P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703
2007 ,(1), (2) :24-37

مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة (JUAPS)

Open Access

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

ظافر فخري عبد القادر الراوي

جامعة الانبار – كلية التربية – قسم علوم الحياة

معلومات البحث:

تاريخ التسليم: ٢٠٠٦/٧/٢٥
تاريخ القبول: ٢٠٠٧/١/١٥
تاريخ النشر: ١٤/ ٠٦ / ٢٠١٢

DOI: 10.37652/juaps.2007.15441

الكلمات المفتاحية:

كتريا *Cytophaga* ،
إنزيم السليليز ،
كوالح الذرة ،
نخالة الحنطة.

الخلاصة:

تهدف الدراسة إلى إنتاج أنزيم السليليز باستعمال عزلتين من بكتريا Cytophaga اذ عزلت الاولى والتي يرمز لها CR1 من تربة منطقة الجزيرة في مدينة الرمادي والمزروعة بمحصول الباميا ،في حين عزلت 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 كبيرة في البيئة. أظهرت العزلة CR2 قدرة عالية في إنتاج أنزيم السليليز في الوسط ألزرعي السائل وكان أفضل إنتاج لها عند الرقم الهيدروجيني 7.5 ودرجة حرارة 35م وباستعمال نخالة الحنطة بتركيز 1.5%سليلوز عند حضنها بحاضنة هزازة وبعدد دورات 125 دورة/دقيقة وحجم لقاح 1مللتر/100 مللتر وبعد 5أيام حضن إذ بلغت الفعالية الإنزيمية 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 المحلية CR2 بأتباع خطوات تنقية شملت الترسيب بكبريتات 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 دالتون باستعمال كروموتوغرافيا الترشيح الهلامي بعمود Superdex-200وأن الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم هو 6.0 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.

المقدمة:

يعد السليلوز من المركبات الكربوهيدراتية المتعددة السكريات إذ يتكون من سلاسل طويلة مستقيمة من وحدات سكر الكلوكوز المرتبطة فيما بينها بأواصر كلايكوسيدية من نوع (B,1-4).

يشكل السليلوز نسبة عالية من مكونات النباتات إذ تصل حوالي ٥٠% من الكتلة النباتية ، وتتراكم كميات كبيرة من المخلفات النباتية في الطبيعة بما يجعلها تعتبر من الملوثات الصلبة التي تسبب الكثير من المشاكل في البيئة ،كما أن هناك العديد من المصادر السليلوزية في الطبيعة والتي تضم المخلفات الزراعية ومخلفات تصنيع الغذاء وتصنيع الأخشاب ومخلفات الصناعات الو رقية كما تشتمل على المخلفات الحيوانية المختلفة ،ولكن المخلفات النباتية هي الأهم من بين تلك المصادر والتي يمكن بعد تحللها أن تستخدم في إنتاج العديد من المركبات المهمة التي يمكن الاستفادة منها[1] .

من الأمور المهمة التي لفتت نظر الباحثين هي صعوبة تحلل السليلوز والتي تنتج من كون جزيئاته مرتبطة بأواصر هيدروجينية مما

* Corresponding author at: Anbar University - College of Education Iraq;
E-mail address: alrawi_daffer@yahoo.com

يسبب تكون السليلوز البلوري والتي تجعل السليلوز غير ذائب في الماء[2].

يعتبر تحلل السليلوز بوساطة الطريقة الحيوية وباستعمال الأنزيمات المنتجة ميكروبيا من قبل الأحياء المجهرية من الطرق المهمة إذ تتحول سلاسل السليلوز الطويلة إلى سلاسل قصيرة تليها خطوة أخرى تشمل كسر الأواصر (B,1-4) ومن ثم تحويل هذه السلاسل القصيرة إلى سكريات ذائبة [3].

ويوجد في الطبيعة عدد كبير من الأحياء المجهرية القادرة على إنتاج الأنزيمات المحللة للسليلوز من بينها أنواع مختلفة من البكتريا التي تختلف في متطلبات النمو[4].

وتعد بكتريا الـ Cytophaga ليست سوطية وتحتوي أشكال مشابهة للسيانوباكتريا محللة للسليلوز ويضم جنسها عدة أنواع بما في ذلك أنواع بحرية[5].

أما نظام أنزيمات السليلز في هذا الجنس من البكتريا فوجد كل من [6] أن بكتريا Cytophaga WTHC2421 تنتج نوعين من أنزيمات السليليز ولهما أوزان جزيئية واطئة احدهما وزنه ألجزيئي 6250 دالتون والثاني 8650 دالتون.

