دور عزلة *Streptomyces* sp. في تحسين إنتاج أنزيم السليليز بوساطة بكتريا *Lysobacter enzymogenes* باستعمال سعف النخيل

ظافر فخري الراوي* ، ادهام علي عبد و احمد محمد تركي****

* جامعة الأنبار / كلية التربية

** جامعة الأنبار / كلية العلوم

الخلاصة

تهدف هذه الدراسة الى محاولة تحسين استعمال سعف النخيل المتوفر بكميات كبيرة لانتاج انزيم السليليز باستعماله مصدرا كربونيا للعزلة البكتيرية *L.enzymogenes* من خلال استعمال اللقاح المساعد من بكتريا *Streptomyces* sp. مقارنة بعدد من المعاملات الاخرى المستعملة في تهيئة وتحضير المصدر الكربوني ، والتي تضمنت المعاملة بالقاعدة هيدروكسيد الصوديوم NaOH وحامض الهيدروكلوريك HCl والتسخين .

اختبرت قابلية كل من بكتريا *L.enzymogenes* وبكتريا *Streptomyces* sp. في تحليل السليلوز في وسط السليلوز الصلب وكذلك اختبرت العزلتين معا لمعرفة امكانية استعمالهما معا في انتاج الانزيم ، واظهرت النتائج ان اعلى قطر للمنطقة الشفافة الناتج عن تحلل السليلوز كان عند استعمال العزلتين معا ومعاملة المصدر الكربوني بهيدروكسيد الصوديوم حيث بلغ معدل قطر المنطقة الشفافة 5.7 سم ، اما تاثير المعاملات المختلفة التي اجريت للمصدر الكربوني في انتاج انزيم السليليز في وسط السليلوز السائل فأظهر استعمال بكتريا *Streptomyces sp.* كمعاملة لتحضير وتهيئة المصدر الكربوني لتحليله من قبل بكتريا *L.enzymogenes* مع تعديل الرقم الهيدروجيني لوسط الانتاج افضل انتاجية للانزيم حيث بلغت الفعالية الانزيمية 8.727 وحدة / مللتر .

وتبين ان تركيز 1% من المصدر الكربوني كان الافضل في انتاج الانزيم ، اذ بلغت الفعالية الانزيمية 8.727 وحدة / مللتر ، واعطت طريقة اضافة المصدر الكربوني بدفعات يومية الى وسط الانتاج افضل انتاجية للانزيم اذ بلغت الفعالية الانزيمية 10.902 وحدة / مللتر ، فيما لم تعط معاملة اضافة المصدر بطريقة التغذية اليومية المتزامنة مع السحب اليومي للمنتوج الا فعالية انزيمية مقدارها 10.878 وحدة / مللتر .

اجريت عملية التنقية للانزيم المنتج بوساطة بكتريا *L.enzymogenes* باتباع خطوات تنقية تضمنت الترسيب بكبريتات الامونيوم بنسبة اشباع 90% وكروموتوغرافيا التبادل الايوني بوساطة عمود المبادل الايوني DEAE-Sephacyl والترشيح الهلامي بعمود Sephacryl -S-300 وقد امكن استرداد 86.06% من الانزيم ، كما بينت نتائج دراسة الظروف المثلى لفعالية الانزيم بعد التنقية ان الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم كان 6 ودرجة الحرارة المثلى 60 م وبمدة تفاعل 90 دقيقة .

اظهرت نتيجة تعيين الوزن الجزيئي للانزيم بوساطة طريقة الترشيح الهلامي ان الوزن الجزيئي للانزيم كان بحدود 36000 دالتن ، فيما بينت دراسة حركيات الانزيم ان قيمة ثابت ميكالس K_m كانت (12.73ملغم/مللتر/دقيقة) في حين ان سرعة التفاعل القصوى V_{max} كانت (12.5وحدة/مللتر).

The Role of *Streptomyces sp.* To Improve Cellulase Enzyme Production By Using *Lysobacter Enzymogenes* On Date Palm Leaves

D. F. A. Al–Rawi[*] , A. A. Assaffii[**] and A. M. AL-Aethawi[**]
[*] College of Education / Al-Anbar Univ.
[**] College of Sciences / Al-Anbar Univ.

Abstract

The aim of this study is to improve using date palm leaves , which are very abundant to produse cellulase enzyme that an be used as carbon resonrce for *L. enzymogenes* bacterial isolate . *streptomyces sp*. was used as helper substrate media compared to other treatments used as another sources of carbon which depend on using *NaOH* as a base and *HCL* as an acid with heating . The ability of *L. enzymogenes* and *Streptomyces sp*. bacteria to lyse crude cellulose was tesed singularly and together to know their ability to produse cellulase enzyme .

Results indicated that the largest diameter for the transperent area , which is as a result for cellulose lysing , is by using both bacteria together and also by treating the carbon source by *NaOH* and the diameter avarage was 5.7cm . However, other treatments for carbon resource in cellulose liquid media indicated that *Streptomyces sp.* as a carbon resource and *L. enzymogenes* to provide the specific enzyme with a pH adjustment gave a better enzyme production which was 8.727 unit / ml .

The concentration of 1% of the carbon source was the best to enzyme production and the enzymic activity was 8.727 unit / ml , also the addition of carbon source on a dialy base interval gave in enzymatic activity of 10.902 unit / ml . However, normal daily feeding in co-ordirate with daily with draw gave an enzymatim activity of 10.878 unit / ml .

Purification of the enzyme produced by *L. enzymogenes* was done by using ammonium sulphate as a sedmentation factor with a saturating percent (90%) and ionic exchange chromatography with a DEAE - Sephacyle bar and sephacyl -S-300 as a gelatinous filtarating bar and 86.06% of the enzyme were re-extracted . The optimum pH was 6 , the optimum temp. was $60c^{o}$ and the time lasted for interation was 90 min.

Molecular weight as done by gelatinous filterating bar was around 36000 dalton . The value of Mekalis K_m was (12.75 U/ml/min) and the maximum interaction velocity was (12.5mg/ml) .

المقدمة

يطرح سنويا الاف الاطنان من المخلفات النباتية للبيئة وتقدر هذه الكمية بحدود 10^{10} وتحتوي هذه المخلفات على نسبة كبيرة من المواد الكربوهيدراتية وتعد هذه المخلفات مصدرا مهما للسليلوز وكثيرا ما تعالج هذه المخلفات بطرائق خاطئة لغرض التخلص منها ، ولاستمرار دورة الكاربون الطبيعية فمن الضروري استعمال الاحياء المحللة للسليلوز والتي تكون قادرة على انتاج انزيم السليليز الذي يساعد ويحفز عملية تحلل السليلوز الى سلاسل قصيرة من السلوبايوز ومن ثم الى الناتج النهائي وهو الكلوكوز والذي يعتبر ناتج مهم من الناحية الاقتصادية لانه يدخل في كثير من الصناعات والاستخدامات المهمة (Ojumu *et.al.*, 2003). أشار Alam

(2004) *et.al.* الى ان السليلوز من اكثر مكونات المخلفات العضوية المتراكمة في البيئة وبصورة سنوية دائمة وتعمل الاحياء المجهرية على تحليله وبالتالي يعتبر مصدرا مهما للطاقة.

عرفت العديد من الاحياء المجهرية التي تساهم وبشكل كبير في انتاج انزيم السليليز وبالتالي المساعدة في تحليل السليلوز واثبتت الفطريات ان لها الدور الاول ومن ثم البكتريا وبالمرتبة الثالثة تاتي الاكتينومايستات وتعتبر بكتريا *Streptomyces* من الاجناس التي لها القابلية على تحليل السليلوز ولها فعالية عالية في هذا المجال .(Tawfiq *et.al.*, 2002)

ومعلوم ان بكتريا جنس *Lysobacter* غير محللة للسليلوز عدا النوع *enzymogenes* الذي يكون محللا للسيليلوز (Holt *et.al.*, 1994).

لانزيم السليليز تطبيقات مهمة في مجالات الصناعة والتقانة الحيوية ، فهو يدخل في الصناعات الغذائية متمثلة بتصنيع الفواكه ، اغذية الاطفال ، العصائر ، كما يدخل في الصناعات النسيجية وتطويرها والصناعات الورقية واستخلاص النشا وتصنيعه ، وفي استخلاص وتصنيع بعض ادوية الاعشاب وله اهمية واضحة في مجالات تصنيع الوقود الحيوي وخاصة الايثانول . (Rajoka 2004).

لانزيم السليليز نظام انزيمي مكون من ثلاثة مكونات اساسية هي انزيمات Endo – glucanase ، Exo و B – glucosidase ويعمل كل منها بصورة تعاونية وبشكل متكامل أي ان عمل احدهما يكمل عمل الاخر (Taylor *et.al.*, 2006).

