لوحظ ان ايونات المغنيسيوم والصوديوم والليثيوم كان لها دورا منشطا في فعالية الانزيم عند كلا التركيزين اما ايونات النحاس والخارصين فقد ادت الى تثبيط فعالية الانزيم وكان التثبيط واضحا عند التركيز 10 ملي مولاري , في حين لم تؤثر اضافة ايون الكالسيوم في فعالية الانزيم, اما بالنسبة للمركبات الكيميائية Ethylene Diamine Tetra Acetic acid, Dithiothreitol , Cysteine, Glutathion , فقد لوحظ انها ادت الى زيادة فعالية الانزيم عند كلا التركيزين.

ان اضافة الانزيم المنقى جزئيا الى اقراص اللحم البقري المفروم والمخزن بالتبريد لمدة سبعة أيام ادى الى تقليل الاكسدة الاولية Peroxide valu (PV) والاكسدة الثانوية Thiobarbituric acid (TBA) واعطى تماسكا اكثركما انه ساعد على زيادة حمل الماء لأقراص اللحم وقلل من نسبة الفقد في الوزن والانكماش اثناء الطبخ وهذه النسبة قلت مع زيادة تركيز الانزيم حتى بلغت 32.94% و 13.74% على التوالي عند التركيز 0.3 % مقارنة مع العينات الضابطة التي كانت نسبة الفقد في الوزن والانكماش اثناء الطبخ فيها 39.06% و 19.67% على التوالي , كما ان اضافة الانزيم لم تؤثر على اللون والنكهة في حين كان التأثير معنويا ($P\leq0.05$) على صفة العصيرية والمظهر الخارجي والقبول العام مقارنة مع عينة التحكم.

استعمل الانزيم المنقى جزئيا ايضا في صناعة اللبن الرائب (Yoghurt) اذ اظهرت النتائج عدم وجود فروق معنوية في الرقم الهيدروجيني والحموضة التسحيحية لكل فترات الخزن من اليوم الاول وحتى اليوم الخامس عشر ولجميع المعاملات, وجد ان اضافة الانزيم الى الحليب مع وقت اضافة البادىء كانت افضل من حيث قابلية حمل الماء ونسبة نضوح الشرش مقارنة مع اضافة الانزيم الى الحليب قبل البسترة بساعتين, كما لوحظ ان قابلية حمل الماء ازدادت ونسبة نضوح الشرش قلت مع زيادة تركيز الانزيم والذي كان 0.03 % ولجميع المعاملات , كما بينت نتائج التقييم الحسي حصول تفوق معنوي عند مستوى $P\leq0.05$ في صفة المظهر الخارجي والثباتية مقارنة مع العينات الضابطة ,كما بينت ايضا ان اللبن الرائب المعامل مع الانزيم عند وقت اضافة البادىء كان اكثر تماسكا وذو مظهر خارجي افضل مقارنة مع عينات اللبن الرائب المعاملة مع الانزيم قبل البسترة بساعتين.

قائمة المحتويات

التسلسل	العنوان	الصفحة
1	**الفصل الاول المقدمة**	2-1
2	**الفصل الثاني مراجعة المصادر**	34-3
1-2	بكتريا *Streptomyces*	3
1-1-2	تشخيص بكتريا *Sreptomyces* sp.	3
2-1-2	اهمية بكتريا *Streptomyces* والاستعمالات التطبيقية لها	5
2-2	بكتريا *Streptomyces smyrnaeus*	8
3-2	انزيم الترانسكلوتامينيز Transglutaminase	10
4-2	ميكانيكية او اليةعمل انزيم TGase	10
5-2	مصادر انزيم TGase	13
1-5-2	مصادر حيوانية	13
2-5-2	مصادر نباتية	13
3-5-2	مصادر مايكروبية	14
4-5-2	مصادر اخرى	15
6-2	تركيب انزيم TGase	15
7-2	الظروف المثلى لانتاج الانزيم	16
8-2	تنقية الإنزيم Enzyme Purification	17
9-2	توصيف الانزيم Enzyme Characterization	18
1-9-2	الوزن الجزيئي لانزيم TGase	19
2-9-2	تاثير الرقم الهيدروجيني على فعالية وثبات الانزيم	20
3-9-2	تأثير درجة الحرارة على فعالية وثبات الانزيم	21
4-9-2	تأثير العناصر المعدنية والمثبطات على فعالية انزيم TGase	22
5-9-2	الثوابت الحركية (Km , Vmax)	24
10-2	الاستعمالات التطبيقية لانزيم MTGase	25
1-10-2	تطبيقات الانزيم في اللحوم والاسماك ومنتجاتها	26
2-10-2	تطبيقات الانزيم في الحليب ومنتجاته (اللبن الرائب)	28
3-10-2	في صناعة المثلجات اللبنية	31
4-10-2	في صناعة الاجبان	31
5-10-2	في منتجات الحبوب	32
6-10-2	تطبيق الانزيم في مجال الاغشية البروتينية الصالحة للأكل	34-33
3	**الفصل الثالث المواد وطرائق العمل Materials and Methods**	81 -35
1-3	الاجهزة المختبرية المستعملة في الدراسة	35
2-3	المواد الكيمياوية	36

1-2-3	المواد الكيميائية المستعملة في الدراسة	36
2-2-3	الأوساط الزرعية الجاهزة المستعملة في الدراسة	38
3-2-3	المواد الاولية Raw materials	38
4-2-3	جمع العينات	38
5-2-3	الاوساط الزرعية	39
1-5-2-3	وسط العزل Inorganic Salt Starch Agar) ISP Medium No.4)	39
2-5-2-3	وسط الانتاج الانزيمي	39
3-5-2-3	وسط المرق المغذي Nutrient broth medium	39
4-5-2-3	وسط الاكار المغذي Nutrient Agar medium	39
5-5-2-3	وسط تحلل الجيلاتين Gelatin hydrolysis medium	39
6-5-2-3	وسط تحلل النشا Starch hydrolysis medium	40
7-5-2-3	وسط Tryptone Soy Agar	40
8-5-2-3	وسط تحلل الكازين Casein hydrolysis medium	40
9-5-2-3	وسط استهلاك السترات Simmon's citrate agar	40
10-5-2-3	وسط اختزال النترات medium Nitrate reduction broth	40
11 -5-2-3	وسط تحلل اليوريا Urea hydrolysis medium	41
12-5-2-3	وسط الانتاج الانزيمي للعزلة المنتخبة	41
1-12-5-2-3	اوساط الانتاج الانزيمي الاربعة (A، B، C، D)	41
2-12-5-2-3	وسط الانتاج الانزيمي ذو الرمز F	41
3-12-5-2-3	وسط الانتاج الانزيمي ذو الرمزG	41
6-2-3	المحاليل	42
1-6-2-3	محلول اليود المخفف Diluted Iodine solution	42
2-6-2-3	صبغة كرام Gram's stain	42
3-6-2-3	محلول الببتون المخفف (0.1 %)	42
4-6-2-3	محلول هيدروكسيد الصوديوم 0.1 مولاري Sodium hydroxide Solution	42
5-6-2-3	محلول منظم (TBE) Tris – Borate EDTA 5x	42
6-6-2-3	محلول انزيم Lysozyme Solution تركيزة 4 ملغم / مل	43
7-6-2-3	صبغة Red safe staining souluion	43
8-6-2-3	محلول دارئ الكلايسين – حامض الهيدروكلوريك عياري 0.1 مولاري	43
9-6-2-3	محلول دارئ الخلات عياري 0.1 مولاري	43
10-6-2-3	محلول دارئ السترات عياري 0.1 مولاري	43
11-6-2-3	محلول دارئ فوسفات البوتاسيوم عياري 0.1 مولاري	43
12-6-2-3	محلول دارئ الكلايسين – هيدروكسيد الصوديوم عياري 0.1 مولاري	44
7-2-3	الكواشف Indicators	44

1-7-2-3	دليل الاوكسيديز Oxidase reagent	44
2-7-2-3	دليل الكاتليز Catalase Reagent	44
3-7-2-3	كاشف اختزال النترات Nitrate reduction test	44
3-3	طرائق العمل	48
1-3-3	تحضير العينة	48
2-3-3	عزل بكتريا *Streptomyces*	48
3-3-3	تنقية العزلات Purification of Isolates	48
4-3-3	حفظ العزلات وادامتها	48
5-3-3	الاختبارات التشخيصية	49
1-5-3-3	الفحوصات المظهرية Morphological tests	49
2-5-3-3	الفحوصات المجهرية Microscopic tests	49
1-2-5-3-3	اختبار الحركة Motility test	49
2-2-5-3-3	فحص المايسليوم الارضي والهوائي Aerial and Substrate mycelium test	49
6-3-3	غربلة العزلات البكتيرية لتحديد العزلة الاكثر انتاجا لانزيم MTGase	49
1-6-3-3	وسط الانتاج	49
2-6-3-3	تحضير اللقاح	50
3-6-3-3	انتاج الانزيم	50
1-3-6-3-3	طريقة التخمرات السائلة (liquid state fermentation)	50
2-3-6-3-3	تقدير الكتلة الحيوية Estimation of the Biomass	50
3-3-6-3-3	طريقة التخمرات الصلبة (Solid state fermentation)	51
4-6-3-3	تقدير فعالية الانزيم Enzyme Activity Estimation	51
1-4-6-3-3	تحضير المنحنى القياسي Standard Curve	52
2-4-6-3-3	تقدير البروتين Protein Estimation	54
7-3-3	الاختبارات الكيموحيوية Biochemical tests	56
1-7-3-3	اختبار تحلل الكازين Casein hydrolysis test	56
2-7-3-3	اختبار الكاتاليز Catalase test	57
3-7-3-3	اختبار تحلل الجيلاتين Gelatin hydrolysis test	57
4-7-3-3	اختبار تحلل النشا Starch hydrolysis test	57
5-7-3-3	اختبار الاوكسيديز Oxidase test	57
6-7-3-3	اختبار استهلاك السترات Citrate utilization test	57
7-7-3-3	اختبار اختزال النترات	58
8-7-3-3	اختبار تحلل اليوريا Urea hydroiysis test	58
9-7-3-3	النمو بظروف لاهوائية Anaerobic growth	58
10-7-3-3	النمو بدرجات حرارية مختلفة	58
11-7-3-3	النمو بارقام هيدروجينية مختلفة	59

12-7-3-3	النمو بتراكيز ملحية مختلفة	59
8-3-3	التشخيص الجيني للعزلة الاكثر انتاجا لانزيم MTGase	59
1-8-3-3	استخلاص الحامض النووي DNA	59
2-8-3-3	الكشف عن الحامض النووي Agarose gel electrophoresis of DNA	60
1-2-8-3-3	تحضير هلام الـ Agarose	60
2-2-8-3-3	طريقة العمل	61
3-8-3-3	تضخيم الحامض النووي DNA	61
1-3-8-3-3	تحضير هلام الاكاروز والترحيل الكهربائي لنواتج تقنية PCR	63
9-3-3	دراسة الظروف المثلى لإنتاج الانزيم بوساطة العزلة المنتخبة	64
1-9-3-3	المصدر الكاربوني الامثل	65
1-9-3-3	تحضير عصير التمر	65
2-1-9-3-3	تحضير مسحوق البطاطا	65
3-1-9-3-3	افضل نسبة استبدال من المصدر الكربوني المحلي المنتخب	65
2-9-3-3	المصدر النتروجيني الامثل	65
3-9-3-3	درجة الحرارة المثلى لإنتاج الأنزيم	65
4-9-3-3	الرقم الهيدروجيني الامثل	66
5-9-3-3	سرعة الاهتزاز المثلى	66
6-9-3-3	حجم اللقاح الأمثل	66
7-9-3-3	مدة الحضن المثلى	66
10-3-3	تنقية انزيم Enzyme Purification: MTGase	66
1-10-3-3	الترسيب بكبريتات الامونيوم Precipitation with ammonium sulphate	66
2-10-3-3	الديلزة Dialysis	67
3-10-3-3	الترسيب بالكحول الاثيلي Ethanol Preciptation	67
4-10-3-3	الترشيح الهلامي بجهاز ÄKTA Pure Gel Filtration25	67
11-3-3	اختبار نقاوة الانزيم	68
1-11-3-3	المحاليل والمواد المستعملة	68
2-11-3-3	طريقة العمل	70
12-3-3	توصيف انزيم MTGase	70
1-12-3-3	تقدير الوزن الجزيئي	70
1-1-12-3-3	المواد والمحاليل المستعملة	70
2-1-12-3-3	طريقة العمل	71
2-12-3-3	الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم Optimum pH	72
3-12-3-3	الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الانزيم pH Stability	72
4-12-3-3	درجة الحرارة المثلى للإنزيم Enzyme Optimum Temperature	73
5-12-3-3	تقدير طاقة التنشيط للانزيم	73
6-12-3-3	الثبات الحراري للإنزيم Enzyme Thermal Stability	73

7-12-3-3	تعيين الثوابت الحركية (V_{max} , K_m) لإنزيم MTGase	74
8-12-3-3	تأثير بعض الأملاح وبعض الكواشف المنشطة والمثبطة في فعالية الإنزيم	74
13-3-3	الاستعمالات التطبيقية لإنزيم MTGase	74
1-13-3-3	تطبيق الانزيم في اقراص اللحم المفروم	75
1-1-13-3-3	المؤشرات الكيميائيةchemical indicators	75
2-1-13-3-3	الصفات الفيزيائيةphysical properties	76
3-1-13-3-3	التقييم الحسي	77
2-13-3-3	تطبيق الانزيم مع اللبن الرائب (Yoghurt)	78
1-2-13-3-3	التقييم الحسي	81
14-3-3	التحليل الاحصائي	81
4	**الفصل الرابع النتائج والمناقشة Results and Discussion**	135 - 82
1-4	عزل البكتريا Isolation of Bacteria	82
2-4	تشخيص العزلات البكتيرية	83
1-2-4	الفحوصات المظهرية Morphological tests	83
2-2-4	الفحوصات المجهرية Microscopic tests	85
3-4	غربلة العزلات البكتيرية	86
1-3-4	طريقة تخمرات الحالة السائلة Liquid state fermentation	86
2-3-4	طريقة تخمرات الحالة الصلبة Solid state fermentation	88
4-4	الاختبارات الكيموحيوية Biochemical tests	89
5-4	تشخيص العزلة البكتيرية باستعمال اختبار 16S rRNA	91
1-5-4	استخلاص الحامض النووي DNA	91
2-5-4	تضخيم الحامض النووي DNA بواسطة تفاعل سلسة البوليمريز (PCR) Polymerase Chain Reaction	92
3-5-4	تحليل تتابع نواتج التضخيم	93
6-4	دراسة الظروف المثلى لانتاج انزيم MTGase من العزلة المحلية لبكتريا *Streptomyces smyrnaeus*-Ati 92	94
1-6-4	الوسط الامثل لانتاج الانزيم من العزلة المحلية *Streptomyces smyrnaeus*-Ati 92	94
2-6-4	المصدر الكاربوني الامثل	95
3-6-4	المصدر النتروجيني الامثل	98
4-6-4	درجة الحرارة المثلى	99
5-6-4	الرقم الهيدروجيني الامثل	100
6-6-4	سرعة الاهتزاز المثلى	101
7-6-4	حجم اللقاح الامثل	102
8-6-4	مدة الحضن المثلى	103
7-4	تنقية انزيم MTGase	105

1-7-4	الترسيب بكبريتات الامونيوم	105
2-7-4	الترسيب بالكحول الاثيلي	106
3-7-4	الترشيح الهلامي بجهاز AKTA pure - 25	107
4-7-4	تعيين نقاوة الإنزيم	109
5-7-4	توصيف انزيم MTGase المنتج من العزلة *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92	110
1-5-7-4	تقدير الوزن الجزيئي	110
2-5-7-4	الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم	112
3-5-7-4	الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الانزيم	114
4-5-7-4	تعيين الدرجة الحرارية المثلى للانزيم	116
5-5-7-4	تعيين طاقة التنشيط	117
6-5-7-4	تعيين الثبات الحراري لانزيم MTGase	118
7-5-7-4	تعيين الثوابت الحركية (V_{max} , K_m) لإنزيم MTGase	120
8-5-7-4	تأثير المنشطات والمثبطات في فعالية الانزيم	122
8-4	الاستعمالات التطبيقية لإنزيم MTGase	125
1-8-4	تطبيق الانزيم في اقراص اللحم المفروم	125
1-1-8-4	المؤشرات الكيميائيةchemical indicators	125
2-1-8-4	الصفات الفيزيائية physical properties	127
1-2-1-8-4	قابلية حمل الماء Water Holding Cabacity (WHC) والرقم الهيدروجيني (pH)	127
3-1-8-4	نسبة الفقد بالوزن والانكماش اثناء الطبخ	129
4-1-8-4	التقييم الحسي لاقراص اللحم البقري المفروم	130
2-8-4	تطبيق الانزيم في صناعة اللبن الرائب (Yoghurt)	131
1-2-8-4	التقييم الحسي لعينات اللبن الرائب	135-134
5	**الفصل الخامس الاستنتاجات والتوصيات**	137-136
1-5	الاستنتاجات	136
2-5	التوصيات	137
6	**الفصل السادس المصادر**	167-138
1-6	المصادر العربية	138
2-6	المصادر الاجنبية	167-139

قائمة الجداول

التسلسل	عنوان الجدول	الصفحة
1-2	الاختبارات التشخيصية لبكتريا *Streptomyces* sp.	4
2-2	بعض المضادات الحياتية المنتجة من بكتريا *Streptomyces* sp .	7
3-2	الاختبارات التشخيصية لبكتريا *Streptomyces smyrnaeus*	8
4-2	بعض الاحياء المجهرية المنتجة لانزيم TGase	14
5-2	الوزن الجزيئي لانزيم TGase من مصادر مختلفة .	19
1-3	الاجهزة والادوات المستعملة في الدراسة والشركة المصنعة لها .	35
2-3	المواد الكيميائية التي استعملت في الدراسة والشركة المنتجة لها	36
3-3	الأوساط الزرعية المستعملة بالدراسة.	38
4-3	تراكيز مختلفة من المحلول القياسي L-Glutamic Acid -γ- Mono-Hydroxamic Acid لتحضير المنحنى القياسي له .	52
5-3	حجم المحلول البروتيني وتركيز البروتين لتحضير المنحنى القياسي لالبومين المصل البقري لتقدير البروتين .	55
6-3	البوادىء المستعملة في تشخيص العزلة البكتيرية	61
7-3	مكونات مجموعة تفاعل البلمرة التسلسلي PCR PreMix kit (i-Taq)	62
8-3	المواد المضافة الى انبوبة التفاعل لتضخيم جين 16S rRNA بتقنية PCR	62
9-3	الظروف المثلى المعتمدة في تفاعل تضخيم جين 16S rRNA في جهاز PCR	63
10-3	استمارة التقييم الحسي لاقراص اللحم المفروم المعاملة بانزيم **MTGase**	78
3- 11	استمارة التقييم الحسي للبن الرائب المعامل بانزيم **MTGase**	81
1-4	مصادر واماكن العزل للبكتريا المعزولة محليا	82
2-4	كفاءة العزلات البكتيرية في انتاج انزيم **MTGase** اعتمادا على الفعالية النوعية (وحدة / ملغم) وباستعمال طريقة تخمرات الحالة السائلة .	86
3-4	كفاءة العزلات البكتيرية في انتاج انزيم **MTGase** اعتمادا على	88

	الفعالية النوعية (وحدة / ملغم) وباستعمال طريقة تخمرات الحالة الصلبة .	
4-4	الاختبارات الكيموحيوية للعزلة البكتيرية **(S13)** المنتجة لانزيم **MTGase**	90
5-4	خطوات تنقية انزيم MTGase المنتج من بكتريا *Streptomyces smyrnaeusAti*-92 المعزولة محليا .	108
6-4	الثوابت الحركية لانزيم MTGase المنقى من *Streptomyces smyrnaeus* Ati- 92 تجاه Z-Gln-Gly كمادة أساس (Substrate) .	121
7-4	تاثير الايونات المعدنية والمثبطات في فعالية انزيم MTGase المنقى والمنتج من بكتريا *Steptomyces smyrnaeus* Ati-92 المعزولة محليا .	123
8-4	المؤشرات الكيميائية للحم المفروم المعامل بانزيم MTGase وغير المعامل	128
9-4	نسبة الفقد بالوزن والانكماش اثناء الطبخ للحم البقري المفروم المعامل وغير المعامل بانزيم MTGase المنتج من بكتريا *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92 المعزولة محليا .	129
10-4	التقييم الحسي لاقراص اللحم البقري المعاملة وغير المعاملة بانزيم MTGase المنتج من بكتريا *Streptomyces smyrnaeus* المعزولة محليا.	130
11-4	اضافة الانزيم الى اللبن الرائب بتراكيز مختلفة وباوقات مختلفة وتأثيره على الرقم الهيدروجيني والحموضة التسحيحية وبعض الصفات الفيزياوية كنسبة نضوح الشرش وقابلية حمل الماء.	133
12-4	التقييم الحسي للبن الرائب المعامل وغير المعامل بانزيم MTGase المنتج من بكتريا *Streptomyces smyrnaeus* Ati- 92 المعزولة محليا .	134

قائمة الأشكال

التسلسل	عنوان الشكل	الصفحة
1-2	ميكانيكية عمل انزيم MTGase : (a) تفاعلات نقل الأسيل, (b) تفاعلات الربط التقاطعي بين اللايسين والكلوتامين , (c) تفاعلات إزالة الأمايد	11
2-2	الربط التقاطعي بفعل عمل انزيم TGase مؤديا الى تكوين بروتينات ذات خصائص وظيفية جديدة وفريدة من نوعها	12
3-2	تركيب انزيم TGase من بكتريا *Streptoverticillium mobaraense*	16
1-3	مخطط طريقة العمل	47
2-3	المنحنى القياسي لمحلول L- Glutamic Acid-γ- Mono-Hydroxamic Acid	53
3-3	المنحنى القياسي لمحلول البومين المصل البقري لتقدير البروتين	56
4-3	البروتينات القياسية معلومة الاوزان الجزيئية المستعملة في الترحيل الكهربائي	71
5-3	يوضح انتاج اللبن الرائب المضاف له MTGase بثلاث معاملات	79
1-4	المستعمرات البكتيرية المعزولة محليا ذات الوان مختلفة على الوسط الزرعي ISP4 Agar	84
2-4	البكتريا المعزولة محليا تحت المجهر	85
3-4	المايسليوم الارضي والهوائي للبكتريا المعزولة محليا , تمثل A : المايسليوم الهوائي , B : المايسليوم الارضي	86
4-4	بعض الاختبارات الكيموحيوية لتشخيص العزلة البكتيرية الأكفأ في انتاج انزيم MTGase	91
5-4	الترحيل الكهربائي للحامض النووي DNA المستخلص من العزلة المحلية الاكثر انتاجا للانزيم بثلاث مكررات .	92
6-4	الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR على هلام الاكاروز 1.5% .	93
7-4	الشجرة الوراثية للعزلة البكتيرية المعزوله محليا وعلاقتها مع السلالات من البكتريا نفسها في بنك الجينات NCBI .	94
8-4	الفعالية النوعية لانزيم MTGase من البكتريا المعزولة محليا *Streptomyces smyrnaeus*-Ati92 باستعمال اوساط انتاجية مختلفة , تمثل A : Bahrim ,B ,C , D , E : Jin , F : Zhang , G : Cui .	95
9-4	تأثير المصادر الكاربونية المختلفة على انتاجية انزيم MGase من بكتريا	97

	Streptomyces smyrnaeus Ati-92 المعزولة محليا.	
10-4	نسبة الاستبدال بمسحوق البطاطا وتأثيره على فعالية انزيم MTGase المنتج من بكتريا *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92 المعزولة محليا.	97
11-4	تأثير المصادر النتروجينية على الانتاجية الانزيمية لانزيم MGase المنتج من بكتريا *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92 المعزولة محليا.	99
12-4	تأثير درجة حرارة الحضن على انتاجية انزيم MTGase من بكتريا *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92 المعزولة محليا.	100
13-4	تأثير الرقم الهيدروجيني لوسط الانتاج على انتاجية انزيم MTGase من بكتريا *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92 المعزولة محليا.	101
14-4	تأثير سرعة اهتزاز الحاضنة على انتاجية انزيم MTGase من بكتريا *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92 المعزولة محليا.	102
15-4	تأثير حجم اللقاح البكتيري على انتاجية انزيم MTGase من بكتريا *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92 المعزولة محليا.	103
16-4	تأثير مدة الحضن على انتاجية انزيم MTGase المنتج من بكتريا *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92 المعزولة محليا.	104
17-4	تاثير نسب التشبع بكبريتات الامونيوم في تركيز انزيم MTGase المنتج من بكتريا *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92 المعزولة محليا	106
18-4	كروموتوكرافي الترشيح الهلامي لانزيم MTGase بجهاز التنقية ÄKTA Pure باستعمال عمود الفصل Superdex G-75 10/300	107
19-4	الترحيل الكهربائي في هلام الاكريل امايد بغياب المادة الماسخة SDS , تمثل A : المستخلص الانزيمي الخام , B : الانزيم المنقى جزئيا بكبريتات الامونيوم والتنافذ الغشائي , C : الانزيم المنقى بعد مرحلة الترشيح الهلامي .	110
20-4	المنحنى القياسي لتقدير الوزن الجزيئي لانزيم MTGase المنتج من بكتريا *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92 بتقنية الترحيل الكهربائي بوجود SDS	111
21-4	تقدير الوزن الجزيئي لانزيم MTGase المنقى من العزلة المحلية *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92 بتقنية الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريل امايد بوجود SDS , تمثل A : الماركر القياسي المعلوم الاوزان الجزيئية , B : انزيم MTGase	112
22-4	الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية انزيم MTGase المنقى من بكتريا *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92 المعزولة محليا .	114
23-4	الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات انزيم MTGase المنتج من بكتريا *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92 المعزولة محليا .	115
24-4	درجة الحرارة المثلى لفعالية انزيم MTGase المنقى والمنتج من بكتريا *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92 المعزولة محليا .	117
25-4	شكل (4-26) منحنى ارينوس لتقدير طاقة التنشيط لانزيم MTGase المنقى من بكتريا *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92 المعزولة محليا .	118

26-4	الثبات الحراري لانزيم MTGase المنتج من بكتريا *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92 المعزولة محليا , تمثل A : درجة الحرارة المثلى لثبات الانزيم , B : الثبات الحراري للانزيم عند 45 م^{o} .	119
27-4	الثوابت الحركية لانزيم MTGase المنقى من البكتريا المعزولة محليا *Streptomyces smyrnaeus* Ati- 92 مقدرة باربع طرائق .	121

قائمة المختصرات

المختصر	المصطلح
MTGase	Microbial Transglutaminase
ISP_4	Inorganic Salt Starch
FDA	Food and Drug Administration
GRAS	Generally recognized as safe
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic acid
DTT	Dithiothreitol
NEM	N- ethylmaleimide
PMSF	phenyl methyl sulfonyl fluoride
Z-Gln-Gly	N-Carbobenzoxy-L-Glutaminylglycine
DNA	Deoxyribonucleic Acid
PCR	Polymerase Chain Reaction
TEMED	N,N,N,N-tetra methyl ethylene diamine
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel Electrophoresis
Rm	Relative Mobility
PV	Peroxide Value
pH	Power of hydrogen
TBA	Thiobarbituric acid
WHC	Water Holding Capacity

1- المقدمة

يشكل انتاج الانزيمات مساحة واسعة في مجال التقنية الحياتية ولاسيما تلك التي لها استعمالات غذائية وطبية وصناعية ، يعد انزيم Transglutaminase (TGase) احد هذه الانزيمات والمعروف ايضاً باسم protein- glutamine gama- glutamyltransferase ، اكتشف الانزيم لأول مرة من قبل العالم الالماني Heinrich Waelsh في كبد خنزير غينيا، الذي كان يعد المصدر الوحيد لإنتاجه حتى نهاية الثمانينات (Gaspar and de Goes-Favoni,2015) ، الا ان كمية وتركيزالانزيم وطرائق التنقيه المعقدة لاستخلاصه وفصله من المصادر الحيوانية وحتى النباتية ادت الى رفع كلفته الاقتصادية (لاكثر من 80 دولارا امريكيا) لكل وحده / ملغم فضلا عن ذلك فان اتمام عمله لا يكون الا بإضافة ايونات الكالسيوم وهذا يؤدي بالتالي الى عيوب تصنيعية للمنتجات المختلفة مما دعى الباحثين والمختصين الى التفكير بمصادر اخرى لانتاج الانزيم وكانت احداها واهمها هي المصادر المايكروبية والتي ادت الى حدوث نقله نوعيه في الانتاج التجاري للانزيم ودخوله في التطبيقات الغذائية المختلفة دون الحاجة الى اضافة ايونات الكالسيوم لنشاطه ،اصبحت الاحياء المجهرية مثل بكتريا *Streptoverticillium* و *Streptomyces* المصادر الرئيسية لإنتاجه كما صنف على انه امن صحيا Generally recognized as safe منذ عام 1998 حسب منظمة الغذاء والدواء الامريكية Food and Drug Administration وتقدر نسبة استعماله في الاغذية 21.9 % سنويا اذ يقوم الانزيم بتكوين روابط تقاطعية بين الجزيئات وداخل الجزيئات بين مجموعة γ -carboxamide من بقايا الكلوتامين ومجموعة ε-amino من بقايا اللايسين في البروتينات والببتيدات والامينات الاوليه (Mostafa, 2020 ; Yin *et al*.,2021) .

اثبتت الدراسات بان للأنزيم دوراً محسناً لصفات العجين والخبز ومنتجات النودلز والمعكرونة وبتراكيز قليلة جدا مقارنة بالمحسنات الاخرى المضافة وايضا في معالجة الطحين ذو النوعية الرديئة من خلال كفاءة الانزيم على تكوين الشبكة الكلوتينية وزيادة قابليتها على الاحتفاظ بالغازات وبالتالي زيادة حجم الخبز الناتج كذلك دوره الفعال في خفض تاثير مرض حساسية الكلوتين عن طريق احداث تغيير او تحوير في بروتينات الحنطة اوتحسين نوعية الاغذية الخالية من بروتينات الكلوتين (Aaron and Torsten,2019; Ogilvie *et al*.,2021) ، كما استعمل الانزيم في رفع القيمة الغذائية للحم من خلال تأثيره الايجابي على الصفات الحسية والوظيفية واعتماداً على قدرته على تكوين شبكة بروتينية قوية عند اضافته الى لحوم الابقار والدجاج ولحم الخنزير وايضا تحسين صوصج الدجاج والذي يكون ضعيفا عادةً مقارنة مع صوصج اللحوم الاخرى

من خلال تعديل خصائص المطاطية والمرونة وقابلية تشكيل الربط التقاطعي وبالتالي تقليل الفقد اثناء الطهي (Erdem *et al*.,2020) ،فضلا عن اهميته وتطبيقاته الواسعة في مجال صناعة الالبان كالجبن واللبن الرائب من خلال زيادة قوة الهلام والتقليل من نسبة نضوح الشرش والزيادة في قابلية حمل الماء واعطاء شكل متجانس ومتماسك خلال فترة الخزن دون ان يؤثر سلبا على الصفات الحسية للمنتوج-Garcia) Gomez *et al*.,2019) ، وله دور ايضا في الحصول على منتوج متماسك وذو رغوة ثابته عند استعماله في المثلجات القشطيه (Gharibzahedi *et al*.,2018) ، وعلى ضوء ما ذكر من اهمية انزيم Transglutaminase (MTGase) الصحية وكذلك الصناعية ومنها الصناعات الغذائية ومعالجته للعديد من المشاكل او الظواهر السلبية التي تتعرض لها المنتجات الغذائية لذا دعت الضرورة الى التفكير بالمصادر الميكروبية كالبكتريا للحصول على عزلة محلية قادرة على انتاج الانزيم بكفاءة عاليه لكي يتم الاستفادة من هذا الانزيم في الصناعات الغذائية المحلية المختلفة ومنها صناعة الالبان المتمثلة باللبن الرائب وكذلك في تحسين الصفات النوعية للحم المفروم .

الهدف من الدراسة :

لأهمية انزيم Transglutaminase المايكروبي في الصناعات الغذائية والاستعمالات المتنوعة والمتعددة له في مجال الاغذية ولارتفاع سعره تجاريا دعت الضرورة الى انتاجه محليا بكلفه اقل وتطبيقه في المنتجات الغذائية ، وهذا يتحقق من خلال ما تتضمنه الدراسة من خطوات والتي تشمل ما يأتي :

1. عزل بكتريا (*Streptomyces*)من مصادر مختلفة تشمل (التربة و انواع من الاغذية)
2. اجراء عملية غربلة للعزلات البكتيرية من حيث قابليتها الانتاجية للأنزيم.
3. تشخيص العزلة البكتيريه الأكثر انتاجا باستعمال بعض الفحوصات المظهرية والمجهرية والكيموحيوية وتأكيدها بالتشخيص الجزيئي (PCR والتسلسل الجيني) .
4. تحديد الظروف المثلى لإنتاج الانزيم بوساطة العزلة المنتخبة والتي تتضمن العديد من المعايير المؤثرة في انتاجه.
5. استخلاص وتنقية وتوصيف الانزيم المنتج من العزلة المحلية.
6. ادخال الانزيم في بعض الصناعات الغذائية كاللبن الرائب واللحم المفروم ودراسة تأثيره في الخصائص النوعية والخزنية لتلك المنتجات .

2- مراجعة المصادر

Literatures Review

1-2 بكتريا *Streptomyces*:

تعود بكتريا الـــ *Streptomyces* الى عائلة *Streptomycetaceae* رتبة *Actinomycetales* ضمن صنف *Actinobacteria* ، اكتشفت لاول مرة من قبل العالمين Waksman and Hernrici سنة 1943 وتوجد في التربة والهواء والماء وتعتبر التربة المصدر الرئيسي لها اذ تكثر في طبقاتها السطحية وتقل كلما زاد العمق ، وهي من اكبر المجاميع البكتيرية التي تمتلك خصائص تميزها عن بقية الاحياء المجهرية ، تقوم هذه البكتريا بتحليل المواد العضوية الموجودة في التربة وتنتج رائحة الارض الرطبة فيها ، كما تحتوي على اكثر من 500 نوع ويتميز جنس *Streptomyces* بتكوين مستعمرات جلدية القوام طباشيرية تاخذ الواناً مميزة تمثل لون الغزل الهوائي (Arial mycelium) والسبورات الكونيدية الناضجة التي تظهر من اعلى الطبق ولون الغزل الارضي (substrate mycelium) من اسفل الطبق وايضاً ظهور تغير في لون الوسط كلياً او جزئياً نتيجة لافراز البكتريا مواد ايضية ثانوية تعرف بالصبغات الذائبة (Hasani *et al*.,2014).

تعد بكتريا *Streptomyces* من الكائنات الحية البدائية النواة وحيدة الخلية غير ممرضة للانسان او الحيوان (Sanglier *et al*.,1993). تنتج بكتريا *Streptomyces* غزلاً دقيقاً يكون متفرع الى ارضي وهوائي ويتميز الغزل الارضي عن الهوائي بكون قطره اصغر واكثر تفرعاً وغير مقسم ولا يحمل سبورات بينما الغزل الهوائي يكون بشكل خيوط غامقة واكثر سمكاً واقل تفرعاً ويحمل سلسلة طويلة من السبورات (Williams *et al*.,1983) . ان الرائحة المميزة التي تنبعث من التربة ناتجة عن وجود بكتريا *Streptomyces* التي تنتج بعض المركبات العطرية ومنها Acetyaldehyde (Abdulhameed,2013;Cross and Goodfellow,1984) .

1-1-2 تشخيص بكتريا *Streptomyces* sp. :

شخصت بكتريا *Streptomyces* حسب ما بين Kampfer (2012) على انها بكتريا خيطية موجبة لصبغة كرام غير متحركة , مكونة للسبورات وتتميز بتكوينها مايسليوم ارضي وهوائي ، توجد في التربة وفي الطين وفي النباتات المتحللة على ضفاف الانهر وفي البرك المائية وعزلت ايضا من السواحل والرواسب ومن اعماق البحار ومن الاعشاب البحرية المتحللة وان رائحة التربة التي تنتجها البكتريا مصدرها مركب Geosmin ومركب methyl- isobroneol ، اغلب انواع

بكتريا *Streptomyces* المحبة للحرارة المعتدلة mesophilic *Streptomyces* تفضل النمو بدرجة حرارة (25 - 35) م عند رقم هيدروجيني 6.5 - 8 بمدة حضن 7 - 14 يوم ، بينما البكتريا المحبة للحموضة acidophilic *Streptomyces* تنمو عند الرقم الهيروجيني 4.5 ، والبكتريا القلوية تنمو عند الرقم الهيدروجيني (10 - 11) ، اما البكتريا thermophilic *Streptomyces* التي تنمو بدرجات حرارية عالية تتراوح بين (40 - 55) م° خلال فترة حضن 2 – 5 ايام والتي تتواجد في السماد العضوي والتبن والحبوب وكذلك في التربة وبراز الخنازير والمياه العذبة وبيئات المياه المعدنية والبيئات البحرية ومن امثلة هذا النوع من البكتريا هو *Streptomyces thermospinisporus* و *Streptomyces thermocoprophilus* ، كما تتواجد بكتريا *Streptomyces* بشكل عام في التربة وجذور النباتات ورواسب البحيرات والرواسب البحرية والانهر (Tatar *et al*.,2020) ، وتحتوي على نسبة عالية من Guanine – Cytosine (57 – 75) % في جينومها (Castaneda-Cisneros *et al*.,2020) ، شخصت بعض انواع بكتريا *Streptomyces* من خلال الاعتماد على الفحوصات الكيموحيوية وكما مبين في جدول (1-2) في حين استعملت تقنية PCR لتشخيص انواع اخرى تابعة لها وذلك لصعوبة تشخيصها ولكثرة انواعها ، ذكر Kemung *et al*,(2020) ان البكتريا المعزولة من تربة الغابات في ماليزيا شخصت على انها *Streptomyces galbus* خلال التشخيص باستعمال جين 16S rRNA بتقنية PCR والتسلسل الجيني (Sequence) .

جدول (2-1) الاختبارات التشخيصية لبعض انواع بكتريا *Streptomyces* (Kampfer, 2012)

الاختبار	النتيجة
Melanin pigment	D
Catalase	+
Oxidase	+
Urease	+
H_2S production	+
Nitrate Reduction	+
Methyl Red (MR)	-
Voges-Proskaur (VP)	-
Citrate utilization	+
Gram- stain	+
Gelatin hydrolysis	+

Fermentation	Aerobic
محللة لكل من :	
Casein	+
Starch	+
Lipid	+
استهلاك المصادر الكاربونية	
D-glucose	+
D-manitol	+
Fructose	+
Sucrose	D
استهلاك المصادر النايتروجينية	
D-alanine	+
L-arginine	+
L-tyrosine	+

D = اختلاف نتيجة التفاعل باختلاف العزلات ، - = نتيجة سالبة ،+ = نتيجة موجبة

2-1-2 اهمية بكتريا *Streptomyces* والاستعمالات التطبيقية لها :

تعد بكتريا *Streptomyces* من اهم الاجناس التي لها القدرة على تحلل المواد العضوية المعقدة من خلال النظم الانزيمية التي تمتلكها وبالتالي تلعب دوراً مهماً في الحفاظ على التوازن البيئي في الطبيعة (Goodfellow and Williams,1983). كما استخدمت بكتريا *Streptomyces* في معالجة الاصابات الفطرية التي تتعرض لها النباتات وان المنتجات

المستخلصة منها تكون امنة وذات كلفة اقتصادية قليلة مقارنة مع المبيدات المستعملة فضلا عن عدم وجود اي تأثيرجانبي لها سواء كان على النبات او حتى الانسان (Heydari and Pessarakli,2010), اذ تنتج بكتريا *Streptomyces* اكثر من 75 % من المضادات الحياتية المستخدمة في المجالات الطبية المختلفة مثل Tetracyclin كمضادات بكتيرية والـ Aremectin كمضاد للطفيليات والـ Daunorubicin كمضادات سرطانية (Brautaset *et al*.,2000) ومن المضادات الحياتية المنتجة من هذه البكتريا ايضاً هي Aminocyclosides ، Polynes ، Pentides ، Nucleosides ، Betalactamat ، Calcopeptides ، Tetracyclines ، Streptomycin ، Neomycin ، Gentamicin (Berdy,2005) ، اشار Tata *et al*.,(2019) الى ان المضاد الحيوي Mzabimycins و Angucycline المنتج من بكتريا *Streptomyces* sp. اظهر نشاطا مضادا لبعض انواع البكتريا المرضية مثل *Staphylococcus aureaus* و *Listeria monocytogenes* مقارنة مع المضادات الحيوية الاخرى ، ذكر Sheik *et al*. (2019) ان الفضة النانوية AgNPs المنتجة من بكتريا *Streptomyces* sp.DW102 ساعدت على تثبيط البكتريا المرضية ، أشار (Hasani *et al*., 2014) الى بعض المضادات الحياتية المنتجة من انواع مختلفة من بكتريا *Streptomyces* والمبينة في الجدول (2-2)، كما انها تمتلك قدرة عالية على التخليق الحيوي لانتاج العديد من المركبات النشطة بايولوجيا مثل المركبات المضادة للبكتريا، المضادة للسرطان ، المضادة للفايروسات والديدان (*Li et al*.,2019).

لبكتريا *Streptomyces* دورا مهما في تحلل الزيوت والدهون في مياه الصرف الصحي للمنازل والمطاعم ومعامل الالبان وذلك من خلال النظم الانزيمية التي تمتلكها ومنها انزيم Lipase الذي يعمل على تحويل السلسة الطويلة والمعقدة للدهون والزيوت الى سلسلة قصيرة قابلة للذوبان والتحلل (Boran *et al* ., 2019)، افاد Kemung *et al*.(2020) الى ان بكتريا *Streptomyces* sp لها القدرة على انتاج النواتج الايضية المضادة للاكسدة والتي يمكن استغلالها بشكل اوسع في المجالات العلاجية المختلفة ، في حين ان هناك انزيمات اخرى مهمة انتجت من قبل بكتريا *Streptomyces exfolitus* منها انزيم يوركيز Uricase والذي له دور رئيسي في خفض نسبة حامض اليوريك في الجسم وذلك من خلال اكسدته وطرحه الى الخارج عن طريق الجهاز البولي (Aly *et al*., 2013)، تمتاز بكتريا *Streptomyces* بانتاجها للعديد من الانزيمات مثل (protease ، amylase ، lipase ، pectinase ، cellulase ، xylanase ، Treansglutaminase and asparaginase) لذا تعتبر من الكائنات الحية المفيدة صناعيا اذ

استخدمت بكتريا *Streptomyces* المعزولة من التربة في انتاج انزيمات البروتيزات واللاييبيزات المستعملة في الصناعات المختلفة ومنها صناعة الجلود والمنظفات والصناعات الدوائية وفي صناعة الخبز ومنتجات الالبان (Al-Dhabi *et al*.,2020 ;Kampfer, 2012)، كما انتجت السكريات المتعددة exopolysaccharide من بكتريا *Streptomyces griseorubens GD5* والتي تعتبر مواد غير سامه قابلة للتحلل لها عدة تطبيقات كمستحلبات ومثبتات ولها خصائص مضادة لمرض السكري ومضادة لبعض المايكروبات وايضا كمضادات للاكسدة (Vinothini *et al*.,2019) ، ايضا استعملت بكتريا *Streptomyces* A1013Y المعزولة من التربة في انتاج صبغة زرقاء اللون ذات فعالية مضادة للاكسدة عند اضافتها الى الغذاء والتي لاقت قبولا لدى المستهلك (Zhu *et al*.,2020).

جدول (2-2) بعض المضادات الحياتية المنتجة من بكتريا *Streptomyces* sp. (Hasani *et al*.,2014)

بكتريا *Streptomyces*(S)	المضاد الحيوي المنتج	بكتريا *Streptomyces*(S)	المضاد الحيوي المنتج
S. orchidaccus	Cycloserin	*S.erythraeus*	Erythromycin
S.oriantalis	Vancomycin	*S.vensuella*	Chloramphenicol
S.fradiae	Neomycin, Actinomycin Fosfomycin, Dekamycin	*S.aureofaciens*	Chlortetracycline, Dimethylchlor tetracycline
S.nodosus	Amphotricin B	*S.ambofaciens*	Spiramycin
S.noursei	Nistatin	*S.avermitilis*	Avermicin
S.mediterranei	Rifampin	*S.alboniger*	Puromycin
S.griseus	Streptomycin	*S.niveus*	Novobicin
S.knanamyceticus	Kanamycin	*S.platensis*	Platenmycin
S.tenebrarius	Tobramycin	*S.roseosporus*	Daptomycin
S.spectabilis	Spectinomycin	*S.ribosidificus*	Ribostamycin
S.viridifaciens	Tetracycline	*S.garyphalus*	Cycloserine
S.lincolensis	Lincomycin, Clindamycin	*S.vinaceus*	Viomycin
S.rimosus	Oxytetracyclin	*S.clavuligerus*	Cephalosporin

2-2 بكتريا *Streptomyces smyrnaeus*

شخص هذا النوع من البكتريا لاول مرة من قبل الباحث التركي Tatar *et al*. (2014) وهي بكتريا خيطية موجبة لصبغة كرام ، هوائية ، غير متحركة ، عزلت من تربة بحيرة مالحة في أزمير في تركيا و تتميز بتكوينها مايسيليوم ارضي وهوائي أبيض، المايسليوم الارضي يكون متفرعا والسبورات تكون بشكل سلسلة لولبية على سطح املس ، تنمو بدرجات حرارة تتراوح بين (28 – 45) م وعند رقم هيدروجيني يتراوح من 4 – 12 ، في حين لاتنمو عند درجات حرارة (4 ، 10 ، 50 ، 55) م ، اظهرت هذه البكتريا فعالية تثبيطية لعفن *Aspergillus parasiticus* وخميرة *Candida utilis* وبكتريا *B. subilis*، *Bacillus cereus* *B.pumilus* كما شخصت البكتريا بالفحوصات البايوكيميائية وكما مبين بالجدول (2-3).

جدول (2-3) الاختبارات التشخيصية لبكتريا *Streptomyces smyrnaeus* (Tater *et al*., 2014)

الاختبار	النتيجة
Casien	-
Xanthine	-
Urease	-
Nitrate Reduction	-
محللة لكل من :	
Arbutin	+
Allantion	+
Starch	+
Adenine	+
Tween40	+
Tween80	+
استهلاك المصادر الكاربونية	
L-arabinose	+

Cellobiose	+
D-fructose	+
D-galactose	+
D-sorbitol	+
D-mannitol	+
Adonitol	+
D-mannose	+
Lactose	+
Maltose	+
Sucrose	+
Dextrin	+
Inulin	+
Xylitol	+
Xylose	+
Succinic acid	+
D-arabinose	-
Dextran	-
L- sorbose	-
L-glutamic acid	-
استهلاك المصادر النايتروجينية	
L-alanine	+
L-arginine	+
α-iso-leucine	+
Glycine	+
Hydroxyl-L- proline	+
L-threonine	+
L-proline	+
L- serine	+
L-valine	+
L-phenylalanine	-
L- methionine	-
L- histidine	-
L- cysteine	-

+ = التفاعل موجب ـ = التفاعل سالب

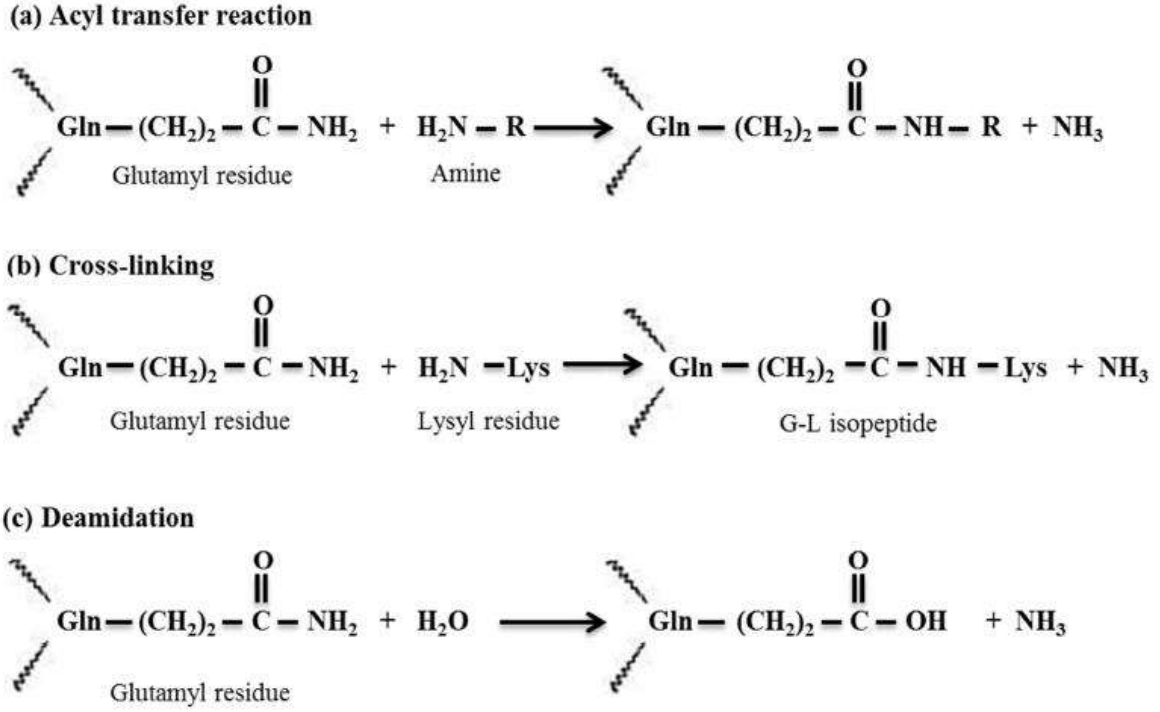
3-2 انزيم الترانسكلوتاميناز (Transglutaminase (TGase:

يعد هذا الانزيم احد انزيمات النقل Transferase والمصنفة من قبل لجنة تصنيف الإنزيمات وسمي بالتسمية النظامية (EC 2.3.2.13) والمعروف ايضاً باسم (protein- glutamine gamma- glutamyltransferase) وكذلك له عدد من التسميات الاخرى منها TGase ، Fibrinoligase ، Factor XIIIa ، Tissue transglutaminase ، glutaminyl- peptide gamma-glutamyltransferase (Kieliszek and Misiewicz,2014)، اكتشف انزيم TGase لاول مرة عام 1957 من قبل العالم الالماني Heinrich Waelsh في كبد خنزير غينيا والذي اعتبر المصدر الوحيد لانتاجه حتى نهاية الثمانينات (de Goes- Favoni and Bueno,2014; Zilda,2014)، استعمل هذا الانزيم لدمج الامينات في البروتينات وهو يعتبر امن صحياً (GRAS) منذ عام 1998 حسب تصريح منظمة الغذاء والدواء الامريكية (FDA) وكذلك الاتحاد الاوربي وفقاً لتوجية EC 13 /2000 لذا فان TGase يمكن استعماله في الصناعات الغذائية (Gaspar and de Goes-Favoni,2015) .

4-2 ميكانيكية او الية عمل انزيم TGase :

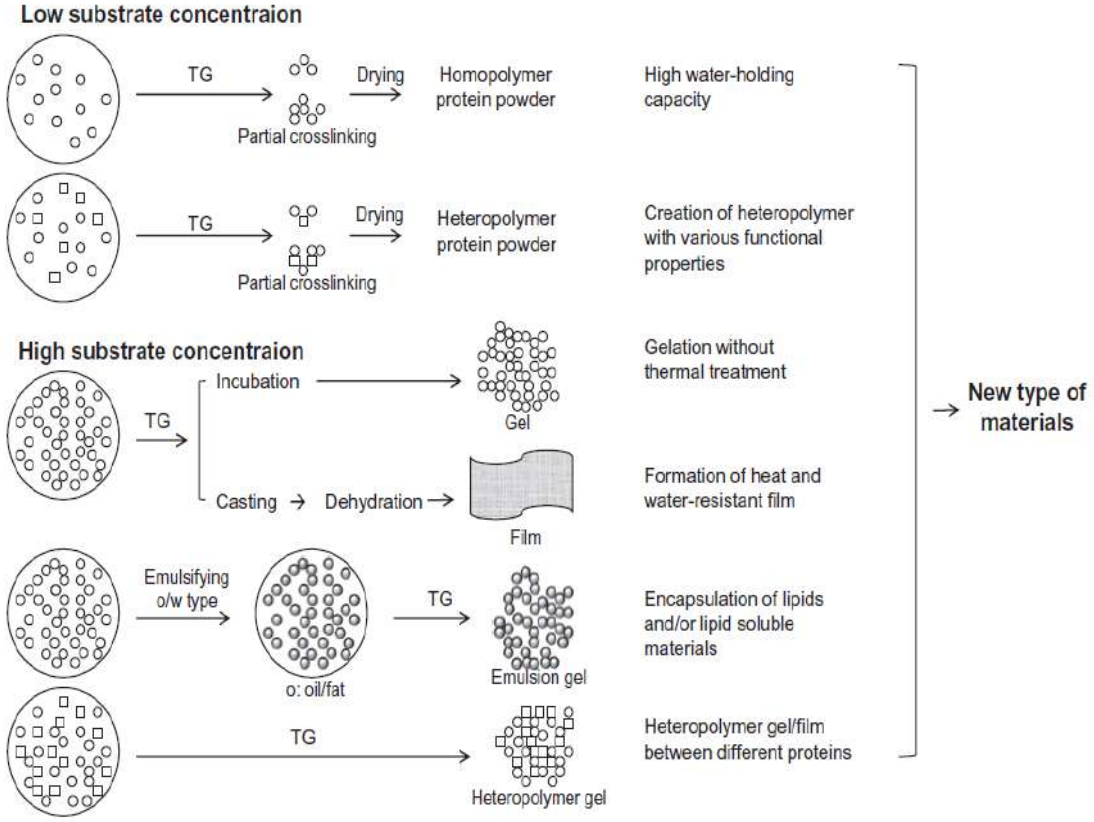
البروتينات هي احدى المكونات الرئيسية في الغذاء وبالتالي فان تحويرها بالطرائق الكيميائية كان محدوداً وغير مرغوب فية بسبب النواتج الثانوية الضارة التي قد تتشكل اثناء المعاملة كما ان العديد من الكواشف الكيميائية المستعملة تكون سامة ، لذلك لجأ العلماء الى استعمال الانزيمات لما لها من صفات امنة ونتائج مرغوبة لكونها تقوم بالعديد من الوظائف كالتحلل الجزئي للبروتينات ودمج المجاميع الوظيفية للبروتينات وكذلك تكوين شبكة بروتينية مرتبطة تساهميا ذات خصائص متعددة (Buchert *et al*., 2010) ، ومن هذه الانزيمات هو انزيم TGsae اذ يمتلك فعاليه و نتائج ممتازة في مجال تحوير البروتينات من خلال عدة ميكانيكيات او اليات منها يحفز تفاعلات نقل مجموعة الاسيل وازالة الامايد وتفاعلات الربط التقاطعي Cross linking (البلمرة) بين الكلوتامين الواهب للاسيل وبين اللايسين المستقبل لمجموعة الاسيل وتكوين Isopeptide كما يعمل هذا الانزيم على تحوير البروتينات عن طريق دمج الامينات ذات الوزن الجزيئي المنخفض ، اذ تزداد عدد الروابط التقاطعية وبالتالي يتغير التركيب الجزيئي للبروتينات من خلال البوليمرات المتكونة ذات الوزن الجزيئي العالي (Sayadi et al.,2013; Celis , 2009)، ان الانزيم المضاف يعمل على نقل مجموعة الاسيل التابعة لمجاميع (γ_Carboxy Amide) ضمن جزيئة الحامض الاميني الكلوتامين في السلسلة الببتيدية او البروتين الذي يعتبر واهب لها الى مجاميع

الامينات الاولية التي تعتبر مستقبله للاسيل ويسمى هذا التفاعل بتفاعلات نقل مجموعة الاسيل (Acyl Transferase) كما في الشكل (2-1- a) اما اذا كان وسط التفاعل حاوياً على الحامض الاميني اللايسين Lysine فان الانزيم المضاف يعمل على الجزيئات البروتينية ويستعمل مجموعة امينو ابسلون (ε-Amino Group) كمستقبل لمجموعة الاسيل الموهوبة من الكلوتامين وبالتالي يؤدي الى تكوين ربط تقاطعي ضمن الجزيئة او الجزيئات البروتينية وتكوين مجموعة lysine - ε (γ- glutamyl) كما في الشكل(2-1- b) ويسمى هذا التفاعل بتفاعل الربط التقاطعي (Cross-Linking Reaction) هذه المجموعة المتكونه تعتبر مهمة في تكوين هلام اكثر ثباتاً من خلال التاثير على صفة كراهية سطح البروتين للماء ومن خلال الربط التقاطعي تتكون بوليمرات عالية الوزن الجزيئي ، اذا ان الاواصر المتكونة نتيجة الربط التقاطعي تكون مسؤولة عن الثباتية خلال التصنيع وكذلك المقاومة للفعل الميكانيكي والتحلل الانزيمي والكيميائي وايضا للظروف التصنيعية المختلفة اما في حالة غياب الامينات الاولية وحجب مجموعة امينوابسلون للحامض الاميني اللايسين من وسط التفاعل فان الماء الموجود في التفاعل يعمل على استقبال مجموعة الاسيل الموهوبة من الكلوتامين وبالتالي فان الكلوتامين بفعل انزيم MTGase يتحول الى حامض الكلوتاميك وهذا التفاعل يغير في شحنة البروتين وبالتالي يسبب تغير في ذائبية البروتين ويسمى هذا التفاعل بتفاعل ازالة الامايد (Deamidation Reaction) كما في الشكل (2 -1-C)(Kieliszek and Misiewicz,2014; Mostafa,2020).



شكل (2-1) ميكانيكية عمل انزيم MTGase : (a) تفاعلات نقل الأسيل. (b) تفاعلات الربط التقاطعي بين اللايسين والكلوتامين . (c) تفاعلات إزالة الأمايد .(Mostafa,2020)

درس كل من Gaspar and de Goes-Favoni (2015) تأثيرعمل انزيم MTGase على الخصائص الوظيفية للبروتينات ، اذ لاحظا بأن المادة الخاضعة عندما تكون من نوع واحد من البروتينات وذات تركيز واطئ فان انزيم MTGase المضاف يعمل على تكوين ربط تقاطعي جزئي وبالتالي تكوين بوليمر متجانس (Homopolymer) ذو قدرة عالية على حمل او حجز الماء ، اما اذا كانت المادة الخاضعة اكثر من نوع من البروتينات وذات تراكيز واطئة فان الانزيم يعمل ومن خلال الربط التقاطعي على تشكيل بوليمر غير متجانس (Heteropolymer) ذو خصائص وظيفية متنوعة وكما مبين في شكل (2-2) ، كذلك بين الباحثان ان تركيز المادة الخاضعة اذا كان عالياً وذات نوع واحد من البروتينات فان اضافة الانزيم ثم الحضن يؤدي الى تكوين هلام بدون معاملة حرارية ، اما عند اضافته وتركه يجف فأنه يكون غشاء (Film) مقاوم للحرارة والماء ، كما ان اضافة الانزيم الى المادة الخاضعة والتي تكون بشكل مستحلب دهن في ماء فأنه يعمل على تكوين هلام مستحلب يستخدم لتغليف المواد الذائبة بالدهن .



شكل (2-2) : الربط التقاطعي بفعل عمل انزيم TGase مؤديا الى تكوين بروتينات ذات خصائص وظيفية جديدة وفريدة من نوعها (Gaspar and de Goes-Favoni 2015).