أما [8] فقد استعملا بكتريا نوع Cytophaga sp.NCIB 9497 في إنتاج أنزيم السليليز باستخدام المزارع المستمرة . في حين إن [9] فقد حصلوا على أفضل إنتاج للأنزيم باستخدام بكتريا Cytophaga sp.LX-7 ومصادر سليلوزية مختلفة كان أفضلها مسحوق السليلوز MN300 ثم الكاربوكسي مثيل سليلوز CMC .

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

ان أنزيم السليليز هو الذي يحفز تحليل السليلوز الذائب وغير الذائب عن طريق كسر الآصرة الكلايكوسيدية (B,1-4) التي تربط بين وحدات الكلوكوز ،والإنزيم عبارة عن نظام إنزيمي من ثلاثة مكونات أساسية هي Endo-glucanase, Exo-glucanase و B-glucosidase وعمليات تحلل وهضم المواد السليلوزية تتم عن طريق هذه المكونات الأساسية للنظام الإنزيمي [11].

أن إنتاج الأنزيم يتأثر بظروف بيئية مختلفة منها الرقم الهيدروجيني pH حيث وجد أن هنالك مدى جيد من الرقم الهيدروجيني تستطيع البكتريا فيه إنتاج الأنزيم وباختلاف الأحياء المجهرية المستخدمة في عملية الإنتاج هذه فقد وجد[12] أن سلالة DLG لبكتريا Bacillus subtils تنتج الأنزيم 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 أكثر ثباتا من الأنزيم المنتج من قبل البكتريا المحبة للحرارة المعتدلة أذا تم استعماله تحت درجات حرارة مرتفعة ، 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 قابلية 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 الو رقية 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 بتركيز 2% و0.5 غم من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين و0.2 غم من كبريتات المغيسيوم1 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 ١% وبكثافة ٦ × ٦١٠ وحدة تكوين مستعمرة / مللتر واستخدمت تقنية الدوارق الهزازة باستعمالدوارق زجاجية سعة 250 مللتر ووضع في كل دورق 100 مللتر 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 هي30,35,40,45,50 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 ألزرعي 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 وبتركيز0.5,1.0,1.5,2,2.5% 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% ,.25,0.5 0.1,0 إلى وسط الإنتاج لتحديد تأثير إضافة هذه الايونات على إنتاج الأنزيم.

تنقية الأنزيم:

استخدمت كبريتات الامونيوم وبإضافة كميات معلومة منها إلى المستخلص 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 المنظمTris HCl وبتركيز ٠,٠٢ 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 2.1*40 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 الديلزة 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 MWt 13700 67000 , Ovalbumin MWt 43000 , Chymotrypsinogen والمحضرة بإذابة 15 ملغم من Bovine serum albumin MWt كل منها في3 مللتر 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 لوغارتيم 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 مولا ري 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 التقية 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 (١) 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/مللتر في حين إن العزلةCR1 ولنفس المصدر الكربوني أعطت أفضل فعالية للأنزيم عند الرقم الهيدروجيني 8.5 إذ كانت فعالية الأنزيم 4.79 وحدة/مللتر.

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/مللتر في حين أعطت العزلة CR1 أفضل إنتاجية للأنزيم عند درجة حرارة 40م إذ كانت فعالية الأنزيم 5.13 وحدة/مللتر ،في حين أظهرت درجات الحرارة الأخرى انخفاضا في إنتاجية الأنزيم وكما موضح في الشكل (٢) ويعزى تأثير درجة الحرارة على إنتاجية الأنزيم من حيث تأثيرها في سرعة التفاعلات الأنزيمية داخل الخلية أو على بعض العوامل المساعدة لنمو العزلة كانخفاض نسبة الأوكسجين الذائب وتثبيط البروتينات كما أن درجات الحرارة المنخفضة تسبب بطئ نمو الكائن ألمجهري وبالتالي تخليق الأنزيم(22).أما تأثير نوع المصدر الكربوني وتركيزه على إنتاجية الأنزيم فقد أظهرت النتائج الموضحة في الأشكال (٣ و ٤) أن أفضل انتاجية للانزيم كانت باستعمال العزلةCR2 ونخالة الحنطة بتركيز 1.5% إذ كانت فعالية الأنزيم 5.52 وحدة/مللتر.

