ISSN: 1991-8941

إنتاج وتوصيف أنزيم السليليز المعزول من عزلة بكتريا محلية *Cytophaga*

ظافر فخري عبد القادر الراوي
جامعة الانبار - كلية التربية - قسم علوم الحياة.

تاريخ الاستلام:2006/7/25 | تاريخ القبول:2007/1/15

الخلاصة

تهـدف الدراسة إلى إنتاج أنزيم السليليز باستعمال عزلتين من بكتريا Cytophaga اذ عزلت الاولى والتـي يرمـز لها CR1 من تربة منطقة الجزيرة في مدينة الرمادي والمزروعة بمحصول الباميا ،في حين عـزلت الثانية والتي يرمز لها CR2 من مخلفات حيوانية. استعملت نخالة الحنطة ومخلفات الذرة (الكوالح) مصدرا وحيد للكربون في الوسط ألزرعي الذي نميت عليه كل من العزلتين وذلك لتوفر هذه المخلفات بكميات كبيـرة في البيئة . أظهرت العزلة CR2 قدرة عالية في إنتاج أنزيم السليليز في الوسط ألزرعي السائل وكان أفـضل إنـتاج لهـا عـند الرقم الهيدروجيني 7.5 ودرجة حرارة 35م وباستعمال نخالة الحنطة بتركيز 1.5 %سـليلوز عند حضنها بحاضنة هزازة وبعدد دورات 125 دورة/دقيقة وحجم لقاح 1مللتر/100 مللتر وبعد 5 أيـام حـضن إذ بلغـت الفعالـية الإنـزيمية 5.976 وحدة/مللتر. أظهرت النتائج أن إضافة أيونات الكالسيوم والمغنيسيوم بصيغة كبريتات وبتركيز 0.5غم/100مللتر زاد من إنتاجية الإنزيم إذ بلغت فعالية الإنزيم 6.121 وحدة/مللتر و6.212حدة/مللتر على التوالي. نقي الإنزيم المنتج من العزلة المحليةCR2 بأتباع خطوات تنقية شـملت الترسـيب بكبـريتات الامونيوم بنسبة إشباع 90% وكروموتوغرافيا التبادل الايوني بوساطة عمود المبادل DEAE- Sepharose ،ثم الترشيح الهلامي بعمود Superdex-200 وقد أمكن استرداد 64.11% من الأنزيم وبعدد مرات تنقية 4.109 . بينت نتائج توصيف الإنزيم أن الوزن ألجزيئي له بلغ حوالي 32000 دالـتون باسـتعمال كروموتوغرافيا الترشيح الهلامي بعمود Superdex-200وأن الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالـية الانزيم هو6.0 وأن درجة الحرارة المثلى لفعالية الأنزيم كانت عند 50 م ،كذلك أشارت النتائج إلى أن الإنزيم أعطى أعلى فعالية أنزيمية بعد60 دقيقة من حضنه عند رقم هيدروجيني 6.0 ودرجة حرارة 50 م.

كلمات مفتاحية: بكتريا *Cytophaga* ، إنزيم السليليز ، كوالح الذرة ، نخالة الحنطة.

المقدمة:

يعـد الـسليلوز من المركبات الكربوهيدراتية المـتعددة الـسكريات إذ يتكون من سلاسل طويلة مستقيمة من وحدات سكر الكلوكوز المرتبطة فيما بينها بأواصر كلايكوسيدية من نوع (B,1-4) .

يـشكل الـسليلوز نـسبة عالية من مكونات النباتات إذ تصل حوالي 50% من الكتلة النباتية ، وتتـراكم كمـيات كبيرة من المخلفات النباتية في الطبيعة بما يجعلها تعتبر من الملوثات الصلبة التي تتسبب الكثير من المشاكل في البيئة ،كما أن هناك العديـد من المصادر السليلوزية في الطبيعة والتي

تـضم المخلفات الزراعية ومخلفات تصنيع الغذاء وتـصنيع الأخشاب ومخلفات الصناعات الو رقية كمـا تـشتمل علـى المخلفات الحيوانية المختلفة ،ولكـن المخلفـات النباتية هي الأهم من بين تلك المـصادر والتي يمكن بعد تحللها أن تستخدم في إنـتاج العديـد مـن المركبات المهمة التي يمكن الاستفادة منها[1] .

مـن الأمور المهمة التي لفتت نظر الباحثين هـي صعوبة تحلل السليلوز والتي تنتج من كون جـزيئاته مرتبطة بأواصر هيدروجينية مما يسبب تكون السليلوز البلوري والتي تجعل السليلوز غير ذائب في الماء [2].

يعتبر تحلل السليلوز بوساطة الطريقة الحيوية وباسـتعمال الأنـزيمات المنتجة ميكروبيا من قبل الأحـياء المجهـرية من الطرق المهمة إذ تتحول سلاسل السليلوز الطويلة إلى سلاسل قصيرة تليها خطوة أخرى تشمل كسر الأواصر (B,1-4) ومن ثـم تحـويل هذه السلاسل القصيرة إلى سكريات ذائبة [3].

ويـوجد فـي الطبـيعة عدد كبير من الأحياء المجهـرية القـادرة على إنتاج الأنزيمات المحللة للسليلوز من بينها أنواع مختلفة من البكتريا التي تختلف في متطلبات النمو[4].

وتعد بكتريا الـ Cytophaga ليست سوطية وتحـتوي أشـكال مـشابهة للسيانوباكتريا محللة للـسليلوز ويـضم جنسها عدة أنواع بما في ذلك أنواع بحرية[5].

أما نظام أنزيمات السليليز في هذا الجنس من البكتـريا فـوجد كـل مـن [6] أن بكتـريا Cytophaga WTHC2421 تنـتج نوعين من أنـزيمات الـسليليز ولهمـا أوزان جزيئية واطئة احـدهما وزنـه ألجزيئـي 6250 دالتون والثاني 8650 دالتون.

أمـا [8] فقـد اسـتعملا بكتـريا نـوع Cytophaga sp.NCIB 9497 في إنتاج أنزيم الـسليليز باستخدام المزارع المستمرة . في حين إن [9] فقـد حـصلوا علـى أفضل إنتاج للأنزيم باسـتخدام بكتـريا Cytophaga sp.LX-7 ومـصادر سليلوزية مختلفة كان أفضلها مسحوق الـسليلوز MN300 ثم الكاربوكسي مثيل سليلوز CMC .

كمـا استعملت مصادر سليلوزية مختلفة هي في معظمها عبارة عن مخلفات نباتية متنوعة في إنتاج أنزيم السليليز من قبل العديد من الباحثين إذ اسـتخدم [1] مخلفات الذرة والحشائش ومخلفات الأخـشاب فـي إنتاج الأنزيم ،كما استخدم [9] تبن الحـنطة في إنتاج الإنزيم، أما [10] فقد استخدموا نخالة الحنطة في إنتاج الأنزيم.

ان أنـزيم الـسليليز هـو الذي يحفز تحليل الـسليلوز الـذائب وغير الذائب عن طريق كسر الآصـرة الكلايكوسيدية (B,1-4) التي تربط بين وحدات الكلوكوز ،والإنزيم عبارة عن نظام إنزيمي مـن ثلاثـة مكـونات أساسـية هـي Endo- , Exo-glucanase glucanase, و-B glucosidase وعمليات تحلـل وهـضم المواد السليلوزية تتم عن طريق هذه المكونات الأساسية للنظام الإنزيمي [11].