5-2 مصادر انزيم TGase :

1-5-2 مصادر حيوانية :

عزل انزيم TGase من مصادر حيوانية متنوعة ومنها كبد خنزير غينيا على يد العالم الالماني Heinrich Waelsh (Sarkar *et al*.,1957)، كما عزل ايضا من كبد الارانب من قبل (Abe *et al*.,1977) واستخلص ايضا من كبد سمك Sea Bream البحري الذي يعود الى عائلة Sparidae من قبل (Yasueda *et al*.,1994)، وتمكن Ohashi *et al*. (1995) من عزل انزيم TGase من ادمغة الجرذان ، وكذلك استطاع الباحثان Puszkin and Raghuraman,(1985) استخلاص الانزيم من قوانص الدجاج، وايضا من المحار الياباني (Kumazawa *et al*.,1997)، ومن كبد الضفادع (Assisi *et al*.,1999) ، والسردين الاوربي (Batista *et al*.,2002) ، وتمكن Worratao and Yongsawatdigul (2005)من عزل انزيم MTGase من سمك البلطي ، وعزل الانزيم من اربعة انواع من الاسماك وهي البلطي والكارب والنهاش والسردين (Binsi and Shamasundar,2012) ، وعزل ايضا من قشريات القطب الجنوبي من نوع *Euphausia superba* (Zhang *et al*.,2017) ، وكذلك من جراد البحر (Sirikharin *et al*.,2018) ، ومن سلمون سالار (Malinowska-Panczyk and Kolodziejska,2018) ومن الروبيان (Zheng *et al*.,2018)، وكذلك استطاع Razavian *et al*. (2020) استخلاص انزيم TGase من كبد الابقار .

2-5-2 مصادر نباتية :

لوحظ وجود انزيم TGase في بعض انواع النباتات من قبل العديد من الباحثين اذ تم عزله من بنجر السكر (Signorini *et al*.,1991) ، وزهرة الشمس *Helianthus tuberosus* (Falcone *et al*., 1993) ، واستخلص ايضا من نبات الاقحوان (Aribaud *et al*.,1995) ، وكذلك عزل من نبات الترمس الابيض (Siepaio and Meunier1995) ، كما تمكن كل من Kang and Cho,(1996) من عزله من اوراق فول الصويا ، وايضا استخلص من جذور واوراق نباتات الباقلاء والحنطة (Lilley *et al*., 1998) ، وكذلك من نبات التبغ (Serafini-Fracassini *et al*.,2002) ، ومن الذرة نوع *Zea mays* (Li *et al*., 2013) ، كما استطاع El- Hofi *et al*.,(2014) من استخلاص الانزيم من نبات اكليل الجبل.

3-5-2 مصادر مايكروبية :

ان عزل انزيم TGase من المصادر الحيوانية والنباتية واجه صعوبات على المستوى التجاري بسبب الكلفة العاليه في عمليات الفصل والتنقية مما دعى الباحثين الى التفكير ببدائل اخرى مختلفة ومنها انتاجه من الكائنات الحية الدقيقة اذ تم عزله لاول مرة من بكتريا S-8112 *Streptoverticillium* عام 1989 من قبل (Motoki and Seguro, 1998; Ando *et al*., 1989) وكذلك انتج من بكتريا *Escherichia coli* (Yokoyama et al., 2000)، وايضا من بكتريا *Corynebacterium glutamicum* (Kikuchi *et al*., 2003)، كما تمكن كل من Ragkousi and Setlow,(2004) من عزل الانزيم من بكتريا *Bacillus subtilis* ، وكذلك انتج من بكتريا *Streptomyces lividans* (Noda *et al*., 2013) ، وعزل من بكتريا *Bacillus circulans* BL32 (de Souza *et al*.,2011) ، ومن بكتريا *Streptomyces mobaraensis* (Jin *et al*.,2016)، وانتج ايضا من بكتريا *Streptomyces* sp. CBMAI 1617 (Ceresino *et al*.,2018)، وتمكن كل من Sorde and Ananthanarayan (2019) من انتاج الانزيم من بكتريا *Bacillus subtilis and Bacillus nakamurai*، وقام Ozcelik *et al*. (2019) بانتاج الانزيم من خميرة *Pichia pastoris* ، كما ان الجدول (2-4) يبين الفعاليه الانزيمية لانزيم TGase المنتج من بعض المصادر المايكروبية المختلفة.

جدول (2-4) بعض الاحياء المجهرية المنتجة لانزيم TGase

الاحياء المجهرية	الفعاليه وحدة / مل	المصدر
Streptoverticillium cinnamomeum	0.331	Junqua *et al*.,(1997)
Bacillus circulans BL32	0.28	de Souza *et al*. (2011)
Actinomycete	0.04	Eshra *et al*. (2015)
Streptomyces sp. *polar*	0.20	Bahrim *et al*. (2010)
Enterobacter sp.C2361	1.18	H-Kittikun *et al*. (2012)
Streptomyces platensis	0.66	Lin *et al*. (2006)

M5218		
Enterobacter sp. *C2361* *Providencia* sp. *C1112*	0.77 0.92	Bourneow *et al.* (2012)
Streptomyces sp.TTA02	0.77	Nuramaliyah *et al.*,(2016)
Streptomyces sp.	1.45	Fawzya *et al.*,(2016)
Bacillus nakamurai *Bacillus subtilis*	1.71 1.61	Sorde and Ananthanarayan,(2018)

4-5-2 مصادر اخرى :

يوجد انزيم TGase في سوائل الجسم اذ تم تحديد ثمانية منه في جسم الانسان وهي TG1 الذي يعرف بانزيم الخلايا الكيراتينية teratiocyte transglutaminase1 وهو مسؤول عن تكوين الغلاف الذي يغطي القرنية ويعتبر حاجز ضد فقدان الماء وحمايتها من الامراض ، انزيم TG2 ويسمى بالانزيم النسيجي tissue transglutaminase والذي يتواجد بشكل واسع في الانسجة والخلايا ، انزيم TG3 وهو انزيم البشرة ويوجد في الجلد والمخ والغشاء المخاطي والامعاء الدقيقة ، انزيم TG4 ويسمى بالانزيم البروستاتي ويوجد في غدة البروستات وسوائل البروستات والسائل المنوي ، TG5 ويسمى ايضا TGx وهو انزيم البشرة اذ يوجد في الطبقات العليا من بشرة الجلد، انزيم TG6،TG7 اللذان يتواجدا في الرئة والخصيتين ، انزيم Factor XIII (Fibrin stabilizing factor) ينتج عن طريق الكبد وهو عامل تثبيت الفايبرين يساعد على ايقاف نزيف الدم والتئام الجروح ويتكون من وحدتين فرعيتين هما (A(FXIII-A و B(FXIII-B) ويحتاج الى الكالسيوم والثرومبين لتنشيطة ، انزيم TGt ويعرف باسم (Band4.2) له دور مهم في الحفاظ على غشاء الخلية وتنظيم استقرارها ، تختلف هذه الانواع من الانزيم في الوزن الجزيئي والخصائص الكيميائية الحيوية لكنها تشترك في متطلبات تنشيطها باضافة الكالسيوم (Duarte *et al.*,2020) .

6-2 تركيب انزيم TGase :

يشكل التركيب الثانوي لانزيم TGase المعزول من بكتريا *Streptoverticillium mobaraense* مجالا داخلياً مضغوطاً مع شق عميق يحتوي على ثمانية خيوط بيتا (β -sheet) محاطة باحد عشر حلزون (α-helices) (Kashiwagi *et al.*, 2002) ، اما التركيب الاساسي

له فيتكون من 331 حامض اميني وذلك من خلال معرفة تسلسل الاحماض الامينية للانزيم بطريقة Edman كما ان الموقع النشط في الانزيم متمثل بالمركز التحفيزي المكون من الحامض الاميني السستئين Cysteine الذي يضم مجموعة الثايول الحرة في الموقع Cys-64 كذلك الاستبارتيك Aspartic acid في الموقع Asp-255 وايضا الهستدين Histiden في الموقع His-274 كما مبين بالشكل (2-3) (Nio and Yokoyama 2017) .

شكل (2-3) : تركيب انزيم TGase المنتج من بكتريا *Streptoverticillium mobaraense* (Nio and Yokoyama , 2017).

2-7 الظروف المثلى لانتاج الانزيم :

الظروف المثلى لها دور مهم في انتاجية الانزيم ومنها المصدر النتروجيني الذي يدخل في تركيب الاحماض الامينية كونها الوحدة الاساسية لبناء البروتينات والانزيمات (المنهل ، 2011) اشار Cui *et al*. (2007) الى ان المصدر النتروجيني الذي يتكون من الببتون وفول الصويا اعطى فعاليه نوعية 0.25 وحدة / ملغم لانزيم MTGase المنتج من بكتريا *Streptomyces hygroscopicus* ، افاد Ceresino *et al*. (2018) الى ان فول الصويا استعملت كمصدر نتتروجيني وبنسبة 2.5% من وسط انتاج الانزيم اذ اعطت فعاليه انزيمية عاليه لانزيم MTGase

المنتج من بكتريا *Streptomyces* sp. CBMAI 1617 ، اما الرقم الهيدروجيني الذي له تأثير على فعاليه الانزيم من خلال تأثيره في تأين المجاميع الايونية في الموقع الفعال للانزيم بالاضافة الى تأثيره في ثبات الانزيم (Whitaker,1972) ، ذكر Jin *et al*. (2016) ان انزيم MTGase المنتج من بكتريا *Streptomyces mobaraensis* كان ثابت عند الرقم الهيدروجيني الذي يتراوح بين (5 – 10) ، ايضا درجة الحرارة التي تعد عاملا اساسيا في تحديد نشاط الاحياء المجهرية وذلك من خلال تأثيرها في معدل النمو والانتاج وتختلف درجة الحرارة حسب نوع الكائن المجهري المستعمل في الدراسة (المنهل ، 2011) بين Sord and Ananthanarayan (2019) ان درجة الحرارة المثلى لانزيم MTGase المنتج من بكتريا *Bacillus subtilis* بلغت 60 م°، وكذلك مدة الحضن التي تعد احد العوامل المهمة والتي تمثل الزمن الامثل لتنمية الاحياء المجهرية لانتاج الانزيم اذ تتأثر بعدة عوامل منها نوع الكائن المجهري المستعمل ومكونات وسط الانتاج الانزيمي (Park *et al*.,1979) اشار Fawzya *et al*. (2016) الى ان اعلى فعاليه لانزيم MTGase المنتج من بكتريا *Streptomyces* sp. كانت في اليوم الرابع من الحضن ، وافاد Turker *et al*. (2016) الى ان فعالية الانزيم المنتج من بكتريا *Streptomyces* sp. كانت اعلى في اليوم السادس من الحضن ، وايضا حجم اللقاح الذي يعتبر احد العوامل المهمة في الانتاج الانزيمي اذ ان الزيادة او النقيصة في حجم اللقاح تؤثر على فعالية الانزيم ، اشار Bahrim *et al*. (2010) الى ان افضل حجم لقاح لبكتريا *Streptomyces* sp. كان 2 مل / 50 مل وسط انتاج انزيمي .

8-2 تنقية الإنزيم Enzyme Purification :

ان تنقية الانزيمات تتطلب اجراء عدد من الخطوات الكيميائية والفيزيائية للتخلص من المواد الموجودة مع الانزيم وكذلك التخلص من البروتينات الاخرى ، وتعتمد كفاءة كل خطوة من خطوات التنقية على كمية الانزيم المستحصل عليها وعلى عدد مرات التنقية ، وان طرائق التنقية تختلف اعتماداً على صفات وخصائص الانزيم المطلوب تنقيته (Segel , 1976) ، قام Ho *et al*. (2000) بتنقية انزيم TGase المنتج من بكتريا *Streptoveticillum ladakanum* باستعمال خطوة المبادل الايوني CM- sepharose CL- 6B ثم كروموتوكرافي الالفة باستعمال عمود Blue sepharose fast flow وبعدد مرات تنقية 14.4 مرة وبحصيلة انزيمية 68.4%. كما تمكن Zhang *et al*. (2012) من تنقية الانزيم المنتج من بكتريا *Streptomyces mobaraensis* DSM40587 بطريقة الترشيح الفائق Ultrafiltration اعقبها خطوة الترشيح الهلامي sephadex G-75 ثم استعمل SP sepharose High performance فكانت عدد

مرات التنقية 5.9 مرة وبحصيلة انزيمية 74% ، كما عمل Nur'amaliyah *et al*. (2016) على تنقية الانزيم المنتج من بكتريا *Streptomyces* sp. TTA 02 SDS 14 بالترشيح الفائق Ultrafiltration وبعدها استعمل المبادل الايوني Q- sepharose ثم الترشيح الهلامي sepacryl S- 200 بعدد مرات تنقية 27.17 مرة وبحصيلة انزيمية 1.36 % ، ونقى Jin *et at*. (2016) الانزيم المنتج من بكتريا *Streptomyces mobaraensis* بطريقة الترسيب بالايثانول بعدها استعمل sepharose fast flow ومن ثم phenyl sepharose بعدد مرات تنقية 21.59 مرة وبحصيلة انزيمية 36.88% ، اما Zhang *et al*. (2018) فقد استعمل خطوة الترسيب بكبريتات الامونيوم بدرجة تشبع 55% ثم بعدها الفصل بالترشيح الهلامي sephadex G-100 تلاها المبادل الايوني DEAE - cellulose بعدد مرات تنقية 48.362 مرة وبحصيلة انزيمية 12.69 % .

9-2 توصيف الانزيم Enzyme Characterization :

ان لانزيم MTGase دوراً في احداث تغيير كبير وواضح في خصائص الغذاء وصفاته من خلال تحوير البروتين وتحسين الثباتية تجاه درجة الحرارة وخصائص الاستحلاب والهلام وزيادة قابلية ربط او حمل الماء ومنع نضوح الشرش دون تغيير في درجة الحموضة او اللون او النكهة او جودة ونوعية الغذاء بل يجعله ذات مقبولية اكثر من خلال امكانية جمع او ربط الاحماض الامينية الاساسية (Ajinomoto, 2013)، يعمل انزيم MTGase في مدى واسع من الرقم الهيدروجيني (4.5 - 8) ودرجة الحرارة (40- 70) م ولا يتطلب اضافة الكالسيوم لتنشيطة وهو عامل مهم في الصناعات الغذائية لان العديد من البروتينات الغذائية مثل كازينات الحليب وكلوبيولين فول الصويا والمايوسين تكون حساسة لايونات الكالسيوم المترسبة ، كما يزداد نشاطة بوجود (K، Ba_2، Ca_2) ويثبط الانزيم بوجود ايونات (Cu_2، pb_2، Zn_2، Hg_2) من خلال ارتباطها بمجموعة الثايول الحرة في الحامض الاميني السستئين بالموقع 64 من الانزيم والذي يمثل مركز نشاط الانزيم (Kieliszek and Misiewicz, 2014; Yokoyama *et al*.,2004) ، لاحظ Ho *et al*. (2000) بان درجة الحرارة 45 م والرقم الهيدروجيني 5.5 هي الاكثر ملائمة للنشاط التحفيزي لانزيم MTGase ، كما ان الانزيم يحافظ على نشاطة بشكل كامل في درجات الحرارة القريبة من الصفر المئوي (Yokoyama *et al*.,2004) ، وفي دراسة اخرى قام بها Jin *et al*. (2016) والتي بين فيها ان انزيم MTGase كان ثابتاً عند مدى من الرقم الهيدروجيني تراوح بين 5- 10 وكانت اقصى فعالية انزيمية له عند الرقم الهيدروجيني 6 ودرجة حرارة 48 م ، وجد Cui *et al*. (2007) ان اضافة انزيم MTGase مع الكاربوهيدرات

مثل Maltodextrin ,Saccharose, Mannose, Trehalose يزيد الثبات الحراري له ، ان الربط التقاطعي للبروتينات بفعل الانزيم يؤدي الى تكوين بوليمرات عالية الوزن الجزيئي ذات خصائص وظيفية مختلفة (Carvajal *et al*.,2011).

2-9-1 الوزن الجزيئي لانزيم TGase

يختلف الوزن الجزيئي لانزيم TGase باختلاف مصدر العزل سواء كان مايكروبياً او نباتياً او حيوانياً ، هناك عدة طرائق لتقدير الوزن الجزيئي منها الترشيح الهلامي والترحيل الكهربائي بوجود المادة الماسخة للبروتين (SDS- PAGE) وكذلك النبذ المركزي الفائق (Ultracentrifuge) ومطياف الكتلة (Mass- Spectrophotometer) ، كما في جدول (2-5).

جدول (2-5) الوزن الجزيئي لانزيم TGase من مصادر مختلفة .

المصدر	طريقة التقدير	الوزن الجزيئي (كيلو دالتون)	المصادر البكتيرية المنتجة للانزيم
Cui *et al*. (2007)	SDS- PAGE	38	*Streptomyces hygroscopicus*
Ko and Kim,(2009)	SDS- PAGE	45	*Streptomyces platensis* YK-2
Jin *et al*. (2016)	LC-MS	37.81	*Streptomyces mobaraensis*
Macedo and Sato(2009)	SDS- PAGE	45	*Streptomyces* sp.
Bourneow *et al*. (2011)	SDS- PAGE	29.84	*Enterobacter* sp.C2361
Nur amaliyah *et al*. (2016)	SDS- PAGE	72	*Streptomyces* sp.TTA 02 SDS 14
المصدر	طريقة التقدير	الوزن الجزيئي	المصادر الحيوانية المنتجة للانزيم
Folk and Cole (1966)	SDS- PAGE	90	كبد خنزير غينيا
Zhang *et al*. (2017)	SDS- PAGE	78	قشريات القطب الجنوبي Antarctic krill (*Euphausia superba*)
Sirikharin *et al*. (2018)	SDS- PAGE	86	جراد البحر
Abe *et al*. (1977)	SDS- PAGE	80	كبد الارنب

Ohashi *et al*. (1995)	SDS- PAGE	75	دماغ الفأر
Worratao and Yongsawatdigul (2005)	SDS- PAGE	85	سمك البلطي
Zheng *et al*. (2018)	SDS- PAGE and western blot	55	الروبيان
Binisi and Shamasundar (2012)	SDS- PAGE	73 – 95	سمك الكارب والبلطي والنهاش والسردين
Zhang *et al*. (2018)	SDS- PAGE	63.5	*Mythimna separate* (Lepidoptera: Noctuidae)
المصدر	طريقة التقدير	الوزن الجزيئي	المصادر النباتية المنتجة للانزيم
Signorini *et al*. (1991)	SDS- PAGE	65	بنجر السكر
Siepaio and Meunier,(1995)	SDS- PAGE	54	نبات الترمس الابيض
Bernet *et al*. (1999)	SDS- PAGE	55	نسيج الذرة الصفراء
Del-Duca *et al*. (1997)	SDS- PAGE	58	التفاح
Kang and Cho (1996)	SDS- PAGE	80	اوراق فول الصويا

2-9-2 تاثير الرقم الهيدروجيني على فعالية وثبات الانزيم :

يؤثر الرقم الهيدروجيني في سرعة التفاعل الانزيمي نتيجة تأين المجاميع الايونية في الموقع الفعال للانزيم وتأثيره في تأين المكونات الاخرى لوسط التفاعل مثل المادة الخاضعة وتأين معقد الانزيم والمادة الخاضعة فضلا عن تاثيره في ثبات الانزيم (الداودي ، 1990) ، يعتمد الرقم الهيدروجيني الامثل للانزيم على عدة عوامل منها درجة الحرارة والقوة الايونية وطبيعة المحلول الدارئ وتركيز المنشطات والمثبطات والمادة الخاضعة ومصدر وتركيز الانزيم (Segel,1976). ذكر Ando *et al*. (1989) ان ثبات الرقم الهيدروجيني للانزيم المنتج من بكتريا *Streptomyces mobaraensis* تراوح بين (6 -8) ، في حين ان الرقم الهيدروجيني الامثل

كان 7 ، اشار Suzuki *et al*. (2000) الى ان الرقم الهيدروجيني الامثل لانزيم TGase المنتج من بكتريا *Bacillus subtilis* بلغ 8.2 ، وجد Cui *et al*. (2007) ان الانزيم TGase المنقى والمنتج من بكتريا *Streptomyces hygroscopicus* ثابت عند رقم هيدروجيني يتراوح بين (5 -8) بدرجة 10مº لمدة 30 دقيقة , بين Macedo (2009) ان الرقم الهيدروجيني الامثل للانزيم المنتج من بكتريا *Streptomyces* sp. CBMAI هو 6.5 ، واشار Zhang (2012) *et al*., الى ان ثبات الرقم الهيدروجيني لانزيم TGase المنتج من بكتريا *Streptomyces mobaraensis* DSM 40587 كان (5- 9) عند درجة حرارة 37 م لمدة 30 دقيقة وكان (5 – 10) عند درجة حرارة 4 م لمدة 12 ساعة ، ذكر El-Hofi *et al*. (2014) ان الرقم الهيدروجيني الامثل لنشاط الانزيم المنتج من نبات اكليل الجبل *(Rosmarinus officinalis)* هو 7 بدرجة حرارة 37 م ، ايضاً اشار (Nur-amaliyah *et al*. (2016 عند استعمال مدى من الارقام الهيدروجينية تراوحت بين (4-9) عند 50 مº فان انزيم TGase المنتج من بكتريا *Streptomyces* sp. TTA 02 SDS 14 كان الامثل عند الرقم الهيدروجيني 6 , بينما لاحظ Zhang *et al*. (2018) عند دراسة الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الانزيم المنتج من يرقات الفراشة *Mythimna separata* larvae والتي تعود الى عائلة *(Noctuidae Lepidoptera)* عند مدى هيدروجيني (3.5- 8.5) لمدة (10 ، 30 ، 120) دقيقة فوجدوا ان الرقم الهيدروجيني الامثل كان 7.5 بدرجة 37 م لمدة 10 دقائق واظهر الانزيم فعالية بنسبة 80% عند الرقم الهيدروجيني (4.5- 8.5)، لاحظ Ozcelik *et al*. (2019) عند استعماله مدى واسع من الارقام الهيدروجينية تراوحت بين 3- 9 عند 37 مº للانزيم المنتج من خميرة *Pichia pastoris* ان الرقم الهيدروجيني الامثل كان 6 ، وجد (2019) Sorde and Ananthanarayan ان الرقم الهيدروجيني الامثل لانزيم MTGase المنتج من بكتريا *Bacillus nakamurai* بلغ 6 عند درجة حرارة 37 م لمدة 30 دقيقة .

2-9-3 تأثير درجة الحرارة على فعالية وثبات الانزيم:

تزداد فعالية الانزيمات بارتفاع درجة الحرارة الى ان تصل الى درجة معينة ثم بعدها تاخذ بالانخفاض نتيجة لحدوث مسخ لبعض جزيئات البروتين وتسمى درجة الحرارة التي يكون فيها الانزيم باقصى فعاليته بدرجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم (Segel,1976)، اما درجة الحرارة التي يكون فيها الانزيم ثابتاً لفترة من الزمن مع الاحتفاظ بمعظم فعاليته تسمى بدرجة حرارة الثبات وهذه الدرجة تعتمد على تركيز الانزيم والرقم الهيدروجيني ومدة الحضن ووجود المنشطات

والمثبطات وكذلك وجود الاواصر ثنائية الكبريت او الكاربوهيدرات والبروتينات الاخرى مع الانزيم والتي تجعله اكثر مقاومة للحرارة (Segel,1976; Whitaker,1972).

ذكر Ando *et al*. (1989) ان درجة الحرارة المثلى لانزيم TGase المنتج من بكتريا *Streptoverticillium mobaraence* كانت 55 مº ، واشار Tsai *et al*. (1996) ان ثبات الانزيم المنتج من بكتريا *Streptoverticillum ladakanum* كان عند درجة حرارة تراوحت بين (45 - 55) م° لمدة 24 دقيقة ، اما الدراسة التي قام بها Cui *et al*. (2007) لمعرفة تاثير درجة الحرارة على انزيم TGase المنتج من بكتريا *Streptomyces hygroscopicus* عند مدى حراري تراوح بين (20 – 70) ºم لمدة 10 دقائق وعند رقم هيدروجيني 6 وجدوا ان الدرجة الحرارية المثلى لنشاط الانزيم كانت (37 - 45) ºم ، في حين فقد الانزيم فعاليته تماماً عند درجة حرارة 70 مº ، كما لاحظوا ان الفعالية الانزيمية زادت تدريجيا عند وصول درجة الحرارة الى 40 ºم ، بين Nur'amaliyah, *et al*. (2016) ان انزيم TGase المنتج من بكتريا *Streptomyces* sp.TTA02 SDS 14 اظهر ثباتية عند درجة حرارة تراوحت بين (15 – 45) م° لمدة 45 دقيقة من الحضن ثم اخذ بالانخفاض بعد هذه الدرجة الحرارية , كما ان الانزيم المنتج من نبات اكليل الجبل (*Rosmarinus officinalis*) كانت درجة الحرارة المثلى لنشاطة 55 م (El-Hofi *et al*.,2014) ، ايضاً أوضح Zhang *et al*. (2018) عند دراسة الدرجة الحرارية المثلى للانزيم المنتج من يرقات فراشة Mythimna separata larvae *Noctuidae* *Lepidoptera* عند حضنه بدرجات مختلفة تراوحت بين (27 – 57) مئوية لمدة 10 دقائق اذ لاحظوا ان فعالية الانزيم اخذت بالارتفاع الى ان وصلت الى اعلى فعاليه لها عند 42 مº ثم بعد ذلك اخذت بالانخفاض، وبين Ozcelik *et al*. (2019) ان درجة الحرارة المثلى لفعالية الانزيم المنتج من خميرة *Pichia pastors* كانت 60 م° ، وجد (2019) Sorde and Ananthanarayan ان درجة الحرارة المثلى لانزيم MTGase المنتج من بكتريا *Bacillus nakamurai* بلغت 50 م° .

2-9-4 تأثير العناصر المعدنية والمثبطات على فعالية انزيم TGase:

ان المركبات والايونات المعدنية الموجودة في وسط التفاعل لها اهمية كبيرة في زيادة نشاط الانزيم وتسمى بالمنشطات ، اما المركبات والايونات التي تبطيء من سرعة التفاعل وتثبطه تسمى بالمثبطات والتي تؤثر على المادة الخاضعة وبعضها يتحد مع المواقع الفعالة على سطح الانزيم

فيقلل من الالفة بين الانزيم والمادة الخاضعة ، وان التثبيط الذي يحصل للانزيم يعتمد على تركيز المادة الخاضعة وتركيز المثبط ووقت التفاعل وتركيز الانزيم ومصدره وكذلك على الرقم الهيدروجيني ودرجة الحرارة وطبيعة المادة الخاضعة والمحلول الدارئ المستعمل والقوة الايونية (Panesar *et al*.,2006).

بين Ando *et al*. (1989) من خلال دراسته على الانزيم المنتج من بكتريا *Streptoverticillium mobaraense* ان Zn^{2+} ، Pb^{2+} كان لهما تأثير تثبيطي واضح اما Mg^{2+} ليس له تأثير على نشاط الانزيم ، اشار Kobayashi *et al*. (1998) الى ان انزيم TGase المنتج من بكتريا *Bacillus subtilis* ازداد نشاطه بوجود مادة DTT (Dithiothreitol) و EDTA(ethylene diamine tetra acetic acid) الا انه فقد فعاليته بوجود NEM (N- ethylmaleimide)، ذكر Cui *et al*. (2007) بان فعالية انزيم TGase المنتج من بكتريا *Streptomyces hygroscopicus* تتثبط بفعل ايونات (Zn^{2+}،Cu^{2+} ، pb^{2+} ، Hg^{2+} ، Fe^{3+}) ، كما وجد Zhang *et al*. (2012) ان انزيم TGase المنتج من بكتريا *Streptomyces mobaraensis* DSM 40587 لم يتأثر نشاطه بوجود العناصر المعدنيه (+Na،+K ، Ba^{2+} ، Ca^{2+}) في حين ان ايونات Cu^{2+} and Zn^{2+} قد ادت الى انخفاض فعاليته بشكل كبير، اشار Nur'amaliyah *et al*. (2016) الى ان الايونات المعدنية تختلف في درجة تاثيرها على انزيم TGase المنتج من بكتريا *Streptomyces* sp. TTA 02 SDS 14 اذ لاحظ ان (+Na،+K ، Ca^{2+} +Li ، Mg^{2+}) ، ادت الى زيادة نشاطة اما Cu^{2+}،Zn^{2+} كان لهما تأثير تثبيطي واضح على نشاط الانزيم ، وايضاً بين بان الانزيم المنتج فقد فعاليته بوجود مادة PMSF (phenyl methyl sulfonyl fluoride) في حين لم يتأثر نشاطه بفعل EDTA ، خلصت الدراسات العلمية الى ان انزيم الترانسكلوتامنيز المايكروبي لم يتأثر بوجود ايونات الكالسيوم Ca^{2+} وبالتالي فإن وجود مركبات معدنية مثل EDTA لا تؤثر على نشاط الانزيم (Lin *et al*.,2008) ، افاد Jin *et al*. (2016) الى ان نشاط الانزيم المنتج من بكتريا *Streptomyces mobaraensis* قد احتفظ بفعاليته بوجود ايونات (+Na،+Li ، +K،Ca^{2+} ، Mg^{2+} ، Ba^{2+} ، Mn^{2+}) وكذلك الحال عند وجود (EDTA ، PMSF) ، الا انه فقد فعاليته بوجود ايونات (Zn^{2+}،Cu^{2+} ، Fe^{3+}) و NEM (N-ethylmaleimide) ، وبين Zilda *et al*. (2017) ان نشاط الانزيم ازداد بوجود ايونات(+Na،+K ، Ca^{2+} ، Mg^{2+}) كما لم يتأثر نشاطة بوجود مادة EDTA في حين ان ايونات (Zn^{2+}،Cu^{2+} ، Li^{2+} ، Fe^{3+}) قد ادت الى انخفاض فعاليته وذلك لكونها تعتبر معادن ثقيله ترتبط مع مجموعة الثايول

الحرة للحامض الاميني Cysteine ولكون هذا الحامض هو جزء من الموقع الفعال للانزيم وبالتالي يحصل تثبيط لفعالية الانزيم ، كما أوضح Sorde and Ananthanarayan (2019) ان نشاط الانزيم المنتج من بكتريا *Bacillus nakamurai* لم يتأثر بوجود الايونات (Na+ ،K+ ، Mg^{2+}،Mn^{2+}) الا انه ثبط بوجود ايونات (Cu^{2+}، Pb^{2+} Hg^{2+}،) .

2-9- 5 الثوابت الحركية (K_m،V_{max}) :

ان الهدف من دراسة الثوابت الحركية والتي تشمل ثابت ميكالس K_m والسرعة القصوى V_{max} هو للتعرف على الفة الانزيم تجاه المواد الخاضعة ، ويعرف ثابت ميكالس بانه تركيز المادة الخاضعة عندما تكون السرعة القصوى في المنتصف (Segel,1976).

بين Cui *et al*. (2007) من خلال المقاييس الحركية التي حددت في خليط التفاعل الذي يحتوي على تراكيز مختلفة من المادة الخاضعة N-CBZ-Gln- Gly (N-carboxybenzoyl-lglutaminyl- glycine) والتي تراوحت بين 0 - 30 ملي مولاري باستعمال طريقة Lineweaver-Burk plots ، ان تأثير تركيز المادة الخاضعة على Vmax و Km لانزيم MTGase المنتج من بكتريا *Streptomyces hygroscopicus* كانت 1.28 وحدة / مل و 54.69ملي مولاري على التوالي عند رقم هيدروجيني 6 ودرجة حرارة 37 م ، كما استطاع Zhang *et al*. (2012) من تحديد قيمة Vmax و Km لانزيم MTGase المنتج من بكتريا *Streptomyces mobaraensis* DSM 40587 وكانت 44.44 وحدة / ملغم من البروتين و 40.47 ملي مول / لتر على التوالي عند رقم هيدروجيني 6 ودرجة حرارة 37 م ، وتمكن Zhang *et al*. (2018) من تقدير قيمة Km و Vmax لانزيم TGase المنتج من يرقات فراشة *Mythimna separata larvae (Noctuidae Lepidoptera)* باستعمال تراكيز مختلفة من المادة الخاضعة N-CBZ-Gln-Gly تراوحت من (5-100) ملي مولاري بطريقة Lineweaver-Burk plots وكانت القيم 12.83 ملي مولاري و 7.99 وحدة / مل على التوالي ، كما بين Sorde and Ananthanarayan (2019) ان قيمة V_{max} و K_m لانزيم TGase المنتج من بكتريا *Bacillus nakamurai* باستعمال تراكيز مختلفة من المادة الخاضعة CBZ-Gln-Gly تراوحت بين (10-70) ملي مولاري كانت 5.28ملي مولاري / دقيقة و 33.92 ملي مولاري على التوالي .

10-2 الاستعمالات التطبيقية لانزيم MTGase:

استعمل انزيم TGase في مجالات متعددة منها في المجال الطبي والصناعي وايضا في المجال الغذائي ، ففي المجال الطبي استعمل انزيم TGase والذي يسمى (Fibrin Glue ، Fibrin - Stabilizing factor ، PlasmTG) كمادة مخثرة للدم في العمليات الجراحيه وفي التئام الجروح ونمو العظام واستعمله الاطباء الاوربيون Fibrin Glue على نطاق واسع خلال العمليات الجراحية الصدرية والقلبية والاوعية الدموية، ذكر Burnouf *et al*. (2013) أن انزيم Fibrin Glue ادخل بشكل رئيسي في العمليات الجراحية ومنها الجراحة التجميلية كجراحة الوجه والفكين وفي معالجة الجروح واصلاح الانسجة وفي زراعة الاسنان ، كما انه كان فعال وعملي في معالجة الاشخاص الذين يعانون من عسر التبول بسبب التهاب المثانة وذلك من خلال الدراسة التي اجريت على 20 شخصاً من ذكر وانثى بعمر سبع سنوات ونصف واعطائهم العلاج الذي يحتوي على الانزيم عن طريق الوريد وكانت النتائج تماثلهم جميعا للشفاء (Bove *et al*.,2018) ، كما اضيف انزيم Fibrin Glue مع الخلايا الجذعية التي تم زرعها داخل الجسم اذ يوفر الانزيم الحماية لها اذ ان العلاج بالخلايا الجذعية مع الانزيم هو وسيلة امنة وفعالة لزرع الخلايا في حالة اصابة عصب الورك (Masgutov *et al*.,2019) .

أشار Kurth and Rogers (1984) الى ان انزيم TGase المعزول من كبد خنزير غينيا استعمل لربط الكثير من بروتينات الاغذية ومنها αs-casein ، β - casein ، k- casein ، β -lactoglobulin وكلوبيولين فول الصويا ، وكذلك الانزيم المعزول من بلازما دم الابقار ادى الى ربط تقاطعي للمايوسين مع بروتين فول الصويا والكازين مع الكلوتين . ان التطبيقات الكيموحيوية لانزيم TGase المعزول من اللبائن كانت محدودة بسبب كلفة الانتاج العالية وصعوبة انتاجه بكميات كبيرة ، كما ان انزيم TGase المنتج من اللبائن يحتاج الى اضافة الكالسيوم Ca لتنشيطه في تطبيقاته مما يسبب الطعم المر في المنتجات الغذائية (Baker *et al*., 1994) لذا قام الباحثون بدراسة الاحياء المجهرية المنتجة لانزيم TGase ، اذ لاحظ Ando *et al*.(1989) عند انتاجه لانزيم TGase من بكتريا *Sterptoverticillium* بان له صفات وخصائص مشابهة للانزيم المنتج من اللبائن من حيث قدرته على تحفيز تفاعلات نقل الاسيل لحامض الكلوتاميك في السلسلة الببتيدية الا ان عمله لا يتطلب وجود الكالسيوم لتنشيطة ، واستعمل انزيم MTGase في اللحم ومنتجات الالبان والماكولات البحرية والاسماك والبروتينات النباتية وانتاج الاغشية القابلة للاكل كما استعمل لتحسين الهلام وتغيير خصائص الرغوة والاستحلاب واللزوجة والالتصاق والقدرة على حمل الماء (Mostafa, 2020).

2-10-1 تطبيقات الانزيم في اللحوم والاسماك ومنتجاتها :

اضاف الباحثان Sakamoto and Soeda (1991) انزيم TGase في صناعة المنتجات الغذائية التي تحتوي على اللحم المفروم ، كما لاحظا بان للانزيم دورا في تحسين صلابة نسيج صوصج الدجاج ، بين Hammer (1998) ان اضافة 2% من انزيم MTGase الى الصوصج ادى الى تماسكه بفعل الربط التقاطعي للبروتينات اثناء الخلط ، كما ان استعمال MTGase لا يتطلب إضافة الملح أو الفوسفات أو المعالجة الحرارية التي كانت تستعمل في اللحوم المعاد تشكيلها او تركيبها ، وهذا يشجع على استعمال MTGase لتلبية طلب المستهلكين للحصول على منتجات صحية منخفضة الصوديوم (Motoki and Kumazawa, 2000)، ومن اهم التطبيقات الصناعية الرئيسية لانزيم MTGase هو اعادة تشكيل او تركيب منتجات اللحوم المختلفة ، اذ يعمل الانزيم من خلال الربط التقاطعي على اعطاء منتوج ذو مظهر جيد ومتماسك كما يقلل الفقد الحاصل اثناء الطبخ فضلاً عن زيادة قابلية الذوبان (Kuraishi *et al*.,2001 ; Castillejos *et al*.,2017) ، كما ان اضافة الانزيم الى كرات اللحم البقري ادى الى زيادة قابيلة حمل الماء (Pietrasilk and Li- chan,2002)، في العام 1996 استعمل نظام لربط القطع الصغيرة من اللحوم باضافة انزيم MTGase و Caseinate اذ يتفاعل الكازين مع الانزيم ويصبح لزج كمادة صمغيه لربط القطع الصغيرة من شرائح اللحم او السمك (Yokoyama *et al*., 2004) ، اشار كل من Hong and Xiong (2012) و Akbari *et al*. (2021) الى أن انزيم MTGase عمل على زيادة قابلية ذوبان البروتينات العضلية الليفيه في لحم الخنزيرتحت ظروف مختلفة وان أقصى درجة من الذوبان كانت عند الرقم الهيدروجيني 3 ، كما وجد الباحثان أيضًا حصول تحسين لبعض الخصائص الوظيفيه كصفة الاستحلاب واللزوجة نتيجة لفعل الانزيم في تكوين الشبكة البروتينية بين السلاسل الكبيرة للمايوسين وبالتالي تغيير بنية المايوسين (تغيير التركيب الثانوي لسلسلة المايوسين) عن طريق إنشاء روابط بروتينية متقاطعة ، اذ تحتوي شبكة البروتين المشكَّلة حديثًا على عدد أقل من α-helices يقابله عدد اكبر من β-sheets وهذا يؤدي الى تكوين بوليمر ذو وزن جزيئي عالي ، وتساهم هذه التحويرات في تكوين شبكة هلامية قوية تلعب دوراً مهماً مثل الصلابة والمرونة والتماسك والالتصاق (Ahmed *et al*., 2009a)، كما أكد Ahmed *et al*. (2009b) أن قوة الهلام في كل من لحوم البقر والدجاج تحسنت عند اضافة انزيم MTGase نتيجة عمله على بروتينات المايوسين ، ان الطلب المتزايد على اللحوم والكلفة العاليه حفزت شركات التصنيع الغذائي على تطوير طرائق تصنيعة يمكن من خلالها استعمال كل اجزء الذبيحة بما في ذلك القطع الصغيرة لانتاج منتوجات ذات جودة عاليه ومظهر مرغوب فيه من قبل

المستهلك وباسعار مناسبة (Maróstica and Pastore, 2010) ، من هذه الطرائق التي استعملت هو ادخال انزيم MTGase الذي يعمل على تكوين ربط تقاطعي لتشكيل قطع اللحم الصغيرة مع بعضها وجعلها متماسكة وذات مظهر جيد ومرغوب مع زيادة قابلية ربط الماء وايضا ثباتية الاستحلاب فضلا عن تقليل الفقد اثناء الطبخ (Duarte *et al*.,2020;Akbari *et al*.,2021) ، بين Kudre and Benjakul (2013) أن قوة هلام السوريمي (surimi) تحسنت بشكل كبير بإضافة انزيم MTGase 0.6 وحدة / غم مع 6% من بروتين الفول السوداني بامبارا (Bambara Groundnut Protein) نتيجة الروابط التساهميه المتكونة بين الكلوتامين واللايسين ، كما ان اضافة انزيم MTGase الى فطائر صدر الدجاج ادى الى تماسكها وتقليل نسبة الفقد اثناء الطبخ (Uran *et al*.,2013) ، كما لوحظ ايضا عند اضافة الانزيم وبتراكيز مختلفة الى الصوصج تحسنا في قوامه وزيادة مقاومته للحرارة نتيجة الروابط التقاطعية المتكونه (Pyrcz *et al*., 2014)، بين Canto *et al*. (2014) ان اضافة انزيم MTGase الى قطع اللحم الصغيرة ادى الى تماسكها بشكل قطع كبيرة بفعل الاواصر التساهمية المتكونه بين البروتينات كما خفض من نسبة الفقد اثناء الطبخ دون ان يؤثر على الطعم واللون.

اوضح Gaspar and de Goes – Favoni (2015) ان تحوير الخصائص الوظيفيه للبروتينات في النظام الغذائي تعتمد على كمية الانزيم المضافة وكذلك على طبيعة المادة الخاضعة او الركيزة البروتينية التي يعمل عليها الانزيم ، اذ بينت الدراسات قدرة الانزيم في المحافظة على ملمس ومظهر اللحوم ومنتجاتها فضلا عن زيادة قوة وتماسك الهلام (Hong *et al*., 2016) ، بين Lesiow *et al*. (2017) ان اضافة انزيم MTGase الى اللحم المفروم يؤدي الى التماسك وتقليل الفقد اثناء الطبخ ، من خلال تحوير الخصائص الوظيفيه للبروتينات عن طريقة دمج الامينات والربط التقاطعي وازالة الامايد (Santhi *et al*.,2017) ، كما يساهم في الحصول على منتجات صحيه ذات محتوى منخفض من الدهون وذلك من خلال التماسك نتيجة للروابط التي يقوم بها الانزيم (Kieliszek and Misiewicz,2014) ، تعتمد جودة اللحوم المصنعة على نوع وكمية المكونات الخام المستعملة في الصناعة وعلى المواد المضافة المختلفة مثل الاملاح والفوسفات ، كما ان انخفاض الملح أو الفوسفات يؤدي إلى انخفاض امتصاص الماء وبالتالي الحصول على منتج ذو جودة منخفضة لذا ان إضافة TGase يعد بديلا لهذه الاضافات في منتجات اللحوم فضلا عن ذلك فان له تاثيرات ايجابية خاصة في مجال الربط التقاطعي والتماسك في اللحوم (Hong *et al*., 2014) ، ان الجهود العلمية المبذولة لتقليل محتوى الصوديوم في اللحوم تعد ضروريه ومهمة كونها تتعلق بصحة المجتمع لذا ركزت البحوث والدراسات على استعمال

بدائل جديدة للحد من اضافة الملح او تقليل نسبته في اللحوم ، ومن هذه البدائل هي ادخال انزيم MTGase في صناعة اللحوم الذي ادى الى خفض نسبة الملح (الصوديوم) المضاف دون التاثير على جودة اللحوم (Atilgan and Kilic, 2017) ، كما ان اضافة انزيم MTGase الى اللحوم يحسن من الخصائص الوظيفيه للبروتينات ويؤدي الى زيادة التماسك دون الحاجة الى اضافة الملح او الفوسفات (Uran and Yilmaz, 2018) ، كذلك بينت العديد من الدراسات على اهمية اضافة هذا الانزيم الى القطع الصغيرة او المثرومة للحصول على لحم متماسك نتيجة لروابط Gln-lys isopeptide المتكونة بين سلاسل المايوسين والاكتين والتي تعتبر البروتينات الرئيسية لبروتينات المايوفايبرل (Myofibrillar) (Sorapukdee and Tangwatcharin,2018; Baugreet *et al*.,2018) ، أوضح Merenkova *et al*. (2019) ان قابلية حمل الماء ازدادت للحم المفروم المعامل بانزيم MTGase اذ بلغت 48.62 % بالمقارنة مع العينة الضابطة والتي كانت 38.84 % بمدة خزن 12 ساعة ، اذ يساعد انزيم MTGase على التخلص من العيوب التصنيعية في انتاج الصوصج ، وايضاً دوره في ربط بروتينات المواد الخام المنخفضة الجودة وذات المصادر المختلفة المضافة في صناعة اللحم ومنتجاته مثل قطع اللحم الصغيرة والمهشمة ومسحوق الحليب المنزوع الدسم او فول الصويا او الحبوب المختلفة ، وجد Liang *et al*., (2020) ان اضافة انزيم MTGase الى هلام السوريمي (Surimi) ادى الى تكوين شبكة بروتينية اكثر تماسكا وانتظاماً ، في حين اثبتت العديد من الدراسات التاثيرات الايجابية لانزيم MTGase المضاف الى اللحم المفروم ، افاد Ardiansyah *et al*. (2020) الى ان اضافة انزيم MTGase بتركيز 0.5 % الى شرائح سمك التونه الصفراء ادى الى تماسكها وزيادة قدرتها على الاحتفاظ بالماء .

2-10-2 تطبيقات الانزيم في الحليب ومنتجاته (اللبن الرائب)

اشار Lorenzen and Schlimm (1998) و Ghaibzahedi and Chronakis(2018) إلى وجود طريقتين عند استعمال الإنزيم في صناعة اللبن الرائب تمثلت الطريقة الأولى باضافة الانزيم الى الحليب ومن ثم تثبيطه حرارياً بعدها تبدأ عملية التخمر بإضافة البادئ أما في الطريقة الثانية فان الانزيم يضاف إلى الحليب في نفس وقت إضافة البادئ اذ يحصل التفاعل الإنزيمي اثناء عملية التخمر، كما لاحظ Mautner *et al*. (1999) تحسن في ثباتية اللبن الرائب المصنع من الحليب الفرز عند زيادة نسبة الانزيم المضاف الى الحليب والتي تراوحت بين (0.05 – 0.1)% ، اشارت الدراسات الى امكانية إضافة الإنزيم إلى الحليب قبل المعاملة الحرارية يليها إضافة البادئ لبدء عملية التخمر ، اذ لوحظ حصول زيادة تماسك ولزوجة الهلام وتحسين حجز الماء

وبالتالي خفض نضوح الشرش(Lauber *et al*., 2000; Şanli *et al*., 2011)، استعمل انزيم MTGase مع مجموعة متنوعة من المنتجات اللبنية ومنها اللبن الرائب اذ ان الانزيم المضاف يعمل على تحسين قوام اللبن الرائب وجعله اكثر تماسكاً دون الحاجة الى زيادة نسبة المواد الصلبة وذلك نتيجة الربط التقاطعي الذي يحصل بفعل الانزيم وتاثيره الايجابي على الخصائص الوظيفيه للبروتينات مثل زيادة تماسك وثبات الهلام وخفض نضوح الشرش بنسبة 20 ٪ في اللبن الرائب عند إضافة الانزيم (Lorenzen *et al*.,2002)، ركزت الدراسات العلمية حول دور واهمية انزيم MTGase بدرجة كبيرة على قدرته في تكوين تفاعلات الربط التقاطعي في بروتينات الحليب (الكازينات) وهذا يعود الى تركيبها الذي يكون بشكل سلاسل مفتوحة مع انخفاض درجة التركيب الثالثي ومرونة التنظيم الحلزوني للكازينات فضلا عن غياب الاواصر ثنائية الكبريت في (αs and β Casein) مما يجعلها جاهزة لعمل الإنزيم مؤدياً إلى تحويرها وتغير خصائصها الفيزيائية بسهولة (Bonisch *et al*.,2006) .

اظهرت الدراسة التي قام بها Monogioudi *et al* . (2011) بان الربط التقاطعي الانزيمي لبروتينات β - casein تجعلها اكثرمقاومة لعمليات الهضم بفعل انزيم الببسين مقارنةً بنموذج β - casein غير المعامل بالانزيم ، بينت الدراسة التي اجراها Sanli *et al*. (2011) على ان ادخال انزيم MTGase في صناعة اللبن الرائب والذي اضيف بتركيز 1 وحدة / غم بروتين حليب باوقات مختلفة (الاضافة الاولى مع وقت اضافة البادئ، الاضافة الثانية بعد البسترة بدرجة 50 مº لمدة 10 دقائق وعينة اخرى لمدة 60 دقيقة ، اما الاضافة الثالثة فكانت بعد مرحلة التجنيس بدرجة 50 مº لمدة 10 دقائق وعينة اخرى لمدة 60 دقيقة) بان وقت اضافة الانزيم بعد البسترة عند 50 مº لمدة 60 ، 10 دقائق كان الافضل مقارنة مع باقي الاضافات وكذلك افضل من عينة التحكم من خلال اللزوجة وتماسك اللبن الرائب وانخفاض نسبة نضوح الشرش ، كما بينت نتائج الفحص باستعمال المجهر الالكتروني ان اضافة الانزيم ادت الى توزيع البروتينات بشكل متوازن في شبكة الهلام لتشكيل الروابط المتقاطعة فيما بينها ، كما لاحظ ايضا ان لبن (Turkish Ayran drinking yogurt) المعامل بالانزيم كان اعلى لزوجة واقل نضوحا للشرش مقارنة مع العينة الضابطة ، ذكر Giosafatto *et al*. (2012) ان بلمرة بروتينات الحليب عن طريق اضافة TGase قد يؤدي إلى تشكيل غشاء او غلاف بروتيني ، مما يحسن من الخصائص الوظيفيه لمنتجات الالبان ، أظهرت الدراسة التي قام بها Liu *et al*. (2014) بان تكوين ε-(γ-glutamyl)-lysine قد يحسن من قابلية الاحتفاظ بالماء ويعمل على زيادة ثباتية الشبكة البروتينية في اللبن الرائب مما يقلل من نضوح الشرش ، ان عمل انزيم MTGase يكون اقل

كفاءة عند وجود بروتينات الشرش بسبب تركيبها الكروي ولكونها اكثر استقراراً نتيجة احتوائها على الاواصر ثنائية الكبريت (Li *et al*., 2015) ، وعلى الرغم من ذلك فقد اشارت الدراسات السابقة الى امكانية عمل انزيم MTGae على بروتينات الشرش عند اضافة مادة DTT (Dithiothreitol) التي لها دور في كسر الاواصر الكبريتيدية مما يجعلها أكثر ملائمة لعمل الانزيم (Lee *et al*, 2002) ، بين Jooyandeh *et al*. (2015) التاثير الايجابي عند اضافة الانزيم الى عينة حليب منخفض الدهن وقبل اضافة الباديء مع وجود عينة مقارنة اذ ادى ذلك الى تحسين الخواص الريولوجية للبن الرائب فضلا عن خفض نسبة نضوح الشرش ، اذ ان الربط التقاطعي للكلوتامين واللايسين بفعل الانزيم يؤدي الى تكوين هلام متماسك وثابت مما يقلل بشكل كبير من نضوح الشرش (Anema *et al*., 2005) ، ذكر Abou-Soliman *et al*. (2017) ان اللبن الرائب المصنع من حليب الابل والمعامل بانزيم MTGase بتركيز 0.4% اعطى نتائج افضل من العينة الضابطة من ناحية التماسك واللزوجة والقدرة على الاحتفاظ بالماء فضلا عن انخفاض وقت التخمر.

يحصل فقد لبروتين الشرش اثناء عملية الترشيح الفائق (ultrafiltration) لذا وجد Wen-qiong *et al*. (2017) ان افضل طريقة لتقليل الفقد هي معاملة الشرش بانزيم MTGase بتركيز 40 وحدة / غم بروتين شرش في درجة حرارة 40 م لمدة 60 دقيقة وعند رقم هيدروجيني 5 اذ لاحظ زيادة في نسبة الاسترداد تراوحت بين 15 – 20 % نتيجة تحفيز ارتباط بروتين الشرش مع الانزيم مقارنة مع العينة الضابطة ، بين Gharibzahedi and chronakis (2018) ان انزيم MTGase المضاف الى اللبن الرائب قلل من نسبة نضوح الشرش وزاد من قابلية حمل الماء واعطى شكل متجانس ومتماسك خلال فترة الخزن دون ان يؤثر سلبا على الصفات الحسية للمنتوج ، كما ان الانزيم المضاف الى اللبن الرائب قليل الدسم ادى الى تماسكه وقلل من نسبة نضوح الشرش فيه وكان تقبل المستهلك له اكثر مقارنة مع العينة الغير مضاف لها الانزيم (García-Gómez *et al*.,2019) ، اشارت الدراسات الى ان استعمال انزيم MTGase في صناعة اليوكرت لا يحسن فقط من القيمة الغذائية والخصائص الوظيفيه من خلال تكوينه للاواصر بين الكلوتامين واللايسين وانما يقلل ايضا من كلفة الانتاج نتيجة لخفض محتوى مسحوق الحليب الفرز المستعمل وكذلك المثبتات وحتى نسبة الدهن في تركيبة اللبن الرائب المصنع (Akbari *et al*.,2021).

2-10-3 في صناعة المثلجات اللبنية :

ان الربط التقاطعي لبروتينات الحليب بفعل إنزيم MTGase له تأثير واضح في خواص الإستحلاب كما ان المعاملة بالإنزيم يمكن ان تزيد من ثباتية الحبيبات الدهنية للحليب.(Hinz *et al.* 2007) ، ذكر EI-Nagar *et al.* (2002) انه يمكن استعمال انزيم MTGase في انتاج المثلجات اللبنية ذو المحتوى الدهني المنخفض او المواد الصلبة اللادهنية المنخفضة ، بين Rossa *et al.* (2012) ان انزيم MTGase يمكن استعماله كبديل جزئي عن الدهن في صناعة المثلجات اللبنية دون ان يؤثر ذلك على الخصائص النوعية للمنتج كما لاحظ ان البلمرة المتكونه بفعل الانزيم ادت الى الاحتفاظ بالفقاعات الهوائيه وبالتالي زيادة الحاصل كما ان الشبكة البروتينية الناتجة عن الربط التقاطعي حسنت من صفات المثلجات اللبنية وجعلتها اكثر تماسكا ومقاومة للذوبان في درجة حرارة الغرفه ، وجد Kasprzyk *et al.* (2016) من خلال الدراسة التي اجراها على المثلجات اللبنية المنخفضة الدهن المضاف لها انزيم MTGase بتركيز 2 وحدة / غم بروتين والمخزن لمدة ثلاثة أشهر مع عينة التحكم بدرجة (-25 م) لوحظ بان المثلجات اللبنية المعاملة بالانزيم كانت اكثر مقاومة للحرارة المتكررة ولم يكن هنالك اختلاف في صفاتها فضلا عن احتفاظها بشكلها اطول فترة مقارنة مع عينة التحكم ، اشار Sanlidere- Alogiu *et al.* (2018) الى ان المثلجات اللبنية المصنعة من حليب الماعز والمضاف لها انزيم MTGase بتراكيز مختلفة (0.5 ، 1 ، 2 ، 4) وحدة / غم بروتين حليب ولمدة 20 و 60 دقيقة كانت اكثر مقاومة للذوبان واكثر تماسك وان نسبة المواد الصلبة الكلية كانت اعلى للمثلجات اللبنية المعاملة بالانزيم عند تركيز 4 وحدة / غم ولمدة 60 دقيقة اذ بلغت 38.98 % مقارنة مع العينة الضابطة والتي كانت نسبة المواد الصلبة الكلية فيها 35.94% .

2-10-4 في صناعة الاجبان :

اشارت الدراسات الى أن انتاج الجبن قليل الدسم له عيوب تصنيعية مختلفة منها زيادة نسبة الرطوبة وارتفاع الحموضة وردائة عملية انضاجه وكذلك انخفاض اجمالي الاحماض الدهنية المتطايرة مقارنة بالجبن الكامل الدسم (Fenelon and Guinee,2000 ؛ Sahan *et al.*, 2008)، وعلى هذا الاساس بدأت العديد من الدراسات لوضع الحلول اللازمة لهذه العيوب منها الدراسة التي قام بها Ahmed *et al.* (2015) والتي لاحظ فيها حصول تحسنا كبيرا في خصائص جودة الجبن قليل الدسم كالشكل والملمس وزيادة القدرة على الاحتفاظ بالماء عند اضافة انزيم MTGase ، أن الروابط التقاطعية او الاواصر التساهمية المتكونة بين جزيئات بروتينات

الشرش بفعل الانزيم المضاف ادت الى خفض قابلية الفقد في نضوح الشرش وزيادة القدرة على ربط الماء ، افاد Aaltonen *et al.* (2014) الى ان اضافة الانزيم الى جبن الإيدام ادى الى زيادة الحاصل بنسبة 4 % نتيجة قلة الفقد اثناء التصنيع ولزيادة محتوى الرطوبة في الجبن، بينت الدراسة التي قام بها Prakasan *et al.* (2015) أن إضافة TGase الى جبن الكوتج يؤدي إلى تحسين الخصائص التركيبية وحجز الماء مع خفض تاثير المعاملة الحرارية ، وجد Metwally *et al.* (2018) ان ادخال انزيم MTGase في صناعة جبن الموزريلا وبتركيز(0.02 – 0.05) % قد حسن من قابلية مرونة الجبن وادى الى زيادة في كمية الحاصل نتيجة انخفاض نسبة الفقد في كل من البروتين والدهن مقارنة مع العينة الضابطة التي حصل فيها فقدان كمية كبيرة من البروتين والدهن خلال نضوح الشرش كما اوصى الباحث الى اهمية استعمال الانزيم بنسبة 0.02% في صناعة الجبن كامل الدسم و 0.05% في الجبن منخفض الدهن ، بين Cadavid *et al.* (2019) عند انتاجه للجبن المعامل بتراكيز مختلفة من انزيم MTGase (0 ، 1 ، 3 ، 5) وحدة / غم بروتين حليب ، أن هذا الجبن كان الافضل في صفة القوام والتماسك وذو قابلية عاليه لحمل الماء مقارنة مع العينة الضابطة عند تركيز 3 وحدة / غم ، ايضا ذكر Garcia- Gomez *et al.* (2019) ان اضافة الانزيم مع وقت اضافة المنفحة في صناعة الجبن الابيض اعطى صلابه وتماسك وزيادة في قابلية حمل الماء اكثر من العينة الضابطة ، درس D'Alessandro *et al.* (2019) تأثير اضافة الانزيم عند تركيز 5 وحدة /غم بروتين الى حليب الحمير (يمتاز بانخفاض مكوناته من المواد الصلبة الكلية والدهن والكازين وبالاخص البيتا كازين) بطريقتين: الاولى اضافة الانزيم قبل اضافة المنفحة وعند درجة حرارة 40 م لمدة 15 دقيقة اما الثانية فتمت باضافة الانزيم والمنفحة بنفس الوقت وعند درجة حرارة 42 م اذ لاحظ ان اضافة الانزيم مع المنفحة ادى الى تحسين صلابة الخثرة وقلل من وقت تكوين الهلام كما قلل ايضا من نسبة الفقد في بروتين الكازين نتيجة للشبكة البروتينية المتكون بفعل الروابط التقاطعيه .