تحضير وتهيئة المصدر الكربوني :

تعتبر عملية تحضير المصدر الكربوني وتهيئته عملية مساعدة لضمان استمرار الية وميكانيكية الانزيمات المحللة ، اذ يعتبر المصدر الكربوني الذي تحتاجه الاحياء المجهرية المنتجة لانزيم السليليز من اهم العوامل التي تؤثر في قابليتها على انتاج الانزيم لان اغلب هذه المصادر يكون السليلوز فيها مرتبط بمكونات صعبة التحلل ، لذلك يكون من المهم اختيار نوع المصدر الكربوني وتهيئته بمعاملات اولية Pretreatment قبل اضافته الى المزرعة الخاصة بانتاج الانزيم ، وهنالك طرق عديدة تستخدم لهذا الغرض من اجل زيادة انتاج الانزيم ، فقد استعملت عدة طرق في هذا المجال ، اذ استعمل Umar Noomrio (1996).

تبن الحنطة المعامل بالاحماض المعدنية كمصدر كربوني للحصول على اعلى انتاج للانزيم ، اما Ojumu *et.al.*, 2003 فقد استعملوا ثلاثة مصادر سليلوزية مختلفة في انتاج انزيم السليليز وهي مخلفات الخشب ، الحشائش ومخلفات الذرة بعد معاملة كل منها بهيدروكسيد الصوديوم.

في حين انتج Rifaat *et.al.*, (2005) انزيم الزايلينيز باستعمال قش الرز المعامل باوكسيد التيتانيوم Tio_2 ، وحديثا تمكن Dien *et.al.*, (2006) من الحصول على افضل انتاج لانزيم السليليز باستعمال مخلفات الذرة المعاملة بالماء المغلي بدرجة حرارة 160 ْم ولمدة 20 دقيقة وازدادت انتاجية الانزيم بزيادة مدة الغليان الى 30 دقيقة .

طريقة اضافة المصدر الكربوني

نظرا لتعدد وتنوع الاحياء المحللة لمركبات السليلوز واختلاف قدراتها حسب نوع المصادر الكربونية المستعملة تعد عملية تحضير وتهيئة وطريقة تنمية المزارع البكتيرية المحللة للسليلوز لانتاج انزيم السليليز مهمة .

اذ اشار Mehmedalija & Enfors (2003) الى ان افضل انتاج لانزيم السليليز كان باستعمال نظام مزارع الوجبة المغذاة Feed batch Culture ، بينما حصل Lyayi (2004) الى افضل انتاج لانزيم

السليليز باستعمال المزارع الصلبة Solid State وبوساطة فطريات *Aspergillus niger* ، *Aspergillus Flavus* ، *Penicillium sp.* .

Alam *et.al.,* (2004) حصلوا على اعلى انتاج لانزيم السليليز باستعمال مزارع الوجبة وبوساطة بكتريا *Streptomyces omiyaensis* وبمصدر كربوني تركيزه 1.2% ، في حين ان Narasimha *et.al.,* (2006) حصلوا على اعلى انتاج للانزيم باستعمال مزارع الوجبة وبوساطة فطر *Aspergillus niger* وبمصدر كربوني تركيزه 1% .

اما Schanfer & Toledo (2004) فقد حصلا على افضل انتاج لانزيم السليليز باستعمال نظام المزارع المستمرة Continuous culture وبوساطة فطر *Trichoderma reesei* وبمصدر كربوني تركيزه 1% .

استخلاص وتنقية انزيم السليليز وتعيين وزنه الجزيئي :

نظرا للاهمية الكبيرة لانزيم السليليز في مجالات عدة ، لذا كان من الضروري الاهتمام بالحصول عليه نقيا بصورة كاملة او جزئية ، اذ استخدمت طرائق مختلفة لتنقية الانزيم المنتج من قبل الاحياء المجهرية وتتمثل باستخدام الترسيب بكبريتات الامونيوم ثم كروموتوغرافيا التبادل الايوني والترشيح الهلامي وغيرها ، كما ان هناك تقنيات مختلفة لتعيين الوزن الجزيئي لانزيم السليليز المعزول من مصادر مختلفة ، الا ان اغلب هذه التقنيات اعتمدت على الترشيح الهلامي والترحيل الكهربائي بوجود او عدم وجود المواد المانحة SDS-PAGE ، Takuga *et.al.,* (1997). والذين استعملوا طريقة الترحيل الكهربائي بوساطة هلام البولي اكريل امايد (Poly acryl amide) في تنقية الانزيم وتعيين وزنه الجزيئي اذ وجد ان الوزن الجزيئي للانزيم كان بحدود 31.000 دالتن بعد استعمال الترشيح الهلامي وتقنية Hydrophobic-interaction chromatographies

العوامل المؤثرة في فعالية انزيم السليليز وحركيات الانزيم :

تعتبر عملية تحديد العوامل المؤثرة في فعالية الانزيم المنقى من العمليات المهمة والتي تشتمل على الرقم الهيدروجيني ودرجات الحرارة ومدة حضن الانزيم مع المادة الاساس (Alam *et.al.,* 2004).

واضافت الدراسات والابحاث الحديثة دراسة حركيات الانزيم وخاصة ما يتعلق بثبات ميكاليس (K_m) وسرعة التفاعل القصوى (V_{max}) (Antonio *et.al.,* 2005).

ونظرا لاختلاف قدرة الاحياء المجهرية في تحليل السليلوز باختلاف مصادر الكربون ولتوفر مخلفات سعف النخيل ذو المحتوى السليلوزي العالي والذي غالبا ما يكون السليلوز فيه مرتبط بمركبات اللكنين مع قدرة عزلات الاكتينومايستات *Actinomycetes* على تحليل هذه المركبات وجعل السليلوز في متناول العزلات المنتجة لانزيم السليليز ، لذا تعد مثل هذه الدراسات عوامل مساعدة في زيادة انتاج انزيم السليليز واتاحة استعمال مصادر كربونية جديدة ، لذلك اقترح مشروع البحث لهذه الدراسة .

المواد وطرائق العمل

البكتريا المستعملة في انتاج انزيم السليليز :

استعملت عزلة من بكتريا *Streptomyces* التي حصلنا عليها من مختبرات كلية العلوم / جامعة الانبار، وذلك لقدرتها في تحليل المركبات المعقدة اذ استعملت مساعدة في تحليل المصدر الكربوني (سعف النخيل) .

واستخدمت عزلة من بكتريا *Lysobacter enzymogenes* المعزولة لاول مرة في العراق من ترب مدينة الرمادي ، وحصلنا عليها ايضا من مختبرات كلية العلوم / جامعة الانبار لقدرتها العالية في انتاج انزيم السليليز .

تحضير وسط الانتاج :

استعمل مسحوق سعف النخيل الذي حصل عليه من تجفيف سعف النخيل عند درجة حرارة 70° م لمدة 48 ساعة ثم طحن ومرر عبر منخل سعة ثقوبه 40 مش وكان محتواه من السليلوز بحدود 37% ومن اللكنين بحدود 21% ، نميت العزلة *L.enzymogenes* على وسط انتاج يتكون من كبريتات الامونيوم كمصدر نتروجيني بتركيز 0.2% وبواقع 2 غم / لتر ، 0.5 غم / لتر من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين و 0.2 غم / لتر من كبريتات المغنيسيوم المائية و 20 ملغم / لتر من كلوريد الكالسيوم المائي وكبريتات المنغنيز المائية وكبريتات الحديدوز المائية و 0.2 غم / لتر من كل من مستخلصات الخميرة والببتون ، واستعمل مسحوق سعف النخيل كمصدرا كربونيا وحيد وبنسبة 1% ، عقمت المزرعة بالمؤصدة على درجة حرارة 121° م وضغط جو 1.5 لمدة 15 دقيقة ، حضنت المزرعة بدرجة حرارة 35° م ورقم هيدروجيني 9.5 ولمدة خمسة ايام بعد تلقيحها بحجم لقاح 1.5 مللتر / 100 مللتر وسط الانتاج وبكثافة لقاح 6×10^6 واستعملت تقنية الدوارق الهزازة باستعمال دوارق زجاجية سعة 250 مللتر ووضع في كل دورق 100 مللتر من وسط الانتاج وبعدد دورات حاضنة قدرها 150 دورة / دقيقة ، كما استعمل وسط السليلوز الصلب في تقدير قابلية كل من بكتريا *L.enzymogenes* , *Streptomyces sp.* في تحليل السليلوز وكذلك في تقدير قابليتهما بصورة مشتركة في تحليل السليلوز في الوسط الصلب والذي يشابه وسط السليلوز السائل من حيث التركيب عدا اضافة نسبة 1.5% اكار للوسط .