أن إنـتاج الأنزيم يتأثر بظروف بيئية مختلفة منها الرقم الهيدروجيني pH حيث وجد أن هنالك مدى جيد من الرقم الهيدروجيني تستطيع البكتريا فـيه إنـتاج الأنـزيم وباختلاف الأحياء المجهرية المستخدمة في عملية الإنتاج هذه فقد وجد[12] أن سـلالة DLG لبكتريا Bacillus subtils تنتج الأنـزيم خارج الخلية وأن أفضل إنتاج قد تم عند الرقم الهيدروجيني 8-4 .

أما بالنسبة لدرجات الحرارة فأن الأنزيم يمكن أن ينتج من البكتريا المحبة للحرارة العالية ويكون أكثـر ثـباتا مـن الأنزيم المنتج من قبل البكتريا المحـبة للحـرارة المعتدلة أذا تم استعماله تحت درجـات حـرارة مـرتفعة ، وان درجة الحرارة

المثلى لإنتاج الأنزيم تختلف باختلاف نوع الأحياء المجهرية المستخدمة[13] .

وعلى نفس الأساس تعتبر عمليات التهوية وحجم اللقاح ونوعية المصدر الكربوني وإضافة الايونات الثنائية من العوامل المهمة التي تحدد فابلية الكائن ألمجهري في إنتاج الأنزيم وتحسين الظروف المثلى للعملية الإنتاجية ،إذ حصل [10] على أفضل إنتاج للأنزيم باستعمال الحاضنة الهزازة وبسرعة 200 دورة /دقيقة ،أما [14] فقد حصلت على أفضل إنتاج للأنزيم باستعمال كمية لقاح قدرها 1 % من حجم وسط الإنتاج من وسط الإنتاج. في حين كان لإضافة الايونات الثنائية إلى وسط الإنتاج دورا ايجابيا في زيادة قدرة الكائنات المجهرية على إنتاج الأنزيم بشرط أن تكون الإضافة بنسب معقولة ،فقد لاحظت [15] أن السلالة BPCR-16 من بكتريا Bacillus pumilus زادت من إنتاجها للأنزيم عند إضافة 1 ملي مولر من ايونات الكالسيوم إلى وسط الإنتاج.

وتعد عملية استخلاص وتنقية الأنزيم الخطوة اللاحقة المهمة التي تلي الحصول على أفضل الظروف لإنتاج الإنزيم ،إذ أن عملية التنقية مهمة من اجل الحصول على أنزيم نقي أو شبه نقي لكي يستعمل في التطبيقات المهمة التي يستعمل فيها الأنزيم ، حيث تشتمل عملية الاستخلاص والتنقية على مجموعة من الخطوات المتعاقبة والمتسلسلة الهدف منها الحصول على أنزيم نقي أو شبه نقي . ومن التطبيقات المهمة لأنزيم السليليز هو استعماله في العديد من العمليات الصناعية وكذلك في مجال التقانة الحيوية ، فقد وج العديد من الباحثين أن الأنزيم يدخل في صناعة الأنسجة والصناعات الورقية والغذائية ، وفي السنوات الأخيرة أصبح له دورا مهما في إنتاج الايثانول والوقود الحيوي [15] والدراسات الحديثة تتضمن كيفية الحصول على الأنزيم بكلف اقتصادية منخفضة ، إذ أن هنالك محاولات متعددة لاستخدام الهندسة الوراثية وهندسة البروتينات في تطوير التقنيات القادرة على تحسين استعمال أنزيم السليليز في عمليات إنتاج الطاقة البديلة وبكلف اقتصادية منخفضة جداً [16].

المواد وطرائق العمل

وسط الإنتاج:استخدمت عزلتين من بكتريا ال *Cytophaga* الأولى معزولة من تربة منطقة الجزيرة في الرمادي والمزروعة بمحصول الباميا وأعطيت الرمز المحلي CR1 والثانية معزولة من مخلفات حيوانية وأعطيت الرمز المحلي CR2 ،نميت كل من العزلتين على وسط إنتاج يتكون من كبريتات الامونيوم بتركيز2% و0.5 غم من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين و0.2 غم من كبريتات المغيسيوما المائية و20 ملغم من كلوريد الكالسيوم المائي و20 ملغم من كبريتات المنغنيز المائية و20 ملغم من كبريتات الحديدوز المائية و0.2 غم من مستخلص الخميرة و0.2غم ببتون واستعمل نوعين من المصدر الكربوني بنسبة 1% وهما كل من نخالة الحنطة ومخلفات الذرة (الكوالح) ،عقمت المزرعة وحضنت على درجة حرارة 30 م ورقم هيدروجيني7.4-7.2 ولمدة ستة أيام وباستعمال لقاح بنسبة 1% وبكثافة 6 × 610 وحدة تكوين مستعمرة / ملليتر واستخدمت تقنية الدوارق الهزازة باستعمالدوارق زجاجية سعة 250 ملليتر ووضع في كل دورق 100 ملليتر من المزرعة وكانت عدد دورات الحاضنة الهزازة 125 دورة/دقيقة.

تقدير فعالية أنزيم السليليز: قيست فعالية الأنزيم حسب طريقة[17] ثم قدرت السكريات المختزلة (الكلوكوز) حسب طريقة[18] وباستخدام جهاز المطياف الضوئي على طول موجي 540 نانوميتر.

تحديد الظروف المثلى لإنتاج أنزيم السليليز:استعمل وسط السليلوز السائل في تحديد العوامل المؤثرة في إنتاج الأنزيم ،بالنسبة للرقم

الهيدروجيني ،ضبط الرقم الهيدروجيني لوسط الإنتاج على الأرقام 4.5,5.5,6.5,7.5,8.5,9.5 لتحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لإنتاج الأنزيم ولكلا العزلتين ولكلا المصدرين الكربونيين المستعملين ،أما تحديد درجة الحرارة المثلى للإنتاج فقد اختبرت درجات حرارة مختلفة هي 30,35,40,45,50 م لتحديد درجة الحرارة المثلى لإنتاج الأنزيم.

ولغرض تحديد نوع المصدر الكربوني الملائم للنمو وإنتاج الأنزيم فقد استخدم مصدرين كربونيين تحوي السليلوز في تركيبها وهي نخالة الحنطة ومخلفات الذرة ،تم طحن كل من المصدرين بعد تجفيفها على درجة حرارة 70م لمدة 48 ساعة في الفرن ثم نخلت بمنخل سعة 40 مش ومزج كل منهما مع مكونات الوسط الزرعي حيث تم اختيار نخالة الحنطة كوسط للانتاج على ضوء النتيجة التي حصل عليها من هذا الاختبار،ومن ثم تم اختبار تأثير تركيز المصدر الكربوني على إنتاج الأنزيم إذ أضيفت نخالة الحنطة إلى وسط الإنتاج وبتركيز 0.5,1.0,1.5,2,2.5% لتحديد التركيز الامثل لانتاج الإنزيم ،كما اختبر تأثير التهوية على نمو كل من العزلتين البكتيريتين المستخدمتين في إنتاج الأنزيم ،فقد استخدمت الحاضنة الهزازة وبسرعة 100,125,150,200,250 دورة/دقيقة ،كما استخدمت حجوم لقاح مختلفة لأغراض تلقيح الوسط السائل من كل من العزلتين تحت الدراسة لاختبار تأثير حجم اللقاح المضاف على إنتاج الأنزيم وكانت نسب الحجوم المضافة 0.5,1.0,1.5,2.0 % من وسط الإنتاج ، ثم اختبرت كلا العزلتين وعلى ضوء النتائج المتحصل عليها من الخطوات السابقة لمدد حضن مختلفة إذ لقح الوسط وقدرت فعالية الأنزيم يوميا ولمدة 9 أيام لتحديد أفضل مدة حضن،أضيفت كل من أيونات الكالسيوم والمغنيسيوم بهيئة كبريتات وبنسب 1.0,1.5% ,0.5,25. 0.1,0 إلى وسط الإنتاج لتحديد تأثير إضافة هذه الايونات على إنتاج الأنزيم.