2-10-5 في منتجات الحبوب:

ان صناعة الخبز تعتمد على المكونات الداخله في تحضيرها من العجين والخميرة والملح والماء وكذلك على الاضافات الاخرى التي تساعد على تحسين تركيبة العجينة من ناحية المرونة والثباتية وقابليتها على الاحتفاظ بالغازات المنتجة خلال عملية التخمير (Pescador-Piedra *et al.*,2009) ، تعتمد الخواص الريولوجية للطحين وكذلك المنتجات المصنعة منه بصورة كبيرة على بروتين الكلوتين الذي تتاثر صفاته بعوامل مختلفة منها صنف الحنطة وظروف ما بعد الحصاد والخزن فضلاً عن تاثير الاصابة الحشرية ولذا فان قدرة بعض البلدان على انتاج انواع

جديدة من الطحين تكون محدودة (Bak *et al*.,1995)، لذا تعد المعاملة الانزيمية لطحين الحنطة بديلا مهما عن المحسنات او المضافات الكيميائية للحصول على التغييرات المطلوبة في صفات العجين فضلا عن الخبز الناتج (Dagdelen and Gocmen ,2007)، النظام الغذائي المنخفض او ذو النوعية الرديئة من الكلوتين يفتقر إلى صفة الشد والمد والقدرة على حجز الغازات اللازمة أثناء الخبز ، لذلك فان البحث عن المعالجات والحلول يمثل تحدياً تقنياً في الصناعات الغذائية ومن هذه الحلول هو اضافة انزيم TGase لتقوية الكلوتين الضعيف (Cauvain, 2015) ،اشار Gerrard *et al*. (1998) الى ان اضافة انزيم MTGase الى الطحين ادى الى زيادة امتصاصية الماء والتي تعد احدى الصفات المهمة للطحين ذو النوعية الجيدة ، كما بين Larre *et al*. (2000) أن إنزيم MTGase قد حفز الربط التقاطعي بين الوحدات الثانوية للكلوتين منتجاً بوليمرات ذات أوزان جزيئية عاليه مع إنخفاض في البروتينات الذائبة بالماء مما ادى الى تغيرات كبيرة في الخصائص الفيزيوكيمياوية كما أن المعاملة بالإنزيم عملت على تقوية الشبكة الكلوتينية وجعلت الكلوتين أقل حساسية تجاه الحرارة ، ان اضافة انزيم MTGase الى طحين الحنطة المصابة بحشرة السونه والتي تتصف عجينتها بالضعف لأرتفاع نشاط البروتيزات فيها أدى الى إنخفاض مجاميع الأمين الحرة وأن وجود الوحدات الثانوية للكلوتين والعالية الوزن الجزيئي يؤكد حدوث الربط التقاطعي وتحفيز تكوين أواصر ثنائية الكبريت نتيجة السلاسل الببتيدية المتعددة والمرتبطة تقاطعياً مؤدية الى تحسين خواص الجودة للطحين (Koksel *et al*.,2001 ; Bonet *et al*.,2005) ، حيث ان الكلوتين هو المكون الرئيسي الموجود في الحبوب مثل الحنطة والشعير لذلك فان الاشخاص الذين يعانون من مرض الاضطرابات الهضمية والتي تبلغ نسبتهم 35% من سكان العالم Celiac disease (التحسس من الكلوتين) لا يتناولون هذه الحبوب وانما يتجهون نحو البدائل كالرز والذرة (Schuppan *et al*., 2005;Ogilvie *et al*.,2021) ، ومع ذلك فإن جودة الخبز تعتمد إلى حد كبير على خصائص اللزوجة من الكلوتين في العجين (Delcour *et al*., 2012) ،اذ قام Gujral and Rosell (2004) باضافة انزيم MTGase الى طحين الرز بنسبة 1٪ واظهرت النتائج تحسناً في الخواص الريولوجية لعجين الرز مع زيادة الحجم (2.75 مل / غم) والحصول على خبز ذو جودة عالية .

2-10-6 تطبيق الانزيم في مجال الاغشية البروتينية الصالحة للأكل:

استعملت الاغشيه القابلة للاكل بشكل واسع في تغليف المنتجات الغذائية الطازجة والمصنعة بهدف حمايتها من التلوث والحفاظ على جودتها واطالة مدة خزنها لاطول فترة ممكنه والتي لاقت اهتماما كبيرا لتوفرها وقابليتها للتحلل (Vargas *et al*., 2008; Pires *et al*., 2011) ، ان

الاغشية البروتينية ذات المصادر النباتية والحيوانية تكون ذات طبيعة محبة للماء وخصوصاً في ظروف ارتفاع الرطوبة مما يسبب ضعف الخواص الميكانيكية لها كقوة الشد والتمدد (Lim *et al.*,1999) , بين Porta *et al.* (2016) ان الاغشية البروتينية القابلة للاكل المصنعة من البكتين وبروتينات بذور البيقية المرة (من فصيلة البقوليات) المضاف لها انزيم MTGase المستعملة في تغليف الفواكة والخضر الطازجة انها ادت الى زيادة فترة خزنها كما لاحظ ان قوة الشد تضاعفت ثلاث مرات مع استطالة وتمدد اكثر مقارنة مع الاغشية الغير معاملة بالانزيم ، اشار Rostamzad *et al.* (2016) ان اضافة انزيم MTGase بنسبة 3% الى الغشاء المتكون من البروتين الليفي العضلي للاسماك ادى الى تحسين الخواص الفيزيائية والميكانيكية وزاد من قوة شد الغشاء بحوالي 62.3 % ، من خلال الربط التقاطعي الذي أدى إلى تحسين صلابة جزيئات البوليمر عن طريق إنشاء شبكة بروتين كثيفة مع زيادة الوزن الجزيئي ، وجد Marquez *et al.* (2017) ان خسائر الفقد بالوزن للتفاح انخفضت بنسبة 80% بعد 10 أيام من تغليفه بطبقة رقيقة من الغشاء المكون من بروتين الشرش والبكتين والمضاف له انزيم MTGase كما انه ساعد ايضاً على تقليل الفقد بالوزن للبطاطا والجزر حتى اليوم السادس للخزن ، بين Kaewprachu *et al.* (2017) ان اضافة انزيم MTGase الى الاغشية المصنعة من البروتين الليفي العضلي للاسماك ادى الى زيادة سمك وقوة الاغشيه نتيجة الروابط التساهمية بين سلاسل البروتين كما ساعد على تقليل نفاذية بخار الماء ، ذكر Fernandez-Bast *et al.*(2018) ان تحضير اغشية نانوية صالحة للاكل باستعمال جسيمات نانوية متوسطة من السيليكا وبروتينات بذور البيقان المر Bitter Vitch(احد انواع محاصيل البقوليات) ومعاملتها بانزيم MTGase ادى الى ربطها تقاطعيا وزاد من قوة الشد والاستطالة بشكل كبير مقارنة مع الاغشية الغير مضاف لها الانزيم ، كما لاحظ من خلال الفحص بالمجهر الالكتروني ان المعاملة بالانزيم جعلت الجسيمات النانوية اكثر تجانساً في كل من البروتينات المرتبطة تقاطعيا ، بين Cruz-Diaz *et al.* (2019) ان الاغشية البروتينية المصنعة من بروتين الشرش والمضاف لها انزيم MTGase والمعاملة بالموجات فوق الصوتية كانت اقل نفاذية لبخار الماء وزيادة في الشد والتماسك مقارنة مع العينة الضابطة ، وجد Sorde and Ananthanarayan (2019) ان الاغشية المصنعة من بروتين جوز الهند وصمغ الغوار والمضاف لها انزيم MTGase عند تركيز 5 وحدة / مل ادى الى زيادة ملحوظة في القوة الميكانيكية من 1.76 الى 3.79 ميكا باسكال واستطالة من 56 ملم الى 184.87ملم كما لاحظ تحسن في خصائص الحجز مثل نفاذية بخار الماء ومعدلات نقل الاوكسجين وايضا زيادة في درجة حرارة الانصهار مع زيادة تركيز الانزيم الى 10 وحدة / مل .

3- المواد وطرائق العمل Materials and Methods

3-1 الاجهزة المختبرية المستعملة في الدراسة وكما مبينة في الجدول (3-1).

جدول (3-1) الاجهزة والادوات المستعملة في الدراسة والشركات المصنعة لها .

ت	اسم الجهاز	الشركة المصنعة	المنشأ
1	Incubator حاضنة	Binder	Germany
2	Shaker incubator حاضنة هزازة	Kottermann	Germany
3	Water bath حمام مائي	GFL	Germany
4	Air oven فرن حراري هوائي	Kottermann	Germany
5	Autoclave جهاز التعقيم (المؤصدة)	Hirayama	Japan
6	Light Compound Microscope مجهر ضوئي	Ernstieitz Wetzlirgm	Germany
7	Hot plate مازج مغناطيسي ذو الصفيحة الساخنة magnetic stirrer	Heldolph MR3001	Germany
8	Vacuum pump مضخة تفريغ	Platinum	USA
9	Spectrophotometer uv/visible	Pye Germany	Germany
10	pH-meter مقياس الرقم الهيدروجيني	EMCO	Germany
11	Sensitive balance ميزان حساس	Denver	Germany
12	Refrigerated centrifuge جهاز النبذ المركزي المبرد	Tafesa Hannover-W-	Germany
13	Freeze dryer المجفد	Hetosicc	Denmark
14	AKTA pure جهاز تنقية البروتينات	GE Healthcare Life Sciences	Sweden
15	Refrigerated centrifuge جهازالنبذ المركزي المبرد	Damon	Germany
16	Vortex مازج	Fanem	Brazil
17	Slab gel electrophoresis	CBS, Scientific	USA
18	UVtransmission	Vilberlourmat	France
19	Microwave	Gosonic	China
20	millipore filter مرشحات دقيقة قطر0.22 ملي مايكرون	Biohazard	Germany
21	اكياس ديلزة ذات نفاذية 14000 - 12000 دالتون	Serva	British
22	Miller مطحنة كهربائية	Al araby	KSA

2-3 المواد الكيمياوية

3-2-1 المواد الكيميائية المستعملة في الدراسة والمبينة في الجدول (3-2).

جدول (3-2) المواد الكيميائية التي استعملت في الدراسة والشركة المنتجة لها :

ت	المادة	الشركة المنتجة
1	كبريتات المغنسيوم المائية $MgSO_4.7H_2O$	Fluka
2	فوسفات ثنائي البوتاسيوم K_2HPO_4	Fluka
3	حامض الهيدروكلوريك HCl	BDH
4	كبريتات الامونيوم Ammonium sulphate	Thomas Baker
5	اكريل امايد Acrylamide	BDH
6	البز اكريل امايد Bis-acrylamide	BDH
7	التمد TEMED	BDH
8	بيرسلفات الامونيوم Ammonium persulphate	BDH
9	مركبتو ايثانول 2-Marcaptoethanol	BDH
10	Sodium Dodecyl sulphate(SDS)	BDH
11	Glycine	BDH
12	Coomassie Brilliant Blue	Merck
13	Bromophenol blue	Merck
14	$MgCl_2$	BDH
15	$CuCl_2$	BDH
16	$FeCl_2$	Merck
17	NaCl	BDH
18	$FeCl_3$	Merck
19	$MnCl_2$	BDH
20	$CaCl_2$	BDH
21	KCl	BDH
22	$ZnSO_4$	BDH
23	Yeast extract	Himedia
24	Urea	Fluka
25	Magnesium sulphate ($MgSO_4 7H_2O$)	BDH
26	Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	BDH
27	$FeSO_4.7H_2O$	BDH
28	Glycerol	Merck
29	Butanol	BDH
30	Methanol	BDH
31	Ethanol	BDH
32	Chloroform	BDH
33	Agar- Agar	Himedia

Himedia	Peptone	34
Himedia	Beef extract	35
Himedia	Soybean powder	36
BDH	(Ethylenediaminetetraacetic acid) EDTA	37
BDH	Gelatin	38
Conda / USA	Agarose	39
Himedia	Nutrient agar	40
Merck	Iodine	41
Merck	Potassium iodide (KI)	42
Merck	Diammonium hydrogen phosphate	43
Fluka	Hydrogen peroxide 3% H_2O_2	44
Fluka	N,N,N,N,Tetramethyl-P-phenylenediamine dihydrochloride	45
Fluka	N,N,N,N, Tetra methyl ethylene diamine TEMED	46
BDH	Sodium hydroxide NaOH	47
BDH	Trichloro acetic acid (TCA)	48
BDH	Glucose	49
BDH	Casein	50
BDH	Acetic acid	51
BDH	Glacial acetic acid	52
BDH	Citric acid	53
BDH	Folin Ciocalteu Reagent	54
BDH	Soluble starch	55
Pharmacia Fine and chemicals	Bovine Serum Albomin (BSA)	56
Sigma Aldrich	Superdex G-75 10/300	57
Sigma Aldrich	Hydroxylamine hydrochloride	58
Sigma Aldrich	Glutathione	59
Sigma Aldrich	N-Carbobenzoxy-L-Glutaminyl-Glycine (Z-Gln-Gly)	60
Sigma Aldrich	L- Glutamic acid γ- monohydroxamate	61
Atom Sientific/UK	Gram staining	62
Intron / Korea	6X Loading dye صبغة التحميل	63
Kapa /USA	Ladder 300bp دليل قياسي حجم 300 زوج قاعدي	64
Intron / Korea	Pre mix pcr خليط تفاعل البلمرة	65
IDT	Primer بادىء	66
i-genomic BYF /Korea	DNA Extraction Mini Kit DNA عدة استخلاص	67
bioMerieux / France	Oxidase Reagent	68
Sacco srl / Italy	Starter (SACCO)	69

3-2-2 الأوساط الزرعية الجاهزة المستعملة في الدراسة الحاليه كما مبين في جدول (3-3) .

جدول (3-3) الأوساط الزرعية الجاهزة المستعملة في الدراسة.

الوسط الزرعي	الشركة المجهزة
وسط العزل(ISP Medium No.4 (Inorganic Salt Starch Agar	Hi Media
وسط المرق المغذي Nutrient Broth medium	Hi Media
وسط الاكار المغذي Nutrient Agar medium	Hi Media
وسط استهلاك السترات Simmon's citrate agar	Hi Media
ISP Medium No.4 (Inorganic Salt Starch Broth)	Hi Media
Tryptone Soy Agar	Hi Media

3-2-3 المواد الاولية Raw materials :

شملت المواد الاولية التي تم شرائها من الاسواق المحلية لمدينة البصرة (سوق الكرمة) 2 كيلو غرام لحم فخذ عجل و 200 غرام شحم , فضلا عن الحليب البقري الطازج والمجهز من قبل محطة الابحاث الزراعية التابعة الى كلية الزراعة جامعة البصرة وبحجم 3 لتر لغرض التطبيق العملي للدراسة الحاليه .

4-2-3 جمع العينات

جمعت 150 عينة من التربة لعزل بكتريا *Streptomyces* من مناطق مختلفة من محافظة البصرة وشملت (القرنة 6 عينات ، الدير 5 عينات ، الهارثة 6 عينات ، كرمة علي 7 عينات ، ضفاف شط العرب 6 عينات ، العشار 4 عينات ، خمسة ميل 5 عينات ، الجمعيات 6 عينات ، المدينة الرياضية 10 عينات ، حدائق كليات العلوم 10عينات والتربية 8 عينات والهندسة 12 عينة والصيدلة 8 عينات والزراعة 9 عينات ومحطة الابحاث الزراعية لكلية الزراعة 5 عينات وحضائر الابقار 3 عينات والبيوت البلاستيكية 10 عينات واطراف بحيرات الاسماك لمركز علوم البحار 8 عينات ، حدائق الاقسام الداخلية 11 عينة ، حدائق مجمع كليات باب الزبير 11 عينة ، اذ اخذت العينات بعد ازالة 3 سم من سطح التربة ووضعت في اكياس من البولي اثيلين المعقمه واغلقت باحكام ثم وضعت في الثلاجة عند درجة 4 م لحين الاستعمال (Abdulhameed, 2013)

، كما تم جمع عينات من روث الابقار والجاموس ، وعينات من الفواكة (التين والتفاح) والبقوليات (العدس , الحمص والفاصوليا) واللحوم (لحم بقر) والاسماك (سمك الكارب) من العشار (سوق الخضارة) ووضعت باكياس من البولي اثيلين لغرض نقلها الى المختبر واجراء عملية العزل.

3-2-5 الاوساط الزرعية :

استعملت الأوساط الزرعية التاليه بعد تعقيمها بجهاز المؤصدة Autoclave على درجة حرارة 121 م وضغط 15 باوند/انج^2 ولمدة 15 دقيقة .

3-2-5-1 وسط العزل ISP Medium No.4 (Inorganic Salt Starch Agar)

حضر حسب تعليمات الشركة المجهزة باذابة 36.5 غم في لتر ماء مقطر , وتم ضبط الرقم الهيدروجيني الى 7.2 , استعمل في عزل بكتريا *Streptomyces* .

3-2-5-2 وسط الانتاج الانزيمي :

حضر الوسط حسب طريقة Jin *et al*. (2016) ذو الرمز E والمكون من (25 غرام peptone , 20 مل glycerol , 6 غرام yeast extract , 2 غرام $MgSO_4.7H_2O$, 2 غرام K_2HPO_4) في لتر من الماء المقطر وضبط الرقم الهيدروجيني على 7.4 استعمل هذا الوسط في انتاج الانزيم .

3-2-5-3 وسط المرق المغذي Nutrient broth medium

حضر حسب تعليمات الشركة المصنعة باذابة 13 غم في لتر ماء مقطر , واستعمل في بعض الاختبارات التشخيصية للبكتريا.

3-2-5-4 وسط الاكار المغذي Nutrient Agar medium

حضر حسب تعليمات الشركة المصنعة باذابة 28 غم في لتر ماء مقطر , واستعمل في بعض الاختبارات التشخيصية للبكتريا.

3-2-5-5 وسط تحلل الجيلاتين Gelatin hydrolysis medium

حضر وسط تحلل الجيلاتين باضافة 12 غم من الجيلاتين الى 100 مل من الوسط الزرعي nutrient broth ووضع في الحمام المائي المغلي لتذويب الجيلاتين ثم ضبط الرقم الهيدروجيني

الى 7.2 ، وزع الوسط في انابيب اختبار بواقع 5 مل لكل انبوب ، استعمل الوسط لمعرفة قدرة البكتريا على تحلل الجيلاتين (Harrigan and McCance, 1976) .

3-2-5-6 وسط تحلل النشا Starch hydrolysis medium

أُذيب 10 غم من نشا الذرة المذاب soluble starch و 3 غم من مستخلص اللحم البقري beef extract و 12 غم أكار في لتر من الماء المقطر , وضبط الرقم الهيدروجيني على 7.5 , استعمل الوسط لمعرفة البكتريا فيما اذا كانت محللة للنشأ (Harley and Prescott ,2002) .

3-2-5-7 وسط Tryptone Soy Agar

حضر هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المجهزة باذابة 37 غم من الوسط في لتر ماء مقطر واستعمل في اختبار انزيم الاوكسديز .

3-2-5-8 وسط تحلل الكازين Casein hydrolysis medium

حضر بأذابة 1 غم من حليب الفرز المجفف Skim milk و 2 غم أكار في 100 مل ماء مقطر وضبط الرقم الهيدروجيني على 7 , استعمل الوسط لمعرفة البكتريا اذا كانت محللة لبروتينات الكازين (Logan and De Vos, 2009) .

3-2-5- 9 وسط استهلاك السترات Simmon's citrate agar

حضر الوسط حسب تعليمات الشركة المجهزة باضافة 24.28 غم / لتر ماء مقطر وبرقم هيدروجيني 7 , واستعمل لمعرفة البكتريا اذا كانت محللة للسترات من خلال استعمالها للسترات كمصدر وحيد للكربون .

3-2-5-10 وسط اختزال النترات Nitrate reduction broth medium

حضر الوسط بوزن 1 غم نترات البوتاسيوم و3 غم مستخلص اللحم البقري و 5 غم ببتون واذيبت في لتر من الماء المقطر وضبط الرقم الرقم الهيدروجيني على 7 ووزع في انابيب اختبار بواقع 5 مل لكل انبوبة ثم عقم بالمؤصدة , استعمل للكشف عن قدرة البكتريا على اختزال النترات الى نتريت (Harley and Prescott, 2002) .

3-2-5-11 وسط تحلل اليوريا Urea hydrolysis medium

حضر الوسط بوزن 20 غم يوريا و 0.095 غم فوسفات ثنائي البوتاسيوم و 0.091 غم فوسفات احادي البوتاسيوم و 0.1 غم مستخلص الخميرة و 0.01 غم صبغة الفينول الحمراء , ذوبت المكونات في لتر من الماء المقطر وضبط الرقم الهيدروجيني على 6.8 ووزع الوسط بانابيب اختبار 5 مل لكل انبوبة وعقم بالمؤصدة لمدة 10 دقائق , واستعمل لمعرفة قدرة البكتريا على تحلل اليوريا من خلال انتاجها لانزيم اليوريز (Atlas, 2006) .

3- 2- 5-12 اوساط الانتاج الانزيمي للعزله المنتخبة

استعملت اوساط انتاج متنوعة لمعرفة الوسط الاكثر انتاجا لانزيم MTGase ومن هذه الاوساط :

3 - 2- 5-12-1 اوساط الانتاج الانزيمي الاربعة التي ذكرها Bahrim *et al*. (2010)

وهي الوسط A المتكون من (2 غم pepton، 5 غم Glucose، 2 غم KH_2PO_4، 1 غم $MgSO_4$، pH 7) لكل لتر، الوسط B المتكون من (20 غم pepton ، 2 غم Glucose، 2 غم KH_2PO_4، 1 غم $MgSO_4.7H_2O$ ، 20 غم pepton Starch، 20 غم Soybean powder، pH 7) لكل لتر، الوسط C الذي يتكون من (1 غم NaCl، 5 غم $(NH4)_2SO_4$، 5 غم Urea، 20 مل glycerol، 0.01 غم $FeSO_4.7H_2O$، pH 7) لكل لتر ، والوسط D الذي يتكون من (1 غم pepton، 4 مل glycerol، 0.5 غم yeast extract، 0.01 غم $ZnSO_4$، pH 7) لكل لتر ، جميع الاوساط حضنت بدرجة حرارة 30 م لمدة 7 أيام مع استعمال الحاضنة الهزازة (Shaker) وبسرعة 200 دورة / دقيقة .

3-2-5-12-2 وسط الانتاج الانزيمي المحضر حسب Zhang *et al*. (2012) ذو الرمز F

المتكون من (3% Polypeptone، 1% Soluble starch، 1% fructose، 0.2% K_2HPO_4، 0.1% $MgSO_4.7H_2O$، 2% $MgCl_2.7H_2O$، pH 7) درجة حرارة الحضن 30 م لمدة 96 ساعة بسرعة دوران 200 دورة / دقيقة .

3-2-5-12-3 وسط الانتاج الانزيمي المحضر حسب (Cui *et al*. (2007 ذو الرمزG

المتكون من (5 غم starch، 5 غم glucose، 10 مل glycerin، 15 غم peptone، 20 غم soybean powder، 5 غم yeast extract، 2 غم $MgSO_4$، 5 غم K_2HPO_4،

$CaCO_3$، 6.5 pH) لكل لتر ، حضن بدرجة حرارة 32 م لمدة 42 ساعة وبسرعة دوران 200 دورة / دقيقة .

6-2-3 المحاليل:

1-6-2-3 محلول اليود المخفف Diluted Iodine solution

تم تحضير محلول اليود المخفف باذابة 2 عم من يوديد البوتاسيوم و 1 غم من اليود في 250 مل من الماء المقطر وتم المزج بصورة جيدة ثم اكمل الحجم الى 300 مل بالماء المقطر , استعمل المحلول للشكف عن قدرة البكتريا على تحلل النشا (Harley and Prescott , 2002) .

2-6-2-3 صبغة كرام Gram's stain

استعملت صبغة كرام حسب تعليمات الشركة المجهزة لها لمعرفة شكل البكتريا تحت المجهر ولون الصبغة التي تصطبغ بها .

3-6-2-3 محلول الببتون المخفف (0.1 %)

حضر محلول التخفيف باذابة 1 غم من الببتون Peptone في لتر من الماء المقطر ووزع في أنابيب اختبار بحجم 9 مل لكل أنبوبة , استعمل في اجراء التخافيف العشرية اثناء الزرع المايكروبي .

4-6-2-3 محلول هيدروكسيد الصوديوم 0.1 مولاري Sodium hydroxide Solution

أذيب 4 غم من هيدروكسيد الصوديوم في لتر ماء مقطر للحصول على محلول تركيزه 0.1 مولاري ,استعمل في تعديل الرقم الهيدروجيني للاوساط الزرعية .

5-6-2-3 محلول منظم (TBE) 5x Tris – Borate EDTA

حضر المحلول المنظم (TBE) 1x وذلك بوزن 3.72 غم من ethylene diamine tetra acetic acid و 54 غم من Tris- base و 27.5 غم من حامض البوريك , ذوبت المكونات في 100 مل ماء مقطر بصورة جيدة واكمل الحجم الى 1000 مل بالماء المقطر كمحلول خزين , ثم سحب منه 100 مل ووضع في دورق حجمي واكمل الحجم الى 500 مل بالماء المقطر للحصول على تركيز 1X , عقم بجهازالمؤصدة على درجة حرارة 121 م لمدة 15 دقيقة

(Sambrook and Russell,2001) , استعمل في تحضير هلام الاكاروز وفي عملية الترحيل الكهربائي كمحلول للكشف عن DNA .

3-2-6-6 محلول انزيم Lysozyme Solution تركيزة 4 ملغم / مل

حضر انزيم Lysozyme باذابة 0.8 ملغم من الانزيم المجفد في 200 مايكرولتر من Gram buffer المجهز من الشركة , استعمل Lysozyme في استخلاص الحامض النووي DNA من البكتريا الموجبة لصبغة كرام .

3-2-6- 7 صبغة Red safe staining souluion

استعملت صبغة Rad Safe حسب تعليمات شركة Intron / Korea المجهزة لها في الترحيل الكهربائي الخاص باستخلاص DNA البكتريا .

3-2-6-8 محلول دارئ الكلايسين – حامض الهيدروكلوريك عياري 0.1 مولاري

حضر المحلول الدارئ باذابة 0.75 غم من الكلايسين في 80 مل ماء مقطر ثم اضيف اليه 0.86 مل حامض الهيدروكلوريك ، بعدها اكمل الحجم النهائي الى 100 مل بالماء المقطر.

3-2-6-9 محلول دارئ الخلات عياري 0.1 مولاري

تم تحضير المحلول الدارئ باذابة 0.186 غم من خلات الصوديوم المائية في 80 مل ماء مقطر ثم اضيف اليه 0.44 مل من حامض الخليك ، بعدها اكمل الحجم النهائي الى 100 مل بالماء المقطر.

3-2-6-10 محلول دارئ السترات عياري 0.1 مولاري

تم تحضير المحلول الدارئ باذابة 2.38 غم من سترات الصوديوم في 80 مل ماء مقطر ثم اضيف اليه 0.4 غم حامض الستريك . ، بعدها اكمل الحجم النهائي الى 100 مل بالماء المقطر.

3-2-6-11 محلول دارئ فوسفات البوتاسيوم عياري 0.1 مولاري

تم تحضير المحلول الدارئ باذابة 1.681 غم من KH_2PO_4 في 80 مل ماء مقطر ثم اضيف اليه 1.3268 غم من K_2HPO_4 ، بعدها اكمل الحجم النهائي الى 100 مل بالماء المقطر.

12-6-2-3 محلول دارئ الكلايسين – هيدروكسيد الصوديوم عياري 0.1 مولاري

تم تحضير المحلول الدارئ باذابة 0.75 غم من الكلايسين في 80 مل ماء مقطر ثم اضيف اليه 0.03 غم من هيدروكسيد الصوديوم . ، بعدها اكمل الحجم النهائي الى 100 مل بالماء المقطر.

7-2-3 الكواشف Indicators :

1-7-2-3 دليل الاوكسيديز Oxidase Reagent

استعمل دليل الاوكسيديز حسب تعليمات شركة bioMerieux الفرنسية المجهزه له لمعرفة ان كانت البكتريا منتجة لانزيم الاوكسيديز .

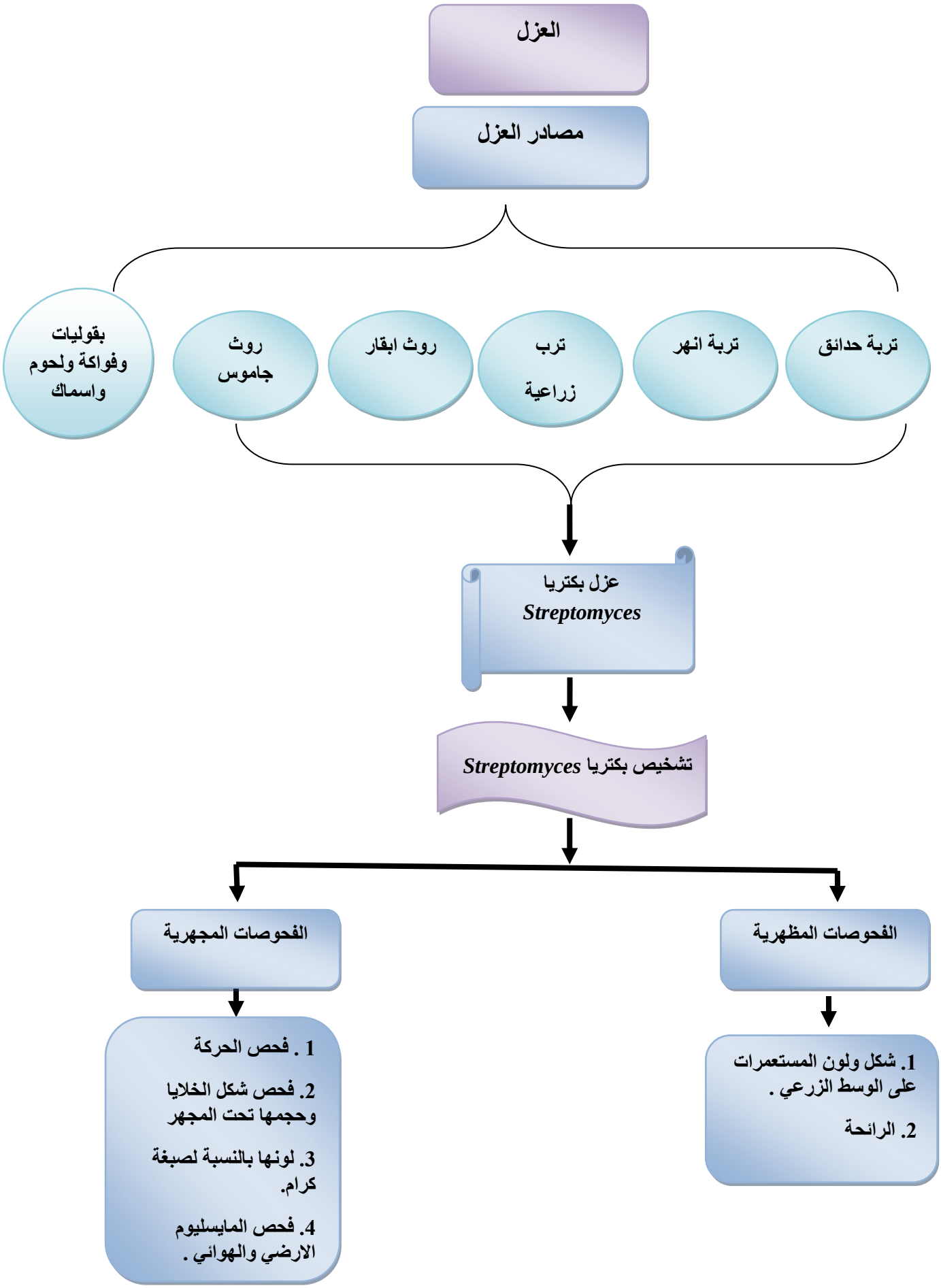
2-7-2-3 دليل الكاتليز Catalase Reagent

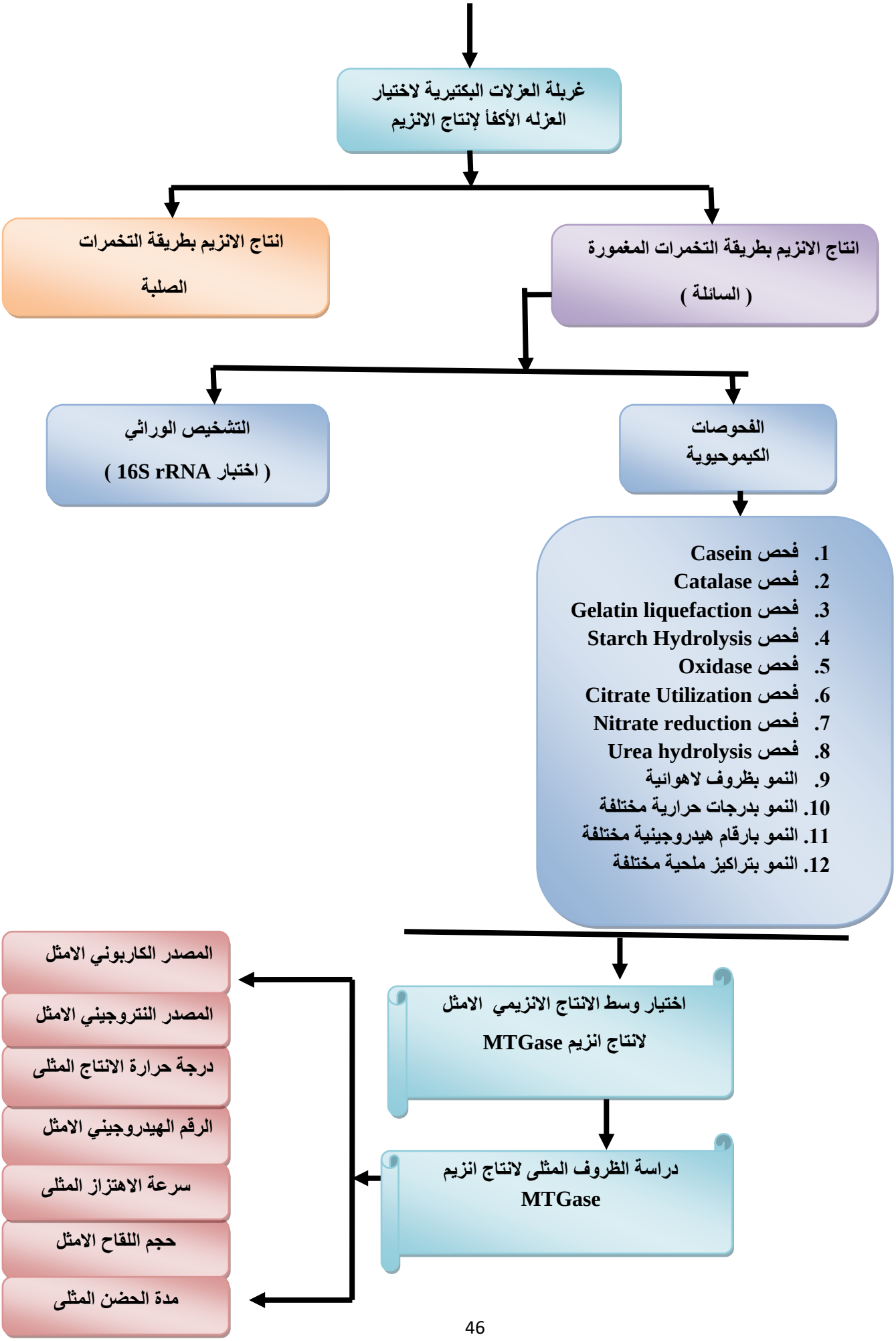
استعمل بيروكسيد الهيدروجين بتركيز 3% لمعرفة ان كانت البكتريا منتجة لانزيم الكاتليز (Benson, 2001).

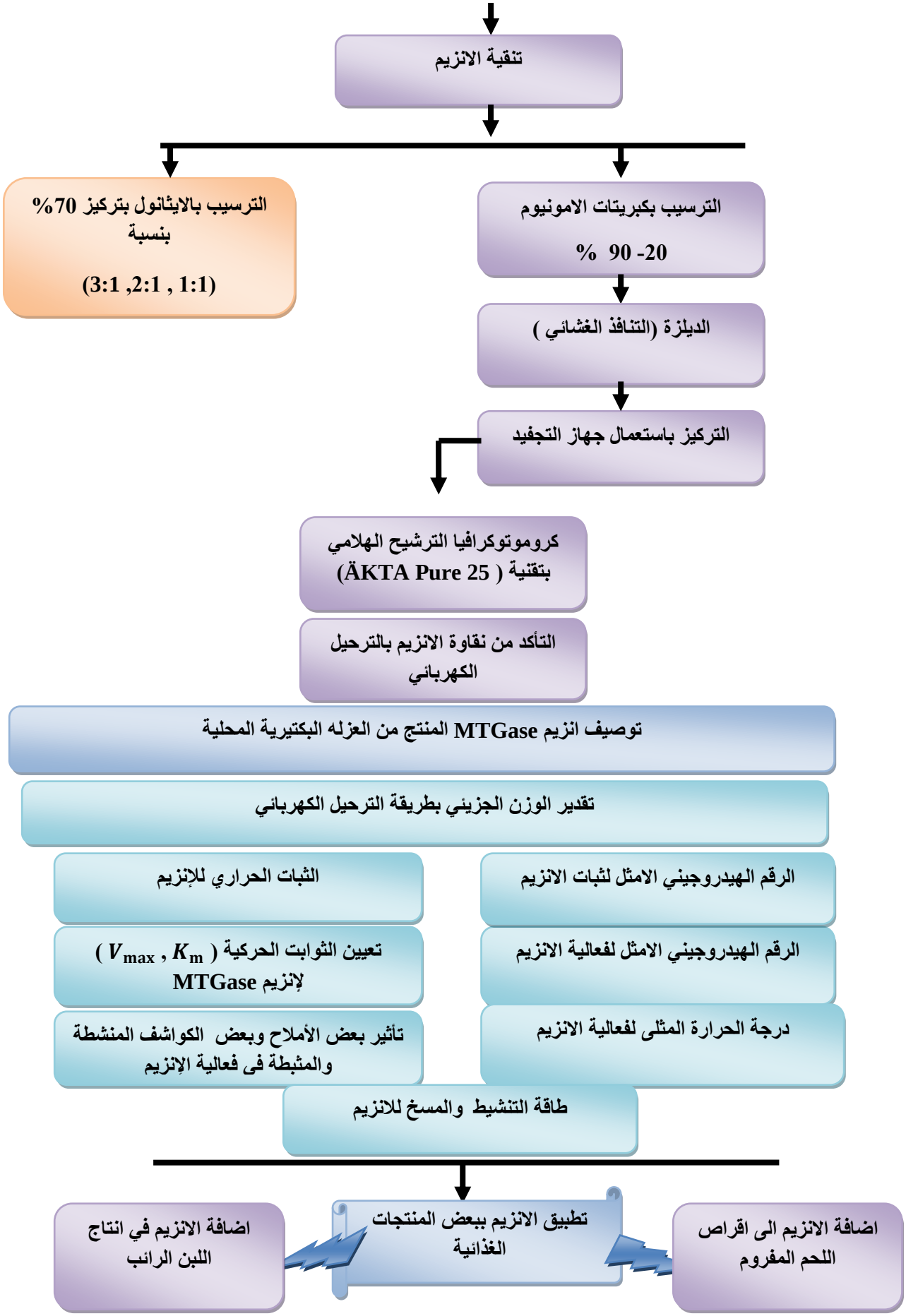
3-7-2-3 كاشف اختزال النترات Nitrate reduction test

المحلول A : حضر باذابة 8 غم حامض السلفانيليك في لتر من حامض الخليك الثلجي تركيزة 5 عياري

المحلول B : حضر باذابة 5 غم α–naphthyl amine في لتر من حامض الخليك الثلجي تركيزة 5 عياري (Benson, 2001) .


العزل
مصادر العزل
تربة حدائق
تربة انهر
ترب زراعية
روث ابقار
روث جاموس
بقوليات وفواكة ولحوم واسماك
عزل بكتريا Streptomyces
تشخيص بكتريا Streptomyces
الفحوصات المظهرية
1. شكل ولون المستعمرات على الوسط الزرعي .
2. الرائحة
الفحوصات المجهرية
1 . فحص الحركة
2. فحص شكل الخلايا وحجمها تحت المجهر
3. لونها بالنسبة لصبغة كرام.
4. فحص المايسليوم الارضي والهوائي .


غربلة العزلات البكتيرية لاختيار العزله الأكفأ لإنتاج الانزيم
انتاج الانزيم بطريقة التخمرات الصلبة
انتاج الانزيم بطريقة التخمرات المغمورة (السائلة)
التشخيص الوراثي (اختبار 16S rRNA)
الفحوصات الكيموحيوية
1. فحص Casein
2. فحص Catalase
3. فحص Gelatin liquefaction
4. فحص Starch Hydrolysis
5. فحص Oxidase
6. فحص Citrate Utilization
7. فحص Nitrate reduction
8. فحص Urea hydrolysis
9. النمو بظروف لاهوائية
10. النمو بدرجات حرارية مختلفة
11. النمو بارقام هيدروجينية مختلفة
12. النمو بتراكيز ملحية مختلفة
اختيار وسط الانتاج الانزيمي الامثل لانتاج انزيم MTGase
دراسة الظروف المثلى لانتاج انزيم MTGase
المصدر الكاربوني الامثل
المصدر النتروجيني الامثل
درجة حرارة الانتاج المثلى
الرقم الهيدروجيني الامثل
سرعة الاهتزاز المثلى
حجم اللقاح الامثل
مدة الحضن المثلى



شكل (3-1) مخطط طريقة العمل .

3-3 طرائق العمل

3-3-1 تحضير العينة

اخذ 10 غرام من كل نموذج من التربة وروث الابقار والجاموس واضيف اليه 1 غرام من كاربونات الكالسيوم ومزجت بصورة جيدة وحضنت بدرجة حرارة 37م لمدة 4 ايام (Abdulhameed, 2013).

3-3-2 عزل بكتريا *Streptomyces*

بعد انتهاء فترة الحضن للتربة وروث الابقار والجاموس ، اذ تم تحضير تخافيف عشرية لجميع العينات التي جمعت باستعمال ماء الببتون المعقم وذلك باضافة 1 غم من كل من (التربة ، روث الابقار والجاموس، التين ، التفاح ، العدس، الحمص ، الفاصوليا ، اللحم البقري وسمك الكارب) الى 9 مل واجريت سلسلة من التخافيف العشرية 10^{-1} -10^{-4} ، بعد ذلك اخذ 1 مل من كل تخفيف ووضع في اطباق بتري معقمة واضيف لكل طبق 20 مل تقريبا من الوسط الزرعي ISP4 (Inorganic Salt Starch Agar) المحضر والمعقم مسبقا وبعد تصلب الاطباق وضعت في الحاضنة بصورة مقلوبة بدرجة 28 م لمدة 7 ايام (Abdulhameed, 2013;Basha *et al.*,2019)

3-3-3 تنقية العزلات Purification of Isolates:

بعد انتهاء فترة الحضن تم مشاهدة الاطباق التي حصل فيها نمو ، وبعدها نقلت المستعمرات المنتخبة بواسطة لوب النقل بطريقة التخطيط للأطباق الحاوية على الوسط الزرعي ISP4 وحضنت بدرجة 28 م لمدة 7 ايام (Basha *et al.*2019) وكررت عملية التنقية ثلاث مرات لضمان الحصول على مستعمرات نقية منفردة.

3-3-4 حفظ العزلات وادامتها:

نقلت العزلات النقية الى انابيب اختبار معقمة حاوية على نفس الوسط الزرعي ISP4 بشكل مائل Slant وحضنت بدرجة 28 م لمدة 7 ايام ثم حفظت في الثلاجة بدرجة 4 م .

5-3-3 الاختبارات التشخيصية:

1-5-3-3 الفحوصات المظهرية Morphological tests

نشطت العزلات البكتيرية بتنميتها على وسط ISP4 وحضنت بدرجة 28 م لمدة 7 ايام ، بعدها تم ملاحظة شكل المستعمرات ومظهرها وحافتها ولونها على الوسط الزرعي .

2 -5-3-3 الفحوصات المجهرية Microscopic tests

تم تنشيط العزلات على وسط ISP4 عند درجة حرارة 28 م لمدة 7 ايام وذلك لغرض تصبيغها بصبغة كرام وفحصها تحت المجهر الضوئي للتعرف على شكل البكتريا وصبغتها .

1-2-5-3-3 فحص الحركة Motility test:

اجري هذا الفحص بالاعتماد على تقنية القطرة المعلقة Hanging drop technique

. (Harley and Prescott ,2002)

2-2-5-3-3 فحص المايسليوم الارضي والهوائي Aerial and Substrate mycelium

استخدمت طريقة Rosana et al.,(2014) لفحص المايسليوم الارضي والهوائي للبكتريا مع اجراء بعض التعديلات عليها ، حضر الوسط الزرعي ISP4 وصب بالاطباق وترك يتصلب وبعد ذلك اخذت قطع مربعة منه ووضعت على شريحة زجاجية موضوعة على لوح زجاجي بشكل حرف V ولقحت قطع الوسط الزرعي المربعة من الجوانب بالبكتريا المنشطة بواسطة لوب الطعن ثم وضع غطاء شريحة cover slidعلى القطع المربعة ووضعت في الحاضنة بدرجة 28 م لمدة 3 ايام بعد ذلك وضعت تحت المجهر الضوئي لرؤية المايسليوم الارضي والهوائي .

6-3-3 غربلة العزلات البكتيرية لتحديد العزله الاكثر انتاجا لانزيم MTGase

1-6-3-3 وسط الانتاج

استعمل وسط الانتاج الانزيمي المذكور في الفقرة (3-2-5-2) لمعرفة العزلات البكتيرية الاكثر انتاجا لانزيم MTGase .

2-6-3-3 تحضير اللقاح

حضر العالق البكتيري بنقل 1 مل من عزله بكتريا *Streptomyces* المنشطة على وسط ISP4 Broth الى 9 مل من محلول التخفيف (ماء الببتون) المعقم ورج جيدا ثم حضرت سلسلة من التخافيف العشرية من الانابيب المعقمة بحجم 9 مل لكل انبوبة وتنميتها على وسط ISP4 Agar بدرجة حرارة 28 م لمدة 7 ايام وتم اختيار التخفيف الحاوي على العدد 1×10^7 و.ت.م / مل .

3-6-3-3 انتاج الانزيم

1-3-6-3-3 طريقة التخمرات السائلة (liquid state fermentation)

حضر وسط الانتاج الانزيمي حسب الفقرة (3-2-5-2) ووزع بدوارق زجاجية سعة 250 مل بواقع 50 مل لكل دورق وعقمت بالمؤصدة ، بعدها بردت ولقحت بمقدار 2 مل من العالق البكتيري (1×10^7 و.ت.م / مل) للعزلات البكتيرية النقية وحضنت في الحاضنة الهزازة (Shaker) بدرجة حرارة 30 م لمدة 7 أيام وبسرعة دوران 200 دورة / دقيقة ، بعد انتهاء فترة الحضن تم اجراء النبذ المركزي المبرد بسرعة دوران (g × 8000) عند درجة 4 م لمدة 10 دقائق لفصل الراشح عن الكتلة الحيوية Biomass ، اخذ الراشح الذي يمثل الانزيم الخارجي الخام لتقدير حجمه والفعاليه الانزيمية والبروتين (Jin *et al*., 2016) ، اما الكتلة الحيوية Biomass المفصولة بالنبذ المركزي غسلت بالماء المقطر مرتين وجمدت بدرجة 18- م° لمدة 24 ساعة ، بعدها سحقت بالهاون الخزفي وباضافة كمية قليلة من محلول دارىء السترات تركيزة 0.1 مولاري وبرقم هيدروجيني 6 ، اجري النبذ المركزي المبرد بسرعة دوران (g × 8000) عند درجة 4 م لمدة 10 دقائق ، بعدها اخذ الراشح والذي يمثل الانزيم الداخلي وقدر له الحجم والفعاليه الانزيمية وتركيز البروتين .

2-3-6-3-3 تقدير الكتلة الحيوية Estimation of the Biomass

قدرت الكتلة الحيوية بعد انتهاء فترة الحضن بالحاضنة الهزازة من خلال الطريقة المتبعة من قبل Zhang *et al*. (2012) وذلك من خلال ترشيح وسط التخمر بورقة ترشيح ، غسل الراسب (الكتلة الحيوية المترسبة على ورقة الترشيح) بالماء المقطر، ثم جففت بالفرن الكهربائي على درجة حرارة 105 م وحتى ثبات الوزن وقدر الوزن الجاف للخلايا من خلال القانون التالي :

وزن الكتلة الحيوية = وزن ورقة الترشيح مع الكتلة الحيوية بعد التجفيف – وزن ورقة الترشيح وهي فارغة

3-3-6-3-3 طريقة التخمرات الصلبة (Solid state fermentation)

استعمل طريقة التخمرات الصلبة حسب الطريقة التي ذكرها (Mahmood (2013 مع اجراء بعض التعديلات عليها ، حضرت دوارق زجاجية سعة 250 مل يحتوي كل دورق على 10 غرام نخالة حنطة و 0.2 غرام كبريتات المغنيسيوم المائية ($MgSO_4.7H_2O$) ورطبت مع 23.33 مل من محلول فوسفات البوتاسيوم الدارىء (pH 7 , 0.1 مولاري) وعقمت بجهاز المؤصدة Autoclave على درجة حرارة 121 م وضغط 15 باوند/انج^2 ولمدة 20 دقيقة ، بعد ذلك لقحت الدوارق بمقدار 1 مل من العالق البكتيري (بواقع 1×10^7 و.ت.م / مل) وحضنت في الحاضنة عند درجة 30 م لمدة 7 ايام ، بعد انتهاء عملية التخمير تم اضافة 100 مل ماء مقطر معقم الى الدوارق ثم وضعت في الحاضنة الهزازة عند درجة حرارة 30 م لمدة 20 دقيقة وبسرعة دوران 100 دورة / دقيقة ، بعدها رشح المستخلص خلال قطعة شاش معقمة تبعتها عملية النبذ المركزي المبرد بسرعة دوران (5000 × g) لمدة 10 دقائق ، قدرت فعالية الانزيم وتركيز البروتين للمستخلص الخام .

3-3-6-4 تقدير فعالية الانزيم Enzyme Activity Assay

قدرة الفعالية الانزيمية باستعمال N-Carbobenzoxy-L-Glutaminylglycine (Z-Gln-Gly) كمادة خاضعة وحسب طريقة الهيدروكزاميت اللونية المتبعة من قبل (Folk 1966) والمحورة من قبل Nur'amaliyah *et al*. (2016) (التحوير شمل درجة الحرارة ومدة الحضن) والتي تتكون من المحاليل التاليه :

1. محلول دارىء السترات (Buffer Citrate) تركيزه 0.1 مولاي و برقم هيدروجيني 6
2. محلول Hydroxylamine hydrochloride تركيزه 2 مولاري
3. محلول L- Glutathione تركيزه 0.1 مولاري
4. محلول المادة الخاضعة N-Carbobenzoxy-L-Glutaminylglycine (Z-Gln-Gly) تركيزه 0.1 عياري .
5. محلول التوقف الذي يتكون من 15% ثلاثي كلورو حامض الخليك و 5% $FeCl_3$ بنسبة (1:1) .

طريقة العمل : حضر مزيج التفاعل في انبوبة اختبار باضافة 100 مايكرولتر من مستخلص الانزيم و 200 مايكرولتر من محلول السترات الدارىء و 25 مايكرولتر من محلول Hydroxylamine hydrochloride و 25 مايكرولتر من محلول Glutathione و 75

مايكرولتر من محلول المادة الخاضعة (Z-Gln-Gly) وتم مزج المكونات بصورة جيدة وحضنت عند درجة حرارة 37 م لمدة 10 دقائق ثم اوقف التفاعل باضافة 425 مايكرولتر من محلول التوقف (رقم 5) ومزج بصورة جيدة وترك لمدة 15 دقيقة واجريت عملية النبذ المركزي بسرعة g× 3500 لمدة 10 دقائق اهمل الراسب واخذت قراءة امتصاصية الراشح على طول موجي 525 نانومتر باستعمال جهاز المطياف الضوئي (عينة تصفير الجهاز احتوت على جميع مواد مزيج التفاعل باستثناء مستخلص الانزيم (Crude Enzyme) , عرفت الوحدة الانزيمية بانها كمية الانزيم التي تقوم بدور العامل المساعد في تكوين مايكرومول واحد من حامض الهيدروكزاميت في الدقيقة الواحدة تحت ظروف التجربة.

3-3-6-4-1 تحضير المنحنى القياسي Standard Curve

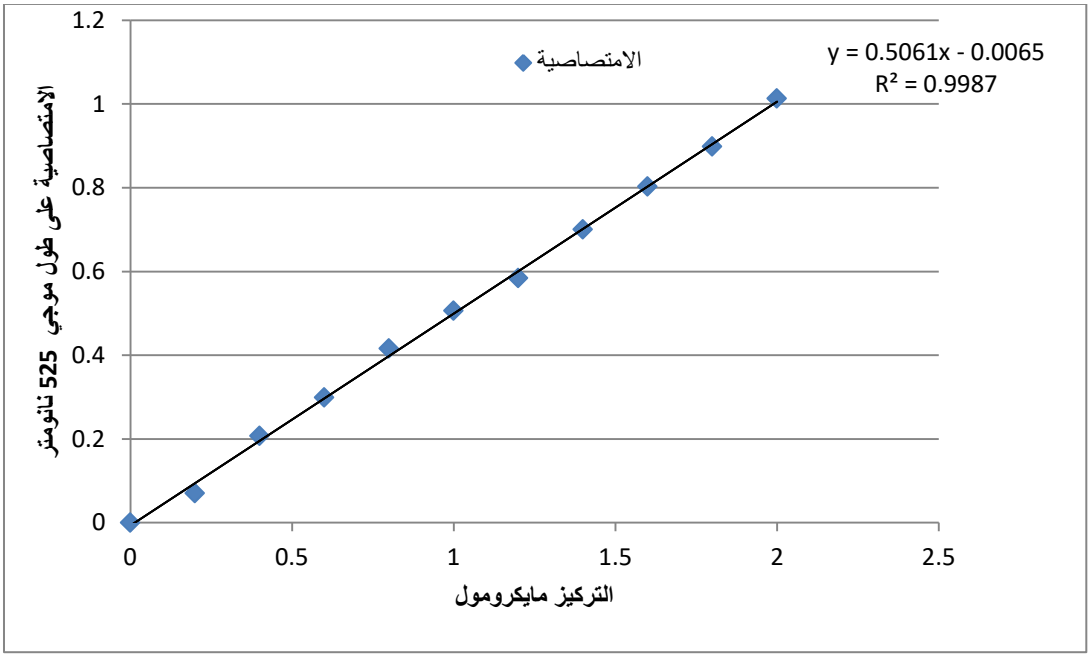
حضر المحلول القياسي L-Glutamic Acid- γ-Mono- Hydroxamic Acid (0.002 مولاري) بوزن 0.0081 غرام من المحلول القياسي ووضع في دورق حجمي سعة 25 مل واكمل الحجم الى 25 مل باضافة محلول دارىء السترات ذو رقم هيدروجيني 6 , ثم بعد ذلك اجريت سلسلة من التخافيف وكما مبين في الجدول (3-4) .

جدول (3-4) تراكيز مختلفة من المحلول القياسي L-Glutamic Acid -γ- Mono- Hydroxamic Acid لتحضير المنحنى القياسي له .

رقم الانبوبة	تركيز حامض L-glutamic acid-y-hydroxamic acid مايكرومول	حجم حامض الكلوتاميك الخزين (مل)	حجم محلول دارئ السترات المضاف (مل)	الحجم النهائي (مل)
1	0	0	4	4
2	0.2	0.4	3.6	4
3	0.4	0.8	3.2	4
4	0.6	1.2	2.8	4
5	0.8	1.6	2.4	4
6	1	2	2	4

4	1.6	2.4	1.2	**7**
4	1.2	2.8	1.4	**8**
4	0.8	3.2	1.6	**9**
4	0.4	3.6	1.8	**10**
4	0	4	2	**11**

بعد ذلك اخذ 0.5 مل من كل حجم نهائي المبين بالجدول اعلاه ووضع في انابيب اختبار وحضنت الانابيب بدرجة حرارة 37 م لمدة 10 دقائق ثم اضيف 0.5 مل من محلول التوقف الذي يتكون من (Trichloroacetic acid %15 و $FeCl_3$ %5) بنسبة (1:1) وترك لمدة 15 دقيقة ثم اجري النبذ المركزي بسرعة 3500 ×g لمدة 10 دقائق واهمل الراسب واخذ الراشح وتم قراءة الامتصاصية له على طول موجي 525 نانومتر بجهاز الطيف الضوئي , ثم بعد ذلك رسم المنحنى القياسي وكما موضح في الشكل (3-2).



شكل (3-2) المنحنى القياسي لمحلول L- Glutamic Acid-γ- Mono-Hydroxamic Acid

2-4-6-3-3 تقدير البروتين Protein Estimation

اتبعت طريقة (1951) Lowry *et al.* لتقدير تركيز البروتين وكما مبين ادناه :

أ . المحاليل :

1. محلول كاربونات الصوديوم Na_2CO_3 بتركيز 2% مذابه في محلول هيدروكسيد الصوديوم NaOH 0.1 مولاري
2. محلول كبريتات النحاس $CuSO_4.5H_2O$ (1%) والمحضر من اذابة 1 غم من كبريتات النحاس في 100 مل ماء مقطر .
3. محلول ترترات الصوديوم (2%) والمحضر من اذابة 2 غم ترترات الصوديوم في 100 مل ماء مقطر .
4. مزج محلول رقم (2) مع محلول رقم (3) بنسب متساوية وحضر قبل القياس مباشرة .
5. مزج محلول رقم (1) مع محلول رقم (4) بنسبة 1 : 50 وحضر قبل القياس مباشرة .
6. محلول كاشف فولن Folin ciocalteu reagent .
7. محلول البومين المصل البقري (Bovine Serum Albumin (BSA القياسي تركيزة 125 مايكروغرام / مل (حضر باذابة 0.0125 غرام من BSA مذاب في كمية من الماء المقطر ثم اكمل الحجم الى 100 مل باستعمال دورق حجمي سعة 100 مل).

ب. تحضير المنحنى القياسي لبروتين البومين المصل البقري :

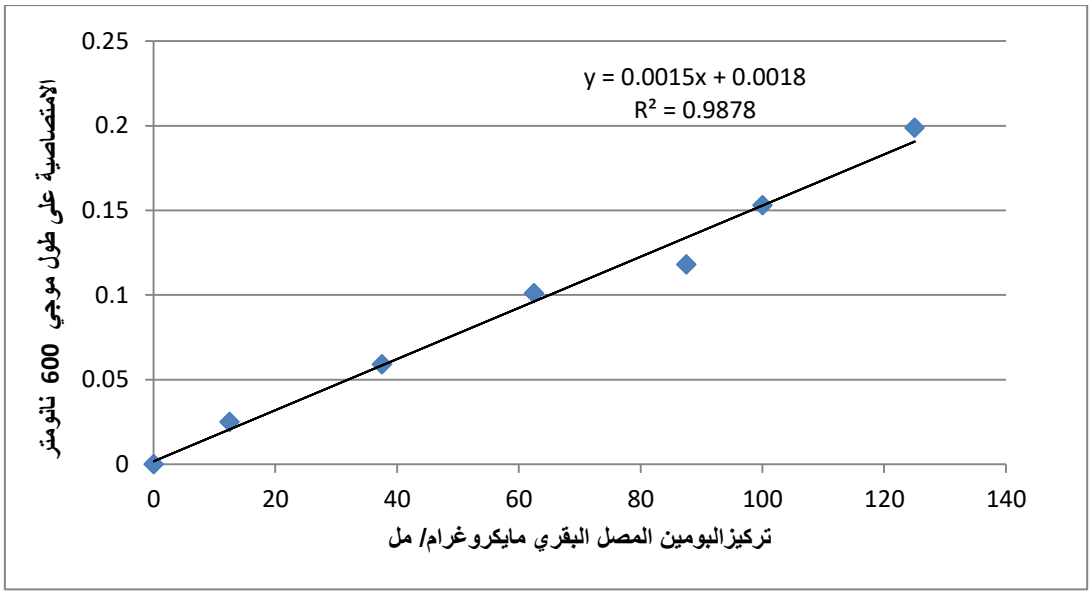
Preparation of Standard Curve of Bovine Serum Albumin

1. حضرت انابيب اختبار ووضعت فيها حجوم مختلفة من المحلول رقم (7) وكالاتي (0 , 0.1 , 0.3 , 0.5 , 0.7 , 0.8 , 1) مل ثم اكمل الحجم لكل انبوبة الى 1 مل بالماء المقطر للحصول على تراكيز مختلفة من البروتين (0 , 12.5 , 37.5 , 62.5 , 87.5 , 100 , 125) مايكروغرام / مل , وكما مبين في الجدول (3-5) .

جدول (3-5) حجم المحلول البروتيني وتركيز البروتين لتحضير المنحنى القياسي لالبومين المصل البقري لتقدير البروتين .