تهيئة وتحضير المصدر الكربوني :

استعمل مسحوق سعف النخيل مصدرا كربونيا وحيد في انتاج انزيم السليليز لتوفره في البيئة بكميات كبيرة ويمكن الحصول عليه بتكلفة واطئة ، حضر المصدر الكربوني بعدة طرائق لغرض تحسين قابلية تحليل السليلوز فيه اذ اشتملت هذه المعاملات على :

1- التسخين : مزج 10 غم من مسحوق سعف النخيل في 100 مللتر ماء مقطر وسخن المزيج الى درجة الغليان ولمدة ساعتين .

2- معاملة القاعدة الـ NaOH : مزج 10 غم من مسحوق سعف النخيل في 100 مللتر من القاعدة هيدروكسيد الصوديوم NaOH بتركيز 1% .

3- معاملة الحامض HCl : مزج 10 غم من مسحوق سعف النخيل في 100 مللتر من حامض الهيدروكلوريك 0.6 HCl عياري .

4- معاملة السيطرة : مزج 10 غم من مسحوق سعف النخيل في 100 مللتر ماء مقطر .

اجريت عملية ترشيح لكل من المعاملات اعلاه باستعمال ورق الترشيح من نوع -1- Whatman وغسل الراسب بالماء المقطر بصورة مستمرة حتى الوصول الى نقطة التعادل في الراشح . جفف الراسب الحاوي على السليلوز في فرن على درجة حرارة 70° م لمدة 48 ساعة واستعمل مصدرا كربونيا في وسط الانتاج .

5- المعاملة الحيوية : تضمنت معاملة المصدر الكربوني مباشرة مع بكتريا *Streptomyces sp.* اضيفت هذه البكتريا الى وسط الانتاج اولا وبحجم لقاح 1 مللتر / 100 مللتر وسط انتاج وبكثافة لقاح5×10^{6}وبعد خمسة ايام اضيف الى وسط الانتاج بكتريا *L.enzymogenes* المستعملة في انتاج انزيم السليليز .

واشتملت المعاملة الحيوية على اضافة بكتريا *Streptomyces* وعلى النحو التالي :

1- اضافة بكتريا *Streptomyces* وبعد خمسة ايام تعقم المزرعة بالمؤصدة على درجة حرارة 105ْ م لمدة 15 دقيقة وبدون تعديل الرقم الهيدروجيني الابتدائي للمزرعة .

2- اضافة بكتريا *Streptomyces* وبعد خمسة ايام تعقم المزرعة بالمؤصدة على درجة حرارة 105ْ م لمدة 15 دقيقة مع تعديل الرقم الهيدروجيني الابتدائي على 9.5 .

3- اضافة بكتريا *Streptomyces* وبدون تعقيم وبدون تعديل الرقم الهيدروجيني الابتدائي .

4- اضافة بكتريا *Streptomyces* وبدون تعقيم مع تعديل الرقم الهيدروجيني على الرقم 9.5 .

تركيز المصدر الكربوني وطريقة اضافته :

استعملت ثلاثة تراكيز للمصدر الكربوني (مسحوق سعف النخيل) وهي 1% ، 1.5% ، 2% واضيف بعدة طرائق وكالاتي :

1- اضيف كل تركيز دفعة واحدة مع تحضير المزرعة .

2- اختير افضل تركيز من الخطوة السابقة وتمت اضافة المصدر الكربوني وبثلاثة حالات (دفعة واحدة ، على شكل دفعات متتابعة بكميات مختلفة) أي قسم الوزن المضاف على شكل دفعات ،اذ ان الطريقة الاولى اضيف فيها 75% من الوزن الكلي للمصدر الكربوني ثم قسم المتبقي على اربعة دفعات ،في حين ان الطريقة الاخرى فاضيف 25%من الوزن الكلي للمصدر الكربوني ثم قسم المتبقي على اربعة دفعات.

3- قسم التركيز المضاف على خمسة اوزان يضاف بصورة يومية ولمدة خمسة ايام بالاعتماد على طريقة اضافة الوسط كاملا وسحب حجم معلوم من المزرعة يوميا وتعويضه مباشرة أي بطريقة التغذية المستمرة .

تقدير فعالية انزيم السليليز :

اتبعت طريقة (Yeoh *et.al.*, 1985) في الكشف عن تحلل السليلوز في وسط السليلوز الصلب ، في حين قيست فعالية انزيم السليليز في الوسط السائل حسب طريقة (Mandel's 1974).

استخلاص وتنقية انزيم السليليز :

نقي الانزيم المنتج بوساطة بكتريا *Lysobacter enzymogenes* وحسب الطريقة الموصوفة من قبل (Takuya *et.al.*, 1997).

تعيين الوزن الجزيئي لانزيم السليليز باستخدام الترشيح الهلامي :

استعملت الطريقة الموصوفة من قبل كل من Laue & Rhodes (1990) لحساب الوزن الجزيئي لانزيم السليليز .

توصيف انزيم السليليز :

تمت دراسة تاثير الارقام الهيدروجينية (5 ، 6 ، 7 ، 8 ، 9 ، 10) ودرجات حرارة (25 ، 30 ، 40 ، 50 ، 60 ، 70 ، 80 ، 90) ْم ومدد حضن الانزيم مع مادة التفاعل وهي (5 ، 10 ، 20 ، 30 ، 60 ، 90 ، 120 ، 150 ، 180) دقيقة . على فعالية انزيم السليليز بعد تنقيته .كما درست حركيات انزيم السليليز وتحديد

كل من ثابت ميكاليس K_m وسرعة التفاعل القصوى V_{max} للانزيم المنقى وباستخدام مادة الكربوكسي مثيل سليلوز CMC كمادة اساس وحسب معادلة Lineweaver Burk Plot .

النتائج والمناقشة

قابلية البكتريا على تحليل السليلوز :

يظهر الجدول (1) ان لكلا الجنسين من البكتريا *Streptomyces* , *Lysobacter* قدرة على تحليل السليلوز وباختلاف المعاملات المستعملة في تحضير وتهيئة المصدر الكربوني واظهرت النتائج تفوق بكتريا *L.enzymogenes* في قابليتها على تحليل السليلوز في الوسط الصلب ، كما اعطت معاملة المصدر الكربوني المعامل بالقاعدة NaOH اعلى قطر للمنطقة الشفافة الناتجة من تحليل السليلوز اذ كان معدل قطر المنطقة الشفافة 4.17 سم .

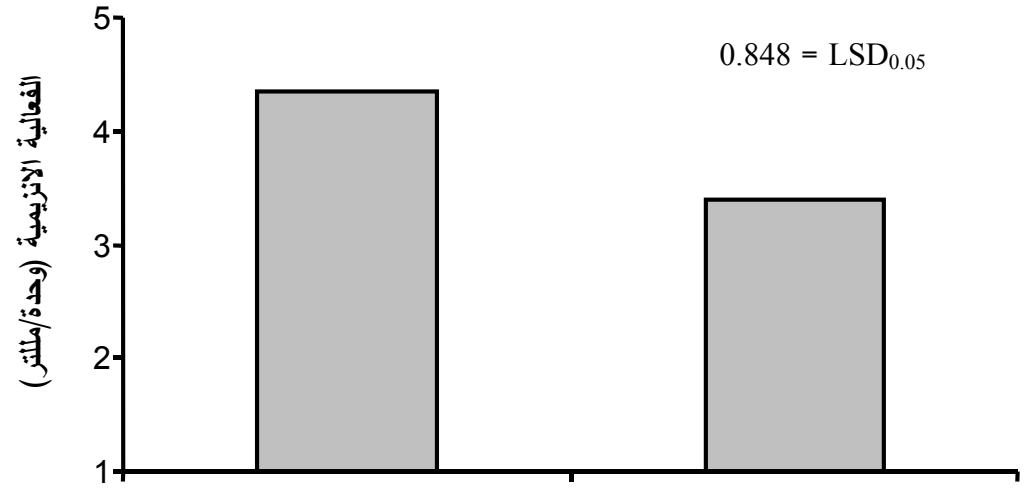
جدول (1) تأثير المعاملات المختلفة في قطر المنطقة الشفافة (سم).