تنقية الأنزيم:

استخدمت كبريتات الامونيوم وبإضافة كميات معلومة منها إلى المستخاص الإنزيمي الخام بصورة تدريجية للحصول على نسبة تشبع مقدارها 90% لغرض تركيز الأنزيم وحسب الطريقة الموصوفة من قبل (10) وكانت الخطوة الثانية أجراء عملية التبادل الأيوني بعد أجراء عملية الديلزة واستخدم عمود المبادل الأيوني DEAE-Sepharose ذي الأبعاد 2.1×35 سم وبعد موازنة العمود بوساطة المحلول المنظم Tris HCl وبتركيز0.02 مولا ر وبرقم هيدروجيني 9 ولمدة 24 ساعة،أجريت عملية الاسترداد للبروتينات المرتبطة على المبادل الأيوني بوساطة تدرج ملحي خطي من صفر-0.7 مولا ر من كلوريد الصوديوم وباستعمال المحلول المنظم سابق الذكر حيث جمعت الأجزاء المنفصلة بعد كل خمسة دقائق وتمت قراءة الامتصاص الضوئي لكل جزء من الأجزاء المنفصلة من العمود عند طول موجي 280 نانوميتر وباستعمال جهاز المطياف الضوئي لمعرفة تركيز البروتين ،كما قيست الفعالية الأنزيمية لكل جزء من الأجزاء وبعدها جمعت الأجزاء ذات الفعالية الأنزيمية العالية وتمت قياس الفعالية لها وتركيز البروتين ومن ثم أجريت ديلزة لهذه الأجزاء تبعتها عملية الترشيح الهلامي للأجزاء ذات الفعالية العالية المجموعة في الخطوة السابقة وذلك باستعمال عمود الترشيح الهلامي Superdex-200 ذي الأبعاد 40*2.1 سم وباستخدام نفس المحلول المنظم في الخطوة السابقة ،إذ جمعت الأجزاء المنفصلة وتمت متابعة هذه الأجزاء عند طول موجي 280 نانوميتر وباستعمال جهاز المطياف الضوئي وقيست الفعالية الأنزيمية لهذه الجزاء وجمعت الأجزاء

ذات الفعالية العالية وقيست فعاليتها الأنزيمية وتركيز البروتين فيها وأجريت الديازة لهذه الأجزاء.

تقدير الوزن ألجزيئي للإنزيم: استعمل عمود الترشيح الهلامي Superdex-200 لغرض تقدير الوزن ألجزيئي لأنزيم السليليز وحسب الطريقة الموصوفة من قبل (19)،حضر محلول الدكستران الأزرق Blue dextran 2000 بتركيز 4 غم/لتر وباستخدام المحلول المنظم المذكور في الفقرة السابقة وتمت متابعة الامتصاص للأجزاء المفصولة المستردة على طول موجي 600 نانوميتر وذلك لحساب حجم الاسترداد للدكستران الأزرق Void Volume(V0) ،بعدها تم أجراء الترشيح الهلامي وبنفس العمود للبروتينات القياسية معلومة الوزن ألجزيئي وهي MWt 25000, Ribonouclease 13700 MWt 43000 , Chymotrypsinogen MWt 67000 , Ovalbumin Bovine serum albumin والمحضرة بإذابة 15 ملغم من كل منها في3 ملليتر من المحلول المنظم وتمت متابعة الامتصاص للأجزاء المستردة على طول موجي 280 نانو ميتر حيث تم حساب حجم الاسترداد (Ve) لكل بروتين قياسي ورسمت العلاقة بين نسبة حجم الاسترداد لكل بروتين قياسي إلى استرداد الدكستران الأزرق (Ve/V0) مقابل لوغاريتم الأوزان الجزيئية للبروتينات القياسية .

توصيف الأنزيم:درست بعض صفات أنزيم السليليز التي شملت الرقم الهيدروجيني ودرجة الحرارة ومدة التفاعل بالاعتماد على ما ذكره (20) ، تم تحديد الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الأنزيم حيث حضرت محاليل لمادة التفاعل كربوكسي مثيل سيليلوز CMC باستخدام محلول سترات الصوديوم 0.5 مولاري وهذه الأرقام هي 4,5,6,7,8,9,10 حيث قدرت فعالية الأنزيم عند جميع قيم الرقم الهيدروجيني أعلاه وحسب الطريقة المذكورة سابقا في تقدير فعالية الأنزيم ،كما قدرت فعالية الأنزيم بعد التنفية عند درجات حرارة مختلفة هي 20,30,40,50,60,70,80 م وبمدة حضن قدرها نصف ساعة وعند القيم الهيدروجيني الامثل المحدد بالخطوة السابقة ،وأخيرا قدرت فعالية الأنزيم المنقى وعند الرقم الهيدروجيني ودرجة الحرارة الامثلين ولمدد زمنية مختلفة هي 5,10,20,30,60,90,120,150 دقيقة لتحديد الوقت الملائم لحضن الأنزيم مع مادة التفاعل.

النتائج والمناقشة:

الظروف المثلى لإنتاج الأنزيم: أظهرت النتائج الموضحة في الشكل (1) الخاصة بتأثير الرقم الهيدروجيني على إنتاج الأنزيم أن أفضل إنتاج للأنزيم كان عند الرقم الهيدروجيني 7.5 وباستعمال العزلة CR2 والمصدر الكربوني نخالة الحنطة إذ كانت فعالية الأنزيم 5.36 وحدة/ملليتر في حين إن العزلةCR1 ولنفس المصدر الكربوني أعطت أفضل فعالية للأنزيم عند الرقم الهيدروجيني 8.5 إذ كانت فعالية الأنزيم 4.79 وحدة/ملليتر.

ويأتي تأثير الرقم الهيدروجيني من خلال تأثيره على صفات الوسط الغذائي وذائبية المواد المغذية وجاهزيتها للكائن الحي كما ويؤثر في اتجاه سير عمليات الايض والتخليق وإنتاج الأنزيمات [21]، أما فيما يخص تأثير درجات الحرارة على إنتاجية البكتريا للأنزيم فكانت أعلى فعالية للأنزيم عند درجة حرارة 30 م وباستعمال العزلةCR2 وعند الرقم الهيدروجيني 7.5 وباستعمال نخالة الحنطة كمصدر كربوني إذ كانت فعالية الأنزيم 5.36 وحدة/ملليتر في حين أعطت العزلة CR1 أفضل إنتاجية للأنزيم عند درجة حرارة 40م إذ كانت فعالية الأنزيم 5.13 وحدة/ملليتر ،في حين أظهرت درجات الحرارة الأخرى انخفاضا في إنتاجية الأنزيم وكما موضح في الشكل (2) ويعزى تأثير

درجـة الحـرارة علـى إنتاجية الأنزيم من حيث تأثيرها في سرعة التفاعلات الأنزيمية داخل الخلية أو علـى بعـض العـوامل المساعدة لنمو العزلة كانخفـاض نـسبة الأوكـسجين الـذائب وتثبيط البـروتينات كمـا أن درجـات الحرارة المنخفضة تـسبب بطئ نمو الكائن ألمجهري وبالتالي تخليق الأنـزيم(22).أمـا تأثيـر نوع المصدر الكربوني وتركيـزه على إنتاجية الأنزيم فقد أظهرت النتائج الموضـحة في الأشكال (3 و 4) أن أفضل انتاجية للانزيم كانت باستعمال العزلةCR2 ونخالة الحنطة بتركيـز1.5% إذ كانـت فعالـية الأنـزيم 5.52 وحدة/مللتر.

