DOC1

عنوان البحث : إنتاج إنزيم البيتا جالاكتوسيد يز بواسطة بكتريا حمض اللاكتيك

اسم الطالبة : خضراء مساعد عطية الزهراني

الدكتور المشرف : أ.د. رضا فؤاد علام راضي

المستخلص

انزيم البيتا جالالكتوسيديز يمكن الحصول على من مجموعه واسعه من المصادر مثل الكائنات الدقيقة، النبات والحيوان واهم وظيفه لهذا لميكروب هي تحلل اللاكتوز الى كلاً من الجلكوزوالجالاكتوزالى سكريات احاديه في اللبن والشرش وهي واحدة من اهم التطبيقات التي تستخدم في الصناعات الغذائية وهذا الانزيم يمكن ان يستخدم اما بصوره حره او مقيده. وتثبيت الانزيم تعتبر الطريقة المثلى للمحافظة على نشاط الانزيم ثباتاً عاليا. في هذه الدراسة تم عزل عشرون عينه من البكتريا من منتجات الالبان(اللبن الزبادي،الحليب المبستر ، اللبنة ، وحليب الأغنام الطازج بالاضافه الى حليب الام) من مدينة جده والتي تحتوي على بكتريا حمض اللا كتيك والمهمة في صناعة الزبادي ومشتقات الالبان حيث نستطيع الحصول على انزيم البيتا جالا كتو سيديز من هذه البكتريا . وجميع هذه العزالات تمت تنميتها على بئيه MRS خاصه لتنمية هذه البكتريا، وبعد عمل فحص على هذه البكتريا لمعرفة النوع الذي ينتج انزيم البيتا جالا كتو سيديز وذلك بزراعتها على بيئة اجار مغذي يحتوي على مادة x-gal والتي ظهرت مستعمرات خضرا اللون على سطح الطبق ،سبع عينات فقط هي التي اعطت مستعمرات خضراء للون وهذ يعتبر دليلاً على تكون الانزيم .وقمنا بتقدير كمية الانزيم المفرز وذلك باستخدام جهاز الاسبكترو فوتوميتر باستخدام مادة oNPGكمادة للتفاعل . وقد لوحظ ان هذه البكتريا تفرز انزيم داخلي وخارجي وقد كان انتاج الانزيم الداخلي الخارجي بنسب متقاربه لذلك اخترنا الانزيم الداخلي لدراسته وقد كان اعلى انتاج لهذ ا الانزيم من العزلة KH2 وبعد اختيارنا لأفضل عزله تنتج الانزيم قمنا بزراعة هذه السلالة المعزولة في بيئة سائله MRS broth وبعد ذلك ثبتنا الخلايا باستخدام مادة صوديوم الجينات. ثم قمنا بطحن الخلايا لاستخراج الانزيم. ولتعريف السلالة قمنا بعمل بالاختبارات الفسيولوجية والبيوكيمايئه المز رعيه والفحص بالمجهر الالكتروني واستخدام تقنية 16SrDNAللعزله المختاره وعرفت على انهاRK *Lactobacillus acidophilus* وعند دراسة المصادر الكربونيه اتضح ان الجلوكوز كان افضل مصدر كربوني وافضل وقت للتحضين كان 48 ساعه بعد ذلك درسنا تأثير درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني على انتاج الانزيم حيث كان افضل درجة حرارة لا نتاج الانزيم هي40ºم بينما كان افضل رقم هيدروجيني كان عند 4.8 بالإضافة الى دراسة اثر العوامل السابقة على نشاط الانزيم النقي وكان افضل درجه لنشاط الانزيم هي 35º م بينما كان افضل رقم هيدروجيني هو 6.2 كما كان اثر بعض الايونات المعدنية على نشاط الانزيم وكان معظمها مثبطا لنشاط الانزيم وبعد دراسة الخواص الفسيولوجية للأنزيم قمنا بفصل الانزيم وذلك بترسيبه في مادة كبرتيات الامونيو بتركيز 80% ثم فصله باستخدام عمود الفصل الكروماتوجرافي وقياس الوزن الجزئي للأنزيم باستخدام electrophoreses gel حيث كان الوزن الجزئي 112 كيلوا دالتون .

DOC2

Production of β-galactosidase by immobilized lactic acid bacteria

By: Khadra Musaed Ateyah Al-Zahrani

Supervised By: Prof. Dr. Reda Fouad Allam Radi

Abstract

The β-galactosidase enzyme can be obtained from microorganisms, plants, and animals. The use of β-galactosidase for the hydrolysis of lactose in milk and whey is one of the promising enzymatic applications in food and dairy processing industries. The enzyme can be used in either soluble or immobilized forms. Immobilization has been found to be convenient method to make enzyme thermo stable and to prevent the loss of enzyme activity. Twenty Lactic acid bacterial isolates were obtained from dairy product samples which were collected from Jeddah, Saudi Arabia. All the bacterial isolates were screened for the presence of β-galactosidase on MRS agar medium. Only seven bacterial isolates showed green colons on MRS (Mann, Rogosa and Sharp) agar medium containing X –gal .The amount of β-galactosidase was determined by spectrophotometry using oNPG as substrate . The highest β-galactosidase producer was the isolates KH2. A homogenization method was used for the release of β-galactosidase from lactic acid bacterial cells. For characterization of the most active isolate, it was examined with light and scanning electron microscope. Cell and culture morphology in addition to physiological characters and biochemical tests were studied. It was identified as an isolate belonging to *lactobacillus acidophilus RK*. Immobilization was used to enhance enzyme activity. The isolate *Lactobacillus* sp. was immobilized on calcium alginate beads intra-cellular and extra- cellular enzyme were determined and compared in immobilized and non-immobilized cells. Concerning the immobilized cells, both the intra-cellular and extra cellular enzymes production has higher activity compared to non immobilized cells enzyme. The effects of different factors on the enzyme production were studied. After immobilization, the maximums production was at 40^{o}C (optimum temperature) and at initial pH at 4.8. The enzyme was precipitated using 80% of ammonium sulphate and purified using Sephadox G-100 column. The optimum temperature of

pure enzyme activities was at 35^{o}C and pH was at 6.2. The molecular weight of the enzyme was 112 kDa as shown by SDS -PAGE analysis.