المعاملة	قطر المنطقة الشفافة (سم)			
	HCl	تسخين	NaOH	بدون معاملة (سيطرة)
Streptomycets	3.3	2.7	4.0	2.2
Lysobacter	4.0	4.1	4.2	2.7
St. + Lys.	5.0	3.7	5.7	3.2

LSD, 0.05 ، عزلات = 0.372 ، معاملات = 0.430 ، تداخل = 0.745

وهذا يتفق مع ما حصل عليه Ojumu *et.al.,* (2003) وربما يعود ذلك الى دور هيدروكسيد الصوديوم في اذابة اللكنين المرتبط بالسليلوز في سعف النخيل وبالتالي المساعدة على سرعة تحلل السيليلوز من قبل البكتريا المحللة للسيليلوز.

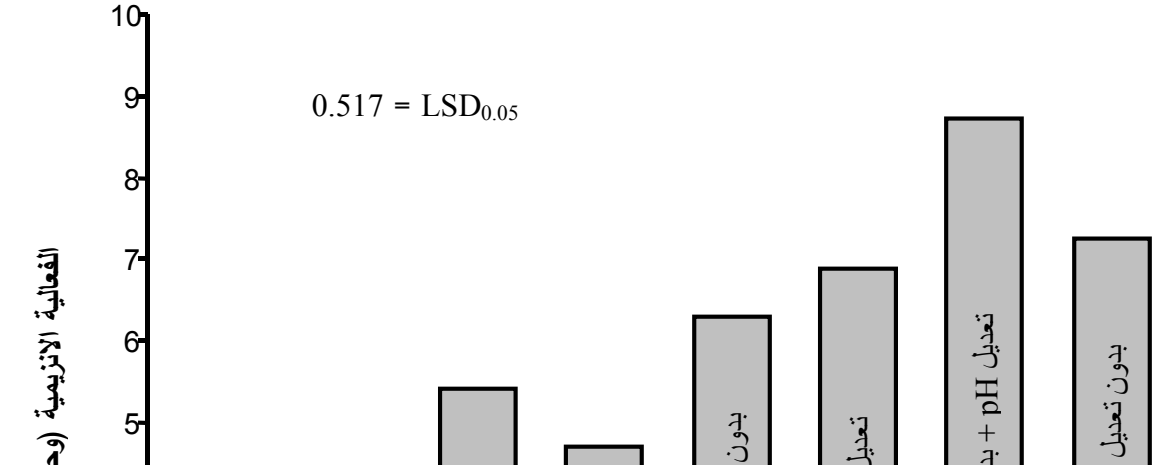
وعند استعمال خليط من كلا الجنسين من البكتريا فقد اظهرت النتائج تفوق معنوي لمعاملة الخليط من الجنسين في تحليل السليلوز اذ اعطى اعلى قطر للمنطقة الشفافة وكان 5.7 سم (جدول 1) ، وباستعمال المصدر الكربوني المعامل بهيدروكسيد الصوديوم ويؤكد ذلك الى امكانية عمل كلا الجنسين معا في تحليل السليلوز وبعدم حصول التضاد الحيوي بينهما وهذا مما اتاح الفرصة في استعمالهما معا في انتاج السليلوز في الوسط السائل .



الشكل (1) يبين تاثير مدة الحضن في قابلية بكتريا *Streptomyces* في انتاج انزيم السليليز اذ تبين النتائج ان حضن البكتريا لمدة خمسة ايام اعطى انتاجية اعلى من الانزيم مقارنة بمدة الحضن عشرة ايام حيث كانت الفعالية الانزيمية 4.343 ، 3.397 وحدة / مللتر على التوالي ولكلا مدتي الحضن ، وهذه النتيجة تمت الافادة منها لاحقا عند استعمال بكتريا .*Streptomyces* sp في تهيئة وتحضير المصدر الكربوني لغرض استعماله في انتاج انزيم السليليز بوساطة بكتريا *L.enzymogenes* .

تاثير معاملات تحضير وتهيئة المصدر الكربوني في انتاج انزيم السليليز :

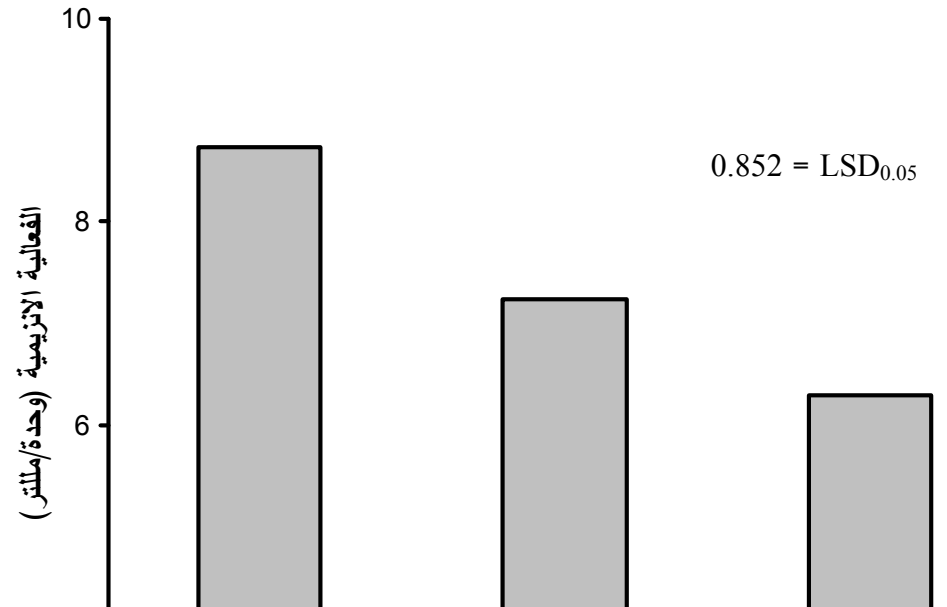
اظهرت النتائج الموضحة في الشكل (2) ان لعملية تحضير وتهيئة المصدر الكربوني تاثير معنوي في زيادة انتاج انزيم السليليز واشارت النتائج الى تفوق المعاملة التي يتم تحضيرها حيويا باستعمال بكتريا *Streptomyces* حيث اعطت المعاملة التي تم استعمال هذه البكتريا فيها وبدون تعقيم مع تعديل الرقم الهيدروجيني اعلى النتائج وبلغت الفعالية الانزيمية 8.727 وحدة / مللتر ويعود ذلك الى ان بكتريا الـ *Streptomyces* ساعدت في تحليل اللكنين المرتبط مع السليلوز في سعف النخيل كما انها تساهم في تحليل السليلوز أي تعمل بصورة متكاملة مع بكتريا *L.enzymogenes* كما ان تعديل الرقم الهيدروجيني الى الرقم الامثل لبكتريا *L.enzymogenes* وهو 9.5 سبب زيادة واضحة في تحليل السليلوز وبالتالي زيادة في انتاجية انزيم السليليز.



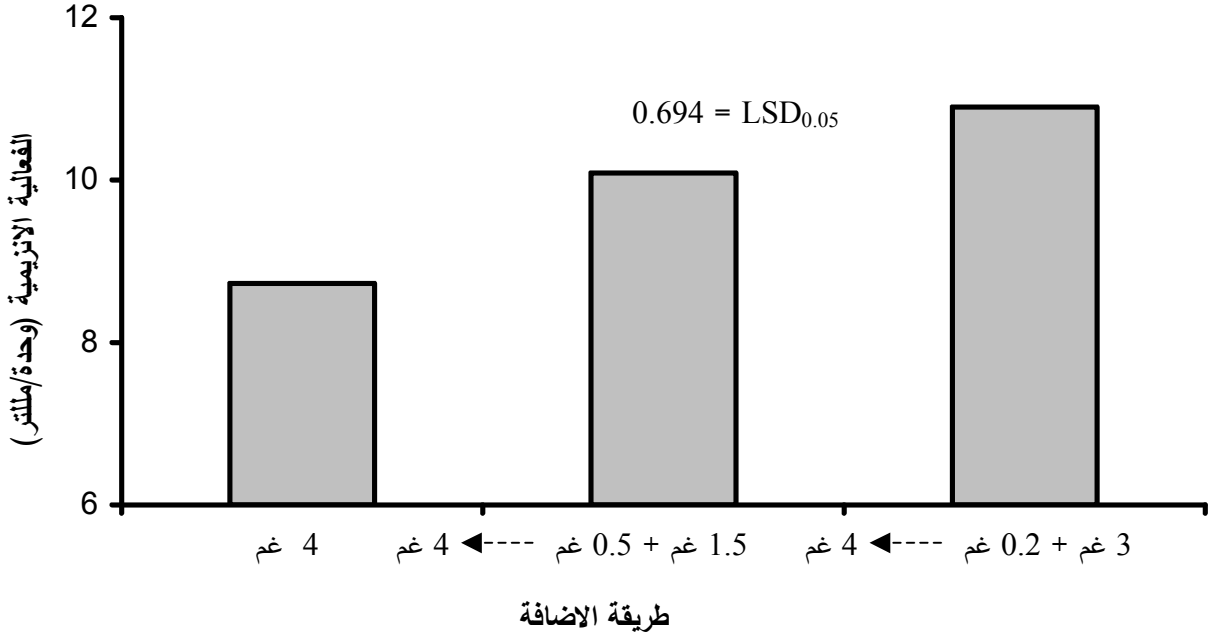
وكذلك تبين النتائج الى حصول زيادة معنوية في انتاج الانزيم بالنسبة للمعاملات الاخرى التي تم تحضير المصدر الكربوني باستعمال القاعدة او الحامض او التسخين مقارنة بمعاملة السيطرة وتتفق هذه النتائج مع النتائج التي توصل اليها كل من (Ojumu *et.al.,* 2003، Rifaat *et.al.,* 2005 ، Dien *et.al.,* 2006. الذين اشاروا جميعهم الى اهمية تهيئة وتحضير المصدر الكربوني قبل اضافته لوسط الانتاج وذلك للحصول على زيادة في انتاج انزيم السليليز .