الوقت الذي أعطت العزلة CR1 أفضل انتاجية للانزيم عند استخدام نفس المصدر الكربوني وبنفس التركيز إذ كانت فعالية الأنزيم 5.24 وحدة/مللتر علما أن عملية تحديد نوع المصدر الكربوني وتركيزه تعتبر من العوامل المهمة في الإنتاج بالتقنيات الحيوية والتي تحدد نجاح العملية الإنتاجية. وبينت نتائج عمليات التهوية على إنتاج الأنزيم من قبل كل من العزلتين أظهرت النتائج الموضحة في الشكل (٥) أن أفضل انتاجية للانزيم كانت عند استعمال العزلة المحليةCR2 وكانت فعالية الأنزيم 5.52 وحدة/مللتر عند عدد دورات حاضنة 125دورة/دقيقة ،في الوقت الذي أعطت العزلة المحليةCR1 أفضل انتاجية للانزيم عند عدد دورات حاضنة 150دورة/دقيقة وكانت فعالية الأنزيم 5.24وحدة/مللتر .

أما فيما يتعلق بتأثير حجم اللقاح على انتاجية الأنزيم فيوضح الشكل (٦) أن أفضل انتاجية للانزيم كانت عند استعمال العزلة المحليةCR2 وبحجم لقاح مقداره ١% من الوسط إذ كانت فعالية الأنزيم 5.52 وحدة/مللتر في الوقت الذي أعطت العزلة الأخرىCR1 أفضل انتاجية للانزيم عند استعمال لقاح بحجم ١,٥ % من الوسط وكانت فعالية الأنزيم 5.41 وحدة/ مللتر ، ويلاحظ أن حجم اللقاح المعتدل أعطى أفضل انتاجية وان استعمال كثافة لقاح قليلة تسبب انخفاض في الإنتاج لأنه يسبب انخفاض في الكتلة الحيوية للعزلة وبالتالي ينعكس على انتاجية الأنزيم ،أما انخفاض انتاجية الأنزيم عند استعمال حجم لقاح كبير فقد يعود السبب إلى التنافس لاستغلال المغذيات في الوسط ألزرعي (23).وباستعمال ظروف الإنتاج المثلى التي اظهرتها الخطوات السابقة درس تأثير مدة الحضن على انتاجية الأنزيم وكما موضح في الشكل(٧) إذ حصل على أفضل انتاجية للانزيم عند استخدام العزلة CR2 وبعد خمسة أيام حضن وكانت فعالية الأنزيم 5.976 وحدة/مللتر في الوقت الذي أعطت العزلةCR1 أفضل فعالية للانزيم بعد ستة أيام حضن وكانت 5.631 وحدة/مللتر ،وقد يعزى السبب في انخفاض فعالية الأنزيم بعد مدة الحضن المثلى إلى حصول تغيرات بيئية في وسط الإنتاج فضلا عن أمكانية حصول تحلل ذاتي للخلايا والذي يرافقه إطلاق مواد ايضية تؤثر سلبا على انتاجية الأنزيم وهذا يتفق مع ما ذكرته[14].

وفي محاولة لغرض تحسين ظروف الإنتاج والحصول على إنتاجية أفضل للانزيم اضيف نوعين من الايونات الثنائية الموجبة إلى وسط الإنتاج وكلا على حدة وأظهرت النتائج الموضحة في الشكل (٨) أن العزلة CR2 أعطت إنتاجية أفضل بإضافة كل من ايونات2Mg+ ،Ca+2 وعند التركيز 0.5% حيث كانت فعالية الأنزيم 6.121 ,6.212 وحدة/مللتر على التوالي ،في الوقت الذي أعطت فيه العزلة CR1 أفضل فعالية للانزيم وباضافة كل من الايونين السابقين عند التركيز0.25% وكانت الفعالية الأنزيمية 5.831 , 5.924 وحدة/مللتر على التوالي، وقد يعزى السبب في زيادة الفعالية إلى عما هذه الايونات

كمرافقات أنزيمية مع الأنزيمات المهمة في عمليات التخليق الحيوي التي تؤدي إلى تحلل المواد السليلوزية وبالتالي زيادة إنتاجية أنزيم السليليز ،في الوقت الذي سبب إضافة التراكيز العالية من الايونات الثنائية إلى تأثير عكسي وتثبيط لنمو البكتريا وبالتالي انخفاض في إنتاجية الأنزيم.

