إنتاج وتوصيف إنزيم البولي غالاكتوروناز القلوي من سلالات بكتيرية معزولة محلياً

رأفت اسماعيل[1] و صباح يازجي[2] و بسام البلعة[3]

الملخّص

استُخدم 84 عزلة بكتيرية عُزلت من عينات محلية مختلفة من تربة وفاكهة وخضار للكشف عن إنتاج إنزيم البكتيناز باستخدام طريقة الوسط الصلب **plate assay method** وقد استخدم بكتين الحمضيات كمصدر وحيد للكربون. أبدت 13 عزلة فقط (15.5%) القدرة على إنتاج إنزيم البكتيناز، اختير منها 4 عزلات كانت قطر الهالة المتشكلة حول مستعمراتها على الطبق الصلب أكبر من 3 سم، صنفت هذه العزلات الأربع فكانت جميعها من جنس ***Bacillus***، حُدّد نوعها باستخدام نظام **API 50 CHB** إذْ تبيّن أن ثلاثاً منها من نوع ***B. subtilis*** وواحدة من نوع ***B.cereus***. اختيرت العزلة التي أعطت أعلى فعالية على الطبق وكانت ***Bacillus subtilis*** (العزلة **B30**). وُصّف إنزيم البولي غالاكتوروناز (**PG**) الذي تم الحصول عليه من هذه العزلة بدراسة الظروف المثلى لعمله. جرى الحصول على أعلى فعالية له عند درجة الحرارة 52 °م، و باهاء (**pH**) = 9 واستنتج أنه يمكن إنتاج البولي غالاكتوروناز وتوصيفه بعد تنقيته لاستخدامه في الصناعات ذات الظروف القلوية ويمكن استخدامه في معالجة مخلفات مياه مصانع الأغذية الغنية بالبكتينات.

الكلمات المفتاحية: بكتيناز، بولي غالاكتوروناز، *Bacillus*.

(1) و(2) قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة دمشق، ص. ب 30621، دمشق، سورية.

(3) هيئة الطاقة الذرية، دمشق، سورية.

Production and characterization of alkaline polygalactuoronase from locally bacterial strains

Rafat, E.[(1)], S. Yazji[(2)] and B. Albalaa[(3)]

Abstract

Eighty four bacterial strains, isolated from various local soils, vegetables and fruits in decomposition were screened to detect pectinase using citrus pectin as the sole carbon source according to solid plate assay.

Results showed that 13 strains showed ability to produce pectinase depolymerization in assay plate as evidenced by clear hydrolization halos formed around the colonies. Four strains among them presented considerable pectinolytic activity since haloes with more than 3 cm in diameter were formed. Based on morphological and chemical characteristics, 3 strains were classified as Bacillus subtilis and 1 strain as Bacillus cereus. The Bacillus subtilis (B30) strain which had the biggest halo and produced high activity of the enzyme was incubated with polygalactuoronic acid under different conditions of temperature and pH levels. This strain showed high activity to produce polygalauoronase at 52°C and pH 9.0. It was concluded that there is an ability to produce locally alkaline polygalactuoronase which can be used for manufacturing purposes, especially for treatment the west products of food processing units to remove pectins.

Keywords: Pectinase, Polygalactuoronase, Bacillus.

[(1),(2)] Food Science Dept. Fac. Agr. P.O.Box 30621 Damascus, Syria.
[(3)] Atomic energy commission of Syria.

المقدمة

تشكّل إنزيمات البكتيناز 10% تقريباً من إجمالي المستحضرات الإنزيمية المنتجة عالمياً (Semenova) وزملاؤه، 2006)، إذْ تنتج هذه الإنزيمات من مصادر ميكروبية مختلفة (بكتيريا، خمائر، فطور) (Lang وDörnenburg، 2000). يستخدم فطر *Aspergillus niger* لإنتاج هذا الإنزيم على المستوى الصناعي (Gummadi و Panda، 2003) فضلاً عن فطور أخرى مثل *Aspergillus japonicas* ، *Rhizopus stolonifer* ، *Fusarium oxysporum* (Jayani وزملاؤه، 2005). كما تنتج إنزيمات البكتيناز من عدة أنواع بكتيرية *Agrobacterium tumefaciens* *Ralstonia solanacearum*، *Bacillus sp.* تبدي إنزيمات البكتيناز المنتجة من الفطر فعالية مثلى في الوسط الحمضي في مجال باهاء (pH) بين 3 و6 في حين تعمل أغلب إنزيمات البكتيناز ذات المنشأ البكتيري بشكل مثالي في الوسط القلوي (Kashyap وملاؤه، 2000؛ Hoondal وزملاؤه، 2002)؛ ما يسمح باستخدامها في مجالات صناعية عديدة (Soares وزملاؤه، 1999). فقد حصل (Miyazaki، 1991) على الفعالية المثلى لإنزيم PG من بكتريا *Bacillus macerans* عند باهاء = 9.0، في حين كانت باهاء = 8.0 هي الأمثل لعمل إنزيم PG المنتج من بكتريا *Bacillus sp.TS47* بحسب (Takao وزملاؤه، 2000) كما وجد (Odeniy وزملاؤه، 2009 أن درجة pH 7.0 هي المثلى لعمل إنزيم بولي غالاكتوروناز المنتج من بكتيريا *Bacillus coagulans*.