تاثير استعمال نظام الدفعات للمصدر الكربوني في تغذية المزرعة :

النتائج الموضحة في الشكل(3) اوضحت ان اعلى انتاجية للانزيم كانت عند تركيز المصدر الكربوني 1% اذ بلغت الفعالية الانزيمية 8.727 وحدة / مللتر هذه النتيجة تتفق مع ما اشار اليه كل من (Alam *et.al.,* 2004، Scafner & Toledo 2004) ، كما اوضحت النتائج في الشكل نفسه ان انتاجية الانزيم انخفضت مع زيادة تركيز المصدر الكربوني في الوسط ، ان زيادة تركيز المصدر الكربوني قد يسبب زيادة في تجميع الناتج النهائي لعملية التحلل وهو الكلوكوز مما يسبب تثبيط لعملية انتاج الانزيم وهذا ما اكده (Narasimha *et.al.,* 2006).

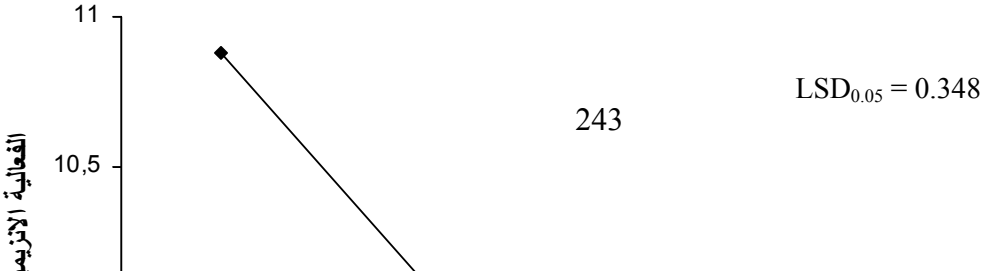


من جانب اخر نجد ان اضافة المصدر الكربوني على دفعات الى الوسط الزرعي اعطى انتاجية اعلى للانزيم حيث بلغت الفعالية الانزيمية 10.902 وحدة / مللتر عند اضافة (75%) من كمية المصدر اولا في حين يقسم الباقي على اربعة دفعات يومية وقد يعزى السبب هنا ان الاضافة بهذه الطريقة تعطي للبكتريا فرصة ووقت افضل لتحليل المصدر الكربوني وكذلك لايسبب تجمع الناتج النهائي للتحلل وهو الكلوكوز وبالتالي الابتعاد عن التثبيط بالناتج النهائي .وهذا ما يوضحه الشكل(4).



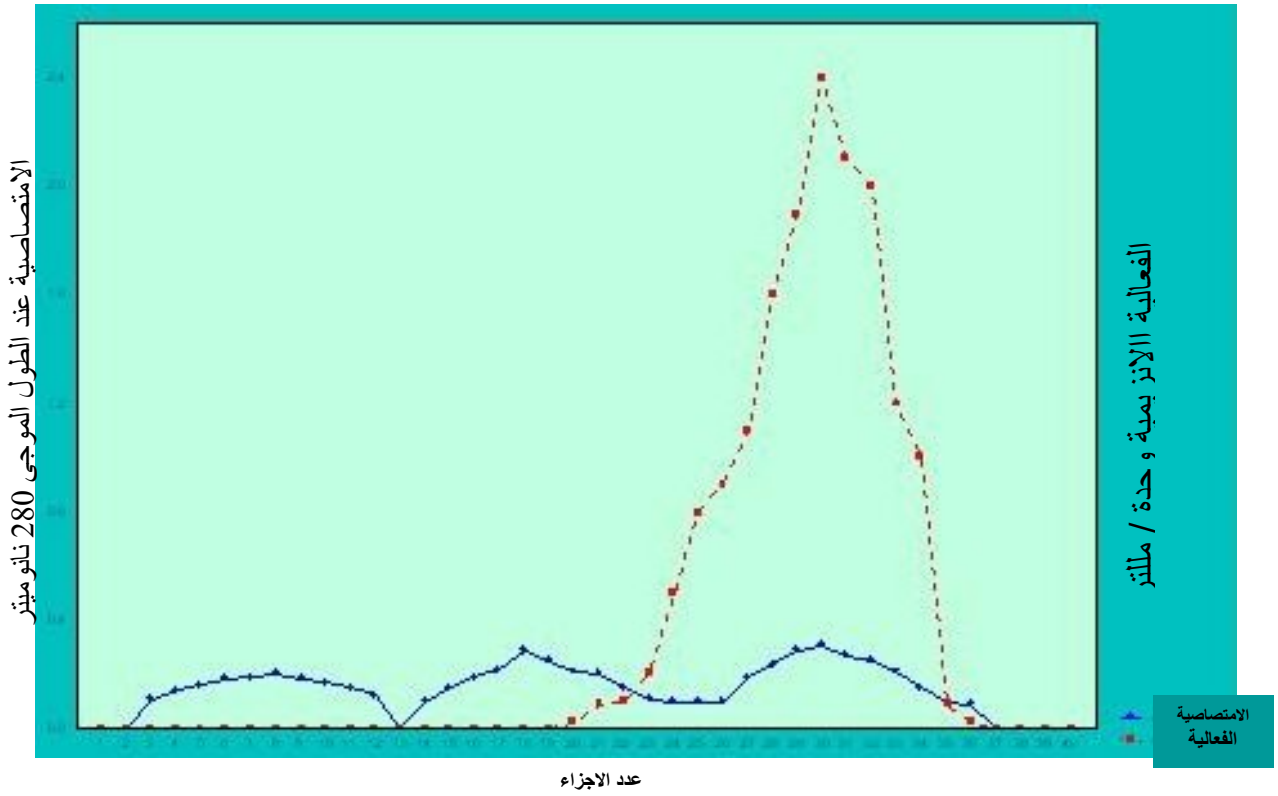
شكل 4 تأثير طريقة اضافة المصدر الكاربوني في انتاجية انزيم السليليز

يتبين من الشكل (5) ان اضافة المصدر الكربوني على دفعات يومية ولكن بصورة سائلة مع حجم معلوم من الوسط الزرعي يرافقها سحب يومي للمنتوج وبنفس الحجم المضاف يوميا لم يعط زيادة واضحة في انتاج الانزيم مقارنة بالطريقة الموضحة نتائجها في الشكل (4) حيث بلغت الفعالية الانزيمية 10.878 وحدة / مللتر مقارنة مع 10.902 وحدة / مللتر في الطريقة السابقة .