الوقت الذي أعطت العزلة CR1 أفضل انتاجـية للانـزيم عـند اسـتخدام نفس المصدر الكربونـي وبنفس التركيز إذ كانت فعالية الأنزيم 5.24 وحـدة/مللتـر علمـا أن عملية تحديد نوع المـصدر الكربونـي وتركيـزه تعتبر من العوامل المهمـة في الإنتاج بالتقنيات الحيوية والتي تحدد نجـاح العملـية الإنتاجـية. وبينت نتائج عمليات التهوية على إنتاج الأنزيم من قبل كل من العزلتين أظهرت النتائج الموضحة في الشكل (5) أن أفضل انتاجية للانزيم كانت عند استعمال العزلة المحلية CR2 وكانت فعالية الأنزيم 5.52 وحدة/مللتر عند عـدد دورات حاضنة 125دورة/دقيقة ،في الوقت الـذي أعطت العزلة المحليةCR1 أفضل انتاجية للانـزيم عند عدد دورات حاضنة 150دورة/دقيقة وكانت فعالية الأنزيم 5.24وحدة/مللتر.

أمـا فيما يتعلق بتأثير حجم اللقاح على انتاجـية الأنـزيم فيوضـح الشكل (6) أن أفضل انتاجية للانزيم كانت عند استعمال العزلة المحلية CR2 وبحجـم لقـاح مقداره 1% من الوسط إذ كانـت فعالية الأنزيم 5.52 وحدة/مللتر في الوقت الـذي أعطت العزلة الأخرىCR1 أفضل انتاجية للانـزيم عـند اسـتعمال لقاح بحجم 1.5 % من الوسط وكانت فعالية الأنزيم 5.41 وحدة/ مللتر ، ويلاحـظ أن حجـم اللقـاح المعتدل أعطى أفضل انتاجـية وان اسـتعمال كـثافة لقاح قليلة تسبب انخفاض في الإنتاج لأنه يسبب انخفاض في الكتلة الحـيوية للعـزلة وبالتالـي ينعكس على انتاجية الأنزيم ،أما انخفاض انتاجية الأنزيم عند استعمال حجـم لقـاح كبيـر فقد يعود السبب إلى التنافس لاسـتغلال المغـذيات فـي الوسـط ألزرعي (23).وباسـتعمال ظروف الإنتاج المثلى التي اظهرتها الخطـوات السابقة درس تأثير مدة الحضن على انتاجـية الأنـزيم وكمـا موضح في الشكل(7) إذ حـصل علـى أفضل انتاجية للانزيم عند استخدام العزلة CR2 وبعد خمسة أيام حضن وكانت فعالية الأنزيم 5.976 وحدة/مللتر في الوقت الذي أعطت العـزلةCR1 أفـضل فعالية للانزيم بعد ستة أيام حـضن وكانـت 5.631 وحـدة/مللتر ،وقد يعزى السبب في انخفاض فعالية الأنزيم بعد مدة الحضن المثلـى إلى حصول تغيرات بيئية في وسط الإنتاج فضلا عن أمكانية حصول تحال ذاتي للخلايا والذي يرافقه إطلاق مواد ايضية تؤثر سلبا على انتاجية الأنزيم وهذا يتفق مع ما ذكرته[14].

وفـي محاولـة لغـرض تحسين ظروف الإنـتاج والحـصول علـى إنتاجية أفضل للانزيم اضـيف نوعين من الايونات الثنائية الموجبة إلى وسـط الإنـتاج وكـلا على حدة وأظهرت النتائج الموضحة في الشكل (8) أن العزلة CR2 أعطت إنتاجـية أفـضل بإضافة كل من ايونات2+Mg ، 2+Ca وعـند التركيز 0.5% حيث كانت فعالية الأنزيم 6.121 ,6.212 وحدة/مللتر على التوالي ،فـي الوقت الذي أعطت فيه العزلة CR1 أفضل فعالـية للانزيم وباضافة كل من الايونين السابقين عـند التركيـز0.25% وكانـت الفعالية الأنزيمية 5.831 , 5.924 وحـدة/مللتر على التوالي، وقد يعـزى الـسبب فـي زيادة الفعالية إلى عما هذه الايـونات كمرافقات أنزيمية مع الأنزيمات المهمة فـي عمليات التخليق الحيوي التي تؤدي إلى تحال

المـواد الـسليلوزية وبالتالي زيادة إنتاجية أنزيم الـسليليز ،فـي الوقت الذي سبب إضافة التراكيز العالـية مـن الايـونات الثنائية إلى تأثير عكسي وتثبيط لنمو البكتريا وبالتالي انخفاض في إنتاجية الأنزيم.

تنقـية الأنـزيم: يوضح الجدول رقم (1) الخطـوات الأساسية لتنقية أنزيم السليليز المنتج مـن قـبل العزلة المحلية CR2 التي تم انتخابها علـى ضـوء النـتائج التـي تم الحصول عليها بالخطـوات الـسابقة ، واسـتعملت نخالة الحنطة كمـصدر كربونـي وحيد في عملية الإنتاج ،كانت فعالـية الأنـزيم بعـد عملـية الترسيب بكبريتات الامونـيوم والتي هي الخطوة الأولى من خطوات عملية التنقية 4.995 وحدة/مللتر ولعبت كبريتات الامونـيوم دورا مهمـا فـي عملية تركيز الأنزيم ويأتـي ذلك من خلال معادلتها للشحنات الموجودة علـى سـطح البـروتين وبطريقة جزيئات الماء المحيطة بجزيئات البروتين مما أدى إلى انخفاض ذائبـية البروتين ومن ثم ترسيبه (24) ،والخطوة التالـية فـي عملية التنقية كانت كروموتوغرافيا التـبادل الأيونـي باسـتعمال المـبادل الايونـي DEAE-Sepharose وذلـك بعد ديلزة المحلول الإنزيمـي المتحـصل علـه بعد عملية الترسيب الـسابقة وكانـت فعالية الأنزيم بعد عملية التبادل الايونـي 3.368 وحـدة/مللتر وبعدد مرات تنقية 1.852 وبعـد ذلـك أجريت الخطوة التالية وهي كروموتوغرافيا الترشيح الهلامي باستعمال العمود Superdex-200 وكانـت الفعالـية الأنـزيمية 4.757 وحـدة/مللتر وعدد مرات التنقية 4.109 وبحصيلة أنزيمية نهائية مقدارها 64.11%.

تقدير الوزن ألجزيئي :

قـدر الـوزن ألجزيئـي لأنزيم السليليز بطـريقة الترشـيح الهلامـي باسـتعمال العمود Superdex-200 مـن خـلال العلاقة بين نسبة حجم الاسترداد الى حجم الفراغ Ve/V0 لوغارتيم الـوزن ألجزيئـي للبروتينات القياسية المستعملة وكما موضح في طريقة العمل ، أظهرت النتائج أن الوزن ألجزيئي للانزيم كان بحدود 32000 دالتون وهـذه النتيجة مقاربة لما حصل عليه (10) الذي وجـد أن الـوزن ألجزيئـي للانـزيم كان بحدود 31000 دالتون.

توصيف أنزيم السليليز بعد التنقية: درس تأثير كل مـن الرقم الهيدروجيني ودرجات الحرارة ووقت التفاعل في فعالية الأنزيم المنقى، استعملت محاليل دارئـة (Buffers) بأرقـام هيدروجينية مختلفة للحـصول على الأرقام الهيدروجينية التي درست عـندها فعالية الأنزيم وبينت النتائج الموضحة في الـشكل (11) أن أعلـى فعالية للانزيم كانت عند الـرقم الهيدروجينـي 6 حيث كانت فعالية الأنزيم 5.444 وحـدة/مللتـر ولنه كلما زادت قيم الرقم الهيدروجينـي عـن هذا الرقم تبدأ فعالية الأنزيم بالانخفاض وقد يعزى السبب في انخفاض الفعالية عـند قـيم الرقم الهيدروجيني القاعدي إلى تأثير مجامـيع الأحمـاض الامينـية الموجودة بالموقع الفعال أو جزيئة الأنزيم على الحالة الأيونية للمادة الأساس [24].