تستخدم إنزيمات البكتيناز في المجال الغذائي لاستخلاص عصائر الفاكهة وتنقيتها. إذْ يكون للعصير الناتج من فاكهة غنية بالبكتين بنية جيلاتينية لزجة نتيجة ارتباطه بلب الفاكهة تؤدي إلى تخفيض مردود العصير الناتج وتزيد من صعوبة إنتاج العصير بطريقة العصر (الضغط). لذا يسهّل استخدام هذه الإنزيمات عملية العصر ويزيد المردود ويخفض لزوجة العصير الناتج (Kashyap وزملاؤه، 2000؛ Alkorta وزملاؤه، 1998) كما تستخدم هذه الإنزيمات في صناعة الشاي والقهوة (Keith وزملاؤه، 1985) وفي استخلاص الزيوت من قشور بعض الفاكهة كالحمضيات (Klug-Santner وزملاؤه، 2006) وفي إنتاج النبيذ وترويقه، ومعالجة مخلفات المياه من المصانع الغذائية (Horikoshi، 1999؛ Tanabe وزملاؤه، 1988)، فضلاً عن صناعات غير غذائية أخرى مثل صناعة الأنسجة وصناعة الورق (Viikari وLantto، 2008؛ Reid وRicard، 2000)، كما تضاف هذه الإنزيمات إلى الأعلاف لرفع قيمتها التغذوية للحيوانات (Foster وزملاؤه، 2001).

تحفّز إنزيمات البكتيناز تفكيك المواد البكتينية التي تدخل في تركيب جدر الخلايا النباتية وتعمل كمادة لاصقة تربط هذه الخلايا ببعضها. وهذه المواد البكتينية هي عبارة

عن سلاسل رئيسة وحداتها الأساسية حمض الغالاكتيورونيك مرتبطة مع بعضها بـــروابط غليكوزيدية α,1-4، ونسبة من وحدات من سكر الرامنوز (Whitaker، 1990). وسلاسل جانبية ترتبط بكل من وحدات حمض الغالاكتيورونيك والرامنوز في السلـــسلة الرئيـــسة، وتتركب من الغالاكتوز والأرابينوز (Shembekar وDhotre، 2009).

تكون المواد البكتينية مؤسترة بالميثيل بدرجات مختلفة، إذْ ترتبط بعـــض مجموعـــات الكربوكسيل لحمض الغالاكتيورونيك بمجموعات الميثيل (CH_3) بنسب مختلفة، يطلق اسم البكتين على المواد البكتينية المؤسترة، في حين تسمى المواد البكتينية غير المؤســـترة أو الحاوية على نسبة ضئيلة جداً من مجموعات الميثيـــل بحمـــض بـــولي غالاكتيورونيـــك (Cho وزملاؤه، 2001).

نتيجة لاختلاف المواد البكتينية عن بعضها، فهي تحتاج إلى إنزيمات بكتيناز متنوعـــة قادرة على تفكيكها (Gummadi وPanda، 2003) . تصنف إنزيمات البكتيناز (بحـــسب آلية عملها والركيزة التي تعمل عليها ونواتج عملية الحلمهة) في مجمـــوعتين رئيـــستين (Ramanujam وزملاؤه، 2008):

Depolymerase: تضم هذه المجموعة نوعين مـــن الإنزيمـــات: الأول هـــو إنـــزيم Polygalacturonase (PG) الذي يحفّز حلمهة الرابطة الغليكوزيدية بين وحدتي حمـــض غالاكتيورونيك غير مؤسترتين بالميثيل منتجاً وحدات من حمض الغالاكتيورونيـــك التـــي تتمتع بخاصية الإرجاع (Sakai *et al.*, 1993)، والثاني إنزيمات Lyase التي تعمل بآليـــة النزع (Elemination) إذْ تتميز نواتج هذا النـــوع باحتوائهـــا علـــى روابـــط مـــضاعفة (Jayani وزملاؤه، 2005).