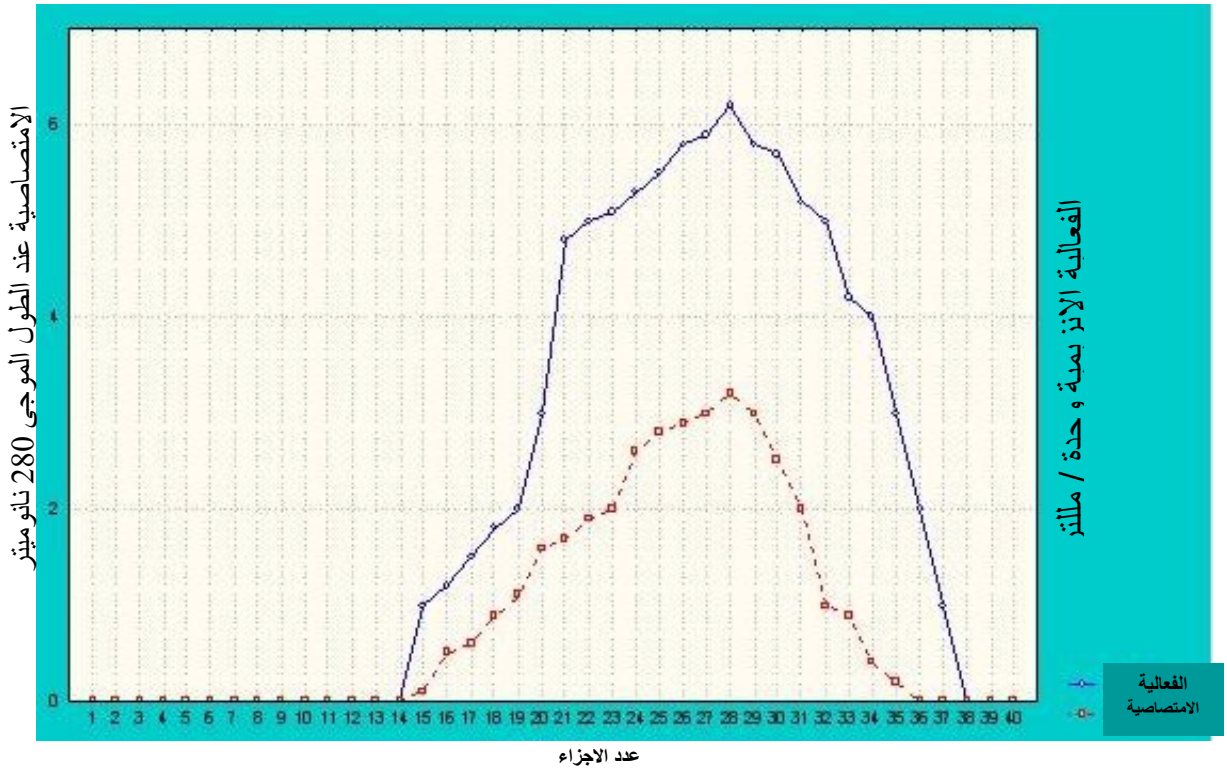


تنقية انزيم السليليز :

اشتملت الخطوات الاساسية لتنقية انزيم السليليز على عملية ترسيبه بكبريتات الامونيوم حيث بلغت الفعالية الانزيمية بعد هذه الخطوة 6.472 وحدة / مللتر أذ تلعب كبريتات الامونيوم دورا مهما في عملية تركيز الانزيم عن طريق معادلة الشحنات الموجودة على سطح البروتين بطريقة جزيئات الماء المحيطة بجزيئات البروتين مما ادى الى انخفاض ذائبية البروتين وترسيب (Englard & Scifters 1990). في حين بلغت الفعالية الانزيمية بعد اجراء عملية التبادل الايوني باستعمال المبادل الايوني DEAE-Sephacyl 5.993 وحدة / مللتر وكما موضح في الشكل (6) . اما الفعالية الانزيمية بعد اجراء عملية الترشيح الهلامي باستعمال العمود Sephacryl-S-300 فقد بلغت 6.017 وحدة / مللتر وبحصيلة انزيمي قدرها 86.06% كما موضح في الشكل (7).



شكل (6) كروموتوغرافيا التبادل الايوني لتنقية انزيم السليليز المنتج من العزلة المحلية
L.enzymogenes



شكل (7) كروموتوغرافيا الترشيح الهلامي لتنقية انزيم السليليز المنتج من العزلة المحلية
L.enzymogenes

تعيين الوزن الجزيئي لانزيم السليليز :

تم تقدير الوزن الجزيئي لانزيم السليليز عن طريق الترشيح الهلامي باستعمال هلام Sephacryl-S-300 من خلال العلاقة بين نسبة حجم الاسترداد الى حجم الفراغ ولوغاريتم الوزن الجزيئي V_e / V_0 للبروتينات القياسية المستعملة وهي

(Ribonuclease Mwt. 13700 Dalton

، Chymotrypsinogen Mwt. 25000 Dalton

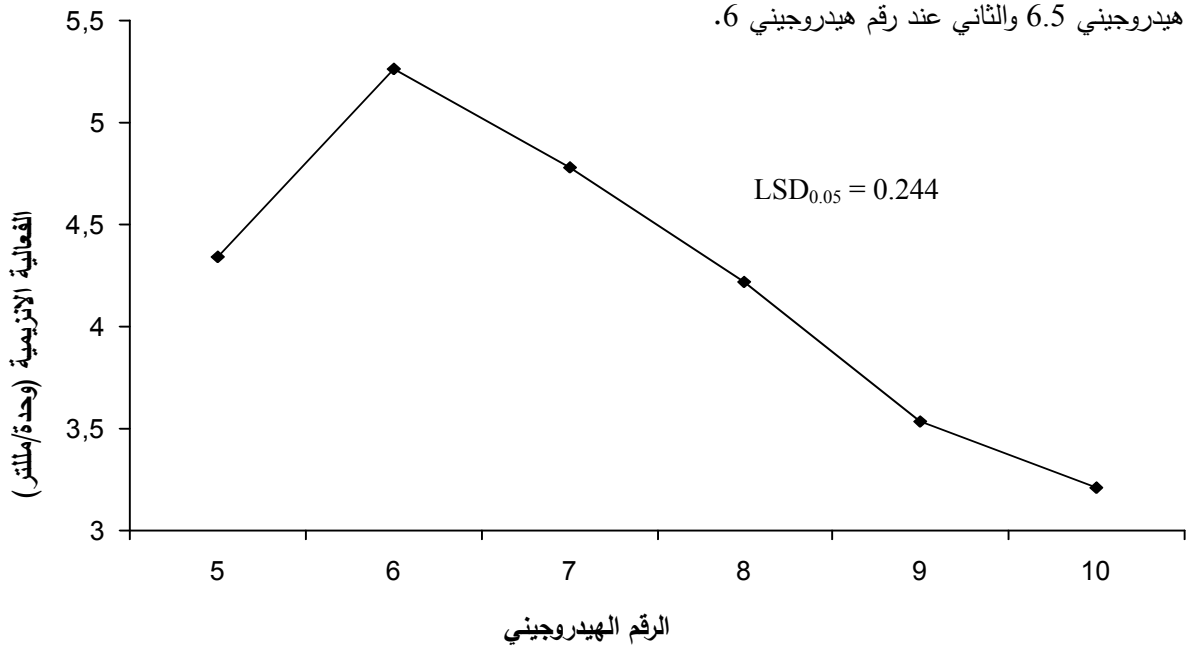
Ova albumin Mwt 43000 Dalton ،

Bovine Serum Albumin 67000 Dalton) .

واظهرت النتائج ان الوزن الجزيئي لانزيم السليليز كان بحدود 36000 دالتون .

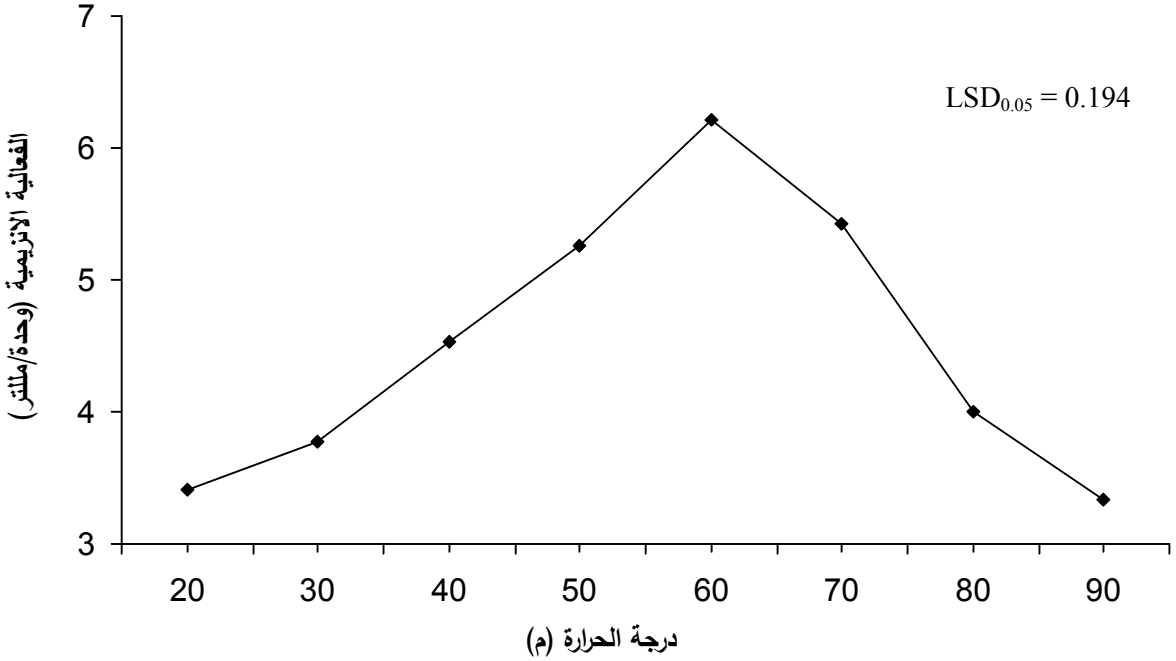
توصيف انزيم السليليز بعد التنقية :