تنقية الأنزيم: يوضح الجدول رقم (١) الخطوات الأساسية لتنقية أنزيم السليليز المنتج من قبل العزلة المحلية CR2 التي تم انتخابها على ضوء النتائج التي تم الحصول عليها بالخطوات السابقة ، واستعملت نخالة الحنطة كمصدر كربوني وحيد في عملية الإنتاج ،كانت فعالية الأنزيم بعد عملية الترسيب بكبريتات الامونيوم والتي هي الخطوة الأولى من خطوات عملية التنقية 4.995 وحدة/مللتر ولعبت كبريتات الامونيوم دورا مهما في عملية تركيز الأنزيم ويأتي ذلك من خلال معادلتها للشحنات الموجودة على سطح البروتين وبطريقة جزيئات الماء المحيطة بجزيئات البروتين مما أدى إلى انخفاض ذائبية البروتين ومن ثم ترسيبه (24) ،والخطوة التالية في عملية التنقية كانت كروموتوغرافيا التبادل الأيوني باستعمال المبادل الايوني DEAE-Sepharose وذلك بعد ديلزة المحلول الإنزيمي المتحصل عله بعد عملية الترسيب السابقة وكانت فعالية الأنزيم بعد عملية التبادل الايوني 3.368 وحدة/مللتر وبعدد مرات تنقية 1.852 وبعد ذلك أجريت الخطوة التالية وهي كروموتوغرافيا الترشيح الهلامي باستعمال العمود Superdex-200 وكانت الفعالية الأنزيمية 4.757 وحدة/مللتر وعدد مرات التنقية 4.109 وبحصيلة أنزيمية نهائية مقدارها 64.11%.

تقدير الوزن ألجزيئي :

قدر الوزن ألجزيئي لأنزيم السليليز بطريقة الترشيح الهلامي باستعمال العمود Superdex-200 من خلال العلاقة بين نسبة حجم الاسترداد الى حجم الفراغ Ve/V0 لوغارتيم الوزن ألجزيئي للبروتينات القياسية المستعملة وكما موضح في طريقة العمل ، أظهرت النتائج أن الوزن ألجزيئي للانزيم كان بحدود ٣٢٠٠٠ دالتون وهذه النتيجة مقاربة لما حصل عليه (10) الذي وجد أن الوزن ألجزيئي للانزيم كان بحدود 31000 دالتون.

توصيف أنزيم السليليز بعد التنقية: درس تأثير كل من الرقم الهيدروجيني ودرجات الحرارة ووقت التفاعل في فعالية الأنزيم المنقى، استعملت محاليل دارئة (Buffers) بأرقام هيدروجينية مختلفة للحصول على الأرقام الهيدروجينية التي درست عندها فعالية الأنزيم وبينت النتائج الموضحة في الشكل (١١) أن أعلى فعالية للانزيم كانت عند الرقم الهيدروجيني 6 حيث كانت فعالية الأنزيم 5.444 وحدة/مللتر وانه كلما زادت قيم الرقم الهيدروجيني عن هذا الرقم تبدأ فعالية الأنزيم بالانخفاض وقد يعزى السبب في انخفاض الفعالية عند قيم الرقم الهيدروجيني القاعدي إلى تأثير مجاميع الأحماض الامينية الموجودة بالموقع الفعال أو جزيئة الأنزيم على الحالة الأيونية للمادة الأساس [24].

أما فيما يتعلق بتعيين درجة الحرارة المثلى لفعالية الأنزيم المنقى فقد درس تأثير درجات الحرارة من20-80 م وعند الرقم الهيدروجيني الامثل للفعالية وهو 6 ولمدة حضن 30 دقيقة وأشارت النتائج الموضحة في الشكل (١٢) حصول زيادة في فعالية الأنزيم مع زيادة درجة الحرارة ولحد 50 م إذ بلغت الفعالية الأنزيمية 5.537 وحدة/مللتر ثم انخفضت لتصل إلى 4.019 وحدة/مللتر عند درجة حرارة80م.يمكن أن يعزى السبب في هذا الانخفاض إلى أن الزيادة في درجة الحرارة قد يؤدي إلى زيادة الحركات الاهتزازية التي تؤثر في التركيب الثالثي للانزيم مما يؤدي إلى مسخ الأنزيم وبالتالي فقدان الجزء الأكبر من فعاليته الأنزيمية [26]. أما عن تأثير وقت التفاعل فقد درس تأثير هذا العامل على فعالية أنزيم السليليز ويوضح الشكل (١٣) أن أعلى فعالية للانزيم كانت بعد60 دقيقة من الحضن مع المادة الأساس وبلغت فعالية الأنزيم 5.723 وحدة/مللتر ثم انخفضت لتصل بعد 150 دقيقة إلى3.825 وحدة/مللتر وقد يعزى السبب في ذلك إلى استهلاك الأنزيم لمادة الأساس المتفاعلة مع الأنزيم.