الأنـزيمية 5.537 وحدة/مللتر ثم انخفضت لتصل إلـى 4.019 وحـدة/مللتـر عند درجة حرارة80 م.يمكن أن يعزى السبب في هذا الانخفاض إلى أن الـزيادة فـي درجـة الحرارة قد يؤدي إلى زيادة الحركات الاهتزازية التي تؤثر في التركيب الثالثي للانزيم مما يؤدي إلى مسخ الأنزيم وبالتالي فقدان الجـزء الأكبـر من فعاليته الأنزيمية [26]. أما عن

تأثير وقت التفاعل فقد درس تأثير هذا العامل على فعالـية أنزيم الـسليليز ويوضح الشكل (13) أن أعلى فعالية للانزيم كانت بعد60 دقيقة من الحضن مـع المادة الأساس وبلغت فعالية الأنزيم 5.723 وحدة/مللتر ثم انخفضت لتصل بعد 150 دقيقة إلى 3.825 وحدة/مللتر وقد يعزى السبب في ذلك إلى اسـتهلاك الأنزيم لمـادة الأسـاس المتفاعلة مع الأنزيم.

References

1- Ojumu, TundeVicetor; Solomon Bamidele;Betiku,Layokun;Stephen Kolawole and Amigum,Bauikolele. (2003).Cellulase production by Aspergilluse flavus Linn isolate NSPR 101 fermented in sawdust,bagasse and corncop,African J of Biote.2(6):150-152.

2- Heiner, A.P and Teleman, O.(1997)."On the structural crystalline cellulose" in (Abstract Tricel of carbohydrates from Trichoderma reesei and other microorganisms). P: 204;Royal Society of chemistry:Cambridge;UK.

3- Mandels, M.Andreotti, R and Roch,C.(1976).Measurement of sacchrifying cellulose.Biotechnol.Bioeng Symp.6:21-23.

4- Ohmiya, K; Sakka, K.Karita, S and Kimura;T. (1997)."Cellulase "In (Biotechnology and Engineering Reviews.14: 365).

5- Christensen, P.J. (1977).The history ,biology ,and taxonomy of the Cytophaga group.Can.J.Microbiol.23:1599-1653.

6- Chang, W.T. and Thayer, D.W. (1977).The Cellulase system of a Cytophaga species.Can.J.Microbiol.23:1285-1292.

7- Hunter, J.B.and J.A.Asenjo. (1987). Kinetics of enzymatic lysis and disruption of yeast cells: Evaluation of two lytic systems with different Properties. Biotechnology and Bioengineering. 30 (4): 471-480.

8- Li.X, Z.Zhou, S.Zhang, F.Jin and P.Gao.(1997).Production and properties of a cellobiose-oxidizing enzyme from a newly isolated celluloltic bacterium Cytophaga sp.LX-7.World Journal of Microbiology and Biotechnology . 13 :683-688.

9- Dahot Umar.M and M.Hanif Noomrio.(1996).Microbial production of Cellulase by Aspergillus fumigates using wheat straw as carbon source. Journal of Islamic Academy of Sciences.9.(4).

10- Takuya Koseki;Shinji Furues; Kinino Iwano;Hiroshi Sakai and Hiroshi Matszawa.(1997).An Aspergillus awamor acetylesterase:Purification of the enzyme ,and cloning and sequencing of the gene. Biochem.J.326: 485-490.

11- Dong Won Kim, Young Kyn Jeong;Young Hun Jung;Jae Kuk Lee;Ki Sung Kim and Haill Ryu.(1995).Kinetic mechanism of cellulose hydrolysis by endo glucanase 1 and Exo glucanase 11 purified from Trichoderma viride. Bull.Korean.Cham.Soc.16: 742-746.

12- Robson, L.M and Chambliss, G.H.(1984). Characterization of the celluloltic activity of a Bacillus isolate.

Appl.Environ.Microbial.47: 1039-1046.

13- Fred, J, Stutzenberger. (1970). Cellulase production by Thermomonospora currata isolated from municipal solid waste compost .Appl.Microbial.22:(2):147-152.

14- Tawfiq, Aziz, Asal. (2000). Isolation and identification of Celluloltic Setreptomyces species from the local soil .A thesis submitted to the College of Science of Saddam University.

15- Kotchoni, O.S; Shonukan;O.O and Gachomo,W.E.(2003).Bacillus pumilus BPCRL 6, a promising candate for Cellulase production under conditions of catabolite repression .African Journal of Biotechnology .2(6):140-146.

16- Micheal, EHimmel. (1999). Improved Cellulase enzyme at NREL.U.S.Department of Energy, Office of Fuels Development.

17- Mandels Mary. (1974). Production and application of Cellulase laboratory procedures. Handbook, U.S.Army materials laboratories.

18- Miller,G.L.(1959).Use of the dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugars .Anallyt.Chem.31:426-428.

19-Laue, T.M. and Rhodes, D.G. (1990). Gelfilitration In Methods of Enzymology (ed. Deutsher,M.P.) .182:556-587.Academic press.

20- Chen, Po-Jui, Tao-Chunwei, Yao-Tsung Chang, and Liag-Ping Lin . (2004) Purification and Characterization of Carboxymethyl cellulose from Sinorhizobiun fredii. Bot. Bull. Acad. 45 : 111-118 .

21- McCarthy, A. J. (1987). Lignocelluloses - degradation by Actinomycetes. FEMS. Microbiol. Rev. 46:145-163.

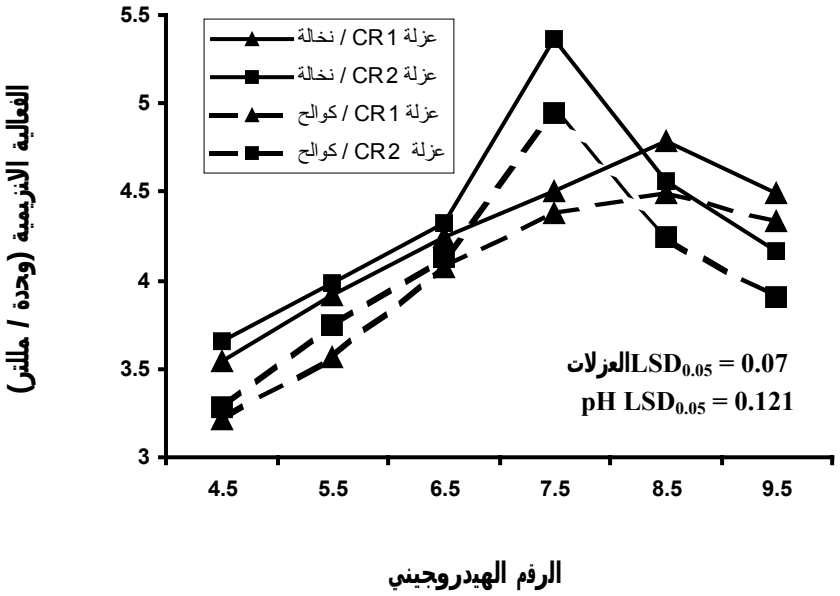
22- Davies, R. (1963). Microbial extra cellular enzymes their uses and some factors affecting their formation in" biochemistry of industrial microorganism "(eds Rainbow. and Rose,A.H.,) Academic press, New York.