Esterase: إنزيم Pectinmethylesterase الذي يحفّز نزع مجموعـــة الميثيـــل مـــن البكتين منتجاً مزيجاً من حمض البولي غالاكتيورونيك والميثانول.

تفرز إنزيمات البكتيناز من الأحياء الدقيقة خارجياً حيث وجدت هذه الإنزيمـــات فـــي طافي المزرعة، ولم تلاحظ أي فعالية لها داخل الخلية (Kelly وFogarty، 1978).

تمتلك أغلب الصناعات الغذائية مجالاً من درجة الـــ pH يـــراوح بـــين (3.0–6.0) وخاصة صناعة العصائر من الفاكهة، الذي يعدُّ مثاليـــاً لعمـــل إنزيمـــات البكتينـــاز ذات المصدر الفطري. إلا أن بعض الصناعات الأخرى التي تتم عند درجات pH معتدلـــة أو قلوية، مثل صناعة هريس الخضار وصناعة القهوة والشاي ومعالجـــة مخلفـــات الميـــاه الحاوية على مواد بكتينية، تتطلب إنزيمات بكتيناز تعمل بشكل مثالي في الوسط القلـــوي (Soares وزملاؤه، 1999). تعدُّ ثباتية إنزيمات البكتيناز ذات المصدر الفطري منخفضة نسبياً عند درجات الحرارة المرتفعة (Silley وزملاؤه، 1986)، أشارت عدة دراسات أن إنزيم البكتيناز المنتج من بكتيريا *Bacillus* يبدي فعالية مثلى في مجـــال مـــن درجـــات

الحرارة بين °C (40-70)، وقد سجّل (Soares وزملاؤه، 1999) أعلى فعالية لإنزيم PG المنتج من عدة عزلات بكتيرية من جنس *Bacillus* في مجال من درجات الحرارة بين 40 و50 °م. في حين كانت درجة الحرارة 60 °م هي المثلى للإنزيم نفسه من بكتيريا *Bacillus macerans* في المجال القلوي بحسب (Miyazaki، 1991)، وعند درجة الحرارة 70 °م للإنزيم المفرز من بكتيريا *Bacillus sp. TS47* عند باهاء 8 (Takao وزملاؤه، 2000) لذا كان الهدف من هذا البحث إنتاج إنزيم بولي غالاكتوروناز من سلالات بكتيرية معزولة محلياً من عينات مختلفة من التربة وعينات من الفاكهة بحالة فساد، واختيار العزلات الأعلى إنتاجاً لإنزيم البولي غالاكتوروناز وتوصيف هذا الإنزيم لتحديد أنسب الظروف لعمله من حيث درجة الـ pH ودرجة الحرارة.

مواد البحث وطرائقه

تم الحصول على المواد اللازمة لإنتاج هذا البحث من شركة Sigma وهذه المواد هي: بكتين حمضيات، وحمض بولي غالاكتيورونيك، وحمض د- غالاكتيورونيك، وحمض دي نتروساليسيليك (DNS).

الأحياء الدقيقة: أجريت الدراسة على (84) عزلة بكتيرية مجهولة لاختبار قدرتها على إنتاج إنزيم البولي غالاكتوروناز عُزلتْ من (135) عينة مختلفة، إذْ جمعت (74) عينة من فاكهة وخضار (بطاطا، زيتون، تفاح، ليمون، برتقال، جزر، صبار، خوخ، خيار) و(20) عينة تربة من حقول حمضيات من مناطق مختلفة من مدينة دمشق وريفها(برزة، العدوي، دوما، داريا، الغوطة الشرقية)، فضلاً عن (41) عينة من تفل الزيتون أخذت من عدة معاصر زيتون في مناطق مختلفة من إدلب وريف دمشق. أجريت عملية العزل بتحضير معلق من هذه العينات في ماء معقم ومزجت جيداً، وحضنت بدرجة 30°C مدة ساعة، ثم زرعت على وسط مغذ صلب (LB Agar) بدرجة حرارة 37°C مدة 24 ساعة. زُرِعت المستعمرات المختلفة عنً بعضها بالشكل على وسط مغذي صلب بالظروف السابقة نفسها، وحفظت العزلات النقية في وسط مغذ يحتوي % 40 غليسرول في الدرجة (20°C-). دُرِست الاختبارات الشكلية والحيوية للعَزلات المختارة للدراسة (التي أعطت أعلى فعالية على الطبق الصلب) اعتماداً على (Bergey وHolt، 2000) للوصول إلى جنس العزلات البكتيرية، وباستخدام نظام API 50 CHB لتحديد نوعها.