References

1- Ojumu, Tunde Vicetor; 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 cellulloltic 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 cellulolytic 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

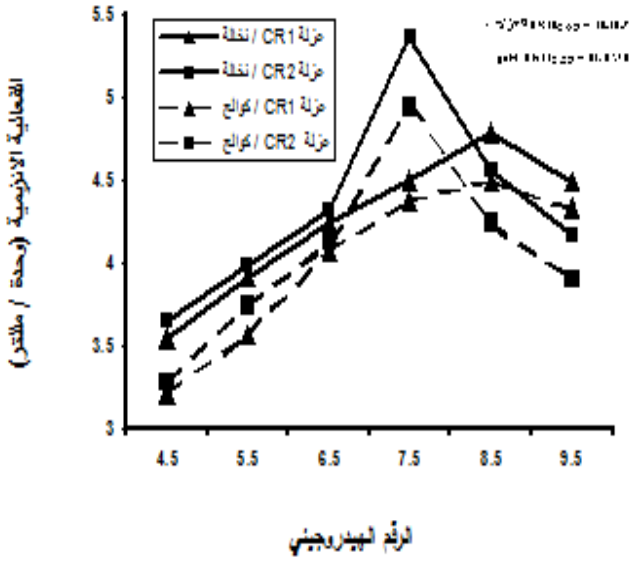
microorganism "(Eds Rainbow. and Rose,A.H.,) Academic press, New York.

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

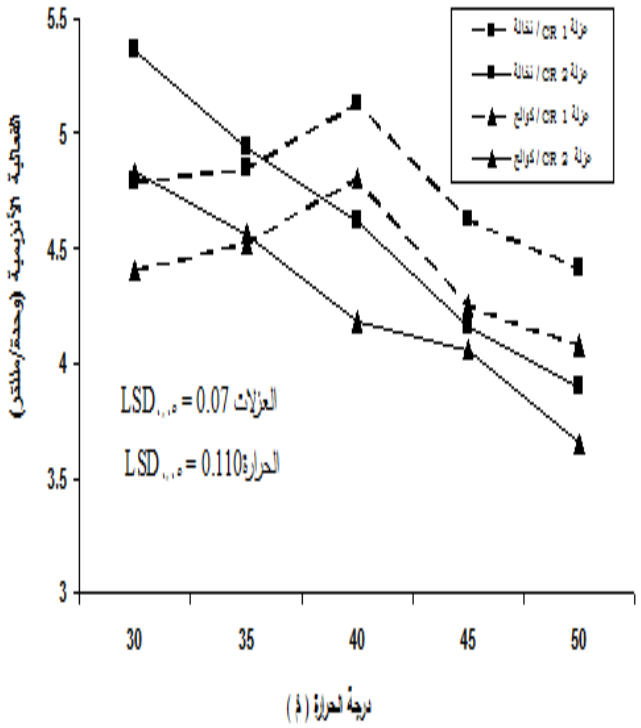
24-Englard, E. M., and Sifters. (1990). Precipitation in: Methods in Enzymology (ed. Murray, E.D. and Dentscher ,P.). 182: 425-441.

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.

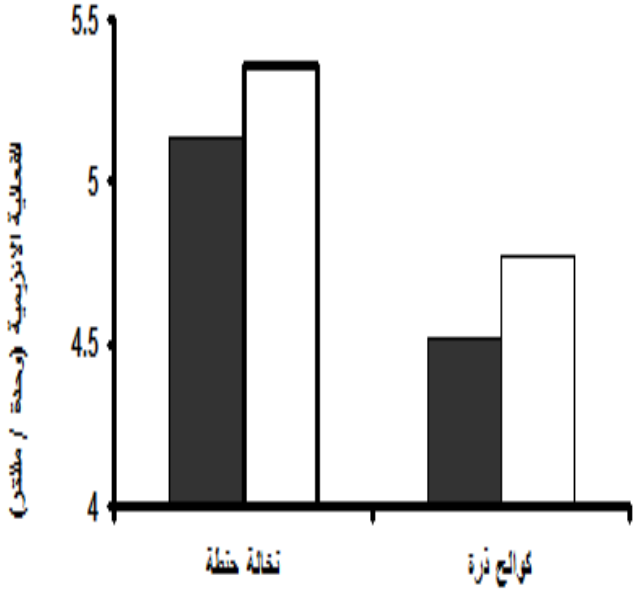
26-Brown, S. H., Sjoholm, C.and Kelly, R.M.(1993). Purification and characterization of a highly thermostable glucose isomerase produced by the extremely thermophillic Eubactrium thermotoga maritime. Biotechnol. Bioeng.41:878-886.