رقم الانبوبة	حجم محلول البروتين القياسي (مل)	حجم الماء المضاف (مل)	الحجم الكلي (مل)	تركيز بروتين BSA مايكروغرام / مل
1	0	1	1	0
2	0.1	0.9	1	12.5
3	0.3	0.7	1	37.5
4	0.5	0.5	1	62.5
5	0.7	0.3	1	87.5
6	0.8	0.2	1	100
7	1	0	1	125

2. اضيف لكل انبوبة 4 مل من محلول رقم (5) مع الرج بصورة جيدة ويترك لمدة 10 دقائق .
3. اضيف 0.4 مل من محلول رقم (6) وبعد الرج بصورة جيدة يترك لمدة 30 دقيقة .
4. تقرأ الامتصاصية على طول موجي 600 نانومتر بجهاز الطيف الضوئي .
5. تم الحصول على المنحنى القياسي برسم العلاقة البيانية بين قراءة الامتصاصية وتركيز البروتين BSA مايكروغرام / مل , كما في الشكل (3-3).



شكل (3-3) المنحنى القياسي لمحلول البومين المصل البقري لتقدير البروتين.

جـ. طريقة تقدير تركيز البروتين في المحلول الانزيمي

1. وضع 1 مل من المحلول الانزيمي في انبوبة اختبار واضيف له 4 مل من محلول رقم (5) وبعد الرج ترك لمدة 10 دقائق .
2. اضيف 0.4 مل من محلول رقم (6) وبعد الرج ترك لمدة 30 دقيقة
3. اخذت قراءة الامتصاصية على طول موجي 600 نانومتر .
4. تم تصفير الجهاز بعينة احتوت على جميع مواد مزيج التفاعل باستثناء المحلول الانزيمي (الذي عوض عن كميته بالمحلول الدارئ) .
5. تم حساب تركيز البروتين في المحلول الانزيمي بالرجوع الى المعادلة المستحصل عليها من المنحنى القياسي لمحلول BSA لتقدير البروتين.

3-3-7 الاختبارات الكيموحيوية Biochemical tests

3-3-7-1 اختبار تحلل الكازين Casein hydrolysis test

لقحت الأطباق الحاوية على وسط تحلل الكازين المحضرفي (3-2-5-8) بالمستعمرات النقية بعمر 7 ايام بطريقة التخطيط وحضنت عند درجة حرارة 28 م لمدة 7 أيام ، أن ظهور هالة شفافة حول المستعمرات النامية يعد دليلاً على تحلل الكازين (Harley and Prescott ,2002).

3-3-7-2 اختبار الكاتاليز Catalase test

اخذ جزء من المستعمرة النقية المنشطة بواسطة اللوب (Loop) ووضعت على شريحة زجاجية واضيف لها قطرة من كاشف بيروكسيد الهيدروجين 3 % ، ان ظهور فقاعات غازية دلالة على ان البكتريا منتجة لانزيم Catalase (Harley and Prescott ,2002) .

3-3-7-3 اختبار تحلل الجيلاتين Gelatin hydrolysis test

لقحت الأنابيب الحاوية على وسط تحلل الجيلاتين المحضرفي (3-2-5-5) بالمستعمرات البكتيرية النقية والمنشطة ، اذ طُعنت الأنابيب بوساطة لوب الطعن باستثناء انبوب المقارنة الذي ترك بدون طعن ، ثم حضنت عند درجة حرارة 28 م لمدة 7 أيام وبعد انتهاء فترة الحضن وضعت الأنابيب في الثلاجة بدرجة حرارة 4 م لمدة ساعة ، بعدها تم مشاهدة الانابيب اذ ان بقاء الوسط سائلا يعد مؤشرا على قدرة البكتريا لانتاج انزيم Gelatinase والذي يعمل على تحلل الجيلاتين (Macfaddin,2000; Harley and Prescott ,2002) .

3-3-7- 4 اختبار تحلل النشا Starch hydrolysis test

لقحت إلأطباق الحاوية على وسط تحلل النشأ المحضرفي (3-2-5-6) بالمستعمرات البكتيرية النقية والمنشطة وذلك من خلال التخطيط بواسطة اللوب وحضنت بدرجة حرارة 28 م لمدة 3-5 أيام ، ثم اضيف محلول اليود على الوسط لمدة 30 ثانية بعدها ازيل المحلول وتركت الاطباق لمدة 3 دقائق ، إن ظهور منطقة شفافة محيطة بالنمو دليل على تحلل النشأ بفعل انزيم α -amylase (Harley and Prescott ,2002).

3-3-7-5 اختبار الاوكسيديز Oxidase test

لقحت الاطباق الحاوية على وسط Tryptone Soy Agar المبين في فقرة (3-2-5-7) بجزء من المستعمرات النقيه والمنشطة ثم حضنت عند درجة حرارة 28 م لمدة 7 ايام ، بعدها اضيفت قطرات من كاشف الاوكسديز المبين في الفقرة (3-2-7-1) على المستعمرات النامية ، تعد النتيجة موجبة عند ظهور اللون البنفسجي (Macfaddin,2000) .

3-3-7-6 اختبار استهلاك السترات Citrate utilization test

لقحت الاطباق الحاوية على وسط استهلالك السترات المحضرفي (3-2-5-9) بالمستعمرات البكتيرية النقية والمنشطة وحضنت بدرجة حرارة 28 م لمدة 7 ايام ، تم متابعة نتيجة الفحص يوميا

اذ ان تحول لون الوسط من الاخضر الى الازرق دليل على استهلاك السترات والنتيجة موجبة (Macfaddin,2000; Harley and Prescott ,2002) .

3-3-7-7 اختبار اختزال النترات

لقحت انابيب الاختبار الحاوية على وسط اختزال النترات المحضرفي (3-2-5-10) بعالق البكتريا المنقاة والمنشطة وحضنت الانابيب بدرجة حرارة 28 م لمدة 3-5 ايام , ثم اضيف 1 مل من المحلول A و 1 مل من المحلول B المحضر في (3-2-7-3) وتركت الانابيب لدقائق قليلة ، وكانت النتيجة موجبة عند تغير لون الوسط الى الاحمر(Harley and Prescott ,2002) .

3-3-7-8 اختبار تحلل اليوريا Urea hydrolysis test

لقحت انابيب الاختبار الحاوية على وسط تحلل اليوريا المحضر في (3-2-5-11) بعالق البكتريا المنشطة وحضنت عند درجة حرارة 28 م لمدة 48 ساعة ، وتعد النتيجة موجبة عند تغير لون الوسط من البرتقالي الى الوردي دلالة على انتاج انزيم اليوريز (Harley and Prescott ,2002).

3-3-7-9 النمو بظروف لاهوائية Anaerobic growth

لقحت الأنابيب الحاوية على الوسط الزرعي ISP4 Broth المعقم بالمستعمرات البكتيرية النقية والمنشطة ، بعد ذلك تم تغطية السطح بزيت البارافين المعقم (1 مل لكل أنبوبة) وملاحظة النمو بعد الحضن عند درجة حرارة 28 م لمدة 7 أيام لاختبار قابلية البكتريا على النمو بغياب الأوكسجين بقراءة الأمتصاص الضوئي بوساطة جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer وعلى طول موجي 600 نانومتر واستعمل الوسط الزرعي ISP4 Broth غير الملقح في تصفير الجهاز .

3-3-7-10 النمو بدرجات حرارية مختلفة

لقحت الانابيب الحاوية على الوسط الزرعي ISP4 Broth المعقم بعالق البكتريا النقية والمنشطة وحضنت بدرجات حرارية مختلفة (4 ،10 ،26 ، 30 ،28 ، 35 ، 40 ، 45 ، 50 ، 55) م لمدة 7 ايام ثم قيست كثافة النمو على طول موجي 600 نانومتر بجهاز المطياف الضوئي واستعمل وسط ISP4 Broth غير الملقح لتصفير الجهاز .

3-3-7-11 النمو بارقام هيدروجينية مختلفة

لقحت الانابيب الحاوية على الوسط الزرعي ISP4 Broth بارقام هيدروجينية مختلفة (4 ، 6 ، 8 ، 10 ، 12) بعالق البكتريا النقية والمنشطة وحضنت بدرجة حرارة 28 م لمدة 7 ايام ثم قيست كثافة النمو على طول موجي 600 نانومتر بجهاز المطياف الضوئي واستعمل وسط ISP4 Broth غير الملقح لتصفير الجهاز .

3-3-7-12 النمو بتراكيز ملحية مختلفة

حضرت انابيب اختبار حاوية على الوسط الزرعي ISP4 Broth بتراكيز ملحية 5% , 7% , 10 % من كلوريد الصوديوم ، ولقحت بعالق البكتريا النقية وحضنت مع انابيب ملقحة بدون تراكيز ملحية وانابيب اخرى بدون تلقيح كعينة سيطرة بدرجة حرارة 28 م لمدة 7 ايام ، استدل على وجود نمو من العكارة المتكونة في الوسط نتيجة نمو البكتريا بالمقارنة مع عينة السيطرة بعد قياسها على طول موجي 600 نانومتر بجهاز المطياف الضوئي .

3-3-8 التشخيص الجزيئي للعزله الاكثر انتاجا لانزيم MTGase

3-3-8-1 استخلاص الحامض النووي DNA

استعملت عدة الاستخلاص Extraction Mini Kit DNA في استخلاص الحامض النووي DNA من العزله البكتيرية الاكثر انتاجا لانزيم MTGase اذ تم الاستخلاص في مختبر وهج الدنا في العاصمة بغداد وحسب الخطوات التالية :

1. نميت البكتريا *Streptomyces* النقية على الوسط الزرعي ISP4 Broth وحضنت عند درجة حرارة 28 م لمدة 7 ايام ، ثم اخذ 1.5 مل من العزله المنشطة ووضع في انبوبة eppendrof سعة 2 مل .
2. اجري النبذ المركزي بسرعة g ×13000 لمدة دقيقة واحدة ، اهمل الراشح باستثناء 50 مايكرولتر منه اضيف الى الراسب ومزج جيدا بواسطة Vortex.
3. اضيف الى الراسب 100 مايكرولتر من المحلول الدارىء MP و 3 مايكرولتر من محلول اللايسوزايم المحضر في (3-2-6-6) لتحطيم جدار الخلية ومزجت جيداً بواسطة المازج Vortex لمدة 30 ثانية .
4. حضنت العينة عند درجة حرارة 37 م لمدة 15 دقيقة مع التقليب 5 – 6 مرات .
5. اجري نبذ مركزي لمدة دقيقة واحدة بسرعة g ×13000 في درجة حرارة الغرفة، ثم ازيل الراشح مع التأكد من ازالة جميع السوائل تماماً.

6. اضيف 200 مايكرولتر من المحلول الدارىء MG و 20 مايكرولتر من المحلول Proteinase K و 5 مايكرولتر من RNAase الى العينة ومزجت بصورة جيدة .
7. حضنت العينة في حمام مائي عند درجة حرارة 65 م لمدة 15 دقيقة.
8. بعد تحلل lysis الخلايا بصورة كاملة، اضيف 250 مايكرولتر من المحلول الدارىء MB ومزجت بواسطة ماصة دقيقة micropipette 5 – 6 مرات وبعد المزج تم التدوير لازالة القطرات من داخل الغطاء .
9. اضيف 250 مايكرولتر ايثانول (بتركيز 80 %) الى العينة , مع المزج بواسطة الماصة الدقيقة 5-6 مرات.
10. اخذ من الخليط في الخطوة 9 بواسطة الماصة 750 مايكرولتر ووضع في انبوبة جمع من نوع EZ- 10 ثم اجري النبذ المركزي بسرعة g ×13000 لمدة دقيقة واحدة واهمل الراشح واخذ الراسب الموجود في انبوبة EZ-10 ونقل الى انبوبة جديدة سعة 2 مل.
11. اضيف 700 مايكرولترمن المحلول الدارىء MW الى الراسب في انبوبة EZ-10، واجري النبذ المركزي بسرعة g ×13000 لمدة دقيقة واحدة للتخلص من الراشح، ثم اجري نبذ مركزي مرة اخرى بنفس السرعة لمدة دقيقة لتجفيف الغشاء , بعدها نقلت الى انبوبة اخرى سعة 1.5 مل .
12. اضيف 50 – 100 مايكرولتر من المحلول الدارىء ME مباشرة على الغشاء ثم الحضن لمدة دقيقة في درجة حرارة الغرفة بعدها النبذ المركزي بسرعة g ×13000 لمدة دقيقة واحدة.

3-3-8-2 الكشف عن الحامض النووي Agarose gel electrophoresis of DNA

اجري الترحيل الكهربائي Electrophoresis باستعمال هلام الاكاروز 1 % للكشف عن الحامض النووي DNA (Sambrook *et al*., 1989)

3-3-8-2-1 تحضير هلام الـ Agarose

حضر بتركيز 1٪ وحسب الطريقة التي ذكرها Sambrook *et al*. (1989) وذلك باذابة 1 غم من الاكاروز في 100 مل من محلول TBE الذي تم تحضيره مسبقا والمذكور في الفقرة (3-2-6-5) , سخن الاكاروز ليغلي ثم ترك ليبرد عند درجة حرارة تراوحت بين (45 -50 درجة مئوية) وصب في قالب الترحيل الكهربائي ووضع المشط في نهاية القالب بعد ان سدت او غلقت نهاية القالب وترك ليتصلب في درجة حرارة الغرفة بعدها ازيل المشط وثبت قالب الترحيل على الوحدة

الافقية الكهربائية الممثلة بالخزان المستخدم في الترحيل الكهربائي، ثم ملئ الخزان بمحلول TBE ليغطي سطح الهلام .

3-3-8-3-2-2 طريقة العمل

تم مزج 3 مايكرولتر من صبغة التحميل (صبغة بروموفينول الزرقاء) مع 5 ميكرولتر من الحامض النووي DNA المستخلص من العزله البكتيرية والمراد ترحيله كهربائياً، بعدها اضيفت العينات في ثقوب الهلام , شغل جهاز الترحيل الكهربائي على 60 ملي امبير بعد ربط الاقطاب ولمدة 1 – 2 ساعة , وملاحظة الترحيل من خلال سريان الصبغة , تم اختبار الهلام للكشف عن حزم DNA بواسطة مصدر للأشعة فوق البنفسجية على طول موجي 336 نانومتر بعد وضع الهلام في حوض يحتوي على 30 مايكرولتر من محلول الصبغة الحمراء Red Safe المحضرة في (3-2-6-7) للحامض النووي و 500 مل من الماء المقطر.

3-3-8-3 تضخيم الحامض النووي DNA

استخدمت تقنية تفاعلات سلسلة البلمرة الانزيمية PCR لتضخيم جين16S rRNAللتأكد من نوع العزلـه باستعمال البوادىء المبينـة بالجدول (3-6) و المجهزة من شركة IDT (Integrated DNA Technologies company, Canada) ,

جدول (3-6) البوادئ المستعملة في تشخيص العزله البكتيرية (Bouras *et al*.,2013)

البادئ	تتابع القواعد النتروجينية	درجة حرارة الالتحام	محتوى قواعد الـ % GC	الحجم الناتج
الأمامي	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG- 3'	54.3	50	1250 زوج قاعدي
العكسي	5'- GGTTACCTTGTTACGACTT- 3’	49.4	42.1	

أذيبت البوادئ المجفدة بكمية من الماء المقطر الخالي من الايونات للوصول الى تركيز نهائي قدره 100 مول/ميكرولتر كمحلول خزين وحفظ بدرجة حرارة 20- م، كما حضر محلول

تركيز10 مول/ميكرولتر، من خلال سحب 10 ميكرولتر من المحلول الخزين واضيف اليه 90 ميكرولتر من الماء المقطر الخالي من الايونات للحصول إلى الحجم النهائي 100 ميكرولتر.

اجري التضخيم بحجم 25 مايكرولتر،أضيفت مجموعة PCR PreMix kit (i-Taq) والتي تتكون من مزيج المواد المذكورة في الجدول (3-7) الى مزيج المكونات المبينة في الجدول (3-8)

جدول (3-7) مكونات مجموعة تفاعل البلمرة التسلسلي PCR PreMix kit (i-Taq)

المادة	الحجم
i-Taq DNA Polymerase	5U/µl
DNTPs	2.5mM
Reaction buffer (10X)	1X
Gel loading buffer	1X

جدول (3-8) المواد المضافة الى انبوبة التفاعل لتضخيم جين 16S rRNA بتقنية PCR

المكونات	التركيز
Taq PCR PreMix	5µl
Forward primer	10 picomols/µl (1 µl)
Reverse primer	10 picomols/µl (1 µl)
DNA	1.5µl
Free nuclease water	16.5 µl
Final volume	25µl

الظروف المثالية من المسخ الابتدائي ودرجة حرارة الالتحام تم التعرف عليها بعد اجراء عدة تفاعلات تجريبية للحصول على هذه الظروف، تم تغيير درجة حرارة التفاعل وتركيز قالب الـ DNA بمعدل (1.5 – 2) مايكرولتر من خلال استعمال جهاز الـ Gradient PCR لجميع العينات

لاختيار افضل درجة حرارة، اذ تعتبر من اهم العوامل المؤثرة على التحام البادئ مع القالب المكمل ، وكما مبين بالجدول (3-9) .

جدول (3-9) الظروف المثلى المعتمدة في تفاعل تضخيم جين 16S rRNA في جهاز PCR

ت	المرحلة	درجة الحرارة م°	الوقت	عدد الدورات
1	المسخ الابتدائي Initial Denaturation	95	3 دقائق	واحدة
2	المسخ النهائي - Denaturation 2	95	45 ثانية	35
3	الالتحام Annealing	56	45 ثانية	
4	الاستطالة Extension-1	72	1 دقيقة	
5	الاستطالة النهائية Extension -2	72	7 دقائق	واحدة

بعد انتهاء وقت التفاعل سحب 5 مايكرولتر من نواتج تضخيم جين 16S rRNA للترحيل الكهربائي.

3-3-8-3-1 تحضير هلام الاكاروز والترحيل الكهربائي لنواتج تقنية PCR

حضر هلام الاكاروز بتركيز 1.5% والترحيل الكهربائي بثلاث مراحل حسب طريقة Sambrook *et al.* (1989) وكما يأتي :

أولاً: تحضير هلام الآكاروز Preparation of Agarose Gel

1. حضر محلول الآكاروز بإذابة 1.5غم من مسحوق الآكاروزفي 100مل من دارئ TBE buffer في بيكر250 مل، وسخن باستعمال فرن المايكرويف Microwave oven لمدة دقيقة واحدة ثم برد الى درجة حرارة 45 – 50 م
2. إضافة 3 مايكرولتر من محلول الصبغة الحمراء (محلول التحميل الاحمر الامن x 20000) إلى الهلام الدافئ.

ثانياً: تحضير قالب هلام الاكاروز Preparation of Casting Agarose

صب الهلام بدرجة 45 – 50 م في قالب الترحيل الكهربائي ووضع المشط في نهاية القالب بعد ان سدت نهاية القالب وترك ليتصلب، بعدها ازيل المشط واضيف محلول الترحيل 1x– TBE buffer ليغطي سطح الهلام .

ثالثاً: الإضافات (وضع وسريان DNA في هلام الآكاروز)

1.تم مزج 5 مايكرولترمن عينات DNA مع 3 مايكرولتر من محلول التحميلLoading dye ثم وضعت في الحفر المخصصة لها في هلام الترحيل مع مراعاة عدم خروج العينة من سطح الحفرة، وضع الدليل الحجمي القياسي DNA ladder في الحفرة المخصصة له على أحد جانبي الهلام وبحجم 5 مايكرولتر .

2. ربطت الأقطاب بصورة مناسبة بحيث يربط القطب الموجب مع الموجب الموجود بمجهز الطاقة لجهاز الترحيل الكهربائي والقطب السالب مع السالب وشغل جهاز الترحيل الكهربائي عند 60 ملي امبير و 90 فولت ولوحظ سريان الصبغة الى الجهة الاخرى من الهلام، بعد انتهاء عملية الترحيل الكهربائي التي استغرقت 90 دقيقة ، وضع قالب الهلام على جهاز transillminator UV light لرؤية حزم DNA المتداخل مع صبغة Red safe بشكل حزم وتقدير الحجم مقارنة مع الدليل الحجمي وذلك للتعرف على حجم الحزم الناتجة من التفاعل PCR.

ارسلت نواتج الجين المضخم مع البوادىء الى شركة Macrogan الكورية ليتم تحديد تتابعات القواعد النتروجينية، واعتمدت تللك التتابعات مع ما متوفر من معلومات حول هذا الجين في بنك الجينات التابع الى مركز NCBI من خلال الموقع الالكتروني (www.ncbi.nlm.nih.gov) وحسب برنامج BLAST Nucleotide وذلك للتعرف على نوع العزله المنتخبة، كما تم رسم شجرة العلاقة الوراثية Phylogenetic Tree للعزله المحلية بعد مطابقتها مع السلالات ذات الصلة القريبة منها في بنك الجينات التابع لمركز NCBI وبالاعتماد على برنامج MEGA7 .

3-3-9 دراسة الظروف المثلى لإنتاج الانزيم بوساطة العزله المنتخبة:

وسط الانتاج الانزيمي نوع B الذي ذكره Bahrim *et al.* (2010) الذي اعطى اعلى فعالية انزيمية ومن خلاله تم دراسة الظروف المثلى للانتاج :

3-3-9-1 المصدر الكاربوني الامثل :

درس تأثير استبدال المصدر الكربوني المتمثل في النشأ (2 %) في وسط الانتاج بمصادر كاربونية بديلة محلية كلا على انفراد وبنسبة استبدال 100% ، شملت المولاس ، عصير التمر ، الكليسرول ، مسحوق البطاطا مع الابقاء على باقي مكونات الوسط.

3-3-9-1-1 تحضير عصير التمر:

استعمل تمر الزهدي المحلي لتحضير عصير التمر بعد ازالة النوى منه واضافة الماء المقطر بنسبة (1: 1) بعدها سخن في الحمام المائي على درجة حرارة 85 م لمدة 45 دقيقة , ثم رشح بقطعة قماش ململ وعقم الراشح بجهاز المؤصدة عند درجة حرارة 121 م لمدة 10 دقائق (Acourene and Ammouche,2010) .

3-3-9-1-2 تحضير مسحوق البطاطا :

حضر مسحوق البطاطا حسب الطريقة المبينة من قبل Guerra-Rodríguez and Vázquez (2014) وذلك بغسلها بالماء مع ازالة قشورها وتقطيعها الى شرائح , ثم جففت على درجة حرارة 105 م لحين ثبات الوزن , بعدها طحنت بشكل مسحوق.

3-3-9-1-3 افضل نسبة استبدال من المصدر الكربوني المحلي المنتخب :

درس تأثير افضل نسبة استبدال للمصدر الكربوني المحلي المنتخب وبنسب مختلفة شملت (25 , 50 , 75 , 100) %

3-3-9-2 المصدر النتروجيني الامثل :

درس تأثير استبدال المصدر النتروجيني المتمثل في مسحوق فول الصويا مع الببتون (2 %) لكل منهما في وسط الانتاج بمصادر نتروجينية اخرى كلا على انفراد وبنسبة استبدال 100 % شملت كبريتات الامونيوم 2 % , نترات الامونيوم 2 % مع الابقاء على باقي مكونات الوسط .

3-3-9-3 درجة الحرارة المثلى لإنتاج الأنزيم :

استعملت درجات حرارية مختلفة (25 ، 28 ، 30 ، 35 ، 37 ، 40) م° للحضن بالحاضنة الهزازة لوسط الانتاج الامثل.

3-3-9-4 الرقم الهيدروجيني الامثل :

حضر وسط الانتاج الانزيمي بارقام هيدروجينية مختلفة (5 ، 6 ، 7 ، 8، 9) وباستعمال محلول 1 مولاري HCl و 1 مولاري NaOH لتعديل الرقم الهيدروجيني .

3-3-9-5 سرعة الاهتزاز المثلى (دورة / دقيقة) :

درس تأثير سرعة الاهتزاز على الانتاج وذلك بوضع الدوارق الزجاجية في الحاضنة الهزازة Shaker بسرعة اهتزاز مختلفة (0 ، 150 ، 175 ، 200 ، 225) دورة / دقيقة ، استخلص الانزيم وقدرت فعاليته في نهاية كل تجربة من تجارب الظروف المثلى للانتاج لمعرفة الظرف الامثل .

3-3-9-6 حجم اللقاح الأمثل :

درس تاثير حجم اللقاح الامثل على انتاجية انزيم MTGase وذلك باستعمال حجوم لقاح مختلفة شملت (0.5 ، 1 ، 2 ، 3 ، 4) مل / 50 مل من وسط الانتاج .

3-3-9-7 مدة الحضن المثلى :

درس تاثير مدة الحضن المثلى على انتاجية انزيم MTGase والتي شملت (1 ، 2 ، 3 ، 4 ، 5 ، 6 ، 7) يوم ، بسرعة دوران 200 دورة / دقيقة .

3-3-10 تنقية انزيم Enzyme Purification : MTGase

3-3-10 -1 الترسيب بكبريتات الامونيوم (Precipitation with ammonium sulphate)

اضيفت اوزان معينة من كبريتات الامونيوم الى المستخلص الانزيمي الخام وبدرجة حرارة 4 م مع التحريك المستمر باستعمال المحرك المغناطيسي (Hot plate magnetic stirrer) للوصول الى نسبة اشباع تراوحت بين (20 - 90) % ، اجريت عملية النبذ المركزي بدرجة حرارة 4 م وبسرعة 10000×g لمدة 30 دقيقة بعد كل مرحلة من مراحل الاضافة وقدرت فعالية الانزيم ونسبة البروتين في الراشح والراسب وبعد الوصول الى الخطوة التي لم تسجل فيها اي فعالية انزيمية في الراشح اهمل الراشح واخذ الراسب وذوب في كمية معينة من محلول دارىء السترات تركيزه 0.1 مولاري وبرقم هيدروجيني 6 (Zhang *et al.*, 2017) ، ثم قدرت له الفعالية الانزيمية كما في (3-3-6-4) وتركيز البروتين كما مبين في (3-3-6-4-2) .

3-3-10-2 الديلزة (Dialysis)

تم تنشيط اكياس الديلزة حسب طريقة (Brewer, 1974) اذ استعملت اكياس الديلزة (ذات اوزان جزيئية تراوحت بين 8 – 14 كيلو دالتون) لاجراء عملية التنافذ الغشائي لراسب المستخلص الانزيمي الذي ذوب بكمية معينة من محلول دارئ السترات (تركيزه 0.1 مولاري ، pH 6) لمدة 30 ساعة وبدرجة 4 م مع استبدال المحلول الدارىء كل 6 ساعات ، وبعد انتهاء الوقت قدرت الفعالية النوعية ثم بعد ذلك ركز المستخلص بجهاز التجفيد لحقنه بجهاز AKTA pure-25.

3-3- 10-3 الترسيب بالكحول الاثيلي Ethanol Preciptation

اضيف الايثانول المبرد بتركيز 70% بدرجة حرارة -15 م بصورة تدريجية الى المستخلص الانزيمي الخام المبرد بدرجة 4 م وتم الترسيب بنسبة 1:1 ، 1: 2 ، 3:1 (حجم مستخلص : حجم كحول) مع التحريك المستمر باستعمال المحرك المغناطيسي (magnetic stirrer) وبوجود الثلج بعدها ترك ليستقر بالثلاجة ولمدة ساعتين ، ثم اجريت عملية النبذ المركزي المبرد وبسرعة 15000×g لمدة 20 دقيقة ، اخذ الراسب وذوب في اقل كمية من محلول دارىء السترات تركيزة 0.1 مولاري وبرقم هيدروجيني 6 ، وقدرت له الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين .

3-3-10-4 الترشيح الهلامي بجهاز Gel Filtration ÄKTA Pure -25

أجريت عملية الترشيح الهلامي حسب الطريقة المتبعة من قبل الطائي (2017) مع اجراء بعض التغييرات عليها بجهاز ÄKTA Pure-25 المجهز من قبل شركة GE Healthcare Life Sciencesالسويدية باستعمال عمود Superdex75 10/300 GL ، تم غسل العمود باستعمال محلول دارىء السترات تركيزة 0.1 مولاري وبرقم هيدروجيني 6 وبمعدل جريان 0.5 مل / دقيقة لمدة 3 ساعات للغسلة الواحدة وكررت عملية الغسل 3 مرات ، تم زرق العينة المركزة التي تم الحصول عليها من عملية الترسيب بكبريتات الأمونيوم بحجم 0.5 مل بالعمود بشكل تدريجي بعد ترشيحها بمرشح Millipore ذي قطر 0.22 مايكرومتر للتخلص من الشوائب وتم متابعة القمم المفصولة على طول موجي 280 نانومتر من خلال الكروموتوكرام الذي يظهر على شاشة الحاسوب وأجريت عملية إسترداد النموذج باستعمال محلول دارىء السترات (تركيزه 0.1 مولاري ، pH 6) وجمعت الأجزاء المستردة من النموذج بواقع 1 مل/ دقيقة بواسطة جهاز جامع العينات نوع F9-R المجهز من نفس الشركة وتم قياس الفعالية الإنزيمية وتركيز البروتين في القمم المفصولة .

3-3-11 اختبار نقاوة الانزيم

استعملت طريقة الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الأكرل أمايد بغياب المواد الماسخةpolyacrylamide gel electrophoresis تبعاً لطريقة (1970) Laemmli الموصوفة من قبل (1990) Garfin لتحديد نقاوة الإنزيم باستعمال جهاز Slab electrophoresis .

3-3-11-1 المحاليل والمواد المستعملة

1. محلول الداريء لهلام الفصل Buffer solution of resolving gel

حضر المحلول الدارىء Tris-HCl بتركيز 1.5 مولاري وبرقم هيدروجيني 8.8 وذلك بإذابة 18.2 غم Tris hydroxymethyl methylamine (Tris-HCl) في 80 مل ماء مقطر وعدل الرقم الهيدروجيني إلى 8.8 بإضافة قطرات من حامض الهيدروكلوريك 1 مولاري وأكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر .

2. محلول داريء الأقطاب

يتكون محلول دارىء الاقطاب من Tris-HCl بتركيز 0.02 مولاري و Glycine بتركيز 0 .2 مولاري وبرقم هيدروجيني 8.3 وحضر بإذابة 3غم Tris-HCl و14.4 غم Glycine في 850 مل ماء مقطر وعدل الرقم الهيدروجيني إلى 8.3 بإضافة قطرات من هيدروكسيد الصوديوم 1 عياري وأكمل الحجم إلى لتر بالماء المقطر .

3. محلول الهلام الخزين Stock Acrylamide (30%)

حضر بإذابة 29 غم من Acrylamide و 1غم من Bisacrylamide في حجم معين من الماء المقطر وأكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر وحفظ بالثلاجة في قنينة معتمة .

4. محلول بيرسلفات الامونيوم Ammonium persulphate

حضر آنياً باذابة 0.15 غم من بيرسلفات الامونيوم في 10 مل ماء مقطر.

5. محلول التثبيت Fixing Solution

حضر بمزج 40% ميثانول مع 10% من ثلاثي كلورو حامض الخليك (TCA).

6. محلول التصبيغ Staining Solution (% 0.1)

حضر بإذابة0.25غم من صبغة الكوماسي الزرقاء Comassie brilliant blue R-250 في 250مل من خليط مكون من حامض الخليك : الميثانول : الماء المقطر بنسبة 1 :4 : 5 على التوالي.

7. محلول إزالة الصبغة Destaining solution

حضر من خليط يتكون من حامض الخليك : الميثانول : الماء المقطر بنسبة 1 : 4 : 5 على التوالي.

8. محلول الحفظ Preserving solution

حضرمن 7% حامض الخليك .

9. محلول صبغة بروموفينول الزرقاء بتركيز Bromo phenol blue 0.25%

حضرة بإذابة 0.25 غم من صبغة بروموفينول الزرقاء في محلول 50% كليسيرول .

10. محلول التمد N,N,N,N-tetra methyl ethylene diamine (TEMED)

محلول جاهز للإستعمال .

11.تحضيرالنموذج

حضر بمزج 150 مايكرولترمن الإنزيم المنقى المركز مع 225 مايكرولتر من محلول هلام الفصل الداريء وإضافة 38 مايكرولتر من محلول صبغة بروموفينول الزرقاء ثم رفعت كثافة محلول النموذج بإضافة 5 قطرات من الكليسرول .

2-11-3-3 طريقة العمل:

1. تحضير هلام الفصل

حضر الهلام بخلط 6 مل من الماء المقطر و3مل من محلول هلام الفصل الداريء و10مل من محلول الأكرل أمايد الخزين و7.5مل محلول هلام الرص الداريء و7.5مل محلول برسلفات الأمونيوم .

2. طريقة العمل

تم حقن الهلام المتكون في المستودع بحجم 10 مل بواسطة محقنة طبية ذات سعة10 مل بعناية لمنع تكون الفقاعات الهوائية ، بعدها وضع المشط وترك لحين تصلب الهلام (حوالي20-25دقيقة) ثم رفع المشط بعناية لمنع حدوث تشوه في الحفر المتكونة وحقنت العينات بواسطة محقنة دقيقة بسعة 50 مايكرولتر ، وضع بعدها المستودع بصورة معكوسة في جهاز الترحيل لملامسة فتحة المستودع لداريء الأقطاب ، أضيف داريء الأقطاب أثناء الترحيل وتم تشغيل مجهز القدرة الكهربائية على 30فولت وبعد مرور15 دقيقة رفعت الفولتية إلى60 فولت وعند وصول الصبغة إلى نهاية الهلام تم قطع التيار الكهربائي ، ثم نزع الهلام من لوحي الزجاج بعناية لتجنب تمزق الهلام ، نقل الهلام إلى حوض يحتوي على محلول تثبيت الصبغة وترك لمدة 5 دقائق وبعدها نقل إلى حوض يحتوي على محلول التصبيغ وترك لمدة 4 ساعات ، بعدها أضيف محلول إزالة الصبغة مع تبديل المحلول كل 40 دقيقة لحين ظهور الحزم بصورة واضحة وحفظ الهلام في محلول الحفظ.

12-3-3 توصيف انزيم MTGase

1-12-3-3 تقدير الوزن الجزيئي

قدر الوزن الجزيئي للانزيم المنقى بطريقة الترحيل الكهربائي باستعمال هلام متعدد الاكريل امايد بوجود العوامل الماسخة Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) تبعاً لطريقة Laemmli (1970) الموصوفة من قبل Garfin (1990) لتحديد الوزن الجزيئي للإنزيم وكما ياتي :

1-1-12-3-3 المواد والمحاليل المستعملة

تضمنت المحاليل المذكورة في الفقرة (3- 3- 11-1) مع اضافة بعض المحاليل التالية:

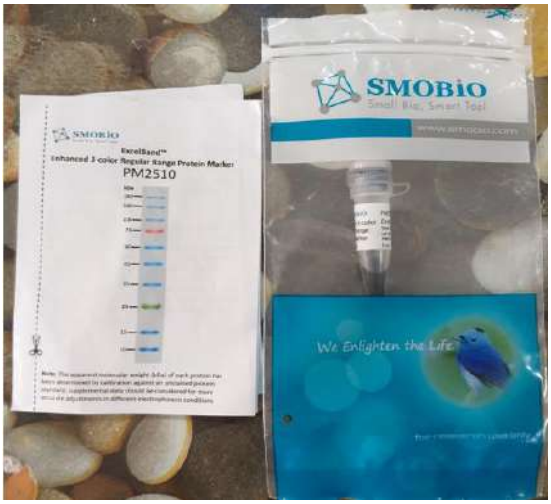
1. محلول SDS (10 %) : أذيب 10 غم من SDS في كمية من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر .

2. محلول دارئ الأقطاب :حضر المحلول رقم 3 مع إضافة 10 مل من 10%SDS.

3. محلول الأكريل أمايد الخزين :حضر المحلول رقم 4 مع إضافة 10 مل من 10%SDS.

4. محلول الخزين الداريء للنموذج :حضر المحلول رقم 12 مع إضافة 0.3 مل من 10%SDSو 0.5 مل من 2-Mercaptoethanol.

5.محاليل البروتينات القياسية :استخدم Marker جاهز صيني المنشأ من شركة SMOBiO ، معلوم الاوزان الجزيئية (10 – 180) كيلودالتون وكما مبين بالشكل (3-4) .



شكل (3-4) البروتينات القياسية معلومة الاوزان الجزيئية المستعملة في الترحيل الكهربائي

6. محلول النموذج : حضر بمزج 250 مايكرولتر من الانزيم المنقى المركز مع 250 مايكرولتر لمحلول رقم (4) ووضع في حمام مائي عند درجة الغليان لمدة 5 دقائق ثم برد الى درجة حرارة المختبر .

3-3-12-1-2 طريقة العمل

اتبعت طريقة العمل المذكورة في الفقرة (3-3-11-2) لإجراء عملية الترحيل الكهربائي وبعد إنتهاء عملية الترحيل تم تحديد الحزم وإيجاد الوزن الجزيئي عن طريق قياس المسافة التي قطعتها الصبغة قبل التصبيغ وقياس المسافة التي قطعتها الحزم البروتينية بعد التصبيغ ومنها إستخرجت الحركة النسبية Relative Mobility (Rm) وفق المعادلة التالية :

الحركة النسبية (Rm) = **المسافة التي قطعتها الحزم البروتينية (سم) / المسافة التي قطعتها الصبغة (سم)**

إستخرج الوزن الجزيئي من خلال رسم العلاقة بين لوغاريتم الأوزان الجزيئية للبروتينات القياسية مقابل حركتها النسبية في الهلام .

3-3-12-2 الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم Optimum pH

تم قياس فعالية انزيم MTGase حسب الفقرة (3-3-6-4)عند قيم مختلفة من الرقم الهيدروجيني وذلك من خلال تحضير محاليل دارئة ذات قوة آيونية 0.1 مولاري وعند قيم مختلفة من الرقم الهيدروجيني تضمنت (3، 3.5، 4، 4.5، 5، 5.5 ، 6، 6.5، 7، 7.5، 8، 8.5 ، 9، 9.5، 10، 10.5)

1. محلول برقم هيدروجيني 3 – 3.5 باستعمال دارئ الكلايسين-حامض الهيدروكلوريك .
2. محلول برقم هيدروجيني 4 – 5.5 باستعمال دارئ الخلات .
3. محلول برقم هيدروجيني 6– 6.5 باستعمال دارئ السترات .
4. محلول برقم هيدروجيني 7– 8 باستعمال داريء فوسفات البوتاسيوم.
5. محلول برقم هيدروجيني 8.5– 10.5 باستعمال دارئ الكلايسين-هيدروكسيد الصوديوم .

بعدها رسمت العلاقة بين قيم الارقام الهيدروجينية مقابل فعالية الانزيم لتعيين الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم .

3-3-12-3 الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الانزيم pH Stability

حضن الانزيم لتحديد الرقم الهيدروجيني الامثل للثبات مع حجوم متساوية من المحاليل الدارئة وبالارقام الهيدروجينية (3 ،3.5 ، 4 ، 4.5 ، 5 ، 5.5 ، 6 ، 6.5 ، 7 ، 7.5 ، 8 ، 8.5 ، 9 ، 9.5 ، 10 ، 10.5) في حمام مائي على درجة حرارة 37م° ولمدة 60 دقيقة ، بعدها قدرت الفعالية المتبقية .

3-3-12-4 درجة الحرارة المثلى للإنزيم Enzyme Optimum Temperature:

قدرت فعالية الانزيم حسب الفقرة (3-3-6-4) على مدى من الدرجات الحرارية في التحضين والتي تراوحت من (25 ، 30 ، 35 ، 40 ، 45 ، 50 ، 55 ، 60 ، 65 ، 70 ، 75 ، 80 ، 85 ، 90 م°) لمدة 10 دقائق عند الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الانزيم .

3-3-12-5 تقدير طاقة التنشيط للانزيم

قدرت طاقة التنشيط لتحويل المادة الاساس الى نواتج Activation energy (Ea) وطاقة مسخ الانزيم Denaturation energy بقياس ثابت سرعة التفاعل الملاحظ Observed Reaction rate Constant (Kobs) عند مدى من درجات الحرارة تراوحت بين (25 – 90) م° ورسمت العلاقة بين مقلوب درجة الحرارة المطلقة 1/T مقابل Log Ko ومنها تم حساب طاقة التنشيط من خلال معادلة ارينوس باستخراج الميل Slope (Segelm, 1976).

$$\text{LogKo} = \frac{-\text{Ea}}{2.3\text{R}}$$

اذ ان :

Ko : ثابت سرعة التفاعل الملاحظ Reaction rate constant

Ea : طاقة التنشيط Activation energy

R : ثابت الغاز (1.987 cal / mol / k) Gas constant.

3-3-12-6 الثبات الحراري للإنزيم Enzyme Thermal Stability :

حضن محلول الإنزيم على الدرجات الحرارية المختلفة (25 ، 30 ، 35 ، 40 ، 45 ، 50 ، 55 ، 60 ، 65 ، 70 ، 75 ، 80 ، 85 ، 90) مْ في حمام مائي لمدة 60 دقيقة ، ثم التبريد مباشرةً ، بعدها قدرت الفعالية المتبقية ، وحضن ايضا الانزيم المنقى على درجة حرارة 45 م لمدة 7 ساعات بعدها قدرت له الفعالية المتبقيه .

3-3-12-7 تعيين الثوابت الحركية (V_{max} , K_m) لإنزيم MTGase

حضرت تراكيز مختلفة من المادة ألخاضعة (Z-Gln-Gly) تراوحت بين (2 ، 6 ، 10 ، 14 ، 18 ، 22 ، 26 ، 30) ملي مولاري (Cui *et al*.,2007)، قدرت قيم ثابت ميكالس K_m والسرعة القصوى V_{max} من رسم العلاقة بين السرعة الأولية V وتراكيز المادة الأساس [S] حسب الطريقة التي اشار اليها (Segel,(1976 ، وباربعة طرائق هي :

1. مخطط لاينوفر – برك Lineweaver – Burk reciprocal plot
2. مخطط هان – وولف Hanes – Woolf plot
3. مخطط وولف – اوغستنسو – هوفستي Woolf–Augustinsson– Hofstee plot
4. مخطط ايدي – سكاتجارد Eadie – Scatchad polt

اذ استخرج معدل قيم ثابت ميكالس والسرعة القصوى للطرائق الاربعة.

3-3-12-8 تأثير بعض الأملاح وبعض الكواشف المنشطة والمثبطة في فعالية الإنزيم .

Effect of Some Salts of Some Activators and Inhibitors Compounds on Enzyme activity.

حضرت محاليل الاملاح والكواشف المنشطة والمثبطة في فعالية الانزيم حسب الطريقة التي ذكرها (2016) ,Nur- amaliyah *et al*. بتركيزين 5 ، 10 ملي مولاري لكل من (NaCl ، KCl ، LiCl ، $CuCl_2$ ، $CaCl_2$ ، $MgCl_2$ ، $FeCl_2$ ، $ZnCl_2$ ، EDTA ، DTT ، Glutathione ، Cysteine) ، تم مزج محلول الإنزيم مع حجم مساوي من كل من الاملاح والمنشطات والمثبطات وحضن في درجة حرارة الثبات 45 م لمدة 60 دقيقة ثم بعدها قدرت فعالية الانزيم المتبقية كنسبة مئوية من فعالية الانزيم غير المعامل .

3-3-13 الاستعمالات التطبيقية لإنزيم MTGase

استعمل الانزيم المنقى جزئيا (بعد الترسيب بكبريتات الامونيوم والديلزة) بفعالية نوعية 6.1196 وحدة انزيمية / ملغم بروتين في التطبيق ، إذ اشتمل التطبيق على اضافة الانزيم بفعالية نوعية (6.1196) وحدة / ملغم الى اللحم المفروم واللبن الرائب وبتراكيز مختلفة .

3-3-13-1تطبيق الانزيم في اقراص اللحم المفروم

حضرت اقراص اللحم المفروم حسب المكونات الاتية :

1. لحم 2 كيلوغرام (لحم فخذ عجل بدون شحم وعظم)
2. 200 غرام شحم
3. ملح بنسبة 0.5 % (10 غم / 2 كغم)

تم فرم اللحم بالماكنة الكهربائية (بعد تعقيمها بالماء الحار بصورة جيدة) واضيف الشحم والملح الى اللحم المفروم ومزج بصورة جيدة وفرم مرة اخرى لغرض التجانس ثم قسمت الى اربع معاملات واضيف الانزيم وكما مبين :

a. المعاملة الاولى 500 غم لحم مفروم بدون اضافة انزيم (عينة ضابطة)
b. المعاملة الثانية 500 غم لحم مفروم مع اضافة انزيم بنسبة 0.1 % .
c. المعاملة الثالثة 500 غم لحم مفروم مع اضافة انزيم بنسبة 0.2 % .
d. المعاملة الرابعة 500 غم لحم مفروم مع اضافة انزيم بنسبة 0.3 % .

اذ استعملت هذه النسب حسب Chin and Chung (2003) ، قسمت كل معاملة الى خمسة اقراص لحم وزن كل قرص 100 غرام , وضعت اقراص اللحم المفروم في أكياس من البولي اثيلين مفرغة من الهواء وغلقت الأكياس بصورة جيدة وخزنت بالتبريد بدرجة حرارة 4م لمدة 7 ايام تم خلالها متابعة التغيرات في المؤشرات الكيميائية والتي شملت رقم البيروكسيد وقيمة حامض الثايوباربيوترك TBA، و الصفات الفيزيائية التي شملت قابلية حمل الماء WHC والرقم الهيدروجيني pH ونسبة الفقد بالوزن أثناء الطبخ وايضا نسبة الانكماش .

3-3-13-1-1 المؤشرات الكيميائية chemical indicators

1. رقم البيروكسيد peroxide value

قدرت قيمة البيروكسيد لأقراص اللحم المفروم المعاملة والمخزنة بالتبريد لمدة (1 ,3 ,7) أيام وللعينة الضابطة وفقا للطريقة المذكورة في Egan *et al* .(1981)، إذ تم وزن 5 غم من الدهن (المستخلص من اقراص اللحم المفروم بواسطة مذيب الداي اثيل ايثر) وأضيف له 30 مل من مزيج يحتوي على (حامض الخليك الثلجي و الكلورفورم بنسبة 3 :2) ومزج بصورة

جيدة لحين ذوبان الدهن ووضع في مكان مظلم لمدة 20 دقيقة ، بعدها اضيف 5 مل من يوديد البوتاسيوم المشبع و20 مل ماء مقطر وبضع قطرات من دليل النشأ ، ثم سحح الخليط بمحلول ثايوكبريتات الصوديوم ذو عيارية 0.001 لحين اختفاء اللون الأزرق ، تم حساب قيمة البيروكسيد من خلال المعادلة التالية :

$$\text{Peroxide Value} = \frac{Na_2S_2O_3 \times 0.001N \times 1000}{\text{Wt. of Sample}}$$

2. قيمة حامض الثايوباربتيورك(Thiobarbituric acid (TBA

قدرت قيمة TBA لأقراص اللحم المعاملة والمخزنة بالتبريد لمدة (1 ،3 ،7) أيام حسب الطريقة التي ذكرها (2017) .Chakanya *et al* وذلك بوزن 1 غم من اقراص اللحم المفروم واضيف الية 10 مل من محلول الدارىء كلوريد البوتاسيوم بتركيز 0.15 مولاري ومزج لمدة 20 ثانية ، ثم اخذ منه 0.5 مل ووضع في انبوبة اختبار واضيف اليه 0.25 مل كاشف TBA و 0.25 مل من TCA (15 %) ، ثم وضعت انبوبة الاختبار في الحمام المائي بدرجة حرارة 95 م لمدة 60 دقيقة ثم بردة بالثلج المجروش واضيف لها 2 مل من البيوتانول ورجت بصورة جيدة مع اجراء النبذ المركزي المبرد بسرعة g × 4000 لمدة 25 دقيقة ثم اخذ الراشح وقيست الامتصاصية بجهاز الطيف الضوئي على طول موجي 532 نانومتر(تم تصفير الجهاز بالبيوتانول) وتم حساب رقم TBA من القانون التالي حسب (1981). Egan *et al* وكما يلي:

TBA NO. (ملغم مالونالديهايد / كغم من النموذج) = Absorbance × 7.8

3-3- 2-1-13 الصفات الفيزيائية physical properties

1. قابلية حمل الماء Water Holding Capacity (WHC)

تم حساب قابلية حمل الماء لأقراص اللحم المخزونه بالتبريد لمدة (1 ، 3 ، 7) أيام حسب الطريقة الموصوفة من قبل الطائي والموسوي (1992) من خلال وزن 10 غم من اقراص اللحم المفروم وأضيف له 20 مل ماء مقطر ، مزجت بصورة جيدة ونقلت المحتويات إلى بيكر

مدرج ووضع في نهايته قمع وورقة ترشيح Whatman No.1 واستلم الراشح وسجل حجمه بعد 30 دقيقة وحسبت قابلية حمل الماء كما مبين :

قابلية حمل الماء (مل) = كمية الماء الكلية (مل) - كمية الماء في الاسطوانة المدرجة (مل)

2. الرقم الهيدروجيني pH

تم تقدير الرقم الهيدروجيني لأقراص اللحم المخزونة بالتبريد لمدة (1 ، 3 ، 7) أيام وذلك باستعمال جهاز pH meter ، بخلط 10 غم من اقراص اللحم المفروم مع 20 مل ماء مقطر ثم ترك لمدة 5 دقائق بعدها اخذت قراءة قيمة الرقم الهيدروجيني (الطائي والموسوي ،1992) .

3. حساب نسبة الفقد بالوزن أثناء الطبخ Cooking Loss

حسبت نسبة الفقدان بالوزن أثناء الطبخ لأقراص للحم المخزونة بالتبريد لمدة 7 أيام وذلك بقلي أقراص اللحم المفروم من كل معاملة على طاوة ساخنة لمدة ثمان دقائق مع التقليب Berry (1991) وحسبت النسبة المئوية للفقد كما في ادناه :

$$\text{الفقد أثناء الطبخ} = \frac{\text{وزن أقراص اللحم قبل الطبخ (غم) - وزنها بعد الطبخ(غم)}}{\text{وزن أقراص اللحم قبل الطبخ (غم)}} \times 100$$

4. حساب نسبة الانكماش بالطبخ Cooking Shrinkage

تم حساب النسبة المئوية للانكماش لأقراص اللحم المعاملة والمخزنة بالتبريد لمدة 7 أيام وذلك بقياس قطر أقراص اللحم قبل الطبخ وبعد الطبخ (Soltanizadeh and Ghiasi-Esfahani,2015) وحسب المعادلة التالية :

$$\text{الانكماش بالطبخ \%} = \frac{\text{قطر اقراص اللحم قبل الطبخ(سم)–قطر اقراص اللحم بعد الطبخ (سم)}}{\text{قطر اقراص اللحم قبل الطبخ (سم)}} \times 100$$

3-3-13-1-3 التقييم الحسي

اجري التقييم الحسي لاقراص اللحم المعاملة بانزيم MTGase بتراكيز مختلفة (0% ، 0.1% ، 0.2% ، 0.3%) من قبل أساتذة مختصين في قسم علوم الأغذية - كلية الزراعة - جامعة البصرة ، وفق استمارة التقييم الحسي التي ذكرها Tseng *et al.* (2000) والتي تضمنت المظهر الخارجي (Appearance) ، اللون (Color) ، النكهة (Flavor)،

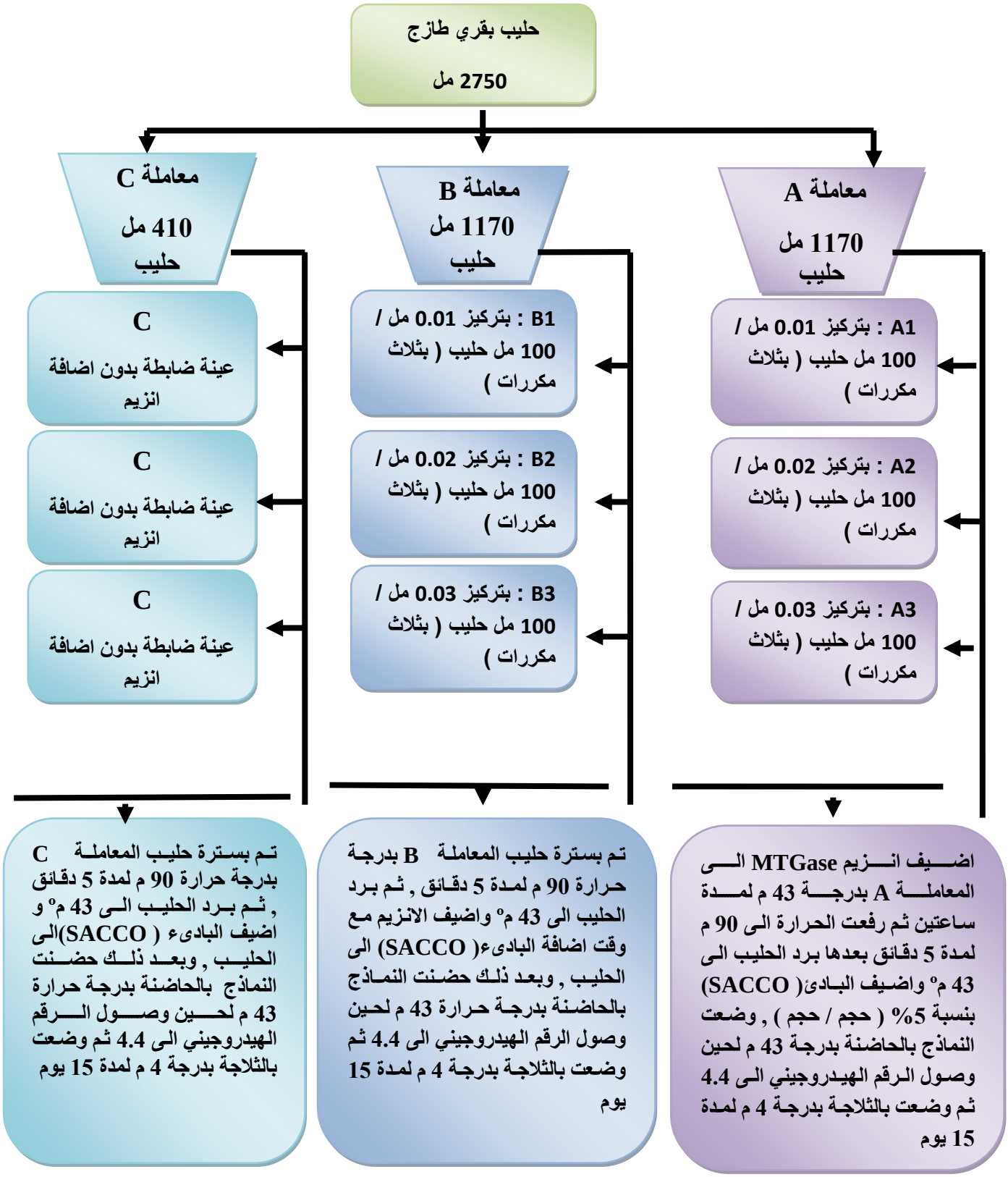
العصيرية (Juiciness) و القبول العام (Overall acceptability) ، والمبينة بالجدول (3-10) .

جدول (3- 10) استمارة التقييم الحسي لاقراص اللحم المفروم والمعاملة بانزيم MTGase .

الدرجة	اللون Color	النكهة Flavor	العصيرية Juiciness	المظهر الخارجي Appearance	القبول العام acceptability
7	مقبول جدا	نكهة قوية	عصيري جدا	مقبول جدا	مقبول جدا
6	مقبول	نكهة متوسط	عصيري	مقبول	مقبول
5	مقبول قليلا	نكهة قليلة	قليل العصيرية	مقبول قليلا	مقبول قليلا
4	وسط	عديمة النكهة	وسط	وسط	وسط
3	غيرمقبول قليلا	نكهة غير مقبولة قليلا	قليل الجفاف	غير مقبول قليلا	غير مقبول قليلا
2	غير مقبول	نكهة غير مقبولة متوسطا	جاف	غير مقبول	غير مقبول
1	غيرمقبول جدا	نكهة غير مقبولة جدا	جاف جدا	غير مقبول جدا	غير مقبول جدا

3-3-13-2 تطبيق الانزيم مع اللبن الرائب (Yoghurt)

اتبعت الطريقة التي ذكرها كل من Ozer *et al*. (2007) و Setiadi Ramdhani (2018) and مع اجراء بعض التعديلات عليها , قسمت العينات الى ثلاث معاملات (A، B ، C) وقسمت المعاملات الى ثلاثة اقسام وبثلاث مكررات لكل قسم وكما مبين بلمخطط التالي شكل (3-5) :



شكل (3 -5) يوضح انتاج اللبن الرائب المضاف له MTGase بثلاث معاملات.

اجريت الفحوصات للمعاملات (A، B ، C) بمدد خزن مختلفة (1 ، 8 ، 15) يوم ، وشملت الفحوصات التالية :

1. قياس الرقم الهيدروجيني خلال فترات الخزن.

تم قياس الرقم الهيدروجيني للبن الرائب خلال فترات الخزن بواسطة جهاز pH- meter من خلال وضع القطب داخل عينة اللبن الرائب المخلوطة بشكل جيد ، ثم اخذت القراءة بعد استقرار قيمة الرقم الهيدروجيني (Setiadi and Ramdhani,2018; Amirdivani and Baba,2011)

2. قياس الحموضة التسحيحية خلال فترات الخزن .

قدرت الحموضة التسحيحية للبن الرائب خلال فترات الخزن حسب الطريقة التي ذكرها Amirdivani and Baba (2011) وطبق القانون التالي :

$$\text{الحموضة التسحيحية \%} = \frac{\text{الحجم النازل من } \boldsymbol{NaOH} \times \mathbf{0.1} \text{ عياري} \times \mathbf{0.009}}{\text{وزن العينة(غم)}} \times 100$$

3.اختبار نضوح الشرش Synersis :

اجري اختبار نضوح الشرش اثناء فترة الخزن وذلك بوزن 100 غرام من اللبن الرائب لكل معاملة مع اجراء نبذ مركزي بسرعة 3500 × g لمدة 15 دقيقة ، بعدها اهمل الراسب واخذ الراشح (Setiadi and Ramdhani, 2018) ، وطبق القانون التالي :

$$\text{نضوح الشرش \%} = \frac{\text{وزن الراشح (غم)}}{\text{وزن نموذج اللبن الرائب (غم)}} \times 100$$

4.اختبار قابلية حمل الماء Water Holding Capacity (WHC)

تم اختبار قابلية حمل الماء حسب ما بينه (Dinkci (2012 خلال فترات الخزن وذلك بوزن 20 غرام من اللبن الرائب لكل معاملة واجري لها نبذ مركزي بسرعة 5000×g لمدة 10 دقائق ، بعدها اهمل الراسب واوزن الراشح وحسبت قابلية حمل الماء اعتمادا على القانون التالي :

$$\text{النسبة المئوية لقابلية حمل الماء } (\%) = \frac{\text{وزن اللبن الرائب(غم)- وزن الراشح(غم)}}{\text{وزن اللبن الرائب (غم)}} \times 100$$

3-3-13- 2-1 التقييم الحسي

اجري التقييم الحسي للبن الرائب (yoghurt) المعامل بانزيم MTGase بتراكيز مختلفة (0.01 , 0.02 , 0.03) مل / 100 مل حليب ، بالاضافة الى عينة السيطرة Control ، من قبل اساتذة مختصين في قسم علوم الاغذية – كلية الزراعة – جامعة البصرة ، وفق استمارة التقييم الحسي التي ذكرها Ramdhani and Setiadi (2019) بدرجة تقييم من (1- 5) والتي تضمنت المظهر الخارجي (Appearance) ، الرائحة (Odor) ، الطعم (Taste) والثباتية (Consistency) ، وكما مبينة بالجدول (3- 11) .

جدول (3- 11) استمارة التقييم الحسي للبن الرائب المعامل بانزيم MTGase

درجة التقييم	المظهر الخارجي Appearance	الرائحة Odor	الطعم Taste	الثباتية Consistency
5				
4				
3				
2				
1				

3-3-14 التحليل الاحصائي

استعمل البرنامج الاحصائي الجاهز Genstat اصدار 2012 في تحليل البيانات ، واختبرت العوامل المدروسة باستعمال اختبار اقل فرق معنوي L.S.D عند مستوى احتمالية 0.05 .