يبين الشكل (8) ان اعلى فعالية لانزيم السليليز بعد تنقيته كانت عند الرقم الهيدروجيني 6 وبلغت الفعالية الانزيمية 5.260 وحدة / مللتر ثم بدات الفعالية الانزيمية بالانخفاض مع زيادة الرقم الهيدروجيني ويعزى السبب في ذلك الى تاثير مجاميع الاحماض الامينية الموجودة بالموقع الفعال او جزيئة الانزيم على الحالة الايونية لمادة الاساس (Chauthaiwale & Rao 1994) وتتفق هذه النتيجة مع ما حصل عليه كل من (Alam *et.al.,* 2004، Antonio *et.al.* 2005، حيث حصل الاول على اعلى فعالية انزيمية عند رقم هيدروجيني 6.5 والثاني عند رقم هيدروجيني 6.



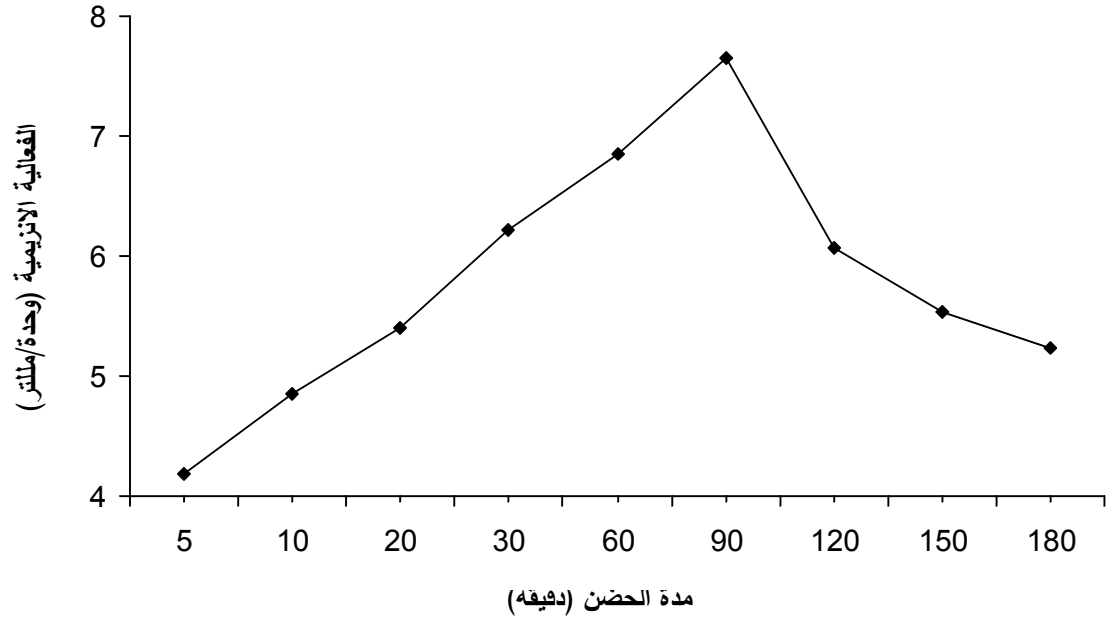
شكل 8 تأثير الرقم الهيدروجيني في فعالية انزيم السليليز المنقى من العزلة *L. enzymogens*

اما الشكل (9) فيوضح تاثير درجات الحرارة المختلفة على فعالية انزيم السليليز وكانت اعلى فعالية انزيمية 6.210 وحدة / مللتر عند درجة حرارة 60 ْم ، ويظهر الشكل نفسه ان الفعالية الانزيمية تنخفض مع ارتفاع درجات حرارة الحضن عن درجة 60 ْم ويعزى السبب في ذلك الى زيادة الحركات الاهتزازية التي تؤثر في التركيب الثالثي للانزيم مما يؤدي الى مسح الانزيم وبالتالي فقدان الجزء الاكبر من فعالية الانزيم (Brows *et.al.,* 1993) وتتفق هذه النتيجة مع ما حصل عليه Aguiar (2001) الذي وجد ان افضل فعالية للانزيم المنتقى والمنتج من قبل فطر *Aspergillus niger* كانت عند درجة حرارة 60 ْم.



شكل 9 تأثير درجة الحرارة في فعالية انزيم السليليز المنقى من العزلة *L. enzymogens*

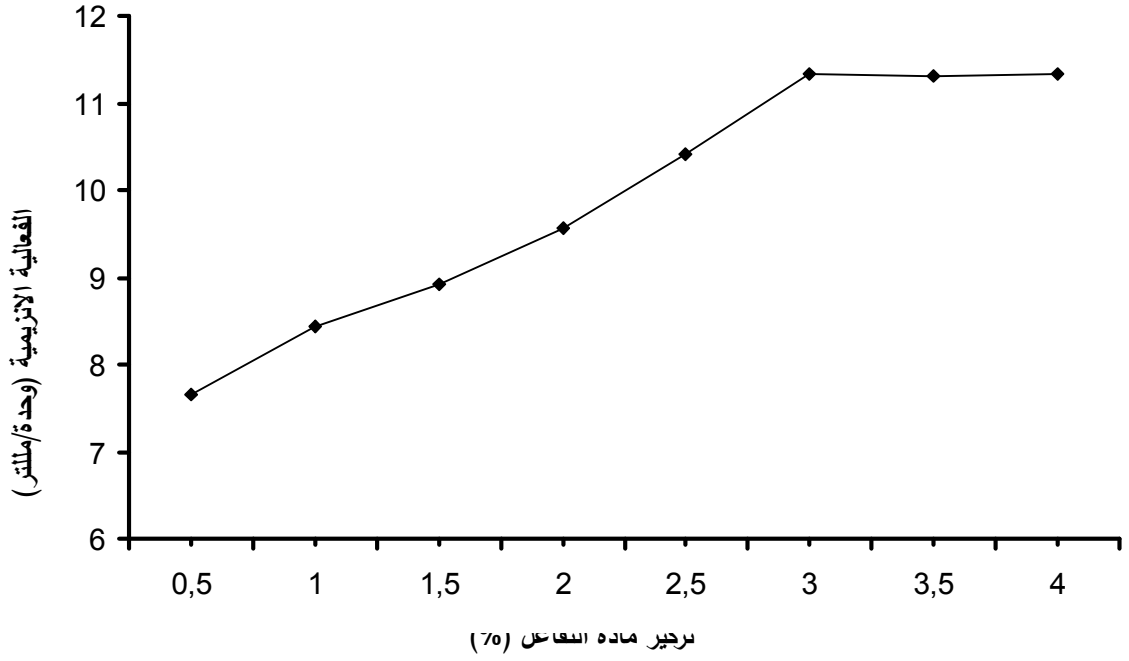
الشكل (10) يبين تاثير وقت تفاعل الانزيم مع مادة الاساس على فعالية الانزيم اذ بلغت اعلى فعالية انزيمية بعد مرور 90 دقيقة على تفاعل الانزيم مع مادة الاساس وكان مقدار الفعالية الانزيمية 7.644 وحدة / مللتر ، في حين انخفضت الفعالية الانزيمية مع زيادة وقت التفاعل لتصل الى 5.231 وحدة / مللتر بعد مرور 180 دقيقة .