الكشف عن إنتاج إنزيم البكتيناز بطريقة الوسط الصلب (Plate Assay Method)

كشفت قدرة العزلات البكتيرية الـ (84) عن إنتاج إنزيم البكتيناز عن طريق زراعة معلق بكتيري (10^6 cell/ml) من كل عزلة (تم تنشيطها لمدة 24 ساعة) على وسط مغّذ صلب (pH 6.0) معقّم بدرجة حرارة 121°C مدة 15 min، يحتوي هذا الوسط على بكتينً الحمضيات كمصدر وحيد للكربون، وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 30°C مدة 48

ساعة، يتركب هذا الوسط من: Citrus Pectin (0.5%), Yeast extract (0.1%), $(NH_4)_2SO_4$ (0.14%), K_2HPO_4 (0.2%), KH2PO4 (0.2%), $MgSO_4.7H_2O$ (0.1%), Agar (1.5%) (Odeniyi و زملاؤه، 2009).

كشف إنتاج إنزيم البكتيناز بغمر سطح الطبق الذي نمت عليه البكتيريا بمحلول يود البوتاسيوم (1غ يود، 5غ يود بوتاسيوم و330 مل ماء) الذي يعمل على ترسيب المواد البكتينية السليمة غير المتفككة في حين لاتترسب السكريات الأحادية الناتجة عن التفكك الإنزيمي لهذه المواد؛ مما يسمح بظهور هالات شفافة حول المستعمرات البكتيرية حيث تفككت المواد البكتينية بفعل الإنزيم الناتج (Soares وزملاؤه، 1999). صنفت قدرة هذه العزلات على إنتاج إنزيم البكتيناز اعتماداً على قطر الهالة المتشكلة حول المستعمرة إلى: جيد جداً للعزلات التي قطر الهالة حولها أكبر من 1.5 cm ، جيد للعزلات التي قطر الهالة حولها أكبر من 1 cm، وضعيف عندما يكون قطر الهالة بين cm (1- 0.5)، وضعيف جداً للعزلات التي استطاعت النمو على الوسط دون أن تظهر هالة حول مستعمراتها Grajek، 1987) ,

تحضير الإنزيم الخام: لُقّح معلق بكتيري يحتوي 10^6 Cell/ml من العزلة المختارة (التي أبدت أعلى فعالية على الطبق) في دورق سعة 125 ml يحتوي 25 ml وسط مغذ سائل (PH 6.0) (يشبه تركيب هذا الوسط تركيب الوسط الصلب باستثناء استخدام حمض بولي غالاكتيورونيك (0.5%) كركيزة بدلاً من البكتين، ودون إضافة آغار)، وضع الدورق في حاضنة متحركة (150 rpm) بدرجة حرارة 30°C مدة 72 ساعة، تم الحصول على الطافي الحاوي على الإنزيم بتثفيل الوسط بسرعة 10,000 rpm مدة 10 دقائق بدرجة حرارة 4°C، وعُدَّتْ مستخلصاً للإنزيم الخام الذي أجريت الدراسة عليه لاحقاً.

قياس فعالية إنزيم (PG) اعتمدت طريقة (DNS) لتقدير فعالية إنزيم Polygalacturonase من خلال قياس كمية السكر المرجع الناتج عن تفكيك الإنزيم للركيزة. حيث يتألف مزيج التفاعل من 0.8 ml ركيزة (0.5% حمض بولي غالاكتيورونيك في محلول موقي Tris–(HCl pH 8.5) و0.2 ml من مستخلص الإنزيم الخام، حُضن مزيج التفاعل بدرجة حرارة 40°C مدة عشر دقائق، وقيست الامتصاصية عند طول موجة 575nm الذي يكون عنده امتصاص الضوء أعظمياً من قبل المعقد الناتج عن كل من السكر المرجع وحمض دي نترو ساليسيليك (DNS). عرّفت وحدة الفعالية لإنزيم (PG) بقدرة الإنزيم على تحرير 1 µmol من حمض الغالاكتيورونيك في الدقيقة في 1 ml في شروط التجربة.