23-Purohit, S. S, and Mathur , S. K. (1996). Enzymes bioacceleractors in : Biotechnology , Fundamentals , and application publisher. India.

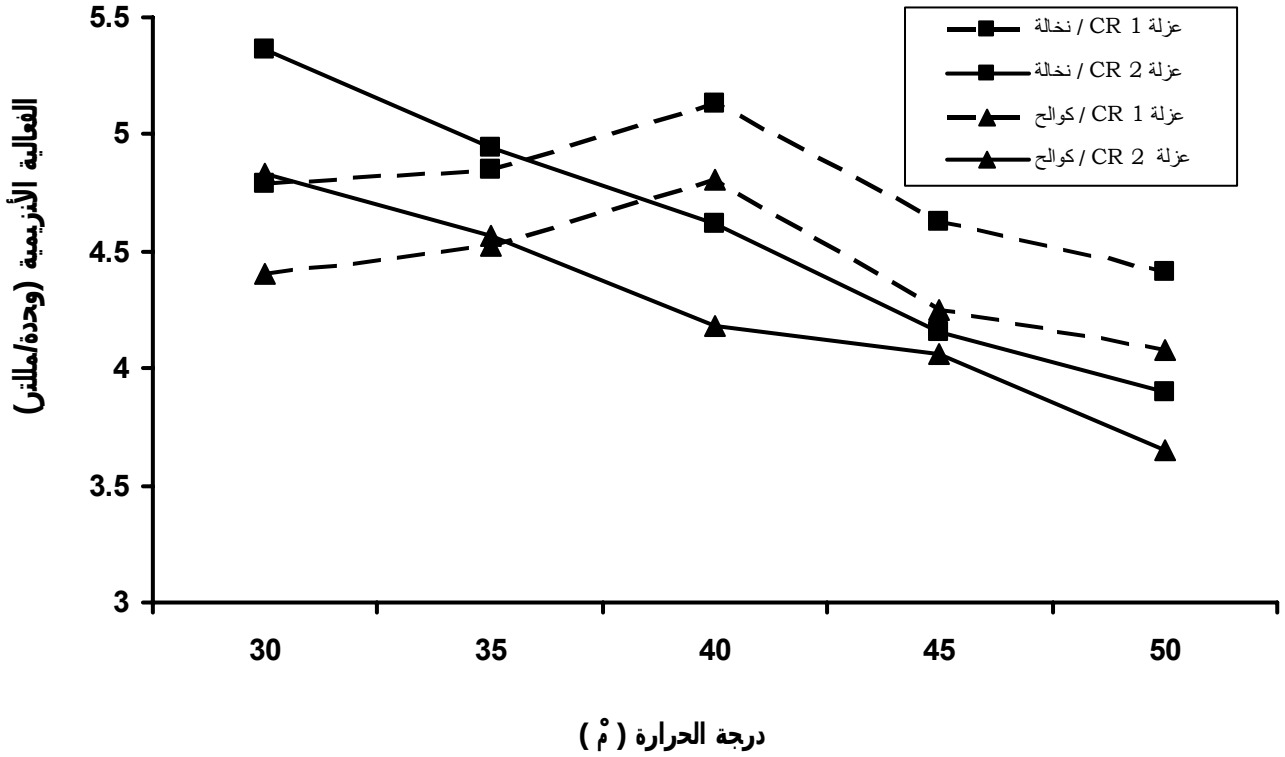
24-Englard, E. M., and Sifters. (1990). Precipitation in: Methods in Enzymology (ed. Murray, E.D.and Dentscher,P.) . 182:425-441.

25-Chauthaiwale, J.V. and Rao, M.B. (1994).Production and purification of extra cellular D-xylose isomerase from alkaliphilic, thermophillic Bacillus sp. Appl Environ. Microbial .60:4495-4499.

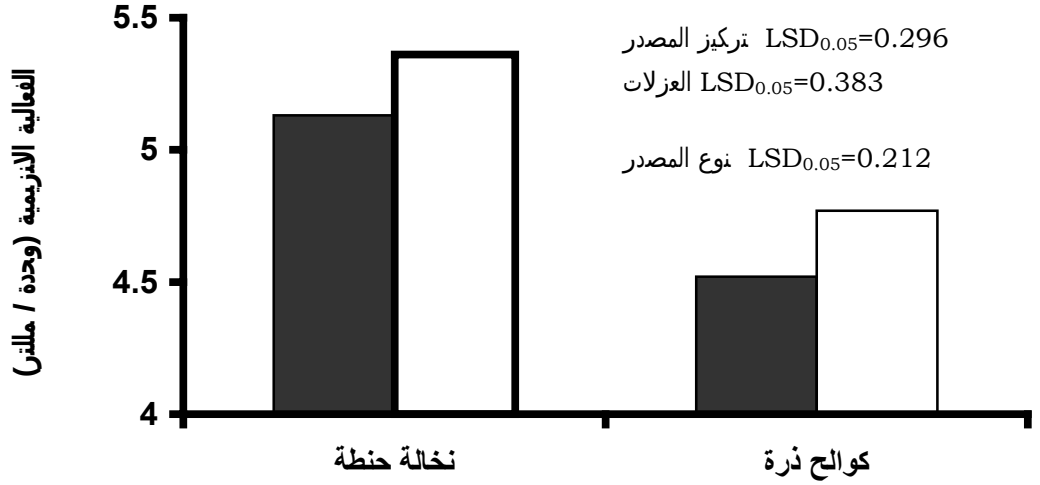
26-Brown , S. H. , Sjoholm,C.and Kelly, R.M.(1993).Purification and characterization of a highly thermostable glucose isomerase produced by the extremely thermophillic Eubactrium thermotoga maritime. Biotechnol. Bioeng.41:878-886.



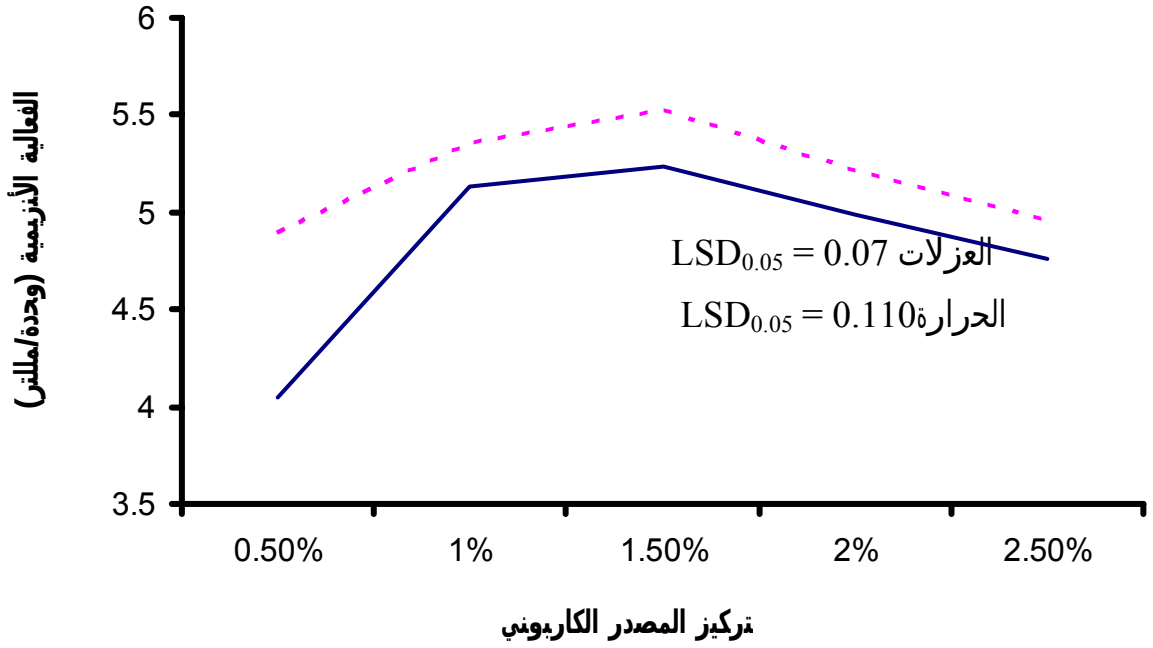
شكل 1. تأثير الرقم الهيدروجيني في إنتاج إنزيم السليليز