شكل ١. تأثير الرقم الهيدروجيني في إنتاج إنزيم السليليز

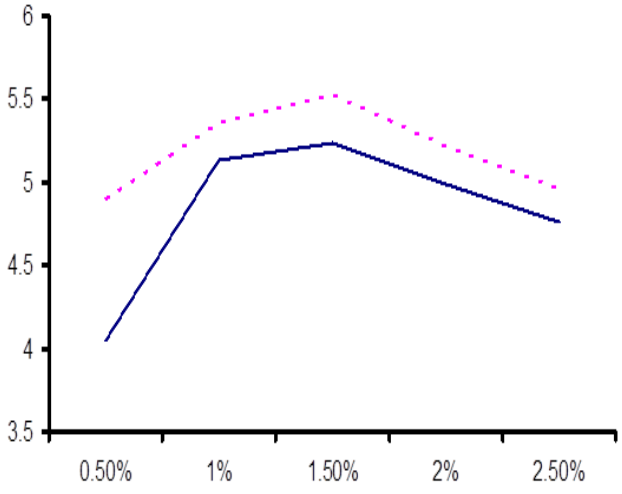


شكل ٢. تأثير درجات الحرارة في إنتاج إنزيم السليليز.

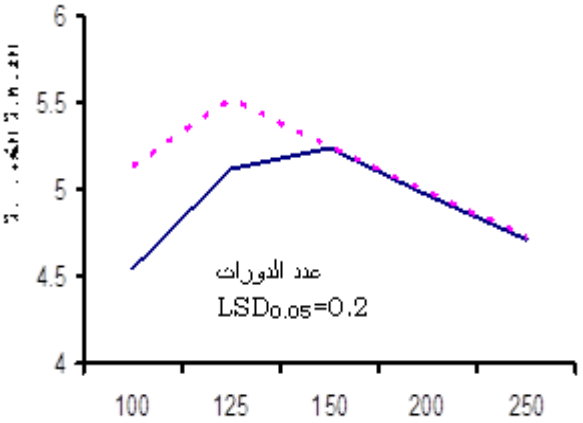


شكل٣. تأثير المصدر الكاربوني في إنتاج أنزيم السليليز من العزلة الأولى والثانية

P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (*JUAPS*) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2007 ,(1), (2) :24-37

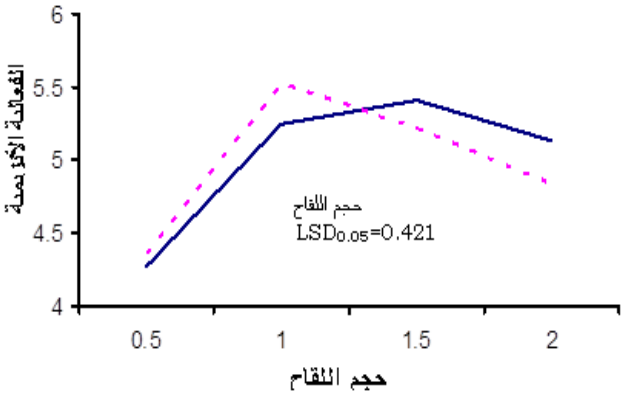


شكل٤. تأثير تركيز المصدر الكاربوني في إنتاج أنزيم السليليز من العزلة الأولى (–) والثانية (– – –) باستخدام نخالة الحنطة كمصدر كاربوني