بهدف توصيف إنزيم PG درست الظروف المثلى لعمله عند قيم مختلفة من الـــ PH ودرجات الحرارة. قدرت الفعالية الإنزيمية عند درجات pH بين (4-10) حيث استخدم لذلك محاليل موقية مختلفة، استخدم (0.1M Tris-Hcl) لمجال pH بين (8-10) والموقي 0.1M Citrate-Phosphate لمجال pH بين (4-7) وعند درجات حرارة مختلفة بين 25 و70°م.

النتائج والمناقشة

أظهرت 13 عزلة بكتيرية من أصل الـ 84 عزلة التي عُزلت من مصادر مختلفة موضحة (لجدول 1) قدرة على إنتاج إنزيم البكتيناز باستخدام طريقة الوسط الصلب الذي يحتوي البكتين كمصدر وحيد للكربون، كانت سبع منها ضعيفة جداً في إنتاج إنزيم البولي غالاكتوروناز إذْ استطاعت فقط النمو على الوسط الصلب دون أن تتشكل هالات حول مستعمراتها عند إضافة محلول اليود لكشف الفعالية الإنزيمية لها، في حين أعطت العزلات الست الأخرى هالات واضحة حول مستعمراتها على الطبق بعد غمره بمحلول اليود، ويبيّن الجدول (2) أقطار هذه الهالات على الطبق، اختير منها 4 عزلات أعطت هالات على الطبق بقطر أكبر من 3سم (الصورة 1).

الجدول (1) نوع العينات التي جمعت بهدف الحصول على العزلات البكتيرية وعددها ومناطق الحصول عليها، وعدد العزلات من كل نوع.

نوع العينة	المنطقة	عدد العينات	عدد العزلات
تربة	دمشق	12	17
تربة	ريف دمشق	8	15
بطاطا	دمشق	9	5
زيتون	ريف دمشق	5	2
تفاح	ريف دمشق	11	4
برتقال	دمشق	16	6
ليمون	دمشق	7	3
جزر	دمشق	13	4
صبار	ريف دمشق	6	3
خوخ	ريف دمشق	7	2
تفل زيتون	ادلب	32	17
تفل زيتون	ريف دمشق	9	6
المجموع	-	135	84

صنفت العزلات البكتيرية التي أعطت هالات على الطبق بقطر أعلى من 3سم فقط اعتماداً على تصنيف Bergey و Holt (2000) لتحديد جنسها، بيّنت النتائج اعتماداً على الصفات الشكلية والحيوية (الجدول 1) أنها من جنس *Bacillus*. واستخدم نظام **API 50 CHB** لتحديد نوعها، فكانت ثلاث منها من نوع *B.subtilis* أعطيت الرموز B1, B30, B79 وواحدة من نوع *B .cereus* أعطيت الرمز S3 (الجدول 3).

الجدول (2) أقطار الهالات المتشكلة حول المستعمرات للعزلات على الطبق الصلب

العزلة	قطر الهالة (سم)
B30	3.8
B1	3.4
B79	3.2
S3	3
K2	1
K1	0.8

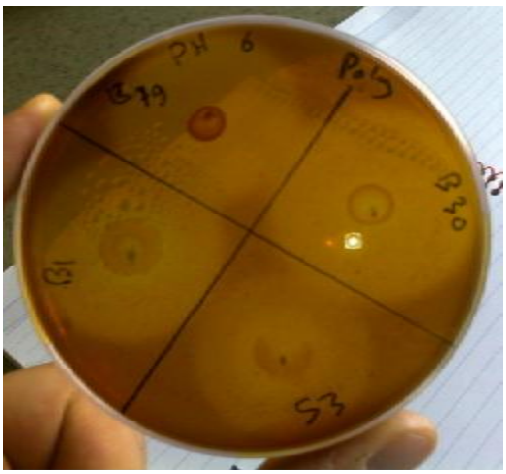
الجدول (3) نتائج الاختبارات الشكلية والحيوية للعزلات المختارة

الاختبار	النتيجة
الشكل	عصوية
الأبواغ	متبوغة
هوائية	+
الحركة	متحركة
اختبار الكاتالاز	+
اختبار الأوكسيداز	+
إرجاع النترات	+
غاز H_2S	+
الإندول	-
تخمير اللاكتوز	+
تخمير الغلوكوز	+
اختبار اليوريا	+

ويتضح في الصورة (1) الهالات المتشكلة على الطبق الصلب حول مستعمرات العزلات الأربع المختارة بعد غمرها بمحلول اليود، إذْ كان أكبر قطر للهالة المتشكلة حول مستعمرة العزلة B30 وقد بلغ 3.8 سم، فاختيرت للدراسة اللاحقة.