4. النتائج والمناقشة Results and Discussion

1-4 عزل البكتريا Isolation of Bacteria

ان عملية عزل وتشخيص الكائن المجهري تعد الخطوة الاولى والرئيسية التي تستند عليها خطوات الدراسة ، اذ تم الحصول على 31 عزلة بكتيرية من ثلاث مصادر (التربة ، روث الابقار ، روث الجاموس) وتوزعت العزلات حسب مصادر واماكن العزل وكما مبين بالجدول (4-1) ، اذ تم خلال عملية العزل اضافة كربونات الكالسيوم ومزجها مع هذه المصادر وبنسبة (1:10) وحضنها عند درجة حرارة 37 م لمدة 4 ايام ، ان اهمية اضافة كربونات الكالسيوم ($CaCo_3$) يعود الى دورها في تسريع جفاف التربة وهذا يساعد على اختزال اعداد البكتريا الخضرية الغير مرغوب بها فضلا عن رفع قيمة الرقم الهيدروجيني لها والذي ينعكس سلبا على نمو بعض الاحياء المجهرية الاخرى كالفطريات (Al-Hulu *et al*.,2011 ;Abdulhameed, 2013)، وهذا ما اكدته العديد من الدراسات التي اشارت الى ان اضافة كربونات الكالسيوم يزيد من اعداد البكتريا الخيطية بمقدار 100 مرة (Bagyoko *et al*.,2018; Maiti *et al*.,2020) ، كما ان استعمال الوسط الزرعي ISP4 agar والذي يعتبر من الاوساط الانتقائية والملائمة لنمو بكتريا *Streptomyces* لاحتوائه على النشأ كمصدر كاربوني فضلا عن الاملاح اللاعضوية المناسبة لنموها وعند رقم هيدروجيني 7.2 ، هذه العوامل جميعها ساعدت البكتريا على النمو بشكل واضح دون غيرها وهذ ما اكدته العديد من المصادر العلمية التي اشارت الى اهمية استعمال هذا الوسط في عزل وتشخيص هذه البكتريا (Kampfer,2012; Basha *et al*.,2019) ، اما بالنسبة لمصادر العزل الاخرى والتي شملت (اللحم البقري ، سمك الكارب ، التين ، التفاح ، العدس ، الحمص ، الفاصوليا) فقد بينت عدم وجود اي نمو للبكتريا الخيطية وهذا جاء متطابقا مع ما ذكرته الدراسات العلمية السابقة على ان التربة تعد المصدر الرئيسي لعزل مختلف انواع بكتريا *Streptomyces* (Chantavorakit *et al*., 2021 ;Kampfer,2012 ; Al-Hulu *et al*.,2011) والتي تعتبر خزين لا ينضب لمختلف انواع الاحياء المجهرية الصناعية .

جدول (4-1) مصادر واماكن العزل للبكتريا المعزولة محليا

رمز العزلة	مصدر العزل	رمز العزلة	مصدر العزل
S1	تربة خمسة ميل	S17	تربة حديقة الاقسام الداخلية
S2	تربة حديقة كلية العلوم	S18	تربة بحيرات اسماك مركز علوم البحار

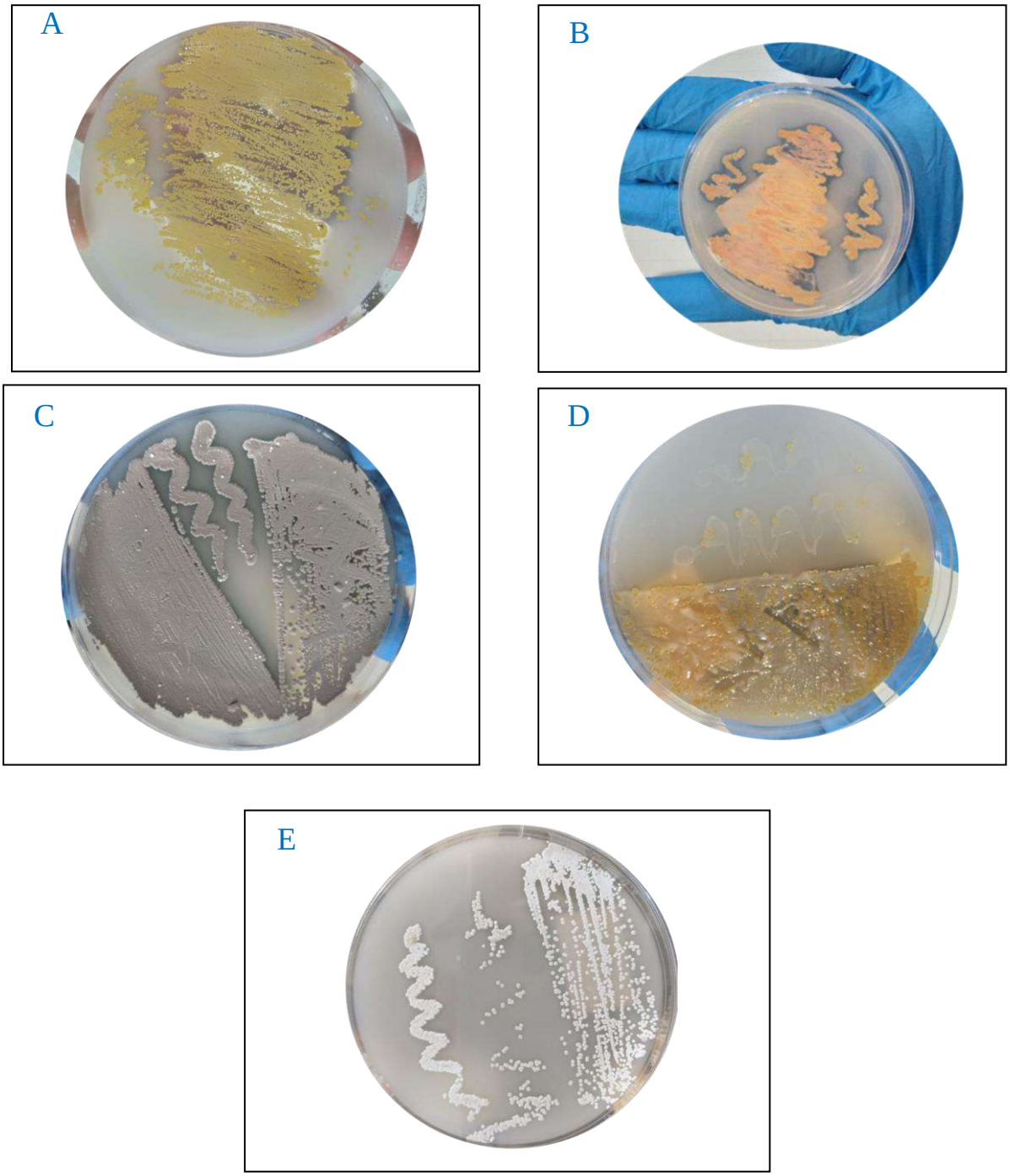
S3	تربة حديقة كلية العلوم	S19	تربة بحيرات اسماك مركز علوم البحار
S4	تربة حديقة كلية الصيدلة	S20	تربة حديقة عامة/ الجمعيات
S5	تربة حديقة كلية الصيدلة	S21	تربة حديقة كلية التربية
S6	تربة حديقة كلية الزراعة	S22	تربة حديقة كلية التربية
S7	تربة حديقة كلية الزراعة	S23	تربة بيوت بلاستيكية
S8	تربة حديقة كلية الهندسة	S24	تربة بيوت بلاستيكية
S9	تربة حديقة كلية االهندسة	S25	تربة نهرية / القرنة
S10	روث ابقار محطة كلية الزراعة	S26	تربة نهرية / القرنة
S11	روث جاموس منطقة الهارثة	S27	تربة حديقة المدينة الرياضية
S12	تربة ضفاف شط العرب منطقة كرمة علي	S28	تربة حديقة المدينة الرياضية
S13	تربة ضفاف شط العرب منطقة كرمة علي	S29	تربة شط العرب /العشار
S14	تربة حديقة عامة / الدير	S30	تربة شط العرب /العشار
S15	تربة حديقة مجمع باب الزبير	S31	تربة حديقة عامة/ الكرمة
S16	تربة حديقة مجمع كليات باب الزبير		

2-4 تشخيص العزلات البكتيرية Identification of Bacterial Isolates

1-2-4 الفحوصات المظهرية Morphological tests

درست الصفات المظهرية لمستعمرات العزلات البكتيرية المعزولة محليا والبالغ عددها 31 عزلة والنامية على وسط ISP4 Agar ، اذ ظهرت العزلات S1 ، S2 ، S3 ، S21 ، S22 ، S27 ، S28 بشكل مستعمرات دائرية مفردة ذات لون اصفر، اما العزلات S4 ، S5 ، S6 ، S7 ، S8 ، S9 ، S14 فكانت مستعمراتها دائرية لزجة جوزية اللون ، بينما العزلات S15 ، S16 ، S17 ، S18 ، S19 ظهرت منتشرة في الوسط وذات لون بصلي ، اما العزلات S12 ، S13 ، S20 ، S25 ، S26 ، S29 ، S30 ، S31 فكانت بشكل مستعمرات مفردة دائرية بيضاء اللون قطنية ، كما ظهرت العزلات S10 ، S11 ، S23 ، S24 بشكل مستعمرات رمادية اللون ذات نمو كثيف وكما مبين في الشكل (4-1 A، B، C، D ، E) ، قد يعزى ظهور مستعمرات العزلات البكتيرية بالوان مختلفة الى الصبغات التي تنتجها هذه البكتريا والتي تعد من الصفات التشخيصية المعتمدة للبكتريا الخيطية والتي يتاثر انتاجها بعدة عوامل منها تركيب الوسط ودرجة الحرارة والرقم الهيدروجيني فضلا عن عمر المزرعة (Nabila and Kampfer, 2012 ;Kannabiran,2018) ، كما ان جميع العزلات البكتيرية كانت تفوح منها

رائحة تشبه رائحة التربة المبتلة بسبب انتاجها لبعض المواد العطرية مثل الاستلديهايد والايزوبيوتانول او لاحتوائها على مادة Geosmin التي يفرزها غزل البكتريا وهذه تعد احدى الدلائل على وجود بكتريا *Streptomyces* ، اتفقت هذه الصفات مع العديد من الدراسات والبحوث حول البكتريا الخيطية (Thakur *et al*.,2007 ; Rahman and Ul-Islam,2008؛ Lapaz *et al*.,2017;Abdulhameed,2013) .

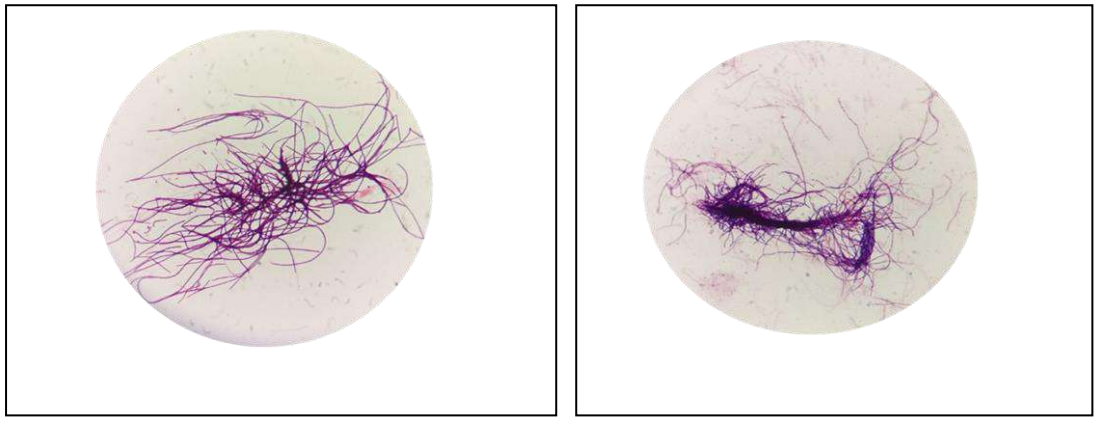


شكل (4-1) المستعمرات البكتيرية المعزولة محليا ذات الوان مختلفة على الوسط الزرعي ISP4 Agar .

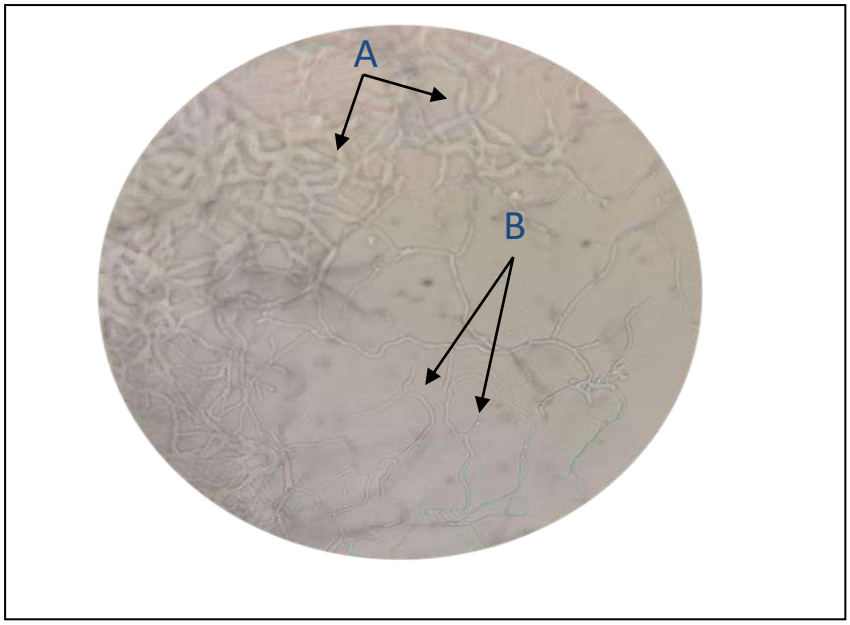
2-2-4 الفحوصات المجهرية Microscopic tests

اجريت الفحوصات المجهرية للعزلات البكتيرية المعزولة محليا بعد تصبيغها بصبغة كرام ، اذ بينت الفحوصات ان جميع العزلات كانت موجبة لصبغة كرام خيطية الشكل بعضها تكون رفيعة وطويلة اشبه بالشعر والبعض الاخر خيطية سميكة متعرجة اشبة بتفرعات الغصن والمبينة في شكل (4-2) ، اذ شخصت العزلات العائدة الى جنس *Streptomyces* باستعمال تقنية الزرع على الشريحة الزجاجية (Slide) والتي تعد من افضل الطرق المعتمدة في تشخيص العزلات التابعة للبكتريا الخيطية على مستوى الجنس لما لها من دور في اظهار الغزل الارضي والهوائي والذي يميز هذه البكتريا بعضها عن البعض (Kampfer, 2012; Abdulhameed,2013) ، اذ تميز الغزل الارضي بكونه شديد التفرع واقل سمكا وغير مقسم ولا يحمل السبورات وذا لون ابيض بينما الغزل الهوائي فكان اقل تفرعا واكثر سمكا ومكون للسبورات بشكل سلسلة قصيرة تراوحت بين ثلاثة الى عدة سبورات وذو لون ابيض وكما مبين في الشكل (4-3) ، اتفقت النتائج مع Kampfer (2012) الذي بين ان بكتريا *Streptomyces* خيطية موجبة لصبغة كرام ومكونة للسبورات ، واتفقت كذلك مع Hasani *et al*.,(2014) الذي ذكر ان بكتريا *Streptomyces* موجبة لصبغة كرام ذات شكل خيطي ، كما اتفقت مع Al-Hulu *et al*. (2011) الذي ذكر ان بكتريا *Streptomyces gelaticus* المعزولة من التربة كانت موجبة لصبغة كرام خيطية، واتفقت ايضا مع جبر (2004) الذي وجد ان بكتريا *Streptomyces* sp. المعزولة من التربة موجبة لصبغة كرام خيطية الشكل.

بعد العزل على وسط ISP4 Agar الذي يعتبر من الاوساط الانتقائية الخاصة بنمو بكتريا *Streptomyces* sp. واجراء الفحوصات المظهرية والمجهرية تم التوصل الى ان العزلة البكتيرية تحمل صفات جنس بكتريا *Streptomyces* .



شكل (4-2) البكتريا المعزولة محليا تحت المجهر.



شكل (3-4) المايسليوم الارضي والهوائي للبكتريا المعزولة محليا ، تمثل A : المايسليوم الهوائي ، B : المايسليوم الارضي

3-4 غربلة العزلات البكتيرية :

اجريت غربلة للعزلات البالغ عددها 31 عزلة باستعمال نوعين من التخمرات الاولى طريقة المزارع السائلة اما الثانية فتضمنت طريقة تخمرات المزارع الصلبة .

1-3-4 طريقة تخمرات الحالة السائلة Liquid state fermentation

استعملت طريقة تخمرات الحالة السائلة لانتخاب افضل عزلة منتجة لانزيم MTGase ومن خلال نتائج التحليل الاحصائي المبينة في الجدول (4-2) لوحظ وجود فروقات معنوية عند مستوى $P \leq 0.05$ بين العزلات المنتجة للانزيم ، اذ ان العزلة S13 اعطت اعلى انتاجية انزيمية ولكل من الانزيم الخارجي والداخلي والتي بلغت الفعالية النوعية لها (0.6751 و 0.0045) وحدة / ملغم على التوالي مقارنة مع بقية العزلات ، قد يعود التفاوت في انتاج الانزيم بين العزلات الى التباين الوراثي بين الانواع المختلفة من العزلات البكتيرية .

جدول (4-2) كفاءة العزلات البكتيرية في انتاج انزيم MTGase اعتمادا على الفعالية النوعية (وحدة / ملغم) وباستعمال طريقة تخمرات الحالة السائلة .

ت	رمز وجنس العزلة البكتيرية	الفعالية النوعية للانزيم الخارجي وحدة / ملغم	الفعالية النوعية للانزيم الداخلي وحدة / ملغم
1	*Streptomyces* S1	0.3470	0.0012
2	*Streptomyces* S2	0.2863	0.0015

0.0018	0.4175	*Streptomyces* S3	3
0.0013	0.3146	*Streptomyces* S4	4
0.0022	0.2356	*Streptomyces* S5	5
0.0016	0.4527	*Streptomyces* S6	6
0.0025	0.1882	*Streptomyces* S7	7
0.0021	0.1911	*Streptomyces* S8	8
0.0017	0.4619	*Streptomyces* S9	9
0.0019	0.5034	*Streptomyces* S10	10
0.0023	0.3851	*Streptomyces* S11	11
0.0031	0.5653	*Streptomyces* S12	12
0.0045	0.6751	*Streptomyces* S13	13
0.0029	0.5548	*Streptomyces* S14	14
0.0016	0.3569	*Streptomyces* S15	15
0.0024	0.2231	*Streptomyces* S16	16
0.0014	0.3660	*Streptomyces* S17	17
0.0030	0.4479	*Streptomyces* S18	18
0.0032	0.5042	*Streptomyces* S19	19
0.0031	0.4198	*Streptomyces* S20	20
0.0028	0.2782	*Streptomyces* S21	21
0.0036	0.4573	*Streptomyces* S22	22
0.0012	0.1657	*Streptomyces* S23	23
0.0015	0.1936	*Streptomyces* S24	24
0.0023	0.2430	*Streptomyces* S25	25
0.0033	0.4371	*Streptomyces* S26	26
0.0019	0.2914	*Streptomyces* S27	27
0.0026	0.3527	*Streptomyces* S28	28
0.0018	0.2482	*Streptomyces* S29	29
0.0029	0.4163	*Streptomyces* S30	30
0.0027	0.4701	*Streptomyces* S31	31
0.0001632	0.01587		LSD

تقاربت النتائج مع البحوث التي اجريت لانتاج انزيم MTGase من انواع مختلفة تعود لبكتريا *Streptomyces* بطريقة تخمرات المزارع السائلة ومن هذه البحوث ما اشار اليه Cui *et al.* (2007) من انتاج انزيم MTGase من بكتريا *Streptomyces hygroscopicus* والذي كانت الفعالية الانزيمية له 0.25 وحدة / ملغم ، ومع ما ذكره (Jin *et al.* (2016 ان الفعالية الانزيمية لانزيم MTGase المنتج من بكتريا *Streptomyces mobaraensis* بلغت 1.75 وحدة / ملغم، وتقاربت ايضا مع Nur'amaliyah *et al.* (2016) الذي حصل على اعلى فعالية انزيمية للانزيم المنتج من بكتريا *Streptomyces* sp. والتي كانت 0.36 وحدة / ملغم.

2-3-4 طريقة تخمرات الحالة الصلبة Solid state fermentation

استعملت طريقة تخمرات الحالة الصلبة في انتاج انزيم MTGase من العزلات البكتيرية المعزولة محليا ومن خلال نتائج التحليل الاحصائي المبينة في الجدول (4-3) لوحظ وجود فروق معنوية بين العزلات في انتاجية الانزيم عند مستوى احتمالية $P \leq 0.05$ ، كما اظهرت النتائج انخفاضا في انتاجية الانزيم ولجميع العزلات المحلية مقارنة مع النتائج المستحصل عليها باستعمال تخمرات المزارع السائلة، قد يعود السبب في ذلك الى توفر المصادر الكاربونية والنتروجينية والمغذيات بشكل اكبر واسهل للاستهلاك من قبل العزلات البكتيرية في التخمرات السائلة فضلا عن توفر الاوكسجين بكميات اكثر نتيجة استعمال الحاضنة الهزازة وبسرعة تصل الى 200 دورة / الدقيقة مما جعل البكتريا ذات انتاجية انزيمية افضل من التخمرات الصلبة ، وعلى الرغم من ان تخمرات الحالة الصلبة اكثر ملائمة لانتاج العديد من الانزيمات المنتجة من قبل الفطريات الخيطية الا ان هناك بعض المحاولات لاستعمالها في انتاج انزيم الترانسكلوتاميناز بواسطة البكتريا ومنها *Bacillus* ، *Streptomyces* (de Souza *et al*.,2008; Mahmood,2013) ، تميزت العزلة البكتيرية ذات الرمز S13 في انتاجها لانزيم Transglutaminase في كلتا الطريقتين الا ان الفعالية النوعية باستعمال نظام تخمرات الحالة السائلة كانت اعلى بكثير من المزارع الصلبة لذلك اعتمدت تقنية تخمرات الحالة السائلة في تنمية هذه البكتريا المنتجة للانزيم الخارجي لاكمال مراحل الدراسة الحالية.

جدول (4-3) كفاءة العزلات البكتيرية في انتاج انزيم MTGase اعتمادا على الفعالية النوعية (وحدة / ملغم) وباستعمال طريقة تخمرات الحالة الصلبة .

ت	رمز وجنس العزلة البكتيرية	الفعالية النوعية لانزيم MTGase وحدة/ ملغم
1	*Streptomyces* S1	0.0215
2	*Streptomyces* S2	0.0183
3	*Streptomyces* S3	0.0307
4	*Streptomyces* S4	0.0179
5	*Streptomyces* S5	0.0248
6	*Streptomyces* S6	0.0351
7	*Streptomyces* S7	0.0402
8	*Streptomyces* S8	0.0393
9	*Streptomyces* S9	0.0186
10	*Streptomyces* S10	0.0262
11	*Streptomyces* S11	0.0396

0.0443	*Streptomyces* S12	12
0.0541	*Streptomyces* S13	13
0.0437	*Streptomyces* S14	14
0.0436	*Streptomyces* S15	15
0.0218	*Streptomyces* S16	16
0.0466	*Streptomyces* S17	17
0.0441	*Streptomyces* S18	18
0.0338	*Streptomyces* S19	19
0.0248	*Streptomyces* S20	20
0.0410	*Streptomyces* S21	21
0.0421	*Streptomyces* S22	22
0.0329	*Streptomyces* S23	23
0.0174	*Streptomyces* S24	24
0.0419	*Streptomyces* S25	25
0.0314	*Streptomyces* S26	26
0.0115	*Streptomyces* S27	27
0.0261	*Streptomyces* S28	28
0.0308	*Streptomyces* S29	29
0.0427	*Streptomyces* S30	30
0.0436	*Streptomyces* S31	31
0.001638		LSD

4-4 الاختبارات الكيموحيوية Biochemical tests

اجريت الاختبارات الكيموحيوية على العزلة (S13) والتي اظهرت اعلى فعالية انزيمية ، اذ بينت النتائج الموضحة في الشكل (4-4) والجدول (4-4) ان هذه العزلة اعطت نتيجة موجبة لاختبار انتاج انزيم الكاتليز وتحلل الجيلاتين والنشا واستهلاك السترات، و اعطت نتيجة سالبة لاختبار تحلل الكازين والاوكسديز واختزال النترات واليوريا ، كما انها غير متحركة وليس لها القدرة على النمو في الظروف اللاهوائية ، كما استطاعت النمو في درجات حرارية (26 ، 28 ، 30 ، 35 ، 40 ، 45) م الا انها لم تنمو عند درجات الحرارة (4 ، 10 ، 50 ، 55) م ،في حين تمكنت من النمو عند ارقام هيدروجينية مختلفة (4 ، 6 ، 8 ، 10 ، 12) وايضا النمو في تراكيز ملحية 5% ، 7% ، 10 % ، ومن خلال هذه الاختبارات التي تؤكد بان العزلة المحلية تعود الى البكتريا الخيطية جنس *Streptomyces* وجاءت هذه النتائج مشابهة لماذكره الباحث Tatar *et al.*,2014)) ، كما اتفقت ايضا مع بعض الاختبارات ونتائجها للعديد من الدراسات حول هذه

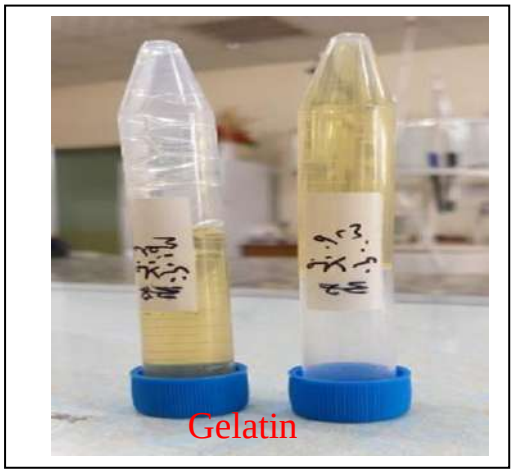
البكتريا (Islam *et al*.,2014 ;Thirumurugan *et al*.,2018 ; Nabila and Kannabiran,2018; Zhao *et al*.,2019) .

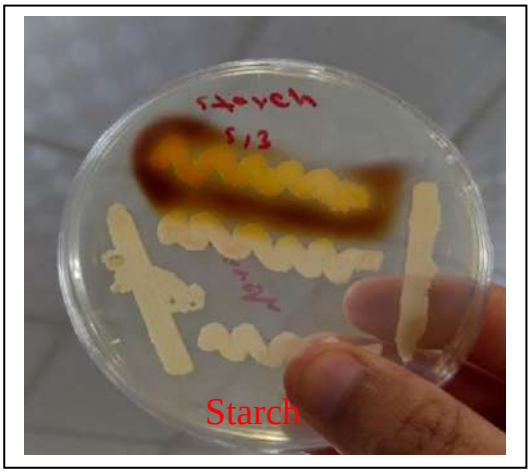
جدول (4-4) الاختبارات الكيموحيوية للعزلة البكتيرية (S13) المنتجة لانزيم MTGase .

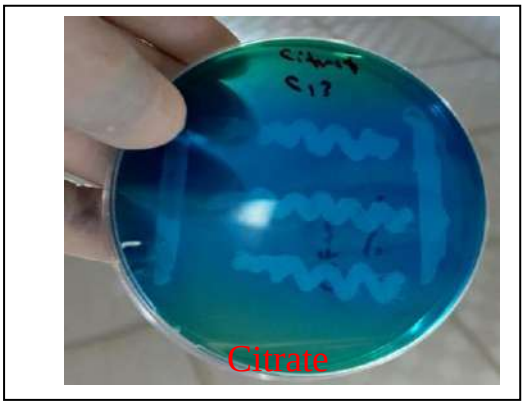
الاختبار	*Streptomyces* S13
تحلل الكازين	-
انتاج الكاتليز	+
انتاج الجيلاتينيز	+
تحلل النشأ	+
انتاج الاوكسديز	-
استهلاك السترات	+
اختزال النترات	-
تحلل اليوريا	-
الحركة	-
النمو بظروف لاهوائية	–
النمو بدرجات حرارية 26م°	+
28	+
30	+
35	+
40	+
45	+
4	–
10	–
50	–
55	–
النمو بارقام هيدروجينية 4	+
6	+
8	+
10	+

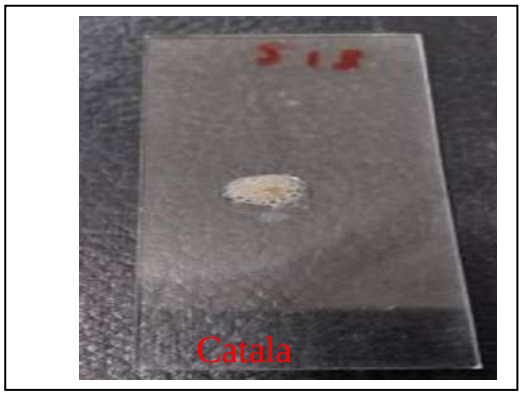
12	+
النمو بتراكيز ملحية 5%	+
7%	+
10%	+

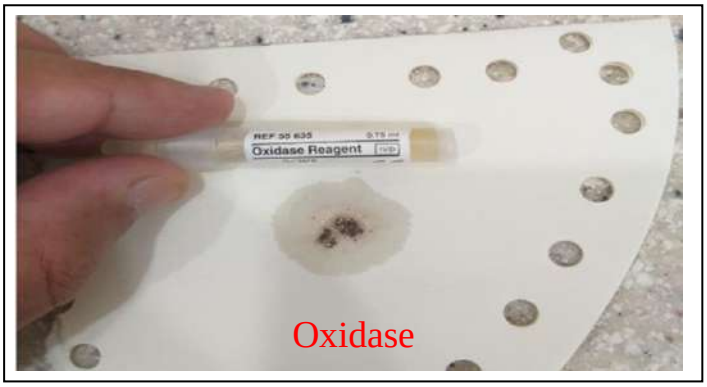
+ : نتيجة موجبة للاختبار ، ــ : نتيجة سالبة للاختبار









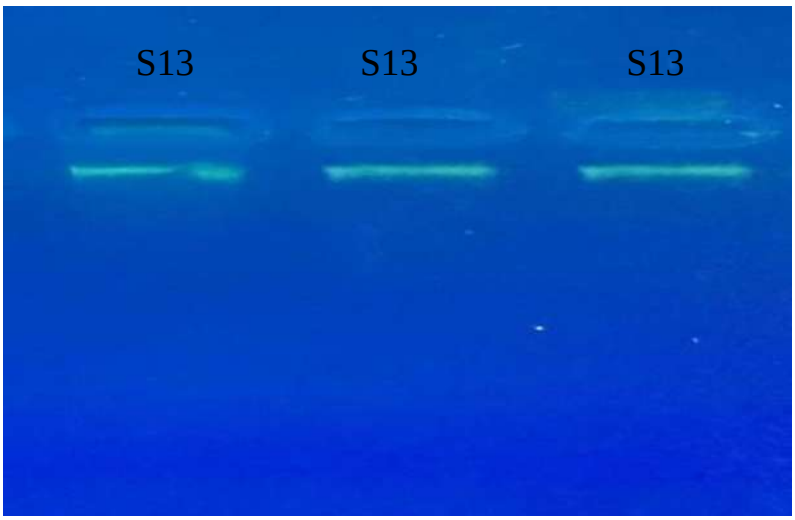


شكل (4-4) بعض الاختبارات الكيموحيوية التشخيصية للعزلة البكتيرية الأكفأ في انتاج انزيم MTGase

5-4 تشخيص العزلة البكتيرية باستعمال اختبار 16S rRNA

1-5-4 استخلاص الحامض النووي DNA

استخلص الحامض النووي DNA من العزلة البكتيرية المعزولة محليا S13 بثلاث مكررات ، وتم التاكد من نقاوة الاستخلاص عن طريق نتائج الترحيل الكهربائي Electrophoresis باستعمال هلام الاكاروز، اذ اظهر الشكل (4-5) ثلاث حزم واضحة للحامض النووي DNA للعزلة البكتيرية *Streptomyces* S13 .

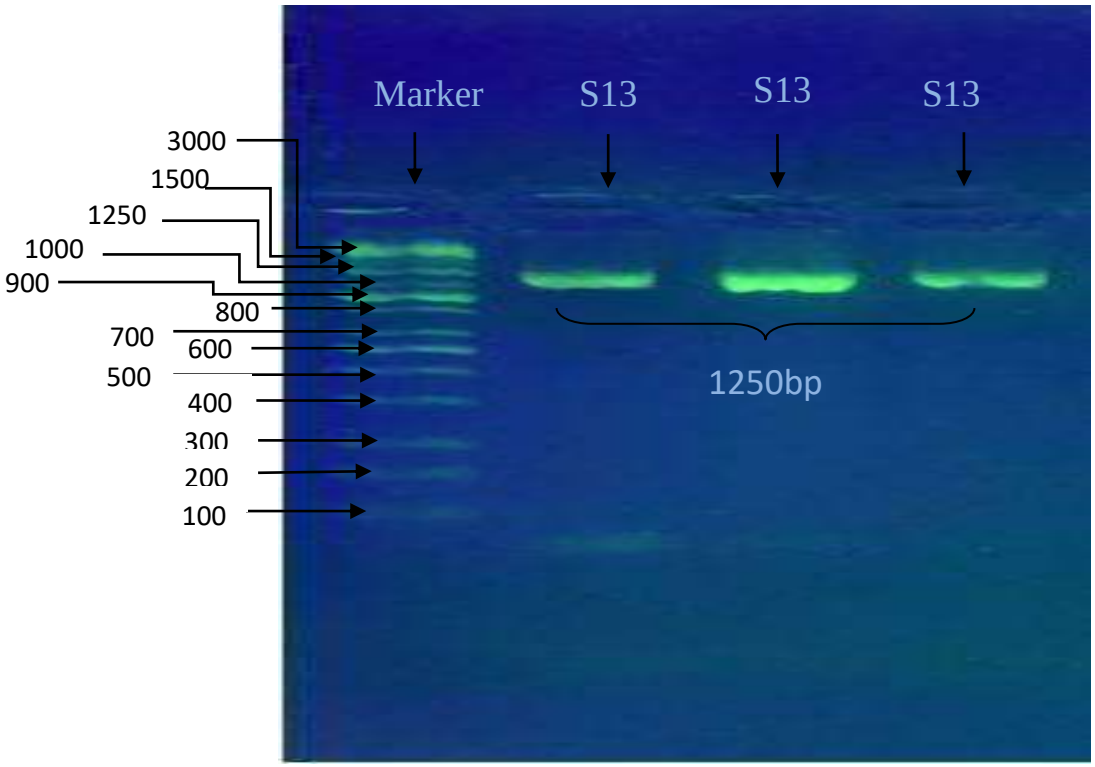


شكل (4-5) الترحيل الكهربائي للحامض النووي DNA المستخلص من العزلة المحلية *Streptomyces* S13 الاكثر انتاجا للانزيم.

2-5-4 تضخيم الحامض النووي DNA بواسطة تفاعل سلسة البوليمريز (PCR) Polymerase Chain Reaction

استعملت تقنية تفاعل سلسلة البوليمريز PCR باستعمال اختبار 16S rRNA اذ تم اجراء التضخيم من خلال البوادىء الخاصة بالجين والمبينة في الفقرة (3-3-8-3) ، اذ لوحظ من خلال الشكل (4-6) ان نتائج الترحيل للجين المضخم للعزلة البكتيرية *Streptomyces* S13 بثلاث مكررات (S13) ظهور حزم خضراء واضحة بحجم 1250 زوج قاعدي ، وهذا يدل على ان البوادىء ارتبطت بالجين المستهدف 16S rRNA دون بقية الاجزاء الاخرى من الحامض النووي DNA المستخلص من العزلة البكتيرية المعزولة محليا ، كما ان الدراسة توافقت مع اغلب الابحاث التي اكدت على امكانية استخدام اختبار 16S rRNA في دراسة تتابع القواعد النتروجينية للحامض النووي منقوص الاوكسجين لتشخيص بكتريا *Streptomyces* sp. للعزلات المحلية

(Bouras *et al*.,2013 ; Tatar *et al*.,2014; Ramirez- Rodriguez *et al*.,2018 ; Kusuma *et al*.,2020) .

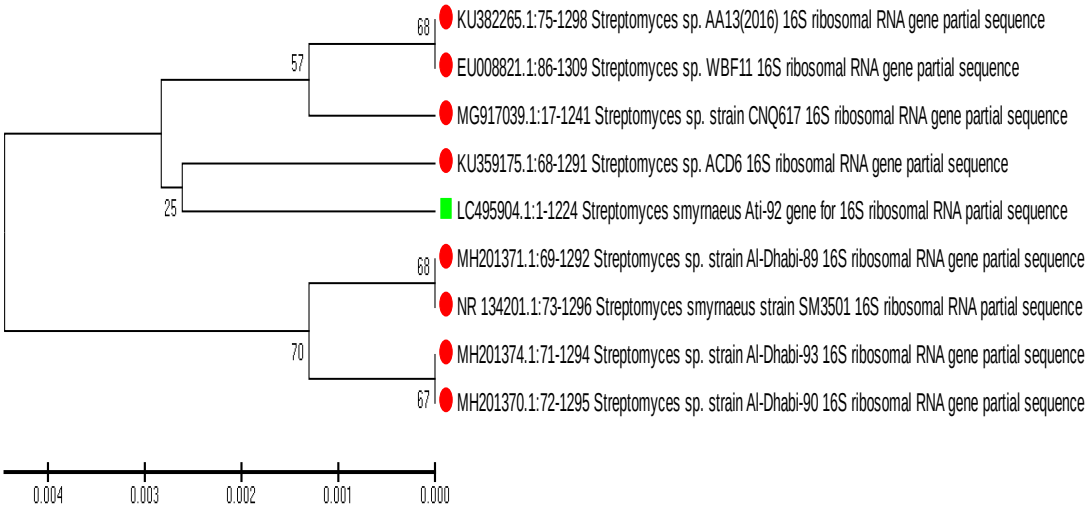


شكل (4-6) الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR على هلام الاكاروز 1.5% .

3-5-4 تحليل تتابع نواتج التضخيم

ارسلت نواتج الجين المضخم مع البوادىء الى شركة Macrogen الكورية ليتم تحديد تتابعات القواعد النتروجينية للعزلة البكتيرية قيد الدراسة ، واعتمدت تلك التتابعات مع ما متوفر من معلومات حول هذا الجين في بنك الجينات التابع الى موقع NCBI وحسب برنامج BLAST Nucleotide للتعرف على نوع العزلة المنتخبة ، اذ اظهرت النتائج بعد تحليلها في برنامج BLAST ان نسبة التطابق كانت 99.51 % بين العزلة المعزولة محليا والسلالة *Streptomyces smyrnaeus* strain SM3501(NR_ 134201.1) المسجلة في بنك الجينات ، لذلك عدت العزلة المحلية عائدة لهذه البكتريا ، رسمت الشجرة الوراثية باستعمال برنامج MEAG 7 لمعرفة العلاقة الوراثية بين العزلات اعتمادا على تتابعات جين 16S rRNA ، وكما مبين بالشكل

(7-4) ، كما سجلت العزلة المعزولة محليا في بنك الجينات NCBI بالاسم : *Streptomyces smyrnaeus* Ati- 92 LC495904 .

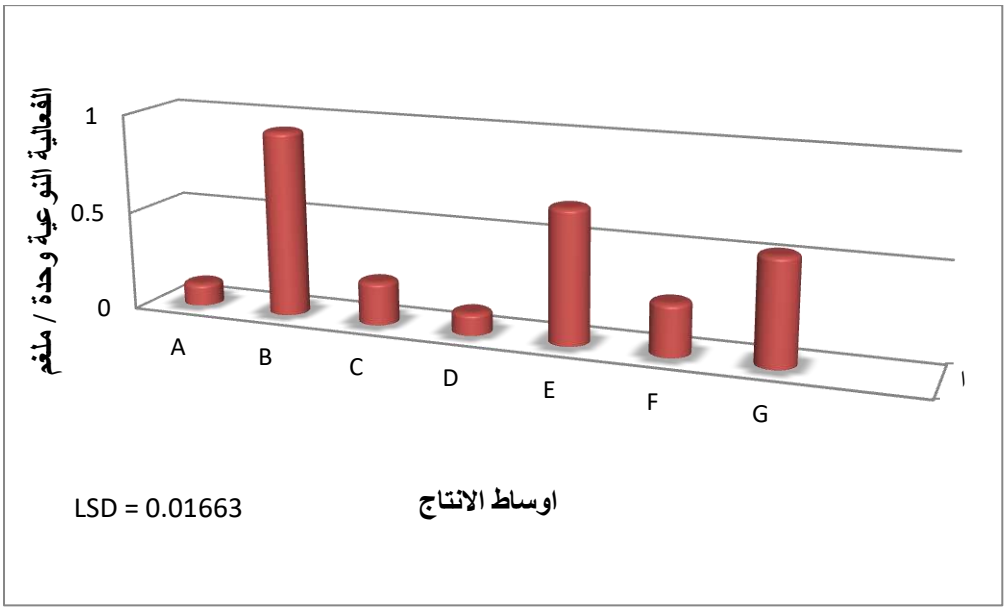


شكل (4-7) الشجرة الوراثية للعزلة البكتيرية المعزوله محليا وعلاقتها مع السلالات من البكتريا نفسها في بنك الجينات NCBI .

6-4 دراسة الظروف المثلى لانتاج انزيم MTGase من العزلة المحلية لبكتريا *Streptomyces smyrnaeus*-Ati 92

1-6-4 الوسط الامثل لانتاج الانزيم من العزلة المحلية *Streptomyces smyrnaeus*-Ati 92

استعملت سبعة اوساط زرعية لتحديد افضل وسط للانتاج ، اظهرت نتائج التحليل الاحصائي وجود فروق معنوية بين الاوساط الزرعية المستعملة عند مستوى معنوي $P \leq 0.05$ ، اذ لوحظ ان افضل وسط انتاجي هو B الذي اعطى اعلى فعالية نوعية والتي كانت 0.9374 وحدة / ملغم، في حين بلغت الفعالية النوعية (0.1147 ، 0.2180 ، 0.1119 ، 0.6751 ، 0.2631 ، 0.5362) وحدة / ملغم لكل من (A ، C ، D ، E ، F ، G) على التوالي ، وكما مبين في الشكل (4-8).



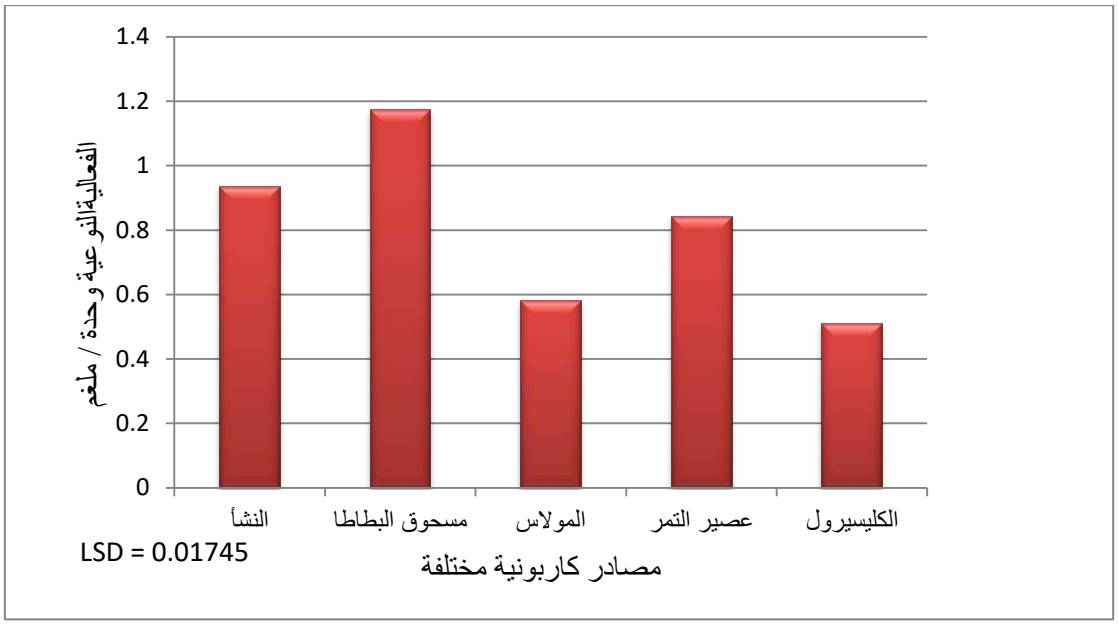
شكل (4-8) الفعالية النوعية لانزيم MTGase المنتج من العزلة المحلية لبكتريا *Streptomyces smyrnaeus*-Ati92 باستعمال اوساط انتاجية مختلفة ، تمثل A ،B ،C ، D Bahrim : E ، Jin : F ، Zhang : G ، Cui .

قد يعود سبب الاختلاف في انتاجية انزيم الترانسكلوتامينيز بين الاوساط الزرعية الى نوع وكمية المصدر الكربوني والنتروجيني فضلا عن مدة الحضن المستعملة ، كما ان وجود النشأ في الوسط الانتاجي كمصدر كربوني اعطى فائدة اضافية وهي حماية الانزيم من بعض العوامل المثبطة اما بالنسبة لفول الصويا والببتون كمصادر نتروجينية كان لها دور كبير في التخليق الحيوي للانزيم والبروتينات الاخرى الضرورية (Bourneow *et al.*,2012) ، اتفقت هذه النتائج مع ما وجده Bahrim *et al*. (2010) الذي استعمل الاوساط الانتاجية (A،B،C،D) بنفس المكونات وكانت اعلى انتاجية من الوسط B ، وكذلك اتفقت مع Fawzya *et al*. (2016) الذي استعمل ستة اوساط انتاجية ووجد ان افضل وسط انتاج هو Bahrim-B الذي اعطى اعلى فعالية انزيمية 1.45 وحدة / مل لانزيم MTGase المنتج من بكتريا *Streptomyces* sp. .

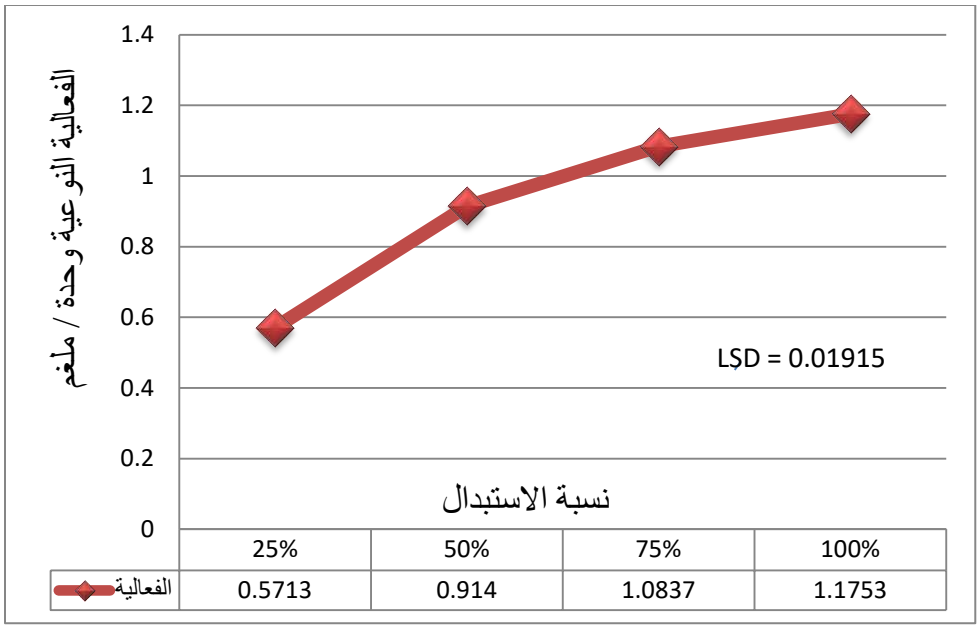
2-6-4 المصدر الكاربوني الامثل

يبين شكل (4-9) تاثير المصادر الكاربونية المختلفة على انتاجية انزيم MTGase المنتج من بكتريا *Streptomyces smyrnaeus*-Ati92 المعزولة محليا ، ومن خلال نتائج التحليل الاحصائي وجد هنالك فروق معنوية بين المصادر الكربونية عند مستوى معنوي $P \leq 0.05$ اختبرت بعض المصادر الطبيعية او المخلفات الصناعية كبدائل محلية في تحضير وسط الانتاج الانزيمي وذلك لما تمتلكه هذه المصادر من مغذيات فضلا عن خفض كلفة الانتاج اذ تفوقت انتاجية

الانزيم (1.1753 وحدة / ملغم) عند استعمال مسحوق البطاطا كمصدر كربوني بديل وبنسبة 100% في وسط الانتاج في حين كانت الفعالية النوعية 0.9374 ، 0.5831 ، 0.8425 ، 0.5102) وحدة / ملغم لكل من النشأ والمولاس وعصير التمر والكليسيرول على التوالي ،كما بينت نتائج التحليل الاحصائي في شكل (4-10) وجود فروق معنوية في نسب الاستبدال لمسحوق البطاطا عند مستوى معنوي 0.05 ،كما لوحظ ايضا تفوق مسحوق البطاطا في انتاجية الانزيم عند نسبة استبدال 100% بفعالية نوعية 1.1753 وحدة / ملغم مقارنة مع نسب الاستبدال 75 % ، 50 % ، 25% التي بلغت عندها الفعالية (1.0837، 0.9140 ، 0.5713) وحدة / ملغم على التوالي ، وقد يعود سبب تفوق مسحوق البطاطا الى احتوائه على مغذيات اكثر من النشأ المختبري والتي ادت الى زيادة الانتاجية الانزيمية ، اتفقت النتائج مع كل من Guerra-Rodríguez and Vázquez (2014) اللذان استعملا مسحوق البطاطا كمصدر كاربوني في وسط انتاج انزيم MTGase من بكتريا *Streptomyces mobaraensis* والذي اعطى فعالية مقدارها 3.2 وحدة / مل ، وتقاربت النتائج مع كل من Bahrim *et al*. (2010) الذي استعمل اربع اوساط انتاجية تحتوي على مصادر كربونية مختلفة شملت الكلوكوز ، النشأ والكليسيرول لانتاج انزيم MTGase من بكتريا *Streptomyces* sp. وكان افضلها النشأ بفعالية انزيمية 0.8 وحدة / مل ، وايضا مع Mahmood (2013) عند دراسته لتأثير خمس مصادر كربونية (النشأ ، الكليسيرول ، المولاس ، السكروز والكلوكوز) كان النشأ الأعلى في انتاجية الانزيم من بين هذه المصادر بفعالية نوعية وصلت الى 1.85 وحدة / ملغم، وايضا مع Sorde and Ananthanarayan (2019) الذي بين استعمال النشأ كمصدر كاربوني لانتاج انزيم MTGase من بكتريا *Bacillus nakamurai* واعطى انتاجية انزيمية مقدارها 3.33 وحدة / مل . في حين وجد De- Souza *et al*. (2006) عند استعمال مصادر كاربونية مختلفة (النشأ ، السكروز ، اللاكتوز ، الفركتوز و الكليسيرول) لانتاج انزيم MTGase من بكتريا *Bcillus circulans* BL32 ان اعلى انتاجية كانت باستعمال الكليسيرول بفعالية انزيمية 0.20 وحدة / مل ، اما النشأ فكان بالمرتبة الثالثة بفعالية انزيمية 0.162 وحدة / مل .



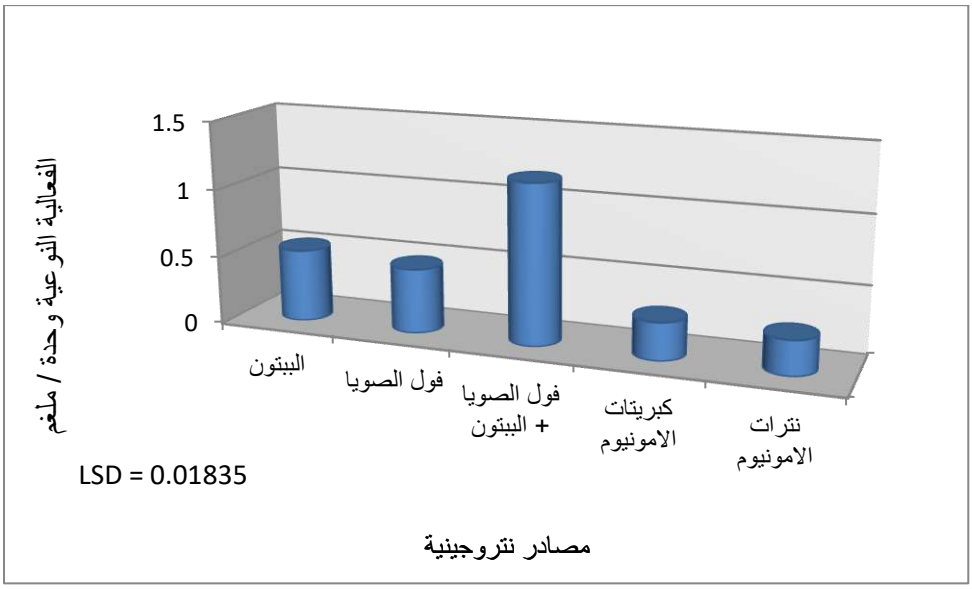
شكل (4-9) تأثير المصادر الكاربونية المختلفة على انتاجية انزيم MTGase من بكتريا *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92 المعزولة محليا.



شكل (4-10) نسب الاستبدال بمسحوق البطاطا وتأثيره على فعالية انزيم MTGase المنتج من بكتريا *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92 المعزولة محليا.

3-6-4 المصدر النتروجيني الامثل

يبين الشكل (4-11) تاثير المصادرالنتروجينية في انتاجية انزيم MTGase من العزلة المحلية لبكتريا *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92، ومن خلال نتائج التحليل الاحصائي لوحظ وجود فروق معنوية بين المصادر النتروجينية العضوية عند مستوى معنوي $P\leq 0.05$ في حين لم تكن هناك اي فروق معنوية بين المصادر النتروجينية الغير عضوية ، اذ لوحظ ان المصدر النتروجيني العضوي المتكون من مزج فول الصويا مع الببتون اعطى اعلى انتاجية انزيمية بفعالية نوعية 1.1753 وحدة / ملغم، اما الفعالية النوعية لنفس المصادر النتروجينية الببتون وفول الصويا كلا على حده كانت (0.5314 ، 0.4762) وحدة / ملغم على التوالي ، بينما كانت انتاجية الانزيم من المصادر النتروجينية غير العضوية كبريتات الامونيوم و نترات الامونيوم (0.2793 و 0.2568) وحدة / ملغم على التوالي ، ان المصادر النتروجينية العضوية اعطت اعلى فعالية نوعية من المصادر الغير عضوية وهذا قد يعود الى الاحماض الامينية والببتيدات التي توفرها (فول الصويا مع الببتون) والتي تساعد على نمو البكتريا وزيادة الانتاج الانزيمي مقارنة مع المصادر الغير عضوية ، في حين ان المصادر اللاعضوية لها تأثيرات متباينة في وسط الانتاج مع زيادة مدة الحضن نتيجة تحرر بعض المجاميع منها وانتشارها في وسط التخمر كمجاميع النترات والكبريتات والتي تؤثر على الرقم الهيدروجيني للوسط وبالتالي على نمو البكتريا وانتاجها للانزيم (Medina *et al.*,2020)، اتفقت النتائج مع Cui *et al*. (2007) الذي اشار الى ان المصدر النتروجيني الذي يتكون من الببتون وفول الصويا اعطى فعالية نوعية 0.25 وحدة / ملغم لانزيم MTGase المنتج من بكتريا *Streptomyces hygroscopicus* ، كما وجد Ceresino *et al*. (2018) ان استعمال فول الصويا كمصدر نتتروجيني وبنسبة 2.5% من وسط انتاج انزيم MTGaseمن بكتريا *Streptomyces* sp. CBMAI 1617 اعطى اعلى فعالية انزيمية بلغت 6.074 وحدة / مل.

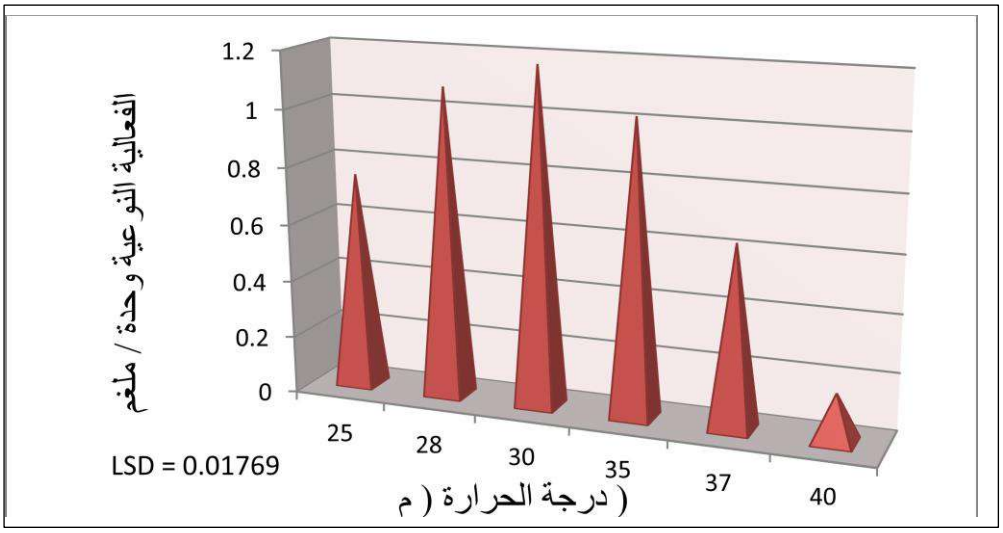


شكل (4-11) تأثير المصادر النتروجينية على انتاجية انزيم MTGase المنتج من بكتريا *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92 المعزولة محليا.

4-6-4 درجة الحرارة المثلى

درس تاثير درجات حرارة مختلفة (25 ، 28 ، 30 ، 35 ، 37 ، 40) م° على انتاجية انزيم MTGase من العزلة المحلية لبكتريا *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92 ، ومن خلال نتائج التحليل الاحصائي وجد هنالك فروقات معنوية بين درجات الحرارة المختلفة في انتاجية الانزيم عند مستوى معنوي $P \leq 0.05$ ، اذ لوحظ ان افضل درجة حرارة كانت 30 م° والتي بلغت عندها الفعالية الانزيمية 1.1753 وحدة / ملغم في حين كانت الفعالية الانزيمية (0.7581 ، 1.0824 ، 1.0251 ، 0.6352 ، 0.167) وحدة / ملغم عند درجة حرارة (25 ، 28 ، 35 ، 37 ، 40) م ° على التوالي وكما مبين في شكل (4-12) ، قد يكون لدرجة الحرارة 30 م تاثير ايجابي اكثر من الدرجات الحرارية الاخرى في ذائبية الاوكسجين والطاقة الحركية للجزيئات وزيادة النواتج الايضية وبالتالي زيادة الانتاجية الانزيمية ، اذ تؤثر درجة الحرارة في تحديد نشاط الاحياء المجهرية المختلفة كالنمو والفعاليات الحيوية الاخرى وبذلك تعد احدى العوامل المهمة للسيطرة على فعاليات الهدم والبناء الحيوي ولاسيما في الصناعات التخمرية (Anderson and Smith, 1976) اتفقت النتائج مع Ando *et al*. (1989) الذي بين ان الفعالية الانزيمية لانزيم MTGase المنتج من بكتريا *Streptoverticillium* كانت 0.13 وحدة / ملغم بدرجة حرارة 30 م ، ومع Zhang *et al*. (2012) الذي ذكر ان الفعالية الانزيمية لانزيم MTGase المنتج من بكتريا *Streptomyces mobaraensis* DSM 40587 كانت 2.93 وحدة / ملغم عند درجة حرارة 30 م ° ، كما اشار ايضا Jin *et al*. (2016) الى ان درجة الحرارة 30 م اعطت فعالية انزيمية 1.75 وحدة / ملغم لانزيم MTGase المنتج من بكتريا *Streptomyces*

mobaraensis ، في حين لاحظ كل من Sorde and Ananthanarayan (2019) ان انزيم MTGase المنتج من بكتريا *Bacillus nakamurai* بلغت فعاليته 3.46 وحدة / مل عند درجة حرارة 37 م .