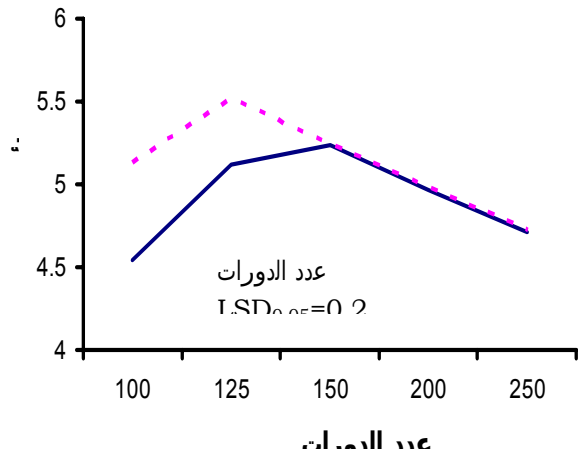
شكل 2. تأثير درجات الحرارة في إنتاج إنزيم السليليز.



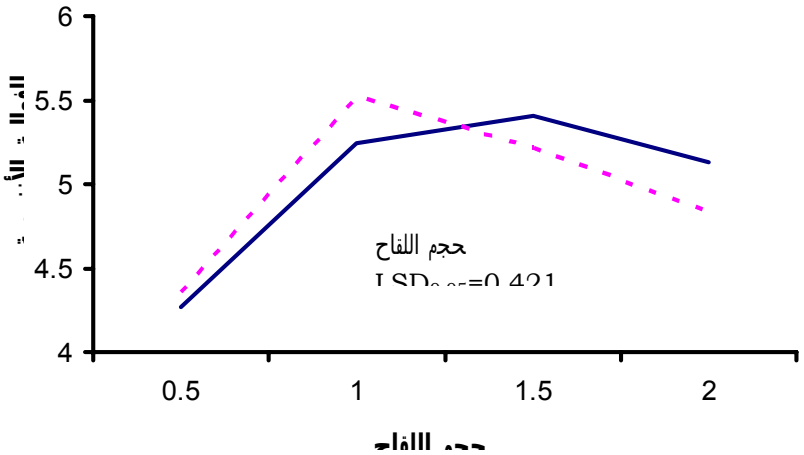
شكل3. تأثير المصدر الكاربوني في إنتاج أنزيم السليليز من العزلة الأولى ■ والثانية □



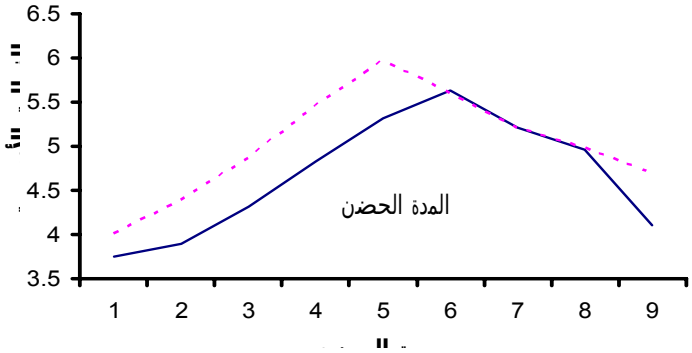
شكل4. تأثير تركيز المصدر الكاربوني في إنتاج أنزيم السليليز من العزلة الأولى (-) والثانية (- - -) باستخدام نخالة الحنطة كمصدر كاربوني



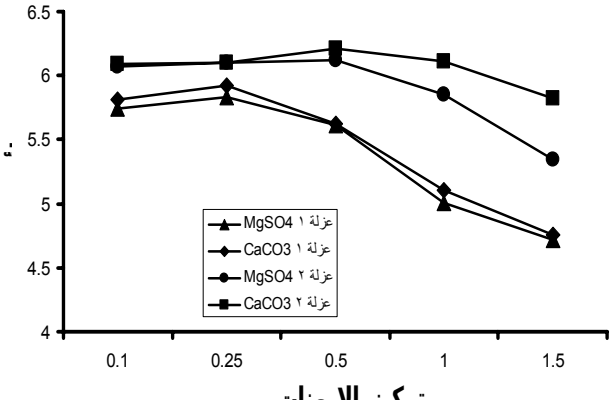
شكل5. تأثير عدد دورات الحاضنة في إنتاج أنزيم السليليز من العزلة الأولى (-) والثانية (- -)



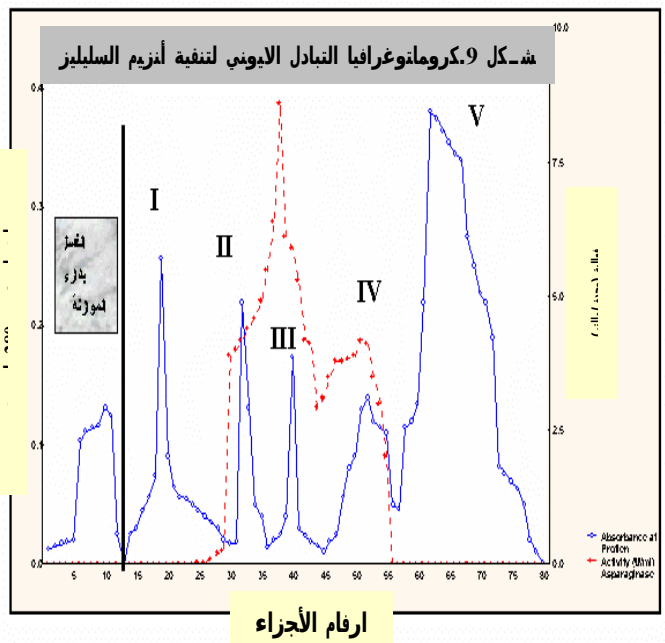
شكل6. تأثير حجم اللقاح (ملتر) في إنتاج أنزيم السليليز من العزلة الأولى (-) والثانية (- - -)

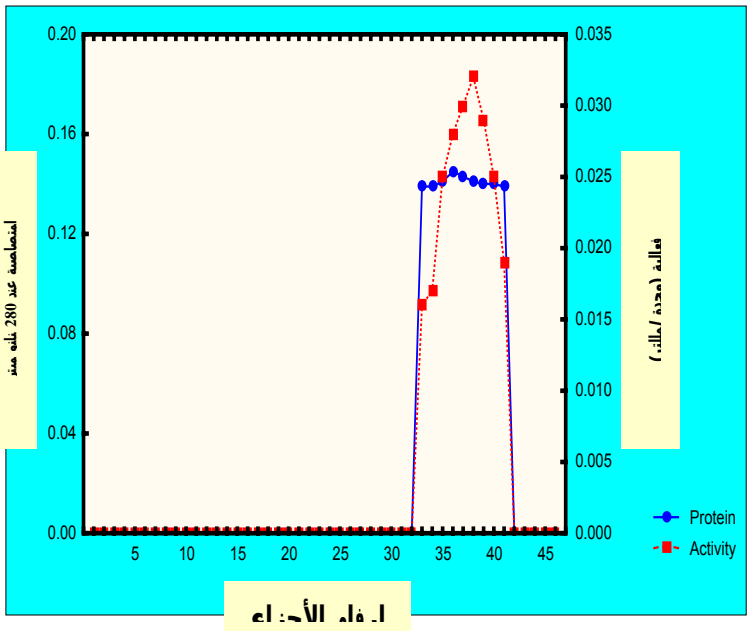


شكل7. تأثير مدة الحضن (يوم) في إنتاج أنزيم السليليز من العزلة الاولى (-) والثانية