تأثير تركيز اللقاحة البكتيرية في إنتاج إنزيم PG:

بهدف تحديد أفضل تركيز للقاحة البكتيرية للعزلة B30 (*B.subtilis*)، يتم عنده الحصول على أعلى فعالية لإنزيم PG، درس تأثير تركيز اللقاحة البكتيرية في إنتاجه بتلقيح وسط مغذ سائل (باهاء= 6.0) يحتوي 0.5% من حمض Polygalacturonic كمصدر وحيد للكربون وبالتركيب المذكور سابقاً نفسه وبتراكيز مختلفة من المعلق البكتيري (خلية/ مل) راوحت بين10^{3} – 10^{9} وحضنت لمدة 72 ساعة مع التحريك بسرعة 150 دورة/ دقيقة بدرجة حرارة 30 °م.



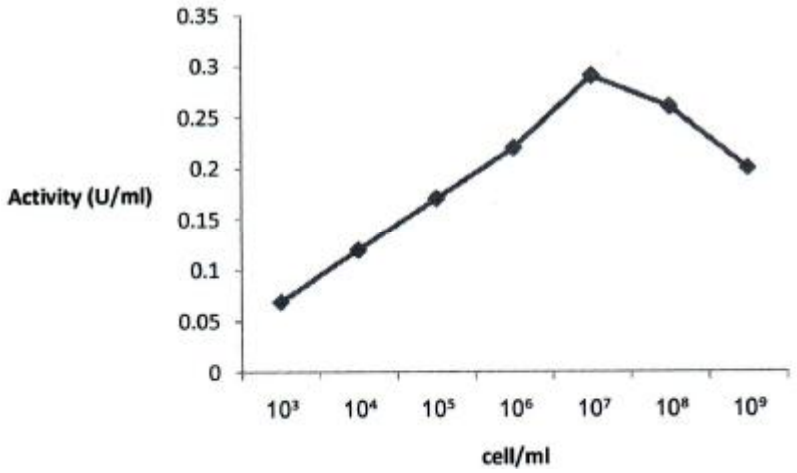
الصورة (1) الهالات المتشكلة حول العزلات الأربع على الوسط الصلب.

بتقدير الفعالية الإنزيمية بطريقة الـ DNS لوحظ ازدياد إنتاج الإنزيم مع زيادة تركيز المعلق البكتيري في الوسط حتى الوصول إلى تركيز 10^{7} خلية/ مل، حيث تم الحصول على أعلى فعالية للإنزيم، ثم بدأت الفعالية بعدها بالانخفاض (الشكل 1). تتوافق هذه النتائج مع ما وجده Babu و Satyanarayana (1995) عند دراسته لإنتاج إنزيم PG من بكتريا *B. coagulans*، ومع kaur و Satyanarayana (2004) عند إنتاجه من *Thermomucor indicaeseudaticae*.

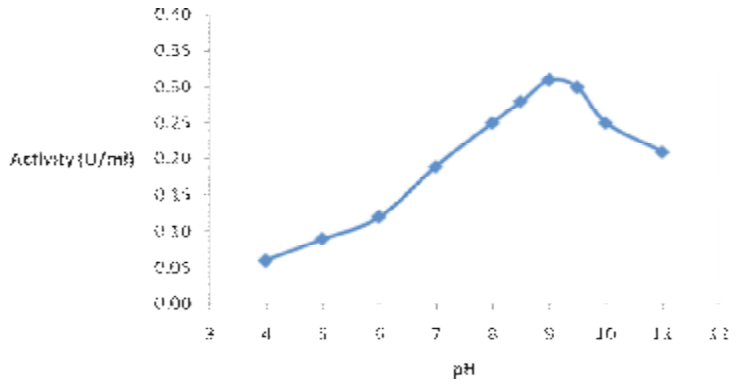
توصيف إنزيم PG:

تأثير درجة الــباهاء (pH) في فعالية إنزيمPG :

بينت النتائج (الشكل 2) أن أفضل باهاء مطلوبة لفعل إنزيم PG (المنتج من العزلــة B30) هي 9 وأخفض فعالية له عند الباهاء 4، وهــذا يتوافــق مــع ماحــصل عليــه Kashyap وزملاؤه (2000) ومع Hoondal وزملاؤه (2002).