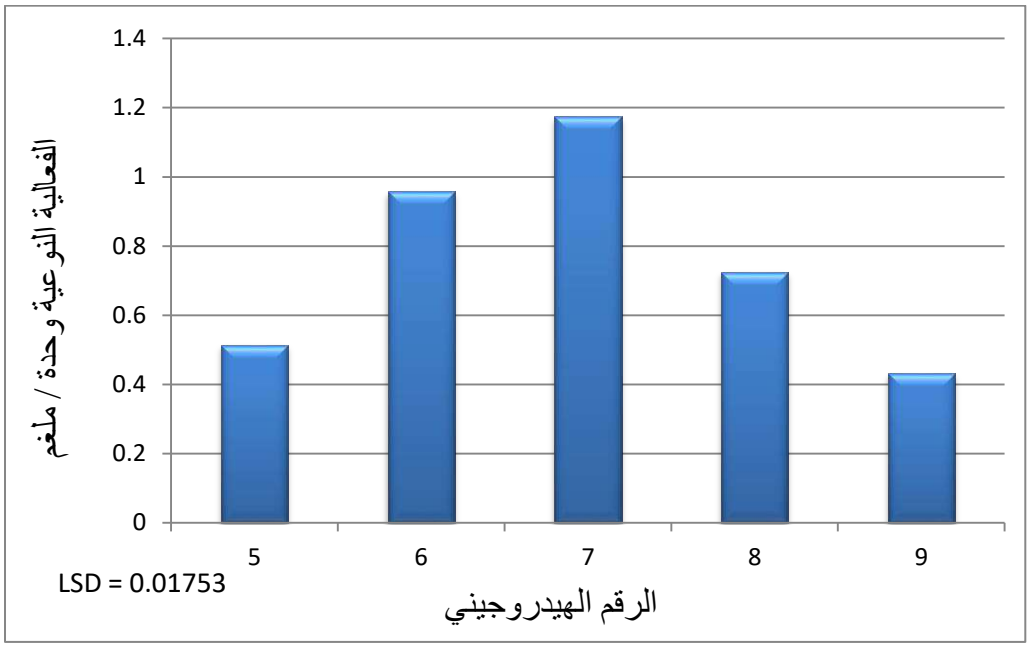


شكل (4-12) تأثير درجة حرارة الحضن على انتاجية انزيم MTGase من بكتريا *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92 المعزولة محليا.

4-6-5 الرقم الهيدروجيني الامثل

يبين شكل (4-13) تاثير الرقم الهيدروجيني لوسط الانتاج على انتاجية انزيم MTGase من بكتريا *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92 ، ومن خلال نتائج التحليل الاحصائي وجد هناك فروق معنوية بين الارقام الهيدروجينية المختلفة في انتاجية الانزيم عند مستوى احتمالية $P \leq 0.05$ ،اذ يلاحظ ان انتاجية الانزيم ازدادت مع زيادة الدالة الحامضية الابتدائية للوسط حتى بلغت اقصاها عند 7 بفعالية نوعية 1.175 وحدة / ملغم ، لتعود بعدها للانخفاض مرة اخرى في الارقام الهيدروجينية القاعدية لتصل الفعالية النوعية 0.431 وحدة / ملغم عند الرقم الهيدروجيني 9 ، ان اهمية الرقم الهيدروجيني الابتدائي لوسط انتاج الانزيم تعود الى تاثيره في صفات الوسط مثل ذائبية مكونات الوسط الغذائي والتحكم بنسب التوافر الحيوي لهذه المكونات فضلا عن تاثيره في تاين وثبات المركبات الحيوية الناتجة اثناء عملية التخمر (Grothe *et al.*,1999) ، وهذه النتائج تتطابق مع ما وجده Zhang *et al.* (2012) اذ لاحظ ان فعالية انزيم MTGase المنتج من بكتريا *Streptomyces mobaraensis* كانت 2.93 وحدة / ملغم عند الرقم الهيدروجيني 7 ، ايضا مع ما اشار اليه Bahrim *et al.* (2010) الى ان انزيم MTGase المنتج من بكتريا *Strepomyces* sp. بلغت فعاليته الانزيمية 0.8 وحدة / مل عند الرقم الهيدروجيني 7 ، بينما

كانت مقاربة لنتائج Nur'amaliyah *et al.* (2016) للانزيم المنتج من بكتريا *Streptomyces* sp. TTA 02 والذي كان ذو فعاليه 0.36 وحدة / ملغم عند الرقم الهيدروجيني 6 .

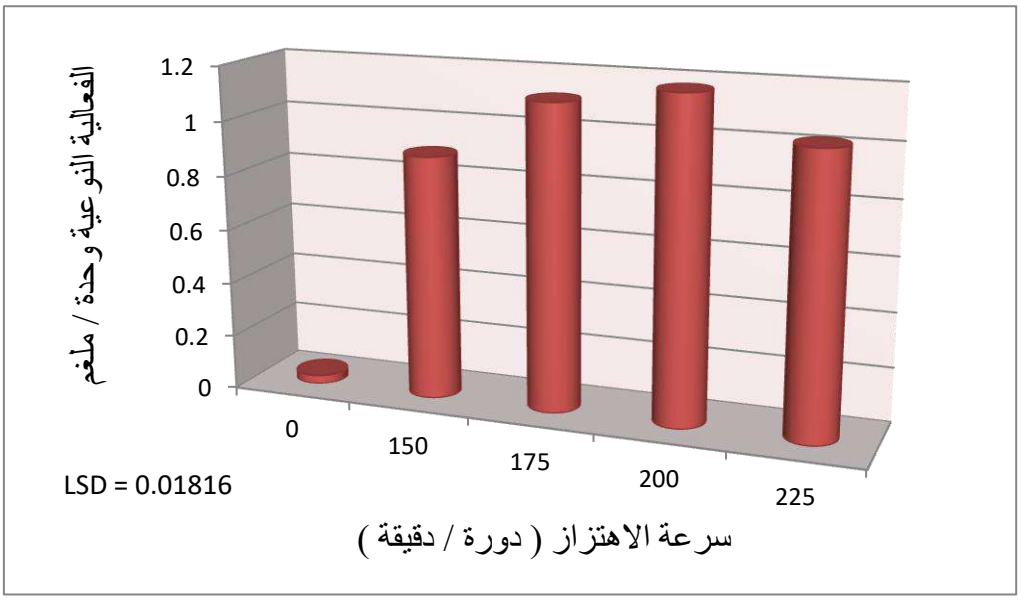


شكل (4-13) تأثير الرقم الهيدروجيني لوسط الانتاج على انتاجية انزيم MTGase من بكتريا *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92 المعزولة محليا.

4-6-6 سرعة الاهتزاز المثلى

وجد من خلال نتائج التحليل الاحصائي للنتائج المبينة في شكل (4-14) فروق معنوية عند مستوى احتمالية $P \leq 0.05$ بين سرع الاهتزاز في انتاج انزيم MTGase المنتج من بكتريا *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92 المعزولة محليا ، اذ لوحظ ان اعلى انتاجية لانزيم MTGase كانت 1.1753 وحدة / ملغم عند سرعة دوران 200 دورة / دقيقة ، اما سرعة الدوران 150 ، 175 ، 225 فقد بلغت عندها الفعالية الانزيمية (0.8947 ، 1.1161 ، 1.0214) وحدة / ملغم على التوالي ، في حين كانت الفعالية الانزيمية تحت الظروف الساكنة 0.031 وحدة / ملغم ، ان سرعة الاهتزاز لها دور في منع تكتل الخلايا وتساعد في زيادة ذوبانية الاوكسجين والعناصر الغذائية في وسط الانتاج فضلا عن مزج مكوناته كما ان الاوكسجين يمتلك تاثيرات مختلفة على تكوين الانزيم خلال التخمرات الهوائية وذلك من خلال تاثيره في المسارات الايضية للاحياء المجهرية المنتجة للانزيم (Potumarthi *et al.*,2007) ، اتفقت النتائج مع Bahrim *et al.* (2010) الذي اشار الى ان الفعالية الانزيمية لانزيم MTGase المنتج من بكتريا *Streptomyces* sp. بلغت 0.8 وحدة / مل عند سرعة دوران 200 دورة / دقيقة ، وايضا مع ما وجده Jin *et al.* (2016) بان افضل سرعة اهتزاز للحاضنة لانتاج انزيم MTGase من

بكتريا *Streptomyces mobaraensis* كانت 200 دورة / دقيقة ، في حين اختلفت مع نتائج كل من Nur'amaliyah *et al*. (2016) والتي بينت بان الفعالية الانزيمية لانزيم MTGase المنتج من بكتريا *Streptomyces* sp.TTA02 كانت 0.36 وحدة / ملغم عند سرعة اهتزاز 125 دورة / دقيقة ، وايضا مع Ando *et al*. (1989) الذي لاحظ بان افضل سرعة اهتزاز لانزيم MTGase المنتج من بكتريا *Streptoverticillium* كانت 250 دورة / دقيقة .

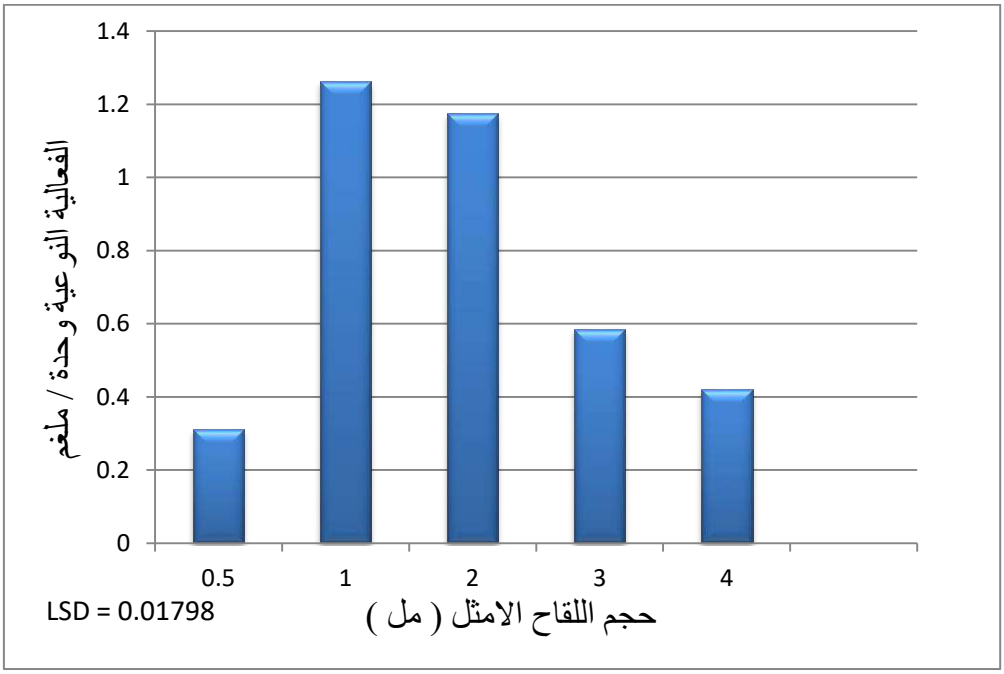


شكل (4-14) تأثير سرعة اهتزاز الحاضنة على انتاجية انزيم MTGase من بكتريا *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92 المعزولة محليا.

4-6-7 حجم اللقاح الامثل

لوحظ من خلال نتائج التحليل الاحصائي للنتائج المبينة في شكل (4-15) وجود فروق معنوية بين حجوم اللقاح المختلفة في انتاجية الانزيم عند مستوى معنوي $P \leq 0.05$ ، كما ان افضل حجم لقاح بكتيري لانتاج انزيم MTGase هو1مل ($10^7 \times 1$ و.ت.م / مل) / 50 مل من الوسط، اذ بلغت عنده اعلى فعالية انزيمية مقدارها 1.2631 وحدة / ملغم ، في حين كانت الفعالية (0.3103 ، 0.5853 ، 0.4192 ، 1.1753) وحدة / ملغم عند استعمال حجم لقاح (0.5 ،2 ، 3 ، 4) مل على التوالي ، اذ ان الزيادة في حجم اللقاح ينتج عنها تنافس الاحياء المجهرية على مكونات الوسط والمغذيات وبالتالي نفاذها في وقت مبكر وكذلك استهلاك الاوكسجين نتيجة النمو وتكتل الخلايا وبالتالي انخفاض انتاجية الانزيم بينما قلة حجم اللقاح يحتاج الى وقت اكثر لاتمام التخمر وبالتالي فان عدد الكائنات الحية يكون غير كافي لانتاج الانزيم المطلوب (Haq *et al*.,2010)، اتفقت النتائج مع ما وجده (Macedo *et al*. (2007 بان افضل حجم لقاح محضر من بكتريا

Streptomyces sp. هو 1 مل / 50 مل من وسط الانتاج الانزيمي والذي اعطى انتاجية انزيمية 1.1 وحدة / ملغم، بينما لاحظ Bahrim *et al.* (2010) ان افضل حجم لقاح محضر من بكتريا *Streptomyces* sp. كان 2 مل / 50 مل وسط الانتاج وبفعالية انزيمية 0.8 وحدة / مل ، كما اختلفت النتائج ايضا مع Jin *et al.* (2016) الذي وجد ان افضل حجم لقاح من بكتريا *Streptomyces mobaraensis* هو 5 مل / 50 مل وسط الانتاج الانزيمي ، ان هذا التباين او الاختلاف قد يعود الى تفاوت العزلات في معدل نموها فضلا عن اختلاف المدة الزمنية لاطوار النمو لكل نوع من انواع البكتريا.

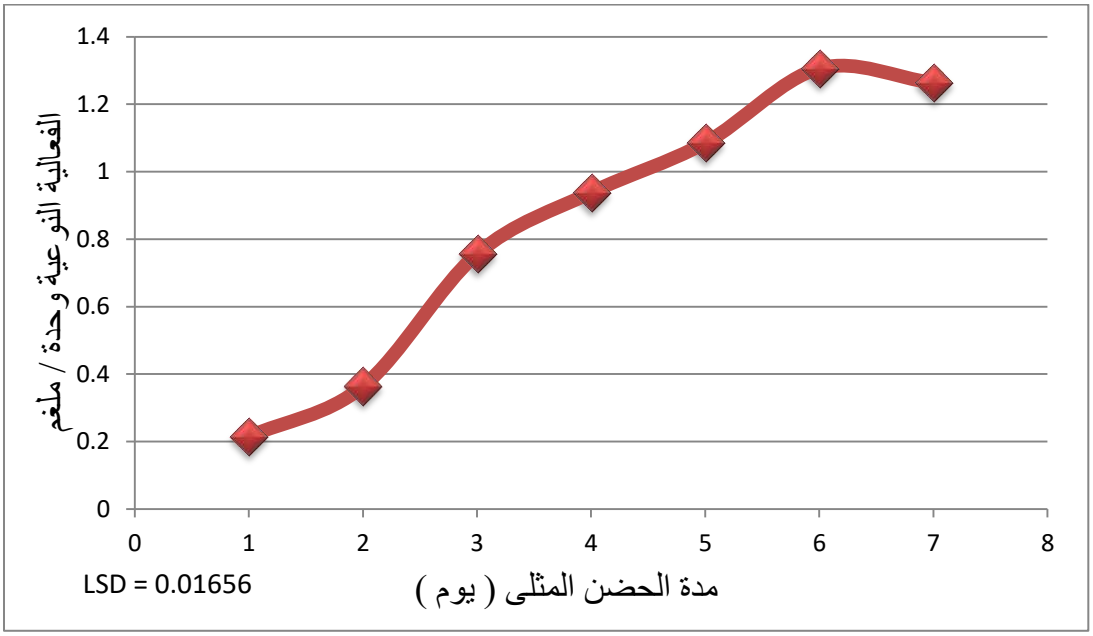


شكل (4-15) تأثير حجم اللقاح البكتيري على انتاجية انزيم MTGase من بكتريا *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92 المعزولة محليا.

8-6-4 مدة الحضن المثلى

لوحظ وجود فروق معنوية بين مدد الحضن المختلفة على انتاجية الانزيم عند مستوى معنوي P $\leq$ 0.05 وكما مبين في شكل (4 – 16) ، اذ أظهرت النتائج ان افضل مدة حضن لوسط الانتاج الانزيمي كانت في اليوم السادس من الحضن والذي بلغت فيه الفعالية الانزيمية 1.3061 وحدة /ملغم لانزيم MTGase المنتج من بكتريا *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92 المعزولة محليا ، كما لوحظ ان الفعالية الانزيمية منذ اليوم الاول وحتى اليوم الخامس اخذت بالارتفاع التدريجي وكانت (0.2146 ، 0.3637 ، 0.7562 ، 0.9382 ، 1.0853) وحدة / ملغم على التوالي ، اما في اليوم السابع فان الفعالية اخذت بالانخفاض قليلا وبلغت 1.2631 وحدة / ملغم، وقد يعود سبب انخفاض الفعالية الانزيمية بعد اليوم السادس من الحضن الى بداية نفاذ المغذيات من

الوسط فضلا عن زيادة نواتج الايض الثانوية للخلايا والتي تؤدي الى تثبيط نموها او موتها وهذا يؤثر سلبا على انتاج الانزيم او يكون هناك افراز لانزيمات اخرى من قبل البكتريا في وسط الانتاج مثل انزيمات البروتيزات التي تسبب تحلل لانزيم Transglutaminase (Mahmood, 2013) ، اتفقت النتائج مع Turker *et al.*, (2016) الذي اشار الى ان اعلى فعالية لانزيم MTGase المنتج من بكتريا *Streptomyces mobaraensis* كانت في اليوم السادس من الحضن والتي بلغت 0.024 وحدة / مل ، وايضا اتفقت مع Zilda *et al.* (2017) الذي وجد ان الانزيم المنتج من بكتريا *Streptomyces thioluteus* TTA اعطى اعلى فعالية انزيمية 0.055 وحدة / مل في اليوم السادس من الحضن ، وتقاربت النتائج مع Bahrim *et al.* (2010) الذي وجد ان مدة الحضن سبعة ايام اعطت فعالية انزيمية 0.8 وحدة / مل لانزيم MTGase المنتج من بكتريا *Streptomyces* sp. ، الا انها اختلفت مع كل من Ando *et al.* (1989) الذي بين ان مدة الحضن ثلاثة ايام قد اعطت فعالية انزيمية 0.13 وحدة / ملغم لانزيم MTGase المنتج من بكتريا *Streptoverticillium* ، وايضا مع Fawzya *et al.* (2016) الذي وجد ان الفعالية الانزيمية لانزيم MTGase المنتج من بكتريا *Streptomyces* sp. كانت 1.45 وحدة / مل بمدة حضن أربعة ايام ، وايضا لم تتفق مع Cui *et al.* (2007) الذي اشار الى ان الفعالية الانزيمية لانزيم MTGase المنتج من بكتريا *Streptomyces hygroscopic* بلغت 0.25 وحدة / ملغم بمدة حضن 42 ساعة .

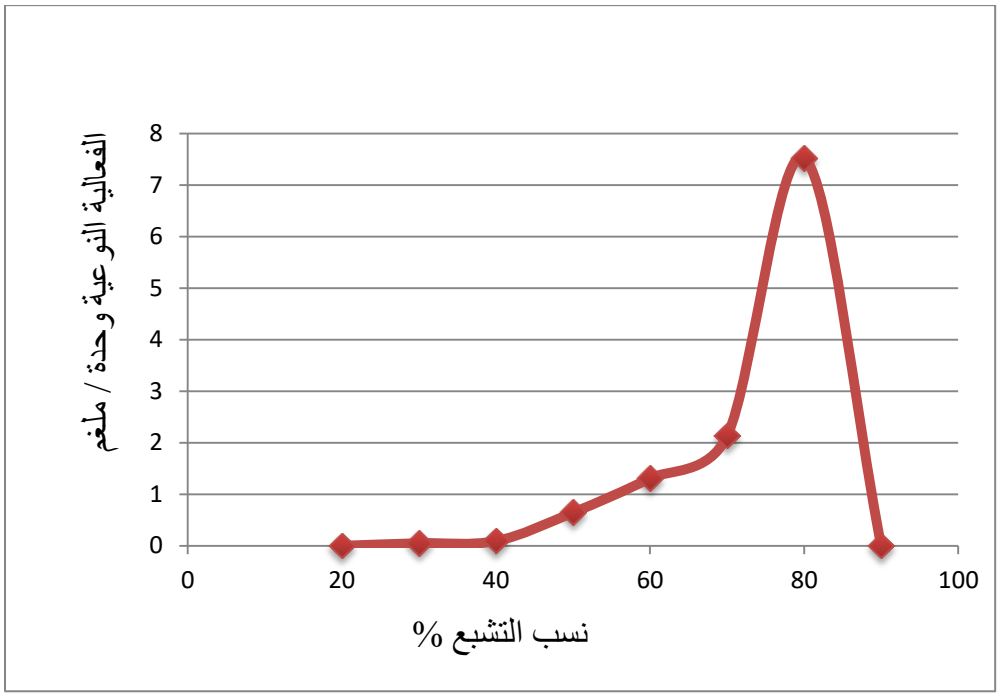


شكل (4-16) تأثير مدة الحضن على انتاجية انزيم MTGase المنتج من بكتريا *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92 المعزولة محليا.

7-4 تنقية انزيم MTGase

1-7-4 الترسيب بكبريتات الامونيوم

استعملت كبريتات الامونيوم في ترسيب المستخلص الخام لانزيم MTGase المنتج من بكتريا *Streptomyces smyrnaeus* عند نسب اشباع مختلفة تراوحت بين (20 – 90) % من اجل معرفة افضل نسبة اشباع للمستخلص الانزيمي اذ لوحظ ارتفاع تدريجي للفعالية النوعية للانزيم في الراسب الناتج مع انخفاض في الفعالية النوعية للانزيم في الراشح الناتج لغاية نسبة اشباع 80% والتي بلغت عندها اقصى فعالية نوعية للانزيم في الراسب ، اعقبها عملية التنافذ الغشائي (الديلزة) للراسب الناتج للتخلص من املاح كبريتات الامونيوم مقابل محلول دارئ السترات (0.1 مولاري وبرقم هيدروجيني 6) لمدة 30 ساعة وبدرجة 4 م مع استبدال المحلول الدارئ كل 6 ساعات وبعد انتهاء الوقت قدرت الفعالية النوعية له اذ اعطت هذه الخطوة فعالية نوعية مقدارها 6.1196 وحده / ملغم وتنقية جزئية للانزيم بلغت 4.6854 مرة وحصيلة انزيمية مقدارها 64.20 % عند استعمال نسب اشباع تراوحت بين 50 – 80 % وكما مبين في شكل (4 – 17)، ان عملية الترسيب بكبريتات الامونيوم تساعد على التخلص من الماء ومن اكبر عدد من البروتينات الاخرى الموجودة في المستخلص الخام وهذه العملية تتم من خلال معادلة الشحنات الموجودة على أسطح البروتينات بفعل الملح المضاف والتي تسبب الاخلال بطبقة الماء المحيطة بجزيئة البروتين وبالتالي يحصل انخفاض في ذائبية البروتينات ومن ثم ترسيبها و تسمى هذه العملية بعملية التمليح الخارجي Salting out (Whitaker,1972) ،اتفقت النتائج مع العديد من الباحثين ومنهم Suzuki *et al.* (2000) الذي استعمل كبريتات الامونيوم في تركيز انزيم MTGase المنتج من بكتريا *Bacillus subtilis* بنسبة اشباع 50% وحصل على فعالية نوعية مقدارها 0.34 وحدة / ملغم وبحصيلة انزيمية 79 % ، ومشابه مع Bourneow *et al.* (2011) الذي حصل على فعالية نوعية لانزيم MTGase المنتج من بكتريا *Enterobacter* sp. بلغت 0.11 وحدة / ملغم وحصيلة انزيمية 85.76 % عند ترسيبة باستعمال كبريتات الامونيوم بنسبة اشباع (50 – 80) % ، ومقارب مع Zhang *et al.* (2018) الذي وجد ان انزيم MTGase المنتج من يرقات *Mythimna separata* والمرسب بكبريتات الامونيوم بنسبة اشباع 55 % اعطى فعالية نوعية مقدارها 0.208 وحدة / ملغم بحصيله انزيمية 89.98 % .



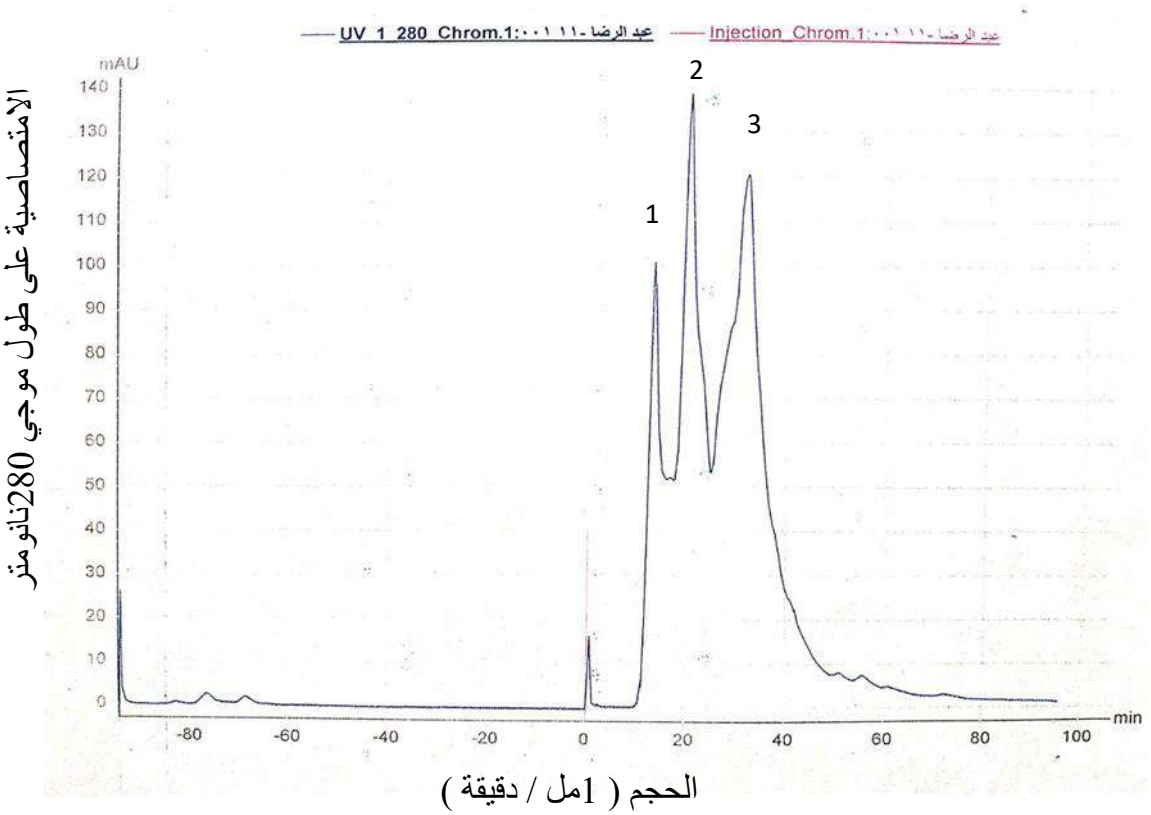
شكل (4-17) تاثير نسب التشبع بكبريتات الامونيوم في تركيز انزيم MTGase المنتج من بكتريا *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92 المعزولة محليا.

4-7-2 الترسيب بالكحول الاثيلي

استعمل الكحول الاثيلي في ترسيب انزيم MTGase المنتج من بكتريا *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92 المعزولة محليا بنسب مزج او خلط مختلفة شملت (1:1 ، 2:1 ، 3:1) (حجم : حجم) ، اذ أظهرت النتائج انخفاض الفعالية النوعية المتحصل عليها والتي بلغت (0.082 ، 0.142 ، 0.231) وحدة / ملغم على التوالي مقارنة مع الفعالية النوعية للانزيم المرسب بكبريتات الامونيوم والتي بلغت (6.1196) وحدة / ملغم بنسبة اشباع 50-80% ، لذلك اعتمدت كبريتات الامونيوم في ترسيب الانزيم واكمال الدراسة عليها ، وجاءت النتائج متفقه مع Bourneow *et al.* (2011) الذي استعمل الكحول الاثيلي بتركيز 70% وكبريتات الامونيوم بنسبة اشباع 50 – 80 % في ترسيب انزيم MTGase المنتج من بكتريا *Enterobacter* sp.C2361 والذي وجد ان الفعالية النوعية للانزيم عند ترسيبة بكبريتات الامونيوم والتي بلغت 0.11 وحدة / ملغم كانت اعلى من الفعالية النوعية عند ترسيب الانزيم بالكحول والتي بلغت 0.09 وحدة / ملغم .

3-7-4 الترشيح الهلامي بجهاز AKTA pure - 25

اجريت تنقية لانزيم MTGase المنتج من بكتريا *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92 بواسطة جهاز AKTA Pure باستعمال عمود الفصل Superdex-G75 ، اذ لوحظ من خلال الشكل (4-18) وجود ثلاث قمم للمستخلص الانزيمي المديلز بعد ترسيبه بكبريتات الامونيوم وقياس تركيز البروتين على الطول الموجي 280 نانومتر اذ جمعت كل قمة على انفراد وقدرت لها فعالية انزيم MTGase والتي ظهرت عند القمة الثالثة بمقدار 0.1264 وحدة / مل في حين لم تكن هناك اي فعالية انزيمية في القمتين الاولى او الثانية ، اختيرت هذه القمة لاكمال خطوات الدراسة اللاحقة عليها بعد ان اجريت عملية الترشيح الهلامي لأكثر من مرة بلغ فيها الحاصل الانزيمي 14.44% وبعدد مرات تنقية 5.973 مرة وكما مبين في جدول (4-5) .



شكل (4-18) كروموتوكرافي الترشيح الهلامي لانزيم MTGase بجهاز التنقية ÄKTA Pure باستعمال عمود الفصل Superdex G-75 10/300

اتفقت النتائج مع العديد من الباحثين ومنهم Ciu *et al.* (2007) اذ تمكن من تنقية انزيم MTGase المنتج من بكتريا *Streptomyces hygroscopicus* بعدة خطوات منها استعمال المبادل الايوني CM-Cellulose وكروموتوكرافيا الترشيح الهلامي Sephadex G-75

والحصول على فعالية نوعية 7.60 وحدة / ملغم وبعدد مرات تنقية 30 مرة وبحصيلة انزيمية 21.1%، كذلك قام Bourneow *et al*. (2011) بتنقية الانزيم المنتج من بكتريا *Enterobacter* sp. بخطوة الترشيح الهلامي مستعملا عمود من نوع Sephadex G-100 إذ تمكن من الحصول على فعالية نوعية مقدارها 2.05 وحدة / ملغم وبعدد مرات تنقية 19.1 مرة ، كما اتفقت ايضا مع Zhang *et al*. (2012) الذي استعمل عدة خطوات في تنقية الانزيم المنتج من بكتريا *Streptomyces mobaraensis* والتي شملت التركيز بالترشيح الفائق والفصل بكروموتوكرافيا الترشيح الهلامي Sephadex G-75 واخيرا استعمل SP Sepharose High Performance التي ادت الى الحصول على فعالية انزيمية مقدارها 17.20 وحدة / مل بعدد مرات تنقية 5.9 مرة وحصيلة انزيمية 74 % ، وايضا مع Nur'amaliyah *et al*. (2016) الذي اشار الى تنقية الانزيم المنتج من بكتريا *Streptomyces* sp. TTA بعدة خطوات تضمنت الترشيح الفائق والمبادل الايوني Q-Sepharose والترشيح الهلامي Sepacryl S-200 اذ بلغت الحصيلة الانزيمية 1.36 % وبعدد مرات تنقية 27.17 وفعالية نوعية 9.78 ، تمكن ايضا Zhang *et al*. (2018) من تنقية الانزيم باستعمال كروموتوكرافيا الترشيح الهلامي Sephadex G100 والمبادل الايوني DEAE- Cellulose-52 فكانت الحصيلة الانزيمية 12.69 % وبعدد مرات تنقية 48.362 وفعالية نوعية 4.836 وحدة / ملغم .

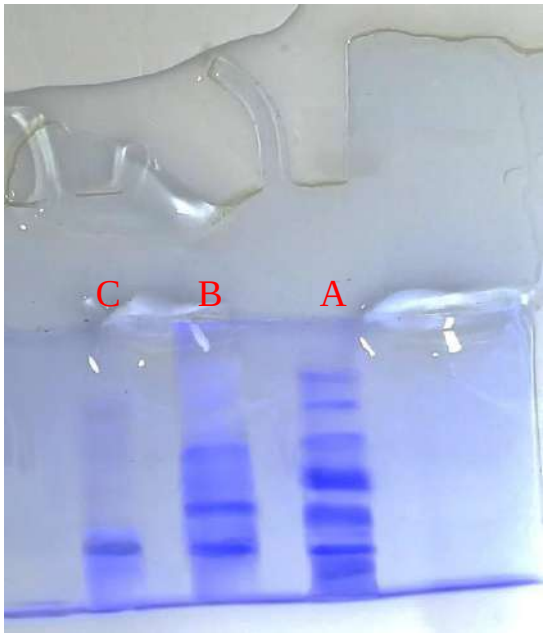
جدول (4-5) خطوات تنقية انزيم MTGase المنتج من بكتريا *Streptomyces smyrnaeus*Ati-92 المعزولة محليا .

خطوات التنقية	الحجم مل	الفعالية وحدة / مل	البروتين ملغم/ مل	الفعالية النوعية وحدة / ملغم	الفعالية الكلية وحدة	عدد مرات التنقية	الحاصل %
المستخلص الخام	200	0.0875	0.067	1.3061	17.5	1	100
الترسيب بكبريتات الامونيوم بنسبة اشباع 50- 80 % والتنافذ الغشائي	36	0.3121	0.051	6.1196	11.2356	4.6854	64 .20

الترشيح الهلامي بعمود Superdex-G75	20	0.1264	0.0162	7.8024	2.528	5.973	14.445

4-7-4 تعيين نقاوة الإنزيم

استعملت تقنية الترحيل الكهربائي بغياب المادة الماسخة للبروتين SDS والتي تعد احدى الطرق التي يجب اجرائها قبل البدء بتوصيف الانزيم اذ لوحظ من خلال الشكل (4-19) ظهور 7 حزم بروتينية في المستخلص الانزيمي الخام في هلام الاكرل امايد A ، و ظهور 3 حزم بروتينية في المستخلص الانزيمي المنقى جزئيا بعد الترسيب بكبريتات الامونيوم في هلام الاكرل امايد B ، في حين ظهرت حزمة بروتينية واحدة بعد مرحلة الترشيح الهلامي بتقنية AKTA Pure للانزيم المنقى في هلام الاكرل امايد كما في المسار C ، ان ظهور الحزمة البروتينية الواحدة مؤشر على نقاوة الانزيم لان وجود بروتينات ومواد اخرى تؤدي الى اعطاء نتائج غير دقيقة حول صفات الانزيم وخصائصة (Segel,1976)، توافقت النتائج مع ماتوصل اليه Soares *et al*. (2003) بحصولهم على حزمة بروتينية واحدة للانزيم المنتج من بكتريا *Bacillus circulans*، ايضا مع ما حصل عليه Zhang *et al*. (2012) على حزمة بروتينية واحدة باستعمال طريقة الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الاكريل امايد لانزيم MTGase المستحصل عليه من بكتريا *Streptomyces mobarensis* ، وكذلك مع Jin *et al*. (2016) الذي حصل على حزمة بروتينية واحدة في الترحيل الكهربائي للتأكد من نقاوة الانزيم المنتج من بكتريا *Streptomyces mobarensis* ، وايضا اتفقت مع Ozcelik *et al*. (2019) الذي اشار الى الحصول على حزمة بروتينية واحدة عند استعمال الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الاكريل امايد للانزيم المنقى من خميرة *Pichia pastoris* .

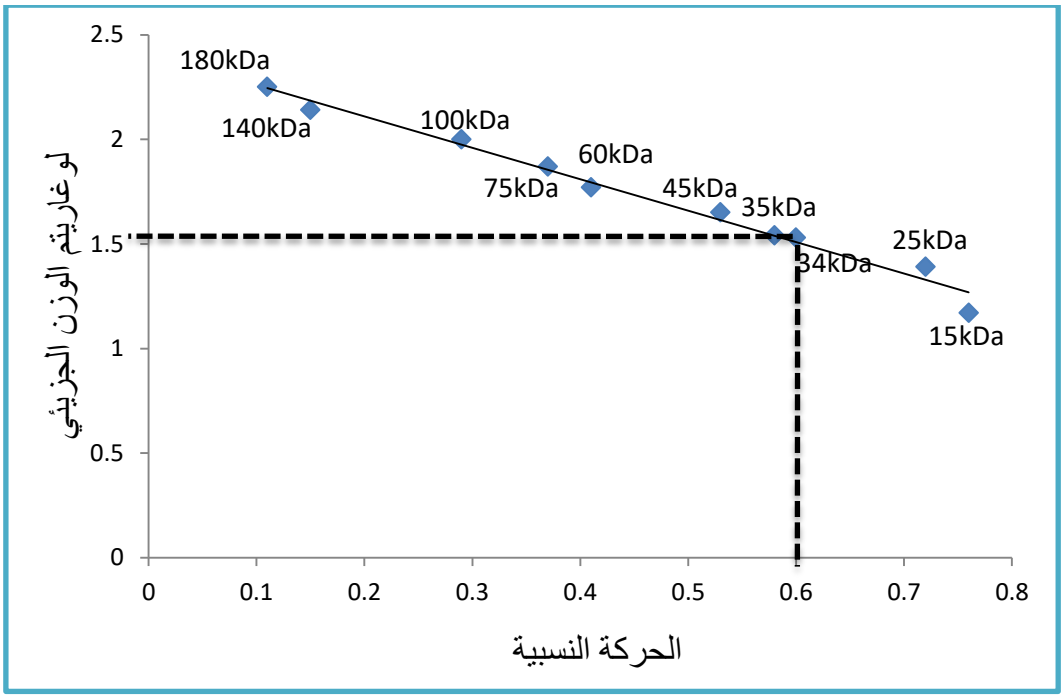


شكل (4-19) الترحيل الكهربائي في هلام الاكريل امايد بغياب المادة الماسخة SDS , تمثل A : المستخلص الانزيمي الخام , B : الانزيم المنقى جزئيا بكبريتات الامونيوم والتنافذ الغشائي , C : الانزيم المنقى بعد مرحلة الترشيح الهلامي .

4-7-5 توصيف انزيم MTGase المنتج من العزلة *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92

4-7-5-1 تقدير الوزن الجزيئي

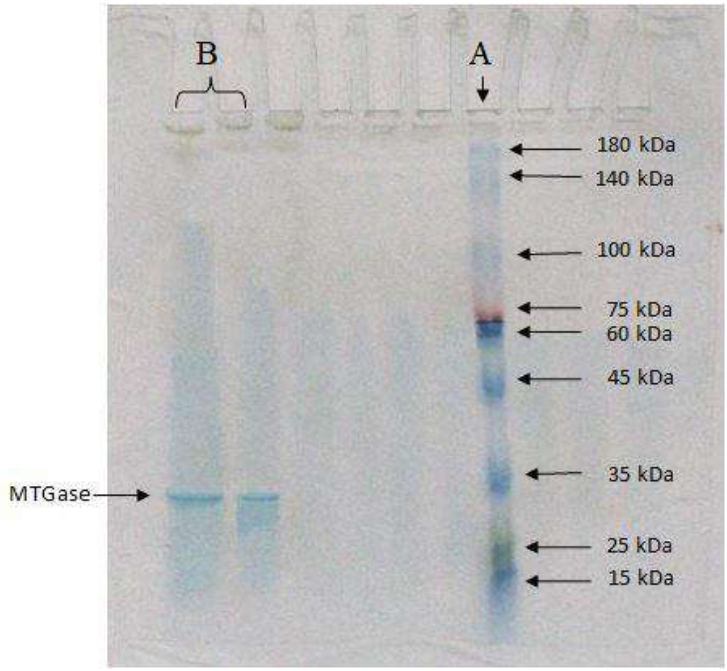
قدر الوزن الجزيئي لانزيم MTGase بتقنية الترحيل الكهربائي في هلام متعدد الاكريل امايد وذلك باستعمال ماركر يحتوي على بروتينات قياسية معلومة الوزن الجزيئي ، اذ يبين الشكل (4-20) العلاقة بين لوغاريتم الوزن الجزيئي والحركة النسبية للبروتينات القياسية في هلام متعدد الاكريل امايد بوجود المادة الماسخة SDS -PAGE لحساب الوزن الجزيئي والتي من خلالها وجد ان الوزن الجزيئي لانزيم MTGase المنتج من بكتريا *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92 المعزولة محليا يساوي 34 كيلو دالتون .



شكل (4-20) المنحنى القياسي لتقدير الوزن الجزيئي لانزيم MTGase المنتج من بكتريا *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92 بتقنية الترحيل الكهربائي بوجود SDS

كما يوضح الشكل (4-21) عملية الترحيل الكهربائي بوجود المادة الماسخة SDS-PAGE للبروتينات القياسية وانزيم MTGase المنقى ، وقد تباينت نتائج الدراسات السابقة في تقدير الوزن الجزيئي لانزيم MTGase اعتمادا على مصدر الانزيم ، اذ وجد Suzuki *et al.* (2000) ان الوزن الجزيئي لانزيم MTGase المنتج من بكتريا *Bacillus subtilis* كان 29 كيلو دالتون عند تقديره بتقنية الترحيل الكهربائي بوجود المادة الماسخة SDS-PAGE ، في حين وجد Soares *et al.* (2003) ان الوزن الجزيئي للانزيم المنتج من بكتريا *Bacillus circulans* يعادل 45 كيلو دالتون عند تقديره بطريقة الترحيل الكهربائي بوجود SDS-PAGE ، وتقاربت النتائج مع كل من Cui *et al.* (2007) الذي اشار الى ان الوزن الجزيئي لانزيم MTGase المنتج من بكتريا *Streptomyces hygroscopicus* كان 38 كيلو دالتون باستعمال الترحيل الكهربائي بوجود مادة SDS ، ومع Lin *et al.* (2008) الذي افاد الى ان الوزن الجزيئي لانزيم MTGase المنتج من بكتريا *Streptoverticillum platensis* كان 40 كيلو دالتون ، وكذلك مع Zhang *et al.* (2012) الذي بين ان الوزن الجزيئي للانزيم المنتج من بكتريا *Strepomyces mobaraensis* بتقنية الترحيل الكهربائي بوجود SDS بلغ 38 كيلو دالتون ، وايضا تقاربت النتائج مع Jin *et al.*,(2016) الذي ذكر ان الوزن الجزيئي المقدر بطريقة الترحيل الكهربائي بوجود SDS كان 37.8 كيلودالتون لانزيم MTGase المنتج من بكتريا *Streptomyces*

mobaraensis ، بينما وجد Ozcelik *et al*. (2019) ان الوزن الجزيئي لانزيم MTGase المنتج من خميرة *Pichia pastoris* المقدر بطريقة الترحيل الكهربائي بوجود SDS كان 50 كيلودالتون ، ان استعمال المادة الماسخة SDS-PAGE في الترحيل الكهربائي لتقدير الوزن الجزيئي يساعد على تحطيم التركيب الرباعي عن طريق ارتباطه بشدة بالوحدات المكونه له ومن ثم الغاء تأثير الشحنة اثناء عملية الفصل ويكون الفارق في الوزن الجزيئي للوحدات المكونه للانزيم هو العامل للفصل على هلام الاكريل أمايد (Segel,1976) .

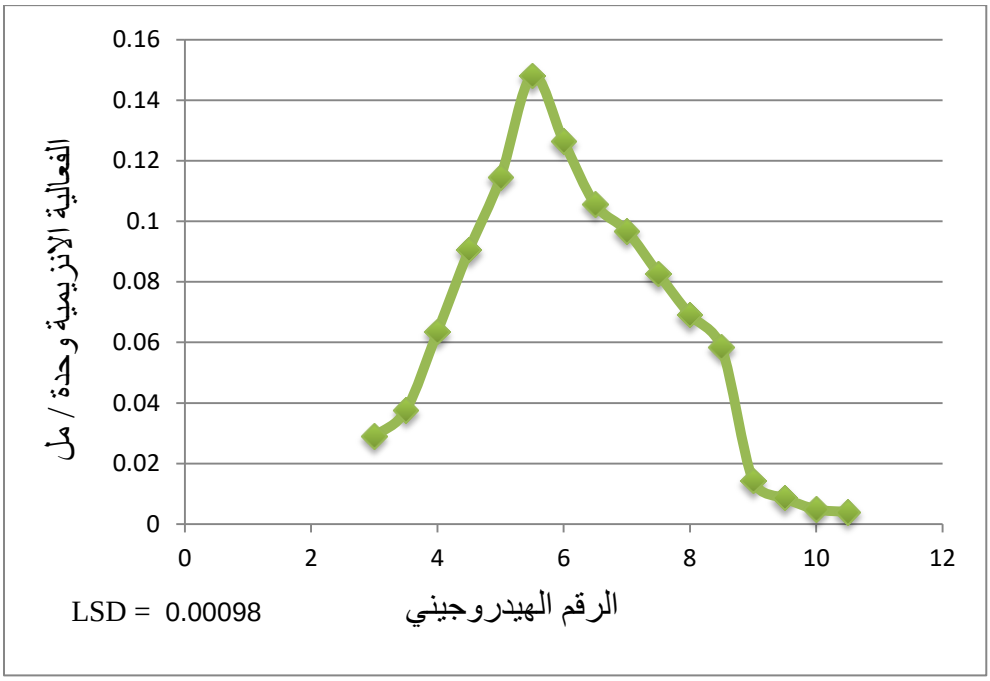


شكل (4-21) تقدير الوزن الجزيئي لانزيم MTGase المنقى من العزلة المحلية *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92 بتقنية الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريل امايد بوجود SDS ، تمثل A : البروتينات القياسية معلومة الاوزان الجزيئية ، B : انزيم MTGase

4-7-5-2 الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم

درس تاثير الرقم الهيدروجيني الامثل في فعالية انزيم MTGase المنقى عند مدى من الارقام الهيدروجينية تراوحت بين (3 - 10.5) ، اذ وجد من خلال التحليل الاحصائي للنتائج المبينه في الشكل (4-22) وجود فروق معنوية بين الارقام الهيدروجينية المختلفة في فعالية الانزيم عند مستوى معنوي $P\leq 0.05$ أظهرت النتائج ان الفعالية الانزيمية اخذت بالارتفاع مع زيادة الرقم الهيدروجيني لوسط التفاعل من (3 – 5.5) وانها بلغت الحد الاقصى عند الرقم الهيدروجيني 5.5 (باستعمال محلول دارئ الخلات) اذ اعطى اعلى فعالية انزيمية وصلت الى 0.1481 وحدة / مل ، ان جميع مكونات وسط التفاعل تكون في حالة ايونية افضل وبالذات الاحماض الامينية في الموقع

الفعال للانزيم عند الرقم الهيدروجيني الامثل مما يدفع التفاعل الانزيمي الى زيادة الفعالية عند مستوى عالٍ (Nielsen *et al*.,2001) ، ثم اخذت بعد ذلك الفعاليه بالانخفاض كلما تم الابتعاد عن الرقم الهيدروجيني الامثل سواء كان باتجاه الارقام الحامضية او القاعدية ، قد يعود سبب انخفاض الفعالية الانزيمية عند الارقام الهيدروجينية الحامضية والقاعدية العالية الى تأثيرالرقم الهيدروجيني لوسط التفاعل في المجاميع القابلة للتأين الموجودة في الموقع الفعال او حدوث تغيير في المادة الاساس للتفاعل او نتيجة لحدوث تغيير في الحالة الايونية لمواد التفاعل التي شملت معقد الانزيم مع المادة الاساس (ES) ومعقد الانزيم مع نواتج التفاعل (EP) (Whitaker,1972)، كما ان الانزيمات تعاني تغيرات في الهيئة التركيبية عند تغير الرقم الهيدروجيني بسبب تغير شحنات المجموعات الجانبية للاحماض الامينية الداخلة في تركيب الانزيم (Murray *et al*.,2000) وجاءت هذه النتائج مقاربة لما توصل اليه Lin *et al*. (2008) الذي وجد ان الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية انزيم MTGase المنقى من بكتريا *Streptoverticillum platensis* كان يتراوح بين (5 – 6) ، وتقاربت مع Zhang *et al*. (2012) الذي بين ان الرقم الهيدروجيني الامثل للانزيم المنقى من بكتريا *Streptomyces mobaraensis* هو 6 ، وايضا تقاربت النتائج مع Nur'amaliyah *et al*. (2016) الذي اشار الى ان افضل فعالية انزيمية عند الرقم الهيدروجيني 6 للانزيم المنقى من بكتريا *Streptomyces* sp. TTA ، وايضا مع Sorde and Ananthanaryayan (2019) الذي افاد بان افضل فعالية انزيمية كانت عند الرقم الهيدروجيني 6 للانزيم المنقى من بكتريا *Bacillus nakamurai* ، كما وجد Ozcelik *et al*. (2019) ان الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم المنقى من خميرة *Pichia pastors* كان 6 ، في حين لم تتفق النتائج مع Ando *et al*. (1989) الذي ذكران الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية انزيم MTGase المنقى من بكتريا *Streptomyces mobaraensis* هو 7 .

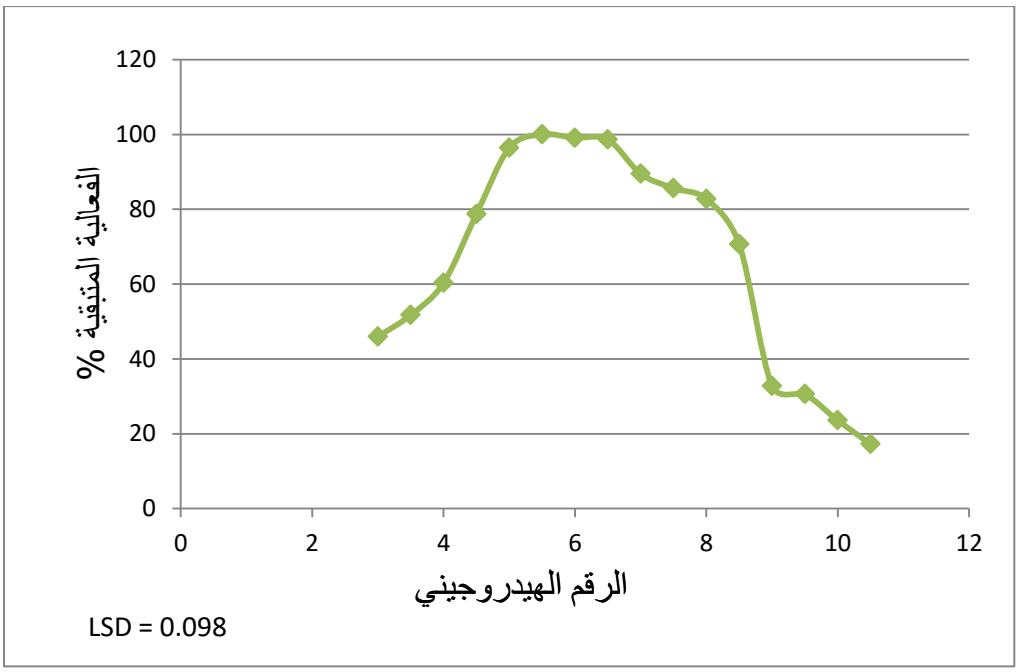


شكل (4-22) الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية انزيم MTGase المنقى من بكتريا *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92 المعزولة محليا .

4-7- 3-5 الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الانزيم

توضح النتائج المبينة في شكل (4-23) انزيم MTGase المنقى من بكتريا *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92 ومن خلال نتائج التحليل الاحصائي لوحظ وجود فروقات معنوية بين مديات من الارقام الهيدروجينية المستعمله في فعالية الانزيم عند مستوى معنوي $P\leq0.05$ ، اذ اظهر ثباتا عند مدى هيدروجيني (5 – 6.5) نتيجة احتفاظه بكامل فعاليته تقريبا عند حضنه لمدة 60 دقيقة عند درجة حرارة 37 م ، كما احتفظ بنسبة 80% من فعاليته عند الارقام الهيدروجينية (7-8) ، في حين فقد الانزيم اكثر من 60% من فعاليته عند الارقام الهيدروجينية القاعدية التي تراوحت بين (8.5 – 10.5) ، اما الارقام الهيدروجينية الحامضية (3 ، 3.5 ، 4 ، 4.5) فقد لوحظ ان الانزيم فقد فعاليته عندها بنسبة (54% ، 48% ، 40 % ، 21 %) على التوالي ، ان الانخفاض الحاصل في ثباتية الانزيم عند الارقام الهيدروجينية الحامضية والقاعدية العالية يحدث نتيجة المسخ Denaturation اللاعكسي لجزيئة الانزيم بسبب التغير الذي يطرأ على شحنات السلاسل الجانبية القابلة للتأيين وبالتالي تحطم التركيب الثلاثي لجزيئة الانزيم لتكون بدلا عنه تركيب اكثر عشوائية مما يؤدي الى تغير في الموقع الفعال وبالنهاية انخفاض الفعالية

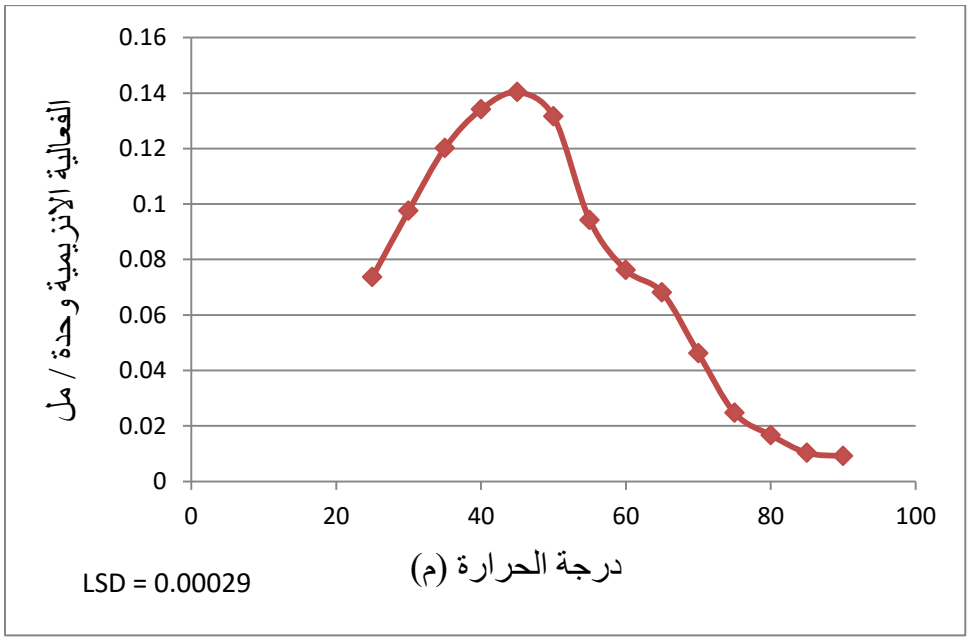
(Segel,1976 ; Palmer ,1985) ، كما ان الانخفاض في الفعالية الانزيمية عند القيم الحامضية او القاعدية قد يعود الى حدوث تغيرات في التركيب الثانوي والثالثي لجزيئة الانزيم فضلا عن تغير الحالة الايونية للموقع الفعال للانزيم (Lehmacher and Bisswanger1990) ، اتفقت النتائج مع ما بينه Cui *et al*. (2007) بان انزيم MTGase المنقى والمنتج من بكتريا *Streptomyces hygroscopicus* أبدى ثباتية في مدى هيدروجيني تراوح بين (5 – 8) عند درجة حرارة 10 م لمدة 30 دقيقة ، وتقاربت مع Lin *et al*. (2008) الذي اشار الى ان الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات انزيم MTGase المنقى والمنتج من *Streptoverticillum plastensis* كان (4 – 8) بفعالية متبقية 80% عند درجة حرارة 37 م لمدة 30 دقيقة من الحضن كما بين ان الانزيم فقد فعاليتة بنسبة 70 % و 50 % عند الرقم الهيدروجيني 3 و 9 على التوالي ، وايضا تقاربت النتائج مع Zhang *et al*. (2012) الذي ذكر ان انزيم MTGase المنقى والمنتج من بكتريا *Streptomyces mobaraensis* اعطى ثباتيه في مدى من الارقام الهيدروجينية تراوحت بين (5 – 9) لمدة 30 دقيقة وعند درجة حرارة 37 م ، وتشابهت مع Sorde and Ananthanarayan (2019) عند دراستهما لثباتية انزيم MTGase المنقى والمنتج من بكتريا *Bacillus nakamurai* اذ لاحظا بان الانزيم ثابت عند الارقام الهيدروجينية (5 – 8) عند درجة حرارة 37 م لمدة 30 دقيقة .



شكل (4-23) الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات انزيم MTGase المنقى من بكتريا *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92 المعزولة محليا .

4-5-7-4 تعيين الدرجة الحرارية المثلى للانزيم

درس تاثير درجة الحرارة في فعالية انزيم MTGase المنقى من خلال التفاعل الانزيمي الذي اجري بدرجات حرارية مختلفة تراوحت بين (25 – 90) مº وعند الرقم الهيدروجيني الامثل 5.5 ، اذ تشير نتائج التحليل الاحصائي الى وجود فروق معنوية بين الدرجات الحرارية المختلفة عند مستوى معنوي $P\leq0.05$ وكما مبين في شكل (4-24) اذ لوحظ حصول زيادة في الفعالية الانزيمية مع زيادة درجة حرارة التفاعل حتى بلغت اقصاها عند 45 مº والتي تمثل درجة الحرارة المثلى التي وصلت عندها الفعالية الانزيمية 0.1403 وحدة / مل ثم انخفضت الفعالية مع وصول درجة الحرارة الى 90 م لتكون 0.0091 وحدة / مل، ان مكونات التفاعل التي تضم كل من الانزيم والمادة الاساس تتغير بشكل واضح مع ارتفاع درجات الحرارة مما يؤدي الى حصول ارتفاع مستمر في فعالية الانزيم بسبب زيادة فرصة حدوث التصادم نتيجة لزيادة الطاقة الحركية لجزيئات المواد المتفاعلة بفعل تاثير درجات الحرارة (Segel,1976) ، الا ان الانزيم يفقد قدرته على الاحتفاظ بتركيبة بشكل كامل مع ارتفاع درجة الحرارة وتجاوزها عن الدرجة الحرارية المثلى نتيجة كسر للاواصر الهيدروجينية وقد يحدث تحطم لتركيبه الثلاثي وفقدانه لخواصه الطبيعية وبالتالي انخفاض فعاليته (Murray *et al*.,2000)، وكانت النتائج متفقة مع ما ذكره Jin *et al*. (2016) بان درجة الحرارة المثلى للانزيم المنقى من بكتريا *Streptomyces mobaraensis* قد تراوحت بين 45 - 50 مº ، وتقاربت مع ماوجده Zhang *et al*. (2012) بأن الدرجة الحرارية المثلى للانزيم المنقى من بكتريا *Streptomyces mobaraensis* كانت 50 م ، وايضا مع Nur'amaliyah *et al*. (2016) الذي اشار الى ان افضل فعالية انزيمية لانزيم MTGase المنقى من بكتريا *Streptomyces* sp.TTA 02 كانت عند درجة حرارة 50 م ، كما افاد كل من Sorde and Ananthanarayan (2019) ان الانزيم المنقى من بكتريا *Bacillus nakamurai* اظهر اقصى فعالية انزيمية عند 50 مº ، بينما ذكر Ozcelik *et al*. (2019) ان الانزيم المنقى من خميرة *Pichia pastoris* كان باقصى فعالية انزيمية عند درجة حرارة 60 م .