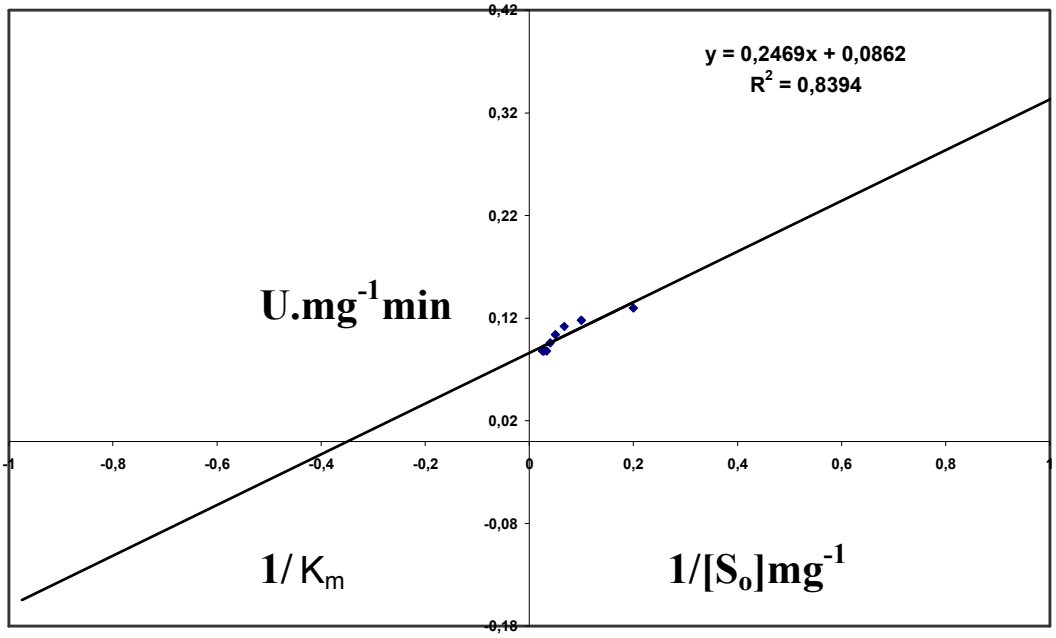
شكل 10 تأثير مدة حضن الانزيم في فعالية انزيم السليليز المنقى من العزلة *L. enzymogens* عند pH 6 ودرجة حرارة 60 مئوي.

اما فيما يتعلق بتقدير الثوابت الحركية لانزيم السليليز فقد درس تاثير تركيز مادة الاساس الكربوكسي مثيل سليلوز CMC لمحلول التفاعل الانزيمي في فعالية الانزيم المنقى وتوضح النتائج في الشكل (11) ان هنالك زيادة واضحة ومعنوية في فعالية الانزيم بزيادة تركيز المادة الاساس لتصل اعلى فعالية عند تركيز 3% اذ بلغت الفعالية الانزيمية 11.322 وحدة / مللتر فيما لم تزداد الفعالية الانزيمية عند استعمال تراكيز اعلى من المادة الاساس مما يدل على ان جميع المواقع الفعالة للانزيم قد اشغلت بمادة الاساس وعليه لايؤثر زيادة تركيز مادة الاساس في الفعالية الانزيمية .

رسمت العلاقة بين مقلوب السرعة الاولية للتفاعل $1/[V_0]$ ومقلوب تركيز مادة التفاعل $1/[S_0]$ لتقدير ثابت ميكاليس (K_m) والسرعة القصوى (V_{max}) للانزيم بعد تنقيته وحسب معادلة Lineweaver-Burk Plot وبينت النتائج ان قيم ثوابت حركية الانزيم K_m ، V_{max} كانت على التوالي 12.75ملغم/مللتر/دقيقة و12.5وحدة/مللتر.



شكل 11 تأثير التراكيز المختلفة لمادة التفاعل CMC في فعالية انزيم السليليز المنقى من العزلة *L. enzymogens*



شكل (12) العلاقة بين مقلوب السرعة الاولية للتفاعل ومقلوب تركيز مادة التفاعل لتحديد قيمة ثابت ميكالس K_m والسرعة القصوى V_{max} حسب طريق Line Weaver- Burk Plot

المصادر

1. Ojumu, Tunde Victor, Solomon Bamideleogo; Betiku, layokun; Stephen Kolawole and Amigun, Bamikolel. (2003). Cellulase Production by *Aspergillus flavus* Linn Isolate NSPR 101 Fermented in Sawdust, bagasse and corncob, African Journal of Biotechnology 2 (6): 150-152.
2. Alam, M. Z, M. A. Manchur and M. N. Anwar. (2004). Isolation, Purification, Characterization of cellulolytic Enzymes produced by the Isolate Streptomyces omiyaensis. Pakistan. J. of Bio. Sci. 7 (10): 1647-1653.
3. Tawfiq, Aziz, Asal; Mohammed. A. K. Ibrahim and Baha. A. Marouf. (2002). A Study on Celluloltic activities of Streptomyces isolates. Iraqi. J. Biotech. 1 (1): 148-160.
4. Holt, G. G; Krig, N. R; Sneath, P. H. A; Staly, J. J. and willimas, S. T. (1994). Bergey's Manual of determinative Bacteriology, 9th. U.S.A.
5. Rajoka, Muhammad Ibrahim. (2004). Influence of various fermentation variables on Exo-glucanase production in Cellumonas flavigena. Electronic J. of Biotech. Vol. 7. No. 3.
6. Taylor E. Larry. Bernard Henrissat, Pedrom. Coutinho, Nathan A.Ekborg, Steven W.Hutcheson, and Ronald M.Eeiner. (2006). Complete Cellulase system in the Marine Bacterium Saccharophagus degardans. Strain 2-40T. J. of Bacteriology Vol. 188, No. 11. P. 3849-3861.
7. Umar, M. Dahot and Hani. Noowrio. (1996). Microbial Production of cellulose by Aspergillus fumigates using wheat straw as carbon source Journal of Islamic Academy of Sciences. 9. (4).
8. Rifaat, H. M, Z. A. Nagieb, Y. M. Ahmed. (2005). Production of Xylanases by Streptomyces Species and their beaching effect on rice straw pulp. Appl Ecology and Environmental Res. 4 (1): 151-160.

9. Dien, B. S., Li, X., Item, L. B., Jordan, D. B., Nichols, N. N., O Bryan, P. J., Cotta, M. A. (2006). Enzymatic Saccharification of Hot-Water pretreated corn and Microbial Technology. 39: 1137-1144.
10. Mehmedaliga Jahic, Fredrik Walberg, Bollok, Perciv Garcia and Seven-Olof Enfors. (2003). Temperature limited Fed-batch technique For control of proteolysis in pichia pastoris bioreactor culture. Microbial cell Factories, 2: 6.
11. Lyayi, Eustace A. (2004). Changes in the cellulose, Sugar and Crude protein contents of agro-industrial by- products fermented with Aspergillus niger, Aspergillus flavus and Penicillium sp. African J of Biotech 3 (3): pp. 186-188.
12. Schafner, D. W. and R. T. Toledo. (2004). Cellulase Production in continuous culture by Trichoderma reesei on Xylos-based media. Biotech and Bioeng J. V. 39, Issue 8. p. 865-869.
13. Takuya Koseki, Shinji Furuse, Kinion Lwano, Hirosh sakai and Hiroshi matszawa. (1997) An. Aspergillus awamor cetylestevase; purification of the enzyme, and cbning and sequencing of the qene. Biochem. J. 326. Pp. 485-490.
14. Antonio Jose Goulart, Eleonora Cano Carmona and Rubens Monti. (2005). Partial purification and properties of cellulose-Free Alkaline Xylanase produced by Rhizopws StoloniFer in Solid-State Fermenation . Brazilin Archives of Bio and Tech. Vol. 48, V. 3: pp. 327-333.
15. Yeoh, H. H, Khow, E. and Lim, G. (1985). A Simple method for screening celluloytic fungi. Mycologia 77: 161-162.
16. Mary Mandels, Mary. (1974). Production and application of cellulose talaboratory procedure. Handbook. U. S. Army materials laboratories.
17. Laue, T. M. and Rhodes, D.G. (1990). Gelfiltration In: Methods of Enzymology (ed. Deutsher, M.P) V. 182: 556-587. Academic press.
18. Narasimha G, Sridevi A, Buddolla Viswanath, Subhosh chanara M, Rajasekhar Reddy B. (2006). Nutrient effects on production of celluloytic enzyme by Aspergillus niger. African J of Botech . Vol. 5, pp. 472-476.
19. Englard, E. M. and Sifters. (1990). Precipitation in: Methods in Enzymology (ed. Marray, E. D and Dentscher, P.) Vol. 182: 425-441.
20. Chauthai wale, J. V. and Rao, M. B. (1994). Production and purification of exracellulare D-Xylose isomerase from alkaliphilic, thermophilic Bacillus sp. Appl. Environ, Microbial 60: 4495-4499.
21. Brow, S. H., Sjoholm, C. and Kelly, R. M. (1993). Purification and characterization of highly thermostable glucose isomerase produsedby the extremely thermophilic Enbacterium Thermotogamritima. Biotechnol. Bioeng 41: 878-886.
22. Aglliar, C. L. (2001). Biodegardation of the cellulose from Sugarcane bagasse by fungal cellulose. Cienc. Techn. Alimen. 3 (2): 117-121.