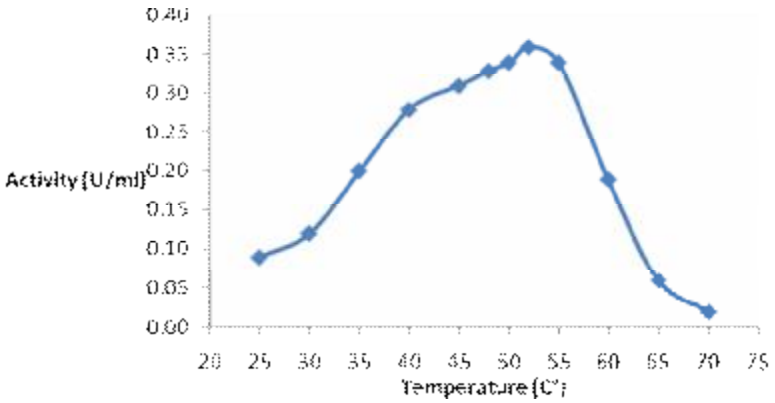
الشكل (1) فعالية إنزيم PG المنتج من العزلة B30 عند تراكيز مختلفة من المعلق البكتيري.



الشكل (2) فعالية إنزيم PG المنتج من العزلة B30 عند درجات مختلفة من الــباهاء

تأثير درجة الحرارة في فعالية إنزيم PG:

أظهرت النتائج أن فعالية هذا الإنزيم المنتج من العزلة B30 ازدادت بارتفاع درجة الحرارة حتى وصلت إلى أعلى قيمة عند درجة الحرارة 52 °م وباهاء= 9 ، ثم انخفضت مع استمرار ارتفاع درجة الحرارة حتى وصلت إلى أخفض فعالية عند درجة الحرارة 70 °م. وهذا يعود إلى تخرب الطبيعة البروتينية للإنزيم عند درجات الحرارة المرتفعة بحيث يصبح غير قادر على تحفيز التفاعل الكيميائي. وهذا يتوافق مع الديد من الدراسات(Soares وزملاؤه ، 1999؛ Miyazaki، 1991 ,؛ Takao وزملاؤه 1991).



الشكل (3) فعالية إنزيم PG المنتج من العزلة B30 عند درجات حرارة مختلفة

الاستنتاجات

يمكن الحصول على إنزيم بولي غالاكتوروناز من بكتريا *Bacillus subtilis*، الذي يتميّز بأنه يعمل بشكل مثالي في المجال القلوي (باهاء= 9.0) وبدرجات حرارة مرتفعة نسبياً 052 °م) ، كما يمكن استخدامه في معالجة مخلفات مياه مصانع الأغذية التي تحتوي نسباً مرتفعة من المواد البكتينية.

ويقترح في دراسات لاحقة أمثلة ظروف إنتاج هذا الإنزيم وتوصيفه بعد تنقيته، وعزل المورثة المسؤولة عن إنتاجه من هذه العزلة وتنسيلها.

References المراجع

Alkorta, I., C. Garbisu, M. J. Llama and J. L. Serra. 1998. Industrial applications of pectic enzymes: A review. Process Biochem., 33: 21-28.

Babu, K. R. and T. Satyanarayana. 1995. N1-Amylase production by thermophilic Bacillus coagulans in solid state fermentation. Process Biochem., 30: 305-309.

Bergey, D. H. and J.G. Holt. 2000. Bergey's manual of determinative bacteriology: Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.

Cho, S. W., S. Lee and W. Shin. 2001. The X-ray structure of Aspergillus aculeatus polygalacturonase and a modeled structure of the polygalacturonase-octagalacturonate complex. J. Molec. Biol., 311: 863-878.

Foster, B., B. Dale and J. Doran-Peterson. 2001. Enzymatic hydrolysis of ammonia-treated sugar beet pulp. Appl. Biochem. Biotechnol., 269-282.

Grajek, W. 1987. Comparative studies on the production of cellulases by thermophilic fungi in submerged and solid-state fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol., 26: 126-129.

Gummadi, S. N. and T. Panda. 2003. Purification and biochemical properties of microbial pectinases – A review. Proc. Biochem., 38: 987–996.

Hoondal, G., R. Tiwari, R. Tewari, N. Dahiya and Q. Beg. 2002. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: A review. Appl. Microbiol. Biotechnol., 59: 409-418.