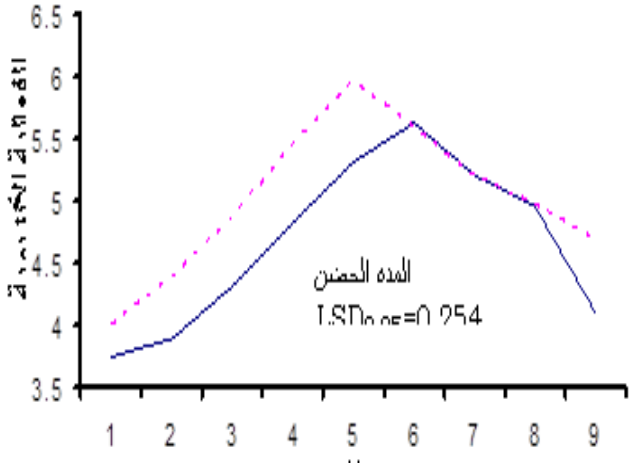
عدد الدورات

شكل٥. تأثير عدد دورات الحاضنة في إنتاج أنزيم السليليز من العزلة الأولى (–) والثانية (– –)

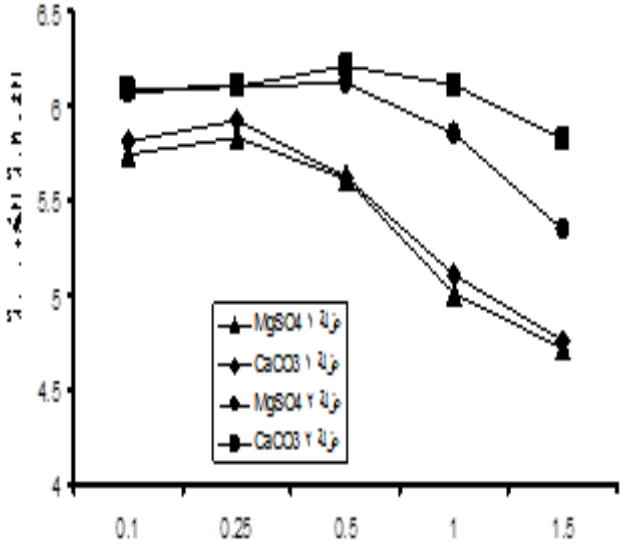


حجم اللقاح

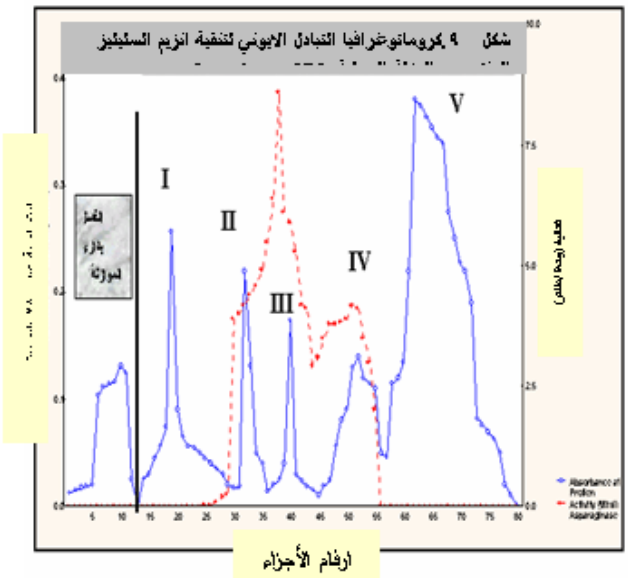
شكل٦. تأثير حجم اللقاح (مللتر) في إنتاج أنزيم السليليز من العزلة الأولى (–) والثانية (– – –)



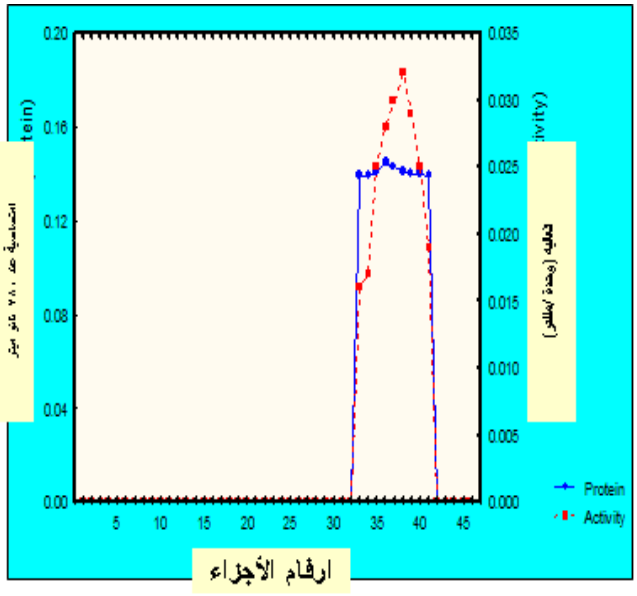
شكل٧. تأثير مدة الحضن (يوم) في إنتاج أنزيم السليليز من العزلة الاولى (–) والثانية (– – –)