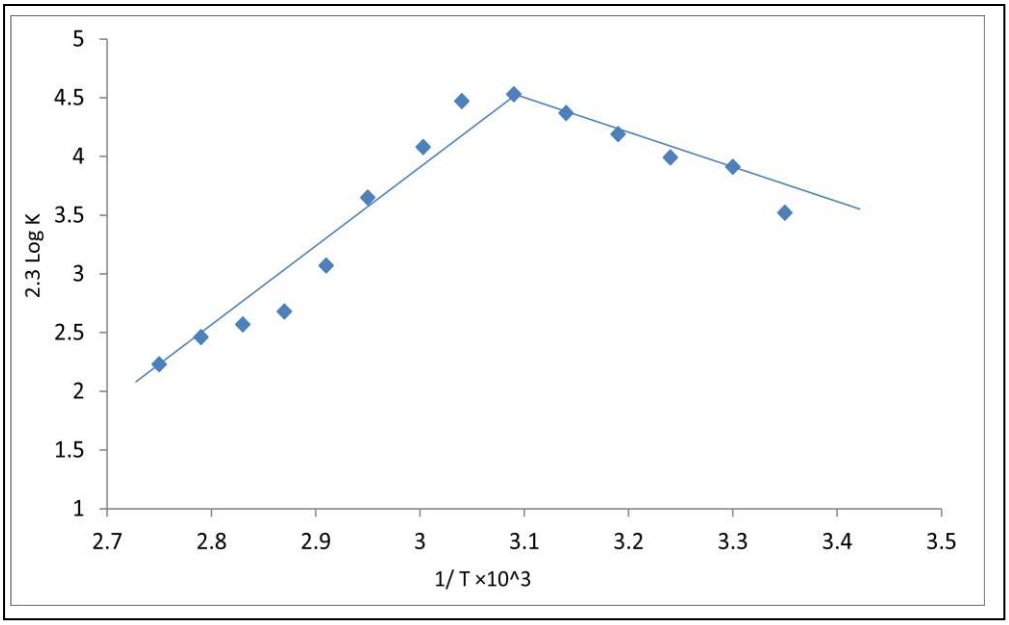


شكل (4-24) درجة الحرارة المثلى لفعالية انزيم MTGase المنقى والمنتج من بكتريا *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92 المعزولة محليا .

4-7-5-5 تعيين طاقة التنشيط

يبين الشكل (4-25) العلاقة بين لوغاريتم سرعة التفاعل لانزيم MTGase ومقلوب درجة الحرارة المطلقة طبقا لمعادلة ارينوس (Arhinose Equation) لاستخراج قيمة طاقة التنشيط اللازمة لتحويل المادة الاساس الى نواتج والتي بلغت 12.82 كيلو سعرة / مول ، اذ تقع هذه القيمة ضمن المدى الطبيعي لقيم طاقة التنشيط (Ea) والذي يتراوح بين 6 – 15 كيلو سعرة / مول ، تمثل طاقة التنشيط اقل كمية من الطاقة اللازمة لتحويل المادة الاساس الى نواتج (Whitaker, 1972) ، وجاءت هذه النتيجة مقاربة مع Wong *et al.* (1990) الذي ذكر ان قيمة طاقة التنشيط لانزيم TGase المنقى من كبد الجرذ بلغت 19.6 كيلو سعرة / مول ، الا انها اختلفت مع Jiang and Lee (1992) الذي اشار الى ان طاقة التنشيط بلغت 47.2 كيلوسعرة / مول لانزيم TGase المنقى من بلازما الخنزير ، وايضا اختلفت مع Tasi *et al.* (1996) الذي بين ان قيمة طاقة التنشيط لانزيم MTGase المنقى من بكتريا *Streptoverticillium ladakanum* بلغت 34.3 كيلوسعرة / مول باستعمال المادة الاساس CBZ-Gln-Gly ، وكذلك مع Lin *et al.* (2008) الذي افاد ان قيمة طاقة التنشيط بلغت 40.49 كيلوسعرة /مول لانزيم MTGase المنقى من بكتريا *Streptoverticillium platensis* باستعمال المادة الاساس CBZ-Gln-Gly ، اما الطاقة اللازمة لمسخ الانزيم فكانت 75 كيلوسعرة / مول ، وهذه القيمة تعطي فكرة عن مدى

حساسية الانزيم تجاه درجات الحرارة العالية فكلما كانت القيمة عالية كان الانزيم اكثر ثباتا تجاه الحرارة وتتراوح الطاقة اللازمة لمسخ الانزيم لمعظم التفاعلات الانزيمية بين (40 – 150) كيلو سعرة / مول (Witaker,1972).

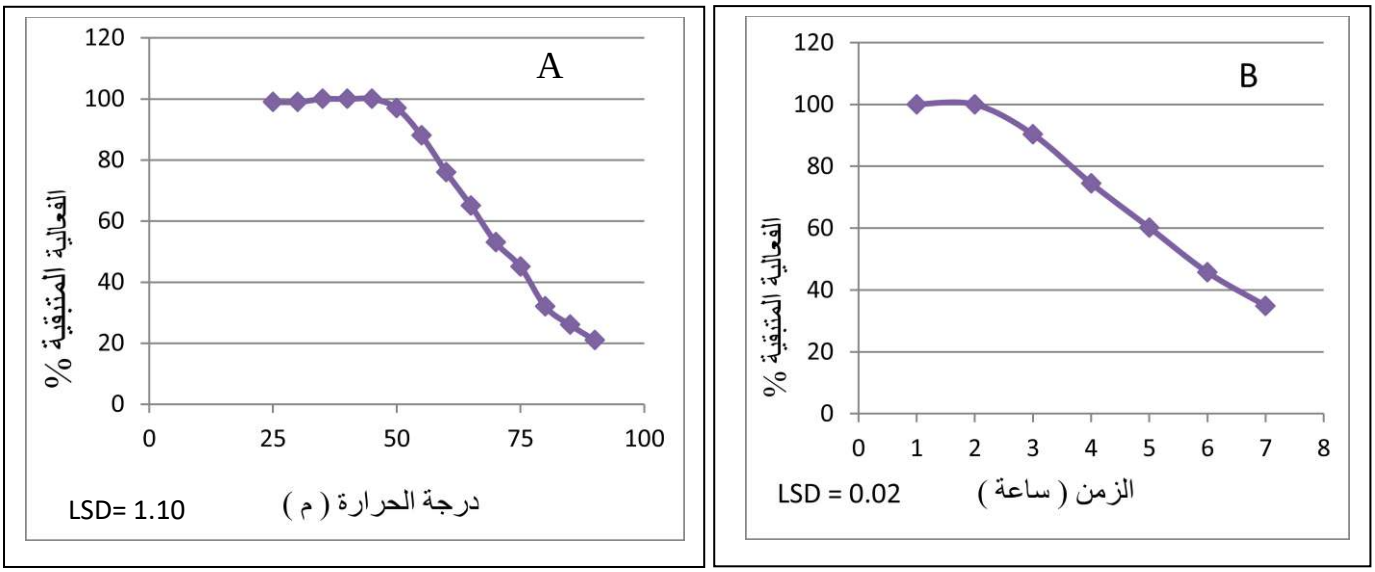


شكل (4-25) منحنى ارينوس لتقدير طاقة التنشيط لانزيم MTGase المنقى من بكتريا *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92 المعزولة محليا .

6-5-7-4 تعيين الثبات الحراري لانزيم MTGase

اظهرت نتائج التحليل الاحصائي للدرجات الحرارية (25 – 90) م عدم وجود فروق معنوية في فعالية الانزيم عند 25 – 50 م° لانزيم MTGase المنقى والمنتج من بكتريا *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92 المحضن لمدة 60 دقيقة اذ احتفظ بمعظم فعاليته عند هذه الدرجات الحرارية ، في حين كان هناك فروق معنوية في الفعالية عند درجة حرارة تراوحت بين 55 – 90 م° اذ انخفضت الفعالية الانزيمية تدريجيا وفقد 12 % من فعاليته عند 55 م° كما فقد 79 % من فعاليته عند 90 م° ، كما لوحظ ان الانزيم المنقى احتفظ بكامل فعاليته عند درجة حرارة 45 م° لمدة ساعتين ، بينما فقد 25.54 % من فعاليته لمدة 4 ساعات من الحضن عند درجة حرارة 45 م وكما مبين بالشكل (4-26 A،B) ، اذ ان تغير الحالة الطبيعية للانزيم نتيجة درجات الحرارة العالية مسببة انخفاض فعالية الانزيم كما ان التغير السريع في طبيعة الانزيم يؤدي الى تحطيم الاواصر الهيدروجينية الضعيفة والتي تؤدي الى فقدان الانزيم لفعاليته كليا (دلالي ، 1986) كما ان درجة

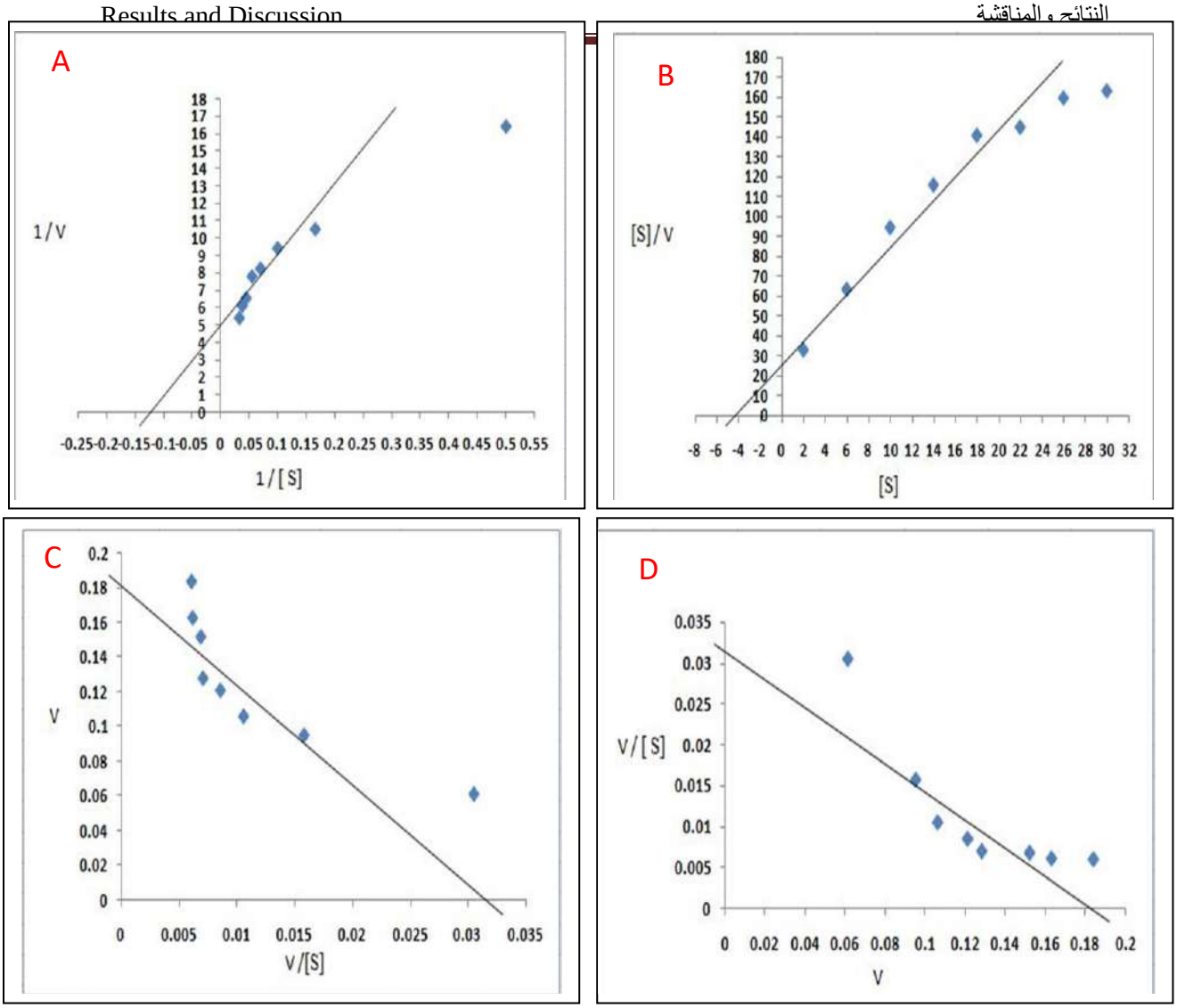
الحرارة العالية تعمل على تكسير الاواصر غير التساهمية التي لها دور في المحافظة على التركيب الثلاثي للانزيم وبالتالي تبدأ السلاسل متعددة الببتيد بالانفتاح ومن ثم فقدان سريع في فعالية الانزيم (Whitaker, 1972; Murray et al.,2000) ، تباينت نتائج الابحاث في تحديد الثبات الحراري للانزيم نتيجة اختلاف مصدر العزل للانزيم ، ذكر Zhang *et al*. (2012) بان الانزيم المنقى والمنتج من بكتريا *Streptomyces mobaraensis* احتفظ بكامل فعاليته بدرجات حرارية تراوحت بين (4 – 30) م كما احتفظ بنسبة 90 % من فعاليته عند 40 م° لمدة 30 دقيقة ، واشار El- Hofi *et al* . (2014) الى ان الانزيم المنتج من نبات اكليل الجبل اعطى ثباتا في درجات حرارية تراوحت بين (50 – 60) م لمدة 15 دقيقة واحتفظ بنسبة 80 % من فعاليته عند 65 م° ، اتفقت النتائج مع Nur'amaliyah *et al*. (2016) الذي وجد ان الانزيم المنتج من بكتريا *Streptomyces* sp. احتفظ بكامل فعاليته عند درجة حرارة 45 م لمدة 45 دقيقة في حين احتفظ بنسبة 70 % من فعاليته لمدة 120 دقيقة من الحضن ، وايضا اتفقت مع Sorde and Ananthanarayan (2019) الذي اشار الى ان الانزيم المنتج من بكتريا *Bacillus nakamurai* اظهر ثباتية عند درجة حرارة تراوحت بين (0 – 50) م واحتفظ بنسبة 42 % من فعاليته عند درجة حرارة 70 م لمدة 60 دقيقة .



شكل (4-26) الثبات الحراري لانزيم MTGase المنقى ، تمثل A : درجة الحرارة المثلى لثبات الانزيم ، B : الثبات الحراري للانزيم عند 45 م° .

7-5-7-4 تعيين الثوابت الحركية (K_m ، V_{max}) لإنزيم MTGase

درست الثوابت الحركية لانزيم MTGase المنقى من خلال دراسة ثابت ميكالس Km والسرعة القصوى Vmax باستعمال (Z- Gln- Gly) كمادة اساس Substrate وبتراكيز مختلفة ، بعدها رسمت العلاقة بين تركيز المادة الاساس والسرعة القصوى لتعيين قيم Km و Vmax وكما موضح في الشكل (4-27 A، B ، C ، D) ، واستخرج المعدل العام لنفس القيم وكما مبين في جدول (4-6) الذي يوضح نتائج هذه القيم ومدى التقارب بين قيم الثوابت الحركية المتحصل عليها من الطرائق الاربعة والتي بلغ فيها معدل Km (6.0321) ملي مولاري و Vmax (0.1835) وحدة / مل ، وجاءت النتائج مقاربة لما حصل عليه Ohtsuka *et al*. (2001) من تقدير ثابت ميكالس Km والسرعة القصوى Vmax لانزيم MTGase المنقى من بكتريا *Bacillus circulans* باستعمال تراكيز مختلفة من المادة الاساس Substrate (Z-Gln- Gly) اذ بلغت قيمة Km للانزيم 8.2 ملي مولاري وقيمة Vmax 3.6 ملي مول / دقيقة ، الا انها اختلفت مع Soares (2003) الذي ذكر ان قيمه ثابت ميكالس بلغت 0.87 ملي مولاري لانزيم MTGase باستعمال المادة الاساس (CBZ-Gln-Gly) , وايضا مع Zhang *et al*. (2012) الذي بين ان استعمال (N-CBZ-Gln-Gly) بتراكيز مختلفة كمادة أساس لتقدير الثوابت الحركية Km و Vmax لانزيم MTGase المنقى من بكتريا *Streptomyces mobaraensis* اعطت قيم لهذه الثوابت والتي بلغت 40.47 ملي مولاري و 44.44 وحدة / ملغم على التوالي ، وكذلك اختلفت مع Jin *et al* . (2016) الذي وجد عند دراسة الثوابت الحركية ان ثابت ميكالس والسرعة القصوى لانزيم MTGase المنقى من بكتريا *Streptomyces mobaraensis* بلغت 23.12 ملي مولاري و 4.46 ملي مول / دقيقة على التوالي باستعمال N-α-CBZ-Gln-Gly كمادة اساس كما بين ايضا ان قيمة ثابت ميكالس بلغت 1.37 ملي مولاري عند استعمال hydroxylamine hydrochloride كمادة اساس ، كما اختلفت مع Sorde and Ananthanarayan (2019) الذي حصل على Km و Vmax مقدارها 33.92 ملي مولاري و 5.28 ملي مول / دقيقة على التوالي لانزيم MTGase المنقى من بكتريا *Bacillus nakamurai* باستعمال تراكيز مختلفة من المادة الاساس CBZ-Gln-Gly ، ان الاختلاف في قيم الثوابت الحركية (Km , Vmax) قد يعود الى مصدر الانزيم نتيجة اختلاف العزلات المايكروبية او اختلاف الظروف المستعملة (كالرقم الهيدروجيني ودرجة حرارة التفاعل والمحلول الدارىء والقوة الايونية) في تقدير قيم هذه الثوابت او كلاهما (Zhang *et al* ., 2012).



شكل (4-27) الثوابت الحركية لانزيم MTGase المنقى من البكتريا المعزولة محليا *Streptomyces smyrnaeus* Ati- 92 مقدرة باربع طرائق .

A : Lineweaver– Burk Reciprocal Plot . B : Hanse – Woolf Plot.

C : Woolf – Augustinsson – Hofstee Plot. D : Eadie – Scatshard Plot .

جدول (4-6) الثوابت الحركية لانزيم MTGase المنقى من *Streptomyces smyrnaeus* Ati- 92 تجاه Z-Gln-Gly كمادة أساس (Substrate) .

طريقة الرسم	Km(ملي مولاري)	Vmax وحدة / مل
A	7.692	0.196
B	5	0.172
C	5.656	0.181
D	5.781	0.185
المعدل	6.0321	0.1835

4- 7-5-8 تأثير المنشطات والمثبطات في فعالية الانزيم

يوضح الجدول (4-7) تاثير عدد من المثبطات وايونات المعادن في فعالية انزيم MTGase المنقى من بكتريا Ati-92 *Streptomyces smyrnaeus* المعزولة محليا والتي شملت كل من $CaCl_2$ ، $MgCl_2$ ، $CuCl_2$ ، $ZnCl_2$ ، $FeCl_2$ ، NaCl ، LiCl ، KCl ، EDTA ، DTT ، Glutathione ، Cysteine ، عند تركيز 5 ، 10 ملي مولاري ، اذ لوحظ ان ايونات Mg ، Na ، Li كان لها دورا منشطا في فعالية الانزيم عند كلا التركيزين مقارنة بالانزيم غير المعامل ، اذ بلغت الفعالية المتبقية 106.78 % ، 116.51% ، 105.31 % على التوالي عند التركيز 10 ملي مولاري ،ان زيادة فعالية الانزيم بوجود بعض الايونات المعدنية يعود الى دورها في زيادة الالفة بين الانزيم والمادة الاساس من خلال مسك المجاميع المتفاعلة في الشكل الثلاثي او تبادل الايونات (دلالي ، 1983) ، بينما حصل انخفاض بسيط في فعالية الانزيم عند اضافة $FeCl_2$ بفعالية متبقية 92.73% عند تركيز 10 ملي مولاري ، الا ان الانخفاض كان واضحا في الفعالية المتبقية عند اضافة ايونات Cu ، Zn والتي بلغت 34.78 % ، 21.48 % على التوالي عند تركيز 5 ملي مولاري وازداد الانخفاض في الفعالية المتبقية للانزيم مع زيادة التركيز الى 10 ملي مولاري لتصل الى 7.62 % ، 18.36 % على التوالي ،وقد يعزى هذا الانخفاض في الفعالية الى ان هذه الايونات (Cu ، Zn) لها القابلية على ربط مجموعة الثايول الحرة التابعة لوحدة السستئين التي تمثل الموقع الفعال للانزيم (Zhang *et al*.,2012) ، في حين لم تؤثر اضافة ايون Ca في الفعالية الانزيمية المتبقية وهذا يدل على ان الانزيم لا يعتمد على ايونات الكالسيوم في نشاطه (Kieliszek and Misiewicz, 2014) ، اما بالنسبة للمركبات الكيميائية EDTA ، DTT ، Glutathion ، Cysteine فقد لوحظ انها ادت الى زيادة فعالية الانزيم بفعالية متبقية 119.86 % ، 127.53 % ، 123.37 % ، 120.48 % على التوالي عند تركيز 10 ملي مولاري ، وقد تكون هذه الزيادة في فعالية الانزيم نتيجة ارتباط هذه المركبات كلا على حده مع الهستيدين في الموقع الفعال للانزيم وتكوين الفه اكثر للانزيم وبالتالي زيادة نشاطه (Nur'amaliyah *et al*.,2016) .

جدول (4-7) تاثير الايونات المعدنية والمثبطات في فعالية انزيم MTGase المنقى والمنتج من بكتريا Ati-92 *Steptomyces smyrnaeus* المعزولة محليا .

العناصر المعدنية	التركيز (ملي مولاري)	الفعالية المتبقية %
الانزيم غير المعامل	0	100
$CaCl_2$	5	99.81
	10	100.31
$MgCl_2$	5	101.23
	10	106.78
$CuCl_2$	5	34.78
	10	7.62
$ZnCl_2$	5	21.48
	10	18.36
$FeCl_2$	5	95.12
	10	92.73
NaCl	5	103.42
	10	116.51
LiCl	5	101.12
	10	105.31
KCl	5	98.14
	10	108.27
EDTA	5	108.63
	10	119.86
DTT	5	113.87
	10	127.53
Glutathione	5	112.64
	10	123.37
Cysteine	5	110.15
	10	120.48

اتفقت النتائج المشار اليها مع العديد من الدراسات السابقة منها ما وجد Kobayashi *et al.*,(1998) ان فعالية انزيم MTGase المنقى من بكتريا *Bacillus subtilis* ازدادت بوجود مركب EDTA و DTT بفعاليه متبقية بلغت 107 % و 176 % على التوالي الا انه فقد فعاليته بوجود مركب N-ethylmaleimide (NEM) بفعالية متبقية بلغت 4 % ، واتفقت مع Lin *et al.* (2008) الذي لاحظ ان انزيم MTGase المنقى من بكتريا *Streptoverticillium platensis* فقد فعاليته بوجود ايونات Zn ، Cu ، Hg بفعاليه متبقية بلغت 32.6 % ، 1.4 % ، 0.8 % على التوالي عند 1 ملي مولاري ، وايضا مع Zhang *et al.* (2012) الذي افاد ان انزيم MTGase المنقى من بكتريا *Streptomyces mobaraensis* لم تتاثر فعاليته بوجود $CaCl_2$ الا ان فعاليته انخفضت بوجود ايون Zn بفعالية متبقية بلغت 8.1 % ، كما وبين ايضا Jin *et al.* (2016) من خلال دراسته تاثير الايونات والمركبات المعدنية بتركيز 5 ملي مولاري على فعالية انزيم MTGase المنقى من بكتريا *Streptomyces mobaraensis* بان فعالية الانزيم لم تتاثر بوجود (Mn ، Ba ، Mg ، Ca ، K) ، كما زادت فعاليته بوجود مركب EDTA ، في حين فقد فعاليته بوجود Cu ، Zn ، NEM بفعالية متبقية بلغت 1.31% ، 7.94 % ، 0.49 % على التوالي ، وكذلك اتفقت مع Nur'amaliyah *et al.* (2016) الذي اشار الى ان الايونات المعدنية تختلف في درجة تاثيرها على انزيم MTGase المنقى من بكتريا *Streptomyces* sp. اذ اظهر Ca ، Li ، K ، Na ، Mg ، EDTA زيادة في نشاط الانزيم عند تركيز 5 و 10 ملي مولاري ، اما ايونات Cu ، Zn فانها ادت الى تثبيط الانزيم بشكل واضح بفعالية متبقية بلغت 5.13 % ، 18.2 % على التوالي عند تركيز 10 ملي مولاري ، وايضا مع Zilda *et al.* (2017) الذي لاحظ حصول زيادة في الفعالية الانزيمية لانزيم MTGase المنقى من بكتريا *Streptomyces thioluteus* بوجود ايونات Mg ، Ca ، K ، Na ، بينما انخفضت بوجود ايونات Cu ، Zn ، Li ، Fe ، في حين انها لم تتاثر بوجود مركب EDTA ، وكذلك اتفقت النتائج مع ما وجد Sorde and Ananthanarayan (2019) ان اضافة ايونات Mg ، Mn ، K ، Na ، بتركيز 5 ملي مولاري لم تؤثر على فعالية انزيم MTGase المنقى من بكتريا *Bacillus nakamurai* ، الا انه فقد فعاليته بوجود ايونات Cu ، Zn ، Hg .

8-4 الاستعمالات التطبيقية لإنزيم MTGase

1-8-4 تطبيق الانزيم في اقراص اللحم المفروم

1-1-8-4 المؤشرات الكيميائية Chemical indicators

1- رقم البيروكسيد Peroxide Value (PV)

بينت نتائج التحليل الاحصائي لاقراص اللحم البقري المفروم حصول انخفاض معنوي عند مستوى $P\leq0.05$ في قيمة رقم البيروكسيد لاقراص اللحم المفروم المعامل بانزيم MTGase بتركيز (0.1 ، 0.2 ، 0.3) % والمخزنة بالتبريد لمدة سبعة أيام مقارنة مع العينه الضابطة وكان الانخفاض واضحا في العينة المعاملة بتركيز 0.3 % وقد يعود السبب في ذلك الى المجاميع الفعاليه التي يمتلكها الانزيم ومنها ، NH_2 OH، CH_3 وكذلك زيادة تركيز الانزيم التي ساعدت على ان تحد من اكسدة الدهون وبالتالي تقليل البيروكسيدات الناتجة ، كما لوحظ ايضا ان قيمة رقم البيروكسيد ارتفعت خلال مدة الخزن الا ان هذا الارتفاع كان اقل مقارنة مع العينة الضابطة وكما هو مبين في الجدول (4-8) اذ كانت قيمة رقم البيروكسيد في اليوم الاول (2.231 ، 1.960 ، 1.930) ملي مكافىء / كغم بتركيز (0.1 ، 0.2 ، 0.3) % على التوالي ، وفي اليوم الثالث من الخزن بالتبريد بلغت (3.14 ، 2.36 ، 1.97) ملي مكافىء / كغم بتركيز (0.1 ، 0.2 ، 0.3) % على التوالي اما في اليوم السابع من الخزن فكانت قيمة رقم البيروكسيد (3.328 ، 2.41 ، 2.13) ملي مكافىء / كغم على التوالي في حين ان قيم رقم البيروكسيد للعينة الضابطة ازدادت بشكل اكبر مقارنة مع المعاملات الحاوية على الانزيم اذ بلغت (3.21 ، 4.1 ، 5.25) ملي مكافىء / كغم في اليوم الاول والثالث والسابع على التوالي ، اتفقت النتائج مع Kunnath *et al*. (2013) الذي افاد الى ان لحم سمك (Pangasius) المفروم تماسك اكثر باضافة انزيم MTGase نتيجة للشبكة البروتينية المتكونة بفعل الانزيم كما انه قلل من اكسدة الدهون، واتفقت مع (Aref *et al*. (2016 الذي بين ان اضافة انزيم MTGase بتركيز 0.5% الى اصابع سمك السلور ادى الى خفض قيمة رقم البيروكسيد (PV) والتي بلغت 1.78 ملي مكافىء / كغم مقارنة مع العينة الضابطة خلال فترة الخزن والتي كانت فيها قيمة رقم البيروكسيد 3.19 ملي مكافىء / كغم وذلك نتيجة اضافة الانزيم التي ادت الى تقليل الاكسدة الاوليه (رقم البيروكسيد) للدهون مما ساعد على زيادة مدة الحفظ .

2- حامض الثايوباربتيورك (Thiobarbituric acid (TBA) :

اوضحت النتائج في الجدول (4-8) تأثير اضافة انزيم MTGase بتراكيز (0.1 ، 0.2 ، 0.3) % على قيمة حامض الثايوبابتيورك (TBA) لاقراص اللحم البقري المفروم والمخزن بالتبريد لمدة سبعة أيام ، اذ تشير نتائج التحليل الاحصائي الى وجود فروق معنوية عند مستوى $P\leq0.05$ في اقراص اللحم المفروم المعامل بالانزيم والعينة الضابطة اذ انخفضت قيمة حامض الثايوباربتيورك لاقراص اللحم البقري المفروم المعامل بانزيم MTGase وكان الانخفاض اكثر مع زيادة تركيز الانزيم مقارنة مع العينة الضابطة التي كانت قيم الحامض مرتفعة فيها ، وقد يعود سبب انخفاض قيم حامض (TBA) في اقراص اللحم المعاملة بالانزيم الى المجاميع الفعالة التي يمتلكها الانزيم التي عملت كمضاد اكسدة ساعدت على ربط الجذور الحرة وبالتالي تقليل الاكسدة الثانوية للحم المفروم ، كما لوحظ ايضا ان قيمة حامض (TBA) ارتفعت خلال مدة الخزن لاقراص اللحم البقري المعامل بالانزيم اذ كانت في اليوم الاول (0.5853 ، 0.5342 ، 0.5136) مالونالديهايد / كغم بتركيز (0.1 ، 0.2 ، 0.3) % على التوالي كما بلغت قيمته في اليوم الثالث من الخزن بالتبريد (0.6712 ، 0.6250 ، 0.5768) مالونالديهايد / كغم بتركيز (0.1 ، 0.2 ، 0.3) % على التوالي اما في اليوم السابع من الخزن فكانت قيمة حامض TBA (0.9814 ، 0.8793 ، 0.7361) مالونالديهايد / كغم بتركيز (0.1 ، 0.2 ، 0.3) % على التوالي الا ان هذا الارتفاع في قيمة حامض TBA كان اكثر وضوحا في العينة الضابطة لاقراص اللحم البقري والتي بلغت (0.6162 ، 0.7531 ، 1.4731) مالونالديهايد / كغم لليوم الاول والثالث والسابع على التوالي من الخزن بالتبريد، اتفقت النتائج مع Aref *et al*. (2016) الذي وجد ان اصابع سمك السلور المخزون بالتجميد والمعامل بانزيم MTGase بتركيز 0.5 % انخفضت قيمة TBA له والتي بلغت 0.75 مالونالديهايد / كغم بالمقارنة مع العينة الضابطة التي كانت قيمة TBA فيها 1.33 مالونالديهايد / كغم نتيجة اضافة الانزيم التي قللت من اكسدة الدهون وبالتالي ادت الى زيادة مدة الحفظ ، واتفقت كذلك مع Ersoz *et al*. (2021) الذي وجد ان قيمة (TBA) Thiobarbituric acid لاقراص اللحم المعامل بانزيم MTGase كانت 32.73 مالونالديهايد / كغم وهي ذات قيمة اقل مقارنة مع العينة الضابطة التي بلغت نسبة TBA فيها 43.09 مالونالديهايد / كغم .

4-8-1-2 الصفات الفيزيائيةphysical properties

4-8-1-2-1 قابلية حمل الماء Water Holding Cabacity (WHC) والرقم الهيدروجيني (pH) :

اشارت النتائج المبينة في جدول (4-8) الى ان اضافة انزيم MTGase الى اقراص اللحم البقري المفروم بتركيز (0.1 ، 0.2 ، 0.3) % ادى الى زيادة حمل الماء بالمقارنة مع العينة الضابطة ، ومن خلال نتائج التحليل الاحصائي لوحظ انخفاضا معنويا عند مستوى $P\leq0.05$ في قابلية حمل الماء لاقراص اللحم البقري المفروم خلال مدة الخزن بالتبريد ولسبعة ايام الا ان هذا الانخفاض في WHC كان اكبر في العينة الضابطة ، اذ كانت قيمة WHC لاقراص اللحم المفروم للعينة الضابطة والعينات المعاملة بالانزيم في اليوم الاول (6 ، 6.5 ، 7 ، 8) مل بتركيز (0 ، 0.1 ، 0.2 ، 0.3) % على التوالي كما بلغت قيمة WHC للعينة الضابطة واقراص اللحم المفروم المعامل بالانزيم في اليوم الثالث من الخزن بالتبريد (5 ، 7 ، 7.5 ، 8) مل على التوالي اما في اليوم السابع من الخزن فقد كانت WHC للعينة الضابطة والعينات المعاملة بالانزيم (4.5 ، 6 ، 6.5 ، 7) مل على التوالي وقد يعود سبب ازدياد قابلية حمل الماء WHC بزيادة تركيز الانزيم لاقراص اللحم البقري المعامل بالانزيم ومقارنة مع العينة الضابطة ولمدة سبعة ايام من الخزن بالتبريد الى ان زيادة تركيز الانزيم ادى الى ربط الماء بشكل اكبر من بقية التراكيز والعينة الضابطة وذلك نتيجة للشبكة البروتينية التي كونها الانزيم بين المايوسين والاكتين والتي اعطت تماسكا افضل (Merenkova *et al*.,2019) ، اتفقت النتائج مع ما اشار اليه Chin and Chung, (2003) الى ان ضافة انزيم MTGase بتركيز 0.3 % الى صوصج لحم الخنزير ساعد على زيادة قابلية حمل الماء واعطى تماسك اكثر ، واتفقت ايضا مع Liang *et al*. (2020) الذي وجد ان انزيم TGase المضاف الى السوريمي المنتج من سمك الكارب ادى الى تكوين شبكة بروتينية اكثر انتضاما وتماسكا بالمقارنة مع العينة الضابطة ، كذلك اتفقت مع Ersoz *et al*. (2021) الذي لاحظ ان قابلية حمل الماء WHC كانت اعلى بالنسبة لاقراص اللحم المعامل بانزيم MTGase والتي بلغت 99.72 % مقارنة بالعينة الضابطة التي كانت WHC فيها 99.68 % .

اما بالنسبة للرقم الهيدروجيني (pH) فاظهرت نتائج التحليل الاحصائي عدم وجود فروق معنويه لاقراص اللحم المفروم المعامل بانزيم MTGase والعينة الضابطة ،اتفقت النتائج مع ما اشار اليه Chin and Chung (2003) الى ان اضافة انزيم MTGase بتركيز 0.3 % الى صوصج لحم الخنزير ليس له تأثير على الرقم الهيدروجيني لصوصج اللحم مقارنة مع العينات غير المعاملة بالانزيم ، كما وجد Dimitrakopoulou *et al*. (2005) ان الانزيم المضافة الى لحم كتف

الخنزير بتراكيز مختلفة ليس له تأثير على الرقم الهيدروجيني بالمقارنة مع العينات غير المعاملة بالانزيم

جدول (4-8) المؤشرات الكيميائية والفيزيائية للحم المفروم المعامل بانزيم MTGase وغير المعامل

مدة الحفظ يوم	التركيز	PV ملي مكافىء / كغم	TBA مالونالديهايد / كغم	WHC مل	pH
1	0	3.12	0.6162	6	5.87
	0.1	2.231	0.5853	6.5	5.89
	0.2	1.960	0.5342	7	5.89
	0.3	1.935	0.5136	8	5.89
3	0	4.1	0.7531	5	5.96
	0.1	3.14	0.6712	7	5.92
	0.2	2.36	0.6250	7.5	5.93
	0.3	1.97	0.5768	8	5.99
7	0	5.25	1.4731	4.5	6.12
	0.1	3.328	0.9814	6	6.11
	0.2	2.41	0.8793	6.5	6.14
	0.3	2.13	0.7361	7	6.19
LSD للتركيز	---	0.027	0.00070	0.4213	0.00942
LSD لمدة الحفظ	---	0.031	0.00080	0.4865	0.01088
LSD للتداخل بينهما	---	0.054	0.00139	0.8426	0.01884

3-1-8-4 نسبة الفقد بالوزن والانكماش اثناء الطبخ

بينت نتائج التحليل الاحصائي وجود انخفاض معنوي $P\leq0.05$ في النسبة المئوية للفقد بالوزن والانكماش اثناء الطبخ لاقراص اللحم البقري المفروم المعامل بانزيم MTGase بتراكيز مختلفة مقارنة مع العينة الضابطة اذ لوحظ ان نسبة الفقد في الوزن والانكماش اثناء الطبخ للعينة الضابطة في اليوم السابع من الخزن بلغت 39.06% ، 19.67% على التوالي ، اما العينات المعاملة بالانزيم فان نسبة الفقد في الوزن والانكماش اثناء الطبخ قلت تدريجيا مع زيادة تركيز الانزيم حتى بلغت 32.94% ، 13.74% على التوالي عند التركيز 0.3 % وقد يعزى ذلك نتيجة للتماسك الحاصل بفعل الربط التقاطعي للشبكة البروتينية المتكونه بين سلاسل المايوسين والاكتين بفعل الانزيم وكما مبين في الجدول (4-9) اذ ان فعالية الربط التقاطعي Cross- linking لانزيم MTGase في اللحم تعتمد على الرقم الهيدروجيني ودرجة الحرارة والقوة الايونية وشحنة سطح البروتين(Akbari *et al*.,2021) ، جاءت هذه النتائج متفقة مع Pietrasik *et al*. (2007) الذي وجد ان قوة هلام لحم الخنزير تحسنت كثيرا باضافة انزيم MTGase الذي كان له تأثير ايجابي على خصائص الترطيب والاستقرار الحراري مما ادى الى تقليل نسبة الفقد اثناء الطبخ ، كما اتفقت ايضا مع Uran *et al*. (2013) الذي اشار الى ان اضافة انزيم MTGase الى فطائر صدر الدجاج ادى الى تماسكها وقلل نسبة الفقد فيها اثناء الطبخ ، وايضا متوافقة مع ماجاء به Lee *et al*. (2017) الذي بين ان اضافة الانزيم الى اللحوم يقلل من الفقد اثناء الطبخ ويساعد على زيادة الارتباط وزيادة قابلية حمل الماء ، وكذلك اتفقت مع Erdem *et al*. (2020) الذي ذكر ان اضافة انزيم MTGase الى اقراص اللحم البقري بتركيز (0.5 ، 1) % قلل من نسبة الفقد اثناء الطبخ والتي بلغت (11.02 ، 10.80) % على التوالي مقارنة مع العينة الضابطة التي بلغت عندها نسبة الفقد 13.17% كما لاحظ ايضا ان نسبة الفقد تقل كلما زاد تركيز الانزيم .

جدول (4-9) نسبة الفقد بالوزن والانكماش اثناء الطبخ للحم البقري المفروم المعامل وغير المعامل بانزيم MTGase .

تركيز الانزيم %	نسبة الفقد بالوزن اثناء الطبخ %	نسبة الانكماش بالطبخ %
0	39.06	19.67
0.1	36.31	17.14

15.64	34.15	0.2
13.73	32.94	0.3
0.03766	0.025	قيمة LSD

4-1-8-4 التقييم الحسي لاقراص اللحم البقري المفروم :

يبين الجدول (4-10) التقييم الحسي لاقراص اللحم المفروم المعاملة والغير معاملة بالانزيم اذ لوحظ من خلال نتائج التحليل الاحصائي ان الانزيم المضاف لم يؤثرعلى اللون والنكهة للمعاملات المضاف لها الانزيم والعينة الضابطة، في حين كان التأثير معنويا ($P\leq0.05$) على صفة العصيرية والمظهر الخارجي والقبول العام عند اضافة الانزيم وبتراكيز مختلفة مقارنة مع العينة الضابطة ، قد يكون السبب في ذلك الى قدرة الانزيم على تكوين روابط تقاطعية بين جزيئات البروتين والتي جعلت من اللحم ان يكون ذو مظهر متماسك ومتجانس فضلا عن ذلك فأن زيادة قابلية حمل الماء مع زيادة تركيز الانزيم قد حسن من درجة العصيرية وبالتالي انعكس ايجابا على صفة التقبل العام للحم المفروم (Liang *et al*.,2020) ، اتفقت النتائج مع Dimitrakopoulou *et al*. (2005) الذي اشار الى ان الانزيم المضاف الى لحم كتف الخنزير ليس له تأثير على الرائحة والطعم واللون ، واتفقت ايضا مع Uran *et al*. (2013) الذي وجد ان فطائر صدر الدجاج لم يتأثر لونها باضافة انزيم MTGase مقارنة مع العينة الضابطة ، ومشابهة لنتائج Aref *et al*. (2016) الذي وجد ان الملمس والتقبل العام لعينات اصابع سمك السلور المعاملة بالانزيم بتركيز 0.5 % كان افضل من العينات غير المعاملة بالانزيم ، وايضا متوافقة مع ماجاء به Erdem *et al*. (2020) الذي بين ان اقراص اللحم البقري والدجاج المعاملة بانزيم MTGase بتركيز 0.5% و 1 % كانت اكثر تماسكا وعصيرية وذات مظهر خارجي افضل من العينة الضابطة كما ان اضافة الانزيم لم تؤثر على اللون.

جدول (4-10) التقييم الحسي لاقراص اللحم البقري المعاملة وغير المعاملة بانزيم MTGase.

تركيز الانزيم	اللون 7	النكهة 7	العصيرية 7	المظهر الخارجي 7	القبول العام 7
0	6	6	3	3	4

5.83	5.66	5.66	6	6	0.1
6	5.83	6	6	6	0.2
6.17	6.16	6.15	6	6	0.3
0.67	0.47	0.67	0.94	0.94	LSD

توزيع الدرجات ، 7 : مقبول جدا ، 6 : مقبول ، 5 : مقبول قليلا ، 4 : وسط ؛ 3 : غير مقبول قليلا ، 2 : غير مقبول ، 1 : غير مقبول جدا . 0 : العينة الضابطة .

4-8-2 تطبيق الانزيم في صناعة اللبن الرائب (Yoghurt)

من خلال الجدول (4-11) الذي يوضح اضافة انزيم MTGase الى الحليب بمعاملتين وبتراكيز مختلفة ، المعاملة الاولى (A) اضافة الانزيم الى الحليب لمدة ساعتين قبل البسترة والمعاملة الثانية (B) اضافة الانزيم مع وقت اضافة البادىء لانتاج اللبن الرائب ، فضلا عن العينات الضابطة التي لم يضاف لها الانزيم ، لوحظ من خلال نتائج التحليل الاحصائي عند مستوى $P\leq0.05$ عدم وجود فروقات معنوية عند اضافة الانزيم ولجميع المعاملات في الرقم الهيدروجيني والحموضة التسحيحية لكل فترات الخزن من اليوم الاول الى اليوم الخامس عشر مقارنة مع العينات غير المعاملة بالانزيم ، اما بالنسبة لنضوح الشرش وقابلية حمل الماء فكانت هنالك فروقات معنوية للعينات المضاف لها الانزيم مقارنة مع العينة الضابطة اذ ان نسبة نضوح الشرش كانت اقل من العينة الضابطة وكذلك قابلية حمل الماء كانت نسبتها اعلى في عينات اللبن الرائب المضاف لها الانزيم ولجميع المعاملات ، كما وجد ان اضافة الانزيم الى الحليب مع وقت اضافة البادىء كانت افضل من حيث قابلية حمل الماء ونسبة نضوح الشرش مقارنة مع اضافة الانزيم الى الحليب قبل البسترة بساعتين وذلك لكون الانزيم المضاف مع البادىء لم يثبط وبالتالي استمر بعمله خلال فترة الحضن والخزن مما اعطى نتائج افضل ، كما لوحظ ايضا ان قابلية حمل الماء ازدادت ونسبة نضوح الشرش قلت مع زيادة تركيز الانزيم والذي كان 0.03 % ولجميع المعاملات وذلك لوجود بروتينات الكازين بشكل سلاسل مفتوحة مع انخفاض درجة التركيب الثالثي ومرونة التنظيم الحلزوني لها فضلا عن غياب الاواصر ثنائية الكبريت مما جعل اضافة الانزيم مؤدية الى تكوين روابط تقاطعية وشبكة بروتينية قوية ساعدت على زيادة التماسك وقللت

من نضوح الشرش دون الحاجة الى زيادة نسبة المواد الصلبة (Bonisch *et al*.,2006) ، وجاءت هذه النتائج متفقة مع العديد من الباحثين ومنهم Farnsworth *et al*. (2006) الذي ذكر ان اضافة انزيم MTGase الى اللبن الرائب ادى الى زيادة تماسكه وقلل من نضوح الشرش بنسبة 40 % مقارنة مع العينات غير المضاف لها الانزيم نتيجة الربط التقاطعي لبروتينات الحليب بفعل الانزيم كما وجد ان الرقم الهيدروجيني لجميع العينات لم يتأثر بوجود الانزيم ، ايضا متوافقة مع نتائج Tsevdou *et al*. (2013) الذي افاد الى ان اضافة الانزيم الى اللبن الرائب ادى الى زيادة التماسك وقلل من نسبة نضوح الشرش مقارنة مع العينة الضابطة واعزى الباحث ذلك الى زيادة الروابط التقاطعية بين الجزيئات البروتينية بفعل عمل الانزيم والذي انعكس ايجابا على تكوين شبكة بروتينية متماسكة قادرة على خفض نضوح الشرش ، كذلك مع ما اشار اليه . Sanli *et al* (2014) بان اضافة انزيم MTGase الى اللبن الرائب لم يؤثر على الرقم الهيدروجيني وكذلك في تطور الحموضة بشكل ملموس مقارنة مع العينات الضابطة كما وجد ايضا ان التماسك كان واضحا في العينات المعاملة بالانزيم ، واتفقت ايضا مع Abou-Soliman *et al*. (2017) الذي وجد ان اللبن الرائب المصنع من حليب الابل والمعامل بانزيم MTGase اعطى نتائج افضل من اللبن الرائب غير المعامل بالانزيم من حيث التماسك والقدرة على الاحتفاض بالماء ، ومشابهة لنتائج كل من Gharibzahedi and Chronakis (2018) اللذان ذكرا بان اضافة الانزيم الى اللبن الرائب قلل من نسبة نضوح الشرش وزاد من قابلية حمل الماء واعطى شكل متجانس خلال فترة الخزن دون التأثير على الصفات الحسية للمنتوج ، كما توافقت النتائج ايضا مع كل من Setiadi and Ramdhani (2018) اللذان اشارا الى ان اضافة الانزيم الى اللبن الرائب قلل من نسبة نضوح الشرش وان هذا التأثير يزداد مع زيادة تركيز الانزيم كما لاحظا ان تماسك اللبن الرائب وقلة نضوح الشرش في العينات المعاملة بالانزيم مع وقت اضافة البادىء كانت افضل من العينات المعاملة بالانزيم قبل البسترة بساعتين وذلك لكون الانزيم المضاف مع البادىء لم يثبط وبالتالي اعطى تماسك اكثر وقلل من نسبة نضوح الشرش خلال فترة الخزن ، وكذلك مع ما افاد به Garcia-Gomez *et al*. (2019) بأن اضافة الانزيم الى اللبن الرائب ادى الى زيادة قوة الهلام وتقليل نسبة نضوح الشرش وزيادة في قابلية حمل الماء واعطاء شكل متجانس ومتماسك خلال فترة الخزن دون ان يؤثر سلبا على الصفات الحسية للمنتوج .

جدول (4-11) اضافة الانزيم الى اللبن الرائب بتراكيز مختلفة وباوقات مختلفة وتأثيره على الرقم الهيدروجيني والحموضة التسحيحية وبعض الصفات الفيزياوية كنسبة نضوح الشرش وقابلية حمل الماء.

المعاملة / الزمن	تركيز الانزيم	الرقم الهيدروجيني	الحموضة التسحيحية	نضوح الشرش %	قابلية حمل الماء %
اضافة انزيم MTGase مع اضافة البادىء 1 يوم	C	4.43	0.863	65	35
	B1	4.45	0.856	60	41
	B2	4.47	0.851	57.5	43
	B3	4.49	0.849	55	45
8 يوم	C	4.176	0.971	70	30
	B1	4.289	0.891	62	37.5
	B2	4.295	0.878	61	41
	B3	4.297	0.872	59	42
15 يوم	C	4.158	0.987	71	29
	B1	4.262	0.913	64	36
	B2	4.266	0.898	62	38.5
	B3	4.270	0.892	60	40.5
اضافة انزيم MTGase الى الحليب لمدة ساعتين قبل البسترة 1 يوم	A1	4.44	0.859	61	40
	A2	4.46	0.853	58	42
	A3	4.48	0.850	56	44
8 يوم	A1	4.286	0.895	63	36
	A2	4.288	0.892	62	38
	A3	4.290	0.889	60	40.5
15 يوم	A1	4.231	0.937	65	35
	A2	4.239	0.926	63	37
	A3	4.257	0.918	60.5	39
LSD للتركيز	-----	0.0063	0.0023	0.74	0.78

LSD لمدة الحفظ	------	0.0041	0.0015	0.49	0.51
LSD للتداخل بينهما	------	0.0109	0.0039	1.28	1.36

تمثل C : عينة السيطرة ، B1 : 0.01 مل/100 مل ، B2 : 0.02 مل/ 100 مل ، B3 : 0.03 مل / 100 مل ، A1 : 0.01 مل / 100 مل ، A2 : 0.02 مل / 100 مل ، A3 : 0.03 مل/ 100مل .

4-8-2-1 التقييم الحسي لعينات اللبن الرائب :

توضح النتائج المبينة في جدول (4-12) التقييم الحسي للبن الرائب المعامل والغيرمعامل بانزيم MTGase ، والتي بينت حصول تفوق معنوي عند مستوى $P\leq0.05$ لدرجات التقييم الحسي في صفة المظهر الخارجي والثباتية مقارنة مع عينات اللبن الرائب غير المعاملة بالانزيم ، نتيجة عمل الانزيم في زيادة الروابط التقاطعية بين البروتينات والتي اعطت ثباتية ومظهر خارجي افضل ، كما بينت نتائج التقييم الحسي ايضا ان اللبن الرائب المعامل بالانزيم مع وقت اضافة البادىء كان اكثر تماسكا وذو مظهر خارجي افضل من عينات اللبن الرائب المعاملة بالانزيم قبل البسترة بساعتين وهذا قد يعود الى كون الانزيم المضاف مع البادىء لم يثبط وبالتالي استمر بعمله في تكوين شبكة بروتينية قويه ومتماسكة خلال فترة الحضن والخزن مقارنة مع العينات المعاملة بالانزيم قبل البسترة ، جاءت هذه النتائج متفقة مع Sanli et al. (2014) الذي بين ان الانزيم المضاف الى عينات اللبن الرائب ادى الى تماسكها بشكل واضح كما لاحظ ان اضافة الانزيم ليس له تأثير على الطعم والرائحة ، كما اتفقت ايضا مع Ramdhani and Setiadi (2019) الذي ذكر ان الانزيم ليس له تأثير على الطعم والرائحة لعينات اللبن الرائب مقارنة مع العينات الضابطة ، كما لاحظ ايضا ان الانزيم المضاف اعطى تماسك وثبات اكثر مقارنة مع عينات اللبن الرائب غير المعامل بالانزيم خلال فترة الخزن التي استمرت 15 يوم ، وايضا متوافقه مع نتائج Garcia-Gomez *et al*. (2019) الذي أوضح ان الانزيم المضاف الى اللبن قليل الدسم ادى الى تماسكه كما ان تقبل المستهلك له كان اكثر مقارنة مع العينة الضابطة .

جدول (4-12) التقييم الحسي لعينات اللبن الرائب المعامل وغير المعامل بانزيم MTGase والمخزنه بالتبريد لمدة 15 يوم .

نوع المعاملة	تركيز الانزيم	المظهر الخارجي 5	الرائحة 5	الطعم 5	الثباتية 5
اضافة الانزيم مع وقت اضافة البادىء	C	3	4.5	4.5	3
	0.01	3.5	4.5	4.5	3.5

	0.02	4.5	4.5	4.5	4.5
	0.03	5	4.5	4.5	5
اضافة الانزيم قبل البسترة بساعتين	0.01	3.5	4.5	4.5	3.5
	0.02	4	4.5	4.5	4
	0.03	4.5	4.5	4.5	4.5
LSD للمعاملة	----	0.433	0.3034	0.3034	7.30
LSD للتركيز	----	0.612	0.4291	0.4291	10.32
LSD للتداخل بينهما	----	0.865	0.6068	0.6068	14.59

توزيع الدرجة من 5 : (1 : غير مقبول) ، (2 : مقبول) ، (3 : متوسط) ، (4 : جيد) ، (5 : جيد جدا)

5- الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions and Recommendations

5-1 الاستنتاجات

1. ان انزيم Microbial Transglutaminase(MTGase) المنتج من البكتريا الخيطية (*Streptomyces* 13) يعد احد الانزيمات التي تفرز خارج الخلية Extracellular .
2. تفوق العزلة البكتيرية *Streptomyces* S13 من انتاجها للانزيم مقارنة مع العزلات البكتيرية الاخرى .
3. اعلى انتاجية لانزيم MTGase كانت باستعمال تقنية تخمرات الحالة السائلة مقارنة مع التخمرات الصلبة.
4. التوصل الى وسط غذائي متوفر ورخيص يتمثل بمستخلص مسحوق البطاطا المحلي ذو كفاءة عالية في انتاج الانزيم من بكتريا *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92 .
5. تنقية الانزيم كانت بخطوتين الاولى الترسيب بكبريتات الامونيوم والثانية الترشيح الهلامي بتقنية AKTA Pur-25 .
6. ثباتية انزيم MTGase المنتج عند مديات حرارية وارقام هيدروجينية واسعة تراوحت بين 25 – 50 م و 5 – 6.5 على التوالي.
7. الايونات المعدنية تأثيرها متباين في فعالية انزيم MTGase اذ ان المغنيسيوم والصوديوم والليثيوم كان لها تأثير منشط في فعالية الانزيم اما الكالسيوم فلم يكن لها تاثير على الانزيم , الا ان الخارصين والنحاس ادت الى خفض فعالية الانزيم .

8. اضافة الانزيم الى اقراص اللحم البقري المفروم المخزن بالتبريد لمدة سبعة ايام قلل من الاكسدة الاولية PV والاكسدة الثانوية TBA واعطى تماسك اكثر لاقراص اللحم مقارنة مع العينات الغير معاملة بالانزيم
9. استعمال انزيم MTGase في صناعة اللبن الرائب (Yoghurt) قلل من نضوح الشرش نتيجة التماسك بفعل الاواصر التساهمية التي كونها الانزيم .

2-5 التوصيات :

1. تحديد نقطة التعادل الكهربائي (PI) للانزيم وكذلك تقدير مايحتوية من كاربوهيدرات .
2. دراسة محتوى الانزيم من الاحماض الامينية وتسلسلها في السلسلة الببتيدية باستعمال مختلف التقنيات الحديثة .
3. دراسة ومتابعة الربط التقاطعي لانزيم MTGase في الالبان واللحوم باستعمال المجهر الالكتروني SEM .
4. اجراء المزيد من التجارب حول استعمال الانزيم في الصناعات الغذائية المختلفة كأضافة الانزيم الى بعض انواع الطحين الغير صالح للخبز بسبب ضعف الشبكة الكلوتينية.

6- المصادر Refranses

6-1 المصادر العربية

الداودي ، علي محمد حسن. (1990) . الكيمياء الحيوية المتقدمة. دار الكتب للطباعة والنشر. جامعة بغداد.

دلالي ، باسل كامل. (1986). اساسيات الكيمياء الحيوية. جامعة الموصل/ وزارة التعليم العالي والبحث العلمي.

الطائي , ايمان هادي عودة , الفكيكي ضياء فالح عبدالله , محيسن رحيم جميل (2017) . تنقية وتوصيف انزيم الالينيز. Alliinase المنتج من الثوم المحلي واستخدامه في انتاج علاج مضاد للتخثر . رسالة ماجستير , علوم الاغذية والتقانات الاحيائية , كلية الزراعة , جامعة البصرة .

الطائي ، منير عبود ، الموسوي أم البشر حميد جابر . (1992). تكنولوجيا اللحوم والأسماك العملي . كلية الزراعة ، جامعة البصرة ، 142 صفحة .

جبر، حميد عبود (2004) . انتاج وتنقية انزيم كلوكوز أيزوميريز من عزلة محلية من البكتريا Streptomyces sp. HM5 مع دراسة بعض خواصه وتطبيقاته . اطروحة دكتوراه في علوم الاغذية والتقانات الاحيائية , كلية الزراعة , جامعة بغداد , 172 صفحة .

المنهل ، علاء جبار عبد (2011). تنقية وتوصيف وتقييد البيتاكالاكتوسايديز المنتج من عفن *Aspergillus oryzae* بطريقة تخمرات الحالة الصلبة وتطبيقة في بعض منتجات الالبان. اطروحة دكتوراه في التقانات الاحيائية , كلية الزراعة , جامعة البصرة , 193 صفحة.

2-6 المصادر الاجنبية

Aaltonen, T., Huumonen, I., and Myllärinen, P. (2014). Controlled transglutaminase treatment in Edam cheese-making. *International dairy journal*, 38(2), 179-182.

Aaron, L., and Torsten, M. (2019). Microbial transglutaminase: A new potential player in celiac disease. *Clinical Immunology*, 199, 37-43.

Abdulhameed, Z. T. (2013). The isolation and study of morphological characterization of *Streptomyces* isolated from the soil as a source of active antibiotic. *College Of Basic Education Researches Journal*, *12*(3), 745-752.

Abe, T., Chun, S. I., DiAugustine, R. P., and Folk, J. E. (1977). Rabbit liver transglutaminase: physical, chemical, and catalytic properties. *Biochemistry*, 16(25), 5495-5501.

Abou-Soliman, N. H., Sakr, S. S., and Awad, S. (2017). Physico-chemical, microstructural and rheological properties of camel-milk yogurt as enhanced by microbial transglutaminase. *Journal of food science and technology*, 54(6), 1616-1627.

Acourene, S. and Ammouche, A. (2010) Optimization of culture medium for baker's yeast, ethanol, citric acid and A-amylase production from dates syrup. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 6(6): 846-860.

Ahhmed, A. M., Kuroda, R., Kawahara, S., Ohta, K., Nakade, K., Aoki, T., and Muguruma, M. (2009a). Dependence of microbial transglutaminase on meat type in myofibrillar proteins cross-linking. *Food Chemistry*, 112(2), 354-361.

Ahhmed, A. M., Nasu, T., Huy, D. Q., Tomisaka, Y., Kawahara, S., and Muguruma, M. (2009b). Effect of microbial transglutaminase on the natural actomyosin cross-linking in chicken and beef. *Meat Science*, 82(2), 170-178.

Ahmed, M. A., El-Nimer, A. M., Mostafa, M. A., and Omar, H. (2015). Effect of fat replacer or transglutaminase on the quality of low-fat Gouda-like cheese. *World Journal of Dairy and Food Sciences*, 10(2), 170-180.

Ajinomoto (2013). Ajinomoto Foods Europe SAS. Germany. Disponível em: Accesso em: 06 fev. 2013.

Akbari, M., Razavi, S. H., & Kieliszek, M. (2021). Recent advances in microbial transglutaminase biosynthesis and its application in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*.

Al-Dhabi, N. A., Esmail, G. A., Ghilan, A. K. M., and Arasu, M. V. (2020). Isolation and screening of *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-49 from the environment of Saudi Arabia with concomitant production of lipase and protease in submerged fermentation. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *27*(1), 474-479.

Aly, M., Tork, S., Al-Garni, S., and Allam, R. (2013). Production and characterization of uricase from *Streptomyces exfoliatus* UR10 isolated from farm wastes. *Turkish Journal of Biology*, 37(5), 520-529.

Amirdivani, S., and Baba, A. S. (2011). Changes in yogurt fermentation characteristics, and antioxidant potential and in vitro inhibition of angiotensin-1 converting enzyme upon the inclusion of peppermint, dill and basil. *LWT-Food Science and Technology*, 44(6), 1458-1464.

Anderson,J.G. and Smith,J.E. (1976).Effect of temperature on filamentous fungi. In: Inhibition and Inactivation of vegetative microbes. *Symposium Society for Applid Bacteriology* (*Eds*.) .Skinner,F.A. and Hugo,W.G.London,Academic press.