Horikoshi, K. 1999. Alkaliphiles: Some Applications of Their Products for Biotechnology. Microbiol. Molec. Biol. Reviews, 63: 735-750.

Jayani, R. S., S. Saxena and R. Gupta. 2005. Microbial pectinolytic enzymes: A review. Proc. Biochem., 40: 2931-2944.

Kashyap, D. R., S. Chandra, A. Kaul and R. Tewari. 2000. Production, purification and characterization of pectinase from a Bacillus sp. DT7. W. J. Microbiol. and Biotechnol., 16, 277-282.

Kaur, P. and T. Satyanarayana. 2004. Production and Starch Saccharification by a Thermostable and Neutral Glucoamylase of a Thermophilic Mould <i>Thermomucor Indicae-Seudaticae</i&gt: W. J. Microbiol. and Biotechnol., 20:. 419-425.

Keith, F. K. M., D. L. D. Vol, R. S. Miles,P. J. Bechtel and T. R. Carr. 1985. Chemical and Sensory Properties of Thirteen Major Beef Muscles. J. Food Sc., 50: 869-872.

Kelly, C. T. and W. M. Fogarty. 1978. Production and properties of polygalacturonate lyase by an alkalophilic microorganism Bacillus sp. RK9. Canad. J. Microbiol., 24: 1164-1172.

Klug-Santner, B. G., W. Schnitzhofer, M. Vrsanská, J. Weber, P. B. Agrawal, V. A. Nierstrasz, and G. M. Guebitz. 2006. Purification and characterization of a new bioscouring pectate lyase from Bacillus pumilus BK2. J. Biotechnol., 121: 390-401.

Lang, C. and H. Dörnenburg. 2000. Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases. Appl. Microbiol. Biotechnol., 53: 366-375.

Miyazaki, Y. 1991. Purification and characterization of an endo-pectate lyase from Bacillus macerans. Agric Biol Chem, 55: 25-30.

Odeniyi, O. A., A. A. Onilude and M. a. Ayodele. 2009. Production characteristics and properties of cellulase/ polygalacturonase by a Bacillus coagulans strain from a fermenting palm-fruit industrial residue. Afric. J. Microbiol., 3: 407-417.

Ramanujam, P. k., N. Saritha and S. Palani. 2008. Production of pectin lyase by solid state fermentation of sugarcane bagasse using Aspergillus niger. Adv.. Biotechnol.. 30-33.

Reid, I. and M. Ricard. 2000. Pectinase in papermaking: solving retention problems in mechanical pulps bleached with hydrogen peroxide. Enz. Microb. Technol., 26, 115-123.

Sakai, T., T. Sakamoto, J. Hallaert and E. J. Vandamme. 1993. Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. Adv. Appl. Microbiol., 39, 213-294.

Semenova, M., O. Sinitsyna, V. Morozova, E. Fedorova, A. Gusakov, O. Okunev, et al. 2006. Use of a preparation from fungal pectin lyase in the food industry. Appl. Biochem. Microbiol., 42: 598-602.

Shembekar, V. S. and A. Dhotre. 2009. Studies of pectin degrading microorganisms from soil. J. Microb. world, 11: 216-222.

Silley, P. 1986. Production and properties of a crude pectin lyase from Lachnospira multiparus. Lett. Appl. Microbiol., 2: 29-31.

Soares, M. M. C. N., R. Silva and E. Gomes. 1999. Screening of bacterial strains for pectinolytic activity: characterization of the polygalacturonase produced by Bacillus sp. Revista de Microbiol., 30: 299-303.

Takao, M., T. Nakaniwa, K. Yoshikawa, T. Terashita and T. Sakai, T. 2000. Purification and Characterization of Thermostable Pectate Lyase with Protopectinase Activity from Thermophilic Bacillus sp. TS 47. Biosci., Biotechnol. Biochem., 64: 2360-2367.

Tanabe, H., Y. Kobayashi and I. Akamatsu. 1988. Pretreatment of pectic wastewater with pectate lyase from an alkalophilic Bacillus sp. Agric. Biological Chem., 52: 1855-1856.

Viikari, L. and R. Lantto. 2008. Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. Wiley-VCH Verlag GmbH, Finland. 271-290

Whitaker, J. R. 1990. New and future uses of enzymes in food processing. Food Biotechnology, 4: 669-697.

Received	**2012/05/08**	**إيداع البحث**
Accepted for Publ.	**2012/08/01**	**قبول البحث للنشر**