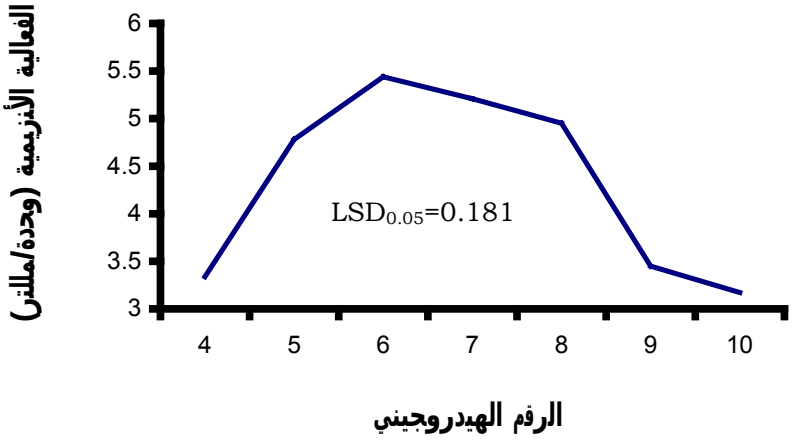


شكل8. تأثير نوع وتركيز الايونات الثنائية الموجبة في إنتاج أنزيم السليليز بواسطة العزلتين المحليتين.

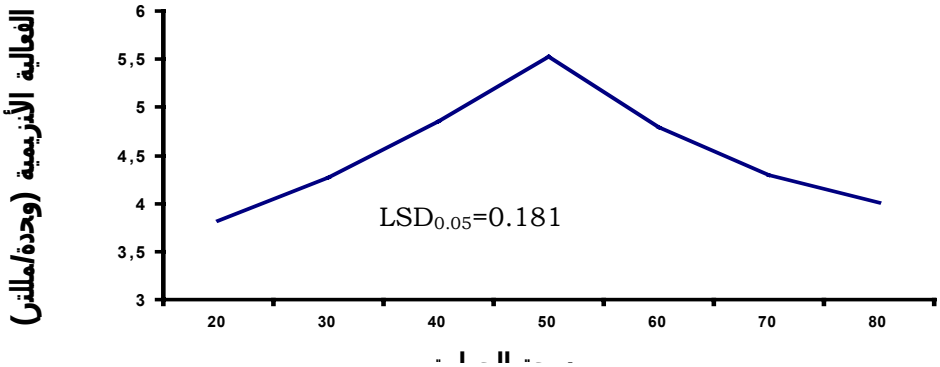




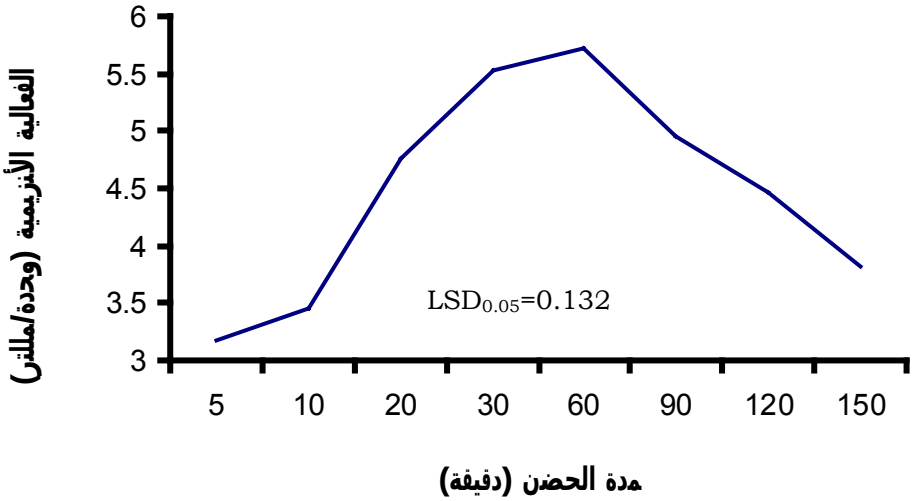
شكل 10 . كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي لتنقية أنزيم السليليز من العزلة المحلية *Cytophaga* CR2



شكل11. تأثير الرقم الهيدروجيني في فعالية أنزيم السليليز المنتج من العزلة الثانية.



شكل12. تأثير درجة الحرارة في فعالية أنزيم السليليز المنتج من العزلة الثانية.



شكل13. تأثير مدة الحضن (دقيقة) في فعالية أنزيم السليليز المنتج من العزلة الثانية.

جدول 1.خطوات تنقية أنزيم السليليز المنتج من العزلة المحلية *Cytophaga* CR2

خطوات التنقية	الحجم (مللتر)	الفعالية الأنزيمية (وحدة/مللتر)	البروتين (ملغم/مللتر)	الفعالية الكلية(وحدة)	الفعالية النوعية (وحدة/ملغم بروتين)	عدد مرات التنقية	الحصيلة%
المستخلص الإنزيمي الخام	140	6.212	0.0249	869.68	249.48	1	100
الترسيب بكبريتات الامونيوم 90% بعد الديلزة	75	4.995	0.0195	374.63	256.15	1.027	43.07
التبادل الايوني بعمود DEAE-Sepharose	50	3.368	0.0071	168.40	474.37	1.856	44.95
الترشيح الهلامي بعمود Superdex-200	20	4.757	0.00244	97.14	1949.59	4.109	64.11

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF CELLULOSE ENZYME ISOLATED FROM LOCAL ISOLATE OF CYTOPHAGA BACTERIA

DHAFER. F.ABDUL KADER AL-RAWI.
E.mail: alrawi_daffer@yahoo.com

Abstract:

The aim of the research was to produce Cellulase via the use of two isolates of Cytophaga bacteria. The first isolate, given the local code CR1, was taken from AL-gazeera region soil in Ramadi grown with okra. The second, given the local code CR2, was taken from animal waste.

Wheat barn and corn wastes (grimes) were used as only carbon source in the culture media where the two isolates have been cultivated. However these wastes were available in big amounts in this environment.

CR2 showed a great ability to produce Cellulase in the liquid medium culture .The best production was at pH 7.5 and 35c temperature using wheat barn of 1.5% cellulose concentration. When incubated in an incubator shaker of 125 R.p.m and a bacterial density of 1ml/100ml medium. After 5 days of incubation, the enzymatic activity was 5.976 unit/ml.

The results have shown that adding calcium and magnesium ions as sulfates of 0.5g/100ml,concentration gave higher production of the enzyme. The enzyme activity was 6.121unit/ml and 6.212unit/ml,respectively.

The enzyme produced from the local isolate CR2 was purified following purification procedure that included precipitation using ammonium sulfates of 90% saturation and ion exchange chromatography via replacing the column DEAE-Sepharose.This was followed by gel filtration column of Superdex-200.It was possible 64.11% of the enzyme with 4.109 times of purification. The results of enzyme description showed that its molecular weight was about 32000 Dalton using gel filtration chromatography of a Superdex-200 column, and that the optimum pH of the enzyme activity was 6.0 .The optimum temperature of the enzyme activity was 50c .The results indicated, also, that the enzyme gave the highest enzymatic activity after 60 minutes of incubation at a pH6.0 and 50c temperature.