Ando, H., Adachi, M., Umeda, K., Matsuura, A., Nonaka, M., Uchio, R., and Motoki, M. (1989). Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. *Agricultural and biological chemistry*, *53*(10), 2613-2617.

Anema, S. G., Lauber, S., Lee, S. K., Henle, T., and Klostermeyer, H. (2005). Rheological properties of acid gels prepared from pressure-and transglutaminase-treated skim milk. *Food Hydrocolloids*, 19(5), 879-887.

Ardiansyah, A., and Sahubawa, L. (2020). Restructuring steak from flakes of yellowfin tuna meat using low salt microbial transglutaminase (MTGase). *In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 404(1) 012073. IOP Publishing.

Aref, S., Morsy, N., Habiba, R., and Zayat, F. (2016). Effect of transglutaminase enzyme and some natural antioxidants on the quality of ready to eat catfish fingers during frozen storage. *Suez Canal University Journal of Food Sciences*, 3(1), 45-55.

Aribaud, M., Carré, M., and Martin-Tanguy, J. (1995). Transglutaminase-like activity in chrysanthemum leaf explants cultivated in vitro in relation to cell growth and hormone treatment. *Plant growth regulation*, *16*(1), 11-17.

Assisi, L., Autuori, F., Botte, V., Farrace, M. G., and Piacentini, M. (1999). Hormonal control of "tissue" transglutaminase induction during programmed cell death in frog liver. *Experimental cell research*, *247*(2), 339-346.

Atilgan, E., and Kilic, B. (2017). Effects of microbial transglutaminase, fibrimex and alginate on physicochemical properties of cooked ground meat with reduced salt level. *Journal of food science and technology*, 54(2), 303-312.

Atlas, R. M.(2006) Handbook of microbiological media for the examination of food. 2nd ed. CRC Press Taylor and Francis Group, USA. 446 p.

Al-Hulu, S. M., Al-Charrakh, A. H., & Jarallah, E. M. (2011). Antibacterial activity of Streptomyces gelaticus isolated from Iraqi soils. *Medical Journal of Babylon*, 8(3), 404-411.

Bagayoko, M. W., Babana, A. H., Kassogué, A., and Dembélé, D. (2018). Antimicrobial Activities of Four Strains of *Streptomyces* sp. Isolated from the Pond of the Village of Demba Tiarki Tara in Mali. *International Journal of Microbiology and Biotechnology*, 3(2), 44-50.

Bahrim, G., Iancu, C., Buţu, N. and Negoiţă, T. (2010). Production of a novel microbial transglutaminase using *Streptomyces* sp. polar strains. *Romanian Biotechnological Letters*, 15(2), 5197-5203.

Bak, P., Nielsen, I. L., Thøgersen, H. C., and Poulsen, C. H. (1995). A method for testing the strengthening effect of oxidative enzymes in dough. In *Wheat Structure* (pp. 361-367). Woodhead Publishing.

Baker, R.A., E.A. Baldwin and M. O. Nisperos-Carriedo (1994) . Edible coatings and films for processed foods. In " Krochta, J. M., E. A. Baldwin and

M.O.Nisperos-Carriedo.(ed.), Edible coating and films to improve food quality, Chaprter 4: 98-104" Technic Publishing Company, Inc. , Lancaster.

Batista, I., Salteiro, A. T., and Mateus, M. J. (2002). Preliminary characterization of European sardine transglutaminase. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, *11*(3-4), 57-64.

Baugreet, S., Kerry, J. P., Allen, P., Gallagher, E., and Hamill, R. M. (2018). Physicochemical characteristics of protein-enriched restructured beef steaks with phosphates, transglutaminase, and elasticised package forming. *Journal of Food Quality*, 2018, pp 1 - 11.

Basha, S. C., Rao, K. S., Venkatanagaraju, E., & Jobi, F. R. (2019). An evaluation of the geographical influence on the α-amylase bioactivity of actinomycetes-isolated from Coringa Mangroves. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(1), 775-783.

Benson, H.J.(2001) Microbiological applications laboratory manual in general microbiology, 8th ed. the McGraw-Hill Companies.478p.

Bernet, E., Claparols, I., Dondini, L., Santos, M. A., Serafini-Fracassini, D., and Torné, J. M. (1999). Changes in polyamine content, arginine and ornithine decarboxylases and transglutaminase activities during light/dark phases (of initial differentiation) in maize calluses and their chloroplasts. *Plant Physiology and Biochemistry*, 37(12), 899-909.

Berdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites. The *Journal of antibiotics*, 58(1), 1-26.

Berry, B. W. (1991). Effects of soy protein and freezing treatments on cooking loss and composition of beef patties. *Journal of Muscle Foods*, 2(2), 105-118.

Binsi, P. K., and Shamasundar, B. A. (2012). Purification and characterisation of transglutaminase from four fish species: Effect of added transglutaminase on the viscoelastic behaviour of fish mince. *Food Chemistry*, *132*(4), 1922-1929.

Bonet, A., Caballero, P. A., Gómez, M., and Rosell, C. M. (2005). Microbial transglutaminase as a tool to restore the functionality of gluten from insect-damaged wheat. *Cereal Chemistry*, 82(4), 425-430.

Bönisch, M. P., Tolkach, A., and Kulozik, U. (2006). Inactivation of an indigenous transglutaminase inhibitor in milk serum by means of UHT-treatment and membrane separation techniques. *International Dairy Journal*, 16(6), 669-678.

Boran, R., Ugur, A., Sarac, N., and Ceylan, O. (2019). Characterisation of *Streptomyces violascens* OC125-8 lipase for oily wastewater treatment. *3 Biotech*, *9*(1), 1-7.

Bouras, N., Meklat, A., Toumatia, O., Mokrane, S., Holtz, M. D., Strelkov, S. E., & Sabaou, N. (2013). Bioactive potential of a new strain of *Streptomyces* sp. PP14 isolated from Canadian soil. *African Journal of Microbiology Research*, 7(25), 3199-3208.

Bourneow, C., and Benjakul, S. (2011). Purification and characterization of microbial transglutaminase from *Enterobacter* sp. C2361. *Thai Journal of Agricultural Science*, 44(5 Special Issue), 496-504.

Bourneow, C., Benjakul, S., Sumpavapol, P., and Aran, H. (2012). Isolation and cultivation of transglutaminase-producing bacteria from seafood processing factories. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 10, 28 – 39.

Bove, P., Iacovelli, V., Tirindelli, M. C., Bianchi, D., Flammia, G. P., Cipriani, C., and Finazzi Agrò, E. (2018). Endoscopic intravesical fibrin glue application in the treatment of refractory hemorrhagic radiation cystitis: a single cohort pilot study. *Journal of endourology*, 33(2), 93-98.

Brautaset, T., Sekurova, O. N., Sletta, H., Ellingsen, T. E., Strøm, A. R., Valla, S., and Zotchev, S. B. (2000). Biosynthesis of the polyene antifungal antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei* ATCC 11455: analysis of the gene cluster and deduction of the biosynthetic pathway. *Chemistry and biology*, *7*(6), 395-403.

Brewer, J. M. (1974) . General techniques: preparation of materials. In J.M. Brewer, A.J. Pesce, RB Ashworth, eds, *Experimental Techniques in Biochemistry. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J.*, pp 1-9.

Buchert, J., Ercili Cura, D., Ma, H., Gasparetti, C., Monogioudi, E., Faccio, G., and Kruus, K. (2010). Crosslinking food proteins for improved functionality. *Annual review of food science and technology*, *1*, 113-138.

Burnouf, T., Goubran, H. A., Chen, T. M., Ou, K. L., El-Ekiaby, M., andRadosevic, M. (2013). Blood-derived biomaterials and platelet growth factors in regenerative medicine. *Blood reviews*, 27(2), 77-89.

Cadavid, A. M., Bohigas, L., Toldrà, M., Parés, D., Carretero, C., and Saguer, E. (2019). Cheese Analogue-Making Process Using Microbial Transglutaminase: Effects on Texture and Syneresis. *International Journal of Food Engineering*, 5(2), 104-110.

Canto, A. C., Lima, B. R. C., Suman, S. P., Lazaro, C. A., Monteiro, M. L. G., Conte-Junior, C. A., and Silva, T. J. (2014). Physico-chemical and sensory attributes of low-sodium restructured caiman steaks containing microbial transglutaminase and salt replacers. *Meat Science*, 96(1), 623-632.

Carvajal, P., Gibert, J., Campos, N., Lopera, O., Barbera, E., Torné, J. M., and Santos, M. (2011). Activity of maize transglutaminase overexpressed in *Escherichia coli* inclusion bodies: an alternative to protein refolding. *Biotechnology progress*, 27(1), 232-240.

Castañeda-Cisneros, Y. E., Mercado-Flores, Y., Anducho-Reyes, M. A., Álvarez-Cervantes, J., Ponce-Lira, B., Evangelista-Martínez, Z., and Téllez-Jurado, A. (2020). Isolation and Selection of *Streptomyces* Species from Semi-arid Agricultural Soils and Their Potential as Producers of Xylanases and Cellulases. *Current Microbiology*, *77*(11), 3460-3472.

Castillejos, G. R., Deleon, J. R., Vazquez, G. B., and Ruiz, O. C. (2017). Properties of fish and beef restructured by MTG derived from *Streptomyces mobaraensis* grown in media based on enzymatic hydrolysates of sorghum. *Czech Journal of Food Sciences*, 35(6), 517-521.

Cauvain, S. (2015)**.** Other cereals in breadmaking. In *Technology of breadmaking* (pp. 377-397). Springer, Cham.

Celis, F. T. (2009). Efeito da reticulação induzida pela transglutaminase e o glutaraldeido sobre as propriedades das microparticulas obtidas por coacervação complexa.

Ceresino, E. B., de Melo, R. R., Kuktaite, R., Hedenqvist, M. S., Zucchi, T. D., Johansson, E., and Sato, H. H. (2018). Transglutaminase from newly isolated *Streptomyces* sp. CBMAI 1617: Production optimization, characterization and evaluation in wheat protein and dough systems. *Food chemistry*, *241*, 403-410.

Chakanya, C., Arnaud, E., Muchenje, V., and Hoffman, L. C. (2017). Colour and oxidative stability of mince produced from fresh and frozen/thawed fallow deer (Dama dama) meat. *Meat science*, 126, 63-72.

Chantavorakit, T., Klaysubun, C., and Duangmal, K. (2021). *Streptomyces acididurans* sp. nov., isolated from peat swamp forest soil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 71(7), 004849.

Chin, K. B., and Chung, B. K. (2003). Utilization of transglutaminase for the development of low-fat, low-salt sausages and restructured meat products manufactured with pork hams and loins. *Asian-australasian journal of animal sciences*, 16(2), 261-265.

Cross,T. and Good fellow. M. (1984) . Taxanomy and classification of the *Actinomycetes*. In (Sykes .G, and skinner, F.A eds.) PP.11-112. *Actinomycetales*, Characteristics and practical importance. Academic press, London .New York.

Cruz-Diaz, K., Cobos, Á., Fernández-Valle, M. E., Díaz, O., and Cambero, M. I. (2019). Characterization of edible films from whey proteins treated with heat, ultrasounds and/or transglutaminase. Application in cheese slices packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 22, 100397.

Cui, L., Du, G., Zhang, D., Liu, H., and Chen, J. (2007). Purification and characterization of transglutaminase from a newly isolated *Streptomyces hygroscopicus*. *Food chemistry*, 105(2), 612-618.

Dagdelen, A. F., and Gocmen, D. (2007). Effects of glucose oxidase, hemicellulase and ascorbic acid on dough and bread quality. *Journal of Food Quality*, 30(6), 1009-1022.

D'Alessandro, A. G., Martemucci, G., Loizzo, P., and Faccia, M. (2019). Production of cheese from donkey milk as influenced by addition of transglutaminase. *Journal of dairy science*, 102(12), 10867-10876.

de Souza, C. F. V., Venzke, J. G., Flôres, S. H., and Ayub, M. A. Z. (2011). Enzymatic properties of transglutaminase produced by a new strain of *Bacillus circulans* BL32 and its action over food proteins. *LWT-Food Science and Technology*, *44*(2), 443-450.

De Souza, C. F., Flôres, S. H., and Ayub, M. A. Z. (2006). Optimization of medium composition for the production of transglutaminase by *Bacillus circulans* BL32 using statistical experimental methods. *Process Biochemistry*, 41(5), 1186-1192.

de Souza, C. F. V., Rodrigues, R. C., Heck, J. X., & Ayub, M. A. Z. (2008). Optimization of transglutaminase extraction produced by Bacillus circulans BL32 on solid-state cultivation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 83(9), 1306-1313.

Del-Duca, S., Bregoli, A. M., Bergamini, C., and Serafini-Fracassini, D. (1997). Transglutaminase-catalyzed modification of cytoskeletal proteins by polyamines during the germination of Malus domestica pollen. *Sexual Plant Reproduction*, 10(2), 89-95.

Delcour, J. A., Joye, I. J., Pareyt, B., Wilderjans, E., Brijs, K., and Lagrain, B. (2012). Wheat gluten functionality as a quality determinant in cereal-based food products. *Annual review of food science and technology*, 3, 469-492.

Dimitrakopoulou, M. A., Ambrosiadis, J. A., Zetou, F. K., and Bloukas, J. G. (2005). Effect of salt and transglutaminase (TG) level and processing conditions on quality characteristics of phosphate-free, cooked, restructured pork shoulder. *Meat science*, 70(4), 743-749.

Dinkci, N. (2012). The influence of transglutaminase treatment on functional properties of strained yoghurt. *J Anim Vet Adv*, 11(13), 2238-2246.

Duarte, L., Matte, C. R., Bizarro, C. V., and Ayub, M. A. Z. (2020). Transglutaminases: part I—origins, sources, and biotechnological characteristics. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *36*(1), 1-18.

Egan,H.;Kirk,R.S.and Sawyer,R(1981).Chemical analysis of food. Logman Scientific and Technical New York.

El-Hofi, M., Ismail, A., Nour, M., and Ibrahim, O. (2014). Isolation, purification and characterisation of transglutaminase from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) leaves. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, *13*(3), 267-278.

El-Nagar, G., Clowes, G., Tudorică, C. M., Kuri, V., and Brennan, C. S. (2002). Rheological quality and stability of yog-ice cream with added inulin. *International Journal of Dairy Technology*, 55(2), 89-93.

Erdem, N., Babaoğlu, A. S., Poçan, H. B., and Karakaya, M. (2020). The effect of transglutaminase on some quality properties of beef, chicken, and turkey meatballs. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(10), e14815.

Ersoz, F., Dincer, E. A., Özceik, A. T., and Mehmet, İ. N. A. N. (2021). Effect of Recombinant Transglutaminase on the Quality Characteristics of Cooked Beef Meatballs. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakultesi Derisi*, *27*(2), 209-215

Eshra, D. H., El-Iraki, S. M., and Abo Bakr, T. M. (2015). Isolation and identification of Actinomycetes transglutaminase producing strains. *International Journal of Current Science*, *18*, 76-88.

Falcone, P., Serafini-Fracassini, D., and Del Duca, S. (1993). Comparative studies of transglutaminase activity and substrates in different organs of *Helianthus tuberosus*. *Journal of plant physiology*, *142*(3), 265-273.

Farnsworth, J. P., Li, J., Hendricks, G. M., and Guo, M. R. (2006). Effects of transglutaminase treatment on functional properties and probiotic culture survivability of goat milk yogurt. *Small Ruminant Research*, 65(1-2), 113-121.

Fawzya, Y. N., Zilda, D. S., Chaniago, S., Prestisia, H. N., Lisdiyanti, P., and Khasanah, N. (2016). Screening of Indonesian *Streptomyces* sp. capable of secreting transglutaminase (MTGase) and optimization of MTGase production using different growth media. *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*, *11*(1), 13-21.

Fenelon, M. A., and Guinee, T. P. (2000). Primary proteolysis and textural changes during ripening in Cheddar cheeses manufactured to different fat contents. *International Dairy Journal*, 10(3), 151-158.

Fernandez-Bats, I., Di Pierro, P., Villalonga-Santana, R., Garcia-Almendarez, B., and Porta, R. (2018). Bioactive mesoporous silica nanocomposite films obtained from native and transglutaminase-crosslinked bitter vetch proteins. *Food Hydrocolloids*, 82, 106-115.

Folk, J. E., and Cole, P. W. (1966). Mechanism of action of guinea pig liver transglutaminase: I. Purification and properties of the enzyme: Identification of a functional cysteine essential for activity. *Journal of Biological Chemistry*, *241*(23), 5518-5525.

García-Gómez, B., Romero-Rodríguez, Á., Vázquez-Odériz, L., Muñoz-Ferreiro, N., and Vázquez, M. (2019). Skim yoghurt with microbial transglutaminase: evaluation of consumer acceptance. *CyTA-Journal of Food*, 17(1), 280-287.

García-Gómez, B., Vázquez-Odériz, M. L., Muñoz-Ferreiro, N., Romero-Rodríguez, M. Á., and Vázquez, M. (2019). Interaction between rennet source and transglutaminase in white fresh cheese production: Effect on physicochemical and textural properties. *LWT*, 113, 108279.

Garfin, D. E. (1990). Purification Procedures. electrophoretic methods. "In Methods in Enzymology" Vol. 185 (Edited. by Murray E. D.).

Gaspar, A. L. C., and de Góes-Favoni, S. P. (2015). Action of microbial transglutaminase (MTGase) in the modification of food proteins: A review. *Food chemistry*, *171*, 315-322.

Gerrard, J. A., Fayle, S. E., Wilson, A. J., Newberry, M. P., Ross, M., and Kavale, S. (1998). Dough properties and crumb strength of white pan bread as affected by microbial transglutaminase. *Journal of Food Science*, 63(3), 472-475.

Gharibzahedi, S. M. T., and Chronakis, I. S. (2018). Crosslinking of milk proteins by microbial transglutaminase: Utilization in functional yogurt products. *Food Chemistry*, 245, 620-632.

Gharibzahedi, S. M. T., Koubaa, M., Barba, F. J., Greiner, R., George, S., and Roohinejad, S. (2018). Recent advances in the application of microbial transglutaminase crosslinking in cheese and ice cream products: A review. *International journal of biological macromolecules*, 107, 2364-2374.

Genstat Release (2012).VRN International Ltd.UK.

Giosafatto, C. V. L., Rigby, N. M., Wellner, N., Ridout, M., Husband, F., and Mackie, A. R. (2012). Microbial transglutaminase-mediated modification of ovalbumin. *Food Hydrocolloids*, 26(1), 261-267.

Goodfellow, M., and Williams, S. T. (1983). Ecology of actinomycetes. *Annual review of microbiology*, *37*(1), 189-216.

Grothe, E., Moo-Young, M., and Chisti, Y. (1999). Fermentation optimization for the production of poly (β-hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. *Enzyme and Microbial Technology*, 25(1-2), 132-141.

Guerra-Rodríguez, E., and Vázquez, M. (2014). Evaluation of a novel low-cost culture medium containing exclusively milk, potato and glycerol for microbial transglutaminase production by *Streptomyces mobaraensis*. *Chemical Engineering Research and Design*, 92(4), 784-791.

Gujral, H. S., and Rosell, C. M. (2004). Functionality of rice flour modified with a microbial transglutaminase. *Journal of Cereal Science*, 39(2), 225-230.

Hammer, G. F. (1998). Microbial transglutaminase and diphosphate in finely comminuted cooked sausage. *Fleischwirtschaft* (Germany), 78(11), 1155-1159.

Harrigan, W. F. and McCance, M. E. (1976) Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic Press, London.

Harley, J.P. and Prescott, L. M. (2002). Laboratory exercises in microbiology .5th ed. The McGraw – Hill companies, U. S. A. 449

Hasani, A., Kariminik, A., and Issazadeh, K. (2014). Streptomycetes: characteristics and their antimicrobial activities. *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2 (1), 63-75

Haq, I., Ali, S., Javed, M. M., Hameed, U., Saleem, A., Adnan, F., and Qadeer, M. A. (2010). Production of alpha amylase from a randomly induced mutant strain of *Bacillus amyloliquefaciens* and its application as a desizer in textile industry. *Pak J Bot*, *42*(1), 473-484.

Heydari, A., and Pessarakli, M. (2010). A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. *Journal of biological sciences*, *10*(4), 273-290.

Hinz, K., Huppertz, T., Kulozik, U., and Kelly, A. L. (2007). Influence of enzymatic cross-linking on milk fat globules and emulsifying properties of milk proteins. *International Dairy Journal*, 17(4), 289-293.

H-Kittikun.A., Bourneow, C., and Benjakul, S. (2012). Hydrolysis of surimi wastewater for production of transglutaminase by *Enterobacter* sp. C2361 and Providencia sp. C1112. *Food chemistry*, 135(3), 1183-1191.

Ho, M. L., Leu, S. Z., Hsieh, J. F., and Jiang, S. T. (2000). Technical approach to simplify the purification method and characterization of microbial transglutaminase produced from *Streptoverticillium ladakanum*. *Journal of food science*, *65*(1), 76-80.

Hong, G. P., and Xiong, Y. L. (2012). Microbial transglutaminase-induced structural and rheological changes of cationic and anionic myofibrillar proteins. *Meat science*, 91(1), 36-42.

Hong, G. P., Chun, J. Y., Jo, Y. J., and Choi, M. J. (2014). Effects of pH-shift processing and microbial transglutaminase on the gel and emulsion characteristics of porcine myofibrillar system. *Korean journal for food science of animal resources*, 34(2), 207- 213.

Hong, P. K., Ndagijimana, M., and Betti, M. (2016). Glucosamine-induced glycation of hydrolysed meat proteins in the presence or absence of transglutaminase: Chemical modifications and taste-enhancing activity. *Food chemistry*, 197, 1143-1152.

Islam, M. S., Aktar, M. B., Rahman, M. M., and Uddin, K. M. (2014). Isolation and characterization of *Streptomyces* spp. collected from Bangladeshi soils, on the

basis of morphological and biochemical studies. *Department of Microbiology, University of Dhaka. Dhaka.*

Jin, M., Huang, J., Pei, Z., Huang, J., Gao, H., and Chang, Z. (2016). Purification and characterization of a high-salt-resistant microbial transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *133*, 6-11.

Jiang, S. T., and Lee, J. J. (1992). Purification, characterization, and utilization of pig plasma factor XIIIa. *Journal of agricultural and food chemistry*, 40(7), 1101-1107.

Jooyandeh, H., Mortazavi, S. A., Farhang, P., and Samavati, V. (2015). Physicochemical properties of set-style yoghurt as effected by microbial transglutaminase and milk solids contents. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*, 4(11S), 59-67.

Junqua, M., Duran, R., Gancet, C., and Goulas, P. (1997). Optimization of microbial transglutaminase production using experimental designs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *48*(6), 730-734.

Kaewprachu, P., Osako, K., Tongdeesoontorn, W., and Rawdkuen, S. (2017). The effects of microbial transglutaminase on the properties of fish myofibrillar protein film. *Food packaging and shelf life*, 12, 91-99.

Kampfer, P. (2012) Genus Streptomyces In: Bergey's manual of systematic bacteriology, Part B, vol 5, 2nd edn. Springer, New York, pp 1455–1517.

Kang, H., and Cho, Y. D. (1996). Purification and properties of transglutaminase from soybean (Glycine max) leaves. *Biochemical and biophysical research communications*, 223(2), 288-292.

Kashiwagi, T., Yokoyama, K. I., Ishikawa, K., Ono, K., Ejima, D., Matsui, H., and Suzuki, E. I. (2002). Crystal Structure of Microbial Transglutaminase from *Streptoverticillium mobaraense*. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(46), 44252-44260.

Kasprzyk, I., Markowska, J., and Polak, E. (2016). Effect of microbial transglutaminase on ice cream heat resistance properties-a short report. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 66(3), 227.

Kemung, H. M., Tan, L. T. H., Chan, K. G., Ser, H. L., Law, J. W. F., Lee, L. H., and Goh, B. H. (2020). Antioxidant activities of *Streptomyces* sp. strain MUSC 14 from mangrove forest soil in Malaysia. *BioMed research international*, *2020*,1-12.

Kieliszek, M., and Misiewicz, A. (2014). Microbial transglutaminase and its application in the food industry. A review. *Folia microbiologica*, *59*(3), 241-250.

Kikuchi, Y., Date, M., Yokoyama, K. I., Umezawa, Y., and Matsui, H. (2003). Secretion of active-form *Streptoverticillium mobaraense* transglutaminase by Corynebacterium glutamicum: processing of the pro-transglutaminase by a cosecreted subtilisin-like protease from *Streptomyces albogriseolus*. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(1), 358-366.

Ko, H. S., and Kim, H. S. (2009). Purification and characterization of transglutaminase from a newly isolated *Streptomyces platensis* YK-2. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 38(6), 801-806.

Kobayashi, K., Suzuki, S. I., Izawa, Y., Yokozeki, K., Miwa, K., and Yamanaka, S. (1998). Transglutaminase in sporulating cells of *Bacillus subtilis*. *The Journal of general and applied microbiology*, 44(1), 85-91.

Köksel, H., Sivri, D., Ng, P. K. W., and Steffe, J. F. (2001). Effects of transglutaminase enzyme on fundamental rheological properties of sound and bug-damaged wheat flour doughs. *Cereal chemistry*, 78(1), 26-30.

Kudre, T. G., and Benjakul, S. (2013). Combining effect of microbial transglutaminase and bambara groundnut protein isolate on gel properties of surimi from sardine (*Sardinella albella*). *Food biophysics*, 8(4), 240-249.

Kumazawa, Y., Sano, K. I., Seguro, K., Yasueda, H., Nio, N., and Motoki, M. (1997). Purification and characterization of transglutaminase from Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *Journal of Agricultural and Food chemistry*, *45*(3), 604-610.

Kunnath, S., Lekshmi, M., Chouksey, M. K., Kannuchamy, N., and Gudipati, V. (2013). Textural quality and oxidative stability of restructured pangasius mince:

effect of protein substrates mediated by transglutaminase. *Journal of Food Science and Technology*, 52(1), 351-358.

Kuraishi, C., Yamazaki, K., and Susa, Y. (2001). Transglutaminase: its utilization in the food industry. *Food reviews international*, 17(2), 221-246.

Kurth, L., and Rogers, P. J. (1984). Transglutaminase catalyzed cross-linking of myosin to soya protein, casein and gluten. *Journal of Food Science*, 49(2), 573-576.

Kusuma, A. B., Nouioui, I., Klenk, H. P., and Goodfellow, M. (2020). *Streptomyces harenosi* sp. nov., a home for a gifted strain isolated from Indonesian sand dune soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70(9), 4874- 4882.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.

Lapaz, M. I., Huguet-Tapia, J. C., Siri, M. I., Verdier, E., Loria, R., and Pianzzola, M. J. (2017). Genotypic and phenotypic characterization of *Streptomyces* species causing potato common scab in Uruguay. *Plant disease*, 101(8), 1362-1372.

Larré, C., Denery-Papini, S., Popineau, Y., Deshayes, G., Desserme, C., and Lefebvre, J. (2000). Biochemical analysis and rheological properties of gluten modified by transglutaminase. *Cereal chemistry*, 77(2), 121-127.

Lauber, S., Henle, T., and Klostermeyer, H. (2000). Relationship between the crosslinking of caseins by transglutaminase and the gel strength of yoghurt. *European Food Research and Technology*, 210(5), 305-309.

Lee, H. C., Jang, H. S., Kang, I., and Chin, K. B. (2017). Effect of red bean protein isolate and salt levels on pork myofibrillar protein gels mediated by microbial transglutaminase. *LWT-food Science and Technology*, 76, 95-100.

Lee, D. S., Matsumoto, S., Matsumura, Y., and Mori, T. (2002). Identification of the ε-(γ-glutamyl) lysine cross-linking sites in α-lactalbumin polymerized by mammalian and microbial transglutaminases. Journal of agricultural and food chemistry, 50(25), 7412-7419.

Lehmacher, A., and Bisswanger, H. (1990). Isolation and characterization of an extremely thermostable D-xylose isomerase from *Thermus aquaticus* HB 8. *Microbiology*, 136(4), 679-686.

Lesiow, T., Rentfrow, G. K., and Xiong, Y. L. (2017). Polyphosphate and myofibrillar protein extract promote transglutaminase-mediated enhancements of rheological and textural properties of PSE pork meat batters. *Meat science*, 128, 40-46.

Li, C., He, H., Wang, J., Liu, H., Wang, H. (2019) Characterization of a LALtype regulator NemR in nemadectin biosynthesis and its application for increasing nemadectin production in *Streptomyces cyaneogriseus*. Sci China Life Sci 62:394–405.

Li, H., Cui, Y., Zhang, L., Luo, X., Fan, R., Xue, C., and Han, X. (2015). Production of a transglutaminase from Zea mays in *Escherichia coli* and its impact on yoghurt properties. *International Journal of Dairy Technology*, 68(1), 54-61.

Li, H., Zhang, L., Cui, Y., Luo, X., Xue, C., and Wang, S. (2013). Expression of soluble recombinant transglutaminase from Zea mays in *Pichia pastoris*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *29*(5), 939-947.

Liang, F., Lin, L., He, T., Zhou, X., Jiang, S., and Lu, J. (2020). Effect of transglutaminase on gel properties of surimi and precocious Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) meat. *Food Hydrocolloids*, 98, 105261.

Lilley, G. R., Skill, J., Griffin, M., and Bonner, P. L. (1998). Detection of Ca2+-dependent transglutaminase activity in root and leaf tissue of monocotyledonous and dicotyledonous plants. *Plant physiology*, *117*(3), 1115-1123.

Lim, L. T., Mine, Y., and Tung, M. A. (1999). Barrier and tensile properties of transglutaminase cross-linked gelatin films as affected by relative humidity, temperature, and glycerol content. *Journal of food science*, 64(4), 616-622.

Lin, S. J., Hsieh, Y. F., Lai, L. A., Chao, M. L., and Chu, W. S. (2008). Characterization and large-scale production of recombinant *Streptoverticillium platensis* transglutaminase. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(9), 981-990.

Lin, Y. S., Chao, M. L., Liu, C. H., Tseng, M., and Chu, W. S. (2006). Cloning of the gene coding for transglutaminase from *Streptomyces platensis* and its expression in *Streptomyces lividans*. *Process Biochemistry*, *41*(3), 519-524.

Liu, Y., Lin, S., Zhang, X., Liu, X., Wang, J., and Lu, F. (2014). A novel approach for improving the yield of *Bacillus subtilis* transglutaminase in heterologous strains. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(8), 1227-1235.

Logan, N. A. and De Vos , P. (2009) Genus Bacillus In: Bergey's manual of systematic bacteriology , Second Edition, Vol.3 , Springer Dordrecht Heidelberg London New York . pp:21-128.

Lorenzen, P. C., and Schlimme, E. (1998). Properties and potential fields of application of transglutaminase preparations in dairying. *International Dairy Federation*.

Lorenzen, P. C., Neve, H., Mautner, A., and Schlimme, E. (2002). Effect of enzymatic cross-linking of milk proteins on functional properties of set-style yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 55(3), 152-157.

Lowry, O.H.; Rosobrough, N.; Far, A.L.; and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* , 193: 265-275.

Macedo, J. A. (2009). Produção, purificação, caracterização e aplicação de transglutaminase de *Streptomyces* sp. CBMAI 837.

Macedo, J. A., Sette, L. D., and Sato, H. H. (2007). Optimization of medium composition for transglutaminase production by a Brazilian soil *Streptomyces* sp. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10(4), 618-626.

Macedo, J., and Sato, H. (2009). Purification and characterization of a new transglutaminase from *Streptomyces* spp. isolated in Brazilian soil. *New Biotechnology*, (25), S125.

MacFaddin, J. F.(2000) Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria, 2nd ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, USA.

Mahmood, W. A. (2013). Production of transglutaminase by a local *Streptomyces* isolate using wheat bran. *Jordan Journal of Agricultural sciences*, 9(1), 33-41.

Maiti, P. K., Das, S., Sahoo, P., and Mandal, S. (2020). *Streptomyces* sp. SM01 isolated from Indian soil produces a novel antibiotic picolinamycin effective against multi drug resistant bacterial strains. *Scientific reports*, 10(1), 1-12.

Malinowska-Panczyk, E., and Kolodziejska, I. (2018). Changes in enzymatic activity of fish and slaughter animals meat after high pressure treatment at subzero temperatures. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, *68*(2), pp 0-0.

Maróstica, M. R., and Pastore, G. M. (2010). Some nutritional, technological and environmental advances in the use of enzymes in meat products. *Enzyme research*.pp 1-8.

Marquez, G. R., Di Pierro, P., Mariniello, L., Esposito, M., Giosafatto, C. V., and Porta, R. (2017). Fresh-cut fruit and vegetable coatings by transglutaminase-crosslinked whey protein/pectin edible films. *LWT*, 75, 124-130.

Masgutov, R., Masgutova, G., Mullakhmetova, A., Zhuravleva, M., Shulman, A., Rogozhin, A., and Rizvanov, A. (2019). Adipose-derived mesenchymal stem cells applied in fibrin glue stimulate peripheral nerve regeneration. *Frontiers in medicine*, 6(68), 1-12.

Mautner, A., Meisel, H., Lorenzen, P. C., and Schlimme, E. (1999). Bestimmung des Dipeptids ε-(γ-glutamyl) lysin aus Transglutaminase-vernetzten Proteinen mittels Aminosäurenanalyse. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 51(2), 155-163.

Merenkova, S., Zinina, O., Loretz, O., Neverova, O., and Sharaviev, P. (2019). Effect of transglutaminase and bacterial concentrates on the development of functional and technological properties of minced meat. *Polish Journal of Food And Nutrition Sciences*, 69(4), 387-396.

Metwally, M. M. E., El-Zeini, H. M., and Gazar, E. F. (2018). Impact of using transglutaminase enzyme in manufacturing low and high fat Mozzarella cheese. *Journal of food, nutrition and population health*, 2, 1-7.

Medina, J., Monreal, C. M., Orellana, L., Calabi-Floody, M., Gonzalez, M. E., Meier, S., and Cornejo, P. (2020). Influence of saprophytic fungi and inorganic additives on enzyme activities and chemical properties of the biodegradation process of wheat straw for the production of organo-mineral amendments. *Journal of environmental management*, 255, 109922.

Monogioudi, E., Faccio, G., Lille, M., Poutanen, K., Buchert, J., and Mattinen, M. L. (2011). Effect of enzymatic cross-linking of β-casein on proteolysis by pepsin. *Food Hydrocolloids*, 25(1), 71-81.

Mostafa, H. S. (2020). Microbial transglutaminase: An overview of recent applications in food and packaging. *Biocatalysis and Biotransformation*, *38*(3), 161-177.

Motoki, M., and Kumazawa, Y. (2000). Recent research trends in transglutaminase technology for food processing. *Food Science and Technology Research*, 6(3), 151-160.

Motoki, M., and Seguro, K. (1998). Transglutaminase and its use for food processing. *Trends in food science and technology*, *9*(5), 204-210.

Murray, R. K; Granner, H. K.; Mayes, P. A and Rodwell. V. W. (2000). Harper's Biochemistry. 25th ed. Appleton and Lange.

Nabila, M. I., and Kannabiran, K. (2018). Antagonistic activity of terrestrial *Streptomyces* sp. VITNK9 against Gram negative bacterial pathogens affecting the fish and shellfish in aquaculture. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 53(2), 171-183.

Nielsen, J. E., Borchert, T. V., and Vriend, G. (2001). The determinants of α-amylase pH–activity profiles. *Protein Engineering, Design and Selection*, 14(7), 505-512.

Nio, N., and Yokoyama, K.(2017). Microbial transglutaminase: from discovery to market, (*Ajinomoto Co. Inc., Japan*).1-8.

Noda, S., Miyazaki, T., Tanaka, T., Chiaki, O., and Kondo, A. (2013). High-level production of mature active-form *Streptomyces mobaraensis* transglutaminase via pro-transglutaminase processing using *Streptomyces lividans* as a host. *Biochemical engineering journal*, *74*, 76-80.

Nur'amaliyah, L. S., Zilda, D. S., and Mubarik, N. R. (2016). Purification and characterization of transglutaminase from local *Streptomyces* sp. TTA 02 SDS 14. *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*, *11*(3), 75-83.

Ogilvie, O., Roberts, S., Sutton, K., Larsen, N., Gerrard, J., and Domigan, L. (2021). The use of microbial transglutaminase in a bread system: A study of gluten protein structure, deamidation state and protein digestion. *Food Chemistry*, 340, 127903.

Ohashi, H., Itoh, Y., Birckbichler, P. J., and Takeuchi, Y. (1995). Purification and characterization of rat brain transglutaminase. The *Journal of Biochemistry*, 118(6), 1271-1278.

Ohtsuka, T., Umezawa, Y., Nio, N., and Kubota, K. (2001). Comparison of deamidation activity of transglutaminases. *Journal of Food Science*, 66(1), 25-29.

Özçelik, A. T., Ersöz, F., and İnan, M. (2019). Extracellular production of the recombinant bacterial transglutaminase in Pichia pastoris. *Protein expression and purification*, *159*, 83-90.

Ozer, B., Kirmaci, H. A., Oztekin, S., Hayaloglu, A., & Atamer, M. (2007). Incorporation of microbial transglutaminase into non-fat yogurt production. *International dairy journal*, 17(3), 199-207.

Palmer, T. (1985). Understanding Enzyme. 2nd ed. Ellis Harwood Limited.

Panesar, P. S., Panesar, R., Singh, R. S., Kennedy, J. F., and Kumar, H. (2006). Microbial production, immobilization and applications of β-D-galactosidase. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology: International Research in Process, Environmental and Clean Technology*, 81(4), 530-543.

Park, Y. K., De Santi, M. S. S., & Pastore, G. M. (1979). Production and characterization of β-galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Food Science*, 44(1), 100-103.

Pescador-Piedra, J. C., Garrido-Castro, A., Chanona-Pérez, J., Farrera-Rebollo, R., Gutiérrez-López, G., and Calderon-Dominguez, G. (2009). Effect of the addition of mixtures of glucose oxidase, peroxidase and xylanase on rheological and breadmaking properties of wheat flour. *International Journal of Food Properties*, 12(4), 748-765.

Pietrasik, Z., and Li-Chan, E. C. Y. (2002). Binding and textural properties of beef gels as affected by protein, κ-carrageenan and microbial transglutaminase addition. *Food Research International*, 35(1), 91-98.

Pietrasik, Z., Jarmoluk, A., and Shand, P. J. (2007). Effect of non-meat proteins on hydration and textural properties of pork meat gels enhanced with microbial transglutaminase. *LWT-Food Science and Technology*, 40(5), 915-920.

Pires, C., Ramos, C., Teixeira, G., Batista, I., Mendes, R., Nunes, L., and Marques, A. (2011). Characterization of biodegradable films prepared with hake proteins and thyme oil. *Journal of Food Engineering*, 105(3), 422-428.

Porta, R., Di Pierro, P., Sabbah, M., Regalado-Gonzales, C., Mariniello, L., Kadivar, M., and Arabestani, A. (2016). Blend films of pectin and bitter vetch (*Vicia ervilia*) proteins: Properties and effect of transglutaminase. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 36, 245-251.

Potumarthi, R., Ch, S., and Jetty, A. (2007). Alkaline protease production by submerged fermentation in stirred tank reactor using *Bacillus licheniformis* NCIM-2042: effect of aeration and agitation regimes. *Biochemical Engineering Journal*, 34(2), 185-192.

Prakasan, V., Chawla, S. P., and Sharma, A. (2015). Effect of transglutaminase treatment on functional properties of paneer. *International journal of current microbiology and applied sciences*, 4(5), 227-238.

Procópio, R. E. D. L., Silva, I. R. D., Martins, M. K., Azevedo, J. L. D., and Araújo, J. M. D. (2012). Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, *16*(5), 466-471.

Puszkin, E. G., and Raghuraman, V. (1985). Catalytic properties of a calmodulin-regulated transglutaminase from human platelet and chicken gizzard. *Journal of Biological Chemistry*, *260*(29), 16012-16020.

Pyrcz, J., Kowalski, R., Kostecki, A., and Danyluk, B. (2014). Technologiczna przydatność enzymu transglutaminazy soli fosforanowej produkcji kutrowanych kiełbas parzonych. *Aparatura Badawcza i Dydaktyczna*, 19(4), 315-320.

Ragkousi, K., and Setlow, P. (2004). Transglutaminase-mediated cross-linking of GerQ in the coats of *Bacillus subtilis* spores. *Journal of bacteriology*, *186*(17), 5567-5575.

Rahman, A. and Ul-Islam, A., (2008). Isolation and identification of *Streptomyces* species from Bangladeshi soil and studies on their secondary metabolites (ph.D, University of Rajshahi), pp 1-130.

Ramdhani, J. P. (2018). Effect of transglutaminase addition to chemical, physical, and culture survivability of yogurt during storage period. In *E3S Web of Conferences* (Vol. 67, p. 03042). EDP Sciences.

Ramdhani, J. P., and Setiadi. (2019, March). Effect of transglutaminase addition on conductivity and functional properties of yogurt. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 2085, No. 1, p. 020034). AIP Publishing LLC.

Ramirez-Rodriguez, L., Stepanian-Martinez, B., Morales-Gonzalez, M., and Diaz, L. (2018). Optimization of the Cytotoxic Activity of Three *Streptomyces* Strains Isolated from Guaviare River Sediments (Colombia, South America). *BioMed research international*, pp 1-14.

Razavian, S. M. H., Kashfi, A., and Khoshraftar, Z. (2020). Purification of bovine liver transglutaminase by gel filtration. *Applied Biological Chemistry*, *63*(1), 1-7.

Rosana, Y., Matsuzawa, T., Gonoi, T., and Karuniawati, A. (2014). Modified slide culture method for faster and easier identification of dermatophytes. *Microbiology Indonesia*, 8(3), 7-7.

Rossa, P. N., Burin, V. M., and Bordignon-Luiz, M. T. (2012). Effect of microbial transglutaminase on functional and rheological properties of ice cream with different fat contents. *LWT-Food Science and Technology*, 48(2), 224-230.

Rostamzad, H., Paighambari, S. Y., Shabanpour, B., Ojagh, S. M., and Mousavi, S. M. (2016)**.** Improvement of fish protein film with nanoclay and transglutaminase for food packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 7, 1-7.

Sahan, N., Yasar, K., Hayaloglu, A. A., Karaca, O. B., and Kaya, A. (2008). Influence of fat replacers on chemical composition, proteolysis, texture profiles, meltability and sensory properties of low-fat Kashar cheese. *The Journal of dairy research*, 75(1), 1- 7.

Sakamoto, H., and Soeda, T. (1991). Minced meat products containing transglutaminase. *Jpn Kokai Tokkyo Koho JP*, 3175929.

Sambrook J. and Russell D. W. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. CSH Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York, USA.

Sambrook, J.; Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning and laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor ,New York. pp: 8.46-8.49.

Sanglier, J.J., Wellington, E.M.H, Behal, V. Feidler, H.P., Ghrobel, R.E., Finance, C.,Hacene, M., Kamoun, A., Kelly, C., Mercer, D.K., Prinzis, S. and Tringo, C.,(1993). Novel bioactive compounds from actinomycetes. Res. Microbiol. 144: 661-663.

Şanlı, T., Şenel, E., Sezgin, E., and Benli, M. (2014). The effects of using transglutaminase, exopolysaccharide-producing starter culture and milk powder on the physicochemical, sensory and texture properties of low-fat set yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 67(2), 237-245.

Şanlı, T., Sezgin, E., Deveci, O., Şenel, E., and Benli, M. (2011). Effect of using transglutaminase on physical, chemical and sensory properties of set-type yoghurt. *Food Hydrocolloids*, 25(6), 1477-1481.

Şanlidere-Aloğlu, H., Özcan, Y., Karasu, S., Çetin, B., and Sağdiç, O. (2018). Influence of transglutaminase treatment on the physicochemical, rheological, and melting properties of ice cream prepared from goat milk. *Mljekarstvo: časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka*, 68(2), 126-138.

Santhi, D., Kalaikannan, A., Malairaj, P., and Arun Prabhu, S. (2017). Application of microbial transglutaminase in meat foods: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(10), 2071-2076.

Sarkar, N. K., Clarke, D. D., and Waelsch, H. (1957). An enzymically catalyzed incorporation of amines into proteins, 25, 451-452.

Sayadi, A., Madadlou, A., and Khosrowshahi, A. (2013). Enzymatic cross-linking of whey proteins in low fat Iranian white cheese. *International Dairy Journal*, *29*(2), 88-92.

Schuppan, D., Dennis, M. D., and Kelly, C. P. (2005). Celiac disease: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and nutritional management. *Nutrition in Clinical Care*, 8(2), 54-69.

Segel, I.H. (1976). Biochemical calculations. 2nd Edition, John and sons. Inc. New York

Seltman, H. J. (2015). Handbook of Experiment design and analysis . Retrieved January , 15 P.428.

Serafini-Fracassini, D., Del Duca, S., Monti, F., Poli, F., Sacchetti, G., Bregoli, A. M., and Della Mea, M. (2002). Transglutaminase activity during senescence and programmed cell death in the corolla of tobacco (*Nicotiana tabacum*) flowers. *Cell Death and Differentiation*, *9*(3), 309-321.

Setiadi and Ramdhani, J. P., (2018). Effect of transglutaminase addition to chemical, physical, and culture survivability of yogurt during storage period. In *E3S Web of Conferences* (Vol. 67, p. 03042). EDP Sciences.

Sheik, G. B., Raheim, A. I. A. A., Alzeyadi, Z. A., and Ibrahim, M. (2019). Extracellular Synthesis, Characterization and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles by a Potent Isolate *Streptomyces* sp. DW102. *Asian Journal of Biological and Life Sciences*, *8*(3), 89- 96.

Sholkamy, E. N., Muthukrishnan, P., Abdel-Raouf, N., Nandhini, X., Ibraheem, I. B., and Mostafa, A. A. (2020). Antimicrobial and antinematicidal metabolites from

Streptomyces cuspidosporus strain SA4 against selected pathogenic bacteria, fungi and nematode. Saudi Journal of Biological Sciences, 27(12), 3208-3220.

Siepaio, M. P., and Meunier, J. C. F. (1995). Diamine oxidase and transglutaminase activities in white lupine seedlings with respect to crosslinking of proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *43*(5), 1151-1156.

Signorini, M., Beninati, S., and Bergamini, C. M. (1991). Identification of transglutaminase activity in the leaves of silver beet (*Beta vulgaris* L.). *Journal of plant physiology*, 137(5), 547-552.

Sirikharin, R., Söderhäll, I., and Söderhäll, K. (2018). Characterization of a cold-active transglutaminase from a crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. *Fish and shellfish immunology*, *80*, 546-549.

Soares, L. H., Assmann, F., and Záchia Ayub, M. A. (2003). Purification and properties of a transglutaminase produced by a *Bacillus circulans* strain isolated from the Amazon environment. *Biotechnology and applied biochemistry*, 37(3), 295-299.

Soltanizadeh, N., and Ghiasi-Esfahani, H. (2015). Qualitative improvement of low meat beef burger using Aloe vera. *Meat science*, 99, 75-80.

Sorapukdee, S., and Tangwatcharin, P. (2018). Quality of steak restructured from beef trimmings containing microbial transglutaminase and impacted by freezing and grading by fat level. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 31(1), 129.

Sorde, K. L., and Ananthanarayan, L. (2019). Isolation, screening, and optimization of bacterial strains for novel transglutaminase production. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, *49*(1), 64-73.

Suzuki, S. I., Izawa, Y., Kobayashi, K., Eto, Y., Yamanaka, S., Kubota, K., and Yokozeki, K. (2000). Purification and characterization of novel transglutaminase from *Bacillus subtilis* spores. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 64(11), 2344-2351.

Tata, S., Aouiche, A., Bijani, C., Bouras, N., Pont, F., Mathieu, F., and Sabaou, N. (2019). Mzabimycins A and B, novel intracellular angucycline antibiotics produced by *Streptomyces* sp. PAL114 in synthetic medium containing L-tryptophan. *Saudi Pharmaceutical Journal*, *27*(7), 907-913.

Tatar, D., Guven, K., Spröer, C., Klenk, H. P., and Sahin, N. (2014). *Streptomyces iconiensis* sp. nov. and *Streptomyces smyrnaeus* sp. nov., two halotolerant actinomycetes isolated from a salt lake and saltern. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *64*(9), 3126-3133.

Tatar, D., Veyisoglu, A., Saygin, H., and Sahin, N. (2020). *Streptomyces boncukensis* sp. nov., isolated from saltern soil. *Archives of Microbiology*, 203(1),279-285.

Thakur, D., Yadav, A., Gogoi, B. K., and Bora, T. C. (2007). Isolation and screening of *Streptomyces* in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. *Journal de Mycologie Médicale*, 17(4), 242-249.

Thirumurugan, D., Vijayakumar, R., Vadivalagan, C., Karthika, P., and Khan, M. K. A. (2018). Isolation, structure elucidation and antibacterial activity of methyl-4, 8-dimethylundecanate from the marine actinobacterium *Streptomyces albogriseolus* ECR64. *Microbial pathogenesis*, 121, 166-172.

Tsai, G. J., Lin, S. M., and Jiang, S. T. (1996). Transglutaminase from *Streptoverticillium ladakanum* and application to minced fish product. *Journal of food science*, 61(6), 1234-1238.

Tseng, T. F., Liu, D. C., and Chen, M. T. (2000). Evaluation of transglutaminase on the quality of low-salt chicken meat balls.*Meat Science*, 55, 427–431.

Tsevdou, M. S., Eleftheriou, E. G., and Taoukis, P. S. (2013). Transglutaminase treatment of thermally and high pressure processed milk: Effects on the properties and storage stability of set yoghurt. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 17, 144-152.

Turker, I., Domurcuk, G., Tokatli, M., Isleroglu, H., and Koc, B. (2016). Enhancement of microbial transglutaminase production from *Streptomyces* sp. *Ukrainian food journal*, (5, Issue 2), 306-313.

Uran, H., and Yilmaz, I. (2018). A research on determination of quality characteristics of chicken burgers produced with transglutaminase supplementation. *Food Science and Technology*, *38*(1), 19-25.

Uran, H., Aksu, F., Yılmaz, İ., and Durak, M. Z. (2013). Transglutaminaz enziminin tavuk köftesinin kalite özelliklerine etkisi, 19(2), 331-335.

Vargas, M., Pastor, C., Chiralt, A., McClements, D. J., and Gonzalez-Martinez, C. (2008). Recent advances in edible coatings for fresh and minimally processed fruits. *Critical reviews in food science and nutrition*, 48(6), 496-511.

Vinothini, G., Latha, S., Arulmozhi, M., and Dhanasekaran, D. (2019). Statistical optimization, physio-chemical and bio-functional attributes of a novel exopolysaccharide from probiotic *Streptomyces griseorubens* GD5. *International journal of biological macromolecules*, *134*, 575-587.

Wen-Qiong, W., Lan-Wei, Z., Xue, H., and Yi, L. (2017). Cheese whey protein recovery by ultrafiltration through transglutaminase (TG) catalysis whey protein cross-linking. *Food chemistry*, 215, 31-40.

Whitaker, J. R. (1972). The glycoside hydrolases. *Principles of Enzymology for the Food Science*. Marcel Dekker Inc, New York City, NY, USA, 433.

Williams, S. T., Goodfellow, M., Wellington, E. M. H., Vickers, J. C., Alderson, G., Sneath, P. H. A., and Mortimer, A. M. (1983). A probability matrix for identification of some streptomycetes. Microbiology, 129(6), 1815-1830.

Worratao, A., and Yongsawatdigul, J. (2005). Purification and characterization of transglutaminase from Tropical tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Food Chemistry*, 93(4), 651-658.

Wong, W. S., Batt, C., and Kinsella, J. E. (1990). Purification and characterization of rat liver transglutaminase. The International journal of biochemistry, 22(1), 53-59.

Yasueda, H., Kumazawa, Y., and Motoki, M. (1994). Purification and characterization of a tissue-type transglutaminase from red sea bream (*Pagrus major*). *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, *58*(11), 2041-2045.

Yin, X., Li, Y., Zhou, J., Rao, S., Du, G., Chen, J., and Liu, S. (2021). Enhanced Production of Transglutaminase in *Streptomyces mobaraensis* through Random Mutagenesis and Site-Directed Genetic Modification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(10), 3144-3153.

Yokoyama, K. I., Nakamura, N., Seguro, K., and Kubota, K. (2000). Overproduction of microbial transglutaminase in *Escherichia coli*, in vitro refolding, and characterization of the refolded form. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, *64*(6), 1263-1270.

Yokoyama, K., Nio, N., and Kikuchi, Y. (2004). Properties and applications of microbial transglutaminase. Applied microbiology and *biotechnology*, 64(4), 447-454.

Zhang, L., Rao, W., Muhayimana, S., Zhang, X., Xu, J., Xiao, C., and Huang, Q. (2018). Purification and biochemical characterization of a novel transglutaminase from Mythimna separata larvae (*Noctuidae, Lepidoptera*). *Journal of biotechnology*, 265, 1-7.

Zhang, L., Yi, H., Du, M., Ma, C., Han, X., Feng, Z., and Zhang, Y. (2012). Enzymatic characterization of transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* DSM 40587 in high salt and effect of enzymatic cross-linking of yak milk proteins on functional properties of stirred yogurt. *Journal of dairy science*, *95*(7), 3559-3568.

Zhang, Y., He, S., and Simpson, B. K. (2017). A cold active transglutaminase from Antarctic krill (*Euphausia superba*): Purification, characterization and application in the modification of cold-set gelatin gel. *Food chemistry*, *232*, 155-162.

Zhao, J., Han, L., Yu, M., Cao, P., Li, D., Guo, X., and Xiang, W. (2019). Characterization of *Streptomyces sporangiiformans* sp. nov., a Novel Soil Actinomycete with Antibacterial Activity against *Ralstonia solanacearum*. *Microorganisms*, 7, 2-17.

Zheng, Z., Xu, W., Aweya, J. J., Zhong, M., Liu, S., Lun, J., and Zhang, Y. (2018). Functional domains of *Litopenaeus vannamei* transglutaminase and their involvement in immunoregulation in shrimp. *Fish and shellfish immunology*, *81*, 168-175.

Zhu, Y., Shang, X., Yang, L., Zheng, S., Liu, K., and Li, X. (2020). Purification, identification and properties of a new blue pigment produced from *Streptomyces* sp. A1013Y. *Food chemistry*, *308*, 125600.

Zilda, D. S., Fawzya, Y. N., Nur'amaliyah, L. S., Prestisia, H. N., Mubarik, N. R., and Lisdiyanti, P. (2017). Optimum Age of Starter for Microbial Transglutaminase (MTGase) Production Produced by *Streptomyces thioluteus* TTA 02 SDS 14 and Characterization of Crude Enzyme. *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*, 12(1), 11-18.

Zilda, D. Z. (2014). Microbial transglutaminase: source, production and its role to improve surimi properties. *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*, *9*(1), 35-44.

Abstract

Thirty- one bacterial isolates were obtained from three sources (soil, cow feces, buffalo feces) from different locations of Basrah city . These isolates were diagnosed after purification and study of the morphological and microscopical characterization and it is related to filamentous bacteria . these isolates were identified to be filamentous bacteria

Liquid and solid state fermentation were performed to screen and select the best isolates that have produced Transglutaminase enzyme. It has been found from our results that liquid state fermentation was produced an extracellular enzyme with high proficiency in comparison with solid state fermentation. In addition, it has been found the S13 has higher productivity with specific activity of 0.6751 U/mg. After diagnostic such as biochemical and antimicrobial tests were performed, the bacteria were found related to *Streptomyces* Genus. The 16S rRNA test was also done and it has been seen that the local bacterial isolate belongs to *Streptomyces smyrnaeus*. This isolate have been registered in NCBI gene bank under the name of *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92(LC495904).

The Optimum conditions for enzyme production from *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92 were studied and was found that the best medium for the production is Bahrim-B. which gave the highest enzymatic activity of 0.9374 U/mg and its productivity was higher among seven medium used in our project. The results stated the best carbon source was local potato powder with the substituted ratio of 100%. However, the best nitrogen source was peptone with soybean (Specific activity=1.1753 U/mg). Additionally, the optimum temperature, pH, agitation speed, inoculum volume, and incubation time were thoroughly studied and the specific activity at 30°C, 7, 200 rpm, 1 ml, and 6 days .

The crud enzyme was purified and precipitated by using Ammonium sulfate at 50-80% with the dialysate method was used for enzyme extract and the specific activity was estimated and it was 6.1196 u/mg with a yield of 64.20% and with purification fold 4.6854 folds. After that Gel filtration technique used by AKTA pure and enzyme extract was passed through Superdex-G75 column. It has seen three peaks for the enzyme extract and the enzyme activity was identified on the third peak with activity equal to 0.1264 u/ml. Gel filtration technique was used

multiple times with enzyme yield of 14.44% and purification fold 5.973 folds. The purity of the enzyme was measured by electrophoresis in polyacrylamide gel without SDS (sodium dodecyl sulphate) protein and found pure enzyme due to appearance of one protein band in the gel.

The purified enzyme characterization was studied such as molecular weight by using SDS-PAGE and it was 34 kDa. The optimum pH for enzyme activity is 5.5 with an activity of 0.1481 u/ml, while pH stability of the enzyme was between (5-6.5). The optimum temperature of the enzyme activity 45°C with activity of 0.1403 u/ml with thermal stability between (25-50°C) at which the enzyme retained its activity after 60 minute of incubation with highest activity recorded at 45°C with same incubation time.The activation energy for conversion of the substrate to the products was 12.82 kcal/mol, whereas for enzyme denaturation was 75 kcal/mol. Kinetics of the enzyme was studied and it has been found that V_{max} and K_m for the enzyme was 0.1835 u/ml, 6.0322 mM respectively by using Z-Gln-Gly as a substrate.

Inhibitors and activators effects on enzyme activity were studied at concentration 5 and 10 mM and seen that magnesium, sodium, and lithium ions have activator role in enzyme activation at both concentrations reported above. While copper and zinc were found as inhibitors for the enzyme activity with maximum effect at a concentration of 10 mM. Regarding calcium ions, adding the ions seems to not affect the enzyme activity. EDTA, Dithiothreitol, Glutathione, Cysteine compound has been noted to increase the enzyme activity at both aforementioned concentrations.

Adding the partial purifying enzyme to minced beef meat that store in the fridge for 7 days decrease the peroxide value (PV) and Thiobarbituric acid (TBA) and the crosslinking was obvious and leading to enhance the water holding capacity and decrease the loss ratio of weight and size during cooking process and this ratio decline more after increasing the enzyme concentration approaching at 32.94%, 13.74% respectively at a concentrationof 0.3%in compassion with the control samples at which the ratio of weight and size at cooking 39.6%, 19.67% respectively. Adding the enzyme has no effect on the color and flavor of the meat while the P-value was less Than 0.05 on Juiciness, texture, and overall acceptability in comparison to the control.

There were no significant statistical differences in pH and acidity after using partial purifying enzyme in the production of yoghurt and for all treatment processes and storage periods after the first and fifteenth days. However. It has been noted that adding the enzyme with starter time was best in water holding capacity and Syneresis ratio in compared to the adding enzyme for milk before the pasteurization by 2 hours. In addition, it has been seen that the water holding capacity increased whereas the Syneresis decreased by increasing the concentration of the enzyme and it was 0.03% for all treatment processes. The sensory evaluation results showed the significant statistical difference at $P \leq 0.05$ in form of appearance and stability compared to the control, and also showed that yoghurt treated with enzyme at the time of adding starter was more crosslinking and best appearance in comparison with yoghurt samples treated with the enzyme before pasteurization by 2 hours

Production, Purification and Characterization of Transglutaminase from local isolate *Streptomyces smyrnaeus* Ati-92 and it's using in some food products

A Thesis

Submitted to The College of Agriculture – The University of Basrah In Partial Fulfillment of The Requirements for The Degree of Ph.D. in Food Science (Biotechnology)

BY

Abdulridha Ati Jaafar Al-Juwaibrawi

Master of Food Science

2013

Supervised By

Prof.Dr. Alaa Jabbar Abd Al- Manhel Pro.Dr. Amal Kadhim Al-Asady

2021