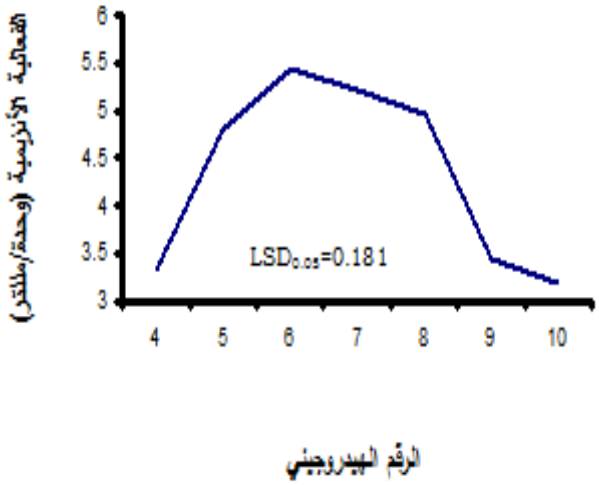
شكل٨. تأثير نوع وتركيز الايونات الثنائية الموجبة في إنتاج أنزيم السليليز بواسطة العزلتين المحليتين.



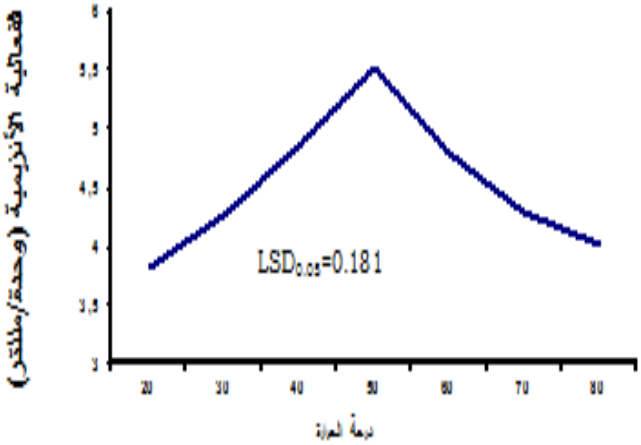
شكل ٩ كروماتوغرافيا التبادل الايوني لتنقية انزيم السليليز



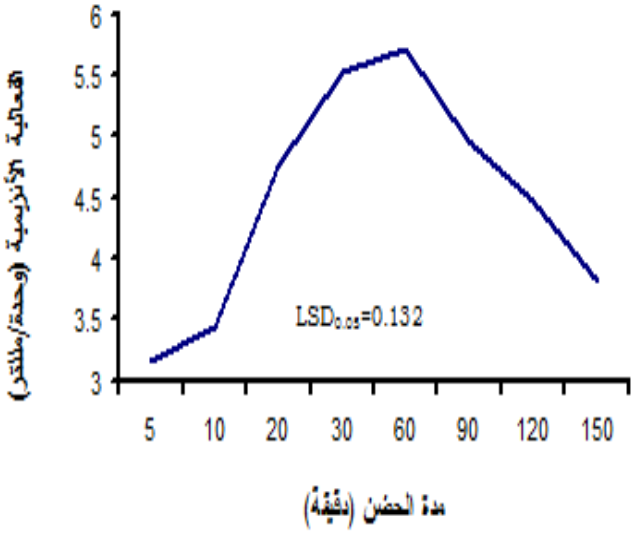
شكل ١٠. كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي لتنقية أنزيم السليليز من العزلة المحلية *Cytophaga* CR2



شكل١١. تأثير الرقم الهيدروجيني في فعالية أنزيم السليليز المنتج من العزلة الثانية.



شكل١٢. تأثير درجة الحرارة في فعالية أنزيم السليليز المنتج من العزلة الثانية.



شكل١٣. تأثير مدة الحضن (دقيقة) في فعالية أنزيم السليليز المنتج من العزلة الثانية.

جدول ١.خطوات تنقية أنزيم السليليز المنتج من العزلة المحلية *Cytophaga* CR2

خطوات التنقية	الحجم (ملتر)	الفعالية الأنزيمية (وحدة/ملتر)	البروتين (ملغم/ملتر)	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

P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (*JUAPS*) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2007 ,(1), (2) :24-37

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.